Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
Cilt 20, Sayı 3, 558-565, 2016

Süleyman Demirel University
Journal of Natural and Applied Sciences
Volume 20, Issue 3, 558-565, 2016

DOI: 10.19113/sdufbed.16945

Alfa-Pinen, Terpineol, Sineol, Linelol ve Kamforun Bakteriyel Hücreler Arası İletişim Sistemi Üzerine İnhibitör Etkileri

Erdi DOĞRU[1], Seyhan ULUSOY*[1]

[1] Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 32260, Isparta

(Alınış / Received: 01.06.2016, Kabul / Accepted: 30.06.2016, Online Yayınlanma / Published Online: 25.07.2016)

Anahtar Kelimeler
Pseudomonas aeruginosa,
Hücreler arası iletişim,
Alfa pinen,
Terpineol,
Sineol,
Linelol

Özet: Pek çok Gram negatif patojen bakteri çeşitli virülens faktörlerinin üretiminin genetik seviyede kontrolünü N-Açil homoserin lakton aracılı hücreler arası iletişim sistemini kullanarak sağlar. Bu nedenle bu hücreler arası iletişim sisteminin engellenmesi veya modifiye edilmesi, bu sistemi yeni terapötiklerin keşfi için cazip bir hedef haline getirmektedir. Hücreler arası iletişim sistemi inhibitörü, bitkisel kökenli pek çok doğal ürün bulunmaktadır. Bu çalışmada defne, adaçayı, mersin ve ardıç uçucu yağlarının bakterilerdeki hücreler arası iletişim sistemi üzerine engelleyici özellikleri incelenmiş ve bu yağ örneklerinin majör bileşenleri GC-MS ile belirlenmiştir. Alfa pinen, terpineol, sineol, linelol ve kamforun (yağ örneklerinin majör bileşenleri) hücreler arası iletişim sistemi üzerine inhibitör etkileri *C. violaceum*, 026, *C. violaceum* VIR07, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar alfa pinen, terpineol, sineol, linelol ve kamforun *C. violaceum*, 026, *C. violaceum* VIR07 suşunda viyolasin üretiminin hem de, *P. aeruginosa* PAO1 ve *P. aeruginosa* PAC-1 klinik izolatında piyosiyanin, elastaz üretimi ve kayma hareketini önemli derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Çalışmanın sonuçları alfa pinen, terpieneol, sineol, linelol ve kamforun, *C violaceum* ve *P. aeruginosa* için hücreler arası iletişim sistemi üzerine inhibitör etkileri bulunduğu tespit edilmiştir.

Quorum Sensing Inhibitory Activities of Alpha-Pinene, Terpineol, Cineole, Linalool and Camphor

Keywords
Pseudomonas aeruginosa,
Quorum sensing,
Alpha pinene,
Terpineol,
Cineole,
Linalool

Abstract: Many pathogenic Gram negative bacteria often use N-Acyl homoserine lactone mediated cell to cell communication (quorum sensing) system to control the gene expression of various virulence factors. Thus blocking or manipulating this system makes it an attractive target for discovery of new therapeutics. There are a number of plant-based natural products as quorum sensing inhibitors.. In this study, QS inhibitory potential of laurus, salvia, myrtus and juniperus essential oils were screened and compositions of oils were analysed by GC-MS. The anti-quorum sensing activity of alpha pinene, terpineol, cineole, linalool and camphor (major components of oils) tested against using *Chromobacterium violaceum* strain CV026, *C. violaceum* strain VIR07, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1. Results showed that alpha pinene, terpineol, cineole, linalool and camphor significantly inhibited violacein production in *C. violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07, as well as the elastase, pyocyanin production, swarming motilty in *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1. Our findings demonstrated that alpha pinene, terpineol, cineole, linalool and camphor have potential as inhibitors of quorum sensing system in *C violaceum* and *P. aeruginosa*.

1. Giriş

Bakteriler çevreleriyle ve birbirleriyle iletişim yeteneğine sahip sosyal organizmalardır[1]. Bakterilerin iletişim dili, onların üreterek büyüme ortamına saldıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Bu moleküllerinin konsantrasyonunun bakteriler tarafından algılanmasıyla, bakteriler birbirlerini algılayarak pek çok özelliğin topluluk halinde gerçekleştirilmesini kontrol edebilmektedir.

*İlgili yazar: seyhanulusoy@sdu.edu.tr

Bu sistem "Quorum Sensing" (Çevreyi/çoğunluğu Algılama Sistemi) olarak bilinmektedir[2]. Bu sistem aracılığıyla çeşitli bakteriyel davranışların (biyofilm oluşumu, antibiyotik sentezi, çeşitli virülens genlerinin ifadesi, simbiyoz) kontrol edildiği bilinmektedir [3]. Gram-negatif fırsatçı patojenlerin çoğu, yüksek yapılı organizmalarda kolonize olmaları sırasında, bu sinyal moleküllerini kullanarak popülasyon davranışlarını düzenlerler[4]. Böylece bu sistem, bakterilere konak üzerinde popülasyon yoğunluklarını algılayarak, eşik hücre yoğunluğuna ulaşıldığında virülens faktörlerinin üretimini genetik seviyede kontrol etmelerini sağlar [5, 6]. Fırsatçı bir insan patojeni olan *Pseudomonas aeruginosa*, çeşitli enfeksiyonlar (yanık, AIDS, kanser) sonucu bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde veya kistik fibroz hastalarının akciğerlerinde ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. *P. aeruginosa*'da virülens faktörlerinin üretimi (elastaz, piyosiyanin, proteaz) ve biyofilm oluşumu N-açil homoserin lakton (HSL) sinyal molekülü aracılı çevreyi algılama sistemi tarafından düzenlenmektedir[7, 8].

Yine Gram(-) fırsatçı bir patojen olan *Chromobacterium violaceum* N-hekzanoyil-HSL (C6-HSL) aracı çevreyi algılama sistemini kullanarak viyolasin üretimini düzenlemektedir [9]. Yine *C. violaceum*'un sinyal molekülü üretemeyen mutant suşları *C. violaceum* VIR07 ve *C. violaceum* 026, diğer bakterilerin açil homoserin lakton molekülleri üretimlerini test için kullanılmaktadır [9, 10]. Bakteriler çevreyi algılama sistemini kullanarak, ürettikleri sinyal molekülleri aracılığı ile iletişim kurmakta, bulundukları ortamda hücre sayılarını takip ederek, yeter çoğunluğa ulaştıkları anda virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik moleküllerin üretimi için gerekli gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylece patojen bakteriler, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak başarılı bir enfeksiyon sürecinin gelişmesini sağlamaktadırlar.

Çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin artışı, enfeksiyonların tedavisi için yeni yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu dahil birçok virülens faktörünün üretiminin çevreyi algılama sistemi ile düzenlenmesi, yeni antibakteriyel moleküllerin geliştirilebilmesi için ilginin çevreyi algılama sistemi üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur[1]. Günümüzde, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için kullanılan antibiyotikler, bakteriyi doğrudan öldürerek veya çoğalmalarını engelleyerek etki gösterdikleri için hızla dirençli bakteriyel popülasyonların gelişmesine neden olmaktadır. Bu da, kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalması, dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi, direncin yayılması ve ekonomik kayıplar ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle dünya genelinde pek çok araştırma grubu tarafından bakteriyel enfeksiyon hastalıkları engellemek veya onların tedavisinde yeni stratejiler tespit etmek için önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar özellikle bakteri hücreleri arasında iletişimin engellenmesi veya modifiye edilmesiyle, çevreyi algılama sistemini bloke eden moleküllerin tespit edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır[11]. Bu yolla, önemli patojenlerin enfeksiyon oluşturma yeteneklerinin zayıflatılması ve bakteriyel enfeksiyonların kontrol altında tutulması hedeflenmektedir.

Günümüzde alternatif tıbba duyulan ilginin artması nedeniyle, kullanılan bitkisel ürünlerin antikanser, antibakteriyel, antienflamatuvar vs. etkilerini konu alan çok sayıda çalışma yapılmaktadır[12, 13]. Ayrıca çeşitli bitkisel kökenli ürünlerin kullanabilirliği açısından, bilimsel çalışmalar konusunda eksikler mevcuttur.

Bu çalışma kapsamında piyasadan temin edilen adaçayı, mersin, defne, uçucu yağ örneklerinin potansiyel çevreyi algılama sistemi üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir. Bunun için öncelikle *C. violaceum* VIR07 ve *C. violaceum* CV026 biyomonitör suşları kullanılarak yağ örneklerinin, çevreyi algılama sistemine potansiyel inhibitör etkileri incelenmiştir. Daha sonra antibakteriyel etkilerini belirlenmesi amacıyla yağ örneklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiş ve GC-MS ile örneklerin uçucu bileşen analizleri yapılarak, yüzdece fazla bulunan etken maddeler tespit edilmiştir. Bunlardan alfapinen, terpineol, sineol, kamfor ve linelolun önemli bir insan patojeni olan *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 klinik izolatında, *C. violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07 suşunda çevreyi algılama sistemi üzerine etkileri, elastaz, piyosiyanin, biyofilm üretimi, viyolasin pigmenti ve kayma hareketi üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bakteriyel suşlar

Deneylerde kullanılan suşlar (Tablo 1) Luria Bertani (LB) sıvı besiyerine ekilmiş ve 30°C veya 37°C de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamına %10(v/v) gliserol ilave edilerek kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 1. Çalışma sırasında kullanılan suşlar

Suş Adı	Özellik	Kaynak
P. aeruginosa PAO1	PT5 orijinal tip	SDÜ Biyoloji Bölümü Stoğu
P. aeruginosa PAC-1	Klinik izolat (Kan kültürü)	SDÜ Biyoloji Bölümü Stoğu
C. violaceum 026	Viyolasin pigmenti üretimi	SDÜ Biyoloji Bölümü Stoğu
C. violaceum VIR07	Viyolasin pigmenti üretimi	SDÜ Biyoloji Bölümü Stoğu

2.2. Uçucu yağ örnekleri

Uçucu yağ örnekleri piyasadan temin edilerek kullanılmıştır.

2.3. GC-MS analizi

Uçucu yağ örneklerinin Shimadzu GC-MS QP 5050 (Kyoto, Japan) Gaz kromatografi-Külte Spektroskopisi (GC-MS) sistemi kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında CP WAX 52 kapiler kolon (50 m x0,32 mm ID, df: 1,2) (Varian), taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 µL dir. GC sıcaklık programı: Fırın başlangıç sıcaklığı 60^{o}C olup dakikada 2^{o}C'lik artış ile bu sıcaklıktan 220^{o}C'ye yükselmiştir. 220^{o}C'de 20 dakika bekletilmiştir. Kolon olarak, Cp WAX 52 CB (50 m * 0,32mm) kullanılmıştır. Dedektör ve enjektör sıcaklığı 250^{o}C şeklindedir.

2.4. Alfapinen, terpineol, sineol, kamfor ve lineolun antibakteriyel özelliklerinin incelenmesi

Uçucu yağ örneklerinin anti-bakteriyel özellikleri *C. violaceum* 026, *C. violaceum* VIR07, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 için agar difüzyon tekniği kullanılarak test edilmiştir. Ayrıca yağ örneklerinin MİK seviyeleri broth dilüsyon metodu ile belirlenmiştir [13].

İnkübasyon sonrasında tüm suşlar ve izolatlar için, gözle görülebilir bulanıklığın olmadığı en düşük derişimdeki yağın bulunduğu tüp MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

2.5. Alfapinen, terpineol, sineol, kamfor ve linelolun viyolasin üretimine etkisinin incelenmesi

C. violaceum suşunda viyolasin adlı pigmentin üretimi çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında gerçekleşmektedir. *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 suşları mutant suşlardır ve doğal olarak viyolasin pigmentini üretememektedir. Ancak ortama *C. violaceum CV*026 için kısa zincirli (C4-C8) ve *C. violaceum* VIR07 için uzun zincirli (C12) sinyal molekülleri eklendiği zaman viyolasin üretimi gerçekleşmektedir [9, 10]. Bu özelliklerinden faydalanılarak *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 suşları ortama sinyal molekülü eklenerek viyolasin üretimi için uyarılmakta ve potansiyel çevreyi algılama sistemi inhibitörü olduğu düşünülen moleküllerin test ortamına eklenmesiyle pigment üretimindeki inhibisyon incelenmektedir.

C. violaceum 026, *C. violaceum* VIR07 suşları sıvı besiyerinde 14-16 saat 30°C'de üretilmiştir. 5 ml LB sıvı besiyeri içerisine öncelikle sinyal molekülleri eklenmiştir. VIR07 için OdDHL sinyal molekülünden 026 için ise OHHL sinyal molekülünden ilave edilerek viyolasin üretimi sağlanmıştır. Test ortamına son derişimleri sineol ve alfa pinen; 2mM, 1mM, 0,5 mM, kamfor; 0,5mM 0,25mM, 0,125mM, terpineol; 0,1mM, 0,05mM, 0,025mM linelol; 0,125mM, 0,0625mM, 0,03125mM olacak şekilde eklenmiş, bakteri kültürlerinden ilave edilerek 30°C'de çalkalamalı inkübatörde (120rpm) 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda şişeler vortekslenerek 1'er ml kültür tüplere alınarak 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda üst faz atılarak alt kısımda kalan pellet üzerine 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilmiştir. Vorteks işleminden sonra tüpler santrifüjlenerek üst faz spektrofotometre küvetine aktarılmış 585 nm'de absorbans değerleri okunarak kaydedilmiştir [14]. Deneyler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınarak sonuçlar kullanılmıştır.

2.6. Kayma testi

Kayma hareketi testi için *P. aeruginosa* suşları bir gece Luria-Bertani besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Her bir kültür, 8g nutrient broth l^{-1}, 5g bakto agar l^{-1} ve %0.5 glikoz içeren kayma besiyerine (alfapinen, terpieneol, sineol, linelol, kamfor 2mM, 1mM, 0.5mM olacak şekilde eklenmiş) içeren petrilere ilave edilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır [15]. Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınarak sonuçlar kullanılmıştır.

2.7. Elastaz aktivitesi

Elastaz üretim testi, Elastin Congo Red (ECR:Sigma) testi ile incelenmiştir [16]. Test edilecek bakteri suşları LB besiyerinde 37°C'de 18-24 saat üretilmiştir. *P. aeruginosa* kültürleri absorbans değerleri 600nm'de 0.02 olacak şekilde bulanıkları ayarlanıp içerisine derişimleri 2mM, 1mM, 0,5mM olacak şekilde alfapinen, terpieneol, sineol, linelol, kamfor eklenmiş, 37^{o}C'de 14 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıstır. İnkübasyon sonunda 100 µl bakteri süpernatantı, 20 mg ECR ihtiva eden 900-µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl2, Ph 7,5) ile karıştırılarak ve 37^{o}C'de 3 saat inkübe edilmiştir. ECR santifüjlenerek süpernatantın absorbansı 495 nm'de okunmuştur. Deneyler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınarak sonuçlar kullanılmıştır.

2.8. Piyosiyanin testi

Piyosiyanin üretimi testi için bakteri suşları LB besiyerinde 37°C'de 18-24 saat üretilmiştir. *P. aeruginosa* kültürleri (600nm 0.02) piyosiyanin broth (PB) besiyerine ekilmiş ve içerisine derişimleri 2mM, 1mM, 0,5mM olacak şekilde alfapinen, terpineol, sineol, linelol, kamfor eklenerek 37°C'de 16 saat çalkalanarak üretilmiştir. PB ortamında üretilen *P. aeruginosa* kültürünün 5 mL si 5mL kloroform ile ekstrakte edilmiş ve organik faz ayrılmıştır [17]. Ayrılan faza 2 mL 0.2 M HCl ilave edilerek piyosiyanin miktarı OD 520 nm'de okunarak sonuçlar kayıt edilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınarak sonuçlar kullanılmıştır.

2.9. Biyofilm testi

Biyofilm testi için, 1 ml *P. aeruginosa* kültürü (OD600=1.0) %1 (v/v) LB içeren 2 ml hacminde tüplere eklenmiştir. Son derişimleri 2mM, 1mM, 0,5mM olacak şekilde alfapinen, terpieneol, sineol, linelol, kamfor eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37°C de 1 gün inkübe edilip, inkübasyon süresi sonunda kültürler dökülerek ve tüpler steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Tüpler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 1 ml %0.5 (w/v) kristal viyole ile 30 dakika boyanarak ve steril saf su ile boyanın fazlası yıkanmıştır. Tüplere eklenen 1 ml % 95 (v/v) etanolün 520 nm için absorbansı okunarak biyofilm oluşumu incelenmiştir[18]. Deneyler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.10. İstatiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için tek yönlü varyans (one way Anova) testi kullanılmıştır.

3. Bulgular

Çalışma için tercih edilen adaçayı, defne, mersin, ardıç uçucu yağ örneklerinin, bakterilerde hücreler arası iletişim sistemine potansiyel etkilerinin olduğu tespit edilmiş ve etkiyi sağlayan etken maddenin belirlenebilmesi için GC-MS ile bileşen analizi yapılmıştır. GC-MS Analiz Sonuçları

GC-MS analiz sonuçlarına göre yağ örneklerinde yüzdece fazla bulunan etken maddeler (alfa pinen, terpineol, sineol, kamfor ve linelol) diğer bakteriler için test edilmek üzere seçilmiştir (Tablo 2).

Alfa pinen, Terpineol, Sineol, Kamfor ve Lineolün Antibakteriyel Özellikleri

Uçucu yağ örneklerinin MİK değerleri *C. violaceum* CV026*, C. violaceum* VIR07 suşu için alfapinen 2mM, linelol 0.125mM, sineol 2mM, terpineol 0.1mM, kamfor 0.5mM derişimde; *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 için ise alfa pinen, terpineol, kamfor, sineol, linelol 2mM derişim için antibakteriyel etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Alfapinen, Terpineol, Sineol, Kamfor ve Linelolün Viyolasin Üretimine Etkileri

Alfapinen, terpineol, sineol, kamfor, ve linelolun farklı derişimlerde *C. violaceum* 026 ve *C. violaceum* VIR07 suşu için viyolasin pigment üretimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu üretim OHHL ve OdDHL sinyal molekülerinin varlığında gerçekleşmektedir.

C. violaceum 026 ve VIR07 suşları için viyolasin üretimini sırasıyla terpineolün; %75-81; % 51-62 kamforun % 65-81; % 49-77 ve alfa pinenin % 40-34; % 61-85 yüksek oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 1a-b).

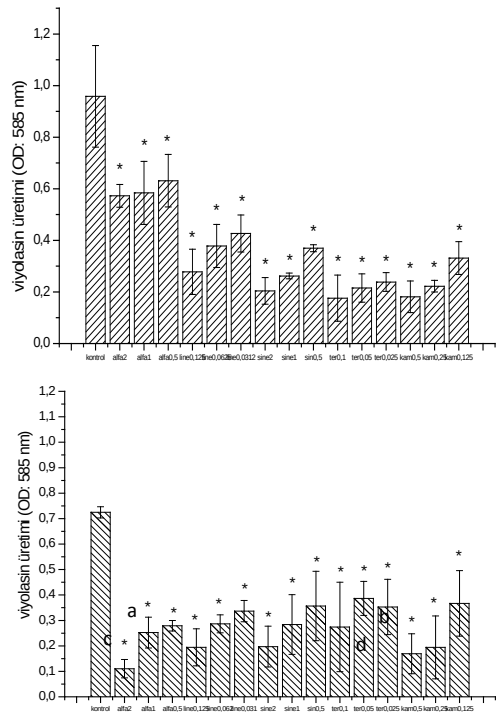
Tablo 2. Adaçayı, Defne, Mersin, Ardıç uçucu yağ örneklerinin % bileşeni

BİLEŞENLER	**defne**	**ardıç**	**adaçayı**	**mersin**
	% oran	**% oran**	**% oran**	**%oran**
Alfa-pinen	4.65	96.0	7.04	*
Beta-pinen	3.42	1.21	1.19	*
kamfor	0.16	0.26	6.45	*
sabinen	7.21	*	1,01	*
mirsen	0.54	1.51	2.53	*
alfa-terpinen	0.27	*	*	*
limonen	1.14	0.71	5.85	4.9
1,8-sineol	59.3		12.6	6.2
gama-terpinen	0.72	*	*	*
simen	1.03	0.32	1.51	*
linelol	1.25	*	2.86	9.05
3,7-oktadiyen-2-ol, 2,6-dimetil	0.82	*	*	*
Linalil Propiyonat	0.32	*	*	*
3sikloheksen-1-mentol, alfa-alfa4-trimetil asetat	14.1	*	*	*
Geranil asetat	0.16	*	*	*
Metil Öjenol	0.72	*	*	*
alfa-tujon	*	*	30.8	*
beta-tujon	*	*	3.73	*
kamfor	*	*	15.7	3.01
Selinen	*	*	4.02	*
Borneol	*	*	1.79	*
1,4-sineol	*	*	*	1.06
o-simen	*	*	*	1.58
alfa terpinolen	*	*	*	0.57
linalil asetat	*	*	*	7.06
l-terpinenol	*	*	*	4.56
D-fenil alkol	*	*	*	2.49
trans-karyofillen	*	*	*	0.68
1-2 propandiyol	*	*	*	3.88
terpinen-4-ol	*	*	*	2.31
beta terpineol	*	*	*	4.42
isoborneol	*	*	*	1.93
alfa terpineol	*	*	*	40.6
benzil alkol	*	*	*	2.35
Timol	*	*	*	1.95

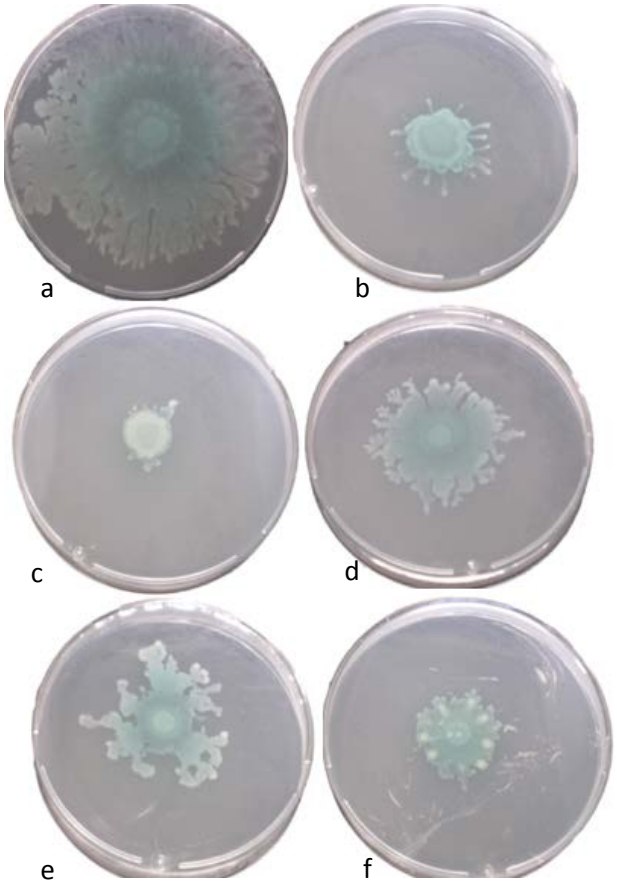
Alfapinen, Terpineol, Sineol, Kamfor ve Linelolün *P. aeruginosa* Kayma Hareketine Etkileri

Bu çalışma da alfa pinen, terpineol, sineol, kamfor, ve linelolün *P. aeruginosa* PAO1 ve *P. aeruginosa* PAC-1 için kayma hareketi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 2).

Alfa pinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelol son derişimleri 1mM olacak şekilde kayma besiyerine eklendiğinde, *P. aeruginosa* PAO1 suşu için kayma hareketini en yüksek oranda terpineolün (%70) ve en düşük oranda sineolün (%46) inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 2a-f). *P. aeruginosa* PAC-1 için kayma hareketini terpineolün %31 ve kamforun %5 oranında azalttığı tespit edilmiştir.



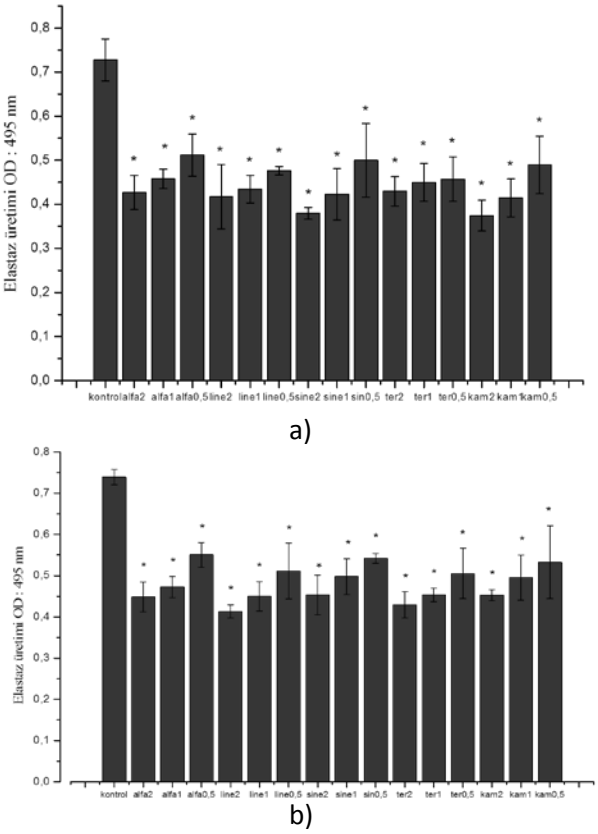
Şekil 1. Alfa pinen, terpineol, sineol, kamfor ve linelolun *C. violaceum* 026 (a) ve VIR07 (b) suşlarının viyolasin üretimine etkileri. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 2. *P. aeruginosa* PAO1 için kontrol (a), 1mM alfa pinen (b), 1mM terpineol (c), 1mM sineol (d), 1mM kamfor (e), 1mM lineol (f) varlığında kayma hareketi.

Alfapinen, Terpineol, Sineol, Kamfor ve Linelolun Elastaz Üretimine Etkileri

Bu çalışmada 2, 1 ve 0.5mM alfa pinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelolün, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1, için elastaz üretimine etkileri test incelenmiştir. *P. aeruginosa* PAO1 ve *P. aeruginosa* PAC-1 için elastaz üretimini, ortama 2 mM alfa pinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelolün eklendiği zaman sırasıyla; kamfor %49; %39, sineol %48; %39, linelol %43; %44, alfapinen %41 ve terpineol %41; %42 oranında inhibe etmiştir (Şekil 3).



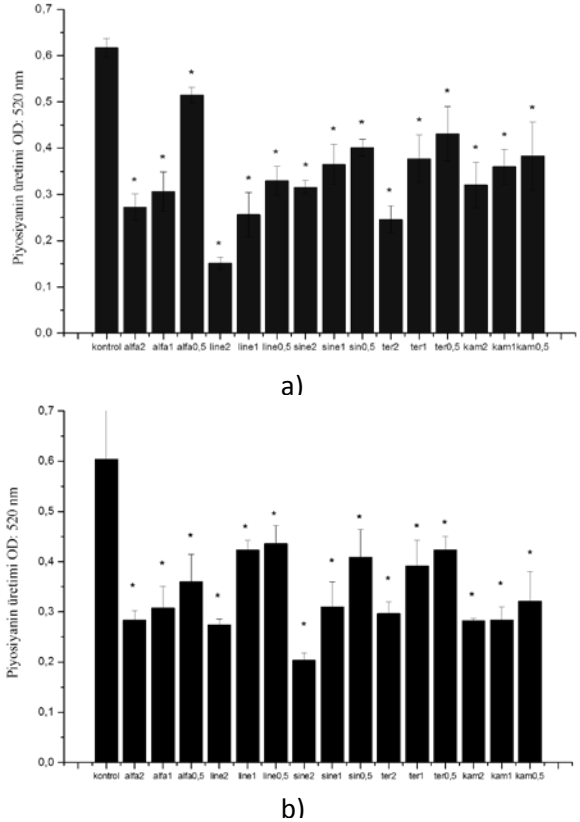
Şekil 3. *P. aeruginosa* PAO1 (a), *P. aeruginosa* PAC-1 (b) için elastaz üretimine alfa pinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelolün (2, 1 ve 0.5 mM için) etkisi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Alfapinen, Terpineol, Sineol, Kamfor ve Linelolün *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 için Piyosiyanin Üretimine Etkileri

Piyosiyanin üretimi bakımından test ortamına alfa pinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelol 2, 1 ve 0.5 mM son derişimde eklenerek *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 inhibisyon etkileri test edilmiştir. 2 mM son derişim için *P. aeruginosa* PAO1 ve *P. aeruginosa* PAC-1 için piyosiyanin üretimini sırasıyla; kamfor %48; %53, sineol %49; %66, linelol %76; %55, alfapinen %56; %53 ve terpineol %60; %51 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4).

Alfapinen, Terpineol, Sineol, Kamfor ve Linelolun *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAC-1 için Biyofilm Oluşumuna Etkileri

P. aeruginosa PAO1 ve *P. aeruginosa* PAC-1 için biyofilm oluşumunu, 2 mM son derişim için sırasıyla; kamfor %25; %30, sineol %24; %29, linelol %8; %20, alfapinen %18; %29 ve terpineol %13; %33 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir.



Şekil 4. *P. aeruginosa* PAO1 (a), *P. aeruginosa* PAC-1 (b) için piyosiyanin üretimine alfa pinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelolün (2, 1 ve 0.5 mM için) etkisi. Sonuçlar One way Anova ile analiz edilmiş (*) ile işaretli sonuçlar ile kontrol arasındaki fark p<0,05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4. Tartışma ve Sonuç

Günümüzde klinik uygulamalarda çoklu ilaç direncine sahip bakteriyel suşların artması, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için yeni stratejiler bulunmasını gerekli kılmaktadır. Ayrıca alternatif tıbba duyulan ilginin artmasıyla, çeşitli amaçlarla kullanılan bitkisel ürünlerin antibakteriyel, antienflamatuvar gibi özellikleri çok sayıda çalışmaya konu olmuştur [12].

Pseudomonas dahil pek çok patojen bakteri, üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleri ile iletişim kurmakta, ortamdaki popülasyon yoğunluklarını izlemekte ve yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylece, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak, başarılı bir enfeksiyon oluşturmaktadır. Çevreyi algılama sisteminin yönlendirilmesi ve modifiye edilmesiyle, bakteri hücrelerinin doğrudan öldürülmeden etkili olması, antibiyotiklerde gözlenen direnç gelişimine neden olmaması açısından bir avantajdır [1].

Bu nedenle patojen bakterilerilerde çevreyi algılama sistemi modifiye edilmesi veya yönlendirilmesine yönelik pek çok molekülün etkisini konu alan artan sayıda çalışma mevcuttur [14, 19-24]. Ancak mevcut çalışmalarda rapor edilen moleküllerin toksik olması, etki göstermesi için yüksek derişimde vücuda alınmasının gerekmesi, in vivo stabilitelerinin düşük olması gibi pek çok olumsuz özellikleri mevcuttur. Bu nedenle hala bakterilerde hücreler arası iletişim sistemini bozabilecek veya yönlendirebilecek toksik olmayan, doğal inhibitör moleküllerin tespitine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu amaçla bu çalışmada zaten etnobotanik amaçla halk arasında kullanılan bazı uçucu yağ örneklerinin etken maddelerinin bu potansiyeli incelenmiştir. Öncelikle potansiyel etkileri incelenmiş ve alfa pinen viyolasin üretiminde *C. violaceum* VIR07 için %84.8, terpineol ise *C. violaceum* 026 için %81.6 oranında inhibisyona sebep olmuştur.

Elastaz, elastin ve kollajen gibi ökaryotik proteinleri parçalayan bir metalloproteazdır [25]. Elaztaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, LasR-LasI çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir [26].

P. aeruginosa PAO1 suşunda elastaz üretimini en yüksek inhibisyonu %49 ile kamfor ve *P. aeruginosa* PAC-1 klinik izolatında ise en yüksek inhibisyonu %44 oranla linelol göstermiştir.

Piyosiyanin mavi renkli, kloroformda eriyen bir pigmenttir. *P. aeruginasa* tarafından üretilir, bakterinin fizyolojisinde ve patojenezinde önemli rol oynar. Piyosiyanin üretimi, doğrudan *rhl* sistemi tarafından kontrol edilirken; LasA üretimi *las* sistemi tarafından kontrol edilir [27, 28]. Ancak çevreyi algılama sistemindeki hiyerarşiden dolayı *las* sisteminin aynı zamanda piyosiyanin üretimini de etkilediği bilinmektedir [27].

P. aeruginosa PAO1 suşunda linelol, piyosiyanin üretimini %76 oranında inhibe ettiği gözlenirken, *P. aeruginosa* PAC-1 izolatında ise %66 oranda sineol'un inhibisyon etkisi gözlenmiştir.

Yine 1mM derişimde terpineolün *P. aeruginosa* PAO1 için kayma hareketini %70 ve *P. aeruginosa* PAC-1 klinik izolatında ise %31 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir.

Literatürde *P. aeruginosa*'nın temel virülans faktörlerinden olan biyofilm yapının, antibiyotik

geçişinde bariyer görevi görerek bakteri direncine katkı sağladığı bilinmektedir[29, 30]. Bu çalışmada alfapinen, kamfor, sineol, terpineol, ve linelol'un *P. aeruginosa* PAO1 suşunda ve *P. aeruginosa* PAC-1 klinik izolatında biyofilm oluşumuna etkileri araştırılmış ancak etken madde uygulanmamış örneklere göre istatiksel olarak önemli inhibisyona sebep olmadıkları tespit edilmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre alfapinen, kamfor, sineol, terpineol ve linelolün viyolasin üretimini neredeyse tamamen inhibe etmesine rağmen (Şekil1.), *P. aeruginosa* PA01 ve *P. aeruginosa* PAC-1 klinik izolatında virülens faktörlerinin üretimi daha az oranda inhibe ettiği (Şekil 2,3,4) tespit edilmiştir. Dahası özellikle biyofilm oluşumu için inhibisyon oranları oldukça düşüktür. Çalışma sonucunda etkisi incelenen etken maddeler arasında terpineol ve sineolün virülens faktörlerinin üretimini en yüksek oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla günlük hayatta sıklıkla kullanılan yağ örneklerinin bileşiminde bulunan etken maddelerin, bakterilerde hücreler arası iletişim sistemini farklı oranlarda etkileyerek inhibitör etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca aynı etken maddeler farklı yağ örneklerinde ve aynı karışım içerisinde farklı oranlarda farklı etken maddeler ile birlikte bulunmaktadır. Bu değişkenlerin hepsi örneklerin etki potansiyelini değiştirmektedir. Çalışmanın sonucunda bu etken maddelerin, bu iletişim sistemini kullanan patojen bakterilerin neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisi ve kontrol edilmesi ve bu amaçla yeni ürünlerin geliştirilmesi için fayda sağlanabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmayı 2575-M-10 No'lu Proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Kaynakça

[1] Rasmussen, T. B., Givskov, M. 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology *152*, 895-904.

[2] Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annual Reviews in Microbiology *50*, 727-751.

[3] McGowan, S.J., Barnard, A.M., Bosgelmez, G., Sebaihia, M., Simpson, N.J., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A., Salmond, G.P. 2005. Carbapenem antibiotic biosynthesis in Erwinia carotovora is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. Molecular microbiology *55*, 526-545.

[4] Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R. 2002. Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections. Laboratory Medicine *33*, 295-306.

[5] Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 8789-8793.

[6] Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., Ladner, J.E. 2007. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry *46*, 1821-1828.

[7] Van Delden, C., Iglewski, B.H. 1998. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerging infectious diseases *4*, 551.

[8] Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V.J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D.I., Bycroft, B.W. 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences *355*, 667-680.

[9] 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. 1997. Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology *143*, 3703-3711.

[10] Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., Ikeda, T. 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in Chromobacterium violaceum type strain ATCC 12472. FEMS microbiology letters *279*, 124-130.

[11] Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Rasmussen, T.B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H.-P., Rygaard, J., Moser, C., Eberl, L. 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infections. Microbiology *151*, 3873-3880.

[12] Cavanagh, H., Wilkinson, J. 2002. Biological activities of lavender essential oil. Phytotherapy Research *16*, 301-308.

[13] Hammer, K.A., Carson, C., Riley, T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of applied microbiology *86*, 985-990.

[14] Choo, J., Rukayadi, Y., Hwang, J.K. 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. Letters in Applied Microbiology *42*, 637-641.

[15] Rashid, M.H., Kornberg, A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 4885-4890.

[16] Ohman, D., Cryz, S., Iglewski, B. 1980. Isolation and characterization of Pseudomonas aeruginosa PAO mutant that produces altered elastase. Journal of Bacteriology *142*, 836-842.

[17] Essar, D., Eberly, L., Crawford, I. 1990. Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent pseudomonads: DNA sequences and characterization of Pseudomonas putida trpE and trpGDC. Journal of bacteriology *172*, 867-883.

[18] Zhang, X.-S., García-Contreras, R., Wood, T.K. 2008. Escherichia coli transcription factor YncC (McbR) regulates colanic acid and biofilm formation by repressing expression of periplasmic protein YbiM (McbA). The ISME journal *2*, 615-631.

[19] Bosgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., Ugur, A., Ceylan, O. 2007. Inhibition of quorum sensing–regulated behaviors by Scorzonera sandrasica. Current microbiology *55*, 114-118.

[20] Khan, M.S.A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F.M., Ahmad, I. 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. Letters in applied microbiology *49*, 354-360.

[21] Salini, R., Sindhulakshmi, M., Poongothai, T., Pandian, S.K. 2015. Inhibition of quorum sensing mediated biofilm development and virulence in uropathogens by Hyptis suaveolens. Antonie van Leeuwenhoek *107*, 1095-1106.

[22] Szabó, M.Á., Varga, G.Z., Hohmann, J., Schelz, Z., Szegedi, E., Amaral, L., Molnár, J. 2010. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. Phytotherapy research *24*, 782-786.

[23] Zhu, H., Sun, S. 2008. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by Tremella fuciformis extract. Current microbiology *57*, 418-422.

[24] Zhu, H., Liu, W., Tian, B., Liu, H., Ning, S. 2011. Inhibition of quorum sensing in the opportunistic pathogenic bacterium Chromobacterium violaceum by an extract from fruiting bodies of lingzhi or reishi medicinal mushroom, Ganoderma lucidum (w. Curt.: Fr.) p. Karst.(higher basidiomycetes). International journal of medicinal mushrooms *13*.

[25] Hamood, A.N., Griswold, J., Colmer, J. 1996. Characterization of elastase-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Infection and immunity *64*, 3154-3160.

[26] Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. 1993. Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication. Science *260*, 1127-1130.

[27] De Kievit, T.R., Iglewski, B.H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infection and immunity *68*, 4839-4849.

[28] Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N. 2000. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of Pseudomonas aeruginosa. Microbes and infection *2*, 1721-1731.

[29] Anwar, H., Costerton, J. 1990. Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy *34*, 1666-1671.

[30] Moskowitz, S.M., Foster, J.M., Emerson, J., Burns, J.L. 2004. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis. Journal of clinical microbiology *42*, 1915-1922.