

Vajinal Floradan İzole Edilen *Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması

Investigation of Antibiofilm Activities of *Lactobacillus* sp. Metabolites Isolated from Vaginal Flora

Müjde Eryılmaz*[✉], Didem Kart**[✉], Suna Sibel Gürpınar*[✉]

*Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

**Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Öz

Amaç: Bu çalışmada, vajinal kültürlerden izole edilen *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki antibiyofilm aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada, önceden 16S rRNA dizi analizi ile identifikasyonları yapılmış olan 20 adet *Lactobacillus* sp. izolatu kullanılmıştır. İzolatların metabolitlerinin antibiyofilm aktiviteleri *P. aeruginosa* üzerine mikropalak temelli antibiyofilm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak steril De Man-Rogosa Sharpe Broth besiyeri kullanılmıştır.

Bulgular: Test edilen metabolitlerin tamamı *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı antibiyofilm aktivite göstermiştir. Metabolitler arasında fark olmakla birlikte, biyofilm hücre sayısında en az 4 logaritma (kob/ml) azalış saptanmıştır. En iyi antibiyofilm aktivite *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus jensenii* metabolitleri için saptanmış olup, bunlar *P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinin tamamını yok edebilmiştir.

Sonuç: Patojen bakterilerin planktonik formlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, biyofilm içindeki bakterilerin eradikasyonunda çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Vajinal *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin göstermiş olduğu iyi antibiyofilm aktivite, bu metabolitlerin biyofilm ilişkili enfeksiyonlar ile mücadelede alternatif ajanlar olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus* sp., metabolit, antibiyofilm aktivite

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the antibiofilm activities of metabolites produced by vaginal *Lactobacillus* sp. against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.

Method: In this study, 20 *Lactobacillus* sp. isolates which were previously identified by 16S rRNA gene sequence analysis were used. Antibiofilm activity of the metabolites of the isolates was determined by using microplate-based antibiofilm method on *P. aeruginosa*. De Man-Rogosa Sharpe Broth was used as negative control.

Results: All tested metabolites showed statistically significant antibiofilm activity on *P. aeruginosa* biofilms. Although there were differences between the metabolites, the number of biofilm cells decreased at least 4 logarithms (cfu/ml). The best antibiofilm activity was determined for *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus jensenii* metabolites that destroyed all *P. aeruginosa* biofilm cells.

Conclusion: Antibiotics commonly used in the treatment of planktonic forms of pathogenic bacteria are often insufficient for the eradication of bacteria in the biofilm. Good antibiofilm activity demonstrated by vaginal *Lactobacillus* sp. metabolites suggests that these metabolites can be used as alternative agents to help combat against biofilm-associated infections.

Keywords: *Lactobacillus* sp., metabolite, antibiofilm activity

Alındığı tarih:

16.07.2019

Kabul tarihi:

15.08.2019

Yayın tarihi:

30.09.2019

ORCID Kayıtları

M. Eryılmaz 0000-0003-3760-1996

D. Kart 0000-0001-7119-5763

S. S. Gürpınar 0000-0003-4244-0920

✉ meryilmaz@ankara.edu.tr

GİRİŞ

Biyofilmler, canlı ya da cansız yüzeylere ve birbirlerine tutunabilen, ekstraselüler polimerik yapıdaki matris içine gömülü hücrelerden oluşan sesil mikroorganizma topluluklarıdır. Bu topluluk içinde yer alan mikroorganizmalar üreme, gen ekspresyonu ve protein üretimi açısından farklı fenotipik özellikler gösterebilirler. Biyofilm içinde yaşayan mikroorganizmanın, üretmiş olduğu polimerik yapılar sayesinde etrafı çevrelenir ve kendini bir matris içine gömerek planktonik formlara kıyasla olumsuz birçok koşul karşısında avantaj sağlar. Örneğin, konak immün sistemi ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidir, bu da biyofilm ilişkili enfeksiyonların eradikasyonunu zorlaştırmaktadır⁽¹⁻⁵⁾.

Biyofilm, ilk kez Antonie Van Leeuwenhoek tarafından 17. yüzyılda dişinde oluşan plakta gösterilmiş ve animalcules olarak adlandırılmıştır. Günümüzde özellikle kateterler, implantlar, yapay kalp kapakçıkları, eklem replasmanları, kontakt lensler gibi cansız yüzeylerde görülmekte ve tedavisi güç enfeksiyonlara yol açarak morbidite ve mortalite oranlarında artışa neden olmaktadır^(2,4).

Pseudomonas aeruginosa, doğada yaygın olarak bulunan, özellikle immünsupresif hastalarda pnömoni, bakteriyemi, menenjit, beyin apsesi, endokardit, septik artrit, osteomyelit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi klinik tablolara neden olan non-fermentatif Gram negatif bir basildir. Özellikle biyofilm ilişkili hastane enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilmekte ve tedavisinde sorun yaşanmaktadır. Araştırmacılar, biyofilm oluşumunun hastane enfeksiyonlarının ortaya çıkışındaki etkin rolleri ve antimikrobiyallerle kontrol altına alınmalarında yaşanan zorluklar nedeniyle alternatif antibiyofilm ajanları araştırmaya yönelmişlerdir⁽⁶⁾. Özellikle hastanelerde ciddi sorun oluşturan *P. aeruginosa* biyofilmlerinin yok edilmesi için acilen yeni antibiyofilm etkili maddelere gereksinim duyulmaktadır.

Laktobasiller insanlarda normal flora üyesi olarak ağızda, vajinada ve bağırsaklarda bulunurlar⁽⁷⁾. Ürettikleri laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi metabolitler ve antagonizma etkileri sayesinde bu bölgelerde koruyucu olarak görev yaparlar^(8,9). Menopoz öncesi sağlıklı kadınlarda vajinada dominant olarak bulunarak patojen mikroorganizmaların kolonize olmasına engel olurlar⁽¹⁰⁾. Son yıllarda flora üyesi mikroorganizmaların organizma üzerindeki olumlu etkilerini bildiren çalışma sayısı artmış ve hastalıkların tedavisinde alternatif olarak kullanılıp kullanılmayacakları araştırmalara konu olmuştur^(9,11-14).

Bu çalışmanın amacı, vajinal kültürlerden izole edilmiş olan *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerindeki antibiyofilm aktiviteilerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Lactobacillus sp. İzolatlarının İdentifikasyonu: Çalışmada, Mayıs 2016-Mayıs 2017 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan, Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilen vajinal kültürlerden izole edilmiş ve önceden 16S rRNA dizi analizi ile identifikasyonları yapılmış olan 9 adet *Lactobacillus gasseri*, 3 adet *Lactobacillus crispatus*, 3 adet *Lactobacillus jensenii*, 3 adet *Lactobacillus fermentum*, 1 adet *Lactobacillus vaginalis* ve 1 adet *Lactobacillus helveticus* izolatı kullanılmıştır⁽⁹⁾.

Metabolit Eldesi: *Lactobacillus* izolatlarının, Rogosa Agar'daki 24-48 saatlik kültürlerinden 5 ml De Man-Rogosa Sharpe (MRS) Broth (pH 6.5) (Merck, Almanya) besiyeri içeren tüplere ekim yapılmış ve 37 °C'de 72 saat, anaerobik koşullarda inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bakteri hücrelerini uzaklaştırmak için bakteri kültürleri 12.000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş, daha sonra supernatantlar 0.45 µm por çaplı steril membran filtrelerden geçirilmiştir^(9,15).

***Pseudomonas aeruginosa* Biyofilm Oluşumu:**

Pseudomonas aeruginosa PAO1 suşu beyin kalp infüzyon (Brain Heart Infusion, BHI) besiyeri içinde 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür 590 nm'de OD 0.5 olacak şekilde spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve son inokulum konsantrasyonu 10⁶ kob/mL'e ayarlanmıştır. Her bir test koşulu için bu inokulum süspansiyonundan 100'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının 12 çukuru boyunca eklenmiştir. İnoküle edilen plaklar 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra çukurlardaki besiyeri dışarı atılarak her çukura yeniden 100'er µl fosfat tamponu eklenmiş ve tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra, plaklar 20 saat inkübasyona bırakılmış ve olgun biyofilm oluşumları sağlanmıştır⁽¹⁶⁾.

***Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm**

Aktivitelerinin Araştırılması: *Lactobacillus* sp. metabolitlerinden 100'er µl alınarak *P. aeruginosa* olgun biyofilmlerini içeren çukurlara aktarılmış ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril MRS sıvı besiyeri (100 µl) kullanılmıştır. Süre sonunda plaklar 5 dakika vortekslenip sonrasında 5 dakika sonikasyon işlemine 3 defa maruz bırakılarak hücrelerin çukurlardan ayrılması sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra biyofilm hücreleri steril bir tüp içine aktarılmış ve hücrelerin sayımı için Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine ekilmiş, tüm deneyler paralel olarak üç kez yinelenmiştir⁽¹⁶⁾.

İstatistiksel Veri Analizleri: İstatistiksel veri analizleri SPSS programı (Ver.23, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Kontrol ve test gruplarının karşılaştırılmasında Student's t-test yöntemi kullanılmıştır. Gruplar arasında p-değeri <0.05 olarak gözlenen farklılıklar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskop (TEM) Analizi: TEM analizi için *P. aeruginosa* olgun biyofilmleri cam slaytlar üzerinde yukarıda bahsedilen koşullar altında

oluşturulmuş ve %2 gluteraldehit ve 0.1 M kakodilat içeren tampon solüsyonu ile örnekler 30 dakika boyunca fikse edilmiştir. Seri alkol solüsyonlarından geçirilen örnekler oda ısısında kurutulduktan sonra Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak altın-palladyum kaplama işlemine tabi tutulmuş ve elektron mikroskopu ile incelenmiştir⁽¹⁷⁾.

BULGULAR

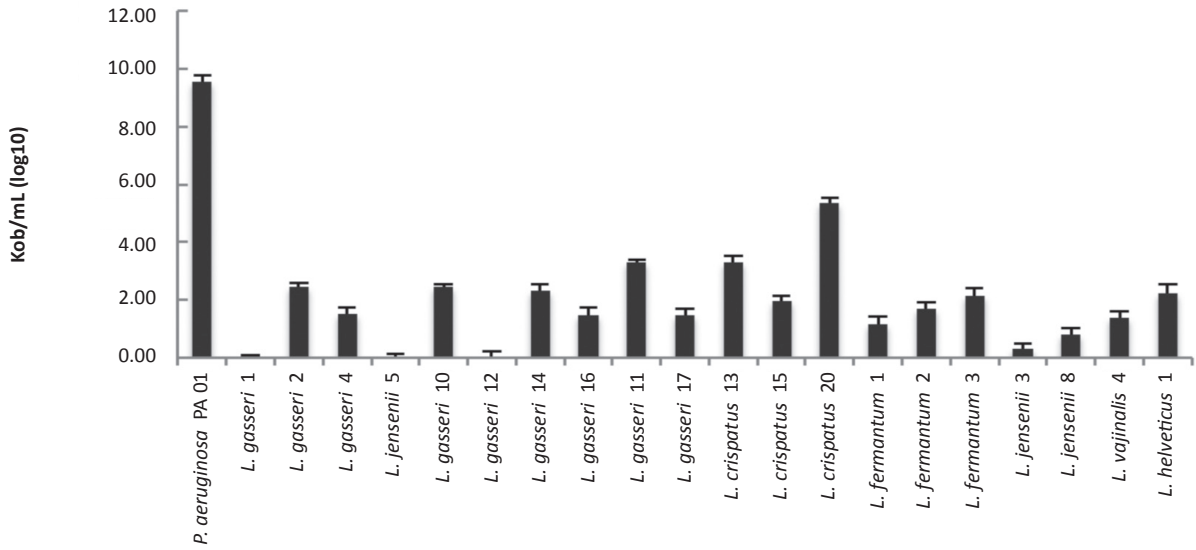
***Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm Aktivite Sonuçları ve Biyofilm Hücrelerinin TEM**

Analizi: *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *P. aeruginosa* biyofilm hücreleri üzerine etkisi mikropalak temelli antibiyofilm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında test edilen izolatların tamamının metabolitleri *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı antibiyofilm aktivite göstermiştir (p<0.05). Metabolitler arasında fark olmakla birlikte, biyofilm hücre sayısında en az 4 logaritma (kob/ml) azalış saptanmıştır. En iyi antibiyofilm aktivite *L. gasseri* ve *L. jensenii* metabolitleri için saptanmış olup, bunlar *P. aeruginosa* biyofilm hücrelerinin tamamını yok edebilmiştir (Grafik 1).

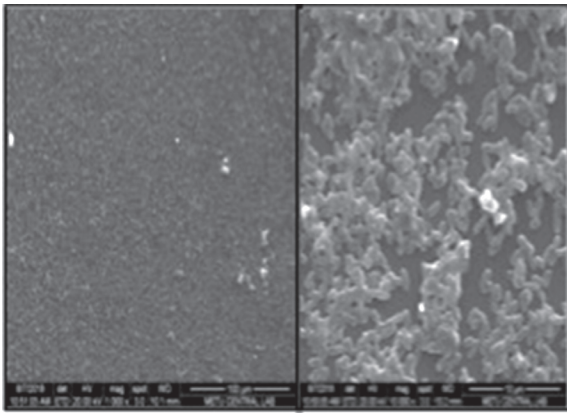
Olgun biyofilm oluşumunun hemen sonrasında taramalı elektron mikroskopu ile biyofilm oluşumu görüntülenmiş ve iki farklı büyütmede de birbirine tutunmuş yoğun biyofilm hücre popülasyonu gözlenmiştir (Resim 1).

TARTIŞMA

Biyofilm içindeki bakteriler, fiziksel ve kimyasal bariyer nedeniyle antimikrobiyal penetrasyonunda azalma, genel stres yanıtı olarak metabolizma ve çoğalma hızında yavaşlama, mikrobiyal heterojenite ve direnç genlerinin aktarımı gibi nedenlerden dolayı antimikrobiyal ajanlara, konakçı immun sistemine ve sıcaklık gibi dış etkenlere karşı planktonik formlara kıyasla daha dirençlidirler. Bu bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların tedavisi oldukça güçtür^(2,18).



Grafik 1. *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm hücreleri üzerindeki antibiyofilm aktivitesi (kob/ml).



Şekil 1. *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm hücrelerinin TEM görüntüsü (x1000 - x10000).

Günümüzde var olan kimyasal ajanlar biyofilmlerle mücadelede yetersiz kalmakta ve bu konuda etkili olabilecek yeni stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Bu açıdan çalışmamız, son yıllarda araştırmacıların oldukça fazla ilgisini çeken flora bakterisi metabolitlerinin antibiyofilm aktivitelerini araştırması açısından önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerinde test edilen tüm *Lactobacillus* metabolitleri, hücre sayılarında yüksek oranda azalma yol açarak istatistiksel olarak anlamlı, oldukça etkin antibiyofilm aktivite göstermiştir. *L. gasseri* ve *L. jensenii* metabolitleri,

P. aeruginosa biyofilm hücrelerinin tamamını yok ederek en iyi antibiyofilm aktiviteyi gösteren izolatlar olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, vajinal ve süt ürünü örneklerinden izole edilmiş *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin *Escherichia coli* üzerindeki antibiyofilm etkisi araştırılmış olup, tüm metabolitlerin antibiyofilm aktivite gösterdikleri görülmüştür. Suşlar arasında farklılıklar olmakla birlikte, vajinal izolatların metabolitlerinin, süt ürünlerinden izole edilen laktobasil metabolitlerine kıyasla daha iyi antibiyofilm etki gösterdikleri bildirilmiştir. En iyi antibiyofilm aktivite gösteren bu vajinal izolatlar, *L. gasseri* ve *L. fermentum* olarak tanımlanmıştır⁽¹⁹⁾. Bir başka çalışmada, Osama ve ark.⁽²⁰⁾ *Lactobacillus rhamnosus* EMCC 1105 ve *L. gasseri* EMCC 1930 suşlarının metabolitlerinin biyofilm ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak en sık karşılaşılan patojenler olan *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibiyofilm etkilerini araştırmış, her iki *Lactobacillus* sp. suşunun metabolitlerinin de üç test bakterisinin biyofilm oluşumunu etkili şekilde inhibe ettiğini görmüşlerdir. *Lactobacillus* sp. metabolitlerinin biyofilm ilişkili enfeksiyonlarla mücadelede umut verici olabileceği bildirilmiştir. Her iki çalışmada da belirtildiği gibi bizim çalışmamızda da en iyi etkiyi gösteren izolatlardan biri *L. gasseri* türüne aittir.

Khiralla ve ark.⁽²¹⁾ çalışmalarında, fermente süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus pentosus* ve *Lactobacillus plantarum* metabolitlerinin *P. aeruginosa* ve *Bacillus cereus* biyofilmlerinin oluşumunu anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. İzolatların kaynağının ev yapımı süt ürünleri olduğu başka bir çalışmada da izole edilen laktobasil metabolitlerinin *Bacillus subtilis* ve *E. coli* K-12 ko-kültürlerinin oluşturduğu biyofilmler üzerindeki aktivitesi araştırılmış ve en iyi antibiyofilm etkiyi *L. plantarum* L32 metabolitinin gösterdiği bildirilmiştir⁽²²⁾.

Shokri ve ark.⁽²³⁾, süt ürünlerinden izole ettikleri *L. fermentum* metabolitlerinin antibiyotik dirençli *P. aeruginosa* suşları üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkili olduklarını göstermişlerdir. Çalışmamızda, *L. fermentum* metabolitlerinin tamamının *P. aeruginosa* biyofilmi üzerinde inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür. Ancak, çalışmada kullanılan *L. fermentum* metabolitlerinin *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal aktivitesi saptanmamıştır⁽⁹⁾. Yapılan çalışmalar laktik asit bakterilerinin antibiyofilm aktivitesinden çeşitli mekanizmaların sorumlu olabileceğini göstermektedir. Bu mekanizmalar, ürettikleri laktik asit ve antimikrobiyal peptidler gibi metabolitlerle bakterilerin çoğalmasını inhibe etmeleri, ürettikleri biyosurfaktanlarla hücre yüzey özelliklerini değiştirerek biyofilm oluşumunda ilk basamak olan bakteriyel tutunmayı zayıflatmaları, hücreler arasındaki agregasyon ve yüzeye tutunma süreçlerini etkileyerek biyofilm bütünlüğünün bozulmasına neden olmaları olarak sıralanabilir. Bunun yanı sıra laktik asit bakterileri tarafından salınan ekzopolisakaritler ve hücre yüzeylerinin fizikokimyasal özellikleri de bu etkiden sorumlu tutulabilir. Antibiyofilm etkide rol oynayan bu mekanizmalar izolata bağlı olarak farklılıklar gösterebilir⁽²⁰⁾.

Farklı kadınların gebelik, cinsel olarak aktif olma, menstürasyon, sigara kullanımı, yaş, temizlik alışkanlıkları ve antimikrobiyal ajan kullanımları gibi durumları göz önüne alındığında vajinal floralarının farklı olabileceği ve florada bulunan mikroorganizmaların ortam koşullarından etkilenecek farklı metabolit içe-

riğine sahip olabileceği bilinmektedir⁽¹⁵⁾. Bu durum sonucunda ortaya çıkabilecek değişik metabolit içeriğinin, *Lactobacillus* türlerinin farklı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sergilemelerine neden olabileceği düşünülebilir.

Yapılan çalışmalar, *Lactobacillus* türlerinin *P. aeruginosa* kaynaklı biyofilmlerle mücadelede günümüzde kullanılan antibiyotikler veya biyositler gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara alternatif olarak kullanılabilir veya bu ajanlar ile kombine kullanılabilir doğal antibiyofilm ajanları olabileceklerini düşündürmektedir. Çoklu ilaç dirençli patojenlere karşı *Lactobacillus* türleri gibi biyolojik kökenli kontrol ajanlarının belirlenmesi, ilaç direnci ile mücadele açısından da oldukça önem taşımaktadır. Bu açıdan daha geniş örnek aralığına sahip çalışmalar planlanarak iyi antimikrobiyal ve antibiyofilm etki gösteren izolatların eldesi sağlanmalı ve tedavide alternatif olarak kullanılabilir yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesi amaçlanmalıdır.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 17H0237011) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(3):e02508-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-16>
2. Beğendik F. Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyolojide biyofilm. *Flora.* 2003;8(4):271-7.
3. Corte L, Pierantoni DC, Tascini C, Roscini L, Cardinali G. Biofilm specific activity: A measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms.* 2019;7(3):73. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030073>
4. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2018;48(1):1-13. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2018.001>
5. Willke Topçu A. Biyofilm nedir? In: Sakarya S (ed.) "Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları" kitabında. Türkiye: Ankara, 2018:1-3.
6. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for

- combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018;9(1):522-54.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
7. Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(12):1-6.
<https://doi.org/10.5812/jjm.27852>
 8. Kılıç E, Aslım B. Laktik asit bakterilerinin vajen florasındaki önemi ve probiyotik olarak kullanımı. *OrLab On-line Mikrobiyoloji Dergisi*. 2003;1(2):70-82.
 9. Eryılmaz M, Gürpınar SS, Palabıyık IM, Guriz H, Gerçeker D. Molecular identification and antimicrobial activity of vaginal *Lactobacillus* sp. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(15):1241-7.
<https://doi.org/10.2174/1389201020666190110164123>
 10. Kovachev S. Defence factors of vaginal lactobacilli. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44:31-9.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1306688>
 11. Bashiardes S, Tuganbaev T, Federici S, Elinav E. The microbiome in anti-cancer therapy. *Semin Immunol*. 2017;32:74-81.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.04.001>
 12. Dimitonova SP, Danova ST, Serkedjieva JP, Bakalov BV. Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women. *Anaerobe*. 2007;13:178-84.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.08.003>
 13. Gopalakrishnan V, Helmink BA, Spencer CN, Reuben A, Wargo JA. The influence of the gut microbiome on cancer, immunity, and cancer immunotherapy. *Cancer Cell*. 2018;33(4):570-80.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.015>
 14. Sgibnev AV, Kremleva EA. Vaginal protection by H₂O₂-producing *Lactobacilli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(10):e22913.
<https://doi.org/10.5812/jjm.22913>
 15. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*. 2014;196(9):645-53.
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-1003-1>
 16. Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis H.J, Coenye T, Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Biofouling*. 2014;30(3): 377-83.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2013.878333>
 17. Wang L, Dong M, Zheng J, et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod*. 2011;37(5):631-6.
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.006>
 18. Hançer Aydemir D. Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri. *Turk J Life Sci*. 2018;3(1):218-30.
 19. Vacheva A, Georgieva R, Danova S, et al. Modulation of *Escherichia coli* biofilm growth by cell-free spent cultures from lactobacilli. *Cent Eur J Biol*. 2012;7(2): 219-29.
<https://doi.org/10.2478/s11535-012-0004-9>
 20. Osama DM, Elkhatib WF, Tawfeik AM, Aboulwafa MM, Abdel-Haleem Hassouna N. Antimicrobial, antibiofilm and immunomodulatory activities of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* against some bacterial pathogens. *Int J Biotechnol Wellness Ind*. 2017;6(1):12-21.
<https://doi.org/10.6000/1927-3037.2017.06.01.2>
 21. Khiralla GM, Mohamed EAH, Farag AG, Elhariry H. Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens. *J Biotech Res*. 2015;6:86-95.
 22. Ganchev I. Antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains. *Sci J Chem*. 2018;6(5):77-82.
<https://doi.org/10.11648/j.sjc.20180605.11>
 23. Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M et al. The inhibition effect of *Lactobacilli* against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017;10(1):34-42.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9267-9>