

Yersinia ruckeri Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Yönetimindeki Virülens Faktörlerinin Araştırılması

Nurdan FİLİK*, Ayşegül KUBİLAY

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: nurdansal@hotmail.com

Araştırma Makalesi

Geliş 09 Mart 2019; Kabul 11 Temmuz 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Filik, N., & Kubilay, A. (2019). *Yersinia ruckeri* suşlarında çevreyi algılama sistemi ve yönetimindeki virülens faktörlerinin araştırılması. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 391-403. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537802>

Özet

Gram-negatif balık patojenleri çevreyi algılama (QS) yönetimindeki AHL (*N*-Acyl homoserine lactones) molekülleriyle virülens faktörleri üzerinde etkili olarak balıklarda enfeksiyon oluşturur. Araştırmada bakteriyel balık patojeni klinik *Y. ruckeri* (12 suş) kullanılmıştır. Acyl yan zincirinde 4-8 karbona sahip *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) ve Acyl yan zincirinde 6-12 karbona sahip *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL) sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 mikrobiyolojik monitör sistemleri (biyosensör suşlarıyla) aracılığıyla araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu kullanılmıştır. Testlerle *Yersinia ruckeri* suşlarının, *C. violaceum* CV026 aracılığıyla BHL molekülünü, *A. tumefaciens* NT1 aracılığıyla OdDHL molekülünü ürettiği tespit edilmiştir. Elastaz spektrofotometreyle, ramnolipid 0,2 g CTAB (Cetiltrimetilamonyumbromid), 5mg/l metilen mavisi ve M9-glutamat minimal medium agarla araştırılmıştır. Hemoliz %5 kanlı agarda, proteaz %2 yağsız süt tozlu agarda, amilaz %2 nişastalı agarda bakterilerin inokülasyonu araştırılmıştır. Sonuçta *Y. ruckeri* ürettikleri sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurmakta ve istedikleri çoğunluğa ulaştıkları anda balık için kritik gen ekspresyonlarını tetikleyerek virülens faktörlerini üretmektedir. Ayrıca busuşlarının azda olsa elastazı ürettiği belirlenirken, ramnolipid, proteaz, amilaz ve hemoliz aktiviteleri gibi virülens faktörlerini üretmediği belirlenmiştir. *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama molekülleri BHL ve OdDHL'yi kullandığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa* insan patojenine özgü virülens faktörleri elastaz ve ramnolipidin *Y. ruckeri*'ye uyarlanarak araştırılmasının sonucunda elastazın bulunması *Y. ruckeri*'nin patojenitesi açısından değerlidir.

Anahtar kelimeler: *Yersinia ruckeri*, çevreyi Algılama Sistemi, AHL molekülleri, virülens faktörleri, elastaz

Investigation of Virulence Factors in Management and Quorum Sensing System in *Yersinia ruckeri* Strains

Abstract

Gram-negative fish pathogens cause infection in fish by detecting quorum sensing managing factors (QS) with AHL (*N*-Acyl homoserine lactones) molecules on virulence factors. Bacterial fish pathogen clinical *Y. ruckeri* (12 strains) were used in this study. Researched production of signaling molecules of *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) own 4-8 carbons in the Acyl side chain and *N*-(3-octododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) own 6-12 carbons in the Acyl side chain, via *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1 are microbiological monitoring systems (upon biosensor strains). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain was used as positive control. *Yersinia ruckeri* strains were found to produce BHL molecule via *C. violaceum* CV026 and OdDHL molecule via *A. tumefaciens* NT1 upon testes. Elastase upon spectrophotometer, rhamnolipid 0.2 g CTAB (Cethyltrimethylammonumbromid), 5 mg/l methylene blue and M9-glutamate minimal medium agar were researched. hemolysin %5 blood agar, protease in %2 skimmed milk agar, amylase in %2 starch agar upon inoculation of bacteria were researched. As a result, *Y. Ruckeri* communicates via the signal molecules they produce and when reach the majority want, produce virulence factors by triggering critical gene expression for fish. In addition, it has been determined that these strains produce elastase at least, whereas it does not produce virulence factors such as rhamnolipid, protease, amylase and hemolysis activities. *Y. ruckeri* was determined to use quorum sensing molecules BHL and OdDHL. *P. aeruginosa* human pathogen specific of virulence factors elastase and rhamnolipid adaptation to *Y. ruckeri* as a result of research presence of elastase is valuable in terms of pathogenesis of *Y. ruckeri*.

Keywords: *Yersinia ruckeri*, quorum Sensing System, AHL molecules, virulence Factors, elastase

GİRİŞ

Enterobacteriaceae familyası üyesi olan *Yersinia ruckeri* Gram-negatif, basil, 1-0,75 µm çapında ve 1,0-3,0 µm uzunluğunda (Tkachenko vd., 2019), sporsuz, kapsülsüz, flagella her zaman mevcut olmadığından değişken motilite gösteren bir bakteridir (Davies ve Frerichs, 1989; Ohtani vd., 2019). *Y. ruckeri* salmonid balıklarda subakut, akut veya kronik septisemi ile seyreden bulaşıcı bir hastalık etkeni olarak ilk kez 1955’de bildirilmiştir. Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) ve Atlantik salmonlarda (*Salmo salar*) yüksek mortaliteye ve önemli ekonomik kayıplara neden olan fırsatçı bir patojen olduğu rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Petrie vd., 1996; Ormsby vd., 2019). Hastalığa, ilk görüldüğü vadinin ismi olan “Hagerman Redmouth” adı verilmişse de 1975’te Amerikan Balıkçılar Birliği’nin Balık Sağlığı Bölümü tarafından hastalığın adı “Enteric Redmouth” (ERM) veya Yersiniozis olarak değiştirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Furones vd., 1993; Austin ve Austin, 1999; Balta vd., 2016). Yersiniozis ağız çevresi, operkulum, yüzgeç tabanları ve anüs etrafında hemorajiler (Fuhrmann, 1983) karaciğer, böbrek, bağırsak, dalak gibi iç organlarda noktasal kanamalarla karakterize olan (Rodgers, 1992) bakteriyel bir enfeksiyondur (Austin vd., 1982; Secades ve Guijarro, 1999; Rigos ve Stevenson, 2001).

Erwin F. Smith (1905)’e göre çok sayıdaki bakteri bir kaç bakteriden daha güçlü olduğu, ancak bu bir kaç bakterinin de birlik olarak engelleri aşabileceği ve enfeksiyon sürecini daha rahat başlatabileceğini bildirmiştir. İşte bu sözlerden yıllar sonra, yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirileri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir (Baskın, 2005; Boşgelmez-Tınaz, 2003). Bakterilerin değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanan topluluklar olduğunu “yalnız yaşayan” ve “yalnız ölen” izole varlıklar olmadıkları araştırmalarla desteklenmektedir (Swift vd., 1994).

Bakteriler birbirlerini anlamak amacıyla Çevreyi Algılama (Quorum Sensing, QS) denilen sistemi kullanırlar. Bakterilerin her bir türü birbirleriyle iletişim kurmak için birden fazla sayıda veya birden fazla çeşitte sinyal molekülü kullanırlar. Bu sinyal molekülleri, bakteriyel popülasyonlara kendi hücre yoğunluklarını algılama imkânı sağlar. Bakterilerin bu şekilde kendi popülasyon yoğunluklarını algılayabilme yeteneklerine “Çevreyi Algılama” denir (Fuqua vd., 1994). Bu sistem sinyal moleküllerinin kullanımı ve algılanmasıyla gerçekleşir. Hatta bu sinyal moleküller ile bakteriler kendi sayılarını bile algılayabilirler. Bakterilerin kullandıkları sinyallerin yapay sinir ağları ile olan benzerlikler göze çarpmaktadır. Bakterilerin bir sinir ağı özelliklerinin birçoğunu barındırdığı bulgusundan hareketle bakteriler için düşük düzeyde bir zekâ yapısı söz konusu olabilir (Hellingwerf, 2005). Çevreyi algılama ile biyofilm oluşumu, beslenme, üreme, spor oluşumu, antibiyotiklere karşı direnç gibi olaylar sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleşir (Throup vd., 1994). OS; bu söz konusu sinyal moleküllerinin salınımını gerçekleştiren ve bakteri popülasyonunu koordine eden düzenleyici bir network sistemidir (Sarabhai vd., 2016; Asif vd., 2019). QS sisteminin en etkili özelliği bakterilerin popülasyon yoğunluğunu anlaması ve virülens faktörlerini düzenlemesidir (Watve vd., 2019). Mikrobiyologlar çevreyi algılama ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda mikroorganizmalar arasındaki sinyal molekülleri bozarak laboratuvar ortamında mikroorganizmaların sayılarını kontrol altında tutmayı başarmışlardır (Throup vd., 1994). Bakteriler arasındaki bu sinyal moleküllerini kullanan mikrobiyologlar bakterileri öldürmek yerine aralarındaki bu sinyal moleküllerini durdurmuşlardır (Throup vd., 1994).

Algılanan moleküller ve kullanılan algılama düzeneğine göre üç tip çevreyi algılama mekanizması vardır: Gram-negatif bakterilerde LuxI homologları denilen bazı enzimler türe özgü AHL moleküllerini katalizler. Bu AHL’lar LuxR tipi transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından algılanır. Gram-pozitif bakterilerde ise sinyal iletimi için oligopeptitlere bağlı olarak iki bileşenli fosforlama zinciri kullanılır. Üçüncü ve son mekanizma “Hibrit sistem”dir. *V. harveyi* modelide denir. Burada hem oligopeptidleri görülür hemde LuxI/LuxR tipi proteinler hücre içinde sinyal yolunda görev alır. LuxLM tarafından; AI-1 ve LuxS tarafından AI-2 sinyal molekülleri olmak üzere iki tip sinyal üretilir. AI-1 molekülü tür içi sinyalleşmeyi sağlarken AI-2 (LuxS) türler arası sinyalleşme de görev alır. Türler arası sinyalleşmeye “cross-talk”da denir (Raffa vd., 2005; Sequences, 2008).

Y. ruckeri’de çevreyi algılama sisteminin *C. violaceum* CV026 biyosensör suşuyla varlığı saptanmıştır. *Y. ruckeri*’nin çevreyi algılama sistemi; pUC18 plazmit taşıyıcısı olarak kurgulanmış, gen kütüphanesinden klonlanmış ve *yruR/yrul* olarak adlandırılmıştır (Temprano vd., 2001). *Y.*

ruckeri'nin N-3-oktanoil homoserin lakton (OHL) sinyal molekülünü üretmektedir (Bruhn vd., 2005). Virülens faktörlerinden yüzme hareketliliği ve biyofilm oluşumu çevreyi algılamatarafından düzenlenirken, kazeinaz, fosfolipaz ve hemoliz üretiminin 3-oxo-C8-HSL sinyal molekülünün salınımı sonrası düzenlenmediği görülmüştür (Delshad vd., 2018).

İnsan kaynaklı *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* NT1 ve *Pseudomonas aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi araştırıldığında *C. violaceum* mor pigment violacein özelliğini üretir. Daha önce yazarlar bir violacein-negatif, pigment üretiminin süpernatant ile inkübasyon ile iade edilebildiği *C. violaceum* CV026'nın mini-Tn5 mutant'ı olarak tanımlamışlardır (McClellan vd., 1997). Yine bu bakterinin sinyal molekülü üretmeyen mutanti, diğer bakterilerin açıl homoserin lakton molekülü üretimlerini test etmek için kullanılmaktadır (Sharma vd., 2003). *A. tumefaciens* mutant suşu ortamda AHL molekülü varlığında orijinal rengi olan yeşil pigment bırakır. Ti plazmid üzerinde bulunan *Tra* genleri *LuxI* ve *LuxR* homologu olan *TraI* ve *TraR* proteinleri ve sinyal molekülü olan N-3(okzokitonol)-L-homoserin lakton aracılığıyla aktive edilirler (Boşgelmez-Tınaz, 2003). *P. aeruginosa*'da, AHL sinyal moleküllerine dayanan, kendi popülasyon yoğunluklarını algılamalarını sağlayan ve çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılan mekanizmayı kullanırlar (Kleerebezem vd., 1997; Ulusoy, 2007). Bu iletişim sisteminin temeli iki protein molekülüne bağlıdır. Bunlardan birisi *LuxI* ailesine mensup AHL sentez ve diğeri de *LuxR* ailesine ait AHL reseptör proteindir. Hücre yoğunluğundaki artışa paralel olarak AHL sinyal moleküllerinde de artış gözlemlenir. Hücre yoğunluğunun artmasıyla AHL sinyal molekülleri sayıca artar ve sınır değere ulaştığı zaman AHL *LuxR*-tip reseptör proteine bağlanarak hedef genlerin uyarılmasını veya baskılanmasını sağlar (Kleerebezem vd., 1997). Balık patojeni *Vibrio anguillarum* çevreyi algılama sistemi sinyal moleküllerinden 3-Okzo-C10-HSL molekülünü salgılayarak regülatör proteinleri *VanI/VanR* sayesinde fenotipik etkilerini gösterir (Ulusoy, 2007). *LuxS*; çevreyi algılama sisteminde proteaz üretimi ve EPS, biyofilm tabakası, flegella/motilite (hareket) gibi fenotipikle ilişkisi olan birçok düzenleme kadar *Vibrio alginolyticus*'un virülensinde de önemli bir rol oynamaktadır (Ye vd., 2008). *Pseudomonas fluorescens* kontrolü çevreyi algılama sisteminde olan 3-Oxo-C10-HSL sinyal molekülünün dışarı bırakılmasından sonra Mupirosini fenotipik etki olarak gösterir (Williams, 2007). *Aeromonas hydrophila*'da *LuxRI* homolog *AhyRI* ve *Aeromonas salmonicida*'da *LuxRI* homolog *AsaRI*'nin varlığıyla AHL moleküllerinden (N-butanoyl-L-homoserin lakton [BHL]) her iki bakteride de bulunmaktadır. Ayrıca, *A. hydrophila* ve *A. salmonicida*'da serine proteaza üretimi çevreyi algılama için bir kanıttır (Swift vd., 1997).

Bakteriler çevreyi algılama sistemiyle virülens faktörlerini yönetir ve etkinleştirir. Ramnolipid hemolitik etkisi olan hemolizindir, mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur (Salyers ve Whitt, 1994). Proteaz roteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur (Turus, 2011). Nişasta çözünmeyen granüller formunda olup (Polaina ve MacCabe, 2007) mikroorganizmaları nişastayı parçalayan enzimler üretmektedir (Yamamoto vd., 2000; Gawande ve Patkar, 2001). Bakteriler sahip kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Sonuç olarak ekzoenzim serin proteaz, ekzotoksin α -hemolizin ve hücre dışı protein olan siderefor gibi virülens faktörleri yüksek bakteri yoğunluğuna bağlı olarak çevreyi algılamasisteminin kontrolündeki genlerin ekspresyonuyla ortaya çıkar (Jangid vd., 2007). *A. hydrophila* ve *Aeromonas salmonicida* N-Açıl homoserin lakton molekülleri üretirler veya *LuxRI*'in homologlarını içerirler. Bu patojenler *LuxRI*'in homologları olan *AhyRI* ve *AsaRI*'ı exprese ederek BHL ve HHL sinyal moleküllerinin sentezini düzenlerler. *Vibrio anguillarum*'da *LuxRI* homologu olan *VanI* N-(3-oxo-Dekanoyl)-L-HSL (ODHL) molekülünün sentezini katalizler (Sharma vd., 2003). Çevreyi algılama sistemi proteaz, EPS, biyofilm, motilite *V. alginolyticus*'un virülensinde etkilidir (Ye vd., 2008). *P. fluorescens* çevreyi algılama kontrolündeki 3-Oxo-C10-HSL sinyal molekülünün başka *P. fluorescens*'in algılamasından sonra Mupirosini etki olarak gösterir (Williams, 2007). *A. hydrophila* ve *A. salmonicida* BHL molekülüyle serine proteaz üretir (Swift vd., 1997). Elastaz ve ekzotoksin A gibi, üretimi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörleri bazı suşlarda tanımlanmıştır (Hamood vd., 1996; Rumbaugh vd., 1999; Zhu vd., 2004).

Bu çalışmada *Y. ruckeri* suşlarının patojenitesinin yetkinliği açısından; fenotipik olarak çevreyi algılama sistemini kullanıp kullanmadığı, kullanıyorsa bu sistemin yönettiği ve patojenin hastalık yapma gücünden sorumlu olduğu virülens faktörleri elastaz, ramnolipid, proteaz, amilaz, hemoliz üretiminin tespiti amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Y. ruckeri Suşlar ve Gelişme Koşulları

Araştırmada ISUBÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edilen, hasta balıkların iç organlarından izole edilmiş ve moleküler düzeyde identifikasyonu yapılmış olan balık patojeni *Y. ruckeri*'nin 12 suşu kullanılmıştır. Suşlar kullanılmaya kadar McFarland 0,5'e göre standardize edilen miktarda -80°C'de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Depolanan suşlar günlük kullanım için -80°C'den alınarak -20°C'de bekletildikten sonra TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan suşlar 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maksimum 7 gün süreyle +4°C'de saklanmıştır. SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 (1 suş) suşu, LB besiyerinde 30°C'de üretilmiştir ve -80°C'de ve %20 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. AHL sinyal moleküllerinin tespiti *C. violaceum* CV026 (1 suş) suşu ve *A. tumefaciens* NT1 (1 suş) suşu kullanılarak yapılmıştır. Bu suşlar %1,2 agar içeren katılaştırılmış ve *A. tumefaciens* NT1 suşu için gentamisin (20 µg/ml); *C. violaceum* suşu için kanamisin (20 µg/ml) LB (%1 tripton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 NaCl) besiyerinde 24 saat süreyle 30°C'de üretilmiştir. Bu stok kültürler farklı testler için kullanılmıştır (Ulusoy, 2007).

Kimyasal maddeler

Çalışmada; gliserol (Acar Chemicals), X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-Dgalaktopiranosid) (Sigma-Aldrich), gentamisin (Oxoid; 10µg), etanol (Sigma-Aldrich), kanamisin (Sigma-Aldrich), lugol solüsyonu (Biorad), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich NIST SRM 2186II), KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich NIST SRM 200B), NaCl (Merck), NH₄Cl (Sigma-Aldrich A9434), MgSO₄.7H₂O (Sigma-Aldrich), CaCl₂.2H₂O (Sigma-Aldrich), glikoz (PubChem), glutamat (SAFC), metilen mavisi (Supelco), cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) (Sigma), tris (Merck), CaCl₂ (Sigma), elastinkongo red (ECR) (Sigma) kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle AHL moleküllerinin tespiti

Ulusoy (2007) tarafından modifiye edilen McClean vd. (1997)'nin metodundan yararlanılmıştır. *Y. ruckeri* Tryptik Soy Agar (TSA)'da 25°C'de 24 saat üretilmiştir. *Y. ruckeri* suşları ve *C. violaceum* CV026 biyosensör suşu aralarında 3 mm olacak şekilde karşılıklı ekilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda renk değişikliğine bakılmıştır. Mor renk görülmesi BHL'nun varlığını belirtmektedir. OdDHL molekülünün varlığı araştırmak için de aynı prosedür uygulanmıştır. Yeşil renk aranırken pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* NT1 suşu için tek fark olarak 20 µg X-Gal ilaveli Luria Bertani Agar (LBA) kullanılmıştır. Sonuçlar pozitif kontrol *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak tespit için çapraz doğrulama testi yapılmıştır (Mohaddam vd., 2014).

Elastaz testi

Ohman vd. (1980)'nin belirttiği prensiple yapılmıştır. *Y. ruckeri* suşlarına Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır. *Y. ruckeri* suşları 25°C'de 14 saat Luria Bertani Broth (LBB) besiyerinde üretilmiştir. Üretilen kültürlerin süpernatantlarından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7,5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 25°C'de 3 saat karıştırılarak hareket halinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda 12000 devirde 2 dk çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Süpernatantlar 96 çukurlu yuvarlak tabanlı plaklara 100 µl olarak çalışılmıştır. Plaklar OD'si 630 nm'de ELİSA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülmüştür. Her bakteri için 7 sonucun OD değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Test sırasında LBB negatif kontrol PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Ulusoy, 2007).

Ramnolipid üretimi testi

Siegmund ve Wagner (1991)'in prensibine göre yapılmış bir testdir. Ramnolipid üretimi testi; 0,2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/l⁻¹ metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar petripleri kullanılmıştır. LBB besiyerinde 25°C'de 24 saat *Y. ruckeri* suşları üretilmiştir. Bu suşların bir gecelik kültürlerinden 25'şer µl alınarak M9-glutamat minimal medium agar petriplerinin ortasına damlatılmıştır. Hazırlanan bu petripler 25°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki sarı-saydam zon ramnolipid aktivitesinin varlığını gösterir. Test sırasında LBB negatif PAO1 suşu pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007; Onwosi ve Odibo, 2012).

Proteaz testi

Y. ruckeri suşları Tryptik Soy Broth (TSB) besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. TSA petrilerinin ortasına yaklaşık 3 mm çaplı çukurlar açılmış ve her bir kültürden % 2 yağsız süt tozu içeren bu çukurların içine 20 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kolonisi etrafında saydam zon oluşması proteolitik aktivitenin varlığını, zon oluşmaması yokluğunu göstermektedir (Arda, 1997; Swift vd., 1999; Dong vd., 2005; Ulusoy, 2007).

Amilaz testi

Y. ruckeri suşları ise TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. %2 nişasta ilaveli TSA besiyerine çizgi ekimi yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler üzerine lugol solüsyonu damlatılmış, pozitif reaksiyonların koloni etrafında saydam alan oluşturması beklenmiştir. Negatif durumlarda ise besiyerinin mavi renkte görülmesi beklenmiştir. Koloni etrafında oluşan pembe-esmer bölge şüpheli reaksiyonu ifade etmektedir. Reaksiyon 5 dk içinde okunmuştur (Arda, 1997; Swift vd., 1999). Amilaz testi her suş için üç defa tekrarlanmıştır.

Hemoliz testi

Y. ruckeri suşları ise TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. %5 koyun kanı içeren TSA petrilerinin ortasına, 25 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Suşların etrafında saydam zon oluşup oluşmamasına göresonuçlar değerlendirilmiştir (Swift vd., 1999). Hemoliz testi her suş için üç defa tekrarlanmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Mikrobiyolojik monitör sistemleri (*C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1), *P. aeruginosa* PAO1, *Y. ruckeri*'nin Koloni Yapıları

Orijinal suşta *C. violaceum* 12472 (Şekil 1) mor renk koloni ve *C. violaceum* CV026 (Şekil 2) mutant suşta ise pigmentsiz koloni oluşumu gözlenmiştir. OdDHL sinyal molekülünün üretimini gösteren *A. tumefaciens* NT1 mutant suşunun koloni yapısı (Şekil 3)'de, pozitif kontrol insan patojenin koloni yapısı *P. aeruginosa* PAO1 (Şekil 4)'de ve *Y. ruckeri*'nin koloni yapısı (Şekil 5) LBA üzerinde verilmiştir.



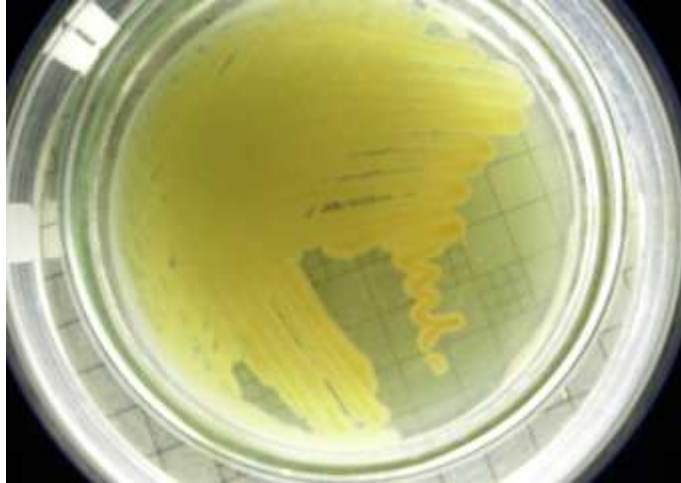
Şekil 1. *C.violaceum* 12472 orijinal suş



Şekil 2. *C. violaceum* CV026 mutant suş



Şekil 3. *A. tumefaciens* NT1 mutant suş

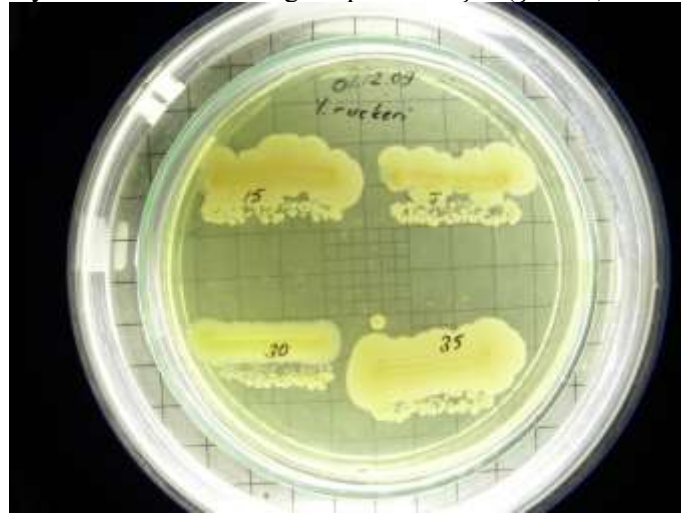
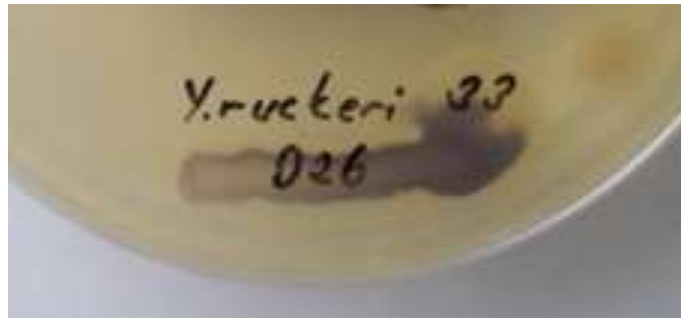


Şekil 4. *P. aeruginosa* PAO1

Şekil 5. *Y. ruckeri*

Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle *Y. ruckeri*'de *N*-acyl Homoserin Lakton (AHL) Sinyal Moleküllerinin Tespiti

Sinyal molükülünün varlığı fenotipik olarak araştırılmıştır. *Y. ruckeri* suşların koloni renk değişimiyle BHL ve OdDHL moleküllerini üretilip üretilmediği takip edilmiştir (Şekil 6). Sonuçta *Y. ruckeri* suşlarının *C. violaceum* CV026 suşu aracılığıyla lakrem renkten mor renge dönüşmesiyle BHL sinyal molükülünü (Şekil 7) ürettiği, *A. tumefaciens* NT1 suşu aracılığıyla dakrem renkten yeşil renge dönüşmesiyle OdDHL sinyal molükülünü ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 8).

Şekil 6. Üreyen *Y. ruckeri* suşların koloni renk değişimiyle BHL ve OdDHL molekülleri üretiminin takibiŞekil 7. *C. violaceum* CV026 aracılığıyla *Y. Ruckeri* suşlarında BHL sinyal molüküllerinin üretimi



Şekil8. *A. tumefaciens* NT1 aracılığıyla *Y. ruckeri* ve *P. aeruginosa* (+kontrol) suşlarında OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi

BHL ve OdDHL Sinyal Moleküllerine Bağımlı Virülens Faktörlerinin Araştırılması

Deneysel çalışmalarla balık patojeni ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz, hemoliz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörlerinin varlığı veya yokluğu bakımından test edilmiştir. Araştırma sırasında kullanılan suşlar ve *Y. ruckeri* suşlarının tamamının testlere verdiği cevaplar gösterilmiştir (Tablo 1).

Y. ruckeri'de Elastaz, Ramnolipid, Proteaz, Amilaz ve Hemoliz Bulguları

P. aeruginosa'nın ürettiği bilinen ve balık patojenine uyarlanan elastaz testinde *Y. ruckeri*'nin tüm suşlarında optik yoğunluğuna bakılarak elastaz üretimi azda olsa tespit edilmiştir (Şekil 9). Sonuçlar incelendiğinde *Y. ruckeri*'nin tüm suşlarında agar testlerinde ramnolipid, proteaz, amilaz ve hemoliz üretimi tespit edilmemiştir.



Şekil 9. *Y. ruckeri* suşlarında elastaz virülens faktörünün varlığı

Tablo 1. Araştırma sırasında kullanılan suşlar ve *Y. ruckeri* suşlarının tamamının testlere verdiği cevaplar

Suş Adı	Özellik	Çevreyi					
		Algılama Sinyal Molekülü Tipi	Elastaz	Ramnolipid	Proteaz	Amilaz	Hemoliz
<i>P. aeruginosa</i> *	PAO1 PT5 orijinal tip	+ Kontrol					
<i>C. violaceum</i> *	CV026	Biyosensör Suş					
<i>A. tumefaciens</i> *	NT1	Biyosensör Suş					
<i>Y. ruckeri</i>	Yavuzlar	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	15	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	17	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	18/1	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	18/2	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	28	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	29/1	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	30	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	33	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	34	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	35	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-
<i>Y. ruckeri</i>	36	BHL ve OdDHL	+	-	-	-	-

*Suşlar pozitif kontrol ve biyosensör suş olarak kullanılmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakteriler istedikleri çoğunluğa ulaştıklarını anladıkları anda virülens faktörleriyle konak üzerindeki etkisini gösterirler (Watve vd., 2019). En ilkel canlılardan biri olarak bilinen bakterilerin sistemleşmiş milyarlarca hücreden oluşan balıkların dokularında hastalık oluşturarak yetiştiricilik

ünitelerinde nasıl büyük ölçüde kayıplara sebep olduğu sorusunun cevaplarından birisi, çevreyi algılamadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık kayıplarının azaltılması için kullanılan profilaktif yöntemlere ek olarak alternatif yeni metotlara gereksinim vardır. Çevreyi algılama sistemini durdurma bunlardan bir tanesidir (Defoirdt vd., 2004).

Temprano vd. (2001) tarafından beyaz mutant *C. violaceum* CV026 ile karşılıklı çapraz olarak inoküle edilen *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama sistemine sahip olduğu saptanmıştır. Beyaz mutant *C. violaceum* CV026 biyosensör suşu kullanılarak yapılan bu çalışmada da çapraz ekimde *Y. ruckeri*'nin tüm suşlarında çevreyi algılama sinyal molekülleri bulunmuştur.

Kastbjerg vd. (2007)'e göre *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C8-HSL), *N*-(3-oxoheptanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C7-HSL) ve *N*-(3-oxononanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C9-HSL) üretmiştir. Benzer şekilde Temperano vd. (2001)'e göre *Y. ruckeri*'de sinyal molekülleri vardır. Söz konusu araştırmamız da *Y. ruckeri* suşlarının tamamının mor renkli koloni oluşturmasıyla BHL ve yeşil renkli koloni oluşturmasıyla OdDHL sinyal moleküllerini ürettiği ispatlanmıştır.

Y. ruckeri'nin ekstraselüler ürünlerinin (ECP), lipazlar, proteazlar ve hemolizinler de dâhil olmak üzere, balıklara enjekte edildiğinde, ağızda ve bağırsaktaki kanamalar gibi bazı karakteristik ERM (Enteric redmouth) bulguları üretirler. Bu nedenle, bu ECP'lerin *Y. ruckeri* enfeksiyonunun patogenezinde rol oynadığı görülmektedir (Tobback, 2009).

Ulusoy (2007) araştırmasında *P. aeruginosa* PAO1 suşunda elastazın olduğunu bulmuştur. Ulusoy (2007)'dan modifiye edilerek balık patojenine uyarlanan teste *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özgü virülens faktörü olan elastaz aktivitesine *Y. ruckeri* suşlarının tamamında rastlanmıştır.

Kumar vd. (2015)'ne göre *Y. ruckeri*'nin birçok virülans mekanizması tanımlanmıştır. Bazı hücre dışı ürünlerin (ECP), konakçılara tekrar enjekte edildiklerinde hastalığın hemorajik formu ile ilişkili klinik bulguları çoğalttığı gösterilmiştir. Bu ECP'nin virülensi tetiklediği bilinmektedir. Azokazın proteaz, sitolitik ve hemolitik aktiviteleri düzenleyen hemolizin *Yh1A* ile geniş bir hedefe sahip olan ve özellikle fibronektin, aktin ve miyozin parçalanmasında etkili olan 47 kDa metalloproteaz *Yrpl* buna örnektir. Ancak araştırmamızda ECP üzerinde bu denli etkili olan proteaz, hemoliz ve amilaz sonuçları çalışılan tüm suşlarda negatiftir.

Ulusoy (2007) araştırmasında *P. aeruginosa* PAO1 suşunda ramnolipidin olduğunu bulmuştur. Ulusoy (2007)'dan modifiye edilerek balık patojenine uyarlanan teste *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özgü virülens faktörü olan ramnolipid aktivitesine *Y. ruckeri* suşlarının tamamında rastlanmamış ve sonuçlar araştırmacıdan farklılık göstermiştir.

Ulusoy (2007) tarafından çevreyi algılama sisteminde rol alan BHL sinyal molekülü aracılığıyla balık patojenleri *A. hydrophila*'nın AhyI/AhyR regülatör proteinleriyle ekzoproteaz üretimini gerçekleştirdiği, *A. salmonicida*'nın ise AsaI/AsaR regülatör proteinleriyle hücre dışı proteaz üretimini gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Fakat çalışılan *Y. ruckeri* suşlarının tamamında proteaz negatif belirlenmiştir.

Romalde ve Toranzo (1993)'a göre patolojik bir aktivite olan amilaz *Y. ruckeri* suşlarının tamamında pozitifken bu araştırmada negatiftir.

Fernández vd. (2007)'e göre *Y. ruckeri*'nin patojenitesinde *Yh1A* olarak adlandırılan hemolizin/sitolizin'in önemli bir rol oynadığını ve hemolizin *Yh1A*, eritrositlerin yanı sıra kültür balığının doku hücrelerini de eritebilmişlerdir. Aynı zamanda *Yh1A*'nın üretimi için iki genin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak çalışılan *Y. ruckeri*'nin suşlarının tamamında hemoliz aktivitesi görülmemiştir.

Patojenitenin oluşumunda, bakteriyel çevreyi algılama karmaşık olduğu için (Boyen vd., 2009), bakteriyel patojenler tarafından üretilen sinyal molekülleri, enfeksiyonların teşhis ve tedaviedilmelerinde yol göstericilerdir (Kumari vd., 2008; Boyen vd., 2009). Spor oluşturma, konjugasyon, biyoluminesans, biyofilm oluşturma, antibiyotik üretimi ve bakteriyosin üretimi gibi türe özgü pek çok davranış çevreyi algılama mekanizması ile kontrol edilmektedir. Çevreyi algılamanın anlaşılması ile yeni dönem probiyotikler olarak tanımlanan metabiyotiklerin tasarlanmasında yarar sağlayacağı düşünülmektedir (Boyen vd., 2009).

İletişim, tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de çok etkin bir olgudur. İletişimin gücüyle mikroorganizma virulent olmakta, hastalık oluşturmayla balık üzerinde ölümcül olabilmektedir. Elde edilen veriler ışığında bakteri hücreleri arasındaki iletişimin engellenmesiyle (Quorum Quenching, QQ) antibakteriyel etki elde etme çalışmaları gelecek için umut vaadeden bir alan olarak görülmektedir. Bu esasa çevreyi algılamanın durdurulmasıyla enfeksiyon gücünün azaltılması su

ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunma arayışlarında alternatif bir metottur. Aynı zamanda quorum quenching modasıyla çevreyi algılama sinyal moleküllerinin tespit edilmesi, bu moleküllerin oluşumunun inhibitörler, mimikler, enzimler aracılığıyla durdurulması hastalıkta erken teşhis kavramını gündeme getirmekte ve bu durumunda balık hastalıkları profilaksisinde önemli olması hedeflenmektedir.

Y. ruckeri suşlarının tamamının çevreyi algılama sistemini kullandığı ve bu sistemin yönetimindeki virülens faktörlerinden elastazı ürettiği bulunmuştur. Araştırmada BHL ve OdDHL sinyal molekülleri aracılığıyla *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama sistemini kullandığının ispatıyla insan patojenine özgü elastaz ve ramnolipid gibi patolojik etkenlerden elastaza *Y. ruckeri*'de rastlanmasının araştırmaya orijinallik kattığını düşünmekteyiz. Bu araştırma makalesinin *Y. ruckeri*'de çevreyi algılama tespitiyle bir sonraki adım olarak bu patojenle ilgili quorum quenching çalışmalarına ve *In vivo* çalışmalara yön göstereceği kanaatindeyiz.

Teşekkür: Çalışma, 1973-YL-09 No'lu Proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiş olan yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Arda, M.(1997). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi No:25, 490s, Ankara.
- Asif, A., Iftikhar, A., Hamood, A., Colmer-Hamood, J.A., & Qaisar, U. (2019). Isonitrile-functionalized tyrosine modulates swarming motility and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 127, 288-295.
- Austin, B., & Austin, D.A. (1999). Bacterial fish pathogens. Diseases in famed and wild fish. 3rd (Revised), Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 457.
- Austin, B., & Austin, D.A. (1987). Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and wild fish. First Edition, Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 364.
- Austin, B., Green, M., & Rodgers, J.C. (1982). Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, 27, 73-78.
- Balta, F., Balta, Z.D., Özgümüş, O.B., & Çağırman, H. (2016). Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin Portörlük Yönünden Tetkiki ve Antimikrobiyal Direncin Tespiti. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences (Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi)*, 1(3), 72-76.
- 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. *Turkish Journal of Biology*, 27, 85-93.
- 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.
- Davies, R.L., & Frerichs, G.N. (1989). Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases*, 12, 357-365.
- 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.
- Delshad, S.T., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., & Bossier, P. (2018). Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *Journal of Fish Diseases*, 41(9), 1429-1438. doi: 10.1111/jfd.12840.
- Donabedian, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *Journal of Infection* 46, 207-214.
- 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.

- Farrand, S.K. (1998). Conjugation in Rhizobiaceae. In: The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Eds.), 199-233. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Fernández L., Prieto M., & Guijarro J.A. (2007). The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. *Microbiology*, 153, 483-489.
- Frerichs, G.N. (1993). Isolation and identification of fish bacterial pathogens. In: Bacterial Diseases of Fish (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), 270–272. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Fugua, W.C., Winans, S.C., & Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269-275.
- Fuhrmann, H., Böhm, H.K., & Schlotfeldt, J.H. (1983). An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *Journal of Fish Diseases*, 6, 309-311.
- Furones, M.D. Rodgers, C.J., & Munn, C.B. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 105-125.
- Gawande, B.N., & Patkar, A.Y. (2001). Purification and properties of a novel raw starch-degrading cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 735-743.
- Hamood, A.N., Griswold, J., & Colmer, J. (1996). Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 64, 3154-3160.
- Hellingwerf, K.J. (2005). Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends in Microbiology*, 13(4), 152-158.
- Jangid, K., Kong, R., Patole, M.S., & Shouche, Y.S. (2007). *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. *BMC Microbiology*, 7, 93, 1-11.
- Kastbjerg, V.G., Nielsen, K.F., Dalsgaard I., Rasch M., Bruhn J.B., Givskov M. & Gram L. (2007). Profiling acylated homoserine lactones in *Yersinia ruckeri* and influence of exogenous acyl homoserine lactones and known quorum-sensing inhibitors on protease production. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 363-74.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., & de Vos, V.M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24, 895-904.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46, 103, doi: 10.1186/s13567-015-0238-4.
- Kumari, A., Pasini, P., & Daunert, S. (2008). Detection of bacterial quorum sensing *N*-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1619-1627.
- McClellan, 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.
- Moghaddam, M.M., Khodi, S., & Mirhosseini, A. (2014) Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology*, 3(4), 1-10.
- Ohman, D.E., Cryz, S.J., & Iglewski, B.H. (1980). Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *Journal of Bacteriology*, 142, 836-842.
- Ohtani, M., Villumsen, K.R., Strøm, H.K., Lauritsen, A.H., Aalbæk, B., Dalsgaard, I., Nowak, B., Raida, M.K., & Bojesen, A.M. (2019). Effects of fish size and route of infection on virulence of a Danish *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 strain in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 503, 519-526, doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.041.
- Onwosi, C.O., & Odibo, F.J.C. (2012). Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 937-942, doi: 10.1007/s11274-011-0891-3.
- Ormsby, M.J., Grahame, E., Burchmore, R., & Davies, R.L. (2019). Comparative bioinformatic and proteomic approaches to evaluate the outer membrane proteome of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Journal of Proteomics*, 199, 135-147, doi: 10.1016/j.jprot.2019.02.014
- Petrie, J., Bronu D.W., & Hastings, T.S. (1996). Isolation of *Yersinia ruckeri* from wild Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Northern Finland. *Journal of Fish Diseases*, 14, 137-140.
- Polaina, J., & MacCabe, A.P. (2007). Industrial Enzymes: Structure. Function and Applications, Springer, The Netherlands.
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D., & Young, J.M. (2005). Bacterial Communication (“Quorum Sensing”) via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 417-423.

- Rigos, G., & Stevenson, R. (2001). The effect of antibiotic treatment on the establishment of persistent infection with *Yersinia ruckeri* serovar II in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 9, 247-253.
- Rodgers, J.C. (1992). Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemological studies. *Journal of Fish Diseases*, 15, 243-254.
- Romalde, J.L., & Toranzo, A.E. (1993) Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the Enteric Redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiology Letters, Federation of European Microbiological Societies*, 112, 291-300.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H., & Hamood, A.N. (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *P. aeruginosa* in burn wound infections. *Infection and Immunity*, 67, 5854-5862.
- Sarabhai, S., Kaur, A., Capalash, N., & Sharma, P. (2016). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanism and regulation of virulence. In *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology* (pp. 231-256).
- Salyers, A.A., & Whitt, D.D. (1994). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 1st ed. Washington, D.C: ASM Press, 260-268, USA.
- Secades, P., & Gujarro, J.A. (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3969-3975.
- Sequences, (2008). Bakteri hücreleri arasında haberleşme (Cell-to-cell communication: quorum sensing). <http://www.genotyping.wordpress.com> <http://genotyping.wordpress.com/2008/05/12/bakteri-hucreleri-arasindahaberlesme-cell-to-cell-communication-quorum-sensing/>. Erişim Tarihi: 28.03.2010.
- Sharma, A., Sahgal, M., & Johri, B.N. (2003). Microbial communication in the rhizosphere: Operation of quorum sensing. *Current Science*, 85(8), 1164-1172.
- Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *BioTechniques*, 5, 265-268.
- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B., & Williams, P. (1999). Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5192-5199.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S., & Stewart, G.S.A.B. (1997). Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI Homologs AhyRI and AsaRI and Their Cognate N-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5271-5281.
- Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P., & Stewart, G.S. (1994). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Science*, 21, 214-219.
- Temprano, A., Yugueros, J., Hernanz, C., Sánchez, M., Berzal, B., Luengo, J.M., & Naharro, G. (2001). Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of *yrul-yrulR* quorum sensing. *Journal of Fish Diseases*, 24(5), 253-261.
- Tkachenko, H., Buyun, L., Terech-Majewska, E., Honcharenko, V., Prokopiv, A., & Osadowski, Z. (2019). Preliminary in vitro screening of the antibacterial activity of leaf extracts from various *Ficus* species (Moraceae) against *Yersinia ruckeri* *Fisheries & Aquatic Life*, 27, 15-26, Archives of Polish Fisheries, doi:10.2478/aopf-2019-0002.
- Tobback, E. (2009). Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor in Veterinary Sciences (PhD), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.
- Turus, N. (2011). Alkali Soğukta Aktif Proteaz Üreticisi *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Enzimin Biyoteknolojik Kullanım Olanakları Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 92s.
- Ulusoy, S. (2007). Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretimini Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100s, Isparta.
- Watve, S., Barrasso, K., Jung, S. A., Davis, K. J., Hawver, L. A., ... & Perez, L. J. (2019). Ethanolamine regulates CqsR quorum-sensing signaling in *Vibrio cholerae*. *bioRxiv*, 589390. Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153, 3923-3938.
- Yamamoto, K., Zhang, Z.Z., & Kobayashi, S. (2000). Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 962-966.
- 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.

Zhu, H., Bandara, R., Conibear, T.C.R., Thuruthyil, S.J., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Givskov, M., & Willcox, M.D.P.(2004). *P. aeruginosa* with LasI quorum sensing deficiency during corneal infection. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45,1897-1903.