

Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) *Citrobacter* spp. İzolatlarına Karşı Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Safiye Elif KORCAN¹, Sevim Feyza ERDOĞMUŞ^{2*}, Mine ERİK³, Arzu ÜNAL⁴, Beytullah KENAR⁵

¹Uşak Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Uşak.

²Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Afyonkarahisar.

³Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Uşak.

⁴Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır.

⁵Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Bölümü, Afyonkarahisar.

Sorumlu yazar e-posta*: feyza.erdogmus@afsu.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4319-7558>

elif.korcan@usak.edu.tr

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7875-5516>

mine.erik@hotmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4703-5131>

arzuunal@gmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4427-3169>

bkenar@aku.edu.tr

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6573-680X>

Geliş Tarihi: 26.07.2022

Kabul Tarihi: 25.01.2023

Öz

Bu çalışmanın amacı; *Citrobacter* izolatlarına karşı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini belirlemektir. Bu çalışmada kullanılan *Citrobacter* izolatları (C1, C2, C3) BD Phoenix™ otomasyon sistemi ile *Citrobacter braakii* olarak tanımlanmıştır. Biyofilm oluşumu Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plak metodu kullanılarak incelenmiştir. Antibiyogram test sonuçlarına göre, tüm izolatlar amfisilin ve amoksisilin-klavulanata karşı dirençli bulunmuştur. Antimikrobiyal aktivite test sonuçları laktik asit bakterilerinden elde edilen ekstraktların (*Lactococcus lactis* (L1), *Lactobacillus fermentum* (L2), *Enterococcus faecalis* (L3), *Lactobacillus casei* (L4), *Lactobacillus plantarum* (L5), *Enterococcus faecium* (L6), *Lactobacillus curvatus* (L7), *Enterococcus durans* (L8) *Lactococcus garviae* (L9), *Enterococcus faecalis* (L10)) *Citrobacter braakii* üzerinde antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğinin olduğu saptanmıştır. En yüksek antimikrobiyal etki C2 izolatı üzerinde ve en düşük etki C3 izolatı üzerinde belirlenmiştir. Antibiyofilm test sonuçlarına göre L1, L2, L4, L6, L7, L8 ekstraktlarının en yüksek dozlarının tüm *Citrobacter* izolatlarında biyofilm oluşumunu engellendiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler

Antibiyobiyotik direnci;
Biofilm; *Citrobacter*
spp; Laktik asit
bakterileri.

Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Lactic Acid Bacteria (LAB) Against *Citrobacter* spp. Isolates

Abstract

The aim of this research was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm effects of LABs against *Citrobacter* isolates. In this study, *Citrobacter* isolates (C1, C2, C3) which were identified as *Citrobacter braakii* with the BD Phoenix™ automation system. Biofilm formation investigated by Congo red agar method and microtiter plate method. According to antibiogram test results, all isolates was resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanate. Antimicrobial activity test results revealed that extracts of LABs (*Lactococcus lactis* (L1), *Lactobacillus fermentum* (L2), *Enterococcus faecalis* (L3), *Lactobacillus casei* (L4), *Lactobacillus plantarum* (L5), *Enterococcus faecium* (L6), *Lactobacillus curvatus* (L7), *Enterococcus durans* (L8) *Lactococcus garviae* (L9), *Enterococcus faecalis* (L10)) extracts have an antimicrobial effect on *Citrobacter braakii*. The highest antimicrobial effect determined on C2 isolate and the lowest effect determined on C3. According to antibiofilm test results, it was observed that high doses of L1, L2, L4, L6, L7, L8 extracts inhibited biofilm formation in all *Citrobacter* isolates.

Keywords

Antibiotic resistance,
Biofilm; *Citrobacter*
spp; Lactic acid
bacteria.

1. Giriş

Biyofilm, yüzeye yapışarak üretmiş oldukları polimer yapısında jelimsi bir tabaka içerisinde yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği topluluktur. Bu tabaka sayesinde mikroorganizmalar kendilerini çevresel şartlara karşı korurlar. Bazı mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak antibiyotiklere karşı direnç gösterirler, bu duruma bağlı olarak enfeksiyonların tedavi edilmesi giderek zorlaşır (Percival vd. 2015). Bakterilerin ekzopolisakkarit matrisi içinde kümelenmiş bir biçimde yer alması onların bağışıklık sistemi tarafından fark edilmemelerini sağlar ve fagositoz ile yok edilmeleri zorlaşır. Araştırmalar, biyofilm üretebilen bakterilerin planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha fazla antibiyotiklere karşı dirençli olduklarını göstermiştir. Bu bakteriler biyofilm tabakası içinde ayrıldıklarında tekrar antibiyotiklere karşı duyarlı hale geçebilirler (Donlan ve Costerton 2002, Szczuka ve Kaznowski 2014). Bakterilerde biyofilm oluşumu antibiyotik direncine sebep olarak hastalıkların tedavisini zorlaştırır ve araştırmacılar her yıl yeni antibiyotikler keşfetmek zorunda kalır. Bu durum ilaç sektöründe ekonomik kayıpların artmasına sebep olur (Costerton 1999). Ayrıca, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilmler gıda endüstrisinde de gıdaların bozulması, ekonomik kayıpların oluşması, gıdaların raf ömürlerinin kısılması, gıda kaynaklı hastalıkların artması gibi ciddi problemlere sebep olur (Gün ve Ekinci 2009, Syne vd. 2013, Corcoran vd. 2014, Di Ciccio vd. 2015).

Laktik asit bakterileri (LAB) gıdalardaki başlıca probiyotiklerdir. Bunların çoğu genel olarak güvenli (GRAS) statüsünde yer alan mikroorganizmalardır. LAB'lar pek çok organik asit, diasetil, aseton, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal bileşikler, peptidler ve bakteriyosin üretirler (Magnusson ve Schnürer 2001, Dinçer vd. 2010, Bayram ve Yıldırım 2016, Erdoğan ve Korcan 2017). LAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinler sağlık ve gıda sektöründe alternatif antimikrobiyal ajanlar olarak görülmektedir. *Citrobacter spp.* Enterobacteriaceae familyasının üyesidir (Nada vd. 2004, Bae vd. 2010). Bu türler idrar ve solunum yolu sistemi

enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıklara sebep olur. Ayrıca *Citrobacter* türleri yiyecek ve su yoluyla bulaşan gıda kaynaklı enfeksiyonların da başlıca nedenlerindedir (Doran 1999).

Bu çalışmanın amacı; LAB'ların hayvansal orjinli *Citrobacter spp.* izolatlarına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerini belirlemektir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Çalışma kapsamında kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışma kapsamında kullanılan LAB izolatları daha önce tamamlanan bir proje kapsamında; fermente et ürünlerinden izole edilerek 16S rRNA sekans analizi ile tanımlanmıştır. *Lactococcus lactis* (L1), *Lactobacillus fermentum* (L2), *Enterococcus faecalis* (L3), *Lactobacillus casei* (L4), *Lactobacillus plantarum* (L5), *Enterococcus faecium* (L6), *Lactobacillus curvatus* (L7), *Enterococcus durans* (L8) *Lactococcus garviae* (L9), *Enterococcus faecalis* (L10) olarak tanımlanmıştır (Proje No: AKU-BAP 17. MYO. 07). Hayvansal orjinli *Citrobacter* izolatları ise Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Biyofilm çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778 suşu ticari olarak satın alınmıştır.

2.2. *Citrobacter* izolatlarının antibiyogram testi

Citrobacter izolatları (C1, C2, C3) BDPPhoenix™ otomasyon sistemi kullanılarak tanımlanmış ve antibiyogram testi yapılmıştır.

2.3. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

Citrobacter izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini belirleyebilmek için Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılmıştır. İzolatlar Kongo kırmızı agarlı (beyin-kalp infüzyon broth 37 g /L, sukroz 50 g /L, kongo kırmızısı 0,8 g /L ve agar 10 g /L) besiyerine ekilerek 37 °C'de, 24 saat inkübe edilmiştir (Percival vd. 2015). Kuru, kırmızı, siyah, düzgün ve şeffaf koloniler biyofilm pozitif

olarak değerlendirilirken pembemsi, düz ve merkezi koyu koloniler biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Donlan ve Costerton 2002).

Ayrıca, *Citrobacter* izolatları mikrotitrasyon plak yöntemi için Nutrient Broth (NB) besiyerinde 37 °C'de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodundan sonra, her bir sıvı kültürden 50 µL alınarak 96-kuyucuklu plakaya aktarıldı ve yeniden 37°C, 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından sıvı besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar üç kez distile su ile yıkanmıştır. 150 µL kristal viyole solüsyonu (%0.5 (v / v)) kuyucuklara eklenmiş ve oda ısısında 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kuyucuklar tekrar distile su ile yıkanmış ve ardından 150 µL etanol: asetik asit (95: 5) her bir kuyucuğa eklenerek 10 dakika bekletilmiştir. Kuyucuktan 100 µL alınarak yeni bir kuyucuğa aktarılmış ve absorbans değerleri 570 nm'de spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir (Thermo Multiskan Go). *P. aeruginosa* ATCC 11778 suşu pozitif kontrol olarak ve mikroorganizma ekilmeyen besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm çalışmalar üç kez tekrar edilmiştir (Mah ve O'Toole 2001).

2.4. *Citrobacter spp*'nin hareketlilik (kayma, yüzme ve titreme) testleri

Titreme (twitching) testi Rashid ve Kornberg (2000)'in yöntemi kullanılarak, kayma (swarming) ve yüzme (swimming) testleri ise Deziel vd. (2001)'in yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tüm testler üç kez tekrarlanmıştır. *P. aeruginosa* ATCC 11778 pozitif kontrol olarak ve mikroorganizma ekilmeyen besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.5. LAB'ların ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin değerlendirilmesi

LAB'ların EPS üretimi Marshall ve Rawson (1999)'a göre yapılmıştır. Tüm çalışmalar üç kez tekrarlanmıştır. LAB izolatları NB besiyerinde 37°C, 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra izolatlar 0.5 McFarland bulanıklığına getirilmiştir (yaklaşık 1- 4 x10⁸ kob/mL) ve 5 mL NB besiyerine ekilerek 37°C, 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kültürden 1 mL ependorf tüplere aktarılmış ve

100°C'de, 10-15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. %85 trikloroasetik asit (TCA) %0.17 oranında eklenmiş ve oda ısısında soğutulmuştur, 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınarak eşit oranda etanol eklenmiştir ve 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Süpernatant kısım dökülüp tekrar etanol ilave edilmiştir ve 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş; ardından fenol sülfürik asit yöntemi uygulanmıştır. Peletler 100 µL steril saf suda çözülürerek üzerine 50 µL saf fenol eklenmiştir. Ardından 500 µL sülfürik asit eklenmiş vortekslenerek 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Örneklerin 490 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Sonuçlar glukoz standart eğrisine göre değerlendirilmiştir.

2.6. LAB'ların antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi

LAB izolatları Man Rogasa Sharp (MRS) broth besiyerinde 37°C'de, 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından 8000 rpm'de 10 dakika (+4°C) santrifüjlenmiştir. Elde edilen supernatantlar 0.2 µm por çapında membran filtreden geçirildikten sonra filtratlar antimikrobiyal etkinliğini belirlenmek için agar kuyu difüzyon ve disk difüzyon yöntemlerinde kullanılmıştır (Schillinger ve Luke 1989, Pringsulaka vd. 2002). *Citrobacter* izolatları 0.5 McFarland bulanıklığına getirilmiş bakteriyel süspansiyonlar steril bir swab ile NA besiyerine ekilmiştir. Besiyerine kuyucukların açılması için 6 mm çapında steril agar delici kullanılmıştır. LAB kültür filtratından 100 µL kuyucuklara aktarılmıştır. Agar disk difüzyon yönteminde Mueller Hilton Agar (MHA) kullanılmıştır. Boş antibiyotik disklere 15 µL LAB kültür filtratlarından emdirilmiştir. Petriler 37°C, 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve oluşan zon çapları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. 10 µg amikasin pozitif kontrol ve mikroorganizma ekilmeyen besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm denemeler üçer kez tekrarlanmıştır.

2.7 LAB'ların antibiyofilm etkinliğinin belirlenmesi

LAB'ların antibiyofilm etkinliğini belirleyebilmek için Thenmozhi vd. (2009) yöntemi kullanılmıştır (Gomes vd. 2019). LAB'lar MRS besiyerinde 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir ve 4000 rpm'de santrifüjlenerek membran filtreden geçirilmiştir. Hücre bulunmayan süpernatant iki kez aynı miktar etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. *Citrobacter* izolatları 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş; ardından LAB ekstraktları patojen kültüre eklenerek 37°C'de 24 saat tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodundan sonra sıvı besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklar üç kez distile su ile yıkanmıştır. % 0.5 kristal viyole solüsyonu kuyucuklara dağıtılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiş ardından 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır (Thermo Multiskan Go) (Donlan ve Costerton 2002, Mah and O'Toole 2001). Tüm çalışmalar üç kez tekrarlanmıştır. % inhibisyon değerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$[1 - (\text{Örnek } A_{570} / \text{Kontrol } A_{570})] \times 100.$$

3. Bulgular

Citrobacter izolatları (C1, C2, C3) BDPhoenix™ otomasyon sistemi ile *Citrobacter braakii* olarak tanımlanmış ve antibiyogram sonuçları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Antibiyogram test sonuçlarına göre tüm izolatlar ampisilin ve amoksisilin-klavulanat antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur. En yüksek

antibiyotik direnci C2 izolatında saptanmıştır. Bu izolat, amoksisilin-klavulanat, ampisilin, sefepim, seftriakson, sefuroksim, ertapenem antibiyotiklerine dirençli, gentamisin, imipenem, meropenem, netilmisin, piperasilin, piperosilin-tazobaktam, tigesiklin, trimetoprim-sülfametaksazol, amikasin, aztreonom, seftazidim, siprofloksasin antibiyotiklerine karşı duyarlılık göstermiştir.

Citrobacter braakii izolatlarının hepsinin biyofilm oluşturabildikleri kongo kırmızı agar ve mikrotitrasyon plak yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 2). Kritik optik yoğunluk (dansite) değerine göre (ODc) biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Biyofilm oluşturmayanlar [(-), OD ≤ ODc], düşük seviyede biyofilm oluşturanlar [(+), ODc < OD ≤ 2 x ODc], orta derecede biyofilm oluşturanlar [(++), 2 x ODc < OD ≤ 4 x ODc], güçlü biyofilm oluşturanlar [(+++), OD > 4 x ODc] olarak değerlendirilmiştir (Gomes vd. 2009). C1 ve C3 izolatları güçlü biyofilm oluşturan olarak ve C2 izolatı orta derecede biyofilm oluşturan izolat olarak değerlendirilmiştir. Hareketlilik test sonuçları tüm *Citrobacter* izolatlarının yüzebildiğini, kayabildiğini ve titreme hareketi yapabildiğini göstermiştir (Çizelge 2).

Çizelge 1. *Citrobacter* izolatlarının antibiyogram testi sonuçları

Antibiyotikler	Test Mikroorganizmaları					
	C 1		C2		C3	
	MİK		MİK		MİK	
Amikasin	<=4	S	<=4	S	<=4	S
Amoksisilin-klavulanat	>32/2	R	>32/2	R	>32/2	R
Ampisilin	>8	R	>8	R	>8	R
Aztreonam	<=1	S	<=1	S	<=1	S
Sefepim	<=1	S	>8	R	<=1	S
Seftazidim	<=0.5	S	<=0.5	S	<=0.5	S
Seftriakson	<=0.5	S	>4	R	<=0.5	S
Sefuroksim	4	S	4	R	4	S
Siprofloksasin	<=0.125	S	<=0.125	S	<=0.125	S
Kolistin	<=1	S	<=1	S	<=1	X
Ertapenem	<=0.25	S	>1	R	<=0.25	S
Gentamisin	<=1	S	<=1	S	<=1	S
İmipenem	1	S	2	S	1	S
Meropenem	<=0.125	S	0.5	S	<=0.125	S
Netilmisin	1	S	2	S	1	S
Piperasilin	<=4	S	<=4	S	<=4	S
Piperasilin- tazobaktam	<=4/4	S	<=4/4	S	<=4/4	S
Tigesiklin	1	S	1	S	1	S
Trimetoprim-sülfametaksazol	<=1/19	S	<=1/19	S	<=1/19	S

MİK (Minimum inhibisyon konsantrasyonu; S (duyarlı), I (ılımlı), R (dirençli).

Çizelge 2. *Citrobacter* izolatlarının hareketlilik ve biyofilm oluşumu testi sonuçları

Test Mikroorganizmaları	Hareket (mm)			Biyofilm Oluşumu	
	Kayma	Yüzme	Titreme	OD±SS	
C1	6	8	10	0,818 (±0,52)	+++
C2	9	7	9	0,681(±0,35)	++
C3	13	8	11	1,068 (±0,58)	+++
PK	9	8	10	1,285 (±0,12)	+++
NK	-	-	-	0,204 (±0,22)	-

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, OD: Optik dansite; SS: Standard sapma; (+) düşük biyofilm oluşumu, (++) orta derecede biyofilm oluşumu, (+++) güçlü biyofilm oluşumu, (-) biyofilm oluşumu yok

LAB izolatlarının EPS üretim miktarları Çizelge 3'te gösterilmiştir. En yüksek EPS üretimi L3 izolatında 42.32 ± 2.15 mg/mL ve en düşük EPS üretimi ise L7 izolatında 3.85 ± 0.28 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3. LAB izolatlarının ekzopolisakkarit üretimi

LAB izolatları	EPS miktarı (mg/mL)±SS
L1 (<i>Lactococcus lactis</i>)	30.44±1.25
L2 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	33.50±0.75
L3 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	42.32±2.15
L4 (<i>Lactobacillus casei</i>)	27.35±1.00
L5 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	35.75±1.75
L6 (<i>Enterococcus faecium</i>)	15.60±1.15
L7 (<i>Lactobacillus curvatus</i>)	3.85±0.28
L8 (<i>Enterococcus durans</i>)	4.25±0.20
L9 (<i>Lactococcus garviae</i>)	7.44±0.55
L10 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	6.15±0.78

SS: Standard sapma

Agar disk difüzyon ve agar kuyu difüzyon testi sonuçlarına göre LAB ekstraktları *Citrobacter* izolatları üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir (Çizelge 4). Amoksilin-klavulanat, ampicilin, sefepim, seftriakson, sefuroksim, ertapenem antibiyotiklerine dirençli olarak belirlenen C2 izolatının LAB ekstraktlarına karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. LAB ekstraktları C3 izolatı üzerinde ise düşük antimikrobiyal etkinlik göstermiştir.

Çizelge 4. Patojen test mikroorganizmalarına karşı LAB ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi.

Test Mikroorganizmaları	Agar disk difüzyon testi sonuçları (mm) ±SS											
	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6	L 7	L 8	L 9	L 10	NK	PK
C1	9±0.7	10±1.2	12±1.1	12±1.0	11±0.7	9±0.5	-	-	-	9±1.2	-	15±0.3
C2	9±0.8	10±0.9	13±0.8	11±1.2	12±1.1	13±1.1	8±0.2	11±1.5	10±0.5	12±1.0	-	14±1.5
C3	10±0.5	8±0.2	9±1.0	8±0.1	-	-	-	-	-	9±0.4	-	15±1.7
Agar kuyu difüzyon testi sonuçları (mm)												
C1	13±0.5	9±0.5	12±1.3	10±1.2	11±0.8	9±1.2	14±0.5	13±1.0	10±0.0	12±1.2	-	15±1.5
C2	10±0.7	13±1.1	11±1.5	13±0.8	12±0.7	16±1.5	19±1.3	20±1.4	11±0.5	10±0.5	-	15±1.2
C3	9±0.4	12±1.2	11±0.9	12±1.4	-	11±0.9	12±1.0	-	-	9±0.4	-	16±1.0

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, SS: Standard sapma

LAB ekstraktlarının *Citrobacter* izolatları üzerindeki antibiyofilm etkisi Çizelge 5'te gösterilmiştir. *Lactococcus lactis* (L1), *Lactobacillus fermentum* (L2), *Lactobacillus casei* (L4), *Enterococcus faecium* (L6), *Lactobacillus curvatus* (L7), *Enterococcus durans* (L8) izolatlarının 1:1 konsantrasyonlarının

tüm *Citrobacter* izolatlarında biyofilm oluşumunu en az %2,93 ve en çok %83,86 oranında engellediği belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* (L5) izolatından elde edilen 1:1 konsantrasyonundaki ekstraktın en yüksek antibiyotik direncine sahip olan C1 izolatının biyofilm oluşturmasını %83,86

oranında inhibe edebildiği saptanmıştır. *Enterococcus faecalis* (L3), *Lactobacillus plantarum* (L5), *Lactococcus garviae* (L9), *Enterococcus faecalis* (L10) izolatlarında elde edilen ekstraktların C2 izolatının biyofilm oluşumunu engellemedikleri belirlenmiştir. Ayrıca, *Lactococcus garviae* (L9),

Enterococcus faecalis (L10) ekstraktları C3 izolatının biyofilm oluşumunu engellemediği belirlenmiştir.

Çizelge 5. LAB ekstraktlarının *Citrobacter* biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkisi

LAB Ekstrakt Konsantrasyonu	% İnhibisyon			LAB Ekstrakt Konsantrasyonu	% İnhibisyon		
	C1	C2	C3		C1	C2	C3
<i>Lactococcus lactis</i> (L1)				<i>Enterococcus faecium</i> (L6)			
1/1	80,92	8,51	37,64	1/1	81,5	10,86	17,79
1/2	73,10	-	24,16	1/2	80,81	-	9,83
1/4	66,62	-	3,27	1/4	80,26	-	-
1/8	43,76	-	-	1/8	71,77	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> (L2)				<i>Lactobacillus curvatus</i> (L7)			
1/1	52,81	2,93	68,18	1/1	75,67	17,03	42,16
1/2	-	-	36,24	1/2	28,23	-	34,83
1/4	-	-	-	1/4	21,02	-	-
1/8	-	-	-	1/8	17,60	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (L3)				<i>Enterococcus durans</i> (L8)			
1/1	82,15	-	26,87	1/1	61,98	18,51	3,93
1/2	81,41	-	5,96	1/2	53,54	8,68	-
1/4	81,05	-	-	1/4	-	-	-
1/8	75,55	-	-	1/8	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> (L4)				<i>Lactococcus garviae</i> (L9)			
1/1	69,43	17,62	15,23	1/1	70,90	-	-
1/2	57,09	-	7,49	1/2	65,64	-	-
1/4	-	-	-	1/4	53,17	-	-
1/8	-	-	-	1/8	43,88	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> (L5)				<i>Enterococcus faecalis</i> (L10)			
1/1	83,86	-	25,84	1/1	73,82	-	-
1/2	74,57	-	-	1/2	46,21	-	-
1/4	50,73	-	-	1/4	19,43	-	-
1/8	30,31	-	-	1/8	11,85	-	-

(-) inhibisyon yok

4. Tartışma ve Sonuç

Citrobacter spp. türleri gıda kaynaklı hastalıkların başlıca etmenleri arasındadır (Tassew vd. 2010, Ifeadike vd. 2012, Settanni vd. 2013). Pek çok çalışmada *Citrobacter* spp. 'lerin antibiyotiklere karşı dirençli oldukları gösterilmiştir. Priyadarshini ve Ramaswamy (2016) yapmış oldukları bir çalışmada; *Citrobacter* türlerinin %79 sefaleksine, %70 sefoksit, %70 siproflaksine ve %69 seftazidime karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada *Citrobacter* türlerinin antibiyotik dirençlilik profili araştırılmıştır (Liu vd. 2017). Çalışmada kullanılan

tüm izolatların sefoksitin'e karşı dirençli ve imipenem, meropenem ve amikasin antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bu türlerin sefoksitine karşı dirençli oldukları imipenem, meropenem ve amikasine karşı ise duyarlı oldukları saptanmıştır. Bu çalışmada, üç *Citrobacter* izolatı (C1, C2, C3) BD Phoenix™ otomasyon sistemi kullanılarak *Citrobacter braakii* olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatların ampiciline ve amoksilin-kavulanata karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. En yüksek antibiyotik direncini C2 izolatı göstermiştir.

Mikroorganizmalarda biyofilm oluşumu antibiyotik direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Biyofilm oluşumu bu bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Uludağ Altun ve Şener 2008, Aydemir Hançer 2018).

Son yıllarda araştırmacılar bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen maddelerin biyofilm oluşumunu engelleyebileceğini ortaya koymuşlardır (Subramanian vd. 2012, Pasteris vd. 2014, Rybalchenko vd. 2015, Dixon vd. 2018). Probiyotik özellikte olan LAB'lar çeşitli antimikrobiyal maddeler üretmektedir ve bu maddeler patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. LAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinler patojen mikroorganizmalara karşı doğal koruyucudurlar (Carminati vd. 2010). Yapılan araştırmalarda, bakteriyosinlerin patojen mikroorganizmalara karşı etkili olduğu ve gıdaları koruma amaçlı kullanılabilir oldukları gösterilmiştir (Tamime 2006). Bakteriyosinlerin gıda koruyucuları olarak kullanılmalarının asıl nedenleri; onların genel olarak güvenli bulunmaları, ökaryotik hücreler üzerinde aktivite göstermemeleri ve toksik olmamaları, pH ve sıcaklığı tolere edebilir olmaları ve mikroorganizmalara karşı etkili olmalarıdır (Galvez vd. 2007, Srinivasan vd. 2013). Rybalchenko vd. (2015) *Lactobacillus fermentum* suşunun stafilkoklar, *Candida albicans* ve enterotoksijenik enterobakteriler üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. *L. fermentum* 97'nin farklı gram pozitif ve gram negatif fırsatçı patojen bakterilerde biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Rybalchenko vd. 2015). Başka bir çalışmada ise Srinivasan vd. (2012), *Lactobacillus rhamnosus* suşundan bakteriyosin izole etmişlerdir ve bu bakteriyosinin gıda kaynaklı patojenler, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Pasteris vd. (2011), *Lactococcus lactis* CRL 1584 izolatının *Citrobacter freundii* üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *L. lactis* CRL 1584 supernatantlarının *Citrobacter freundii* patojeni üzerinde inhibe edici etkisi olduğunu göstermişlerdir. Başka bir çalışmada (Bendjedou vd. 2012), *Lactobacillus paracasei* tarafından üretilen bakteriyosinin 32 patojen suş üzerinde

antibakteriyel etkisi olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışma sonuçlarımız; L1, L2, L4, L6, L7, L8 izolatlarından elde edilen ekstraktların 1:1 konsantrasyonlarının tüm patojen test mikroorganizmalarında biyofilm oluşumunu engellediği belirlenmiştir. LAB ekstraktlarının seyreltme oranları arttıkça antibiyofilm etkinliklerinin azaldığı saptanmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada LAB'ların EPS üretim kapasiteleri araştırılmıştır. EPS üretimi, bakterileri fagositoz, antibiyotik ve osmatik basınca karşı koruyucu bir etki oluşturur (Cerning 1990). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, LAB'lar tarafından EPS üretilmediği açığa çıkarmıştır. Tallon vd. (2013) mısır bitkisinden izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* EP56 izolatının 0.114 mg/mL EPS ürettiğini belirlemişlerdir (Tallon vd. 2013). Başka bir çalışmada ise Looijesteijn vd. (2001) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ4010. İzolatı tarafından üretilen EPS'nin bakteriyofaj, metal iyonları ve antimikrobiyal ajanlara karşı koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda LAB izolatlarının farklı oranlarda EPS üretimi yaptıkları belirlenmiştir. En fazla EPS üretimi L3 izolatında ve en düşük EPS üretimi ise L7 izolatında saptanmıştır. LAB izolatları tarafından üretilen EPS miktarı arttıkça LAB'ların adhezyon kapasitelerinin de artabileceği ve bu durumun onların daha iyi kolinize olmalarına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür (Looijesteijn vd. 2001).

Sonuç olarak; bu çalışma ile LAB ekstraktlarının [*Lactococcus lactis* (L1), *Lactobacillus fermentum* (L2), *Enterococcus faecalis* (L3), *Lactobacillus casei* (L4), *Lactobacillus plantarum* (L5), *Enterococcus faecium* (L6), *Lactobacillus curvatus* (L7), *Enterococcus durans* (L8) *Lactococcus garviae* (L9), *Enterococcus faecalis* (L10)] hayvansal orjinli *Citrobacter braakii* (C1, C2, C3) izolatları üzerinde antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğinin olduğu belirlenmiştir. LAB'lardan elde edilen antimikrobiyal etkili maddeler antibiyotikler için alternatif olarak *Citrobacter spp.* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilir. İleride yapılacak olan çalışmalar LAB'lardan antimikrobiyal etkili maddelerin izole edilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

yapılması üzerine olmalıdır. Bu sayede, antibiyofilm etkinliği yüksek olan LAB'lardan elde edilen bu maddeler gıda ve sağlık sektöründe kullanılabilir ve biyoteknolojik çalışmalar ile geliştirilebilir.

5. Kaynaklar

- Aydemir-Hançer, D., 2018. The biological significance of bacterial biofilms and effective control strategies. *Turkish Journal of Life Sciences*, **3(1)**, 218-230.
- Bae, I.K., Park, I., Lee, J.J., Sun, H.I., Park, K.S., Lee, J.E., 2010. Novel variants of the *qnrB* gene, *qnrB22* and *qnrB23*, in *Citrobacter werkmanii* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 3068-3069.
- Bayram, M. and Yıldırım, Z., 2016. Isolation of bacteriocin producing bacterium (*Enterococcus faecium*) from white cheese and characterization of its bacteriocin. *Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research*, **13**, 103-115.
- Bendjedou, K., Fons, M., Strocker, P., Sadoun, D., 2012. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK2005, an intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28 (4)**, 1543-1552.
- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J., 2010. Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. *Biotechnology of lactic acid bacteria novel applications* edited by Fernanda Mozzi, Raul R. Raya and Graciela M. Vignolo Blackwell Publishing, 177-192.
- Cerning J., 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**, 113-130.
- Ciccio, P., Vergara, Di A., Festino, A.R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini S., Lanieri, A., 2015. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, **50**, 930-936.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican, M., 2014. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Applied and Environmental Microbiology*, **80(4)**, 1507-1514.
- Costerton, J.W., 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **11**, 217-221.
- Deziel, E., Comeau, Y., Villemur, R., 2001. Initiation of biofilm formation by *P. aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology*, **183**, 1195-1204.
- Dinçer, E., Kivanç, M., Karaca, H., 2010. Lactic acid bacteria as biopreservative and bacteriocins. *Journal of Food*, **35 (1)**, 1-8.
- Dixon, M., Flint, S., Palmer, J., Love, R., Biggs, P., Beuger, A., 2018. Analysis of culturable and non-culturable bacteria and their potential to form biofilms in a primary treated dairy wastewater system. *Environmental Technology*, **39**, 17.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**, 167-193.
- Doran, T.I., 1999. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review. *Clinical Infectious Disease*, **28**, 384-394.
- Erdoğan, S.F. and Korcan, S.E., 2017. Researches on Science and Art in 21 st Century Turkey, Chapter: Investigations of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, **1**, 1497-1503.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Omar, N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, **120**, 51-70.
- Gomes, F., Martins, N., Ferreira, I.C.F.R., Henriques, M., 2019. Anti-biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Heliyon*, **5(5)**, e01728.
- Gün, İ. and Ekinçi, F.Y., 2009. Biofilms: microbial life of surfaces. *Journal of Food*, **34 (3)**, 165-173.
- Ifeadike, C.O. Ironkwe, O.C. Adogun, P.O. Nnebue, C.C. Emelumadu, O.F. Nwabueze, S.A., 2012. Prevalence and pattern of bacteria and intestinal parasites

- among food handlers in the Federal Capital Territory of Nigeria. *Nigerian Medical Journal*, **53**, 166-171.
- Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Xu, J., 2017. Antimicrobial resistance and cytotoxicity of *Citrobacter spp.* in Maanshan Anhui province, China. *Frontiers Microbiology*, **8**, 1357.
- Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E, Abee T and Hugenholtz J., 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, **64 (1-2)**, 71-80.
- Magnusson, J. and Schnürer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1-5.
- Mah, T.F.C. and O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, **9**, 34-39.
- Marshall, V.M. and Rawson, H.L., 1999. Effects of exopolysaccharide producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 137-143.
- Nada, T., Baba, H., Kawamura, K., Ohkura, T., Torii, K., Ohta, M., 2004. A small outbreak of third generation cephem-resistant *Citrobacter freundii* infection on a surgical ward. *Japanese Journal of Infection Disease*, **57**, 181-182.
- Pasteris, S.E., Guidoli, M.G., Otero, M.C., Bühler, M.I., Nader-Macías, E.M., 2011. In vitro inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. *Veterinary Microbiology*, **151(3)**, 336-344.
- Percival, S.L., Suleman Vuotto, L., C. Donelli, G., 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of Medical Microbiology*, **64**, 323-334.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A., 2012. Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish. *Food Control*, **23**, 547-551.
- Priyadarshini Rani, K.L. and Ramaswamy, R., 2016. Isolation and antibiotic sensitivity pattern of *Citrobacter* species with ESBL and AmpC detection at tertiary care hospital, Bangalore. *Journal of Evolution Medical and Dental Science*, **5(30)**, 1553-1556.
- Rashid, M.H. and Kornberg, A., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 4885-4890.
- Rybalchenko, O.V., Bondarenko, V.M., Orlova, O.G., Markov, A.G., Amasheh, S., 2015. Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation. *Archives of Microbiology*, **197 (8)**, 1027-1032.
- Schillinger, U. and Luke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **55(8)**, 1901-1906.
- Settanni, L., Miceli A., Francesca, N., Cruciata, M., Moschetti, G., 2013. Microbiological investigation of *Raphanus sativus* L. grown hydroponically in nutrient solutions contaminated with spoilage and pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **160**, 344-352.
- Srinivasan, R., Kumawat, D.K., Kumar, S., Kumar Saxena, A., 2013. Purification and characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* L34. *Annals of Microbiology*, **63(1)**, 387-392.
- Subramanian, P., Umadevi, S., Kumar, S., Stephen, S., 2012. Determination of correlation between biofilm and extended spectrum β lactamases producers of Enterobacteriaceae. *Scholars Research Journal*, **2(1)**, 2-6.
- Syne, S., Ramsbhag, A., Adesiyun, A., 2013. Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection Ecology and Epidemiology*, **19**, 3.
- Szczuka, E. and Kaznowski, A., 2014. Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm, *Folia Microbiology*, **59**, 283-288.

Tamime, A.Y., Skriver, A., Nilsson, L.E., 2006. Starter cultures. *Fermented Milks*, **2**, 11-52.

Tassew, H., Abdissa, A., Beyene, G., Gebre-Selassie, S., 2010. Microbial flora and food borne pathogens on minced meat and their susceptibility to antimicrobial agents. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, **20**, 137-143.

Tallon, R, Bressollier P. and Urdaci M.C., 2013. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, **154(10)**, 705-712.

Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J., Karutha Pandian, S., 2009. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, **57**, 284-294.

Uludağ Altun, H. and Şener, B., 2008. Biofilm infections and antimicrobial resistance. *Hacettepe Medical Journal*, **39**, 82-88.