

Gram Negatif Bakterilerin ve Steril Süpernatantlarının *Candida albicans* Biyofilmi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Comparison of the Effects of Gram- Negative Bacteria and Their Sterile Supernatants on *Candida albicans* Biofilm

Mayram Hacıoğlu[®], Özlem Oyardı[®]

İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Atif/Cite as: Hacıoğlu M ve Oyardı Ö. Gram negatif bakterilerin ve steril süpernatantlarının *Candida albicans* biyofilmi üzerine etkilerinin karşılaştırılması, Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(2):163-71.

Öz

Amaç: Çeşitli bakteriler ve/veya mantarların bir arada bulunarak oluşturduğu polimikrobiyal biyofilmler, çoğu zaman bu türlerin tek başlarına oluşturdukları monomikrobiyal biyofilmlerden çok daha dirençlidirler. Bu çalışmada, *Candida albicans* biyofilmlerinin *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* veya *Pseudomonas aeruginosa*'nın veya bu bakterilerin süpernatantlarının varlığında nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: *C. albicans* SC 5314, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 ve *P. aeruginosa* PA01 kontrol kökenleri kullanılarak *C. albicans* ile Gram negatif polimikrobiyal biyofilmleri steril mikropatlarda oluşturulmuştur. Hem Gram negatif bakterilerin varlığında hem de steril süpernatantlarının varlığında biyofilm içerisinde değişen *C. albicans* sayısı saptanmıştır.

Bulgular: Sonuçlarımıza göre, çalışılan Gram-negatif bakterilerin tümü biyofilm içerisindeki *C. albicans* hücrelerine antagonist etki göstermiş ve kontrole göre yaklaşık üç log'luk azalma görülmüştür. Steril süpernatantların da *C. albicans* biyofilmi üzerine inhibitör etki gösterdikleri ve maya sayısını en az bir log azalttığı belirlenmiştir. MTT testi ve floresan mikroskopu ile elde edilen görüntüler de bu sonuçları doğrulamıştır.

Sonuç: Pek çok enfeksiyonda ortaya çıkabilen *C. albicans*-Gram negatif polimikrobiyal biyofilmlerde, bakteriler hem hücreleri ile hem de steril hücresiz süpernatantları ile *C. albicans* biyofilm hücrelerini antagonist olarak etkilemiştir.

Anahtar kelimeler: Polimikrobiyal biyofilm, süpernatant, *Candida albicans*

ABSTRACT

Objective: Polymicrobial biofilms consisting of a combination of various bacteria and/or fungi are generally much more resistant than monomicrobial biofilms formed by these species alone. In this study, it was aimed to investigate how *Candida albicans* biofilms were affected in the presence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa* or supernatants of these bacteria.

Method: *C. albicans* with Gram-negative polymicrobial biofilms were formed on sterile microplates by using control strains of *C. albicans* SC 5314, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 and *P. aeruginosa* PA01. The number of *C. albicans* in biofilms was determined in the presence of both Gram-negative bacteria and sterile supernatants.

Results: According to our results, all Gram negative bacteria displayed an antagonist effect against *C. albicans* in the biofilm and a three log decrease was observed compared to the control. Sterile supernatants were shown to have an inhibitory effect on the *C. albicans* biofilms and reduce the number of yeasts by at least one log. MTT assay and fluorescence microscopy images also confirmed the results.

Conclusion: In *C. albicans*-Gram-negative polymicrobial biofilms that can occur in many infections, bacteria affected *C. albicans* biofilm cells as antagonist agents, both with their cells and sterile cell-free supernatants.

Keywords: Polymicrobial biofilm, supernatant, *Candida albicans*

Alındığı tarih / Received:
20.07.2020 / 20.July.2020

Kabul tarihi / Accepted:
24.02.2021 / 24.February.2021

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2021 / 01.June.2021

ORCID Kayıtları

M. Hacıoğlu 0000-0003-0823-631X
Ö. Oyardı 0000-0001-9992-7225

✉ mayram.tuysuz@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Biyofilm, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışarak oluşturdukları topluluklar olarak tanımlanır ve insanlarda ortaya çıkan enfeksiyonların yaklaşık %65-80'i biyofilm ile ilişkilidir^(1,2). Biyofilmlerde antimikrobiyal maddelere karşı görülen direnç, genellikle antimikrobiyal maddenin biyofilm içine kısıtlı penetrasyonu, çeşitli direnç genlerinin ekspresyonu ve hücrelerin değişen üreme ve metabolik aktiviteleri gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, biyofilm içerisindeki hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelere göre yaklaşık 1.000 kat daha dirençli olabilmektedir^(3,4).

Normal flora elemanları olan *Candida* türleri, yüzeyel enfeksiyonların yanı sıra ciddi sistemik enfeksiyonlar ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar oluşturabilen fırsatçı mikroorganizmalardır. Biyofilm üretimi hem *Candida albicans* hem de non-albicans *Candida*'lar için en önemli virülans faktörlerinden biridir ve antifungal direnç ile de ilişkilidir⁽⁵⁾. Hem ülkemizde hem de dünyada yapılan çalışmalarda non-albicans *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun *C. albicans*'a göre daha fazla olduğu gösterilmiştir⁽⁶⁻⁸⁾. Ancak, nozokomiyal kan enfeksiyonları arasında dördüncü sırada yer alan kandidemiler de dâhil olmak üzere günümüzde tüm kandidozlarda hala en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır⁽⁹⁾. *C. albicans* biyofilmleri, maya hücreleri, yalancı hif ve gerçek hifler tarafından oluşturulmuş hücre dışı polimerik matriksten meydana gelen karmaşık bir sistemdir. *C. albicans* biyofilmleri oluşurken, biyofilm içerisindeki maya hücrelerinin yanı sıra psödohif ve hif oluşumu yani filamentasyonda da artış gözlenir⁽¹⁰⁾. Non-albicans *Candida* türlerinin çoğu ise bu filamentasyon kabiliyetinden yoksundur ve tamamı maya hücrelerinden meydana gelen topluluklar oluşturur. Ancak, tüm *Candida* türleri tarafından oluşturulan biyofilmler, hücre dışı polimerik matriksten meydana gelmektedirler^(11,12). Hem yapışmayı sağlayan hem de antifungal ve konak savunmalarına karşı dirence neden olan bu hücre dışı polimerik matriks, protein (%55), karbonhidrat (%25), lipid (%15) ve DNA (%5)'dan meydana gelmektedir⁽¹⁰⁾.

Çeşitli bakteriler ve/veya mantarların bir arada bulunarak oluşturduğu polimikrobiyal biyofilmler ise çoğu zaman bu türlerin tek başlarına oluşturdukları monomikrobiyal biyofilmlerden çok daha dirençlidirler. Polimikrobiyal biyofilmler, mikrobiyal ya da konak kaynaklı polisakaritlerden oluşan matriks içerisine gömülü, virüs, bakteri, mantar veya parazit gibi çeşitli mikroorganizmaların bir arada bulunması ile meydana gelen karmaşık hücre topluluklarıdır ve zaman zaman hastane enfeksiyonları etkenlerinin de içinde bulunduğu dirençli mikroorganizmalar da polimikrobiyal biyofilmlere katılabilmektedirler^(5,13,14). Yapılan çalışmalar, birden fazla mikroorganizma tarafından oluşturulan bu polimikrobiyal biyofilmlerdeki mantarların antibakteriyel ilaçların aktivitesini, bakterilerin ise antifungal ilaçların aktivitesini değiştirebildiklerini göstermiştir⁽¹⁵⁾. Bakteriler ve *C. albicans*'ın aynı habitat içerisinde yaşamaları mutualistik, sinerjistik veya antogonistik etki yaratabilmektedir^(16,17).

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* antimikrobiyal ajanlara geliştirdikleri direnç nedeniyle; pnömoni, sistemik enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, menenjit veya nozokomiyal enfeksiyonlar gibi tedavisi oldukça güç enfeksiyonlara neden olabilen Gram negatif çomaklardır⁽¹⁸⁾. Oluşturdukları biyofilmler ile kistik fibrozis enfeksiyonlarına veya kontakt lens, üriner ve santral venöz kateterler, endotrakeal tüpler gibi yabancı cisimlere yapışarak hayati öneme sahip enfeksiyonlara neden olabilirler⁽¹⁹⁾. Bu bakteriler aynı zamanda kateter gibi yabancı cisimler üzerinde ve gastrointestinal sistem, peritonit, kistik fibrozis ve yanık ve yaralarda *C. albicans* ile polimikrobiyal biyofilmler de oluşturabilirler⁽¹⁴⁾.

Nozokomiyal *C. albicans* enfeksiyonlarının %26-57'sini oluşturan ve polimikrobiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında da %70'in üzerinde tedavi başarısızlığına neden olabilen fungal/bakteriyel polimikrobiyal biyofilmlerine karşı antimikrobiyal ajanların çoğu zaman etkisiz kalabildikleri gösterilmiştir^(5,14,20). Ancak buna rağmen yapılan literatür araştırmasına göre bu polimikrobiyal biyofilmler ile ilgili yapılan çalışmaların monomikrobiyal biyofilm çalışmalarına göre daha az oldukları görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamızda,

C. albicans + *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* veya *P. aeruginosa*'nın varlığında oluşturulan fungal/bakteriyel polimikrobiyal biyofilmlerin etkileşimleri, dolayısıyla bakterilerin veya yalnızca hücresiz süpernatantların *C. albicans* biyofilmi üzerine etkilerinin karşılaştırılarak değerlendirilmesi ve bu polimikrobiyal biyofilmler içerisindeki farklı türler arasında olan etkileşimlerin anlaşılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, *C. albicans* SC 5314, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606 ve *P. aeruginosa* PA01 kontrol kökenleri kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumu: Bir gecelik taze maya ve bakteri kültürleri, sırasıyla yeast nitrogen base broth (YNB-Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, ABD) ve tryptic soy broth (TSB, Difco Sparks, MD, ABD) besiyerleri içinde 37°C'de bir gece yatay çalkalayıcıda (75 rpm) inkübe edilmiştir. Kültürler steril fosfat tamponunda iki kez yıkanmış (3.000 rpm, 5-10 dakika), spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve %0.2 glukoz içeren TSB (TSB-g) içerisinde son inokulum konsantrasyonu 1×10^7 koloni oluşturan birim (kob)/ml'ye ayarlanmıştır. *C. albicans* ve Gram negatif bakteriler 1:1 oranında dış ortamda karıştırılarak polimikrobiyal süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyonlardan 100'er µl alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarına eklenmiş ve polimikrobiyal biyofilmler (*C. albicans* + *E. coli*, *K. pneumoniae* *A. baumannii* veya *P. aeruginosa*) oluşturulmuştur. Yalnızca *C. albicans* ve sadece bakterilerin bulunduğu kontrol kuyuları da eklenerek plaklar 37°C'de inkübe edilmiştir. Dört saat sonra plaklardaki besiyeri dışarı atılarak her kuyu 100'er µl fosfat tamponu ile yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez yıkanmıştır. Taze besiyeri eklendikten sonra, plaklar 20 saat daha inkübasyona kaldırılmıştır^(21,22).

Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *Candida albicans* sayısının belirlenmesi: Inkübasyon sonrası kuyulardaki besiyeri dışarı atılarak, yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla her kuyu 100'er µl fosfat tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Biyofilm içerisindeki canlı

mikroorganizma sayısını saptamak amacıyla kuyulardaki biyofilmler ikişer kez ultrasonik su banyosu içerisinde sonikasyon (5 dakika) ve mikroplak çalkalayıcı ile vorteks (900 rpm) işlemlerinden geçirilmiştir. Çalkalayıcıda homojenize olan biyofilm solüsyonu steril tüplere aktarılarak fosfat tamponu içerisinde seri dilüsyonları yapılmış ve *C. albicans* sayımı için CHROMagar *Candida* besiyeri kullanılmıştır. 37°C'de bir gece inkübasyon sonrası koloniler sayılarak ve seyreltme faktörü de hesaba katılarak kob/ml sayıları belirlenmiştir. Tüm deneyler üç kez yinelenmiştir^(21,23).

Süpernatantların hazırlanması: Hazırlanışı yukarıda belirtildiği şekilde bakteri biyofilmleri oluşturulmuş ve biyofilm tabakasına dokunmadan üst sıvılar steril tüplere ayrı ayrı toplanmıştır. Tüpler, 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve 0.2 µM'lık enjektör ucu filtre ile süzülerek hücresiz steril süpernatantlar elde edilmiştir⁽²³⁾.

Süpernatantların *Candida. albicans* biyofilmi üzerine etkilerinin belirlenmesi: Gram negatif bakterilerin süpernatantlarından 100'er µl alınarak *C. albicans* biyofilmlerini içeren kuyulara aktarılmış ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası plaklar ikişer kez ultrasonik su banyosu içerisinde sonikasyon (5 dakika k) ve mikroplak çalkalayıcı ile vorteks (900 rpm) işlemlerinden geçirilmiştir. Bu işlemlerden sonra biyofilm solüsyonu steril tüplere aktararak fosfat tamponu içerisinde seri dilüsyonları yapılmış ve hücrelerin sayımı için Triptik Soy Agar (TSA, Difco Sparks) besiyerine ekilmiştir. 37°C'de bir gece inkübasyon sonrası koloniler sayılarak ve seyreltme faktörü de hesaba katılarak kob/ml sayıları belirlenmiştir. Tüm deneyler üç kez yinelenmiştir⁽²³⁾.

MTT yöntemi ile biyofilm içerisindeki mikroorganizma canlılığının belirlenmesi: *C. albicans*'ın bakterilerle veya hücre içermeyen steril bakteriyel süpernatantlarla birlikte 96 kuyulu steril mikroplak içerisinde biyofilmi oluşturulmuştur. Tek başına *C. albicans* içeren kuyular da çalışmaya eklenmiştir. Oluşan biyofilmlerdeki mikroorganizma canlılığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) kolorimetrik yöntemi ile test edilmiştir. MTT yöntemi

mi, canlı mikroorganizmaların redüktazlarının bir tetrazolyum tuzu olan MTT'yi çözünemeyen formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Biyofilm oluşumundan sonra kuyulardaki süspansiyon uzaklaştırılmış ve 0.5 mg/ml MTT solüsyonu içeren taze besiyerinden her bir kuyuya eklenmiştir. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristallerini çözmek için 150 µl DMSO her bir kuyuya eklenmiştir. Optik yoğunluk, mikropalak okuyucu (EON-BioTEK Instruments, Winooski, VT, ABD) kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Yüzde canlılık *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilm ile karşılaştırılarak belirlenmiştir⁽²⁴⁾.

Floresan mikroskopu ile biyofilm kütlesinin analizi: Polimikrobiyal biyofilmlerdeki ve hücre içermeyen steril süpernatantlar ile muamele edilmiş *C. albicans* biyofilmlerindeki canlı/ölü mikroorganizma varlığı, akridin oranj (Invitrogen, Carlsbad, California, ABD) ve propidyum iyodür (Invitrogen, Carlsbad, California, ABD) boyaları kullanılarak floresan mikroskopu ile incelenmiştir. Bir ml fosfat tamponu içerisine 1 µl akridin oranj (5 mg/ml) ve 1 µl propidyum iyodür (3 µg/ml) konularak floresan çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında oluşturulan biyofilm örneklerinin üzerine 200 µl hazırlanan bu floresan solüsyonu eklenmiştir. Mikropalak ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanmış ve oda ısısında 20-30 dakika bekletilmiştir. Kuyular fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla bir kez fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Akridin oranj canlı hücreleri boyayarak yeşil renkli floresan açığa çıkarırken, propidyum iyodür hücre membranları hasar görmüş ölü hücreleri kırmızı renkte boyamaktadır. Böylelikle canlı hücreler yeşil renkli, ölü hücreler ise kırmızı renkli görülmektedir. Biyofilmler, Olympus BX51 floresan mikroskopu, Olympus DP72 kamera ve DP2-TWA1 yazılımı kullanılarak görüntülenmiştir⁽²⁵⁾.

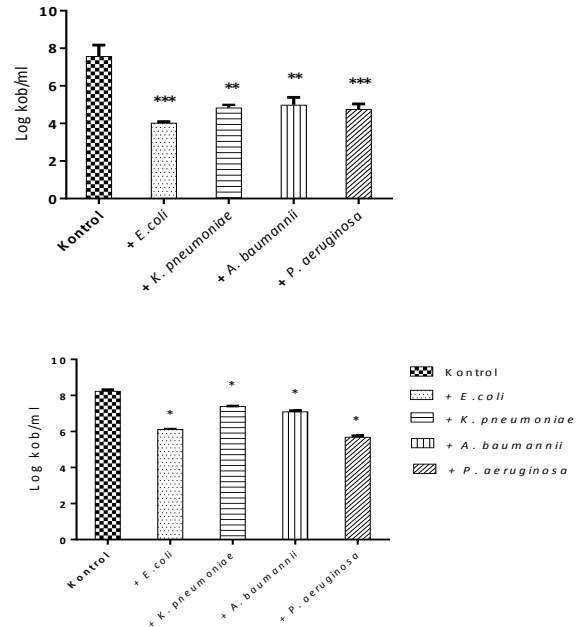
İstatistik: Çalışmada elde edilen veriler, bilgisayar ortamına aktarılarak GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) ile değerlendirilmiştir. Tüm deneyler ayrı ayrı üç kez yinelenip sonuçların ortalaması alınarak standart sapmaları saptanmıştır. One-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve

post-hoc test olarak ise Bonferroni's Multiple Comparison testi kullanılarak *p* değeri <0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

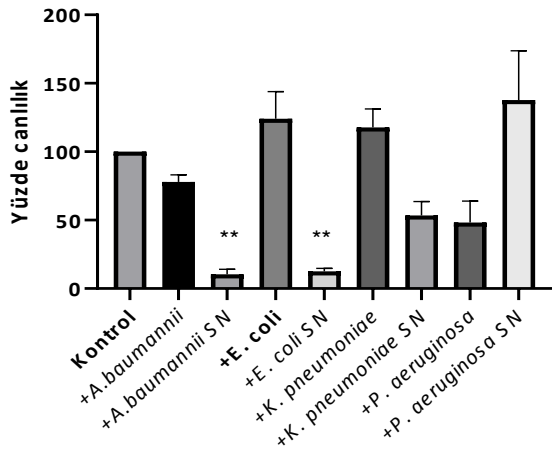
BULGULAR

Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *Candida albicans* sayısı: Gram negatif bakterilerin ve *C. albicans*'ın polimikrobiyal biyofilmleri mikropalalarda oluşturulmuş ve *C. albicans* hücrelerinin sayısı koloni sayımı ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, çalışılan tüm Gram negatif bakteriler *C. albicans* biyofilmlerini antagonist etkilemiş ve kontrole göre hücre sayılarında yaklaşık 3 log'luk düşüş gözlenmiştir (Şekil 1a).

Süpernatantların *Candida albicans* biyofilmi üzerine etkileri: Olgun *C. albicans* biyofilm hücrelerine Gram negatif bakterilerin steril süpernatantları eklendikten sonra maya hücrelerinin sayısı koloni sayımı ile tespit edilmiştir. *E. coli* ve *P. aeruginosa* süpernatantlarının *C. albicans* biyofilm hücrelerinin sayısını 2 log'dan daha fazla, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* süpernatantlarının ise yaklaşık 1 log azalttığı saptanmıştır (Şekil 1b).



Şekil 1. Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *C. albicans* sayısı. a) *C. albicans*'ın Gram negatif bakterilerle bir arada bulunduğu biyofilmlerdeki sayısı b) *C. albicans*'ın steril süpernatantlar ile bir arada bulunduğu biyofilmlerdeki sayısı *İstatistiksel olarak anlamlı (*p* değeri < 0.05).



Şekil 2. *Candida albicans*'ın tek başına (kontrol), bakteriler ve hücre içermeyen steril süpernatantlarla birlikte oluşturduğu biyofilm canlılık yüzdesi ** İstatistiksel olarak anlamlı (p değeri < 0.05). SN: süpernatant

Biyofilmlerdeki mikroorganizma canlılığı: Gram negatif bakterilerin *C. albicans* ile oluşturduğu biyofilmdeki canlı hücre yüzdesi *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilmdeki canlı hücre yüzdesinden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Bakteriye süpernatantların *C. albicans* biyofilm oluşumuna olan etkileri incelendiğinde, özellikle *E. coli* ve *A. baumannii* süpernatantlarının *C. albicans* biyofilm oluşumunu ciddi oranlarda inhibe ettiği görülmektedir. *K. pneumoniae* süpernatantı ise *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilme göre yaklaşık %50 daha az biyofilm oluşumuna neden olmuştur. Diğer bakterilerden farklı olarak *P. aeruginosa*, *C. albicans*'ın biyofilm oluşumunu hücre içermeyen süpernatantın daha yüksek oranda inhibe etmiştir.

Floresan mikroskopu görüntüleri: Polimikrobiyal biyofilmlerdeki *C. albicans* kütlelerinin azlığı, buna karşın bakteriyel popülasyonun daha fazla olduğu floresan mikroskopu görüntüleri ile gösterilmiştir. *C. albicans* biyofilmleri hücre içermeyen steril süpernatantlarla muamele edildikten sonra, akridin oranj ve propidyum iyodür ile boyandığında, canlı hücreler yeşil renkte, ölü hücreler ise kırmızı renkte boyanmıştır.

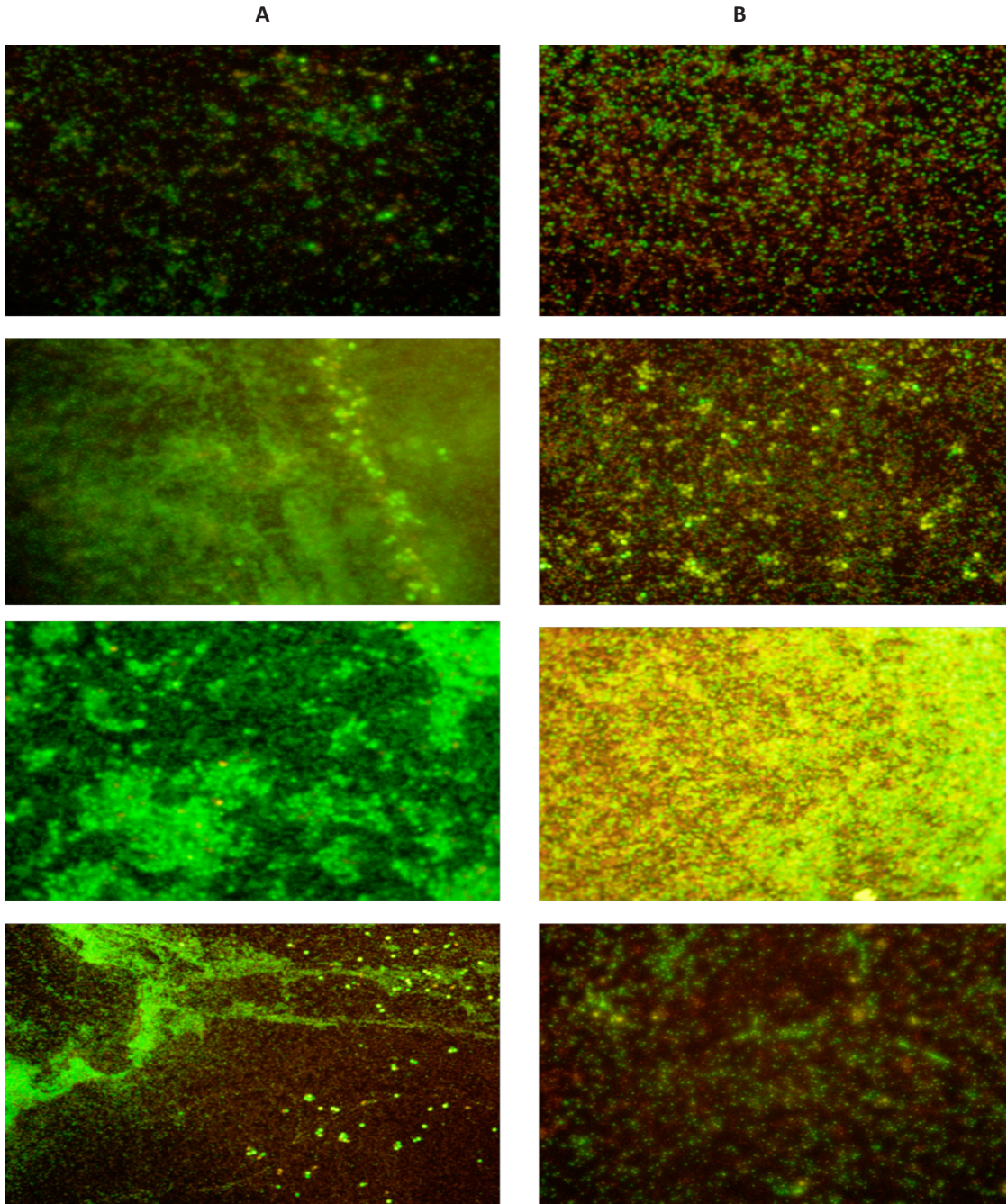
TARTIŞMA

İnvaziv mantar enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıra-

da yer alan *Candida* türleri, nozokomiyal kan dolaşımını enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilebilmektedir ve tüm nozokomiyal patojenler arasında da en yüksek mortalite oranına (yaklaşık %47) sahip olan mikroorganizmalardır⁽²⁶⁾. Mikroorganizmaların birbirlerine veya kalıcı vasküler kateterler gibi tıbbi cihazlara yapışarak oluşturdukları biyofilmler içerisindeki mantar hücreleri, antifungal tedavilere direnç gösterdikleri gibi konak savunmasını da bozabilirler. Bu biyofilmler zaman zaman heterojen bir yapı göstererek bakterilerle birlikte polimikrobiyal biyofilmler şeklinde de oluşabilmektedir⁽⁵⁾.

Bu amaçla çalışmamızda, kistik fibrozis başta olmak üzere çeşitli sistemik enfeksiyonlar, vajinal enfeksiyonlar, oral enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar, deri ve yara enfeksiyonlarında polimikrobiyal biyofilmler oluşturabilen *C. albicans* ve *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* veya *P. aeruginosa* bakterilerinin birlikte oluşturdukları biyofilmler incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre, çalışılan Gram negatif bakterilerin tümü biyofilm içerisindeki *C. albicans* hücrelerini istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) şekilde inhibe etmiş ve antagonist etki göstermiştir. En yüksek antagonist etkiye neden olan bakteri *E. coli* olarak belirlenmiştir. *E. coli*- *C. albicans* polimikrobiyal biyofilmlerindeki *C. albicans* sayısı kontrol grubuna göre üç log azalma göstermiştir. Diğer Gram negatif bakteriler de benzer şekilde *C. albicans*'ın polimikrobiyal biyofilmlerdeki varlığını yaklaşık iki log azaltmışlardır. Gram negatif bakterilerin *C. albicans* biyofilm oluşumu üzerine antagonist etkileri olması ve polimikrobiyal biyofilmlerdeki *C. albicans* sayısını azaltmalarına rağmen, MTT sonuçlarına göre tüm polimikrobiyal biyofilmlerdeki toplam canlı hücre sayısı istatistiksel olarak azalmamıştır. Floresan mikroskopu görüntüleri de polimikrobiyal biyofilmlerdeki Gram negatif bakteri varlığının fazlalığını doğrulamaktadır.

Candida albicans Gram negatif bakterilerle birlikte değil, Gram negatif bakterilerin biyofilmlerinden elde edilen hücresiz süpernatantlar ile birlikte inkübe edildiğinde ise biyofilmdeki *C. albicans* sayısı daha az etkilenmiştir. Gram negatif hücrelerin varlığı *C. albicans*'ın biyofilm içerisinde tutunmasını yüksek



Şekil 3. Floresan görüntüleri. A: Polimikrobiyal biyofilmler B: Bakteriye süpernatantların *C. albicans* üzerine etkileri. Görüntüler sırası ile; *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*. AO/PI kullanılarak canlı hücreler yeşil ve ölü hücrelerde kırmızı ile boyanmıştır (büyütme $\times 40$, ölçü = 20 μm).

oranda etkilerken, bu etkinin bir kısmından Gram negatif bakterilerin biyofilm ortamına salgıladıkları maddelerin, bir kısmından ise bakteri hücrelerinin fiziksel varlığının sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Çalışılan tüm bakterilerin süpernatantları, *C. albicans*'ın tek başına oluşturduğu biyofilme göre

biyofilm içerisindeki *C. albicans* sayısını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır. En fazla inhibitör etki gösteren süpernatantlar *E. coli* ve *P. aeruginosa* süpernatantları olarak belirlenmişlerdir (iki log azaltma). *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* süpernatantları ise yaklaşık bir log'luk azalmaya neden olmuşlardır.

Süpernatantların gözlenen etkileri, *C. albicans*'ın katı yüzeylere yapışmasının veya biyofilm oluşumu ve gelişiminin hasar görmesinin bir sonucu olabileceğini düşündürmüştür.

Koloni sayım sonuçları, MTT sonuçları ile karşılaştırıldığında ise *P. aeruginosa* süpernatantı hariç tüm süpernatantların benzer sonuçlarla *C. albicans*'ın biyofilmdeki canlılık yüzdesini azalttıkları gözlenmiştir. *E. coli* süpernatantı *C. albicans* biyofilmlerindeki canlılık yüzdesini kontrol grubuna kıyasla %12.6'ya kadar düşürmüştür. *C. albicans* biyofilmindeki canlılık yüzdesini en çok etkileyen süpernatant ise *A. baumannii* süpernatantı olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre %90'a yakın bir oranda biyofilmdeki *C. albicans* canlılığını azaltmıştır.

Pseudomonas aeruginosa süpernatantı ise *C. albicans* biyofilm oluşumuna karşı etkisiz kalmış ve oluşan biyofilm kütlesini değiştirememiştir. Sonuçlarımızdan farklı olarak, Holcombe ve ark.⁽²⁷⁾ tarafından yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* süpernatantı biyofilm oluşumun ilk basamağından itibaren ortamda bulunduğu *C. albicans* biyofilm oluşumunun inhibe olduğu, fakat adezyon aşamasından (1 saat) sonra ortamdan uzaklaştırılan süpernatantın etkisiz olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde adezyon aşamasından sonra ortama konulan süpernatantın ise biyofilm oluşumunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından elde edilen bu sonuçlar, süpernatantların biyofilmin hangi aşamasında ilave edildiğine ve ne kadar süre ile etkili olduklarına göre biyofilm üzerine olan etkilerinin değiştiğini göstermiştir.

Kistik fibrozis hastalarının akciğerleri ve ciddi yanık yaralarında sıklıkla bir arada bulunabilen *C. albicans* ve *P. aeruginosa*'nın birbirleri ile karmaşık ilişki içerisinde oldukları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, *Pseudomonas*'ın quorum sensing sinyal molekülü olan 3-oxo-C12-homoserin laktonun *Candida* morfolojisini ve fungal metabolit olan farnesolün de *Pseudomonas*'ı antagonist olarak etkilediği gösterilmiştir^(28,29).

Peleg ve ark.⁽³⁰⁾ tarafından yapılan başka bir çalışmada da yine benzer şekilde *A. baumannii*'nin *C. albicans*

hif oluşumunu dolayısıyla biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Benade ve ark.⁽³¹⁾ tarafından yapılan bir araştırmada, aralarında *K. pneumoniae*'nin de bulunduğu çeşitli bakterilerin aerobik koşullarda *C. albicans*'ın üremesini inhibe ettiği saptanmıştır. Genellikle üriner sistem enfeksiyonlarında bir arada bulunan *E. coli*'nin ise, *C. albicans*'ın mesane mukozasına yapışmasını arttırdığı gösterilmiştir^(17,32). Elde ettiğimiz sonuçlarımızın daha önce yapılan çalışmalar ile *E. coli* hariç uyum gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda, *E. coli*'nin de diğer Gram negatif bakteriler gibi *C. albicans* biyofilm hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiş bu durum farklı suşların farklı sonuçlar gösterebileceği şeklinde yorumlanmıştır. Floresan görüntüleme sonuçlarına göre de süpernatantların *C. albicans* biyofilmindeki canlı hücre sayısını azalttığı, biyofilm içerisindeki kırmızı renkli ölü hücrelere bakarak anlaşılmalıdır.

Çeşitli kültürlerden elde edilen hücresiz steril süpernatantların, elde edildikleri mikroorganizmaya bağlı olarak değişmekle birlikte bakteriyosin, hidrojen peroksit veya organik asitler gibi çeşitli biyolojik aktif maddeler içerebildikleri ve bu maddelerin de başka mikroorganizmalar için antimikrobiyal etki gösterebileceği bilinmektedir⁽³³⁾. Yapılan bir çalışmada, *E. coli*'nin süpernatantının aralarında *C. albicans*'ın da bulunduğu altı farklı *Candida* türünün biyofilmi üzerine etkisi araştırılmış ve *E. coli*'nin salgıladığı maddelerin *Candida*'ların biyofilm oluşumu için gerekli olan hif oluşum genlerinin ekspresyonunu engellediği böylece biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir⁽³⁴⁾. Çalışmamızda, Gram negatif bakterilerden elde ettiğimiz steril süpernatantların *C. albicans* biyofilmi üzerine inhibitör etki gösterdikleri ve maya sayısını en az bir log azalttıkları gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, bakteri hücrelerinin maya hücreleri ile bir arada bulunduğu biyofilmlerde, yalnızca süpernatantlarının bulunduğu biyofilmlere göre *C. albicans* sayısının daha fazla azaldığı belirlenmiş ve bu durum da bakteriyel/fungal biyofilmlerde yalnızca süpernatant içerisindeki biyolojik aktif maddelerin değil aynı zamanda bakteri hücrelerinin de antimikrobiyal etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Dimorfik bir maya olan *C. albicans* değişen ortam koşullarında mayadan hife dönüşerek biyofilm oluşturmaya başlamaktadır⁽³⁴⁾. *C. albicans* biyofilmleri, maya hücreleri, yalancı hif ve gerçek hiflerden meydana gelen karmaşık bir sistemdir ve zaman zaman çeşitli bakterilerle birlikte polimikrobiyal biyofilmler oluşturabilir^(16,17). Yapılan çalışmalar nozokomiyal *C. albicans* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğunun polimikrobiyal enfeksiyonlar olduğunu göstermiş, ancak buna rağmen fungal-bakteriyel biyofilmlerle ilgili yapılan çalışmaların monomikrobiyal biyofilm çalışmalarına göre daha az oldukları görülmüştür⁽¹⁴⁾. Bu nedenle çalışmamızın polimikrobiyal biyofilmlerin doğasını anlamaya ve bu biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonlarla mücadelede terapötik stratejilerin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; sistemik enfeksiyonlar, vajinal enfeksiyonlar, deri ve yara enfeksiyonları, oral enfeksiyonlar, gastrointestinal enfeksiyonlar ve kistik fibrozis gibi pek çok enfeksiyonda ortaya çıkabilen *C. albicans* Gram negatif polimikrobiyal biyofilmlerde bakteriler hem hücreleri ile hem de steril hücresiz süpernatantları ile *C. albicans* biyofilm hücrelerini antagonist olarak etkilemiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSA-2017-26191 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: Istanbul University Scientific Research Projects Unit (Project No. TSA-2017-26191).

KAYNAKLAR

- Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. PLoS Pathog. 2012;8(4):e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
- Macià MD, Del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36(6):375-81. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.04.006>
- Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. Future Microbiol. 2012;7(9):1061-72. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. Mycoses. 2012;55(3):199-204. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x>
- Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. Crit Rev Microbiol. 2021;47(1):91-111. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
- Lahkar V, Saikia L, Patgiri SJ, Nath R, Das PP. Estimation of biofilm, proteinase & phospholipase production of the *Candida* species isolated from the oropharyngeal samples in HIV-infected patients. Indian J Med Res. 2017;145(5):635-40. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1773_14
- Hacioglu M, Guzel CB, Savage PB, Tan ASB. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. Med Mycol. 2019;57(3):291-9. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy023>
- Tüzüner U, İnci R. *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun modifiye mikroplak ve modifiye XTT redüksiyon yöntemleri ile saptanması. Ege Tıp Derg. 2017;56(4):178-82. <https://doi.org/10.19161/etd.395217>
- Jahagirdar VL, Davane MS, Aradhya SC, Nagoba BS. *Candida* species as potential nosocomial pathogens- A review. Electron J Gen Med. 2018;15(2):em05. <https://doi.org/10.29333/ejgm/82346>
- Nett JE, Andes DR. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. J Fungi (Basel). 2020;6(1):21. <https://doi.org/10.3390/jof6010021>
- Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. Med Mycol. 2009;47:681-9. <https://doi.org/10.3109/13693780802549594>
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):288-305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):193-213. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>
- Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2011;19(11):557-63. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.004>

15. Alam F, Catlow D, Di Maio A, Blair JMA, Hall RA. *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(4):925-35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz514>
16. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):42-8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>
17. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;299(1):1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01668.x>
18. CDC. Gram-negative bacteria infections in healthcare settings. Centers for Disease Control and Prevention. [<https://www.cdc.gov/hai/organisms/gram-negative-bacteria.html>]. (Erişim tarihi: 10/06/2020).
19. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Topics.* 2012;22(1):2-16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
20. 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. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv334>
21. Hacıoğlu M, Oyardı O, Bozkurt-Guzel C, Savage PB. Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. *J Antibiot (Tokyo).* 2020;73(7):455-62. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0299-0>
22. Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):74-82. <https://doi.org/10.1128/AAC.01599-12>
23. Tavernier S, Crabbé A, Hacıoğlu M, et al. Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(9):e00302-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00302-17>
24. Kairo SK, Bedwell J, Tyler PC, Carter A, Corbel MJ. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine.* 1999;17(19):2423-38. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00023-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00023-7)
25. Peyyala R, Kirakodu SS, Ebersole JL, Novak KF. Novel model for multispecies biofilms that uses rigid gas-permeable lenses. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(10):3413-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00039-11>
26. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62(4):e1-50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
27. Holcombe LJ, McAlester G, Munro CA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiology.* 2010;156(5):1476-86. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037549-0>
28. McAlester G, O'Gara F, Morrissey JP. Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt5):563-69. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47705-0>
29. Keçeli Özcan S, Dündar D, Sönmez Tamer G. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antikandidal aktiviteleri ve in vitro *Candida* biyofilm oluşumunun inhibisyonu. *Mikrobiyol Bul.* 2012;46(1):39-46.
30. Peleg AY, Tampakakis E, Fuchs BB, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Mylonakis E. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(38):14585-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805048105>
31. Benadé E, Stone W, Mouton M, Postma F, Wilsenach J, Botha A. Binary interactions of antagonistic bacteria with *Candida albicans* under aerobic and anaerobic conditions. *Microb Ecol.* 2016;71(3):645-59. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0706-4>
32. Levison E, Pitsakis G. Susceptibility to experimental *Candida albicans* urinary tract infection in the rat. *J Infect Dis.* 1987;155(5):841-6. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.5.841>
33. Frickmann H, Klenk C, Warnke P, Redanz S, Podbielski A. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of Staphylococci. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2018;8(4):119-27. <https://doi.org/10.1556/1886.2018.00022>
34. Bandara HM, Cheung BP, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. Secretory products of *Escherichia coli* biofilm modulate *Candida* biofilm formation and hyphal development. *J Investig Clin Dent.* 2013;4(3):186-99. <https://doi.org/10.1111/jicd.12048>