

Vibrio anguillarum* Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Virülens Faktörlerinin İncelenmesi

Nurdan NURCAN¹, Ayşegül KUBİLAY^{1}, Gülgün BOŞGELMEZ-TINAZ²**

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta

²Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul

Geliş : 10.12.2015

Kabul : 06.04.2016

**Sorumlu yazar: aykub@yahoo.com

Basılı ISSN: 1300 - 4891E. Dergi ISSN: 1308 - 7517

Özet

Son yıllarda yapılan araştırmalar, patojenik bakterilerin bir çoğunun virülens faktörlerinin üretimini *N*-açıl homoserin lakton (AHL) türevi sinyal molekülleri aracılığı ile kontrol ettiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada Gram negatif bakteriyel bir balık patojeni olan *Vibrio anguillarum* izolatlarında *N*-açıl homoserin lakton türevi sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak araştırılmıştır. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *V. anguillarum* suşlarının, *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde negatif sonuç vermesine karşın, *A. tumefaciens* NT1 kullanılarak yapılan testlerde, pozitif sonuçlar verdiği saptanmıştır. Ayrıca bu suşların, *V. anguillarum*'un patojenitesinde önemli rol oynadıkları düşünülen biyofilm oluşumu, pigment üretimi ve proteaz aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *V. anguillarum*, çevreyi algılama sistemi, biyofilm, pigment, proteaz, *N*-açıl homoserin lakton

Investigation on Quorum Sensing System and Virulence Factors of *Vibrio anguillarum* Strains

Abstract

In recent years, are reported that virulence factors of many pathogenic bacteria are controlled via acyl homoserine lactone (AHL) signaling molecules. In this study, production of N-acyl homoserine lactone signaling molecules were investigated using *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biosensor strains in *Vibrio anguillarum* isolates, Gram negative fish pathogens. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain was used as a positive control. As a result of, it was found that negative results by using *C. violaceum* CV026 in test, despite positive results using *A. tumefaciens* NT1 in test of *V. anguillarum* strains. In addition were determined of biofilm formation, production of pigments and protease activity which are thought to play an important role in the pathogenesis in the *V. anguillarum* strains.

Keywords: *V. anguillarum*, quorum sensing system, biofilm, pigment, protease, N-acyl homoserine lactones

***Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.**

GİRİŞ

Günümüzde bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için en yaygın olarak tercih edilen yöntem antibiyotik kullanımıdır. Ancak gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımı antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına, bu da, kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalması, dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi ve direncin yayılması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, "enfeksiyon hastalıkları" hala dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir (Baskın, 2005).Günümüzde hastalık yapan bakterilerin % 70'in den fazlası klinikte kullanılan mevcut antibiyotiklerden en az birine karşı dirençli hale gelmiştir. Dolayısıyla, yeni

antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar çok büyük önem kazanmıştır. Bu hedeflerden bir tanesi bakteriler arası iletişim (quorum sensing) mekanizmasının inhibe edilmesidir. Gram (-) bakteriler birbirleriyle haberleşme amacıyla, açıl-homoserin lakton (AHL) türevi sinyal moleküllerini kullanırlar. Bakteriler bu sinyal molekülleri aracılığıyla yeterli çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin üretimi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedirler. Hücreler arası iletişimi sağlayan bu haberleşme sistemi quorum sensing (çevreyi algılama) olarak adlandırılır (Boşgelmez-Tınaz , 2003; Chu vd., 2015). Bu olay bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenlenme olanağı verir. Böylelikle, konakta enfeksiyon oluşturabilecek yeter çoğunluğa ulaşıncaya kadar bağışıklık sistemi tarafından patojen bakterinin fark edilmemesi sağlanarak başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturulur (Boşgelmez-Tınaz, 2013). İlk defa *Vibrio fisheri*'de tanımlanmış olan bu bakteriyel iletişim sisteminin daha sonra bu bakteri ile sınırlı olmadığı *Erwinia carotovora*, *Yersinia enterocolitica*, *A. tumefaciens* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi bir çok insan, hayvan ve bitki patojeni tarafından yaygın olarak kullanıldığı keşfedilmiştir (Milton vd., 1997). Gram negatif bakteriler birbirleriyle haberleşme amacıyla, açıl-homoserin lakton (AHLs) moleküllerini kullandıkları bilinmektedir (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

V. anguillarum Gram negatif bakteriyel bir balık patojenidir. Balıklarda hemorajik septisemiye neden olan vibriozis hastalığının etkenidir (Milton vd., 1997).

Daha önce yapılan çalışmalar *V. anguillarum*'da çevreyi algılama sistemi ve virülens arasında doğrudan bir bağlantı olmadığını göstermiştir (Milton vd., 2001, Purohit, 2013). Ancak, ilginç bir şekilde bir çevreyi algılama sistemi inhibitörü olan furanon C30'un gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum*'un neden olduğu vibriozis'den ölümleri azalttığı gözlenmiştir (Rasch vd., 2004; Bruhn vd., 2005). Bakterilerde bu sistemin ve virülens faktörlerinin üretim mekanizmalarının çalışılması, patojen bakterilerin neden olduğu hastalıkların önüne geçilmesi açasından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, *V. anguillarum* izolatlarında çevreyi algılama sistemi ve virülens faktörlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; *V. anguillarum*'un ürettiği N-açıl homoserin lakton (AHL) sinyal moleküllerinin tespiti ve çevreyi algılama sisteminin etkisi altında olan virülens faktörlerinden özellikle biyofilm oluşumu, pigment ve proteaz üretimleri incelenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırmada S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi mikroorganizma koleksiyonu içinden alınan 5 adet *V. anguillarum* suşu kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* PAO1 suşu, AHL sinyal moleküllerinin tespiti için kullanılan *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

AHL moleküllerinin tespiti

AHL sinyal moleküllerinin tespiti, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak gerçekteştirilmiştir. Açıl yan zincirinde 4-8 karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 suşu kullanılmıştır. Ortamdaki mevcut AHL molekülleri, *C. violaceum* CV026suşunda mor bir pigment olan viyolasinin üretimini uyarır (McClean vd., 1997). Diğer bir biyosensör olarak, pZLR4 plazmiti taşıyan

A. tumefaciens NT1 suşu kullanılmıştır (Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001). *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşu, ortamda X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid) varlığında, *N*-açıl yan zincirinde 6-12 karbona sahip AHL molekülünün uyarılmasıyla yeşil pigment meydana getirir (Bruhn vd., 2005; Ulusoy, 2007; Myszka ve Czaczkyk 2012; Purohit, 2013).

AHL moleküllerinin tespiti için çapraz doğrulama testi

Çalışılan suşlarda AHL moleküllerinin üretimi, her iki biyosensör suş (CV026 ve NT1) ile besiyeri üzerinde paralel çizilerek test edilmiştir. Sonuçlar *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007; Mohaddam vd., 2014).

Biyofilm testi

Biyofilm oluşumu O'Toole ve Kolter'in (1998) tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir. *V. anguillarum* suşları LB besiyerinde (%3 NaCl eklenmiş) (LBS) 16 saat üretilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri yoğunluğu OD 600'de 0,8'e ayarlanmıştır. Bakteri kültürü 1/100'lük steril LBS ortamı ile sulandırılmıştır. Sulandırılan kültürler düz tabanlı 96 çukurlu mikropalakalara 100 µl olarak ilave edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben mikropalakalar distile su ile yıkanmış ve %1'lik kristal viyole ile 15 dk süresince boyanmıştır. Daha sonra boya dökülerek fazlası saf su ile yıkanmıştır. 200 µL %95 etanol eklenerek absorbans değerleri ELISA okuyucuda 490 nm'de okunarak değerlendirilmiştir (Ye vd., 2008; Deepa vd., 2014).

Pigment testi

Test edilecek *V. anguillarum* suşları %1 NaCl içeren 10 ml LBS besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. İnkübe edilen bakteri kültürleri OD600'de 0.05'e ayarlanmıştır. Dilüsyonda LB ve LB içinde 5mM'lık L-Tryosine (Tirozin) içeren ortam kullanılmış ve hazırlanan kültürler 25°C'de karıştırılarak 24 saat inkübe edilmiştir. Çeşitli zaman aralıklarında tirozin içeren ve içermeyen kültürlerden 1 ml örnek alınarak 12000 devirde 2 dksantrifüj edilerek süpernatantı toplanmıştır. Süpernatantlar 96 çukurlu düz tabanlı mikropalakalara 100 µl ilave edilerek, her bakteri izolatu için ayrı ayrı çalışılmıştır. Pigment üretimi; 405 nm'de ELISA okuyucusunda optik yoğunluklarının ölçümü ile hesaplanmıştır (Croatto vd., 2002).

Proteaz testi

Test edilecek 18 saatlik *V. anguillarum* suşları % 2 yağsız süt tozu içeren %1 oranında tuz (NaCl) ilaveli TSA petrilerinin ortasına açılan 3 mm'lik çukurlara 20 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Arda, 1997; Swift vd., 1999; Dong vd., 2005; Ulusoy, 2007). Suşların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir.

BULGULAR

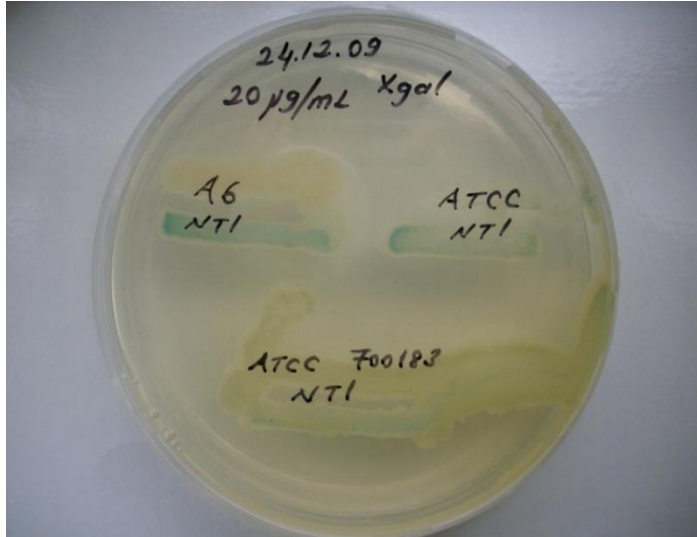
Çalışmada kullanılan *V. anguillarum* suşlarının (A4, A5, A6, ATCC, ATCC 700183) *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları ile yapılan testlerde uzun zincirli bir sinyal molekülü olan *N*-(3-oxodecanoyl)-L-homoserin lakton (ODHL)

molekülünü üretmelerine karşın, kısa zincirli bir sinyal molekülü olan *N*-hexanoyl-L-homoserin lakton (C6-HSL) üretmediği gözlenmiştir.

V. anguillarum suşlarında ODHL sinyal moleküllerinin varlığının tespiti ile bu moleküllere bağımlı olarak gerçekleşen biyofilm oluşturma, pigment ve proteaz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörleri de tespit edilmiştir.

Biyosensör Suşlar Aracılığıyla *V. anguillarum*'da N-acyl Homoserin Lakton (AHL) Sinyal Moleküllerinin Tespiti

AHL moleküllerinin üretimi, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak fenotipik olarak araştırılmıştır. Hem uzun zincirli hem de kısa zincirli açıl homoserin lakton molekülleri üretebilen *P. aeruginosa* PA01 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testte *V. anguillarum* suşlarının kısa zincirli *N*-hexanoyl-L-homoserine lacton (C6-HSL) sinyal molekülünü üretmediği tespit edilmiştir. C6-HSL sinyal molekülünü üretmeyen *V. anguillarum* suşlarının tamamının *A. tumefaciens* NT1suşu kullanılarak yapılan testte ise ODHL sinyal molekülünü üretebildikleri saptanmıştır (Şekil 1).



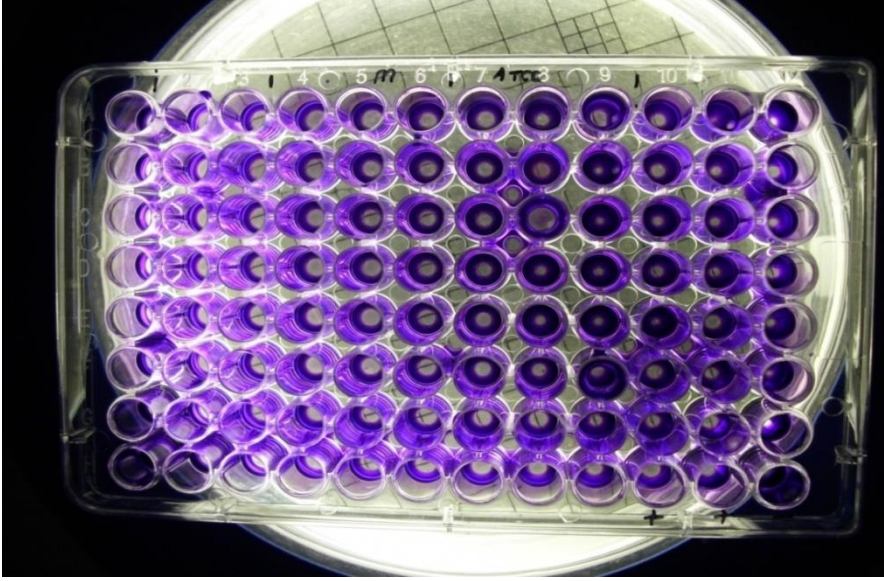
Şekil 1. *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu kremden yeşile renk değişimiyle *V. anguillarum*'da, ODHL sinyal moleküllerinin varlığı

N-(3-okzodekanoyl)- L-homoserinelactone (ODHL) Sinyal Moleküllerine Bağımlı Virülens Faktörlerinin Üretimi

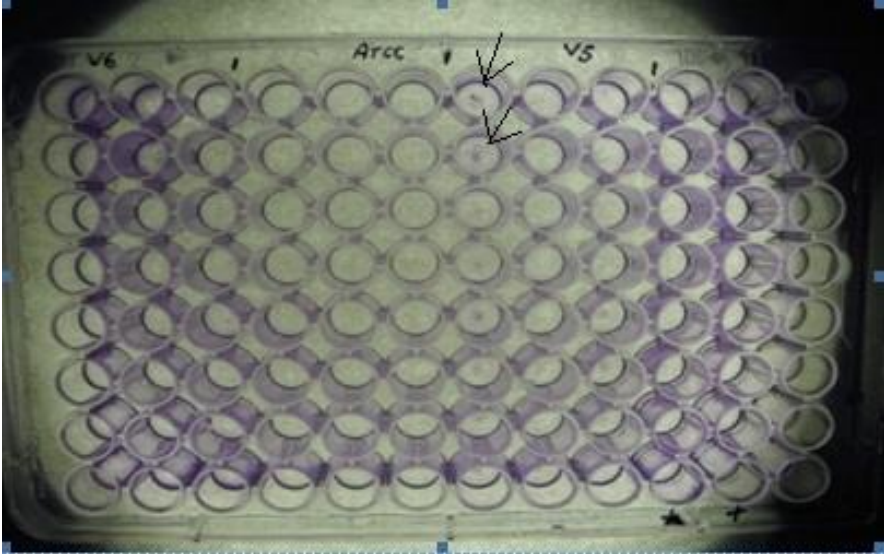
V. anguillarum suşları; biyofilm oluşumu, pigment ve proteaz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörlerinin varlığı bakımından test edilmiştir.

***V. anguillarum*'da biyofilm testi bulguları**

V. anguillarum suşlarının tümünde (A4, A5, A6, ATCC, ATCC 700183) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 2, 3).



Şekil 2. Kristal viyole ile boyanmış biyofilm



Şekil 3. *V. anguillarum* suşlarında biyofilm oluşumu

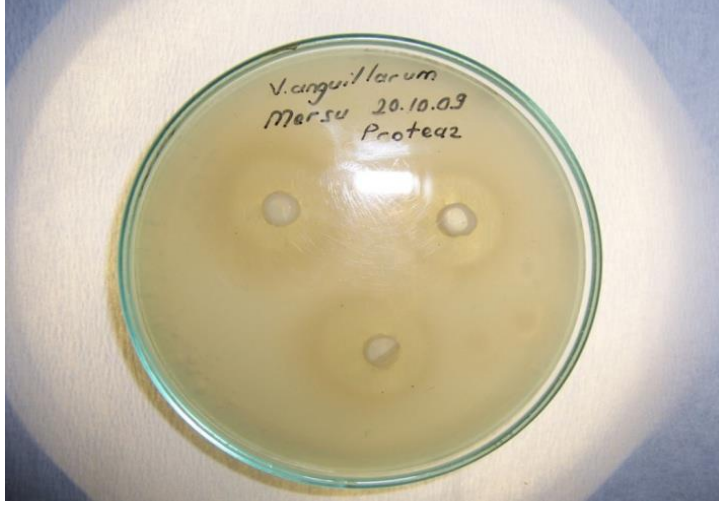
***V. anguillarum* 'da pigment testi bulguları**

V. anguillarum suşlarında pigment üretimi ölçümünün sonuçları incelendiğinde tirozin ilave edildikten sonra suşlarda pigment üretimini tespit etmek amacıyla bakılan optik yoğunluğun 20., 40. ve 50. saatlerde yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, çalışılan *V. anguillarum* suşlarının tümünde tirozin varlığının pigment üretimini artırdığı saptanmıştır.

V. anguillarum'da proteaz testi bulguları

Proteaz üretimi tespiti amacıyla kontrol suşu *P. aeruginosa* PAO1 kullanılmıştır.

Virülens faktörlerinden proteaz üretiminin *V. anguillarum* A6 suşunda 18 mm zon çapıyla en geniş zon çapına sahip olduğu kaydedilmiştir. Kullanılan diğer suşlar da; A5 17 mm (Şekil 4), A4 ve ATCC 700183 16 mm ve ATCC 12,3 mm zon çapı ölçülerek, proteaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. *V. anguillarum*'da proteaz aktivitesi

TARTIŞMA ve SONUÇ

Birçok mikroorganizma sosyal bazı davranışlar sergilemektedir. Üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir çoğunluğa ulaşip ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylelikle, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturabilmektedirler (Saraçlı, 2006). Patojenik bakterilerin birçoğunun virülens faktörlerinin üretimini AHL türevi sinyal molekülleri aracılığı ile kontrol ettiğinin keşfedilmesi ile çevreyi algılama sistemi antimikrobiyal tedavi için yeni ve cazip bir hedef haline almıştır. Bu nedenle patojen bakterilerde çevreyi algılama sistemi ve virülens faktörlerinin üretiminin incelenmesi bu patojenlerin yol açtığı hastalıkların önlenmesinde büyük önem taşımaktadır.

Wang 2004'de yaptığı bir çalışmada *V. anguillarum* *N*-(3-oxodecanoyl)-HSL (3-oxo-C10-HSL) ve *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) moleküllerini kullanarak haberleştiklerini bildirmiştir. Bu çalışmada da *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *V. anguillarum* suşlarının kısa zincirli sinyal molekülünü olan C6-HSL üretmediği tespit edilmiştir. C6-HSL sinyal molekülünü üretmeyen bu suşların tamamının *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan testte ise uzun zincirli sinyal molekülü 3-oxo-C10-HSL üretebildikleri tespit edilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda, *V. anguillarum* (Defoirdt, 2005; Milton vd., 1997) suşlarında ODHL(3-oxo-C10-HSL) sinyal moleküllerinin varlığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar ile *V. anguillarum*'da ODHL suşlarındaki sonuçlar benzerlik göstermiştir.

Balıklarda ciddi virülens oluşturan *V. anguillarum* suşlarının tümünde fenotipik olarak biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Biyofilm oluşumunu, *V. anguillarum* (Croxatto vd., 2002) suşlarında ele almışlardır. Bildirilen bu çalışmalarda *V. anguillarum* suşlarındaki biyofilm oluşumu araştırmamızda da benzerlik göstermektedir.

Croxatto vd. (2002), yaptıkları çalışmayla *V. anguillarum* suşlarında tirozin ile pigment tespitini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da *V. anguillarum* suşlarının tamamında tirozinin pigment üretimini artırdığı optik yoğunluklar ölçüldüğünde görülmüştür. Bakterilerde çevreyi algılama yönetimindeki ciddi virülens faktörlerinden biri olan proteaz; *V. anguillarum*'un tüm suşlarında tespit edilmiştir.

En basit yapıları canlılardan biri olarak bilinen bakterilerin sistemleşmiş milyarlarca hücreden oluşan organizmalar olarak balıklarda nasıl hastalık oluşturduğunun özellikle doğal ortamlarda ve yetiştiricilik ünitelerinde nasıl ciddi kayıplara sebep olduğunun cevaplarından birisi de çevreyi algılamadır. Çevreyi algılama bakterilerin düşünerek hareket ettiklerinin de bir göstergesidir. Aralarındaki bakteriyel iletişimin bir nedenle engellenmesi veya kesilmesi balıklar üzerindeki olumsuz etkilerin büyük oranda azaltacaktır. Son yıllarda, su ürünleri yetiştiriciliğinde, iyi bir yönetim için alternatif stratejiler arasında probiyotik, immunostimulant uygulamaları ve aşılardan bazıları başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu metotlara alternatif yeni metotlara da gereksinim vardır. Bakterilerde çevreyi algılama sisteminin engellenmesi bunlardan bir tanesi olarak düşünülebilir (Defoirdt vd., 2004).

Bakteriyel patojenler tarafından üretilen sinyal molekülleri, bakteriyel infeksiyonların takibi ve teşhisi için biyolojik işaretleyicilerdir. Çevreyi algılama sinyal moleküllerinin tespiti, bakteriyel infeksiyonları belirlemek için bir araç olarak, çok erken bir safhada daha yararlı olabilir (Boyen vd., 2009).

Alıntılama

Nurcan N., Kubilay A., Boşgelmez-Tınaz G. 2016. *Vibrio anguillarum* Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Virülens Faktörlerinin İncelenmesi. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. 12(1), 49-57.

KAYNAKLAR

- Arda, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi No:25, 490s. Ankara.
- Baskın, H., 2005. Mikroorganizmanın Çevreye Uyumu ve Biyofilm: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama). Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 9-10.
- Boşgelmez-Tınaz, G., 2003. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. Turk J Biol. 27, 85-93.
- Boşgelmez-Tınaz, G. "Disruption of Bacterial cell-to-cell communication (Quorum Sensing): A Promising Novel Way to Combat Bacteria-Mediated Diseases". Journal of Marmara University Institute of Health Sciences. 3 (3), 159-163 (2013).
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. Veterinary Microbiology. 135, 187-195.
- Bruhn, J. B., Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buchholtz, C., Larsen J. L., Gram L., 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. Diseases of Aquatic Organisms. (65) 43-52.

- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of acyl homoserine lactone signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact.* (11) 1119-1129.
- Chu, T., Ni, C., Zhang, L., Wang Q., Xiao J., Zhang, Y., and Liu, Q., 2015. A quorum sensing-based in vivo expression system and its application in multivalent bacterial vaccine. *Microbial Cell Factories.* (14), 37
- Croxatto, A., Chalker, V.J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Camara, M., Milton D.L., 2002. VanT, a Homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, Regulates Serine, Metalloprotease, Pigment and Biofilm Production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology.* 184(6), 1617-1629.
- Deepa, S., Venkateswaran, P., Vinithkumar N. V., Kirubakaran R., 2014. Prevention of Acyl Homoserine Lactone (AHL) mediated biofilm Formation by selected flora of Andaman & Nicobar Island. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences.* (43), 11.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., Verstraete, W., 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture.* 240, 69-88.
- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H.L., Greenberg, P., Zhang, L., 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology.* 56: 1287-1301.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology.* 143, 3703-3711.
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M. and Williams, P. 2001. The Lux M homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl) homoserine lactone and N hexanoyl homoserine lactone. *J Bacteriol.* 183, 3537-47.
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the vanI/vanR locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 179, 3004-3012.
- Moghaddam, M. M., Khodi S., Mirhosseini, A. 2014. Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology: Open Access.* 3 (4), ISSN: 2327-5073.
- Myszka, K. and Czaczyk K., 2012. N-Acyl homoserine Lactones (AHLs) as Phenotype Control Factors Produced by Gram – Negative Bacteria in Natural Ecosystems. *Pol. J. Environ Stud.* 21(1), 15-21.
- O'Toole G.A. and Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology.* 28(3), 449 – 461.
- Purohit, A.A., 2013. Acyl homoserine lactone signaling in members of the Vibrionaceae family. University of Tromsø.
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W.J., Ekmann, K.S., Larsen, J.L., Johansen, C., Riedel, K., Eberl, L., Givskov, M., Gram, L., 2004. An Inhibitor of Bacterial Quorum Sensing Reduces Mortalities Caused by Vibriosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *System. Appl. Microbiol.* 27, 350-359.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., Gram, L., 2001. Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods.* 44: 239-251.
- Saraçlı, M.A., 2006. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. *Gülhane Tıp Dergisi.* 48(4), 244-250.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., JR., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K., 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 6036-6041.

- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P., 1999. Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67 (10), 5192-5199.
- Ulusoy, S., 2007. Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretimini Araştırılması. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 100s, Isparta.
- Wang, L., 2004. Autoinducer-2 (A₁-2) Mediated Quorum Sensing In *Escherichia coli*., Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, in partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy Advisory Committee Thesis.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y., Zhang, Y.X., 2008. Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.