



TURKISH

JOURNAL OF AQUATIC SCIENCES



RESEARCH ARTICLE/ARAŞTIRMA MAKALESİ

ISSN: 2149-9659

E-ISSN: 2528-9462

Pseudomonas fluorescens BALIK PATOJENİNDE ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ VE VİRÜLENS FAKTÖRLERİ

Nurdan NURCAN, Ayşegül KUBİLAY

Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü, Isparta-Türkiye

ARTICLE INFO

Received: 18/05/2016

Accepted: 28/09/2016

Published online: 04/12/2016

Nurcan and Kubilay 31(2): 68-78 (2016)

doi: 10.18864/TJAS201608

Corresponding author: Nurdan NURCAN, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Isparta-Türkiye

E-mail: nurdansal@hotmail.com

Anahtar Kelimeler:

P. fluorescens
Çevreyi algılama sistemi
Virülens faktörleri
Biyofilm
Pigment
Rhamnolipid

Keywords:

P. fluorescens
Quorum sensing system
Virulence factors
Biofilm
Pigment
Rhamnolipid

Öz

Araştırmada Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinden *Pseudomonas fluorescens*'in üç adet suşu kullanılmıştır. Suşlar da öncelikle *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) ve *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL) sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak test edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak, *P. fluorescens* suşları, *C. violaceum* CV026 suşu kullanıldığında BHL sinyal molekülünü üretmediği, bununla birlikte, *A. tumefaciens* NT1 kullanıldığında, *P. fluorescens* suşlarının OdDHL sinyal molekülünü ürettiği tespit edilmiştir. *P. fluorescens* suşları; biyofilm, pigment, rhamnolipid, elastaz, amilaz, hemoliz ve proteaz aktiviteleri gibi virülens faktörlerini üretmiştir.

Abstract

QUORUM SENSING SYSTEM AND VIRULENCE FACTORS IN *Pseudomonas fluorescens* FISH PATHOGEN

In this study three *Pseudomonas fluorescens* strains, Gram-negative fish pathogen were used. Previously *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) and *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) signal molecules of production of strains were examined using biosensor strains, *Chromobacterium violaceum* CV026 strain and *Agrobacterium tumefaciens* NT1. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain used to as positive control. As a results of this study; *P. fluorescens* strains did not produce BHL signal molecules using *C. violaceum* CV026. However, the strains produced OdDHL signal molecules using *A. tumefaciens* NT1. It was determined production of biofilm, pigment, rhamnolipid, elastase, protease, amylase and hemolysis activity as phenotype tested as virulence factors in the strains.

GİRİŞ

Çevreyi Algılama Sistemi ‘‘Quorum Sensing (QS)’’ hayatına devam etmek için bakteriye güç katan bir sistemdir (Chu vd., 2015). Bakterilerin kendi aralarında ‘Ben buradayım’ mesajı veren bir iletişim mekanizması vardır. Bu mesajı da moleküller aracılığıyla gerçekleştirirler. Birçok organizma hastalık oluşturmak için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan QS sistemi; bakterilerin ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verileri diğerlerine iletmesine imkan sağlamaktadır (Camara, 2007). QS sistemleri bakteriler içinde farklılık göstermektedir. Gram negatif bakterilerde Acyl Homoserin Laktonlar (AHL) veya Homoserin Laktonlar (HSL), otoindükleyicilerle (AI-1) indüklenen Lux I / Lux R formunda bir QS sistemi bulunur (Ersoy vd., 2005; Greenberg, 2003; Federle ve Bassler, 2003). Gram negatif bakterilerde QS sistemleri ile belirlenen davranış biçimleri arasında biyoluminesans, virülens, biyofilm oluşumu, hareketlilik, antibiyotik üretimi, ekzoenzim salgılanması, bazı pigment üretimleri, plazmidlerin konjugasyonla transferi, durağan faza geçiş, nodül oluşumu gibi davranışlara rastlanılmıştır (Karaboz ve Sukatar, 2004). Başka bir ifadeyle, QS ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama varlığını gösteren mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonunda ki artışıyla biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur (Akan ve Kınık, 2014). Biyofilm oluşumu *in vivo* olarak canlı hücrelerde veya *in vitro* olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilir (Mıdık vd., 2011). Biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (Camara, 2007). LuxS ve LuxR mutant gen değişimiyle virülens faktörü olan biyofilm oluşmaktadır (García-Aljaro vd., 2012). Quorum sensing bakterilerin gen ekspresyonlarıyla düzenlediği koordine bir davranıştır. Hedef genlerin düzenlediği virülens faktörleriyle ve sinyal molekülleriyle mikroorganizmaların varlığı tespit edilebilir (Moghaddam vd., 2014).

Çevreyi algılama hücreden hücreye molekül aracılığıyla dışarıdan hiçbir müdahale olmadan bakterilerin iletişim kurdukları bir sistemdir. Araştırmacılar DNA’larına müdahale edilerek yüklenen

programla milyarlarca bakterinin aynı anda aynı komutu yerine getirdiğini belirtmişlerdir. (Aleksandra, 2010). Çevreyi algılama bakterinin salt çoğunluğu sağladığını algıladıktan sonra bakteriyi harekete geçiren bir sistemdir. Böylece biyofilm, biyoluminesans, hareket, konjugasyon, proteaz, ramnolipid, elastaz gibi virülens faktörleri oluşmaktadır.

P. fluorescens çevre koşullarının uygun olmadığı ve stres faktörlerinin fazla olduğu durumlarda ortaya çıkarak balıklarda hemorojik septisemilere neden olan Gram negatif bir bakteridir. Bakteri sarı-yeşil pigmentli koloni oluşturan, hareketli, sporsuz, kapsülsüz basil şeklindedir (Arda vd., 2002). *P. fluorescens*'in suda çok yaygın olması nedeniyle hastalığın bulaşması su yoluyla olmaktadır. Su primer enfeksiyonun kaynağını oluşturur (Timur ve Timur, 2003).

P. fluorescens ile ilgili çevreyi algılama sistemi ve virülens faktörü ile ilgili sınırlı araştırmalar mevcuttur. Allison vd., (1998) *P. fluorescens* patojeninde N-hekzanoil-Lhomoserin lakton (HHL) moleküllerini, Williams (2007) ise 3-Oxo-C10-HSL sinyal moleküllerini çalışmışlardır. Wei ve Zhang, (2006) *P. fluorescens*'in biyokontrol aktivitelerini düzenlediğini belirterek bunu; LuxR–LuxI gen sınıfından PcoR ve PcoI'dan oluşan bir çevreyi algılama sistemiyle yönettiklerini açıklamışlardır.

Bu araştırmada, Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinden *P. fluorescens* suşunun çevreyi algılama sisteminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; *P. fluorescens* balık patojeninde N-acyl homoserine lakton AHL sinyal moleküllerinin tespiti ve çevreyi algılama sisteminin kontrolünde olan virülens faktörlerinden biyofilm, elastaz, proteaz, pigment, ramnolipid, amilaz ve hemoliz üretimi incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada Kullanılan Bakteriyel Suşlar: S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi'nden hasta balıklardan izole edilen *Pseudomonas fluorescens* (3 adet suş) suşları kullanılmıştır. Bu suşlar çalışmadan önce geleneksel yöntemler ve API 20NE hızlı teşhis kitleriyle fenotipik özellikleri teyit edilmiştir. S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu, biyosensör suşlar *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 temin edilmiştir.

Kullanılan bakterilerin Üretimi ve Muhafazası: *P. aeruginosa* suşu, Luria-Bertani besiyerinde 30°C’de, *P. fluorescens* suşları 25°C’de üretilerek her iki suşta %20 gliserin ve -80°C’de muhafaza edilmiştir (Ausubel vd., 1988).

BHL sinyal moleküllerinin varlığı araştırılırken; *C. violaceum* CV026 suşu %1,2 agar içeren katılaştırılmış kanamisin (20 µg/mL) LB (%1 tripton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 NaCl) besiyerinde (McClellan vd., 1997) üretilmiştir. OdDHL moleküllerinin varlığı için; *A. tumefaciens* NT1 suşu %1,2 agar içeren katılaştırılmış gentamisin (20 µg/mL) (%1 tripton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 NaCl) (Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001) üretilmiştir.

AHL Moleküllerinin Tespiti: *N*-acyl yan zincirinde 4-8 karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 indikatör suşu kullanılmıştır. Ortamdaki AHL molekülleriyle *C. violaceum* CV026 biyosensör suşunda mor pigment olan viyolasinin üretilir. (McClellan vd., 1997). pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* NT1 (Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001) indikatör suşu, ortama X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid) eklendiğinde, *N*-acyl yan zincirinde 6-12 karbona sahip AHL molekülünü uyarmasıyla yeşil renk oluşturur. Bakterinin orijinal krem renginin yeşil renge değişimiyle çevreyi algılamının varlığı ispatlanmaktadır (Bruhn vd., 2005; Ulusoy, 2007; Myszka ve Czaczky, 2012).

***C. violaceum* CV026 Biyosensör Suşu ve *A. tumefaciens* NT1 Biyosensör Suşu Kullanılarak *P. fluorescens*’de AHL Sinyal Moleküllerinin Üretimini Araştırılması:** AHL sinyal moleküllerinin araştırılmasında; Ulusoy (2007) tarafından modifiye edilen McClellan vd., (1997)’nin metodundan yararlanılmıştır. TSA besiyerinde *P. fluorescens* 25°C’de 24 saat üretilmiştir. AHL molekül tespiti için *P. fluorescens* suşları saf koloni şeklinde TSA kültüründen LBA besiyerine 2 cm’lik çizgi olarak ekilmiş *C. violaceum* CV026 biyosensör suşu da patojen bakterilerle arasında 3 mm aralıkla aynı boyutta karşısına ekilmiş ve 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Böylece inkübasyon sonucunda mor renk oluşumuna bakılarak çevreyi algılama sisteminin sinyal molekülünden *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL)’nin varlığı belirlenmiştir. OdDHL molekülünün varlığı araştırmak için de aynı prosedür uygulanmıştır. Yeşil renk aranırken *A. tumefaciens* NT1 suşu için tek fark olarak 20 µg X-Gal

ilave edilmiş LBA besiyeri kullanılmıştır. Sonuçlar pozitif kontrol *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak AHL moleküllerinin tespiti için çapraz doğrulama testi yapılmıştır (Mohaddam vd., 2014).

Biyofilm Testi: *P. fluorescens* suşları 16 saat boyunca Luria-Bertani (LB) ortamda üretilmiştir. 17. saatin başında bakteri yoğunluğu OD 600’de 0,8’e ayarlanmıştır. Bakteri kültürü 1/100’lük steril LBS ortamı ile sulandırılmıştır. Sulandırılan kültürlerden 100 µl düz tabanlı 96 çukurlu mikropklara eklenerek 30°C’de 24 saat üretilmiştir. İnkübasyon sonrası çukurlar distile su ile yıkanmıştır. Mikropklaklar daha sonra %2’lik kristal viole ile 15 dk süresince boyanmıştır. Bu boyama süresince eğer varsa biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları boyanması beklenmiştir. Boyama sonrası fazla boya hafifçe saf suyla yıkanmış ve bakterilerin tutunarak meydana getirdiği biyofilm fotoğrafı alınmıştır. Ayrıca pleytlere 2x200 µl %95 etanol-saf su ile 4 mL’ye tamamlanmıştır. Mikropklakların 600 nm’de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülmüştür (O’Toole ve Kolter, 1998; Ye vd., 2008; Deepa vd., 2014). LBS negatif kontrol, *P. aeruginosa* PAO1 suşu ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Pigment Testi: Croxatto vd., 2002’de tanımlamasına göre yapılmıştır. 10 mL LB besiyerinde 25°C’de 24 saat *P. fluorescens* suşları üretilmiştir. Bakteri kültürleri OD 600’de 0,05 olarak ele alınmış, dilüsyonda LB saf halde ve LB içinde 5mM’lık L-Tyrosine (Tirozin) içeren ortam kullanılmıştır. Hazırlanan kültürler 25°C’de karıştırılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında tirozinli ve tirozinsiz kültürlerden 1 mL örnek alınarak 12000 devirde, 2 dk santirifüj edilerek süpernatantı toplanmıştır. Süpernatantlardan 96 çukurlu düztabanlı mikropklara 100 µl olarak her bakterinin süpernatantından 8 çukura ilave edilerek çalışılmıştır. Pigment üretimi; süpernatantın her defasında 600 nm’de ELISA okuyucusunda optik yoğunluklarının ölçümü ile hesaplanmıştır. LB negatif kontrol, *C. violaceum* 12472 suşu ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca TSA içerisine 0,1% tirozin eklenerek ekim yapılmış, 30°C’de inkübe edilerek tirozinli agara ekim yapıldıktan sonra her gün koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında saydamlaşma görülmesi beklenmiştir.

Ramnoflipid Üretimi Testi: Siegmund ve Wagner (1991) tarafından belirtilen metoda göre ramnoli-

pid üretimi 5 mg/l metilen mavisi ve 0,2 g cetiltri-metilamonyumbromid (CTAB) içeren M9-gluta-mat minimal medium agarla yapılmıştır. *P. fluorescens* LBB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Bu suşların 25. saatindeki LBB kültürlerinden 20'şer µl bahsedilen agara petrilerinin üzerine damlatılmıştır. Bu halde 30°C'de 24-48 saat üre-mesi beklenmiştir. Sonucunda bakteri kolonisi et-rafındaki sarı-saydam zon oluşuyla ramnolipid ak-tivitesinin varlığı ispatlanmıştır. LBB negatif kontrol, *P. aeruginosa* PAO1 suşu ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Ramnolipid testi üç tekerrür olarak uygulanmıştır (Ulusoy, 2007).

Elastaz Testi: *P. fluorescens*'e Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman vd., 1980). *P. fluorescens* suşları LBB besiyerinde 25°C'de 14 saat üretilmiştir. Süpernatantlardan 100 µL üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7,5, 20 mg ECR) eklenmiş ve 30°C'de 3 saat karıştırılarak inkübe edilmiştir. Çözülmemiş ECR 12000 devirde 2 dk santrifüjlenerek uzaklaş-tırılmış ve süpernatantlar 96 çukurlu yuvarlak ta-banlı mikropklara 100 µL olarak çalışılmıştır. OD 600 nm'de ELISA ile optik yoğunlukları ölçülmüştür. LBB negatif kontrol, *P. aeruginosa* PAO1 suşu ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007).

Proteaz Testi: *P. fluorescens* suşları TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. % 2 yağsız süt tozu içeren TSA petrilerinin ortasına açılan 3 mm'lik çukurlara 20 µl bakteri kültürü eklenmiş ve 25°C'de 24 saat üretilmiştir. *P. fluorescens* kül-türü eklenen bölgedeki çukurun etrafında oluşan saydam zon çapı görülmüş ve ölçülmüştür. (Arda, 1997; Swift vd., 1999; Dong vd., 2005; Ulusoy, 2007) Proteaz testi üç paralel çalışılmıştır.

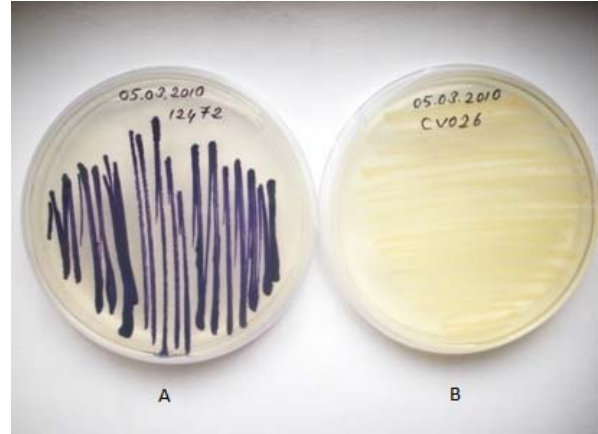
Amilaz Testi: *P. fluorescens* suşları TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. % 2 nişasta içe-ren TSA besiyerine her bir suştan ekilmiş ve 25°C'de 24 saat sonra oluşan koloniler üzerine lu-gol solüsyonu damlatılmıştır. 5 dk içerisinde ko-loni etrafında berrak zon oluşması pozitif olarak yorumlanırken, mavi renkte görülmesi negatif ola-rak yorumlanmıştır. Pembe-esmer bölge şüpheli olarak değerlendirilmiştir (Arda, 1997; Swift vd., 1999). Amilaz testi her suş için üç defa tekrarlan-mıştır.

Hemoliz Testi: *P. fluorescens* suşları TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. %5 koyun kanı içeren TSA petrilerinin ortasına çukur açılmış, her bir suştan 30 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat üretilmiştir. *P. fluorescens* kolonisi eklenen bölge-

deki çukurun etrafında oluşan saydam zon çapı gö-rülmüş ve ölçülmüştür. Saydam zon oluşumu he-molizin göstergesidir (Swift vd., 1999). Ayrıca çizgi tarzındaki ekimlerde üç tekerrürlü olarak ya-pılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

***C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens*'nin Koloni Renkleri ve Yapıları:** Orjinali violen renkte olan *C. violaceum* 12472'de koloni oluşumu ve BHL molekülü varlığında kremden mora dönüşen mu-tant suş *C. violaceum* CV026'da pigmentsiz ko-loni oluşumu Şekil 1.'de verilmiştir. OddHL sin-yal molekülünü üretimini gösteren *A. tumefaciens* NT1 mutant suşunun krem renkli kolonisi Şekil 2.'de gösterilmiştir. Pozitif kontrol insan patojeni *P. aeruginosa* PAO1 Şekil 3.'de, balık patojeni *P. fluorescens*'nin agar üzerinde kolonisi Şekil 4.'de verilmiştir. Bakteri kolonilerinde özellikle renk-le-rine dikkat çekilmektedir



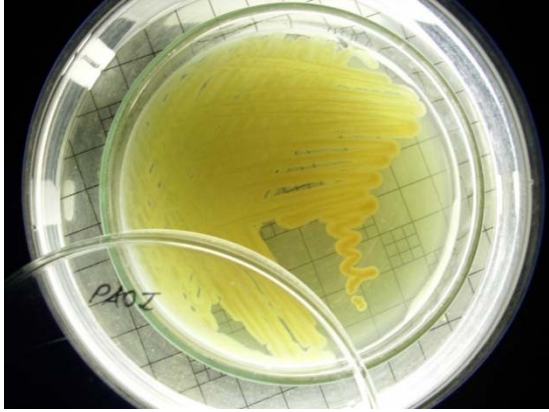
Şekil 1. A. *Chromacterium violaceum* 12472 suşu ve B. *Chromacterium violaceum* CV026 mutant suş

Figure 1. A. *Chromacterium violaceum* 12472 strain and B. *Chromacterium violaceum* CV026 mutant strain



Şekil 2. *Agrobacterium tumefaciens* NT1 mutant suş

Figure 2. *Agrobacterium tumefaciens* NT1 mutant strain



Şekil 3. Pozitif kontrolde kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu

Figure 3. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain as used positive control

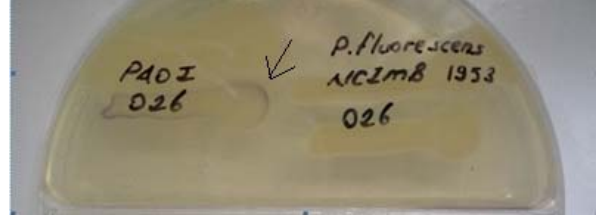


Şekil 4. Balık patojeni *Pseudomonas fluorescens* suşu

Figure 4. Fish pathogen *Pseudomonas fluorescens* strain

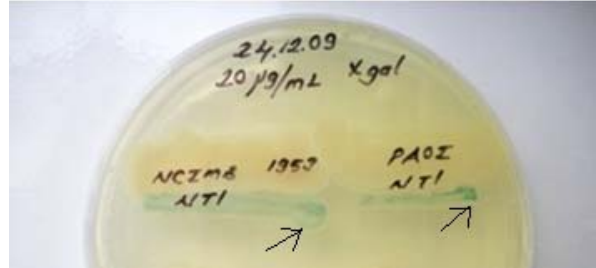
İndikatör Suşlar Aracılığıyla *P. fluorescens*'de N-acyl Homoserin Lakton (AHL) Sinyal Moleküllerinin Tespiti: *C. violaceum* CV026 suşunun

renginin değişmemesi fenotipik açıdan *P. fluorescens* suşlarının BHL sinyal molekülünü üretmediğini Şekil 5'te göstermiştir. *A. tumefaciens* NT1 suşunun yeşil renge dönüşmesiyle OdDHL sinyal molekülünü ürettiği Şekil 6'da saptanmıştır.



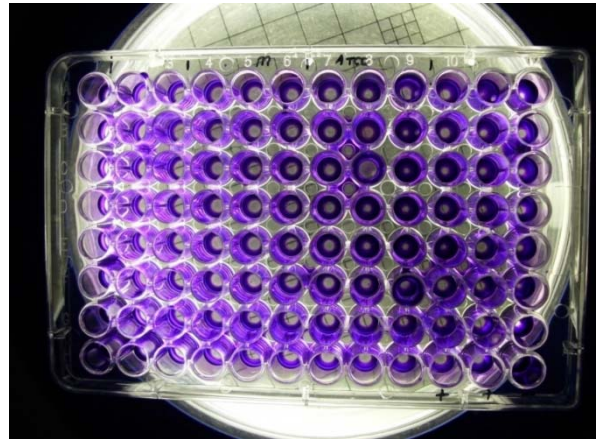
Şekil 5. *C. violaceum* CV026 biyosensör suşunun krem renkte kalmasıyla *P. fluorescens*'te BHL sinyal moleküllerinin yokluğu

Figure 5. Absence of BHL signaling molecules in *P. fluorescens* strain when remain cream of *C. violaceum* CV026 biosensor strain



Şekil 6. *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşunun kremden yeşil renk değişimiyle *P. aeruginosa* PAO1 gibi *P. fluorescens*'de OdDHL sinyal moleküllerinin varlığı

Figure 6. The presence of OdDHL signaling molecules in *P. fluorescens*, A change from cream to green of *A. tumefaciens* NT1 biosensor strain as *P. aeruginosa* PAO1

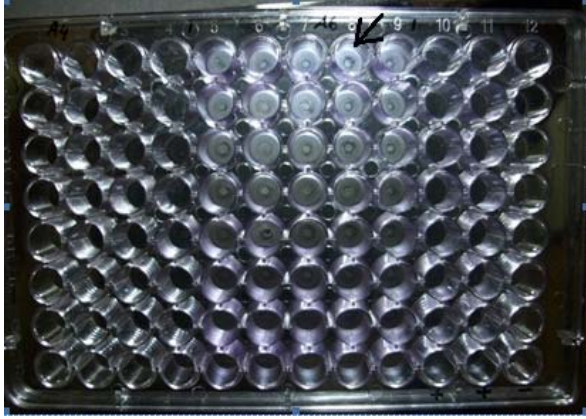


Şekil 7. Kristal viole ile boyanmış mikropatlarda *P. fluorescens* suşunda farklı yoğunlukta biyofilm oluşumu

Figure 7. Biofilm formation in micro plates stained with crystal violet in *P. fluorescens*

Tablo 1. Biyofilm testinde 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk sonuçları**Table 1.** The optical density results in the biofilm test at 600 nm wavelength

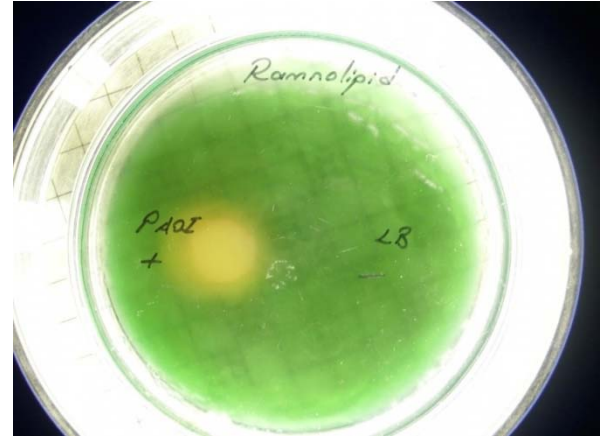
1. Suş	2. Suş	3. Suş	PAO1 (+)	LB (-)
0,104	0,07	0,07	0,103	0,07
0,105	0,085	0,076	0,106	0,058
0,101	0,104	0,077	0,108	0,081
0,077	0,071	0,071	0,096	0,065
0,078	0,167	0,071	0,096	0,066
0,074	0,092	0,069	0,108	0,057
0,162	0,105	0,104	0,115	0,009
0,104	0,078	0,133	0,116	0,092
Ort. 0,111607	Ort. 0,108071	Ort. 0,113714	Ort. 0,113286	Ort. 0,053571

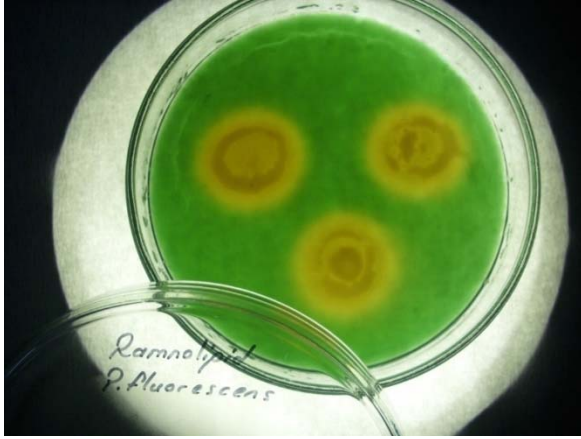
**Şekil 8.** Etanol, kristal viole, ve saf suyla muamele sonrasında mikrop-laklara tutunduğu yüzeyi bırakmayan biyofilm tabakası ve adezyon gücü**Figure 8.** Biofilm and adhesion formation in microp-plate after treatment with crystal violet ,ethanol and deionised water

***P. fluorescens*'de pigment testi bulguları:** *P. fluorescens* suşlarında pigmentin varlığı tirozin kullanılarak araştırılmıştır. Tirozin ilave edilen suşlarda pigment üretiminin optik yoğunluğu 20., 40. ve 60. saatlerde yüksek olduğu görülmüştür. Pigment üretiminin 20. saatte *P. fluorescens* 3 ve 2 suşlarında artmazken 1 suşunda artmıştır. 40. saatte de 3 ve 1 suşlarında artış devam etmiştir. Ancak 60. Saatte yapılan ölçümde pigment üretiminde *P. fluorescens* 3 suşunda artış, 2 suşunda

azalma, 1 suşunda ise herhangi bir değişimin olmadığı belirlenmiştir. Suşlar arasında değişkenlik söz konusu olsa da *P. fluorescens* suşlarında tirozinin varlığı pigment üretimini artırmıştır.

***P. fluorescens*'de rhamnolipid testi bulguları:** *P. fluorescens* suşlarının pozitif kontrol *P. aeruginosa* (PAO1) suşu ve negatif kontrol steril Luria Bertani Broth (LBB) Şekil 9.'daki görüntüyle karşılaştırılarak *P. aeruginosa* PAO1 gibi rhamnolipid ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 10.).

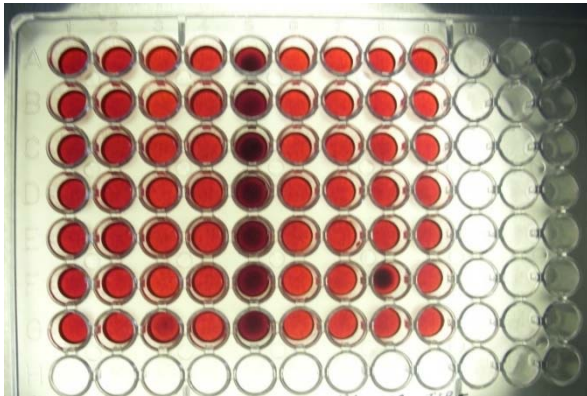
**Şekil 9.** Rhamnolipid testinde kullanılan *P. aeruginosa* (PAO1) suşu ve Luria Bertani Broth (LBB)**Figure 9.** Used in *P. aeruginosa* (PAO1) strain (positive control) and Luria-Bertani Broth (negative control) in rhamnolipids test



Şekil 10. *P. fluorescens* P1'in rhamnolipid üretimi

Figure 10. Rhamnolipids production in the *P. fluorescens* P1

***P. fluorescens*'de elastaz bulguları:** Elastaz aktivitesi 600 nm dalga boyunda 0,292 olan *P. aeruginosa* PAO1 optik yoğunluğuna göre *P. fluorescens* 1 suşunda 0,290, 2 suşunda 0,289, 3 suşunda 0,291 elastaz absorban değerleri tespit edilmiş ve 3. suşun sonucu Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. *P. fluorescens* suşlarında elastaz testi

Figure 11. Elastase test in the *P. fluorescens* strains

***P. fluorescens* proteaz bulguları:** Proteaz virülens faktörü *P. fluorescens* 1 ve 3 suşlarında tespit edilirken 2 suşunda edilmemiştir.

***P. fluorescens*'de amilaz bulguları:** *P. fluorescens* suşlarında amilaz testi pozitifdir (Şekil 12. ve Şekil 13.).



Şekil 12. *P. fluorescens* suşlarında lugol solüsyonu damlatılmadan önce

Figure 12. Before from drop of lugol solution in the *P. fluorescens* strains



Şekil 13. Lugol solüsyonu damlatılmış *P. fluorescens* suşlarında amilaz zonu

Figure 13. Amylase zone after dropped lugol in *P. fluorescens* strains

***P. fluorescens*'de hemoliz testi bulguları:** *P. fluorescens* suşlarında hemoliz tespit edilmiştir (Şekil 14. ve Şekil 15.).



Şekil 14. *P. fluorescens*'da well difüzyon testinde hemoliz zonu

Figure 14. Hemolysis zone in a well diffusion test of *P. fluorescens*



Şekil 15. *P. fluorescens*'da, çizgi ekiminde hemoliz zonu

Figure 15. Hemolysis zone in streaked of *P. fluorescens*

Çevreyi algılama sistemi ilk kez *Vibrio fischeri*'de; bakterilerin belli bir yoğunluğa ulaştığında ışık özelliği kazanması ile fark edilerek tanımlanmıştır. *P.aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* gibi insan patojenlerinde bakteri savunması amaçlı benzer nitelikte moleküller tanımlanmıştır. Bu moleküller ile mikroorganizmaların konak invazyonunu, ilaç direncini, hareketlerini, fosfat alımını, osmoregülasyonu, nitrojen fiksasyonunu gibi olayları kontrol edebildikleri bilinmektedir (Ağalar, 2011). *P.aeruginosa*'nın pozitif kontrol olarak kullanıldığı bu araştırma da *P. aeruginosa* referansıyla *P. fluorescens*'in de bu tip moleküllerle iletişime geçtikleri agar üzerindeki renk değişimiyle anlaşılmıştır.

P. fluorescens suşlarında öncelikle BHL ve OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak araştırılmıştır. *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *P. fluorescens* suşlarının BHL sinyal molekülünü üretmediği tespit edilmiştir. *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan testte ise OdDHL sinyal molekülünü üretebildiklerini göstermiştir. Araştırmada *P. fluorescens* OdDHL sinyal molekülünü üretebildiklerinin tespitiyle çevreyi algılama sisteminin varlığı ortaya konmuştur. Testin prensibine göre renk değişimine bakılarak söz konusu balık patojeninin çevreyi algılama sistemini kullandığı ispatlanmıştır. Bakterilerdeki çevreyi algılama sistemi; mikroorganizmaların yeterli yoğunluğa ulaştıklarını algılayarak aynı anda virülens faktörlerini aktifleştiren bir sistemdir.

Daha önce ki araştırmalarda, *P. fluorescens* (Allison vd., 1998) HHL, *P. fluorescens* (Williams, 2007) 3-Oxo-C10-HSL sinyal moleküllerinin varlığı bildirilmiştir. Bildirilen çalışmalardan farklı olarak bu araştırmada *P. fluorescens* suşlarında BHL molekülü tespit edilmiştir.

Wei ve Zhang (2006) çevreyi algılamayla *P. fluorescens* 2P24 suşunun biyokontrol aktivitelerini

düzenlediğini belirterek LuxR–LuxI gen sınıfından PcoR ve PcoI'dan oluşan bir çevreyi algılama sistemiyle yönettiklerini açıklamışlardır. Aynı çalışmada PcoI geninin çevreyi algılama sinyallerinin antifungal etkisini belirterek bu genin biyofilm, kolonizasyon, ortamda virülens yeteneğine engel olan etkenleri hissettiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu araştırmada da *P. fluorescens*'in iletişim mekanizmasının çevreyi algılama ile yönetildiği ispatlanmıştır. Bu araştırma ki *P. fluorescens* suşları çevreyi algılamanın kontrolündeki tüm virülens faktörlerini üretmiştir.

Allison vd., (1998) *P. fluorescens*'in biyofilm ürettiğini ve biyofilmin doğrudan hücreler arası iletişimde kullanılan AHL molekülleriyle ilişkili olduklarını söylemişlerdir. Bu araştırmada da AHL moleküllerinin de varlığı tespit edilerek biyofilm oluşumu görülmüştür.

Molobela vd., (2010) *P. fluorescens* biyofilminde amilaz ve proteaz etkisini incelemişler. Biyofilmin oluşarak yüzeye tutunduğunu belirtmiş ekstraselüler polimerik substantlar (EPS) ve EPS bileşenlerini saptamışlardır. Bu EPS içerisinde proteaz ve amilaz aktivitelerini incelemişler ve testlerin sonucunda EPS yapısının çoğunun proteinlerden oluştuğunu saptamışlardır. Bu araştırmada da benzerlik görülmüş ve *P. fluorescens*'in biyofilm oluşturduğu saptanmıştır.

Balıklarda ciddi virülens oluşturarak çeşitli dokularda zararlara sebep olan *P. fluorescens* suşlarının tümünde fenotipik olarak biyofilmi oluşturduğu belirlenmiştir. Gün ve Ekinci, 2009'da belirttiklerine göre *P. fluorescens*'in LapA yüzey proteini aracılığıyla biyofilm oluşumunda dönüşümsüz, tutunma aşamasında ise destekleme fonksiyonlarını oluşturmuştur. Bildirilen bu çalışmalardaki *P. fluorescens* suşlarındaki sonuçlar araştırmamızda da benzerlik göstermiştir.

Delille vd. (2007) *P. fluorescens*'in biyofilm ilk katmanının germanyum kristallerinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Belirtilen tüm araştırmalarda olduğu gibi bu araştırmada da biyofilmin varlığı tespit edilmiştir ve bu araştırmayı desteklemektedir.

Kjelleberg vd. (1997) *C. violaceum* pigment üretimini fenotipik olarak düzenlediğini belirtmişlerdir. Araştırmada *C. violaceum* suşu bildirilen bu çalışmayla benzerlik göstermiş ve aynı zamanda bu suş araştırmamızda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada *P. fluorescens* suşlarının tamamında tirozinin pigment üretimini artırdığı optik yoğunluklarla görülmüştür. Ağarda

yapılan çalışma da *P. fluorescens*'in bir suşu ve *P. aeruginosa* PAO1 tirozini saydamlaştırılmıştır. Testteki saydamlaşma gösteren bakteriyel balık patojenlerinde tirozin aminoasidinin pigment üretimini uyardığı sonucuna varılmıştır.

Besin kaynaklarının yetersiz olduğu durumlarda çevreyi algılama sistemi ramnolipid üretimini uyarır ve bakterinin hareketini besinlerin bulunduğu ortama doğru çevirir (Göze, 2009). *P. aeruginosa* PAO1 pozitif kontrol olarak kullanıldığı testte *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özgü virülens faktörlerinden olan ramnolipid ve elastaz aktivitesinin balık patojeni *P. fluorescens* suşlarında da olduğu tespit edilmiştir.

Virülens faktörlerinden biri olan proteaz *P. fluorescens* (1 ve 3) suşlarında tespit edilirken bu aktiviteye *P. fluorescens*'in 2 suşunda rastlanmamıştır. *P. fluorescens*'in tüm suşlarında amilaz ve hemoliz aktivitesi tespit edilmiştir.

Balık hastalıklarında profilaktif stratejiler; probiyotik kullanımı (Gatesoupe, 1999; Verschuere vd., 2000), immunostimulantlar (Sakai, 1999) ve aşı (Newman, 1993; Gudding vd., 1999; Heppell ve Davis, 2000) uygulamaları önemli yer tutmaktadır. Patojenlere karşı korunmada; çevreyi algılamanın ne olduğunun bilinmesi, etkisinin anlaşılması, kontrolünde olan virülens faktörlerinin etkinliğini kaybetmesi ve bakterilerin aralarındaki iletişimin bitirilmesi yeni bir stratejik metot olarak düşünülmektedir (Defoirdt vd., 2004).

Mikroorganizmaların kurdukları iletişimin anlaşılmasıyla genetik, metabolik ve fizyolojik aktiviteler hem anlaşılacak hem de tedavi gibi önemli konularda çığır açacak yeni amaçlar için kullanılabilir hale gelecektir (Yılmaz-Yıldıran vd., 2015).

SONUÇ

Bakteride neredeyse tek güç gendir. Gen modifikasyonu yapılmadan çevreyi algılama sisteminin durdurulması son yıllarda gündemdedir. Genlerin ekspresyonuna hükmeden bu sistemin anlaşılması ve bakterileri direk öldürmek yerine bakteriler arasındaki iletişimin kesilmesi su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodu olarak öngörülmektedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ağalar, C., (2011). Yabancı Cisimlerde Biyofilm Gelişimi Engellenebilir Mi? Bir Multidisipliner Araştırma Grubu Modeli, ANKEM Derg 2011;25(2):125-129 26. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Kahvaltılı Oturum-4 sunumundan (18-22 Mayıs 2011, Kızılağaç/Manavgat) 125 doi: 10.5222/ankem.2011.125
- Aleksandra, D., (2010). The Dawn of the Living, Talking Robots. The Journal of Young Investigators: An Undergraduate, *Peer-Reviewed Science Journal*, 19, 22, <http://www.jyi.org>. <http://www.jyi.org/features/ft.php?id=285>. Erişim Tarihi: 03.05.2010.
- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., & Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 179-184.
- Akan, E., & Kınık, A. (2014). Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi, *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology*, 14, 42-51.
- Arda, M., Seçer, S., & Sarıyüpeoğulları, M. (2002). Balık Hastalıkları. Medisan Yayın Serisi 56. Ankara.
- Arda, M. (1997). Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi No:25, 490. Ankara.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moor, D., Seidman, J., Smith, J., & Stauhle, K. (1988). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Intersciences.
- 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.
- Camara, M. (2007). Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations. <http://wmc7.liacs.nl/proceedings/WMC7Camara.pdf>
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., & Farand, S.K. (1998). Production of acylhomoserine lactone signals by gram-negative

- plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 1119-1129.
- Chu, T., Ni, C., Zhang, L., Wang Q., Xiao J., Zhang, Y., & 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 Acyle 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.
- Delille, A., Quile's, F., & Humbert, F. (2007). In Situ Monitoring of the Nascent *Pseudomonas fluorescens* Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 5782-5788.
- 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.
- Ersoy, E., Karaboz, İ., Sukatar, A., Aldağ, D.S., Sinecan, E., & Güner, G. (2005). Biyoluminesent *Photobacterium leiognathi* TEM04S2 Straini ile Bakterilerde Quorum Sensing 'in Kanıtlanması, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(2), 1-6.
- Federle, M.J., & Bassler, B. (2003). Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1291-1299.
- García-Aljaro, C., Melado-Rovira, S., Milton D.L., & Blanch A.R. (2012). Quorum-sensing regulates biofilm formation in *Vibrio scophthalmi*. *BMC Microbiology*, 12: 287.
- Gatesoupe, F.J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Göze, E.Y. (2009). Çeşitli Bitki Ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa*'da Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, *Yüksek Lisans Tezi*, 64s, Isparta.
- Greenberg, E.P. (2003). Bacterial communication and group behavior. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1288-1290.
- Gudding, R., Lillehaug, A., & Evensen, Ø., (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72, 203-212.
- Gün, İ., & Ekinci, F.Y. (2009). Biyofilmler: Yüzeylelerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda, Derleme/Review*, 34(3), 165-173.
- Heppell, J., & Davis, H.L. (2000). Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43, 29-43.
- Karaboz, İ., & Sukatar, A. (2004). Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları) *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(5), 23-32.
- Kjelleberg, S., Steinberg, P., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M., & De Nys, R. (1997). Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems?. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 85-93.
- 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-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143, 3703-3711.
- Mıdık, F., Tokatlı, M., & Özçelik, F. (2011). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve üretimini etkileyen faktörler. Syf: 106.
- 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.
- Molobela, I.P., Cloete, T.E., & Beukes M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria., *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(14), 1515-1524.
- Myszka, K. & Czaczyk, K. (2012). N-Acylhomoserine Lactones (AHLs) as Phenotype Control Factors Produced by Gram – Negative Bacteria in Natural Ecosystems. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 1, 15-21.
- Newman, S.G. (1993). Bacterial vaccines for fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 145-185.
- 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.
- O'Toole, G.A. & 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.
- 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.
- Sakai, M. (1999). Current status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63-92.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., JR., Rinehart, K.L., & Farrand, S.K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 6036-6041.
- 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.
- Timur, G., & Timur, M. (2003). Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No:5. 538 s. ISBN.975-404699-5.
- 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.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 655-671.
- Wei, H.L., & Zhang, L.Q., (2006). Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24, *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 267-280.
- Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153, 3923-3938.
- 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.
- Yılmaz-Yıldırım, H., Karahan, A.G., & Başyigit-Kılıç, G. (2015). Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(1), 79-90.