

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ ve HÜCRESİZ
SÜPERNATANTLARININ YARA ENFEKSİYONLARINA YOL
AÇAN ÖNEMLİ PATOJENLERE KARŞI POTANSİYEL
PROBİYOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZGENUR YILMAZ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-19005 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI



TEŞEKKÜR



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Probiyotik Bakteriler.....	2
2.1.1. Laktik Asit Bakterileri.....	4
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4. Biyofilm.....	13
2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Yara Enfeksiyonlarında Kullanımları.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç.....	21
3.1.1. İzolasyon Örnekleri.....	21
3.1.2. Standart Bakteri Suşları.....	21
3.1.3. Besiyerleri ve Çözeltiler.....	24
3.1.4. Test Kitleri ve Cihazlar.....	27
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	29
3.2.1.1. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	29
3.2.1.1.1. Gram boyama.....	29
3.2.1.1.2. Katalaz testi.....	29
3.2.1.1.3. Oksidaz testi.....	29
3.2.2. Bakterilerinin Stoklanması.....	30

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	30
3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin 16 rRNA PZR Yöntemi İle Tespiti.....	30
3.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Fenotipik Olarak Belirlenmesi.....	32
3.2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	33
3.2.6.1. Laktik asit izolatlarına ait aktif kültürlerinin değerlendirilmesi.....	33
3.2.6.2. Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlarının değerlendirilmesi.....	35
3.2.7. Standart Patojen Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	37
3.2.8. Laktik Asit İzolatlarına Ait Hücresiz Süpernatantlarının Antibiyofilm Etkilerinin Belirlenmesi	38
3.2.8.1. Patojenlerin hazırlanması.....	38
3.2.8.2. Hücresiz süpernatantların hazırlanması.....	39
3.2.8.3. Hücresiz süpernatantlarının patojenden önce inkübasyonu.....	39
3.2.8.4. Hücresiz süpernatantlarının patojen ile beraber inkübasyonu.....	40
3.2.8.5. Hücresiz süpernatantlarının patojenden sonra inkübasyonu.....	41
3.2.8.6. İnhibisyon etkilerin belirlenmesi.....	42
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon, PZR ve Sekans Bulguları.....	44
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testlerine İlişkin Bulgular.....	46
4.3. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları.....	49
4.3.1. Aktif Kültür.....	49
4.3.2. Hücresiz Süpernatant (HS).....	52
4.4. Patojen Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Potansiyelleri.....	61
4.5. Hücresiz Süpernatantların Antibiyofilm Etkilerinin Belirlenmesi.....	62
4.5.1. Patojenden Önce İnkübasyon.....	62
4.5.2. Patojen İle Beraber İnkübasyon.....	71
4.5.3. Patojenden Sonra İnkübasyon.....	80

4.5.4. Biyofilm Çalışmalarına İlişkin Bulguların Karşılaştırılması.....	89
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	113
KAYNAKLAR.....	116
Ek-1 (ADÜ-HADYEK Kararı).....	131
ÖZGEÇMİŞ.....	132



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

L	: Litre
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
rpm	: Revolutions per minute
ATCC	:American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kültürü Koleksiyonu)
CO₂	: Karbondioksit
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
EPS	: Ekzopolisakarit
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Danışma Kurulu)
FAO	: Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GF	: Growth Factors (Büyüme faktörleri)
HAMP	: Hepsidin Antimikrobiyal Peptid
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek performans sıvı kromatografisi)
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
IPW	: International Probiotic Workshop (Uluslararası Probiyotik Çalıştayı)
KCl	: Potasyum klorür
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LABIP	:Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu)
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MRSA	:Methicillin- resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Metisiline dirençli

	<i>Staphylococcus aureus</i>)
NaCl	: Sodyum klorür
OECD	:Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü)
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
RNA	: Ribo Nükleik asit
SF	: Serum fizyolojik
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TSST	: Toksik şok sendromu toksini
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Probiyotik olma belirteçleri.....	4
Şekil 2.	Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri	8
Şekil 3.	LAB'ın immun sistem hücreleri ile olan etkileşimi.....	16
Şekil 4.	LAB'ın yara enfeksiyonlarına yol açan patojen bakterilere karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal etkiler.....	16
Şekil 5.	LAB aktif kültür deney özeti.....	34
Şekil 6.	LAB hücresiz süpernatant deney özeti.....	36
Şekil 7.	Çalışmada yapılan deneylerin özeti.....	43
Şekil 8.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları (Patojenden önce inkübasyon).....	67
Şekil 9.	N-HS-72 ve HS-72 hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları (Patojenden önce inkübasyon).....	70
Şekil 10.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları (Patojen ile beraber inkübasyon).....	76
Şekil 11.	N-HS-72 ve HS-72 hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları (Patojen ile beraber inkübasyon).....	79
Şekil 12.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları (Patojenden sonra inkübasyon).....	85
Şekil 13.	N-HS-72 ve HS-72 hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları (Patojenden sonra inkübasyon).....	88

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Gradyent difüzyon (E-Test) testi yapılış aşamaları.....	32
Resim 2.	LAB agar spot testlerinin yapılışı.....	34
Resim 3.	Agar kuyu difüzyon testlerinin yapılışı.....	36
Resim 4.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojenden önce inkübasyonuna ilişkin deney özeti.....	40
Resim 5.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojen ile beraber inkübasyonuna ilişkin deney özeti.....	41
Resim 6.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojen sonra inkübasyonuna ilişkin deney özeti.....	42
Resim 7.	Laktik asit izolatlarının koloni morfolojileri.....	44
Resim 8.	PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45
Resim 9.	LAB' ın antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanması.....	47
Resim 10.	LAB aktif kültürlerinin patojenlere karşı gösterdiği antimikrobiyal aktiviteler.....	50
Resim 11.	Agar kuyu difüzyon testi sonuçlarının değerlendirilmesi.....	56
Resim 12.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojen bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon zon görüntüleri.....	57
Resim 13.	Patojen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelleri.....	61
Resim 14.	Patojen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelleri (48 saatlik inkübasyon plakları).....	61
Resim 15.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojenden önce inkübasyonu sonrası plak görüntüsü.....	66
Resim 16.	Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar.....	66
Resim 17.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojen ile beraber inkübasyonu sonrası plak görüntüsü.....	75
Resim 18.	Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar.....	75
Resim 19.	LAB hücresiz süpernatantlarının patojenden sonra (gelişen biyofilm yapılar) plaklara eklenmesi ve inkübasyonu.....	84
Resim 20.	Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar.....	84

Resim 21. HS-72 ve N-HS-72 uygulaması sonrası biyofilm yapıların karşılaştırılması.....	92
--	----



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.	Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	3
Tablo 2.	<i>P. aeruginosa</i> 'nın etken olduğu enfeksiyonlar ve lokalizasyonları.....	10
Tablo 3.	<i>S. aureus</i> 'un insanlarda yaptığı enfeksiyonlar.....	12
Tablo 4.	<i>S. aureus</i> 'un hayvanlarda yaptığı enfeksiyonlar.....	12
Tablo 5.	Bazı probiyotik bakterilerin <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki inhibe edici etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar.....	19
Tablo 6.	Fermente süt ürünleri ve alındıkları yerler.....	21
Tablo 7.	Çalışmada kullanılan standart bakteri suşlarına ilişkin detaylı bilgiler...	22
Tablo 8.	Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	24
Tablo 9.	Çalışmada kullanılan çözeltiler.....	26
Tablo 10.	Çalışmada kullanılan test kitleri.....	27
Tablo 11.	Çalışmada kullanılan cihazlar.....	28
Tablo 12.	16S rRNA genini çoğaltmak için hazırlanan PZR karışımı.....	31
Tablo 13.	Antibiyotik MİK Sınır Değerleri (mg/L).....	33
Tablo 14.	Patojenlerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin belirlenmesi.....	38
Tablo 15.	İzolatlarla ilişkin izolasyon bulguları.....	45
Tablo 16.	LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları.....	46
Tablo 17.	Antibiyotik duyarlılık testleri sonuçları.....	48
Tablo 18.	LAB aktif kültürlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi	51
Tablo 19.	LAB hücresiz süpernatantlarının pH değerleri.....	55
Tablo 20.	LAB hücresiz süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi.....	58
Tablo 21.	Patojenlerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi.....	62

ÖZET

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ ve HÜCRESİZ SÜPERNATANTLARININ YARA ENFEKSİYONLARINA YOL AÇAN ÖNEMLİ PATOJENLERE KARŞI POTANSİYEL PROBİYOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yılmaz Ö. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Probiyotik laktik asit bakterileri, savunma hücre üretimini stimüle ederek yara iyileşmesine yardımcı olabilir ve pek çok patojen bakteriye karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinlik gösterebilirler. Bu çalışmada çeşitli fermente süt ürünlerinden izole edilen 12 laktik asit bakteri aktif kültür ve hücresiz süpernatantların, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* a karşı antimikrobiyal etkilerinin, ayrıca hücresiz süpernatantların patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici ve oluşturulan biyofilmleri yıkıcı etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Aktif kültürler agar spot, hücresiz süpernatantlar ise agar kuyu difüzyon yöntemiyle değerlendirildi. Biyofilm deneyleri için ise, kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi kullanıldı. İzolatların 16S rRNA PZR analizleriyle: *Pediococcus parvulus* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus paracasei* (%16.7, 2/12), *Leuconostoc mesenteroides* (%16.7, 2/12), *Lactobacillus coryniformis* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus reuteri* (%16.7, 2/12), *Lactobacillus rhamnosus* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus alimentarius* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus delbrueckii* (%8.3, 1/12) ve *Lactococcus lactis* (%8.3, 1/12) türleri olduğu belirlendi. İzolatların antibiyotik duyarlılık profilleri E-test yöntemi ile değerlendirildi ve seçili antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edildi. Antimikrobiyal aktivite bulgularına göre; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ve *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının (HS-72) patojen bakteriler içerisinde yalnızca *P. aeruginosa* suşlarına gösterdikleri inhibisyon etkilerin benzer oldukları değerlendirildi. Hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan üç uygulama içerisinde, her bir patojen için en yüksek biyofilm inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre HS-72'nin patojen ile beraber inkübasyonu sonucunda: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için sırasıyla %96.0 ve %95.7 (*L. lactis* suş IL6288), *S. aureus* ATCC 35556 için %94.2 (*L. reuteri* suş SKB1241) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %96.2 (*L. paracasei* suş RV-M192)

kaydedilen en yüksek inhibisyon oranlarıdır. İnhibisyon etkilerin antimikrobiyal aktivite deneylerinde organik asitlerden, biyofilm deneylerinde ise, süpernatantlardaki diğer inhibitör maddelerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un oluşturdukları biyofilmlerin, kronik yaraların tedavisinde karşılaşılan önemli bir problem olduğu göz önüne alındığında, bu çalışmada laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların, patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici ve oluşturulan biyofilmleri yıkıcı etkilerinin belirlendiği yeni bulguların bilimsel literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, hücresiz süpernatant, laktik asit bakterileri, yara enfeksiyonları.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL PROBIOTIC EFFECTS OF LACTIC ACID BACTERIA AND CELL-FREE SUPERNATANTS AGAINST IMPORTANT PATHOGENS LEADING TO WOUND INFECTIONS

Yilmaz O. Aydin Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Microbiology Program, Ph.D. Thesis, Aydin, 2020.

Probiotic lactic acid bacteria stimulates the production of defense cells and thereby help the healing of wound. It can also be effective in antimicrobial and antibiofilm activity against many pathogenic bacteria. In this study, it was aimed to evaluate the antimicrobial effects of 12 lactic acid bacteria active cultures and cell-free supernatants isolated from various fermented milk products against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, as well as the inhibitory effects of cell-free supernatants on the biofilm formation of pathogens. Active cultures were evaluated by agar spot and cell-free supernatants were evaluated by agar-well diffusion method. As for biofilm experiments the quantitative-microdilution plate method was used. It was determined that isolates were *Pediococcus parvulus* (8.3%, 1/12), *Lactobacillus paracasei* (16.7%, 2/12), *Leuconostoc mesenteroides* (16.7%, 2/12), *Lactobacillus coryniformis* (8.3%, 1/12), *Lactobacillus reuteri* (16.7%, 2/12), *Lactobacillus rhamnosus* (8.3%, 1/12), *Lactobacillus alimentarius* (8.3%, 1/12), *Lactobacillus delbrueckii* (8.3%, 1/12) and *Lactococcus lactis* (8.3%, 1/12) species by 16S rRNA PCR analysis. Antibiotic susceptibility profiles of the isolates were evaluated by E-test method and it was determined that they were sensitive to selected antibiotics. According to the findings of antimicrobial activity, the inhibition effects of active culture and cell-free supernatants (HS-72) of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain ND04 and *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain CAU4374 were evaluated to be only similar to *P. aeruginosa* strains among the pathogenic bacteria. Three separate applications performed with cell-free supernatants and the highest biofilm inhibition rate was determined for each pathogen. Accordingly, as a result of incubation of HS-72 with pathogen, the following highest inhibition rates were recorded; 96.0% and 95.7% (*L. lactis* strain IL6288) for *P. aeruginosa* ATCC 15692 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, 94.2% (*L. reuteri* strain SKB1241) for *S.*

aureus ATCC 35556 and 96.2% (*L. paracasei* strain RV-M192) for *S. aureus* ATCC 6538. Inhibition effects are thought to be caused by organic acids in antimicrobial activity experiments, and other inhibitory substances in supernatants in biofilm experiments. Considering that biofilms formed by *P. aeruginosa* and *S. aureus* pathogens are important problem in the treatment of chronic wounds, it is thought that new findings in which the cell-free supernatants of lactic acid isolates inhibit biofilm formation of pathogens and destruct the generated biofilms will greatly contribute to the scientific literature.

Keywords: Biofilm, cell-free supernatant, lactic acid bacteria, wound infections.



1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa ve *Staphylococcus aureus*, insan ve pek çok hayvan türünde çeşitli enfeksiyonlara neden olabilen patojen türlerdir. Son yıllarda konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, akut ve kronik yaraların tedavisindeki başarısızlıklara mikrobiyal biyofilmlerinin neden olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle yeni terapötik yaklaşımlara olan ihtiyaç artmaktadır.

Oldukça iyi bilinmektedir ki probiyotikler, çeşitli sebeplerle deri mikrobiyotasının doğal dengesinin bozulması durumunda, immun sistem hücrelerinin üretimini stimüle ederek, deri iyileşmesine yardımcı olabilir ve postbiyotik olarak adlandırılan hücresiz metabolitleri ile pek çok patojen bakteriye karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinlik gösterebilirler (Yang ve ark, 2015; Nakatsuji ve ark, 2017; Lukic ve ark, 2018). Probiyotiklerin bu gibi özelliklere sahip oldukları düşünüldüğünde, potansiyel kullanımlarının daha fazla araştırma yapılmasına değecek nitelikte olduğu görülmektedir.

Konu ile ilgili literatürler incelendiğinde; yapılan in vitro çalışmalarda probiyotik suşlar tarafından üretilen hücresiz süpernatant ve lizatların, canlı kültürlerinin kullanımına oranla daha az araştırıldığı görülmektedir. Ancak, son yıllarda bazı araştırmacılar tarafından hücresiz metabolitlerin kullanımlarının, patojen bakterilerle mücadelede daha etkili ve güvenli bir yol olduğu bildirildikten sonra, bu geleneksel algı değişmeye başlamıştır. Buna bağlı olarak planlanan güncel araştırmaların, probiyotik bakteri ve ürünlerinin (hücresiz süpernatant, lizat gibi), patojen bakterilere karşı gösterdiği antibiyofilm ve antibakteriyel etkiyi ortaya koyacak mekanizmaları aydınlatmaya yönelik çalışmalar olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, marketlerden ve halk pazarlarından alınan peynir (beyaz peynir, koyun peyniri, tulum peyniri, lor ve çökelek), yoğurt ve kefir çeşitlerinden oluşan fermente süt ürünlerinden izole edilen ve 16S rRNA PZR analiziyle tür düzeyinde belirlenen laktik asit bakterilerine ait aktif kültür ve hücresiz süpernatantların, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkilerinin ve ayrıca hücresiz süpernatantlarının, patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici ve oluşturulan biyofilmleri yıkıcı etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotik Bakteriler

Probiyotik “yaşam için” anlamına gelen ve ilk olarak 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından “bir mikroorganizma tarafından salgılanarak diğer bir mikroorganizmanın üremesini uyaran maddeler” anlamında ve “antibiyotik” teriminin karşısı olarak kullanılmış Yunanca bir terimdir (Cani, 2018). Fuller 1989’da probiyotikleri; “konak hayvanın yararına olacak şekilde intestinal mikrobiyal dengesini iyileştiren canlı mikrobiyal besin katkısı” olarak ifade etmiştir. Daha sonraki yıllarda “içerdiği yeterli sayıda canlı, tanımlanmış mikroorganizma ile konağın mikroflorasını değiştirerek, o konağın yararına sağlık etkileri oluşturan besin” olarak bu tanım genişletilmiştir (Lin ve Zhang, 2017). 2004 yılında Uluslararası Probiyotik Çalıştayı’nda (IPW) probiyotikler; sağlık yönünden belirli hastalıkları tedavi edici, etkileri klinik deneylerle kanıtlanmış ürünler olarak tanımlanmıştır (Volk ve Lacy, 2017).

Görüldüğü gibi yıllar boyunca probiyotiklere ilişkin birçok tanımlama yapılmış olup, güncel probiyotik tanımlamalarını genel başlıklar altında aşağıdaki gibi toparlayabiliriz (Sun ve ark, 2015; Ahl ve ark, 2016; Harata ve ark, 2016; Budden ve ark, 2017; Kumar ve ark, 2017; Porto ve ark, 2017).

- Yeterli miktarda alındığında konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır.
- Bağırsaklarda mikroorganizma ve beslenme dengesini, sistemik ve mukozal immüniteyi düzenleyerek konakçı fizyolojisini olumlu yönde etkileyen ve besinlere eklenen mikroorganizmalardır.
- Konakçının vücut kompartmanlarının birinde mikroflorayı değiştirerek, sağlığı üzerinde olumlu etkilerde bulunan, canlı ve iyi tanımlanmış mikroorganizmaları yeterli sayıda içeren preparat veya ürünlerdir.
- İnsan ve hayvanlara verilen, konakçıda mikroorganizma flora özelliklerini düzenleyerek, olumlu etkilerde bulunan mikroorganizma kültürleridir.
- Konakçı canlıda intestinal mikroorganizma dengesini düzenleyerek olumlu etkilerde bulunan canlı besin katkısıdır.

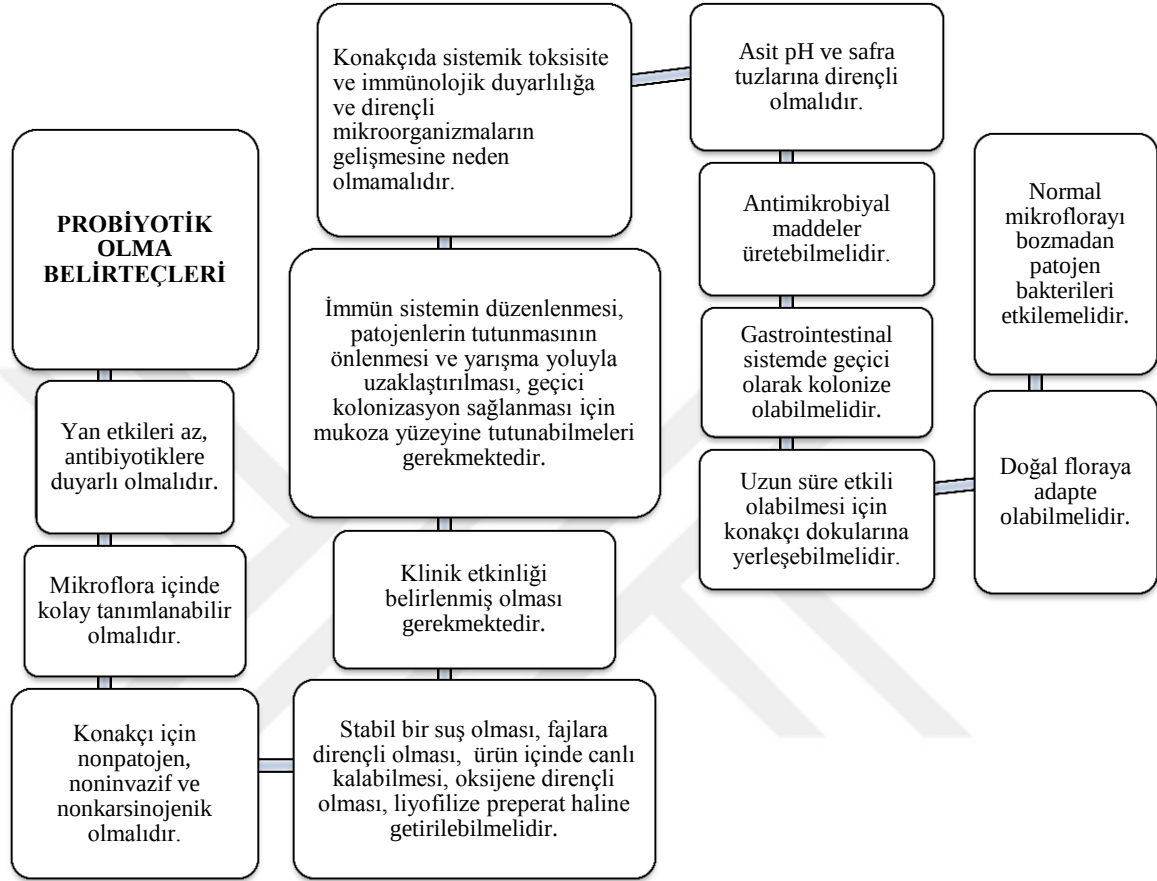
Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri, *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus*'tur. Probiyotik mikroorganizmalar Tablo 1'de özetlenmiştir (Yirga, 2015; Olveira ve Molero, 2016; Kumar ve ark, 2017).

Tablo 1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Yirga, 2015; Olveira ve Molero, 2016; Kumar ve ark, 2017).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> * <i>Lactobacillus amylovorus</i> * <i>Lactobacillus brevis</i> * <i>Lactobacillus reuteri</i> * <i>Lactobacillus casei</i> * <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> * <i>Lactobacillus plantarum</i> * <i>Lactobacillus farminis</i> * <i>Lactobacillus rhamnosus</i> * <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> * <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> * <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> * <i>Bifidobacterium thermophilum</i> * <i>Bifidobacterium lactis</i> *
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> * <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> * <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> * <i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus cereus</i> *
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> * <i>Pediococcus pentoseceus</i> *
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetilactis</i> <i>Streptococcus infantarius</i> * <i>Streptococcus salivarius</i> *
<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes capillus</i> <i>Bacteriodes juis</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> * <i>Leuconostoc citreum</i> * <i>Leuconostoc lactis</i> *
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar: <i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> * <i>Saccharomyces boulardii</i> * <i>Saccharomyces pastorianus</i> * <i>Candida torulopsis</i>

* Hayvan sağlığında kullanılan probiyotik türleri

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için çeşitli kriterlere sahip olması gerekmektedir. Söz konusu bu kriterler Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu (LABIP) tarafından belirlenmiştir (Şekil 1) (Cerbo ve ark, 2016).



Şekil 1. Probiyotik olma belirteçleri (Cerbo ve ark, 2016).

2.1.1. Laktik Asit Bakterileri

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların büyük bir bölümünü laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. LAB: Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, basil ve kok şeklinde, katalaz negatif, aerotolerant, aside dayanıklı nitrata indirgemeyen, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten bir gruptur. Su, toprakta hemen hemen hiç bulunmazlar ve doğal ortamları; süt ve süt ürünleri, fermente gıdalar, taze veya çürümüş bitkiler, insan ve hayvan bağırsak mukoza içerikleridir. Fenotip özelliklerine göre: Obligat homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve obligat

heterofermentatif olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Bosch ve ark, 2014; Reis ve ark, 2017).

Laktik asit bakterileri içerisinde yer alan cinsler: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Vagococcus* ve *Aerococcus* 'dur. Ayrıca *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* cinsi üyeleri fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür (başlatıcı kültür) olarak kullanılmaktadır (Cerbo ve ark, 2016).

Enterokoklar; tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan, kokobasil şeklinde görülebilen, genellikle katalaz negatif, Gram pozitif bakterilerdir. İnsan ve hayvan intestinal florasının birer parçası olup, yapılan çalışmalarda ürettiği bakteriyosinlerle pek çok patojene karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri bildirilmiştir (Bhola ve Bhadekar, 2019).

Leuconostoc cinsi bakteriler; genellikle çift veya zincir oluşturmuş halde bulunan, katalaz-negatif, fakültatif anaerob, hareketsiz Gram pozitif bakterilerdir. Kolonileri genellikle yuvarlak şekilli ve grimsi beyaz renktedir. Sentezledikleri dekstranlar gıda sanayisinde emülgatör ve kıvam arttırıcı olarak kullanılmaktadır. *L. mesenteroides* fermente ürünlerden sıklıkla izole edilen türlerdir (Gan ve ark, 2019).

Pediococcus cinsi bakteriler; çift halde veya tetrat formunda bulunan, katalaz-negatif, hareketsiz Gram-pozitif bakterilerdir. Bu cins içerisinde yer alan türlerin fermentasyon sürecinde starter kültür olarak kullanıldığı ve bazılarının pediyosin olarak adlandırılan bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. Ayrıca, *Pediacocci* türlerinin biyokoruyucu olarak gıda sanayisinde kullanımları mevcuttur. *Pediococcus* cinsi içerisinde yer alan *P. parvulus* türü, sütün fermentasyonunda ve peynir yapımında kullanımlarından dolayı, süt ve süt ürünlerinden izolasyonları mümkündür. (Holland ve ark, 2011).

Laktokoklar; yuvarlak ya da oval biçimli, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen Gram pozitif bakterilerdir. Mezofilik karakterde bakteriler olup, süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan en yaygın türü *L. lactis* ' dir. Üretmiş oldukları bakteriyosinler patojenler üzerinde inhibisyon etki gösterdiği bilinmektedir (Mills ve ark, 2011).

Laktobasiller; çomak ya da kokkobasil şeklinde, spor oluşturmeyen, genellikle katalaz negatif Gram pozitif bakterilerdir. Laktobasiller, fermente süt ürünleri ve et gibi gıdalarda, insan ve hayvanların mukozal membranları gibi çok geniş alanlardan izole edilebilirler. *Lactobacillus* cinsi, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ve *L. reuteri* gibi bakteri türlerini içermektedir (Reis ve ark, 2017).

L. delbrueckii; çomak şeklinde, hareketsiz, katalaz negatif, Gram pozitif, laktik asit üreten, yoğurda lezzet, dokusal özelliklerini veren ve üretiminde starter kültür olarak

kullanılan bir bakteridir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, test patojenlere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Shokryazdan ve ark, 2014).

L. acidophilus; çomak şeklinde, uçları yuvarlak, anaerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz negatif, Gram pozitif, termofilik özellikte bir bakteridir. Koloni morfolojileri pürüzlü ve kenarları saçaklı görünümündedir. Laktozu homofermentatif yönden fermente etmekte ve laktik asitin yanı sıra az miktarda da asetik asit, asetaldehit ve etanol oluşturmaktadır (Ahmed ve ark, 2010).

L. casei; fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, hareketsiz, yuvarlak şekilli bir bakteridir. Özellikle süt endüstrisinde yer alan ve fermentatif metabolizma sürecinde metabolik son ürün olarak laktik asit sentezleyen mikroorganizmadır (Lukic ve ark, 2018).

L. paracasei; çomak şeklinde, fakültatif heterofermentatif, spor oluşturmayan, Gram pozitif bir bakteridir. Bakteriyosin, ekzopolisakkarit ve aroma maddeleri oluşturabilme yetenekleri sayesinde, starter kültürler arasında yer almaktadır. Genellikle insan gastrointestinal sisteminde normal floranın bir parçası olarak bulunmakta ve fermente edilmiş süt, et ve sebzelerden izole edilmektedir (Lavermicocca ve ark, 2015).

L. rhamnosus; spor oluşturmayan, hareketsiz, Gram pozitif, katalaz negatif, kısa zincirler şeklinde görünen, fakültatif heterofermentatif bir mikroorganizmadır. Pentozları ve glukogonları fermente edebilme, estraselüler polisakkarit üretebilme yeteneklerine sahiptirler. Vajina ve gastrointestinal sistem de dahil olmak üzere birçok farklı ortamdan izole edilmiş çok çeşitli suşlara sahip olup, yoğurt gibi fermente süt ve süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Al-Malkey ve ark, 2017).

L. plantarum; düzgün çomak şeklinde, tek, çift veya kısa zincirler halinde bulunan, genellikle kamçısız ancak hareketli, Gram pozitif bir bakteridir. Kolonilerin rengi; beyaz, açık sarı, bazen de koyu sarı olabilmektedir. Süt ve süt ürünlerinden, fermente bitkilerden, insan ağzı ve sindirim sisteminden izole edilebilirler (Gan ve ark, 2019).

L. reuteri; çomak şekilli, anaerobik, katalaz negatif Gram pozitif bir bakteridir. Doğal olarak insanlar, domuzlar, tavuklar ve fareler dahil olmak üzere çok çeşitli organizmaların bağırsaklarında bulunurlar. Fermente süt ürünlerinden ve insan sütünden izole edilebilirler (Ahl ve ark, 2016).

L. coryniformis; çomak şekilli, katalaz negatif, oksidaz negatif, Gram pozitif bir bakteridir. Yapılan çeşitli çalışmalarda fermente süt ürünlerinden ve sebzelerden izole edilebilir oldukları, ürettiği çeşitli antifungal bileşiklerle de çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Slavica ve ark, 2015).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, LAB' ın ürettiği bazı metabolitlerin, çeşitli patojenlerin gelişimlerini ve biyofilm oluşturmalarını inhibe ettikleri bildirilmiştir (Ouweland ve ark, 2013; Nakatsuji ve ark, 2017; Lukic ve ark, 2018). Metabolitler içerisinde yer alan organik asitler; laktik asit, asetik asit, formik asit, fenillaktik asit, kaproik asit ve propiyonik asit olup, hücre zarındaki yağı çözerek hücre içine nüfuz etmesi ve hücre içinin normalde nötr olan pH'ını düşürerek hücrenin inaktivasyonuna yol açarak etki gösterdiği bilinmektedir (Wieland ve ark, 2002; Welman ve Maddox, 2003; Lukic ve ark, 2018).

LAB'ın metabolitleri içerisinde yer alan hidrojen peroksit (H_2O_2); katalaz enzimi tarafından parçalanırken, LAB katalaz negatif olduğu için parçalanmadan kalmaktadır. Bu avantaj sayesinde, LAB diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Ramos ve ark, 2012). Hidrojen peroksit, bakteri hücre proteinlerindeki ve hücre zarında bulunan lipidlerdeki sülfidril gruplarını okside etmektedir. Bu güçlü oksidasyon aktivitesi, hidrojen peroksit bakterisidal etki gösterme avantajı sağlamaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bazı reaksiyonlarda hidrojen peroksit üreten bakterilerin, ortamdaki oksijeni tüketerek anaerobik koşullar yarattığı ve gelişmek için oksijene ihtiyaç duyan mikroorganizmaların hücre zarı geçirgenlik fonksiyonlarını bozarak antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Lukic ve ark, 2018).

LAB tarafından üretilen karbondioksit (CO_2); düşük konsantrasyonlarda bazı mikroorganizmaların gelişimini teşvik edici, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibe edici etki gösterdiği bilinmektedir (Prince ve ark, 2012).

LAB metabolitlerinden olan diasetil; insanlar ve hayvanlar üzerinde herhangi bir toksik etki göstermeyen ve diğer metabolitler gibi çeşitli patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bilinen bir maddedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda Gram pozitif bakterilerin, diasetile Gram negatif bakterilerden ve mayalardan daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Im ve ark, 2016).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bazı düşük molekül ağırlıklı bileşikler; düşük pH değerlerinde aktif olmaları, ısıya dayanıklı olmaları, geniş spektrumda etki göstermeleri ve asetonda çözünabilir olmaları gibi çeşitli özelliklere sahip olup, bazı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Wang ve ark, 2011).

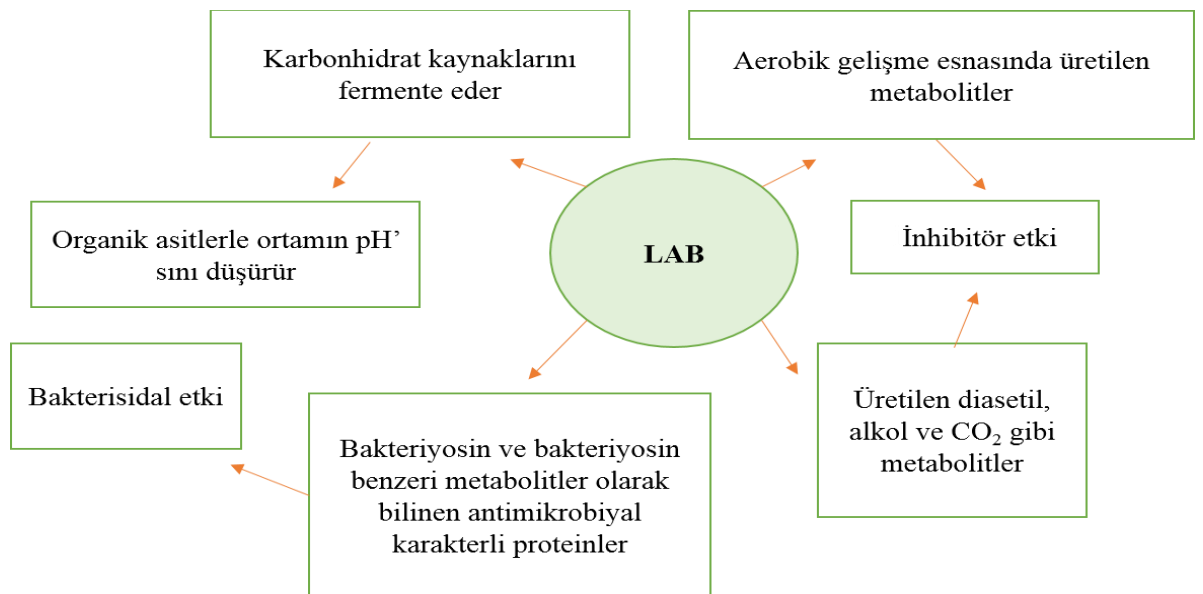
Probiyotik LAB içerisinde yer alan *L. reuteri* bakterisinin ürettiği reuterin ve reutericyclin metabolitlerinin, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu oldukları bilinmektedir. Reuterin: *L. reuteri* bakterisinin gliserolu anaerobik olarak fermente etmesi sonucu oluşan, geniş pH aralığında aktif, ısıya, proteolitik ve lipolitik enzimlere karşı dirençli olan bir metabolittir (Yang ve ark, 2015). Reutericyclin ise, sadece Gram pozitif bakterilere etki

gösteren bir metabolit olup, proteinler için bir iyonofor (iyonları hidrofilik ortamdan hidrofobik ortama transfer eden maddeler için kullanılan terim) görevi görmekte ve sitoplazmik membrana katılarak, zar aracılığıyla ortamın pH değerini düşürmektedir (Karczewski ve ark, 2010; Yang ve ark, 2015).

LAB metabolitlerinden piroglutamik asit: *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* ve *Streptococcus bovis* suşları tarafından üretilen; ısıya karşı dirençli, pH değerinin 2,5'in üzerinde olduğu ortamlarda hedef bakterinin türüne bağlı olarak etkinliğini kaybeden ve antimikrobiyal etki mekanizması organik asitlere benzerlik gösteren bir maddedir (Santos ve ark, 2016).

Bazı LAB'ların antimikrobiyal aktivitelerinden sorumlu olan bakteriyosinler; ribozomal olarak sentezlenen, protein veya peptit yapısındaki, üretici hücreler üzerinde öldürücü etki yapmayan ve genellikle dar etki spektrumuna sahip olarak tanımlanan maddelerdir (Zakaria, 2013). *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* ve *Leuconostoc* cinsine ait birçok bakteriyosin tanımlanmış olup, *Listeria*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* cinsi gibi birçok bakteriye karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Rosenfeldt ve ark, 2003). Yapılan çeşitli çalışmalarda ısı uygulamaları ve pH değişikliklerinin bakteriyosin aktivitesini etkiledikleri bildirilmiştir (Baquerizo ve ark, 2014).

LAB'ın patojen mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitesi çeşitli mekanizmalar ile gerçekleşmektedir (Şekil 2) (Shokryazdan ve ark, 2014; Cerbo ve ark, 2016).



Şekil 2. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri.

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas cinsi: *Pseudomonadaceae* ailesi içinde yer alan, suda ve toprakta yaşayan, insanların yanı sıra bitki ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilen büyük bir non-fermentatif bakteri topluluğudur. Bu cins içerisinde en çok izole edilen türü: 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3 µm boyunda olabilen, basil veya kokobasil morfolojisinde, Gram negatif boyanan *P. aeruginosa*'dır. Spor ve kapsül oluşturmaz ve uçta bulunan tek polar flajeli ile hareketlidir. 17 somatik (O) ve 6 flagella (H) antijeni vardır. O antijeni ısıya dayanıklı, flagella ve fimbria antijenleri ısıya dayanıksızdır. Besiyerlerinde non-mukoid ve mukoid tipte çeşitli koloni morfolojilerinde görülebilmektedir (Harvey ve ark, 2012).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogeneğinde konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynamaktadır. Bakterinin virulans faktörleri hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak incelenmektedir. Virulans faktör üretimi bakteride genetik düzeyde regüle edilmektedir. Etkene bağlı olarak enfeksiyonun gelişme süreci; bakteri adezyon ve kolonizasyonu, lokal invazyon ve yaygın sistemik olmak üzere birbirini takip eden üç basamakta gerçekleşmektedir (Kohler ve ark, 2000; Ochoa ve ark, 2013).

P. aeruginosa insan ve pek çok hayvan türünde (sığır, koyun, keçi, domuz, at, köpek, kedi, sürüngenler gibi) çoğunlukla irinli ve bazen de akut sistemik enfeksiyonlara neden olan oportunistik (fırsatçı) patojen bir bakteridir (Breidenstein ve ark, 2011). Sağlıklı hayvanların deri, müköz membran ve dışkılarında da yaşayabilen bir bakteri olup, mastitis, arthritis, enteritis, pneumonia, peritonitis ve ürogenital sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Alcorn ve Wright, 2004; Öztürk ve ark, 2017).

P. aeruginosa hidrofilik yapıda, nemli ortamı seven bir bakteri türü olup, insanda koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelere yerleşim göstermektedir (Henry ve Speert, 2011). İnsanlarda şiddetli hastane enfeksiyonları ile birlikte, sepsisemi, endokarditis, solunum sistemi enfeksiyonları, dış ve orta kulak iltihabları, korneal ülserler, menenjit, bağırsak, kemik ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Breidenstein ve ark, 2011). *P. aeruginosa*'nın insanlarda etken olduğu enfeksiyonlar ve lokalizasyonları Tablo 2' de özetlenmiştir.

Tablo 2. *P. aeruginosa*'nın etken olduğu enfeksiyonlar ve lokalizasyonları (Breidenstein ve ark, 2011; Ventola, 2015).

• Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları
o Ektima gangrenozum
o Piyoderma
o Yara enfeksiyonu
o Dermatit
o Yanık
• Bakteriyemi
o Primer
o Sekonder
• AIDS ile ilişkili enfeksiyonlar
• Endokardit
o Kalp kapağında enfeksiyon
o Prostetik kalp kapak enfeksiyonu
• Gastrointestinal sistem enfeksiyonları
o Nekrotizan enterokolit
o Epidemik diyare
o Shanghai ateşi
• Göz enfeksiyonları
o Keratit (Kornea ülseri)
o Endoftalmit
• Kemik ve eklem enfeksiyonları
o Sternoartiküler piyoartroz
o Vertebra osteomyeliti
o Simfiz pubis enfeksiyonu
o Ayağın osteokondriti
o Kronik komşuluk yolu ile osteomyelit
• Kulak enfeksiyonları
o Otitis eksterna
o Malign eksternal otit
o Kronik süpüratif otitis media
• Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları
o Menenjit
o Beyin apsesi
• Solunum sistemi enfeksiyonu
o Pnömoni
• Üriner sistem enfeksiyonları
o Akut
o Kronik

2.3. *Staphylococcus aureus*

S. aureus: Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz, 0,5-1,5µm çaplarında koklardır. Koloni morfolojileri yuvarlak düzgün, kabarık, mat, S tipinde olup, koagülaz pozitif suşlardır (Petrov ve ark, 2013).

Stafilokoklar içerisinde virülansı en yüksek olan *S. aureus*' un virülansında rol oynayan faktörler; hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir. Özellikle mukoid türlerinde, polisakkarid yapıda bakteriyi fagositozdan koruyan bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu ekzopolisakkarit konak hücrelerine, kateterler gibi yabancı cisimlere bakterinin adezyonunu kolaylaştırmaktadır. *S. aureus* toksik etkilerini enzimatik aktivite ve sitokin salınımı ile gösteren, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilmektedir (Koneman ve ark, 2006).

S. aureus insanlarda nazofarenks, bazen cilt, daha nadiren vajina ya da istisnai olarak rektum veya perineal bölgede bulunabilir ve aerosol, direk kontakt gibi çeşitli yollarla cilt veya müköz membranlardaki herhangi bir bölgeyi kontamine edebilirler. *S. aureus*'a bağlı insanlarda gelişen enfeksiyonlar: dolaşım sistemi enfeksiyonları (bakteriyemi, endokardit ve perikardit), solunum sistemi, kas ve iskelet, santral sinir sistemi, üriner sistem enfeksiyonları ile karşımıza çıkmaktadır (Nakatsuji ve ark, 2017). Bu enfeksiyonlar içerisinde yara enfeksiyonları en sık görülen enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. *S. aureus* ile ilişkili bütün lokalize primer cilt enfeksiyonları, yumuşak dokulara hızla yayılabilir ve sellülit, lenfanjit ve hatta nekrotizan fasiit meydana getirebilirler. *S. aureus*' un insanlarda etken olduğu enfeksiyonlar Tablo 3' de özetlenmiştir.

Tablo 3. *S. aureus*'un insanlarda yaptığı enfeksiyonlar (Nakatsuji ve ark, 2017).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları:	Apseye dönüşen, derin dokulara yayılarak; osteomyelit, artrit veya bakteriyemiye yol açabilir. Sekonder deri enfeksiyonları: Özellikle egzemalarda görülmektedir.
İmpetigo:	Yüzeyel bir deri enfeksiyonudur.
Büllöz impetigo:	Küçük büllerle karakterizedir. Hastalık eksfoliyatif toksin üreten suşlarla oluşur. Bu yüzden lokalize haşlanmış deri sendromu olarak da bilinmektedir.
Folikülit:	Kıl folikülünün yüzeyel veya derin inflamasyonudur.
Fronkül:	Derin yerleşimli inflamatuvar nodüllerle seyredir.
Karbonkül:	Furonkülün derialtına geçmesiyle oluşan apselerdir.
Hidradenitis süppürativa:	Ter bezlerinin iltihabıdır. Genellikle aksiller bölgede görülmektedir.
Haşlanmış deri sendromu:	<i>S. aureus</i> suşlarına bağlı hastalıklarda görülen bir durumdur. Toksin en sık faj grup II tarafından üretilir.
Toksik şok sendromu:	(1/4 olguda enterotoksin B veya C rol oynar)

S. aureus hayvanlarda da çeşitli enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojen olup, en sık karşılaşılan deride yaptığı hastalıklar Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. *S. aureus*'un hayvanlarda yaptığı enfeksiyonlar (O'Flaherty ve ark, 2005; Morgan, 2008).

Tür	Konak	Hastalıklar/İzole edilen yerler
<i>S. aureus</i>	Sığır	Mastitis, impetigo
	Koyun	Mastitis, dermatitis, kene piyemisi, beningn folikülitis
	Keçi	Mastitis, dermatitis
	Domuz	Meme bezlerinde botriyomikoziz Meme bezlerinde impetigo
	At	Mastitis
	Kedi, köpek	Piyoderma, endometritis, sistitis, otitis eksterna ve diğer irinli durumlar
	Kümes hayvanları	Artitis ve sepsis, bumblefoot, omfalitis

2.4. Biyofilm

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer” adı verilen polisakkarit bazlı jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanmaktadır (Laitman ve ark, 2014).

Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi; ortamın pH' ısı ve sıcaklığı, bakteri türü ve hücre duvarının yapısı, bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddelerin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Simões ve ark, 2010).

Yapılan birçok çalışmada, biyofilmlerin sabit noktalarda biyolojik dönüşümlerini tamamladıkları gösterilmiştir (Simões ve ark, 2010). Bakterilerin yüzeye tutunmaları dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki basamakta gerçekleşen bir oluşumdur (Donlan, 2002). Dönüşümlü basamakta; bakteri hücresi yüzey ile uzun mesafeli elektrostatik, hidrofobik ve Van der Waals gibi zayıf etkileşim güçleri içerisinde. Dönüşümsüz tutunmada ise; kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol, hidrofobik, iyon-dipol, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri içerisinde (Donlan, 2002). Diğer bir evre olan yüzey kolonizasyonunda; tutunan bakteri gelişmekte ve daha sonra bölünmektedir. Biyofilm oluşumunun son aşaması olan kopma veya ayrılma evresinde ise; tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılmaktadır (Simões ve ark, 2010).

Biyofilm yapıları ile bakteriler; nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve immün sistem bileşenlerinin fagositosundan kendilerini koruyarak avantaj sağlamış olurlar (Donlan ve Costerton, 2002). Yapılan çeşitli çalışmalarda; kistik fibroz, akciğer, periodontit, endokardit, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kronik yara, protez kapak, santral venöz kateter gibi enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan zorlukların sebepleri olarak biyofilm yapıları gösterilmiştir (Savage ve ark, 2013; Baquerizo ve ark, 2014; Foster, 2017; Kumar ve ark, 2017).

Bazı bakteriler biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bunlardan en çok bilinenleri; *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'dur. Özellikle *P. aeruginosa* ve *S. aureus*' un oluşturdukları biyofilmler kronik yaraların iyileşmesinde birincil engeldir (Savage ve ark, 2013). Yapılan çeşitli çalışmalarda, *P. aeruginosa*' nın hücre dışına salgıladığı birçok virülans etmeninin kontrolü ve biyofilm oluşumunun; birbiri ile ilişkili “*las*” ve “*rhl*” olarak tanımlanan iki çoğunluğu algılama (ÇA) sistemleri ile kontrol edildiği bildirilmiştir. Bu sistemler; biyofilm oluşumu, elastaz (*LasA* ve

Las B), alkalen proteaz, hidrojen siyanid, ekzotokzin A, piyosiyanin, lektin, rhamnolipid, sigma etmen (*rpoS*), ve süperoksid dismutaz başta olmak üzere çeşitli virülans etmenlerin üretimini kontrol ettiği bilinmektedir (Terada ve ark, 1999). *Las B* elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de “*las* sistemi” olarak adlandırılan birincil sistem; *Las I* (3-oxo-C12- HSL- L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu *AI* sentaz geni) ve *Las R* (“transcriptional activator” proteini kodlayan geni) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem; biyofilm oluşumunu ve *Las B* elastaz, *Las A* proteaz, ekzotokzin A gibi diğer ekstrasellüler virülans etmenlerinin üretimini kontrol etmektedir (Henry ve Speert, 2011). Yapılan çeşitli çalışmalarda, *P. aeruginosa*’nın glukoprotein ve musinin bulunduğu yüzeylerde geliştiğinde, tobramisin gibi pek çok antibiyotiğe karşı gösterdiği direncin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Joint ve ark, 2007; Kim ve ark, 2009).

S. aureus çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunan, fagositoza karşı direnç sağlayan biyofilm tabakası ile ortam şartlarına oldukça dayanıklı olan bir mikroorganizmadır (Cucarella ve ark, 2001). *S. aureus*’lar da poli-N-süksinil- β -1-6 glikozamin (PIA-PNSG) polisakkarit tutunma matriksinin üretiminden sorumlu bir operon olan, *icaADBC* gen kümesi bulunmaktadır. *icaADBC* tarafından üretilen bu maktriğin hücrelerin birbirine yapışmasını sağladığı ve *icaADBC* gen kümesini barındıran *S. aureus* suşlarının, potansiyel biyofilm üreticisi olduğu bilinmektedir (Szcuka ve ark, 2013). Konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda, *ica* operonunda yer alan *icaA* geninin, UDP-N-asetilglukozaminden N-asetilglukozamin oligomerlerinin sentezinde yer alan N-asetilglukozamil transferaz üretiminden sorumlu olduğu, N-asetilglukozaminin ise biyofilm tabakasının ana maddesini oluşturduğu bildirilmiştir (Szcuka ve Kaznowski, 2014).

2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Yara Enfeksiyonlarında Kullanımları

Deri dış çevreye karşı ilk savunma hattını temsil eden önemli bir organdır. Başlıca işlevleri; mekanik direnci sağlamak, su ve tuz kaybını düzenlemek ve vücudu mikroorganizmaların neden olduğu çevresel zararlardan korumaktır. Yanık, travma veya bazı deri hastalıklarıyla, komensal ve patojenler arasındaki dengenin bozulmasıyla, hem çevrede bulunan hem de florada bulunan bakterilerin deride hastalık oluşturma riski artmaktadır (Barzegari ve ark, 2020).

Yapılan moleküler çalışmalarla deri mikrobiyotasında: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* filumların baskın olduğu ve *Propionibacterium* spp.,

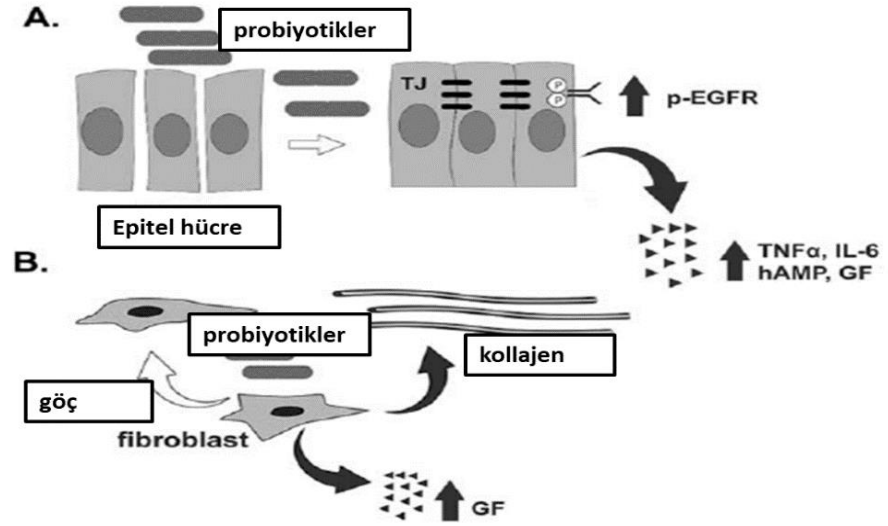
Staphylococcus spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp., bakterileri ve *Malassezia* mantar cinslerinin olduğu bildirilmiştir (Jeong ve ark, 2018).

Son yıllarda antimikrobiyal direncin, ciddi bir küresel tehdit olduğu açıkça görülmektedir. Bu nedenle, yara enfeksiyonlarına neden olan patojenlerin tedavilerinde kullanılan mevcut antibiyotiklere, alternatif gösterilebilecek terapötik tedavilere ilgi artmaktadır. Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD), alternatif tedavilerin bilimsel çalışmalarının daha fazla yapılması ve kanıtlarının güçlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Günümüzde araştırılan konu başlıkları arasında yer alan alternatif tedavilerin bazılarının; antimikrobiyal direnç inhibitörlerini (aljinat ve poliaminler gibi) içerdiği, bazılarının ise farklı mekanizmalara sahip diğer kimyasal ve biyolojik ajanlar olan; polianyonik maddeler, enzimler, potasyum permanganat, antimikrobiyal peptitler, metal iyonları, halojen iyonlarını içerdiği görülmektedir. Bunlara ek olarak bakteriyofajlar ve probiyotikler gibi yararlı mikroorganizmalar da araştırılan önemli konu başlıklarıdır (Barzegari ve ark, 2020).

Yara enfeksiyonlarına çoğunlukla: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* gibi biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu bilinmektedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda; çeşitli sebeplerle deri mikrobiyotasının doğal dengesinin bozulması durumunda, probiyotik LAB' ın bağışıklık hücrelerinin üretimini uyararak, yara enfeksiyonlarına yol açan bu patojenlerin rekabetçi bir şekilde dışlanması yoluyla, konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler yaratarak işlev gördüğü bilinmektedir (Karczewski ve ark, 2010; Wong ve ark, 2013; Mohammedsaeed ve ark, 2015). Ayrıca LAB' ın, patojenin üremesini engelleyen ve çekirdek algılama sistemine müdahale eden biyoaktif molekülleri ürettiği bildirilmiştir (Yang ve ark, 2015; Nakatsuji ve ark, 2017; Lukic ve ark, 2018).

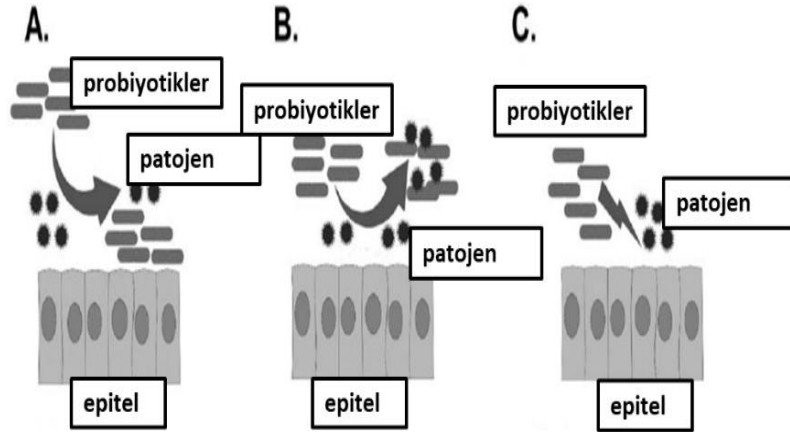
Epitel hücrelerin ve fibroblastların işlevlerinin; kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiği göz önüne alındığında, probiyotikler tarafından epidermal bariyerin modüle edilmesinin bağışıklık bileşenleri üzerindeki etkileri ile yakından bağlantılı olduğu görülmektedir (Slama ve ark, 2013; Pastar ve ark, 2014).

Yapılan çeşitli çalışmalarda probiyotik LAB' ın epitel hücrelerin fonksiyonlarını modüle ederek, patojen bakteriler ile yarışmalı olarak adezyonda rol oynadığı bildirilmiştir (Şekil 3, 4) (Lukic ve ark, 2018).



Şekil 3. LAB'ın immün sistem hücreleri ile olan etkileşimi.

A. LAB'ın epitel hücreleri üzerindeki modüle edici etkisi: Epitel hücrelerden TNF-a, IL-6, antimikrobiyal peptitlerin (HAMP) ve büyüme faktörlerinin (GF) salınımını uyararak, immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu, patojenin eliminasyonunu ve doku rejenerasyonunu artırır. B. LAB, fibroblastların farklılaşmasını, göçünü, kolajen birikmesini ve GF üretimini indükler (Lukic ve ark, 2018).



Şekil 4. LAB'ın yara enfeksiyonlarına yol açan patojen bakterilere karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal etkiler.

A. LAB, patojenin üremesini engelleyen ve/veya çoğunluğu algılama sistemine müdahale eden biyoaktif molekülleri serbest bırakır. B. LAB, patojenin koagregasyonunu ve mukozal yüzeylerden elimine edilmesini sağlar. C. LAB, epitel hücre reseptörlerine bağlanarak deri ve mukozal yüzeylerde patojenin yer değiştirmesine neden olur (Lukic ve ark, 2018).

Bugüne kadar LAB’ ın çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkilerini araştıran çok sayıda in vitro çalışma yapılmıştır (Fijan ve ark, 2019). Çalışmalarda kullanılan ana teknikler değerlendirildiğinde, agar kuyu difüzyon testi ve farklı varyasyonları karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *A. baumannii* türleri ise, sıklıkla araştırılan patojenler arasında yer almaktadır (Jones ve ark, 2010; Varma ve ark, 2011; Lopes ve ark, 2017; Onbas ve ark, 2019).

Son yıllarda yapılan çeşitli in vitro çalışmalar değerlendirildiğinde, yara enfeksiyonlarına neden olan patojenlere karşı en çok kullanılan probiyotiklerin, laktik asit bakterileri olduğu ve içlerinden *L. plantarum*, *L. acidophilus* ve *L. reuteri* türlerinin daha çok araştırıldığı görülmektedir. Araştırmacılardan bazıları probiyotik suşlar tarafından üretilen süpernatantları veya ekstraktları kullanırken (Ramos ve ark, 2012; Mohammedsaeed ve ark, 2014; Lopes ve ark, 2017; Onbas ve ark, 2019), bazıları canlı probiyotik kültürlerini ve birden fazla probiyotik türlerini aynı anda kullanmışlardır (Prince ve ark, 2012; Lopes ve ark, 2017; Li ve ark, 2018).

Yapılan bazı çalışmalarda, postbiyotik olarak adlandırılan hücresiz metabolitlerin kullanımlarının, canlı mikroorganizmanın kendisinin kullanımına kıyasla daha güvenli ve etkili oldukları bildirilmiştir (Lukic ve ark, 2017). Hücre lizatlarının kullanıldığı diğer çalışmalarda hem lokal hem de sistemik olarak bağışıklık sistemini modüle ederek, yara enfeksiyonu ile ilişkili parametreleri azalttığı bildirilmiştir (Yang ve ark, 2015; Nakatsuji ve ark, 2017).

Probiyotik LAB’ ın *S. aureus* ve *P. aeruginosa* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkilerini gösteren çeşitli hayvan modelli çalışmalar da mevcuttur. Söz konusu çalışmalar incelendiğinde; deney hayvanlarında yanık yaralar, iskemik yaralar ve cilt lezyonlarının oluşturulduktan sonra, probiyotiklerin topikal ve lokal enjeksiyonu şeklinde kullanıldıkları görülmüştür. Bu çalışmalarda, probiyotiklerin yaranın enfekte yanık veya kesik bir yara olup olmadığına bakılmaksızın, patojenlere karşı antagonistik etkisi doğrulanmıştır. Topikal olarak uygulanan LAB suşlarının, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde inhibe edici etkileri belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda test edilen probiyotiklerin, yara enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılabilir oldukları sonucuna varılmıştır (Valdez ve ark, 2005; Shu ve ark, 2013; Argenta ve ark, 2016; Ong ve ark, 2019; Sürmeli ve ark, 2019).

Yara iyileşmesini hedefleyen deneylerde, fareler ve sıçanlar en yaygın kullanılan hayvan modelleridir. Bununla birlikte, bu hayvanların insanlara kıyasla daha ince bir

epidermisi ve dermisi olduğu düşünülürken, doğru bir metod olarak uygulanabilirliği sorgulanması gerekmektedir. Öte yandan benzer yapı ve iyileşme yönünden, derisi insan derisine en yakın hayvanlar üzerinde yapılan deneyler (özellikle domuz); yüksek maliyet, genetik manipülasyon eksikliği ve hayvanların kullanım zorluğunu dezavantaj olarak göstermektedir. Bu nedenle konu ile ilgili yapılan çalışmaların daha çok in vitro düzeyde sınırlı kalmış olduğu görülmektedir (Chisholm ve Xu, 2012; Johnson ve ark, 2018; Sami ve ark, 2019).

Son yıllarda yapılan hayvan modeli çalışmalar değerlendirildiğinde, en sık kullanılan probiyotik LAB suşun *L. plantarum* ATCC 10241 olduğu ve çeşitli probiyotikler ile başta *P. aeruginosa* ve ardından *S. aureus* olmak üzere çeşitli patojenlere karşı etkili bir antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Sürmeli ve ark (2019), *L. plantarum* ATCC 10241 suşunun, MRSA ATCC 43300 patojeninden önce lokal olarak (tek doz 1×10^6 CFU/mL) farelere uygulamış ve probiyotik suşun yara enfeksiyonlarından korunma ve tedavisinde kullanılabilir olduğunu değerlendirmiştir. Satish ve ark (2017), *L. plantarum* ATCC 10241 suşunun tavşanlarda lokal olarak uygulama (tek doz 3×10^8 CFU/mL) sonrası, *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu yanık yara enfeksiyonunun ve açılan yara izinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Ong ve ark (2019), *L. plantarum* USM8613 suşuna ilişkin hücresiz süpernatantın parafilm ile %10 (v/v) protein açısından zengin fraksiyonunun, farelerde tek doz olarak lokal uygulaması sonrası, *S. aureus*'u yüksek oranda inhibe ettiğini ve yara iyileşmesinin arttırıldığını bildirmişlerdir. Huseini ve ark (2012) kefir bakterisinin ve özütlerinin, çeşitli patojenler üzerindeki etkilerini hem in vitro hem de sıçan yanık modelleri ile araştırmışlar ve her iki çalışmayla antimikrobiyal ve yara iyileşmesinde pozitif etkileri olduğunu değerlendirmişlerdir. Yapılan in vitro çalışmalarda *L. plantarum*'un, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunu ve yanık yara modellerindeki etkene bağlı gelişen enfeksiyonları azalttığı gösterilmiştir (Baquerizo ve ark, 2014). Probiyotikler içerisinde yer alan laktobasillerin epitel hücrelerinin modüle edilmesinin yanı sıra, onarımında da rol oynadığı bilinmektedir. Tüysüz fare modeli deneylerinde UVB ile deride hasar oluşturulmuş ve artmış kollajen sentezi ile *L. plantarum*'un varlığının korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Nasrabadi ve ark, 2011).

Probiyotik LAB'ın antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çeşitli klinik çalışmalar mevcuttur. Söz konusu bu çalışmalarda, LAB topikal olarak yanık yara ve ayak ülserlerinde kullanılmış, bazılarında ise hastalara oral olarak da uygulanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışmalara ilişkin bulgular değerlendirildiğinde; probiyotik uygulaması sonrası patojenik yükün azaldığı görülmektedir (Thomson ve ark, 2012; Mayes ve ark, 2015). Ayrıca ameliyat

sonrası probiyotik tüketiminin (esas olarak *L. plantarum* 299) konak bağışıklık sistemini uyardığı, postoperatif enfeksiyon sayısını azalttığı, hastanede yatış süresi ve reçete edilen antibiyotik miktarını azalttığı değerlendirilmiştir (Rayes ve ark, 2002; Roudsari ve ark, 2015).

Probiyotik bakterilerden LAB, hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda en çok tercih edilen türleri içermektedir. Tablo 5’de bazı probiyotik bakterilerin, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerindeki inhibe edici etkilerini gösteren çeşitli çalışmalara değinilmiştir (Sikorska ve Smoragiewicz, 2013; Mohammedsaeed ve ark, 2014; Ramos ve ark, 2012; Ahl ve ark, 2016; Lukic ve ark, 2018).

Tablo 5. Bazı probiyotik bakterilerin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerindeki inhibe edici etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar.

Probiyotik	Etkinlik	Referans
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Atopik dermatitis	(Elbe-Bürger ve ark, 2002)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Atopik dermatitis/Yara enfeksiyonları	(Rosenfeldt ve ark, 2003)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Atopik dermatitis	(Rosenfeldt ve ark, 2003)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 10241	Antimikrobiyal etkinlik <i>P. aeruginosa</i>	(Valdez ve ark, 2005)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Epidermal keratinositlerin korunması	(Segawa ve ark, 2008)
<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	Atopik dermatitis	(Piccardi ve Manissier, 2009; Watanabe ve ark, 2009)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH5	Antimikrobiyal etkinlik	(Ahmed ve ark, 2010)
<i>Lactobacillus fermentum</i> NCIMB7230	Antimikrobiyal etkinlik	(Jones ve ark, 2010)
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730, <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i>	Antimikrobiyal etkinlik	(Thomas ve ark, 2011)
<i>Bifidobacteria</i> spp.	Yara enfeksiyonları -hassas ciltlerde kullanım	(Archer ve ark, 2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	Atopik lezyonların engellenmesi	(Goto ve ark, 2011)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG lizat ve süpernatantları	in vitro hücre kültüründe <i>S. aureus</i> gelişimi ve adezyonunu inhibe edici etkinlik	(Mohammedsaeed ve ark, 2014)
<i>Pediococcus acidilactici</i> CHOOZITM <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92	Antimikrobiyal etkinlik	(Arques ve ark, 2015)

<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ150/TAB50		
<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i>	Antimikrobiyal etkinlik	(Al-Malkey ve ark, 2017)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> DSMZ 20081, <i>L. acidophilus</i> LA-5, <i>L. plantarum</i> 226V, <i>Lactobacillus salivarius</i> DSMZ 20555, <i>L. casei</i> DSMZ 20021 (Süpernatantları)	<i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> biyofilmlerinin inhibe edilmesi için topikal uygulamalar	(Lopes ve ark, 2017)
<i>L. reuteri</i> DSMZ 17938, <i>L. acidophilus</i> DSMZ, <i>Bacillus coagulans</i> DSMZ, <i>L. plantarum</i> 299V, DSM 9843, <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	<i>P. aeruginosa</i> Disk difüzyon metodu ile antibiyotiklerle sinerjik kullanımı	(Moghadam ve ark, 2018)
<i>L. plantarum</i> F-10 (Hüresiz süpernatantı)	<i>P. aeruginosa</i> , MRSA üzerinde antimikrobiyal, antibiyofilm etki	(Onbas ve ark, 2019)
<i>L. acidophilus</i> CL1285 <i>L. casei</i> LBC80R, <i>L. rhamnosus</i> CLR2	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> için antibiyotiklerle birlikte topikal uygulamalarda	(Li ve ark, 2018)

(Tablo 5' in devamı)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon Örnekleri

Çalışmamız için Aydın Merkez’de yer alan marketlerden ve halk pazarlarından; peynir (beyaz peynir, koyun peyniri, tulum peyniri, lor ve çökelek), yoğurt ve kefir çeşitlerinden oluşan, toplam 12 marka fermente süt ürünü çalışma materyali olarak kullanıldı (Tablo 6). Örnekler aseptik ve soğuk koşullarda, en geç 4 saat içerisinde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji rutin teşhis laboratuvarına getirilerek bakteri izolasyonu işlemlerine başlandı ve izolasyon işlemleri tamamlanıncaya kadar +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

Tablo 6 . Fermente süt ürünleri ve alındıkları yerler.

Materyal	Alındığı yer
Beyaz peynir, Koyun peyniri	Marka 1, Pazar
Beyaz peynir	Marka 2, Market
Koyun peyniri	Marka 3, Pazar
Lor peyniri	Marka 4, Pazar
Çökelek	Marka 5, Market
Yoğurt	Marka 6, Market
Kefir, Yoğurt	Marka 7, Pazar
Beyaz peynir	Marka 8, Pazar
Tulum peyniri, Koyun peyniri	Marka 9, Market
Beyaz peynir	Marka 10, Market
Lor peyniri, Yoğurt	Marka 11, Pazar
Yoğurt	Marka 12, Market

3.1.2. Standart Bakteri Suşları

Çalışmada, *P. aeruginosa* ATCC 15692, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* ATCC 6538, *S.*

aureus ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 35556 standart suşları kullanıldı. Standart suşlar, Amerikan Tıp Kültürü Koleksiyonu (ATCC)’den ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein Merkezi Araştırma Laboratuvarı’na ait bakteri koleksiyonundan temin edildi (Tablo 7). Çalışma öncesi tüm standart patojen suşlar, gelişimlerine uygun besiyerlerine ekilerek, 37°C’de 24-48 saat inkübe edildi. İki kez aktifleştirilen suşlardan, stok kültürler hazırlanıp, -80 °C’de % 20’lik gliserol içerisinde muhafaza edildi.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan standart bakteri suşlarına ilişkin detaylı bilgiler.

Bakteri suşu	İzolasyon yeri	Uygulamalar	Besiyeri	Gelişme koşulları
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15692)	Enfekte yara	- Bakteriyofaj - Fırsatçı patojen araştırmaları - Piyosiyanin üretimi	Nutrient agar (NA) Nutrient broth (NB)	37°C, aerobik
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Dış kulak enfeksiyonu	- Antimikrobiyal koruyucuların testi - Medya testi - Kalite kontrol testi - Sterilite testi - Rhamnolipid üretimi - İlaç ve kişisel bakım testleri	Nutrient agar (NA) Nutrient broth (NB)	37°C, aerobik
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Kan kültürü	- Kontrol suşu - Gıda testi - Medya testi (MHA) - Kalite kontrol suşu - Antibiyotik duyarlılık disk testleri	Tryptic Soy Broth (TSB) Tryptic Soy Agar (TSA)	37°C, aerobik
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 29213)	Deri	- Kalite kontrol testi - Duyarlılık testi - İlaç deneyleri	Tryptic Soy Broth (TSB) Tryptic Soy Agar (TSA)	37°C, aerobik
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 6538)	Klinik izolat	İlaç deneyleri	Nutrient agar (NA)	37°C, aerobik

<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 25923)	(İnsan) Lezyon	• Antimikrobiyal ajanların testi • Antimikrobiyal el yıkama formülasyonlarının test edilmesi • Dezenfektanların test edilmesi • İlaç deneyleri • Kişisel bakım testleri • Duyarlılık testi • İnhibisyon testi • Medya testi • Kalite kontrol suşu	Tryptic Soy Broth (TSB) Tryptic Soy Agar (TSA)	37°C, aerobik
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 35556)	Klinik izolat	• Kalite kontrol suşu • Süt ürünlerinin incelenmesi • Duyarlılık disk testleri • Su testi • Enterik araştırmalar	Tryptic Soy Broth (TSB) Tryptic Soy Agar (TSA)	37°C, aerobik
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 33591)	Klinik izolat	• Hemoliz çalışması (Hemoliz pozitif suş)	Nutrient agar (NA) Nutrient broth (NB)	37°C, aerobik

(Tablo 7' nin devamı)

3.1.3. Besiyerleri ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilere ilişkin bilgiler Tablo 8 ve Tablo 9’da verildi.

Tablo 8. Çalışmada kullanılan besiyerleri.

Besiyeri	İçerik	Hazırlanışı	Kullanım Amacı
de Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth (Oxoid CM0359)	Kazein pepton 10,0 g/L, Et özütü 10,0 g/L, Maya özütü 4,0 g/L, D (+) glukoz 20,0 g/L, Di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/L, Tween 80 1,0 g/L, Di-amonuyum hidrojen sitrat 2,0 g/L, Sodyum asetat 5,0 g/L, Magnezyum sülfat 0,2 g/L, Manganez sülfat 0,4 g/L	52,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanır.	LAB’ ın stok kültürlerin hazırlanması ve çalışma öncesi aktifleştirilmesinde kullanıldı.
de Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar (Oxoid CM0361)	Siklohegzimit içermeyen MRS Agar	Kazein pepton 10,0 g/L, Et özütü 10,0 g/L, Maya özütü 4,0 g/L, D (+) glukoz 20,0 g/L, Di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/L, Tween 80 1,0 g/L, Di-amonuyum hidrojen sitrat 2,0 g/L, Sodyum asetat 5,0 g/L, Magnezyum sülfat 0,2 g/L, Manganez sülfat 0,04 g/L, Agar-agar 14,0 g/L	66,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanır. 45 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür.
	Siklohegzimit içeren MRS Agar	50 mg/L siklohegzimit içerecek şekilde hazırlanır.	LAB’ın ilk izolasyon işleminde kullanıldı.
M17 Agar (Merck 115108)	Soya pepton 5 g/L, Kazein pepton 2,5 g/L, Sığır eti pepton 2,5 g/L, Maya ekstraktı 2,5 g/L, Sığır eti ekstraktı 5 g/L, Laktoz monohidrat 5 g/L, Askorbik asit 0.5 g/L, Sodyum, β -gliserofosfat 19 g/L, Magnezyum sülfat 0,25 g/L, Agar agar 12,75 g/L	33,25 g’ ı 1000 mL distile suya eklenir, kaynayana kadar ısıtılır ve çözüldükten sonra 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilir. 45 °C’ ye kadar soğutulup petri kaplarına dökülür.	LAB’ın ilk izolasyon işleminde kullanıldı.

M17 Broth (Merck 115029)	Soya unu peptonu 5 g/L, Et peptonu 2,5 g/L, Kazein pepronu 2,5 g/L, Maya ekstraktı 2,5 g/L, Et ekstraktı 5 g/L, Laktoz monohidrat 5 g/L, Askorbik asit 0,5 g/L, Sodyum β -gliserofosfat 19 g/L, Magnezyum sülfat 0,25 g/L	42, 25 g' ı 1000 mL distile suya eklenir, kaynayana kadar ısıtılır ve çözündükten sonra 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir.	LAB'ın ilk izolasyon işleminde kullanıldı.
Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 22092)	Kazein pepton 17,0 g/L, Soya pepton 3,0 g/L, D(+) Glukoz 2,5 g/L, NaCl 5,0 g/L, Di-potasyum hidrojen fosfat 2,5 g/L	40,0 g besi yeri 1 litre distile suda çözülür ve 121°C 'da 15 dakika otoklavda sterilize edilir.	
Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 22091)	Kazein pepton 15,0 g/L, Soya pepton 5,0 g/L, NaCl 5,0 g/L Agar-agar 15,0 g/L.	40,0 g besi yeri 1 litre distile suda çözülür ve 121 °C 'da 15 dakika otoklavda sterilize edilir. 45 °C' ye kadar soğutulup petri kaplarına dökülür.	Patojen bakterilerin geliştirilmesinde kullanıldı.
Nutrient Broth (NB) (Oxoid CM0001)	Beef Ekstrakt 1 g/L, Yeast Ekstrakt 2 g/L, Peptone 5 g/L, Sodyum Klorit 5 g/L	20 g dehidre besiyeri 1 litre su ile çözülür ve 121 ° C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir.	
Nutrient Agar (NA) (Oxoid CM0003)	Pepton 5,0 g/L, Et ekstraktı 3,0 g/L, Agar-agar 12,0 g/L		
Skim Milk (Merck 70166)	20 g Skim milk, 100 mL distile su	20 g Skim milk, 100 mL distile suda çözüldükten sonra, 118 °C' de 10 dakika otoklavlanır.	Mikroorganizmaların stoklarının -20 ve -80 °C' de muhafaza edilmesinde kullanıldı.
Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Merck 1.10493)	(Beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar) 27,5 g/L, D(+) Glucose 2,0 g/L, NaCl 5,0 g/L, Na ₂ HPO ₄ 2,5 g/L	37,0 g dehidre besiyeri 1 litre distile suda çözülür ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanır.	Patojen bakterilerin geliştirilmesinde kullanıldı.

(Tablo 8' in devamı)

Tablo 9. Çalışmada kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	İçerik	Hazırlanışı	Kullanım amacı
% 0,1' lik Peptonlu Su Çözeltisi	0,1 g Pepton 100 mL distile su	0,1 g Pepton 100 mL distile suda çözündürülür. 121 °C' de 15 dakika otoklavladı.	Seyreltme çözeltisi olarak, LAB izolasyonunda kullanıldı.
% 0,9' luk Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (FTS)	0,9 g NaCl 100 mL distile su	0,9 g NaCl 100 mL distile su içerisinde çözündürüldü.	Gram boyamada bakterilerin fiksasyonunda kullanıldı.
Steril Serum Fizyolojik (SF)	8.5 g NaCl, 1000 mL distile su	Homojen olacak şekilde karıştırılır ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.	Biyofilm yapıların yıkanmasında kullanıldı.
Siklohegzimit Çözeltisi (Sigma-Aldrich)	50 mg/mL Siklohegzimit	40 mL, 0,5 g/L stok çözeltilerden alınarak 360 mL' lik MRS Agar besiyerine ilave edildi.	Selektif ön zenginleştirme ortamında maya-küf inhibitörü olarak kullanıldı.
% 3' lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Çözeltisi (Bactident Catalase, Merck 1.11351)	3 mL H ₂ O ₂ 100 mL distile su	100 mL distile su 3 mL H ₂ O ₂ ' e eklenerek hazırlandı.	Katalaz testi için kullanıldı.
1M Sodyum Hidroksit Çözeltisi	4 g NaOH	100 mL distile suda çözündürülerek hazırlandı.	HS'lerin pH'larının ayarlanması için kullanıldı.
1 M Hidroklorik Asit Çözeltisi	Yoğunluğu 1, 19 olan % 38' lik derişik HCl' den 8,062 mL	Distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.	HS'lerin pH'larının ayarlanması için kullanıldı.
Kristal Viyole Çözeltisi	Kristal viyole 1g, Asit-Fenik kristali (fenol kristali) 2 g, etil alkol (% 96) 10 mL, distile su (100 mL)	Kristal viyole ve fenol kristali porselen havanda ezilip üzerine yavaşça etil alkol eklenerek hazırlandı.	Gram boyamada ve biyofilm yapıların boyanmasında kullanıldı.
Lugol çözeltisi	İyot 1g, potasyum iyodür (KI) 2g, distile su 300 mL	İyot ile KI havanda iyice ezilip üzerine yavaş yavaş distile su ilave edilip hazırlandı.	Gram boyamada kullanıldı.
Safranin Çözeltisi	Safranin 0,5 g, etil alkol 10 mL, distile su 100 mL	Etil alkol içinde çözündürüldükten sonra, distile su ile karıştırılarak hazırlandı.	Gram boyamada kullanıldı.
5X TBE Tamponu	Tris-baz (Sigma): 54 g/L, Borik asit (Riedel-de Haën) 27,5 g/L, EDTA.2H ₂ O; (Sigma) 3,72 g/L.	Tampon içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı, pH 8.13-8.30'a ayarlandı.	(PZR) (5 kat seyreltilerek) Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforezde tampon çözelti olarak kullanıldı.

% 1,5' luk Agaroz Jel (Sigma-Aldrich A9539)	Agaroz	1 g / 1,5 g agaroz üzerine 100 mL 1X TBE tamponu eklenir ve mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirildi. Soğutulduktan sonra 5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek elektroforez tankına döküldü.	Genomik DNA'ların ve PZR ürünlerinin elektroforezde görüntülenmesi için kullanıldı.
Agaroz Jel	Agaroz	Agaroz, çalışılacak miktarda 5X TBE Tamponu eklenerek hazırlandı.	Elektroforezde kullanıldı.
6X Yükleme Tamponu	% 0,015 Bromfenol Mavisi, % 0,015 Xylene Cyanol FF, % 30 Gliserol.	0,015 g Bromfenol Mavisi ve 0,015 g Xylene Cyanol FF tartılarak üzerine 30 mL Gliserol eklendi. Steril distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.	Elektroforezde, PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde kullanıldı.
SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.)			Agaroz jelde örneklerin görüntülenmesi için kullanıldı.

(Tablo 9'un devamı)

3.1.4. Test Kitleri ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan test kitleri ve cihazlar Tablo 10 ve Tablo 11' de verildi.

Tablo 10. Çalışmada kullanılan test kitleri.

Test kiti	Marka	Kullanım amacı
Oksidaz test stribi	Bactident Oxidase, Merck 1.13300	Oksidaz testi
E-Test MİK test stripleri: Klindamisin(LIO-92072) (0.016-256 mg/L) Tetrasiklin (LIO-92114) (0.016-256 mg/L) Gentamisin (LIO-92010) (0.064-1024 mg/L) Streptomisin (LIO-92111) (0.064-1024 mg/L) Vankomisin (610247) (0.016-256 mg/L)	Liofilchem, Italya	LAB izolatlarının antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik olarak belirlenmesinde kullanıldı.
InstaGene Matrix DNA izolasyon kiti	Bio-rad	DNA izolasyonu
Markır	Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, SM0321	LAB DNA fragmentlerinin karşılaştırılmasında kullanıldı.
0.22 µm çapındaki mikrofiltre	Millipore, Millex-GP Syringe filter SLGP033RS	Hücresiz süpernatantların hazırlanmasında kullanıldı.

Tablo 11. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka-Model	Kullanım amacı
Anaerobik kavanoz	Oxoid Anaero Jar	LAB izolatlarının oksijensiz ortamda inkübasyonu için kullanıldı.
6 mm çaplı steril agar delici	ISOLAB (05112001)	Antimikrobiyal aktivite deneylerinde agar besiyerinde kuyular açmak için kullanıldı.
Etüv	Memmert	Mikroorganizmaların inkübasyonu için kullanıldı.
Hücre densitometre cihazı (McFarland birimi)	Biosan	Mikroorganizma yoğunluğunu belirlemede kullanıldı.
Santrifüj cihazı	Mikro 200R (Hettich)	Örneklerin santrifüjü için kullanıldı.
Termal döngüleme cihazı	bioer Life Express TC-96/G/H(b) Thermal Cycle	PZR işlemi termal döngüleme cihazında gerçekleştirildi.
Elektroforez cihazı	Elektroforez tankı: Biorad Güç kaynağı: Thermo Fisher Scientific EC250-90	Elektroforez işlemi için kullanıldı.
Görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Infinity VX2 1100	Görüntüleme işlemi için kullanıldı.
Işık mikroskobu	Olympus CX21FS1, Japan	LAB identifikasyonunda kullanıldı.
Saflaştırılmış PZR ürünü ölçüm cihazı	Nano (MAESTROGEN)	PZR ürünlerinin saflaştırma işleminden sonra DNA miktarlarının ölçülmesi amacıyla kullanıldı.
Spektrofotometre cihazı	Thermo Multiscan Spectro	Biyofilm yapıların OD ₅₉₅ nm dalga boyunda ölçülmesi için kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

LAB suşlarının izolasyonu için, çalışma örneklerinin homojenizasyonu % 0.1' lik steril peptonlu su çözeltisi kullanılarak yapıldı. İzolatların dilüsyonları 1/10 olacak şekilde ardışık olarak, % 0.1'lik steril peptonlu su içeren tüplerde hazırlandı ve dilüsyonlarından 0.1 mL alınarak, 50 mg/L siklohegzimit içeren MRS ve M17 agara yayma ekimleri yapıldı. Ardından 37 °C'de anaerob koşullarda 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda farklı morfolojide kolonilerden seçilip MRS ve M17 agara ekimleri yapıldı ve 37°C'de anaerob koşullarda 48 saat inkübasyona bırakıldı. Tek düşen kolonilerden saf kültür elde etmek amacıyla ekimler tekrarlandı (Halkman, 2005; Azadnia ve Khan, 2009).

3.2.1.1. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

İzolatların saf kültürleri elde edildikten sonra: Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı.

3.2.1.1.1. Gram boyama

LAB izolatlarının saf kültürlerinden alınan koloniler, lamın üzerine fizyolojik tuzlu su damlatıldıktan sonra yayılarak fikse edilip, 1 dakika kristal viyole ile muamele edildi. Ardından boya akıtılıp distile su ile yıkandı. Preparat lugol çözeltisinde 1 dakika bekletilerek, distile su ile yıkanıp, alkol (% 95) ile 15 saniye muamele edildi. Son olarak safranin boyası ile 30 saniye boyanıp, yıkandıktan sonra kurutulan preparatlar mikroskopta, 100x' lik immersiyon objektifinde incelenip, Gram pozitif olan izolatlar seçildi (Halkman, 2005).

3.2.1.1.2. Katalaz testi

LAB izolatlarına ait saf kültürlerden alınan kolonilere, lam üzerinde % 3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatıldı ve gaz kabarcıklarının oluşmaması katalaz testi açısından negatif olarak değerlendirildi (LAB suşları katalaz negatif) (Halkman, 2005).

3.2.1.1.3. Oksidaz testi

LAB izolatların saf kültürlerinden alınan koloniler, oksidaz test strip üzerine inokule edildi ve mor renk oluşumunun gözlenmemesiyle izolatların oksidaz negatif oldukları belirlendi (Halkman, 2005).

3.2.2. Bakterilerin Stoklanması

Çalışmada kullanılan *Lactococcus* izolatı % 20 gliserol içeren M17 sıvı besiyerinde, laktobasil izolatları % 20 gliserol içeren MRS sıvı besiyerinde, diğer bakteriler ise % 20 gliserol içeren Brain Hearth Infusion (BHI) sıvı besiyerinde -20 °C’de saklandı.

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma öncesi LAB izolatlarının MRS agara ekimleri yapıp, anaerobik olarak 37 °C’de, 48 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatların kültürlerinden birer koloni alınıp, içinde 1 mL steril su bulunan eppendorf tüplerinde süspansiyonları hazırlandı. 12000 rpm’ de 1 dakika santrifüj edilip, süpernatantları atılıp pellete 200 µL InstaGene Matrix DNA (Bio-rad) kitinden eklendi ve 56 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, örnekler 10 saniye vortekslenip (yüksek devirde), 100 °C’de 8 dakika inkübe edildi. Örnekler tekrar 10 saniye vortekslenip, 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası elde edilen üstteki berrak faz DNA kaynağı olarak kullanıldı. DNA miktarları ölçülerek, A260/A280 oranı 1.8 ile 2 arasında olan DNA’lar kullanılabilir olarak kabul edildi. İzole edilen DNA’lar -20 °C’de kullanılmak üzere muhafaza edildi.

3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA PZR Yöntemi İle Tespiti

İzolatların tür düzeyinde identifikasyonları konvansiyonel yöntemler ve 16S rRNA amplikon dizi analizi ile gerçekleştirildi. 1370 baz çiftlik 16S rRNA geni fragmenti, 16S 20 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' ve 16S 1390 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3' universal primerleri kullanılarak çoğaltıldı (Edwards ve ark, 1989; Zheng ve ark, 1996). PZR karışımı Tablo 12’ deki hesaplamalar doğrultusunda hazırlandı.

Tablo 12. 16S rRNA geninin amplifikasyonu için hazırlanan PZR karışımı.

Reaktifler (Konsantrasyon)	Hacim
PZR buffer (10X, +KCl, -MgCl ₂)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
dNTP(10 mM)	1 µL
Primer F (20 pMol)	1 µL
Primer R (20 pMol)	1 µL
Taq Polimeraz (5 U/µL)	0,4 µL
Steril distile su	36,1 µL
DNA (20 ng/µL)	1,5 µL
TOPLAM:	50 µL

PZR koşulları: 94°C’ de 5 dakikalık ön denatürasyon, 94°C’ de 30 saniye denatürasyon, 55°C’ de 30 saniye bağlanma ve 72°C’ de 1 dakika 30 saniye uzamadan oluşan 35 döngülük amplifikasyon ve 72°C’ de 15 dakikalık final uzamadan oluşacak şekilde ayarlanarak, 96 örnek kapasiteli Boeco Thermal döngüleme cihazında gerçekleştirildi.

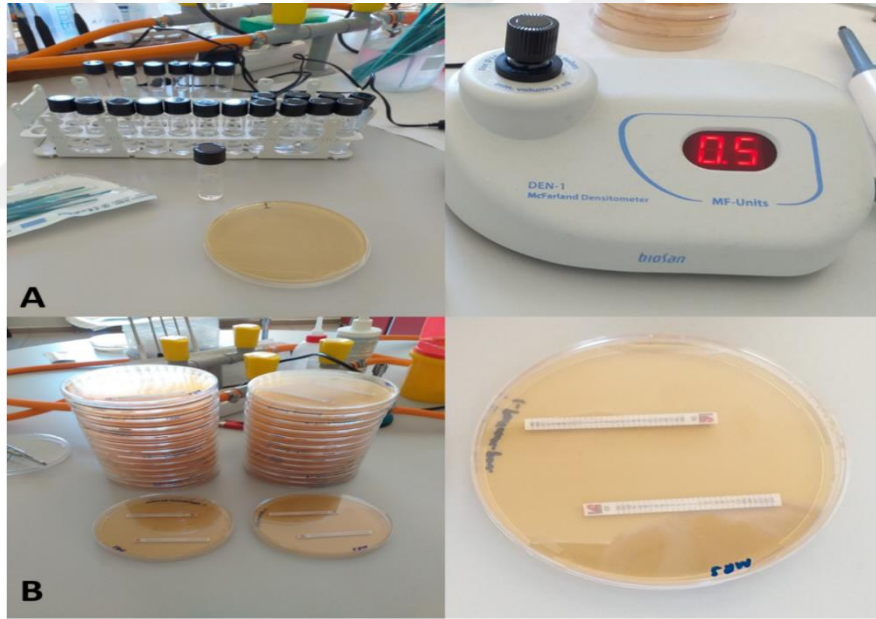
Genomik DNA örneklerinin elektroforezi için, %1.5 agaroz içeren jeller kullanıldı. 1.5 g agaroz, 100 mL 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözölmüş, 45°C’ ye kadar soğutulmuş ve %5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) ilave edilerek, yatay elektroforez plakasına döküldü. Elektroforez plakasına jel tarağı yerleştirildikten sonra, 30 dakika polimerizasyonu için bekletilerek, jel tarakları çıkartılıp, jelin üzerini kapatacak biçimde 1X TBE tampon çözeltisinden ilave edildi.

Baz büyüklüğü tespiti için, 100 bp’lik marker (Fermentas GeneRuler TM) kullanıldı. PZR ürünlerinden 5 µL alınarak, üzerine 2 µL 6X yükleme boya çözeltisi ilave edilip kuyucuklara yüklendi. Elektroforez, 80 voltta yaklaşık bir saat süreyle yürütüldü. Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra bant büyüklükleri değerlendirildi.

PZR işlemi sonrasında elde edilen 16S rRNA ampikonları MacroGen (Hollanda) firmasına gönderilerek DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Sekans analizlerinde ABI Primse cihazı kullanıldı ve dizileme iki yönde, PZR için kullanılan primerler yardımıyla yapıldı. 16S rRNA dizileri NCBI (National Center for Biotechnological Information) Nucleotide Blast programı kullanılarak, Gen Bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) ile karşılaştırıldı ve her izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlendi.

3.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Fenotipik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen LAB suşlarının vankomisin, gentamisin, klindamisin, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine olan duyarlılıkları gradiyent difüzyon (E-Test) testi ile belirlendi. İzolatlar MRS agar'da canlandırıldıktan sonra bakteri kültürleri 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/mL) bulanıklığına eşit olacak şekilde ayarlanarak MRS agara yayma ekimleri yapıldı (Leite ve ark, 2015) (Resim 1). Test edilecek antibiyotiklere ait stripler MRS agar yüzeyine yerleştirildi ve 37 °C'de 48 saat anaerobik olarak inkübe edildi (Blandino ve ark, 2008). İnkübasyon sonunda her bir izolat için MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri belirlenip, EFSA 2012 (Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Danışma Kurulu) dökümanında yer alan ölçüm aralıklarına göre değerlendirildi (Tablo 13).



Resim 1. Gradiyent difüzyon (E-Test) testi yapılış aşamaları.

A. LAB izolatlarının 0.5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde hazırlanması B. MRS agara yayma ekimlerin yapılması ve antibiyotiklere ait striplerin yerleştirilmesi

Tablo 13. Antibiyotik MİK Sınır Değerleri (mg/L).

	Vankomisin	Gentamisin	Klindamisin	Tetrasiklin	Streptomisin
<i>Lactobacillus</i> zorunlu homofermantatif ^a	2 ^b	16	1	4	16
<i>Lactobacillus acidophilus</i> grup	2	16	1	4	16
<i>Lactobacillus</i> zorunlu heterofermantatif ^c	*	16	1	8	64
<i>Lactobacillus reuteri</i>	*	8	1	16	64
<i>Lactobacillus</i> fakültatif heterofermantatif	*	16	1	8	64
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	*	16	2	32	*
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	*	16	1	8	32
<i>Lactobacillus casei</i> / <i>paracasei</i>	*	32	1	4	64
<i>Pediococcus</i>	*	16	1	8	64
<i>Leuconostoc</i>	*	16	1	8	64
<i>Lactococcus lactis</i>	4	32	1	4	32

* Doğal dirençli suşlar ^a *L. delbrueckii*, *L. helveticus* bu gruba dahildir. ^b *L. salivarius* için analiz gerekli değildir. ^c *L. fermentum* bu gruba dahildir.

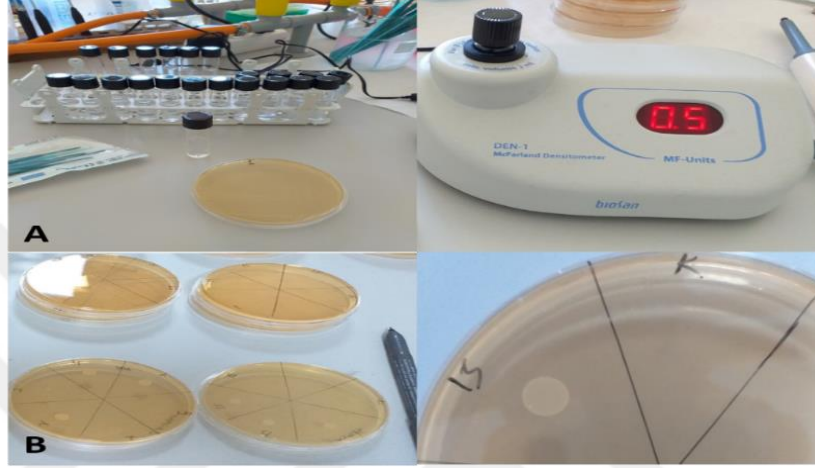
3.2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

LAB izolatlarına ait aktif kültürlerin agar spot yöntemiyle; hücresiz süpernatantların agar kuyu difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi (Simova ve ark, 2009; Shokryazdan ve ark, 2014; Jasim ve ark, 2017).

3.2.6.1. Laktik asit izolatlarına ait aktif kültürlerinin değerlendirilmesi

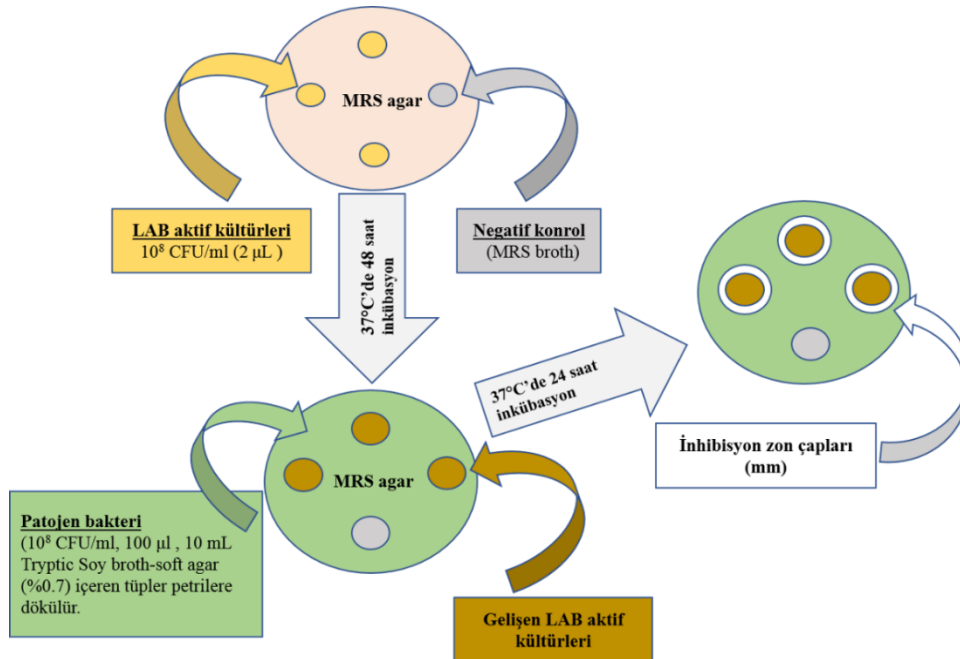
Çalışmada kullanılacak LAB izolatlarının ekimleri MRS agara yapıldı ve 37 °C' de anaerob koşullarda 48 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatlardan, 10⁸ CFU/mL yoğunluğa karşılık gelen McFarland değerlerine göre (0.5 McFarland bulanıklık standardı) tüpler hazırlandı. İzolatlara ait tüplerden 2 µL alınarak, MRS agar petrilere nokta şeklinde ekim yapıldı. Bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kontrol olarak kullanıldı. Petriler 30 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldıktan sonra, 37 °C' de 48 saat anaerobik kavanozda inkübasyona bırakıldı. Aynı zamanda patojen bakteri suşlarının TS (Triptik Soy) agara ekimleri yapıldı ve aerobik olarak 37 °C' de 24 saat inkübe edildi. Gelişen patojen bakterilerin, serum fizyolojik

içeren tüplerde 10^8 CFU/mL yoğunluğa karşılık gelen McFarland değerlerine göre (0.5 McFarland bulanıklık standardı) süspansiyonları hazırlandı. Süspanselerden 100 µL alınarak, 10 mL TS sıvı besiyeri-soft agar (% 0.7) içeren tüplere aktarıldı ve gelişen LAB izolatlarına ait petrilere döküldü. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, aerobik olarak 37 °C’de 24 saat inkübe edildi (Resim 2). 24 saat sonrasında gözlenen inhibisyon zon çapları değerlendirildi (Leite ve ark, 2015). Çalışma Şekil 5’ de özetlendi.



Resim 2. LAB agar spot testlerinin yapılışı.

A. LAB aktif kültürlerinin hazırlanışı B. LAB aktif kültürlerinin MRS agar petrilere nokta şeklinde ekimlerinin yapılması



Şekil 5. LAB aktif kültür deney özetı.

Çalışma üç kez tekrar edildi ve her tekrar üç kontrollü yapıldı (n=9). İnkübasyon sonrasında, LAB aktif kültürlerine ait inhibisyon zonları aşağıdaki kriterler doğrultusunda değerlendirildi (Leite ve ark, 2015).

İnhibisyon zon belirlenmemiş: - (Negatif inhibisyon etki)

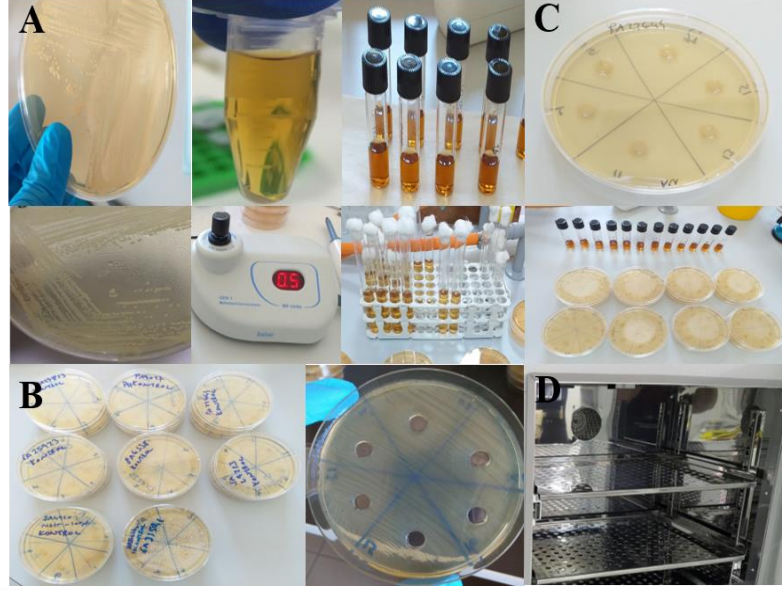
İnhibisyon zon <1 mm ya da belirgin değil: $\pm$ (Zayıf/ düşük inhibisyon etki)

1 mm < İnhibisyon zon $\leq$ 2 mm: + (Pozitif inhibisyon etki)

2 mm < İnhibisyon zon < 5 mm: ++ (Kuvvetli pozitif/güçlü inhibisyon etki)

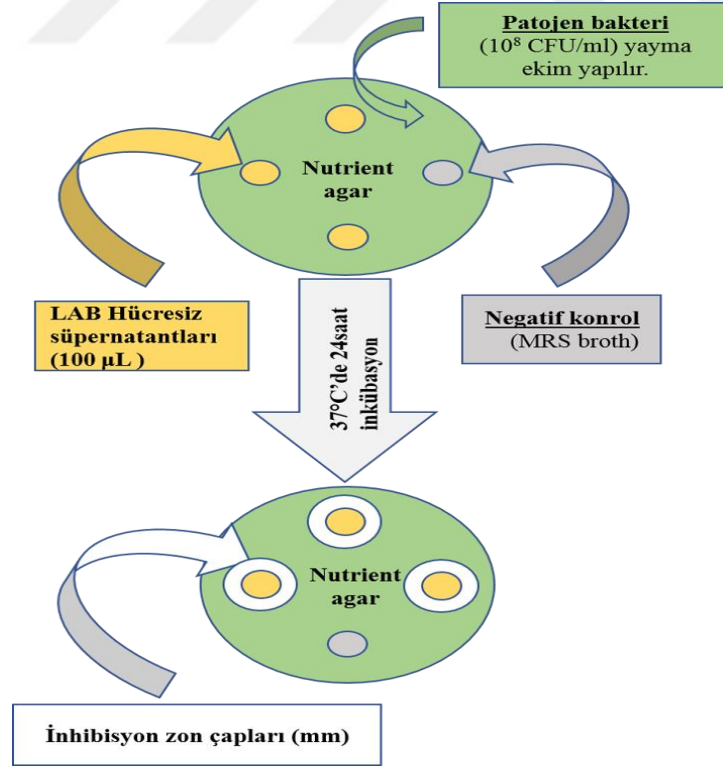
3.2.6.2. Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlarının değerlendirilmesi

LAB izolatları MRS sıvı besiyerinde, (%1, v/v) 37 °C’ de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda izolatlar: 4 °C’de 4000 $\times$ g de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları ayrı bir tüpe aktarıldı. Aktarılan bu süpernatantlar, 0,22 μ m çapındaki mikrofiltreden (Millipore, Millex-GP Syringe filter SLGP033RS) geçirildi ve hücresiz süpernatantlar (HS) elde edildi. Her izolata ait HS’nin pH değerleri ölçüldü ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen HS’ler; sırasıyla HS-24, HS-48 ve HS-72 olarak adlandırıldı. Çalışmada kullanılacak patojen bakteri suşların ekimleri, deneyden bir gece önce TS agara yapıldı. Kültürlerden alınan koloniler, serum fizyolojik içerisinde süspanse edilip, 10⁸ CFU/mL yoğunluğa karşılık gelen McFarland değerlerine göre (0.5 McFarland bulanıklık standardı) McFarland cihazında ölçüldü. Patojenlere ait süspansiyonlardan, 20 mL Nutrient agar içeren petrilere yayma ekimler yapıldı. Oda ısısında 30 dakika kurumaya bırakıldıktan sonra, plaklara 6 mm çaplı steril agar delici ile kuyucuklar açıldı ve her laktik asit izolatına ait HS-24, HS-48, HS-72 hücresiz süpernatantlarından, 100 μ L alınarak kuyulara koyuldu. Bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kontrol olarak kullanıldı. Petriler, aerobik olarak 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 3) (Martinez ve ark, 2013; Shokryazdan ve ark, 2014). Çalışma Şekil 6’ de özetlendi.



Resim 3. Agar kuyu difüzyon testlerinin yapılışı.

A. Hücresiz süpernatant (HS) ve patojenlerin hazırlanması B. Nutrient agar petrilerine steril agar delici ile 6 mm çaplı kuyucukların açılması C. HS' lerin kuyucuklara eklenmesi D. Petrilerin aerobik olarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılması



Şekil 6. LAB hüresiz süpernatant deney özeti.

Çalışma üç kez tekrar edildi ve her tekrar üç kontrollü yapıldı (n=9). Hücresiz süpernatantlara ait inhibisyon zonları aşağıdaki kriterler doğrultusunda değerlendirildi (Shokryazdan ve ark, 2014).

İnhibisyon zon belirlenmemiş: - (Negatif)

İnhibisyon zon <10 mm ya da belirgin değil: ± (Düşük inhibisyon etki)

10 mm ≤ İnhibisyon zon < 20 mm: + (Orta inhibisyon etki)

20 mm ≤ İnhibisyon zon: ++ (Güçlü inhibisyon etki)

Agar kuyu difüzyon testinde, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen hücresiz süpernatantlardan (HS-24, HS-48 ve HS-72), en güçlü inhibisyon etkiye sahip olanları belirlendi. İnhibisyon etkiye sahip HS'lerin pH'ları, organik asitlerden kaynaklanabilecek antimikrobiyal etkiyi elimine etmek için, 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanılarak 6.7'ye ayarlandı ve nötr hücresiz süpernatant (N-HS-72) olarak adlandırıldı. Agar kuyu difüzyon yöntemi aynı şekilde uygulanarak değerlendirme, nötr olmayan ve nötr olan hücresiz süpernatantlar karşılaştırılarak yapıldı.

3.2.7. Standart Patojen Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Patojenlerin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma potansiyelleri kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile belirlendi (Öztürk ve ark, 2017; Ersoy ve ark, 2019). Çalışma öncesinde patojen bakteri suşlarının TS agara ekimleri yapıldı ve aerobik olarak 37°C' de 24 saat inkübe edildi. Gelişen kolonilerinden, her bir suş için hazırlanan 5 mL' lik TS sıvı besiyerlerine ekim yapılarak, aynı koşullarda tekrar inkübe edildi. Patojen suşlara ait, gecelik kültürden (1/40 seyreltme), %0,25 glikoz içeren TS sıvı besiyerine ekim yapıldı. Vortekslenerek, steril U tabanlı 96 kuyucuklu polistren plaklara (Nunc, Danimarka) her bir kuyucukta 200 µL bakteri süspansiyonu olacak şekilde inoküle edildi. Negatif kontrol olarak 200 µL bakteri içermeyen, %0,25 glikozlu TS sıvı besiyeri kullanıldı. Plaklar aerobik olarak, 37°C'de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kuyucuklardaki besiyeri dökülerek, planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 200 µL/kuyu steril serum fizyolojik (SF) ile üç defa yıkandı. Ardından plaklar 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Plaklara, % 1'lik kristal viyole çözeltisinden, 200 µL/kuyu eklenerek 15 dakika boyamaya bırakıldı ve ardından boya uzaklaştırılıp üç kez 200 µL/kuyu SF ile yıkandı. Tekrardan plaklar 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve

kuyucuklara etanol-aseton (%80 etanol-%20 aseton) karışımından 200 µL/kuyu eklenerek, mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) OD₅₉₅ nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı.

Çalışma üç kez tekrar edildi ve her tekrar üç kontrollü yapıldı (n=9). Patojenlerin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonundaki biyofilm oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi, aşağıdaki kriterler doğrultusunda yapıldı (Tablo 14).

$$ODc = \text{Negatif kontrolün OD ortalaması} + (3 \times \text{Negatif kontrolün SS değeri})$$

Tablo 14. Patojenlerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi (Stepanovic ve ark, 2000).

OD ₅₉₅ nm	Değerlendirme	Skorlama
OD MB ≤ ODc	(Biyofilm oluşturmayan)	0
ODc < OD MB ≤ 2 X ODc	(Zayıf)	+
2 X ODc < OD MB ≤ 4 X ODc	(Orta derece)	++
4 X ODc < OD MB	(Güçlü)	+++

*OD: Optik Dansite,

ODc: Optik Dansite kesim değeri (cut-off value)

OD MB: Mikroorganizma Biyofilm Optik Dansite,

SS: Standart Sapma

3.2.8. Laktik Asit İzolatlarına Ait Hücresiz Süpernatantlarının Antibiyofilm Etkilerinin Belirlenmesi

Gudiña ve ark (2010), Bulgasem ve ark (2017) ve Zamani ve ark (2017)' ın çalışmalarında uygulanan metodlar bu çalışma için modifiye edilerek uygulandı.

3.2.8.1. Patojenlerin hazırlanması

Patojenlerin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma potansiyelleri kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile belirlendi. Patojenlerin biyofilm oluşturmaları için inkübasyon süresi 48 saat olarak ayarlandı.

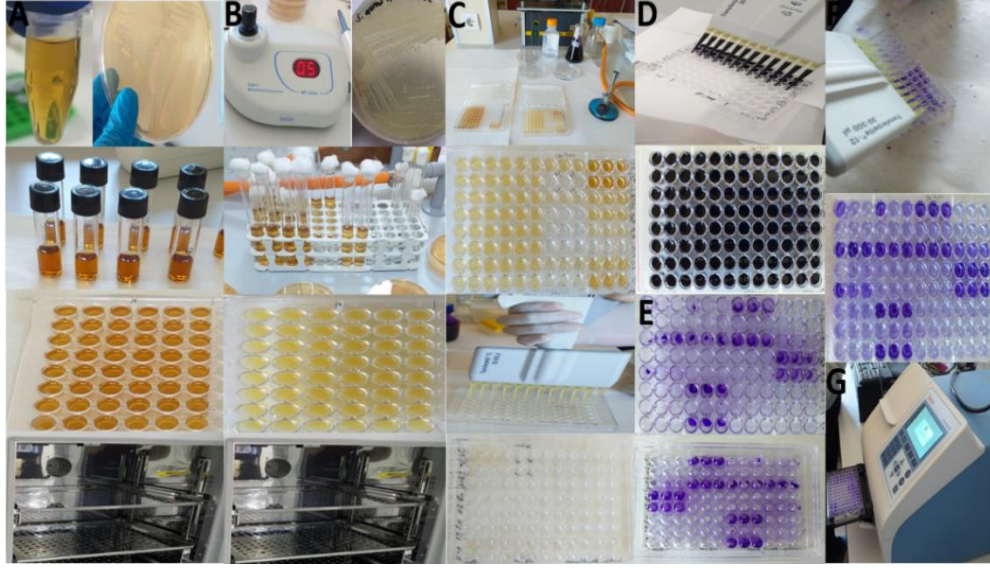
3.2.8.2. Hücresiz süpernatantların hazırlanması

LAB izolatları MRS sıvı besiyerinde, 37 °C’de 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda izolatlar: 4 °C’de 4000 ×g’ de 10 dakika santrifüj edilerek, 0,22 µm por çaplı filtrelerden geçirildi ve hücresiz süpernatantlar elde edildi. Her izolata ait hücresiz süpernatantın pH değerleri ölçüldü ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen hücresiz süpernatantlar; sırasıyla HS-24, HS-48 ve HS-72 olarak adlandırıldı.

3.2.8.3. Hücresiz süpernatantlarının patojenden önce inkübasyonu

Steril U tabanlı 96 kuyucuklu polistren plakların her bir kuyucuğuna, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan hücresiz süpernatantlardan, 200 µL/kuyu eklendi ve aerobik olarak 37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanıldı. Aynı zamanda test patojenlerin, TS sıvı besiyerlerine ekimleri yapıldı ve aerobik olarak 37 °C’ de 24 saat inkübe edildi. Patojen suşlara ait, gecelik kültürden (1/40 seyreltme), % 0,25 glikoz içeren TS sıvı besiyerine ekim yapıldı. Plaklarda yer alan hücresiz süpernatantlar uzaklaştırılıp, hazırlanan glikozlu TS sıvı besiyerindeki patojenlerden; her bir kuyucukta 200 µL bakteri süspansiyonu olacak şekilde kuyucuklara inoküle edildi. Negatif kontrol olarak 200 µL/kuyu bakteri içermeyen, %0,25 glikozlu TS sıvı besiyeri; pozitif kontrol olarak glikozlu TS sıvı besiyeri içeren patojenler kullanıldı. Ardından plaklar, aerobik olarak 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri dökülerek, planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 200 µL/kuyu steril SF ile üç defa plaklar yıkanıp, 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ardından kuyucuklara % 1’ lik kristal viyole çözeltisinden 200 µL/kuyu eklenerek plaklar, 15 dakika boyamaya bırakıldı ve üç kez 200 µL/kuyu SF ile yıkanarak boya uzaklaştırıldı. Plaklar 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra, etanol-aseton (%80 etanol-%20 aseton) karışımından 200 µL/kuyu eklenerek, mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) OD₅₉₅ nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı (Resim 4). Çalışma üç kez tekrar edildi ve her tekrar üç kontrollü yapıldı (n=9).



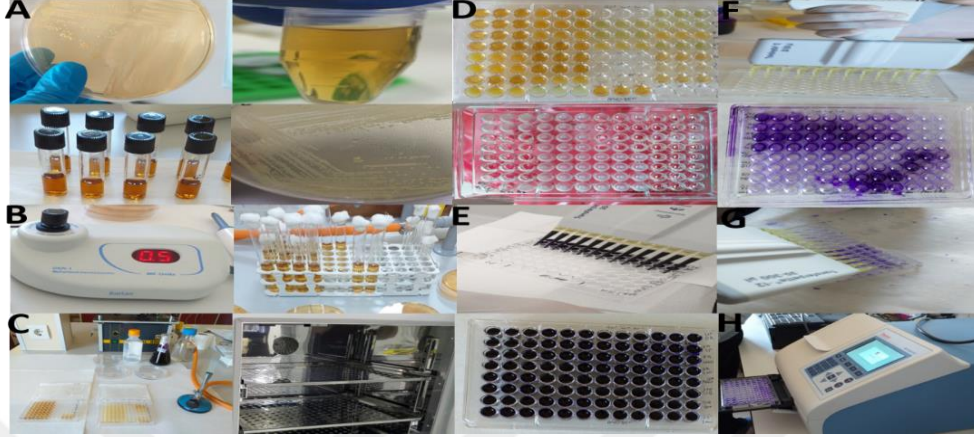
Resim 4. LAB hücresiz süpernatantlarının patojenden önce inkübasyonuna ilişkin deney özeti.

A. Hücresiz süpernatantların hazırlanması, plaklara ekilmesi ve inkübasyonu B. Patojen bakterilerin hazırlanması, hücresiz süpernatantların plaklardan uzaklaştırıldıktan sonra, patojenlerin eklenmesi ve inkübasyonu C. Patojen bakteri ve hücresiz süpernatant içeriklerin uzaklaştırılıp, plakların yıkanması D. Plaklara kristal viyole çözeltisinin eklenmesi E. Plakların yıkanması ve kurutulması F. Plaklara etanol-aseton (% 80 etanol- % 20 aseton) karışımı eklenmesi G. Biyofilm yapıların spektrofotometrede ölçülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi *Resimler *S. aureus* ATCC 35556 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklenmiştir.

3.2.8.4. Hücresiz süpernatantlarının patojen ile beraber inkübasyonu

Daha önce hazırlanan patojen bakteri suşları (100 µL/kuyu) ve laktik asit bakterilerinin hücresiz süpernatantları (100 µL/kuyu) aynı anda steril U tabanlı 96 kuyucuklu polistren plakların her bir kuyucuğuna eklendi. Negatif kontrol olarak 200 µL/kuyu bakteri içermeyen, %0,25 glikozlu TS sıvı besiyeri ve 200 µL/kuyu MRS sıvı besiyeri; pozitif kontrol olarak da, hücresiz süpernatant ile uygulama yapılmayan kuyular kullanıldı ve plaklar 37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri dökülüp, planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla, plaklar 200 µL/kuyu steril SF ile üç defa yıkandı ve 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Plaklara % 1’lik kristal viyole çözeltisinden, 200 µL/kuyu eklenerek, 15 dakika boyamaya bırakıldı. Ardından plaklar, üç kez 200 µL/kuyu SF ile yıkanıp, boya uzaklaştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Plaklara etanol-aseton (% 80 etanol-%20 aseton) karışımından 200 µL/kuyu

eklenerek, mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) OD₅₉₅ nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı (Resim 5). Çalışma üç kez tekrar edildi ve her tekrar üç kontrollü yapıldı (n=9).



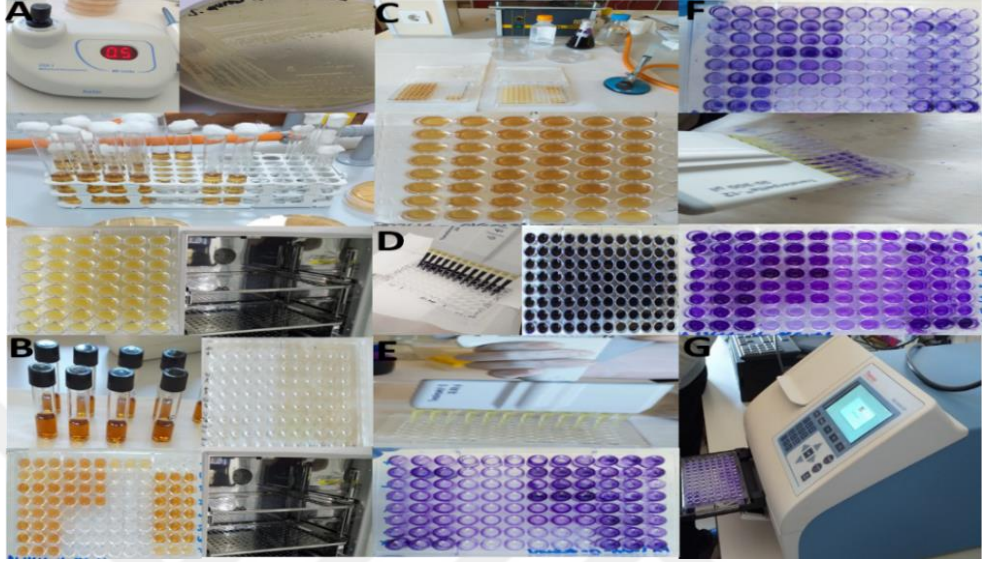
Resim 5. LAB hücresiz süpernatantlarının patojen ile beraber inkübasyonuna ilişkin deney özeti.

A. Hücresiz süpernatantların hazırlanması B. Patojen bakterilerin hazırlanması C. Patojen bakteri ve hücresiz süpernatantların plaklara ekilmesi ve inkübasyonu D. Patojen ve hücresiz süpernatant içeriklerin uzaklaştırılması, plakların yıkanması E. Plaklara kristal viyole çözeltisinin eklenmesi F. Plakların yıkanması ve kurutulması G. Plaklara etanol-aseton (% 80 etanol- % 20) karışımının eklenmesi H. Biyofilm yapıların spektrofotometrede ölçülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi *Resimler *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklendirilmiştir.

3.2.8.5. Hücresiz süpernatantlarının patojenden sonra inkübasyonu

Daha önce uygulanan spektrofotometrik mikropalak yöntemi bu aşamada da kullanıldı. Patojen suşlara ait gecelik kültürden (1/40 seyreltme) % 0,25 glikoz içeren TS sıvı besiyerine ekim yapıldı. Vortekslenerek, steril U tabanlı 96 kuyucuklu polistren plaklarda, her bir kuyucukta 200 µL bakteri süspansiyonu olacak şekilde inoküle edildi. Negatif kontrol olarak 200 µL/kuyu bakteri içermeyen, % 0,25 glikozlu TS sıvı besiyeri kullanıldı ve plaklar aerobik olarak, 37 °C’ de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri dökülüp, planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla plaklar 200 µL/kuyu SF ile üç defa yıkandı. Ardından plaklara 200 µL/kuyu hücresiz süpernatantlardan (HS-24, HS-48, HS-72) ilave edildi. Negatif kontrol olarak, uygulama kuyucuklarına hücresiz süpernatant içermeyen MRS sıvı besiyerinden 200 µL/kuyu eklendi. Plaklar, aerobik olarak 37 °C’ de 24 saat

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plaklara daha önce anlatılan basamaklarda uygulanan kristal viyole metodu uygulandı (Resim 6). Plakların, mikropalak okuyucuda (Thermo Multiscan Spectro) OD₅₉₅ nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı. Çalışma üç kez tekrar edildi ve her tekrar üç kontrollü yapıldı (n=9).



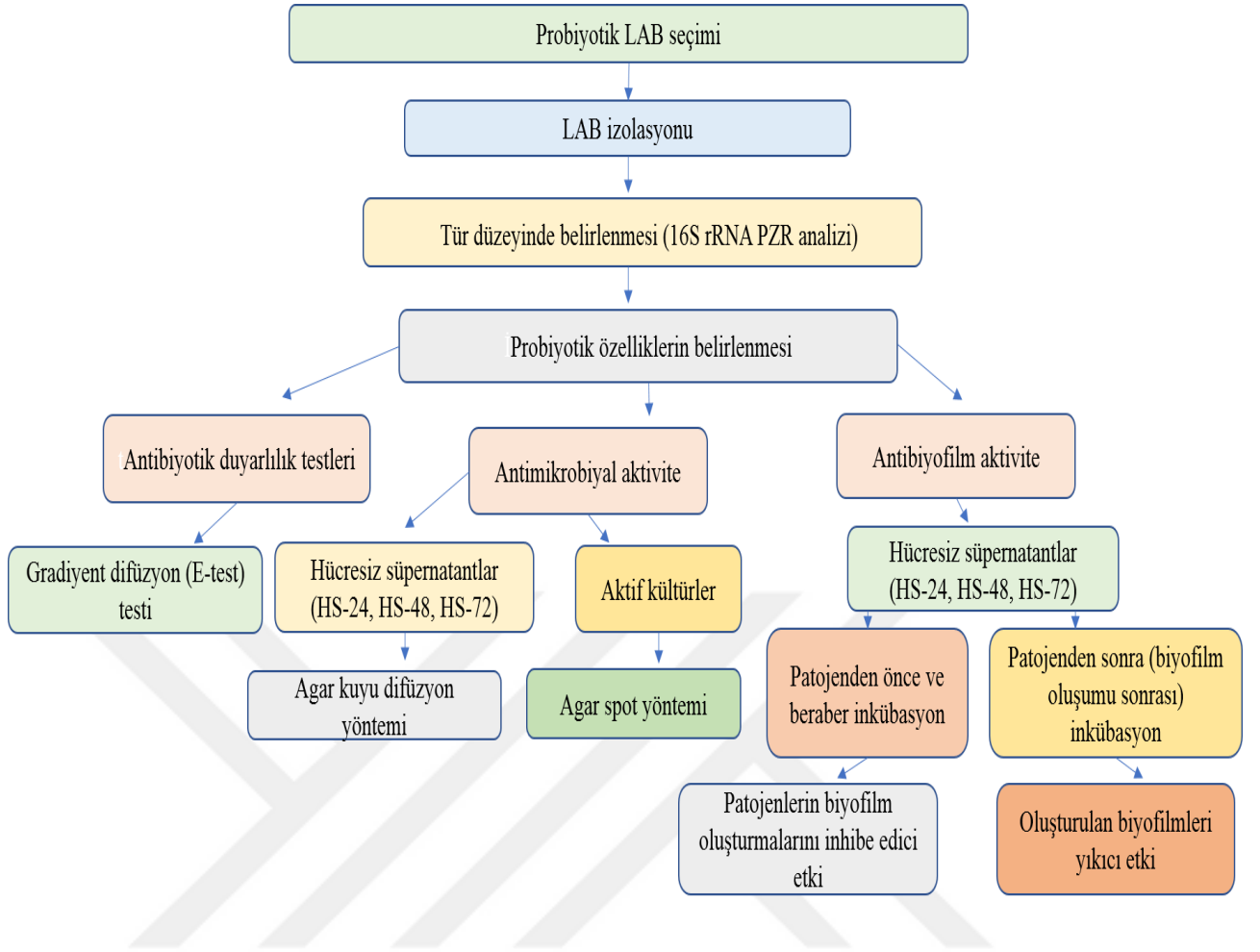
Resim 6. LAB hüresiz süpernatantlarının patojen sonra inkübasyonuna ilişkin deney özeti.

A. Patojen bakterilerin hazırlanması, plaklara ekilmesi ve inkübasyonu B. Hüresiz süpernatantların hazırlanması, patojenlerin plaklardan uzaklaştırıldıktan sonra, eklenmesi ve inkübasyonu C. Patojen bakteri ve hüresiz süpernatant içeriklerin uzaklaştırılıp, plakların yıkanması D. Plaklara kristal viyole çözeltisinin eklenmesi E. Plakların yıkanması ve kurutulması F. Plaklara etanol-aseton (%80 etanol-%20) karışımı eklenmesi G. Biyofilm yapıların spektrofotometrede ölçülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi *Resimler *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklendirilmiştir.

3.2.8.6. İnhibisyon etkilerin belirlenmesi

Yapılan farklı üç biyofilm çalışmasında kullanılan hüresiz süpernatantlardan (HS-24, HS-48 ve HS-72) inhibisyon etkiye sahip olanların pH'ları nötrleme işlemi sonrasında (N-HS) spektrofotometrik mikropalak yöntemi ile tekrar çalışılıp, nötr olmayan ve nötr olan hüresiz süpernatantlar karşılaştırılarak değerlendirmeler yapıldı.

Bu tez çalışmasında yapılan deneylerin özeti Şekil 7' de verildi.



Şekil 7. Çalışmada yapılan deneylerin özeti.

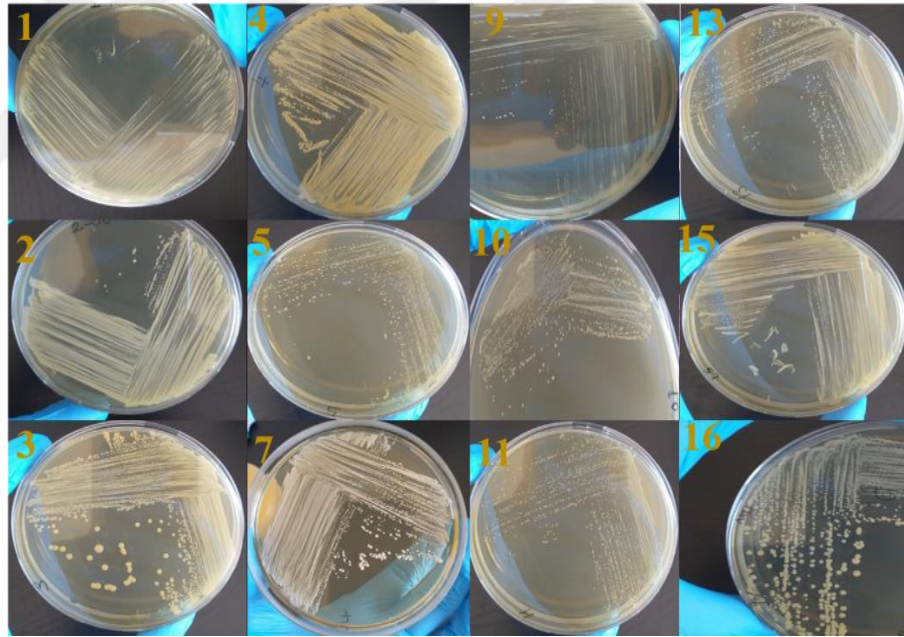
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versiyon 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanıldı. Patojen bakteri ve LAB izolatlarına ait hüresiz süpernatant (HS-24, HS-48 ve HS-72) gruplarına göre sonuçların karşılaştırılabilmesi için, İki Yönlü Varyans Analizi (Two Way ANOVA) ile Post-hoc Tukey testi uygulandı. Analizlerine göre elde edilen sonuçlardan $P < 0,05$ olan değerler önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon, PZR ve Sekans Bulguları

Bu çalışmada, Aydın Merkez’de yer alan marketlerden ve halk pazarlarından alınan 12 markaya ait 12 adet fermente süt ürününden laktik asit bakterisi izole edildi. Gram (+), beyaz koloni oluşturan ve kok şeklinde bir izolatın *Lactococcus*, şeffaf koloni oluşturan, çok küçük yuvarlak koklar ve oval şeklinde olan iki izolatın *Leuconostoc*, grimsi veya beyazımsı renkte, pürüzsüz, yuvarlak koloni oluşturan, tetrad şeklinde olan bir izolatın *Pediococcus*, küçük, yuvarlak, beyaz koloni oluşturan, tek veya zincir şeklinde, kısa veya uzun çomak görünümlü olan sekiz izolatın laktobasil olduğu tespit edildi. Katalaz ve oksidaz testlerinin negatif (-) sonuç verdiği doğrulandı (Resim 7).



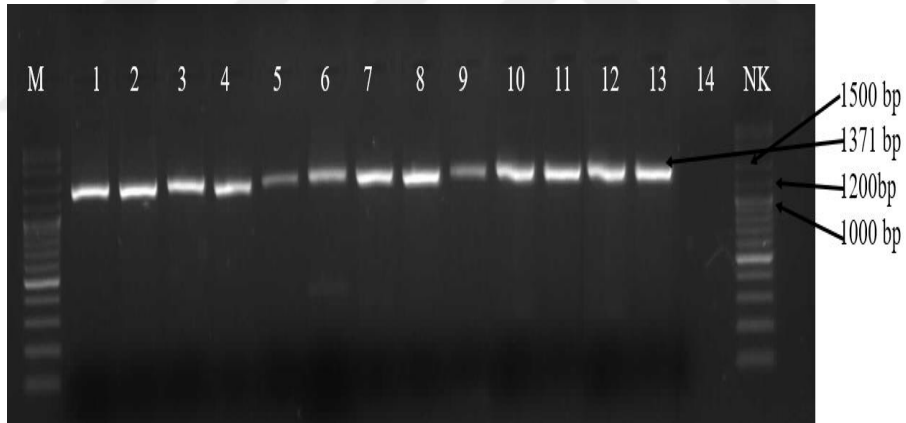
Resim 7. Laktik asit izolatlarının koloni morfolojileri.

(İ-1) *Pediococcus parvulus*, (İ-2) *Lactobacillus paracasei*, (İ-10) *Leuconostoc mesenteroides*, (İ-13) *Lactobacillus coryniformis* beyaz peynirden, (İ-3) *Lactobacillus reuteri* koyun peynirinden, (İ-4) *Lactobacillus rhamnosus*, (İ-15) *Lactobacillus alimentarius* lor peynirinden, (İ-5) *Lactobacillus delbrueckii* çökelekten, (İ-7) *Lactobacillus paracasei*, (İ-16) *Lactobacillus reuteri* yoğurttan, (İ-9) *Leuconostoc mesenteroides* kefirde ve (İ-11) *Lactococcus lactis* tulum peynirinden izole edildi (Tablo 15).

Tablo 15. İzolatlara ilişkin izolasyon bulguları.

İzolat No	Materyal
İ-1	Beyaz peynir
İ-2	Beyaz peynir
İ-3	Koyun peyniri
İ-4	Lor peyniri
İ-5	Çökelek
İ-7	Yoğurt
İ-9	Kefir
İ-10	Beyaz peynir
İ-11	Tulum peyniri
İ-13	Beyaz peynir
İ-15	Lor peyniri
İ-16	Yoğurt

PZR analizleri sonucunda elde edilen jelde izolatlara ait bantlar görüldü ve pozitif olarak değerlendirildi (Resim 8).



Resim 8 . PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

1. *P. parvulus* 2. *L. paracasei* 3. *L. paracasei* 4. *L. mesenteroides* 5. *L. mesenteroides* 6. *L. coryniformis* 7. *L. reuteri* 8. *L. reuteri* 9. *L. rhamnosus* 10. *L. alimentarius* 11. *L. delbrueckii* 12. *L. lactis* 13. Pozitif Kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 15692) 14. Negatif Kontrol (DNA'sız master miks) M:100 bp'lik DNA ladder (Fermentas)

İzolatlara ait sekans sonuçları, Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırıldı. İzolatların *Pediococcus parvulus* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus paracasei* (%16.7, 2/12), *Leuconostoc*

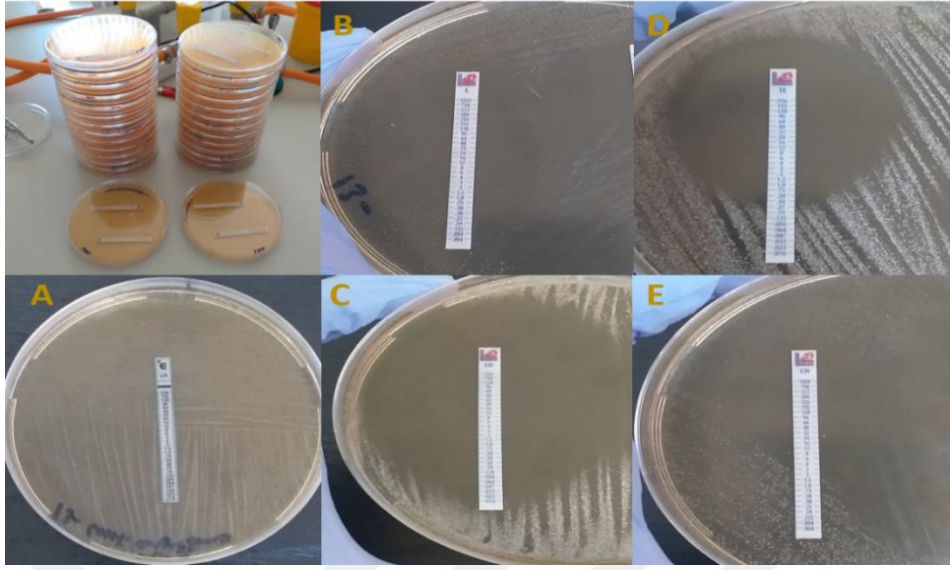
mesenteroides (%16.7, 2/12), *Lactobacillus coryniformis* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus reuteri* (%16.7, 2/12), *Lactobacillus rhamnosus* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus alimentarius* (%8.3, 1/12), *Lactobacillus delbrueckii* (%8.3, 1/12) ve *Lactococcus lactis* (%8.3, 1/12) türleri olduğu belirlendi. İzolatlarla ilişkin homolojiler yüzde olarak Tablo 16’da verildi.

Tablo 16. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları.

İzolatlar	16S rRNA Analiz Sonucu	(%) Benzerlik	NCBI Numaraları	Erişim
İ-1	<i>P. parvulus</i> suş 2.6	%93.42	GU116592.1	
İ-2	<i>L. paracasei</i> suş RV-M192	%97.31	MK966341.1	
İ-3	<i>L. reuteri</i> suş J33	%97.78	MK922076.1	
İ-4	<i>L. rhamnosus</i> suş SRMPB19	%98.77	MK951691.1	
İ-5	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> suş ND04	%97.08	CP016393.1	
İ-7	<i>L. paracasei</i> suş ZFM54	%99.10	CP032637.1	
İ-9	<i>L. mesenteroides</i> suş Le8	%99.26	MG825699.1	
İ-10	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> suş CAU4374	%99.20	MF357192.1	
İ-11	<i>L. lactis</i> suş IL6288	%91.45	CP033606.1	
İ-13	<i>L. coryniformis</i> suş MXJ 32	%98.44	KF985961.1	
İ-15	<i>L. alimentarius</i> suş HBUAS52461	%99.75	MK835747.1	
İ-16	<i>L. reuteri</i> suş SKB1241	%98.43	MK564724.1	

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testlerine İlişkin Bulgular

İzole edilen LAB suşlarının antibiyotik direncini belirlemek üzere gradiyent difüzyon (E-test) testleri tercih edildi. Gradiyent difüzyon testi ile belirlenen izolatların MİK değerleri, EFSA 2012 dökümanında yer alan ölçüm aralıklarına göre değerlendirildi. Yalnızca *L. alimentarius* suş HBUAS52461, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ve *L. lactis* suş IL6288 izolatlarının vankomisin antibiyotiğine olan duyarlılığı değerlendirildi ve hepsinin duyarlı olduğu tespit edildi. EFSA 2012 dökümanında yer alan kritere göre, vankomisine doğal dirençli diğer laktik asit izolatların vankomisin açısından değerlendirilmeleri gerekli bulunmadı ve tüm izolatların gentamisin, klindamisin, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlendi (Resim 9, Tablo 17).



Resim 9. LAB' ın antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanması.

A.Vankomisin (VA)'e doğal direnç gösteren izolatların kontrolü B. İzolatların Streptomisin (S)'e olan duyarlılıkları C. İzolatların Klindamisin (CD)'e olan duyarlılıkları D. İzolatların Tetrasiklin (TE)'e olan duyarlılıkları E. İzolatların Gentamisin (CN)'e olan duyarlılıkları.

Tablo 17. Antibiyotik duyarlılık testleri sonuçları.

İzolat no	Analiz sonucu	Vankomisin	Gentamisin	Klindamisin	Streptomisin	Tetrasiklin
İ-1	<i>P. parvulus</i> suş 2.6	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-2	<i>L. paracasei</i> suş RV-M192	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-3	<i>L. reuteri</i> suş J33	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-4	<i>L. rhamnosus</i> suş SRMPB19	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-5	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> suş ND04	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-7	<i>L. paracasei</i> suş ZFM54	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-9	<i>L. mesenteroides</i> suş Le8	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-10	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> suş CAU4374	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-11	<i>L. lactis</i> suş IL6288	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-13	<i>L. coryniformis</i> suş MXJ 32	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-15	<i>L. alimentarius</i> suş HBUAS52461	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
İ-16	<i>L. reuteri</i> suş SKB1241	*Değerlendirilmedi	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı

* EFSA 2012 dökümanına göre, vankomisine doğal dirençli olan suşların vankomisin duyarlılık testlerinin yapılmasına gerek görülmemektedir.

EFSA (Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Danışma Kurulu) 2012 dökümanında yer alan ölçüm aralıklarına göre değerlendirildi.

4.3. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

4.3.1. Aktif Kültür

Laktik asit bakterilerine ait aktif kültürlerin test patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde; toplam 12 laktik asit izolatının 6 tanesinin (%50, 6/12) yalnızca *P. aeruginosa* suşlarına karşı, 4 tanesinin (%33.3, 4/12) tüm indikatör bakterilere karşı inhibisyon etkileri olduğu, 2 tanesinin (%16.7, 2/12) ise etkisiz olduğu tespit edildi.

(İ-1) *P. parvulus* suş 2.6 aktif kültürlerinin; tüm *Pseudomonas* suşlarına karşı kuvvetli pozitif inhibisyon etki (++), *S. aureus* 29213 suşu hariç (zayıf etki/ $\pm$) diğer *Staphylococcus* suşlarına karşı pozitif inhibisyon etki (+) gösterdiği belirlendi.

(İ-2) *L. paracasei* suş RV-M192 ve (İ-7) *L. paracasei* suş ZFM54 aktif kültürlerinin; tüm *Pseudomonas* suşlarına ve *S. aureus* ATCC 35556 suşuna karşı kuvvetli pozitif inhibisyon etki (++), *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* ATCC 6538 suşlarına pozitif inhibisyon etki (+), *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 29213 suşlarına zayıf ($\pm$) inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

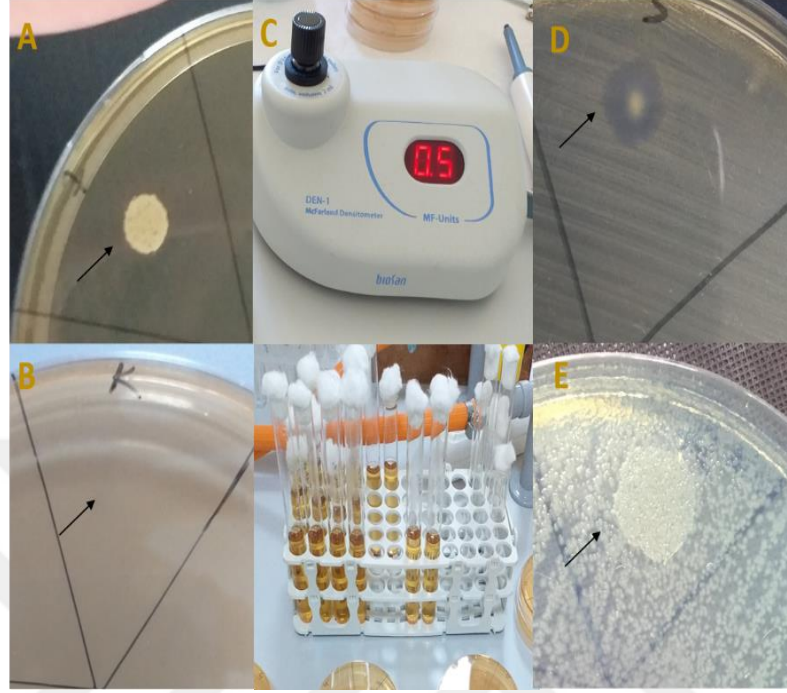
(İ-3) *L. reuteri* suş J33 (kuvvetli pozitif/ ++), (İ-4) *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (kuvvetli pozitif/ ++) ve (İ-5) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, (İ-9) *L. mesenteroides* suş Le8, (İ-10) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 ve (İ-11) *L. lactis* suş IL6288 aktif kültürlerinin yalnızca *Pseudomonas* suşları üzerinde inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

(İ-13) *L. coryniformis* suş MXJ 32 aktif kültürlerinin; tüm *Pseudomonas* suşları ve *S. aureus* ATCC 33591 için pozitif etki (+) (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için kuvvetli pozitif etki/ ++), *S. aureus* ATCC 35556 suşu için kuvvetli pozitif etki (++) ve diğer *Staphylococcus* suşları için zayıf ($\pm$) inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

(İ-15) *L. alimentarius* suş HBUAS52461 ve (İ-16) *L. reuteri* suş SKB1241 aktif kültürlerinin indikatör bakteriler üzerinde inhibisyon etki göstermediği belirlendi.

Özetle çalışmada, yalnızca (İ-1) *P. parvulus* suş 2.6, (İ-2) *L. paracasei* suş RV-M192, (İ-7) *L. paracasei* suş ZFM54 ve (İ-13) *L. coryniformis* suş MXJ 32 aktif kültürlerinin tüm indikatör bakteriler üzerinde inhibisyon etki gösterdiği, (İ-3) *L. reuteri* suş J33, (İ-4) *L. rhamnosus* suş SRMPB19, (İ-5) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, (İ-9) *L. mesenteroides* suş Le8, (İ-10) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 ve (İ-11) *L. lactis* suş IL6288 aktif kültürlerinin yalnızca *P. aeruginosa* üzerinde inhibisyon etki gösterdiği, (İ-15) *L. alimentarius* suş HBUAS52461 ve (İ-16) *L. reuteri* suş SKB1241 aktif

kültürlerinin ise indikatör bakteriler üzerinde inhibisyon etki göstermediği belirlendi (Resim 10). Değerlendirme sonuçları Tablo 18’ de verildi.



Resim 10. LAB aktif kültürlerinin patojenlere karşı gösterdiği antimikrobiyal aktiviteler.

A. Gelişen LAB aktif kültürü B. Kontrol (MRS sıvı besiyeri) C. Patojenin hazırlanması D. Aktif kültürün patojene karşı gösterdiği inhibisyon zon çapı E. İnhibisyon etkinin gözlenmemesi.

Tablo 18. LAB aktif kültürlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi.

Laktik Asit Bakteri İzolatları	Agar spot test sonuçları (AO ± SS) mm							
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>				
	(ATCC 15692)	(ATCC 27853)	(ATCC 9027)	(ATCC 35556)	(ATCC 29213)	(ATCC 33591)	(ATCC 6538)	(ATCC 25923)
(İ-1) <i>P. parvulus</i> suş 2.6	3,52 ± 0,04 ++	3,67 ± 0,07 ++	3,43 ± 0,09 ++	1,5 ± 0 +	0 ±	1,43 ± 0,1 +	1,43 ± 0,05 +	1,44 ± 0,05 +
(İ-2) <i>L. paracasei</i> suş RV-M192	3,54 ± 0,05 ++	3,53 ± 0,05 ++	2,8 ± 0 ++	2,46 ± 0,05 ++	0 ±	1,5 ± 0 +	1,5 ± 0 +	0 ±
(İ-3) <i>L. reuteri</i> suş J33	3,96 ± 0,09 ++	3,73 ± 0,05 ++	3,56 ± 0,05 ++	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-4) <i>L. rhamnosus</i> suş SRMPB19	3,76 ± 0,05 ++	3,5 ± 0 ++	3,34 ± 0,11 ++	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-5) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> suş ND04	1,57 ± 0,13 +	1,54 ± 0,05 +	1,4 ± 0,12 +	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-7) <i>L. paracasei</i> suş ZFM54	3,01 ± 0,03 ++	3,02 ± 0,07 ++	3,03 ± 0,07 ++	3,01 ± 0,03 ++	0 ±	1,5 ± 0 +	1,5 ± 0 +	0 ±
(İ-9) <i>L. mesenteroides</i> suş Le8	1,96 ± 0,09 +	2,01 ± 0,03 ++	2 ± 0 +	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-10) <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> suş CAU4374	1,97 ± 0,05 +	1,93 ± 0,1 +	2 ± 0 +	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-11) <i>L. lactis</i> suş IL6288	2,02 ± 0,04 ++	2,04 ± 0,1 ++	2 ± 0 +	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-13) <i>L. coryniformis</i> suş MXJ 32	2,06 ± 0,05 ++	1,64 ± 0,09 +	1,5 ± 0 +	3,4 ± 0,12 ++	0 ±	1,51 ± 0,03 +	0 ±	0 ±
(İ-15) <i>L. alimentarius</i> suş HBUAS52461	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -
(İ-16) <i>L. reuteri</i> suş SKB1241	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -

* İnhibisyon zon belirlenmemiş: - (Negatif inhibisyon etki), İnhibisyon zon <1 mm ya da belirgin değil: ± (Zayıf/ düşük inhibisyon etki),

1 mm < İnhibisyon zon ≤ 2 mm: + (Pozitif inhibisyon etki), 2 mm < İnhibisyon zon < 5 mm: ++ (Kuvvetli pozitif/güçlü inhibisyon etki) (Leite ve ark, 2015).

(AO ± SS) mm AO: Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma.

4.3.2. Hücresiz Süpernatant (HS)

Bu çalışmada, 12 adet LAB izolatına ait hücresiz süpernatantın antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu difüzyon testleri ile belirlendi ve 2 hücresiz süpernatantın (%16.7, 2/12) (İ-5-HS ve 1-10-HS) yalnızca *Pseudomonas* suşlarına, 4 hücresiz süpernatantın (%33.3, 4/12) (İ-1-HS, İ-2-HS, İ-7-HS ve İ-13-HS) tüm patojen bakteri suşlarına karşı inhibisyon etki gösterdiği değerlendirildi. Toplam 12 izolata ait hücresiz süpernatantlardan (HS-72): 9 tanesinin (%75, 9/12) (İ-1-HS, İ-2-HS, İ-3-HS, İ-4-HS, İ-5-HS, İ-7-HS, İ-10-HS, İ-11-HS ve İ-13-HS) *P. aeruginosa* 9027, 2 tanesinin (%16.7 2/12) (İ-9-HS ve İ-16-HS) *S. aureus* ATCC 35556 ve 1 tanesinin (%8.3, 1/12) (İ-15-HS) her iki patojen bakteri suşlarına karşı en yüksek inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

(İ-1-HS) *P. parvulus* suş 2.6' e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24'ün en yüksek inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna ($21,11 \pm 0,33$ mm/ güçlü etki/++); en düşük inhibisyon zonun ise, *S. aureus* ATCC 29213 suşuna ($10,22 \pm 0,44$ mm/ orta etki/+) karşı olduğu tespit edildi. HS-48' in en yüksek inhibisyon zonunun: *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna ($20,67 \pm 0,5$ mm/ güçlü etki/++), en düşük inhibisyon zonun ise *S. aureus* ATCC 29213 suşuna (10 mm/ orta/+) karşı olduğu belirlendi. HS-72'nin en yüksek inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna (30 mm/ güçlü etki/++); en düşük inhibisyon zonun ise *S. aureus* ATCC 29213 suşuna (10 mm/ orta etki/+) karşı olduğu tespit edildi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* suş RV-M192'e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24'ün en yüksek inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna ($21,22 \pm 0,44$ mm/ güçlü etki/++), en düşük inhibisyon zonun ise *S. aureus* ATCC 29213 suşuna (10 mm/ orta etki/+) karşı olduğu belirlendi. HS-48' in en yüksek inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna ($24,33 \pm 0,5$ mm/ güçlü etki/++), en düşük inhibisyon zonun ise *S. aureus* ATCC 29213 suşuna (10 mm/ orta etki/+) karşı olduğu tespit edildi. HS-72'nin en yüksek inhibisyon zonunun *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna ($30,67 \pm 0,5$ mm/ güçlü etki/++), en düşük inhibisyon zonun ise *S. aureus* ATCC 29213 suşuna (10 mm/ orta etki/+) karşı olduğu belirlendi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* suş J33' e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24' ün $20,67 \pm 0,5$ mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşuna en yüksek inhibisyon etki gösterdiği, buna karşılık *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* ATCC 6538 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına ise inhibe edici etki göstermediği belirlendi. HS-48' in $21,67 \pm 0,5$ mm

(güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna en yüksek inhibisyon etki gösterdiği, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına ise inhibe edici etki göstermediği tespit edildi. HS-72' nin 22mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna en yüksek inhibisyon etki gösterdiği, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına ise inhibe edici etki göstermediği belirlendi. *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı inhibisyon etki HS-24 uygulamasında gözlenmeyip, HS-48 ve HS-72 uygulamaları sonrasında 10 mm (orta etki/+) inhibisyon zonu kaydedildi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* suş SRMPB19'e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24' ün $20,89 \pm 0,33$ mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 35556 suşlarına en yüksek inhibisyon etki gösterdiği, buna karşılık 10 mm (orta etki/+) ile *S. aureus* ATCC 25923 suşuna en düşük etki gösterdiği belirlendi. HS-48' in 25 mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna en yüksek inhibisyon etki gösterdiği, buna karşılık 15 mm (orta etki/+) ile *S. aureus* ATCC 33591 suşuna en düşük etki gösterdiği tespit edildi. HS-72' nin $30,33 \pm 0,5$ mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna en yüksek inhibisyon etki gösterdiği, buna karşılık 10 mm (orta etki/+) ile *S. aureus* ATCC 25923 suşuna en düşük etki gösterdiği belirlendi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04'e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24' ün 16 mm (orta etki/+) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşlarına karşı en yüksek etki gösterdiği, HS-48 ve HS-72 uygulamalarında da *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşu için en yüksek zon çapı (sırasıyla; $19,33 \pm 0,5$ mm orta etki/+ ve 20 mm/ güçlü etki/++) kaydedildi. Ayrıca her üç uygulamanın *S. aureus* ATCC 35556, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* ATCC 6538 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına inhibe edici etki göstermediği tespit edildi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* suş ZFM54'e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24' ün $22,44 \pm 0,53$ mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *S. aureus* ATCC 35556 suşuna karşı en yüksek etki gösterdiği, 10 mm (orta etki/+) zon ortalamasıyla *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına en düşük etki gösterdiği belirlendi. HS-48' in en yüksek inhibisyon etkisinin ($25,11 \pm 0,33$ mm/ güçlü etki/++) *S. aureus* ATCC 35556 suşu üzerinde olduğu ve HS-72'nin $25,44 \pm 0,53$ mm (güçlü etki/++) zon ortalamasıyla *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşuna karşı etki gösterdiği

tespit edildi. *S. aureus* ATCC 29213 suşuna ait inhibisyon zon çapının değişmediği (10 mm/ orta etki/+) belirlendi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* suş Le8' e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24, HS-48, HS-72 uygulamalarında en yüksek inhibisyon zon çapı (sırasıyla 22 mm, $24,67 \pm 0,5$ mm ve $26 \pm 0,87$ mm/ güçlü etki/++) *S. aureus* ATCC 35556 suşuna karşı en yüksek etki gösterdiği, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 6538 ve *S. aureus* 33591 suşlarına karşı inhibe edici etki göstermediği tespit edildi. *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı HS-24 ve HS-48 uygulamalarında inhibisyon zon çapı gözlenmezken, HS-72'de inhibisyon zon çapı 10 mm (orta etki/+) olarak kaydedildi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374'e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: *P. aeruginosa* ATCC 15692, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşları için inhibisyon zon çapları HS-24 (sırasıyla 15 mm, 15 mm, 15 mm/ orta etki/+), HS-48 (sırasıyla 18 mm, $16,33 \pm 1,32$ mm ve 18 mm/ orta etki/+) ve HS-72 (sırasıyla 18 mm, 15 mm, $18,33 \pm 0,5$ mm/ orta etki/+) uygulamaları için kaydedildi. Her üç uygulama sonucunda: *S. aureus* ATCC 35556, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923 suşlarına ilişkin inhibisyon zonu tespit edilmedi.

(İ-11-HS) *L. lactis* suş IL6288'e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: *P. aeruginosa* ATCC 15692, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027 ve *S. aureus* ATCC 35556 suşları için inhibisyon zon çapları HS-24 (tümü için 15 mm/ orta etki/+), HS-48 (sırasıyla 15 mm/ orta etki/+, 15 mm/orta etki/+, 18 mm/orta etki/+, $33 \pm 1,32$ mm/güçlü etki/++ ve $18,33 \pm 1$ mm/orta etki/+) ve HS-72 (sırasıyla $15,78 \pm 0,44$ mm/orta etki/+, 15 mm/orta etki/+, 21 mm/güçlü etki/++ ve 19 mm/orta etki/+) uygulamaları için belirlendi. Her üç uygulama sonucunda: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 33591, *S. aureus* ATCC 6538 ve *S. aureus* 25923 suşlarına ilişkin inhibisyon zonu tespit edilmedi.

(İ-13-HS) *L. coryniformis* suş MXJ 32' e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24 ve HS-48 için en yüksek inhibisyon etki *S. aureus* ATCC 35556 (sırasıyla $20,33 \pm 0,5$ mm/güçlü etki/++ ve $20,67 \pm 0,5$ mm/güçlü etki/++) suşuna, HS-72 için ise *P. aeruginosa* ATCC 9027 (25 mm/güçlü etki/++) suşuna karşı olduğu belirlendi. En düşük inhibisyon etki ise, her üç uygulama için *S. aureus* ATCC 29213 ve *S. aureus* ATCC 25923 (10 mm/orta etki/+) suşlarına karşı tespit edildi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* suş HBUAS52461' e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24 ve HS-48 için en yüksek

inhibisyon etki *S. aureus* ATCC 35556 (sırasıyla 20,67±0,5 mm; 24,67±0,5 mm/ güçlü etki/++) suşuna karşı gözlemlendi. HS-72 için ise; en yüksek etki *S. aureus* ATCC 35556 (25 mm/güçlü etki/++) ve *P. aeruginosa* ATCC 9027 (25 mm/güçlü etki/++) suşlarına karşı belirlendi. En düşük inhibisyon etki ise, her üç uygulama için *S. aureus* ATCC 29213 (10 mm/orta etki/+) suşuna karşı tespit edildi. HS-24 uygulaması sonrası *S. aureus* ATCC 25923 patojeni üzerinde inhibisyon zonu gözlenmezken, HS-24 ve HS-72 uygulamaları sonrasında inhibisyon zonları (sırasıyla 10 mm; 14,78±0,44 mm/orta etki/+) kaydedildi.

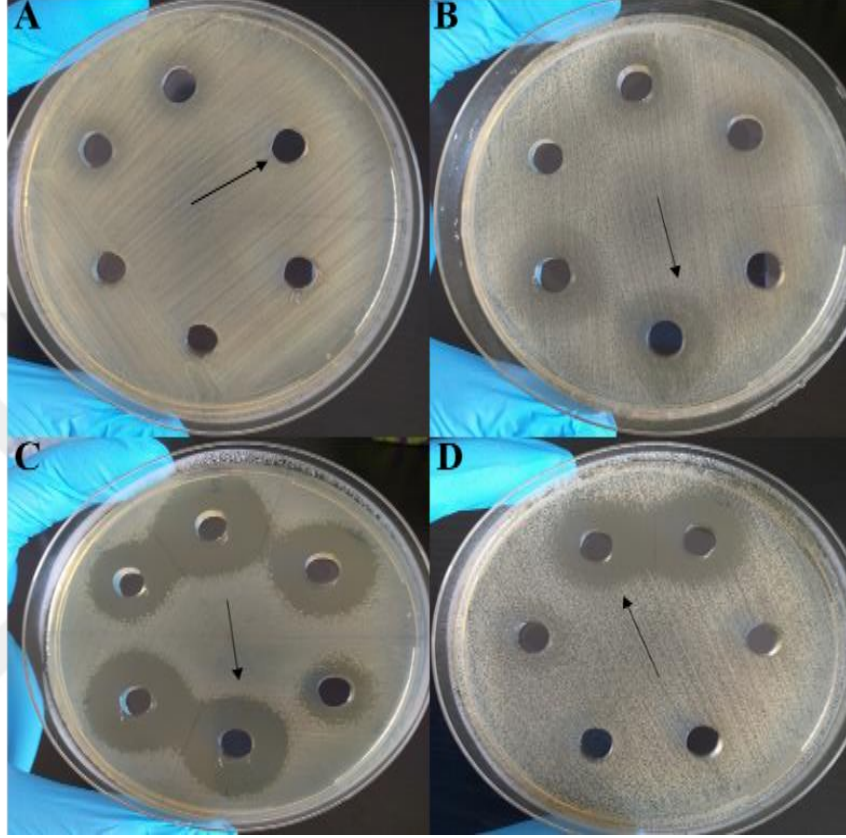
(İ-16-HS) *L. reuteri* suş SKB1241' e ait hücresiz süpernatantların patojen bakteri suşları üzerindeki zon çapları değerlendirildiğinde: HS-24, HS-48 ve HS-72 için en yüksek inhibisyon etki *S. aureus* ATCC 35556 (sırasıyla 23,67±0,5 mm; 24,67±0,5 mm; 25 mm/ güçlü etki/++) suşlarına karşı gözlemlendi. HS-24 ve HS-48 uygulamalarında: *S. aureus* ATCC 29213 suşuna karşı inhibisyon zonu gözlenmezken, HS-72 uygulaması sonrasında inhibisyon zonu 10 mm/orta etki olarak kaydedildi.

Agar kuyu difüzyon testinde: 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen hücresiz süpernatantlara ilişkin pH değerleri ölçüldü (Tablo 19). Agar kuyu difüzyon testi sonucunda hücresiz süpernatantlardan (HS-24, HS-48 ve HS-72) en yüksek inhibisyon çapları belirlenenlerin pH'ları, 1 N NaOH veya 1 N HCl kullanılarak 6.7'ye ayarlandı ve nötr hücresiz süpernatant (N-HS) olarak değerlendirildi.

Tablo 19. LAB hücresiz süpernatantlarının pH değerleri.

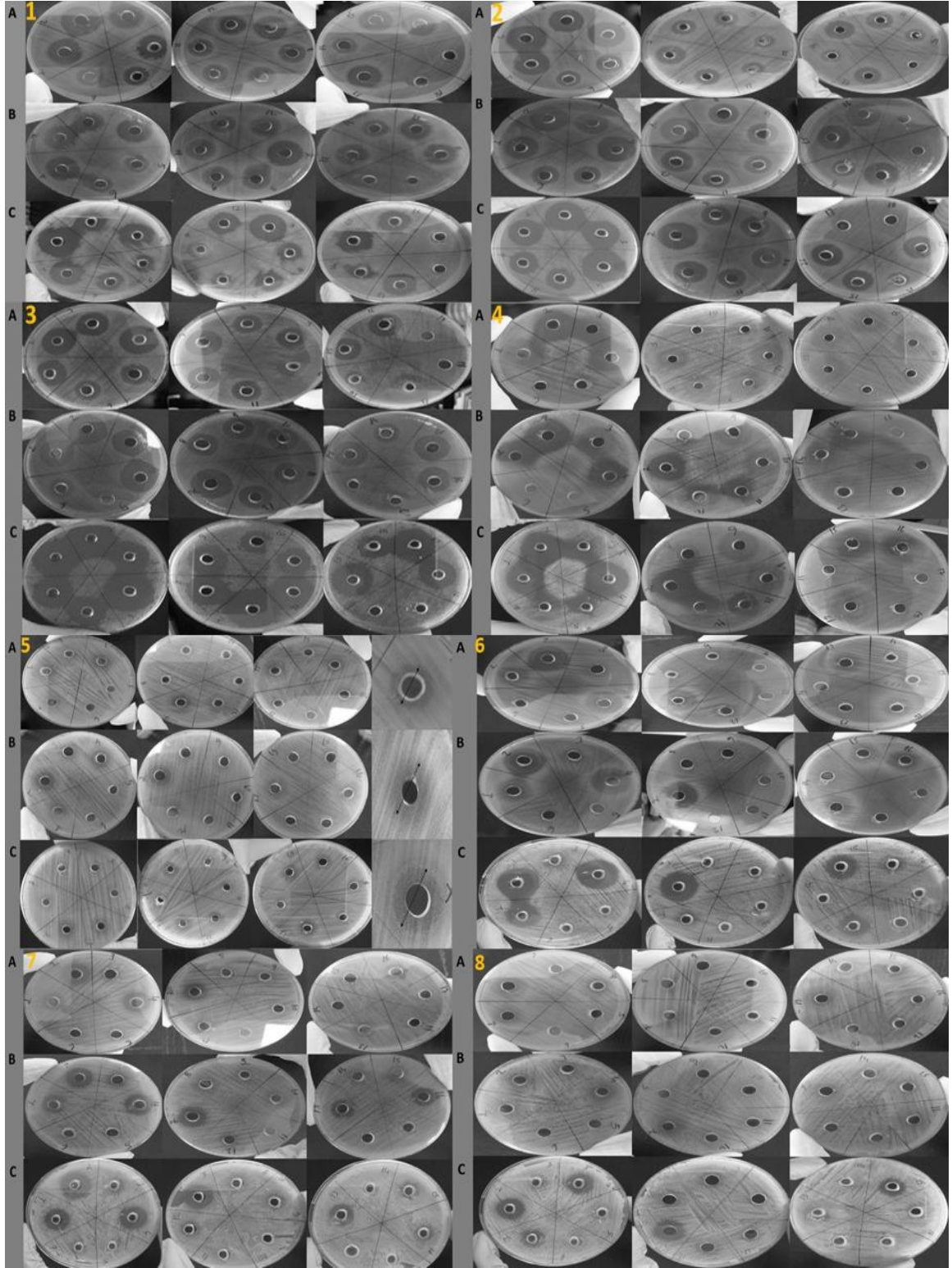
İzolatlar	pH HS-24	pH HS-48	pH HS-72
İ-1 <i>P. parvulus</i> suş 2.6	4,5	4,5	4,5
İ-2 <i>L. paracasei</i> suş RV-M192	4	4	4
İ-3 <i>L. reuteri</i> suş J33	4,5	4,5	4,5
İ-4 <i>L. rhamnosus</i> suş SRMPB19	4	4	4
İ-5 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> suş ND04	5	5	5
İ-7 <i>L. paracasei</i> suş ZFM54	4	4	4
İ-9 <i>L. mesenteroides</i> suş Le8	4,5	4,5	4,5
İ-10 <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> suş CAU4374	4,5	4,5	4,5
İ-11 <i>L. lactis</i> suş IL6288	5	5	5
İ-13 <i>L. coryniformis</i> suş MXJ 32	4	4	4
İ-15 <i>L. alimentarius</i> suş HBUAS52461	4	4	4
İ-16 <i>L. reuteri</i> suş SKB1241	4,5	4,5	4,5

LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon zon çaplarının hemen hemen hepsinin HS-72 uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi (Resim 11, Resim 12). Çalışmaya ilişkin sonuçlar Tablo 20’ de verildi.



Resim 11. Agar kuyu difüzyon testi sonuçlarının değerlendirilmesi.

A. İnhibisyon etkinin gözlenmemesi (Örnek, *S. aureus* ATCC 29213) B. İnhibisyon zon çapı belirgin değil (Örnek, *S. aureus* ATCC 25923) C. İnhibisyon zon çapı belirgin (Örnek, *P. aeruginosa* ATCC 27853) D. İnhibisyon zon çapı belirgin (Örnek, *S. aureus* ATCC 35556)



Resim 12. LAB hücresiz süpernatantlarının patojen bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon zon görüntüleri.

A. HS-24, B. HS-48, C. HS-72 (1. *P. aeruginosa* ATCC 15692, 2. *P. aeruginosa* ATCC 27853, 3. *P. aeruginosa* ATCC 9027, 4. *S. aureus* ATCC 35556, 5. *S. aureus* ATCC 29213, 6. *S. aureus* ATCC 33591, 7. *S. aureus* ATCC 6538, 8. *S. aureus* ATCC 25923).

Tablo 20. LAB hücresiz süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi.

Laktik Asit Bakteri İzolatları		İnhibisyon Zon Çapları (AO ± SS) mm							
		<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>				
		(ATCC 15692)	(ATCC 27853)	(ATCC 9027)	(ATCC 35556)	(ATCC 29213)	(ATCC 33591)	(ATCC 6538)	(ATCC 25923)
(İ-1-HS)	HS-24	20 ±0,00 ++	20,67±0,5 ++	21,11±0,33 ++	15,33±0,5 +	10,22±0,44 +	15,56±0,53 +	17±0,00 +	15,56±0,53 +
<i>P. parvulus</i> suş 2.6	HS-48	20,67±0,5 ++	20±0,00 ++	20,67±0,5 ++	20±0,00 ++	10±0,00 +	17,67±0,5 +	19±0,00 +	15,33±0,5 +
	HS-72	20,56±0,53 ++	21±0,00 ++	30±0,00 ++	24,67±0,5 ++	10±0,00 +	20±0,00 ++	20±0,00 ++	16±0,00 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-2-HS)	HS-24	20,11±0,33 ++	20±0,00 ++	21,22±0,44 ++	20,33±0,5 ++	10 ±0,00 +	15±0,00 +	16,11±0,33 +	12,11±0,33 +
<i>L. paracasei</i> suş RV-M192	HS-48	20,33±0,5 ++	20±0,00 ++	24,33±0,5 ++	20,33±0,5 ++	10 ±0,00 +	15,33±0,5 +	18±0,00 +	15,33±0,5 +
	HS-72	24,67±0,5 ++	24±0,00 ++	30,67±0,5 ++	25±0,00 ++	10 ±0,00 +	25,22±0,44 ++	20,33±0,5 ++	17,67±0,5 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-3-HS)	HS-24	20,67±0,5 ++	20±0,00 ++	20,22±0,44 ++	20±0,00 ++	0	0	0	0
<i>L. reuteri</i> suş J33	HS-48	16±0,00 +	20±0,00 ++	21,67±0,5 ++	20,67±0,5 ++	0	0	10±0,00 +	0
	HS-72	15,67±0,5 +	20±0,00 ++	22 ±0,00 ++	21±0,00 ++	0	0	10±0,00 +	0
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-4-HS)	HS-24	19,78±0,44 +	20,89±0,33 ++	20±0,00 ++	20,89±0,33 ++	0	20±0,00 ++	16±0,00 +	10 ±0,00 +
<i>L. rhamnosus</i> suş SRMPB19	HS-48	20±0,00 ++	20,44±0,73 ++	25±0,00 ++	20,67±0,5 ++	0	15 ±0,00 +	16±0,00 +	17±0,00 +
	HS-72	21±0,00 ++	25±0,00 ++	30,33±0,5 ++	25,67±0,5 ++	0	25,33±0,5 ++	18,33±0,5 +	17±0,00 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0

	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-5-HS)	HS-24	14,67±0,5 +	16±0,00 +	16±0,00 +	0	0	0	0	0
<i>L. delbrueckii</i>	HS-48	14,67±0,5 +	15,33±0,5 +	19,33±0,5 +	0	0	0	0	0
subsp. <i>bulgaricus</i>	HS-72	15,22±0,44 +	16,67±0,5 +	20±0,00 ++	0	0	0	0	0
suş ND04	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-7-HS)	HS-24	20±0,00 ++	20±0,00 ++	20±0,00 ++	22,44±0,53 ++	10±0,00 +	15±0,00 +	15±0,00 +	10±0,00 +
<i>L. paracasei</i> suş	HS-48	22±0,00 ++	21,11±0,33 ++	21,44±0,73 ++	25,11±0,33 ++	10±0,00 +	15±0,00 +	15±0,00 +	10±0,00 +
ZFM54	HS-72	25±0,00 ++	24,33±0,5 ++	25,44±0,53 ++	25,33±0,5 ++	10±0,00 +	24,67±0,5 ++	17,56±0,53 +	16,11±0,78 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-9-HS)	HS-24	18,67±0,5 +	16±0,00 +	15±0,00 +	22±0,00 ++	0	0	0	0
<i>L. mesenteroides</i> suş	HS-48	18,67±0,5 +	18±0,00 +	19,33±1 +	24,67±0,5 ++	0	0	0	0
Le8	HS-72	20±0,00 ++	20±0,00 ++	20±0,00 ++	26±0,87 ++	0	0	0	10±0,00 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-10-HS)	HS-24	15±0,00 +	15±0,00 +	15±0,00 +	0	0	0	0	0
<i>L. mesenteroides</i>	HS-48	18±0,00 +	16,33±1,32 +	18±0,00 +	0	0	0	0	0
subsp.	HS-72	18±0,00 +	15±0,00 +	18,33±0,5 +	0	0	0	0	0
<i>mesenteroides</i> suş	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
CAU4374	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
(İ-11-HS)	HS-24	15±0,00 +	15±0,00 +	15±0,00 +	15±0,00 +	0	0	0	0
<i>L. lactis</i> suş IL6288	HS-48	15±0,00 +	15±0,00 +	18,33±1,32 +	18,33±1 +	0	0	0	0
	HS-72	15,78±0,44 +	15±0,00 +	21±0,00 ++	19±0,00 +	0	0	0	0
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0

(İ-13-HS)	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
	HS-24	18,33±0,5 +	16,33±0,5 +	16,33±1 +	20,33±0,5 ++	10±0,00 +	15,33±0,5 +	13±0,00 +	10±0,00 +
<i>L. coryniformis</i> suş MXJ 32	HS-48	20±0,00 ++	20±0,00 ++	20±0,00 ++	20,67±0,5 ++	10±0,00 +	16,33±0,5 +	14,67±0,5 +	10±0,00 +
	HS-72	20±0,00 ++	20±0,00 ++	25±0,00 ++	24±0,00 ++	10±0,00 +	18±0,00 +	15±0,00 +	10±0,00 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
	HS-24	17,44±0,53 +	16±0,00 +	17,33±1 +	20,67±0,5 ++	10±0,00 +	10,67±0,5 +	10,67±0,5 +	0
<i>L. alimentarius</i> suş HBUAS52461	HS-48	18,33±0,5 +	20±0,00 ++	20±0,00 ++	24,67±0,5 ++	10±0,00 +	10±0,00 +	12,33±0,5 +	10±0,00 +
	HS-72	21±0,00 ++	20±0,00 ++	25±0,00 ++	25±0,00 ++	10±0,00 +	17±0,00 +	15,89±0,33 +	14,78±0,44 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
	HS-24	17,67±0,5 +	16,67±0,1 +	17±0,87 +	23,67±0,5 ++	0	15,33±0,5 +	12±0,00 +	10±0,00 +
(İ-16-HS)	HS-48	19±0,87 +	20±0,00 ++	20±0,00 ++	24,67±0,5 ++	0	16±0,00 +	14,33±0,5 +	0
	HS-72	20±0,00 ++	17,78±0,44 +	21±0,00 ++	25±0,00 ++	10±0,00 +	16±0,00 +	16±0,00 +	10±0,00 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
	HS-24	17,67±0,5 +	16,67±0,1 +	17±0,87 +	23,67±0,5 ++	0	15,33±0,5 +	12±0,00 +	10±0,00 +
<i>L. reuteri</i> suş SKB1241	HS-48	19±0,87 +	20±0,00 ++	20±0,00 ++	24,67±0,5 ++	0	16±0,00 +	14,33±0,5 +	0
	HS-72	20±0,00 ++	17,78±0,44 +	21±0,00 ++	25±0,00 ++	10±0,00 +	16±0,00 +	16±0,00 +	10±0,00 +
	N-HS-72	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
	HS-24	17,67±0,5 +	16,67±0,1 +	17±0,87 +	23,67±0,5 ++	0	15,33±0,5 +	12±0,00 +	10±0,00 +

(Tablo 20' nin devamı)

*İnhibisyon zon belirlenmemiş: - (Negatif)

İnhibisyon zon < 10 mm ya da belirgin değil: ± (Düşük inhibisyon etki)

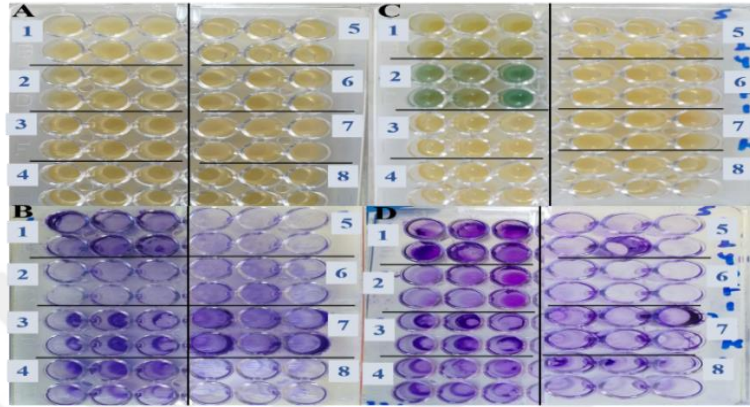
10 mm ≤ İnhibisyon zon < 20 mm, + (Orta inhibisyon etki)

20 mm ≤ İnhibisyon zon ++ (Güçlü inhibisyon etki) (Shokryazdan ve ark, 2014).

AO: Aritmetik Ortalama, SS: Standart Sapma

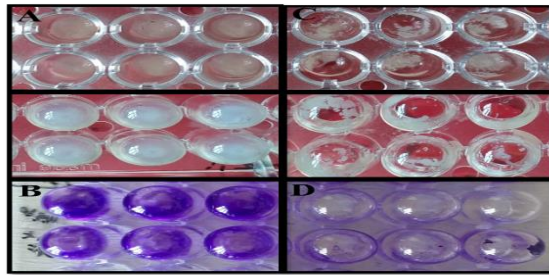
4.4. Patojen Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Potansiyelleri

Patojenlerin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma potansiyelleri kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile değerlendirildi ve *S. aureus* ATCC 33591 suşunun orta dereceli, diğer tüm patojenlerin güçlü biyofilm oluşturdıkları belirlendi (Resim 13, Resim 14), (Tablo 21).



Resim 13. Patojen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelleri.

A. 24 saatlik inkübasyon plağı B. 24 saat inkübasyon sonrası gelişen biyofilm yapılar (Kristal viyole uygulaması sonrası plak görüntüsü) C. 72 saatlik inkübasyon plağı D. 72 saat inkübasyon sonrası gelişen biyofilm yapılar (Kristal viyole uygulaması sonrası plak görüntüsü) (1. *P. aeruginosa* ATCC 15692, 2. *P. aeruginosa* ATCC 27853, 3. *P. aeruginosa* ATCC 9027, 4. *S. aureus* ATCC 35556, 5. *S. aureus* ATCC 29213, 6. *S. aureus* ATCC 33591, 7. *S. aureus* ATCC 6538, 8. *S. aureus* ATCC 25923).



Resim 14. Patojen bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelleri (48 saatlik inkübasyon plakları).

A. 48 saatlik inkübasyon plağındaki biyofilm yapıların gözlenmesi (güçlü/+++) B. Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar C. 48 saatlik inkübasyon plağındaki biyofilm yapıların gözlenmesi (orta/++) D. Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar **S. aureus* ATCC 6538 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklenmiştir.

Tablo 21. Patojenlerin biyofilm oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi.

Patojenler	24 saat inkübasyon OD MB	48 saat inkübasyon OD MB	72 saat inkübasyon OD MB	Negatif Kontrol OD
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 15692)	+++	+++	+++	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	+++	+++	+++	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 35556)	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 33591)	++	++	++	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	+++	+++	+++	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	+++	+++	+++	-

* OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilm Optik Dansite

0,64 < OD MB ≤ 1,28 (++) Orta biyofilm oluşturucu suşlar

1,28 < OD MB (+++) GÜÇLÜ biyofilm oluşturucu suşlar (Stepanovic ve ark, 2000).

4.5. Hücresiz Süpernatantların Antibiyofilm Etkilerinin Belirlenmesi

4.5.1. Patojenden Önce İnkübasyon

(İ-1-HS) *P. parvulus* suş 2.6'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %38,4 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %88,5 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %92,1 HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++ , *S. aureus* ATCC 35556 ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise zayıf/+ olduğu (HS-72 için orta/++) tespit edildi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* suş RV-M192'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için

en yüksek inhibisyon oranı %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %79 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %89,5 ile HS-48 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %91,5 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-72 orta/++), *S. aureus* ATCC 35556 (HS-24 için orta/++) ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise zayıf/+ olduğu (HS-72 orta/++) tespit edildi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* suş J33'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %78,6 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %82,2 ile HS-24 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %88,6 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-72 orta/++), *S. aureus* ATCC 35556 (HS-72 için güçlü/+++ ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++ olduğu (HS-72 güçlü/+++)) tespit edildi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* suş SRMPB19'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %66,6 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %73,1 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %88 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %86,1 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 HS-24 ve HS-72 için zayıf/+, HS-48 için orta/++ ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++ olduğu (HS-72 güçlü/+++)) belirlendi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %73 ile HS-24 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %82,3 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %86 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %90,1 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler

biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 (HS-72 için orta/++) patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 için zayıf/+ ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++, zayıf/+, güçlü/+++ (sırasıyla HS-24, HS-48, HS-72) tespit edildi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* suş ZFM54'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %85,5 ile HS-24 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %81 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %87,7 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %93 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 (HS-24 için orta/++) ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 (HS-72 için orta/++) patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise zayıf/+ olduğu belirlendi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* suş Le8'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %47,1 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %89,7 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %89,8 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 için zayıf/+ (HS-48 için orta/++) ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++ (HS-24 için zayıf/+) olduğu belirlendi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %66,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %76,5 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %89,2 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %92,6 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 için zayıf/+ ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++ (HS-48 için zayıf/+) olduğu belirlendi.

(İ-11-HS) *L. lactis* suş IL6288'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %37,7 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %89,5 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %86 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 için güçlü/+++ (HS-72 için zayıf/+) ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++ (HS-24 için güçlü/+++)' olduğu belirlendi.

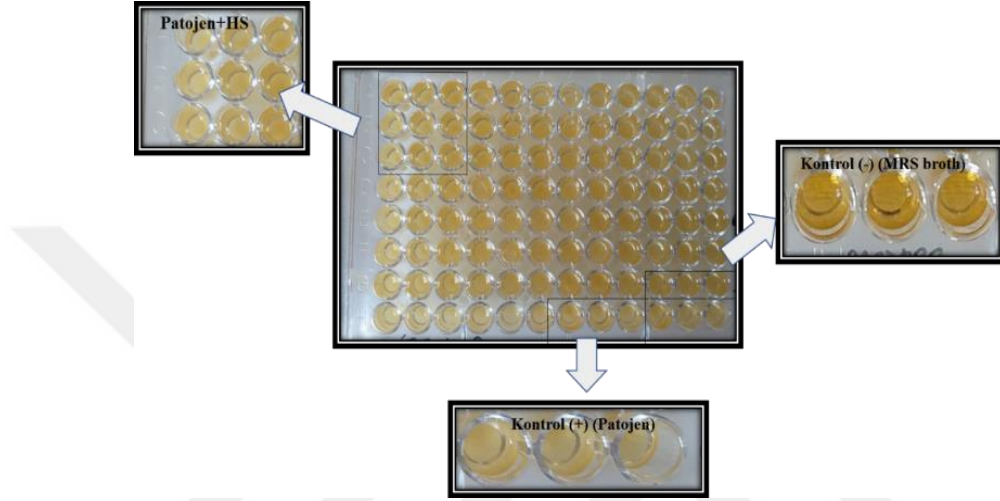
(İ-13-HS) *L. coryniformis* suş MXJ 32' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %66,6 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %71,6 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %90,7 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %93,3 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/ +++, *S. aureus* ATCC 35556 ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise zayıf/+ olduğu belirlendi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* suş HBUAS52461'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %35,3 ile HS-24 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %76,8 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %87,9 ile HS-24 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %92,1 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 için zayıf/+ (HS-48 için orta/++) ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise zayıf/+ (HS-72 için orta/++)' olduğu belirlendi.

(İ-16-HS) *L. reuteri* suş SKB1241'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %58,6 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %87 ile HS-48 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %89,1 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler

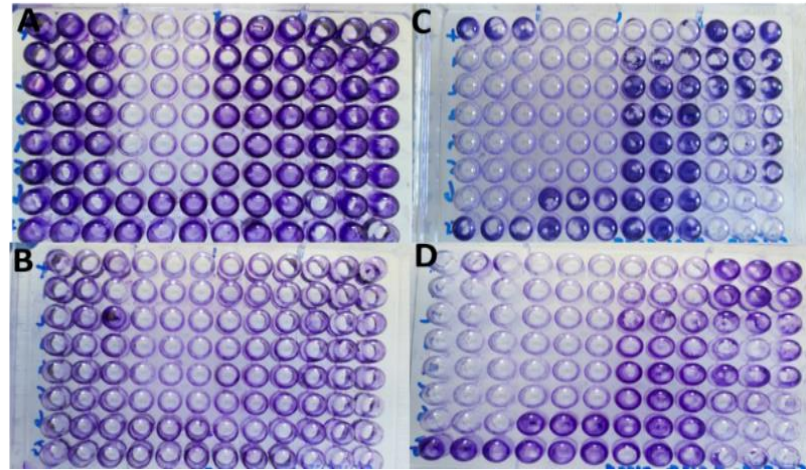
istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri güçlü/+++, *S. aureus* ATCC 35556 için zayıf/+ (HS-72 için orta/++) ve *S. aureus* ATCC 6538 için ise orta/++ olduğu belirlendi.

LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranlarına ilişkin verilere Şekil 8’ de, biyofilm yapılarına da Resim 15 ve 16’ da yer verildi.



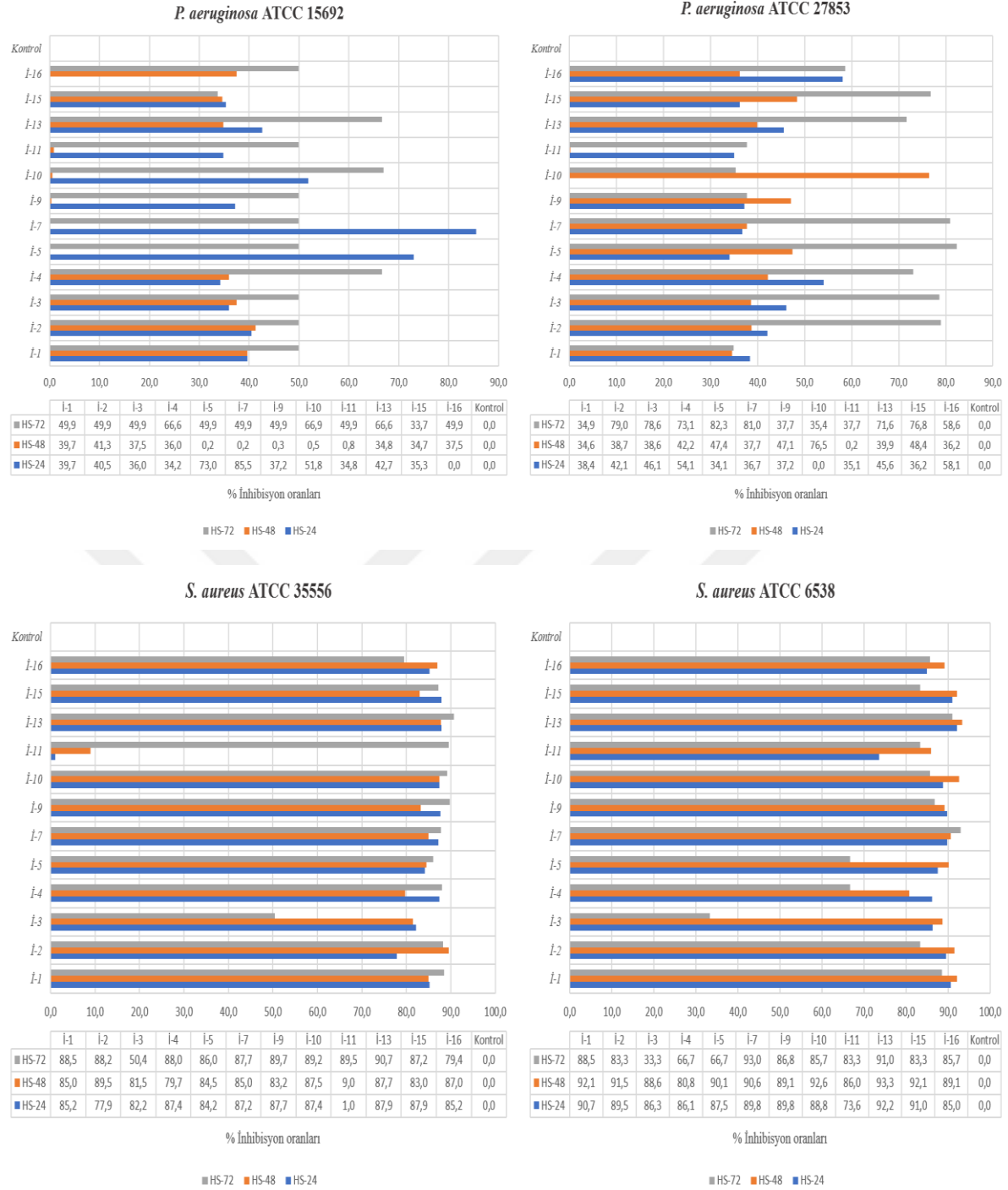
Resim 15. LAB hücresiz süpernatantlarının patojenden önce inkübasyonu sonrası plak görüntüsü.

**S. aureus* ATCC 6538 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklenmiştir.



Resim 16. Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapıları.

A. *P. aeruginosa* ATCC 15692 B. *P. aeruginosa* ATCC 27853 C. *S. aureus* ATCC 35556 D. *S. aureus* ATCC 6538



Şekil 8. LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları.İ-1 *Pediococcus parvulus* suş 2.6, İ-2 *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, İ-3 *Lactobacillus reuteri* suş J33, İ-4 *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, İ-5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, İ-7 *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, İ-9 *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8, İ-10 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, İ-11 *Lactococcus lactis* suş IL6288, İ-13 *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32, İ-15 *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461, İ-16 *Lactobacillus reuteri* suş SKB124, Kontrol-MRS sıvı besiyeri.

Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların (HS-24, HS-48 ve HS-72) anti-biyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyonun etkinin HS-72 (%56,3, 27/48) uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi. Bu nedenle, laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlar (HS-72) nötralizasyon işlemine tabii tutuldu ve optik dansiteleri (OD₅₉₅) değerlendirildi.

(İ-1-HS) *P. parvulus* 2.6 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %49,9 (HS-72), %34,9 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %34,9 (HS-72), %25,5 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %88,5 (HS-72), %41,6 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %88,5 (HS-72), %37,3 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* RV-M192 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %49,9 (HS-72), %31,6 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %79 (HS-72), %33,9 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %88,2 (HS-72), %29,6 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %83,3 (HS-72), %37,7 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* J33 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %49,9 (HS-72), %33,7 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %78,6 (HS-72), %36,7 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %50,4 (HS-72), %17,5 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %44,8 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* SRMPB19 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %66,6 (HS-72), %34,4 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %73,1 (HS-72), %36,4 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %88 (HS-72), %4,3 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %66,7 (HS-72), %61,5 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND04 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %49,9 (HS-72), %35,4 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %66,7 (HS-72), %35,7 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 35556 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* ZFM54 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %81 (HS-72), %38,2 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %93 (HS-72), %43,8 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *S. aureus* ATCC 35556 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* Le8 izolatına ait inhibisyon oranları: *S. aureus* ATCC 35556 için %89,7 (HS-72), %83 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %86,8 (HS-72),

%85,7 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CAU4374 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %66,9 (HS-72), %33,9 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %35,4 (HS-72), %36,4 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %89,2 (HS-72), %70,4 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %85,7 (HS-72), %74,7 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-11-HS) *L. lactis* IL6288 izolatına ait inhibisyon oranları: *S. aureus* ATCC 35556 için %89,5 (HS-72), %38,8 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %83,3 (HS-72), %70,7 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-13-HS) *L. coryniformis* MXJ 32 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %71,6 (HS-72), %37,4 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %90,7 (HS-72), %25,8 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %91 (HS-72), %51,5 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* HBUAS52461 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %76,8 (HS-72), %37,9 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %87,2 (HS-72), %22,3 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %83,3 (HS-72), %35,7 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-16-HS) *L. reuteri* SKB1241 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %49,9 (HS-72), %35,6 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %58,6 (HS-72), %39,4 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %85,7 (HS-72), %38 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *S. aureus* ATCC 35556 için gözlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

Değerlendirmeye ilişkin veriler Şekil 9' da yer almaktadır.



Şekil 9. N-HS-72 ve HS-72 hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları.

İ-1 *Pediococcus parvulus* suş 2.6, İ-2 *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, İ-3 *Lactobacillus reuteri* suş J33, İ-4 *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, İ-5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, İ-7 *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, İ-9 *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8, İ-10 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, İ-11 *Lactococcus lactis* suş IL6288, İ-13 *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32, İ-15 *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461, İ-16 *Lactobacillus reuteri* suş SKB124, Kontrol- MRS sıvı besiyeri.

4.5.2. Patojen İle Beraber İnkübasyon

Hücresiz süpernatantların patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici olası özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan diğer bir çalışma, süpernatantların patojenler ile beraber inkübasyona bırakılmasıdır. 48 saat inkübasyon sonunda patojenlerin biyofilm oluşturma potansiyelleri, pozitif kontrolleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Buna göre, tüm laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası biyofilm oluşturma kapasitelerinde azalma olduğu tespit edildi (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374' ün, *S. aureus* ATCC 35556 patojenine uygulanan HS-24 uygulaması hariç).

(İ-1-HS) *P. parvulus* suş 2.6'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %95 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,3 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %92,7 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,8 ile HS-24 ve HS-48 uygulamalarında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48) olduğu belirlendi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* suş RV-M192'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %95 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,8 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %92,2 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %96,2 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri zayıf/+ (HS-24, HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24, HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-48) olduğu belirlendi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* suş J33' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %95,3 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %92,3 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %93,7 ile HS-72

uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24 ve HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-24) olduğu belirlendi. Ayrıca, *S. aureus* ATCC 35556 için HS-72 orta/++ olduğu tespit edildi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* suş SRMPB19'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %95,8 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,2 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %93 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24) ve güçlü/+++ (HS-48), *S. aureus* ATCC 6538 için ise, zayıf/+ (HS-24, HS-48 ve HS-72) olduğu belirlendi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %94,8 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,2 ile HS-48 ve HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,3 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 6538 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24) ve güçlü/+++ (HS-48) olduğu belirlendi. Ayrıca, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 6538 patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri HS-72 için zayıf/+ olarak değerlendirildi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* suş ZFM54'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %94,7 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,7 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,2 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler

istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24 ve HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-48 ve HS-72) olarak değerlendirildi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* suş Le8'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %95,7 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,2 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,8 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için güçlü/+++ (HS-24) ve orta/++ (HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-48) olarak değerlendirildi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %93 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,7 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için zayıf/+ (HS-24, HS-48 ve HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için güçlü/+++ (HS-24) ve orta/++ (HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-48) olarak değerlendirildi.

(İ-11-HS) *L. lactis* suş IL6288'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %96 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,7 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %93 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için

zayıf/+ (HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için güçlü/+++ (HS-24) ve orta/++ (HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48) olarak değerlendirildi.

(İ-13-HS) *L. coryniformis* suş MXJ 32'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %95,8 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,5 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,8 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için zayıf/+ (HS-48), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24 ve HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-48) olarak değerlendirildi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* suş HBUAS52461'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %94,5 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %93,8 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %96 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için zayıf/+ (HS-24, HS-48 ve HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24 ve HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48) olarak değerlendirildi.

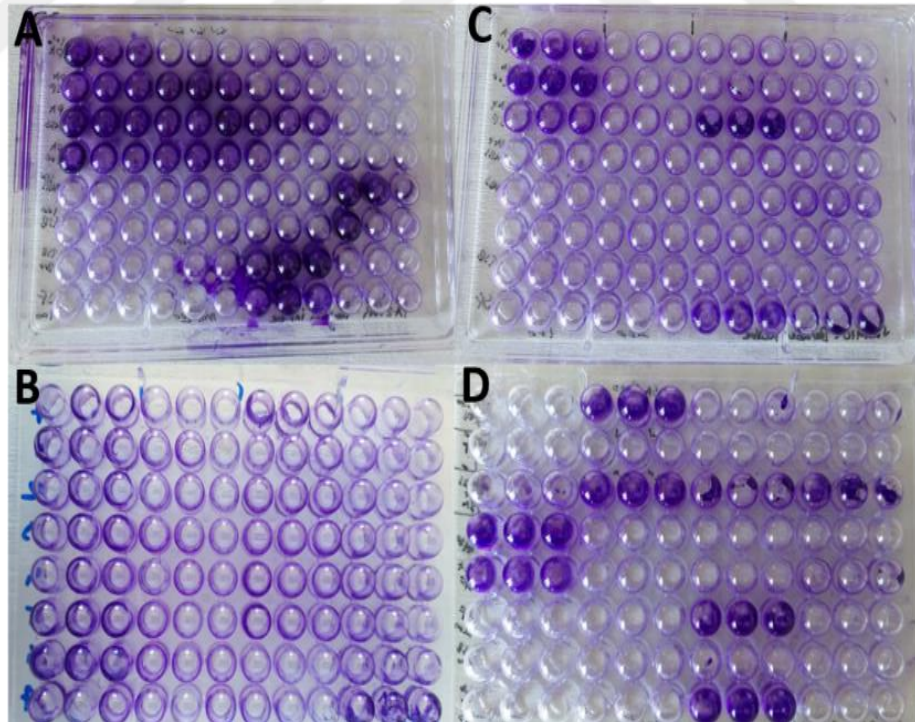
(İ-16-HS) *L. reuteri* suş SKB1241'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %94,7 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %91,2 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %94,2 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,8 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için zayıf/+ (HS-24 ve HS-48), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için zayıf/+ (HS-24, HS-48 ve HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için orta/++ (HS-24 ve HS-48) ve *S. aureus* ATCC 6538 için zayıf/+ (HS-48) olarak değerlendirildi.

LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranlarına ilişkin verilere Şekil 10' da, biyofilm yapılarına da Resim 17 ve 18' de yer verilmiştir.



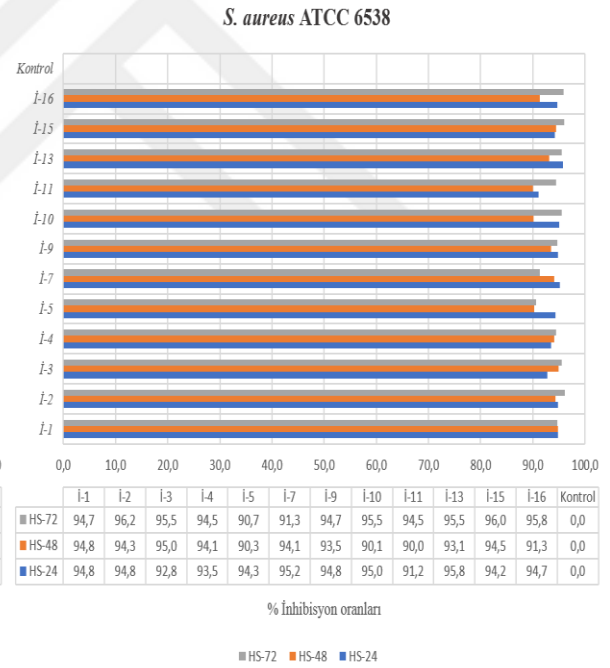
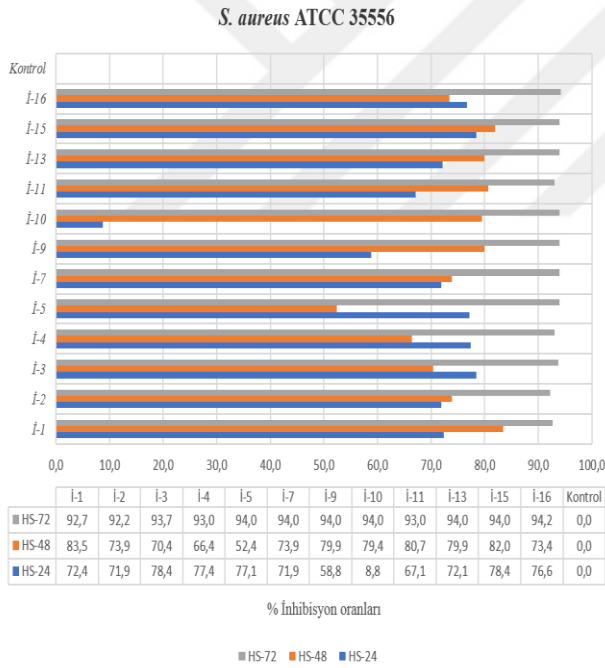
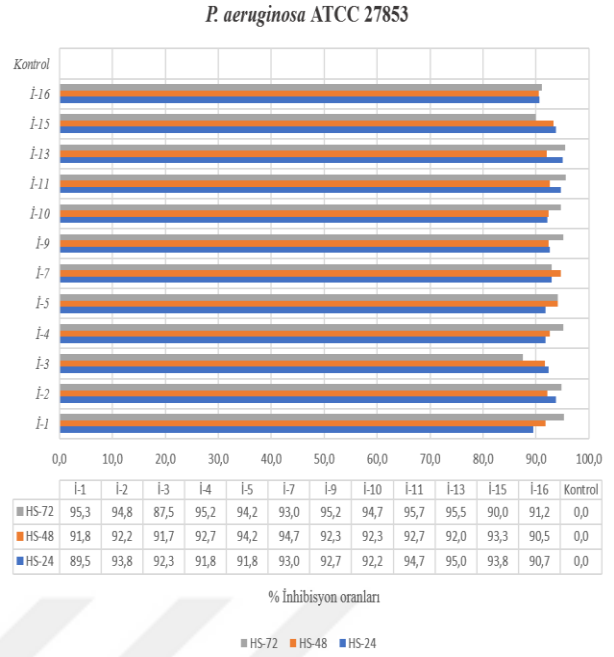
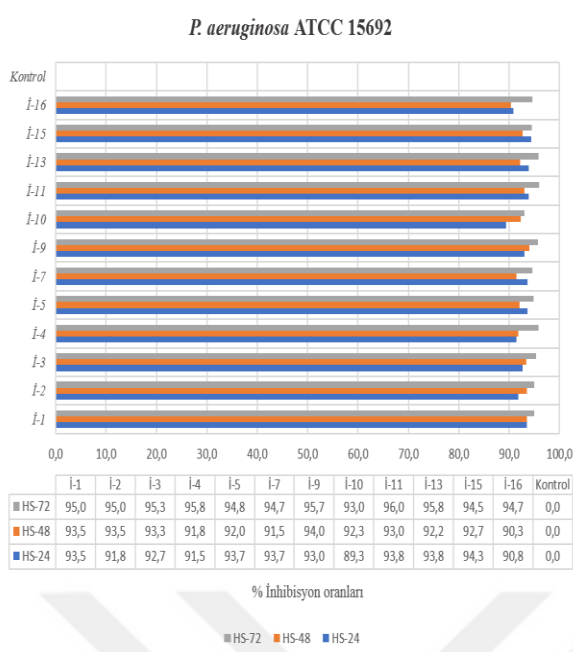
Resim 17. LAB hücresiz süpernatantlarının patojen ile beraber inkübasyonu sonrası plak görüntüsü.

**P. aeruginosa* ATCC 15692 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklendirilmiştir.



Resim 18. Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar.

A. *P. aeruginosa* ATCC 15692 B. *P. aeruginosa* ATCC 27853 C. *S. aureus* ATCC 35556 D. *S. aureus* ATCC 6538.



Şekil 10. LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları.İ-1 *Pediococcus parvulus* suş 2.6, İ-2 *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, İ-3 *Lactobacillus reuteri* suş J33, İ-4 *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, İ-5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, İ-7 *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, İ-9 *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8, İ-10 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, İ-11 *Lactococcus lactis* suş IL6288, İ-13 *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32, İ-15 *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461, İ-16 *Lactobacillus reuteri* suş SKB124, Kontrol- MRS sıvı besiyeri.

LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantların (HS-24, HS-48 ve HS-72) antibiyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon etkinin HS-72 (%81.3, 39/48) uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi. Bu anlamda, laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlar (N-HS-72) nötralizasyon işlemine tabii tutuldu ve optik dansiteleri (OD₅₉₅) değerlendirildi. N-HS-72 uygulama sonrası inhibisyon oranları, bazı izolatlara ait HS uygulamalarında azalırken, bazılarında HS-72 inhibisyon oranlarına yakın olarak bulundu.

(İ-1-HS) *P. parvulus* 2.6 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95 (HS-72), %90,5 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,3 (HS-72), %75,5 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 92,7 (HS-72), %59,4 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,7 (HS-72), %87,3 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* RV-M192 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95 (HS-72), %73,3 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,8 (HS-72), %75 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 92,2 (HS-72), %33,6 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %96,2 (HS-72), %82,8 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* J33 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95,3 (HS-72), %85 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %87,5 (HS-72), %81,1 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 93,7 (HS-72), %71,9 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5 (HS-72), %88 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* SRMPB19 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95,8 (HS-72), %83,5 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,2 (HS-72), %73,5 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 93 (HS-72), %83,2 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,5 (HS-72), %93,2 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND04 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %94,8 (HS-72), %84,8 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,2 (HS-72), %49,7 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 94 (HS-72), %77,9 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %90,7 (HS-72), %80,8 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* ZFM54 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %94,7 (HS-72), %89,6 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %93 (HS-72), %82,3 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %94 (HS-72), %89,5 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %91,3 (HS-72), %79,7 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* Le8 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95,7 (HS-72), %79 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,2 (HS-72),

%63,4 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 94 (HS-72), %88,2 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,7 (HS-72), %94,3 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CAU4374 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %93 (HS-72), %57,1 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %94,7 (HS-72), %54,9 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %94 (HS-72), %23,8 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5 (HS-72), %80,8 (N-HS-72) olarak belirlendi.

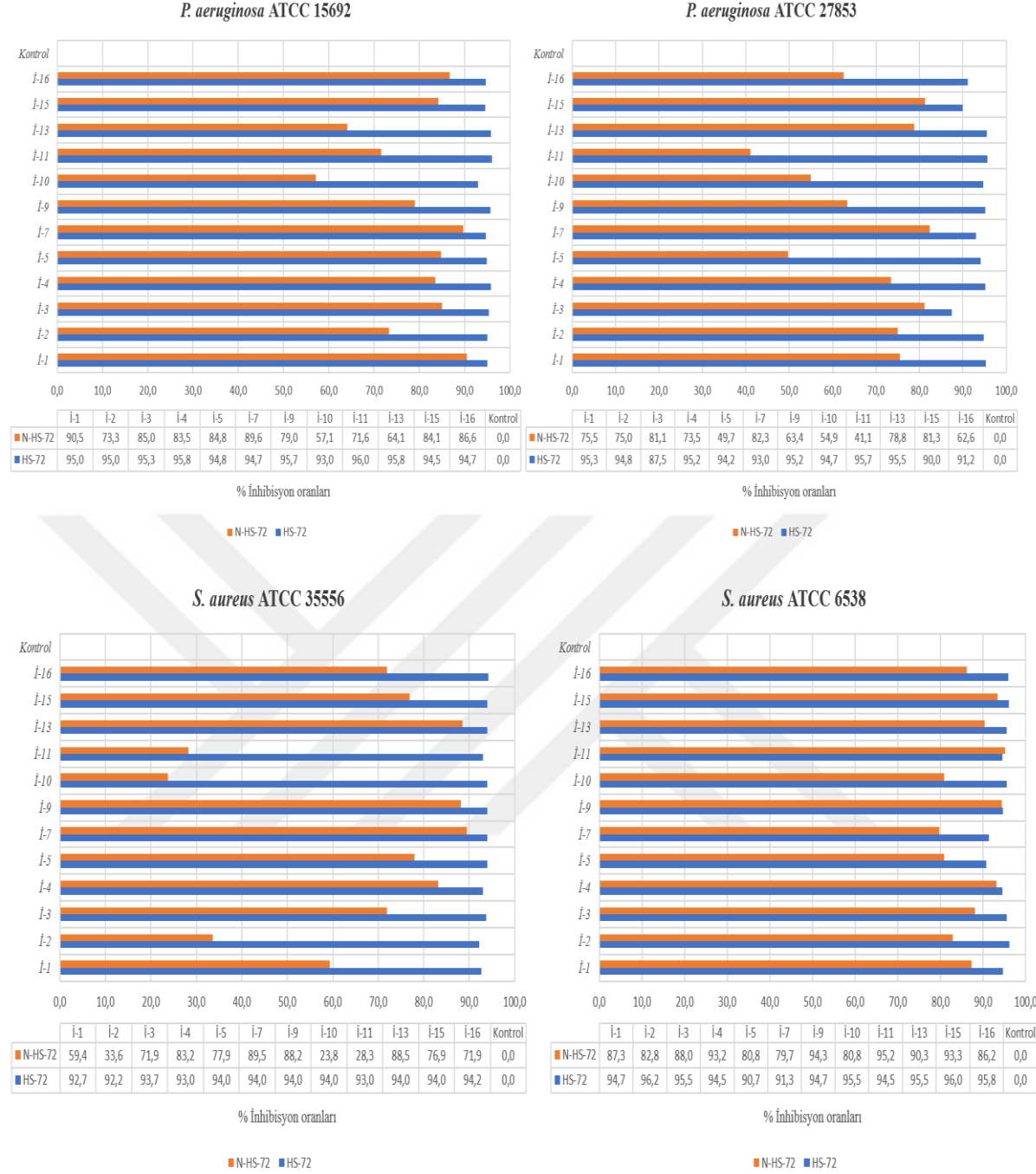
(İ-11-HS) *L. lactis* IL6288 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %96 (HS-72), %71,6 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,7 (HS-72), %41,1 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 93 (HS-72), %28,3 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %94,5 (HS-72), %95,2 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-13-HS) *L. coryniformis* MXJ 32 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95,8 (HS-72), %64,1 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,5 (HS-72), %78,8 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 94 (HS-72), %88,5 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5 (HS-72), %90,3 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* HBUAS52461 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %94,5 (HS-72), %84,1 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %90 (HS-72), %81,3 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %94 (HS-72), %76,9 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %96 (HS-72), %93,3 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-16-HS) *L. reuteri* SKB1241 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %94,7 (HS-72), %86,6 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %91,2 (HS-72), %62,6 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için % 94,2 (HS-72), %71,9 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,8 (HS-72), %86,2 (N-HS-72) olarak belirlendi.

Değerlendirmeye ilişkin veriler Şekil 11’de yer almaktadır.



Şekil 11. N-HS-72 ve HS-72 hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları.

İ-1 *Pediococcus parvulus* suş 2.6, İ-2 *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, İ-3 *Lactobacillus reuteri* suş J33, İ-4 *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, İ-5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, İ-7 *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, İ-9 *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8, İ-10 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, İ-11 *Lactococcus lactis* suş IL6288, İ-13 *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32, İ-15 *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461, İ-16 *Lactobacillus reuteri* suş SKB124, Kontrol- MRS sıvı besiyeri.

4.5.3. Patojenden Sonra İnkübasyon

Bu çalışmada, LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar (HS-24, HS-48 ve HS-72) patojenler tarafından 48 saat inkübasyon sonrası biyofilm yapılarının olduğu kuyulara eklenip, biyofilm yıkıcı etkileri araştırıldı. Yapılan HS uygulamalar sonrası biyofilm yapıları içeren kuyulara ilişkin OD değerleri, patojenlerin uygulama yapılmayan pozitif kontrol ile karşılaştırılarak yüzde (%) inhibisyon oranları belirlendi.

(İ-1-HS) *P. parvulus* suş 2.6' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %83,6 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %74,8 ile HS-48 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). *S. aureus* ATCC 35556'a karşı inhibisyon etkinin ise düşük (%4,3) olduğu belirlendi. Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerinin tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 uygulaması orta/++) olduğu değerlendirildi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* suş RV-M192'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %84,1 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %80,6 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %24,8 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %35,7 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-48 ve HS-72 uygulaması orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* suş J33'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %85,5 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %89,3 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %74,9 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %57,2 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72

orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-48 zayıf/+, HS-72 için orta/++ ve *S. aureus* ATCC 35556 için HS-72 için orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* suş SRMPB19'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %83,8 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %82,1 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %35,1 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-48 ve HS-72 için orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %85,5 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %87,8 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %57,5 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-48 ve HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-48 ve HS-72 için orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* suş ZFM54'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %84 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %87,8 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %34,3 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24, HS-48 ve HS-72 için orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* suş Le8'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için

en yüksek inhibisyon oranı %85,1 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %89,3 ile HS-48 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %35,1 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 orta/++ ve HS-48 zayıf/+) olarak değerlendirildi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %84,8 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %93,5 ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %75,7 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %36,2 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 ve HS-48 orta/++, HS-72 zayıf/+, *S. aureus* ATCC 35556 için HS-72 orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-11-HS) *L. lactis* suş IL6288'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %85,5 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %86,8 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %75,2 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %44,1 ile HS-48 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 ve HS-48 orta/++, *S. aureus* ATCC 35556 için HS-72 orta/++) olarak değerlendirildi.

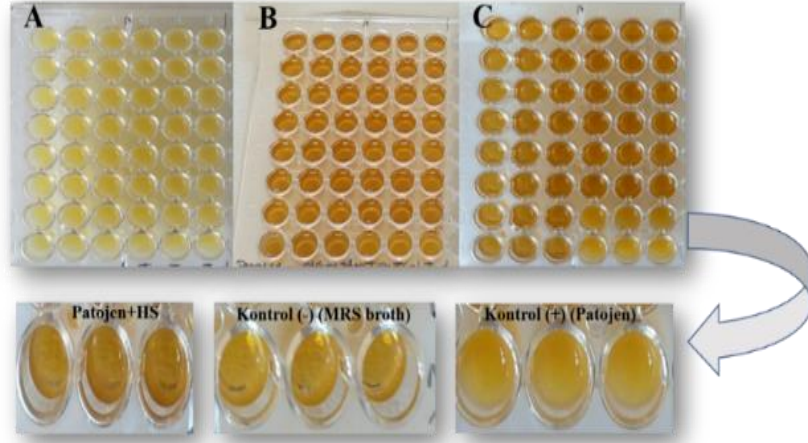
(İ-13-HS) *L. coryniformis* suş MXJ 32'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %83,6 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %80 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %34,8 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %38,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek,

veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 orta/++) olarak değerlendirildi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* suş HBUAS52461'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %83,3 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %84,6 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %53,6 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %35,1 ile HS-24 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-48 ve HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 orta/++) olarak değerlendirildi.

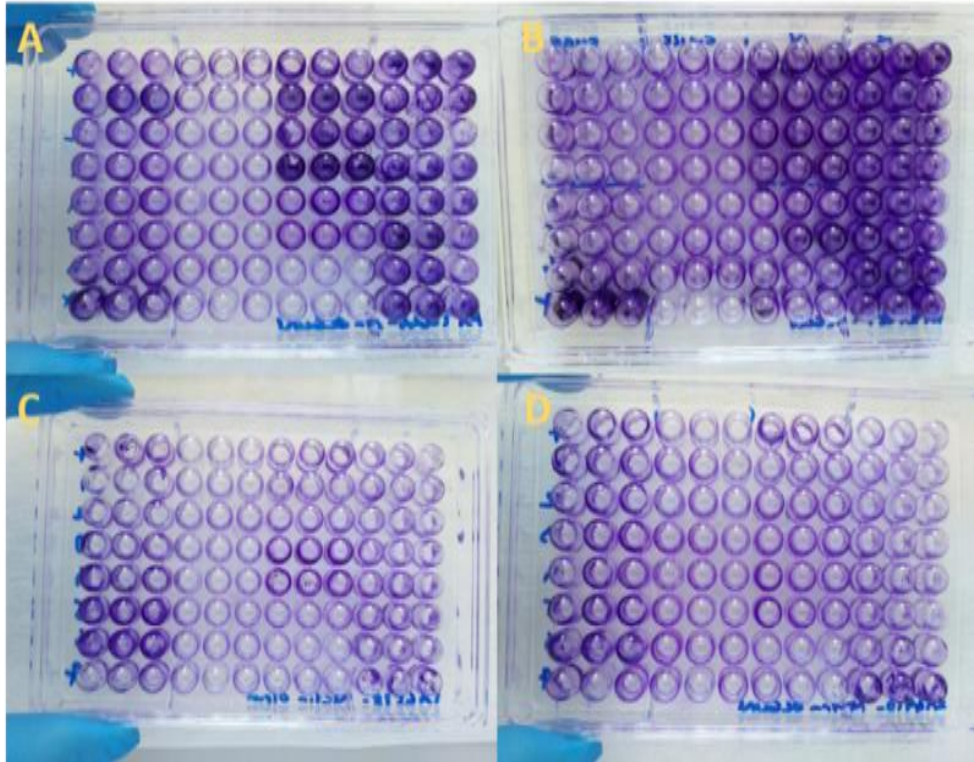
(İ-16-HS) *L. reuteri* suş SKB1241'e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonrası patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı %83,3 ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %89,5 ile HS-24 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için %74,9 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %52,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedilerek, veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Uygulamaya ilişkin veriler biyofilm kesme değerine göre klinik olarak yorumlandığında; patojenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri tüm gruplar içerisinde güçlü/+++ (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-72 orta/++, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 zayıf/+ ve HS-72 orta/++, *S. aureus* ATCC 35556 için HS-72 orta/++) olarak değerlendirildi.

LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranlarına ilişkin verilere Şekil 12' de, biyofilm yapıları da Resim 19 ve 20' de yer verildi.



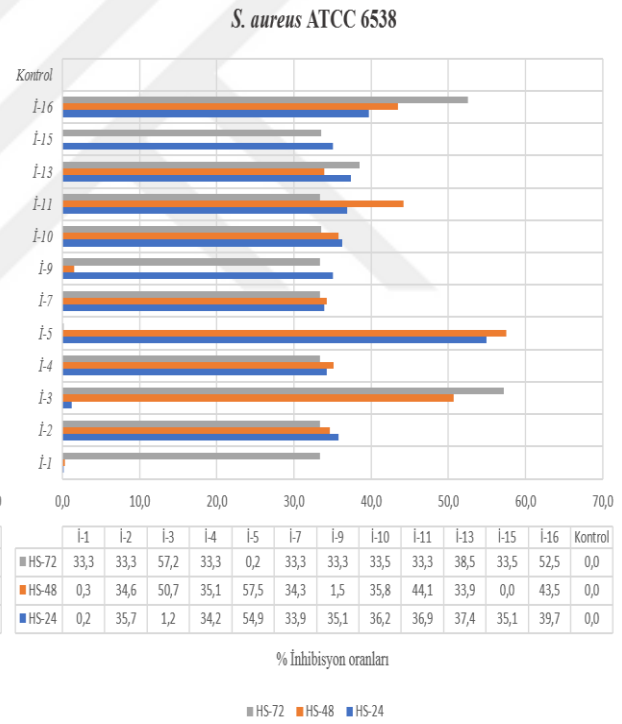
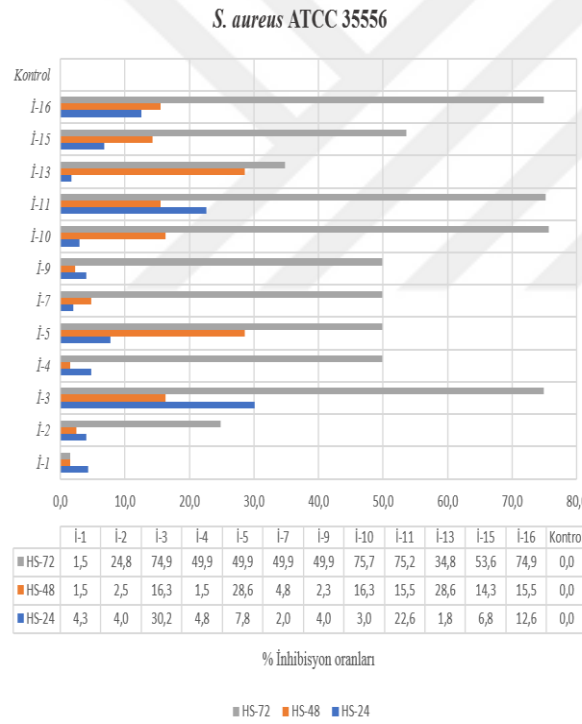
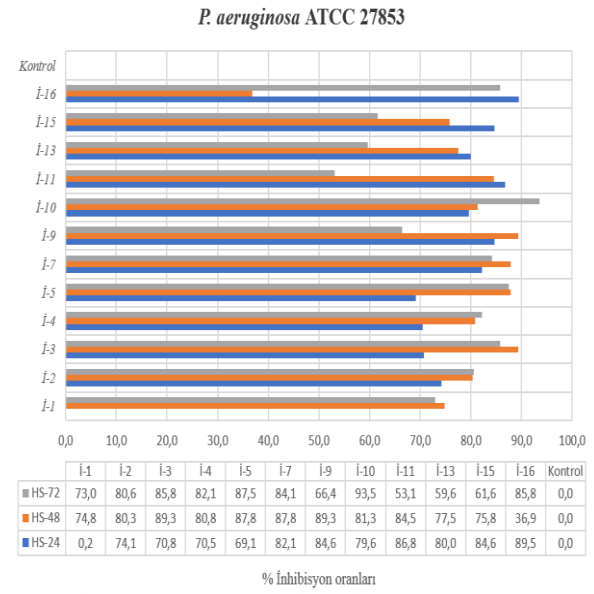
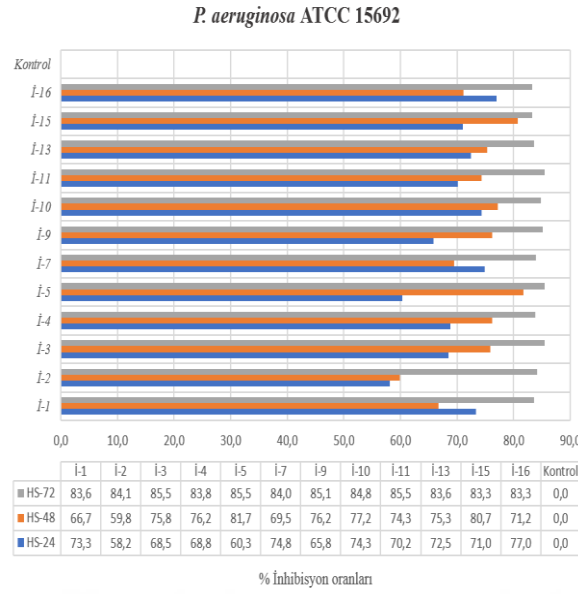
Resim 19. LAB hücresiz süpernatantlarının patojenden sonra (gelişen biyofilm yapılar) plaklara eklenmesi ve inkübasyonu.

A. Patojen bakteri B. Patojen bakteri + Hücresiz süpernatant (HS) C. Patojen bakteri + Hücresiz süpernatant (HS) inkübasyon sonrası plak görüntüsü **P. aeruginosa* ATCC 15692 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklenmiştir.



Resim 20. Kristal viyole uygulaması sonrası biyofilm yapılar.

A.*P. aeruginosa* ATCC 15692 B. *P. aeruginosa* ATCC 27853 C. *S. aureus* ATCC 35556 D. *S. aureus* ATCC 6538



Şekil 12. LAB hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları.İ-1 *Pediococcus parvulus* suş 2.6, İ-2 *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, İ-3 *Lactobacillus reuteri* suş J33, İ-4 *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, İ-5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, İ-7 *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, İ-9 *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8, İ-10 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, İ-11 *Lactococcus lactis* suş IL6288, İ-13 *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32, İ-15 *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461, İ-16 *Lactobacillus reuteri* suş SKB124, Kontrol- MRS sıvı besiyeri.

Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların (HS-24, HS-48 ve HS-72) antibiyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde, en yüksek inhibisyonun etkinin HS-72 (%62,5, 30/48) uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi. Bu anlamda, laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlar (N-HS-72) nötralizasyon işlemine tabii tutuldu ve optik dansiteleri (OD₅₉₅) değerlendirildi. N-HS-72 uygulama sonrası inhibisyon oranları, bazı izolatlara ait HS uygulamalarında azalırken, bazılarında HS-72 inhibisyon oranlarına yakın bulundu.

(İ-1-HS) *P. parvulus* 2.6 izolatına ait inhibisyon oranları: *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. *S. aureus* ATCC 35556'a karşı ise inhibisyon etki kaydedilmedi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için belirlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu (*S. aureus* ATCC 6538 suşu hariç) değerlendirildi.

(İ-2-HS) *L. paracasei* RV-M192 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %84,1 (HS-72), %33,2 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %80,6 (HS-72), %34,6 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %24,8 (HS-72), %24,8 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-3-HS) *L. reuteri* J33 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %85,5 (HS-72), %34,9 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %74,9 (HS-72), %60,2 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %57,2 (HS-72), %50,5 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için belirlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-4-HS) *L. rhamnosus* SRMPB19 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %83,8 (HS-72), %34,7 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %82,1 (HS-72), %34,9 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *S. aureus* ATCC 35556 için belirlenen inhibisyon etkinin neredeyse tamamının kaybolduğu (%7,8) kaydedildi.

(İ-5-HS) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND04 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %87,5 (HS-72), %34,7 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692, *S. aureus* ATCC 6538 için belirlenen inhibisyon etkinin kaybolduğu ve *S. aureus* ATCC 35556 için ise inhibisyon etkinin neredeyse tamamının kaybolduğu (%9) değerlendirildi.

(İ-7-HS) *L. paracasei* ZFM54 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %84 (HS-72), %35,1 (N-HS-72), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %84,1 (HS-72),

%35,1 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %49,9 (HS-72), %27,3 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %25 (N-HS-72) olarak belirlendi.

(İ-9-HS) *L. mesenteroides* Le8 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %85,1 (HS-72), %35,7 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %49,9 (HS-72), %26,1 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için kaydedilen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-10-HS) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* CAU4374 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %84,8 (HS-72), %34,2 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,5 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 35556 için kaydedilen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

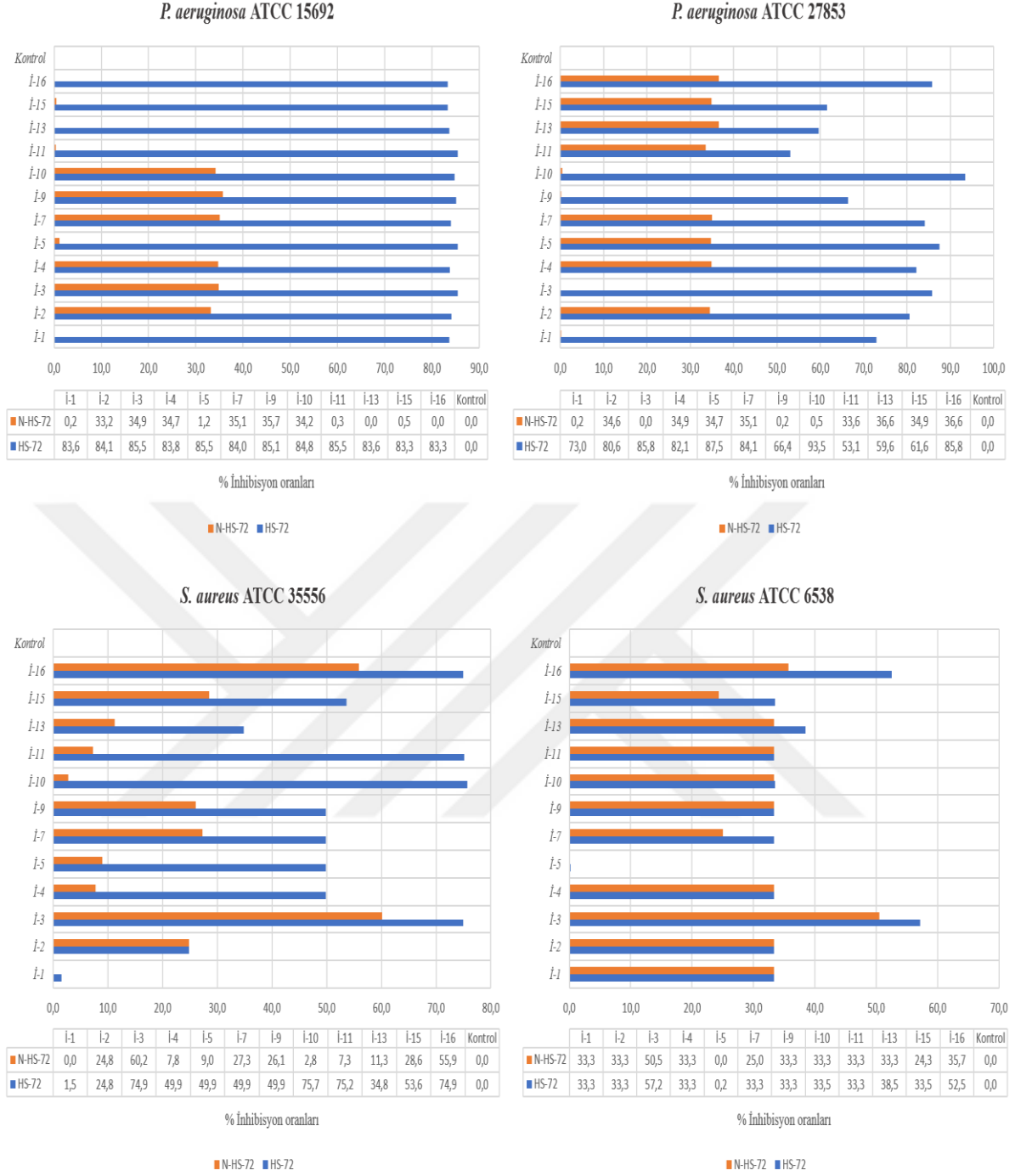
(İ-11-HS) *L. lactis* IL6288 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %53,1 (HS-72), %33,6 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,3 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için kaydedilen inhibisyon etkinin kaybolduğu ve *S. aureus* ATCC 35556 için ise, neredeyse tamamen kaybolduğu (%7,3) değerlendirildi.

(İ-13-HS) *L. coryniformis* MXJ 32 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %59,6 (HS-72), %36,6 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %34,8 (HS-72), %11,3 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %38,5 (HS-72), %33,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için kaydedilen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-15-HS) *L. alimentarius* HBUAS52461 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %61,6 (HS-72), %34,9 (N-HS-72), *S. aureus* ATCC 35556 için %53,6 (HS-72), %28,6 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %33,5 (HS-72), %24,3 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için kaydedilen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

(İ-16-HS) *L. reuteri* SKB1241 izolatına ait inhibisyon oranları: *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %85,8 (HS-72), %36,6 (N-HS-72) *S. aureus* ATCC 35556 için %74,9 (HS-72), %55,9 (N-HS-72) ve *S. aureus* ATCC 6538 için %52,5 (HS-72), %35,7 (N-HS-72) olarak belirlendi. N-HS-72 uygulaması sonrası, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için kaydedilen inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi.

Değerlendirmeye ilişkin veriler Şekil 13’de yer almaktadır.



Şekil 13. N-HS-72 ve HS-72 hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki % inhibisyon oranları. İ-1 *Pediococcus parvulus* suş 2.6, İ-2 *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, İ-3 *Lactobacillus reuteri* suş J33, İ-4 *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, İ-5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, İ-7 *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, İ-9 *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8, İ-10 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, İ-11 *Lactococcus lactis* suş IL6288, İ-13 *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32, İ-15 *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461, İ-16 *Lactobacillus reuteri* suş SKB124, Kontrol- MRS sıvı besiyeri.

4.5.4. Biyofilm Çalışmalarına İlişkin Bulguların Karşılaştırılması

Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre %95 güven aralığında;

- 4 farklı patojen bakteri suşuna (*P. aeruginosa* ATCC 15692, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 35556 ve *S. aureus* ATCC 6538) ait sonuçlar arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).
- LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatant (HS-24, HS-48, HS-72) uygulamalarının sonuçları arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).
- Kontrol grubu ve deney sonucu arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).
- Patojen bakteriler ile hücresiz süpernatant uygulamaları birlikte ele alındığında sonuçlar arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).
- Patojen bakteri ile kontrol grubu ve deney sonucu birlikte ele alındığında sonuçlar arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).
- Hücresiz süpernatant uygulamaları ile kontrol grubu ve deney sonucu birlikte ele alındığında sonuçlar arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).
- Patojen bakteri, hücresiz süpernatant ile kontrol grubu ve deney sonucu birlikte ele alındığında sonuçlar arasında anlamlı fark vardır ($p<0,05$).

Bu sonuçlara göre; yapılan çalışmada 12 farklı LAB izolatına ait belirlenen hücresiz süpernatantlar (HS-24, HS-48 ve HS-72) içerisinde bazıları, patojenlerin biyofilm yapılarını önemli derecede inhibe ettiği, patojen bakteri çeşiti ve hücresiz süpernatanta göre inhibisyon oranlarının değişiklik gösterdiği belirlendi. İstatistiksel analizler, yapılan çalışma sonucunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

Tüm laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan üç uygulama (HS-24, HS-48 ve HS-72) içerisinde, her bir patojen için en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için kaydedilen en yüksek inhibisyon oranı sırasıyla % 96 ve % 95,7 ile *L. lactis* suş IL6288 izolatına ait HS-72' nin patojen ile beraber inkübasyonu, *S. aureus* ATCC 35556 için kaydedilen en yüksek inhibisyon oranı % 94,2 ile *L. reuteri* suş SKB1241 izolatına ait HS-72' nin patojen ile beraber inkübasyonu ve *S. aureus* ATCC 6538 için kaydedilen en yüksek inhibisyon oranı % 96,2 ile *L. paracasei* suş RV-M192 izolatına ait HS-72' nin patojen ile beraber inkübasyonu sonucunda olduğu değerlendirildi ($p<0,05$).

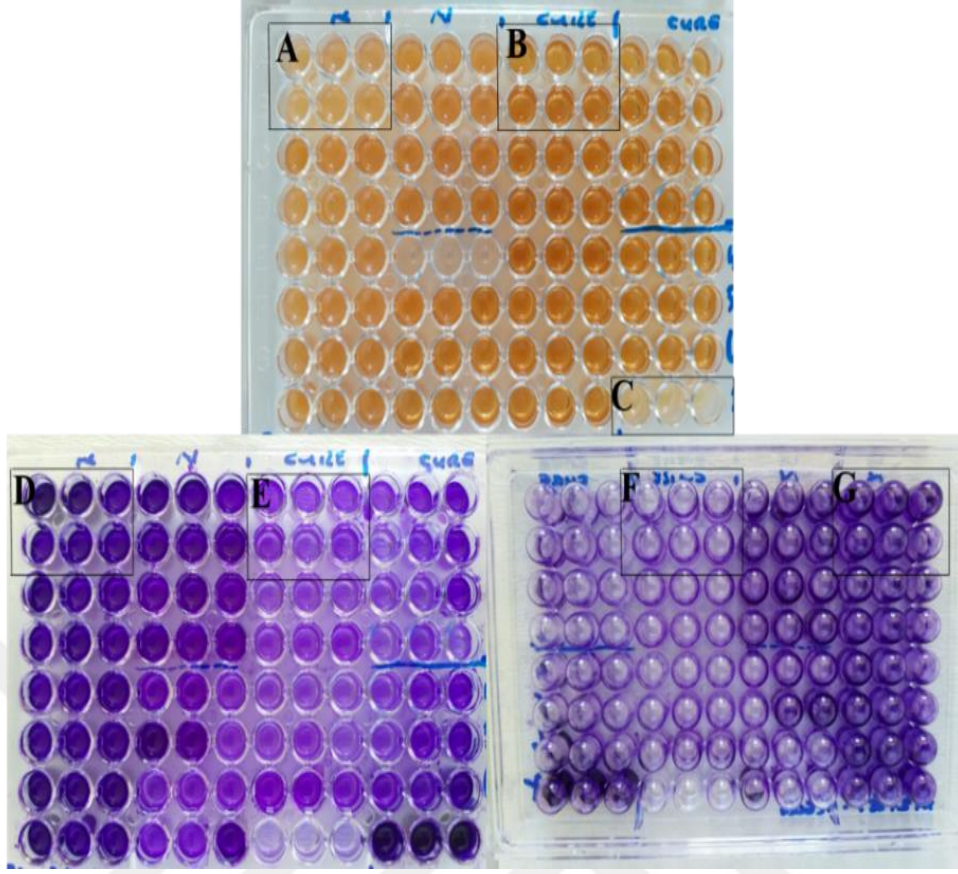
LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan (patojenden önce, patojen ile beraber ve patojenden sonra inkübasyon) uygulamalar içerisinde, patojenlerin en

yüksek inhibisyon oranları değerlendirildi. *P. parvulus* suş 2.6'ya ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları: patojenden önce, *S. aureus* ATCC 6538 için %92,1 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %95,3 ile HS-72 uygulamasında, patojende sonra *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %83,6 ile HS-72 uygulamasında olduğu belirlendi. *L. paracasei* suş RV-M192'ye ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları, patojenden önce, *S. aureus* ATCC 6538 için %91,5 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *S. aureus* ATCC 6538 için %96,2 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %84,1 ile HS-72 uygulamasında olduğu tespit edildi. *L. reuteri* suş J33' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları, patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için %88,6 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %89,3 ile HS-48 uygulamasında olduğu belirlendi. *L. rhamnosus* suş SRMPB19'a ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 35556 için % 88 ile HS-72 uygulamasında, patojen ile beraber *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95,8 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 15692 için % 83,8 ile HS-72 uygulamasında olduğu belirlendi. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04' e ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için %90,1 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %94,8 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için % 87,8 ile HS-48 uygulamasında olduğu tespit edildi. *L. paracasei* suş ZFM54' e ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için %93 ile HS-72 uygulamasında, patojen ile beraber *S. aureus* ATCC 6538 için %95,2 ile HS-24 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için %87,8 ile HS-48 uygulamasında olduğu belirlendi. *L. mesenteroides* suş Le8' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için %89,8 ile HS-24 uygulamasında, patojen ile beraber *P. aeruginosa* ATCC 15692 için %95,7 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı % 89,3 ile HS-48 uygulamasında olduğu tespit edildi. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374'e ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için % 92,6 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *S. aureus* ATCC 6538 için %95,5

ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı % 93,5 ile HS-72 uygulamasında olduğu belirlendi. *L. lactis* suş IL6288'e ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 35556 için % 89,5 ile HS-72 uygulamasında, patojen ile beraber *P. aeruginosa* ATCC 15692 için % 96 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı % 86,8 ile HS-24 uygulamasında olduğu kaydedildi. *L. coryniformis* suş MXJ 32' ye ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için % 93,3 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *P. aeruginosa* ATCC 15692 için % 95,8 ile HS-72 uygulamasında ve *S. aureus* ATCC 6538 için %95,8 ile HS-24 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 15692 için % 83,6 ile HS-72 uygulamasında olduğu belirlendi. *L. alimentarius* suş HBUAS52461' e ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için %92,1 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *S. aureus* ATCC 6538 için % 96 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı % 84,6 ile HS-24 uygulamasında olduğu tespit edildi. *L. reuteri* suş SKB1241'e ait hücresiz süpernatantların her üç uygulama sonucunda en yüksek inhibisyon oranları; patojenden önce *S. aureus* ATCC 6538 için % 89,1 ile HS-48 uygulamasında, patojen ile beraber *S. aureus* ATCC 6538 için % 95,8 ile HS-72 uygulamasında, patojenden sonra *P. aeruginosa* ATCC 27853 için % 89,5 ile HS-24 uygulamasında olduğu belirlendi.

Tüm laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan (patojenden önce, patojen ile beraber ve patojenden sonra inkübasyon) uygulamalar içerisinde patojenlerin en yüksek inhibisyon oranları değerlendirildiğinde; patojenden önce inkübasyon sonucu en yüksek inhibisyon etki: *S. aureus* ATCC 6538 (%83.3, 10/12) ve *S. aureus* ATCC 35556 (%16.7, 2/12), patojen ile beraber: *S. aureus* ATCC 6538 (%50, 6/12), *P. aeruginosa* ATCC 15692 (%33.3, 4/12), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (%8.3, 1/12), hem *S. aureus* ATCC 6538 hem de *P. aeruginosa* ATCC 15692 (%8.3, 1/12), patojenden sonra: *P. aeruginosa* ATCC 15692 (%33.3, 4/12) ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 (%66.7, 8/12) suşları için olduğu belirlendi. Yapılan bu üç uygulama içerisinde en yüksek inhibisyon etki *S. aureus* ATCC 6538 (%44.4, 16/36) suşu için kaydedildi.

HS-72 ve N-HS-72 uygulaması sonrası biyofilm yapıların karşılaştırılmasına ilişkin örnek Resim 21' de yer almaktadır.



Resim 21. HS-72 ve N-HS-72 uygulaması sonrası biyofilm yapıların karşılaştırılması.

A. N-HS-72 uygulaması B. HS-72 uygulaması C. Kontrol (+) D. Kristal viyole (KV) uygulaması sonrası N-HS-72 E. KV uygulaması sonrası HS-72 F. KV uygulaması sonrası HS-72 G. KV uygulaması sonrası N-HS-72 **P. aeruginosa* ATCC 27853 suşuna ait çalışmada yapılan uygulamalardan örneklendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

LAB fermentasyon özelliklerinden dolayı süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Peynir üretiminde en yaygın şekilde starter olarak kullanılan bakteri türleri: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ve *Streptococcus thermophilus*' tur. Bu çalışmada, *P. parvulus* suş 2.6, *L. paracasei* suş RV-M192, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, *L. coryniformis* suş MXJ 32 beyaz peynirden, *L. reuteri* suş J33 koyun peynirinden, *L. rhamnosus* suş SRMPB19, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 lor peynirinden izole edildi. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ise çökelekten izole edildi. Yapılan çeşitli araştırmalarda, *L. casei* subsp. *casei*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ve *L. lactis* türleri tulum peynirlerinden izole edilmiştir (Mills ve ark, 2011). Çalışmalara benzer olarak, bu çalışmada *L. lactis* suş IL6288 tulum peynirinden izole edildi.

Yoğurtta tüm fermentasyon metabolizması starter kültürler tarafından düzenlenmektedir. Yoğurt üretiminde starter kültür olarak *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kullanılmaktadır (Bilkova ve ark, 2011). Araştırmacılara paralel olarak, bu çalışmada *L. paracasei* suş ZFM54 ve *L. reuteri* suş SKB1241 izolatları yoğurttan izole edildi. Kefir mikroflorasının araştırıldığı bir çalışmada, *Lactobacillus* spp. ve *Leuconostoc* spp.'nin florada baskın cinsler oldukları belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca, *L. mesenteroides*, *L. casei*, *L. brevis* ve *L. caucasicum* bakteri türleri izole edilmiştir (Simova ve ark, 2002). Araştırmacılara paralel olarak, bu çalışmada *L. mesenteroides* suş Le8 kefirinden izole edildi.

İzolatların tür düzeyinde belirlenebilmesi için yapılan 16S rRNA PZR işlemi sonrasında sekans analizleri değerlendirildi. Sekans analizleri sonuçlarına göre çalışmada; iki adet (%16.7, 2/12) *L. mesenteroides* (*L. mesenteroides* suş Le8, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374), bir adet (%8.3, 1/12) *P. parvulus* suş 2.6, bir adet (%8.3, 1/12) *L. lactis* suş IL6288 ve sekiz adet (%66.7, 8/12) Laktobasil suşu (*L. paracasei* suş RV-M192, *L. reuteri* suş J33, *L. rhamnosus* suş SRMPB19, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, *L. paracasei* suş ZFM54 *L. coryniformis* suş MXJ 32, *L. alimentarius* suş HBUAS52461, *L. reuteri* suş SKB1241) izole edildi.

LAB gibi kommensal bakterilerin, patojenler için direnç genlerin rezervuarı olabileceği düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada, LAB' ın antibiyotik direncinin

insanlarda artmasındaki temel etmenlerden biri olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, hem izolatların hem de metabolitlerinin güvenli kullanımı açısından antibiyotik duyarlılık profillerinin doğru kriterlere göre değerlendirilmesi gerekmektedir. Antibiyotik duyarlılık testleri birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Difüzyon yöntemleri gibi kalitatif veya yarı-kalitatif yöntemler, dolaylı olarak MİK değerlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, günümüzde EFSA tarafından kabul edilmezler (EFSA, 2012). Gradyent difüzyon (E-test) testi, laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık profillerini doğru bir şekilde ortaya koyan en güvenilir yöntemlerden biridir. Bu nedenle, çalışmada E-test yöntemi tercih edilip, sonuçlar EFSA dökümanında yer alan kriterler doğrultusunda değerlendirildi. Özellikle, antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda güvenli kabul edilen izolatlar deneylerde kullanıldı.

Mayrhofer ve ark (2008) *L. acidophilus* grubunda yer alan 104 bakteri suşunun antibiyotik duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında; mikrodilüsyon ve E-test yöntemleriyle belirlenen MİK değerlerini gösteren sonuçların, disk difüzyon metodu ile belirlenen inhibisyon zon çaplarıyla korelasyon gösterdiklerini değerlendirmişlerdir.

Carasi ve ark (2014) farklı *L. kefir* suşlarının seçili sekiz antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını incelemişler ve tüm suşların tetrasiklin, klindamisin, streptomisin, ampisilin, eritromisin, kanamisin ve gentamisine karşı duyarlı olduklarını, iki suşun ise kloramfenikole dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Korhonen ve ark (2010) 75 farklı *L. rhamnosus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını mikrodilüsyon ve E-test yöntemleriyle değerlendirmişler; çoğunun ampisiline klindamisin, eritromisin, gentamisin, streptomisin ve tetrasikline duyarlı, üç suşun ise klindamisin, eritromisin ve streptomisine dirençli olduklarını belirlemişlerdir.

EFSA dökümanında vankomisine doğal dirençli suşların vankomisin duyarlılıklarının değerlendirilmeleri gerekli bulunmadığı için (EFSA, 2012), yalnızca *L. alimentarius* suş HBUAS52461, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ve *L. lactis* suş IL6288 izolatlarının vankomisin duyarlılık profilleri incelendi ve hepsi vankomisin duyarlı olarak değerlendirildi. Ayrıca, tüm izolatların gentamisin, klindamisin, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlendi.

LAB izolatlarının aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirildikleri mevcut çalışmalar, in vitro, hayvan modeli ya da klinik çalışmalar olarak ayrılmaksızın değerlendirildiğinde: *L. plantarum*, *L. cassei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *B. breve* ve *B. longum* suşlarının en çok kullanılan probiyotikler olduğu görülmektedir. Araştırmacılardan bazıları, probiyotik LAB

suşları tarafından üretilen süpernatantları veya ekstraktları kullanırken (Ramos ve ark, 2012; Mohammedsaeed ve ark, 2014; Lopes ve ark, 2017; Onbas ve ark, 2018), bazıları, aktif kültürlerini kullanmıştır. Bazı araştırmacılar ise, birden fazla probiyotik LAB suşunu aynı anda kullanmıştır (Thomas ve ark, 2011; Prince ve ark, 2012; Al-Malkey ve ark, 2017; Lopes ve ark, 2017; Li ve ark, 2018). Literatürde yer alan çalışmaların amaçlarına benzer olarak, bu çalışmada izole edilen laktik asit bakterilerinin aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının, seçili patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi.

Bugüne kadar probiyotiklerin çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkilerini araştıran in vitro çalışmalarda kullanılan ana teknikler değerlendirildiğinde; agar-kuyu difüzyon testi ve farklı varyasyonları karşımıza çıkmaktadır (Jones ve ark, 2010; Varma ve ark, 2011; Al-Malkey ve ark, 2017; Lopes ve ark, 2017; Onbas ve ark, 2018; Fijan ve ark, 2019).

Kumar ve ark (2017) tairu (geleneksel Hint ev yapımı lor) ve kefirde LAB izole etmiş ve antimikrobiyal aktivite deneylerinde agar spot, agar kuyu difüzyon, biyofilm deneylerinde ise, kristal viyole yöntemini uygulamışlardır. Agar spot testinde izolatların aktif kültürlerinin, agar kuyu difüzyon testinde ise hücresiz süpernatantların test patojenlerine karşı gösterdikleri inhibisyon etkiler değerlendirilmiştir.

Araştırmacılara paralel olarak, bu çalışmada da LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde, aktif kültürler için agar spot, hücresiz süpernatantlar için agar kuyu difüzyon testleri tercih edildi. Biyofilm çalışmalarında ise kristal viyole yöntemi uygulandı.

Koohestani ve ark (2018) *L. acidophilus* LA5 ve *L. casei* 431 suşlarına ait hücresiz süpernatantların, *S. aureus* ATCC 25923 üzerindeki antimikrobiyal ve biyofilm yıkıcı özelliklerini araştırdıkları çalışmada; hücresiz süpernatantlar (HS), MRS sıvı besiyerinde 37°C' de 48 saat inkübe edilen laktik asit bakterilerinden elde edilmiştir. Agar kuyu difüzyon yöntemi uygulanmış, HS'lerden açılan kuyulara 100 µL ilave edilmiş ve 37°C' de inkübasyon sonrası zon çapları değerlendirilmiştir. Jeong ve ark (2018) kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* suşları (*L. kefiranofaciens* DD2, DD5 ve DD6) ve standart kültür olan *Lactobacillus* suşlarına (*L. plantarum* ATCC 10,012, *L. johnsonii* JCM 1022 ve *L. rhamnosus* ATCC 7469) ait hücresiz süpernatantların, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* üzerindeki antimikrobiyal ve biyofilm oluşturmalarını inhibe edici özelliklerini araştırdıkları çalışmada; hücresiz süpernatantlar, MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 72 saat inkübe edilen laktik asit bakterilerinden elde edilmiştir. Araştırmacıların kullanmış oldukları metoda paralel olarak, bu çalışmada da, LAB izolatları, MRS sıvı besiyerinde (%1, v/v)

37°C’de 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra, 4°C’de 20 dakika $4000 \times g$ ’ de santrifüj edilip, 0.22 lik filtreden geçirilerek hazırlandı.

Bu çalışmada, laktik asit bakterilerine ait aktif kültürlerin test patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde; toplam 12 laktik asit izolatından, 6 tanesinin (%50) yalnızca *Pseudomonas* suşlarına karşı, 4 tanesinin (%33.3) tüm patojen bakteri suşlarına karşı inhibisyon etki gösterdiği ve 2 tanesinin (%16.7) tüm patojen suşlarına karşı etki göstermediği tespit edildi. Ayrıca, yalnızca *P. parvulus* suş 2.6, *L. paracasei* suş RV-M192, *L. paracasei* suş ZFM54 ve *L. coryniformis* suş MXJ 32 aktif kültürlerinin, tüm patojen bakteri suşlarına karşı inhibisyon etki gösterdiği belirlendi. *L. reuteri* suş J33, *L. rhamnosus* suş SRMPB19, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, *L. mesenteroides* suş Le8, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 ve *L. lactis* suş IL6288 aktif kültürlerinin, patojen bakteri suşları içerisinde yalnızca *P. aeruginosa* üzerinde inhibisyon etki gösterdiği ve *L. alimentarius* suş HBUAS52461 ve *L. reuteri* suş SKB1241 aktif kültürlerinin ise, tüm patojen bakterilere karşı inhibisyon etki göstermediği tespit edildi.

Sikorska ve Smoragiewicz (2013) MRSA üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip LAB türlerinin: *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum* ve *L. lactis* olduklarını değerlendirmişlerdir. Yi ve ark (2016) *L. coryniformis* XN8 suşunun, *S. aureus* üzerinde yüksek inhibe edici yeteneğe sahip olmakla birlikte, diğer pek çok patojen mikroorganizma üzerindeki etki spektrumunun da geniş olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılara paralel olarak, bu çalışmada izole edilen *L. coryniformis* suş MXJ 32 aktif kültürlerinin, tüm patojen bakteri suşları üzerinde inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

Malvisi ve ark (2016) yapmış oldukları bir çalışmada, *L. lactis* tarafından üretilen nisin A bakteriyosinin, MRSA suşların gelişimlerini inhibe edici ve öldürücü etkilerini ortaya koymuşlardır. Charlier ve ark (2009) ise, *L. lactis*’ in *S. aureus* patojenine spesifik antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Saha ve ark (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. lactis*’ ten elde edilmiş, çok işlevli bir doğal bağışıklık proteini olan Lipocalin-2 (Lcn2)’nin, *E. coli*’ nin büyümesini inhibe ettiğini ve enterobaktin sideroforunun biyolojik aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, izole edilen *L. lactis* IL6288 aktif kültürünün *P. aeruginosa* üzerinde en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi.

Altuntaş ve ark (2010) fermente süt ürünlerinden LAB izole ettikleri çalışmalarında; izolatların *S. aureus*’a karşı antimikrobiyal etkisini agar spot ve kuyu difüzyon yöntemleriyle

değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, izolatların çoğunun patojen suşlar üzerinde inhibe edici etkilere sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Bhola ve Bhadekar (2019) laktobasillerin, çoklu antibiyotik direnci olan *S. aureus*' un klinik izolatları üzerindeki potansiyel antibakteriyel etkilerini araştırdıkları çalışmada: *L. plantarum* (NCIB 6376), *L. acidophilus* (ATCC 11975) ve *L. casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469) standart suşlarının güçlü inhibisyon etkilere sahip olduklarını bildirmişlerdir. Abedi ve ark (2013) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aktif kültürlerinin, *E. coli*' ye karşı yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ise, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 aktif kültürlerinin patojen bakteriler içerisinde, yalnızca *P. aeruginosa* üzerinde inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

Bu çalışmada, LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantların antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyu difüzyon testleri ile belirlenip: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 hücresiz süpernatantlarının (%16.7, 2/12) yalnızca *Pseudomonas* suşlarına, *Pediococcus parvulus* suş 2.6, *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54 ve *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32 hücresiz süpernatantlarının (%33.3, 4/12) tüm patojen bakteri suşlarına karşı inhibisyon etki gösterdiği değerlendirildi. Ayrıca, *Pediococcus parvulus* suş 2.6, *Lactobacillus paracasei* suş RV-M192, *Lactobacillus reuteri* suş J33, *Lactobacillus rhamnosus* suş SRMPB19, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, *Lactobacillus paracasei* suş ZFM54, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, *Lactococcus lactis* suş IL6288 ve *Lactobacillus coryniformis* suş MXJ 32 hücresiz süpernatantlarının (HS-72) *P. aeruginosa* 9027 (%75, 9/12) patojenine, *Leuconostoc mesenteroides* suş Le8 ve *Lactobacillus reuteri* suş SKB1241 hücresiz süpernatantlarının (HS-72)) *S. aureus* ATCC 35556 (%16.7, 2/12) patojenine ve *Lactobacillus alimentarius* suş HBUAS52461 her iki patojen bakteri suşlarına (%8.3, 1/12) karşı en yüksek inhibisyon etki gösterdiği belirlendi.

Yapılan tüm LAB izolatlarına ait HS uygulamaları (HS-24, HS-48 ve HS-72) içerisinde, patojenlere karşı kaydedilen en yüksek inhibisyon zon çapları: *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşu için *L. paracasei* suş ZFM54 (25 mm/güçlü etki) ait HS-72 uygulamasıyla, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu için *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (25 mm/güçlü etki) ait HS-72 uygulamasıyla, *P. aeruginosa* ATCC 9027 suşu için *L. paracasei* suş RV-M192 (30,67±0,5 mm/güçlü etki) ait HS-72 uygulamasıyla, *S. aureus* ATCC 35556 suşu için *L. mesenteroides* suş Le8 (26 mm/güçlü) ait HS-72 uygulamasıyla, *S. aureus* ATCC 29213 suşu için *P. parvulus* suş 2.6 (10,22 mm/orta etki) ait HS-24 uygulamasıyla, *S. aureus* ATCC 33591

suşu için *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (25,33 mm/güçlü etki) ait HS-72 uygulamasıyla, *S. aureus* ATCC 6538 suşu için *L. paracasei* suş RV-M192 (20,33 mm/güçlü etki) ait HS-72 uygulamasıyla, *S. aureus* ATCC 25923 suşu için *L. paracasei* suş RV-M192 (17,67 mm/orta etki) HS-72 uygulamasıyla olduğu belirlendi.

Kumar ve ark (2017) tairu (geleneksel Hint ev yapımı lor) ve kefirde laktik asit bakterisi izole ettikleri çalışmada; yapılan 16S rRNA PZR analizleri sonucunda izolatların *L. casei* ve *L. plantarum* türleri olduklarını belirlemişler ve MRSA (S547) patojeni üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde agar spot ve agar kuyu difüzyon, biyofilm deneylerinde ise kristal viyole yöntemi uygulanmıştır. Yapılan agar spot testinde, izolatların aktif kültürleri kullanılmış, *L. casei* (27.0 ± 1.0 mm) ve *L. plantarum* için (23.3 ± 1.5 mm) inhibisyon zon çapları belirlenmiştir. Agar kuyu difüzyon testinde kullanılmak üzere, izolatlara ait hücresiz süpernatantlar (HS) 24 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden elde edilmiş ve pH'ları 1 M NaOH ile 6.7'e ayarlanmıştır. Yapılan nötralizasyon işlemi sonrasında, *L. plantarum* izolatına ait HS'lerin MRSA üzerinde inhibisyon etkinlikleri gözlenmezken, *L. casei* ait HS'lerde patojenlere karşı inhibisyon zonları (12.7 ± 1.5 mm) belirlenmiştir. *L. plantarum* izolatına ait HS'lerin MRSA üzerindeki inhibe edici etkisinin organik asit veya hidrojen peroksitten kaynaklandığı bildirilmiştir.

Ren ve ark (2018) çeşitli ev yapımı fermente gıdalardan *L. plantarum* (L2, L16, T4 ve T8), *L. pentosus* (L19 ve S6) ve *L. paracasei* (H9) laktik asit bakterilerini izole etmişler ve *S. enterica* (ATCC 14028), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 8739), *B. cereus* Frankland (CICC 20551) suşlarına karşı potansiyel antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmişlerdir. İndikatör test bakterileri üzerindeki inhibisyon zon çapının >13 mm'den yüksek olduğu değerlendirilirken, HS'lerin *E. coli* ve *Bacillus* patojenlerinden ziyade, *S. aureus* ve *Salmonella* spp. üzerinde inhibitör etki gösterdikleri saptanmıştır.

Stefania ve ark (2017) *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. lactis* ATCC 11454, *L. casei* ATCC 334, *L. reuteri* ATCC 55148 ve *S. boulardii* ATCC MYA-796 (Sb48) probiyotiklerinin, *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC PTA-7296 üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini araştırdıkları çalışmada; probiyotiklere ait hücresiz süpernatantların, *S. aureus* ATCC 29213 patojenine karşı daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bilkova ve ark (2011) laktik asit izolatlarına (*L. murinus*, *L. mucosae*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. plantarum* DSM 9843, *L. reuteri* ATCC 55845 ve *L. reuteri* ATCC 55370) ait hücresiz süpernatantların, *S. aureus* ATCC 6538 üzerinde antimikrobiyal aktivitelerini agar kuyu difüzyon tekniği ile değerlendirdikleri çalışmada; en yüksek inhibitör etkinin *L. mucosae* hücresiz süpernatatına ait olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca,

süpernatantlara (10 dk./60 °C: 60 dk./100 °C) ısıtma işlemi, proteaz uygulaması ve pH nötralizasyon işlemleri uygulanmış ve etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan pH nötralizasyon işlemi sonucunda inhibitör aktivite kaybolurken, diğer iki işlem sonrası aktivitenin nispeten azaldığı ancak, gözlenmeye devam ettiği bildirilmiştir. Ayrıca test edilen suşlardan *S. aureus* ATCC 25923 (15.8±5.0 mm)'ün inhibitör etkilere en dirençli suş olduğu belirlenmiştir.

Voravuthikunchai ve ark (2006) tarafından izole edilen *L. reuteri* suşlarına ait hücresiz süpernatantların, MRSA gibi önemli patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal etki gösterdikleri bildirilmiştir.

Abedi ve ark (2013) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarına ait hücresiz süpernatantlarının *E. coli* patojenine karşı antimikrobiyal etkisini, disk difüzyon yöntemleriyle değerlendirmişler ve belirlenen inhibitör etkinin laktik asitten kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarına ait hücresiz süpernatantların, yalnızca *Pseudomonas* spp. suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve en yüksek inhibisyon zon çapının *P. aeruginosa* 9027 için (20 mm) kaydedildiği belirlendi.

Bu çalışmada, LAB izolatlarına ait aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının (HS-24, HS-48 ve HS-72) antimikrobiyal aktivite bulguları değerlendirildiğinde; her iki uygulama için: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ve *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının (HS-72) indikatör bakteriler içerisinde yalnızca *P. aeruginosa* üzerindeki inhibisyon etkisinin, *P. parvulus* suş 2.6, *L. paracasei* suş RV-M192, *L. paracasei* suş ZFM54 ve *L. coryniformis* suş MXJ 32 aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının (HS-72) tüm patojen bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisinin benzer olduğu tespit edildi.

Yapılan çeşitli çalışmalarda laktobasillere ait hücresiz süpernatantların antimikrobiyal etkilerinin; fermentasyon boyunca ürettiği ve inhibitör aktiviteden sorumlu ekstrasellüler antibakteriyel ajanlar olan organik asitlerden (laktik asit, asetik asit, formik asit, fenillaktik asit, kaproik asit ve propiyonik asit) kaynaklanabileceği bildirilmiştir. İnhibisyon etki, çözünmemiş formda bulunan organik asitlerin; hücre zarındaki yağı çözerek hücre içine nüfuz etmesi ve hücre içinin normalde nötr olan pH'sını düşürerek, hücrenin inaktivasyonuna yol açması olarak açıklanmıştır (Jasim ve ark, 2017; Zamani ve ark, 2017). Bu çalışmada, laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon zon çaplarının HS-72 uygulamasıyla kaydedildiği değerlendirildi. Kullanılan hücresiz süpernatantlara ait 24,48 ve 72 saat inkübasyonları sonunda ölçülen pH değerleri, 4 ve 5.5 aralığında değişen değerlerdir. Pek çok araştırmacı bu düşük pH' nın süpernatantların inhibitör aktivitelerini etkileyebileceğini, bu nedenle süpernatantların

nötralizasyon işlemi sonrası etkilerinin değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Bu nedenle, laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlar (HS-72) nötralizasyon işlemine tabii tutularak, inhibisyon zon çaplarının gözlenmemesi sonucu; inhibisyon etkinin kaybolduğu değerlendirildi. Nötralize işlemi sonrasında test edilen N-HS'lerin patojenler üzerindeki inhibisyon etkilerinin kaybolması; söz konusu etkilerinin organik asitlerden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Koohestani ve ark (2018) *L. acidophilus* LA5 ve *L. casei* 431 suşlarına ait hücresiz süpernatantların, *S. aureus* ATCC 25923 patojeni üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştırdıkları bir çalışmada; hücresiz süpernatantların pH'ları, 1 N NaOH ile nötralize edilmiş ve pH 6.7 olarak ayarlanıp uygulanmıştır. Nötralizasyon işlemi sonrasında antimikrobiyal aktivitenin kaybolduğu; etkinin organik asit üretiminden kaynaklandığı ve bakteriyosinle ilişkili olmadığı belirlenmiştir. *L. acidophilus* LA5 suşunun lactacin B olarak bilinen spesifik bakteriyosinini, yalnızca starter kültürlerle (*S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) birlikte üredikleri zaman sentezlediği gösterilmiştir (Tabasco ve ark, 2009).

Bilkova ve ark (2011) laktik asit izolatlarına (*L. murinus*, *L. mucosae*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. plantarum* DSM 9843, *L. reuteri* ATCC 55845 ve *L. reuteri* ATCC 55370) ait hücresiz süpernatantların, *S. aureus* ATCC 6538 üzerinde antimikrobiyal aktivitelerini agar kuyu difüzyon tekniği ile değerlendirdikleri bir çalışmada; hücresiz süpernatantların, pH nötralizasyon işlemi sonrasında antimikrobiyal aktivitelerini kaybetmesinin nedeninin, organik asit ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Proteinaz K ve ısı uygulamalarının inhibitör aktivite üzerinde az etki ya da etki göstermediği, yalnızca *L. reuteri* ATCC 55730 suşunun hücresiz süpernatantının ısıdan etkilenebilen antimikrobiyal ajanlara sahip olabileceği ve buna bağlı olarak inhibisyon aktivitesinin ısı uygulaması sonrasında azalmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Jeong ve ark (2018) kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* suşları (*L. kefiranofaciens* DD2, DD5 ve DD6) ve standart kültür olan *Lactobacillus* suşlara (*L. plantarum* ATCC 10,012, *L. johnsonii* JCM 1022 ve *L. rhamnosus* ATCC 7469) ait 72 saatlik hücresiz süpernatantların, *S. mutans* ve *S. sobrinus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini araştırdıkları çalışmada: DD2, ATCC 10012, ATCC 7469 ve JCM 1022 suşlarının test patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin organik asitlerden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Osama ve ark (2017) *L. rhamnosus* EMCC 1105 ve *L. gasseri* EMCC 1930 suşlarına ait 24 ve 48 saatlik hücresiz süpernatantların, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini araştırdıkları bir çalışmada; inhibisyon etkinin organik asitlerden

kaynaklandığını bildirmişlerdir. Zalán ve ark (2010) laktik ve asetik asitlerin, *Lactobacillus* spp. suşlarının antimikrobiyal aktivitesine neden olan organik asitler olduklarını değerlendirmişlerdir.

Konu ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda, LAB'ın uzun süre kültüre edilmelerinin, patojen bakteriler üzerinde güçlü inhibisyon etki gösterebilen etmenlerden biri olabileceği bildirilmiştir. Bu etki gelişirken ürettiği karbondioksit konsantrasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, laktobasillerin geliştirildikleri anaerobik koşullara kıyasla, mikroaerofilik çevrenin inhibitör aktivite üzerinde daha etkili olduğu düşünülmektedir. Bu, bazı antibakteriyel madde ya da maddelerin üretimi için oksijen varlığının gerekli olduğunu ya da desteklediğini açıklar niteliktedir (Annuk ve ark, 2003). Çeşitli çalışmalarda laktik asit bakterileri tarafından üretilen karbondioksitin, düşük konsantrasyonlarda bazı mikroorganizmaların gelişimini teşvik edici rol oynarken, yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Prince ve ark, 2012). Yapılan bu çalışmada 24, 48 ve 72 saatlik inkübe edilmiş kültürlerle ilişkin hücresiz süpernatantların (HS) inhibitör aktivitelerine bakıldığında; aktivitenin 72 saatlik HS'de en yüksek olduğu değerlendirildi. Bu nedenle, çalışmada LAB'ın uzun süre kültüre edilmeleri, antimikrobiyal etkiye sebep olan etmenlerden biri olarak yorumlanabilir.

Çalışmada, patojenlerin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda biyofilm oluşturma potansiyelleri kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde; patojenlerin en uygun biyofilm oluşturma sürelerinin 48 saat olduğu, *S. aureus* ATCC 33591 suşunun orta dereceli ve diğer patojenlerin güçlü biyofilm oluşturdıkları tespit edildi. Bu nedenle, çalışmada kullanılan patojen suşların biyofilm oluşturmaları için gereken inkübasyon süresi 48 saat olarak ayarlandı.

Ersoy ve ark (2019) kistik fibrozis hastalarının solunum epiteliyle *P. aeruginosa* arasındaki etkileşim sonucu bakteride ortaya çıkan fenotipik değişiklikleri inceledikleri bir çalışmada; yeşil floresan protein eksprese eden bir suş olan *P. aeruginosa* PAO1 için 48 saat sonunda biyofilm oluşumu belirlenmiş ve kristal viyole yöntemi uygulanmıştır. Plaklar OD₅₉₅ nm dalga boyunda okunmuş ve optik dansitesi 1'den büyük olan izolatların biyofilm oluşturduğu kabul edilmiştir. Araştırmacılara paralel olarak, bu çalışmada da test patojenleri için en uygun biyofilm oluşturma kapasitesi 48 saat olarak belirlendi. Konu ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 25923 standart suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmış, 48 saat inkübasyon sonucu suşların tamamında biyofilm oluşumu gözlenmiştir (Tutar ve ark, 2015).

Patojen bakterilerin biyofilm yapıları uzun yıllardır çalışılan konular arasındadır. Ancak, LAB gibi probiyotik sayılan yararlı bakterilerin biyofilm oluşumları, hatta bu biyofilmlerin önemli patojenler üzerinde olası inhibisyon etkilerinin araştırılması daha çok yenidir. Çeşitli araştırmalarda çoklu antibiyotik direnci olan bakterilerde bile inhibe edici etkiler kaydedilmiştir (Schellenberg ve ark, 2006; Roghmann ve ark, 2006). Bu nedenle, bu çalışmada çeşitli fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların, patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici ve oluşturulan biyofilmleri yıkıcı etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Bu çalışmada, hücresiz süpernatantların patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla; süpernatantlar patojenlerden önce plaklarda 24 saat inkübe edilip, inkübasyon sonrası uzaklaştırılıp, yerine patojenler eklenerek, 48 saat inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde: *P. parvulus* suş 2.6, *L. paracasei* suş RV-M192, *L. reuteri* suş J33, *L. rhamnosus* suş SRMPB19, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, *L. paracasei* suş ZFM54, *L. mesenteroides* suş Le8, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-48 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 uygulaması hariç), *L. lactis* suş IL6288 (*P. aeruginosa* ATCC 15692, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-48) (*S. aureus* ATCC 35556 için HS-24 ve HS-48 uygulamaları hariç), *L. coryniformis* suş MXJ 32, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 ve *L. reuteri* suş SKB1241 (*P. aeruginosa* ATCC 15692 için HS-24 uygulaması hariç)' e ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonucunda patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında, biyofilm oluşturma kapasitelerinde azalma olduğu tespit edildi.

LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde; her bir patojen için yapılan üç uygulamada (HS-24, HS-48 ve HS-72) elde edilen inhibisyon oranları içerisinde en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı *P. parvulus* suş 2.6 %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 %49,9 ile HS-72, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 %66,6 ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 %73 ile HS-24 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 %85,5 ile HS-24 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 %66,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 %66,6 ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 %35,3 ile HS-24 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 %49,9 ile HS-72 uygulamasında belirlendi.

P. aeruginosa ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 (%38,4) ile HS-24 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%79) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%78,6) ile HS-72 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%73,1) ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%82,3) ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 (%81) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%47,1) ile HS-48 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%76,5) ile HS-48 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%37,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%71,6) ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%76,8) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%58,6) ile HS-72 uygulamasında kaydedildi.

S. aureus ATCC 35556 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 (%88,5) HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%89,5) ile HS-48 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%82,2) ile HS-24 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%88) ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%86) ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 (%87,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%89,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%89,2) ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%89,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%90,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%87,9) ile HS-24 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%87) ile HS-48 uygulamasında belirlendi.

S. aureus ATCC 6538 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 (%92,1) HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%91,5) HS-48 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%88,6) ile HS-48 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%86,1) ile HS-24 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%90,1) ile HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM5 (%93) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%89,8) ile HS-24 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%92,6) ile HS-48 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%86) ile HS-48 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%93,3) ile HS-48 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%92,1) ile HS-48 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%89,1) ile HS-48 uygulamasında belirlendi.

Tüm laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan üç uygulama içerisinden, her bir patojen için en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için *L. paracasei* suş ZFM54 izolatına ait HS-24 uygulaması (%85,5), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04

izolatına ait HS-72 uygulaması (%82,3), *S. aureus* ATCC 35556 için *L. coryniformis* suş MXJ 32 izolatına ait HS-72 uygulaması (%90,7), *S. aureus* ATCC 6538 için *L. coryniformis* suş MXJ 32 izolatına ait HS-48 uygulaması (%93,3) kaydedilen en yüksek inhibisyon oranlarıdır.

Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların antibiyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon etkinin HS-72 (%56.3, 27/48) uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi. İzolatlara ait 72 saatlik nötr hücresiz spernatant (N-HS-72) uygulaması sonrasında tüm patojenler için antibiyofilm etkinin; bazı suşlar için kaybolduğu, bazıları için azaldığı veya hemen hemen aynı kalmış olduğu tespit edildi.

L. paracasei suş ZFM54, *L. mesenteroides* suş Le8, *L. lactis* suş IL6288, *L. coryniformis* suş MXJ 32 ve *L. alimentarius* suş HBUAS52461 izolatlarına ait N-HS-72 uygulaması sonrasında, *P. aeruginosa* ATCC 15692 için antibiyofilm etkinin kaybolduğu, HS-72 inhibisyon oranlarıyla kıyaslanarak tespit edildi. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, *L. mesenteroides* suş Le8 ve *L. lactis* suş IL6288 izolatlarına ait 72 saatlik nötr hücresiz spernatant (N-HS-72) uygulaması sonrasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için antibiyofilm etkinin kaybolduğu belirlendi. *L. rhamnosus* suş SRMPB19, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04, *L. paracasei* suş ZFM54 ve *L. reuteri* suş SKB1241 izolatlarına ait 72 saatlik nötr hücresiz spernatant (N-HS-72) uygulaması sonrasında, *S. aureus* ATCC 35556 için antibiyofilm etkinin kaybolduğu tespit edildi. Tüm LAB izolatlarına ait 72 saatlik nötr hücresiz spernatant (N-HS-72) uygulaması sonrasında, *S. aureus* ATCC 6538 için antibiyofilm etkinin devam ettiği belirlendi.

Bulgasem ve ark (2015) *L. plantarum*, *L. curvatus*, *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* izolatlarına ait hücresiz süpernatantların, antibiyofilm yeteneklerini araştırdıkları çalışmalarında; hücresiz süpernatantları patojenden önce ve patojenle beraber olmak iki farklı şekilde uygulamışlar; patojenin biyofilm oluşumlarının önemli ölçüde inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Yapılan pek çok çalışmada, bazı laktik asit bakterileri hücresiz süpernatantlarının, patojenlerin yüzeye olan adezyonunu azalttıkları bildirilmiştir. Yüzeye olan adezyonun inhibisyonu, süpernatantların ortamın daha hidrofilik hale getirmiş olmasıyla açıklanmaktadır. Söz konusu bu inhibisyon etki sayesinde, *Lactobacillus* spp.' e ait hücresiz süpernatantların içerdiği biyosüpfaktan maddenin; katater, protez, stent gibi medikal cihazların *P. aeruginosa* ve *S. aureus* enfeksiyonlarından korunmasında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Mathur ve ark, 2018; Yan ve ark, 2019). HS'ler bakterinin hücre yüzeyinde değişikliklere yol açan eksopolisakkaritler yoluyla; biyofilm oluşumunda görevli gen ekspresyonlarını inhibe eden sinyal moleküllerinin bağlanmasını engelleyerek antibiyofilm etki gösterebilmektedir.

Bu çalışmada hücresiz süpernatantların, patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici olası özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla süpernatantlar, patojenler ile beraber inkübasyona bırakıldı. 48 saat inkübasyon sonucunda patojenlerin biyofilm oluşturma potansiyelleri, pozitif kontrolleri ile karşılaştırılarak belirlendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde; tüm laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların uygulanması sonrası, patojenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerinde azalma olduğu tespit edildi (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 izolatının, *S. aureus* ATCC 35556 patojenine uygulanan HS-24 uygulaması hariç).

Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde; her bir patojen için yapılan üç uygulamada elde edilen inhibisyon oranları içerisinde en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı *P. parvulus* suş 2.6 (%95) ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%95) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%95,3) ile HS-72 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%95,8) ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%94,8) ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 (%94,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%95,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%93) ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%96) ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%95,8) ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%94,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%94,7) ile HS-72 uygulamasında kaydedildi.

P. aeruginosa ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 (%95,3) ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%94,8) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%92,3) ile HS-24 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%95,2) ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%94,2) ile HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 (%94,7) ile HS-48 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%95,2) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%94,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%95,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%95,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%93,8) ile HS-24 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%91,2) ile HS-72 uygulamasında belirlendi.

S. aureus ATCC 35556 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 (%92,7) HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%92,2) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%93,7) ile HS-72 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%93) ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%94) ile HS-72

uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 (%94) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%94) ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%94) ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%93) ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%94) ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%94) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%94,2) ile HS-72 uygulamasında kaydedildi.

S. aureus ATCC 6538 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 (%94,8) HS-24 ve HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 (%96,2) HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 (%95,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 (%94,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%94,3) ile HS-24 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 (%95,2) ile HS-24 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 (%94,8) ile HS-24 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%95,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 (%94,5) ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 (%95,8) ile HS-24 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 (%96) ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş SKB1241 (%95,8) ile HS-72 uygulamasında belirlendi.

Tüm laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan üç uygulama içerisinden, her bir patojen için en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için *L. lactis* suş IL6288 izolatına ait HS-72 uygulaması (%96), *P. aeruginosa* ATCC 27853 için *L. lactis* suş IL6288 izolatına ait HS-72 uygulaması (%95,7), *S. aureus* ATCC 35556 için *L. reuteri* suş SKB1241 izolatına ait HS-72 uygulaması (%94,2), *S. aureus* ATCC 6538 için *L. paracasei* suş RV-M192 izolatına ait HS-72 uygulaması (%96,2) en yüksek inhibisyon oranlarıdır.

Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların antibiyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyonun etkinin HS-72 (%81.3, 39/48) uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi. Bu nedenle, laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlar (N-HS-72) nötralizasyon işlemine tabii tutulmuş ve optik dansiteleri (OD₅₉₅) değerlendirildi. N-HS-72 uygulama sonrası inhibisyon oranları; bazı izolatlara ait HS uygulamalarında azalırken, bazılarında HS-72 inhibisyon oranlarına yakın olduğu belirlendi.

Tüm laktik asit izolatlarına ait 72 saatlik nötr hücresiz süpernatantlar (N-HS-72) değerlendirildiğinde: *L. paracasei* RV-M192, *L. coryniformis* MXJ 32, *L. alimentarius* HBUAS52461 ve *L. mesenteroides* Le8 izolatlarına ait nötr hücresiz süpernatantların (N-HS-72) patojenler ile 48 saat inkübasyonu sonucu, biyofilm oluşturma potansiyellerinin önemli

derecede inhibe edildiği belirlendi. Ayrıca, N-HS-72 uygulaması sonucu da inhibisyon etkilerinin devam ettiği saptandı.

Khiralla ve ark (2015) *L. pentosus*, *L. plantarum* ve *L. pentosus* HG izolatlarına ait hücresiz süpernatantların *B. cereus* ve *P. aeruginosa* patojenlerine karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerini araştırdıkları çalışmada; hücresiz süpernatantlar izolatların 24 saatlik kültürlerinden elde edilmiş ve patojen ile beraber 96 kuyucuklu plaklara inoküle edilerek, 37°C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kristal viyole yöntemi ile plaklar boyanıp, mikropalak okuyucuda ölçümleri yapılmıştır. Araştırmacılar, hücresiz süpernatantların her iki patojenin biyofilm oluşumlarını önemli derecede azalttıklarını bildirmişlerdir. Söz konusu antibiyofilm etki; patojenlerin üremelerinin inhibe edilmesinden ziyade, mikropalak yüzeye olan adezyonun inhibisyonu ya da organik asitler (asetik asit ve laktik asit), bakteriyosin ve süpernatant içerisinde yer alan diğer inhibitör maddeler ile patojenlerin çekirdek algılama (QS) sistemlerinin inhibe edilmesi şeklinde açıklanmıştır.

Jeong ve ark (2018) kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* suşları (*L. kefirifaciens* DD2, DD5 ve DD6) ve standart bakteri kültürü olan *Lactobacillus* suşlarına (*L. plantarum* ATCC 10,012, *L. johnsonii* JCM 1022 ve *L. rhamnosus* ATCC 7469) ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlarının, *S. mutans* ve *S. sobrinus* üzerindeki antimikrobiyal ve biyofilm oluşturmalarını inhibe özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada: DD2, ATCC 10012, ATCC 7469 ve JCM 1022 suşlarının test patojenlerinin gelişimlerini ve biyofilm oluşumlarını inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, belirlenen inhibisyonun biyofilm oluşumunda rol oynayan genlerin inhibe edilmesiyle ilişkili olduğunu düşünmektedir. Kullanılan patojen suşlar farklı olmasına rağmen, bu çalışmada da laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantların (HS-72) patojenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerini önemli derecede inhibe ettikleri değerlendirildi.

Rao ve ark (2015) *L. plantarum* ve *L. pentosus* suşlarına ait süpernatantların, *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia* patojenlerine karşı gösterdikleri antibiyofilm etkilerin üretilen organik asitler ile gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

Hor ve Liong (2014) çeşitli süt, yoğurt ve fermente ürünlerden izole ettikleri 87 laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların, cilt patojeni olan *S. aureus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmada: *L. bulgaricus* FTDC 8611 izolatına ait hücresiz süpernatantın diğerlerine kıyasla, *S. aureus*' un biyofilm oluşumunu önemli ölçüde engellediği değerlendirilmiştir. Yapılan yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizler sonucunda, hücresiz süpernatantların içerisinde yer alan; laktik asit, asetik

asit, hidrojen peroksit ve diasetil bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteden sorumlu oldukları belirlenmiştir.

Bu çalışmada, laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar, patojenler tarafından 48 saat inkübasyon sonrasında oluşturulan biyofilm yapılarının olduğu kuyulara eklenip, biyofilm yıkıcı etkileri araştırıldı. Buna göre; tüm laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların, her üç uygulama sonunda patojenlerin pozitif kontrolleri ile karşılaştırıldığında, patojenlerin biyofilm yapılarını yüzde yüz yıkamadığı belirlendi. *P. parvulus* suş 2.6 a ait tüm HS uygulamaları sonucu, *S. aureus* ATCC 35556 patojenine karşı inhibisyon etki gözlenmezken, *S. aureus* ATCC 35556 için *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 HS-24 ve *S. aureus* ATCC 6538 için HS-72 uygulamaları sonucu inhibisyon etki belirlenmemiştir. *S. aureus* ATCC 35556 için *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374, *L. alimentarius* suş HBUAS52461, *L. coryniformis* suş MXJ 32 HS-24 uygulamaları ve *S. aureus* ATCC 6538 için *L. mesenteroides* suş Le8 ve *L. alimentarius* suş HBUAS52461 HS-48 uygulamaları sonucu inhibisyon etki kaydedilmemiştir.

Yapılan bu çalışmada, HS uygulamaları sonucu bazı patojenlere karşı inhibisyon etki belirlenirken, bazıları için inhibisyon etki kaydedilmedi. *P. parvulus* suş 2.6' a ait tüm HS uygulamaları sonucu *S. aureus* ATCC 35556 patojenine karşı inhibisyon etki belirlenmedi. *P. aeruginosa* ATCC 27853 için HS-24 uygulamasında inhibisyon etki gözlenmezken, HS-48 ve HS-72 uygulamalarında belirlenen etkinin, N-HS-72 uygulaması sonrası tekrar kayb olduğu saptanmıştır. *S. aureus* ATCC 35556 için *L. paracasei* suş RV-M192' a ait HS-24 ve HS-48 uygulamalarında inhibisyon etki gözlenmezken, HS-72 uygulaması sonrası etki kaydedildi (%24,8). N-HS-72 uygulaması sonrası ise inhibisyon etkinin değişmediği belirlendi. *S. aureus* ATCC 6538 için *L. reuteri* suş J33'e ait HS-24 uygulamasında inhibisyon etki gözlenmezken, HS-48 ve HS-72 uygulamaları sonrası etki kaydedildi. *S. aureus* ATCC 35556 için *L. rhamnosus* suş SRMPB19'a ait HS-24 ve HS-48 uygulamalarında inhibisyon etki gözlenmezken, HS-72 uygulaması sonrası etki belirlendi. *S. aureus* ATCC 35556 için *L. paracasei* suş ZFM54'e ait HS-24 ve HS-48 uygulamalarında inhibisyon etki gözlenmezken, HS-72 uygulaması sonrası etki kaydedildi (%49,9). *S. aureus* ATCC 35556 için *L. mesenteroides* suş Le8'e ait HS-24 ve HS-48 uygulamalarında inhibisyon etki gözlenmezken, HS-72 uygulaması sonrasında etki belirlendi (%49, 9).

LAB izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde; her bir patojen için yapılan üç uygulamada elde edilen inhibisyon oranları içerisinde en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı *P. parvulus* suş 2.6 için %83,6 ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192

için %84,1 ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 için %85,5 ile HS-72, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 için %83,8 ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 için %85,5 ile HS-72, *L. paracasei* suş ZFM54 için %84 ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 için %85,1 ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 için %84,8 ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 için %85,5 ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ32 için %83,6 ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 için %83,3 ile HS-72 uygulamasında ve *L. reuteri* suş SKB1241 için %83,3 ile HS-72 uygulamasında kaydedildi.

P. aeruginosa ATCC 27853 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 için %74,8 ile HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 için %80,6 ile HS-72, *L. reuteri* suş J33 için %89,3 ile HS-48 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 için %82,1 ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 için %87,8 ile HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 için %87,8 ile HS-48 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 için %89,3 ile HS-48 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 için %93,5 ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 için %86,8 ile HS-24 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 için %80 ile HS-24 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 için %84,6 ile HS-24 uygulamasında ve *L. reuteri* suş SKB1241 için %89,5 ile HS-24 uygulamasında kaydedildi.

S. aureus ATCC 35556 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 için %4,3 ile HS-24 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 için %24,8 ile HS-72 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 için %74,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 için %49,9 ile HS-72 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 için %75,7 ile HS-72 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 için %75,2 ile HS-72 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ32 için %34,8 ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 için %53,6 ile HS-72 uygulamasında ve *L. reuteri* suş SKB1241 için %74,9 ile HS-72 uygulamasında belirlendi.

S. aureus ATCC 6538 için en yüksek inhibisyon oranı: *P. parvulus* suş 2.6 için %33,3 ile HS-72 uygulamasında, *L. paracasei* suş RV-M192 için %35,7 ile HS-24 uygulamasında, *L. reuteri* suş J33 için %57,2 ile HS-72 uygulamasında, *L. rhamnosus* suş SRMPB19 için %35,1 ile HS-48 uygulamasında, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 için %57,5 ile HS-48 uygulamasında, *L. paracasei* suş ZFM54 için %34,3 ile HS-48 uygulamasında, *L. mesenteroides* suş Le8 için %35,1 ile HS-24 uygulamasında, *L. mesenteroides* subsp.

mesenteroides suş CAU4374 için %36,2 ile HS-24 uygulamasında, *L. lactis* suş IL6288 için %44,1 ile HS-48 uygulamasında, *L. coryniformis* suş MXJ 32 için %38,5 ile HS-72 uygulamasında, *L. alimentarius* suş HBUAS52461 için %35,1 ile HS-24 uygulamasında ve *L. reuteri* suş SKB1241 için %52,5 ile HS-72 uygulamasında kaydedildi.

Tüm laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan üç uygulama içerisinde her bir patojen için en yüksek inhibisyon oranı belirlendi. Buna göre: *P. aeruginosa* ATCC 15692 için en yüksek inhibisyon oranı *L. reuteri* suş J33 (%85,5) ile HS-72 ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%85,5) ile HS-72 uygulamasında, *P. aeruginosa* ATCC 27853 için *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%93,5) ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 35556 için *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 (%75,7) ile HS-72 uygulamasında, *S. aureus* ATCC 6538 için *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 (%57,5) ile HS-48 uygulamasında belirlendi.

Laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantların antibiyofilm aktivitesi değerlendirildiğinde, en yüksek inhibisyon etkisinin HS-72 (%62,5, 30/48) uygulamasıyla kaydedildiği tespit edildi. Bu nedenle, laktik asit bakterilerine ait 72 saatlik hücresiz süpernatantlar (N-HS-72) nötralizasyon işlemine tabii tutuldu ve optik dansiteleri (OD₅₉₅) değerlendirildi. N-HS-72 uygulama sonrası inhibisyon oranları, bazı izolatlara ait HS uygulamalarında azalırken, bazılarında HS-72 inhibisyon oranlarına yakın bulundu.

Çalışmada yapılan N-HS-72 uygulamaları sonrasında inhibisyon etkinin değişmediği uygulamalar kaydedildi. *P. parvulus* suş 2.6, *L. rhamnosus* suş SRMPB19, *L. mesenteroides* suş Le8, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 ve *L. lactis* suş IL6288' e ait N-HS-72 uygulaması sonrası *S. aureus* ATCC 6538 için inhibisyon etkinin değişmediği belirlendi. Ayrıca, *L. paracasei* suş RV-M192'e ait N-HS-72 uygulaması sonrası *S. aureus* ATCC 35556 ve *S. aureus* ATCC 6538 için inhibisyon etkinin değişmediği kaydedildi.

Zamani ve ark (2017) çeşitli peynirlerden izole ettikleri *L. plantarum* spp. izolatına ait hücresiz süpernatantların (HS), çoklu antibiyotik direnci gösteren *P. aeruginosa*, *S.aureus* ve *E. coli* patojenleri üzerindeki antibiyofilm etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada patojenlere ilişkin biyofilm yapıları, 96-kuyucuklu mikrotiter plaklarda 37 °C' de 48 saat inkübasyon sonunda elde edilmiş ve oluşan biyofilm yapıları üzerine 100 µL HS' lerden eklenerek, 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm biyofilm çalışmalarında kristal viyole metodu uygulanmış ve ölçümler 550 nm' de mikropalak okuyucuda yapılmıştır. Çalışmada HS' lerin sadece patojenik bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda önceden oluşturulmuş biyofilm yapılarını da bozduğu, EDTA, SDS ve Tween 80 gibi kimyasallardan etkilenmediği ve yüksek sıcaklıkların (80 ve 100 °C) yanı sıra, geniş bir pH

aralığında bile kararlılık gösterdiği sonuçlarına ulaşılmıştır. Ayrıca HS'lerin en yüksek aktivitesinin, *P. aeruginosa* patojeni üzerinde olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, koruyucu ve terapötik yaklaşımlar için kullanılabilecek maddelerin üretilmesi için *L. plantarum* spp.,'nin uygun bir tür olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir.

El-Mokhtar ve ark (2020) yoğurttan izole ettikleri *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. bugarius* suşlarına ait hücresiz süpernatantların, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* patojenlerine karşı antibiyofilm yeteneklerini araştırmışlardır. Hücresiz süpernatantlar, patojen ile beraber, patojenin biyofilm oluşturmamasından sonra uygulanmış ve her iki uygulama sonrasında inhibisyon etkinin tüm patojenlere karşı güçlü etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, hücresiz süpernatantların bakteriyel biyofilmleri inhibe edici yeteneklerinin; ortamda biyosümfaktanların ve ekzopolisakkaritlerin varlığı ile ilişkili olduklarını bildirmişlerdir.

Kim ve ark (2009) enterohemorajik *E. coli* tarafından polistiren ve polivinil klorür mikropklarda oluşturulan biyofilmlerin, sırasıyla % 87 ve % 94' ünü *L. acidophilus*'a ait ekzopolisakkaritler ile inhibe ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, *Lactobacillus* suş RC-14'e ait hücresiz süpernatantların, *S aureus*' un cerrahi implantlara adezyonunu ve enfeksiyon oluşturmamasını önemli ölçüde engellediklerini değerlendirmişlerdir (Gan ve ark, 2019).

Shokri ve ark (2018) fermente süt ürünlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnci olan *P. aeruginosa* suşlarına karşı antibiyofilm ve antibakteriyel etkilerini araştırdıkları çalışmada: 57 laktobasil izolatını içinde 16 rRNA analizi sonucunda tanımlanan iki *L. fermentum* suşunun, patojen üzerinde antibiyofilm ve inhibe edici/öldürücü etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) sonuçlarına göre, antimikrobiyel etkinliklerin; laktik asit, asetik asit ve formik asit organik asitlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, laktik asit bakterilerinin inhibe edici özelliklerinin çoğunluğu algılama mekanizmasıyla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin, patojenlerin sentezledikleri AHL türü ÇA molekülleri etkisiz hale getiren ve patojenite özelliklerini sınırlayan ÇA-inhibitörlere sahip olduğu bilinmektedir (Varma ve ark, 2011). Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, *L. paracasei* sbp. *paracasei* CMGB 18'in *P. aeruginosa*'nın üremesini, yüzeye tutunmasını ve ÇA mekanizmasında rol alan moleküllerin üretimini gerçekleştirecek gen ekspresyonlarını engellediği bildirilmiştir. Ayrıca, LAB tarafından üretilen organik asitlerin ÇA inhibitörleri olarak rol oynadıkları değerlendirilmiştir (Ramos ve ark, 2012). Yapılan diğer bir çalışmada ise, uçucu ve suda/yağda çözünebilen

aromatik bir bileşik olan 5H-furanon'un, patojenlerin çoğalmalarında ve biyofilm oluşturmalarının engellenmesinde etkin olduğu bildirilmiştir (Wallis ve ark, 2019).

Barken ve ark (2008) *cheY* kemotaksis geninin baskılanmasına bağlı olarak bazı probiyotiklerin, *P. aeruginosa*'nın biyofilm yapılarını yıkabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların, pek çok patojenin quorum sensing mekanizmalarını inhibe ederek, biyofilm oluşumlarını engelledikleri değerlendirilmiştir (Wang ve ark, 2015).

Koohestani ve ark (2018) *L. acidophilus* LA5 ve *L. casei* 431 suşlarına ait hücresiz süpernatantların (HS), *S. aureus* ATCC 25923 patojeni üzerindeki biyofilm yıkıcı özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada, HS'lerin hem hidrofobik hem de hidrofilik yüzeylerden biyofilm yapıların giderilmesinde potansiyel bir terapötik madde olabileceğini değerlendirmişlerdir.

Stefania ve ark (2017) *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. lactis* ATCC 11454, *L. casei* ATCC 334, *L. reuteri* ATCC 55148 ve *Saccharomyces boulardii* ATCC MYA-796 (Sb48) probiyotiklerinin, *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC PTA-7296 üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerini araştırdıkları çalışmada: *L. acidophilus* hücresiz süpernatantının her iki patojen, *L. lactis*, *L. reuteri* ve *S. boulardii* hücresiz süpernatantlarının ise, yalnızca *S. aureus* patojeninin biyofilm kütesini azalttığını bildirmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda laktik asit bakterilerinin kullanım alanlarının ne kadar geniş olduğunu görmekteyiz. Bunun sebebi, mikroorganizmaların “genel olarak patojenik olmayışı” ve “genel olarak güvenli” statüsüne sahip oluşuyla ilişkilidir. Laktik asit bakterilerinin terapötik faydaları hemen hemen tüm alanlarda incelenmesine rağmen, dermatolojideki uygulamaları daha çok yenidir.

Yara enfeksiyonlarına çoğunlukla *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae* gibi biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu bilinmektedir. Özellikle *P. aeruginosa* ve *S. aureus*’un oluşturdukları biyofilmler, kronik yaraların iyileşmesinde birincil engeldir (Savage ve ark, 2013).

Bu çalışmada izole edilen *P. parvulus*, *L. paracasei*, *L. mesenteroides*, *L. coryniformis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. alimentarius*, *L. delbrueckii* ve *L. lactis* laktik asit bakterilerine ait aktif kültür ve hücresiz süpertantlarının, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkilerinin, ayrıca hücresiz süpernatantların patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici ve oluşturulan biyofilmleri yıkıcı etkileri belirlendi. Yapılan pek çok in vitro çalışmada antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde, agar kuyu difüzyon testi ve farklı varyasyonlarının kullanılmış olduğu değerlendirildi (Jones ve ark, 2010; Varma ve ark, 2011; Lopes ve ark, 2017; Onbas ve ark, 2019). Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer şekilde, agar spot ve agar kuyu difüzyon yöntemleri tercih edildi. Biyofilm çalışmalarında ise, yine en çok tercih edilen kantitatif mikrodilüsyon plak yöntemi kullanıldı (Öztürk ve ark, 2017; Ersoy ve ark, 2019). İzolatların antibiyotik duyarlılık profilleri, gradiyent difüzyon (E-test) testi ile EFSA 2012 dökümanında yer alan ölçüm aralıkları temel alınarak incelendi ve seçili antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları tespit edildi.

LAB izolatlarına ait aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının antimikrobiyal aktivite bulguları değerlendirildiğinde, her iki uygulama için: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suş ND04 ve *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suş CAU4374 aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının (HS-72) patojen bakteriler içerisinde yalnızca *P. aeruginosa* üzerindeki inhibisyon etkisinin, *P. parvulus* suş 2.6, *L. paracasei* suş RV-M192, *L. paracasei* suş ZFM54 ve *L. coryniformis* suş MXJ 32 aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının (HS-72) tüm patojen bakteriler üzerindeki inhibisyon etkilerinin benzer olduğu belirlendi.

Tüm laktik asit izolatlarına ait hücresiz süpernatantlar ile ayrı ayrı yapılan üç uygulama (HS-24, HS-48 ve HS-72) içerisinde, her bir patojen için en yüksek biyofilm inhibisyon oranı belirlendi. Sonuçlar değerlendirildiğinde: *P. aeruginosa* ATCC 15692 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 için sırasıyla % 96 ve % 95,7 ile *L. lactis* suş IL6288 izolatına ait HS-72' nin patojen ile beraber inkübasyonu, *S. aureus* ATCC 35556 için % 94,2 ile *L. reuteri* suş SKB1241 izolatına ait HS-72' nin patojen ile beraber inkübasyonu ve *S. aureus* ATCC 6538 için % 96,2 ile *L. paracasei* suş RV-M192 izolatına ait HS-72' nin patojen ile beraber inkübasyonu sonucunda en yüksek inhibisyon oranı belirlendi.

Hücresiz süpernatantlara ait bulgular değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon zon çapları ve biyofilm inhibisyon oranlarının hemen hemen HS-72 uygulamasıyla kaydedildiği belirlendi. Bu nedenle, hücresiz süpernatantlara ait pH'lar 6.7'ye ayarlanarak inhibisyon etkinin organik asitlere bağlı olup olmadığı araştırıldı. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde nötralizasyon işlemi sonrasında, patojenlere karşı kaydedilen inhibisyon zonlarının gözlenmemesi; inhibisyon etkinin, organik asitler ile ilişkili olmasıyla açıklanabilir. Ancak, aynı nötr hücresiz süpernatantlar, biyofilm deneylerinde de kullanıldığında, antimikrobiyal aktivite deneylerinden farklı olarak inhibisyon etkinin bazılarında azaldığı, değişmediği veya hemen hemen aynı kaldığı değerlendirildi. Yapılan çeşitli çalışmalarda söz konusu antibiyofilm etkinin sebebi, patojenlerin gelişmelerinin inhibe edilmesinden ziyade, mikrop plak yüzeye adezyonun inhibisyonu ya da ortamda bakteriyosin veya süpernatant içerisinde yer alan diğer inhibitör maddeler ile patojenlerin çekirdek algılama (QS) sistemlerinin inhibe edilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından çözünmemiş formda bulunan inhibitör maddelerin, hücre zarındaki yağı çözerek hücre içine nüfuz etmesi ve hücre içinin normalde nötr olan pH'sını düşürerek, hücrenin inaktivasyonuna yol açması ile inhibisyon etki gösterdiği bildirilmiştir (Jasim ve ark, 2017; Zamani ve ark, 2017). Bu çalışmada da benzer olarak, inhibisyon etkinin organik asitler dışında başka bir sebepten kaynaklanabileceği ve detaylı olarak araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, izole edilen laktik asit bakterilerine ait aktif kültür ve hücresiz süpernatantlarının, yara enfeksiyonlarına yol açan *P. aeruginosa* ve *S. aureus*' un farklı standart suşlarına karşı güçlü antimikrobiyal ve antibiyofilm etki gösterdiğini ortaya koyan birçok veri kaydedildi. Özellikle izolatlara ait hücresiz süpernatantların patojenden önce, patojen ile beraber ve patojenden sonra (biyofilm oluşumu sonrası) uygulamalarını içeren biyofilm çalışmalarında ilgi çekici sonuçlar kaydedildi.

Güncel çalışmalara bakıldığında, bu çalışmada izole edilen laktik asit bakterilerine ait hücresiz süpernatantların, patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe edici ve oluşturulan

biyofilmleri yıkıcı etkilerini ortaya koyan çalışmalara rastlanmamıştır. Bu nedenle, test edilen patojenlere karşı antibiyofilm etki gösteren izolatlara ait kaydedilen yeni bulguların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Özellikle, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* patojenlerinin akut ve kronik yaraların tedavisinde karşılaşılan önemli türler olduğu düşünüldüğünde, çalışmada izole edilen probiyotik özellikte laktik asit bakterilerinin, bu patojenlere karşı terapötik amaçlı kullanılabilir potansiyellere sahip olmaları tedavilerinde umut verici olabilir. Bu sebeple, konu ile ilgili inhibisyon etki ve mekanizmaların hedeflendiği *in vivo* alışmalardan, ilk aşamada deney hayvan model çalışmaları ve bir sonraki aşama olarak da klinik tedavi uygulama çalışmalarının yapılması gerektiği kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

- Abedi D, Feizizadeh S, Akbari V, Jafarian-Dehkordi A.** In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2013, 8(4), 260.
- Ahl D, Liu H, Schreiber O, Roos S, Phillipson M, Holm L.** *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiologica* 2016, 217(4), 300-310.
- Ahmed Z, Wang Y, Cheng Q, Imran M.** *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. *African Journal of Biotechnology* 2010, 9, 2843–2850.
- Alcorn JF, Wright JR.** Degradation of pulmonary surfactant protein D by *P. aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *Journal of Biology Chemistry* 2004, 279, 30871-30879.
- Al-Malkey MK, Ismeeal MC, Al-Hur FJA, Mohammed SW, Nayyef HJ.** Antimicrobial effect of probiotic *Lactobacillus* spp. on *P. aeruginosa*. *Journal of Contemporary Medical Sciences* 2017, 3(10), 218-223.
- Altuntaş EG, Ayhan K, Okcu G, Erkanlı K, Balcı MH, Sonakın ŞS.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri. *Gıda* 2010, 35(3), 197-203.
- Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M.** Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 94, 403–412.
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME.** *S. aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2011, 445–459.
- Argenta A, Satish L, Gallo P, Liu F, Kathju S.** Local application of probiotic bacteria prophylaxes against sepsis and death resulting from burn wound infection. *PloS one* 2016, 11(10).

Arques JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International* 2015, 58, 41-83.

Azadnia PKNA, Khan N.AH. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2009, 10(3), 235-240.

Baquerizo Nole KL, Yim E, Keri JE. Probiotics and prebiotics in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2014, 71(4), 21-814.

Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Tolker-Nielsen T. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *P. aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 2008, 10(9), 2331-2343.

Barzegari A, Kheyrolahzadeh K, Khatibi SMH, Sharifi S, Memar MY, Vahed S Z. The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms. *Infection and Drug Resistance* 2020, 13, 659.

Bhola J, Bhadekar R. In vitro synergistic activity of lactic acid bacteria against multi-drug resistant staphylococci. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2019, 19(1), 70.

Bilkova A, Sepova HK, Bukovsky M, Bezakova L. Antibacterial potential of lactobacilli isolated from a lamb. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2011, 56(56), 319-324.

Blandino G, Milazzo I, Fazio D. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008, 20(4), 199-203.

Bosch M, Fuentes MC, Audivert S, Bonachera MA, Peiro S, Cune J. *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: Probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2014, 94, 803–809.

Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. *P. aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiology* 2011, 19, 419–426.

Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nature Reviews Microbiology* 2016, 15, 55-63.

Bulgasem BY, Hassan Z, Abdalsadiq NK, Yusoff WMW, Lani MN. Anti-adhesion activity of lactic acid bacteria supernatant against human pathogenic *Candida* species biofilm. *Health Science Journal* 2015, 9(6), 1.

Canli PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 2018, 67(9), 1716-1725.

Carasi P, Díaz M, Racedo S M, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell MDLA. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed Research International* 2014.

Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Medina J.C.M, Lannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of *Lactobacillus*. *Journal of Clinical Pathology* 2016, 69, 187–203.

Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Interactions between *S. aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 2009, 131(1), 30-39.

Chisholm AD, Xu S. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 2012, 1(6), 879-902.

Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *S. aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 2001, 183, 96.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15(2), 93-167.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2002, 8, 90.

Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 1989, 17(19), 7843-7453.

EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 2012, 10(6), 2740.

Elbe-Bürger A, Egyed A, Olt S, Klubal R, Mann U, Rappersberger K, Rot A, Stingl G. Overexpression of IL-4 alters the homeostasis in the skin. *Journal of Investigative Dermatology* 2002, 118(5), 767–778.

El-Mokhtar MA, Hassanein KM, Ahmed AS, Gad GF, Amin MM, Hassanein OF. Antagonistic Activities of Cell-Free Supernatants of *Lactobacilli* Against Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* and *P. aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance* 2020, 13, 543.

Ersoy MO, Sakarya S, Gunay N, Yilmaz O. Cystic Fibrosis-Modulated Phenotypic Changes of *P. aeruginosa* May Be a Critical Determinant for Respiratory Infections and Unresponsiveness to Antimicrobial Agents. *KLIMIK* 2019, 32(1), 22-29.

Fijan S, Frauwallner A, Langerholc T, Krebs B, ter Haar née Younes JA, Heschl A, Rogelj I. Efficacy of Using Probiotics with Antagonistic Activity against Pathogens of Wound Infections: An Integrative Review of Literature. *BioMed Research International*, 2019.

Foster TJ. Antibiotic resistance in *S. aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews* 2017, (41)3, 430–449.

Gan Y, Su S, Li B, Fang C. Efficacy of Probiotics and Prebiotics in Prevention of Infectious Complications Following Hepatic Resections: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2019, 28(2).

Goto K, Iwasawa D, Kamimura Y, Yasuda M, Matsumura M, Shimada T. Clinical and histopathological evaluation of *Dermatophagoides farinae*-induced dermatitis in NC/Nga mice orally administered *Bacillus subtilis*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2011, 73(5), 649–654.

Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010, 76, 298-304.

- Halkman K.** Food Microbiology Practices. Ankara: Merck, *Başak Printing Press* 2005, 358.
- Harata G, Kumar H, He F, Miyazawa K, Yoda K, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Rautava S, Salminen S.** Probiotics modulate gut microbiota and health status in Japanese cedar pollinosis patients during the pollen season. *European Journal of Nutrition* 2016, 1-9.
- Harvey RA, Cornelissen CN, Fisher BD.** Lippincott Microbiology (3rd ed), Wolters Kluwer Health, 2012, 129-139.
- Henry DA, Speert DP.** *Pseudomonas*. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition: American Society of Microbiology 2011, 677-91.
- Holland R, Crow V, Curry B.** Lactic acid bacteria *Pediococcus* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2011, 2, 149-152.
- Hor YY, Liong MT.** Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *S. aureus*. *Dermatologica sinica* 2014, 32(3), 141-147.
- Huseini HF, Rahimzadeh G, Fazeli MR, Mehrazma M, Salehi M.** Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns* 2012, 38(5), 719-723.
- Im AR, Kim HS, Hyun JW, Chae S.** Potential for tyndalized *Lactobacillus acidophilus* as an effective component in moisturizing skin and anti-wrinkle products. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2016, 12(2), 64-759.
- Jasim EI, Shawket DS, Mohsin YM, Mohammed BB, Abdalelah D, Ibraheem MA.** Comparative study between the effect of the lactic acid bacteria and non against some pathogenic bacteria. *International Journal of Science and Nature* 2017, 7(4), 656-660.
- Jeong D, Kim DH, Song KY, Seo KH.** Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefiranofaciens* DD2 against oral pathogens. *Journal of Oral Microbiology* 2018, 10(1), 147.
- Johnson TR, Gómez BI, McIntyre MK, Dubick MA, Christy RJ, Nicholson SE, Burmeister DM.** The cutaneous microbiome and wounds: new molecular targets to promote wound healing. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, 19(9), 2699.

Joint I, Allan Downie J, Williams P. Bacterial conversations: talking, listening and eavesdropping. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 2007, 362(1483), 11-15.

Jones ML, Ganopolsky JG, Labbé A, Prakash S. A novel nitric oxide producing probiotic patch and its antimicrobial efficacy: preparation and in vitro analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, 87(2), 509-516.

Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RJ, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010, 298(6), 9.

Khiralla GM, Mohamed EA, Farag AG, Elhariry H. Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens. *Journal of Biotechnology Research* 2015, 6, 86.

Kim Y, Sejong OH, Kim SH. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009, 379, 324–329.

Kohler T, Curty LK, Barja F, Van Delden C, Pecher JC. Swarming of *P. aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology* 2000, 182, 5990–5996.

Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (5 ed) Lippincott Williams and Wilkins 2006, 625-648.

Koohestani M, Moradi M, Tajik H, Badali A. Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *S. aureus*. *Veterinary Research Forum* 2018, 4(9), 301.

Korhonen J, Van Hoek AH, Saarela M, Huys G, Tosi L, Mayrhofer S, Wright AV. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus*. *Beneficial Microbes* 2010, 1(1), 75-80.

Kumar M, Kissoon-Singh V, Coria AL, Moreau F, Chadee K. Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in Muc2 mucin deficient mice. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2017, 312, 34-45.

Laitman I, Natan M, Banin E, Margel S. Synthesis and characterization of fluoro-modified polypropylene films for inhibition of biofilm formation. *Colloids and Surfaces* 2014, 115, 8-14.

Lavermicocca P, Dekker M, Russo F, Valerio F, Di Venere D, Sisto A. *Lactobacillus paracasei*-enriched vegetables containing health promoting molecules. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion* 2015, 361-370.

Leite AM, Miguel MAL, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VMF, Mayo B, Delgado S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science* 2015, 98(6), 3622-3632.

Li Z, Behrens AM, Ginat N, Tzeng SY, Lu X, Sivan S, Jaklenec A. Biofilm-Inspired Encapsulation of Probiotics for the Treatment of Complex Infections. *Advanced Materials* 2018, 30(51), 180.

Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *Immunology* 2017, 18, 2.

Lopes EG, Moreira DA, Gullón P, Gullón B, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK. Topical application of probiotics in skin: adhesion, antimicrobial and antibiofilm in vitro assays. *Journal of Applied Microbiology* 2017, 122(2), 450-461.

Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov, et al. Probiotics or pro-healers the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration* 2018, 4.

Malvisi M, Stuknyte M, Magro G, Minozzi G, Giardini A, et al. Antibacterial activity and immunomodulatory effects on a bovine mammary epithelial cell line exerted by nisin A-producing *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science* 2016, 99, 2288-2296

Martinez RCR, Wachsman M, Torres NI, LeBlanc JG, Todorov SD, de Melo Franco B D G. Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. *Food Microbiology* 2013, 34(2), 376-381.

Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *Biofilms and Microbiomes* 2018, 4(1), 1-13.

Mayes T, Gottschlich MM, James LE, Allgeier C, Weitz J, Kagan RJ. Clinical safety and efficacy of probiotic administration following burn injury. *Journal of Burn Care and Research* 2015, 36(1), 92-99.

Mayrhofer S, Domig KJ, Mair C, Zitz U, Huys G, Kneifel W. Comparison of broth microdilution, E test, and agar disc diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Applied and Environmental Microbiology* 2008, 74(12), 3745-3748.

Mills S, Ross RP, Coffey A. Lactic acid bacteria *Lactococcus lactis*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2011, 2, 132-137.

Moghadam SS, Khodaii Z, Zadeh SF, Ghooshchian M, Aghmiyuni ZF, Shabestari TM. Synergistic or antagonistic effects of probiotics and antibiotics-alone or in combination-on antimicrobial-resistant *P. aeruginosa* isolated from burn wounds. *Archives of Clinical Infectious Diseases* 2018, 13(3).

Mohammedsaeed W, McBain AJ, Cruickshank SM, O'Neill CA. *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *S. aureus* on epidermal keratinocytes. *Applied and Environmental Microbiology* 2014, 80(18), 81.

Mohammedsaeed W, Cruickshank S, McBain AJ, O'Neill CA. *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases reepithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Scientific Reports* 2015, 5(1), 16147.

Morgan M. Methicillin resistant *S. aureus* and animals: zoonosis or humanosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008, 62(6), 1181-1187.

Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, Chun KA, et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *S. aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine* 2017, 9, 4680.

Nasrabadi MH, Aboutalebi H, Ebrahimi MT, Zahedi F. The healing effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from Iranian traditional cheese on gastric ulcer in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011, 5(12), 51-1446.

Ochoa S.A, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila L.B, López-Martínez B, Xicohtencatl-Cortes J. Pathogenic characteristics of *P. aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Boletín Medico del Hospital Infantil de México* 2013, 70(2), 138-150.

O'Flaherty S, Ross RP, Meaney W, Fitzgerald GF, Elbreki MF, Coffey A. Potential of the Polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71(4), 1836–1842.

Olveira G, Molero I. An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* 2016, 63(9), 482-494.

Onbas T, Osmanagaoglu O, Kiran F. Potential properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a bio-control strategy for wound infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2019, 11(4), 1110-1123.

Ong JS, Taylor TD, Yong CC, Khoo BY, Sasidharan S, Choi SB, Liong MT. *Lactobacillus plantarum* USM8613 aids in wound healing and suppresses *S. aureus* infection at wound sites. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2019, 1-13.

Osama DM, Elkhatib WF, Tawfeik AM, Aboulwafa MM, Hassouna NAH. Antimicrobial, antibiofilm and immunomodulatory activities of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* against some bacterial pathogens. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 2017, 6(1), 12-21.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Current Opinion in Biotechnology* 2013, 82, 89.

Öztürk ŞB, Ertuğrul MB, Çörekli E. Diyabetik Ayak Enfeksiyonlarında Etken Bakteriler ve Biyofilm Oluşturma Oranları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2017, 47(1):33-38.

Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Advances in Wound Care* 2014, 3(7), 64-445.

Petrov V, Mihaylov G, Tsachev I, Zhelev G, Marutsov P, Koev K. Otitis externa in dogs microbiology and antimicrobial susceptibility. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2013, 164, 18-22.

Piccardi N, Manissier P. Nutrition and nutritional supplementation: Impact on skin health and beauty. *Dermato-Endocrinology* 2009, 1(5), 271–274.

Porto MC, Kuniyoshi TM, Vitolo M, Oliveira RPS. *Pediococcus* spp. An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances* 2017, 1.

Prince T, McBain AJ, O'Neill CA. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *S. aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Applied and Environmental Microbiology* 2012, 78(15), 26-5119.

Ramos AN, Sesto Cabral ME, Nosedá D, Bosch A, Yantorno OM, Valdez JC. Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *P. aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 2012, 20(4), 552-562.

Rao KP, Chennappa G, Suraj U, Nagaraja H, Raj CAP, Sreenivasa MY. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorghum-based traditional fermented food. *Probiotics Antimicrobial Proteins* 2015, 7(2):146–156.

Rayes N, Hansen S, Seehofer D, Müller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. Early enteral supply of fiber and *Lactobacilli* versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* 2002, 18(7-8), 609-615.

Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, Maria do Carmo GP. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research* 2017, 37, 1-19.

Ren D, Zhu J, Gong S, Liu H, Yu H. Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods. *BioMed Research International*, 2018.

Roghmann MC, McGrail L. Novel ways of preventing antibiotic-resistant infections: What might the future hold?. *American Journal of Infection Control* 2006, 34(8), 469-475.

Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, 111(2), 389–395.

Roudsari MR, Karimi R, Sohrabvandi S, Mortazavian AM. Health effects of probiotics on the skin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015, 55(9), 1219-1240.

Saha P, Chassaing B, Yeoh BS, Viennois E, Xiao X, Kennett MJ, Vijay-Kumar M. Ectopic expression of innate immune protein, Lipocalin-2, in *Lactococcus lactis* protects against gut and environmental stressors. *Inflammatory Bowel Diseases* 2017, 23(7), 1120-1132.

Sami DG, Heiba HH, Abdellatif A. Wound healing models: a systematic review of animal and non-animal models. *Wound Medicine* 2019, 24(1), 8-17.

Santos CM, Pires MC, Leao TL, Hernandez ZP, Rodriguez ML, Martins AK. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology* 2016, 162(7), 207.

Satish L, Gallo PH, Johnson S, Yates CC, Kathju S. Local probiotic therapy with *Lactobacillus plantarum* mitigates scar formation in rabbits after burn injury and infection. *Surgical Infections* 2017, 18(2), 119-127.

Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. *S. aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013, 57, 70.

Schellenberg J, Smoragiewicz W, Karska-Wysocki B. A rapid method combining immunofluorescence and flowcytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture. *Journal of Microbiological Methods* 2006, 65(1), 1-9.

Segawa S, Hayashi A, Nakakita Y, Kaneda H, Watari J, Yasui H. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates the development of dermatitis and inhibits immunoglobulin E production in atopic dermatitis model NC/Nga mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2008, 31(5), 884–889.

Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The inhibition effect of Lactobacilli against growth and biofilm formation of *P. aeruginosa*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2018, 10(1), 34-42.

Shokryazdan P, Siew CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Faseleh Jahromi M, Ho YW. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International* 2014, 16.

Shu M, Wang Y, Yu J, Kuo S, Coda A, Jiang Y, Huang CM. Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant *S. aureus*. *PloS one* 2013, 8(2), 55380.

Sikorska H, Smoragiewicz W. Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *S. aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2013, 42(6), 475-481.

Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 2010, 43, 83-573.

Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G, Spasov Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002, 28(1), 1-6.

Simova ED, Beshkova DB, Dimitrov ZP. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 2009, 106(2), 692-701.

Slama RB, Kouidhi B, Zmantar T, Chaieb K, Bakhrouf A. Anti-listerial and anti-biofilm activities of potential probiotic *lactobacillus* strains isolated from Tunisian traditional fermented food. *Journal of Food Safety* 2013, 33(1), 8–16.

Slavica A, Trontel A, Jelovac N, Kosovec Z, Santek B, Novak S. Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T. *Journal of Biotechnology* 2015, 202, 50-59.

Stefania DM, Miranda P, Diana M, Claudia Z, Rita P. Antibiofilm and Antiadhesive Activities of Different Synbiotics. *Journal of Probiotics and Health* 2017, 5(182), 2.

Stepanovic S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2000, 40(2), 175-179.

Sun M, He C, Cong Y, Liu Z. Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota. *Mucosal Immunology* 2015, 8, 969-978.

Sürmeli M, Maçın S, Akyön Y, Kayıkçıoğlu AU. The protective effect of *Lactobacillus plantarum* against meticillin-resistant *S. aureus* infections: an experimental animal model. *Journal of Wound Care* 2019, 28(3), 29-34.

Szczuka E, Urbańska K, Pietryka M, Kaznowski A. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *S. aureus* strains. *Folia Microbiology* 2013, 58, 47-52.

Szczuka E, Kaznowski A. Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiology* 2014, 59, 8-283.

Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C, Requena T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 2009, 132(2-3), 109-116.

Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AL, Vasil ML. *P. aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infection and Immunity* 1999, 67, 2371-2376.

Thomas JG, Motlagh H, Povey SB, Percival SL. The role of micro-organisms and biofilms in dysfunctional wound healing. *In Advanced Wound Repair Therapies* 2011, 39-76.

Thomson CH, Hassan I, Dunn K. Yakult: a role in combating multi-drug resistant *P. aeruginosa*?. *Journal of Wound Care* 2012, 21(11), 566-569.

Tutar U, Çelik C, Ataş M, Tunç T, Gözel M. Standart mikroorganizma suşlarının biyofilm formasyon aktivitelerinin değerlendirilmesi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015, 6(2), 135-139.

Valdez JC, Peral MC, Rachid M, Santana M, Perdigon G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *P. aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clinical Microbiology and Infection* 2005, 11(6), 472-479.

Varma P, Nisha N, Dinesh KR, Kumar AV, Biswas R. Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2011, 20(3), 137-143.

Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: Part 1. *Causes and Threats* 2015, 40(4), 277-83.

Volk N, Lacy B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* 2017, 27, 1-13.

Voravuthikunchai SP, Bilaso S, Supamala O. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe* 2006, 12(5-6), 221-226.

Wallis JK, Krömker V, Paduch JH. Biofilm challenge: lactic acid bacteria isolated from bovine udders versus staphylococci. *Foods* 2019, 8(2), 79.

Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ. *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *American Journal of Pathology* 2011, 179(6), 75.

Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang, Z. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015, 74, 119-126.

Watanabe T, Hamada K, Tategaki A, Kishida H, Tanaka H, Kitano M, Miyamoto T. Oral administration of lactic acid bacteria isolated from traditional South Asian fermented milk inhibits the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2009, 55(3), 271-278.

Welman AD, Maddox IS. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 2003, 21, 269-274.

Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G. Pulmonary inflammation induced by *P. aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infection Immunology* 2002, 70, 1352-1358.

Wong VW, Martindale RG, Longaker MT, Gurtner GC. From germ theory to germ therapy: skin microbiota, chronic wounds, and probiotics. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2013, 132(5), 854-861.

Yan X, Gu S, Cui X, Shi Y, Wen S, Chen H, Ge J. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *S. aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis* 2019, 127, 12-20.

Yang F, Wang A, Zeng X, Hou C, Liu H, Qiao S. *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions. *BMC Microbiology* 2015, 15(1), 32.

Yi L, Dang J, Zhang L, Wu Y, Liu B, Lü X. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by *Lactobacillus coryniformis* XN8. *Food Control* 2016, 67, 53-62.

Yirga H. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. *Journal Probiotic Health* 2015, 3, 132.

Zakaria GE. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2013, 59(6), 36-425.

Zalán Z, Hudáček J, Štětina J, Chumchalová J, Halász A. Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *European Food Research and Technology* 2010, 230(3), 395.

Zamani H, Rahbar S, Garakoui SR, Afsah Sahebi A, Jafari H. Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical and Biomedical Research* 2017, 3(2), 39-44.

Zheng D, Alm EW, Stahl DA, Raskin L. Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, 62(12): 4504-4513.

EKLER

Ek 1

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi
Madde 8'e göre: ölü hayvan veya dokusu, mezbaha materyalleri ile yapılan çalışmalar
HADYEK iznine tabii değildir. Bu nedenle, çalışmanın yapılabilmesi için etik kurul kararına
gerek bulunmamaktadır.



ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YILMAZ Özgenur
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Gölcük/ 29.11.1988
E-mail : phdozgylmz@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce, İspanyolca

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji A.B.D.	2020
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üni.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji A.B.D.	2014
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üni. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2012

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Finlandiya Hükümeti Araştırmacı Bursu, Helsinki Üniversitesi Tıp Fakültesi, Haartman Araştırma Enstitüsü (1.09.2019- 1.03.2020).

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2019-2020	Helsinki Üni. Tıp Fakültesi, Haartman Araştırma Enstitüsü	Araştırmacı
2016-2019	ADÜ/ REDPROM (TÜBİTAK Araştırma Projesi)	Araştırmacı

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Yildiz I, Tileklioglu E, Yilmaz O, Ertabaklar H, Sakarya S. Stabilized hypochlorous acid, a topical therapeutic strategy for *Trichomonas vaginalis* infection: An in vitro study. *Parasitologists United Journal* 2020, 13(1), 60-65.

Ersoy MO, Sakarya S, Gunay N, Yilmaz O. Cystic Fibrosis-Modulated Phenotypic Changes of *Pseudomonas aeruginosa* May Be a Critical Determinant for Respiratory Infections and Unresponsiveness to Antimicrobial Agents. *KLİMİK Journal* 2019, 32(1), 22-29.

Yildiz I, Yilmaz O, Tileklioglu E, Sakarya S, Ertabaklar H. Stabilised hypochlorous acid: a new therapeutic strategy against dangerous parasitic eye infection agent *Acanthamoeba* spp. *The Journal of Environmental Protection and Ecology* 2018, 19(3), 1397-1404.

Yilmaz O, Sakarya S. Is ‘Hanging Drop’ a Useful Method to Form Spheroids of Jimt, Mcf-7, T-47d, Bt-474 That are Breast Cancer Cell Lines. *Single Cell Biology* 2018, 7(170), 2.

2. BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Sözlü Bildiriler

Yilmaz O, Turkyilmaz S. Investigation of antibiotic resistance and clonal distributions of Pantone-Valentine leukocidin-positive MRSA strains isolated from mastitic bovine milk. XXXVIII. *Turkish Microbiology Congress*, 04-08 November 2018, Antalya/Turkey.

Yilmaz O, Sakarya S. Is ‘Hangingdrop’ an useful method to form spheroids of JIMT-1, MCF-7, T-47D, BT-474 that are breast cancer cell lines. *International Agriculture, Environment and Health Congress*, 26-28 October 2018, Aydın/Turkey.

Cihan E, Yilmaz O, Sakarya S, Ozturk SB, Ertugrul BM. Determination of biofilm formation potentials of *Kocuria kristinae* and *Kocuria rosea* isolated from various patient

samples. *International Agriculture, Environment and Health Congress*, 26-28 October 2018, Aydin/Turkey.

Yilmaz O, Sur E, Turkyilmaz S. Antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. Isolated from broilers. *1st International Health Science and Life Congress*, 2-5 May 2018, Burdur/Turkey.

Cihan E, Yilmaz O, Sakarya S, Ozturk SB, Ertugrul BM. Determination of biofilm formation potential of *Kocuria kristinae* and *Kocuria rosea* isolated from deep tissue samples of patients with diabetic foot infection. *13 th National Wound Congress with International Participation*, 13-16 December 2018, Antalya/Turkey.

Poster Bildirileri

Cihan E, Yilmaz O, Sakarya S. Evaluation of Tigecycline Sensitivity in Colistin Resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *International Agriculture, Environment and Health Congress*, 26-28 October 2018, Aydin/Turkey.

Cetin H, Erdogan G, Yilmaz O, Ucar EH, Peker C, Sakarya S. Investigation of Intramammal Hypochlorous Administration in Cattles with Subclinic Mastitis. *Mediterranean Veterinary Congress*, 13-14 December 2018, Kirikkale/Turkey.

Yilmaz O, Sakarya S. Production of spheroids from HT-29, Caco-2 and SW480 cell lines. *11th World Congress on Cell and Tissue Science*, 9-10 May 2018, Tokyo/Japan.

Ucan N, Yilmaz O, Turkyilmaz S. Isolation of *Mycoplasma* spp. from pulmonary calf lungs and clinical mastitis cattle milk. *1st International Health Science and Life Congress*, 2-5 May 2018, Burdur/Turkey.

Yildiz I, Tileklioglu E, Yilmaz O, Sakarya S, Ertabaklar H. Stabilised hypochlorous acid: A new therapeutic strategy against dangerous parasitic eye infection agent *Acanthamoeba* spp. *XIX.Turkish Clinical Microbiology and Infectious Diseases Congress*, 28-31 March 2018, Antalya/Turkey.

Yilmaz O, Yildiz I, Tileklioglu E, Ertabaklar H, Sakarya S. A New Agent in the struggle with the parasite "*Trichomonas vaginalis*": Stabilize Hypochlorous Acid. *XIX.Turkish Clinical Microbiology and Infectious Diseases Congress*, 28-31 March 2018, Antalya/Turkey.