

# Oküler yüzey patojenlerine karşı probiyotik laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesi

Sertaç Argun Kıvanç<sup>1</sup>, Berna Akova<sup>1</sup>, Merih Kıvanç<sup>2</sup>, Merve Kaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uludağ Üniversitesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa

<sup>2</sup>Eskişehir Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir

**Anahtar Kelimeler:** Laktik asit bakterileri, göz patojenleri, EPS, Antibiyofilm, antibakteriyal

## GİRİŞ

Antibiyotik dirençliliği günümüzün önemli problemlerinden biridir. Bu nedenle alternatif yöntemler aranmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar yararlı bakterilerin birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde olanak sağlayabileceği fikrini doğurmuştur. Sağlıklı bir mikrobiyotayı yeniden oluşturmak fikri gelişmiş ve buna bağlı olarak yeni tedavi ve profilaksi yolları aranmaya başlanmıştır.(1) Bu yolların başında da probiyotiklerin kullanımı gelmektedir. Probiyotiklerin içerisinde yer alan en önemli bakteriler laktik asit bakterileridir.(2,3) Laktik asit bakterileri çok uzun yıllardan beri çeşitli gıdaların üretilmesinde kullanılan yararlı bakterilerdir ve insanlarda normal mikrobiyotanın üyeleri olarak genellikle sindirim ve üreme sistemlerindeki diğer başka mikrobiyal türlerle birlikte bulunurlar. (4,5) Laktik asit bakterilerinin metabolik ürünlerinden en önemlilerinden biri ekzopolisakkaritler (EPS)'dir. Ekzopolisakkaritler genellikle polisakkaritlerin tüm formu ile ilişkili mikrobiyal hücre duvarının dış tarafında bulunurlar. Laktik asit bakteri EPS'lerinin antioksidan, bağışıklık düzenleyici, anti-inflamatuar, anti-biyofilm ve anti-tümör etkilere sahip olduğu bilinmektedir.(6-8)

Antibiyotik dirençliliğinin en önemli sebeplerinden birisi ise bakterilerin biyofilm oluşturma kabiliyetleridir. **(9-11)** Biofilm patojen bakteriler tarafından oluşturulan ve içerisine bakterilerin gömüldüğü bir yapıdır ve önemli bir virülans faktörüdür. Biyofilm içerisindeki bakteriler antimikrobiyal ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri ve proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler.**(9-13)** Bu direnç doğuştan gelen konakçı savunmaları ve biyofilm ile ilişkili bakterilere özgü ve geleneksel antimikrobiyal dirençten farklı olan bir dirençtir ve bakterileri antimikrobiyal ajanlarından korumaktadır.**(14)**

Probiyotiklerin göz hastalıklarında kullanımına ilişkin çalışmalar sınırlıdır. Bildiğimiz kadarı ile bu çalışma bu alanda literatürdeki öncül çalışmalardandır. Bu çalışmamızda gözden izole edilen biyofilm oluşturduğu bilinen bakterilerin kendileri ve biyofilmleri üzerine değişik laktik asit bakterilerinin EPS'lerinin etkinliğini inceledik.

## **MATERYAL ve METOT**

### **Materyal**

#### **Test Mikroorganizmaları**

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmalarımız insan göz yüzeyinden elde edilen patojen mikroorganizmalar ve insan orijinli laktik asit bakterileridir (24, 311.a , 7.1, 11, Ka1, 312,622 3111,621 kodlu), tüm bakteriler daha önceki çalışmalarda göz yüzeyinden izole edilen ve saklanan patojen bakterilerdir; bu bakteriler Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesinden temin edilerek çalışmalarda kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Göz yüzeyinden elde edilen patojen bakteriler

Mikroorganizma kodu	Mikroorganizma ismi
13/2	<i>Bacillus cereus</i>
20PCA	<i>Bacillus cereus</i>
23PCA	<i>Bacillus pumilus</i>
23CZPX	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
25-1CZPX	<i>Pseudomonas putida</i>
47 PCA	<i>Listeria monocytogenes</i>
8/2 PCA	<i>Brevibacillus agri</i>
25-1 A	<i>Stenotrophomonas maltophilia,</i>
35-1 PCA	<i>Bacillus spp.</i>
4-1 PCA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
24-1	<i>Bacillus cereus</i>
13/2 PCA	<i>Bacillus cereus</i>

## **METOT**

### **Mikroorganizmaların Hazırlanması**

Stoktan çıkarılan patojen mikroorganizmalar BHI brotha, laktik asit bakterileri ise MRS ve M17 brotha ekimi yapıldı. Patojen bakteriler 37°C'de 24 saat, laktik asit bakterileri ise 37°C'de 24-48 saat %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Kültürler geliştikten sonra patojen bakteriler tekrar BHI agar ve kanlı agara, laktik asit bakterileri ise MRS agar ve M17 agara ekim yapılarak patojen bakteriler 37°C de 24 saat, laktik asit bakterileri ise 37°C'de 24-48 saat %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilerek çoğaltma yapıldı. Gelişen kolonilerin morfolojileri incelenerek ve daha sonra Gram boyama yapılarak saflıkları kontrol edildi.

## Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması

Bakterilerin moleküler tanımlanması 16S rRNA gen bölgesinin dizi bilgisine göre yapılmıştır. Bakterilerin genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra 27F:5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R:5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' primerler kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için PCR kuruldu. **(15)** Elde edilen PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra MacroGen Europe şirketine dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen 16S rRNA gen dizileri BioEdit programı kullanılarak düzenlenmiştir. 27F ve 1492R primerleri ile okunan diziler birleştirilmiştir ve National Center for Biotechnology (NCBI) web sitesinde bulunan GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması yüzde benzerlik oranıyla belirlenmiştir.

## Laktik Asit Bakteri ve Süpernatantlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesi sandviç overlay yöntemi ve kuyucuk yöntemi ile belirlendi.

Sandviç overlay yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi: Bunun için MRS agar petrilere 20 ml olacak şekilde dağıtıldı. Agar katılaştıktan sonra 18-24 saatlik laktik asit bakterileri kültürlerinden 10 $\mu$ l ekim yapıldı ve 24-48 saat 37°C de %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Bu süre sonunda üzerine içerisinde patojen bakteri sayısı mililitrede 10<sup>6</sup> kob olacak şekilde hazırlanan 7ml BHI yumuşak agar dökülerek petri kutusundaki gelişen kültürlerin üzerine yayıldı. Hazırlanan petri kutuları 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra oluşan zon çapları değerlendirildi. Çalışmalar çift paralel olarak yürütüldü. **(16)**

Kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi: Laktik asit bakterileri MRS broth besiyerinde 24-48 saat 37°C'de %10 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Daha sonra kültürler 4°C, 11.000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant başka bir tüpe alınıp, pH 5,6'ya ayarlandı. 20ml Müller Hilton broth içine 10<sup>6</sup> kob/ml olacak şekilde patojen bakterinin 18-24 saatlik kültüründen ilave edildikten

sonra petriye döküldü ve besiyeri katılaştıktan sonra 8mm çapındaki mantar delici ile kuyucuklar açıldı. Kuyucukların dip kısmına birer damla agar döküldükten sonra daha önce hazırlanan hücresiz filtratlardan 100µl aktararak 15 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 24saat 37°C de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçüldü. Çalışmalar çift paralel olarak yürütüldü.

### **Laktik Asit Bakterilerinden Ekzopolisakkarit Eldesi**

Laktik asit bakterileri MRS brothta 24-48 saat süre 35°C'de %10 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültürler 6000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek üstte oluşan sıvı farklı bir tüpe aktarıldı. Tüpün üzerine %20 trikloroasetik asit ilave edilerek +4 °C' de bir gece bırakıldı. Bu süre sonunda örnekler 10000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst kısımda oluşan sıvı alınarak bir başka tüpe aktarıldı ve sıvının üzerine soğutulmuş bir hacim etanol eklenerek -20 °C'de bir gece bırakıldı. Daha sonra örnekler 10000 rpm' de +4 °C' de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst kısımda oluşan sıvı kısım döküldü ve altta oluşan pelet üzerine sıcak distile su ilave edilerek pelet çözündürülerek çalışmalarda kullanıldı (Şekil 1).



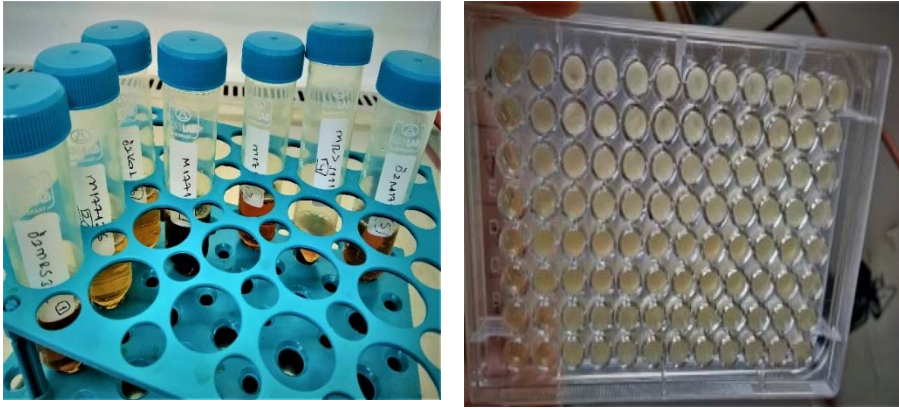
**Şekil 1.** Laktik asit bakterilerinden EPS'nin elde edilmesi

### **Ekzopolisakkaritin Antibakteriyal Aktivitesinin Belirlenmesi**

Hazırlanan ekzopolisakkaritlerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri mikrotitrasyon yöntemi ile belirlendi.

### **Ekzopolisakkaritlerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi**

Ekzopolisakkaritlerin antibiyofilm aktivitesi mikrotitrasyon yöntemi ile belirlendi. Laktik asit bakterilerine ait hazırlanan EPS solüsyonları 110 derecede 10 dakika otoklavda steril edilerek kullanıldı. Patojen test bakterileri BHI broth besiyerine ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra %2 glikoz içeren triptik soy brotha (TSB) aktararak yoğunluğu McFarland 1'e göre ayarlandı ve buradan mikrotitrasyon plağına 100µl ekim yapıldı. Üzerine içinde 20mg/ml EPS bulunan solüsyondan 100µl aktararak 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra biyofilm tayini yapıldı (Şekil 2).

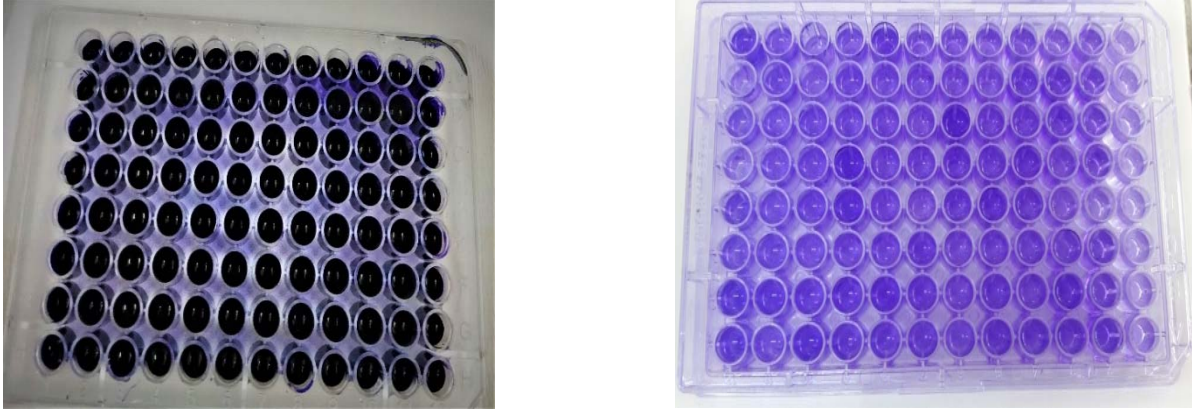


**Şekil 2.** Elde edilen EPS lerin MİK değerlerinin belirlenmesi

### **Biyofilmin Belirlenmesi**

Patojen bakterilerin inkübasyon süreleri sonunda plaklar Elisa okuyucuda 490nm de okunarak değerlendirildi. Sonra mikrotitrasyon plakları boşaltılarak steril fizyolojik tuzlu (FTS) su ile üçer defa yıkandı, böylece planktonik bakterilerin uzaklaşması ve plak duvarına biyofilm sayesinde tutunan bakterilerin kalması sağlandı. Plaklar kuruduktan sonra, kuyucuklar 200 µl %96'lık metanol ile 5 dakika muamele edildi ve böylece biyofilm oluşturan bakterilerin fiksasyonu sağlandı. Daha sonra metanol boşaltıldı ve plaklar kurutuldu. Kuyucuklara 200 µl %1'lik kristal viyole eklendi, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (Şekil 3). Boya nazikçe yıkandıktan sonra 200 µl %33'lük

asetik asit eklenerek 570 nm'de optik yoğunluk ölçüldü. Negatif kontrol olarak bakteri eklenmemiş besiyeri kullanıldı.(17,18) Çalışma çift paralel olarak yapıldı.



**Şekil 3.** Mikrotitrasyon yöntemi ile biyofilmin belirlenmesi

### **Tarayıcı elektron mikroskobu (TEM) için Örneklerin Hazırlanması ve Görüntü Alınması**

Örnekler 0.1 M cacodylate tampon ile yıkandıktan sonra %2,5'lik glutaraldehit ile oda sıcaklığında 1-1,5 saat fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra örnekler cacodylate tampon ile tekrar yıkandı. %1'lik OsO<sub>4</sub> ile 1 saat post-fiksasyon yapıldı. Cacodylate tampon ile 2-3 kez tekrar yıkandı. %30'luk, %50'lik, %70'lik, %90'lık ve %100'lük alkol serileri ile dehidrasyon işlemi yapıldı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Alkol serilerinden sonra hemen Critical Point Dryer'da kurutma işlemi yapıldı. Daha sonra örnekler 40 mA'de 1 dakika altın ile kaplandı ve TEM'de incelendi.

### **İstatistik Analizi**

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolomogorov Simirnov testi ile incelenmiştir. Probiyotik bakterilerin EPS'lerinin biofilm üzerine etkisine bakılırken optik dansite değerlerinin ortalama ve standart sapmaları tanımlayıcı istatistik yöntemleri ile yapıldı. Ortalamaların birbirleri ve kontrol grubu ile karşılaştırmalarında Oneway-Anova ve Tukey tetleri kullanılmıştır. Analizlerde,  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, veriler, SPSS ( IBM Corp.

Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı kullanılarak değerlendirildi.

## BULGULAR

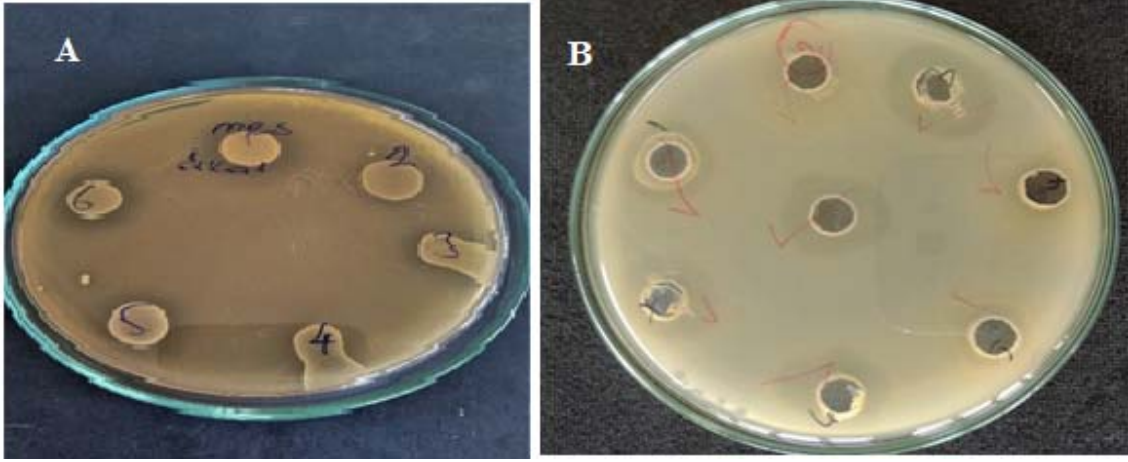
İnsan orijinli laktik asit bakterileri 16S rRNA gen bölgesine göre tanımlamaları ve erişim numaraları Tablo 2 de verildi. Seçilen izolatlardan 6 tanesi *Lactobacillus rhamnosus*, biri *Lactobacillus acidophilus* biri *L. brevis* ve biri de *L. plantarum* olarak belirlendi.

**Tablo 2.** Laktik asit bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları

Bakteri kodu	Bakteri ismi	Erişim No
24	<i>L. rhamnosus</i>	KM513646.1
311	<i>L. brevis</i>	CP021674
71	<i>L. plantarum</i>	MK027021
11	<i>L. acidophilus</i>	CP010432
Ka1	<i>L. rhamnosus</i>	LT220504.1
321	<i>L. rhamnosus</i>	KM513646.1
622	<i>L. rhamnosus</i>	LT220504.1
3111	<i>L.rhamnosus</i>	KM513646.1
621	<i>L. rhamnosus</i>	KP090128.1

Laktik asit bakterilerinin gerek kendileri gerekse filtratlarının patojen test bakterilerine değişen oranlarda antibakteriyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Şekil 4 ).

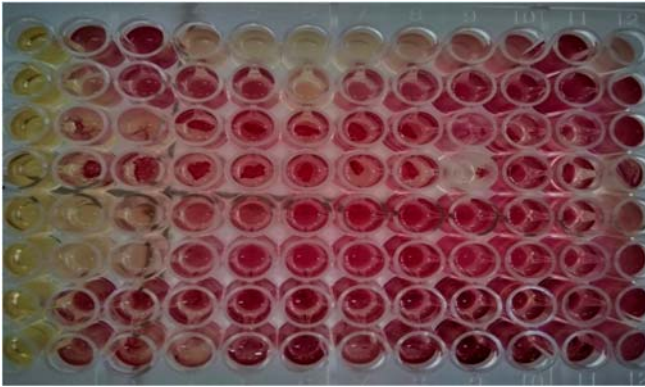




**Şekil 4.** Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisi; A.Sandvic overlay yöntemi B. Kuyucuk yöntemi

### **EPS'nin Antimikrobiyal Aktivitesi**

Farklı laktik asit bakterilerine ait ekstrapolisakkaritlerin patojen bakteriler üzerine olan MİK değerleri hesaplandı. Bu MİK değerleri Tablo 3'de verildi. Bu değerler 9,0mg/mL ile 0,438mg/mL arasında değişmekteydi. *S. epidermidis* 'e karşı en etkili ekzopolisakkaritin *L.plantarum*'a ait olan ekzopolisakkarit olduğu tespit edildi. *B. cereus*'a karşı en etkili EPS *L. rhamnosus* 24'e ait EPS iken bunu *L.plantarum*'a ve *L. acidophilus*'a ait olan EPS'ler takip etti. (Şekil 5).



**Şekil 5.** Ekzopolisakkaritlerin MİK değerlerinin belirlenmesi

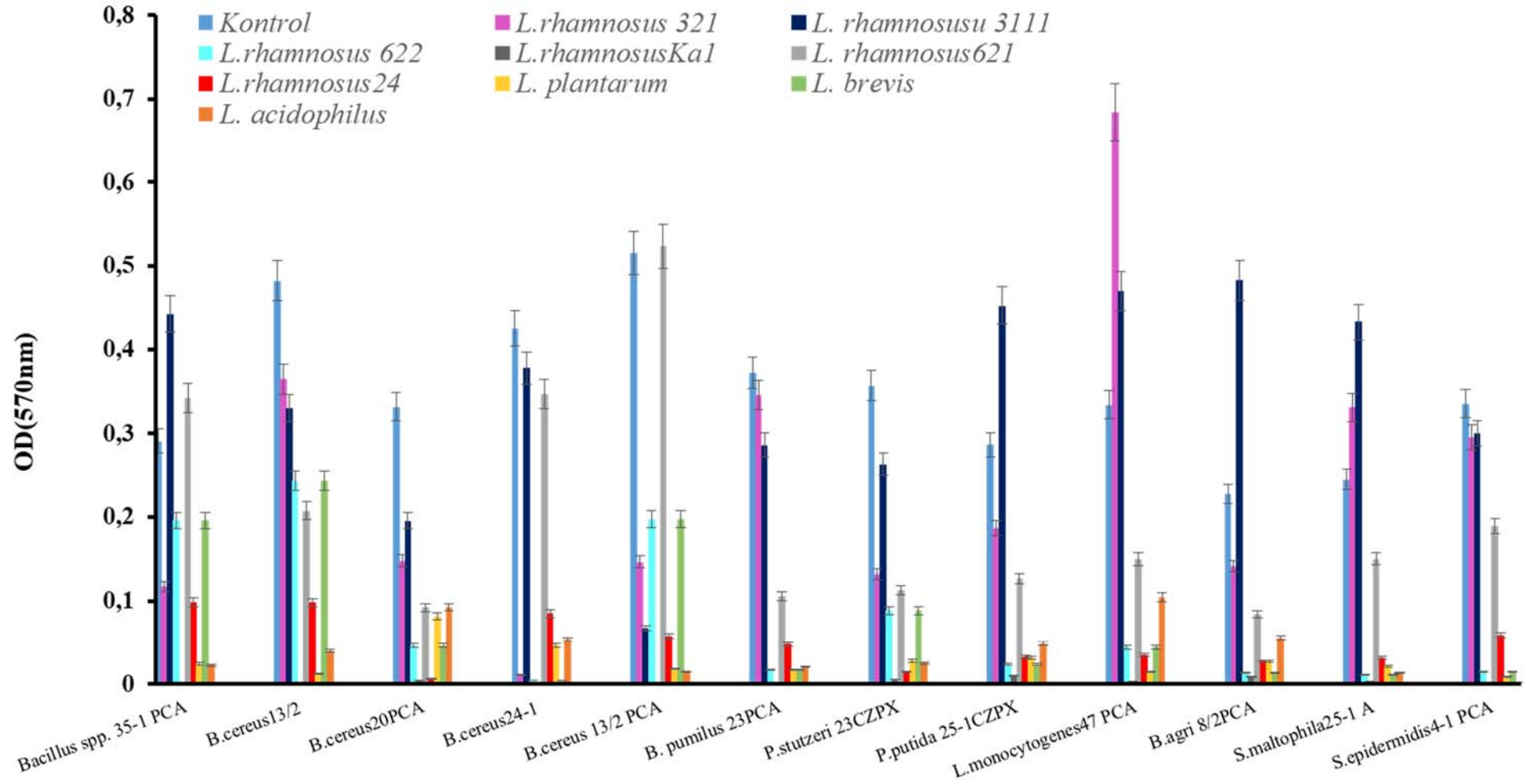
**Tablo 3.** Laktik asit bakterilerine ait ekzopolisakaritlerin patojen bakteriler üzerine MİK (mg/mL) değerleri

Patojen Bakteriler	Minimum inhibitör konsantrasyon (mg/mL)								
	<i>L. rhamnosus</i> 321	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. rhamnosus</i> 3.1.1.1	<i>L. rhamnosus</i> 24	<i>L. rhamnosus</i> Ka1	<i>L. plantarum</i> 71	<i>L. rhamnosus</i> 621	<i>L. rhamnosus</i> 622
<i>B.cereus</i> 13/2	-	5,000	<b>4,500</b>	6,750	5,750	6,500	7,000	8,250	6,750
<i>B.cereus</i> 20PCA	-	<b>2,500</b>	9,000	3,375	5,750	6,500	7,000	4,125	3,375
<i>B. pumilus</i> 23PCA	3,625	5,000	9,000	3,375	<b>1,438</b>	6,500	<b>1,750</b>	4,125	3,375
<i>P.stutzeri</i> 23CZPX	-	5,000	9,000	6,750	5,750	6,500	7,000	8,250	1,688
<i>P.putida</i> 25-1CZPX	7,250	5,000	4,500	3,375	5,750	6,500	7,000	4,125	6,750
<i>L.monocytogenes</i> 47 PCA	3,625	5,000	2,250	1,688	1,438	6,500	1,750	2,063	3,375
<i>B.agri</i> 8/2PCA	-	5,000	4,500	6,750	5,750	6,500	7,000	8,250	6,750
<i>S.maltophilia</i> 25-1 A	-	<b>2,500</b>	9,000	6,750	5,750	6,500	7,000	4,125	3,375
<i>Bacillus spp.</i> 35-1 PCA	7,250	<b>2,500</b>	4,500	3,375	<b>1,438</b>	6,500	<b>1,750</b>	4,125	6,750
<i>S.epidermidis</i> 4-1 PCA	7,250	<b>2,500</b>	4,500	3,375	<b>1,438</b>	6,500	<b>0,438</b>	8,250	6,750
<i>B.cereus</i> 24-1	7,250	<b>1,250</b>	9,000	1,688	<b>0,719</b>	6,500	<b>0,875</b>	8,250	3,375
<i>B.cereus</i> 13/2 PCA	7,250	-	9,000	1,688	1,438	6,500	1,750	8,250	3,375

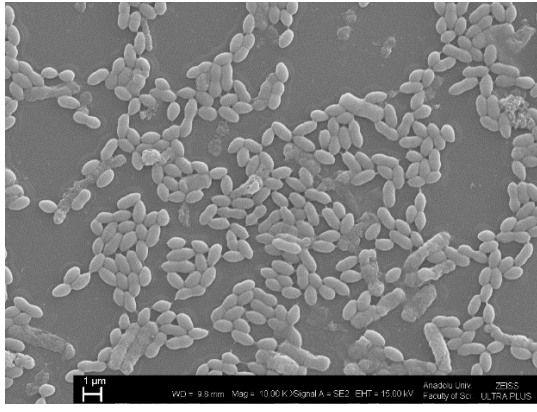
Hesaplanan MİK değerlerinde uygulanan ekzopolisakkaritler patojen test bakterilerinin biyofilm oluşturmalarını farklı oranlarda inhibe etti. Tüm bakterilerin ürettiği biyofilmlerin üzerine ortalama etkilerine baktığımız zaman *L. rhamnosus* 321 ve *L. rhamnosus* 3111'in optik dansite ölçümleri kontrol grubundan istatistiksel anlamlı olarak farklı bulunmadı ( sırası ile  $p= 0,177$  ve  $p=1,000$  Oneway-Anova). Diğer probiyotik bakterilerin ortalama optik dansite ölçümleri kontrol grubundan istatistiksel anlamlı olarak düşük bulundu. (Tablo 4). Bazı probiyotik bakterilerin bazı patojen bakterilerde biyofilm oluşumunu arttırdığı görüldü. *L. rhamnosus* 321, *L. Monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu artırdı. Benzer etki *L. rhamnosus* 3111'de de görüldü. Buna karşılık *L.rhamnosus* 621, *L.rhamnosus* 621, *L.rhamnosus* Ka1, *L.brevis* ve *L. acidophilus* biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiler (Şekil 6). Gözde en sık rastlanan bakterilerden *S. epidermis*'te ise bütün ekzopolisakkaritlerin biyofilm oluşumunu değişen oranlarda inhibe ettiği görüldü. En etkili ekzopolisakkarit *L.rhamnosus* Ka1, *L.brevis*, *L.plantarum* ve *L.acidophilus*'a ait ekzopolisakkaritler idi (Şekil 6). Bu veriler Tarayıcı Elektron Mikroskop(TEM) görüntüleri ile de doğrulandı (Şekil 7).

**Tablo 4.** Probiyotik bakterinin etkisi sonrası optik dansite ölçümleri ve biyofilm oluşumuna en etkili olduğu patojen bakteriler.

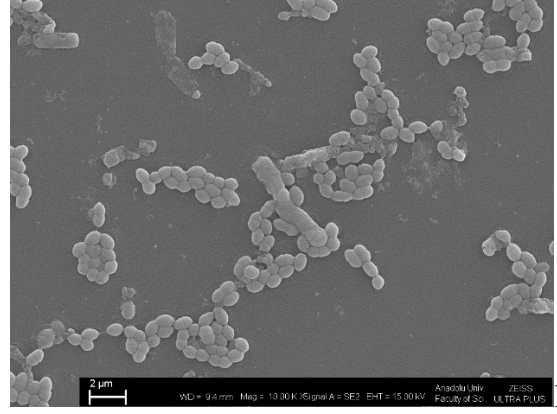
Bakteri ismi	Ortalama optik dansite ölçümü	Probiyotik bakterinin biyofilm oluşumuna en etkili olduğu patojen bakteri	Optik dansite ölçümü
Kontrol grubu	0,35±0,08		
<i>L. rhamnosus</i> 24	0,05±0,03	<i>Bacillus cereus</i> 20PCA	0,006
<i>L. brevis</i> 311	0,07±0,08	<i>Bacillus cereus</i> 24-1	0,004
<i>L. plantarum</i> 71	0,02±0,02	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 4-1 PCA	0,008
<i>L. acidophilus</i> 11	0,04±0,03	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 4-1 PCA	0,002
<i>L. rhamnosus</i> Ka1	0,01±0,01	<i>Bacillus cereus</i> 13/2	0,0005
<i>L. rhamnosus</i> 321	0,24±0,18	<i>Bacillus cereus</i> 24-1	0,01
<i>L. rhamnosus</i> 622	0,07±0,09	<i>Bacillus cereus</i> 24-1	0,005
<i>L.rhamnosus</i> 3111	0,34±0,13	<i>Bacillus cereus</i> 13/2 PCA	0,07
<i>L. rhamnosus</i> 621	0,20±0,13	<i>Brevibacillus agri</i> 8/2 PCA	0,08



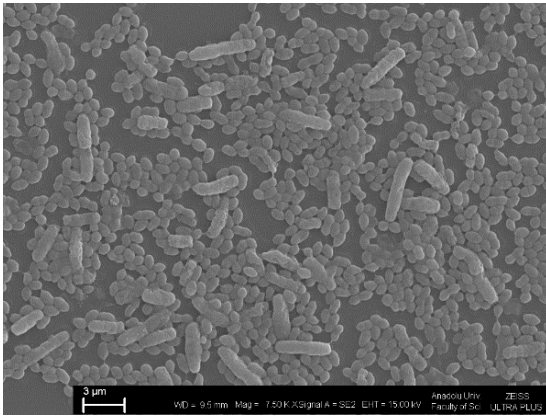
**Şekil 6.** Laktik asit bakterilerine ait EPS'lerin patojen oküler yüzey bakterilerinin oluşturduğu biofilme karşı geliştirdikleri antibiyofilm aktivitesi



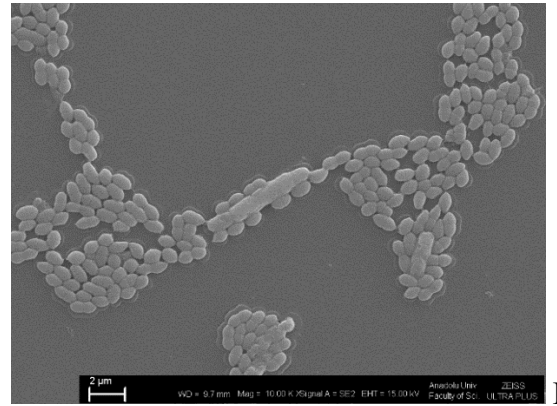
A



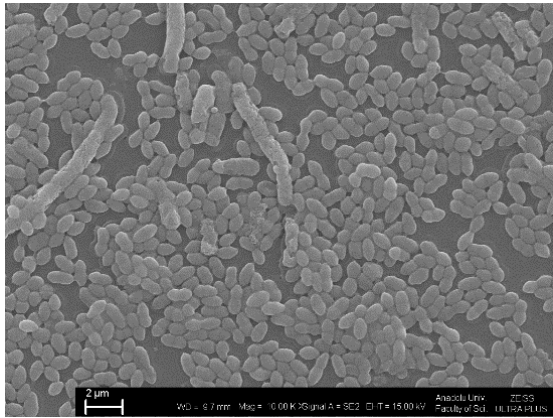
B



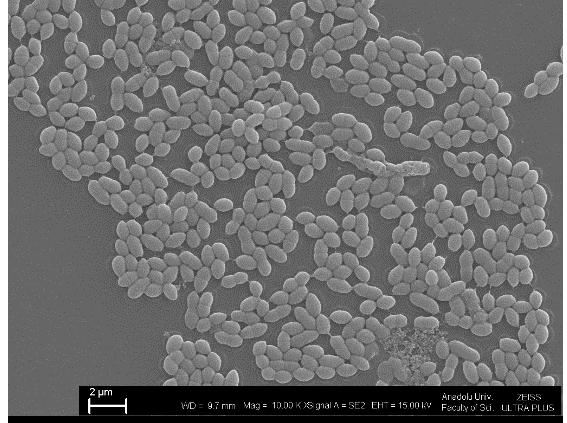
C



D



E



F

**Şekil 7.** Antibiyofilm aktivitesinin SEM görüntüleri; A-B *B. cereus* biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus*'un oluşturduğu EPS'nin etkisi; EPS yok (A), EPS var (B); C-D, *S. epidermidis* in biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus*'un oluşturduğu EPS'nin etkisi, EPS yok (C), EPS var (D); E-F, *P. Putida*'nın biyofilm oluşumuna *L.rhamnosus*'un oluşturduğu EPS'nin etkisi EPS yok (E), EPS var (F).

## TARTIŞMA

İnsan vücudu 100 trilyondan fazla mikroorganizma ile kolonize olmuş durumdadır.(19) Mikrobiyal kolonizasyonun en yoğun olduğu bölgeler sindirim sistemi, ağız boşluğu, deri ve vajinadır.(20) Her ne kadar göz yüzeyinde bu kadar mikroorganizma olmadığı düşünüüyorsa da bağımsız çalışmalarda göz yüzeyinin mikrobiyal çeşitliliğinin beklenenden daha fazla olduğunu ortaya koymuştur.(21,22) Bu çeşitliliğin içinde yararlı mikroorganizmalar önemli yer teşkil etmektedirler. Yapılan çalışmalar denge sağlayıcı mikrobiyomların göz yüzeyinde patolojik bakteri kolonizasyonunu azalttığı gösterilmiştir.(1,23,24) Son dönemde probiyotik bakterilerin önemi anlaşılmaya başladıkça bu homeostazı sağlayan bakterilerin insan vücuduna uygulanması düşüncesi ortaya çıkmıştır, ancak göz ile ilgili çalışmalar çok kısıtlıdır. Iovieno ve arkadaşları yaptıkları pilot çalışmada vernal keratokonjunktiviti olan hastaların gözlerine 4 hafta boyunca *Lactobacillus acidophilus* uygulamış ve 7 hastanın 6'sında semptomların düzeldiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada impresyon sitolojisi yapılmış ve 2 hastada ICAM-1 ve TLR-4 seviyeleri düşük bulunmuştur.(25) Bir başka klinik çalışmada Chisari ve arkadaşları kuru göz hastalarını 20'şerli 2 gruba ayırmış bir gruba suni göz yaşı diğer gruba suni göz yaşı ve *Bifidobacterium lactis* ve *Bifidobacterium bifida* mikroorganizmalarının karışımını kullanmışlardır. Çalışma sonuç olarak probiyotik bakterilerin kurugöz tedavisinde faydalı olabileceğini bildirmiştir.(26) Feher ve arkadaşları oral alınan Vit A, B, D ve omega 3 yağ asidine yine sistemik probiyotik lizat eklendiğinde irritable göz sendromuna daha fazla etki ettiğini bildirmiş ve nanopartiküllü probiyotiklerin daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.(27) Dennis-Wall ve arkadaşları ise kendisinde alerjik rinokonjunktivit olduğunu söyleyen hastalar sistemik olarak *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium bifidum* ve *Bifidobacterium longum* uygulamış ve rinokonjunktivit hastalarının yaşam kalite anketlerinin daha iyi olduğunu belirtmiştir.(28) Yeni yayınlanan bir çalışmada Nehal ve ark.(29) deve sütünden elde ettikleri *Lactococcus lactis*'in EPS'sinin *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* ve *Candida albicans*'a karşı inhibitor etki gösterdiğini bildirmişlerdir ancak bu çalışmada patojen bakterilerin kaynağı oküler yüzey değildir. Biz çalışmamızda probiyotik bakterilerin ürettiği ekstrapolisakkaritlerin oküler yüzeyden elde edilen patojen bakterilere karşı anti-mikrobiyal ve anti-biyofilm etkilerini

inceledik. Bildiğimiz kadarı ile bu çalışma incelediği konu açısından literatürde öncü olma niteliği taşımaktadır. Göz yüzeyinden sıklıkla elde edilen ve birçok oküler enfeksiyonun patojeni olarak tespit edilebilen *S. epidermidis* 'e karşı en etkili ekzopolisakkaritin *L.plantarum*'a ait olan ekzopolisakkarit olduğu tespit edildi. *Bacillus*'lara karşı ise en etkili EPS *L. rhamnosus* 24'e ait iken bunu *L.plantarum*'a ve *L. acidophilus*'a ait olan EPS'ler takip etti.

Bakterilerin patojenitesini belirleyen bir virülans faktörü de biyofilmdir ve oluşumu ile patojen bakteriler antibiyotiklere dirençli hale gelmektedirler. Biyofilm fiziksel bir bariyer olarak antibiyotik ve dezenfektanların mikroorganizma hücrelerine ulaşmasını engellemektedir.**(30,31)** Biyofilm mikrokolonileri içindeki artan bakteri yoğunluğu, atık birikimine ve değişmiş bir mikro ortama neden olur. Oksijen olmaması aminoglikozidlerin antimikrobiyal etkinliğini azaltır.**(32,33)** Daha önce yapılan çalışmalarda konjunktivadan izole edilen bazı mikroorganizmaların patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu gösterilmişti.**(34)** Ancak probiyotik bakterilerin biofilm oluşumunu karşı etkilerini gösteren literatür kısıtlıdır. Mahdhi ve ark.**(3)** (2018). *L. plantarum* ve *Bacillus* sp. ait EPS' nin *E. coli* nin biyofilm oluşturmasını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu durumu sinyal molekülleri nedeniyle indol üretim seviyesinin düşmesine ve hidrofobikliğin azalmasına bağlamışlardır. *L. acidophilus* –EPS HT-29 insan kolon adenokarsinoma hücrelerine *E. coli* 0157:H7'nin adezyonunu inhibe etmiştir.**(2)** Ancak göz yüzeyinde bulunup biyofilm üretme özelliğinde olan patojenlerin biofilmlerine etkili madde ve ilaçlarla ilgili çalışmalar mevcutken probiyotik bakterilerin bu anlamda kullanıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Daha önceki birçok çalışmada göz yüzeyinden elde edilen patojen bakterilerin oluşturdukları biofilmlere vankomisin, linezolid, imipenem gibi anti-bakteriyel ilaçlar ve anti inflamatuvar ilaçlar denenmiş hepsinin etkisi sınırlı kalmıştır.**(35,36)** Bu çalışmada probiyotiklerden elde edilen EPS'ler kullanıldı. En etkili ekzopolisakkarit *L.rhamnosus* Ka1, *L.brevis*, *L.plantarum* ve *L.acidophilus*'a ait EPS'ler olduğu tespit edildi ancak çok küçük bir oranda bazı bakterilerde biyofilm oluşmasını tetikleyen EPS'lerin de olduğu görüldü.

## **SONUÇLAR**

Sonuç olarak laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'lerin antibakteriyal ve antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu invitro çalışmalarda görüldü. Bu alışmalar öncül ve başlangıç aşamasında olup ilerleyen dönemler açısından mit vadedicidir. Çalışmamız gözdeki mikroorganizmalar ile ilgili olarak yapılan ilk çalışmalardan biridir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular ilerki çalışmalarda kullanılacak probiyotik ve patojen bakteri seçimi açısından çok değerlidir. Bu alışmalar sonucunda geliştirilecek topikal damlalar ile oküler yüzeydeki yerleşik mikrobiyota, lokal immün savunmalar arasında bir homeostaz kurulma ihtimali oküler yüzey sağlığı açısından önemlidir. Ancak daha üzerinde invitro ve hayvan çalışmaları yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.



## KAYNAKLAR

1-Lu LJ, Liu J. Human Microbiota and Ophthalmic Disease. *Yale J Biol Med.* 2016 Sep 30;89(3):325-30

2- Kim Y, Oh S, Kim SH. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 6;379(2):324-9.

3-Mahdhi A, Leban N, Chakroun I, Bayar S, Mahdouani K, Majdoub H, B. Kouidhi B.. Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp., as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli* *Microb. Pathog,* 2018;125:448-53.

4-Dinçer E, Kivanç M, Karaca H. Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler. *Gıda.* 2010;35(1):55-62.

5- Rademaker JLW, de Bruijn FJ. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, 2000. <http://www.msu.edu.edu./user/debruijn/dna1-4htm>, Nov.

6-Van Casteren WHM, Dijkema C, Schols H A, Beldman G, Voragen AGJ. Characterisation and modification of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B40. *Carbohydr. Polym.* 1998;37:123–30.

7-Champagne CP, Gardner NJ, Lacroix C. Fermentation Technologies for the production of exopolysaccharide synthesizing *Lactobacillus rhamnosus* concentrated cultures, *Journal of Biotechnology,* 2007;10 (2): 211– 20.

8-Zhoua Y, Cuia Y, Qub X. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2019;207:317-32.

9-Kıvanç SA, Kıvanç M, Kılıç V, Güllülü G, Özmen AT. Comparison of Biofilm Formation Capacities of Two Clinical Isolates of *Staphylococcus Epidermidis* with and without *icaA* and *icaD* Genes on Intraocular Lenses. *Turk J Ophthalmol*. 2017Apr;47(2):68-73.

10-Kıvanç SA, Kıvanç M, Yiğit T. Antibiotic susceptibility, antibacterial activity and characterisation of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Exp Ther Med*. 2016 Sep;12(3):1732-40.

11-Kıvanç SA, Kıvanç M, Bayramlar H. Microbiology of corneal wounds after cataract surgery: biofilm formation and antibiotic resistance patterns. *J Wound Care*. 2016 Jan;25(1):12, 14-9.

12-Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbial Rev* 2002;15(2): 167-93.

13-Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emergency of infect diseases*, 2002;8:881-90.

14-Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000;44, 1818–24.

15- Pratten, J, Wilson M, Spratt DA. Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003;18: 45-49.

16- González L, Sandoval H, Sacristán N, Castro JM, Fresno JM, Tornadijo ME. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control* 2007;18 :716–22.

17- Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FC, Velloso MDS, Fuchs BB, Mylonakis E, Jorge AOC, Junqueira JC. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*. 2018Feb;34(2):212-25.

18- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr;40(2):175-9.

19-Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, 2017;3: 71-82.

20- Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 2005;1284: 103–12.

21- Dong Q, Brulc JM, Iovieno A. et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 5408.

22-Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. Culturing of ‘Unculturable’ Human Microbiota Reveals Novel Taxa and Extensive Sporulation. *Nature*;2016; 533:543.

23-Kugadas A, Wright Q, Geddes-McAlister J, Gadjeva M. Role of Microbiota in Strengthening Ocular Mucosal Barrier Function Through Secretory IgA. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Sep 1;58(11):4593-600.

24-Kugadas A, Gadjeva M. Impact of Microbiome on Ocular Health. *Ocul Surf.* 2016 Jul;14(3):342-9.

25-Iovieno A, Lambiase A, Sacchetti M, Stampachiacchiere B, Micera A, Bonini S. Preliminary evidence of the efficacy of probiotic eye-drop treatment in patients with vernal keratoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008 Mar;246(3):435-41.

26- Chisari G, Chisari EM, Francaviglia A, Chisari CG. The mixture of bifidobacterium associated with fructo-oligosaccharides reduces the damage of the ocular surface. *Clin Ter.* 2017 May-Jun;168(3):e181-5.

27- Feher J, Pinter E, Kovács I, Helyes Z, Kemény A, Markovics A, Plateroti R, Librando A, Cruciani F. Irritable eye syndrome: neuroimmune mechanisms and benefits of selected nutrients. *Ocul Surf.* 2014 Apr;12(2):134-45.

28- Dennis-Wall JC, Culpepper T, Nieves C Jr, Rowe CC, Burns AM, Rusch CT, Federico A, Ukhanova M, Waugh S, Mai V, Christman MC, Langkamp-Henken B. Probiotics (Lactobacillus gasseri KS-13, Bifidobacterium bifidum G9-1, and Bifidobacterium longum MM-2) improve rhinoconjunctivitis-specific quality of life in individuals with seasonal allergies: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2017 Mar;105(3):758-67.

29-Nehal F, Sahnoun M, Smaoui S, Jaouadi B, Bejar S, Mohammed S. Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. *Microbial Pathogenesis*, 2019; 132:10-9.

30-Shih PC, Huang CT. Effect of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:309-14.

31-Drenkard E, Ausubel F.M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002;740-3.

32- Tack KJ, Sabath LD. Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*. 1985;31(3):204-10.

33- del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Aug;82(2):204-9.

34- Kivanç SA, Takım M, Kivanç M, Güllülü G. *Bacillus* Spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens. *Afr Health Sci*. 2014 Jun;14(2):364-71.

35- Kivanc SA, Akova-Budak B, Yildiz M, Kivanc M. The effect of the linezolid and the vancomycine on biofilm production that formed on two different acrylic hydrophobic intraocular lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2015;56(7 ):287.

36- Kivanc SA, Akova-Budak B, Kivanc M, Cevik SG, Gullulu G, Ozmen AT, Yucel AA. The effects of sub- and above-MIC concentrations of vancomycin, linezolid and imipenem on *Staphylococcus spp.* isolated from ocular surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2016;57(12):5401.