

Göz Yüzeyinden Elde Edilen Bakterilerin Oluşturduğu Biyofilme Karşı Probiyotik Bakterilerin Hücresiz Filtratlarının Antibiyofilm Etkilerinin Araştırılması

Investigation Of The Antibiofilm Effects Of Cell-free Supernatants Of Probiotic Bacteria Against The Biofilm Formed By Bacteria Obtained From The Ocular Surface

Sertaç Argun KIVANÇ¹ , Berna AKOVA¹ , Merih KIVANÇ^{2*} 

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye
² Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye



ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı probiyotik laktik asit bakterilerine ait hücresiz filtratların göz yüzeyinden izole edilmiş olan *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Staphylococcus epidermidis*'in ürettikleri biyofilm üzerine antibiyofilm aktivitesinin araştırılmasıdır.

Materyal-Metot: Laktik asit bakterileri olarak *Lactobacillus rhamnosus* 1743, *Lactobacillus plantarum*1771, *Lactobacillus rhamnosus* 3111, *L. rhamnosus* KA1 ve *L. rhamnosus* 1724 kullanıldı. Kullanılmadan önce hem laktik asit bakterilerinin hem test bakterilerinin saflıkları kontrol edildi. Laktik asit bakterileri hücresiz filtratları 22µm'lik filtreden geçirildi. Hücresiz filtratın antibiyofilm etkisi için TSB ortamında kültüre edilen test bakterileri kuyucuklara dağıtıldı. Kuyucuklar yıkandıktan sonra 570 nm'de spektrofotometrik olarak optik yoğunluğa göre biyofilm oluşumu değerlendirildi.

Bulgular: Laktik asit bakterilerinden elde edilen hücresiz filtratların farklı test bakterilerinde farklı oranlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlemlendi. *L. rhamnosus* KA1'in hücresiz filtratı test edilen tüm bakterilerin biyofilmlerini ortalama en fazla azaltan filtrattı. Laktik asit bakterilerinin filtratlarının biyofilmi en çok azalttıkları test bakterisi *P. stutzeri* 23 CZPX olarak tespit edildi.

Sonuç: Probiyotik laktik asit bakterilerinden elde edilen hücresiz filtratlar bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin önlenmesinde yardımcı olabilir. Farklı LAB hücresiz filtratlarının farklı test bakterilerinin oluşturduğu biyofilme etkileri değişebilmektedir. Geniş spektrumlu bir LAB hücresiz filtratın tespiti ve etkinliği için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Hücresiz filtrat, laktik asit bakterisi, probiyotik, biyofilm, parabiyoetik

Alınış / Received: 30.07.2022 Kabul / Accepted: 21.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the antibiofilm activity of the acellular filtrates of probiotic lactic acid bacteria on the biofilm produced by *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Staphylococcus epidermidis*, isolated from the ocular surface.

Material-Method: *Lactobacillus rhamnosus* 1743, *Lactobacillus plantarum*1771, *Lactobacillus rhamnosus* 3111, *L. rhamnosus* KA1 and *L. rhamnosus* 1724 were used as lactic acid bacteria. The purity of both lactic acid bacteria and pathogenic test bacteria was checked before use. Cell-free supernatant of lactic acid bacteria were passed through a 22µm filter. For the antibiofilm effect of the acellular filtrate, test pathogenic bacteria cultured in TSB medium were dispersed into the wells. After washing the wells, biofilm formation was evaluated spectrophotometrically at 570 nm according to optical density.

Results: It was observed that acellular filtrates obtained from lactic acid bacteria inhibited biofilm formation at different rates in different test bacteria. The *L. rhamnosus* KA1 acellular filtrate was the filtrate that reduced the biofilms of all tested bacteria at most. It was also determined that the filtrates of lactic acid bacteria reduced the biofilm of *P. stutzeri* CZPX 23 at most.

Conclusion: Cell-free supernatants obtained from probiotic lactic acid bacteria can help prevent biofilms formed by bacteria. The effects of acellular filtrates of different lactic acid bacteria on the biofilm formed by different test bacteria may vary. Further studies are needed for the detection and efficacy of a broad-spectrum lactic acid bacteria acellular filtrates.

Keywords: Cell-free supernatant, lactic acid bacteria, probiotic, biofilm, parabiotic



1. Giriş

Biyofilm “bir alt tabakaya veya ara yüze ya da birbirlerine geri dönüşümsüz olarak bağlanan, sahip oldukları hücre dışı polimerik maddelerden oluşan bir matris içine gömülmüş hücrelerle karakterize edilen sabit bir mikrobiyal topluluk” olarak tanımlanmaktadır [1,2]. Biyofilmler mikroorganizmaların oluşturduğu bir savunma şeklidir. Bulaşıcı hastalıkların yaklaşık %65'inin biyofilmle ilgili enfeksiyonlar olduğu belirlenmiştir [3]. Biyofilm ve biyofilmle ilişkili enfeksiyonların varlığı göz hastalıklarında da gözlenmektedir. Göz içi lensler, kontakt lensler, sütür materyali, kapak implantları, soket implantları, orbita implantları ve skleral serklaj materyalleri, punktum tıkaçları ve sert ve yumuşak kontakt lensler üzerinde oküler bakterilerin biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durum iyileşme konusunda sorunlara neden olmaktadır [2,4,5].

Biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olan bakteriler arasında *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis* yer almaktadır [2,6,7]. Biyofilm oluşturan bir başka ajan olan *Listeria monocytogenes* de konjonktivit, keratit, sklerokeratit, endoftalmi ve akut koryoretinite neden olmaktadır [8,9].

Bakterilerin, hızla antibiyotiklere direnç kazanması ve biyofilm oluşturması nedeniyle mikroorganizmaları kontrol altına almak için farklı stratejiler geliştirilmiştir; bu stratejilerin arasında laktik asit bakterilerinin kullanımı da yer alır. Laktik asit bakterilerinin (LAB) antibiyofilm etkileri gösterilmiştir [10,11]. Laktik asit bakterileri oluşturdukları antimikrobiyal bileşikler, bakteriyosinler, bakteriyosin benzeri maddeler, hidrojen peroksit, laktik asit gibi maddeler nedeniyle mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite gösterdiği düşünülmektedir [12-18].

Bu çalışmada probiyotik laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarının *L. monocytogenes*, *P. putida*, *P. sututzeri*, *S. maltophilia*, *S. epidermidis* biyofilmi üzerine antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bakteriler

Probiyotik laktik asit bakterileri (LAB) *Lactobacillus rhamnosus* 1743, *Lactobacillus plantarum* 1771, *Lactobacillus rhamnosus* 3111, *Lactobacillus rhamnosus* KA1, *Lactobacillus rhamnosus* 1724, ve test bakterileri daha önce yapılan çalışmalarda göz yüzeyinden izole edilen ve stoklanan *Pseudomonas stutzeri* CZPX 23, *Pseudomonas putida* CZPX 25-1, *Listeria monocytogenes* PCA 47, *Stenotrophomonas maltophilia* 25-1A, *S.epidermidis* PCA 4-1 Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji biriminden sağlanarak kullanılmıştır. Stoktan çıkarılan LAB Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) brotha ekilerek 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra MRS agara ekilerek aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloni özellikleri incelenerek ve Gram boyama yapılarak morfolojik özellikleri incelenerek saflıkları kontrol edilmiştir. Test bakterileri ise beyin kalp infüzyon (BHI) brothta ekilerek 37°C de 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiş daha sonra BHI agara ekilerek 35°C de 24 saat inkübe edilmiş ve kültürler Gram boyama yapılarak mikroskopik olarak saflıkları kontrol edildikten sonra kullanılmıştır.

Test bakterilerinin biyofilm aktivitesi mikrotitrasyon plaklarında Stepanovic ve arkadaşlarının belirttikleri yöntemle göre belirlenmiştir [19].

Hücresiz Filtratın Hazırlanması

Laktik asit bakterileri MRS brotha ekilerek 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra kültürler 15dk +4 derecede 10000 rpm de santrifüj edilerek üst kısımdaki filtratların pH'sı 5.5 'a ayarlanmıştır. Her bir hücresiz filtrat 22µm'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

Hücresiz Filtratların Antibakteriyel ve Antibiyofilm Aktivitesi

Hücresiz filtratların antibakteriyel aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları BHI broth içerisinde 35°C'de 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir. Steril Petri plaklarına aktif test mikroorganizmalarından 10⁶ kob/mL olacak şekilde aktararak üzerlerine 20 ml 45 °C'ye kadar soğutulmuş nutrient agar besiyeri konularak karıştırılmış ve agar donduktan sonra agarda 0,8 cm çapında steril mantar delici ile çukurlar açılmıştır. Daha sonra çukurların dipleri ince bir agar tabakası ile kaplanmıştır. Her kuyucuğa 80 µl hücresiz filtratı aktararak 37°C'de 24 saat inkübe edilerek değerlendirilmiştir [20].

Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratının antibiyofilm aktivitesi için test bakterileri TSB içerisine ekilerek 18 saat 35°C'de inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden 10 µL (10⁸ kob/ml) çok kuyucuklu ELISA plağının kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerine %2 glikoz içeren 140 µL TSB aktarıldı. Daha sonra 50 µL laktik asit bakterilerinin filtratlarından ilave edildi ve 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Bir grup kuyucuğu da kontrol olarak test bakterileri ve TSB eklendi. İnkübasyondan sonra, plakalar boşaltıldı ve her bir kuyucuk, steril fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklar, 15 dakika 200µL %99 metanol ile muamele edildi. Bu süre sonunda kuyucuklar boşaltılarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuk, 5 dakika boyunca 200 µL %2 kristal viyole ile boyandı. Bu süre sona erdiğinde kuyucuklar distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Kurutmadan sonra, kuyucuklara 160µL %33 glasiyal asetik asit ilave edildi ve 570 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Optik yoğunluğa (OD) göre biyofilm oluşumu değerlendirildi. Test iki paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Yüzde biyofilm giderimi hesaplandı.

$$\% \text{Biyofilm giderim} = \frac{\text{ODBlank} - \text{ODDeney}}{\text{ODBlank}} \times 100$$

3. Bulgular

Test bakterilerimiz *L. monocytogenes* PCA 47 ve *P. stutzeri* CZPX 23 yüksek, *S. maltophilia* 25-1A ve *S. epidermidis* 4-1 orta, *P. putida* CZPX 25-1 zayıf biyofilm oluşturan izolatlarıdır.

Hücreli filtratlar antibakteriyel etkinlik göstermemiştir ancak bakterilerin biyofilm oluşumunu değişen oranlarda engellemiştir (Tablo 1). Probiyotik laktik asit bakterilerinin hücreli filtratları göz yüzeyinden izole edilen bakterilerin in vivo olarak biyofilm oluşumunu %98,69-%4,88 oranlarında inhibe etmiştir. En dirençli bakteri *S. epidermidis* 4-1 olmuştur. *L. rhamnosus* 1743 ve *L. rhamnosus* 1724'e ait hücreli filtratları *S. epidermidis* 4-1'in biyofilm oluşumunun artmasına neden olmuştur. Laktik asit bakterilerin hepsinin filtratları *P. stutzeri* CZPX 23 biyofilmini %50'nin üzerinde inhibe etmiştir. *P. putida* CZPX 25-1 biyofilmi *L. rhamnosus* 3111 ve *L. rhamnosus* 312 haricinde %50 üzerinde inhibisyon sağlanmıştır. *L. monocytogenes* PCA 47 biyofilmini *L. plantarum* 1771 ve *L. rhamnosus* KA1 filtratları sırası ile %82,88 ve 91,78 oranında inhibe etmiştir. *L. rhamnosus* KA1 filtratı *S. maltophilia* 25-1A %95,95 oranında inhibe etmiştir.

Tablo 1: Probiyotik laktik asit bakterilerinin hücreli filtratlarının antibiyofilm aktivitesi

	Test bakterilerinin biyofilmlerinin yüzde giderimi (%)					Ortalama	
	<i>P. stutzeri</i> CZPX 23	<i>P. putida</i> CZPX 25-1	<i>S. maltophilia</i> 25-1A	<i>L. monocytogenes</i> PCA 47	<i>S. epidermidis</i> 4-1		
Probiyotik bakterilerin hücreli filtratları	<i>L. rhamnosus</i> 1743	76,35	77,93	68,32	21,73	-8,58	47,15
	<i>L. plantarum</i> 1771	82,06	81,17	82,30	82,88	49,32	75,55
	<i>L. rhamnosus</i> 3111	98,69	7,69	41,73	44,71	79,05	54,37
	<i>L. rhamnosus</i> KA1	80,68	82,83	95,95	91,78	80,52	86,35
	<i>L. rhamnosus</i> 1724	83,08	67,15	9,93	37,29	-6,58	38,17
	<i>L. rhamnosus</i> 312	58,89	16,33	19,12	63,68	4,88	32,52
	Ortalama	79,96	55,51	52,89	57,01	33,10	

Not: Negatif değer biyofilm üretiminin tetiklendiğini göstermektedir.

L. rhamnosus KA1 filtratı test edilen tüm bakterilerin biyofilmlerini en fazla azaltan filtrat olmuştur. Laktik asit bakterilerinin filtratlarının biyofilmi en çok azalttıkları test bakterisi *P. stutzeri* CZPX 23 olarak tespit edilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Bakterilerin biyofilm oluşturmaları antibiyotik direncine neden olarak bazı terapötik seçenekleri etkisiz hale getirebilir. Bu durum ise uygun bir tedavi seçiminde zorluklara neden olabilir. Biyofilmin yaşı ve matriksi bileşimi antibiyotik direnç seviyesini etkilediğinden, biyofilm duyarlılık testleri önem taşımaktadır. Bir monokültürde veya diğer türlerle birlikte biyofilmlerin oluşumu, enfeksiyonların etyopatogenezi için önem taşımaktadır. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar hem fagositoza hem de antibiyotiklere karşı artan direnç göstermektedir [2,21].

Laktik asit bakterilerine ait hücreli filtratlar çalışmada kullandığımız test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Bulgularımızın aksine yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin hücreli filtratlarının bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [22-24]. Forestier ve arkadaşları (ark.) [23] *Lactobacillus casei rhamnosus* hücreli filtratının *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*'in büyümesini

engellediğini rapor etmişlerdir. Muhammad ve ark. [24], *L. plantarum*'un hücresiz filtratının *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. El-Mokhtar ve ark. [22], *L. plantarum* izolatlarına ait hücresiz filtratların çoğunun *L. monocytogenes* üzerine inhibe edici etkisi varken bir izolatın etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yine test edilen *L. plantarum* izolatlarının yarısına ait hücresiz filtratların *S. aureus*'u inhibe etmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar antimikrobiyal aktivitenin asitlik ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamıza benzer olarak *L. acidophilus* hücresiz filtratının klinik *P. aeruginosa* izolatlarının büyümesini engelleyemediği bildirilmiştir. Araştırmacılar bunun hücresiz filtrat içinde bulunan antimikrobiyel maddelere *P. aeruginosa*'nın direncini göstermişlerdir [25] Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktivitesi organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit, antimikrobiyal peptitler ve bakteriyosinlerin üretimi gibi farklı mekanizmalar yoluyla olmaktadır [12-18,24,26] Bulguların farklılığı test patojenlerinin farklı kaynaklardan izole edilmiş olmasından kaynaklanabileceği gibi kullanılan filtratın yoğunluğundan da kaynaklanıyor olabilir.

Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarının antibiyofilm etkileri son dönemde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [27,28]. Fermente palmye özütünden elde edilen *Lactobacillus brevis*'in hücresiz filtratının hem *A. baumannii* hem *E. coli*'nin oluşturduğu biofilm üzerine yüksek inhibitör etkisi olduğu görülmüştür [27]. Avokado ve salatalıktan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarına karşı fermente mısır gevreğinden izole edilen *Lactobacillus brevis* ve hazır *L. acidophilus* ve *Lactocaseibacillus rhamnosus* suşları kullanılmıştır. Hücresiz filtratın varlığının, bu suşların biyofilm oluşum yeteneklerini azalttığı ve önceden oluşturulmuş biyofilmlerinin bütünlüğünü bozduğu tespit edilmiştir [28]. Son dönemde yapılan bu çalışmalarda çoğunlukla bitkisel kaynaklı bakteriler kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda test bakterisi olarak *P. stutzeri* CZPX 23, *P. putida* CZPX 25-1, *S. maltophilia* 25-1A, *S. epidermidis* 4-1 ve *L. monocytogenes* PCA 47 bakterileri kullanılmıştır. *Pseudomonas* spp. ince, çubuk şeklinde, spor oluşturmayan Gram negatif basillerdir. *P. stutzeri* bir, *P. putida* bir veya daha fazla polar flagella nedeniyle hareketli bakterilerdir. Test bakterilerinden *P. putida* 25-1 düşük biyofilm oluşturmaktadır. *P. putida* CZPX 25-1'in biyofilmine karşı en yüksek etki gösteren hücresiz filtrat %83 inhibisyon oranı ile *L. rhamnosus* KA1'e aitti. Yapılan bir çalışmada *P. putida* logaritmik büyüme fazına girdikten sonra, uygulanan tetrasiklinin *P. putida*'nın biyofilm oluşumunu doza bağımlı olarak güçlü bir şekilde uyardığı gösterilmiştir. Tetrasiklin stresine yanıt olarak, *P. putida*'nın biyofilm ile ilgili genlerinin (lapa) ekspresyon seviyesinin modüle olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak hücrenin yapışma kabiliyetinin arttığı ve sonuçta daha sağlam bir biyofilm oluştuğu gözlenmiştir. Biyofilm içindeki bakteri popülasyonu bu koşullarda antibiyotikten etkilenmeden hayatta kalmıştır. Antibiyotiklerin, biyofilm oluşumu üzerinde daha güçlü bir indükleyici etki yaptığı rapor edilmiştir [29,30]. Bu durum için biyofilmlerin inhibisyonu için alternatif bir yol olarak probiyotik laktik asit bakterileri yararlı olabilir. *L. plantarum* 1771 ve *L. rhamnosus* KA1'e ait hücresiz filtratlar bu konuda ümit vaat etmektedir. Ding ve arkadaşları *P. stutzeri*'de, biyofilm oluşumunun hücre dışı protein miktarı ile yüksek pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir [31]. Bir başka çalışmada ise yüksek tuz, asidite ve yüksek ısı gibi stres faktörlerinin *P. stutzeri*'nin biyofilm oluşturma etkisini indüklediğini tespit etmişlerdir [32]. Çalışmamızda LAB hücresiz filtratlarının en etkili olduğu test bakterisi *P. stutzeri* CZPX 23 idi. *L. rhamnosus* 3111'in hücresiz filtratı *P. stutzeri* CZPX 23'ün oluşturduğu biyofilmi %99 oranında inhibe etmiştir. Benzer olarak yapılan bir çalışmada El-Mokhtar ve ark., laktobasillus izolatlarına ait hücresiz filtratların *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunda hücresiz filtrat dozuna bağlı olarak bir azalma gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca, 24 saatlik biyofilmlere hücresiz filtrat ilavesinde oluşan biyofilmin %41 oranında bozulduğunu saptamışlardır [22]. Razaee ve ark., lahanaya turşusundan elde ettikleri *Lactocaseibacillus rhamnosus* ve *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarının hücresiz filtratlarını yiyecek patojeni olan *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma üzerine etkilerine bakmışlardır. Genel olarak hücresiz filtrat etkisi altında kontrol grubuna göre çok daha zayıf bir biyofilm geliştiği tespit edilmiştir. *L. rhamnosus*'un *P. aeruginosa* biyofilminin oluşumu üzerinde önemli bir inhibitör etkisi olduğunu saptamışlardır [33]. Jeyenatan ve ark., ortopedik implantlar üzerinde gelişen *P. aeruginosa* biyofilmine *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *Lactobacillus fermentum* hücresiz filtratlarının etkisini araştırmışlardır. Hücresiz filtratların *P. aeruginosa*'ya karşı yapışma önleyici, anti-biyofilm ve toksik etkileri görülmüştür [34].

Çalışmamızdaki bir başka test bakterisi ise *S. maltophilia* 25-1A'dır. *S. maltophilia*, fermentatif olmayan, gram negatif bir basildir. Farklı yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabilmektedir [35-40]. *S. maltophilia*, önemli bir fırsatçı oküler patojen olarak ortaya çıkmaktadır. Bu organizmanın neden olduğu enfeksiyonların çoğu, oküler bozukluğu olan hastalarda meydana gelir ve karakteristik olarak *S. maltophilia*'nın dirençli antibiyogramı, tedavi seçeneklerini sınırlar. Keratit, konjonktivit gibi oküler enfeksiyonlar ve katarakt cerrahisi sonrası endoftalmiye neden olan mikroorganizmalardan biri olan *S. maltophilia* kullanılan birçok antibiyotiğe içsel direnç göstermekte ve bu nedenle tedavide bazı

sıkıntılar ortaya çıkarmaktadır [37-39]. *S. maltophilia* β-laktamazlar ve diğer proteolitik, inaktive edici proteolitik enzimler üretir. DNase, RNase, elastaz, lipaz, hyaluronidaz, müsinaz ve hemolizin gibi hücre dışı enzimler ile antibiyotikleri etkisiz hale getirir. Aynı zamanda dış membran geçirgenliğinde meydana gelen değişiklikler ve antibiyotikler tarafından hedeflenen yapıların modifikasyonu nedeniyle uygulanan antibiyotikler *S. maltophilia*'nın inhibisyonunda etkisiz kalmaktadır [35]. Biyofilm içindeki *S. maltophilia*'nın test edilen bir çok antibiyotiğe duyarlılığının büyük ölçüde azaldığı ortaya konmuştur. Ancak levofloksasinin *S. maltophilia* biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini elektron mikroskobu ile gösterilmiştir [36]. Çalışmada test edilen probiyotik laktik asit bakterilerine ait hücresiz filtratların *S. maltophilia* biyofilmi üzerine farklı oranlarda inhibe edici etki gösterdikleri belirlendi. *L. plantarum* 1771 *S. maltophilia* biyofilmini % 82 oranında giderirken *L. rhamnosus* KA1 filtratı biyofilmi %96 oranında inhibe etmiştir. Antibiyotiklere direnç gösteren *S. maltophilia* biyofilminin probiyotik laktik asit bakterileri ile inhibe olması önem taşımaktadır. Bu bulgular laktik asit bakteri filtratlarının *S. maltophilia* biyofilminin inhibisyonu ile ilgili ilk bulgulardan biridir.

S. epidermidis 4-1 de çalışmadaki test bakterilerindedir. *S. epidermidis*, koagülaz negatif, gram pozitif kok şeklindeki bakterilerdir. *S. epidermidis*, endoftalmide izole edilen en yaygın patojenlerden biridir. İntraoküler lenslerden izole edilen *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturma potansiyeline sahip olduğu ve antibiyotiklere de direnç gösterdiği vurgulanmıştır [2,41,42]. Bu çalışmada *L. rhamnosus* 1743 ve *L. rhamnosus* 1724e ait hücresiz filtratlar *S. epidermidis* 4-1 biyofilminin artmasına neden olmuştur. Buna karşın *L. rhamnosus* 3111 filtratı %79, *L. rhamnosus* KA1 %81 oranında biyofilmi inhibe etmiştir. Frickman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *L. rhamnosus* hücresiz filtratının *S. epidermidis* ve *S. aureus*'un biofilmleri üzerine etkisi izlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde *L. rhamnosus* hücresiz filtratı *S. epidermidis* planktonik hücre kültürleri üzerinde kullanıldığında, etkili bulunmamıştır. *S. aureus*'a karşı hücresiz filtrat miktarı 15 katına çıkartıldığında pozitif kontrol değerlerinin altına inmiş olarak bulunmuştur; *S. epidermidis* için tüm dozlarda pozitif kontrol ile ya benzer ya da üzerinde sonuç bulunmuştur. Buna karşılık biyofilm üzerine etkisine bakıldığında, *L. rhamnosus* hücresiz filtratının kullanılması, pozitif kontrole kıyasla biyofilmin hem *S. aureus* için hem de *S. epidermidis* için biyofilm büyümesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiş ancak farklı hücresiz filtrat konsantrasyonları için değişken ve hatta çelişkili etkiler gözlemlenmiştir [43].

Çalışmamızdaki son test bakterisi *L. monocytogenes*'dir. *L. monocytogenes* gram pozitif bir bakteridir. *L. monocytogenes* enfeksiyonunun en yaygın oküler şekli konjonktivitir. Listeria ile ilişkili konjonktivit, menenjitli hastalarda endojen veya eksojen olabilmektedir. İnsanlarda listeria ile ilişkili keratit ve endoftalmi vakaları da bildirilmiştir. İnsanda listeria ilişkili endoftalmi, karakteristik bir pigmentli hipopiyon ve yüksek göz içi basıncı ile ilişkilendirilmiştir [44, 45]. *L. monocytogenes* PCA 47 yüksek biyofilm oluşturan bir bakteridir. *L. plantarum* 1771, *L. rhamnosus* KA1 ve *L. rhamnosus* 312'ye ait filtratlar sırasıyla %83, %92 ve %64 oranlarında biyofilmi inhibe etmiştir. Çalışmamıza benzer olarak, Hossain ve ark. [46], LAB suşları ile birlikte kültürlendiğinde *L. monocytogenes* tarafından biyofilm oluşumunun baskılandığını göstermiştir. Camargo ve ark. [12], *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu önlemek için laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarını kullanmışlardır. Beraber verildiğinde biyofilm oluşumunu engelleyen hücresiz filtratın oluşmuş biyofilme etkisiz olduğu görülmüştür. EDTA ile etkinliğin artabileceği ileri sürülmüştür. *L. acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* suşlarının hücresiz filtratlarının *L. monocytogenes* izolatlarının biyofilm oluşumunu azalttığını ve olgun biyofilmlerini dağıttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, hücresiz filtrat varlığında *L. monocytogenes*'te biyofilm düzenleyici faktör A (prfA) gen ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır [28].

Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarının nasıl etki ettikleri incelendiği çalışmalar laktik asit bakteri filtratları içinde bulunan bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddelerin antibiyofilm aktivite göstermiş olabileceği üzerinde durmuşlardır [12-18]. Bakteriyosin üreten *L. curvatus* ET31'in hücresiz filtratı üç *L. monocytogenes* suşunun biyofilmlerini inhibisyonu açısından değerlendirilmiştir. *L. curvatus* ET31'in hücresiz filtratı biyofilm oluşumunu engellemiş ancak oluşmuş biyofilm üzerine etkisiz kalmıştır [12]. Laktik asit bakterilerinin antibiyofilm aktivitesi bu bakteriler tarafında oluşturulan biosülfektanlar ile de ilgili olabilir. Laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen biosülfektanlar antibiyofilm aktivitesi gösterebilir [13]. *L. jensenii* ve *L. rhamnosus* hücre yüzeylerinden izole edilen biosülfektanlar, 25 ila 100 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda uygulandığında, yaralarda, tıbbi implantlarda ve endüstriyel yüzeylerde sıklıkla biyofilm oluşturan çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip *E. coli*, *S. aureus* ve *A. baumannii*'nin suşlarına karşı antibakteriyel, anti-adeziv ve anti-biyofilm aktivite göstermiştir. *A. baumannii* hücre zarına ve *S. aureus* hücre duvarına zarar verdiğini ortaya çıkarmıştır. *S. aureus*'a karşı antiadeziv aktivite göstermiştir [14]. İki *Lactobacillus casei* suşunun hücre yüzeylerinden izole edilen ham biosülfektanlar, oral fırsatçı *S. aureus* suşlarına karşı güçlü yapışma

önleyici ve biyofilm önleyici maddeler olarak rapor edilmiştir [15]. *Lactiplantibacillus plantarum*'a ait biyosüpfaktan *P. aeruginosa* biyofilmini doza bağılı olarak inhibe etmiştir. Araştırmacılar biyosüpfektanın anti-Quorum sensing (Çekirdek algılama) aktivitesi gösterdiğini ayrıca piyosyanin, toplam proteaz, LasA ve LasB elastazda azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Çekirdek algılama (QS, quorum sensing), virülans faktörleri de dahil olmak üzere bakterilerdeki çeşitli biyolojik özelliklerin ifadesini kontrol etmektedir. QS sistemini etkileyen bileşikler, bakteriyel biyofilmi önlemek için potansiyel bir strateji olarak kabul edilmektedir [47]. Bakteriyosinler, farklı pH konsantrasyonlarında stabildir ve bazıları biyofilmleri yok etme yetenekleriyle ilgili olan farklı biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir [16]. Laktik asit bakterilerinin etkisinin nedenlerinden biri de metabolik atık olarak hidrojen peroksit veya organik asitler üretmeleri ve maddelerin biyofilmde büyüyen hücreleri çevreleyen ortamın pH'sında bir değişikliğe neden olarak etkili olmasıdır [17]. Ancak bazı koşullarda çalışmamızda *S. epidermidis* 4-1'de görüldüğü gibi laktik asit bakteri metabolit ürününden faydalanabilir veya ondan etkilenmeyebilir [18].

Sonuç olarak probiyotik laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratları biyofilmin önlenmesinde alternatif maddeler olarak görev alabilirler. Ancak biyofilmi oluşturan bakterilerin özelliğine göre etkili olabilecek laktik asit bakterisi değişiklik gösterebilmektedir. Geniş spektrumlu antibiyofilm olarak kullanılacak hücresiz LAB filtratlarının tespiti ve test edilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Kam Hepdeniz, Ö., Seçkin, Ö. 2017. Dinamik mikrobiyal bir yaşam: Oral biyofilm. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 8(3): 47-55.
- [2] Kıvanç, S. A., Kıvanç, M., Kılıç, V., Güllülü, G., Özmen, A. T. 2017. Comparison of biofilm formation capacities of two clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* with and without *icaA* and *icaD* genes on intraocular lenses. Turk J Ophthalmol, 47(2):68-73.
- [3] Gbejuade, H. O., Lovering, A. M., Webb, J. C. 2015. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop, 86(2):147-158.
- [4] Bispo, P. J., Haas, W., Gilmore, M. S. 2015. Biofilms in infections of the eye. Pathogens, 4(1):111-136.
- [5] Paranhos, R. M., Batalhão, C. H., Semprini, M., Regalo, S. C., Ito, I. Y., de Mattos Mda, G. 2007. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. J Appl Oral Sci, 15(1):33-38.
- [6] Enoch, D. A., Birkett, C. I., Ludlam, H. A. 2007. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents, 29 Suppl 3:S33-41.
- [7] Safdar, A., Rolston, K. V. 2007. *Stenotrophomonas maltophilia*: changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. Clin Infect Dis, 45(12):1602-1609.
- [8] Tay, E., Rajan, M., Tuft, S. 2008. *Listeria monocytogenes* sclerokeratitis: a case report and literature review. Cornea, 27(8):947-949.
- [9] Shoughy, S. S., Tabbara, K. F. 2014. *Listeria monocytogenes* endophthalmitis following keratoconjunctivitis. Clin Ophthalmol, 8:301-304.
- [10] Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Bayar, S., Mahdouani, K., Majdoub, H., Kouidhi, B. 2018. Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus spp.*, as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli*. Microb Pathog, 125:448-453.
- [11] Akova, B., Kıvanç, S. A., Kıvanç, M. 2021. Antibiofilm effect of probiotic lactic acid bacteria against *Bacillus* spp obtained from the ocular surface. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 25(24):7799-805.

- [12] Camargo, A. C., de Paula, O. A., Todorov, S. D., Nero, L. A. 2016. In vitro evaluation of bacteriocins activity against *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Biochem Biotechnol*, 178(6):1239-1251.
- [13] Fariq, A., Saeed, A. 2016. Production and biomedical applications of probiotic biosurfactants. *Curr Microbiol*, 72(4):489-495.
- [14] Gudiña E. J., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. 2010. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 76(1):298-304.
- [15] Merghni, A., Dallel, I., Noumi, E., Kadmi, Y., Hentati, H., Tobji, S., Ben Amor, A., Mastouri, M. 2017. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog*, 104:84-89.
- [16] Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R. P. 2018. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 4:9.
- [17] Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., Cincaro, L. 2017. Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microb Biotechnol*, 10(4):819-832.
- [18] Nadell, C. D., Drescher, K., Foster, K. R. 2016. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 14(9):589-600.
- [19] Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2002. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2):175-179.
- [20] Carminati, D., Giraffa, G., Bossi, M. G. 1989. Bacteriocin-Like Inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*, 52(9):614-617.
- [21] Prince, A. S. 2002. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med*, 347(14):1110-1111.
- [22] El-Mokhtar, M., Hassanein, K. M., Ahmed, A. S., Gad, G. F. M., Amin, M. M., Hassanein, O. F. E. 2020. Antagonistic activities of cell-free supernatants of lactobacilli against extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect and Drug Resist*, 13: 543–552.
- [23] Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol*. 152(2):167–173.
- [24] Muhammad, Z., Ramzan, R., Abdelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., Pan, S. 2019. Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner Mongolian Fermented Cheese Against Foodborne Pathogens. *Pathogens*, 8(2):71.
- [25] Jamalifar, H., Rahimi, H., Samadi, N., Shahverdi, A., Sharifian, Z., Hosseini, F., Eslahi, F., Fazeli, M. 2011. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*, 3 (1):21–25.
- [26] Mani-Lopez, E., Arrijo-Bretón, D., López-Malo, A., 2022. The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 21:604–641.
- [27] Sornsenee, P., Chatatikun, M., Mitsuwan, W., Kongpol, K., Kooltheat, N., Sohbenalee, S., Pruksaphanrat, S., Mudpan, A., Romyasamit, C. 2021. Lyophilized cell-free supernatants of *Lactobacillus* isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *PeerJ*, 9:e12586.
- [28] Masebe, R. D., Thantsha, M. S. 2022. Anti-biofilm activity of cell free supernatants of selected lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* isolated from avocado and cucumber fruits, and from an avocado processing plant. *Foods*, 11(18):2872.
- [29] Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. P., Høiby, N. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4):1175-1187.
- [30] Liu, C., Sun, D., Zhu, J., Liu, J., Liu, W. 2020. The regulation of bacterial biofilm formation by cAMP-CRP: A Mini-Review. *Front Microbiol*, 11:802.

- [31] Ding, X. S., Zhao, B., An, Q., Tian, M., Guo, J. S. 2019. Role of extracellular polymeric substances in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(21-22):9169-9180.
- [32] Yan, N., Yang, Z., Shang, L., Dai, S., Zhan, Y., Lu, W., Lin, M., Yan, Y. 2017. Patterns of Biofilm formation in *Pseudomonas stutzeri* Under abiotic stresses. *Biotechnology Bulletin*, 33(2): 172-178.
- [33] Rezaei, Z., Khanzadi, S., Salari, A. 2021. Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactocaseibacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). *AMB Express*, 11(1):156.
- [34] Jeyanathan, A., Ramalmete, R., Blunn, G., Gibbs, H., Pumilia, C. A., Meckmongkol, T., Lovejoy, J., Coathup, M. J. 2021. Lactobacillus cell-free supernatant as a novel bioagent and biosurfactant against *Pseudomonas aeruginosa* in the prevention and treatment of orthopedic implant infection. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 109(10):1634-1643.
- [35] Sharma, S., Chinyadza, T., Chapnick, E. K., Ghitan, M. 2008. *Stenotrophomonas maltophilia* infection during treatment for pancreatitis with imipenem/cilastatin. *Clin.Microbiol.Newsletters*, 30:12-3
- [36] Sun, E., Liang, G., Wang, L., Wei, W., Lei, M., Song, S., Han, R., Wang, Y., Qi, W. 2016. Antimicrobial susceptibility of hospital acquired *Stenotrophomonas maltophilia* isolate biofilms. *Braz J Infect Dis*, 20(4):365-373.
- [37] Horio, N., Horiguchi, M., Murakami, K., Yamamoto, E., Miyake, Y. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* endophthalmitis after intraocular lens implantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238(4):299-301.
- [38] Karakurt, A., Abdik, O., Sengün, A., Karadağ, R., Saricaoğlu, S., Sarikatipoğlu, H. Y., Hasiripi, H. 2006 *Stenotrophomonas maltophilia* Endophthalmitis after cataract extraction. *Ocul Immunol Inflamm*,14(1):41-46.
- [39] Park, B. C., Lim, H. R., Park, S. J., Koh, J. W. 2021. Clinical features and management of *Stenotrophomonas maltophilia* keratitis. *Ophthalmol Ther*, 10(3):525-533.
- [40] Jucker, B. A., Harms, H., Zehnder, A. J. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol*, 178(18):5472-5479.
- [41] Katiyar, R., Vishwakarma, A., Kaistha, S. D. 2012. Analysis of biofilm formation and antibiotic resistance of microbial isolates from intraocular lens following conventional extracapsular cataract surgery. *Int J Res Pure Appl Microbiol*. 2(2):20–24.
- [42] Kivanc, S. A., Kilic, V., Akova, B., Kivanc, M. 2020. The biofilm formation properties of the *S. epidermidis* isolates obtained from conjunctiva and multi-drug resistance. *Kuwait Medical Journal*, 52:143-150.
- [43] Frickmann, H., Klenk, C., Warnke, P., Redanz, S., Podbielski, A. 2018. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of Staphylococci. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 8(4):119-127.
- [44] Altaie, R., Fahy, G. T., Cormican, M. 2006. Failure of *Listeria monocytogenes* keratitis to respond to topical ofloxacin. *Cornea*, 25(7):849-850.
- [45] Gaskell, K. M., Williams, G., Grant, K., Lightman, S., Godbole, G. 2017. *Listeria Monocytogenes*: a rare cause of endophthalmitis, a case report. *IDCases*, 8:45-46.
- [46] Hossain, M. I., Mizan, M. F. R., Ashrafudoulla, M., Nahar, S., Joo, H.-J., Jahid, I. K., Park, S. H., Kim, K.-S., Ha, S.-D. 2020. Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. *LWT-Food Science and Technology*, 118, Article 108864.
- [47] Patel, M., Siddiqui, A.J., Ashraf, S.A., Surti, M.; Awadelkareem, A.M.; Snoussi, M.; Hamadou, W.S.; Bardakci, F.; Jamal, A.; Jahan, S.; et al. *Lactiplantibacillus plantarum*-derived biosurfactant attenuates quorum sensing-mediated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*. *Microorganisms* 2022, 10, 1026.