

Gül (*Rosa damascena* Mill.) Uçucu Yağının *Pseudomonas aeruginosa*'da Biyofilm Oluşumu ve Kayma Hareketi Üzerine Etkisi

Halime Çevikbaş , Seyhan Ulusoy  

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta

Geliş Tarihi (Received): 11.07.2023, Kabul Tarihi (Accepted): 23.12.2023

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): seyhanulusoy@sdu.edu.tr (S. Ulusoy)

☎ 0246 211 4068 📠 0246 211 4399

ÖZ

Pseudomonas aeruginosa, bağışıklığı baskılanmış hastalarda akut ve kronik enfeksiyonlara sebep olan Gram-negatif, fırsatçı bir patojendir. *P. aeruginosa*, virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşturma özelliklerini bir çeşit hücreler arası iletişim sistemi olan çevreyi algılama (Quorum sensing, QS) haberleşme sistemi ile kontrol eder. Bu haberleşme sisteminin farklı sentetik veya doğal moleküller ile engellenmesi veya yönlendirilmesiyle patojen bakterilerin kontrolünü konu alan çalışmalar yapılmaktadır. İçerdiği aktif moleküller sayesinde antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivitelere sahip olan bitkisel uçucu yağlar bu anlamda büyük potansiyel taşımaktadır. Bu çalışmada gül uçucu yağının, gül uçucu yağının temel bileşenlerinin (sitronellol, geraniol ve nerol) ve bu üç bileşenin karışımının (CGN) *Pseudomonas aeruginosa* PA01 suşu için hücrelerarası iletişim (QS) sistemi üzerine engelleyici etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda *P. aeruginosa* PA01 suşu için kayma hareketini; gül uçucu yağının %83, sitronellol, geraniol, nerol ve karışım CGN'nin, %61-75 oranında engellediği belirlenmiştir. *P. aeruginosa* PA01 suşu için biyofilm oluşumunu, gül uçucu yağı %54-68, sitronellol, geraniol, nerol ve karışım CGN %10-15 oranında baskılamıştır. Gül uçucu yağının *P. aeruginosa*'nın kayma hareketini ve biyofilm oluşumunu gül yağının temel bileşenlerinden daha yüksek oranda inhibe etmesi önemlidir. Bu çalışmanın sonuçları, sitronellol, nerol, geraniol ve CGN'nin *P. aeruginosa* suşu için anti-QS aktivitesine sahip olduğunu, ancak gül uçucu yağının çeşitli uygulamalarda kullanılabilecek potansiyelinin bulunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gül uçucu yağı, Biyofilm, *P. aeruginosa*, Kayma hareketi

Effect of Rose (*Rosa damascena* Mill) Essential Oil on Biofilm Formation and Swarming Motility on *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative, opportunistic pathogen that causes acute and chronic infections in immunocompromised patients. *P. aeruginosa* controls the production of virulence factors and biofilm formation properties with the Quorum sensing (QS) communication system, which is a kind of intercellular communication system. Studies have been carried out on the control of pathogenic bacteria by blocking or directing this communication system with different synthetic or natural molecules. Herbal essential oils, which have antibacterial, antifungal and antiviral activities because of their active molecules, have great potential in this sense. In this study, the inhibitory effects of rose essential oil, its major components (citronellol, geraniol, and nerol), and a combination of these three components (CGN) on the intercellular communication (QS) system of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 strain were investigated. As a result of the study, it was determined that rose essential oil inhibited the swarming motility for the *P. aeruginosa* PA01 strain by 83%, and the inhibition by citronellol, geraniol, nerol, and a mixture CGN was in the range of 61-75%. For *P. aeruginosa* PA01 strain, biofilm formation was suppressed by rose essential oil by 54-68%, citronellol, geraniol, nerol, and mixture CGN by 10-15%. It was important that rose essential oil inhibited the swarming motility and biofilm formation of *P. aeruginosa* at a higher rate than the essential components of rose oil.

The results of this study showed that citronellol, nerol, geraniol, and CGN had anti-QS activity for *P. aeruginosa* strain, but rose essential oil had a potential to be used in various applications.

Keywords: Rose essential oil, Biofilm, *P. aeruginosa*, Swarming motility

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, akut ve kronik solunum yolu enfeksiyonları, göz ve yanık yaraları gibi birçok enfeksiyona neden olan Gram-negatif fırsatçı bir patojen bakteridir [1-3]. *P. aeruginosa*, bu enfeksiyonlara oluşturmak için hareketlilik, çeşitli proteazlar ve toksinler gibi çok çeşitli virülans faktörlerini içeren donanımına sahiptir. Ayrıca dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı yüksek direnç seviyeleri nedeniyle *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu enfeksiyonlar en önemli sağlık sorunları arasında kabul edilmektedir [4-7].

P. aeruginosa'da virülans faktörlerinin üretilmesi, biyofilm oluşumu gibi özellikler QS iletişim sistemi tarafından düzenlenmektedir. *P. aeruginosa*'da bu sistemi oluşturan las, rhl, *Pseudomonas* kinolon sinyal (PQS) ve entegre QS (IQS) olmak üzere dört temel QS yolağı rapor edilmiştir [8-12]. Bu iletişim sistemi, *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu, piyosiyenin, elastaz ve ramnolipid üretimi ve virülans genlerinin ekspresyonunu düzenlemek için birbirine bağlıdır [13]. *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma yeteneği, geleneksel antibiyotiklere direnç sağlaması nedeniyle hastalar ve sağlık sektörü için ciddi bir sorun oluşturmaktadır. *P. aeruginosa*'nın sebep olduğu biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi oldukça zor ve maliyetlidir. Ayrıca bu enfeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sebep olmaktadır [14].

Son yıllarda, antibiyotik dirençli suşların ortaya çıkışını azaltmak için virülans faktörlerinin ve düzenleyici mekanizmaların (QS) hedeflenmesi, *Pseudomonas*'ın sebep olduğu enfeksiyonların kontrolü için umut verici yaklaşımlardan biridir [15, 16]. Doğada bitkisel uçucu yağlar antimikrobiyal özellikleri sayesinde bitkilerin korunmasında, önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli patojenlere karşı seçici toksisiteye sahip olmaları ve mikroorganizmalarda direnç gelişimini önleyen farklı etki mekanizmalarına sahip bileşenler içermesi, uçucu yağların dikkat çekici özelliklerindedir [17]. Ayrıca uçucu yağların QS sistemi üzerine etkilerini inceleyen araştırmalar mevcuttur [18-22].

Gül yağının, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antifungal, probiyotik, antipiretik etkiler, anti Human Immunodeficiency Virus (HIV), antiülser etkileri çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir [23-30]. Ancak gül yağının ve onun başlıca bileşenlerinin *P. aeruginosa* için biyofilm oluşumuna etkisi ilk defa bu çalışma ile araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bakteri Suşu, Ortam, Kültür Şartları ve Kimyasallar

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu (*P. aeruginosa* PAO1) kullanılmıştır. *P. aeruginosa* PAO1

suşunu geliştirmek için Luria-Bertani (LB) besin ortamı kullanılmış [31] ve 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Gül (*R. damascena*) uçucu yağı Sebat Ltd. Şti'den (Keçiborlu, Isparta) temin edilmiştir. Sitronellol, geraniol ve nerol, Sigma Aldrich'den (St. Louis, ABD) satın alınmış ve etanol ile çözülmüştür.

GC-MS Analizi

Gül uçucu yağının bileşen analizi Shimadzu QP5050 (Kyoto, Japonya) marka GC-MS ile Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Araştırma Uygulama Merkezinde yapılmıştır. Analiz Varian marka CP WAX 52 kapiler kolon (50m x 0,32 mm), taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 1 µL dir.

Antibakteriyel Etkilerin Araştırılması

Sitronellol, geraniol, nerol ve gül uçucu yağının farklı derişimlerinin anti-bakteriyel özellikleri, *P. aeruginosa* PAO1 suşları için agar difüzyon tekniği kullanılarak test edilmiştir [26].

Biyofilm Testi

Gül uçucu yağı, sitronellol, geraniol ve nerolün anti-biyofilm özellikleri, Zhang vd. [32] tarafından önerilen yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 1 mL LB sıvı besiyeri içeren plastik tüplere 0.5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklıkta ayarlanmış olan gecelik *P. aeruginosa* kültürü eklenmiştir. Ardından Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) seviyelerinin altındaki derişimlerde gül yağı %1, %0.5, %0.25 (h/h), sitronellol (2.25mM, 1.125mM, 0.5625 mM), geraniol (1.44mM, 0.72mM, 0.36mM), nerol (0.81mM, 0.405mM, 0.2025mM) ve bu bileşenlerin karışımı CGN ilave edilmiştir. Tüpler iki gün 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyerleri dökülerek her tüp saf su ile üç kez yıkanmış, kurutulmuştur. Biyofilm tabakası %0.1 kristal viyole ile 30 dakika boyanmıştır. Ardından kristal viyole dökülerek, tüpler üç kez saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra, tüplere 1 mL %95 etanol (hacim/hacim) ilave edilmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda absorpsans 570 nm'de ölçülmüştür. Her deney üç kez tekrar edilmiştir. % biyofilm inhibisyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Biyofilm İnhibisyonu} = 100 - \frac{\text{Örnek Absorpsans}}{\text{Kontrol Absorpsans}} \times 100$$

Kayma Hareketi Testi

Gül uçucu yağı, sitronellol, geraniol ve nerolün *P. aeruginosa* için kayma hareketine etkisi Rashid ve Kornberg'in [33] metoduna göre incelenmiştir. Bunun için %0.5 ve noble agar ve glikoz içeren besiyeri

hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerine sitronellol (2.25mM), geraniol (1.44mM), nerol (0.81mM), CGN ve %1 oranında gül uçucu yağı ilave edilmiştir. Sonrasında gecelik *P. aeruginosa* PAO1 kültürü, swarming agar petriyelerinin ortasına inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kayma hareketi, inokülasyon noktasından etrafa doğru hareket eden bakteri hücrelerinin oluşturduğu çaplar ölçülerek değerlendirilmiştir. Her deney üç kez tekrarlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler üçer tekrarlı yapılarak ortalamaları alınmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

GC-MS Analizi

GC-MS analiz sonuçlarına göre, *R. damascena* Mill. uçucu yağının %70'ini sitronellol (%35), geraniol (%22), nerol (%13)'ün oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Bu sonuçlara göre sitronellol, geraniol ve nerol sırasıyla %35, %22 ve %13 oranlarında karıştırılıp CGN hazırlanmıştır.

Tablo 1. Gül yağının GC-MS analiz sonuçları

Table 1. GC-MS analysis results of rose essential oil

Bileşen Adı	Gül Yağı (%)
Etanol	1.08
Linalool	0.5
Sitrenellol	35
Nerol	22
Geraniol	13
Fenil etil alkol	1
Nanodekan	13
Metil öjenol	1.33
Öjenol	0.82

Antibakteriyel Etki

Agar difüzyon yöntemi ile sitrenellol, geraniol, nerolün 100 mM- 6.25 mM ve gül uçucu yağının %20-%2.5 (hacim/hacim) derişimlerinde *P. aeruginosa* PAO1 suşu için antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Test edilen derişimlerde bu maddelerin *P. aeruginosa* PAO1 suşu için antibakteriyel etki göstermedikleri belirlenmiştir.

Biyofilm Oluşumu

P. aeruginosa'nın biyofilm hücrelerinin, antibiyotiklere ve biyositlere, planktonik hücrelere göre daha dirençli olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle bu bakteri ile enfekte olmuş hastaların tedavisi oldukça zor olmaktadır. Son

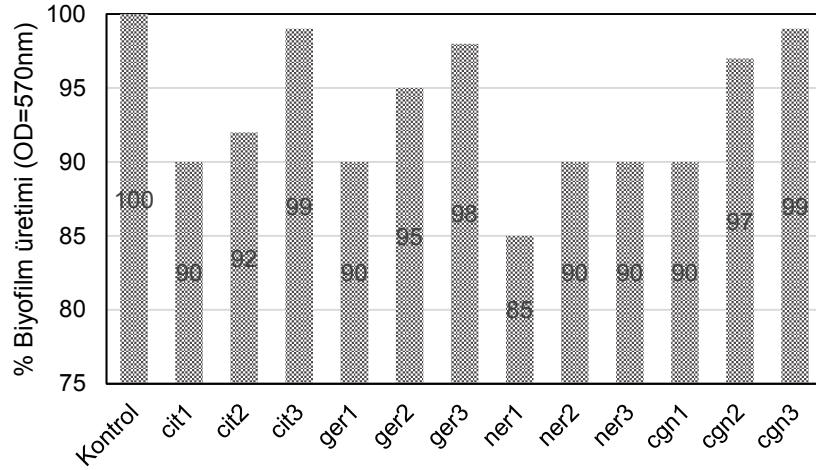
zamanlarda yapılan birçok çalışma, QS iletişim sisteminin inhibisyonunun, virülans faktörlerinin üretimini ve biyofilm oluşumunu doğrudan etkileyebileceğini tutarlı bir şekilde vurgulamaktadır. Bu nedenle, *P. aeruginosa*'da QS iletişim sisteminin baskılanmasının, virülans özellikleri kontrol etmenin potansiyel bir yolu olabileceği ve enfeksiyon hastalıklarının kontrolü ile biyofilm oluşumuna karşı yeni tedavi alternatiflerin keşfedilmesini sağlayabileceği düşünülmektedir [34, 35].

Bu çalışmada sitronellol, geraniol, nerol, CGN ve gül uçucu yağının *P. aeruginosa* PAO1 suşu için biyofilm oluşumuna etkisini değerlendirmek için statik biyofilm testi yapılmıştır. Sitronellol, geraniol, nerol ve CGN *P. aeruginosa* PAO1 için biyofilm oluşumunu önemli seviyede baskılamamıştır. Sitronellol (2.25mM), geraniol (1.44mM), nerol (0.81mM) ve CGN biyofilm oluşumunu sırasıyla %10, %10, %15, %10 oranlarında azaltmıştır (Şekil 1). Bununla birlikte, gül uçucu yağı, biyofilm oluşumunu %1, %0.5 ve %0.25 (hacim/hacim) derişimlerinde sırasıyla %68, %57 ve %54 oranında baskıladığı belirlenmiştir (Şekil 2). Sonuç olarak gül uçucu yağı yüksek antibiyofilm aktivitesine sahipken, onun temel bileşenleri sitronellol, geraniol, nerol ve bunların karışımı olan CGN'nin düşük antibiyofilm aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

Kayma Hareketi Analizi

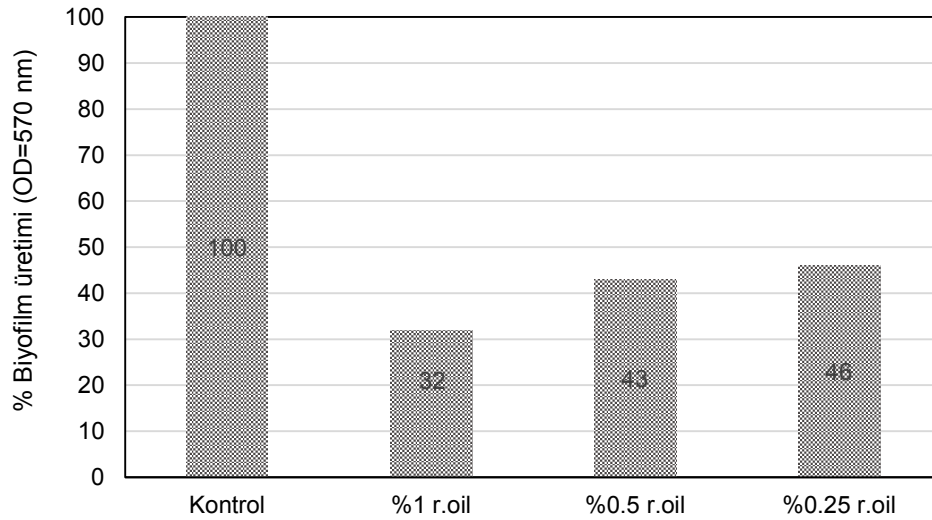
Kayma hareketi (swarming), *P. aeruginosa* ve bazı başka bakterilerde tanımlanan kamçıya bağlı yüzey hareketliliğinin bir şeklidir [36]. Bu hareket, bakterinin bir yüzeye tutunarak orada kolonize olmasını sağlamaktadır [37, 38]. Kayma hareket yeteneği bulunan patojenler, hızla değişen ortamlarda karşılaştıkları çeşitli zorluklara uyum sağlayabilmektedirler. Kayma hareketinin, bakterinin biyofilm oluşumu ve virülansında önemli rol oynadığı iyi bilinmektedir [39, 40]. Ayrıca, bu hareket yeteneğinin antibiyotik direnci ile de ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, kayma hareketini kontrol etmek, yeni anti-enfektif stratejilerin geliştirilmesi için büyük ilgi görmektedir [41, 42].

Bu çalışmada gül uçucu yağının, sitronellol, geraniol, nerol ve CGN karışımının *P. aeruginosa* PAO1suşu için kayma hareketine etkileri incelenmiştir. Gül uçucu yağı, %1 derişimde kayma hareketini %83 oranında engellemiştir. 2.25 mM sitronellol, 1.44 mM geraniol, 0.81 mM nerol ve CGN ise *P. aeruginosa* PAO1 suşunun kayma hareketini %61 ila %75 oranında inhibe etmiştir [Şekil 3, 4]. Sonuç olarak, gül uçucu yağının ana bileşenlerden daha yüksek oranda kayma hareketini engellediği belirlenmiştir.



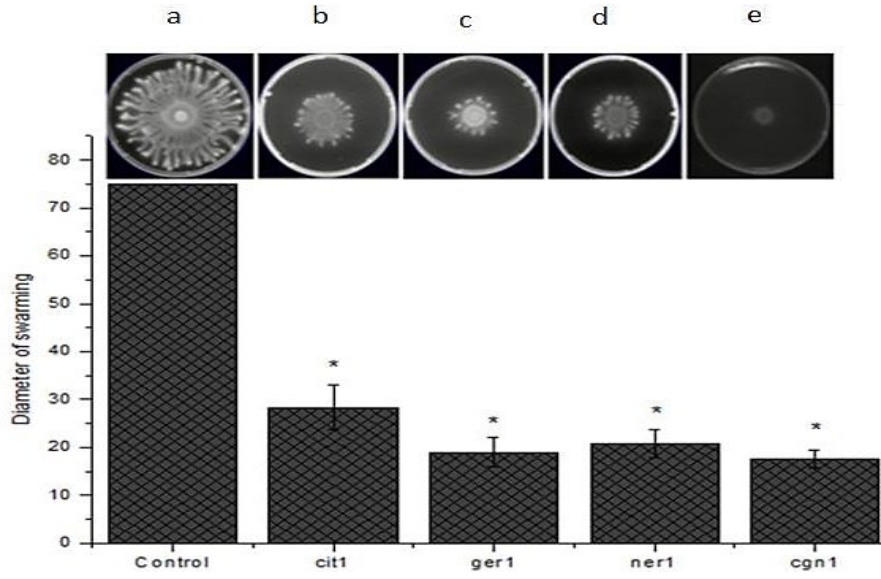
Şekil 1. Farklı derişimlerde sitronellol (cit 1: 2.25mM, cit 2: 1.125mM, cit 3: 0.5625mM), geraniol (ger 1:1.44mM, ger 2: 0.72mM, ger 3: 0.36mM), nerol (ner 1: 0.81mM, ner 2: 0.405mM, ner 3: 0.2025mM) and CGN'nin *P. aeruginosa* PAO1 üzerinde biyofilm oluşumuna etkileri. (Kontrol= Majör bileşen içermeyen *P. aeruginosa* PAO1 kültürü)Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır.

Figure 1. Effects of different concentrations of citronellol (cit 1: 2.25mM, cit 2: 1.125mM, cit 3: 0.5625mM), geraniol (ger 1:1.44mM, ger 2: 0.72mM, ger 3: 0.36mM), nerol (ner 1: 0.81 mM, ner 2: 0.405mM, ner 3: 0.2025mM) and CGN on biofilm formation on P. aeruginosa PAO1. (Control= P. aeruginosa PAO1 culture without major component) All experiments were repeated at least 3 times and averaged.



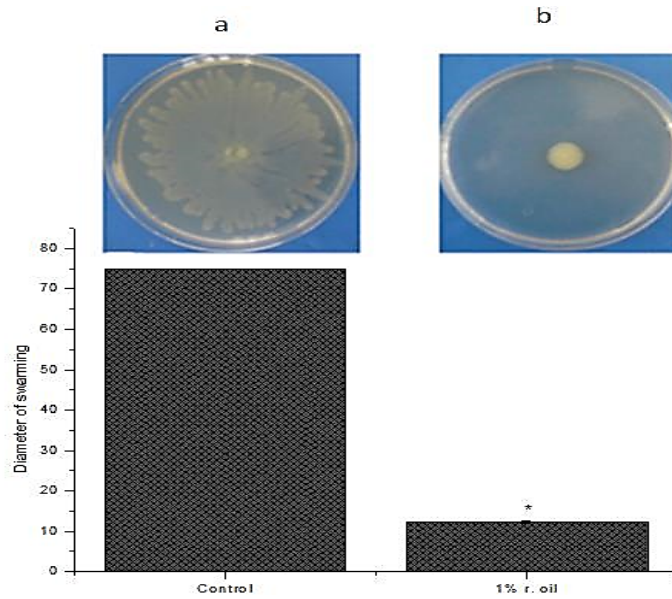
Şekil 2. Farklı derişimlerde *Rosa damascena* Mill. uçucu yağının (%1, %0.5, %0.25) *P. aeruginosa* PAO1 üzerinde biyofilm oluşumuna etkisi. (Kontrol= *Rosa damascena* uçucu yağı içermeyen *P. aeruginosa* PAO1 kültürü) Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır.

Figure 2. Effects of different concentrations of rose essential oil (1%, 0.5%, 0.25%) on biofilm formation on P. aeruginosa PAO1. (Control= P. aeruginosa PAO1 culture without rose essential oil) All experiments were repeated at least 3 times and averaged.



Şekil 3. Kayma hareketi testi. (a) Kontrol *P. aeruginosa* PA01 (Kontrol= Majör bileşen içermeyen *P. aeruginosa* PA01), (b) sitronellol (cit1: 2.25mM), (c) geraniol (ger1: 1.44mM), (d) nerol (ner1: 0.81mM), (e) CGN. Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlanmış ve one-way ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Asterix, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı verileri göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 3. Swarming motility test. (a) Control P. aeruginosa PA01 (Control P. aeruginosa PA01 culture without major component), (b) citronellol (cit1: 2.25mM), (c) geraniol (ger1: 1.44mM), (d) nerol (ner1: 0.81mM), (e) CGN. All experiments were repeated at least 3 times and their statistical significance was evaluated using one-way ANOVA. Asterix shows statistically significant data compared to control ($P<0.05$).



Şekil 4. Kayma hareketi testi. (a) Kontrol *P. aeruginosa* PA01 (Kontrol= Etken madde içermeyen *P. aeruginosa* PA01), (b) *Rosa damascena* Mill. uçucu yağı (%1). Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlanmış ve one-way ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Asterix, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı verileri göstermektedir ($P<0.05$).

Figure 4. Swarming motility test. (a) Control P. aeruginosa PA01 (Control P. aeruginosa PA01 culture without major component), (b) R. damascena Mill essential oil (1%). All experiments were repeated at least 3 times and their statistical significance was evaluated using one-way ANOVA. Asterix shows statistically significant data compared to control ($P<0.05$).

QS iletişim sistemi, *P. aeruginosa* dahil birçok Gram-negatif bakterinin çoklu ilaç direnci ve patogenezinde önemli rol oynayan düzenleyici sistem olarak kabul edilmektedir [43]. *P. aeruginosa*, bilinen antibakteriyel tedavileri sonuçsuz bırakan en tehlikeli patojen bakterilerden biridir [44]. Bu yüzden son zamanlarda, *P. aeruginosa*'nın da neden olduğu enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede yeni antibakteriyel stratejilerinin geliştirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Bu stratejilerden, mikroorganizma canlılığını veya büyümesini doğrudan etkilemeyen, dolayısıyla kullanılan ajana direnç geliştirmeyen ama patogenezi engelleyen sonuçlar beklenmektedir. Bu nedenle test edilen ajanların MIK seviyesinin altında kullanılması gerekmektedir [45].

Soković vd. [46] *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* gibi bazı uçucu yağların antibakteriyel etkilerini, yağ içerisinde oransal olarak çok bulunan mentol, timol, karvakrol gibi bileşenlerle ilişkilendirmişlerdir. Ancak bazı uçucu yağ örneklerinin antibakteriyel aktiviteleri ile bileşenlerin oranları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirtmişlerdir. Bu durumun uçucu yağ içerisindeki farklı bileşenlerin sinerjik etkisilerinden ve/veya düşük konsantrasyonlarda bile aktif olabilen diğer bileşenlerin varlığıyla açıklanabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışma sonucunda gül uçucu yağının hem kayma hareketini hem de biyofilm oluşumunu yağın başlıca bileşenlerinden daha çok baskıladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, *P. aeruginosa* PAO1 suşu için sitronellol, geraniol, nerol ve bu üç molekülün kombinasyonunun belirli seviyede kayma hareketi ve biyofilm oluşumunu azalttığı belirlense de, gül uçucu yağının kayma hareketi ve biyofilm oluşumunu önemli seviyede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

SONUÇ

Patojenik bakterilerin biyofilm oluşturma özellikleri, gıda endüstrisi ve insan/hayvan sağlığı için büyük bir sorun olarak kabul edilir. Bakteriyel biyofilm oluşumunu da düzenleyen QS iletişim mekanizmasının engellenmesi ve/veya bozulması, biyofilm oluşumunun önlenmesine ve biyofilm kaynaklı birçok sağlık sorununun çözümlenmesine yardımcı olabilir.

Bu çalışmada, gül uçucu yağının, saf etken maddelere göre daha etkili şekilde *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu ve kayma hareketini engellediği belirlenmiştir. Bu etkinin detaylarının ortaya konabilmesi için, gül uçucu yağ bileşenlerinin sinerji ve antagonizm özelliklerinin detaylı olarak araştırılması gereklidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2776-YL-11 No'lu Proje ile mali olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] Willcox, M.D. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens

wear: A review. *Optometry and Vision Science*, 84(4), 273-278.

- [2] Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 403-434.
- [3] Klockgether, J., Tummler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research*, 6, 1261.
- [4] Hilliam, Y., Kaye, S., Winstanley, C. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *Journal of Medical Microbiology*, 69(1), 3-13.
- [5] Aldawsari, M.F., Khafagy, E.S., Saqr, A.A., Alalaiwe, A., Abbas, H.A., Shaldam, M.A., Hegazy, W.A.H., Goda, R.M. (2021). Tackling virulence of *Pseudomonas aeruginosa* by the natural furanone sotolon. *Antibiotics*, 10(7), 871.
- [6] Hegazy, W.A.H., Khayat, M.T., Ibrahim, T.S., Nassar, M.S., Bakhrebah, M.A., Abdulaal, W.H., Alhakamy, N.A., Bendary, M.M. (2020). Repurposing anti-diabetic drugs to cripple quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms* 8(9), 1285.
- [7] Valentini, M., Gonzalez, D., Mavridou, D.A., Filloux, A. (2018). Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Opinion in Microbiology*, 41, 15-20.
- [8] Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., Iglewski, B.H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 179(10), 3127-3132.
- [9] Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Rahme, L.G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-homoserine lactones. *Molecular Microbiology*, 55(4), 998-1014.
- [10] Dubern, J.F., Diggie, S.P. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular Biosystems*, 4(9), 882-888.
- [11] Lee, J., Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41.
- [12] Rampioni, G., Falcone, M., Heeb, S., Frangipani, E., Fletcher, M.P., Dubern, J.F., Williams, P. (2016). Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, 12(11), e1006029.
- [13] 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(16), 8789-8793.
- [14] Tuon, F.F., Dantas, L.R., Suss, P.H., Tasca Ribeiro, V.S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A review. *Pathogens*, 11(3), 300.

- [15] Mühlen, S., Dersch, P. (2016). Anti-virulence strategies to target bacterial infections. *Curr Top Microbiol Immunol*, 398, 147-183.
- [16] Kamal, A.A., Maurer, C.K., Allegretta, G., Hauptenthal, J., Empting, M., Hartmann, R.W. (2018). Quorum sensing inhibitors as pathoblockers for *Pseudomonas aeruginosa* infections: a new concept in anti-infective drug discovery. *Antibacterials*, 2,185-210.
- [17] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- [18] Luciarci, M.C., Blázquez, M.A., Alberto, M.R., Cartagena, E., Arena, M.E. (2021). Lemon oils attenuate the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* by quorum sensing inhibition. *Molecules*, 26(10), 2863.
- [19] Sobieszczańska, N., Myszka, K., Szwengiel, A., Majcher, M., Grygier, A., Wolko, Ł. (2020). Tarragon essential oil as a source of bioactive compounds with anti-quorum sensing and anti-proteolytic activity against *Pseudomonas* spp. isolated from fish—in vitro, in silico and in situ approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 331, 108732.
- [20] Tomáš, N., Myszka, K., Wolko, Ł., Nuc, K., Szwengiel, A., Grygier, A., Majcher, M. (2021). Effect of black pepper essential oil on quorum sensing and efflux pump systems in the fish-borne spoiler *Pseudomonas psychrophila* KM02 identified by RNA-seq, RT-qPCR and molecular docking analyses. *Food Control*, 130, 108284.
- [21] Luciarci, M.C., Blázquez, M.A., Alberto, M.R., Cartagena, E., Arena, M.E. (2021). Lemon oils attenuate the pathogenicity of pseudomonas aeruginosa by quorum sensing inhibition. *Molecules*, 26(10), 2863.
- [22] D'Almeida, R.E., Sued, N., Arena, M.E. (2022). Citrus paradisi and *Citrus reticulata* essential oils interfere with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in vivo on *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine Plus*, 2(1), 100160.
- [23] Mahmood, N., Piacente, S., Pizza, C., Burke, A., Khan, A. I., Hay, A.J. (1996). The anti-HIV activity and mechanisms of action of pure compounds isolated from *rosa damascena*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 229(1), 73-79.
- [24] Aridoğan, B.C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Ozbaşar, D., Mumcu, E., (2002). Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of Pharmacal Resarch*, 25(6), 860-864.
- [25] Ozkan, G., Sağdıç, O., Baydar, H., (2004). Antioxidant and antibacterial activities of *Rosa damascena* flower extracts. *Food Science and Technology*, 10(4), 277- 281.
- [26] Ulusoy, S., Boşgelmez-Tınaz, G., Secilmiş-Canbay, H., (2009). Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties rose essential oil, hydrosol and absolute. *Current Microbiology*, 59, 554-558.
- [27] Abdel-Hameed, M., Bertrand, R.L., Piercey-Normore, M.D., Sorensen, J.L. (2016). Putative identification of the usnic acid biosynthetic gene cluster by de novo whole-genome sequencing of a lichen-forming fungus. *Fungal Biology*, 120(3), 306-316.
- [28] Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, Wu N. (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, 15(5), 3200-10.
- [29] Achuthan, C.R., Babu, B.H., Padikkala, J. (2003). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Rosa damascena*. *Pharmaceutical Biology*, 41(5), 357-361.
- [30] Kumar, N., Bhandari, P., Singh, B., Bari, S. S. (2009). Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 361-367.
- [31] Adonizio, A., Kong, K.F., Mathee, K. (2008). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 198-203.
- [32] Pereira, L.A.S., Oliveira, M.M.M.D., Martins, H.H.D.A., Vale, L.A.D., Isidoro, S.R., Botrel, D.A., Piccoli, R.H. (2019). Sanitizing cinnamaldehyde solutions against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22.
- [33] Mohammed, M.H., Farghaly, R.M., Abdel-Aziz, N.M. (2023). The effect of some essential oils against biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* of meat sources. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 6(1), 100-115.
- [34] 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(6), 615-631.
- [35] 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(9), 4885-4890.
- [36] Wagner, V.E., Li, L.L., Isabella, V.M., Iglewski, B.H. (2007). Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387(2), 469-479.
- [37] Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B. (2009). bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 48(1), 1-12.
- [38] Vijayakumar, K., Ramanathan, T. (2020). Musa acuminata and its bioactive metabolite 5-Hydroxymethylfurfural mitigates quorum sensing (las and rhl) mediated biofilm and virulence production of nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 246, 112242.

- [39] Casciaro, B., Lin, Q., Afonin, S., Loffredo, M.R., de Turris, V., Middel, V., Mangoni, M.L. (2019). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and expression of virulence genes by selective epimerization in the peptide Esculentin-1a (1-21) NH 2. *The FEBS Journal*, 286(19), 3874-3891.
- [40] Darzins, A. (1994). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, 11(1), 137-153.
- [41] Norizan, S., Yin, W.F. (2013). Chan, K.G., Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. *Sensors*, 13(4), 5117-5129.
- [42] Gupta, R.K., Setia, S., Harjai, K. (2011). Expression of quorum sensing and virulence factors are interlinked in *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro approach. *Am J Biomed Sci.*, 3(2), 116-125.
- [43] Zhang, Y., Kong, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao, W. (2018). Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity. *LWT*, 92,133-139.
- [44] Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 2008-2017.
- [45] Sivri, E.D., Ulusoy, S. (2018). Reduction of tissue maceration in potatoes by rose essential oil. *Akademik Gıda*, 16(2), 127-134.
- [46] Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P.D., Brkić, D., van Griensven, L.J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532-7546.
-