T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İLACA DİRENÇLİ PATOJENLER VE BİYOFİLMLERİN KONTROLÜNDE YENİ NESİL ANTİBİYOTİK ALTERNATİFLERİ OLARAK LİYOFİLİZE POSTBİYOTİK METABOLİTLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BENANNUR DOĞAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2026

10842888

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İLACA DİRENÇLİ PATOJENLER VE BİYOFİLMLERİN KONTROLÜNDE YENİ NESİL ANTİBİYOTİK ALTERNATİFLERİ OLARAK LİYOFİLİZE POSTBİYOTİK METABOLİTLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BENANNUR DOĞAN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ DR. RAFİG GURBANOV

BİLECİK, 2026

10842888

BEYAN

‘’İlaç dirençli patojenler ve biyofilmlerin kontrolünde yeni nesil antibiyotik alternatifleri olarak liyofilize postbiyotik metabolitlerin etkinliğinin değerlendirilmesi’’ başlıklı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazım aşamasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehberine uygun olarak tez/dönem projemi hazırladığımı, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel etik kurallarına uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, çalışmamın herhangi bir kısmının başka bir tez/dönem projesi olarak sunulmadığını, aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Benannur Doğan

.../.../2026

İmza

	YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN ÖĞRENCİ BEYAN FORMU	BŞEÜ-KAYSİS Belge	DFR-516
		İlk Yayın Tarihi/Sayısı	30.04.2026/16 -
		Revizyon Tarihi	00
		Revizyon No.su	00
		Toplam Sayfa	1

Bölüm I. Yapay Zekâ Kullanım Durumu

☐Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalandım**.

☒Bu tezin/projenin yazım süreçlerinde yapay zekâ tabanlı herhangi bir araçtan **faydalanmadım**.

Bölüm II. Yapay Zekâ Kullanım Detayları

**Bu bölüm yalnızca yapay zekâ kullanımı beyan edilmiş ise doldurulacaktır. Aksi durumda boş bırakılmalıdır.*

Tezinizde/projenizde kullandığınız yapay zekâ araçlarını ve sürümünü listeleyiniz:

Yapay zekâ araçlarını tezimin/projemin aşağıdaki aşamalarında ilgili amaçlar için kullandım. (Birden fazla seçenek işaretlenebilir):

- ☐ Cümle oluşturma
- ☐ Literatür tarama
- ☐ Çeviri
- ☐ Düzenleme/dil kontrolü
- ☐ Veri işleme ve analizi
- ☐ Veri görselleştirme
- ☐ Görüntü üretme
- ☐ Kaynakça düzenleme
- ☐ Diğer (Belirtiniz):.....

Bu çalışmada yapay zekâ kullanımı ***Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber***'e ve akademik dürüstlük ilkelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup yapay zekâ araçlarından alınan destek, etik kurallar ve kaynak gösterme esaslarına uygun biçimde belirtilmiştir. Yapay zekâ kullanımı, çalışmanın özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmayacak biçimde gerçekleştirilmiştir. Usulsüz yapay zekâ kullanımı (örneğin: kaynak göstermeksizin metin üretimi, otomatik içerik üretiminin özgün eser gibi sunulması, yanıltıcı kaynak gösterimi vb.) tarafımdan kesinlikle yapılmamıştır. Yapay zekâ araçlarının sağladığı bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi, yanlış veya eksik bilgi bulunması halinde tüm sorumluluğun tarafıma ait olduğunu; ayrıca çalışmamla ilgili bu beyana aykırı bir durumun herhangi bir zamanda tespit edilmesi durumunda ortaya çıkabilecek akademik ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi beyan ederim.

Benannur Doğan

…/…/2026

İmza

ÖN SÖZ

Bu tez çalışması, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi'nin Biyomühendislik Yüksek Lisans bölümü bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması sürecinde bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, akademik desteğini ve değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım Doç Dr. Rafig GURBANOVa teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmanın deneysel süreçlerinde bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan, laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Sevinç KARAÇAM KOŞ'a teşekkür ederim.

Çalışmamızda kullanılan *L. gasseri* L10 izolatını temin eden Doç. Dr. Esin Kıray'a; liyofilizatör cihazından yararlanmamızı sağlayan Doç. Dr. Fadime Özdemir'e ve bu süreçte desteklerini esirgemeyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (BİYOTEKMER) teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca *S. aureus* ATCC 6538 kökenli MRSA, *S. pneumoniae* ATCC-BAA 1665 ve *E. coli* ATCC 35218 suşlarını temin eden Doç. Dr. Ceren Türkcan'a ve İstanbul Arel Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Antibiyotik direncindeki küresel ve hızlı artış ile biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan zorluklar, yeni nesil antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda, probiyotik bakterilerce üretilen postbiyotik metabolitler, patojen mikroorganizmalar üzerinde güçlü inhibitör etkiler sergileme potansiyeline sahiptir. Bu çalışmanın amacı, liyofilize *Lactobacillus gasseri* L10 ve *Lactiplantibacillus plantarum* 299v kaynaklı postbiyotik metabolitlerin, ilaca dirençli patojenler üzerindeki etkinliklerini araştırmaktır. Araştırmada test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* ATCC 35218, Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 6538 kökenli) ve *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 suşları kullanılmıştır. İlgili probiyotik suşlardan hücresiz süpernatant formunda elde edilen postbiyotik metabolitler, biyoaktif bileşenlerin bozulmasını önlemek, yüksek stabilite ve uzun raf ömrü sağlamak amacıyla liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Hazırlanan bu liyofilize postbiyotiklerin farklı konsantrasyonları patojenlere uygulanmıştır. Postbiyotiklerin antibakteriyel aktiviteleri hücre canlılık analizi ve "Agar spot" testi ile; antibiyofilm etkinlikleri ise kristal viyole yöntemiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak analiz edilmiş ve anlamlılık düzeylerine göre karşılaştırılmıştır. Bulgular, liyofilize postbiyotik metabolitlerin, ilaca dirençli patojenler üzerinde konsantrasyona bağımlı antibakteriyel ve antibiyofilm aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, hem klinik uygulamalar için dayanıklı farmakolojik ajanların geliştirilmesine olanak tanımakta hem de dirençli enfeksiyonlarla mücadele stratejilerine yön vererek halk sağlığının korunmasına önemli bir katkı sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus gasseri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, postbiyotik, liyofilizasyon, antibakteriyel etki, biyofilm

ABSTRACT

The global and rapid increase in antibiotic resistance and the challenges encountered in the treatment of biofilm-induced infections necessitate the development of next-generation antimicrobial strategies. In this context, postbiotic metabolites produced by probiotic bacteria have the potential to exhibit strong inhibitory effects on pathogenic microorganisms. The aim of this study is to investigate the efficacy of lyophilized postbiotic metabolites obtained from *Lactobacillus gasseri* L10 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299v against drug-resistant pathogens. *Escherichia coli* ATCC 35218, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (derived from *S. aureus* ATCC 6538), and *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 strains were used as test microorganisms in the study. Postbiotic metabolites obtained from the relevant probiotic strains in cell-free supernatant form were subjected to lyophilization to prevent degradation of bioactive components and to ensure high stability and long shelf life. Different concentrations of the prepared lyophilized postbiotics were applied to pathogens. The antibacterial activities of postbiotics were evaluated using cell viability analysis and the "Agar spot" test; antibiofilm activity was examined using the crystal violet method. All obtained data were statistically analyzed and compared according to significance levels. The findings reveal that lyophilized postbiotic metabolites exhibit concentration-dependent antibacterial and antibiofilm activity against drug-resistant pathogens. This study makes it possible to develop resistant pharmacological agents for clinical applications and provides a significant contribution to public health protection by guiding strategies to combat resistant infections.

Keywords: *Lactobacillus gasseri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, postbiotic, lyophilization; antibacterial activity; biof

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ i

ÖZET ii

ABSTRACT iii

ŞEKİLLER LİSTESİ vi

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ vii

1. GİRİŞ 1

2. LİTERATÜR ÖZETİ 3

2.1. Mikrobiyota 3

2.2. Probiyotikler ve paraprobiyotikler 3

2.3. Postbiyotikler 5

2.4. *Lactiplantibacillus plantarum* 13

2.5. *Lactobacillus gasseri* 14

2.6. Antibiyotik dirençli patojenler 15

2.6.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 16

2.6.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) 17

2.6.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 18

2.7. Biyofilm 18

3. MATERYAL VE METOT 20

3.1 Probiyotik Bakterilerin Büyütülmesi, Hücresiz Süpernatant Eldesi ve Liyofilizasyon 20

3.2. Liyofilize Hücresiz Süpernatantın Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi 20

3.2.1. Agar spot assay ile antibakteriyel etkinin değerlendirilmesi 21

3.3. Liyofilize hücresiz süpernatantın antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi 21

3.4. İstatistiksel Analiz 22

4. BULGULAR 23

4.1. Antibakteriyel aktivite sonuçları 23

4.1.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etki 23

4.1.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etki 25

4.1.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etki 28

4.2. Antibiyofilm Aktivite Sonuçları 31

4.2.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibiyofilm etki 31

4.2.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* MRSA üzerindeki antibiyofilm etki 33

4.2.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibiyofilm etki 35

5. TARTIŞMA 38

5.1 Antibakteriyel Etkinliğin Değerlendirilmesi 39

5.1.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etkinlik 39

5.1.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etkinlik 40

5.1.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etkinlik 43

5.2 Antibiyofilm Etkinliğin Değerlendirilmesi 44

5.2.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibiyofilm etkinlik 44

5.2.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibiyofilm etkinlik 46

5.2.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA- 1665 üzerindeki antibiyofilm tkinlik 47

5.3. Çalışmanın Sınırlılıkları 49

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 50

KAYNAKLAR 51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil.1. Bir KZYA olan bütirat molekülünün mitokondrideki enerji metabolizmasına katılışı.**8**

Şekil.2. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırma **11**

Şekil.3. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etkinliği **21**

Şekil 4. *Lactobacillus gasseri* L10 hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etkinliği.....**22**

Şekil 5. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etkinliği **24**

Şekil.6. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etkinliği.....**25**

Şekil.7. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etkinliği.....**27**

Şekil.8. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etkinliği.....**28**

Şekil.9. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği **30**

Şekil.10. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği **30**

Şekil.11. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) MRSA biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği **32**

Şekil 12. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) MRSA biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği.....**32**

Şekil.13. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği. **34**

Şekil.14. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 biyofilm oluşumu üzerindeki etkinliği.....**34**

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ATCC American Type Culture Collection

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

AMR: Antimikrobiyal Resistance

EPS: Extracellular Polymeric Substances

HGT: Horizontal Gene Transfer

ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

KZYA: Kısa Zincirli Yağ Asidi

NIH: National İnstitutes Of Heal

HMP: Human Microbiom Project

ESS: Enterik Sinir Sistemi

GABA: Gama-Aminobütirik Asit

HPA: Hipotalamus-Hipofiz-Adreanal aksı

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

HDACi: Histon Deacetylase inhibitor

MUC2: Mucin 2

MUC3: Mucin 3

GALT:Gut-Associated Lymphoid Tissue

İL-10: İnterlökin-10

TGF-ß: Transforming Growth Factor Beta

FOXP3: Forkhead Box P3

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

VPA: Valproik Asit

TSA: Trikostantin A

SMCT:Sodium-coupled Monocarboxylate Transporter

HMCT: H^+-coupled Monocarboxylate Transporter

GPR41: G-protein coupled recetor 41

GPR43: G-protein coupled receptor 43

GPR109A: G-protein coupled receptor 109A

HCT-8: Human colorectal tumor -8

GPCR: G protein coupled receptör

AMPK: AMP-activated protein kinase

BDNF: Brain-derived neurotophic factor

Aß: Amyloid Beta

SOD: Superokside dismutase

coA: Coenzyme A

PPARα: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha;

NLRP3: NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3

GLP-1: Glucagon-like peptid-1

TCA: Tricarboxylic Acid Cyle

ARE: Antioxidant Response Element

MSSA: Meticilin susceptible *Staphylococcus aureus*

MRSA: Meticilin Resistant *Staphylococcus aureus*

QS: Quarum Sensing

MDR: Multidrug Resistance

LAB: Lactic Acid Bacteria

UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli*

PTM: Post-Translasional Modification

PMF: Proton Motive Force

ATP: Adenosin Triphosphat

LPS: Lipopolysaccharide

EPI: Efflux Pump İnhibitor

BV: Bacterial Vaginoz

ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli*;

PBP: Penicilin-Binding Protein

EV: Extracellular Vesycule

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

AHL: N-Acyl Homoserine Lactone

AHP: N-Acyl Homoserine Lactone;

MRS: De Man, Rogosa and Sharpe

IL-1β: İnterlökin-ß

CV: Crystal Violet

SCFA: Short-Chain Fatty Acid

TA: Toxin-Antitoxin

TSB: Tryptic Soy Broth

OD600: Optical Density at 600 nm

SEM: Standard Error of the Mean

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

MBC: Minimum Bactericidal Concentration

GSR: Glutathione Reductase

CFS: Cell-Free Supernatant

CFU: Colony-Forming Unit

OD550: Optical Density at 550 nm

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

ROS: Reactive Oxygen Species

NOX: NADPH Oxidase

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced Form

$FADH_2$: Flavin Adenine Dinucleotide, Reduced Form

DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns

SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome mec

PBP2a: Penicillin-Binding Protein 2a

LC-MS/MS: Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

UT: Untreated

LP: *Lactiplantibacillus plantarum* CFS uygulanan gruplar

LG: *Lactobacillus gasseri* CFS uygulanan gruplar

ns: Not significant

AIP: Autoinducing Peptide

HDAC: Histone Deacetylase

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Virus

TP53: Tumor Protein p53

MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7

FFAR: Free Fatty Acid Receptor

GC-MS: Gas Chromatography–Mass Spectrometry

ESBL: Extended-Spectrum Beta-Lactamase

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından modern tıbbın karşı karşıya olduğu en kritik küresel tehditlerden biri olarak tanımlanan antimikrobiyal direnç (AMR), mevcut antibiyotiklerin etkinliğini hızla azaltmakta ve yeni nesil terapötik stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Patojen bakterilerin sergilediği bu direnç mekanizmalarının merkezinde, çoğunlukla biyofilm oluşturma yetenekleri yer almaktadır. Kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matriks (EPS) içerisine gömülü mikrokoloniler halinde organize olan biyofilm yapıları, serbest (planktonik) formdaki bakterilere kıyasla antimikrobiyal ajanlara ve konakçı immün yanıtına karşı 10 ila 1000 kat daha yüksek direnç gösterebilmektedir. Bu durum, kronik ve tekrarlayan enfeksiyonların tedavisini konvansiyonel antibiyotiklerle neredeyse imkânsız hale getirmektedir (Abebe, 2020; Belay vd.,2024).

Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede ve konakçı homeostazisinin korunmasında, insan mikrobiyotası kökenli probiyotik mikroorganizmalar uzun süredir potansiyel biyoterapötik ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Ancak canlı probiyotiklerin klinik uygulamalarında; özellikle immün sistemi baskılanmış (immünosüpresif) hastalarda bakteriyemi/sepsis riski, antibiyotik direnç genlerinin yatay transfer (HGT) yoluyla diğer mikroorganizmalara aktarılma olasılığı ve canlı hücre stabilitesinin korunmasındaki zorluklar önemli güvenlik ve lojistik kısıtlar oluşturmaktadır.

Bu kısıtlamaların aşılmasında "postbiyotikler", güvenli ve yenilikçi bir alternatif olarak ön plana çıkmaktadır. Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (ISAPP) uzlaşısına göre postbiyotikler; konakçıya sağlık yararı sağlayan, inaktive edilmiş mikroorganizmaları ve/veya bunların hücresiz biyoaktif metabolitlerini ifade etmektedir (Salminen vd., 2021). Probiyotik bakterilerin metabolik aktiviteleri sonucu ortama salınan hücresiz süpernatantlar; bakteriyosinler, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA'lar), organik asitler, muropeptitler, hücre yüzey proteinleri ve ekzopolisakkaritler gibi fonksiyonel moleküller açısından zengindir (Aguilar-Toalá vd., 2018; Wegh vd., 2019). Postbiyotikler; canlı hücre içermemeleri sayesinde translokasyon ve direnç geni aktarımı risklerini tamamen ortadan kaldırırken, hedef patojenler üzerinde doğrudan antimikrobiyal, membran bozucu ve biyofilm oluşumunu engelleyici/matriks parçalayıcı etkiler gösterebilmektedir (Ma, vd., 2023).

Bu biyoaktif metabolitlerin klinik ve endüstriyel boyutta uygulanabilir bir farmasötik forma dönüştürülmesinde ise liyofilizasyon (dondurarak kurutma) kritik bir rol oynamaktadır.

Liyofilize formülasyonlar; metabolitlerin termal bozunmasını önleyerek biyoaktivitelerini uzun süre korumakta, doz standardizasyonu sağlamakta ve sıvı süpernatantlara kıyasla stabil, taşınabilir ve pratik bir kullanım platformu sunmaktadır (Saadatzadeh vd., 2013; Sornsenee vd., 2021).

Bu tez çalışmasının temel amacı; probiyotik kaynaklı hücresiz postbiyotik metabolitlerin liyofilize formülasyonlarının, ilaca dirençli ve biyofilm oluşturan kritik patojenler üzerindeki anti-patojenik ve anti-biyofilm etkinliğini in vitro koşullarda değerlendirmektir. Elde edilecek bulgular, dirençli bakteriyel enfeksiyonların yönetiminde sentetik antibiyotiklere tamamlayıcı veya alternatif olabilecek, düşük sitotoksisiteye ve yüksek stabiliteye sahip yeni nesil biyoterapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mikrobiyota

İnsan vücudu, ekolojik yapı ve konak bileşimini ifade eden holobiont bir ekosistemdir. Bu ekolojik yapıyı oluşturan mikrobiyota ise bakteri, fungus, virüs, protozoa, arkea ve alg olmak üzere vücudumuzdaki kommensal, simbiyotik ve patojenik tüm mikroorganizmaları kapsayan bir terimdir. Mikroorganizmaların varlığının bilinci, 1670'lere dayanmakta olup ilk defa hollandalı bilim insanı Antonie van Leeuwenhoek tarafından fark edilmiştir. Mikrobiyolojinin tarihi boyunca, insan sağlığı üzerine olan çalışmalarda ağırlıklı olarak, mikroorganizmaların insanlarda hastalık etkeni olduğuna odaklanılmıştır (Aslan ve Altındiş, 2017). Yeni nesil dizileme teknolojileri ve biyoinformatik analiz yöntemlerindeki gelişmeler, insan ile mikroorganizmalar arasındaki simbiyotik etkileşimin moleküler düzeyde aydınlatılmasını hızlandırmış ve bu doğrultuda 2007 yılında ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) öncülüğünde İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) başlatılmıştır. Yaklaşık 30 trilyon insan hücresine ev sahipliği yapan insan organizması, sayısal olarak bu büyüklüğe eşdeğer veya daha yüksek yoğunlukta bir mikrobiyal yük barındırmaktadır (Turnbaugh vd., 2007; Sender vd., 2016.).

Hücresel oranın ötesinde mikrobiyotanın asıl etkisi, taşıdığı genomik zenginlikten (metagenom) kaynaklanmaktadır. İnsan mikrobiyomu, insan konakçı genomunun barındırdığı gen sayısının yüzlerce katı kadar benzersiz gen dizilimi içermektedir (Human Microbiome Project Consortium, 2012). İnsan organizması tarafından kodlanamayan pek çok enzimatik ve metabolik yolu tamamlayan bu geniş genetik rezervuar; bağışıklık sisteminin olgunlaşması, metabolik regülasyon ve gastrointestinal homeostazinin sürdürülmesinde vazgeçilmez bir biyokimyasal kapasite sunmaktadır (Arenas-Gómez vd., 2023; Cox vd., 2022).

2.2. Probiyotikler ve paraprobiyotikler

İnsan mikrobiyotasının çeşit ve miktar açısından en fazla barındığı organ bağırsaktır. Fizyolojik olarak insan bağırsak yapısı bu kalabalık topluluğa yer verecek şekilde iç yüzey alanını arttıran, girintili çıkıntılı bir yapı sağlayan villus ve mikrovilluslar barındırmaktadır. Bu yüzey alanının ~32 m^2 olduğu bildirilmektedir (Helander ve Fändriks, 2014). Bağırsak uzunluğunun ise, insanın kendi uzunluğunun 5 katı kadar olduğu bildirilmektedir (Leroy vd., 2023). Bu doğrultuda, bağırsak, insan vücudundaki en yoğun mikrobiyal topluluklardan birini

barındırmakta olup, yüksek yoğunlukta ve çeşitlilikte mikroorganizma içermesi beklenen bir yapıdır. Bu mikroorganizmalar, konak ile simbiyotik bir ilişki içerisinde bulunarak insan fizyolojisinin sürdürülmesinde ve çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli roller üstlenmektedir. İnsan mikrobiyotasının en yoğun popülasyonunu barındıran gastrointestinal kanalda mikrobiyal denge, kommensal mikroorganizmalar ile potansiyel patojenler arasındaki dinamik rekabete dayanmaktadır. Bu dengenin sürdürülmesinde kritik rol oynayan probiyotikler, Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (ISAPP) tarafından *"yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar"* olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar; yüzey yapı bileşenleri ve salgıladıkları biyoaktif metabolitler aracılığıyla immünomodülasyon, metabolik regülasyon ve gastrointestinal homeostazinin korunmasında temel biyokimyasal işlevler üstlenmektedir (Horrocks vd., 2023).

Gastrointestinal sistem, zengin vasküler yapısının yanı sıra bağımsız işlev görebilen kapsamlı bir nöronal ağa, Enterik Sinir Sistemi'ne (ESS) sahiptir. ESS, merkezi sinir sistemi ile bağırsak arasındaki çift yönlü iletişimi koordine eden mikrobiyota-bağırsak-beyin ekseninin temel nörolojik bileşenini oluşturmaktadır. Bu eksen boyunca bilgi akışı; nörotransmitterler, nöromodülatörler, nöropeptitler ve nörohormonlar aracılığıyla dinamik ve çift yönlü (bidirectional) olarak gerçekleşmektedir (Sharkey ve Mawe, 2023; Aburto ve Cryan, 2024). Bağırsak mikrobiyotası doğrudan nöroaktif bileşikler (GABA, serotonin ve dopamin prekürsörleri gibi) sentezleme ve konakçı nörokimyasını regüle etme yeteneğine sahipken, konakçı kaynaklı nörokimyasal sinyaller de mikrobiyal kompozisyonu ve fonksiyonel aktiviteyi doğrudan modüle edebilmektedir (Cryan ve Dinan, 2012). Bu karmaşık etkileşim mekanizması; otizm spektrum bozukluğu, majör depresyon ve Alzheimer hastalığı gibi nöropsikiyatrik ile nörodejeneratif patolojilerin patofizyolojisinde mikrobiyom temelli mekanizmaların ve probiyotik etkilerin araştırılmasına zemin hazırlamaktadır (Shin ve Kim, 2023).

ESS, merkezi sinir sisteminden (MSS) bağımsız olarak gastrointestinal motilite ve sekresyonu koordine edebilen otonom nöronal bir ağdır. Bununla birlikte MSS'nin sempatik ve parasempatik kolları ile hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseni, bağırsak mikrobiyotası ile konakçı fizyolojisi arasında çift yönlü (bidirectional) bir iletişim köprüsü kurmaktadır (Sharkey ve Mawe, 2023). Stres durumunda aktive olan sempatik uyarı ve HPA (hipotalamus-hipofiz-adrenal) ekseni aktivasyonu sonucu salgılanan kortizol, mukus tabakasının kalınlığını, epitel bariyer geçirgenliğini ve bağırsak motilitesini değiştirerek mikrobiyal kompozisyonu ve

kommensal popülasyonların metabolik homeostazisini doğrudan etkilemektedir (Dong ve Mayer, 2024).

Mikrobiyota-bağırsak-beyin ekseninin nörokimyasal regülasyonunda probiyotikler; gamma-aminobütirik asit (GABA), serotonin, dopamin ve noradrenalin gibi nöroaktif bileşiklerin sentezinde ve regülasyonunda aktif rol oynamaktadır. *Lacticaseibacillus rhamnosus* (eski adıyla *Lactobacillus rhamnosus)*'un inhibitör bir nörotransmitter olan GABA üretme yeteneği, buna bir örnektir. (Clarke vd., 2014). Nöromodülatör etkilerin yanı sıra probiyotik mikroorganizmalar, eksojenik sindirim enzimlerinin (laktaz, amilaz vb.) indüksiyonuna katkı sağlamakta; sindirilemeyen diyet liflerini fermente ederek hem enterositler için temel enerji kaynağı olan hem de sistemik immünoregülasyon sağlayan kısa zincirli yağ asitlerini (KZYA) üretmektedir (Mann vd., 2024).

Probiyotiklerin sağladığı biyolojik faydalar büyük ölçüde bu metabolik türevlere dayansa da, canlı mikroorganizmaların klinik ve endüstriyel kullanımı birtakım biyogüvenlik ve teknolojik kısıtları beraberinde getirmektedir. Canlı bakterilerin; immün yetmezliği bulunan veya immünosüpresif hastalarda mukozal bariyeri aşarak kan dolaşımına geçmesi (bakteriyel translokasyon) sonucu bakteriyemi/sepsis oluşturma riski, antibiyotik direnç veya virülans faktörlerini HGT yoluyla patojenlere aktarma potansiyeli ve suşa özgü öngörülemeyen mutasyonel değişimler klinik güvenliği sınırlandırmaktadır (Piqué vd., 2019; Rad vd., 2022). Teknolojik açıdan ise canlı hücrelerin liyofilizasyon, depolama ve lojistik süreçlerinde canlılıklarını kaybetmeleri ve soğuk zincir zorunluluğu, geniş ölçekli formülasyon stabilitesini zorlaştırmaktadır.

Bu kısıtlamaların aşılmasında paraprobiyotikler (inaktive/cansız mikrobiyal hücreler veya hücre duvarı fraksiyonları) ve postbiyotikler (hücresiz süpernatantlar, çözünür biyoaktif metabolitler ve lizatlar) yenilikçi ve güvenli biyoterapötik alternatifler olarak ön plana çıkmaktadır. Canlı hücre içermeyen bu preparatlar; enfeksiyon ve direnç geni transferi risklerini tamamen ortadan kaldırırken, yüksek ısıl ve kimyasal stabilite sergilemekte, soğuk zincir gereksinimini bertaraf ederek raf ömrünü uzatmakta ve farmasötik açıdan standardize edilebilir, maliyet etkin çözümler sunmaktadır (Dahmouni vd., 2026).

2.3. Postbiyotikler

ISAPP konsensüsüne göre postbiyotikler; *"konakçıya sağlık yararı sağlayan, inaktive edilmiş mikroorganizmaların ve/veya bunların hücresel bileşenlerinin ve metabolik ürünlerinin preparasyonu"* olarak tanımlanmaktadır (Salminen vd., 2021). Bu kapsamda postbiyotik

fraksiyonlar; bakteri hücresine bağlı yapısal bileşenleri (peptidoglikan türevi muropeptitler, teikoik asitler, hücre yüzey proteinleri ve ekzopolisakkaritler) kapsayabileceği gibi, fermantasyon ve büyüme süreçlerinde hücre dışına salınan çözünür biyoaktif metabolitleri (organik asitler, fonksiyonel enzimler, biyoaktif peptitler, bakteriyosinler ve kısa zincirli yağ asitleri -KZYA/ SCFA) de içine almaktadır (Dahmouni vd., 2026).

Probiyotik mikroorganizmaların konakçı üzerinde sergilediği immünomodülatör, metabolik ve antimikrobiyal etkilerin büyük bir bölümü, hücresel canlılıktan ziyade doğrudan bu fonksiyonel metabolitlerin biyokimyasal aktiviteleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Güncel biyoterapötik ve farmasötik araştırmalar; özellikle patojen membranlarını hedef alan doğal antimikrobiyal peptitler olan bakteriyosinler ile konakçı immünitesi ve mukozal bariyer bütünlüğünde merkezi rol oynayan KZYA'lar üzerine yoğunlaşmaktadır (Sugrue vd., 2024; Mann vd., 2024).

Postbiyotik metabolitler, bağırsak epitel bütünlüğünün korunması, mukozal bariyer fonksiyonunun güçlendirilmesi ve intestinal immün homeostazinin epigenetik düzeyde regülasyonunda doğrudan biyokimyasal işlevler üstlenmektedir. Probiyotik kökenli biyoaktif süpernatant fraksiyonları (özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* kaynaklı metabolitler), goblet hücrelerinde müsin biyosentezinden sorumlu MUC2 ve MUC3 genlerinin ekspresyonunu indükleyerek mukus tabakasının yapısal yoğunluğunu artırmaktadır (Liu vd., 2023). Kalınlaşan mukus tabakası, patojenlerin epitel yüzeye adezyonunu sterik olarak engellerken, postbiyotik fraksiyonda yer alan bakteriyosinler, organik asitler ve litik enzimler patojen proliferasyonunu doğrudan inhibe ederek konakçı lehine kolonizasyon direncini (colonization resistance) pekiştirmektedir (Mishra vd., 2024; Chen vd., 2024). Toplam immün sistemin yaklaşık %70'ine ev sahipliği yapan bağırsakla ilişkili lenfoid doku (GALT), lümendeki postbiyotik sinyal moleküllerinin konakçı immünitesiyle etkileşime girdiği birincil merkezdir (Ruigrok vd., 2023). Bağırsak epitelinde yer alan özelleşmiş membranöz (M) hücreler ve dendritik hücreler aracılığıyla örneklenen postbiyotik bileşenler, lamina propriadaki immün efektör hücrelere aktarılmaktadır. Bu metabolit havuzu içerisinde yer alan KZYA'lar (özellikle asetat, propiyonat ve bütirat), sergiledikleri histon deasetilaz inhibitörü (HDACi) aktivitesi sayesinde epigenetik birer düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Mann vd., 2024; Nshanian vd., 2025). KZYA'lar, HDAC inhibisyonu yoluyla histon asetilasyonunu artırarak kromatin yapısını transkripsiyona uygun hale getirmekte ve regülatör T (Treg) hücrelerinin gelişimi, fonksiyonel stabilitesi ve immün toleransın sağlanmasında anahtar rol oynayan FOXP3 (Forkhead box P3) transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu yukarı yönlü regüle (up-

regülasyon) etmektedir (Hu vd., 2022) FOXP3 geninin transkripsiyonel aktivasyonu; interlökin-10 (IL-10) ve transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β) gibi anti-inflamatuar sitokinlerin salınımını tetikleyerek efektör T hücrelerinin yol açtığı aşırı inflamatuar yanıtları ve otoimmün reaktiviteyi baskılamaktadır (Smith vd., 2013; Cui vd., 2024). Böylece postbiyotik metabolitler, hücresel canlılık gerektirmeksizin hem mukozal düzeyde patojen adezyonunu engelleyen fizikokimyasal bir kalkan oluşturmakta hem de GALT ekseninde epigenetik mekanizmalar üzerinden anti-inflamatuar ve immünomodülatör kontrol sağlamaktadır.

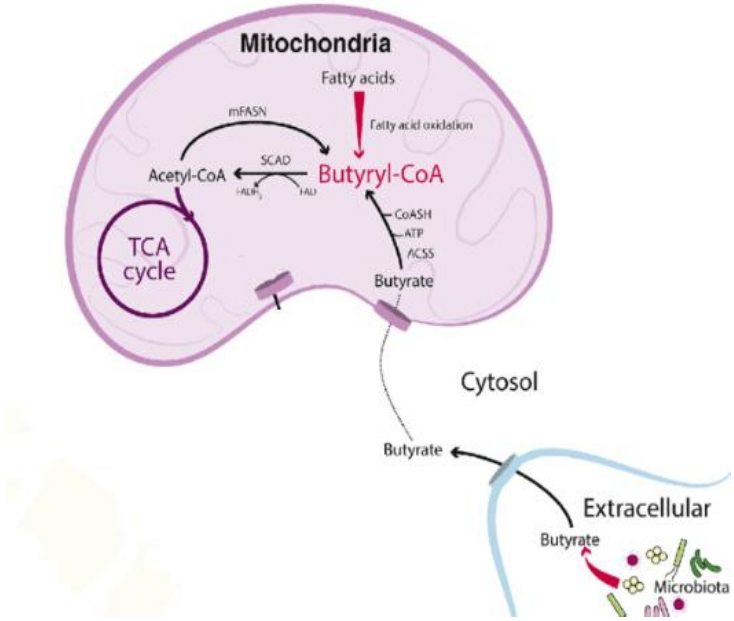
KZYA'ların antikanser araştırmalarda potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilmesi, temelde sergiledikleri HDACi aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir (Kalyanaraman vd., 2024). Örneğin bir tümör süpresör (hücre döngüsü arrestini indükleyen) olan p21 proteininin gen dizisi, HDAC ile etkileşebilen (affinitesi olan) Sp1 ve Sp3 bölgelerini barındırmaktadır. Fakat aynı zamanda bir HDAC inhibitörü olduklarından, ortama verilecek olan KZYA, burada p21 proteininin ekspresyonunu engelleyecek olan HDAC faktörünü inhibe etmektedir (Waby vd., 2010). KZYA'lar ile yapısal ve fonksiyonel benzerlik gösteren bir bütirat analoğu olan valproik asit (VPA) ile bir diğer spesifik HDAC inhibitörü olan trikostatin A'nın (TSA) hücresel yanıtları karşılaştırılmıştır. Uygulanan HDAC inhibitörü maruziyeti sonrasında, p21 düzeyi ile pro-apoptotik bir protein olan PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis) ekspresyonunda belirgin bir artış saptanmıştır (Gilardini Montani vd., 2017). Bu bulgular, KZYA türevlerinin HDAC inhibisyonu aracılığıyla apoptotik mekanizmaları ve hücre döngüsü kontrol noktalarını yeniden aktive edebildiğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, sodyum bütiratın meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü etkileyebildiği ve G1 fazında hücre döngüsü arrestine yol açabildiği gösterilmiştir (Ibrahim vd., 2024) KZYA'ların, probiyotikler tarafından sentezlenip kolonositler tarafından absorplandıktan sonra dolaşımda diğer organlara taşındıkları sırada kullandıkları çeşitli yollar bulunmaktadır. Bunlar pasif difüzyon, taşıyıcı aracılı transport (sodyum bağımlı-SMCT, H^+ bağımlı-HMCT), G protein reseptörleri (GPR41, GPR43, GPR109A) ve serbest yağ asidi reseptörleridir (Free Fatty Acid Receptors; FFAR). Bunlardan özellikle G-protein reseptörleri, KZYA'ların konak üzerindeki sistemik etkisini sağlayan ana sinyal moleküllerinden biridir. G-protein kenetli reseptörleri inceleyen bir çalışmada; sağlıklı kolon dokusunda yüksek düzeyde eksprese edilen GPR43'ün, kolorektal adenokarsinom ve metastatik lenf nodu örneklerinde immünohistokimyasal olarak belirgin biçimde azaldığı veya kaybolduğu gösterilmiştir. Aynı araştırmada, HCT-8 kolorektal kanser hücre hattına uygulanan propiyonat ve bütiratın G0/G1 fazı arrestini tetiklediği ve

apoptozu indüklediği saptanmıştır (Tang vd., 2011). KZYA'lar doğal bağışıklık sisteminde hücresel hasar ve patojenik uyaranlara yanıt olarak kaspaz-1 aktivasyonunu ve pro-inflamatuar sitokinlerin matürasyonunu yöneten NLRP3 inflamazom kompleksi üzerinde çift yönlü (bimodal) bir regülasyon sergilemektedir (Wang vd., 2024; Shi vd., 2025). KZYA'ların NLRP3 inflamazomunu indükleyici veya baskılayıcı etkileri; hedef hücre tipine, inflamatuar mikroçevreye ve fizyolojik koşullara bağlı olarak bağlam-bağımlı (context-dependent) bir immünomodülatör yanıt oluşturmaktadır (Han vd., 2024). KZYA'ların immünomodülatör etkileri; moleküler yapılarına, uygulanan doza ve hedef hücre tipine bağlı olarak yüksek spesifiklik sergilemektedir. Nitekim sıçan L6 kas hücrelerinde bütirat ve propiyonatın konsantrasyona bağlı olarak belirgin anti-inflamatuar aktivite gösterdiği (Martin vd., 2022), insan makrofaj modellerinde ise hücresel bağlama göre farklı immün yolakların aktive olabildiği bildirilmiştir (Wang vd., 2024).

Bu doğrultuda çalışma kapsamında, canlı probiyotik hücrelerin yüzey bileşenlerinden kaynaklanabilecek immünoreaktif arka planı ve çapraz etkileşimleri bertaraf etmek amacıyla hücresiz süpernatant (postbiyotik fraksiyon) kullanımı tercih edilmiştir. Canlı hücrelerin yol açtığı maskeleyici etkileri ortadan kaldıran bu yöntem, metabolit havuzunun hedef patojenler ve biyofilmler üzerindeki spesifik biyoaktivitesinin kontrollü, tekrarlanabilir ve doğrudan analiz edilmesine olanak tanımaktadır.

Postbiyotik metabolitler, lipid ve glukoz metabolizmasının homeostatik regülasyonunda çok yönlü biyokimyasal mekanizmalarla görev almaktadır. Enteroendokrin L hücrelerindeki G-protein kenetli reseptörleri (GPCR) uyararak glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) sekresyonunu tetikleyen KZYA'lar; glukoza bağımlı insülin salınımını optimize ederken hepatik de novo

lipogenezi baskılamaktadır (Oteng ve Liu, 2023). Eş zamanlı olarak, butiril-CoA üzerinden asetil-CoA'ya dönüştürülerek doğrudan mitokondriyal trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılan bütirat, hücresel enerji sensörleri olan AMPK (AMP-activated protein kinase) ve PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) yolaklarını aktive ederek anabolik yağ depolanmasını sınırlandırmakta, mitokondriyal yağ asidi β-oksidasyonunu ve periferal glukoz alımını yukarı yönlü regüle etmektedir (Şekil 1; Gao vd., 2009; den Besten vd., 2015; Zheng vd., 2022). Bu moleküler mekanizmalar, postbiyotik metabolitlerin insülin duyarlılığını artırma ve hiperlipidemiyi sınırlandırma yoluyla metabolik sendrom ve tip 2 diyabet gibi patolojilerde koruyucu bir terapötik potansiyel sunduğuna işaret etmektedir.



Şekil 1. Bir KZYA olan bütirat molekülünün mitokondrideki enerji metabolizmasına katılışı (Trefely vd., 2020).

KZYA'lar, hücresel antioksidan yanıt elementlerine (ARE) bağlanan Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu indükleyerek hücre içi redoks homeostazisinin korunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Cuciniello vd., 2023). Bağırsak mikrobiyota kompozisyonu ile reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri arasında dinamik bir denge bulunmaktadır (Yardeni vd., 2019). Düşük konsantrasyonlarda hücresel sinyal iletiminde haberci moleküller olarak işlev gören ROS'lar, aşırı biriktiğinde lipid peroksidasyonuna ve hücresel hasara yol açmaktadır. Bu bağlamda postbiyotik metabolitler, hücresel mikroçevreye ve doza bağlı olarak bağlam-bağımlı (context-dependent) bir redoks yanıtı oluşturmaktadır. Örneğin *Lactiplantibacillus plantarum (*eski adıyla *Lactobacillus plantarum)* kaynaklı metabolitlerin, fizyolojik koşullardaki sağlıklı hücrelerde savunma mekanizmalarını tetikleyecek düzeyde kontrollü ROS sinyalleşmesini uyardığı; inflamatuar

stres altındaki hücrelerde ise anti-inflamatuar yolakları aktive ederek aşırı ROS üretimini baskıladığı gösterilmiştir (Wu vd., 2024).

Benzer şekilde, hücresiz süpernatantlarda bulunan L-laktat gibi ara metabolitler, hücresel ihtiyaca göre NADPH oksidaz (NOX) enzimlerini modüle edebildiği gibi, laktat dehidrojenaz (LDH) aracılığıyla piruvata dönüşüp TCA döngüsü üzerinden NADH/$FADH_2$ açığa çıkararak glutatyon redüktaz (GSR) bağımlı antioksidan savunma sistemini de destekleyebilmektedir (Iatsenko vd., 2018). Ayrıca kommensal mikroorganizmalar, diyet kaynaklı kompleks fenolik bileşikleri enzimatik olarak transforme ederek biyoyararlanımı yüksek, bağırsak bariyerini kolaylıkla aşabilen ve sistemik antioksidan kapasite sunan biyoaktif postbiyotik formlara dönüştürmektedir (Almahbashi ve Altuntas, 2025).

Aşırı ROS üretimi ve fosfolipid membranlarda meydana gelen lipid peroksidasyonu, hücre zarı bütünlüğünü bozarak Hasarla İlişkili Moleküler Paternlerin (DAMPs) hücre dışına salınmasına neden olmaktadır. Bu durum NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetikleyerek romatoid artrit, ateroskleroz ve nörodejeneratif patolojiler gibi kronik inflamatuar süreçleri başlatmaktadır (Yin vd., 2022). Alzheimer hastalığı patogenezinde, ekstraselüler amiloid-β (Aβ) agregatları mikroglia ve astrositleri uyararak mitokondriyal disfonksiyonu ve pro-inflamatuar kaskadı hızlandırmaktadır (Heneka vd., 2025; Li vd., 2024).

Postbiyotik bütirat; sergilediği HDAC inhibitörü aktivite ve Nrf2 yolağı indüksiyonu sayesinde antioksidan enzim ekspresyonunu artırmakta ve mikroglial hücrelerin pro-inflamatuar M1 fenotipinden, doku onarımı ve fagositoz kapasitesi yüksek anti-inflamatuar M2 fenotipine geçişini (mikroglial repolarizasyon) sağlamaktadır (Ziabska vd., 2026). M2 fenotipindeki mikroglialar, Aβ plaklarının ve hücresel debrisin fagositozla klirensini hızlandırırken, nöronal sağkalımı, sinaptik plastisiteyi ve bilişsel fonksiyonları destekleyen BDNF (brain-derived neurotrophic factor) sentezini artırmaktadır. Klinik çalışmalar, 12 haftalık probiyotik/postbiyotik desteğinin serum BDNF düzeylerinde %36'lık bir artış sağladığını, süperoksit dismutaz (SOD) seviyelerini yükselttiğini ve pro-inflamatuar IL-1β konsantrasyonunu anlamlı derecede azalttığını doğrulamaktadır (Hsu vd., 2024).

Postbiyotik metabolitlerin sistemik ve immünolojik etkilerinin yanı sıra doğrudan patojen bakteriler ve bunların oluşturduğu dirençli biyofilm tabakaları üzerindeki inhibe edici aktiviteleri, çalışmanın temel odağını oluşturmaktadır. Hücresiz süpernatant formundaki postbiyotik fraksiyonların, klinik açıdan yüksek risk taşıyan metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında, serbest (planktonik) hücre proliferasyonunu baskılamanın ötesinde, bakterilerin yüzey adezyonunu ve

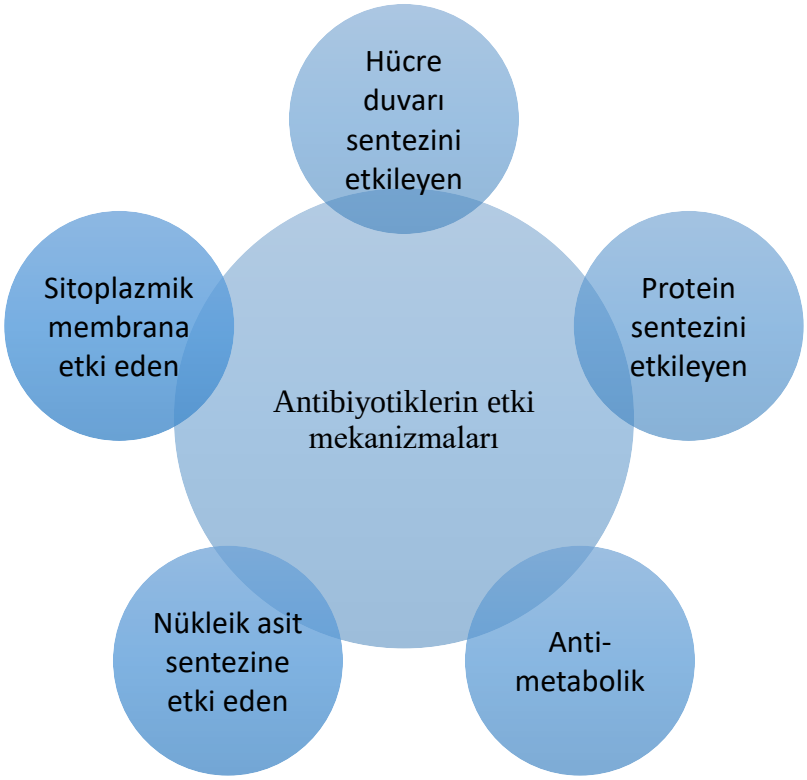
biyofilm olgunlaşmasını anlamlı düzeyde engellediği saptanmıştır (Le vd., 2025). Postbiyotik metabolitlerin anti-biyofilm etki mekanizmasında, bakteriler arası iletişimi ve virülans faktörlerinin ekspresyonunu koordine eden Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama- QS) sistemlerinin baskılanması belirleyici rol oynamaktadır. Nitekim subterapötik (sub-MİK) konsantrasyonlarda uygulanan *Lactobacillus casei* kaynaklı hücresiz süpernatantların, dirençli *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarında QS regülasyonundan sorumlu lasR/lasI, rhlR/rhlI ve pqsA/pqsR gen ekspresyonlarını aşağı yönlü regüle ettiği gösterilmiştir (Azami vd., 2022). Benzer biçimde *Lactiplantibacillus plantarum* kökenli postbiyotik metabolitlerin de konsantrasyona bağımlı olarak *Enterococcus faecalis* kaynaklı biyofilm biyokütlesini ve EPS matriks bütünlüğünü güçlü bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (Saedi vd., 2025).

Postbiyotik fraksiyonların en kritik biyoaktif bileşenlerinden olan bakteriyosinler, başta laktik asit bakterileri (LAB) olmak üzere mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ribozomal antimikrobiyal peptitlerdir. Geleneksel antibiyotiklerin aksine dar ve türe özgü bir etki spektrumu sergileyen bu moleküller, yerleşik kommensal mikrobiyotaya zarar vermeden hedef patojenleri seçici olarak inhibe edebilmektedir. Bu yüksek hedef seçicilikleri sayesinde bakteriyosinler, çoklu ilaca dirençli (MDR) patojenlerin kontrolünde konvansiyonel ajanlara güçlü bir biyoterapötik alternatif sunmaktadır (Thoda ve Touraki, 2023). Dirençli patojenler antimikrobiyallere karşı çok katmanlı savunma stratejileri geliştirmektedir. Toksin-antitoksin (TA) sistemleri, hücresel stres koşullarında labil (kararsız) antitoksinin yıkılması ve serbest toksinin metabolik aktiviteyi durdurmasıyla bakteriyi dormansi/persister fenotipine sokarak fenotipik ilaç toleransı sağlamaktadır (Jurenas vd., 2022). Membrana yerleşik aktif dışa akım (efflux) pompaları ise antibiyotikleri hücre dışına pompalayarak hücre içi ilaç konsantrasyonunu düşürmektedir. Bu noktada postbiyotik fraksiyonlardaki polifenolik bileşikler doğal efflux pompa inhibitörleri (EPI) olarak görev yapabilmektedir (Duda-Madej vd., 2025). Ek olarak β-laktamazlar, karbapenemazlar ve modifiye edici enzimler, antibiyotiğin kimyasal yapısını hidrolize ederek ilacı enzimatik yoldan inaktive etmektedir (Gargate vd., 2025).

Konvansiyonel antibiyotikler hücresel etki mekanizmalarına göre, hücre duvarı sentezi, sitoplazmik membran bütünlüğü, ribozomal protein sentezi, nükleik asit fonksiyonları ve folat metabolizması (antimetabolitler) olmak üzere beş ana sınıfta toplanmaktadır (Şekil 2). Patojenlerin, bu klasik hedeflerin tamamına karşı direnç ve biyofilm koruması geliştirmesi, membran lizisini çoklu noktalardan tetikleyen bakteriyosinler, QS inhibitörleri ve organik

asitleri içeren liyofilize postbiyotik metabolit havuzunun yeni nesil çok hedefli (multi-target) biyoterapötikler olarak geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Bakteriyel patojenlerde genetik direnç mutasyonlarının bulunmadığı durumlarda dahi TA sistemleri fenotipik toleransı tetikleyebilmektedir. Nitekim *Weissella cibaria* modelinde, Bro-Xre TA sisteminin tetrasiklin maruziyeti altında aktive olarak bakteriyi persister (dormansi) fenotipine yönlendirdiği ve hücresel sağkalımı sağladığı gösterilmiştir (Xiang vd., 2024). Buna karşın, *Lactobacillus* kaynaklı postbiyotik metabolitlerin, üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC) suşlarında genetik kökenli olmayan persister hücre oluşumunu, aktif dışa akım (efflux) pompa aktivitesini ve biyofilm biyokütlesini baskılayarak konvansiyonel antibiyotiklerle güçlü bir sinerjik etkinlik sergilediği bildirilmiştir (Nair vd., 2026). Bu bulgular, postbiyotiklerin antibiyotik etkinliğini artıran ve direnç gelişimini sınırlandıran adjuvan ajanlar olarak yüksek potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır.



Şekil.2. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırma.

Bakteriyosinler, yapısal ve biyosentetik özelliklerine göre temel olarak lantibiyotikler (Sınıf I) ve non-lantibiyotikler (Sınıf II) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır. Lantibiyotikler, translasyon sonrası modifikasyonlar (PTM) sonucu oluşan ve lantiyonin/β-metillantiyonin halka yapıları içeren moleküller olup, özellikle çoklu ilaca dirençli (MDR)

Gram-pozitif patojenlere karşı yüksek afinite ve stabilite sergilemektedir. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen ve prototipik bir lantibiyotik olan nişin, geniş bir patojen panelinde test edilen 575 suşun 309'unda anlamlı büyüme inhibisyonu sağlamıştır (Charest vd., 2024). Ayrıca bakteriyosinlerin, in vitro koşullarda epitelyal ve endotelyal bariyerleri herhangi bir sitotoksik hasar oluşturmaksızın aşabildiği ve kommensal hücreler üzerinde yüksek biyouyumluluk profili sunduğu belirlenmiştir (Dreyer vd., 2019).

Bakteriyosinlerin birincil antimikrobiyal etki mekanizması, hedef bakteri membranında stabil porlar oluşturarak hücre içi iyon dengesini bozmaya ve proton-itici kuvveti (proton motive force - PMF) tüketerek hücresel ATP sentezini durdurmaya dayanmaktadır (Sugrue vd., 2024). Bu litik aktivite, üretici suşa ortamdaki duyarlı komşu mikroorganizmalara karşı belirgin bir ekolojik rekabet üstünlüğü kazandırmaktadır. Nitekim kolisin (bakteriyosin) üreten *E. coli* suşlarının, kolisinojenik olmayan suşlara kıyasla streptomisin baskısı altındaki kolonik mikroçevrede çok daha yüksek yoğunlukta kolonize kaldığı, benzer şekilde *Enterococcus faecium* KH24 tarafından salınan bakteriyosinlerin gastrointestinal lümendeki *Lactobacillus* popülasyonunu ve genel mikrobiyal homeostaziyi pozitif yönde modüle ettiği gösterilmiştir (Bhardwaj vd., 2010).

2.4. *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum, insan gastrointestinal mikrobiyotasında ve fermente gıda ekosistemlerinde yaygın olarak bulunan, Gram-pozitif, fakültatif heterofermentatif ve mikroaerofilik çubuk şeklinde bir laktik asit bakterisidir. 15–45 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilme kabiliyeti ve yüksek asit/safra tuzu toleransı, suşun gastrointestinal lümendeki zorlu fizikokimyasal koşullara adaptasyonunu kolaylaştırmaktadır. Geniş bir karbonhidrat fermantasyon kapasitesine ve zengin bir yüzey protein repertuvarına sahip olan *L. plantarum*, konakçı epitel hücrelerine yüksek adezyon kabiliyeti sergileyerek patojen kolonizasyonuna karşı mukozal bariyeri desteklemekte ve mikrobiyota temelli biyoterapötik yaklaşımlar için model bir mikroorganizma niteliği taşımaktadır (MC de Vries vd., 2006; Hao vd., 2024).

L. plantarum kaynaklı postbiyotik fraksiyonların antimikrobiyal kapasitesi, büyük ölçüde plantarisin (PlnA, PlnEF, PlnJK, Plantarisin NC8 vb.) adı verilen ribozomal sentezli bakteriyosin havuzuna dayanmaktadır. Bu biyoaktif peptitler, *Staphylococcus aureus* (MSSA/MRSA), *Listeria monocytogenes, Salmonella enterica, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi kritik gıda ve klinik kaynaklı patojenlere karşı güçlü bir bakterisidal/bakteriyostatik profil sergilemektedir (Field vd., 2016; Azzahra vd., 2025).

Özellikle çoklu ilaca dirençli (MDR) *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarında, plantarisin maruziyetinin biyofilm oluşumunu %59 oranında azalttığı ve biyofilm ilişkili protein geninin (bap) ekspresyonunu %52 düzeyinde baskıladığı saptanmıştır (Javadi vd., 2025).

L. plantarum hücresiz süpernatantlarının antimikrobiyal gücü yalnızca bakteriyosinlerle sınırlı kalmayıp, laktat, asetat ve diğer KZYA'lar gibi küçük molekül ağırlıklı organik asitlerin sinerjisiyle desteklenmektedir. Bakteriyosin por oluşumuna karşı sterik bir bariyer oluşturan Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS) dış membranı, ortamdaki organik asitlerin protonasyonu ve pH düşüşü ile destabilize edilmektedir. Bu durum membran geçirgenliğini artırarak peptitlerin ve biyoaktif metabolitlerin hücre içine difüzyonunu kolaylaştırmaktadır (Danilova vd., 2019). Nitekim *L. plantarum* postbiyotiklerinin hem *Enterococcus faecalis* hem de gram negatif olan *P. aeruginosa* suşlarında direnç gen ekspresyonlarını regüle ettiği, hücre dışı EPS bütünlüğünü bozduğu ve doza bağımlı olarak biyofilm biyokütlesini anlamlı düzeyde inhibe ettiği gösterilmiştir (Yang vd., 2023; Nezhadi ve Ahmadi, 2024; Narang vd., 2025).

2.5. *Lactobacillus gasseri*

Lactobacillus gasseri, insan gastrointestinal ve ürogenital mikrobiyotasının yerleşik kommensal türlerinden biri olup anne sütünden de izole edilebilen önemli bir probiyotiktir. Konakçı mukozasında immünomodülatör ve antienflamatuar aktiviteleri kontrollü şekilde regüle etme yeteneğine sahiptir (Wang vd., 2024; Zhang vd., 2024). Özellikle sağlıklı vajinal mikrobiyotada baskın laktobasil türleri arasında yer almakta ve bakteriyel vajinoz (BV) insidansı ile negatif bir korelasyon sergilemektedir (Heravi S. vd., 2024). Koruyucu etki, laktik asit üretimiyle sağlanan asidik mikroçevre, hidrojen peroksit (H_2O_2) salınımı, epitel yüzeyine spesifik adezin proteinleri aracılığıyla yüksek tutunma kapasitesi ve patojen kolonizasyonunu engelleyen biyofilm benzeri koruyucu bir tabaka oluşturma kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (Croatti vd., 2022; Zhang vd., 2022).

L. gasseri kaynaklı postbiyotik fraksiyonlar, suşa özgü antimikrobiyal ve biyokimyasal metabolit çeşitliliği ile karakterizedir. Bunların başında, insan mikrobiyomunda tanımlanmış özgün bir tiyopeptit sınıfı antibakteriyel bileşik olan laktosilin (lactocillin) ile ribozomal sentezli bir bakteriyosin olan gasserisin A gelmektedir (Donia vd., 2014). Bunun yanı sıra *L. gasseri* tarafından salgılanan ekstraselüler veziküller (EV), epitel hücreleri ile mikrobiyal adezyon sinyalleşmesini modüle ederek konakçı lehine koruyucu bariyer yanıtlarını tetiklemekte, *Gardnerella vaginalis* veya *Trichomonas vaginalis* kaynaklı pro-inflamatuar EV sinyallerini nötralize etmektedir (Artuyants vd., 2024). Ayrıca hücresiz süpernatanttan izole edilen biyosürfaktanlar ve L-glutaminaz gibi biyoaktif enzimler, hedef mikroorganizmaların yüzey

gerilimini ve metabolik stabilitesini bozarak tekil formda dahi belirgin antimikrobiyal ve anti-biyofilm güç sergilemektedir (Mahdi vd., 2024).

L. gasseri hücresiz süpernatantları ve metabolitleri, *Helicobacter pylori*, ETEC/UPEC, *Staphylococcus aureus, Klebsiella oxytoca* ve *Proteus mirabilis* gibi klinik açıdan kritik patojenlerin hem planktonik büyümesini hem de doku kolonizasyonunu baskılamaktadır (Ushiyama vd., 2003; Gao vd., 2022; Szczerbiec vd., 2024). Anti-biyofilm düzeyinde ise *L. gasseri* biyoaktif metabolitleri ve biyosürfaktanları, *Candida albicans* (vulvovajinal kandidiyazis etkeni), *G. vaginalis* ve *P. aeruginosa* biyofilm biyokütlesini parçalamakta, hücre adezyonunu ve matriks olgunlaşmasını konsantrasyona bağımlı olarak inhibe etmektedir (Das ve Konwar, 2024; Zhang vd., 2022).

Farklı probiyotik türleri, sentezledikleri bakteriyosinler, organik asit profilleri ve hücre dışı vezikül kompozisyonları bakımından heterojen postbiyotik metabolit havuzlarına sahiptir. *L. plantarum* geniş fermantasyon adaptasyonu ve zengin plantarisin repertuvarı ile öne çıkarken, *L. gasseri* laktosilin, gasserisin ve mukozal bariyer adezyon faktörleri gibi insan mikrobiyotasına özgü spesifik metabolitler taşımaktadır. Bu doğrultuda tez çalışmasında, iki farklı model laktobasil suşunun (*L. plantarum* ve *L. gasseri*) hücresiz süpernatant fraksiyonları standardize edilip liyofilize edilerek, dirençli patojenler ve biyofilmler üzerindeki terapötik etkinliklerinin karşılaştırmalı analizi hedeflenmiştir.

2.6. Antibiyotik Dirençli Patojenler

Antimikrobiyal direnç (AMR), patojen mikroorganizmaların genetik ve fizyolojik adaptasyon mekanizmaları geliştirerek standart antimikrobiyal ajanların terapötik etkinliğini bertaraf etmesi durumudur (World Health Organization, 2026). DSÖ ve küresel sağlık otoriteleri tarafından modern tıbbın öncelikli krizlerinden biri olarak nitelendirilen bakteriyel AMR; 2021 yılı itibarıyla küresel ölçekte yaklaşık 1,14 milyon ölümün doğrudan nedeni olmuş ve 4,71 milyon ölümle ilişkilendirilmiştir (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). Bunun yanında, DSÖ'nün 2025 küresel sürveyans raporunda, 2023 yılında bildirilen laboratuvar verileri doğrulanmış bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık altıda birinin antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilmiştir (World Health Organization, 2025). Bu epidemiyolojik tablo, mevcut antibiyotiklerin etkinliğini hızla tüketirken, dirençli patojenlerle mücadelede hücresiz postbiyotik metabolitler gibi yenilikçi biyoterapötik alternatiflerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Bakterilerde antimikrobiyal direnç profili, türün doğuştan sahip olduğu yapısal özelliklere dayanan doğal (intrinsik) direnç veya kromozomal mutasyonlar ile HGT sonucu şekillenen kazanılmış direnç mekanizmalarıyla ortaya çıkmaktadır (Belay vd., 2024). Direnç determinantlarının suşlar arasında hızla yayılmasını sağlayan HGT süreçleri; plazmitler aracılığıyla hücreler arası fiziksel temasla yürütülen konjugasyon, çevredeki serbest DNA parçalarının yetkin hücrelerce genoma dahil edildiği transformasyon ve bakteriyofajlar vasıtasıyla gen taşınmasını kapsayan transdüksiyon yolakları üzerinden gerçekleşmektedir (Wachino vd., 2025).

Patojenlerin antibiyotik baskısını aşmak için geliştirdiği biyokimyasal savunma stratejileri temelde beş ana eksende toplanmaktadır. Bu mekanizmalar; penisilin bağlayan proteinler (PBP) veya ribozomal bölgeler gibi hedef yapıların afinitesini düşüren modifikasyonlar, β-laktamazlar ve modifiye edici enzimler aracılığıyla antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu, hücre içine giren ilacın enerji-bağımlı efflux sistemleriyle dışarı pompalanması, dış membran porinlerinin kapatılarak geçirgenliğin azaltılması ve bakterilerin EPS içerisine organize olarak antimikrobiyal penetrasyonunu engelleyen dirençli biyofilm yapıları ile persister fenotipleri oluşturmasıdır (Abbas vd., 2024; Liu vd., 2024). Bu kapsamda, çalışmada farklı Gram özelliklerine, antibiyotik direnç mekanizmalarına ve biyofilm oluşturma kapasitelerine sahip *Escherichia coli* ATCC 35218, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665, postbiyotik metabolitlerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliklerinin farklı patojen modelleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla seçilmiştir.

2.6.1. *Escherichia coli* ATCC 35218

Gram-negatif, çomak (basil) morfolojisine sahip ve fakültatif anaerob özellik gösteren bu model suş, flagella yapıları aracılığıyla aktif motilite sergilemektedir. β-laktam grubu antibiyotiklerin temel etki mekanizması, hücre duvarı peptidoglikan sentezinde çapraz bağlanmayı sağlayan transpeptidaz enzimlerini (penisilin bağlayan proteinler, PBP'ler) inhibe etmektir. Bu antibiyotiklere karşı direnç ise β-laktamaz enzimlerinin β-laktam halkasını hidroliz ederek antibiyotiği etkisizleştirmesi gibi mekanizmalarla gelişebilmektedir. Bakteriyel genomda varlığı doğrulanmış olan *bla*TEM-1 direnç geni, β-laktamaz sentezini kodlayarak organizmanın β-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine katkıda bulunmaktadır (Anorue vd., 2025). Kronik ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarının patogenezinde rol alan üropatojen bakterilerde biyofilm oluşumu, antimikrobiyal ajanların ekstraselüler matrikse

difüzyonunu sınırlandırarak klinik tedaviyi güçleştiren temel bir faktördür (Reddy ve Ramnani, 2024). Karşılaştırmalı biyofilm analizlerinde yüksek biyokütle oluşturma kapasitesi sergileyen ve genetik direnç altyapısı ayrıntılı olarak tanımlanmış olan bu suş, standart bir direnç ve biyofilm modeli niteliği taşımaktadır (Barzdina vd., 2026).

2.6.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylococcus aureus, nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlar, cerrahi alan ve derin yara enfeksiyonları, apseler ile yoğun bakım ünitelerinde gelişen sistemik komplikasyonların önde gelen patojenleri arasında yer almaktadır (Salmanton-García vd., 2024; Osman vd., 2024). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının sergilediği direnç fenotipi, temelde kromozomal olarak taşınan mecA geni tarafından kodlanan alternatif bir transpeptidaz olan Penisilin Bağlayan Protein 2a (PBP2a) sentezine dayanmaktadır (Du Toit, 2025). Standart koşullarda β-laktam grubu antibiyotikler doğal PBP enzimlerine bağlanarak hücre duvarı peptidoglikan sentezini bloke ederken, PBP2a proteini bu antibiyotiklere karşı oldukça düşük bağlanma afinitesi sergilemekte ve antibiyotik baskısı altında dahi hücre duvarı transpeptidasyon reaksiyonunun kesintisiz sürdürülmesini sağlamaktadır (Lade ve Kim, 2021).

DSÖ tarafından yeni antimikrobiyal ve biyoterapötik stratejilerin geliştirilmesinde yüksek öncelikli patojenler arasında tanımlanan MRSA, duyarlı suşlardan farklı olarak SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome mec) adı verilen mobil bir genetik kaset taşımaktadır (World Health Organization, 2024; Fang vd., 2024). Bu kromozomal element, yapısal mecA geninin yanı sıra ekspresyonu kontrol eden transmembran sinyal iletici mecR1 ve transkripsiyonel baskılayıcı mecI regülatör genlerini, ayrıca kasetin bakteriyel kromozoma entegrasyonu ve eksizyonunu yöneten bölgeye özgü rekombinaz genlerini (ccrA, ccrB, ccrC) içermektedir (Shore vd., 2011). SCCmec bölgesinin HGT ile yayılabilmesi ve diğer antibiyotik sınıflarına ait direnç determinantlarını da barındırabilmesi, MRSA izolatlarında çoklu ilaç direnci (MDR) gelişimini hızlandırmakta ve konvansiyonel tedavilerin klinik başarısını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır (World Health Organization Regional Office for Europe, 2024; Miao vd., 2017). MRSA'nın, kronikleşen enfeksiyonlarında tedavi başarısını etkileyen bir diğer önemli özelliği de biyofilm oluşturma kapasitesidir. Bu süreç, yüzeylere adezyon, hücresel çoğalma, matriks oluşumu ve olgunlaşma aşamalarını içeren çok aşamalı bir süreçtir. Biyofilm gelişimi esnasında, bakteriyel hücrelerin oluşturduğu EPS, antimikrobiyal ajanların hücrelere ulaşımını sınırlandırarak bakterilerin tedaviye karşı toleransını artırabilmektedir. Bu süreç,

enfeksiyonların persistan (kalıcı) hale gelmesi ve tekrarlayan bir seyir göstermesine katkıda bulunabilmektedir (Aboelnaga vd., 2024).

2.6.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665

Gram-pozitif diplokok morfolojisine sahip olan *Streptococcus pneumoniae* (özellikle hastalık yapıcı-antibiyotik direnç çalışmalarında kullanılan referans suş ATCC BAA-1665), küresel ölçekte toplum kökenli pnömoni, invaziv bakteriyemi ve sağkalanlarda %50'ye varan kalıcı nörolojik hasara yol açabilen bakteriyel menenjitin birincil etkenleri arasındadır (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2026). Ayrıca otitis media ve sinüzit gibi yaygın mukozal enfeksiyonların da temel kaynağı olan bu patojen, artan direnç oranları ve yüksek morbidite/mortalite yükü sebebiyle DSÖ tarafından küresel ölçekte öncelikli patojenler listesinde tanımlanmaktadır (World Health Organization, 2024).

Netherlands7F-39 (ST191) klonal soyunda veya bu klonla ilişkili pnömokoklarda farklı antibiyotik sınıflarına karşı direnç, birden fazla moleküler mekanizmanın birlikte etkisiyle gelişmektedir. β-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç, MRSA'daki gibi ekzojen bir protein kazanımından ziyade, yapısal transpeptidaz enzimlerini kodlayan genlerdeki mutasyonel yeniden yapılanma (pbp1a, pbp2x ve pbp2b mutasyonları) sonucu antibiyotiğin bağlanma afinitesinin düşmesiyle gerçekleşmektedir (Zhang vd., 2026). Makrolid grubu antibiyotiklere karşı direnç ise hem erm(B) geni tarafından kodlanan rRNA adenin N-6-metiltransferaz enziminin 23S rRNA alt birimini metillemesi (hedef bölge modifikasyonu) hem de mef(A) ve mef(E) genleri tarafından eksprese edilen aktif dışa akım (efflux) pompa sistemleri aracılığıyla sağlanmaktadır (Zahari vd., 2023).

S. pneumoniae'nin biyofilm oluşturma yeteneği, antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen fenotipik toleransı belirgin şekilde artırmaktadır (Sun vd., 2023). Planktonik hücrelere kıyasla biyofilm mimarisine geçen bakterilerde 700'den fazla gende diferansiyel ekspresyon değişikliği meydana gelmekte, matriks içindeki yüksek hücre yoğunluğu ve genetik yetkinlik (kompetans), mobil genetik elementler üzerindeki direnç determinantlarının HGT ile aktarımını hızlandırmaktadır (Chao vd., 2015).

2.7. Biyofilm

Biyofilm, mikroorganizmaların biyotik veya abiyotik yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunarak kendi sentezledikleri EPS içerisine organize olduğu kompleks toplulukları ifade etmektedir (Flemming vd., 2025). Başta polisakkaritler olmak üzere yapısal proteinler ve ekstraselüler DNA'dan oluşan bu matriks yapısı, antimikrobiyal ajanların hücrelere

difüzyonunu fiziksel ve elektrostatik olarak kısıtlayan dinamik bir bariyer işlevi görmektedir (Liu vd., 2024). Deneysel çalışmalar, antibiyotik konsantrasyonunun biyofilmin iç katmanlarına doğru belirgin şekilde azaldığını, oluşan bu konsantrasyon gradyanının ve derin tabakalardaki metabolik kısıtlılığın bakterileri persister fenotipe yönlendirerek planktonik hücrelere kıyasla çok daha yüksek bir tolerans sağladığını ortaya koymaktadır (Daffinee vd., 2023; Pai vd., 2023).

Biyofilm biyokütlesinin olgunlaşması ve virülans faktörlerinin senkronize ekspresyonu, popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak çalışan hücreler arası kimyasal iletişim mekanizması olan QS tarafından yönetilmektedir. Gram-negatif bakterilerde sinyal iletimi; LuxI-tipi sentazlar tarafından sentezlenen N-açil homoserin lakton (AHL) moleküllerinin LuxR reseptörlerine bağlanarak hedef gen transkripsiyonunu başlatması esasına dayanmaktadır (Soto-Aceves vd., 2023). Gram-pozitif bakterilerde ise iletişim, oto-indükleyici peptitlerin (AIP) hücre dışına salınması ve eşik konsantrasyona ulaşıldığında membrana bağlı iki bileşenli histidin kinaz reseptörleri tarafından algılanmasıyla yürütülmektedir. Stafilokoklarda tanımlanan agrABCD operon sistemi bu peptit aracılı regülasyonun en temel örneğidir (Williams, 2025).

Sesil biyofilm mimarisi; kateterler, idrar sondaları, kardiyak implantlar, ortopedik protezler ve endoskoplar gibi invaziv tıbbi cihaz yüzeylerine kolonize olarak tedavisi son derece güç nozokomiyal ve kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır (Domouchtsidou vd., 2025). Biyofilmlerin oluşturduğu riskler klinik alanla sınırlı kalmayıp, DSÖ tarafından su güvenliği raporlarında vurgulanan şebeke boru hatlarındaki kolonizasyonların yanı sıra süt ve et işleme hatları başta olmak üzere tüm gıda endüstrisinde kalıcı kontaminasyon rezervuarlarına yol açmaktadır (Oliveira vd., 2024; LaPointe vd., 2025). Hem klinik hem de endüstriyel boyuttaki bu yaygın tehdit profili, klasik antibiyotiklerin yetersiz kaldığı biyofilm bariyerini parçalamak ve QS sistemlerini bloke etmek amacıyla liyofilize postbiyotik metabolitler gibi yenilikçi biyoterapötik stratejilerin geliştirilmesini elzem kılmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Probiyotik Bakterilerin Büyütülmesi, Hücresiz Süpernatant Eldesi ve Liyofilizasyon

Fakültatif anaerobik karakterdeki probiyotik suşlar olan *Lactiplantibacillus plantarum* 299v ve *Lactobacillus gasseri* L10, De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) sıvı besiyerinde (broth) 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda bakteri süspansiyonları, hücresel biyokütleyi metabolit havuzundan ayırmak amacıyla +4 °C'de, 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant fazı toplanarak, olası hücre kalıntılarını ve canlı bakteri geçişini tamamen bertaraf etmek üzere 0,22 µm gözenek çapına sahip polietersülfon (PES) membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir (Sengprasert vd., 2024; Wasiak vd., 2024).

Elde edilen steril hücresiz süpernatantlar (CFS) -80 °C'de derin dondurucuda dondurulduktan sonra, liyofilizasyon cihazı (Freeze Dryer, Biobase, Çin) kullanılarak kurutulmuş ve toz formda postbiyotik ekstraktlar elde edilmiştir. Liyofilize metabolit tozları biyoaktif bileşenlerin stabilitesini korumak amacıyla +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Tüm analizler öncesinde liyofilize ekstreler, ilgili hücre kültürü/deney besiyeri içerisinde 500 mg/mL nihai stok konsantrasyonuna sahip olacak şekilde çözündürülerek (rekonstitüe edilerek) filtre sterilizasyonuyla kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2. Liyofilize Hücresiz Süpernatantın Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan patojen suşlar, Arel Üniversitesi'nden Doç. Dr. Ceren Türkcan tarafından temin edilmiştir. %15 gliserol stoklarında (-80 °C) muhafaza edilen *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 kökenli MRSA ve *Escherichia coli* ATCC 35218 patojen suşları, Triptik Soy Broth (TSB) besiyerinde üç ardışık pasaj yapılarak aktive edilmiştir. *S. pneumoniae* ATCC BAA-1665, ilk aktivasyon aşamasında kanlı agar üzerinde %5 CO_2 atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir. Aktivasyon sonrasında tüm patojen suşlar Triptik Soy Broth (TSB) besiyerinde üç ardışık pasaj yapılarak deneyler için hazırlanmıştır. Aktif bakteri kültürleri, başlangıç bakteri yükünün standardize edilmesi ve farklı uygulama grupları arasında karşılaştırılabilirliğin sağlanması amacıyla 1×10^6 CFU/mL nihai konsantrasyona ayarlanmış ve 96 kuyulu mikroplakalara her bir kuyu için 100 µL hacimde aktarılmıştır.

Liyofilize hücresiz süpernatantlar, 500 mg/mL ana stok konsantrasyonuna göre tartılarak rehidre edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerden hareketle, steril TSB besiyeri içerisinde 10-125 mg/mL çalışma konsantrasyon aralığında seri dilüsyonlar oluşturulmuş ve

patojen süspansiyonları ile birleştirilerek, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Deney tasarımında negatif kontrol olarak bakteri içermeyen steril TSB besiyeri, çözücü/araç kontrolü olarak ise liyofilize edilip aynı protokol ile rehidre edilmiş steril TSB besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda patojenlerin üreme kinetiği ve hücresel canlılığı, mikroplaka okuyucuda 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluk (OD_{600}) ölçümleri ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Cate vd., 2024).

3.2.1. Agar spot assay ile antibakteriyel etkinin değerlendirilmesi

Liyofilize hücresiz süpernatant fraksiyonlarının patojen bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliği, agar spot assay yöntemi kullanılarak görsel/nitel olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla her bir doz çözeltisinden 10 µL alınarak 990 µL steril distile su içeren eppendorf tüplerine aktarılmış ve 1:100 oranında seyreltilerek 10^{-2} dilüsyonu hazırlanmıştır. Aynı işlem ardışık olarak tekrarlanarak 10^{-4}, 10^{-6} ve 10^{-8} dilüsyonları elde edilmiştir. Liyofilize hücresiz süpernatant fraksiyonlarının her bir başlangıç dozundan hazırlanan 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6} ve 10^{-8} dilüsyonlarının 3µL'lik hacimleri Triptic Soy Agar (TSA) besiyerleri yüzeyine spotlanmış ve besiyerleri 37°C'de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan bakteri üremesi fenotipik olarak değerlendirilmiş ve deney sonuçları fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

3.3. Liyofilize Hücresiz Süpernatantın Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Liyofilize hücresiz süpernatant fraksiyonlarının antibiyofilm potansiyeli, mikrodilüsyon bazlı kristal viyole (CV) biyokütle boyama yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Falqueto vd., 2026). Bu işlem, spektrofotmetrik canlılık ölçümünü baz alan (96 kuyulu mikroplate kullanılan) antibakteriyel etkinlik testi akabinde gerçekleştirilmiştir. 96 kuyulu mikroplate içeriğindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve kuyular, yüzeye tutunamayan planktonik hücreleri tamamen arındırmak amacıyla steril distile su (dH_2O) ile üç kez nazikçe yıkanmıştır. Yüzeye yapışan sesil biyofilm tabakasının fiksasyonu için her bir kuyuya 150 µL metanol ilave edilmiş ve plakalar oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra metanol aspire edilerek kuyuların kuruması sağlanmıştır.

Fikse edilen biyofilm biyokütlesi, her bir kuyuya 130 µL %0,1'lik (w/v, dH_2O içinde) CV çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika süreyle boyanmıştır. Süre sonunda serbest ve spesifik olmayan boyayı uzaklaştırmak amacıyla mikroplakalar dH_2O banyosunda daldırma yöntemiyle yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Hücrelere ve EPS matrikse bağlanan kristal viyolenin çözünmesi (elüsyonu) amacıyla kuyulara 130 µL %30'luk (v/v,

dH_2O içinde) asetik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Biyofilm biyokütle miktarı, mikroplaka okuyucu (Multiskan FC, Thermo Scientific) aracılığıyla 550 nm dalga boyunda (OD_{550}) absorbans ölçümü yapılarak tespit edilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

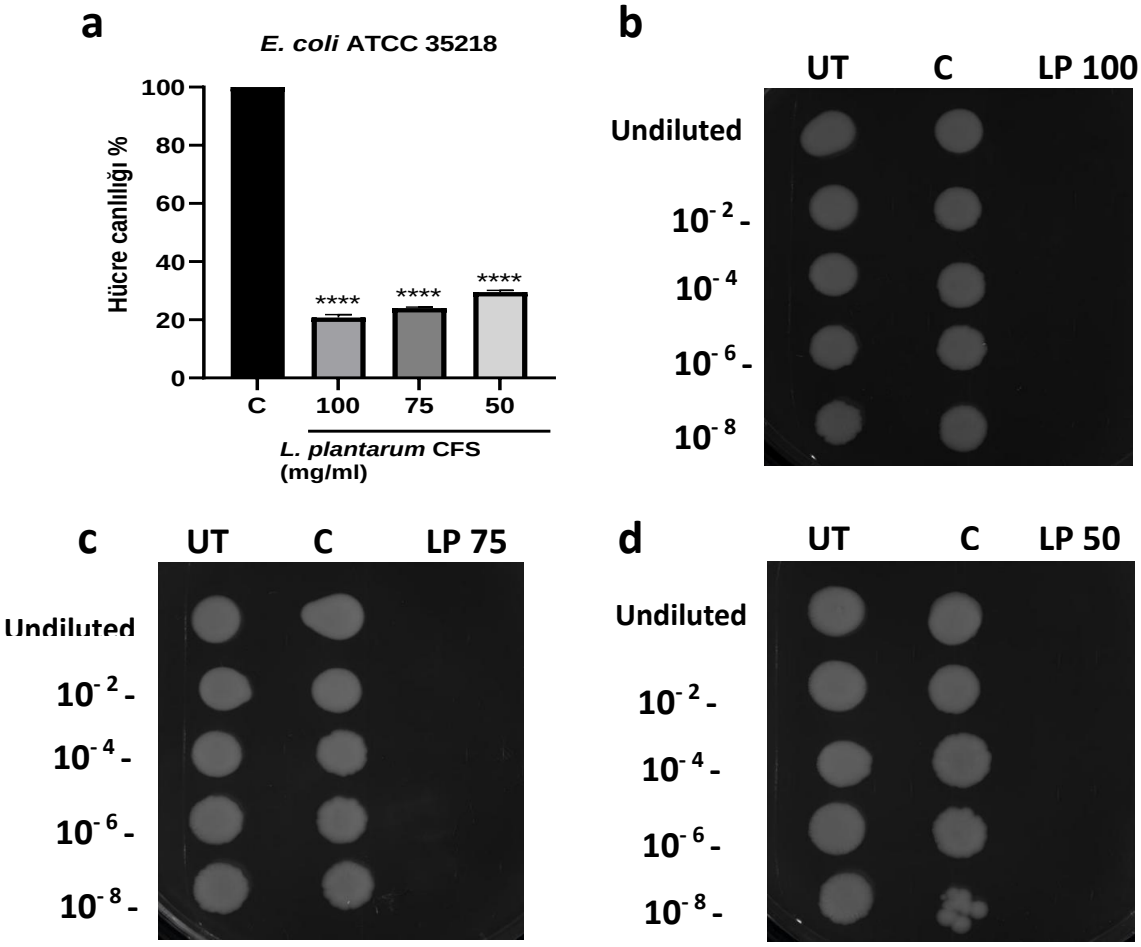
Tüm deneysel çalışmalar en az üç bağımsız biyolojik tekrar ve teknik replikeler ($n \geq 3$) halinde yürütülmüştür. Analizlerden elde edilen kantitatif verilerin istatistiksel değerlendirmeleri ve grafiksel gösterimleri GraphPad Prism (v11.0, GraphPad Software, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde Ordinary One-way ANOVA testi uygulanmıştır. Analiz öncesinde verilerin normallik ve varyans homojenliği varsayımları değerlendirilmiştir. One-way ANOVA sonucunda anlamlı farklılık saptanması durumunda, kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla Dunnett çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Tanımlayıcı istatistiksel veriler ortalama ± standart hata (Mean ± SEM) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiş; şekil/grafiklerdeki anlamlılık düzeyleri, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$ şeklinde gösterilmiştir.

4. BULGULAR

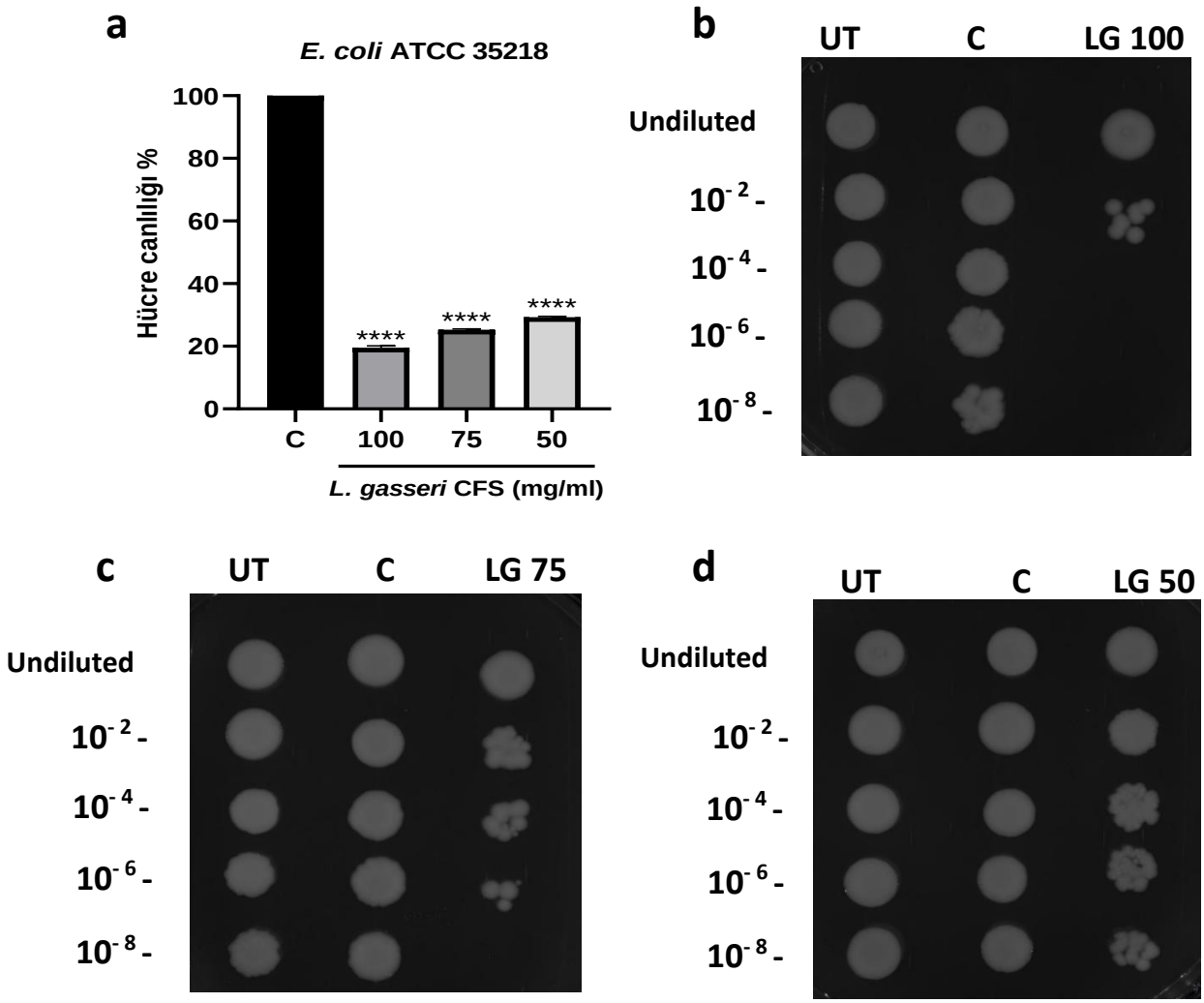
4.1. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

4.1.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etki

L. plantarum 299v ve *L. gasseri* L10 suşlarından elde edilen hücresiz süpernatantların (CFS), model Gram-negatif dirençli patojen olan *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerindeki antibakteriyel inhibitör aktivitesi, seri dilüsyon (10^{-2} ila 10^{-8}) basamaklarını içeren agar spot yöntemi ve spektrofotometrik hücre canlılığı analizleri ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3 ve Şekil 4).



Şekil 3. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (50, 75 ve 100 mg/mL) *L. plantarum* CFS uygulamasının *E. coli* hücre canlılığı (%) üzerindeki inhibitör etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (n =4). (Kontrol grubuna kıyasla **** p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 canlılık). İstatistiksel analiz Ordinary One-way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **(b–d)** Farklı konsantrasyonlardaki (sırasıyla 100, 75 ve 50 mg/mL) *L. plantarum* CFS muamelelerine ait agar spot analiz görüntüleri (UT: İşlem uygulanmamış bakteri grubu / untreated, C: CFS uygulanmayan, deneyde kullanılan dozlara karşılık gelen besiyeri koşulları dikkate alınarak hazırlanan ve inkübe edilen bakterisiz kontrol besiyeri grubu, LP: *L. plantarum* CFS uygulanan gruplar).



Şekil 4. *Lactobacillus gasseri* L10 hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (50, 75 ve 100 mg/mL) *L. gasseri* CFS uygulamasının *E. coli* hücre canlılığı (%) üzerindeki inhibitör etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (n=4) (Kontrol grubuna kıyasla **** p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 canlılık). İstatistiksel analiz Ordinary One-way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **(b–d)** Farklı konsantrasyonlardaki (sırasıyla 100, 75 ve 50 mg/mL) *L. gasseri* CFS muamelelerine ait agar spot analiz görüntüleri (UT: İşlem uygulanmamış bakteri grubu / untreated, C: CFS uygulanmayan, deneyde kullanılan dozlara karşılık gelen besiyeri koşulları dikkate alınarak hazırlanan ve inkübe edilen bakterisiz kontrol besiyeri grubu, LG: *L. gasseri* CFS uygulanan gruplar).

L. plantarum CFS uygulamasının *E. coli* ATCC 35218 suşunun proliferasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; artan metabolit konsantrasyonuna paralel olarak bakteriyel canlılıkta doza bağımlı ve istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir azalma kaydedilmiştir ($p < 0,0001$; Şekil 3a). Negatif kontrol grubunda hücre canlılığı %100 kabul edildiğinde, 50 mg/mL CFS maruziyeti patojen canlılığını %29,50 ± 0,65 seviyesine düşürmüştür.

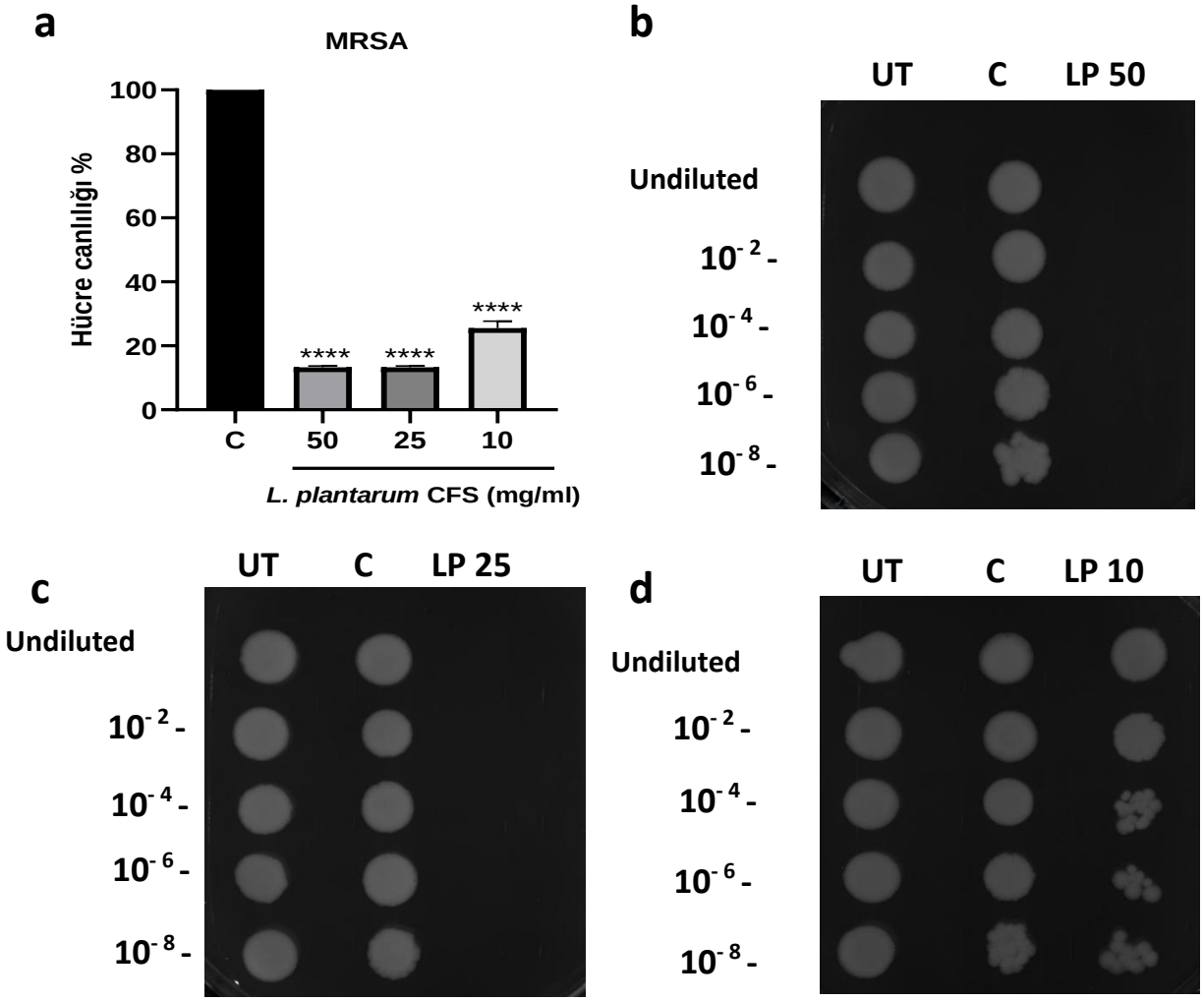
Konsantrasyonun 75 mg/mL ve 100 mg/mL'ye yükseltilmesiyle birlikte hücresel canlılık sırasıyla %24,00 ± 0,41 ve %20,75 ± 1,05 düzeyine gerileyerek yaklaşık %80'lik bir büyüme inhibisyonu sağlanmıştır. Agar spot analizinden elde edilen makroskobik kültür görüntüleri de (Şekil 3b-d), CFS uygulanan gruplarda artan dilüsyon serilerinde koloni yoğunluğunun belirgin biçimde azaldığını ve konsantrasyona bağlı olarak spot alanlarındaki bakteriyel büyümenin baskılandığını doğrulamaktadır.

Benzer şekilde, *L. gasseri* CFS uygulamasının da *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerinde güçlü bir antibakteriyel profil sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4). Kontrol grubu ile kıyaslandığında; 50 mg/mL, 75 mg/mL ve 100 mg/mL *L. gasseri* CFS maruziyeti sonucunda patojen canlılık oranları sırasıyla %29,25 ± 0,50, %25,25 ± 0,50 ve %19,50 ± 1,29 düzeylerinde belirlenmiş olup, tüm doz gruplarında meydana gelen azalma istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$; Şekil 4a). Agar spot plakalarındaki seyreltme serileri incelendiğinde (Şekil 4b-d), işlem görmemiş (UT) ve kontrol gruplarına kıyasla CFS muamelesi yapılan serilerde koloni yoğunluğunda belirgin bir tükenme gerçekleştiği, yüksek dilüsyon basamaklarında ise koloni formasyonunun tamamen sınırlandığı gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde; hem *L. plantarum* hem de *L. gasseri* kaynaklı postbiyotik fraksiyonların, 50 - 100 mg/mL konsantrasyon aralığında Gram-negatif referans patojen *E. coli* üzerinde %70'in üzerinde güçlü bir bakterisidal/bakteriyostatik baskı oluşturduğu ve iki probiyotik suşun antibakteriyel etkinlik profillerinin birbiriyle yüksek düzeyde uyumlu olduğu saptanmıştır.

4.1.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etki

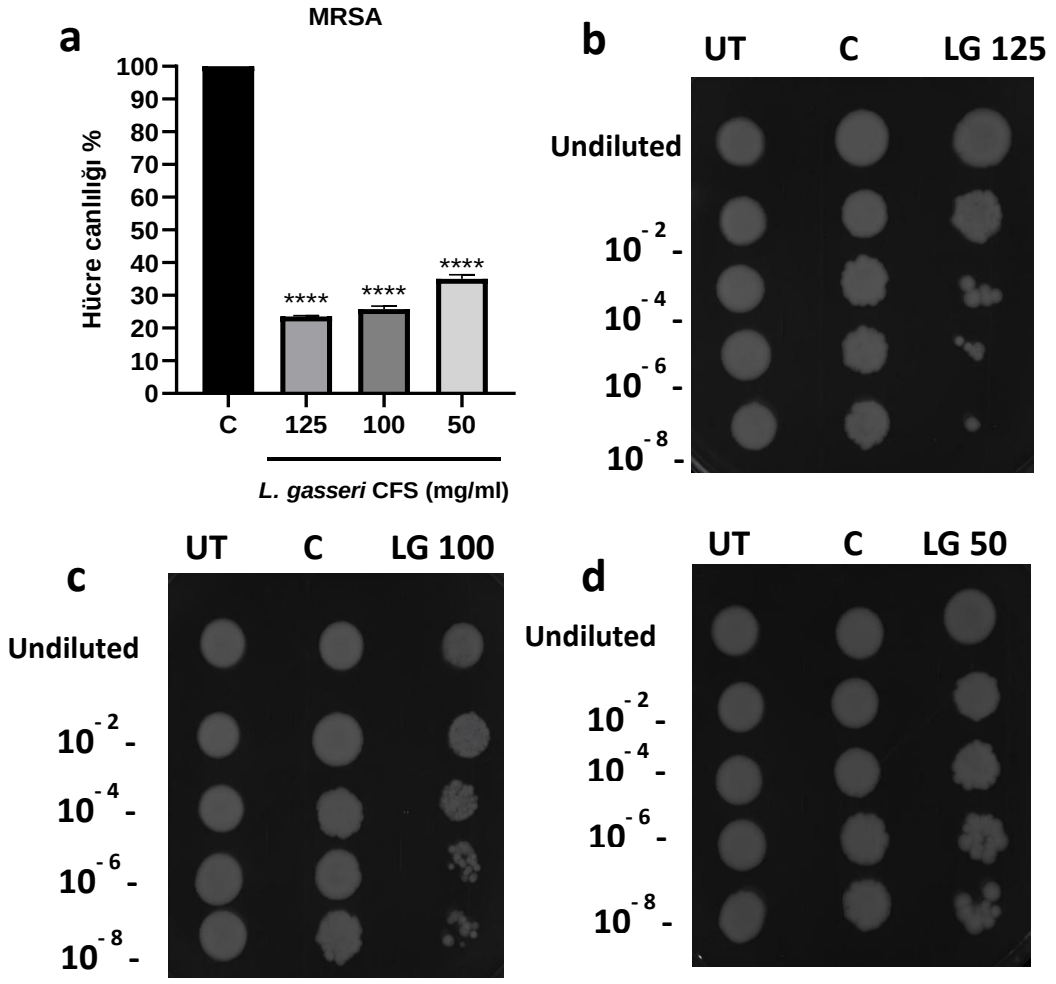
Hücresiz süpernatantların (CFS), klinik öneme sahip Gram-pozitif model dirençli patojen olan metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşu üzerindeki antibakteriyel inhibitör aktivitesi; seri seyreltme basamaklarını içeren agar spot yöntemi ve spektrofotometrik hücre canlılığı analizleri ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5 ve Şekil 6).



Şekil 5. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (10, 25 ve 50 mg/mL) *L. plantarum* CFS uygulamasının MRSA hücre canlılığı (%) üzerindeki doza bağımlı inhibitör etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ±Standart Hata olarak sunulmuştur (n=4) (Kontrol grubuna kıyasla **** p < ,0001; C: Kontrol grubu, %100 canlılık). İstatistiksel analiz Ordinary One-way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **(b–d)** Farklı konsantrasyonlardaki (sırasıyla 50, 25 ve 10 mg/mL) *L. plantarum* CFS muamelelerine ait agar spot analiz görüntüleri (UT: İşlem uygulanmamış bakteri grubu / untreated, C: CFS uygulanmayan, deneyde kullanılan dozlara karşılık gelen besiyeri koşulları dikkate alınarak hazırlanan ve inkübe edilen bakterisiz kontrol besiyeri grubu, LP: *L. plantarum* CFS uygulanan gruplar).

L. plantarum CFS uygulamasının MRSA proliferasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; test edilen tüm konsantrasyonlarda patojen hücre canlılığının kontrol grubuna (C, %100) kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır ($p < 0,0001$; Şekil 5a). Deney sonuçlarına göre; 10 mg/mL konsantrasyondaki en düşük CFS dozu dahi MRSA canlılığını %25,5 ± 2,1 seviyesine gerileterek yaklaşık %75'lik güçlü bir büyüme inhibisyonu sağlamıştır. Konsantrasyonun 25 mg/mL ve 50 mg/mL'ye yükseltilmesiyle birlikte patojen canlılık oranları sırasıyla %13,25 ± 0,7 ve %13,25 ± 0,6 düzeylerine inmiş, her iki üst doz grubunda birbirine yakın ve maksimum düzeyde (%86,75) bir antibakteriyel baskılanma platosu elde edilmiştir. Agar spot plakalarındaki seyreltme basamakları (10^{-2} - 10^{-8})

incelendiğinde de (Şekil 5b–d), 10 mg/mL grubunda yüksek seyreltmelerde seyrek koloniler gözlenirken, 25 ve 50 mg/mL uygulanan serilerde koloni formasyonunun belirgin şekilde ortadan kalktığı tespit edilmiş ve agar spot görüntüleri kantitatif canlılık verileriyle tam bir uyum sergilemiştir.



Şekil 6. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (50, 100 ve 125 mg/mL) *L. gasseri* CFS uygulamasının MRSA hücre canlılığı (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (n=4) (Kontrol grubuna kıyasla ****p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 canlılık). İstatistiksel analiz Ordinary One-way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **(b–d)** Farklı konsantrasyonlardaki (sırasıyla 125, 100 ve 50 mg/mL) *L. gasseri* CFS muamelelerine ait agar spot analiz görüntüleri (UT: İşlem uygulanmamış bakteri grubu / untreated, C: CFS uygulanmayan, deneyde kullanılan dozlara karşılık gelen besiyeri koşulları dikkate alınarak hazırlanan ve inkübe edilen bakterisiz kontrol besiyeri grubu, LG: *L. gasseri* CFS uygulanan gruplar).

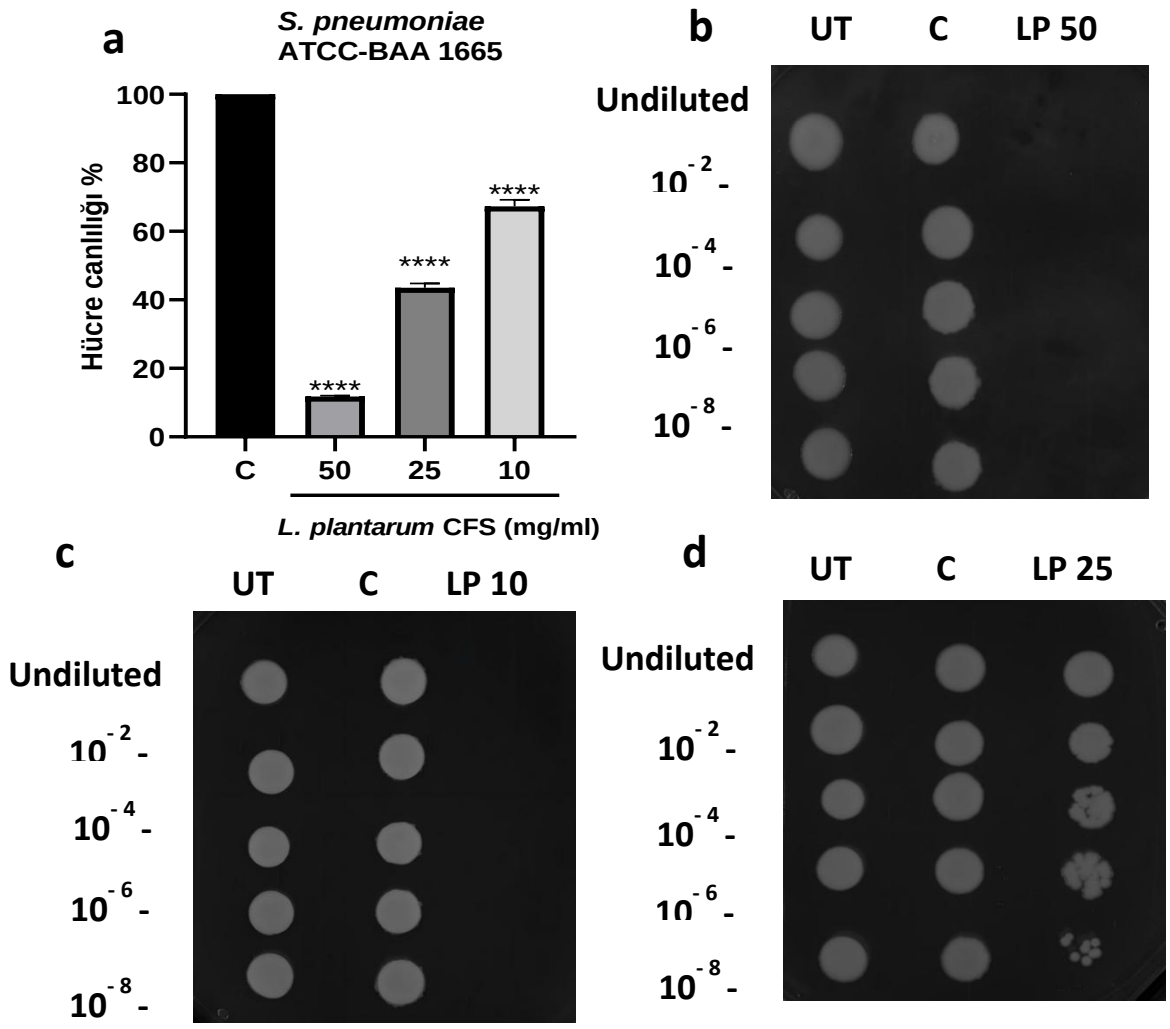
L. gasseri CFS uygulamasının MRSA canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde ise, artan konsantrasyona paralel olarak doza bağımlı ve anlamlı bir antibakteriyel aktivite kaydedilmiştir ($p < 0,0001$; Şekil 6a). Kontrol grubuyla kıyaslandığında; 50 mg/mL *L. gasseri* CFS maruziyeti patojen canlılığını %35,0 ±1,4 seviyesine düşürmüştür. Dozun 100 mg/mL ve

125 mg/mL'ye çıkarılması durumunda ise hücre canlılığı sırasıyla %25,8 ± 1,3 ve %23,5 ± 0,7 düzeylerine gerilemiştir. Agar spot analizinden elde edilen kültür görüntüleri (Şekil 6b–d), işlem uygulanmamış bakteri (UT) ve bakterisiz besiyeri içeren kontrol (C) gruplarına kıyasla CFS muamelesi yapılan serilerde koloni yoğunluğunun seyreldiğini ve yüksek doz gruplarında patojen büyümesinin etkin bir biçimde baskılandığını doğrulamaktadır.

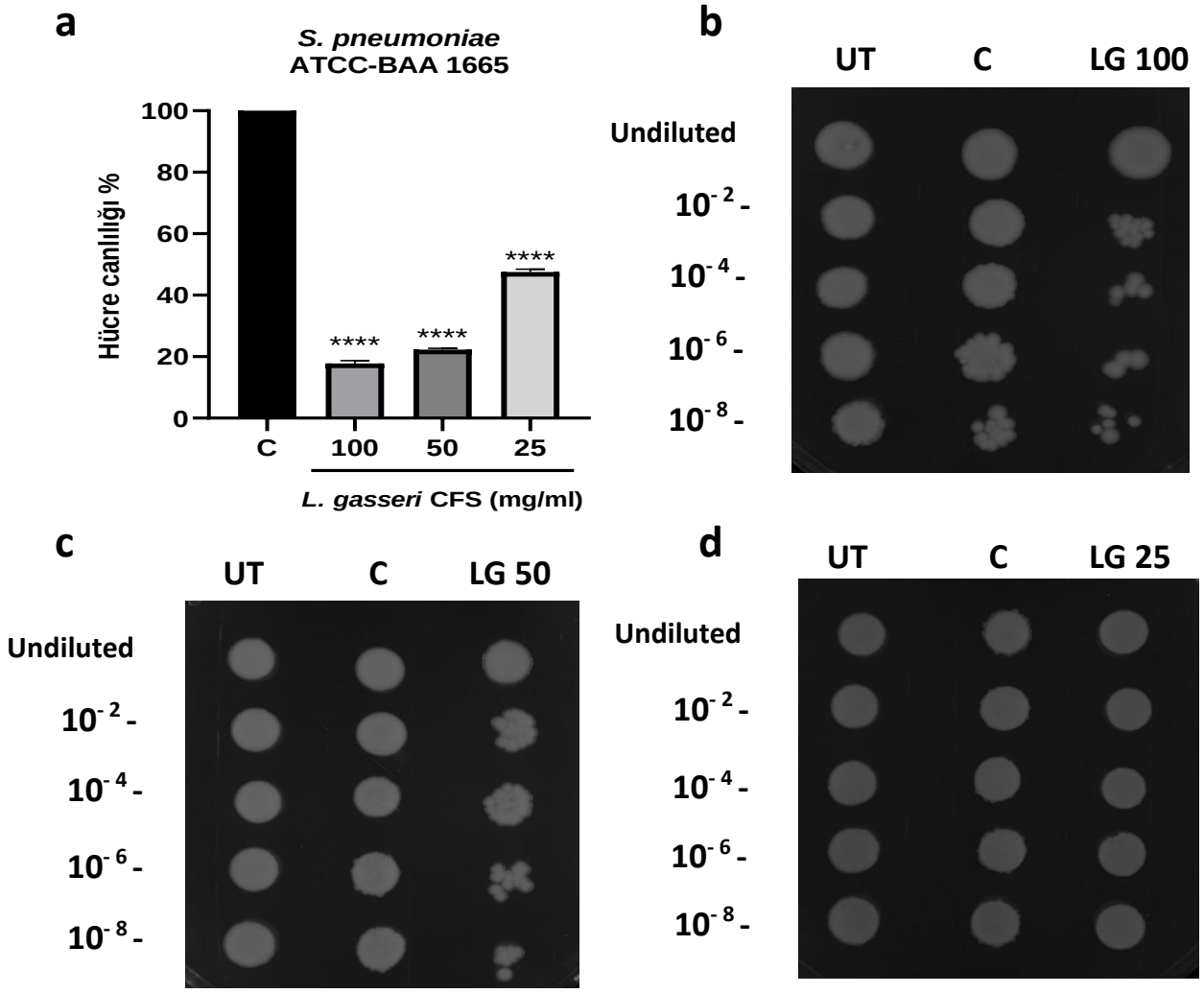
Elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde; her iki probiyotik suşa ait hücresiz süpernatant fraksiyonlarının, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşunun hücresel çoğalmasını ve koloni oluşturma kapasitesini doza bağımlı olarak güçlü bir şekilde baskıladığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, iki probiyotik suşun MRSA üzerindeki inhibitör etkinlik profilleri karşılaştırıldığında belirgin bir performans farkı saptanmıştır. *L. plantarum* hücresiz süpernatantı, en düşük uygulama konsantrasyonundan itibaren güçlü bir canlılık kaybı oluşturarak hızla tepe inhibisyon seviyesine ulaşmıştır. Buna karşılık, *L. gasseri* supernatantının benzer bir antibakteriyel baskı oluşturabilmesi için belirgin şekilde daha yüksek uygulama derişimlerine gereksinim duyulmuştur. Dahası, *L. plantarum* süpernatantı çok daha düşük doz aralıklarında kullanılmasına rağmen ulaştığı maksimum baskılama yüzdesi bakımından da *L. gasseri*'ye kıyasla belirgin biçimde daha yüksek bir antibakteriyel güç sergilemiştir. İki probiyotik suşun ortak olarak değerlendirilebildiği 50 mg/mL konsantrasyonunda, *L. plantarum* CFS uygulamasında MRSA hücre canlılığı %13,25 ± 0,6 düzeyine gerilerken, *L. gasseri* CFS uygulamasında %35,0 ± 1,4 düzeyinde kalmıştır. Bu sonuçlar, ortak test konsantrasyonunda her iki CFS fraksiyonunun da MRSA canlılığı üzerinde belirgin bir baskılama oluşturduğunu göstermektedir.

4.1.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etki

Hücresiz süpernatantların (CFS), Gram-pozitif model patojen olan *S. pneumoniae* ATCC BAA-1665 suşu üzerindeki antibakteriyel inhibitör aktivitesi; mikrodilüsyon bazlı spektroformetrik hücre canlılığı analizleri ve agar spot yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (10, 25 ve 50 mg/mL) *L. plantarum* CFS uygulamasının *S. pneumoniae* hücre canlılığı (%) üzerindeki doza bağımlı inhibitör etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ±Standart Hata olarak sunulmuştur (n=4) (Kontrol grubuna kıyasla ***p<0,001, ****p<0,0001, C: Kontrol grubu, %100 canlılık) İstatistiksel analiz Ordinary One-way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **(b–d)** Farklı konsantrasyonlardaki (sırasıyla 50, 25 ve 10 mg/mL) *L. plantarum* CFS muamelelerine ait agar spot analiz görüntüleri (UT: İşlem uygulanmamış bakteri grubu / untreated, C: CFS uygulanmayan, deneyde kullanılan dozlara karşılık gelen besiyeri koşulları dikkate alınarak hazırlanan ve inkübe edilen bakterisiz kontrol besiyeri grubu, LP: *L. plantarum* CFS uygulanan gruplar).



Şekil 8. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (25, 50 ve 100 mg/mL) *L. gasseri* CFS uygulamasının *S. pneumoniae* hücre canlılığı (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ±Standart Hata olarak sunulmuştur (n=4) (Kontrol grubuna kıyasla ****p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 canlılık). İstatistiksel analiz Ordinary One-way ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **(b–d)** Farklı konsantrasyonlardaki (sırasıyla 100, 50 ve 25 mg/mL) *L. gasseri* CFS muamelelerine ait agar spot analiz görüntüleri (UT: İşlem uygulanmamış bakteri grubu / untreated, C: CFS uygulanmayan, deneyde kullanılan dozlara karşılık gelen besiyeri koşulları dikkate alınarak hazırlanan ve inkübe edilen bakterisiz kontrol besiyeri grubu, LG: *L. gasseri* CFS uygulanan gruplar).

L. plantarum CFS uygulamasının *S. pneumoniae* canlılığı üzerindeki etkileri incelendiğinde; artan konsantrasyona bağlı olarak belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir büyüme baskılanması kaydedilmiştir (Şekil 7a). Kontrol grubu (%100) ile kıyaslandığında; en düşük uygulama dozu olan 10 mg/mL konsantrasyonda canlılık %67,25 ± 1,89 düzeyine gerilemiş ($p < 0,001$), konsantrasyonun 25 mg/mL'ye çıkarılmasıyla canlılık %43,50 ± 1,32 seviyesine düşmüştür ($p < 0,0001$). En yüksek test konsantrasyonu olan 50 mg/mL uygulamasında ise patojen canlılığı %11,75 ± 0,25'e kadar gerileyerek yaklaşık %88,25 oranında güçlü bir tepe inhibisyonu sağlanmıştır ($p < 0,0001$). Agar spot kültür plakalarındaki

seyreltme basamakları incelendiğinde (Şekil 7b–d); 10 mg/mL grubunda yüksek seyreltmelerde ayrık koloniler gözlenirken, artan konsantrasyonla (25 mg/mL ve 50 mg/mL) birlikte koloni formasyonunun belirgin şekilde sınırlandığı ve canlılık grafiği ile tam bir paralellik gösterdiği saptanmıştır.

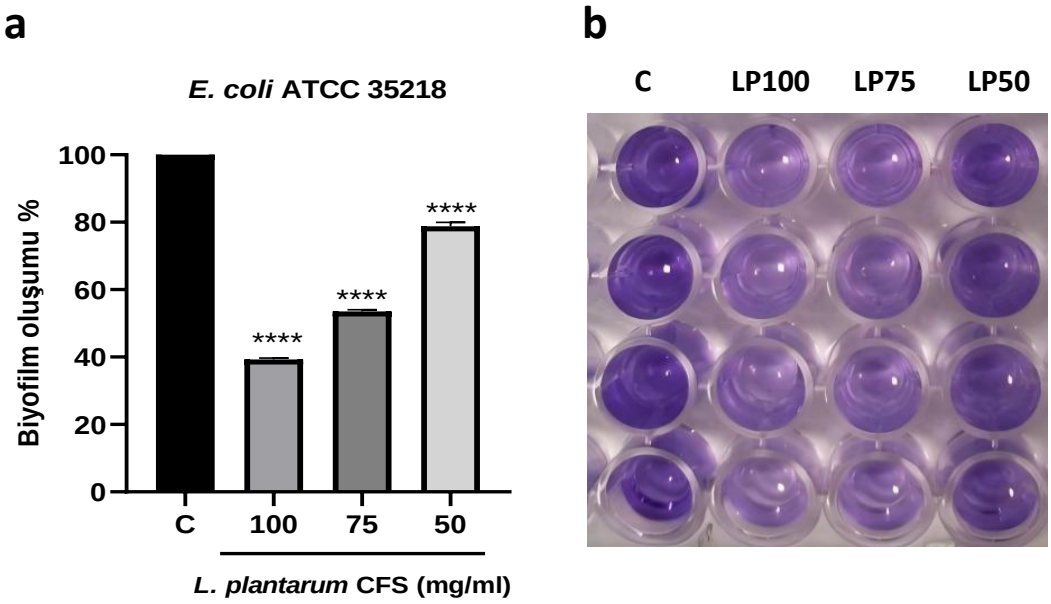
L. gasseri CFS uygulamasında ise test edilen tüm konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 mg/mL) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir canlılık kaybı elde edilmiştir ($p < 0,0001$; Şekil 8a). Patojen canlılık oranları, 25 mg/mL dozunda %47,50 ± 0,96, 50 mg/mL dozunda %22,25 ± 0,48 ve en yüksek doz olan 100 mg/mL konsantrasyonda %17,75 ± 0,95 olarak belirlenmiştir. Agar spot seyreltme serilerinde de (Şekil 8b–d), doza bağımlı olarak koloni yoğunluğunun azaldığı ve 100 mg/mL uygulamasında bakteriyel büyümenin etkin şekilde sınırlandığı gözlemlenmiştir.

İki probiyotik suşa ait hücresiz süpernatant fraksiyonların inhibitör profilleri karşılaştırıldığında; ortak test konsantrasyonları olan 25 mg/mL ve 50 mg/mL derişimlerde *L. plantarum* CFS'nin, patojen canlılığını sırasıyla %43,50 ve %11,75 seviyelerine çekerek, aynı konsantrasyonlardaki *L. gasseri* CFS uygulamalarına (%47,50 ve %22,25) kıyasla daha güçlü bir antibakteriyel baskı oluşturduğu belirlenmiştir.

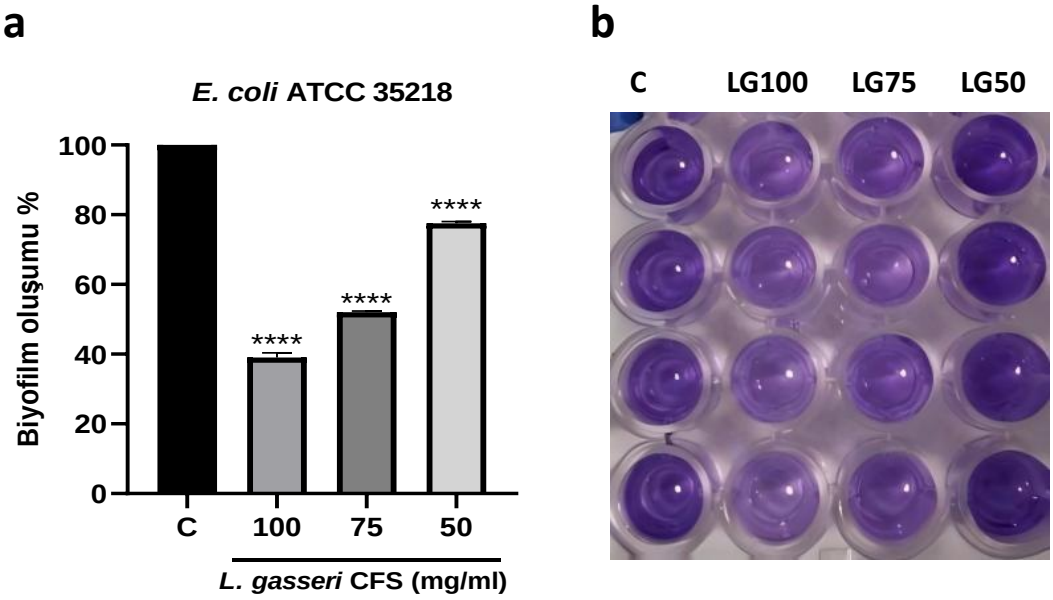
4.2. Antibiyofilm Aktivite Sonuçları

4.2.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibiyofilm etki

L. plantarum 299v ve *L. gasseri* L10 suşlarından izole edilen hücresiz süpernatantların (CFS), model Gram-negatif patojen *E. coli* ATCC 35218 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi üzerindeki inhibitör etkinliği, mikrodilüsyon bazlı kristal viyole (CV) biyokütle boyama yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* ve *L. gasseri* CFS uygulamalarının *E. coli* biyofilm biyokütlesi üzerindeki inhibitör etkilerine ait analiz grafikleri Şekil 9 ve Şekil 10'da sunulmuştur.



Şekil 9. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (50, 75 ve 100 mg/mL) *L. plantarum* CFS uygulamasının bağıl biyofilm oluşumu (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (Kontrol grubuna kıyasla ****p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 biyofilm). **(b)** Kristal viyole boyamasına ait temsili mikrokuyu biyofilm biyokütle görüntüleri.



Şekil 10. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) *Escherichia coli* ATCC 35218 biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (50, 75 ve 100 mg/mL) *L. gasseri* CFS uygulamasının bağıl biyofilm oluşumu (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (Kontrol grubuna kıyasla ****p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 biyofilm). **(b)** Kristal viyole boyamasına ait temsili mikrokuyu biyofilm biyokütle görüntüleri.

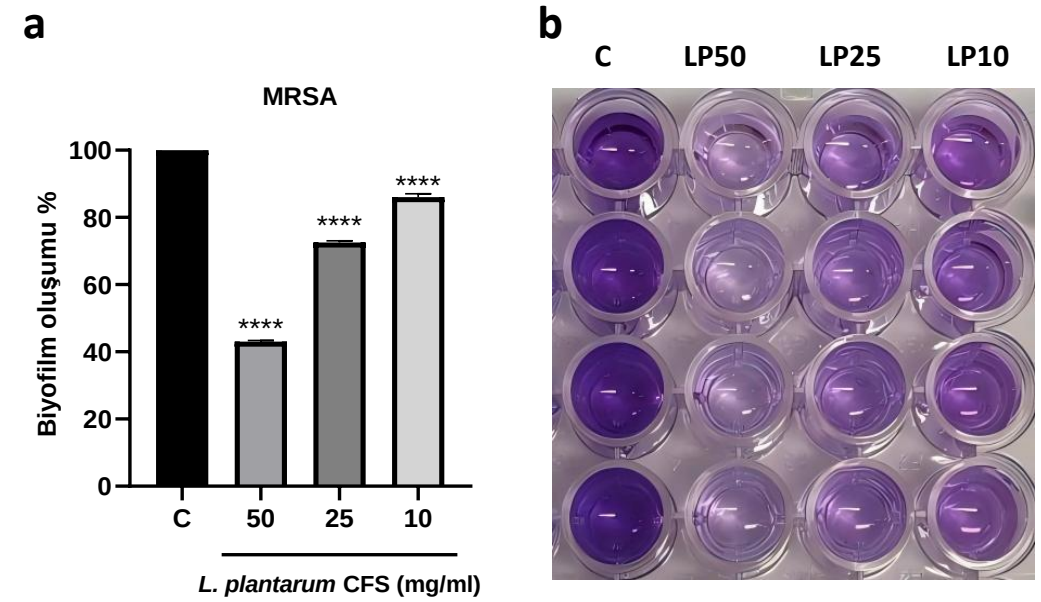
L. plantarum CFS uygulamasının *E. coli* biyofilm formasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; artan süpernatant konsantrasyonuna paralel olarak biyofilm biyokütlesinde istatistiksel açıdan anlamlı ve doza bağımlı bir azalma kaydedilmiştir (Şekil 9a). İşlem uygulanmayan kontrol grubu (%100) ile kıyaslandığında; 50 mg/mL konsantrasyondaki CFS maruziyeti biyofilm oluşumunu %78,75 ± 1,25 düzeyine geriletmiştir ($p < 0.0001$). Konsantrasyonun 75 mg/mL ve 100 mg/mL'ye yükseltilmesiyle birlikte biyofilm biyokütle oranları sırasıyla %53,50 ± 0,50 ve %39,25 ± 0,48 seviyelerine düşerek istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir inhibisyon sağlamıştır ($p < 0.0001$). Kristal viyole boyama kuyularına ait makroskobik görüntüler de (Şekil 9b), artan metabolit konsantrasyonuyla birlikte kuyu tabanına bağlanan boya yoğunluğunun ve sesil biyokütle miktarının belirgin biçimde azaldığını doğrulamaktadır.

L. gasseri CFS uygulamasında ise test edilen tüm konsantrasyonlarda (50, 75 ve 100 mg/mL) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir biyofilm baskılanması tespit edilmiştir ($p <0.0001$, Şekil 10a). Bağıl biyofilm oluşum yüzdeleri; 50 mg/mL dozunda %77,50 ± 0,50 75 mg/mLdozunda %52,00 ± 0,41 ve en yüksek test dozu olan 100 mg/mL uygulamasında %39,00 ± 1,22 olarak hesaplanmıştır. Kristal viyole mikrokuyu görünümleri de (Şekil 10b), doza bağımlı renk açılmasını ve biyofilm tabakasındaki seyreltmeyi açıkça ortaya koymaktadır.

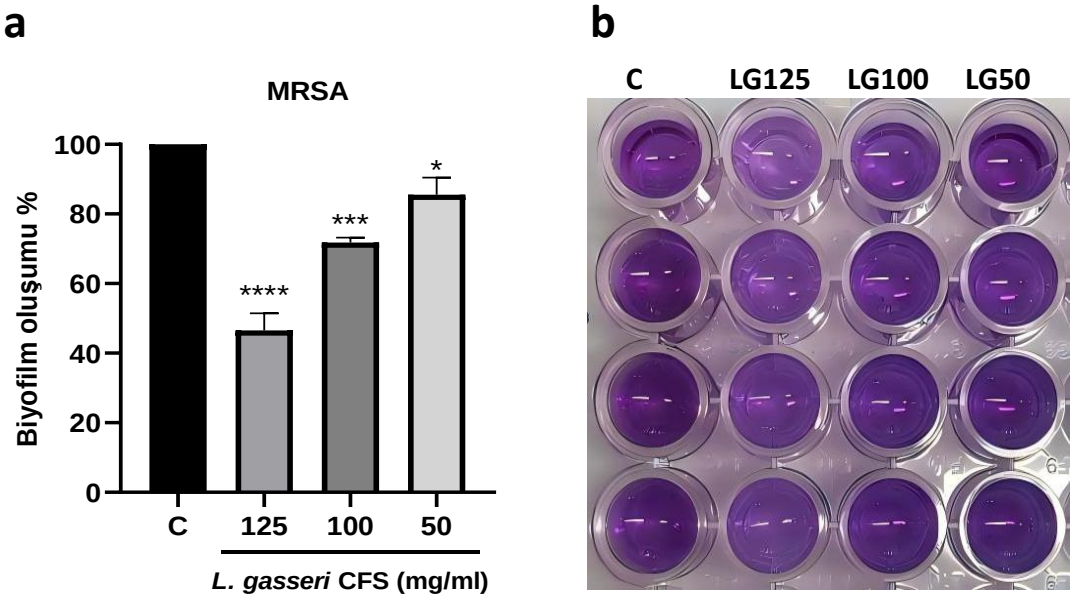
Sonuç olarak; hem *L. plantarum* hem de *L. gasseri* kaynaklı postbiyotik fraksiyonların, 50-100 mg/mL aralığında *E. coli* ATCC 35218 suşunun yüzeye tutunma ve sesil matriks oluşturma yeteneğini benzer ve doza bağımlı bir dinamikle baskıladığı, en yüksek test dozunda biyofilm biyokütlesini %60'ın üzerinde inhibe ettiği belirlenmiştir.

4.2.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* MRSA üzerindeki antibiyofilm etki

Hücresiz süpernatantların (CFS) klinik model dirençli patojen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* MRSA suşunun biyofilm formasyonu üzerindeki inhibitör etkisi; mikrodilüsyon bazlı kristal viyole (CV) biyokütle boyama yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 11 ve Şekil 12).



Şekil 11. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) MRSA biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (10, 25 ve 50 mg/mL) *L. plantarum* CFS uygulamasının bağıl biyofilm oluşumu (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (Kontrol grubuna kıyasla, ****p <0,0001; C: Kontrol grubu, %100 biyofilm). **(b)** Kristal viyole boyamasına ait temsili mikrokuyu biyofilm biyokütle görüntüleri.



Şekil 12. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) MRSA biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (50, 100 ve 125 mg/mL) *L. gasseri* CFS uygulamasının bağıl biyofilm oluşumu (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (Kontrol grubuna kıyasla *p <0,05, ***p <0,001, ****p<0,0001; C: Kontrol grubu, %100 biyofilm). **(b)** Kristal viyole boyamasına ait temsili mikrokuyu biyofilm biyokütle görüntüleri.

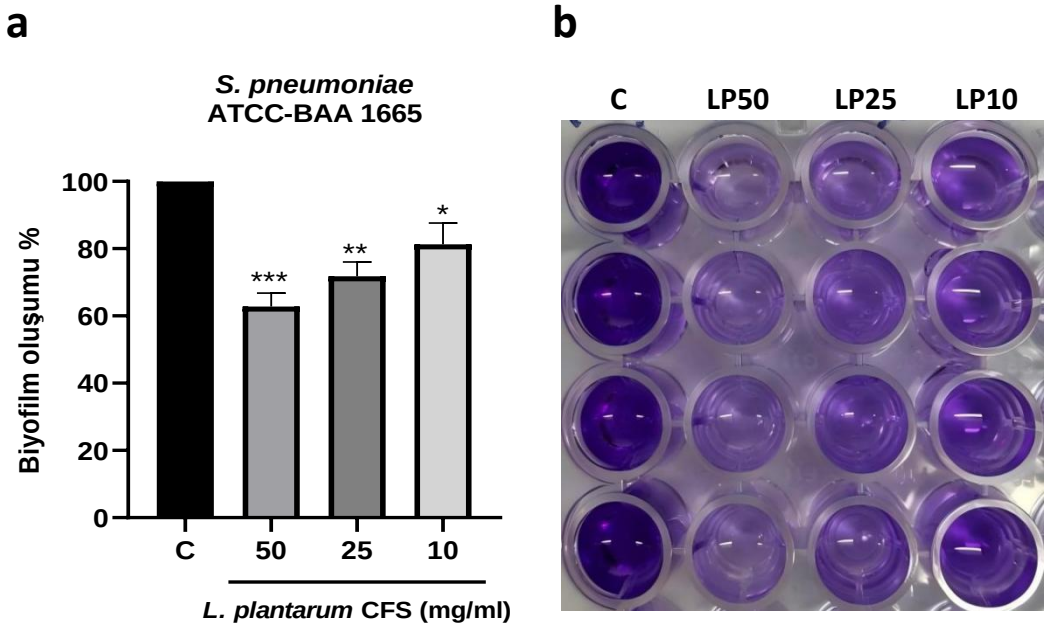
L. plantarum CFS uygulamasının MRSA biyofilm üretimi üzerindeki etkileri incelendiğinde; test edilen tüm konsantrasyonlarda biyofilm biyokütlesinde kontrol grubuna (%100) kıyasla doza bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir gerileme kaydedilmiştir (Şekil 11a). En düşük uygulama dozu olan 10 mg/mL konsantrasyonda biyofilm oluşumu %86,0 ± 1 seviyesine düşmüş ($p < 0,0001$), konsantrasyonun 25 mg/mL'ye çıkarılmasıyla biyokütle oranı %72,5 ± 0,50 düzeyine gerilemiştir ($p < 0,0001$). En yüksek test dozu olan 50 mg/mL CFS maruziyetinde ise biyofilm oluşumu %43,00 ± 0,41 seviyesine inerek yaklaşık %57 oranında güçlü bir biyofilm inhibisyonu elde edilmiştir ($p < 0,0001$). Kristal viyole boyama kuyularına ait mikromimari görüntüler de (Şekil 11b), artan metabolit konsantrasyonuna paralel olarak kuyu tabanına tutunan boyalı sesil matriks yoğunluğunun kademeli biçimde azaldığını doğrulamaktadır.

L. gasseri CFS uygulamasında ise 50, 100 ve 125 mg/mL konsantrasyon serilerinde MRSA biyofilm oluşumunun kontrol grubuna kıyasla doza bağımlı olarak baskılandığı saptanmıştır (Şekil 12a). Bağıl biyofilm oluşum yüzdeleri; 50 mg/mL grubunda %85,50 ± 5,1 ($p < 0,05$), 100 mg/mL grubunda %71,7 ± 1,5 ($p < 0,001$) ve en yüksek test dozu olan 125 mg/mL grubunda %46,2 ± 5,3 ($p < 0,0001$) olarak hesaplanmıştır. Kristal viyole mikrokuyu görselleri de (Şekil 12b), artan dozla birlikte boya tutulumundaki belirgin azalmayı ve sesil tabakanın zayıfladığını ortaya koymaktadır.

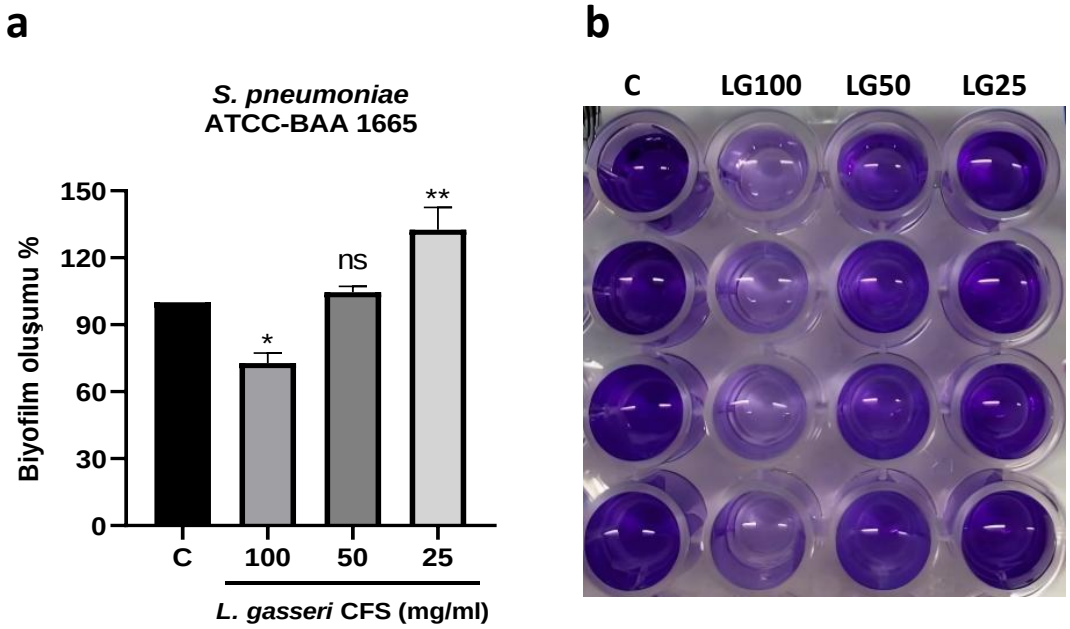
İki probiyotik suşa ait postbiyotik fraksiyonların antibiyofilm etkinlik profilleri kıyaslandığında; her iki ürünün de MRSA biyofilm biyokütlesini %50'nin üzerinde baskılama kapasitesine sahip olduğu, ancak *L. plantarum* hücresiz süpernatantının bu etkiyi belirgin şekilde daha düşük bir konsantrasyon aralığında (10-50 mg/mL) gerçekleştirdiği saptanmıştır.

4.2.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibiyofilm etki

Hücresiz süpernatantların (CFS) model patojen *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi üzerindeki etkileri; mikrodilüsyon bazlı kristal viyole (CV) biyokütle boyama yöntemiyle kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 13 ve Şekil 14).



Şekil 13. *Lactiplantibacillus plantarum* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 biyofilm oluşumu üzerindeki inhibitör etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (10, 25 ve 50 mg/mL) *L. plantarum* CFS uygulamasının bağıl biyofilm oluşumu (%) üzerindeki doza bağımlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (Kontrol grubuna kıyasla * p <0,05, ** p <0,01,***p < 0,001 ; C: Kontrol grubu, %100 biyofilm). **(b)** Kristal viyole boyamasına ait temsili mikrokuyu biyofilm biyokütle görüntüleri.



Şekil 14. *Lactobacillus gasseri* hücresiz süpernatantının (CFS) *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 biyofilm oluşumu üzerindeki etkinliği. **(a)** Farklı konsantrasyonlardaki (25, 50 ve 100 mg/mL) *L. gasseri* CFS uygulamasının bağıl biyofilm oluşumu (%) üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi. Veriler kontrol grubuna göre normalize edilmiş ve Ortalama ± Standart Hata olarak sunulmuştur (Kontrol grubuna kıyasla *p <0,05, **p <0,01, ns: istatistiksel olarak anlamsız; C: Kontrol grubu, %100 biyofilm). **(b)** Kristal viyole boyamasına ait temsili mikrokuyu biyofilm biyokütle görüntüleri.

L. plantarum CFS uygulamasının *S. pneumoniae* biyofilm formasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde; test edilen tüm konsantrasyonlarda biyofilm biyokütlesinde kontrol grubuna (%100) kıyasla doza bağımlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma kaydedilmiştir (Şekil 13a). 10 mg/mL konsantrasyondaki CFS maruziyeti biyofilm oluşumunu %81,25 ± 6,25 seviyesine geriletirken ($p < 0,05$), konsantrasyonun 25 mg/mL ve 50 mg/mL'ye yükseltilmesiyle bağıl biyofilm oluşum oranları sırasıyla %71,75 ± 4,25 ve %62,75 ± 3,91 düzeylerine inmiştir (sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,001$). Kristal viyole boyama kuyularına ait makroskobik görüntüler de (Şekil 13b), artan metabolit konsantrasyonuna paralel olarak kuyu tabanındaki boyalı sesil matriks yoğunluğunun kademeli biçimde azaldığını doğrulamaktadır.

L. gasseri CFS uygulamasının *S. pneumoniae* biyofilm üretimi üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde ise belirgin bir konsantrasyon bağımlı farklılaşma saptanmıştır (Şekil 14a). En düşük uygulama dozu olan 25 mg/mL konsantrasyonda, kontrol grubuna kıyasla biyofilm oluşumunda anlamlı bir artış (%132,5 ± 10,3) gerçekleştiği tespit edilmiştir ($p < 0,01$). 50 mg/mL dozunda biyofilm formasyonu kontrol grubu ile benzer seviyede (%104,5 ± 2,6; $p = 0,8973$, anlamsız) kalırken; yalnızca en yüksek test konsantrasyonu olan 100 mg/mL uygulamasında biyofilm biyokütlesi %72,75 ± 4,8 seviyesine gerileyerek istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon sağlamıştır ($p < 0,05$). Mikrokuyu görüntüleri de (Şekil 14b), düşük konsantrasyondaki yoğun boya tutulumunun 100 mg/mL seviyesinde zayıfladığını ortaya koymaktadır.

Elde edilen sonuçlar; *L. plantarum* CFS'nin düşük dozlardan itibaren *S. pneumoniae* biyofilm formasyonunu doza bağımlı ve tutarlı bir biçimde baskıladığını, buna karşılık *L. gasseri* CFS'nin düşük dozda biyofilm üretimini indüklediğini ve antibiyofilm etkinliğe ancak yüksek konsantrasyonda (100 mg/mL) ulaşabildiğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Küresel ölçekte kritik bir halk sağlığı krizine dönüşen AMR, DSÖ tarafından 21. yüzyılın en acil müdahale gerektiren öncelikli biyomedikal tehditlerinden biri olarak tanımlanmaktadır. Konvansiyonel antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı sonucu ortaya çıkan direnç mekanizmaları, mevcut kemoterapötik seçenekleri hızla işlevsiz kılmaktadır. Bu terapötik açmaz; patojen mikroorganizmaların biyotik veya abiyotik yüzeylere tutunarak EPS içerisine gömüldüğü sesil biyofilm mimarisiyle birleştiğinde çok daha karmaşık bir hal almaktadır. Biyofilm kalkanı, antimikrobiyal ajanların iç tabakalara difüzyonunu fiziksel ve kimyasal olarak bloke etmekte, metabolik olarak inaktif persister hücre oluşumunu indüklemekte ve bakterilere planktonik formlarına kıyasla bin kata varan fenotipik bir tolerans kazandırmaktadır. Özellikle klinik ortamlarda nozokomiyal ve persistan enfeksiyonlara yol açan *Escherichia coli*, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Streptococcus pneumoniae* gibi patojenlerin oluşturduğu biyofilm tabakaları, klasik antibiyotik monoterapilerinin yetersizliğini ortaya koymakta ve alternatif biyoterapötik arayışını elzem kılmaktadır.

Bu doğrultuda, LAB kökenli CFS'ler ve/veya liyofilize postbiyotik fraksiyonlar; canlı probiyotik kullanımının taşıdığı bakteriyel translokasyon, kontrolsüz kolonizasyon ve direnç geni aktarımı gibi güvenlik risklerini ortadan kaldıran güçlü bir biyomoleküler strateji olarak dikkat çekmektedir. Postbiyotik havuzunda yer alan organik asitler, biyoaktif bakteriyosinler ve hücre dışı sekrete edilen fonksiyonel metabolitler; bakteriyel membran bütünlüğünü bozmanın yanı sıra hücreler arası iletişim (quorum sensing) mekanizmalarını ve yüzeye ilk adhezyon basamaklarını hedef alan çok yönlü (multi-target) bir etki mekanizması sergilemektedir.

Bu çalışmada; *Lactiplantibacillus plantarum* 299v ve *Lactobacillus gasseri* L10 suşlarından ayrıştırılan ve akabinde liyofilize edilen CFS'lerin, hem Gram-pozitif (MRSA, *S. pneumoniae*) hem de Gram-negatif (*E. coli*) model patojenler üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, liyofilize postbiyotik fraksiyonların patojenlerin hem serbest hücresel çoğalmasını hem de biyofilm matriks oluşumunu doza bağımlı olarak etkin bir biçimde baskıladığını göstermiştir. Aynı zamanda probiyotik suşun sekretom kompozisyonuna ve hedef patojenin hücre duvar mimarisine bağlı olarak dikkate değer etkinlik ve duyarlılık farklılıkları sergilediğini ortaya koymuştur.

5.1 Antibakteriyel Etkinliğin Değerlendirilmesi

5.1.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibakteriyel etkinlik

L. plantarum 299v ve *L. gasseri* L10 suşlarından elde edilen liyofilize CFS'lerin, β-laktamaz üreten model Gram-negatif patojen *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerinde doza bağımlı olarak güçlü bir antibakteriyel baskılama sergilediği saptanmıştır. Gram-negatif bakteriler, sahip oldukları LPS temelli dış membran mimarisi ve seçici porin kanalları nedeniyle birçok antimikrobiyal ajanın hücre içine penetrasyonunu kısıtlamakta ve Gram-pozitif türlere kıyasla daha yüksek bir intrensek tolerans sergilemektedir (Saxena vd., 2023). Dolayısıyla, çalışmamızda kullanılan her iki LAB kökenli postbiyotik fraksiyonun dirençli bir *E. coli* suşu üzerinde belirgin bir büyüme inhibisyonu sağlaması, bu biyoterapötik moleküllerin dış membran bariyerini aşabilme potansiyelini göstermesi açısından klinik ve biyoteknolojik bir önem taşımaktadır.

Postbiyotiklerin Gram-negatif bakteriler üzerindeki inhibitör kapasitesi, hedef patojenin membran yapısının yanı sıra postbiyotiğin izole edildiği probiyotik türün özgün biyoaktif metabolit profiline sıkı sıkıya bağlıdır. Nitekim Sezer ve ark. (2026), kefir kaynaklı farklı *L. plantarum* ve *Lactococcus lactis* suşlarından elde dilen postbiyotiklerin ESBL-pozitif *E. coli* izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini incelemiş ve özellikle *L. plantarum* kaynaklı postbiyotiklerin belirli konsantrasyonlarda hem bakteriyostatik hem de bakterisidal etki gösterebildiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, söz konusu çalışmada çok sayıda suştan elde edilen postbiyotiklerin dirençli *E. coli* izolatları üzerindeki genel antimikrobiyal potansiyeli ve MIC/MBC değerleri ön plana çıkarılırken, çalışmamızda *L. plantarum* ve *L. gasseri* kaynaklı CFS'lerin aynı deneysel koşullar altında doğrudan karşılaştırılması ve antimikrobiyal etkinliğin hem spektrofotometrik canlılık hem de agar spot seyreltme analizi ile birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda spektrofotometrik analizler her iki postbiyotik fraksiyonun da benzer ve güçlü bir canlılık kaybı oluşturduğunu ortaya koyarken, agar spot plakalarında gözlenen seyreltme serilerindeki koloni dağılımları, iki suş arasında ince fenotipik farklılıklar sergilemiştir. Bu durum, *L. plantarum* ve *L. gasseri* suşlarının sekrete ettiği organik asit havuzu, hidrojen peroksit derişimi veya plantarisin/gasserisin gibi spesifik bakteriyosinlerin agar matrisindeki difüzyon kinetiği ve membran polarizasyonu üzerindeki etki tarzlarının birbirinden farklı olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak kristal viyole yöntemi kullanılarak yapılan biyofilm analizleri her iki CFS'nin de *E. coli*'nin yüzeye tutunma

ve biyofilm biyokütlesi oluşturma kapasitesini doza bağlı olarak baskıladığını göstermiştir. Bu yönüyle çalışmamız, yalnızca postbiyotiklerin planktonik *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini doğrulamakla kalmayıp, enfeksiyonların kalıcılığını sağlayan ve tedaviyi zorlaştıran bir etken olmak açısından kritik bir öneme sahip biyofilm oluşumunun baskılanmasını da değerlendirmektedir. Laktobasil kaynaklı hücresiz süpernatantların çoklu direnç profiline sahip *E. coli* suşları üzerindeki etkinliği literatürdeki diğer bulgularla da desteklenmektedir. Akgöl ve ark. (2026), çoklu ilaca dirençli *E. coli* klinik izolatlarında *Lactobacillus salivarius* CFS'sinin güçlü antibakteriyel ve antibiyofilm özellikleri sergilediğini ortaya koymuştur. Benzer biçimde Abdelhamid ve ark. (2018), en az beş farklı antibiyotiğe dirençli altı *E. coli* suşuna karşı *L. plantarum* dahil farklı probiyotik süpernatantlarının anlamlı bir antibakteriyel aktivite profiline sahip olduğunu rapor etmiştir. Öte yandan Vertillo Aluisio ve ark. (2024), *L. gasseri* CFS'sinin β-laktamaz üreten bir diğer Gram-negatif patojen olan *Klebsiella pneumoniae* üzerindeki inhibitör etkisini göstermiştir. Bu veriler, çalışmamızda β-laktamaz üreticisi *E. coli* ATCC 35218 üzerinde tespit edilen antibakteriyel etkinliğin yalnızca *L. plantarum* ile sınırlı kalmayıp *L. gasseri* metabolitleri ile de başarıyla elde edilebilmesi bulgusunu tamamlamaktadır.

Postbiyotiklerin antibakteriyel etkinliği in vitro test modellerinin ötesine geçerek in vivo sistemlerde de doğrulanmaktadır. Ismael ve ark. (2025), dirençli *E. coli* kaynaklı deneysel kolit fare modelinde *L. plantarum* uygulamasının bağırsak doku hasarını azalttığını, inflamatuvar sitokin kaskadını baskıladığını ve terapötik bir iyileşme sağladığını rapor etmiştir. Her ne kadar bu çalışmada canlı probiyotik formülasyonu kullanılmış olsa da elde edilen dokusal koruma, *L. plantarum* kaynaklı biyoaktif metabolit havuzunun dirençli Gram-negatif enteropatojenlerin kolonizasyonunu baskılama ve enfeksiyon ilişkili inflamasyonu sınırlandırma yeteneğini dolaylı olarak kanıtlamaktadır.

Elde ettiğimiz veriler; metabolit karakterizasyonuna ihtiyaç duymakla birlikte, liyofilize postbiyotik fraksiyonların dirençli *E. coli* enfeksiyonlarına karşı tek başına veya adjuvan olarak kullanılabilecek umut verici doğal antimikrobiyal adaylar olduğunu göstermektedir.

5.1.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibakteriyel etkinlik

L. plantarum 299v ve *L. gasseri* L10 suşlarından elde edilen liyofilize CFS'lerin, klinik öneme sahip nozokomiyal model patojen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) üzerinde güçlü bir büyüme inhibisyonu sergilediği tespit edilmiştir. MRSA suşlarının mecA geni kaynaklı

alternatif penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) ekspresyonu ile geliştirdiği β-laktam direnci (Lade ve Kim, 2021), klasik antibiyotik monoterapilerini işlevsiz kıldığından, membran bütünlüğünü ve hücresel biyokimyayı alternatif yolaklardan hedefleyen biyoterapötik stratejilerin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Gram-negatif patojenlerin aksine Gram-pozitif bir bakteri olan MRSA'nın LPS yapılı seçici bir dış membran bariyerine sahip olmaması; postbiyotik fraksiyonda bulunan organik asitlerin, biyoaktif bakteriyosinlerin ve hücre dışına salgılanan fonksiyonel bileşenlerin doğrudan sitoplazmik membrana ve peptidoglikan tabakaya difüzyonunu kolaylaştırmaktadır (Lade ve Kim, 2021). Nitekim spektrofotometrik canlılık ve agar spot analizleri bir arada değerlendirildiğinde; çalışmamızda test edilen her iki LAB kaynaklı postbiyotiğin MRSA üzerindeki antibakteriyel baskılayıcı profilinin, dış membran bariyerine sahip Gram-negatif *E. coli* ATCC 35218 suşuna kıyasla daha belirgin bir duyarlılıkla gerçekleştiği saptanmıştır. MRSA'da CFS uygulmasına bağlı olarak hücresel canlılık kaybı spektrofotometrik analizlerde daha yüksek seviyelerde gerçekleşirken agar spot analizlerinde de özellikle yüksek seyreltmelerde koloni oluşumunun daha belirgin şekilde baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum, *E. coli* ATCC 35218 suşunun, uygulanan postbiyotik fraksiyonlara karşı MRSA'ya kıyasla daha düşük seviyede duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur.

Her iki probiyotik suşa ait CFS'ler, MRSA proliferasyonunu doza bağımlı olarak anlamlı düzeyde inhibe etmekle birlikte, iki türün inhibitör potensleri arasında dikkate değer bir fark gözlemlenmiştir. *L. plantarum* CFS uygulaması en düşük konsantrasyonlardan itibaren güçlü bir bakterisidal/bakteriyostatik baskı oluşturarak yüksek inhibisyon platosuna ulaşmıştır. Buna karşılık *L. gasseri* kaynaklı CFS benzer bir büyüme baskısı sergileyebilmesi için belirgin şekilde daha yüksek derişimlere gereksinim duyulmuştur. Literatürde, aralarında *L. plantarum* suşlarının da yer aldığı LAB süpernatantlarının klinik MRSA izolatları üzerinde güçlü bir inhibisyon oluşturduğunu ortaya koyan çok sayıda veri mevcuttur (Kalaycı Yüksek vd., 2021). Ancak söz konusu çalışma, temel olarak belirli LAB türlerinden elde edilen CFS'lerin MRSA üzerinde inhibitör etkisini incelemeye yönelik iken, çalışmamızda *L. plantarum* ve *L. gasseri* kaynaklı postbiyotik fraksiyonların antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri aynı deney sisteminde farklı gram özelliklerine sahip olan üç model patojen (*E. coli* ATCC 35218, MRSA ve *S. pneumoniae* ATCC-BAA 1665) üzerinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu yönüyle çalışmamız, LAB kaynaklı postbiyotiklerin MRSA üzerindeki bilinen inhibitör etkisini tekrarlamaktan ziyade, farklı patojenlere karşı antibakteriyel ve antibiyofilm yanıtları iki farklı LAB kaynağı açısından karşılaştırmalı olarak ortaya koymuştur.

Benzer şekilde Jasim ve AL Zubaidy (2022), *L. plantarum* ve *L. reuteri* kaynaklı hücresiz süpernatantların dirençli klinik MRSA izolatlarının hem canlılığını hem de biyofilm formasyonunu baskıladığını bildirmiştir. Altı farklı LAB suşunun karşılaştırıldığı bir diğer araştırmada ise *L. plantarum* K014 suşunun MRSA üzerinde en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi sergileyen suş olarak öne çıkması (Mlambo vd., 2022), çalışmamızda kullanılan *L. plantarum* 299v suşunun düşük dozlarda dahi üstün etkinlik göstererek öne çıkmasıyla paralellik arz etmektedir. Bu yüksek potens, *L. plantarum* tarafından sentezlenen plantarisin türevi spesifik bakteriyosin havuzunun ve organik asit derişiminin stafilokok hücre duvarı ve membran polarizasyonu üzerindeki güçlü litik etkisinden kaynaklanıyor olabilir (Ye vd., 2024; Du vd., 2022).

Literatürde *L. plantarum* suşlarının MRSA üzerindeki inhibitör etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, bu çalışmaların önemli bir kısmında taze sıvı süpernatantlar standardize edilmemiş hacimsel oranlar (% v/v) üzerinden değerlendirilmiştir. Çalışmamızı mevcut literatürden ayıran en temel metodolojik üstünlük; hücresiz süpernatantın liyofilize edilerek kuru ağırlık bazında (mg/mL) kesin konsantrasyon gradyanlarına dönüştürülmesi ve aynı işlemden geçirilen liyofilize kontrol besiyeri ile normalize edilmesidir. Bu yaklaşım, sıvı besiyeri bileşenlerinden kaynaklanabilecek olası artefaktları tamamen elimine ederek gözlenen antimikrobiyal baskının doğrudan postbiyotik metabolit fraksiyonuna ait olduğunu kanıtlamakta ve farmasötik açıdan tekrarlanabilir, standardize bir doz-yanıt korelasyonu sunmaktadır. Ayrıca spektrofotometrik canlılık analizlerinin geniş seyreltme basamaklarını içeren agar spot kinetiği ile desteklenmesi, *L. plantarum* 299v kaynaklı liyofilize postbiyotiklerin düşük dozlarda dahi sergilediği yüksek antibakteriyel gücü somut ve kantitatif bir zemine oturtmaktadır.

L. plantarum metabolitlerinin yanı sıra, *L. gasseri* kaynaklı hücresiz süpernatantların da stafilokok enfeksiyonlarına karşı taşıdığı antimikrobiyal potansiyel son dönem çalışmalarında dikkat çekmektedir. Nitekim Ishikawa ve ark. (2020), *L. gasseri* YIT12321 suşuna ait hücresiz süpernatantın MRSA üzerinde belirgin bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini, dahası süpernatantın pH'sının nötralize edilmesi durumunda dahi antimikrobiyal etkinliğini koruduğunu saptamıştır. Bu durum, *L. gasseri* kaynaklı büyüme inhibisyonunun yalnızca asidik ortam veya proton derişiminden kaynaklanmadığını; süpernatant havuzundaki termostabil biyoaktif peptitler (gasserisin vb.) ve salgılanan fonksiyonel metabolitlerin koordineli etkisine dayandığını ortaya koymaktadır (Ishikawa vd., 2020). Vajinal kaynaklı laktobasillerin değerlendirildiği bir başka çalışmada da MRSA ATCC 33592 suşu üzerindeki inhibitör etkinin

laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerin kombine sinerjisi ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Petrova vd., 2014). Benzer biçimde klinik gözlemsel çalışmalarda nazal mikrobiyotadaki *L. gasseri* kolonizasyonunun MRSA taşıyıcılığı ile negatif korelasyon göstermesi (Bessesen vd., 2015), bu türün patojen kolonizasyonunu baskılama yeteneğini desteklemektedir.

Literatürde *L. gasseri*'nin immünomodülatör ve probiyotik özelliklerini inceleyen kapsamlı çalışmalar bulunmasına karşın, doğrudan liyofilize CFS fraksiyonunun MRSA üzerindeki kantitatif antibakteriyel dinamiklerini inceleyen in vitro veriler görece sınırlıdır. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen sonuçlar; *L. gasseri* kaynaklı liyofilize süpernatantların MRSA üzerindeki inhibitör profilini ortaya koyması bakımından literatüre özgün bir katkı sağlamakta ve her iki probiyotik suşun da dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde umut vadeden doğal biyoterapötik adaylar olduğunu doğrulamaktadır.

5.1.3. *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerindeki antibakteriyel etkinlik

L. plantarum 299v ve *L. gasseri* L10 suşlarından elde edilen liyofilize CFS'lerin, klinik olarak önemli bir solunum yolu patojeni olan *S. pneumoniae* ATCC BAA-1665 suşu üzerindeki antibakteriyel inhibitör etkinliği incelenmiştir. Spektrofotometrik hücre canlılığı analizleri ile agar spot yöntemiyle elde edilen bulgular yüksek düzeyde bir korelasyon ve tutarlılık sergilemiştir. Mikrodilüsyon analizlerinde saptanan doza bağımlı canlılık kayıplarının, agar spot kültür plakalarındaki koloni yoğunluğunun seyrelmesi ve üreme alanlarının baskılanması ile birebir örtüşmesi; liyofilize postbiyotik metabolitlerin pnömokok proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkisini iki farklı metodolojik yaklaşımla doğrulamaktadır.

Her iki probiyotik suşa ait postbiyotik fraksiyonların, doza bağımlı olarak anlamlı bir büyüme inhibisyonu sağlamakla birlikte, ortak test konsantrasyonlarında *L. plantarum* CFS'nin, *L. gasseri*'ye kıyasla daha güçlü bir antibakteriyel baskı oluşturduğu saptanmıştır. Postbiyotiklerin pnömokoklar üzerindeki bu antimikrobiyal etki mekanizması literatürdeki güncel moleküler bulgularla desteklenmektedir. Nitekim Borralho ve ark. (2025), insan oral mikrobiyotasından izole edilen *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus oralis* suşlarına ait hücresiz süpernatantların *S. pneumoniae* üremesini ve biyofilm formasyonunu baskıladığını bildirmiştir. Araştırmacılar, bu inhibitör etkinliğin Proteinaz K uygulaması sonrasında ortadan kalktığını ve genomik analizlerde çok sayıda bakteriyosin gen kümesinin tespit edildiğini belirterek, gözlenen antimikrobiyal baskının temel olarak bakteriyosin benzeri peptitler

aracılığıyla yürütüldüğünü ortaya koymuştur (Borralho vd., 2025). Bu bulgular; çalışmamızda kullanılan *L. plantarum* ve *L. gasseri* liyofilizatlarının *S. pneumoniae* üzerinde sergilediği güçlü bakterisidal/bakteriyostatik etkinliğin de süpernatant havuzunda yer alan termostabil bakteriyosin benzeri biyoaktif peptitler ve organik asitlerin hücre duvarı sentezini/membran potansiyelini destabilize etmesiyle gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir (Sugrue vd., 2024).

Laktobasil kökenli metabolitlerin solunum yolu patojenleri üzerindeki etkinliği diğer araştırmalarda da vurgulanmaktadır. Chong ve ark. (2019), *L. plantarum* DR7 suşuna ait hücresiz süpernatantın klinik *S. pneumoniae* izolatları da dahil olmak üzere çeşitli solunum yolu patojenlerinin proliferasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Bu veriler, çalışmamızda *L. plantarum* 299v kaynaklı hücresiz ekstraktların referans suş *S. pneumoniae* ATCC BAA-1665 üzerinde oluşturduğu yüksek antibakteriyel baskıyı destekler niteliktedir.

Literatürde LAB süpernatantlarının genel antibakteriyel potansiyelini inceleyen geniş bir veri tabanı bulunmasına karşın bir pnömokok modeli olan *S. pneumoniae* ATCC BAA-1665 suşu üzerinde doğrudan liyofilize edilmiş ve kuru ağırlık bazında standardize edilmiş postbiyotik ekstraktların etki kinetiğini inceleyen araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu doğrultuda çalışmamız; hem *L. plantarum* 299v hem de *L. gasseri* L10 kökenli liyofilize postbiyotik fraksiyonların dirençli pnömokok suşlarına karşı alternatif ve biyolojik bir antimikrobiyal strateji olarak değerlendirilebileceğini göstererek literatürdeki bu boşluğa doğrudan ve deneysel bir katkı sunmaktadır.

5.2 Antibiyofilm Etkinliğin Değerlendirilmesi

5.2.1. *Escherichia coli* ATCC 35218 üzerindeki antibiyofilm etkinlik

Liyofilize CFS'lerin, β-laktamaz üreten model patojen *Escherichia coli* ATCC 35218 suşunun biyofilm biyokütlesi üzerindeki etkileri incelendiğinde test edilen tüm konsantrasyon aralığında anlamlı bir antibiyofilm inhibisyonu belirlenmiştir. Her iki postbiyotik fraksiyonda da en yüksek biyofilm baskılanması tepe konsantrasyonda (100 mg/mL) elde edilmiş, CV boyama kuyularındaki optik yoğunluk azalışı ile spektrofotometrik biyokütle ölçümleri uyum sergilemiştir. Bununla birlikte, planktonik hücre canlılığı ile sesil biyofilm verileri kıyaslandığında, CFS uygulamalarının antibakteriyel etkisinin antibiyofilm etkinliğe kıyasla daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bu durum, EPS içerisine gömülü sesil bakteri topluluklarının sahip olduğu fiziksel bariyer ve fenotipik direnç mekanizmalarının doğal bir yansıması olarak değerlendirilmektedir (Uruén vd., 2021).

Laktobasil kaynaklı hücresiz süpernatantların dirençli *E. coli* suşlarının biyofilm mimarisini hedef alabildiği literatürdeki çeşitli çalışmalarla belgelenmiştir. Mekky ve ark. (2022), *L. plantarum* Y3 süpernatantının ilaca dirençli *E. coli* suşlarında güçlü bir biyofilm inhibisyonu sağladığını rapor etmiştir. Benzer şekilde, çalışmamızdaki patojenle aynı direnç profiline sahip ampisiline dirençli *E. coli* suşları üzerinde laktobasil süpernatantlarının anlamlı antibiyofilm aktivite sergilediği gösterilmiştir (Magalhães Fernandes vd., 2023). Biyofilm baskılanmasının moleküler ve biyokimyasal arka planı incelendiğinde, süpernatant içeriğindeki biyoaktif polimerlerin ve metabolitlerin kritik roller üstlendiği görülmektedir. Nitekim Mahdhi ve ark. (2018), *L. plantarum* kökenli EPS'lerin *E. coli* ATCC 35218 suşunda %50 oranında biyofilm inhibisyonu sağladığını bildirmiştir. Benzer bir mekanizma *L. gasseri* için de geçerli olup, Rani ve ark. (2018), *L. gasseri* FR4 kaynaklı EPS'lerin patojenik *E. coli* O157:H7 suşunun biyofilm oluşumunu etkin biçimde sınırladığını ortaya koymuştur. Bu veriler; çalışmamızda kullanılan liyofilize CFS'lerin sergilediği antibiyofilm aktivitenin, ortam pH'sını düşüren organik asitlerin yanı sıra CFS fraksiyonunda bulunan EPS'ler ve ssalgılanan biyoaktif moleküllerin patojenin abiyotik yüzeye adhezyonunu engellemesi ve matriks bütünlüğünü bozmasıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Nitekim Ozma ve ark. (2024), *L. plantarum* CFS uygulamasının çoklu ilaca dirençli *E. coli* izolatlarında biyofilm biyokütlesini engellemenin yanı sıra biyofilm oluşumundan sorumlu gen ekspresyonlarını doğrudan baskıladığını bildirerek bu çok basamaklı etki mekanizmasını doğrulamıştır.

Postbiyotiklerin planktonik büyüme ile biyofilm üretimi üzerindeki etki kinetiği, hedef suşun patotipik özelliklerine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin Oliveira ve ark. (2022), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC F4) üzerinde 40 mg/mL *L. plantarum* CFS uygulamasının planktonik büyümeyi baskılamaksızın yalnızca biyofilm oluşumunu selektif olarak inhibe ettiğini bildirmiştir. Buna karşılık çalışmamızda, β-laktamaz üreten *E. coli* ATCC 35218 suşunda hem planktonik çoğalmanın hem de sesil biyofilm biyokütlesinin eş zamanlı olarak baskılandığı belirlenmiştir. Bu fenotipik farklılık, hedef bakteri suşlarının yüzey antijenleri, virülans faktörleri, membran porin ekspresyonları ve antibiyotik duyarlılık profillerindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir.

Literatürde genel olarak laktobasil süpernatantlarının antibiyofilm potansiyeline odaklanılmış olsa da, standardize liyofilize formülasyonda *L. plantarum* 299v ve özellikle *L. gasseri* L10 suşlarının β-laktamaz pozitif *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerindeki karşılaştırmalı antibiyofilm dinamiklerini inceleyen veriler oldukça kısıtlıdır. Elde ettiğimiz bulgular, her iki probiyotik suşa ait postbiyotik fraksiyonların dirençli Gram-negatif patojenlerin hem serbest

proliferasyonunu hem de yüzeye tutunarak kalıcı biyofilm kalkanı oluşturmasını engelleyen çift yönlü bir biyoterapötik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

5.2.2. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerindeki antibiyofilm etkinlik

Liyofilize CFS'lerin, klinik olarak kritik bir nozokomiyal patojen olan metisiline dirençli *S. aureus (*MRSA) suşunun biyofilm formasyonu üzerindeki inhibitör etkisi değerlendirilmiş ve her iki postbiyotik fraksiyonun da doza bağımlı olarak biyofilm biyokütlesini anlamlı düzeyde baskıladığı saptanmıştır. Kantitatif kristal viyole ölçümleri, uygulanan konsantrasyonun artışına paralel olarak mikrokuyu tabanına tutunan sesil hücre yoğunluğunun kademeli biçimde azaldığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, iki probiyotik suşun antibiyofilm potensleri kıyaslandığında; *L. plantarum* CFS'nin 50 mg/mL konsantrasyonda ulaştığı tepe biyofilm inhibisyonuna, *L. gasseri* CFS'nin ancak 125 mg/mL gibi 2,5 kat daha yüksek bir derişimde ulaşabildiği belirlenmiştir. Bu durum, *L. pl*antarum 299v sekretomunun MRSA biyofilm gelişimini önlemede daha üstün bir biyoaktif potense sahip olduğuna işaret etmektedir.

Literatürde LAB kökenli süpernatantların stafilokok biyofilmleri üzerindeki baskılayıcı rolü farklı çalışmalarla desteklenmektedir. Nitekim Jasim ve Al-Zubaidy (2022), *L. plantarum* ve *L. reuteri* kaynaklı CFS'lerin dirençli klinik MRSA izolatlarının biyofilm üretimini anlamlı düzeyde azalttığını ve *L. plantarum* süpernatantının daha yüksek bir antibiyofilm aktivite sergilediğini bildirmiştir. Bahsi geçen çalışmada suş tanımlamasının yapılmamış olmasına karşın, çalışmamızda genomik ve probiyotik özellikleri kapsamlı biçimde bilinen L. *plantarum* 299v suşunun kullanılmış olması, elde edilen antibiyofilm etkinliğin suşa özgü metabolit profiliyle doğrudan ilişkilendirilmesine olanak tanımaktadır. Benzer şekilde Dubey ve ark. (2023), *L. plantarum* MTCC 2621 süpernatantının MRSA kaynaklı biyofilm formasyonunu önlemenin yanı sıra önceden oluşmuş olgun biyofilmleri de eradike edebildiğini rapor etmiştir. Bu veriler, farklı *L. plantarum* suşlarının MRSA biyofilm mimarisini hedef alma konusunda geniş spektrumlu bir etkinliğe sahip olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmamızda postbiyotiklerin biyofilm oluşumunu önleme (profilaktik/inhibitör) potansiyeli başarıyla ortaya konmuş olup, olgunlaşmış matriks tabakalarının dağıtılmasına (eradikasyon) yönelik kinetik dinamiklerin aydınlatılması ileri araştırmalar için önemli bir hedef teşkil etmektedir.

Laktobasil kaynaklı postbiyotiklerin antibiyofilm etki mekanizması, hücreler arası iletişimin engellenmesi ve yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile yakından ilişkilidir. Nitekim Saidi ve ark. (2023), *Lactobacillus paracasei* ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* suşlarının bakteriyel büyümenin yanı sıra mikroorganizmanın yüzeye ilk adhezyon basamaklarını da güçlü bir şekilde baskıladığını bildirmiştir. Biyofilm ontogenisinde ilk yüzeye tutunma (adhesion) ve mikrokoloni oluşumu kritik basamaklar olduğundan; çalışmamızda kullanılan *L. plantarum* ve *L. gasseri* liyofilizatlarının içerdiği biyosürfaktanlar, EPS'ler ve organik asit havuzunun abiyotik yüzeyin hidrofobisitesini değiştirerek veya stafilokok yüzey adezinlerini bloke ederek erken dönem biyofilm tutunmasını engellediği düşünülmektedir (Che vd., 2024; Patel vd., 2021).

Sonuç olarak; *L. plantarum* 299v ve *L. gasseri* L10 kökenli liyofilize CFS'ler, MRSA suşunun sesil formasyona geçişini ve patojenik biyofilm kalkanı oluşturmasını engellemede güçlü biyoterapötik adaylar olarak öne çıkmaktadır. Gelecek çalışmalarda, bu postbiyotik fraksiyonların stafilokok biyofilm düzenleyici genleri (icaA, agr, sarA) üzerindeki transkripsiyonel regülasyonunun ve olgun biyofilm matriksi üzerindeki enzimatik/kimyasal bozundurucu etkilerinin aydınlatılması gerekmektedir.

5.2.3. Streptococcus pneumoniae ATCC BAA- 1665 üzerindeki antibiyofilm etkinlik

Liyofilize CFS'lerin *S. pneumoniae* ATCC BAA-1665 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve iki probiyotik sekretomu arasında dikkate değer bir yanıt profili farklılığı saptanmıştır. *L. plantarum* 299v CFS uygulaması, test edilen tüm konsantrasyonlarda pnömokok biyofilm biyokütlesini kontrol grubuna kıyasla doza bağımlı bir şekilde baskılamıştır. Buna karşılık *L. gasseri* L10 CFS uygulaması bifazik/konsantrasyona bağlı çift yönlü bir yanıt sergilemiş; yalnızca en yüksek test konsantrasyonunda (100 mg/mL) anlamlı bir biyofilm inhibisyonu sağlarken, 50 mg/mL dozunda etkisiz kalmış, en düşük test dozu olan 25 mg/mL konsantrasyonda ise kontrol grubuna kıyasla biyofilm biyokütlesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artışa (%132,5) yol açmıştır.

L. gasseri CFS'sinin düşük test konsantrasyonunda (25 mg/mL) sergilediği bu biyofilm indükleyici etki, hücresiz süpernatantların çok bileşenli kimyasal mimarisi ve pnömokokların mikroçevresel stres faktörlerine verdiği fenotipik adaptasyon ile açıklanabilir. Laktobasil süpernatantları; organik asitler, biyoaktif peptitler/bakteriyosinler, hidrojen peroksit ve besiyeri matriksinden taşınan eser iyonların bir arada bulunduğu karmaşık bir metabolit havuzuna

sahiptir (Vertillo Aluisio vd., 2024; Sengprasert vd., 2024). Pnömokok biyofilm fizyolojisi incelendiğinde, ortamdaki spesifik metabolitlerin biyofilm formasyonunu zıt yönlerde regüle ettiği bilinmektedir. Nitekim Blanchette ve ark. (2016), *S. pneumoniae* kültürlerine laktat ilavesinin biyofilm biyokütlesini azalttığını, buna karşın asetat varlığının biyofilm üretimini doğrudan artırdığını göstermiştir. Bu durum, *L. gasseri* CFS içerisinde bulunabilecek organik asitler ve diğer metabolitlerin konsantrasyona bağlı etkileri ile ilişkili olabilecek olası bir mekanizmayı düşündürmektedir. Özellikle asetat gibi bazı metabolitlerin düşük konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu artırabileceği bildirilmiş olmakla birlikte (Blanchette vd., 2016), çalışmamızda CFS bileşenlerinin kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmediğinden bu mekanizmanın deneysel olarak doğrulanması gerekmektedir. Bir diğer olası mekanizma ise süpernatant içeriğindeki biyoaktif proteinlerin ve metal iyonlarının etkileşimidir. Sengprasert ve ark. (2024), *L. gasseri* L10 sekretomundaki antibakteriyel etkinliğin önemli ölçüde protein yapılı bileşenlere dayandığını ortaya koymuştur. Ancak gasserisin T gibi laktobasil bakteriyosinlerinin sentez ve aktivitesi ortamdaki çinko gibi divalent katyonların derişimine son derece duyarlı olup, yüksek metal iyonu varlığı bakteriyosin etkinliğini baskılayabilmektedir (Guo vd., 2014). Bununla birlikte Brown ve ark. (2017), çinko mevcudiyetinin *S. pneumoniae* hücrelerinde interbakteriyel agregasyonu ve yüzeye tutunmayı tetikleyerek biyofilm biyokütlesini artırdığını bildirmiştir. Dolayısıyla 25 mg/mL gibi konsantrasyonlarda laktobasil metabolitlerinin seyreltilmesi; bir yandan bakterisidal/bakteriyostatik baskıyı azaltarak bakteride sub-letal bir savunma stresini tetiklemiş, diğer yandan süpernatant havuzundaki agrege edici bileşenlerin pnömokok biyofilmini indüklemesine zemin hazırlamış olabilir. Yüksek konsantrasyonda (100 mg/mL) ise laktat, bakteriyosin ve diğer inhibitör metabolitlerin derişimi eşik değeri aşarak net bir biyofilm baskılanması sağlamış olabilir. Çalışmamızda CFS fraksiyonlarının spesifik iyon içeriği veya metabolomik parmak izi ayrıştırılmadığından, gözlenen bu konsantrasyona bağlı fenotipik dönüşümün tekil bir bileşene atfedilmesi mümkün değildir. Bu doğrultuda elde edilen bulgular; *L. plantarum* 299v'nin stabil ve geniş spektrumlu bir antibiyofilm ajanı olduğunu kanıtlarken, *L. gasseri* L10 sekretomunun pnömokoklar üzerindeki çift yönlü etkisinin aydınlatılması için süpernatant fraksiyonlarının kromatografik olarak saflaştırıldığı ve izole metabolitlerin biyofilm gen ekspresyonları üzerindeki etkilerinin incelendiği ileri çalışmalara gereksinim olduğunu ortaya koymaktadır.

5.3. Çalışmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada, *L. plantarum* 299v ve *L. gasseri* L10 kaynaklı liyofilize CFS fraksiyonlarının dirençli model patojenler üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlikleri farklı konsantrasyonlarda değerlendirilmiş ve her iki probiyotik kaynaklı fraksiyon için belirgin biyolojik aktiviteler ortaya konmuştur. Bununla birlikte, elde edilen bulguların daha ileri düzeyde yorumlanabilmesi ve gözlenen etkilerin mekanistik açıdan açıklanabilmesi açısından çalışmanın kapsamı doğrultusunda bazı ek değerlendirmelere ihtiyaç bulunmaktadır.

Öncelikle, kullanılan CFS fraksiyonlarının kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle gözlenen antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerin belirli bir metabolit veya bileşene spesifik olarak bağlanması mümkün değildir. Bununla birlikte, elde edilen farklı etki profilleri, CFS içerisinde bulunan farklı biyoaktif bileşenlerin katkısının araştırılabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada antibakteriyel etkinliğin farklı konsantrasyonlardaki değişimi değerlendirilmiş olmakla birlikte, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerleri belirlenmemiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar konsantrasyona bağlı etkinlik profillerini ortaya koyarken, MIC ve MBC gibi standart parametreler üzerinden bir eşik değer tanımlanmamıştır.

Çalışmada standart bir antibiyotik pozitif kontrol grubu kullanılmamıştır. Bu nedenle elde edilen antibakteriyel etkinlik, aynı deney koşulları altında standart bir antibiyotik ile doğrudan karşılaştırılmamıştır. Bununla birlikte, çalışmada kullanılan antibiyotik dirençli ve özellikleri tanımlanmış ATCC kaynaklı patojenler üzerindeki elde edilen bulgular, postbiyotik fraksiyonların bu mikroorganizmalar karşısındaki biyolojik aktivitesine ilişkin önemli deneysel veriler sağlamaktadır.

Biyofilm deneylerinde temel olarak biyofilm oluşumunun inhibisyonu değerlendirilmiştir. Bu nedenle önceden oluşturulmuş olgun biyofilmler üzerindeki eradikasyon etkisi çalışma kapsamına dahil edilmemiştir.

Son olarak, bu çalışma kapsamında postbiyotik fraksiyonların konak hücreleri üzerindeki olası etkilerini değerlendirmeye yönelik sitotoksisite analizleri gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle elde edilen antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin biyolojik uyumluluk açısından değerlendirilmesi bu çalışmanın kapsamı dışında kalmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; *L. plantarum* 299v ve *L. gasseri* L10 suşlarından izole edilen liyofilize CFS'lerin, model patojenler (*Escherichia coli* ATCC 35218, MRSA ve *Streptococcus pneumoniae* ATCC BAA-1665) üzerindeki antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlikleri spektrofotometrik ve fenotipik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, her iki probiyotik sekretomunun da patojenlerin planktonik canlılığını doza bağımlı ve anlamlı biçimde baskıladığını ve abiyotik yüzeylerde sesil biyofilm biyokütlesi oluşumunu sınırlandırdığını göstermiştir. Karşılaştırmalı analizler; *L. plantarum* 299v fraksiyonunun özellikle MRSA ve *S. pneumoniae* üzerinde daha düşük dozlarda dahi belirgin bir antibakteriyel ve antibiyofilm potens sergilediğini, buna karşılık *L. gasseri* L10 sekretomunun *S. pneumoniae* biyofilmi üzerinde düşük konsantrasyonda indükleyici, yüksek konsantrasyonda ise baskılayıcı bifazik bir yanıt oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmanın literatüre sağladığı önemli metodolojik ve bilimsel katkılardan biri; sıvı süpernatantların liyofilizasyon yöntemiyle kuru ağırlık bazında standardize edilmiş konsantrasyonlarda değerlendirilmesi ve besiyeri kaynaklı etkilerin kontrol edilmesine yönelik bir yaklaşımın kullanılmasıdır. Bu yaklaşım, laktobasil kaynaklı postbiyotik fraksiyonların farklı konsantrasyonlardaki antibakteriyel ve antibiyofilm etkilerinin kontrollü biçimde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Çalışma, canlı probiyotik kullanımına alternatif olarak probiyotik kaynaklı hücresiz fraksiyonların antibiyotik dirençli patojenler üzerindeki potansiyelinin değerlendirilmesine yönelik deneysel veriler sunmaktadır. Gelecekteki araştırmalarda; öncelikle liyofilizasyon veriminin ve besiyeri kaynaklı kuru madde katkısının nicel olarak belirlenmesi; ayrıca 0,22 µm filtrasyon ve liyofilizasyon basamaklarının peptidik bileşenlerin geri kazanımı üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi önerilmektedir. Bunun yanı sıra, gözlenen bu suşa özgü etki profillerinin kimyasal altyapısını aydınlatmak amacıyla süpernatant havuzundaki organik asit ve biyoaktif bakteriyosin profillerinin kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle (LC-MS/MS, GC-MS) kantifiye edilmesi öncelikli bir adım olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, postbiyotik fraksiyonların önceden oluşmuş olgun biyofilmleri parçalama (eradikasyon) potansiyelinin belirlenmesi, hedef patojenlerdeki adezyon ve virülans genleri üzerindeki transkripsiyonel regülasyonun ortaya konulması ve memeli hücre modellerindeki biyouyumluluk testleri ile desteklenerek *in vivo* enfeksiyon modellerinde terapötik etkinliğinin doğrulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, A., Barkhouse, A., Hackenberger, D., & Wright, G. D. (2024). Antibiotic resistance: A key microbial survival mechanism that threatens public health. *Cell Host & Microbe*, 32(6), 837–851.

Abdelhamid, A. G., Esaam, A., & Hazaa, M. M. (2018). Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant E. *coli*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(5), 603–607.

Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilms in antibiotic resistance and adverse outcomes of nosocomial infection. *Journal of Molecular Biology, 432*(20), 5507–5517.

Aboelnaga, N., Elsayed, S. W., Abdelsalam, N. A., Salem, S., Saif, N. A., Elsayed, M., ... & Elhadidy, M. (2024). Deciphering the dynamics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm formation: From molecular signaling to nanotherapeutic advances. *Cell Communication and Signaling*, 22, 188.

Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105–114.

Akgöl, E., Aydin, E., Temel, A., & Renders, D. P. (2026). Postbiotic approach to antibiotic resistance: Antibacterial and antibiofilm potential of Lactobacillus salivarius supernatant. *International Microbiology*, 29(4), 475–484.

Almahbashi, A., & Gunes Altuntas, E. (2025). From preparation to bioactivity: A comparative study on preparation methods and characterization of postbiotics. *Food Science & Nutrition, 13*(5).

Anorue, M., Ejikeugwu, C., Iroha, C. S., et al. (2025). Extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* encoding aminoglycoside and fluoroquinolone resistant genes in urinary tract infection patients in a tertiary hospital in Nigeria. *BMC Infectious Diseases.25,1171*

Arenas-Gómez, C. M., Garcia-Gutierrez, E., Escobar, J. S., & Cotter, P. D. (2023). Human gut homeostasis and regeneration: The role of the gut microbiota and its metabolites. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(6), 764–785.

Artuyants, A., Hong, J., Dauros-Singorenko, P., Phillips, A. R. J., & Simoes-Barbosa, A. (2024). Lactobacillus gasseri and Gardnerella vaginalis produce extracellular vesicles that contribute to the function of the vaginal microbiome and modulate host-Trichomonas vaginalis interactions. *Molecular Microbiology*, 122(3), 357–371.

Aslan, F. G., & Altındiş, M. (2017). İnsan Mikrobiyom Projesi, Mikrobiyotanın Geleceği ve Kişiye Özel Tıp Uygulamaları. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 1–6.

Azami, S., Arefian, E., & Kashef, N. (2022). Postbiotics of *Lactobacillus casei* target virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by modulating quorum sensing. *Archives of Microbiology, 204*(2), 157.

Azzahra, S. (2025). Plantaricin: Production dynamics, functional applications, and challenges in food biopreservation. *Journal of Food Processing and Preservation, 2025*, 6215738.

PaBelay, W. Y., Getachew, M., Tegegne, B. A., Teffera, Z. H., Dagne, A., Zeleke, T. K., … & Aschale, Y. (2024). Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1444781.

Bessesen, M. T., Kotter, C. V., Wagner, B. D., Adams, J. C., Kingery, S., Benoit, J. B., Robertson, C. E., Janoff, E. N., & Frank, D. N. (2015). MRSA colonization and the nasal microbiome in adults at high risk of colonization and infection. *Journal of Infection*, *71*(6), 649–657

Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur, G., Vij, S., & Malik, R. K. (2010). Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic Enterococcus faecium KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 156–164.

Blanchette, K. A., Shenoy, A. T., Milner, J., II, Gilley, R. P., McClure, E., Hinojosa, C. A., ... & Orihuela, C. J. (2016). Neuraminidase A-exposed galactose promotes *Streptococcus pneumoniae biofilm* formation during colonization. *Infection and Immunity*, 84(10),2922-2932

Borralho, J., Handem, S., Lança, J., Ferreira, B., Candeias, C., Henriques, A. O., Hiller, N. L., Valente, C., & Sá-Leão, R. (2025). Inhibition of pneumococcal growth and biofilm formation by human isolates of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus oralis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *91*(3), 01336-24

Brown, L. R., Caulkins, R. C., Schartel, T. E., Rosch, J. W., Honsa, E. S., Schultz-Cherry, S., Meliopoulos, V. A., Cherry, S., & Thornton, J. A. (2017). Increased zinc availability enhances initial aggregation and biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7*, 233.

Cate, J. D., Sullivan, Y. Z., & King, M. D. (2024). Inhibition of microbial growth and biofilm formation in pure and mixed bacterial samples. *Microorganisms, 12*(7), 1500

Centers for Disease Control and Prevention (2026). *Clinical Features of Pneumococcal Disease*. [Erişim: 11.10.2026, https://www.cdc.gov/pneumococcal/hcp/clinical-signs/index.html]

Chao, Y., Marks, L. R., Pettigrew, M. M., & Håkansson, A. P. (2015). Streptococcus pneumoniae biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 194.

Charest, A. M., Reed, E., Bozorgzadeh, S., Hernandez, L., Getsey, N. V., Smith, L., … & Riley, M. A. (2024). Nisin inhibition of Gram-negative bacteria. *Microorganisms*, 12(6), 1230.

Che, J., Shi, J., Fang, C., Zeng, X., Wu, Z., Du, Q., Tu, M., & Pan, D. (2024). Elimination of pathogen biofilms via postbiotics from lactic acid bacteria: A promising method in food and biomedicine. *Microorganisms*, 12(4), 704.

Chen, Y., Xiao, L., Zhou, M., & Zhang, H. (2024). The microbiota: A crucial mediator in gut homeostasis and colonization resistance. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1417864.

Chong, H.-X., Yusoff, N. A. A., Hor, Y.-Y., Lew, L.-C., Jaafar, M. H., Choi, S.-B., Yusoff, M. S. B., Wahid, N., Abdullah, M. F. I. L., Zakaria, N., Ong, K.-L., Park, Y.-H., & Liong, M.-T. (2019). *Lactobacillus plantarum* DR7 improved upper respiratory tract infections via enhancing immune and inflammatory parameters: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Dairy Science*, *102*(6), 4783–4797

Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014). Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology*, 28(8), 1221–1238.

Cox, T. O., Lundgren, P., Nath, K., et al. (2022). Metabolic control by the microbiome. *Genome Medicine*, 14, 80.

Croatti, V., Parolin, C., Giordani, B., Fedi, S., Vitali, B., & Foschi, C. (2022). Lactobacilli extracellular vesicles: Potential postbiotics to support the vaginal microbiota homeostasis. *Microbial Cell Factories*, 21, 237.

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 701–712.
Cui, J., et al. (2024). Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules. *Frontiers in Immunology, 15*, 1387975.
Cuciniello, R., Di Meo, F., Filosa, S., Crispi, S., & Bergamo, P. (2023). The antioxidant effect of dietary bioactives arises from the interplay between the physiology of the host and the gut microbiota: Involvement of short-chain fatty acids. *Antioxidants*, 12(5), 1073.
den Besten, G., Bleeker, A., Gerding, A., van Eunen, K., Havinga, R., van Dijk, T. H., ... & Bakker, B. M. (2015). Short-chain fatty acids protect against high-fat diet-induced obesity via a PPARγ-dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*, 64(7), 2398–2408.
de Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. ve de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract*. International Dairy Journal, 16(9), 1018–1028
Daffinee, K. E., Piehl, E. C., Bleick, C., & LaPlante, K. L. (2023). Eradication of *Staphylococcus epidermidis* within biofilms: Comparison of systemic versus supratherapeutic concentrations of antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *67*(6), e00108-23
Dahmouni, S., Benabdelmoumene, D., Bengharbi, Z., Fodil, M. K., Umar, K. M., Qadi, W. S. M., Krache, F., Waqar, M., Tong, X., Han, R., Abu Bakar, Z. H., Sarian, M. N., Mediani, A., Jam, F. A., & Hamezah, H. S. (2026). Postbiotics and paraprobiotics in food biochemistry mechanisms stability and nutritional applications. *npj Science of Food*, *10*, 242.
Domouchtsidou, A., Ioannou, P., Lianou, A., Tsante, K. A., Tsakri, D., Bonova, E., Baliou, S., Fortis, S. P., Chaldoupis, A. E., Samonis, G., Koutserimpas, C., Sokou, R., Papadopoulos, D. V., & Tsantes, A. G. (2025). Biofilms in clinical infection: Pathophysiology, diagnosis, and the evolving therapeutic landscape. *Journal of Clinical Microbiology*
Danilova, T. A., Adzhieva, A. A., Danilina, G. A., Polyakov, N. B., Soloviev, A. I., & Zhukhovitsky, V. G. (2019). Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms. Bulletin of Experimental Biology and Medicine.167(6), 751-754
Das, S., & Konwar, B. K. (2024). Inhibiting pathogenicity of vaginal *Candida albicans* by lactic acid bacteria and MS analysis of their extracellular compounds. *APMIS, 132*(3), 161–186
Dong, T. S., & Mayer, E. A. (2024). Advances in brain-gut-microbiome interactions: A comprehensive update on signaling mechanisms, disorders, and therapeutic implications. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 18*(1), 1–13
Donia, M. S., Cimermancic, P., Schulze, C. J., Blanding, M. E., Chung, I. K., et al. (2014). A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell, 158*(6), 1402–1414.
Du Toit, A. (2025). In tandem towards resistance. *Nature Reviews Microbiology, 23*(1), 5
Du, H., Chi, H., Yao, H., Lu, Z., Bie, X., Zhang, C., Zhao, H., Lu, F., & Chen, M. (2022). The antibacterial activity of plantaricin GZ1–27 against MRSA and its bio-preservative effect on chilled pork in combination with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, *377*, 109539
Dreyer, L., Smith, C., Deane, S. M., Dicks, L. M. T., & van Staden, A. D. (2019). Migration of bacteriocins across gastrointestinal epithelial and vascular endothelial cells, as determined using in vitro simulations. *Scientific Reports*, 9, 11481.

Dubey, A. K., Sharma, M., Parul, Raut, S., Gupta, P., & Khatri, N. (2023). Healing wounds, defeating biofilms: *Lactiplantibacillus plantarum* in tackling MRSA infections. *Frontiers in Microbiology, 14*, 1284195

Duda-Madej, A., Viscardi, S., Niezgódka, P., Szewczyk, W., & Wińska, K. (2025). The impact of plant-derived polyphenols on combating efflux-mediated antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9), 4030.

Falqueto, A., Rodrigues, R. S., Souza, L. V., Carvalho, A. F., Caggia, C., Nero, L. A., Machado, S. G., & Randazzo, C. L. (2026). Bactericidal and antibiofilm activity of lactic acid bacteria-derived cell free extracts against dairy-associated spoilage and pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology, 17*, 1783760

Fang, Y., et al. (2024). *Genetics of antibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Biotechnology Journal, 18(7), e2200521.

Field, D., O'Connor, R., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2016). In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against Staphylococcus biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 508.

Flemming, H.-C., van Hullebusch, E. D., Little, B. J., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., ... & Wuertz, S. (2025). Microbial extracellular polymeric substances in the environment, technology and medicine. *Nature Reviews Microbiology*, 23(2), 87–105.

Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R. E., Martin, R. J., Lefevre, M., ... & Ye, J. (2009). Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 58(7), 1509–1517.

Gao, X., Wang, Z., Li, X., Zhang, X., Du, S., Jia, M., Hu, D., Jia, X., Cong, B., Zhang, Y., Ma, C., Zhou, S., & Zhang, J. (2022). A new *Lactobacillus gasseri* strain HMV18 inhibits the growth of pathogenic bacteria. *Food Science and Human Wellness, 11*(2), 247–254

Gargate, N., Laws, M., & Rahman, K. M. (2025). Current economic and regulatory challenges in developing antibiotics for Gram-negative bacteria. *npj Antimicrobials and Resistance*, 3, 50.

GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet, 404*(10459), 1199–1226

Gilardini Montani, M. S., Granato, M., Santoni, C., Del Porto, P., Merendino, N., D'Orazi, G., ... & Cirone, M. (2017). Histone deacetylase inhibitors VPA and TSA induce apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. *Cellular Oncology*, 40(2), 167–180.

Guo, X., Uenishi, H., Kawai, Y., Yasuta, N., Kasuga, G., Takezawa, S., Seto, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H., & Saito, T. (2014). Effect of divalent metal cations on production of gassericin T by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Milk Science, 63*(3), 129–135

Han, K., Meadows, A. M., Rodman, M. J., Russo, A. C., Sharma, R., Singh, K., ... & Sack, M. N. (2024). Propionate functions as a feeding state–dependent regulatory metabolite to counter proinflammatory signaling linked to nutrient load and obesity. *Journal of Leukocyte Biology*, 115(4), 738–749.

Hao, Y., Li, J., Wang, J., & Chen, Y. (2024). Mechanisms of health improvement by *Lactiplantibacillus plantarum* based on animal and human trials: A review. Fermentation, 10(2), Article 73.

Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract – revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(6), 681–689.

Heneka, M. T., van der Flier, W. M., Jessen, F., Hoozemans, J. J. M., Thal, D. R., Boche, D., ... & Riechers, S.-P. (2025). Neuroinflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Immunology*, 25(5), 321–352.

Horrocks, V., King, O. G., Yip, A. Y. G., Melo Marques, I., & McDonald, J. A. K. (2023). Role of the gut microbiota in nutrient competition and protection against intestinal pathogen colonization. *Microbiology*, 169(8), 001377.

Hu, M., Alashkar Alhamwe, B., Santner-Nanan, B., Miethe, S., Harb, H., Renz, H., Potaczek, D. P., & Nanan, R. K. (2022). Short-chain fatty acids augment differentiation and function of human induced regulatory T cells. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(10), 5740.

Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207–214.

Hsu, Y.-C., Huang, Y.-Y., Tsai, S.-Y., Kuo, Y.-W., Lin, J.-H., Ho, H.-H., ... & Sun, Y. (2024). Efficacy of probiotic supplements on brain-derived neurotrophic factor, inflammatory biomarkers, oxidative stress and cognitive function in patients with Alzheimer's dementia: A 12-week randomized, double-blind active-controlled study. *Nutrients*, 16(1), 16.

Iatsenko, I., Marra, A., Boehm, C., et al. (2018). Microbiota-derived lactate activates production of reactive oxygen species by the intestinal NADPH oxidase Nox and shortens Drosophila lifespan. *Immunity*, 49(5), 929–942.e5.

Ishikawa, T., Imai, S., Nakano, T., Terai, T., Okumura, T., Hanada, N., & Kawahara, H. (2020). Antibacterial activity of the probiotic candidate *Lactobacillus gasseri* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Dentistry, 20*(1), 1–8

Jasim, H. M., & Al Zubaidy, Z. M. (2022). Antibacterial and anti-biofilm formation using *Lactobacillus plantarum* and *L. reuteri* against MRSA isolates. *Diyala Journal for Pure Science, 18*(4)

Ibrahim, J.-N., El-Hakim, S., Semaan, J., Ghosn, S., El Ayoubi, H., Elnar, A. A., Tohme, N., & El Boustany, C. (2024). Sodium butyrate (NaB) and sodium propionate (NaP) reduce cyclin A2 expression, inducing cell cycle arrest and proliferation inhibition of different breast cancer subtypes, leading to apoptosis. *Biomedicines, 12*(8), 1779.

Ismael, M., Qayyum, N., Gu, Y., Na, L., Haoyue, H., Farooq, M., ... & Lü, X. (2025). Functional effects of probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* in alleviation multidrug-resistant *Escherichia coli*-associated colitis in BALB/c mice model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 17(6), 4138–4155.

Javadi, K., Emadzadeh, M. R., Mohammadzadeh Hosseini Moghri, S. A. H., Halaji, M., Parsian, H., Rajabnia, M., & Pournajaf, A. (2025). Anti-biofilm and antibacterial effect of bacteriocin derived from *Lactobacillus plantarum* on the multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. *Protein Expression and Purification*, 226, 106610.

Jurenas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*, 20(6), 335–350.

Kalyanaraman, B., Cheng, G., & Hardy, M. (2024). The role of short-chain fatty acids in cancer prevention and cancer treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 761, 110172.

Kalaycı Yüksek, F., Gümüş, D., Bayırlı Turan, D., Nakipoğlu, Y., Adaleti, R., & Küçüker, A. M. (2021). Cell-free supernatants of lactobacilli inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus* and carbapenem-resistant *Klebsiella* strains. *Ege Tıp Dergisi, 60*(4), 332–339.

Lade, H., & Kim, J.-S. (2021). Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics, 10*(4), 398.C

LaPointe, G., Wilson, T., Tarrah, A., Gagnon, M., & Roy, D. (2025). Biofilm formation in dairy: A food safety concern—Microbial community tracking from dairy farm to factory;

Insights on biofilm management for enhanced food safety and quality. *Journal of Dairy Science*, 108(8), 8101–8119.

Le, V. H., King, T., Wuerzberger, B., et al. (2025). Metabolites derived from bacterial isolates of the human skin microbiome inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Microbiology Spectrum*, *13*(9), e01306-25.

Leroy, F., Smith, N. W., Adesogan, A. T., Beal, T., Iannotti, L., Moughan, P. J., & Mann, N. (2023). The role of meat in the human diet: Evolutionary aspects and nutritional value. *Animal Frontiers*, *13*(2), 11–18.

Li, C., Chen, Y., Kwok, L.-Y., Chen, X., Yu, H., Yang, H., ... & Zhang, H. (2014). Identification of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* isolates with broad-spectrum antibacterial activity. *Dairy Science & Technology*, 94, 601–615.

Li, Y., Chen, X., Zhou, M., Feng, S., Peng, X., & Wang, Y. (2024). Microglial TLR4/NLRP3 inflammasome signaling in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 97(1), 75–88.

Liu, H. Y., Prentice, E. L., & Webber, M. A. (2024). Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *npj Antimicrobials and Resistance*, 2, 27.

Liu, Y., Yu, Z., Zhu, L., Ma, S., Luo, Y., Liang, H., Liu, Q., Chen, J., Guli, S., & Chen, X. (2023). Orchestration of MUC2—The key regulatory target of gut barrier and homeostasis: A review. *International Journal of Biological Macromolecules, 236*, 123862

Ma, L., Tu, H., & Chen, T. (2023). Postbiotics in human health: A narrative review. *Nutrients*, *15*(2), 291.

Magalhães Fernandes, M. S., Rios, J. C., Vasconcelos, B. M., Lourenço, M. L. M. C., Matos, M. N. C., Cavalcante, R. M. B., ... & Carneiro, V. A. (2023). Effect of Lactobacillusspp. *cell-free supernatant against planktonic growth and biofilm formation of foodborne Escherichia coli isolates. Letters in Applied Microbiology*, 76(1), ovac006.

Mahdi, L. H., Hasoon, B. A., Sulaiman, G. M., Mohammed, H. A., Jawad, K. H., Al-Dulimi, A. G., … & Khan, R. (2024). Anti-microbial efficacy of L-glutaminase (EC 3.5.1.2) against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection. *The Journal of Antibiotics*, 77(2), 111–119.

Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Bayar, S., Mahdouani, K., Majdoub, H., & Kouidhi, B. (2018). 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*. *Microbial Pathogenesis, 125*, 448–453

Mann, E. R., Lam, Y. K., & Uhlig, H. H. (2024). Short-chain fatty acids: Linking diet, the microbiome and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 24, 577–595.

Martin, J. L. A., Cartwright, N. M., Hutchinson, A. L., Robinson, L. E., Ma, D. 9888865W. L., & Monk, J. M. (2022). Differential effects of short-chain fatty acids on L6 myotube inflammatory mediator production in response to lipopolysaccharide- or palmitic acid-stimulation. *Nutrients*, 14(14), 2826.

Mekky, A. F., Hassanein, W. A., Reda, F. M., & Elsayed, H. M. (2022). Anti-biofilm potential of *Lactobacillus plantarum* Y3 culture and its cell-free supernatant against multidrug-resistant uropathogen *Escherichia coli* U12. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 2989–2997.

Miao, J., Chen, L., Wang, J., Wang, W., Chen, D., Li, L., Li, B., Deng, Y., & Xu, Z. (2017). Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbial Pathogenesis, 107*, 17–28

Mishra, B., Mishra, A. K., Mohanta, Y. K., et al. (2024). Postbiotics: The new horizons of microbial functional bioactive compounds in food preservation and security. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6, 28.

Mlambo, L. K., Abbasiliasi, S., Tang, H. W., Ng, Z. J., Parumasivam, T., Hanafiah, K. M., ... & Tan, J. S. (2022). Bioactive metabolites of *Lactiplantibacillus plantarum* K014 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC43300 and in vitro evaluation of its antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Current Microbiology*, 79(12), 359.

Nair, V. G., Chellappan, D. R., Durai, R. D., Rajesh, Y. B. R. D., Narbhavi, D., Anupriya, A., ... & Nagarajan, S. (2026). Synergistic antipersister, efflux inhibitory & antibiofilm activities of vaginal Lactobacillus-derived postbiotics against UPEC: Toward a novel therapeutic for UTIs. *Scientific Reports*, 16, 5005.

Narang, A., Kaur, S., Kaur, K., Bedi, N., Rajput, N., & Kaur, G. (2025). Targeting microbial biofilms and promoting wound healing in MRSA-infected diabetic rats using postbiotics of *Lactiplantibacillus plantarum*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.*

Nezhadi, J., & Ahmadi, A. (2024). Assessing the efficacy of postbiotics derived from *Lactobacillus plantarum* on antibiotic resistance genes in nosocomial pathogens such as *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, *77*(12)

Nshanian, M., Gruber, J. J., Geller, B. S., Chleilat, F., Lancaster, S. M., White, S. M., ... & Snyder, M. P. (2025). Short-chain fatty acid metabolites propionate and butyrate are unique epigenetic regulatory elements linking diet, metabolism and gene expression. *Nature Metabolism*, 7(1), 196–211.

Oliveira, G. S., Freire, H. P. S., Romano, C. C., Rezende, R. P., Evangelista, A. G., Meneghetti, C., et al. (2022). Bioprotective potential of lactic acid bacteria and their metabolites against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 168 001216.

Oliveira, I. M., Gomes, I. B., Simões, L. C., & Simões, M. (2024). A review of research advances on disinfection strategies for biofilm control in drinking water distribution systems. *Water Research*, 253, 121273.

Osman, A.-H., Darkwah, S., Kotey, F. C. N., Odoom, A., Hotor, P., Dayie, N. T. K. D., & Donkor, E. S. (2024). Reservoirs of nosocomial pathogens in intensive care units: A systematic review. *Environmental Health Insights, 18*, 1–16

Oteng, A.-B., & Liu, L. (2023). GPCR-mediated effects of fatty acids and bile acids on glucose homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1206063.

Ozma, M. A., Ghotaslou, R., Asgharzadeh, M., Abbasi, A., Ahangarzadeh Rezaee, M., & Samadi Kafil, H. (2024). Cytotoxicity assessment and antimicrobial effects of cell-free supernatants from probiotic lactic acid bacteria and yeast against multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, *77*(9), ovae084

Patel, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Surti, M., Awadelkareem, A. M., Ashraf, S. A., Alreshidi, M., Snoussi, M., Rizvi, S. M. D., Bardakci, F., Jamal, A., Sachidanandan, M., & Adnan, M. (2021). Inhibition of bacterial adhesion and antibiofilm activities of a glycolipid biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with its physicochemical and functional properties. *Antibiotics, 10*(12), 154ğş6

Pai, L., Patil, S., Liu, S., & Wen, F. (2023). A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: Insights from reviews on antibiotic resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1327069.

Piqué, N., Berlanga, M., & Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed Lactobacillus and Bifidobacterium species based on their immunomodulatory properties. **Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1455–1465.

Petrova, M., Georgieva, R., Dimitonova, S., Ivanovska, N., Hadjieva, N., & Danova, S. (2014). Inhibitory activity of vaginal lactobacilli against human pathogens. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23*(Suppl. 1), 627–631

Rad, A. H., Aghebati Maleki, L., Kafil, H. S., & Asgharzadeh, M. (2022). Postbiotics: A novel strategy in food safety and health. *Trends in Food Science & Technology.*

Rani, R. P., Anandharaj, M., & Ravindran, A. D. (2018). Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its in vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules, 109*, 772–783

Reddy, C. M. S., & Ramnani, V. K. (2024). Comparative analysis of phenotypic techniques used to find biofilm formation in urinary isolates. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 16*(8), 1705–1708

Ruigrok, R. A. A. A., Weersma, R. K., & Vich Vila, A. (2023). The emerging role of the small intestinal microbiota in human health and disease. *Gut Microbes*, 15(1), 2201155.

Saadatzadeh, A., Fazeli, M. R., Jamalifar, H., & Dinarvand, R. (2013). Probiotic properties of lyophilized cell free extract of *Lactobacillus casei. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 131–137.

Saidi, N., Saderi, H., Owlia, P., & Soleimani, M. (2023). Anti-biofilm potential of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* cell-free supernatant extracts against *Staphylococcus aureus*. *Advanced Biomedical Research, 12*, Article 50

Saedi, S., Nezhadi, J., Abedi Soleimani, R., Asghari Ozma, M., & Samadi Kafil, H. (2025). Effects of postbiotics derived *from Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* on biofilm formation and virulence gene expression of *Enterococcus faecalis.* Jundishapur Journal of Microbiology, 18(10)

Sadeghpour Heravi, F. (2024). Host-vaginal microbiota interaction: Shaping the vaginal microenvironment and bacterial vaginosis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 11, 177–191.

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., ... & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649–667.

Salmanton-García, J., Bruns, C., Rutz, J., Albertsmeier, M., Ankert, J., Bernard, L., Bataille, C., Couvé-Deacon, E., Fernández-Ferrer, M., Fortún, J., Galar, A., Grill, E., Guimard, T., Classen, A. Y., Vehreschild, J. J., Stemler, J., Naendrup, J.-H., Hampl, J. A., Tallon, B., ... Mellinghoff, S. C. (2024). Costs and resource utilization patterns in surgical site infections: A pre-COVID-19 perspective from France, Germany, Spain, and the UK. *Journal of Hospital Infection, 147*, 123–132.

Shore, A. C., Deasy, E. C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R., & Coleman, D. C. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA, mecI, mecR1, blaZ,* and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(8), 3765–3773

Saxena, D., Maitra, R., Bormon, R., Czekanska, M., Meiers, J., Titz, A., Verma, S., & Chopra, S. (2023). Tackling the outer membrane: Facilitating compound entry into Gram-negative bacterial pathogens. *npj Antimicrobials and Resistance*, 1, 17.

Sengprasert, P., Waitayangkoon, P., Kamenkit, O., Sawatpanich, A., Chaichana, T., Wongphoom, J., Ngarmukos, S., Taweevisit, M., Lotinun, S., Tumwasorn, S., Tanavalee, A., & Reantragoon, R. (2024). Catabolic mediators from TLR2-mediated

proteoglycan aggrecan peptide-stimulated chondrocytes are reduced by *Lactobacillus*-conditioned media. *Scientific Reports, 14*, 18043

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164(3), 337–340.

Sezer, Ç., Bilge, N., Büyük, G. D., & Ayyıldız Akın, M. (2026). Antimicrobial effect of postbiotics on multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Foods, 15*(2), 384

Sharkey, K. A., & Mawe, G. M. (2023). The enteric nervous system. *Physiological Reviews*, 103(2), 1487–1564.

Shi, Y., Xin, D., Zhang, H., Wang, S., Yang, M., & Liu, C. (2025). Propionate alleviates ulcerative colitis by modulating the PI3K/AKT signaling pathway and suppressing NLRP3 inflammasome activation. *Food & Function*, 16(17), 6925–6938.

Shin, C., & Kim, Y.-K. (2023). Microbiota-gut-brain axis: Pathophysiological mechanism in neuropsychiatric disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1411, 17–37.

Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly-Y, M., ... & Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.

Sornsenee, P., Chatatikun, M., et al. (2021). Lyophilized cell-free supernatants of Lactobacillus isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *PeerJ*, 9, e12586.

Soto-Aceves, M. P., Diggle, S. P. ve Greenberg, E. P. (2023). *Microbial Primer: LuxR-LuxI Quorum Sensing*. Microbiology, 169(9), 001343

Sun, H., Chai, X., Xu, G., & Wei, S. (2023). The formation and drug resistance mechanism of biofilm for *Streptococcus pneumoniae* infection in severe respiratory patients. *Cellular and Molecular Biology, 69*(1), 75–80.

Sugrue, I., Ross, R. P., & Hill, C. (2024). Bacteriocin diversity, function, discovery and application as antimicrobials. *Nature Reviews Microbiology, 22*(9), 556–571.

Szczerbiec, D., Bednarska-Szczepaniak, K., & Torzewska, A. (2024). Antibacterial properties and urease suppression ability of Lactobacillus inhibit the development of infectious urinary stones caused by Proteus mirabilis. *Scientific Reports*, 14, 943.

Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., & Nie, D. (2011). Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 18(4), 602–618.

Thoda, C., & Touraki, M. (2023). Probiotic-derived bioactive compounds in colorectal cancer treatment. *Microorganisms*, 11(8), 1898.

Trefely, S., Lovell, C. D., Snyder, N. W., & Wellen, K. E. (2020). Compartmentalised acyl-CoA metabolism and roles in chromatin regulation. *Molecular Metabolism*, 38, 100941.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449, 804–810.

Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2021). Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics, 10*(1), 3

Ushiyama, A., Tanaka, K., Aiba, Y., Shiba, T., Takagi, A., Mine, T., & Koga, Y. (2003). Lactobacillus gasseri OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant Helicobacter pylori infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(8), 986–991.

Vertillo Aluisio, G., Mezzatesta, M. L., Cafiso, V., Scuderi, R., Stefani, S., & Santagati, M. (2024). Cell-free supernatant of *Lactobacillus gasseri* 1A-TV shows a promising activity to eradicate carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1471107.

Waby, J. S., Chirakkal, H., Yu, C. W., Griffiths, G. J., Benson, R. S. P., Bingle, C. D., & Corfe, B. M. (2010). Sp1 acetylation is associated with loss of DNA binding at promoters associated with cell cycle arrest and cell death in a colon cell line. *Molecular Cancer*, 9, 275.

Wachino, J.-i. (2025). Horizontal gene transfer systems for spread of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Microbiology and Immunology*, 69(7), 367–376.

Wang, W., Dernst, A., Martin, B., Lorenzi, L., Cadefau-Fabregat, M., Phulphagar, K., ... & Mangan, M. S. J. (2024). Butyrate and propionate are microbial danger signals that activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages upon TLR stimulation. *Cell Reports*, 43(9), 114736.

Wasiak, J., Głowacka, P., Pudlarz, A., Pieczonka, A. M., Dzitko, K., Szemraj, J., & Witusik-Perkowska, M. (2024). Lactic acid bacteria-derived postbiotics as adjunctive agents in breast cancer treatment to boost the antineoplastic effect of a conventional therapeutic comprising tamoxifen and a new drug candidate: An aziridine–hydrazide hydrazone derivative. *Molecules*, 29(10), 2292.

Wegh, C. A. M., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., & Belzer, C. (2019). Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4673.

Williams, P. (2025). Microbial Primer: agr-mediated quorum sensing in Gram-positive pathogens. *Microbiology, 171*(7), 001590

World Health Organization Regional Office for Europe (2024). Antimicrobial Resistance. [Erişim: 11.10.2026, https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/antimicrobial-resistance]

World Health Organization (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization. [Erişim: 11.10.2026, https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461]

World Health Organization. (2025). *Global antibiotic resistance surveillance report 2025*. https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337Lade

World Health Organization (2026). *Antimicrobial resistance*. [Erişim: 11.10.2026, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance]

Wu, S., Chen, Y., Wei, F., Chen, Z., Fan, J., Luo, Y., Li, P., & Gu, Q. (2024). Lactiplantibacillus plantarum ZJ316 alleviates the oxidative stress and cellular apoptosis via modulating Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Journal of Functional Foods, 121*, 106409

Xiang, X., et al. (2024). The Bro-Xre toxin-antitoxin modules in *Weissella cibaria*: Inducing persister cells to escape tetracycline stress by disrupting metabolism. *Frontiers in Microbiology.*

Yang, S., Liu, L., Guo, S., Chen, X., Deng, X., Tu, M., ... & Wang, J. (2023). Antimicrobial activity against Staphylococcus aureus and genome features of Lactiplantibacillus plantarum LR-14 from Sichuan pickles. *Archives of Microbiology.*

Yardeni, T., Tanes, C. E., Bittinger, K., Mattei, L. M., Schaefer, P. M., Singh, L. N., ... & Wallace, D. C. (2019). Host mitochondria influence gut microbiome diversity: A role for ROS. *Science Signaling*, 12(588).

Ye, Z., Shentu, H., Zhou, Q., Wu, D., Li, P., & Gu, Q. (2024). A novel bacteriocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, purified from *Lactiplantibacillus plantarum* ZFM9. *Food Chemistry, 451*, 139344.

Yin, Y., Liu, Y., Sigdel, K. R., & Duan, L. (2022). Role of NLRP3 inflammasome in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology, 13*, 931690.

Zahari, N. I. N., Engku Abd Rahman, E. N. S., Irekeola, A. A., Ahmed, N., Rabaan, A. A., Alotaibi, J., Alqahtani, S. A., Halawi, M. Y., Alamri, I. A., Almogbel, M. S., Alfaraj, A. H., Al Ibrahim, F., Almaghaslah, M., Alissa, M., & Yean, C. Y. (2023). A review of the resistance mechanisms for β-lactams, macrolides and fluoroquinolones among *Streptococcus pneumoniae*. *Medicina*, *59*(11), 1927

Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., & Chen, L. (2024). Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9, 211.

Zhang, Q., Chen, Q., Chen, S., Zhang, J., Chen, W., & Zhang, H. (2022). Inhibitory effect of *Lactobacillus gasseri* CCFM1201 on *Gardnerella vaginalis* in mice with bacterial vaginosis. *Archives of Microbiology*.

Zhang, Y., Shen, J., Hu, F., Wang, B., Liu, C., Jiang, F., ... & Zhao, G. (2026). Molecular characterization and correlation with β-lactam resistance of penicillin-binding protein 2x, 2b, and 1a of Streptococcus pneumoniae in clinical pneumococcal isolates. *Microbiology Spectrum*, 14(8), e03850-25.

Zheng, Z., Tang, J., Hu, Y., & Zhang, W. (2022). Role of gut microbiota-derived signals in the regulation of gastrointestinal motility. *Frontiers in Medicine*, 9, 961703.

Ziabska, K., Pawelec, P., Stanaszek, L., & Ziemka-Nalecz, M. (2026). The diverse effect of HDAC inhibitors: Sodium butyrate and givinostat on microglia polarization after hypoxia-ischemia in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(2), 1114.