

# Karışık Gram Negatif Bakteri Kültürlerinde Biyofilm Oluşumu ve Siprofloksasin Duyarlılığına Etkileri: Kesitsel Araştırma

## Biofilm Formation by Mixed Gram-Negative Bacteria Cultures and its Effects on Ciprofloxacin Sensitivity: Cross-Sectional Research

<sup>1</sup> Hadil BİTAR<sup>a</sup>, <sup>2</sup> Fethiye Ferda YILMAZ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İzmir, Türkiye

<sup>b</sup>Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, İzmir, Türkiye

Bu çalışma, TMC 2020 Çevrim İçi Sempozyumu'nda (25-27 Aralık 2020) e-poster olarak sunulmuştur. Ayrıca kongre kitabında özet olarak yer almıştır.

**ÖZET Amaç:** Farklı cins Gram-negatif bakterilerin aynı ortamda üretilmesi sonucu oluşturulan biyofilm miktarlarında meydana gelebilecek farklılıklar ile bunun siprofloksasine olan duyarlılığa etkisinin araştırılması amaçlandı. **Gereç ve Yöntemler:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* standart suşlarının siprofloksasine olan duyarlılıkları disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Ayrıca bu bakterilerle oluşturulan ikili-üçlü karışık kültürlerin de siprofloksasine duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırıldı. Her bir suşun ayrı ayrı ve ikili-üçlü karışımlarıyla hazırlanan kültürlerin biyofilm oluşturma düzeyi siprofloksasin uygulanmadan önce ve sonra kristal viyole yöntemiyle test edildi. **Bulgular:** *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* için siprofloksasin minimum inhibitör konsantrasyonları sırasıyla 0,008 mg/L; 0,016 mg/L ve 0,250 mg/L olarak tespit edildi. Siprofloksasin inhibisyon zon çapları her üç bakteri için de 30 mm'nin üzerindeydi. Karışımlar için siprofloksasin minimum inhibitör konsantrasyonları, *E. coli*+*K. pneumoniae* kültüründe 0,016 mg/L, *P. aeruginosa*'nın diğer iki bakteri ile ikili ve üçlü karışımlarında ise 0,250 mg/L olarak tespit edildi. Siprofloksasin uygulamasından önce ve minimum inhibitör konsantrasyonlarının altındaki değerlerde hem tek hem karışık bakteri kültürlerinde güçlü düzey biyofilm oluşumu saptandı. Minimum inhibitör konsantrasyon ve üzerindeki değerlerde ise biyofilm oluşmadı veya zayıf biyofilm oluşumu gözlemlendi. **Sonuç:** Doğal koşullardaki gibi farklı bakterilerin bir araya gelmesiyle oluşturulan kültürlerdeki biyofilm düzeylerinin ve siprofloksasine olan duyarlılığın değişiminin araştırıldığı bu çalışmada, biyofilm oluşturan mikroorganizmalarla mücadeleye katkı sağlayabilecek bazı ön verilere ulaşıldığından biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisine yönelik benzer ve ileri çalışmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

**ABSTRACT Objective:** It was aimed to investigate the differences that may occur in the amount of biofilm formed due to growing different types of Gram-negative bacteria in the same environment and the effect of this on the susceptibility to ciprofloxacin. **Material and Methods:** The susceptibility of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* standard strains to ciprofloxacin were determined by disk diffusion and microdilution method. In addition, the susceptibilities of double-triple mixed cultures formed with these bacteria to ciprofloxacin were investigated by microdilution method. Biofilm formation levels of cultures prepared with separate and double-triple mixtures of each strain were tested by crystal violet method before and after ciprofloxacin application. **Results:** The minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin to *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were determined as 0.008 mg/L, 0.016 mg/L and 0.250 mg/L, respectively. The ciprofloxacin inhibition zone diameters were over 30 mm for all three bacteria. Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin for the mixtures, *E. coli*+*K. pneumoniae* culture, it was determined as 0.016 mg/L, and 0.250 mg/L in double and triple mixtures of *P. aeruginosa* with the other two bacteria. Strong biofilm formation was detected in both single and mixed bacterial cultures before ciprofloxacin administration and at values below the minimum inhibitory concentrations. At the minimum inhibitory concentration and above, no biofilm was formed or weak biofilm formation was observed. **Conclusion:** In this study, which investigated the change in biofilm levels and susceptibility to ciprofloxacin in cultures formed by the combination of different bacteria as in natural conditions, it is thought that it will be a guide for similar and advanced studies on the treatment of biofilm-related infections, since some preliminary data that can contribute to the fight against biofilm-forming microorganisms have been reached.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilmler; siprofloksasin;  
Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlar

**Keywords:** Biofilms; ciprofloxacin;  
Gram-negative bacterial infections

**KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:**

Bitar H, Yilmaz FF. Karışık gram negatif bakteri kültürlerinde biyofilm oluşumu ve siprofloksasin duyarlılığına etkileri: Kesitsel araştırma. J Lit Pharm Sci. 2024;13(1):1-7.

**Correspondence:** Fethiye Ferda YILMAZ

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, İzmir, Türkiye

**E-mail:** ferda.yilmaz@ege.edu.tr

Peer review under responsibility of Journal of Literature Pharmacy Sciences.

**Received:** 13 Mar 2023

**Received in revised form:** 08 Feb 2024

**Accepted:** 09 Feb 2024

**Available online:** 01 Mar 2024

2630-5569 / Copyright © 2024 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Mikroorganizmalar çeşitli yüzeylere tutunarak çoğaldıktan sonra etraflarını saran hücre dışı polimerler üreterek oluşturdukları bir matris içinde yaşamlarını sürdürebilmektedir. Bu yapıya biyofilm adı verilmektedir ve genellikle biyofilm içindeki mikroorganizmalar süspansiyon hâlindeki (planktonik) mikroorganizmalardan farklı özelliklere (artmış antibiyotik direnci vb.) sahip olmaktadır. Biyofilmi oluşturan mikroorganizma toplulukları tek bir türden veya farklı türlerden oluşabilmektedir.<sup>1,2</sup>

Özellikle hastane ortamındaki enfeksiyonların yüksek oranda biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Kullanılan tıbbi malzemeler üzerindeki biyofilm yapıları, bakteriler ve mayalar tarafından oluşturulabilmekte ve bu mikroorganizmalar için kaynak olarak genellikle hastanın kendi florası, sağlık çalışanlarının elleri, çeşme suyu veya çevresel yüzeyler görülmektedir. Kateterler, yapay kalp kapakları, eklem replasmanları gibi mikroorganizmalara kolaylıkla tutunabilme imkânı sağlayan yüzeylerde oluşan enfeksiyonların, sıklıkla ve yalnızca mevcut yapay aracın çıkarılması ile tedavi edilemediği görülmüştür.<sup>1</sup>

Besin bulabildikleri ortamlarda, tüm yüzey tiplerinde, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* gibi bazı bakteri grupları yüksek oranda biyofilm oluşturma eğilimine sahiptirler. Çoklu kültürlerde biyofilm substrata özgü, saf kültürlerde ise türe özgü olmaktadır.<sup>3</sup>

Biyofilm yapıları, antimikrobiyal penetrasyonunda azalma, metabolizma ve çoğalma hızında yavaşlama, heterojenite, biyofilme özgü fenotip ve direnç genlerinin aktarımına bağlı olarak antimikrobiyal dirence neden olabilmektedir. Biyofilmin konjugasyonun rahatlıkla yapılabilmesine olanak sağlayan fiziksel yapısı, mikrobiyal topluluk içerisindeki genetik çeşitliliğe imkân tanıyan ve özellikle çoklu ilaç-dirençli bakterilerin ortaya çıkışını sağlayan horizontal gen aktarımını da kolaylaştırmaktadır.<sup>1,2,4</sup>

Bu çalışmada, 2 veya 3 Gram-negatif mikroorganizmanın bir araya geldiğinde oluşturduğu biyofilm düzeylerindeki artış veya azalma ile biyofilmin siprofloksasin [ciprofloxacın (CIP)] duyarlılığına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada standart ATCC kökenleri ile çalışılması planlandığından ve hasta izolatlarına yer verilmediğinden etik kurul izni alınmamıştır. İlk olarak seçilen standart kökenlerin CIP'ye olan duyarlılıkları Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi ve mikrodilüsyon testleri ile belirlendi. Daha sonra kökenlerin biyofilm oluşturma düzeyleri 96 kuyucuklu mikropoplaklarda tek başınayken ve ikili-üçlü kombinasyonlar hâlindeyken kristal viyole yöntemi ile test edildi. Bu testler her bir mikroorganizma ile kombinasyonlar için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) üzeri ve altı konsantrasyonlarda başlangıç aşamasında ortama eklenen CIP varlığında da tekrarlandı.

### BAKTERİ SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI

Taze kültürleri hazırlanan *Escherichia coli* ATCC 29998, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 standart suşlarının fizyolojik tuzlu su içerisindeki süspansiyonları, McFarland 0,5 ( $10^7$ - $10^8$  KOB/mL) bulanıklığına ayarlanarak testler için hazır hâle getirildi.

### ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

**Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi:** Mueller-Hinton Agar (Merck, Almanya) plakların yüzeyine bakteri süspansiyonları steril eküvyonlar ile yayıldı. Aseptik koşullarda CIP-5 µg antibiyotik diskleri [BD BBL Sensi-Disc (Becton, Dickinson and Company, ABD)] yerleştirildi ve 35 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda disklerin etrafında beliren zonların çapı mm cinsinden ölçülerek Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi-2020 [The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-2020 (EUCAST-2020)] önerilerine göre değerlendirildi.<sup>5,6</sup> Testler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

**Mikrodilüsyon Testi:** Steril plastik U tabanlı mikropoplaklardaki her bir kuyucuğa 50 µl Mueller Hinton Broth (Merck, Almanya) dağıtıldı. Bu kuyucuklar içerisinde CIP stok solüsyonundan çift katlı seri dilüsyonlar hazırlandı (1,000-0,004 mg/L). Serilerin son kuyucuklarına antibiyotik ilave edilmedi ve üreme kontrolü olarak ayrıldı. Ayrıca besiyeri sterilite kontrolleri için de kuyucuklar ayrıldı. McFarland 0,5 olan bakteri süspansiyonları, 1/100 oranında dilüe edildi ( $1-2 \times 10^5$  KOB/mL) ve hazırlanan antibiyotikli kuyu-

cuklara ilave edildi. Daha sonra, 35 °C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda göz ile değerlendirilen kuyucuklarda üreme görülmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi ve EUCAST-2020 önerilerine göre değerlendirildi.<sup>5,6</sup> Testler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

### KRİSTAL VİYOLE YÖNTEMİ İLE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN BELİRLENMESİ

Steril 96 kuyucuklu düz tabanlı polistiren mikrop-lardaki her bir kuyucuğa 180 µl Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyeri dağıtıldıktan sonra üzerine McFarland 0,5 standardı bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonlarından 20 µl eklenip 35 °C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak sadece TSB içeren kuyucuklar bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklar boşaltılıp steril fosfat tamponu ile 3 defa yıkandı. Kurutma kâğıdı üzerinde ters çevrilerek kuruması için beklendi. Biyofilm tabakasını fikse etmek için kuyucuklara 180 µl metanol doldurulup 20 dk sonra boşaltıldı, plaklar ters çevrilip kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuklar 180 µl %0,1’lik (w/v) kristal viyole çözeltisi ile dolduruldu ve 20 dk sonra boşaltıldı. Musluk suyu ile yıkandıktan sonra ters çevrilip kurumaya bırakıldı. Biyofilm tabakasına tutunan boya, etanol/aseton (80/20: v/v) karışımı ile 20 dk süre çözülüp 96 kuyucuklu U tabanlı başka bir mikrop-lak içine alındı. Optik dansite (OD), mikrop-laka okuyucuda [Thermo Scientific-Varioskan Flash, US (Thermo Fisher Scientific, ABD)] 580 nm (OD-mo) dalga boyunda ölçüldü. Aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak biyofilm düzeyleri zayıf, orta ve güçlü olmak üzere sınıflandırıldı.<sup>7,8</sup> Çalışmalar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

- Sınır değer (cut-off: ODc): Ortalama negatif kontrol OD+(3xstandart sapma)
- Negatif:  $OD-mo \leq ODc$
- Zayıf:  $ODc < OD-mo \leq 2xODc$
- Orta:  $2xODc < OD-mo \leq 4xODc$
- Güçlü:  $4xODc < OD-mo$

### KOMBİNASYONLARIN ANTİBİYOTİK DUYARLILIK VE BİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mikrodilüsyon ve biyofilm testi ikili ve üçlü bakteri kombinasyonları ile tekrar çalışıldı. Her testte kontrol

olması amacıyla bakteriler tek olarak da çalışıldı. Her bir bakterinin 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış süspansiyonlarından 1:1 oranında ikili karışımları ve 1:1:1 oranında üçlü karışımları hazırlandı.

#### İkili bakteri karışımları (1:1):

*E. coli* (500 µl)+*P. aeruginosa* (500 µl)

*E. coli* (500 µl)+*K. pneumoniae* (500 µl)

*K. pneumoniae* (500 µl)+*P. aeruginosa* (500 µl)

#### Üçlü bakteri karışımı (1:1:1):

*E. coli* (330 µl)+*K. pneumoniae* (330 µl)+*P. aeruginosa* (330 µl)

Karışımlar daha sonra 1:100 oranında seyreltilerek mikrodilüsyon testlerinde kullanıldı. Mikrop-laka kuyucuklarına dağıtılan 50 µl’lik CIP seri dilüsyonları (1,000-0,004 mg/L) üzerine bakteri karışımlarından 50 µl ilave edildi. Daha sonra, 35 °C’de 18-24 saat inkübasyonun ardından MİK değeri belirlendi. Testler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Belirtilen koşullarda oluşan biyofilmi ve CIP’nin biyofilme etkisini görmek için aynı kuyucuklar üzerinde biyofilm varlığını görmek için kristal viyole yöntemi kullanıldı. Bu amaçla MİK değerlendirmeleri yapıldıktan sonra kuyucuklar boşaltıldı, fosfat tamponu ile yıkandı, metanol ile oluşan biyofilmin fiksasyonu sağlandı. Kuyucuklara 90 µl %0,1’lik kristal viyole çözeltisi eklendi ve 20 dk sonra boşaltılıp musluk suyu ile boyanın fazlası giderildikten sonra ters çevrilip kurutuldu. Son olarak etanol/aseton (80/20: v/v) karışımı ile biyofilme bağlanan boya çözülerek 580 nm’de OD değerleri ölçüldü.

## BULGULAR

Bu çalışmada, standart *E. coli* ATCC 29998, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşları için belirlenen CIP-MİK değerleri sırasıyla 0,008 mg/L; 0,016 mg/L ve 0,250 mg/L ve zon çapları ise 30 mm ve üzeri olarak bulunmuştur. Karışık kültürlerde ise CIP-MİK değerleri; *E. coli*+*K. pneumoniae* için 0,016 mg/L, *P. aeruginosa*’nın diğer iki bakteri ile olan ikili kombinasyonu ve üçlü kombinasyonda ise 0,250 mg/L olarak tespit edildi. Standart Gram-negatif bakteri suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırıldığı bu çalışmada, OD<sub>580</sub> değerlerine göre her üç bakterinin de güçlü

**TABLO 1:** Siprofloksasin MİK değerleri ve biyofilm (OD580) absorbands değerleri.

Bakteriler	CIP-MİK (mg/L±SS)	CIP-ZÇ (mm±SS)	BF-OD580 (Absorbans±SS)
<i>E. c.</i>	0,008±0,0	30±0,0	2,2±0,6
<i>K. p.</i>	0,016±0,0	30±0,0	2,5±1,0
<i>P. a.</i>	0,250±0,0	31±0,0	2,6±1,0
<i>E. c.+K. p.</i>	0,016±0,0	-	2,2±0,6
<i>E. c.+P. a.</i>	0,250±0,0	-	2,2±0,6
<i>K. p.+P. a.</i>	0,250±0,0	-	4,1±0,7
<i>E. c.+K. p.+P. a.</i>	0,250±0,0	-	4,1±0,2

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon; CIP: Siprofloksasin; ZÇ: Zon çapı; - : Test edilmedi; BF-OD580: Biyofilm-Optik dansite (580 nm); SS: Standart sapma; *E. c.*: *Escherichia coli* ATCC 25922; *K. p.*: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *P. a.*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

düzye biyofilm ( $OD_{580} > 0,4$ ) oluşturduğu görüldü. Çalışmamızda *K. pneumoniae*+*P. aeruginosa* ikili kültüründe ve üçlü kültürde oluşan biyofilm düzeylerinin, her birinin tek olarak oluşturduğu düzeylere göre yaklaşık 2 kat artmış olduğu görüldü. *E. coli* içeren ikili kombinasyonlarda ise  $OD_{580}$  değerinin *E. coli*'nin tek olarak çalışıldığı kuyucuklardaki değerlerle aynı olduğu görülmüştür. Ortama CIP ilave edilmeden önce, bakterilerin hem tek hem de ikili ve üçlü karışık kültürlerinde, güçlü düzeyde biyofilm ( $OD_{580} > 0,4$ ) oluşturduğu gözlemlendi. Tek ve karışık kültürlerde biyofilm düzeylerine CIP'nin etkisi araştırıldığında, daha önce belirlenen CIP-MİK değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlarda zayıf biyofilm ( $0,1 < OD_{580} \leq 0,2$ ) oluştuğu veya hiç biyofilm oluşmadığı ( $OD_{580} \leq 0,1$ ), CIP-MİK'nin altındaki konsantrasyonlarda ise güçlü düzeyde ( $OD_{580} > 0,4$ ) biyofilm oluştuğu gözlemlendi (Tablo 1).

## TARTIŞMA

Kinolon grubu antibiyotikler hastane ve toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Yaygın kullanımlarına bağlı olarak da direnç artışı meydana gelmektedir. Gram-Negatif bakterilerin pek çoğunun duyarlılığının bu grubun önemli bir üyesi olan CIP'ye karşı azalmış olduğu bildirilmektedir. Kinolonlar, bakteri hücrelerindeki hedefleri olan DNA giraz ve topoizomeras IV işlevlerine etki ederek DNA sentezini inhibe ederler. Kinolon direnci ise hedefin değişmesi veya ilacın hedefe yeterli konsantrasyonda ulaşmaması ile ilgilidir.<sup>9</sup>

Bu çalışmada, standart *E. coli* ATCC 29998, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC

27853 suşları için belirlenen CIP-MİK ve zon çapı değerlerinin EUCAST sınır değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür.<sup>5,6</sup> Karışık kültürlerde elde edilen CIP-MİK değeri sonuçlarına göre MİK değerlerinin genellikle ikili ve üçlü kültür karışımlarındaki bakteriler içerisinde duyarlılığı en az olanın değerine yakın olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç virülans özellikleri baskın olan türün duyarlılık özelliğinin test sonuçlarına yansımış olabileceğini düşündürmüştür. Benzer olarak Thet ve ark. çalışmalarında, klinik olarak önemli *Staphylococcus aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarını kullanarak agarlı besiyeri desteği üzerindeki nano-gözenekli polikarbonat membranlar üzerinde karışık kültürler hazırlamıştır. Oluşan biyofilm kültürü içerisinde *P. aeruginosa*'nın baskın hâle geçtiği görülmüştür. Canlı biyofilm topluluğu ile bu bakterilerin virülans faktörleri arasında bir korelasyon olduğu belirtilmiştir.<sup>10</sup>

Bu çalışmada, test edilen 3 standart Gram-negatif bakterinin de güçlü düzey biyofilm oluşturduğu görüldü. Günümüzde nozokomiyal enfeksiyonların büyük bir kısmı biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Kateterler, yapay kalp kapakları, eklem replasmanları mikroorganizmaların kolaylıkla tutunabildikleri önemli yüzeylerdir.<sup>1</sup> Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, kan akımı ve tükürüğün fiziksel gücü, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dayanıklıdır.<sup>4,11</sup> Biyofilm oluşturan *E. coli* suşlarının, oluşturmaya göre ampisilin, sefotaksim, norfloksasin ve nalidiksik aside daha dirençli olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>12</sup> Antibiyotikler ve sürfaktanlar bazı

durumlarda biyofilmlerin kontrolünü sağlamak için kullanılmaktadır. Biyofilm yapısındaki ekzopolisakaridlerin antibiyotiklerin penetrasyonunu azaltarak bakteriye ulaşmasına engel olması ve dirençli mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların artması nedeniyle bu uygulamalar zaman zaman yetersiz kalmaktadır.<sup>1,12</sup>

Endonezya’da klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae*’nin antibiyotik direnç profili ve biyofilm üretme kapasitesini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada izolatların birçok antibiyotiğe dirençli olduğu, sadece meropenem, amikasin ve piperasilin-tazobaktama karşı direnç oranlarının düşük olduğu bildirilmiştir. Çoğul dirençli izolatların oranı %54,49 olarak belirlenmiştir. İzolatların %85,63’ünün biyofilm üretebildiği tespit edilmiştir. Birden fazla antibiyotiğe dirençli izolatların çoğunun aynı zamanda biyofilm üreticisi olduğunun saptandığı bildirilmiştir. Biyofilm üretebilen *K. pneumoniae*’nin biyofilm üretmeyenlere göre antibiyotik direncinin daha yüksek olduğunu gösterilmiştir.<sup>13</sup>

Doğal koşullarda tek bir türün oluşturduğu biyofilmlere kıyasla birden fazla organizmanın birlikte oluşturduğu biyofilmlere daha çok rastlanmaktadır.<sup>2</sup> Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar, ilaç direnci nedeniyle yüksek mortalite oranlarına sahiptir. Polimikrobiyal biyofilmlerde çeşitli mikroorganizmalar birlikte yaşarlar ve neden oldukları enfeksiyonları tedavi etmek monomikrobiyal olanlara göre daha zordur.<sup>14</sup> *In vitro* biyofilm modelleri, polimikrobiyal biyofilmleri ve bunlara karşı uygulanacak potansiyel tedavi yöntemlerini araştırmak için oldukça yararlıdır.<sup>15</sup> Polimikrobiyal biyofilmler, tek tür biyofilmlere göre antimikrobiyallere karşı daha fazla direnç geliştirebilir. Bakterilerin dağılımı, çevreyle, birbirleriyle veya konakçı ile etkileşime girme şekline bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.<sup>16</sup>

Çalışmamızda, *K. pneumoniae*+*P. aeruginosa* ikili kültüründe ve üçlü kültürde oluşan biyofilm düzeylerinin, her bir bakterinin tek olarak oluşturduğu biyofilm düzeylerine göre yaklaşık 2 kat arttığı, *E. coli* içeren ikili kombinasyonlarda ise *E. coli*’nin tek olarak çalışıldığı kuyucuklar ile aynı değerlerde olduğu görülmüştür. Üçlü ve ikili kombinasyonlardaki bu farkı yorumlamak için daha çok örnekle çalışıl-

ması ve daha ileri düzey testlerin yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. CIP ile karşılaşmadan önce, bakterilerin hem tek hem de ikili-üçlü karışık kültürlerinde, güçlü düzeyde biyofilm oluştuğu gözlemlendi. Tek ve karışık kültürlerde biyofilm düzeylerine CIP’nin etkisi araştırıldığında, daha önce belirlenen MİK değerlerinin üzerindeki CIP konsantrasyonlarında zayıf biyofilm oluştuğu veya hiç oluşmadığı, altındaki konsantrasyonlarda ise güçlü düzeyde biyofilm oluştuğu gözlemlendi. Bu durum, CIP’nin MİK ve üzeri konsantrasyonlarda hem üreme düzeyleri hem biyofilm üzerine inhibisyon etkisinin görüldüğünü, MİK’nin altındaki konsantrasyonlarda ise böyle bir etkisinin olmadığını işaret etmektedir.

*P. aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas protegens* Pf-5 ve *K. pneumoniae* KP-1 arasındaki etkileşimlerin yararlı veya zararlı olup olmadığını belirlemek için yapılan bir çalışmada bu bakteriler çiftler hâlinde kültüre alınarak biyofilm modelleri oluşturulmuştur. Ayrıca mutant türler ve/veya değiştirilmiş çevresel koşullar ile organizmaya özgü fizyolojinin sonuçlara olan etkisi de gösterilmiştir.<sup>17</sup>

Cendra ve ark., *P. aeruginosa* PA14 ve *S. aureus* Newman suşlarının monokültürlerindeki biyofilmin karışık kültürdeki biyofilme göre antibiyotiklere daha duyarlı olduğunu tespit etmiştir. *P. aeruginosa* ve *S. aureus*, kistik fibroz hasta örneklerinden yaygın olarak izole edilen 2 temel patojenin bir arada bulunduğu hastalığın seyrini sinerjik etkileriyle ciddi olarak etkilediğini belirtmiştir. Genellikle çocukluk döneminde akciğer epitelini kolonize eden *S. aureus* ve erişkin çağlarda etken olarak ortaya çıkan *P. aeruginosa*’nın enfekte yaralarda da aynı anda birlikte görüldüğünü bildirmiştir.<sup>16</sup>

Diyabetik ayak enfeksiyonu olan hastalarda etken dağılımı ve mikroorganizmaların biyofilm oluşturma oranlarının araştırıldığı bir çalışmada diyabetik ayak enfeksiyonu olan hastalardan alınan kemik ve yumuşak doku örneklerinden 81 etken bakteri izole edilmiştir. On hastada polimikrobiyal enfeksiyon saptanırken, izolatların %65,4’ünün Gram-negatif basil olduğu ve en sık *Pseudomonas* spp. izole edildiği bildirilmiştir. Bunu sırasıyla *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. ve *Serratia* spp. türleri takip

etmiştir. Bunların %83'ünün biyofilm üretebildiği, *Pseudomonas* bakterilerinin %93,7'sinin biyofilm üretebildiği tespit edilmiştir. Diyabetik ayak enfeksiyon etkenlerinin biyofilm oluşturmalarını önlemek veya oluşan biyofilmi ortadan kaldırmak için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği, biyofilm yönetiminin kronik yara tedavisinin en etkili basamağını oluşturduğu ve bu konuda az sayıda çalışma olduğu vurgulanmaktadır.<sup>18</sup>

## SONUÇ

Biyofilm yapısı mikroorganizmaların ortam koşullarına dayanıklılığını artırırken bizim için onlarla mücadeleyi daha güç hâle getirmektedir. Bu nedenle mikroorganizmaların biyofilm oluşturma mekanizmaları ve hangi koşullardan etkilendiğinin iyi tespit edilmesi ve bu koşullara uygun önlemlerin alınması gereklidir. Çalışmamızda da görüldüğü gibi ortamda güçlü virülans özelliklerine sahip farklı cins mikroorganizmalar bulunuyorsa onların bu karışımlar içerisinde öne çıkarak baskın hâle gelebileceğine dikkat edilmelidir. Bu durumda sorumlu organizmalar arasından antibiyotik direncinin yanı sıra biyofilm oluşturma gibi virülans özellikleri de dikkate alınarak tedavi planlanması doğru bir yaklaşım olacaktır.

Doğal ortama benzer bir model oluşturmak amacıyla birden fazla Gram-negatif bakteri cinsi ile oluş-

turulan kültürler üzerine CIP'nin etkinliğinin test edildiği bu çalışmada, özellikle hastanede, yoğun bakım ünitelerinde biyofilm oluşturma yetenekleriyle öne çıkarak büyük sorunlara neden olan mikroorganizmalara karşı çözüm üretmeye yönelik önemli ön verilere ulaşılmıştır. Hastalar için uzun süren, masraflı ve zor bir süreç neden olan biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi konusunda yapılacak benzer ve ileri çalışmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

## Finansal Kaynak

Bu araştırma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje no: TLP-2019-21368) desteklenmiştir.

## Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

## Yazar Katkıları

**Fikir/Kavram:** Fethiye Ferda Yılmaz, Hadil Bitar; **Tasarım:** Fethiye Ferda Yılmaz; **Denetleme/Danışmanlık:** Fethiye Ferda Yılmaz; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Hadil Bitar; **Analiz ve/veya Yorum:** Fethiye Ferda Yılmaz, Hadil Bitar; **Kaynak Taraması:** Fethiye Ferda Yılmaz, Hadil Bitar; **Makalenin Yazımı:** Fethiye Ferda Yılmaz, Hadil Bitar; **Eleştirel İnceleme:** Fethiye Ferda Yılmaz; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Fethiye Ferda Yılmaz; **Malzemeler:** Fethiye Ferda Yılmaz.

## KAYNAKLAR

- Beğendik F. Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyolojide biyofilm [Biofilms in infectious diseases and clinical microbiology]. *Flora*. 2003;8(4):271-7. [Link]
- Kam Hepdeniz Ö, Seçkin Ö. Dinamik mikrobiyal bir yaşam: oral biyofilm [A dynamics microbial life: oral biofilm]. *Süleyman Demirel Üni SBE Derg*. 2017;8(3):47-55. [Crossref]
- Gün İ, Ekinci FY. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam [Biofilms: microbial life on surfaces]. *Gıda*. 2009;34(3):165-73. [Link]
- Temel A, Erač B. Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü [Bacterial biofilms: detection methods and role in antibiotic resistance]. *TMC Derg*. 2018;48(1):1-13. [Link]
- Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST, 2020, Version 10.0. (Cited: 20.02.2020) [Link]
- Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST, 2020, Version 10.0. (Cited: 20.02.2020) [Link]
- Passerini de Rossi B, Garcia C, Calenda M, Vay C, Franco M. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin on biofilms and planktonic cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(3):260-4. [Crossref] [PubMed]
- Zhuo C, Zhao QY, Xiao SN. The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One*. 2014;9(10):e108409. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Gülşay Z. Kinolonlarda direnç problemi [Resistance problem in quinolones]. *ANKEM Derg*. 2002;16(3):232-7. [Link]
- Thet NT, Wallace L, Wibaux A, Boote N, Jenkins ATA. Development of a mixed-species biofilm model and its virulence implications in device related infections. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019;107(1):129-37. [Crossref] [PubMed]
- Ceyhan Güvenses N, Ekmekcioğlu S. Biyofilm kontrolünde biyositler ve etki tarzları [Biocides and their mode of action in biofilm control]. *Elektronik Mikrobiyol Derg TR*. 2016;14(1):1-19. [Link]

12. Onbaşı D, Yuvalı Çelik G, Ökçesiz A. Mikrobiyal biyofilmlere karşı yeni antibiyofilm stratejileri ve nanoteknolojik yaklaşımlar [New antibiofilm strategies and nanotechnological approaches against microbial biofilms]. *J Health Sci.* 2017;26(3):262-6. [\[Link\]](#)
13. Nirwati H, Sinanjung K, Fahrurrisa F, Wijaya F, Napitupulu S, Hati VP, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proc.* 2019;13(Suppl 11):20. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
14. Qu Y, Locock K, Verma-Gaur J, Hay ID, Meagher L, Traven A. Searching for new strategies against polymicrobial biofilm infections: guanlylated polymethacrylates kill mixed fungal/bacterial biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):413-21. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Dean SN, Walsh C, Goodman H, van Hoek ML. Analysis of mixed biofilm (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Biofouling.* 2015;31(2):151-61. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Cendra MDM, Blanco-Cabra N, Pedraz L, Torrents E. Optimal environmental and culture conditions allow the in vitro coexistence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in stable biofilms. *Sci Rep.* 2019;9(1):16284. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
17. Booth SC, Rice SA. Influence of interspecies interactions on the spatial organization of dual species bacterial communities. *Biofilm.* 2020;2:100035. [\[Crossref\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PMC\]](#)
18. Öztürk ŞB, Ertuğrul MB, Çörekli E. Diyabetik ayak enfeksiyonlarında etken bakteriler ve biyofilm oluşturma oranları [Bacterial agents in diabetic foot infections and their biofilm formation rates]. *TMC Derg.* 2017;47(1):33-8. [\[Link\]](#)