

**NOZOKOMİYAL VE TOPRAK İZOLATI *Acinetobacter*
TÜRLERİNİN QUORUM SENSİNG SİNYAL
MOLEKÜLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF THE QUORUM SENSING SIGNAL
MOLECULES OF NOSOCOMIAL AND SOIL ISOLATE
STRAINS OF *Acinetobacter spp.***

DEMET ERDÖNMEZ

Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

DEMET ERDÖNMEZ'in hazırladığı **NOZOKOMİYAL VE TOPRAK İZOLATI *Acinetobacter* TÜRLERİNİN QUORUM SENSİNG SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN BELİRLENMESİ** adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

(Prof. Dr., Nilüfer Cihangir)

.....

Başkan

(Prof. Dr., Nilüfer Aksöz)

.....

Danışman

(Prof. Dr., Necdet Sağlam)

.....

Üye

(Doç. Dr., Işıl Seyis Bilkay)

.....

Üye

(Yrd. Doç. Dr., Mesut Şam)

.....

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yenilikleri keşfedildikten sonra anlamak kolaydır; önemli olan onları keşfetmektir.

Galileo Galilei

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11 /08 /2014

DEMET ERDÖNMEZ

ÖZET

NOZOKOMİYAL VE TOPRAK İZOLATI *Acinetobacter* TÜRLERİNİN QUORUM SENSİNG SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN BELİRLENMESİ

DEMET ERDÖNMEZ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Eş Tez Danışmanı: Doç. Dr. Abbas TANER

Ağustos 2014, 112 Sayfa

Acinetobacter türleri, çeşitli enfeksiyonların nedeni olmasının yanında nozokomiyal fırsatçı patojen olarak karışımıza çıkmaktadırlar. Her ortama kolay adapte olmalarının sonucunda antibakteriyel ajanlara karşı *Acinetobacter* türlerinin giderek artan oranda direnç geliştirdiği görülmektedir. *Acinetobacter* türleri ayrıca biyofilm oluşturma yetenekleri ve çeşitli patojenite kriterleri ile de öne çıkmaktadırlar. Çevrelerine karşı geliştirdikleri bu özellikler quorum sensing olarak bilinen bakteriyel iletişim veya çevreyi algılama mekanizması ile düzenlenerek oluşmaktadır.

Bu çalışmada nozokomiyal etken olarak tanımlanan 50 *Acinetobacter* türü ile toprak gibi doğal ortamdan izole edilen 20 *Acinetobacter* türü arasında bakteriyel iletişim molekülü olarak bir farklılık olup olmadığı araştırıldı. Aynı zamanda antioksidan özellikleri ile bilinen “quercetin” ve “resveratrol” moleküllerinin quorum sensing mekanizması üzerindeki etkisi de incelendi. Nozokomiyal *Acinetobacter*

türlerinin izole edildiği klinik materyal ve servis bilgilerinin yansira hastalara ait cinsiyet özellikleri ile *Acinetobacter* türleri arasındaki dağılımları hesaplandı. Biyokimyasal testler sonucunda nozokomiyal olarak tanımlanan tüm türlerin *A. baumannii*, topraktan izole edilen türlerin ise *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus* ve *A. calcoaceticus* olduğu saptanmıştır. Fenotipik yöntemlerle tanımlamaları yapılan 70 *Acinetobacter* türünün biyosensör bakteriler olan *Chromobacterium violaceum* 026, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47, *Agrobacterium tumefaciens* NTL1 yardımıyla yapılan çapraz doğrulama ve ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre topraktan izole edilen türlerin 3-oxo-C8-AHL ve C8-AHL sinyal moleküllerini üretebildiği saptanmıştır. Klinik izolatların ise topraktan izole edilen türlerin ürettiği sinyal moleküllerinin yansira C10-AHL, C12-AHL, C14-AHL ve C16-AHL gibi uzun zincirli sinyal moleküllerini de üretebildikleri görülmüştür.

Bakteriyel iletişim molekülü üreten *Acinetobacter* izolatlarının quorum sensing sistemi tarafından düzenlenen biyofilm oluşturma yeteneklerinin ve demir kazanımında önemli rolü olan siderofor yapma yeteneklerinin olduğu görülmüştür. Antioksidan özelliklerinden dolayı seçilen quercetin ve resveratrol'ün yapılan çalışmalarla bakteriyel iletişim sistemini inhibe edebildikleri saptanmıştır. Quercetin ve resveratrol'ün bu anti-quorum sensing yolu ile oluşan inhibisyon yetenekleri *Acinetobacter* türlerinin oluşturduğu antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirilen direnci de önleyebilecekleri görüşüne varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter spp.*, Quorum sensing, Quercetin, Resveratrol, Anti-quorum sensing, İnce Tabaka Kromatografisi, *Chromobacterium violaceum* 026, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47, *Agrobacterium tumefaciens* NTL1

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE QUORUM SENSING SIGNAL MOLECULES OF NOSOCOMIAL AND SOIL ISOLATE STRAINS OF *Acinetobacter spp.*

DEMET ERDÖNMEZ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. ABBAS TANER

AUGUST 2014, 112 pages

In addition to causing various infections, *Acinetobacter* species are described as nosocomial pathogens. These species are increasingly developing resistance against antibacterial agents due to their capability to adapt to any environment. *Acinetobacter* species are also prominent their biofilm forming ability and various pathogenicity criteria. *Acinetobacter* species develops these capabilities against their environment by quorum sensing mechanism which is a bacterial communication or ambient sensing mechanism.

In this study, to detect the differences in bacterial communication molecules of 50 nosocomial and 20 soil isolated *Acinetobacter spp.* In addition, the effect of "quercetin" and "resveratrol" molecules on quorum sensing mechanism is also investigated. These molecules are known to have antioxidant properties.

Distribution of nosocomial *Acinetobacter* species according to their isolation material and services along with patients' gender are also analyzed during this study. According to the biochemical tests, although all nosocomial isolated were identified as *A. baumannii*, the soil isolates belonged to *A. baumannii*, *A. haemolyticus* or *A. calcoaceticus* species. 70 *Acinetobacter* species which were classified by phenotypic methods, were compared with the biosensor bacteria, *Chromobacterium violaceum* 026, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 and *Agrobacterium tumefaciens* NTL1 by cross validation and thin layer chromatography for their ability to produce signal molecules. As result of this study it was determined that, while soil isolates can produce 3-oxo-C8-AHL and C8-AHL, clinical isolates in addition can also produce long chained signalling molecules such as C10-AHL, C12-AHL, C14-AHL and C16-AHL.

As other results of this study it can be stated that; *Acinetobacter* isolates that produce bacterial signalling molecules have the ability to form biofilms which is regulated by quorum sensing system. Also these isolates can produce siderophores which play an important role in iron absorption. Along with these findings, it was detected that antioxidant molecules like quercetin and resveratrol, can inhibit the bacterial communication system. By this quorum sensing inhibition process it can be suggested that quercetin and resveratrol can prevent the resistance formed by *Acinetobacter* species against antimicrobial agents.

Keywords: *Acinetobacter* spp., Quorum sensing, Quercetin, Resveratrol, Anti-quorum sensing, Thin Layer Chromatography, *Chromobacterium violaceum* 026, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47, *Agrobacterium tumefaciens* NTL1

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel katkılarıyla bana yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e,

Tez çalışmam süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım eş danışmanım sayın Doç. Dr. Abbas TANER'e

Akademik hayata girmemde önemli bir yere sahip olan, tez çalışmam süresince bilgi ve bilimsel görüşlerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim değerli hocam sayın Prof. Dr. Necdet SAĞLAM'a,

Tez çalışmamda laboratuvarını bana açan bilgi, tecrübe ve çalışma disiplini ile örnek aldığım sayın Dr. Daniel López'e, Almanya'da desteklerini esirgemeyen ve bilimsel dünya görüşleriyle örnek aldığım Dr. Gudrun Koch ve Dr. Anna YEPES'e, arkadaşlıkları ve dostluklarıyla Juan Carlos GARCÍA-BETANCUR, İsa WESTEDT ve Benjamin MIELİCH'e,

Tez çalışmamda görüş ve önerilerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e

Ailemden biri gibi olan ve her zaman desteğini esirgemeyen canım oda arkadaşım Araş. Gör. Kübra ERKAN'a,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, desteklerini hiç üstümden eksik etmeyen canım annem Hava ERDÖNMEZ ve canım babam Ramazan ERDÖNMEZ'e, kardeşim olmasından her zaman gururlandığım canım abim Devrim ERDÖNMEZ ve eşi Dilek ERDÖNMEZ'e, ailemize katılmasıyla hayatımızı renklendiren canım yeğenim Uygur ERDÖNMEZ'e,

Dostluklarını benimle paylaştıkları ve manevi desteklerini esirgemedikleri için canım arkadaşlarım Dr. Solmaz Mosayyebi ve Araş. Gör. Betül Zehra KARAGÜL'e

Her zaman yanımda oldukları, hiç bir zaman esirgemedikleri sevgileri, dostlukları ve destekleri için hayatımdaki yerleri ayrı olan Ahu SOYLU, Sebahat TEKCAN DÜĞENCİ, Özgecan ERDEM, ve Araş.Gör.Y. Doruk ARACAGÖK'e,

Öğrenim sürem boyunca katıldığım tüm etkinlikleri destekleyen H.Ü. ÖYP Koordinatörlüğü'ne,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Acinetobacter</i> Türlerin Genel Özellikleri	2
2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe	2
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	4
2.1.3. Patogenez ve Virülans Faktörleri	5
2.1.4. <i>Acinetobacter</i> 'in Virülasında Etkili Olan Faktörler	5
2.1.5. Epidemiyoloji	6
2.2. <i>Acinetobacter</i> 'lerde Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	7
2.2.1. <i>Acinetobacter</i> 'lerde Biyofilm Oluşumu	9
2.2.2. <i>Acinetobacter</i> 'lerde Demir Kazanım Mekanizmaları	11
2.3. <i>Acinetobacter</i> Türlerinin Hastane Enfeksiyonları ile İlişkisi	12

2.4. Bakterilerin Dili "Quorum Sensing"	13
2.4.1. Quorum Sensing İletişim Sistemini Kullanan Mikroorganizmalar	18
2.4.2. Quorum Sensing Moleküllerinin Tespitinde Kullanılan Biyosensör Bakteriler	19
2.4.2.1. Quorum Sensing Biyosensörü Olarak <i>Chromobacterium violaceum</i> (CV026).....	19
2.4.2.1.1. <i>C. violaceum</i> 'un Viyolasin Pigmentinin Sentezi	22
2.4.2.2. Quorum sensing biyosensörü olarak <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL1, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> WCF47	23
2.4.3. Bakteriyel İletişim Sisteminin Moleküler Mekanizması	23
2.4.3.1. Açıl Homoserin Lakton (LuxI/LuxR) Tipi QS İletişimi	24
2.4.3.2. Otoindükleyici-2 Tipi QS İletişimi	26
2.4.3.3. Otoindükleyici Peptidler	26
2.5. Bakteriyel İletişim Sisteminin Engellenmesi	27
2.5.1. Çevreyi Algılama Molekülünün Üretiminin Önlenmesi	27
2.5.2. N-Açıl Homoserin Lakton Sinyal Molekülünün Yıkılması veya İnhibisyonu	27
2.5.3. N-Açıl Homoserin Lakton Sinyal Molekülünün Alınımının Önlenmesi	28
2.5.4. Bakteriyel İletişim Sisteminin Engelleyicileri	29
2.6. Sinyal Molekülünün Tespitinde Kullanılan Yöntemler	31
2.6.1. Kromatografik Yöntemler	31
2.6.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi	32
2.7. Bitki Ekstraktlarının Anti-Quorum Sensing Aktivite Çalışmaları	33
3. MATERYAL VE METOD	35

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar	35
3.2. Quorum Sensing Sinyal Molekülleri	36
3.3. Toprak örneklerinden <i>Acinetobacter</i> türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonları	38
3.4. Bakterilerin Tanımlanması	38
3.4.1. Gram Boyama	39
3.4.2. Endo Agar ve MacConkey Agar Besiyerinde Üremenin Değerlendirilmesi .	39
3.4.3. Leeds <i>Acinetobacter</i> Besiyeri ve Kromojenik <i>Acinetobacter</i> Agar Besiyerinde Üremenin Değerlendirilmesi	39
3.4.4. Oksidaz Varlığının Araştırılması	39
3.4.5. Katalaz Varlığının Saptanması	39
3.4.6. Triple Sugar Iron Besiyerinde Üretim	40
3.4.7. Dnaz Aktivitesinin Belirlenmesi	40
3.4.8. 44 ⁰ C'de Üreme	40
3.5. <i>Acinetobacter</i> Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi	40
3.6. <i>Acinetobacter</i> Suşlarının Hastane Servislerine Göre Dağılım Oranlarının Hesaplanması	41
3.7. N-açil Homoserin Laktonun <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarında Tespiti	41
3.7.1. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarının <i>Chromobacterium violaceum</i> 026 Mutant Suşu ile N-Açil Homoserin Laktonun Tespiti	41
3.7.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 (pCF218)(pCF372) , <i>A. tumefaciens</i> WCF (pCF218)(pCF372) ve <i>A. tumefaciens</i> NTL1 (pZLR4) Mutant Suşları İle N-Açil Homoserin Laktonun Tespiti	42

3.8. Bakteri Üreme Eğrisinin Türbidometrik Yöntemle Belirlenmesi	44
3.8.1. N-Açıl Homoserin Laktonun <i>Acinetobacter spp.</i> Kültür Ortamından Ekstraksiyonu	44
3.8.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Açıl-Homoserin Lakton Sinyal Moleküllerinin Ayrımı	44
3.9. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarında Quorum Sensing Mekanizması İle Düzenlenen Biyofilm Oluşturma Yetenekleri Ve Siderofor Üretiminin Tespiti	45
3.9.1. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespiti	45
3.9.2. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarının Siderofor Üretiminin Tespiti	46
3.10. Antioksidan Özelliğe Sahip Quercetin Ve Resveratrol Molekülünün Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi	47
3.10.1. Anti-Quorum Sensing Disk Difüzyon ve Agar Difüzyon Testi	47
3.10.2. Quercetin Ve Resveratrol'ün Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi	47
3.10.2.1. Viyolasin Pigment İzolasyonu	48
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	49
4.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	49
4.2. Nozokomiyal ve Topraktan İzole Edilen <i>Acinetobacter</i> Suşlarının Tanısı	49
4.3. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarının <i>Chromobacterium violaceum</i> 026 Mutant Suşu Kullanılarak Çapraz Doğrma Metodu İle N-Açıl Homoserin Laktonun Üretimlerinin Saptanması	61
4.4. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarının <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL1, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> WCF47 Biyosensör Suşları Kullanılarak Çapraz Doğrma Metodu İle N-Açıl Homoserin Lakton Üretimlerinin Saptanması	62

4.5. <i>Acinetobacter</i> Türlerinin Üreme Eğrisinin Türbidometrik Yöntemle Belirlenmesi	67
4.6. <i>Acinetobacter</i> Türlerinden N-Açıl Homoserin Laktonun Ekstraksiyonu ve İnce Tabaka Kromatografisi'nde Moleküllerin Ayrımı	68
4.7. <i>Acinetobacter spp.</i> İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yetenekleri ve Siderofor Üretiminin Tespiti	76
4.8. Quercetin Molekülünün Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi	83
4.9. Resveratrol Molekülünün Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi ...	86
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	106
EKLER	109

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ l: mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrad Derece

gr: gram

ml: mililitre

mM: milimolar

M: Molar

mm: milimetre

L: Litre

LB: Luria Bertani

TSB: Tryptic Soy Broth

TSI: Triple Sugar Iron

AHL ve HSL: Açil- Homoserin Lakton

DMSO: Dimetilsulfoksit

CAS: Chrome azurol S

QS: Quorum sensing

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. LB agar besiyerinde üremiş <i>Acinetobacter spp.</i>	4
Şekil 2. 2. Biyofilm oluşum mekanizması	11
Şekil 2. 3. Bakteriyel iletişim mekanizması ile ortaya çıkan biyolojik mekanizmalar ve uygulamaları	14
Şekil 2. 4. Bakteriyel iletişim “Quorum sensing”	15
Şekil 2. 5. Petri üzerinde ve sıvı besiyerinde ışık üreten <i>Vibrio fischeri</i> kolonileri	15
Şekil 2. 6. Bakteriyel iletişim molekülü 3-oxo-C6-Homoserin lakton	16
Şekil 2. 7. <i>Vibrio fischeri</i> (LuxI/LuxR) Bakterisinde Biyoışımın Şematik İfadesi.....	17
Şekil 2. 8. Bazı Gram negatif bakterilerin kullandığı bakteriyel iletişim molekülleri	18
Şekil 2. 9. <i>Chromobacterium violaceum</i> 12472'nin ürettiği viyolasin pigmenti	22
Şekil 2. 10. Viyolasin biyosentezi	23
Şekil 2. 11. Yüksek bakteri yoğunluğunda AHL miktarı eşik değere ulaşır ve AHL-LuxR kompleksi meydana gelir. Hemen ardından antibiyotik üretimi, virülans faktörleri, pigment üretimi gibi özellikler düzenlenir	25
Şekil 2. 12. Biyoışım reaksiyonları	26
Şekil 2. 13. N-açil homoserin lakton üretiminin engellenme mekanizması	27
Şekil 2. 14. N-açil homoserin laktonun enzimlerle ve bazı inhibitörlerle engellenmesi.....	28
Şekil 2. 15. N-açil homoserin laktonun diğer bakteriler tarafından alınmasının engellenmesi	29
Şekil 2. 16. Bitki ve fungal kaynaklardan elde edilen bazı quorum sensing inhibitörleri	30
Şekil 2. 17. N-açil homoserin lakton tespitinde en sık kullanılan yöntemler ve belirteçleri	31
Şekil 2. 18. Kromatografi Çeşitleri	32

Şekil 2. 19. Quercetin molekülünün kimyasal yapısı	34
Şekil 2. 20. Antioksidan özelliği olan resveratrolün moleküler yapısı	34
Şekil 3. 1. DNaz agar testi (A; DNaz negatif, B; DNaz pozitif)	40
Şekil 3. 2. Çapraz doğrulama testinin uygulanışı.....	42
Şekil 3. 3. a) <i>C.violaceum</i> 12472 b) <i>C.violaceum</i> 31532 c) <i>C.violaceum</i> 026.....	42
Şekil 3. 4. .(a) <i>A. tumefaciens</i> A136 , (b) <i>P. aeruginosa</i> PA01, (c) C4-C8 AHL molekülü doğrulama testi için pozitif kontrol <i>P. aeruginosa</i> PA01 suşu <i>A. tumefaciens</i> A136 biyosensör suşu ile yanyana inoküle edilerek kullanıldı.....	43
Şekil 3. 5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> türlerinin çapraz doğrulama için uygulanışı.....	43
Şekil 3. 6. CAS agar besiyerinde siderofor üretimi	46
Şekil 4. 1. Nozokomiyal etken olarak tanımlanan <i>Acinetobacter</i> türlerinin izolasyon kaynakları	49
Şekil 4. 2. <i>Acinetobacter spp.</i> 'nin ışık mikroskobu x100 objektif altındaki görüntüsü, B. Endo Agar'da üreme sonucu ve C. MacConkey Agar'da üreme sonucu (Laktoz negatif sonuç).....	50
Şekil 4. 3. Kromojenik <i>Acinetobacter</i> Seçici Besiyeri (a) ve Leeds <i>Acinetobacter</i> Seçici Besiyeri (b)'nde üreyen koloniler	50
Şekil 4. 4. Oksidaz Testi (a; Oksidaz negatif, b; Oksidaz pozitif) , Katalaz testi (c;Katalaz pozitif, d; Katalaz negatif).....	51
Şekil 4. 5. TSI agar besiyerinde üreme (Negatif Sonuç).....	52
Şekil 4. 6. Nozokomiyal etken olarak tanımlanan <i>Acinetobacter</i> 'lerin hasta cinsiyetlerine göre dağılımı.....	60
Şekil 4. 7. <i>Chromobacterium violaceum</i> 026 ile çapraz doğrulama sonuçları	62
Şekil 4. 8. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL1, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> WCF47 suşları ile çapraz doğrulama ile sinyal tespiti.....	63
Şekil 4. 9. Bakterilerin Ortalama Üreme Eğrisi	68

Şekil 4. 10. A1 ve T1 izolatlarından ekstrakte edilen sinyal moleküllerinin <i>A. tumefaciens</i> A136 suşu ile kontrolü.....	68
Şekil 4. 11. İnce tabaka kromatografisi ile sinyal moleküllerinin ayrılması	69
Şekil 4. 12. 24 kuyucuklu polistren plaklarda biyofilm oluşumu	77
Şekil 4. 13. Nozokomiyal <i>Acinetobacter</i> 'lerde biyofilm oluşumu	78
Şekil 4. 14. Toprak Kaynaklı <i>Acinetobacter</i> 'lerde Biyofilm Oluşumu.....	80
Şekil 4. 15. C6-HSL türü iletişim molekülünün bakterilerin biyofilm yetenekleri üzerine etkisi	81
Şekil 4. 16. CAS agar üzerinde izolatların siderofor üretimi.....	82
Şekil 4. 17. Quercetin'in disk difüzyon testi	83
Şekil 4. 18. Quercetin'in Disk Difüzyon Testi Sonuçları	84
Şekil 4. 19. Quercetin'in Agar Difüzyon Testi Sonuçları	84
Şekil 4. 20. Ortamdaki viyolasin pigmenti üzerine farklı konsantrasyonlardaki quercetin'in etkisi	85
Şekil 4. 21. Resveratrol'ün disk difüzyon testi sonucu.....	86
Şekil 4. 22. Resveratrol'ün Agar Difüzyon Testi Sonuçları	87
Şekil 4. 23. Resveratrol'ün Disk Difüzyon Testi Sonuçları	87
Şekil 4. 24. Ortamdaki viyolasin pigmenti üzerine farklı konsantrasyonlardaki resveratrol'ün etkisi.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1. <i>Acinetobacter</i> cinsinin taksonomisi	3
Çizelge 2. 2. <i>Acinetobacter</i> 'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmaları	8
Çizelge 2. 3. N-açil homoserin lakton (AHL) biyosensör suşları	20
Çizelge 3. 1. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler	35
Çizelge 3. 2. Kullanılan Bakteri Suşları, Özellikleri ve Kaynakları	36
Çizelge 3. 3. Çalışmada Standart Olarak Kullanılan Quorum Sensing Sinyal Molekülleri	37
Çizelge 3. 4. Quercetin'in ve Resveratrol'ün Uygulama Tablosu	48
Çizelge 4. 1. Nozokomiyal <i>Acinetobacter</i> izolatlarının toplu test sonuçları.....	53
Çizelge 4. 2. Toprakta izole edilen <i>Acinetobacter</i> izolatlarının toplu test sonuçları	56
Çizelge 4. 3. Nozokomiyal <i>Acinetobacter spp</i> 'lerin klinik özellikleri	58
Çizelge 4. 4. Klinik servislerden gönderilen <i>Acinetobacter</i> örneklerinin dağılımları.....	60
Çizelge 4. 5. <i>Acinetobacter</i> örneklerinin gönderildiği klinik servisler ve gönderilen örnek sayıları ile <i>Acinetobacter</i> örneklerinin gönderildiği klinik servislere göre örneklerin yüzdesi	61
Çizelge 4. 6. Nozokomiyal <i>Acinetobacter</i> suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü.....	70
Çizelge 4. 7. Toprakta izole edilen <i>Acinetobacter</i> suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü.....	73

1. GİRİŞ

Enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler geçtiğimiz yüzyılın önemli buluşlarından biri olarak dikkat çekmektedir. Enfeksiyon etmenlerine karşı elde edilen bu başarı son yıllarda yaygın ve uygunsuz antibiyotik kullanımı sonucunda mikroorganizmaların antimikrobiallere direnç kazanmaları neticesinde gölgelenmiş ve bu durum halk sağlığını tehdit eder boyutlarda bir sorunun ortaya çıkmasına yol açmıştır. Mikroorganizmalar duyarlı oldukları antibiyotiklere karşı farklı mekanizmalar ile direnç kazanmakta ve patojenitede etkin olmaktadır. Mikroorganizmalar arasında kullanılan quorum sensing sistemi olarak adlandırılan çevreyi algılama veya çoğunluğu algılama ya da diğer bir ifadeyle bakteriyel iletişim sistemi, antimikrobiyal tedavide umut vadeden ve konağa zararın minimum düzeyde olduğu bir sistem olarak dikkatleri çekmektedir. Kısaca ifade etmek gerekirse, “quorum sensing” adıyla bilinen iletişim sistemi, aynı ortam içindeki türlerin popülasyonundaki artış doğrultusunda, türlerin bu artışı algılaması ve bunun sonucunda tüm bireylerin koordineli biçimde özel genlerin ekspresyonunu düzenlemesi gibi davranış değişikliklerini göstermesi olarak tanımlanabilmektedir[1-5] . Quorum sensing sistemi ilk defa Gram negatif bakterilerde saptanmasına rağmen Gram pozitif bakteriler ve bazı funguslarda da kullanılan bir mikrobiyal iletişim sistemidir [6-8] . Bu iletişim sisteminin aydınlatılması ve enfeksiyonda etkin moleküllerin saptanması, enfeksiyonların tedavisini kolaylaştıracaktır. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından yapılan araştırmalara göre, hemen hemen tüm bakteri türlerinde gözlenen antibiyotik direncinin en yüksek olduğu ülkeler arasında Türkiye'nin ilk sıralarda yer aldığı görülmektedir [9] . Antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin en yaygın olduğu ortamlar hastanelerdir. Hastane enfeksiyonu, başka sağlık problemleri ile ilgili bir nedenle hastaneye gelen bir hastada ortaya çıkan enfeksiyon olarak ifade edilir. Ertek'e göre hastane enfeksiyonları genellikle hasta hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra ve taburcu olduktan sonra 10 gün içinde gelişmektedir [10] . Hastane enfeksiyonları hastanede yatış süresini uzatmakta, hastada önemli sağlık sorunlarına sebep olmakla birlikte, tedavi masraflarının artışı ile kayıplara ve tedavi sürecinin uzaması ile kimi zaman tedavinin olumsuz sonuçlanmasına da yol açmaktadır. Hastane enfeksiyonu etkenleri arasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter spp.*

ve *Serratia spp.* gibi Gram negatif türler ilk sıraları almaktadır [11] . Bu mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı görülen çoklu direnç giderek artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan ve geniş bir alanı kapsayan bazı çalışmaların sonuçlarına göre, *Acinetobacter* gibi yoğun bakım ünitelerinden sıklıkla izole edilen bakterilerde, antibiyotiklere karşı direnç gelişimi gözlenmekte ve alternatif tedavi oldukça kısıtlı olmaktadır. Çoklu direnç gelişiminin en önemli nedeni olarak plasmid veya transpozonların aktarılması sayılmaktadır, fakat son yıllar da yapılan çalışmalar Gram negatif bakterilerde antibiyotiklere karşı dirence yol açan kromozomal mekanizmaların olduğunu da ortaya koymaktadır. Nitekim *Acinetobacter*'in klinik örneklerden izole edilen türleri ile çevreden izole edilen türleri arasında antibiyotik direnci bakımından farklılık olduğu gözlenmektedir. Bu farklılığın sebepleri arasında bakteriyel iletişim sistemi de vardır. Bu bağlamda bakteriyel iletişim sisteminin farklı biçimlerde inhibisyonunun antibakteriyel etki gösterebileceğine dair gözlem ve kanıtlar mevcuttur [12,13] . Bu çalışmamızda, çeşitli kliniklerdeki hastane enfeksiyonu görülen hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının kullandıkları quorum sensing sinyal moleküllerini tespit etmek, aynı zamanda doğadan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının ürettiği sinyal molekülleri ile karşılaştırmak, enfeksiyonda etkin olan sinyal moleküllerinin neler olduğunu araştırmak ve antioksidan özelliğe sahip Quercetin ve Resveratrol moleküllerinin N-açil homoserin lakton sinyal molekülleri üzerindeki etkinliğinin saptanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. *Acinetobacter* Türlerinin Genel Özellikleri

2.1.1. Taksonomi ve Tarihçe

İlk kez 1911 yılında Beijerinck tarafından topraktan izole edilen *Acinetobacter* türleri *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılmış, daha sonra 1939 yılında DeBord tarafından da üretral akıntidan izole edilip tanımlanmıştır [14] . *Acinetobacter* tanımı yunanca hareketsiz anlamına gelen “akinetos” kelimesinden köken almıştır. *Acinetobacter* türleri 1954 yılında Brison ve Prevot tarafından Gram negatif, pigmentsiz, hareketsiz, sporsuz, nonfermentatif, kapsüllü, zorunlu aerobik kokobasiller olarak tanımlanmıştır [15] . Vücut sıvılarında ve katı besiyerinde daha

çok diplokok şeklinde bulunmaları, bu bakterilerin *Neisseriae*'lar ile karıştırılmasına sebep olmaktadır. Bu iki tür arasında önemli bir fark vardır. *Acinetobacter* türleri oksidaz oluşturmazken, *Neisseriae*'lar oluşturmaktadır. Ayrıca *Acinetobacter* türleri anaerob koşullarda üreyememesi ve nitrat redüksiyonunun negatif olması gibi özellikleri ile *Enterobacteriaceae* ailesinden de ayrılmaktadırlar. Bu bakterilerin günümüze kadar birçok isimle anılması, teşhis ve tedavinin yanlış yapılmasına sebep olmuştur. Bu isimler *Micrococcus calcoaceticus*, *Herellea vaginicola*, *Moraxella lwoffii*, *Mima polymorpha*, *B. Anitratum*, *Achromobacter*, *Moraxella glucidolytica* ve *Alcaligenes*'dir. Gram negatif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif olarak tanımlanan mikroorganizmaların tamamı *Acinetobacter* cinsi altında sınıflandırılmıştır. Gram negatif kokobasiller arasında oksidaz negatif olarak dikkat çeken tür *Acinetobacter*'lerdir [16,17] . Taksonomik olarak 1971 yılından itibaren Moraxellaceae familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.1).

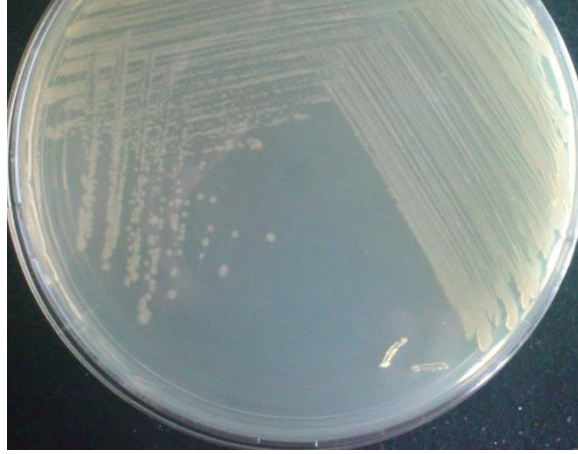
Çizelge 2.1. *Acinetobacter* cinsinin taksonomisi [191]

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gamma Proteobacteria
Takım:	Pseudomonadales
Familya:	Moraxellaceae
Cins:	<i>Acinetobacter</i>

Acinetobacter cinsinin günümüze kadar DNA dizi analizleri yapılarak, benzerlikleri saptanan 32 genomik türü tanımlanmıştır. *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. Junii*, *A. johnsoni*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens* olmak üzere 7 genomik türe isimler verilmiş, fakat diğer türler isimlendirilmemiştir [18] . *Acinetobacter*'lerin ayrıca sakkarolitik ve asakkarolitik olarak iki farklı grupta incelendiği de görülmüştür. Hastanelerden izole edilen *Acinetobacter* türleri genellikle *A.calcoaceticus* – *A.baumannii* kompleksi adı altında incelenmektedir[18] .

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Doğada toprak, gıda maddeleri, su gibi ortamlarda yaygın bulunan *Acinetobacter* türleri, cansız yüzeylerde günlerce canlı kalarak hastane enfeksiyonlarının önemli bir kaynağını oluştururlar [19] . Bu bakteriler üremek için herhangi bir üreme faktörüne ihtiyaç duymazlar. Oksidaz negatif ve katalaz pozitif olup, Mac Conkey ve Endo agar besiyerinde laktoz negatif S tipi koloniler oluşturan Gram negatif bakteriler olarak tanımlanırlar ve genel olarak 30-35°C'de ürerler [26] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. LB agar besiyerinde üremiş *Acinetobacter spp.*

Üç şekerli demirli besiyeri (TSI) ve oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluşturmazlar, yani non-fermentatifler. Topraktan sıklıkla izole edilen türü *A. calcoaceticus*' tur [19] . Hastane kökenli enfeksiyonların yaklaşık olarak %80'inden sorumlu olan, klinik örneklerden en sık izole edilen glukozu oksitleyen ve hemoliz yapamayan türü *A. baumannii*'dir. *A. baumannii*'nin 44°C'de üremesi bu bakterinin diğer türlerden ayrılmasını sağlar [20] . Glukozu okside edemeyen *A. Iwoffii* ve hemoliz yapabilen *A. haemolyticus* klinik örneklerden izole edilen diğer türleridir. *A. johnsonii*, 37°C'de üreyememesi ile diğer tüm türlerden farklı bir özellik göstermektedir [14] . Bu bakterilerin klinik örneklerden izolasyonunu kolaylaştıracak seçici-ayırıcı besiyerleri geliştirilmiş olup bu amaçla en sık Herellea agar; Leeds *Acinetobacter* Medium veya Kromojenik *Acinetobacter* agar besiyeri kullanılmaktadır.

2.1.3. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Acinetobacter cinsi bakterilerin bağışıklık sistemi kuvvetli olan bireylerde virülans potansiyellerinin düşük olmasına bağlı olarak enfeksiyon oluşturma riski düşüktür. Bu bağlamda fırsatçı patojen olarak hastane enfeksiyonlarında sık görülen bir etmendir. Bu bakterilerin kapsüllü olmaları, kuru ortamlarda aylarca canlı kalabilmeleri ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal etki gösteren peptit veya protein gibi moleküller üretmeleri, cansız ortamlardaki yaşam sürelerini artırabilen önemli faktörlerdendir. *Acinetobacter* hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit tabakanın insan için endotoksijenik potansiyeli hakkında yeterli bilgiye rastlanılmamıştır.

2.1.4. *Acinetobacter*'in Virülansında Etkin Olan Faktörler

a) Polisakkarit kapsül: Bakteri yüzeyinin hidrofilik olmasını ve fagositozdan korunmasını sağlayan; L-ramnoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-glukuronik asitten oluşan bu yapı, aynı zamanda selektif IgA eksikliği görülen bireylerde tekrarlayan enfeksiyonların görülmesine sebep olabilir. Damar içi kateter veya trakeal kanül gibi yüzeylerde bu bakterinin tutunması kolaylaşır.

b) Fimbria ve/veya kapsüler polisakkarit: İnsan epitel hücrelerine bağlanmayı sağlayan yapılardır.

c) Lipopolisakkarit ve Lipid A: Bakteri hücre duvarındaki bu maddeler patojenitede etkin yer alır.

d) Lipazlar: Fosfolipaz D ve C'nin insan serumunda bakterinin çoğalmasını ve epitel hücre invazyonunda önemli olduğu gösterilmiştir

d) Aerobaktin ve siderofor : Bakterinin canlı bünyesinde çoğalabilmesi için gerekli olan demir, demir tutucu dış membran reseptör proteinlerinin üretimi ile sağlanmaktadır. Bu özellik önemli virülans etmenlerindedir.

Virülansta etkin olan özellikler yukarıda sayılanlarla sınırlı değildir. Yapılan son çalışmalara göre bazı genetik özellikler de virülansta etkindir. Örneğin; antibiyotik direncine sebep olan PER-1 geninin virülansı arttırdığı ve klinik olarak morbiditesi ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlarda rol oynadığı saptanmıştır [21-24] .

2.1.5. Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri, dünyada gelişmişlik düzeyine bakılmaksızın salgınlara neden olan fırsatçı patojen olarak dikkat çekmektedir. Çoğunlukla yaralarda kolonize olan bu türler, solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olarak; hastane gibi kapalı ortamlarda kapı kolu, hasta yatağı, hasta çarşafı, ventilatör aleti ve tuvaletlerden yayılım sağlamaktadır[25] .

Kuruluğa, farklı sıcaklık ve pH değişimlerine dayanıklı olmaları, *Acinetobacter* türlerinin diğer enfeksiyon etkenlerine göre cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmelerini sağlamaktadır. Nitekim; *Acinetobacter* cinsi bakteriler, canlılıklarının devamı için çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme yeteneğine sahip olmaları sebebiyle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilirler [26] .

Bazı çalışmalara göre; donmuş yiyecek ve pastörize sütlerden de izole edilen *Acinetobacter* cinsi bakterilerin cam gibi yüzeylerde de kolayca tutunabildiği ve buralardan da yayılım gösterdiği saptanmıştır [27] .

Sağlıklı bireylerin %25'inin derisinde yer alan ve normal deri florasından sayılan *Acinetobacter*'ler, özellikle koltuk altı ve kasık gibi nemli bölgelerde bulunmaktadır [26] . *Acinetobacter* türlerinin hastane personelinin %15-33'ünün ellerinde kolonize olduğu, bu kökenleri hastalara ve ekipmanlara aktardıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [28] . Hastane ortamında bulunmayan ve tedavi görmeyen bireylerde bu etkenin görülme sıklığı oldukça düşüktür. Deri ile sınırlı olmayan bulaş yolları arasında ağız boşluğu ve solunum yolları da sayılmaktadır. Salgın dönemlerinde, yatarak tedavi gören hastalarda *Acinetobacter* türlerini bulundurma oranları yüksek olup %7-18 boğaz taşıyıcılığı ön plandadır [29] . Yaygın olarak görüldükleri hastane ortamları arasında yoğun bakım üniteleri (YBÜ) öne çıkmaktadır. Ülkemizde yoğun bakım ünitelerinde yapılan ve bir çok merkezden alınan verilerin bir araya gelmesi ile oluşturulan bir çalışmada *Acinetobacter* cinsi bakterilerin, nozokomiyal enfeksiyonların etkeni olan Gram negatif bakteriler arasında üçüncü sırada olduğu belirlenmiş ve antibiyotik direncinin arttığı belirtilmiştir [30] . Yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan alınan dışkı örneklerinde çoklu ilaç direnci görülen *Acinetobacter* türleri izole edilmiştir. Son yıllarda, ılıman iklimlerde giderek yaygınlaşan enfeksiyonların ana etkeni olarak

öne çıkan *Acinetobacter* türleri dünya genelinde ortak bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir [20,31-33] .

Amerika ve Avrupa'daki birçok hastanede, nozokomiyal patojenler arasında *A. baumannii* öne çıkmaktadır. Brooklyn'de tıp merkezlerindeki mikrobiyoloji laboratuvarlarında tanımlanan tüm patojen Gram negatif türlerin yaklaşık %10'u *A. baumannii*'dir [34] .

Türkiye'de yapılan bir çalışmada *A. baumannii*, hastane kökenli pnömoni etkenleri arasında %24'lük bir oran ile ilk sırada yer almıştır. Bu olguların önemli bir kısmının ventilatörle ilişkili pnömoni olduğu dikkati çekmektedir [25] .

Acinetobacter türlerinde görülen antibiyotik direnci çağımızın önemli bir sorunu olarak belirtilmektedir. Özellikle çoklu ilaç direnci görülen *A. baumannii*, tedavisi zor bir bakteri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç dünyanın tüm coğrafik bölgelerinde ortaya çıkabilen ancak tıp merkezlerine göre farklılık gösteren, hatta tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklere karşı da değişebilen bir olgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2. *Acinetobacter*'lerde Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Acinetobacter türleri geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanımının sonucunda, tedavide halen kullanılan antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirmiştir. Bu durum sadece *Acinetobacter* türleri ile sınırlı değildir, fakat her ortamda rahatça üreyebilmeleri ve hastanelerdeki kolonizasyonu sebebiyle *Acinetobacter* türlerindeki bu direnç gelişimi dikkatleri çekmektedir. Geniş spektrumlu bir betalaktam antibiyotik grubu olan karbapenemlere direnç gelişmesi *Acinetobacter* enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamış, dirençli olan *Acinetobacter* türlerinin tedavisinin gelecekte çok zor olacağı düşüncesini doğurmuştur [35,36] . Nozokomiyal enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan çoğul dirençli *Acinetobacter*'lerin yoğun bakım ünitelerindeki enfeksiyonlarının tedavisinde büyük problemler yaşanmaktadır. 1970'lerden bu yana kullanılan birçok antibiyotik bu bakteriler üzerindeki etkinliğini yitirmiştir. Bu bakterilerin günümüzde kullanılan aminoglikozid, üreidopenisilinler, aminopenisilinler, sefamisinler, geniş ve dar spektrumlu sefalosporinler, kloramfenikol ve tetrasiklin

gibi birçok antibiyotiğe yüksek oranda direnç gösterdikleri saptanmıştır [37] . Bu durum, enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmakta, hatta ölümlere sebep olmaktadır. Hasta enfeksiyonlarından yaygın olarak izole edilen *A. baumannii* ampisilin, amoksisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere gösterdiği doğal direncin yanında YBÜ'deki mortalitenin %19-25'inden sorumludur [25] .

Acinetobacter'ler genomlarındaki lokalize transpozon adı verilen diziler yardımıyla direnç genlerini aktarabilirler. Ayrıca *Acinetobacter*'lerde çok sayıda ve çeşitli moleküler büyüklükte plasmidlerin bulunduğu bildirilmiştir. Bu özellikte bakterilerin direnç genlerini birbirlerine aktarmalarını sağlamaktadır [38] .

Acinetobacter'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmalarının bazıları Çizelge 2.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 2. *Acinetobacter*'lerde bulunan antibiyotik direnç mekanizmaları [26]

ANTİBİYOTİKLER	MEKANİZMA
Beta laktamlar	Beta laktamaz (plazmid ve/veya kromozom kökenli) Penetrasyonun azalması Hedef molekülde değişiklik
Aminoglikozidler	Enzim ile modifikasyon İçeri alınmanın azalması
Florokinolonlar	Hedef molekülde değişiklik Penetrasyonun azalması, aktif dışarı atım

Tedavide yaygın kullanılan ve güçlü bir antibiyotik grubu olan Karbapenemlerin *Acinetobacter* türleri üzerindeki etkinliği giderek azalmaktadır. Karbapenemlere gösterilen direncin bir nedeni de bu bakterilerin gösterdiği beta laktamaz aktivitesidir. Karbapenemazlar olarak da ifade edilen Meropenem veya İmipenemi hidrolize edebilen bu metabolik ürünler kromozomal veya plasmidler aracılığı ile üretilmektedir. Aktif bölgelerinde taşıdıkları metal iyonları nedeniyle metallo beta laktamazlar adını alan bu maddeler çoğunlukla IMP ve VIM türü enzimler olarak tanımlanmaktadır [39] . Karbapenem grubu antibiyotiklerin bir çoğu beta laktamazlar tarafından hidrolize edilemezler, fakat *Acinetobacter spp*'lerin sahip olduğu plazmidlerce kodlanan sınıf B beta laktamazlar içinde sayılan metallo beta

laktamazlar, karbapenem ve yeni kuşak sefalosporinleri hidrolize ederek etkinliklerini kısıtlamakta ve dolayısıyla bu bakterilerin direnç oranları giderek artmaktadır. Bu enzimler plasmidler tarafından kodlandığı için türler arasında aktarım da kolaylaşır ve bu antibiyotiklere karşı direnç göstermelerine sebep olur. *Acinetobacter* türlerinin sahip olduğu betalaktamazlar genetik olarak farklı bölgelerin ürünleri olarak ortaya çıkar. Örneğin, sefalosporinlerin hidrolizini sağlayan ACE1-4 iken, penisilinleri etkileyen TEM-1, TEM-2 ve CARB-5 beta laktamazlarıdır [40,41] .

Karbapenemleri hidrolize eden plazmid kaynaklı, ilk beta laktamaz ARI-1 (*Acinetobacter* rezistant imipenem) 1985 yılında İskoçya'da tanımlanmıştır. OXA-23 adı verilen bu enzim imipenemi de hidrolize etmekte ancak ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere etki etmemektedir. İlerleyen yıllarda birçok OXA tipi enzimler saptanmış; OXA-23, OXA-27, OXA-40, OXA-51, OXA-58 olarak tanımlanan ve plazmidlerce kodlanan bu enzimler, sınıf D karbapenemazlar arasında sayılmaktadır [40] .

Acinetobacter spp.'lerin tamamında aynı direnç profilleri gözlenmemekle beraber *A. baumannii* kökenlerinde beta laktam direnci daha sık ortaya çıkmaktadır. Beta laktam türü antibiyotiklere karşı gelişen direnç çeşitli mekanizmalar ile ortaya çıkmaktadır. Bunlar;

- 1- Beta laktamaz enzimleriyle antibiyotiğin parçalanması,
- 2- Beta laktam antibiyotiğin hücre içine girişinin engellenmesi,
- 3- Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişikliklerin oluşması,

Genellikle bu mekanizmaların bir arada işlemesi sonucu direnç gelişimi gözlenmektedir.

2.2.1. *Acinetobacter*'lerde Biyofilm Oluşumu

Birçok bakteri canlı veya cansız yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Sahip oldukları bu yetenek patojenlerin antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immün yanıtından kaçmasına olanak sağlar [16] . *Acinetobacter spp.* için biyofilm oluşumu önceleri önemsenmemiş, fakat sebep oldukları enfeksiyonların artması ve bakteriyel direnç gelişimi dikkate alındığında önemi artmıştır [42] . Genel

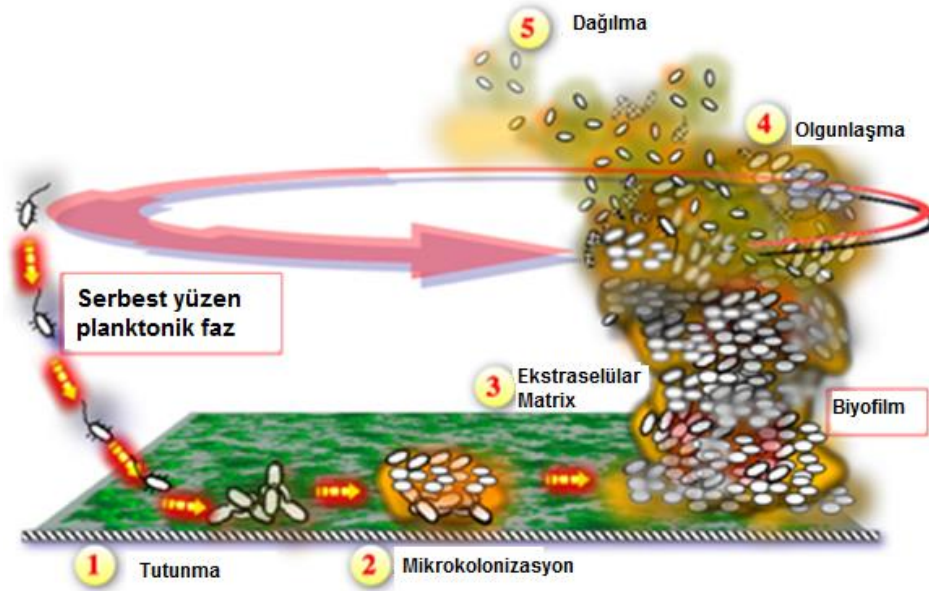
olarak bakterilerin biyofilm oluşturmaları için ilk basamak, canlı veya cansız yüzeye flagella hareketi ile ulaşabilmesidir. Ancak *Acinetobacter* türleri hareketsizdir. *Acinetobacter*'lerdeki biyofilm oluşumunun mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı hipotezlere göre *Acinetobacter*'lerde cansız veya canlı ortamlarda tip-IV pilinin sebep olduğu hareket ile biyofilm oluşmaktadır, fakat henüz bu durum ispatlanamamıştır [43,44] .

Acinetobacter'lerde görülen biyofilm oluşumu sadece cam ve polistren plaklar gibi abiyotik ortamlarda değil, çeşitli canlı hücreleri gibi biyotik ortamlarda da görülebilmektedir [45] . *Acinetobacter spp*'de pililerin biraraya gelmesi ile biyofilm adezyon proteini ortamda birikerek cansız yüzeylere tutunması sağlanır. Bu sürecin arkasından biyofilm oluşumu süreklilik kazanır ve gitgide olgunlaşır. Klinik izolatların yüzeylere adezyonu ve bazı biyofilm oluşturma yeteneklerinin çoklu antibiyotik direnci ile ilişkili olduğu, bu izolatlarda biyofilm oluşumuna paralel diğer membran proteinlerinin üretiminde de bir artış olduğu bilinmektedir [42] . Hastane enfeksiyonlarına neden olan çoklu ilaç direncine sahip *A.baumannii* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin canlı bünyesinde iken epitel hücrelere tutunması ile doğru orantılı olduğu saptanmıştır [46] . Aynı zamanda bu suşlarda, biyofilm oluşumunda önemi saptanan PER-1 beta laktamaz geninin bulunduğu, biyotik ortamlara bakterinin daha kolay tutunabildiği belirtilmektedir [46,47] . Tedavide sıklıkla kullanılan aminoglikozidlerin biyofilm üreten *A.baumannii*'nin kolonizasyonunu ve sebep olduğu enfeksiyon riskini artırdığı gösterilmiştir [47] .

Biyofilm oluşumunda bakteri yoğunluğunun algılanmasıyla başlayan süreç, ortamda çeşitli moleküllerin ve katyonların birikmesi ile hız kazanıp, farklı besinlerin varlığıyla katman halinde yoğunlaşır. Ekstraselüler olarak ortama verilen tersiyer bir yapı içerisinde bakterileri çevreleyen ekstraselüler bir matrix içinde karbonhidratlar, nükleik asitler, proteinler gibi biyolojik faaliyetler için önemli bileşenler yer alır. Bu matriks içine bakteriler tarafından bazı sinyaller salınır. *Acinetobacter*'lerde ekstraselüler sinyallerin bazıları, BfmRS gibi iki bileşenli düzenleyici sistemler tarafından algılanabilir (şekil 2.2.).

Bu transkripsiyonel düzenleyici sistem, hücreye yapışma ve polistren yüzeyde biyofilm oluşumu için gerekli olan pililerin üretiminden sorumlu şaperon sisteminin ekspresyonunu aktifleştirmektedir. Aynı zamanda BfmRS sistemi kültür ortamında

hücre morfolojisini de kontrol eder. *A. baumannii* 19606 suşu polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumunda CsuA / BABCDE şaperon-usher salgılama sistemi tarafından üretilen hücresel pili başlatıcı rol oynar. Daha önce bahsedildiği gibi salgılanma, BfmRS sistemi tarafından düzenlenir [24] .



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum mekanizması [192]

A. baumannii'nin cansız yüzeylerde biyofilm oluşturmada, hareketli bir bakteri olmamasına rağmen sahip olduğu çeşitli mekanizmalar ile düzenlenen pililerin Tip-1 pililer olduğu araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir [48] . *Acinetobacter* türlerinin oluşturduğu biyofilm fenotipleri, nozokomiyal etken olduğu bilinen ve biyofilm oluşturma yeteneği aydınlatılmış olan *Escherichia coli* ile benzerdir [49] . *Acinetobacter* türlerinde görülen biyofilm oluşturma yeteneğinde pili oluşum sistemleri ve ekstraselüler salgılanan OmpA proteinin önemi büyüktür [24,42] .

2.2.2. *Acinetobacter*'lerde Demir Kazanım Mekanizmaları

Bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların gelişiminde demir önemli bir element olarak karşımıza çıkar. Çoğu zaman bakteri demir için konakla yarışmak zorundadır. Üreme ortamlarında laktoferrin ve transferrin gibi demir bağlayan proteinlerde bolca bulunan demir, bakteri üremesi sırasında bazen ortamda serbest halde bulunmayabilir. Demir, temel hücresel fonksiyonları kodlayan genlerin ekspresyonu ile ilişkilidir. Bunun için mikroorganizmalar demiri sağlamak

adına duyarlılığı yüksek demir kazanım sistemlerini aktive etmek için farklı mekanizmalar geliştirmişlerdir [43] . Bu aktivasyon sonucunda elde edilen sideroforlar, bakteriye sadece demir kazanımı değil konakta hücre harabiyetine neden olarak virülansında ek bir özellik kazandırmaktadır [50] . *Acinetobacter* türleri sideroforları en yaygın kullanan türlerden biridir. Sahip oldukları demir kazanım sistemiyle farklı demir kaynaklarını kullanarak, konağın bünyesinde kolonize olmayı başarırlar [51] . İlk kez *A. baumannii* 19606 suşunda tanımlanmış olan asinetobaktin (acinetobactin) ve hemin kazanım mekanizmasının ekspresyonu da siderofor aracılı demir kazanım sistemi ile sağlanmaktadır [52] . Sideroforlar, antibiyotik direncindeki atılım pompası benzeri bir mekanizma ile hücre dışına salınmaktadırlar. *Acinetobacter* türlerinde demir kazanımında önemli olan asinetobaktin ile ilişkili 18 açık okuma bölgesi (ORF) içeren bir bölgenin bakterinin kromozomunda yer aldığı gösterilmiştir. Bu bölgede tanımlanan 12ülf ve *barB* siderofor salınımından sorumluyken, *bauA* asinetobaktin transportundan, *basD* ise asinetobaktin biyosentezinden sorumlu olmaktadır. *Acinetobacter* türlerinin demir ihtiyacını gidermedeki başarıları tüm yüzey ve ortamlarda kolayca üremelerine ve oralarda kolonize olmalarına sebep olmaktadır [52] .

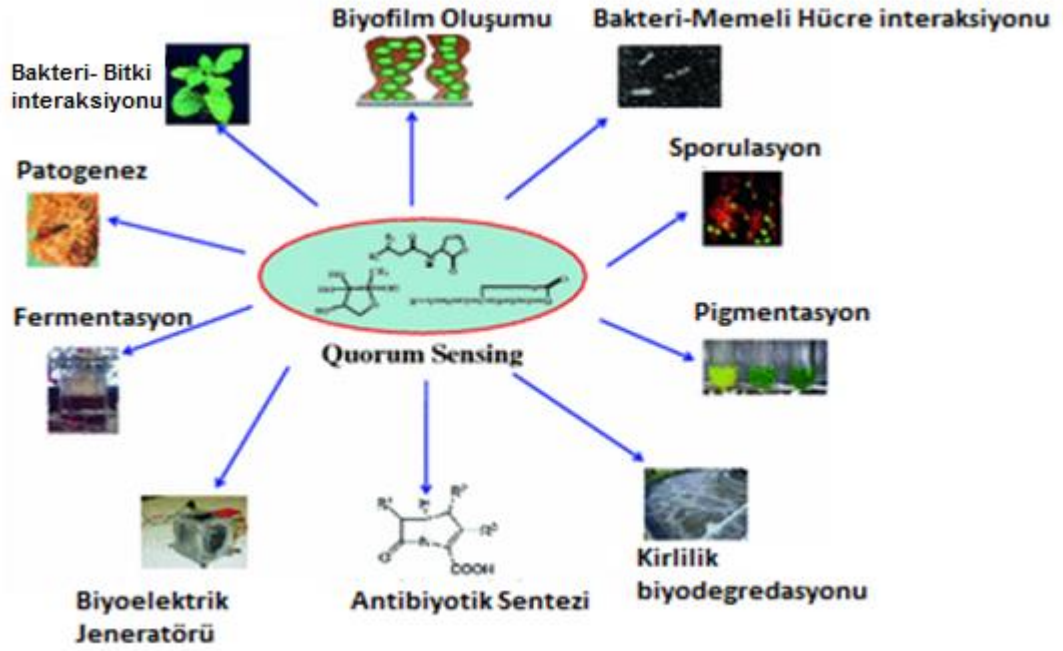
2.3. *Acinetobacter* Türlerinin Hastane Enfeksiyonları ile İlişkisi

Enfeksiyon gelişimi gözlenen hastaların, hastanede kaldığı süreçte veya sonrasında meydana gelen veya hastanelerde gelişmesine rağmen taburcu olduktan sonra ortaya çıkan enfeksiyonlar hastane enfeksiyonları olarak tanımlanmaktadır. Hastane ortamındaki kontaminasyon ve enfeksiyon kaynaklarının yoğunluğu *Acinetobacter* türleri ile meydana gelen salgınların kontrolünü güçleştirmektedir. Enfeksiyon kontrolünde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, *Acinetobacter* türlerinin yayılmasına neden olmaktadır. Bu uygulamanın sonucunda hastane ortamlarında dirençli *Acinetobacter* türleri gelişmektedir. *Acinetobacter* suşlarında gözlenen artan direnç gelişimi özellikle hastanede yatan hastalar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle *Acinetobacter* enfeksiyonlarının engellenmesinde kontrollü antibiyotik kullanımının önemi büyüktür. Hastane ortamlarında gelişen salgınlar, bu suşların çevredeki kalıcılığı nedeniyle; tıbbi cihaz ve malzemelerin özensiz kullanımı ve hasta takip ve tedavisi sırasında hava yoluyla veya hastaya temas sonucu oluşmaktadır.

Acinetobacter türleri hastane çevresine kolayca adapte olabilmeleri sebebiyle, önemi gittikçe artan nozokomiyal patojenlerdir.

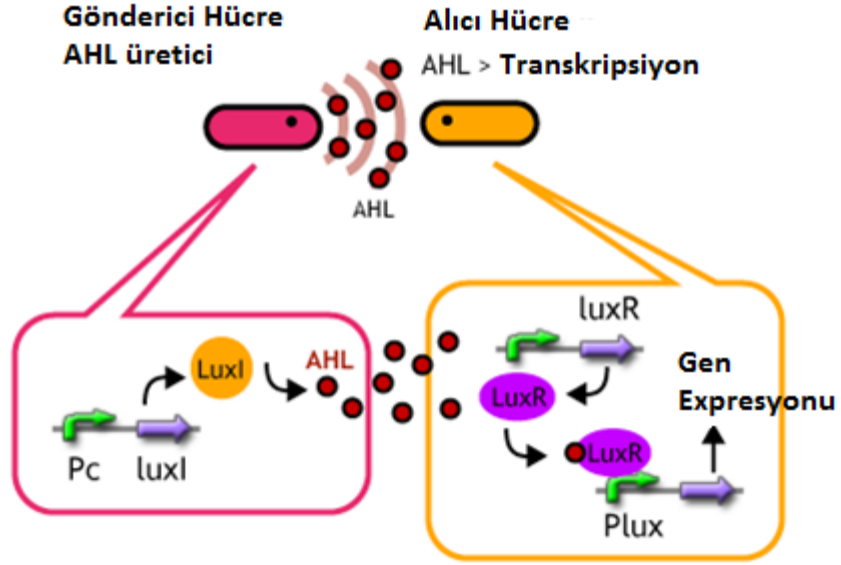
2.4. Bakterilerin Dili “Quorum sensing”

Bakteriler de yüksek organizmalar gibi çevreleriyle ve birbirleriyle sürekli iletişim kurabilen sosyal canlılardır. Memeli bir organizmada heyecan ve korku durumunda çevresinde olup biten olaylara karşı bir tepki olarak adrenalin hormonu salgılanması artar, kan damarları genişler, acı hissi azalır. Göz bebeklerinin büyümesiyle göze alınan ışık artar, daha net ve hızlı görüş sağlanır. Kompleks canlılar olmadıklarından bu gibi harekete ve görselliğe dayalı davranışları bakterilerde gözlemleyemeyiz, fakat bu canlılar da mikro çevrelerinde meydana gelen besin azlığı, antibiyotik varlığı, pH değişimi, osmolarite gibi farklılıklara uyum sağlayabilirler. Bu uyum sağlamada ürettikleri ve ortama salgıladıkları küçük iletişim (sinyal) molekülleri ile popülasyon yoğunluğunu algılayarak, davranışlarını bu yoğunluğa bağlı olarak düzenlemeleri büyük önem taşımaktadır [53] . Bakteriler, bakteri hücrelerinin metabolik etkinlikleri sonucu sentez edilmekte olan iletişim moleküllerini difüzyon ile ortama salgılamakla kalmayıp popülasyondaki iletişim moleküllerinin konsantrasyonunu da algılayabilirler. Sözü edilen bu olay, “Quorum Sensing” veya çevreyi algılama ya da bakteriyel iletişim olarak ifade edilmektedir. Quorum sensing; tek bir mikroorganizmanın ortama sinyal molekülünü bırakması ve bu molekülün popülasyon tarafından algılanmasıyla, gen ekspresyonunun, bütün bir popülasyonun gen ekspresyonu dikkate alınarak koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizması olarak açıklanmaktadır [4,54] . Yüksek canlılarda görülen seslerin veya sözcüklerin yerini bakterilerde iletişim molekülleri almıştır. İletişim molekülleri, üretildikleri hücrelerin ve diğer hücrelerin metabolizmalarında yarattıkları düzenlemeler nedeniyle otoindükleyici veya otouyarıcı olarak da anılmaktadır[55-57] . Bakterilerin iletişimi için birden fazla kimyasal sinyal molekülü vardır ve bu moleküller hem tür içinde hem de türler arasında iletişimi sağlayarak mikro çevredeki değişimlerden kaynaklanan etkinin yaratılmasında görev almaktadır [58] . Bakterilerde iletişim mekanizmasının bir göstergesi olarak virülans faktörlerinin gen ekspresyonu, antibiyotik üretimi, biyofilm oluşumu, spor oluşumu, pigment üretimi, kayma hareketi, simbiyozis, yüzme hareketi ve biyoışım gibi birçok olay örnek verilebilir (Şekil 2.3).



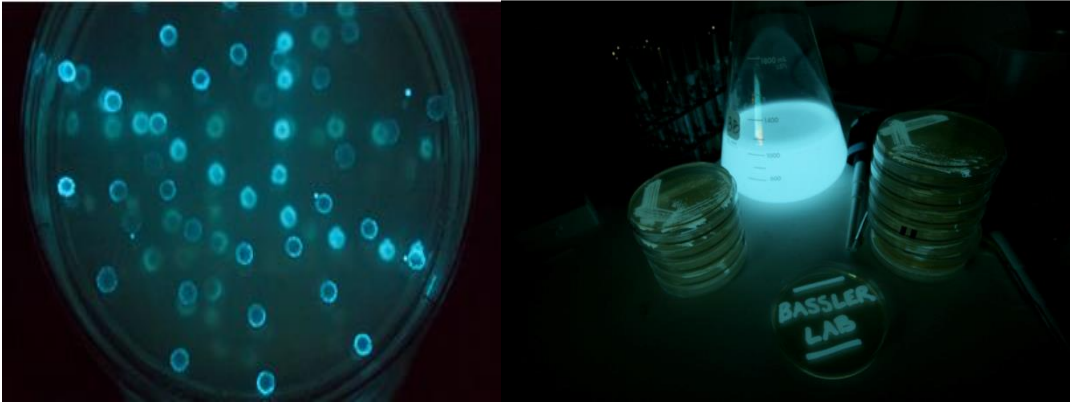
Şekil. 2.3. Bakteriyeletişim mekanizması ile ortaya çıkan biyolojik mekanizmalar ve uygulamaları [59]

Quorum sensing olarak ifade edilen çevreyi algılama mekanizmasının işleyişi sinyal molekülünün sentezlenmesi, sinyal moleküllerinin besi ortamına salınması, ve sinyal moleküllerinin algılanması adı verilen üç aşamada gerçekleşir. Sentez aşamasında her mikroorganizma, üreme eğrisindeki üs cinsinden üreme fazının sonuna geldiğinde kendine özgü genleri sayesinde yüksek miktarda sinyal molekülü üretir. Sentezlenen bu sinyal molekülleri hücre zarındaki bu moleküle özgü sistemler aracılığıyla ortama salınır (Şekil 2.4). Sinyal moleküllerinin modifikasyonu ve ortama salgılanması protein yapıdaki özel moleküller aracılığıyla gerçekleşir [8]. Algılama ise; ya sinyal molekülünün hücre içine alınmasıyla, ya da sinyal molekülünün hücre içine alınmadan, hücre zarında bulunan bir reseptör ile etkileşimi yoluyla gerçekleşir [60].



Şekil 2.4. Bakteriyeletişim “Quorum sensing” [193]

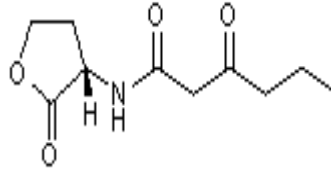
İlk kez 1960 yılında *Vibrio fischeri* adı verilen deniz bakterisinin metabolizması sonucu oluştuğu düşünülen biyoluminesans (biyoışım) olayında, Quorum Sensing denilen bu iletişim mekanizmasından söz edilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Petri üzerinde ve sıvı besiyerinde ışık üreten *Vibrio fischeri* kolonileri [194, 195]

Bilim adamları *V. fischeri*'nin kültür ortamında belli yoğunluğa ulaşmadan ışımamın görülmediğini, bakteri yoğunluğu arttığında ise bu biyoışımın oluştuğunu gördüklerinde olayın yorumunu yapmaya çalışmışlar [61] ve kültürün erken dönemlerinde biyoışımın engellenmesini sağlayan bir inhibitörün etkisini, belli yoğunluğa ulaşan *V. fischeri* 15ülfite15on15nun bu inhibitörü giderebildiği yönünde bir görüş ileri sürmüşlerdir [62] .

Ancak yapılan diğer çalışmalarla biyoluminesans olayının düşük hücre yoğunluğunda da indüklendiği görülmüştür. Buna bağlı olarak, daha sonra biyoışımaya olayının bir inhibitör maddeden kaynaklı değil de bir aktivatör molekülün (AI) birikerek artması sonucu meydana geldiği anlaşılmıştır [63,64]. Sözü edilen bu aktivatör molekülün, bakteriler tarafından salgılandığı, populasyon yeterli çoğunluğa ulaştığında ortamda birikerek biyoışımaya olayının gerçekleşmesine sebep olduğu görülmüştür. Aktivatör olarak ifade edilen molekül yukarıda açıklanan otoindükleyici moleküldür. Eberhard ve ark. ilk kez 1981'de *V.fischeri* tarafından üretilen iletişim molekülünü izole etmişler ve özelliklerini belirlemişlerdir. Gram negatif bakterilerin büyük bir çoğunluğunda da iletişim molekülü olarak kullanılan bu molekül N-açil homoserin lakton (AHL veya HSL) türevidir N-(3-oxohexanoil)-homoserin lakton (3-oxo-C6-HSL) olarak tanımlanmıştır [65] (Şekil 2.6 ve Şekil 2.7).

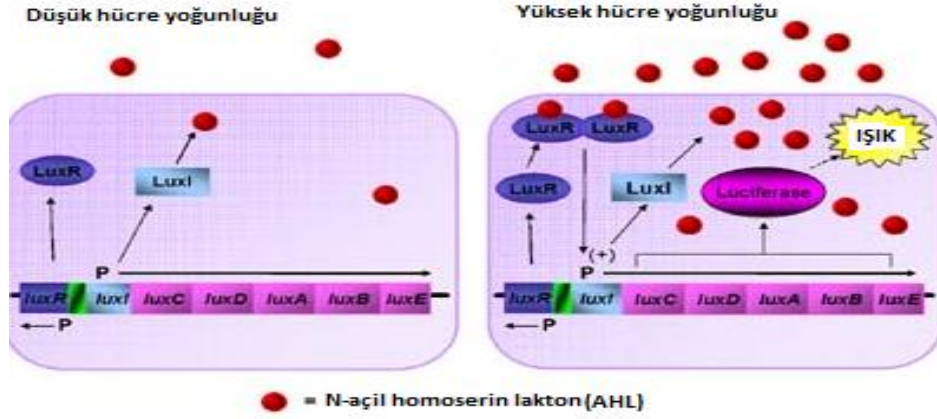


Şekil 2.6. Bakteriyel iletişim molekülü 3-oxo-C6-Homoserin lakton

V.fischeri bakterisinde gözlenen biyoışımaya olayının genetik regülasyonu 1983 yılında aydınlatılmıştır. Yapılan bu çalışma esas alınarak *V.fischeri*'deki iletişim mekanizmasının genetik modellenmesi yapılmış, bu model diğer çalışmalara da örnek teşkil etmiştir [66].

İlerleyen yıllarda Gram negatif bir bakteri olan *V.fischeri*'de quorum sensing mekanizmasının rolü dikkatleri diğer Gram negatif bakterilere yönlendirmiştir. Bunun sonucunda yapılan çalışmalar bakteriyel iletişim sisteminin sadece deniz bakterisi *V. fischeri* ve *V. harvei* ile sınırlı olmadığını göstermiştir.

Quorum Sensing



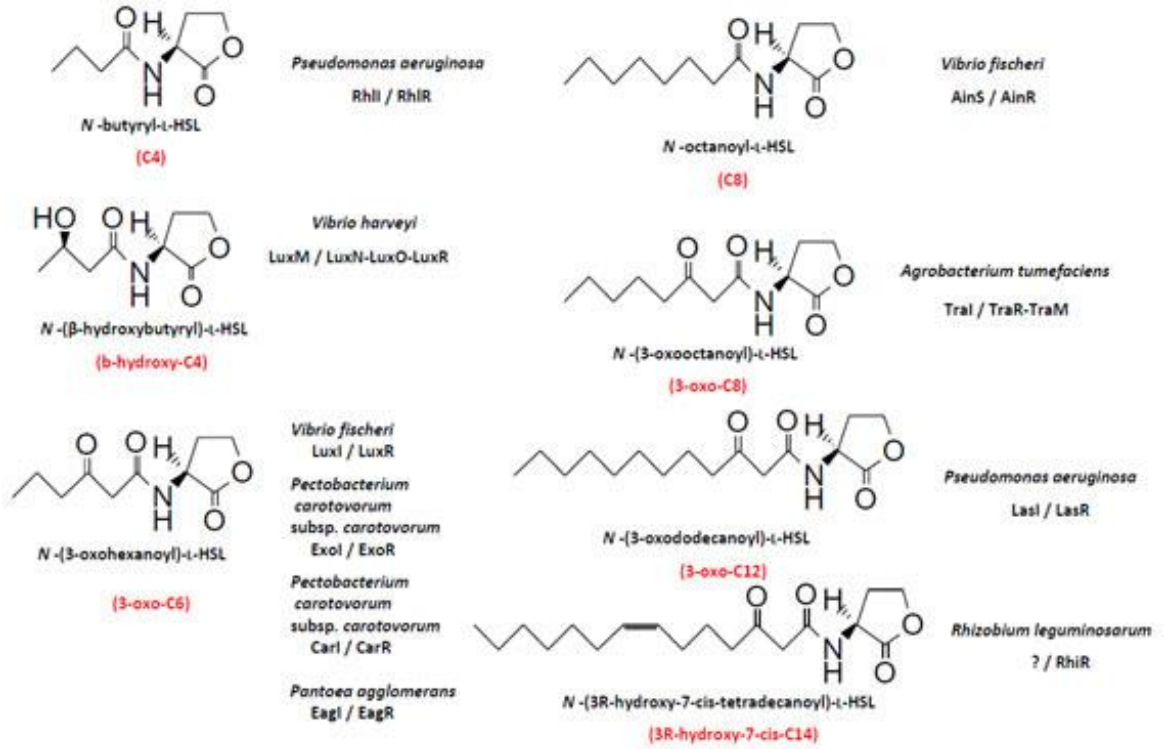
Şekil 2.7. *Vibrio fischeri* (LuxI/LuxR) bakterisinde biyoışımının şematik ifadesi [196]

Antibiyotik üretiminde önemli bir yere sahip olan *Erwinia carotovora* bakterisinin, karbapenem antibiyotiklerini üretemeyen mutantlarıyla çalışan grup, bakteriyel iletişimin farklı bir örneğiyle karşılaşmışlardır. Bu çalışmada antibiyotik üretemeyen *E.carotovora* mutantı ile yine antibiyotik sentezleyemeyen diğer bir mutantla birlikte besiyerine ekildiğinde antibiyotik üretebilir hale gelmektedir. Çalışma göstermiştir ki ikinci mutant grup ilk mutantın antibiyotik üretimini tetikleyen bir “iletişim molekülü” sentezlenmektedir. Bu antibiyotik üretimini sağlayıcı otoindüktör molekül *V. fischeri*'nin biyoışımına yol açan sinyal molekülünün birebir aynısıdır ve bu bulgunun sonucunda *Erwinia carotovora*'da da bir quorum sensing mekanizmasının yer aldığı anlaşılmıştır [67] .

Yapılan bir diğer çalışmada klinik izolat olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörlerinden biri olan elastaz üretiminde *V.fischeri* benzeri iletişim mekanizmasını kullandığını ve elastaz üretiminden sorumlu N-açil homoserin lakton molekülünün 3-oxo-C12-HSL olduğu saptanmıştır [68] . İlk olarak deniz bakterisinde görülen bakteriyel iletişim sistemi'nin *Erwinia carotovora* mutantlarında da yer aldığı bilgisinden hareketle bu sistemin diğer bakteriler tarafından da yaygın olarak kullanılıyor olduğu kabul görmeye başlamış, bu nedenle ortamdaki N-açil homoserin lakton türü sinyal moleküllerinin tespitini kolaylaştıracak genetiği değiştirilmiş ve metabolizmal aktivitelerinin kolayca saptanabildiği biosensör türlerin geliştirilmesi noktasına gelmiştir [69] .

2.4.1. Quorum Sensing İletişim Sistemini Kullanan Mikroorganizmalar

Gram negatif bir bakteri olan *V. fischeri*'de saptanan bu bakteriyel iletişim sistemini, Gram pozitif bakteri grupları hatta ökaryot olan fungus türlerinin de kullandığı çeşitli çalışmalarca belirlenmiştir. Bu bağlamda söz edilen bu iletişim sistemi; aynı tür mikroorganizmalar arasında, farklı tür mikroorganizmalar arasında ve bakteri ile ökaryot diğer mikroorganizmalar arasında görülebilir (Şekil 2.8). Çalışmalar daha çok patojen bakteriler üzerinde yapılmış ve sistemin virülanstaki etkinliği aydınlatılmaya çalışılmıştır [8] .



Şekil 2. 8. Bazı Gram negatif bakterilerin kullandığı bakteriyel iletişim molekülleri [70]

Passador ve ark., *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmayla, bakteriyel iletişim sisteminin virülansta etkin olmasını sağlayan açıl-homoserin lakton sinyal moleküllerini ürettiklerini aynı zamanda bu molekülleri bakteri-bakteri iletişimde kullandıklarını belirlemişlerdir [71] .

Gram negatif bakterilerin oluşturdukları biyofilm'in deniz bitkisi olan *Enteromorpha*'nın zoosporlarının gelişmesinde önemli olduğunu saptayan Joint ve ark., bu iletişim sisteminin kompleks canlı ve bakteri arasında da olabileceğini

göstermişlerdir [72] . Üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı yaygınlaşan probiyotik bir tür olan *Lactobacillus plantarum*' un in vitro ve in vivo olarak, *P. aureginosa*'da patojeniteyi inhibe etme özelliği araştırılmış, *L. Plantarum* veya bu türe ait ürünlerin, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında lokal tedavi amacıyla terapötik ajan olarak kullanılabileceği ispat edilmiştir [73] .

2.4.2. Quorum Sensing Moleküllerinin Tespitinde Kullanılan Biyosensör Bakteriler

Açıl-homoserin lakton gibi sinyal moleküllerinin ve yapılarının aydınlatılması için kütle spektrometrisi (MS), gaz kromatografisi (GC)-MS, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve kızıl ötesi spektroskopi (IR) dahil olmak üzere çeşitli analitik yöntemler gerekir [74-76] . Bu tür analitik yöntemler çok hassas ve net sonuçlar vermelerine rağmen oldukça pahalı yöntemlerdir. Bu yöntemlere kıyasla daha az verimli olmasına rağmen biyosensör bakterilerin kullanımıyla ortamdaki sinyal moleküllerinin tespiti ve ne olduğu hakkında da bilgi edinilebilir. AHL üretiminde temel gen bölgelerinden biri olan luxI homolog geninin aktivasyonu ile bazı fenotipik özellikler açığa çıkabilir. Bunlar; biyoışma, viyolasin pigment üretimi, beta-galaktosidaz aktivitesi ve yeşil floresan protein gibi aktiviteler olabilir [77] . AHL'leri tespit etmek için geliştirilmiş biyosensör suşlar, Çizelge 2.3.'de sıralanmıştır.

2.4.2.1. Quorum Sensing Biyosensörü Olarak *Chromobacterium violaceum* (CV026)

C. violaceum, tropikal ve subtropikal bölgelerin toprak ve su kaynaklarından izole edilebilen Gram negatif, fakültatif anaerobik ve saprofitik, Proteobacterium grubuna dahil olan bir bakteridir. Genel olarak ürettiği mor pigment olan viyolasin karakteristik özelliğidir (Şekil 2.9). *C. violaceum* 12472, kısmi olarak antibiyotik üretimini, virülans faktörlerini, kitinolitik aktiviteyi ve mor pigment üretimini sinyal moleküllerine dayanan quorum sensing mekanizmasını kullanarak düzenler. Viyolasin üretmeyen mini-Tn5 mutant'ı *C. violaceum* 026 suşunun ortamda N-açıl homoserin lakton türü iletişim molekülü olduğunda viyolasin pigmenti üretmeye başladığı görülmüştür [1,78] .

Çizelge 2.3. N-açıl homoserin lakton (AHL) biyosensör suşları (Laura Steindler 2007)

Taşıdığı Plasmid	Bakteri türü	QS tipi	Reporter sistemi	En iyi saptadığı molekül	Saptadığı molekül	Referans
pCF218 + pCF372	<i>A. tumefaciens</i> WCF47	Tral/R (<i>A. tumefaciens</i>)	β -galaktosidaz	3- oxo-C8-AHL	Tip-1	Zhu ve ark. 1998
pZLR4	<i>A. tumefaciens</i> NTL1	Tral/R (<i>A. tumefaciens</i>)	β -galaktosidaz	3- oxo-C8-AHL	Tip-1	Farrand ve ark. 2002
pDC141E33	<i>A. tumefaciens</i> NTL1	Tral/R (<i>A. tumefaciens</i>)	β -galaktosidaz	3- oxo-C8-AHL	Tip-1	Shaw ve ark. 1997
pJZ384 + pJZ410 + pJZ372	<i>A. tumefaciens</i> KYC55	Tral/R (<i>A. tumefaciens</i>)	β -galaktosidaz	3- oxo-C8-AHL	Tip-1	Zhu ve ark. 2003
pKDT17	<i>E. coli</i>	Lasl/R (<i>P. aeruginosa</i>)	β -galaktosidaz	3-oxo-C12-AHL	Tip-2	Pearson ve ark. 1994
M71LZ	<i>P. aeruginosa lasI-</i>	Lasl/R (<i>P. aeruginosa</i>)	β -galaktosidaz	3-oxo-C12-AHL	Tip-3	Dong ve ark. 2005
pJNSinR	<i>S. melilotis</i> inl::lacZ	SinI/R (<i>S. meliloti</i>)	β -galaktosidaz	3-oxo -C14-AHL	Tip-4	Llamas ve ark. 2004
<i>S. melilotis</i> inl::lacZ	<i>S. melilotis</i> inl::lacZ	SinI/R (<i>S. meliloti</i>)	β -galaktosidaz	3-oxo-C14-AHL	Tip-4	Llamas ve ark. 2004
pSF105 + pSF107	<i>P. fluorescens</i> 1855	PhzI/R (<i>P. fluorescens</i> 2-79)	β -glukuronidaz β -galaktosidaz	3-hydroxy-C6-AHL	Tip-5	Khan ve ark. 2005
<i>C. violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum</i>	Cvil/R (<i>C. violaceum</i>)	Viyolasin pigmenti	C6-AHL	Tip-6	McClellan ve ark. 1997

Tip-1: 3-oxo-AHLs C6-AHL C8-AHL, C10-AHL, C12-AHL, C14-AHL, 3-hydroxy-C6-AHL, 3- hydroxy-C8-AHL, 3-hydroxy-C10-AHL, Tip-2: C12-AHL, C10-AHL, 3-oxo-C10-AHL, Tip-3: 3-oxo-C10-AHL, Tip-4: 1-3-oxo- C16-AHL,C16-AHL, 1-3-oxo- C16-AHL, C14-AHL, Tip-5: C8-3-hydroxy-AHL, Tip-6: 3-oxo-C6-AHL,C8-AHL, 3-oxo-C8-AHL, C4-AHL, Tip-7: C6-AHL, 3-oxo-C8-AHL,C8-AHL, Tip-8: 3-oxo-C10-AHL, C12-AHL, Tip-9: C10-AHL, Tip-10: 3-oxo-C10-AHL, Tip-11: C6-AHL,C8-AHL C10-AHL [1,3,5,53,69,79-87]

Çizelge 2. 3. N-açıl homoserin lakton (AHL) biyosensör suşları (Laura Steindler 2007) (devamı)

Taşıdığı Plasmid	Bakteri türü	QS tipi	Reporter sistemi	En iyi saptadığı molekül	Saptadığı moleküller	Referans
pSB401	<i>E. coli</i>	LuxI/R (<i>V. fischeri</i>)	<i>luxCDABE</i>	3-oxo-C6-AHL	Tip-7	Winson ve ark. 1998
pHV200I ⁻	<i>E. coli</i>	LuxI/R (<i>V. fischeri</i>)	<i>luxCDABE</i>	3-oxo-C6-AHL	Tip-7	Pearson ve ark. 1994
pSB403	Geniş konak aralığı	LuxI/R (<i>V. fischeri</i>)	<i>luxCDABE</i>	3-oxo-C6-AHL	Tip-7	Winson ve ark. 1998
pSB536	<i>E. coli</i>	Ahyl/R (<i>A. hydrophyla</i>)	<i>luxCDABE</i>	C4-AHL		Swift ve ark. 1997
pAL101	<i>E. coli</i> (<i>sdiA</i> mutant)	RhII/R (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>luxCDABE</i>	C4-AHL		Lindsay ve ark. 2005
pSB1075	<i>E. coli</i>	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>luxCDABE</i>	C12-3-oxo-AHL	Tip-8	Winson ve ark. 1998
pAS-C8	Geniş konak aralığı	CepI/R (<i>B. Cepacia</i>)	GFP	C8-AHL	Tip-9	Riedel ve ark. 2001
pKR-C12	Geniş konak aralığı	LasI/R (<i>P. aeruginosa</i>)	GFP	C12-3-oxo-AHL	Tip-10	Riedel ve ark. 2001
pJBA-132	Geniş konak aralığı	LuxI/R (<i>V. fischeri</i>)	GFP	C6-3-oxo-AHL	Tip-11	Andersen ve ark. 2001

Tip-1: 3-oxo-AHLs C6-AHL C8-AHL, C10-AHL, C12-AHL, C14-AHL, 3-hydroxy-C6-AHL, 3-hydroxy-C8-AHL, 3-hydroxy-C10-AHL, Tip-2: C12-AHL, C10-AHL, 3-oxo-C10-AHL, Tip-3: 3-oxo-C10-AHL, Tip-4: 1-3-oxo-C16-AHL, C16-AHL, 1-3-oxo-C16-AHL, C14-AHL, Tip-5: C8-3-hydroxy-AHL, Tip-6: 3-oxo-C6-AHL, C8-AHL, 3-oxo-C8-AHL, C4-AHL, Tip-7: C6-AHL, 3-oxo-C8-AHL, C8-AHL, Tip-8: 3-oxo-C10-AHL, C12-AHL, Tip-9: C10-AHL, Tip-10: 3-oxo-C10-AHL, Tip-11: C6-AHL, C8-AHL, C10-AHL [1,3,5,53,69,79-87]



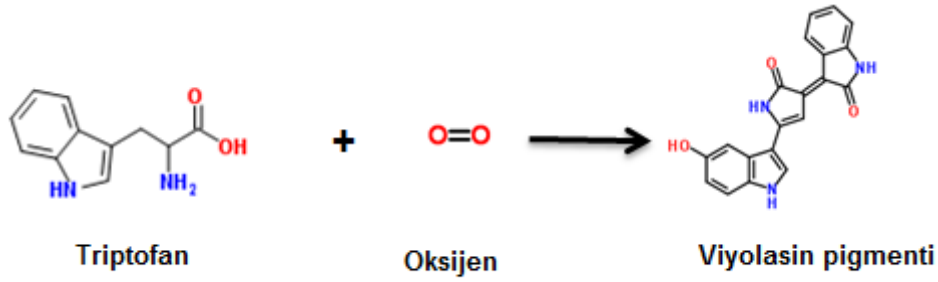
Şekil 2. 9. *Chromobacterium violaceum* 12472'nin ürettiği viyolasin pigmenti

Viyolasin üretimi için biyosensör olarak bu bakterinin kullanımı çok basit bir analiz olmasına karşın, birçok homoserin lakton türünü keşfedebilme olanağı sağlamaktadır. CV026 biyosensör suşunda viyolasin üretimi N-açıl yan zincirlerindeki uzunluğa bağlı olarak C4 ve C8 arasında değişen homoserin lakton türevlerini saptamada kullanılır. C10'dan C14'e N-açıl yan zincirlerinden oluşan homoserin lakton türevleri, viyolasin üretimini inhibe etmesi nedeniyle saptanmaları amacıyla ortama viyolasin sentezi tetikleyicisi sinyal molekülleri eklenir. Çalışma sonrasında beklenen rengin oluşmaması ortamda uzun zincirli AHL'ların varlığına işarettir. Aynı zamanda CV026 biyosensör suşunun homoserin lakton türevi iletişim moleküllerini tespit etme yeteneklerini ince tabakalı kromatografi ile de ispatlanmıştır [1]

2.4.2.1.1. *C. violaceum*'un Viyolasin Pigmentinin Sentezi

Chromobacterium violaceum tarafından üretilen viyolasin pigmenti suda çözünmez ve temel olarak 3 yapısal ünitelerden oluşmaktadır. Bunlar; 5-hidroksiindol, 2-oxindol ve 2-pyrrolidone'dur [88]. Viyolasin pigmentinin kimyasal yapısını aydınlatmaya yönelik çalışmalar 1920'li yıllarda başlamış ve molekülün kimyasal yapısının yanı sıra sentezi ve degradasyonu da açıklanmıştır [89,90]. Bu ve benzeri çalışmalar sırasında fakültatif anaerob bir bakteri olan *C. violaceum* bakterisinin viyolasin pigment sentezinin anaerob şartlarda azaldığı görülmüş, bu durum oksijen varlığının pigment üretiminde önemli bir yere sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır [91]. Ancak bu konuda yapılan ileri çalışmalar

pigment sentezinde sadece oksijenin değil, L-triptofanın veya D-triptofanın da önemli olduğunu göstermiştir (Şekil 2.10.) [89] .



Şekil 2. 10. Viyolasin biyosentezi [89]

2.4.2.2. Quorum sensing biyosensörü olarak *Agrobacterium tumefaciens* NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136 ve *Agrobacterium tumefaciens* WCF47

A. tumefaciens Gram negatif kok morfolojisindeki bir toprak bakterisidir. Ti plazmid ile onkogenik DNA'nın bitkiye transferini sağlayarak taç tümörüne neden olan bir patojendir. Bu özelliğinden dolayı gen klonlamasında sık kullanılan bir mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır. *A. tumefaciens* tarafından oluşturulan tümörlerce bitki metabolitlerinin sentezinden sorumlu enzimleri kodlayan genlerin aktivasyonu ile opin ve agropin gibi metabolitlerin üretimi sağlanır. Taç tümörü içerisinde sentezlenen opin ve agropinler hücre dışına salgılanır. *A. tumefaciens* bunları karbon veya azot kaynağı olarak kullanır. Ti plazmit üzerinde bulunan opin katabolizması genleri, bakteriye opin alınımı ve parçalanmasında görev alırlar [79,80,92] . Plazmid üzerinde 196 gen bölgesi bulunur ve 195 protein kodlanmaktadır. Ti plazmid üzerinde bulunan tra genleri LuxI ve LuxR homoloğu olan TraI ve TraR proteinleri ve sinyal molekülü olan N-3(okzokitonol)-L-homoserin laktone aracılığıyla aktive edilirler [2] .

2.4.3. Bakteriyel iletişim Sisteminin Moleküler Mekanizması

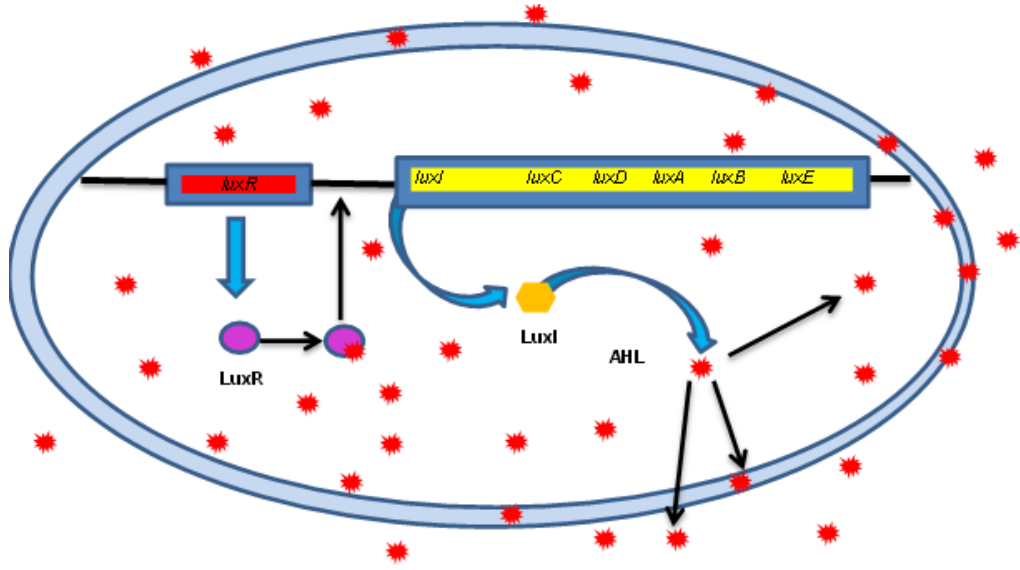
Aynı tür bakterilerin birbirleriyle iletişimlerini sağlayan moleküller kimi zaman diğer bakteri türlerini algılamada fayda sağlamamaktadır. Sinyal molekülleri "Açıl-

Homoserin Lakton (otoindükleyici-1)”, “otoindükleyici peptidler” ve “otoindükleyici 2” gibi birkaç farklı sınıfta incelenmektedir.

2.4.3.1. Açıl Homoserin Lakton (LuxI/LuxR) Tipi QS İletişimi

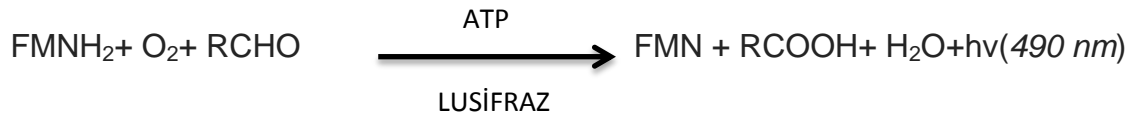
Deniz suyu ve denizde yaşayan canlıların oluşturduğu biyoışımaya olayının anlaşılması 1700-1800'lü yıllara kadar uzanmaktadır. Bu olayın sadece denizlerde olmadığını karada yaşayan kimi fungusların ve böceklerinde gece olunca ışık ürettiği görülünce bilim adamları bu olayın aydınlatılması gerektiğini düşünmüşlerdir. Bilim adamları biyoışımaya olayının canlıya nasıl bir avantaj sağlayabileceğini araştırmışlar, bu bağlamda canlının biyoışımaya olayını kimi zaman avlanmak için kimi zaman diğer canlılarla iletişim kurmak veya bulunduğu ortamda varlığını göstermek için ya da saldırgan türlerden kurtulabilmek için kullanabildiği görülmüştür. Bakteriyel iletişimdeki rolü ise bakteri türlerinin birbirleriyle bağlantı kurması sonucu oluşmasıdır.

İlk defa Gram negatif bakteri *V. fischeri*'de saptanmış, biyoışımının bakteriyel iletişim sistemi ile ilişkisi aydınlatılmıştır. Biyoışımının meydana gelmesinde bazı gen bölgeleri sorumludur. Bunlar; luxR, luxI, luxC, luxD, luxA, luxB ve luxE adı verilen ve iki operonda organize olan gen bölgeleridir. Lusiferaz enziminin alfa ve beta alt birimlerini luxA ve luxB genleri kodlarken; lusiferaz enzimi sentezinde gerekli olan aldehit gruplarının sentezi ve elde edilmesinden luxC, D ve E genleri sorumludur. LuxI, Açıl-Homoserin Lakton (AHL) sentezinde gerekli olan bir gen iken, luxR AHL transkripsiyonunu kontrol eden bir regülatör proteini kodlar (Şekil 2.11.). LuxR proteini ile AHL'un birleşmesi ile proteinin yapısı değişir, lusiferaz sentezinden sorumlu gen bölgelerinin aktivasyonu sağlanır. Bu mekanizma sonucu üretilen AHL moleküllerinin LuxR proteini ile birleşmesi ışımada hızlı bir artışa neden olur.

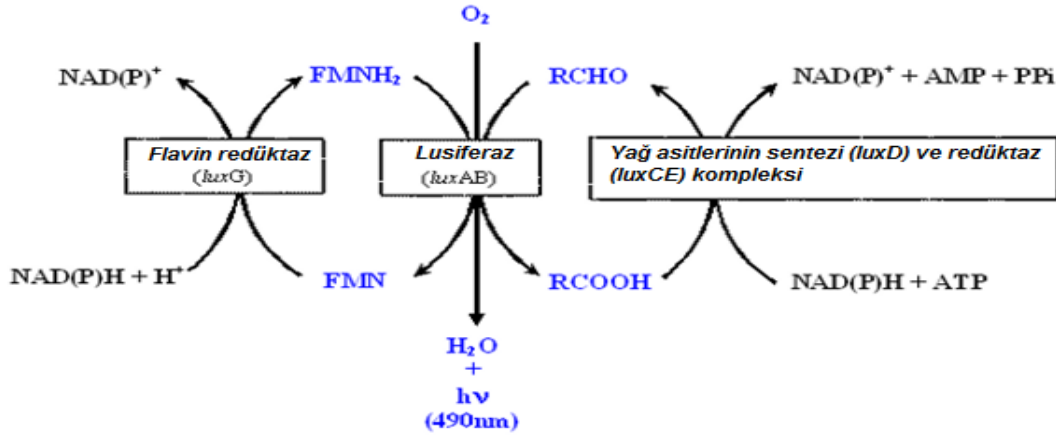


Şekil 2.11. Yüksek bakteri yoğunluğunda AHL miktarı eşik değere ulaşır ve AHL-LuxR kompleksi meydana gelir. Hemen ardından antibiyotik üretimi, virülans faktörleri, pigment üretimi gibi özellikler düzenlenir.

Bakterilerin biyoışımaya olayını gerçekleştirebilmesi için ortamda substrat olan lusiferin, lusiferaz enzimi ve uzun zincirli alifatik aldehit olan bir faktör bulunur ve tüm reaksiyon oksijenli ortamda gerçekleşir. Bakterilerin sahip olduğu lusiferin, flavin mononükleotid (FMN)'den meydana gelir. Bakteriyel biyoışımaya için primer elektron vericisi olarak NADH'tir ve elektronlar lusiferaz aracılığıyla iletilmektedir (Şekil 2.12). Bu reaksiyon;



şeklinde özetlenebilir.



Şekil 2.12. Biyoışım reaksiyonları [93]

2.4.3.2. Otoindükleyici-2 Tipi QS İletişimi

LuxS geni tarafından kodlanan otoindükleyici-2 (AI-2) tipi QS sinyal molekülleri, Gram negatif ve pozitif birçok bakteri tarafından üretilen universal iletişim molekülüdür. İlk kez *V. harveyi*'de, daha sonra *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Salmonella typhimurium* gibi birçok mikroorganizmanın da bu tip iletişimi kullandığı saptanmıştır [94,95]. Bu iletişim mekanizmasında S-ribozil-homosistein, homosisteine ve 4,5-dihidroksi-2,3-pentandiona (DPD) dönüşür. Bu reaksiyonu ise LuxS proteini aktive eder. Oluşan 4,5-dihidroksi-2,3-pentandion molekülü ortamdaki su ile reaksiyona girer ve değişik yapıda farklı AI-2 sinyal molekülleri oluşturulur [60].

2.4.3.3. Otoindükleyici Peptidler

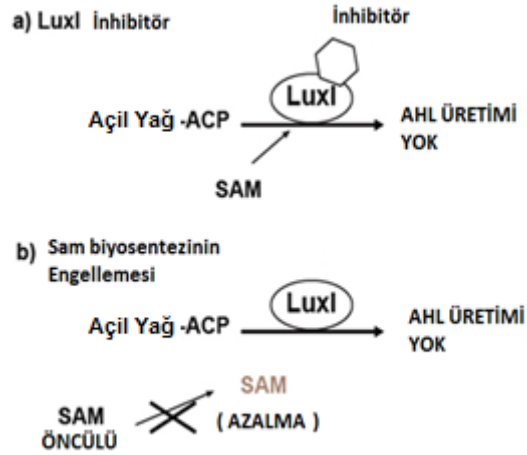
Daha çok Gram pozitif bakterilerin ürettiği ve "otoindükleyici peptidler" (AIP) olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu protein sentezi sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. Bakteri hücre zarında bulunan "ATP binding cassette" (ABC transporter) sistemi tarafından hücre içinden dışarıya difüzyonla değil aksine aktif olarak enerji kullanılarak salgılanır. *S.aureus* virülans genleri, *B.subtilis* ve *S. pneumoniae*'nin kompetans (DNA alım) genleri, laktik asit bakterilerinde bakteriosin üretimi, *E. faecalis*'de konjugatif plazmid transferi ve *B.subtilis*'de sporulasyon, QS molekülleri aracılığı ile kontrol edilmektedir [56,96].

2.5. Bakteriyel İletişim Sisteminin Engellenmesi

Virülansta etkinliği saptanan bu sistemin inhibisyonu, birçok enfeksiyonun tedavisinde yeni bir yaklaşımdır. Bu inhibisyonun oluşumunda antibiyotiklerin etki mekanizmalarında olduğu gibi, ya sinyal molekülünün üretimi önlenecek, ya sinyal molekülü yıkılacak ya da engellenecek veya diğer bakterilerin sinyal moleküllerini algılaması engellenecektir.

2.5.1. Çevreyi Algılama Molekülünün Üretimini Önlenmesi

1996 yılında Tatedo ve ark. *P.aeruginosa* izolatları üzerine yaptıkları çalışmada, azitromisin bakteriyel iletişimden sorumlu gen bölgelerini etkilediği, dolayısıyla sinyal moleküllerini azalttığı ve elastaz gen ekspresyonunu önlediğini gözlemlemiştir (Şekil 2.14). Yine triklosan adı verilen bir molekülün sinyal molekül sentezinden sorumlu bir enzimi inhibe ettiği de saptanmıştır [97].



Şekil 2.13. N-açil homoserin lakton üretiminin engellenme mekanizması [70]

2.5.2. N-Açil Homoserin Lakton Sinyal Molekülünün Yıkılması Veya İnhibisyonu

Sentezlenmiş olan N-açil homoserin lakton moleküllerinin parçalanması diğer bir hedef olabilir. Bu mekanizma ya enzimler ya da bazı inhibitörler tarafından sağlanır. Gram negatiflerin sinyal molekülleri AHL laktonaz ve AHL açılaz tarafından yıkılabilir. Gram pozitiflerin sinyal molekülleri ise bazı inhibitörler aracılığı ile yıkılabilir. Fenolik inhibitörlerden “closantel“ ve “RWJ-49815” histidin

kinazı inhibibe ederek protein metabolizmasını bozduğu bildirilmiştir [98] (Şekil 2.14.).

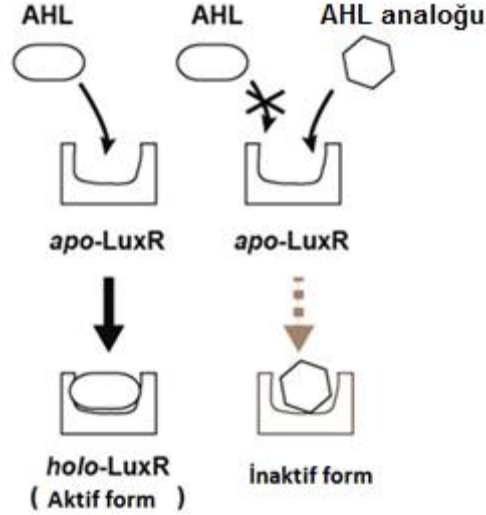
Bakteriyel sinyali etkileyen moleküller	Fonksiyonu
Enzimler	
AHL- laktonaz	AHL sinyal molekülünün degradasyonu
AHL- açılaz	AHL sinyal molekülünün degradasyonu
İnhibitörler	
Triclosan	Yağ asitlerinin biyosentezinin engellenmesi
Furanon <i>Delisea pulchra</i>	Hızlı LuxR degradasyonu
Truncated AIP-II	Otoindükleyici peptidlerin antagonisti
Furanon C-30	AHL moleküllerinin antagonisti
3-oxo-C12-(2-aminocyclohexanone)	3-oxo-C12- AHL antagonisti
Closantel	Histidin kinaz inhibisyonu

Şekil 2.14.N-açil homoserin laktonun enzimlerle ve bazı inhibitörlerle engellenmesi [98]

2.5.3. N-Açil Homoserin Lakton Sinyal Molekülünün Alınımının Önlenmesi

Çevreyi algılama sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla sinyal reseptör proteinlerinin sentezinin engellenmesi ya da AHL analogları aracılığıyla bu proteinlerin reseptöre bağlanmasının azaltılması da ayrı bir mekanizma olarak denmektedir. Bir kırmızı makro alg olan *Delisea pulchra*'nın üretmiş ve veziküllerinde depolamış olduğu furanon bileşiklerinin yapısal olarak AHL sinyal

analoğu olduğu LuxR proteinine bağlanarak AHL'nin serbest kalmasına yol ağtığı ve böylece *V. fischeri*'nin bakteriyel çevreyi algılama sistemini inhibe ettiği bildirilmektedir [98] (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. N-açıl homoserin laktonun diğer bakteriler tarafından alınmasının engellenmesi [70]

2.5.4. Bakteriyel İletişim Sisteminin Engelleyicileri

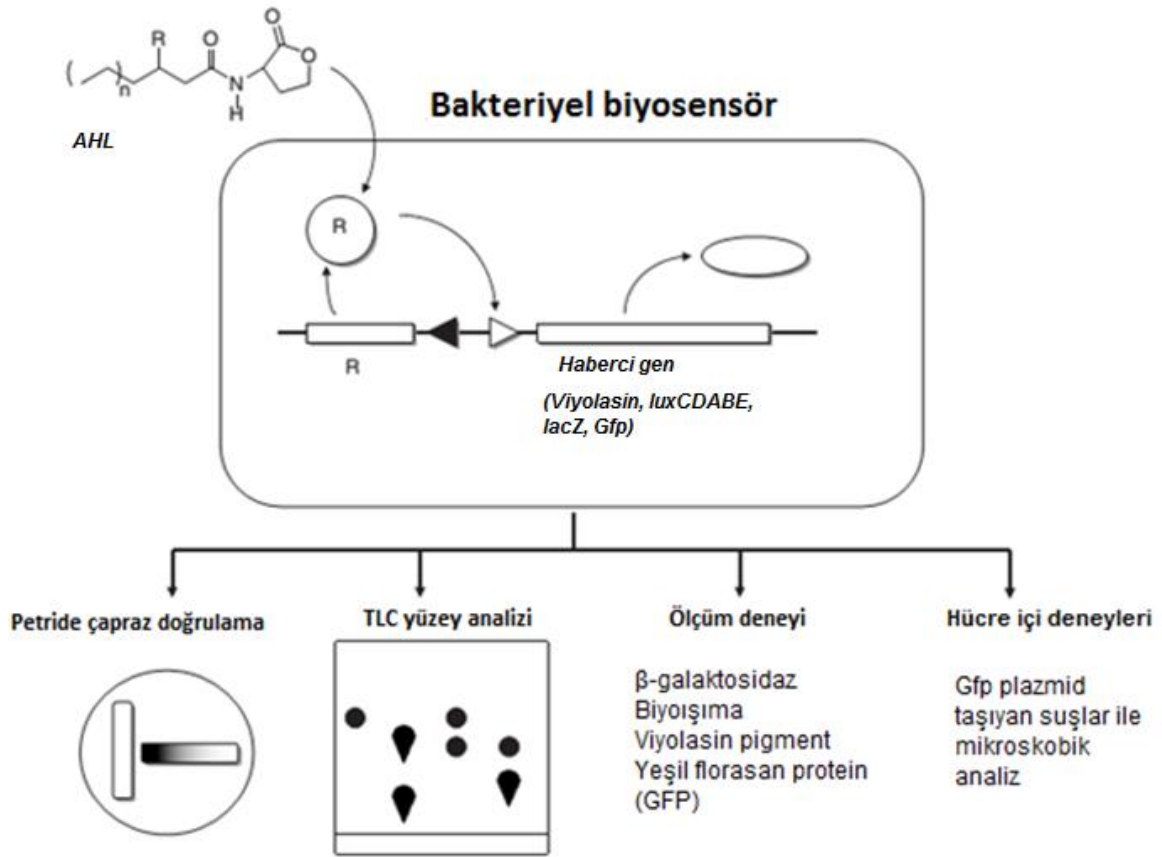
Çevreyi algılama sisteminde engelleyiciler, bitki ve fungus gibi kaynaklardan izole edilebilir. Hem bitkiler hem de funguslar çevreyi algılama sistemini kullanan bakterilerle işbirliği içindedirler. Bu fungus ve bitkilerin, çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşenleri üreterek, bu bakterilerin hastalık oluşturmalarını, kolonize olmalarını ve bulaşmalarını azalttıkları görülmüştür [99,100] . Şekil 2.16'da bu tip engelleyiciler gösterilmektedir. Martinelli vd., bir seri furanon bileşenleri ile yaptıkları çalışma sonucunda, furanon 12'nin N-açıl-homoserin lakton aktivitesini stimüle ettiğini ve viyolasin üretimini azalttığını bulmuşlardır [101] . *C. violaceum* 026 suşunda bu açıdan furanon 12'nin uzun zincirli AHL molekülleriyle benzer rol oynadığını, optimum AHL varlığında bile viyolasin üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir [101] . *Delisea pulchra*'dan elde edilen halojenlenmiş furanonlar, etkili bir N-açıl-homoserin lakton antagonisti olarak tanımlanmıştır.

Reseptör Antagonist Bileşikleri	
<p>3-oxo-C₁₂-(2-aminophenol) Smith ve ark.,2003</p>	<p>3-oxo-C₁₂-(aminocyclohexanone) Smith ve ark.,2003</p>
<p>Patulin Rasmussen, 2005</p>	<p>TP-5 Muh ve ark., 2006</p>
<p>4-bromophenylpropionyl-HSL Geske ve ark., 2007</p>	<p>C₁₀-CPA Ishida ve ark.,2007</p>
<p>Hydroxymethylfuranone esters R=alkyl or chlorinated alkyl Kim ve ark.,2007</p>	<p>C30 furanone Hentzer ve ark.,2007</p>
<p>Sulfonyleureas inhibitor R=alkyl or phenyl-alkyl Frezza ve ark,2008</p>	<p>Iberin Jakobsen, 2012</p>
<p>Ajoene Jakobsen, 2012</p>	
N-açil homoserin lakton sentez inhibitörleri	
<p>J8-C8 Chung ve ark., 2011</p>	<p>BuT-DADMe-Immucillin A Gutierrez ve ark, 2009</p>

Şekil:2.16. Bitki ve fungal kaynaklardan elde edilen bazı quorum sensing inhibitörleri [102-115]

2.6. Sinyal Molekülünün Tespitinde Kullanılan Yöntemler

N-açil homoserin laktonlarının tespitinde daha önceden de belirtildiği gibi biyosensör bakterilerin kullanımı sinyal moleküllerinin varlığının saptanması açısından önemli bir buluştur. Çapraz doğrulama yöntemiyle saptanan sinyal moleküllerinin neler olduğu ise ince tabaka kromatografisi gibi maliyeti ucuz ve uygulaması ise kolay bir yöntemle sağlanmaktadır. Şekil 2.17’de N-açil homoserin laktonlarının tespiti için kullanılan yöntem ve belirteçler gösterilmektedir.



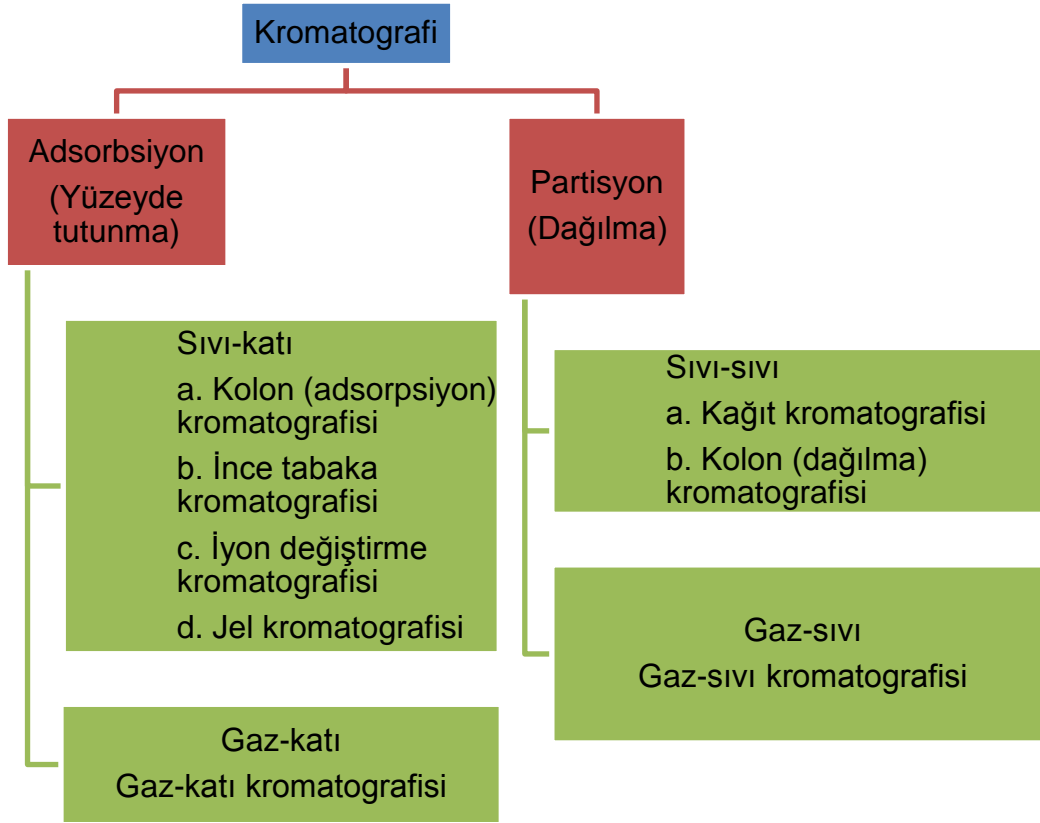
Şekil 2.17. N-açil homoserin lakton tespitinde en sık kullanılan yöntemler ve belirteçleri [77]

2.6.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, kimya ve eczacılık alanında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Temel olarak biri sabit diğeri hareketli faz olan bir karışım halinde bulunan moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. İlk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvett (1903) tarafından geliştirilen bu yöntem, bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta

kullanılmıştır. Kolonda oluşan renk bantlarından dolayı bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermiştir.

Kromatografi temel olarak adsorbsiyon (yüzeyde tutma) ve partisyon (dağılma) mekanizmaları üzerinden yürür. Kromatografik sistemleri aşağıdaki şema ile de gösterebiliriz (Şekil 2.18.):



Şekil 2.18. Kromatografi Çeşitleri

Kromatografide adsorbsiyon genel olarak; katı veya sıvı moleküllerin, sıvı veya gaz moleküllerini çekim kuvvetleri yardımıyla yüzeyde tutmasına denir. Dağılım ise; bir karışımdaki maddelerin birden fazla çözücü içerisindeki çözünürlükleri oranında dağılmasıdır. Bu durum, çözücünün ve maddenin özelliklerine bağlı olarak gerçekleşir.

2.6.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi

Uygulanış şekli kağıt kromatografisi ile benzerlik gösterir. Sabit faz olarak, genellikle silika jel (SiO_2), alüminyumoksit (Al_2O_3), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Burada etkin mekanizma adsorbsiyon'dur. İnce tabaka

kromatografisi'nde silika jel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu plakalar hazır olarak satılabildiği gibi laboratuarda da hazırlanabilir. Cam levhaların boyutları 5x20cm ile 20x20cm arasında değişir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir, bu kalınlık 0.25-2mm arasındadır.

2.7. Bitki Ekstraktlarının Anti-Quorum Sensing Aktivite Çalışmaları

Uygarlık tarihi boyunca birçok medeniyet, bitkileri tedavi amaçlı olarak kullanmıştır. Eski mısır uygarlığındaki mumyaların mezarlarında papirüslerin üzerine yazılmış bitkisel tedavi yöntemlerinin yerini Hititlerde tabletler almış ve yazılı kaynak olarak günümüze kadar gelmiştir. Avrupa ve Anadolu'ya hakim olan Roma imparatorluğunun tabetlerinde de bitkisel tedavi uygulamalarına rastlanılmaktadır. Bitkisel tedavi sadece eski zamanlarda uygulanmayıp günümüze kadar gelmiş olup hala kullanılmaya devam edilmektedir. Özellikle patojenlerin tedavisinde bitki ekstraktlarından yararlanılması, farmakoloji biliminin gelişmesine de katkıda bulunmuştur. Bitkiler doğada yaygın bulunmasının yanında canlılar tarafından besin kaynağı olarak da kullanılabilir. Bitkilerin kullanımları sonucunda doğaya toksik etki göstermeleri birçok antimikrobiyal araştırma da tercih sebebi olmasını sağlamıştır.

Antimikrobiyal etkili moleküllerin patojenlerin eliminasyonu için kullanılması sonucunda, mikroorganizmalarda değişik mekanizmaların geliştirilmesi yolu ile antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi söz konusu olmuştur. Böylece tedavide kullanılan birçok antibiyotik kullanım alanının daralması yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesini doğurmuştur. Yeni kaynakların başında ise bitki ekstraktları yer almıştır. Bitki ekstraktlarının her ne kadar tedavide etkin olduğu saptansa da doğru kullanımı dışında canlıya zarar verdiği de gözlenmiştir. Yapılan birçok çalışmada canlıya zararı en düşük bileşiklere yönelmiş ve çağımızın popüler konularından olan antioksidan özelliği olan bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır. Antioksidan özelliği bulunan bazı moleküllerin antimikrobiyal ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir. Antimikrobiyal ajanların bakterilerin virülansında etkinliğinin azalması, bu mekanizmanın düzenlenmesinden sorumlu olan bakteriyel iletişim sistemin üzerinde araştırmaların yapılmasına neden olmuştur.

Bakteriyel iletişim sisteminin aydınlatılmasının yanında bu sistemin engellenmesi de bakteriyel virülans karşısında başarı kazanılmasını sağlayacaktır.

Anti-quorum sensing olarak da ifade edilen bu bakteriyel iletişim sistemi inhibisyonunda çeşitli bitki ekstraktları kullanılmaktadır. Bu ekstraktların içeriği ise çok çeşitli bileşiklerden oluşur. Bu bileşiklerin canlı bünyesinde nasıl bir etkinliğe sahip olduğu ise araştırmalarda aydınlatılmamıştır. Çalışmamızda antioksidan özelliği bilinen quercetin ve resveratrol bileşikleri kullanılmıştır. Quercetin; flavonoid grubuna giren, elma, soğan, çay, kırmızı üzüm gibi birçok meyve ve sebzenin kabuğunda yaygın bulunan sarı pigmenttir (Şekil 2.19). Çeşitli çalışmalarda quercetin'in antikanserojenik, anti enflamatuar ve antihistamin etkisinin olduğu da saptanmıştır.



Şekil 2.19. Quercetin molekülünün kimyasal yapısı [116]

Resveratrol ise; başta kırmızı üzüm olmak üzere ananas ve yer fıstığındada bulunan doğal bir fitoaleksindir (Şekil 2.20) . Fitoaleksinlerin bitkiyi uv ışınlarından korumanın yanında bazı patojenlere karşı korumada da fayda sağlar. Örneğin resveratrol, olumsuz hava koşulları altında siyah üzüm tarafından fungal etkenlere karşı üretilir. Resveratrol, birçok maddeye göre antioksidan özelliği yüksek bir moleküldür. Yaşlanmayı geciktirici etkisinin yanında kan yağlarını düşürücü etkisinde saptanmıştır.



Şekil 2.20. Antioksidan özelliği olan resveratrolün moleküler yapısı [117]

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Bir özel ve bir devlet hastanesi'nde farklı klinik örneklerden otomatize yöntemler ile hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen 50 *Acinetobacter spp.* ve topraktan izole edilen 20 *Acinetobacter spp.* suşu çalışma kapsamına dahil edildi. Elde edilen suşlar, rutin uygulamalar için Triptik Soy Agar (TSA) ve %5 Koyun Kanlı Agar Besiyeri'ne inoküle edilerek 37°C'de inkübe edildi. Bakteriyel tanımlama yapılırken *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Acinetobacter olarak tanımlanan suşlar, bakteriyel sinyal molekülü ekstraksiyonu gibi çalışmalar için kullanılabilme amacıyla TSA'dan %20 gliserollü Luria Bertani sıvı besiyerine inoküle edilerek, 3 paralel halinde -20°C'de muhafaza edildi.

Çalışmalarda kullanılmak üzere Luria Bertani Agar besiyerinde üretilen kültürler, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı'nda tez çalışması süresince stok halinde saklandı. Çalışmada kullanılan antibiyotikler ise Çizelge 3.1'de yer almaktadır. Quorum sensing (çevreyi algılama) sinyal moleküllerinin tespitinde kullanılan biyosensör suşlar ve kontrol suşları Çizelge 3.2.'de belirtilen kaynaklardan temin edildi.

Çalışmalarda elde edilen sonuçlara ait fotoğraflar aksi belirtilmediği takdirde Nikon Coolpix S3200® kullanılarak tarafımızca çekilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler

Antibiyotik Adı	Kullanılan Miktar
Ampisilin sodyum tuzu(Sigma)	100 µg/ml
Tetrasiklin ≥88.0% (HPLC) (Sigma)	50 µg/ml
Gentamisin sülfat tuzu tozu (Sigma)	50 µg/ml
Kanamisin sülfat (Sigma)	20 µg/ml
Spectinomisin dihidrochlorid ≥603 µg/ mg (Sigma)	25 µg/ml
X-gal (5-Chlor-4-Brom-indolyl-β-D-galaktosid)	60 µg/ml

*Antibiyotikler Sigma Aldrich®'ten temin edilmiştir.

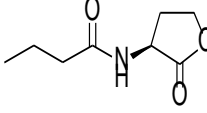
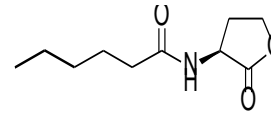
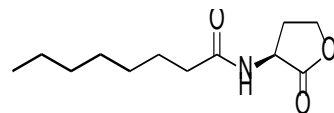
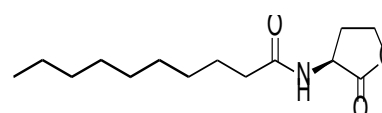
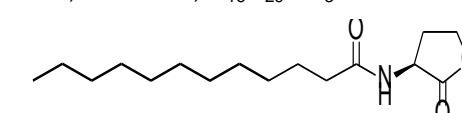
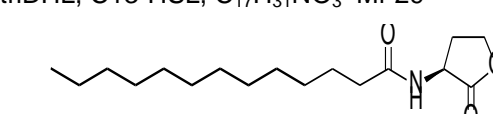
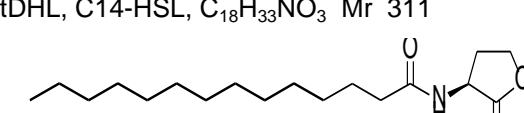
Çizelge 3.2. Kullanılan Bakteri Suşları, Özellikleri ve Kaynakları

Bakteri	Özelliği	Kaynak
<i>Chromobacterium violaceum</i> CVO26	Biyosensör	Prof. Dr. Robert J.C. McLean (Texas State University-San Marcos)
<i>Chromobacterium violaceum</i> 31532	Pozitif Kontrol	
<i>Chromobacterium violaceum</i> 12472	Yabani Tip	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	Biyosensör	Prof. Dr. Stephen K Farrand (University of Illinois at Urbana-Champaign)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 (pCF218) (pCF372)	Biyosensör	Associate Professor Scott Rice (University of New South Wales)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Pozitif Kontrol	Dr. Daniel Lopèz (Julius-Maximilians-Universität Würzburg)
WCF47(pCF218)(pCF372)	Biyosensör	Prof. Dr. Stephen Winans (Cornell University)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 19606)	Kontrol suşu	Doç. Dr. Abbas TANER KORU HASTANESİ
<i>Acinetobacter türleri</i> (A1-A50)	Araştırılan bakteriler	Özel ve Devlet Hastanesi'nden temin edilen klinik örnek
<i>Acinetobacter türleri</i> (T1-T20)	Araştırılan bakteriler	Beytepe Kampüs Toprağı ve Mamak Eski Şehir Çöplüğü'nden alınan toprak örnekleri

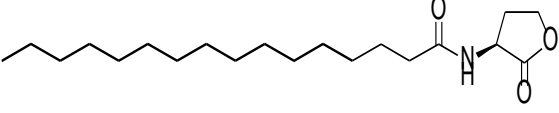
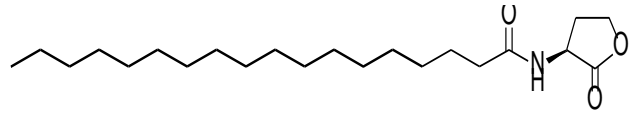
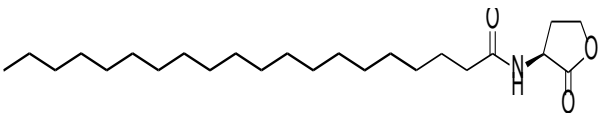
3.2. Quorum Sensing Sinyal Molekülleri

Acinetobacter türlerinde varlığı saptanan quorum sensing sinyal molekülleri Çizelge 3.3. de verilen standartlara göre değerlendirildi. Bu sinyal molekülleri The School of Molecular Medical Sciences, Nottingham University'den temin edilmiştir [197].

Çizelge 3.3. Standart Olarak Kullanılan Quorum Sensing Sinyal Molekülleri

Quorum Sensing Sinyal Molekülü	Moleküler Yapısı
N-Butyryl-L-homoserin lakton	BHL, C4-HSL, C ₈ H ₁₃ NO ₃ Mr 171 
N-Hexanoyl-L-homoserin lakton	HHL, C6-HSL, C ₁₀ H ₁₇ NO ₃ Mr 199 
N-Octanoyl-L-homoserin lakton	OHL, C8-HSL, C ₁₂ H ₂₁ NO ₃ Mr 227 
N-Decanoyl-L-homoserin lakton	DHL, C10-HSL, C ₁₄ H ₂₅ NO ₃ Mr 255 
N-Dodecanoyl-L-homoserin lakton	dDHL, C12-HSL, C ₁₆ H ₂₉ NO ₃ Mr 283 
N-Tridecanoyl-L-homoserin lakton	triDHL, C13-HSL, C ₁₇ H ₃₁ NO ₃ Mr 299 
N-Tetradecanoyl-L-homoserin lakton	tDHL, C14-HSL, C ₁₈ H ₃₃ NO ₃ Mr 311 

Çizelge 3.3. Standart Olarak Kullanılan Quorum Sensing Sinyal Molekülleri (devamı)

Quorum Sensing Sinyal Molekülü	Moleküler Yapısı
<i>N</i> -Hexadecanoyl-L- homoserin lakton	hDHL, C16-HSL, C ₂₀ H ₃₅ NO ₃ Mr 339 
<i>N</i> -Octadecanoyl-L- homoserin lakton	oDHL, C18-HSL, C ₂₂ H ₃₉ NO ₃ Mr 367 
<i>N</i> -Icosanoyl-L- homoserin lakton	IHL, C20-HSL, C ₂₄ H ₄₃ NO ₃ Mr 395 

3.3. Toprak Örneklerinden *Acinetobacter* Türlerinin İzolasyon Ve İdentifikasyonları

Steril koşullar altında toprağın 5 cm derinliğinden alınan toprak örneklerinden 10 gram tartılıp, 100 ml %0.9'luk NaCl çözeltisi içerisine bırakıldı. 30°C'ye ayarlanmış etüv'de 200rpm'de 10 dakika inkübe edilen örneklerden *Acinetobacter* türleri için özel olan Kromojenik *Acinetobacter* agar besiyerine 10⁻³ oranında sulandırılan homojen süspansiyondan 100µl alınarak yayma yöntemi ile ekim yapıldı. 30°C'de 24 saat inkübe edilen örneklerden, pembe koloni oluşturan 20 örnek seçildi. Biyokimyasal olarak da doğrulamak adına Gram boyama, Endo agar, Mac Conkey agar, Leeds *Acinetobacter* Agar Besiyerindeki üremelerinin karşılaştırılmasının yanında Oksidaz ve Katalaz testleri de uygulandı [38,118-122] .

3.4. Bakterilerin Tanımlanması

Kanlı agar besiyerinde üreyen, *Acinetobacter spp.* olarak -20°C'de saklanan 70 kültür örneğinin, *Acinetobacter spp.* olduklarını doğrulamak için aşağıdaki fenotipik testler yapıldı.

3.4.1. Gram Boyama

Temiz bir lam üzerine bir damla bırakılan distile suyun içerisinde Triptik soy agar'da seçilen bir *Acinetobacter* kolonisi süspansiyon edilerek yayıldı. Hazırlanan preparatlar Gram boyama işlemine tabii tutuldu, ardından ışık mikroskopunun 100X'lük objektifinde incelendi.

3.4.2. Endo Agar ve MacConkey Agar Besiyerinde Üremenin Değerlendirilmesi

Acinetobacter türlerinin Gram negatif olmaları nedeniyle örnekler seçici ve ayırt edici besiyeri olan Endo agar ve MacConkey agar besiyerlerine inoküle edildi [123]. Üreyen suşlar diğer testler için triptik soy agar besiyerine inoküle edilmiştir ve bu kültürlerden Gram boyama tekniği ile Gram özellikleri doğrulandı.

3.4.3. Leeds *Acinetobacter* Besiyeri ve Kromojenik *Acinetobacter* Agar Besiyerinde Üremenin Değerlendirilmesi

Acinetobacter türleri için seçici besiyeri olan bu iki besiyeri ile izolatların tür tanımlanması yapıldı [124,125]. Koyu pembe kolonilerin oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

3.4.4. Oksidaz Varlığının Araştırılması

Triptik soy agar besiyerinde üreyen taze kültür örneğinden eküvyonla alınan koloninin üzerine kovaks ayracı damlatıldı [126,127]. Koloninin bulunduğu kısımda 10 saniye içinde mor rengin oluşması pozitif olarak, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi.

3.4.5. Katalaz Varlığının Saptanması

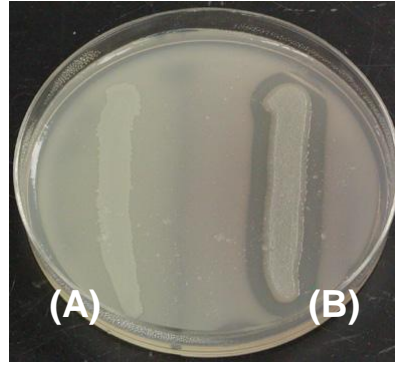
Triptik soy agar besiyerinde üreyen 24 saatlik taze bakteri kültüründen öze yardımıyla az miktarda lam üzerine örnek alınıp, üzerine 2-3 ml %3 H₂O₂ ilave edildi [128]. Oluşan hava kabarcığı ile katalaz test sonucu pozitif olarak değerlendirildi.

3.4.6. Triple Sugar Iron Agar Besiyerinde Üretim

Tek koloni ekimi ile petride tek tek düşen koloniden iğne uçlu öze ile alınan örnek besiyerinin dik kısmına batırılarak sonra yatık kısmının yüzeyinde zik zak çizilerek ekim yapıldı [129] . Ekimler 37°C'de 18–24 saat İnkübe edildi, fermantatif veya nonfermantatif olması incelendi.

3.4.7. DNaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Triptik soy broth besiyerindeki taze kültürden alınan 4µl örnek, Dnaz besiyerinde açılan kuyucukların ortasına bırakıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyonda kalması sağlandı. Petri yüzeyine tüm yüzey kaplanacak şekilde 1N HCl solüsyonu döküldü [130] . Kuyucuğun çevresinde HCl ve DNA birleşmesi sonucu oluşan matlaşma ile Dnaz negatif olarak yorumlandı.



Şekil 3.1. Dnaz agar testi (A; Dnaz negatif, B; Dnaz pozitif) [198]

3.4.8. 44°C'de Üreme

Brain Heart Infüzyon (BHI) broth besiyerinde 24 saat 37°C'de üretilen homojen bakteri kültüründen 0.1ml alınarak, BHI agar besiyerine inoküle edildi ve 44°C'lik etüve konuldu, 24 ve 48 saat sonra üremeleri değerlendirildi.

3.5. *Acinetobacter* Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Hastanelerden toplanan bakteri örneklerinin elde edildikleri klinik materyallere (KM) göre dağılım oranları aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$KM'den elde edilen örnek oranı = \frac{KM'den izole edilen örnek sayısı}{Toplam örnek sayısı} \times 100$$

3.6. *Acinetobacter* Suşlarının Hastane Servislerine Göre Dağılım Oranlarının Hesaplanması

Hastanelerden toplanan bakteri örnekleri elde edildikleri servislere göre dağılım oranları aşağıdaki eşitliğe göre belirlendi.

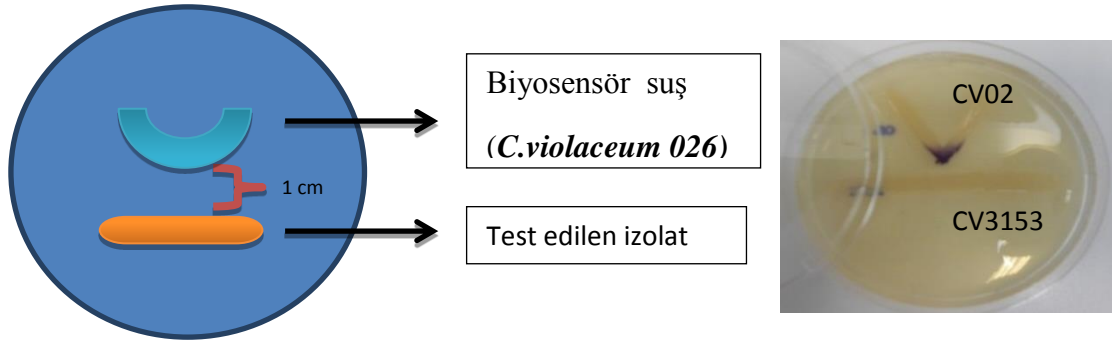
$$\text{Servisdeki örnek oranı} = \frac{\text{Servisten izole edilen örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

3.7. N-açıl Homoserin Laktonun *Acinetobacter spp.* İzolatlarında Tespiti

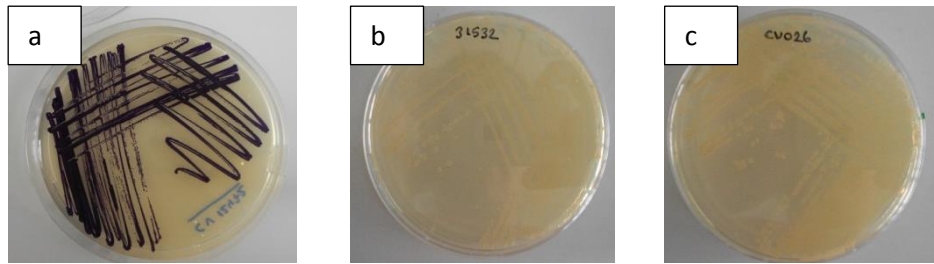
Acinetobacter spp. olarak biyokimyasal testlerle doğrulanan 70 izolatın N-açıl homoserin lakton türü sinyal moleküllerini üretilen üretilmediklerinin tespiti için Çizelge 3.1.'de söz edilen biyosensör bakteri türleri kullanıldı.

3.7.1. *Acinetobacter spp.* İzolatlarının *Chromobacterium violaceum 026* Mutant Suşu ile N-Açıl Homoserin Laktonun Tespiti

Çalışmada kullanılan *Acinetobacter* türlerinin, quorum sensing sinyal molekülü tespiti için topraktan izole edilen suşların 6 saat'lik 30°C'de ve klinik örneklerin 37°C'de Tryptic Soy Broth sıvı besiyerinde inkübe edilen *taze kültürleri kullanıldı*. Açıl homoserin üretimlerinin belirlenmesi için *Acinetobacter spp.* ile biyosensör *C.violaceum 026* suşu arasında 1 cm olacak şekilde yan yana ekildi [1,131,132] (Şekil 3.2). *C.violaceum 026* biyosensör suşundaki renk değişimine göre pozitif veya negatif olarak değerlendirildi. Viyolasin pigmenti üretimini doğrulamak için pozitif kontrol olarak *Chromobacterium violaceum ATCC 12472* ve sinyal molekülü üretimini doğrulamak için *C. violaceum ATCC 31532* pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 3.3.). Ekim işleminin ardından 30°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılan *Acinetobacter* türlerinin quorum sensing sinyal molekülü üretilen üretilmedikleri Luria Bertani Agar'da incelendi. C4-C6 AHL sinyal molekülleri varlığını tespit için yapılan bu test 3'er paralel olarak yapılmıştır [133,134] .



Şekil 3.2. Çapraz doğrulama testinin uygulanışı

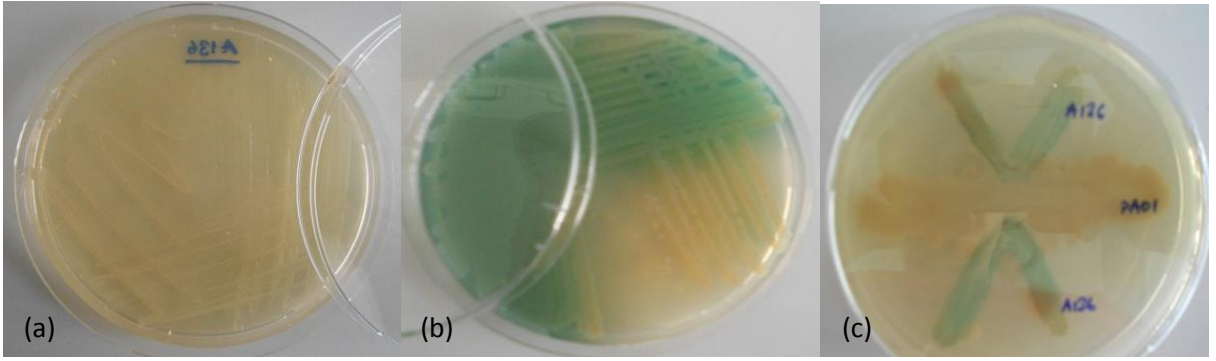


Şekil 3.3. a) *C. violaceum* 12472 b) *C. violaceum* 31532 c) *C.violaceum* 026

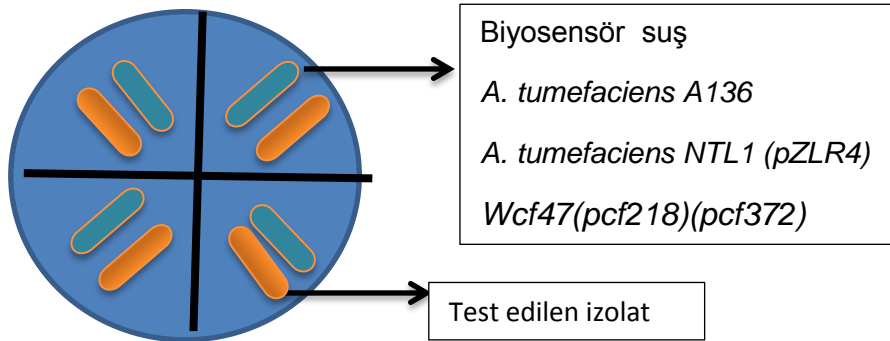
3.7.2. *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218)(pCF372), *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 (pCF218)(pCF372) ve *A. tumefaciens* NTL1 (pZLR4) Mutant Suşları İle N-Açil Homoserin Laktonun Tespiti

A. tumefaciens A136 (pCF218) (pCF372) ve *Agrobacterium tumefaciens* WCF 47 (pCF218)(pCF372) türleri önerildiği gibi içerisinde 50 µg/ml spectinomycin ve 4.5 µg/ml tetracycline bulunan Luria Bertani besiyerine ve *A. tumefaciens* NTL1 (pZLR4) içerisinde 30 µg/ml Gentamisin bulunan Luria Bertani besiyerine inoküle edilip 48 saat 28°C'de inkübasyona bırakıldı [131,135,136] . 3-oxo-C8 AHL ürettiği bilinen *P. aeruginosa* PAO1 pozitif kontrol olarak kullanıldı ve LB agar besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.4). *Acinetobacter* türleri, N-Açil homoserin laktonun tespiti için, 37°C'de 24 saat'lik Tryptic Soy Broth hazır besiyerinde üretildi. *Acinetobacter* türleri aralarında 1cm olacak şekilde seçilen *Agrobacterium tumefaciens*'in sensör suşlarından biri ile (*Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218)(pCF372)), *Agrobacterium tumefaciens* WCF 47 (pCF218)(pCF372), *A. tumefaciens* NTL1 (pZLR4)) yanyana ekilir. Daha önceden cam boncuklar

yardımıyla seril koşullar altında %0.2 Mannitol içeren AB Mineral agar besiyerinin yüzeyine X-gal yayılır (Şekil 3.5.). Ekim işleminin ardından 30°C'de 72 saatlik inkübasyona bırakılan *Acinetobacter* türlerinin quorum sensing sinyal molekülü üretip üretmedikleri incelendi [137,138] . Quorum sensing tespitinde kullanılan besiyeri AB Mineral Besiyeri'dir. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 25dk otoklavda steril edildi. 60µg/ml X-gal steril edilen besiyeri yüzeylerine eklenmiş ve cam boncuklar yardımıyla yüzeye yayılması sağlanmıştır. Güneş ışığına maruz kalmadan çeker ocakta besiyeri yüzeyi kurutulmuştur. C4-C12 AHL sinyal molekülleri varlığını tespit için yapılan bu test üçer kez tekrarlandı. *Acinetobacter* türleri yukarıda anlatıldığı şekilde AB medium agar besiyerine inoküle edilip 28°C'de 48 saat inkübe edildi [3] .



Şekil 3.4. (a) *A. tumefaciens* A136 , (b) *P. aeruginosa* PAO1, (c) C4-C12 AHL molekülü doğrulama testi için pozitif kontrol olan *P.aeruginosa* PAO1 suşu, *A. tumefaciens* A136 biyosensör suşu ile yanyana inoküle edilerek kullanıldı.



Şekil 3.5. *Agrobacterium tumefaciens* türlerinin çapraz doğrulama için uygulaması

3.8. Bakteri Üreme Eğrisinin Türbidometrik Yöntemle Belirlenmesi

N- açıl homoserin lakton bakterilerin üssel üreme fazında yüksek oranda üretilir, bu nedenle her bir bakterinin üreme eğrisi çıkarıldı. *Acinetobacter* olarak belirlenen ve N-açıl Homoserin Lakton üretimi pozitif olan izolatlar, Triptik soy broth besiyerine inoküle edildi. Toprakten izole edilen izolatlar 30°C'de ve klinik izolatlar 37°C'de 150 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Her saat başı spektrofotometre (UV-1700 Spektroformetre, Shimadzu®)'de 600nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre üreme grafiği oluşturuldu.

3.8.1. N-Açıl Homoserin Laktonun *Acinetobacter Spp.* Kültür Ortamından Ekstraksiyonu

N-Açıl Homoserin Lakton ürettiği saptanan *Acinetobacter* suşları, sinyal molekülü ekstraksiyonu için bir öze dolusu kültürden alınıp, 25ml triptik soy broth sıvı besiyerinde 12 saat 37°C'de üretildi. Elde edilen kültürler, 4°C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktarılıp, üzerine eşit hacimde %0,1 asetik asit içeren etil asetat çözeltisi eklendi. Yeni bir tüpe aktarılan organik fazın büyüklüğü 0.2µm (non-pyrogenic, Sartorius) olan steril şırınga ucu filtreden süzüldü. Ardından çeker ocak içerisinde oda sıcaklığında 1 hafta süreyle etil asetatın uzaklaştırılması için beklendi [137,139,140] . Tamamen uçurulan organik fazın olduğu tüplerdeki kalıntı 50µL metanol içerisinde çözülerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.8.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Açıl-Homoserin Lakton Sinyal Moleküllerinin Ayrımı

Metanol içerisinde çözülen sinyal molekülleri ters faz TLC plakalarına (RP-18 F254; Merck) başlangıç noktasına göre her bir örnek yükleme alanı 1.5 cm aralık olacak şekilde uygulandı. Hareketli faz olarak Kloroform-metanol (95:5, v/v), hazırlandı. Hareketli fazın ince tabaka plakasının üst kısmının 2cm altına kadar ilerlemesi sağlandı. Ayrım işlemi tamamlandıktan sonra TLC plakaları çeker ocak içerisinde 2 saat kurumaya bırakıldı. Moleküllerin ayrımında biyosensör bakterisi olarak *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218)(pCF372) kullanıldı. Kurutulan TLC plakalarının üzerine %0.9 agar içeren 50ml AB mineral yumuşak agar besiyeri (50°C) + 10ml *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218)(pCF372) (48

saat'lik 100ml) kültürü ve X-gal (60µg/ml) eklenerek yayılması sağlandı. Besiyeri katılaştınca TLC plakası 30°C'de 24 saat inkübe edildi [137,141,142] . Test sırasında negatif kontrol olarak metanol kullanıldı. Standart olarak C4-AHL, C6-AHL, C8-AHL, C10-AHL, C12-AHL, C13-AHL, C14-AHL, C16-AHL, C18-AHL, 20-AHL sinyal molekülleri kullanıldı. AHL moleküllerinin bulunduğu bölgeler, beyaz zemin üzerinde yeşilimsi nokta oluşumuyla belirlendi. Rf değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki eşitlik kullanıldı [143,144] . Plakanın tanka yerleştirilmesinden önce tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilir. Ayrılan maddelerin lekelerinin belirlenmesi ve kullanılan reaktifler kağıt kromatografisinde olduğu gibidir.

Ayrılan maddeler görülür hale getirildikten sonra çözücü yardımıyla madde içerisindeki farklı bileşiklerin belli noktalara ilerlediği gözlenir. Her maddenin hareketli faz ile sürüklenmeleri farklıdır. Böylece her madde için uygulanan koşullar belirtilerek karakteristik değerler verilebilir. Buna sürüklenme derecesi veya alıkonma faktörü denir ve R_f ile gösterilir.

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol (Sx, cm)}}{\text{Çözücünün orjinden itibaren aldığı yol (Sf, cm)}}$$

3.9. *Acinetobacter Spp.* İzolatlarında Quorum Sensing Mekanizması İle Düzenlenen Biyofilm Oluşturma Yetenekleri Ve Siderofor Üretiminin Tespiti

Acinetobacter olarak tanımlanan bakterilerden, quorum sensing molekülüne sahip olan türlerin, bu sistem tarafından düzenlenen biyofilm ve siderofor üretimi araştırıldı.

3.9.1. *Acinetobacter Spp.* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Tespiti

Klasik bir yöntem olan kristal viyole metodu ile biyofilm oluşumu tespit edildi. Triptic soy broth besiyerinde 30°C veya 37°C'de 24 saat inkübe edilen *Acinetobacter spp.* izolatları, optik dansite değeri 600nm'de 0.05 olacak şekilde TSB besiyeri ile dilüsyonları yapılan kültür örneklerinden 50ml'lik TSB besiyerlerine 100µl inokülasyon gerçekleştirildi. Ekim yapılan bu ortamlar 200rpm'e ayarlanmış çalkalamalı etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 24 kuyucuklu polistren plakların her bir kuyucuğuna 900µl TSB besiyeri +

100µl *Acinetobacter* örneği eklendi. 30°C veya 37°C'de üretilen kültürler için 24 ve 48 saatlik olmak üzere iki farklı deney düzeneği hazırlandı. Kültürasyonun ardından plaklardan besiyeri boşaltıldı ve her bir kuyucuk 3 kez 1XPBS tamponu ile yıkandı. Daha sonra bu plakların kuyucukları 65°C'ye ayarlanan etüv'de kurutuldu. %1 kristal viyole çözeltisi ile 2 dk süreyle boyanmaları sağlandı. Boya işleminin bitiminde kuyucuklar distile su ile 3 kez yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. %30'luk asetik asit çözeltisi ile çözülen kuyucuklardaki kristal viyole çözeltisi 595nm'de spektrofotometrede kontrole karşı ölçüldü ve *Acinetobacter* türlerinin biyofilm oluşturma yetenekleri belirlendi [145-147] .

Ek bir çalışma olarak gram negatif bakteriler tarafından yaygın kullanılan ve *Chromobacterium violaceum* 31532 bakterisinden izole edilen C6-AHL molekülü'nün *V.harveyi*, *A. tumefaciens* A136, *B. subtilis* 3610, *B. subtilis* 6633, *B.megaterium*, *S.epidermitis* WT, *S. aureus* Newmann, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA14, *E. aerogenes*, *Salmonella typhi*, *E. coli* XL1, *E. coli* DH5α , *S.aureus* USA300, *K. pneumoniae* gibi bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri üzerine etkisi de araştırıldı.

3.9.2. *Acinetobacter* spp. İzolatlarının Siderofor Üretiminin Tespiti

Acinetobacter türleri de asinetobaktin adı verilen sideroforları üretirler. Düşük demir varlığında siderofor üretimi, Schwyn ve Neiland'ın kullandığı yöntem esas alınarak, Chrome Azurol-S (CAS) agarda fenotipik olarak araştırıldı [148-152] . Besiyerinin mavi renginin turuncuya dönüşmesi, siderofor üretiminin göstergesi olarak değerlendirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. CAS agar besiyerinde siderofor üretimi [199]

3.10. Antioksidan Özelliğe Sahip Quercetin Ve Resveratrol Molekülünün Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi

Doğal bir bileşik ve antioksidan özelliğe sahip olan Quercetin (Sigma Aldrich) ve Resveratrol'ün (Sigma Aldrich) farklı konsantrasyonları çalışmada anti-quorum sensing aktivitesini gözlemlemek için kullanıldı. Quercetin dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde ve resveratrol etanol içerisinde çözüldü. C6-AHL (*N*-Hexanoyl-L-homoserin lakton) molekülü; Gram negatif bakteriler tarafından sıklıkla iletişim molekülü olarak kullanıldığı için bu molekül üzerinde anti-quorum sensing aktivite deneyleri yapıldı. Nottingham Üniversitesi'nden temin edilen saf *N*-Hexanoyl-L-homoserin lakton molekülü 2mg/ml (etil asetat) olacak şekilde hazırlanarak kullanıldı.

3.10.1. Anti-Quorum Sensing Disk Difüzyon Ve Agar Difüzyon Testi

30°C'de 18 saat üretilen *C. violaceum* 026 biyosensör suşu kültür bulanıklığı Mc Farland 0.5'e (10^8 cfu/ml) göre ayarlandıktan sonra, 10ml yumuşak Luria Bertani agar besiyerine 100µl *C. violaceum* 026 ve 50µl C6-HSL ekstraktı eklendi. Katılaştıran yumuşak LB- agar besiyerinin üzerine farklı konsantrasyonlarda (2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 mg/ml) quercetin veya resveratrol emdirilmiş diskler yerleştirilip, inkübasyon için 30°C'de 48 saat etüvde bırakıldı.

Agar difüzyon testi için; %0.9 agar, 100µl *C. violaceum* 026 ve 50µl C6-HSL ekstraktı bulunan LB besiyeri katılaştığında 4mm genişliğinde kuyucuklar açıldı. Açılan bu kuyucuklara farklı konsantrasyonlardaki (2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 mg/ml) quercetin veya resveratrol eklendi. Petriler 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Agar difüzyon ve disk difüzyon testleri üçer kez tekrarlandı [12,13,153-156] .

3.10.2. Quercetin Ve Resveratrol'ün Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi

Çizelge 3. 4.'te verilen miktarlar doğrultusunda farklı konsantrasyonlardaki (2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 mg/ml) quercetin veya resveratrol ependorf tüplere eklendi. İnkübasyon sonucunda oluşan viyolasin pigment miktarı spektrofotometrede 585nm'de ölçülerek anti-quorum sensing aktivitesi saptandı.

Çizelge 3. 4. Quercetin'in ve Resveratrol'ün Uygulama Tablosu

İçerik	A (µl)	B (µl)	C(µl)	Final Konsantrasyonu
Luria Bertani Broth	895	890	890	
CV026	100	100	100	1x10 ⁸ cfu/ml
C6-AHL	50	50	50	150µmol/ml
Quercetin	-	-	5	Resveratrol veya quercetin'nin
Resveratrol	-	-	5	farklı konsantrasyonları (2,5,10,50,100,150,200,250 mg/ml)
DMSO veya Etanol	-	5	-	
Toplam hacim	1045	1045	1045	

3.10.2.1. Viyolasin Pigment İzolasyonu

Sıvı kültürden viyolasin pigmenti ekstraksiyonu Blosser ve Gray'in önerdiği şekilde yapıldı. LB besiyerinde üretilen *Chromobacterium violaceum* 026 suşunun 15 saatlik 20ml taze kültüründen 100µl alınarak Çizelge 3.4'de verilen prosedür çerçevesinde olacak şekilde 1ml LB besiyerine ekim yapıldı. 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılan kültür vorteks ile karıştırıldı ve bu tüpten 200µl kültür alınıp 1,5ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Hücrelerin parçalanması için üzerine 200µl %10 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenip 5 dakika vortekslendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Viyolasin pigmenti izolasyonu için suyla doyurulmuş butanol 900µl (50ml n-butanol + 10ml distile su olarak) tüpe eklendi ve 5 saniye vortekslendi. Daha sonra 10.000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz yeni bir tüpe aktarılarak 585 nm'de mikroplate spektrofotometre'de (SpectraMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA®) okundu ve viyolasin miktarı tespit edildi [157] .

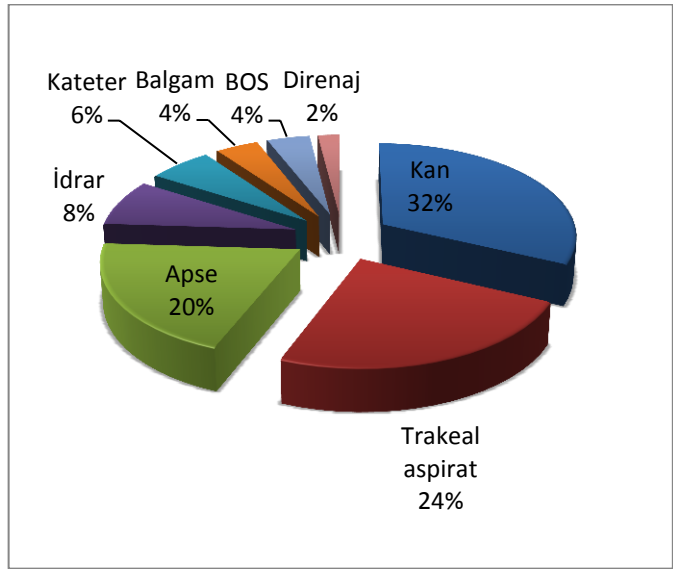
4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

İki ayrı hastaneden elde edilen, farklı klinik servislerden gönderilmiş ve nozokomiyal enfeksiyona yol açtığı belirlenmiş, otomatize sistemlerce *Acinetobacter spp.* olarak tanısı konmuş 50 ve toprak örneklerinden izole edilmiş 20 *Acinetobacter spp.* çalışma kapsamına alınmıştır.

Çalışmaya alınan ve nozokomiyal etken olan 50 *Acinetobacter spp.*'nin %32'si kan, %24'ü trakeal aspirat, %20'si apse, %8'i idrar, %6'sı kateter, %4'ü balgam, %4'ü BOS ve %2'si direnaj örneğinden izole edilmiştir. Bu suşların örneklere göre dağılımı şekil 4.1. de verilmiştir.

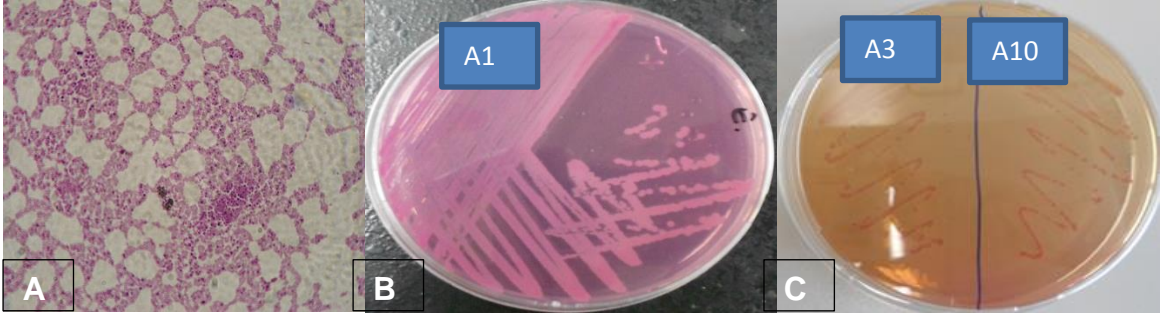
Örnek Türü	Örnek Sayısı (%)
Kan	16 (32)
Trakeal aspirat	12 (24)
Apse	10 (20)
İdrar	4 (8)
Kateter	3 (6)
Balgam	2 (4)
BOS	2 (4)
Direnaj	1 (2)
Toplam	50 (100)



Şekil 4.1. Nozokomiyal etken olarak tanımlanan *Acinetobacter* türlerinin izolasyon kaynakları

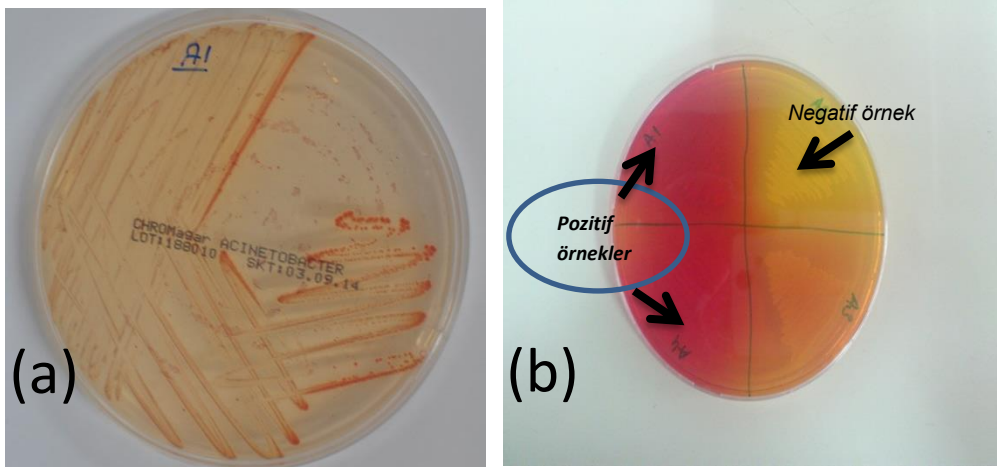
4. 2. Nozokomiyal ve Toprakta İzole Edilen *Acinetobacter* Suşlarının Tanısı

Nozokomiyal ve toprak örneklerinin Gram boyanması sonucunda Gram negatif kokobasil morfolojisinde oldukları saptandı (Şekil 4. 2.). Endo agar ve MacConkey agar besiyerine inoküle edilen örneklerin üremeleri sonucunda laktozu kullanamadıkları saptandı (Şekil 4. 2.).



Şekil 4. 2. A. *Acinetobacter* spp. 'nin ışık mikroskobu x100 objektif altındaki görüntüsü, B. Endo Agar'da üreme sonucu ve C. MacConkey Agar'da üreme sonucu (Laktoz negatif sonuç)

Çeşitli örneklerden izole edilen bakterilerin *Acinetobacter* olarak tanımlanabilmesi için seçici besiyerleri de kullanıldı. Özellikle birçok hastane ve çalışmada kullanılan kromojenik *Acinetobacter* agar besiyeri ve Leeds *Acinetobacter* Agar besiyeri çalışma kapsamında kullanıldı. Hastane ve toprak izolatlarının tamamının bu seçici besiyerlerinde üremeleri bu bakterilerin *Acinetobacter* türü olduğunu göstermiştir (Şekil 4. 3.).

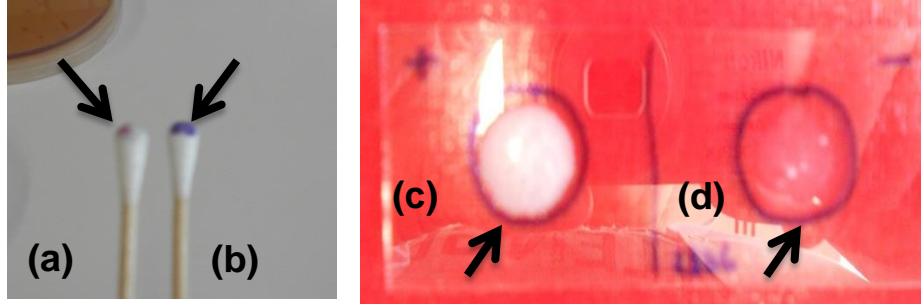


Şekil 4.3. Kromojenik *Acinetobacter* Seçici Besiyeri (a) ve Leeds *Acinetobacter* Seçici Besiyeri (b)'nde üreyen koloniler

Acinetobacter türlerinin tanımlanmasında önemli bir test olan oksidaz testi sonucunda tüm izolatların oksidaz negatif oldukları görüldü (Şekil 4. 4.). Katalaz enziminin *Acinetobacter* türlerinde sentezlenip sentezlenmediğini saptamak adına yapılan katalaz testi sonucunda, 70 bakteri örneğinin katalaz enzimini üretebildiği belirlendi (Şekil 4. 4.). Katalaz enzimi sayesinde bakteri metabolizma için toksik bir

molekül olan hidrojen peroksidi parçalar, tepkime sonucunda metabolizmal faaliyetlerde kullanabileceği su ve oksijeni kazanır. Metabolizmal faaliyetleri için üretebildikleri katalaz enzimi zorunlu aerob *Acinetobacter* türlerinin bir çok ortama kolay adaptasyonunu sağlar.

Şekil 4. 4. Oksidaz Testi (a; Oksidaz negatif, b; oksidaz pozitif) , Katalaz testi



(c;Katalaz pozitif, d; Katalaz negatif)

Saf kültür olarak izole edilen örneklerin enterik bakterilerden ayrılabilmesi için triple sugar iron agar besiyerine inokülasyon gerçekleştirildi. Tüm bakteri örnekleri TSI besiyerinde üremesine rağmen karbonhidrat kaynağı olarak besiyerinde bulunan glukoz, sukroz ve laktozun kullanılmadığı dolayısıyla izolatların nonfermentatif oldukları saptandı (Şekil 4. 5.). Besiyerinin dik ve yatık kısmında asit oluşumuna bağlı olarak sarı rengin gözlenmemesi bakterinin nonfermentatif olduğunu göstermektedir. Isıya dayanıklı deoksiribonukleaz (Dnaz) enzimi ile hücre çekirdeğinde bulunan deoksiribonukleik asidi (DNA) degrades ederek ayrıştırmasına dayanan Dnaz testi sonucuna göre *Acinetobacter* türleri Dnaz aktivitesine sahip değildirler (Şekil 4. 5.).

Deoksiribonükleaz (Dnaz) enzimi, nükleik asitlerin yapısında bulunan fosfodiester bağlarına etki eden ve DNA'nın eşlenmesi sırasında oluşan hatalı bölgeleri tanıyan ve bu kısımların uzaklaştırılmasını sağlayan bir nükleaz'dır. Dnaz, *Acinetobacter*ler için virülans özelliği değildir.



Şekil 4.5. TSI agar besiyerinde üreme (Negatif Sonuç)

Çalışmamızda kullanılan *Acinetobacter* suşlarının Gram özelliği, Endo agar ve MacConkey agar'da üreme durumları, oksidaz aktivitesi, katalaz aktivitesi ve Dnaz aktivitesi, üç şekerli demirli besiyerinde asit ve gaz oluşturma yeteneği, 44°C üreme özelliği, hemoliz yapabileme yeteneği kontrol edilerek identifikasyonları gerçekleştirildi. İncelenen suşların sayısı, uygulanan testler ve bu testlerin sonuçları Çizelge 4. 1. Ve Çizelge 4. 2.'de gösterildi.

Test sonuçları incelendiğinde hastanelerden alınan örnekler Vitek-32 otomatize sisteminin verilerine uyumlu olarak *A. baumannii* olarak tanımlandı. Ayırıcı özellik olarak suşların 44°C üremeleri dikkate alındı. Pek çok patojen bakterinin 44°C'de üreyebildiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir [120] . Örneğin *E.coli*' nin fekal koliform olarak isimlendirmesinde 44°C'de üreyen olması bu duruma bir örnek oluşturmaktadır. *A. baumannii* olarak isimlendirilen türlerin hasta materyalinden elde edilmiş olmaları bu nedenle beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Dört farklı toprak örneğinden izole edilen ve *Acinetobacter* türlerinin tanımlanması için uygulanan testler sonucunda T2,T4,T8,T13 ve T17 suşları hemoliz yapmaları nedeniyle *Acinetobacter haemolyticus*; T1 ,T5 ,T6 ,T7,T9 ,T11 , T12 ,T14 ,T16 ,T18 ,T19 ve T20 suşları ise 44°C üreyebildikleri için *A.baumannii* olarak tanımlandı. T3,T10 ve T15 suşlarının hemoliz yapamamaları ve 44°C'de

Çizelge 4.1.Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarının toplu test sonuçları

İzolat no	Kültür	Vitek-32	Endo Agar		MacConkey Agar		Kanlı Agar	Leeds Acinetobacter Agar	Kromojenik Acinetobacter Agar	Oksidaz Testi	Katalaz Testi	DNaz Testi	TSI Agar	44°C'de Üreme
		İzolat	Üreme	Laktöz K.	Üreme	Laktöz K.	Hemoliz	Üreme	Üreme					
A1	Kateter	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A2	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A3	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A4	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A5	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A6	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A7	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A8	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A9	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A10	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A11	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A12	Kateter	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A13	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A14	İdrar	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A15	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A16	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A17	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A18	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A19	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A20	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+

A1-A20 *Acinetobacter* spp., Vitek-32; bakteri tanımlama otomatize sistem, TSI; üç şekerli demirli besiyeri

Çizelge 4.1. Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarının toplu test sonuçları (devamı)

İzolat no	Kültür	Vitek-32	Endo Agar		MacConkey Agar		Kanlı Agar	Leeds Acinetobacter Agar	Kromojenik Acinetobacter Agar	Oksidaz Testi	Katalaz Testi	DNaz Testi	TSI Agar	44°C'de Üreme
		İzolat	Üreme	Laktöz K.	Üreme	Laktöz K.	Hemoliz	Üreme	Üreme					
A21	İdrar	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A22	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A23	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A24	İdrar	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A25	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A26	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A27	Balgam	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A28	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A29	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A30	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A31	Direnaj	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A32	Kateter	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A33	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A34	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A35	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A36	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A37	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A38	Balgam	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A39	BOS	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
A40	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+

A21-A40; *Acinetobacter* spp., Vitek-32; bakteri tanımlama otomatize sistem, TSI; üç şekerli demirli besiyeri

Çizelge 4.1 Nozokomiyal *Acinetobacter* izolatlarının toplu test sonuçları (devamı)

İzolat no	Kültür	Vitek-32	Endo Agar		MacConkey Agar		Kanlı Agar	Leeds Acinetobacter Agar	Kromojenik Acinetobacter Agar	Oksidaz Testi	Katalaz Testi	Dnaz Testi	TSI Agar	44°C'de Üreme
		İzolat	Üreme	Laktoz K.	Üreme	Laktoz K.	Hemoliz	Üreme	Üreme					
A41	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A42	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A43	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A44	BOS	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A45	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A46	İdrar	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A47	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A48	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A49	Abse	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
A50	Kan	<i>A.baumannii</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+

A41-A50 *Acinetobacter* spp., Vitek-32; bakteri tanımlama otomatize sistem, TSI; üç şekerli demirli besiyeri

Çizelge 4.2. Toprakta izole edilen *Acinetobacter* izolatlarının toplu test sonuçları

İzolat no	Kültür	Endo Agar		MacConkey Agar		Kanlı Agar	Leeds Acinetobacter Agar	Kromojenik Acinetobacter Agar	Oksidaz Testi	Katalaz Testi	DNaz Testi	44°C'de Üreme	TSI Agar
		Üreme	Laktoz K.	Üreme	Laktoz K.	Hemoliz	Üreme	Üreme					
T1	Toprak 1	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T2	Toprak 2	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
T3	Toprak 2	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
T4	Toprak 4	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
T5	Toprak 3	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T6	Toprak 1	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T7	Toprak 4	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T8	Toprak 2	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
T9	Toprak 4	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T10	Toprak 4	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
T11	Toprak 1	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T12	Toprak 4	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T13	Toprak 4	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
T14	Toprak 4	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T15	Toprak 1	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
T16	Toprak 3	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T17	Toprak 2	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
T18	Toprak 1	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T19	Toprak 4	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
T20	Toprak 3	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-

T1-T20 *Acinetobacter* spp., TSI; üç şekerli demirli besiyeri

ürememeleri bu izolatların *Acinetobacter calcoaceticus* olarak tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

Dortet ve ark. yaptıkları çalışmayla sıcaklığın ve kanlı agar besiyerinde hemolitik üremenin *Acinetobacter* türleri arasındaki ayırmda önemli olduğunu vurgulamışlardır [158] . Bu ayırım rutin laboratuvar uygulamalarında sıklıkla başvuru olan bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır [159] . Bu bağlamda topraktan ve klinik izolatların tanımlanmasında kullandığımız testlerin sonuçlarının uyumlu olduğu saptandı.

Nozokomiyal enfeksiyona neden olan *Acinetobacter* türlerinin servislere ve hasta cinsiyetine göre dağılımı Çizelge 4.3'te, cinsiyetlere göre *Acinetobacter* türü bakterilerin görülme sıklığı Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu verilere göre erkek hastalarda *Acinetobacter* türlerinin daha fazla görüldüğü saptanmıştır. Çizelge 4.4.'teki verilere göre örneklerin klinik servislere göre dağılımları incelendiğinde bu bakterilerin hastanelerin her ortamından kolaylıkla izole edilebileceğini göstermiştir.

Trottier ve ark yaptığı çalışmanın verilerine göre yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Acinetobacter* türlerinin erkek hastalarda daha yaygın enfeksiyona sebep olduğu vurgulanmış, bu durum bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir [160] .

Çizelge 4.5.'de verilen *Acinetobacter* örneklerinin gönderildiği klinik servisler ve örnek sayıları ile ilgili bulgular *Acinetobacter* türlerinin hastanelerin her alanına kolayca kolonize olabildiklerini, özellikle ameliyat öncesi bazı testlerin yapıldığı Reanimasyon/Anesteziyoloji departmanlarında %32 gibi bir yüksek oranda bulunduğu göstermektedir. Reanimasyon/Anesteziyoloji departmanını %14 oranı ile acil, genel cerrahi, nöroşirürji takip etmektedir. %6'luk oran ile dermatoloji ve nefroloji ardından üroloji ve nöroloji %4 oranı ile bunları takip etmektedir. En düşük oran olan %2 ise gastroloji ve göğüs cerrahisi ile transplantasyon ünitelerini kapsamaktadır.

Çizelge 4.3. Nozokomiyal *Acinetobacter spp*'lerin klinik özellikleri

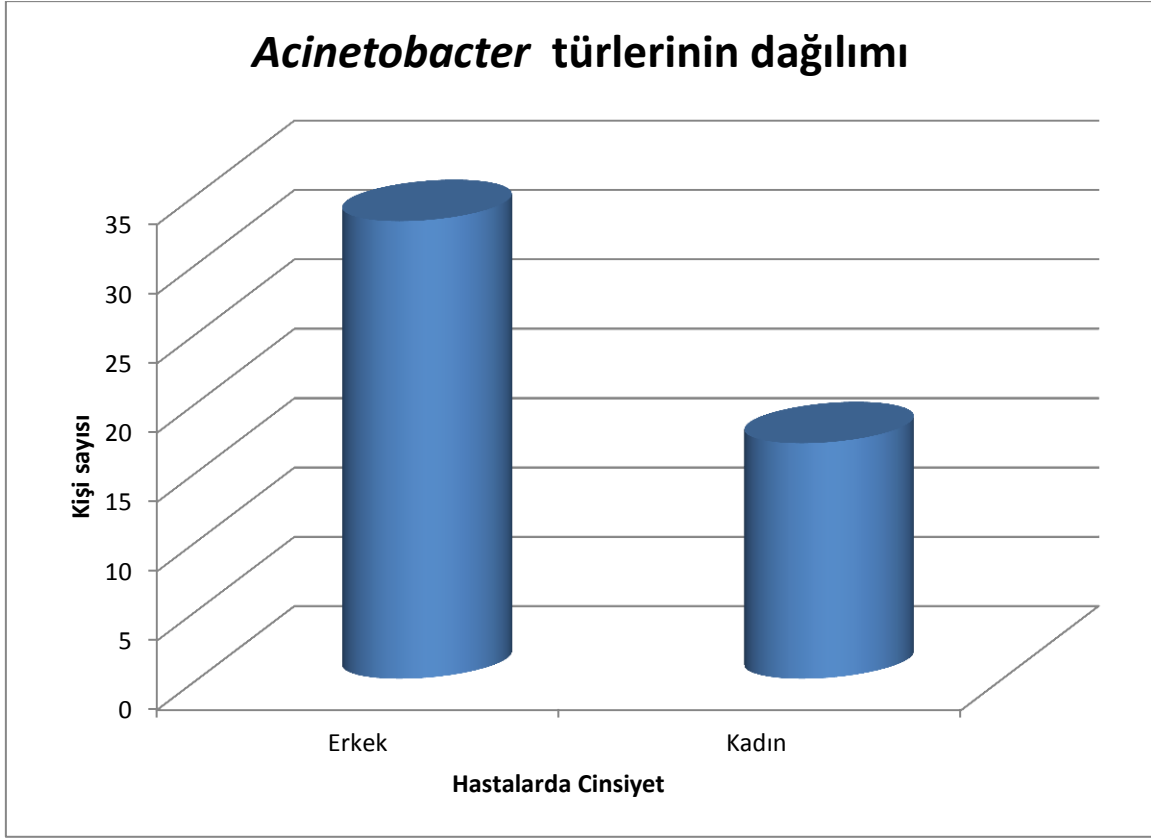
İzolasyon no	Kültür	Vitek-32	Cinsiyet	Klinik Servisi
		İzolasyon		
A1	Kateter	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/ Anesteziyoloji
A2	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A3	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Acil
A4	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A5	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Acil
A6	Kan	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A7	Kan	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A8	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Dermatoloji
A9	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Acil
A10	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A11	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Genel Cerrahi
A12	Kateter	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Nöroşirürji
A13	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Genel Cerrahi
A14	İdrar	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Üroloji
A15	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A16	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Genel Cerrahi
A17	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Acil
A18	Abse	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Nöroşirürji
A19	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A20	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Dermatoloji
A21	İdrar	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Gastroloji
A22	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A23	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Nöroşirürji
A24	İdrar	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Genel Cerrahi
A25	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Acil
A26	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Genel Cerrahi
A27	Balgam	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Nöroşirürji
A28	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Genel Cerrahi
A29	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A30	Kan	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A31	Direnaj	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Transplantasyon
A32	Kateter	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A33	Kan	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A34	Abse	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Genel Cerrahi
A35	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Nöroloji

A1-A25: Özel hastaneden toplanan *Acinetobacter* suşları; A26-A50: Devlet Hastanesi'nden toplanan *Acinetobacter* suşları'dır.

Çizelge 4.3. Nozokomiyal *Acinetobacter spp*'lerin klinik özellikleri (devamı)

İzolasyon no	Kültür	Vitek-32	Cinsiyet	Klinik Servisi
		İzolasyon		
A36	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Nöroşirürji
A37	Kan	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A38	Balgam	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Nefroloji
A39	BOS	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Nöroşirürji
A40	Kan	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A41	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Reanimasyon/Anesteziyoloji
A42	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Acil
A43	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Nöroloji
A44	BOS	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Nöroşirürji
A45	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Dermatoloji
A46	İdrar	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Nefroloji
A47	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Acil
A48	Trakeal aspirat	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Göğüs Cerrahisi
A49	Abse	<i>A.baumannii</i>	Erkek	Üroloji
A50	Kan	<i>A.baumannii</i>	Kadın	Nefroloji

A1-A25: Özel hastaneden toplanan *Acinetobacter* suşları; A26-A50: Devlet Hastanesi'nden toplanan *Acinetobacter* suşları'dır.



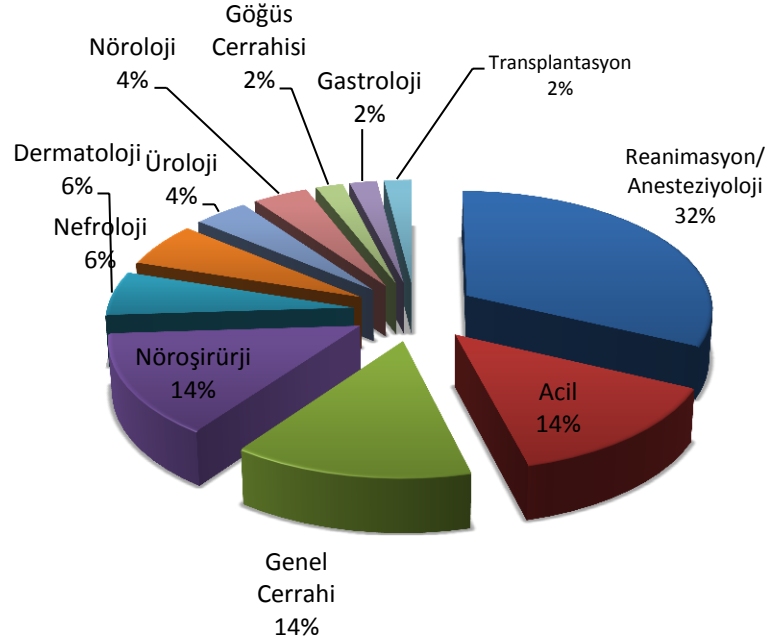
Şekil 4.6. Nozokomiyal etken olarak tanımlanan *Acinetobacter*'lerin hasta cinsiyetlerine göre dağılımı

Çizelge 4.4. Klinik servislerden gönderilen *Acinetobacter* örneklerinin dağılımları

Klinik servis	Kan	Trakeal aspirat	Apse	İdrar	Kateter	Balgam	BOS	Dire naj
Reanimasyon/Anesteziyoloji	9	3	2	-	2	-	-	-
Acil	2	4	1	-	-	-	-	-
Genel Cerrahi	2	1	3	1	-	-	-	-
Nöroşirürji	1	1	1	-	1	1	2	-
Dermatoloji	1	-	2	-	-	-	-	-
Nefroloji	1	-	-	1	-	1	-	-
Üroloji	-	-	1	1	-	-	-	-
Nöroloji	-	2	-	-	-	-	-	-
Göğüs Cerrahisi	-	1	-	-	-	-	-	-
Gastroloji	-	-	-	1	-	-	-	-
Transplantasyon	-	-	-	-	-	-	-	1
TOPLAM	16	12	10	4	3	2	2	1

Çizelge 4.5. *Acinetobacter* örneklerinin gönderildiği klinik servisler ve gönderilen örnek sayıları ile *Acinetobacter* örneklerinin gönderildiği klinik servislere göre örneklerin yüzdesi

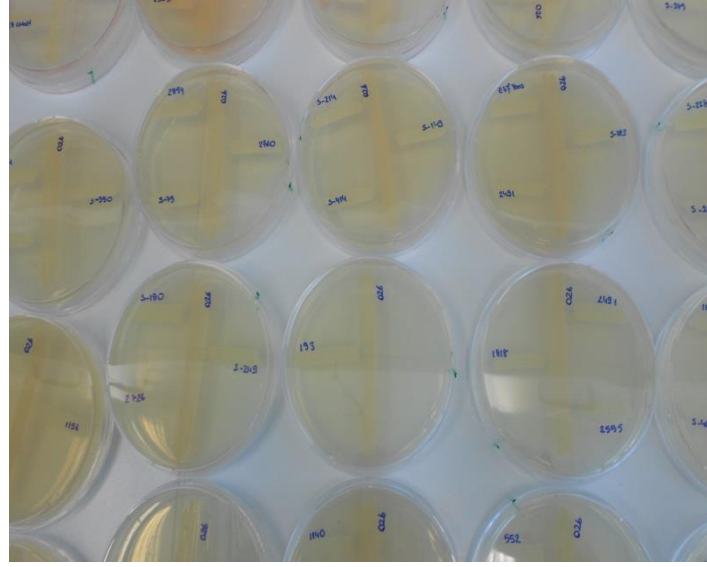
Klinik servis	Örnek sayısı
Reanimasyon/ Anesteziyoloji	16
Acil	7
Genel Cerrahi	7
Nöroşirürji	7
Dermatoloji	3
Nefroloji	3
Üroloji	2
Nöroloji	2
Göğüs Cerrahisi	1
Gastroloji	1
Transplantasyon	1
TOPLAM	50



4.3. *Acinetobacter* spp. İzolatlarının *Chromobacterium violaceum* 026 Mutant Suşu Kullanılarak Çapraz Doğrula Metodu İle N-Açil Homoserin Laktonun Üretimlerinin Saptanması

Daha öncede söz konusu edildiği gibi *Chromobacterium violaceum* 026 biyosensör suşu C4-C6 AHL moleküllerini saptamada kullanılır. Bu moleküllerin varlığında viyolasin pigmenti üretimi tetiklenir ve CV026 mor pigment üretir. Araştırmamızda *Acinetobacter* türleri ile yapılan çapraz doğrulama testi sonuçlarına göre *Acinetobacter* türleri düşük karbon sayısı içeren homoserin laktonları üretmemektedir (Şekil 4.7). Bazı araştırmacıların verilerine göre *Acinetobacter* türleri kısa zincirli sinyal moleküllerini hem düşük oranda üretmekte hemde degrade edebilmektedir [161,162]. Bu nedenle *Acinetobacter*'lerin üretebildikleri kısa zincirli moleküllerin tespiti ancak LC-MS, GC-MS ve Maldi-tof gibi kompleks cihazlarla mümkün olmaktadır. Dolayısıyla kısa zincirli sinyal molekülleri yüksek oranda üretilmediğinde biyosensör suşlar yardımıyla tespit edilememektedir [141]. Bu nedenle bu çalışmada mor pigmentin görülmemesi belki de kısa zincirli

homoserin lakton üretiminin yüksek oranda olmaması ya da suşların molekülleri hızla degrade edebilmeleri nedeniyle de olmuş olabileceği düşünülmektedir.

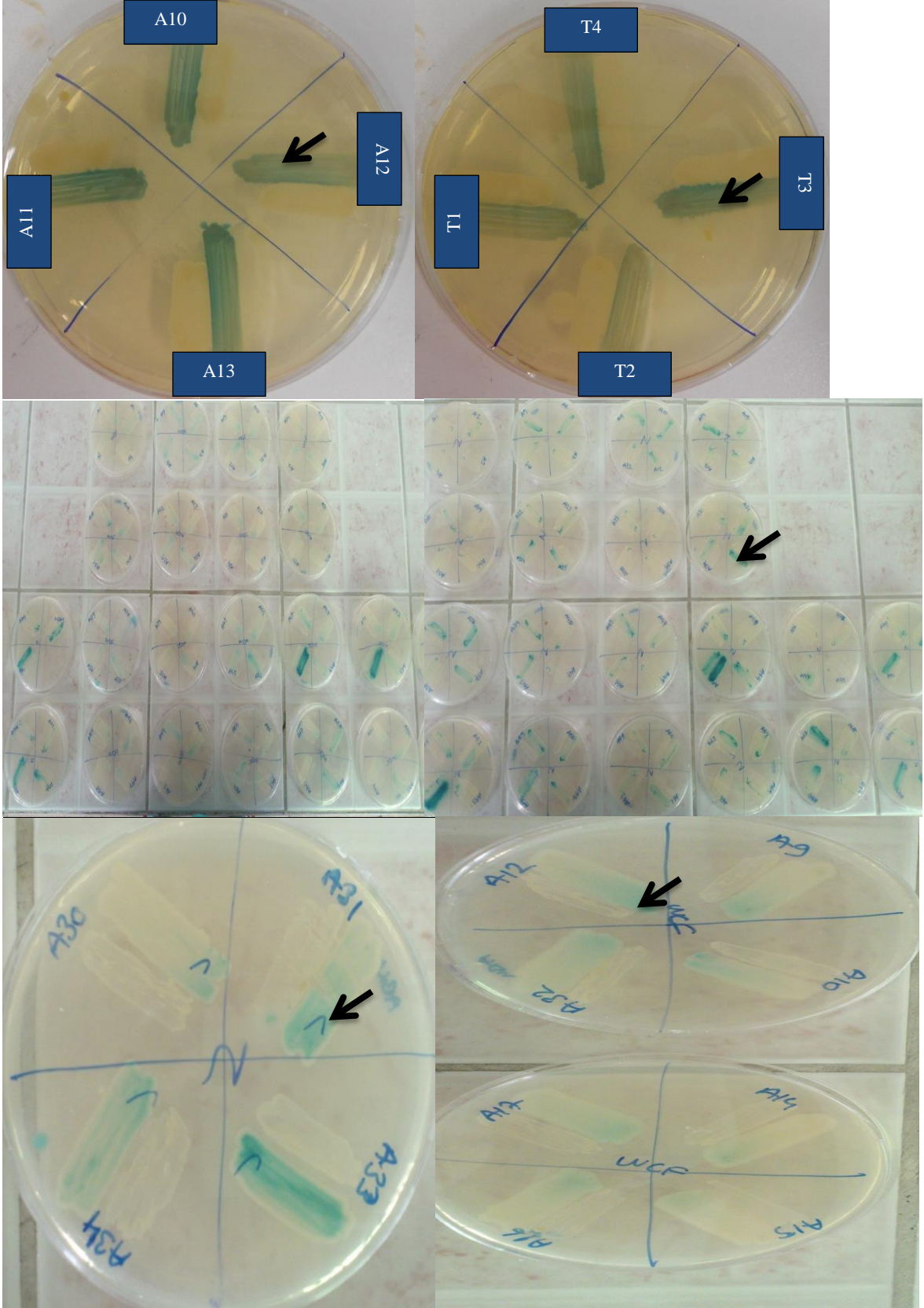


Şekil 4.7. *Chromobacterium violaceum* 026 ile çapraz doğrulama sonuçları

(Kısa Zincirli N-açıl Homoserin Lakton Üretimi Negatif)

4.4. *Acinetobacter* spp. İzolatlarının *Agrobacterium tumefaciens* NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136 ve *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 Biyosensör Suşları Kullanılarak Çapraz Doğrula Metodu İle N-Açıl Homoserin Lakton Üretimlerinin Saptanması

Agrobacterium tumefaciens NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 biyosensör suşları C8-C14 AHL moleküllerinin tespitinde kullanılır. Bu moleküllerin varlığında adı geçen biyosensör suşlarda β -galaktosidaz enzimi üretimi tetiklenir ve ortamdaki X-gal nedeniyle yeşil renk gözlenir. *Agrobacterium tumefaciens* NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 biyosensör suşları ile çalışmamızda yer alan *Acinetobacter* türlerinin çapraz doğrulama testi sonucunda tüm suşların sinyal moleküllerini üretebildikleri görüldü (Şekil 4.8). Daha önce bahsedildiği gibi *Agrobacterium tumefaciens* NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136 ve *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 uzun zincirli sinyal moleküllerinin tespitinde



Şekil 4.8. *Agrobacterium tumefaciens* NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 suşları ile çapraz doğrulama ile sinyal tespiti

kullanılır. *Acinetobacter*'lerin kısa zincirli sinyal moleküllerini degrades etmesine sebep olan mekanizma uzun zincirli moleküller üzerinde etkin değildir. Ayrıca biyosensör bakterilerin bu sinyal moleküllerini tespit edebiliyor olması, yüksek oranda üretildiklerinin göstergesidir.

Sinyal moleküllerinin tespitinde biyosensör bakterilerin kullanılması yaygın bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyosensör bakterilerle yapılan çalışmalar patojen bakteriler üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte günümüzde tarımdan, sağlık endüstrisine ve gıda endüstrisi'ne kadar birçok alanda bakteriyel iletişimle ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

McClellan ve ark., *Yersinia enterocolitica* W828 ve *Serratia liquefaciens* MG1'de yer alan bakteriyel iletişim moleküllerinin tespitinde *Chromobacterium violaceum* 026 ile çapraz doğrulama testini uygulamış ve çalışma sonucunda yan yana ekildiklerinde *C. violaceum* 026 suşunda viyolasin pigment üretiminin tetiklendiğini gözlemlemişler ve ince tabaka kromatografisi ile bu moleküllerin farklılığını saptamışlardır [1] .

Boşgelmez-Tınaz ve ark., yoğun bakım ünitelerinden izole ettikleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında bakteriyel iletişim molekülü varlığını araştırmışlar. Yapılan diğer çalışmaların aksine *P. aeruginosa* suşlarının *C.violaceum* 026 suşu ile çapraz doğrulama sonucunda negatif sonuç verdiğini göstermişlerdir. Bunun nedeni olarak *P. aeruginosa* izolatlarında kısa zincirli AHL veya sinyal molekülü seviyesinin çok düşük olabileceğini ileri sürmüşlerdir [163] .

Pseudomonas aeruginosa ile yapılan bir diğer çalışmada Şenturk ve ark., üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *Pseudomonas aeruginosa* türlerinin bakteriyel iletişim molekülü olarak C12-AHL (uzun zincirli) ve C4-AHL (kısa zincirli) ürettiklerini çeşitli biyosensör bakterileri kullanarak belirlemişlerdir [164] . Dolayısıyla araştırmamızda kullanılan *Acinetobacter* izolatlarında kısa zincirli AHL moleküllerinin sentezlenmiyor olması da bir diğer olasılık olarak karşımıza çıkmaktadır.

Chan ve ark., çoklu ilaç direnci görülen *A. baumannii* 4KT suşundaki sinyal moleküllerini LC-MS/MS cihazı ile analiz etmişler ve bu bakterinin C6-HSL (m/z

200.400) ve C8-HSL (m/z 228.500) sinyal moleküllerini ürettiğini belirtmişler [165] . Oysa çalışmamızda C6-AHL tespit edilmemiştir. Yukarıdaki araştırmanın biyosensör suşlarla değil LC-MS/MS ile yapılmış olması neticesinde çalışmamızdan farklı bir sonucun ortaya çıkması beklenebilir.

Morgan-Sagastume ve ark., aktif çamur içerisinde bakteriyel iletişim moleküllerinin rolü hakkında yaptıkları çalışmayla *Aeromonas* ve *Pseudomonas* türlerinin aktif çamurda yaygın olan türler olduğunu ve bu türlerin sahip oldukları sinyal moleküllerinin varlığını *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 biyosensör suşları ile tespit etmişlerdir. Bu ortamlarda bulunan sinyal moleküllerinin 3-oxo-C6-AHL, C4- AHL, C6- AHL, 3-oxo-C8- AHL , C8- AHL ve C7- AHL olarak saptandığını bildirmişlerdir [166] .

Borlee ve ark., *Pieris rapae* larvalarının orta bağırsağında bulunan mikrobiyal florada patojen olarak enfeksiyon etkeni olan *Pantoea* CWB304'nin ürettiği sinyal moleküllerini tespit etmişler ve *Pantoea* CWB304'dan izole edilen edilen sinyal moleküllerinin *Pseudomonas aeruginosa* PA01 üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda alkali olan bağırsak florasından elde edilen AHL'lerin *Pseudomonas aeruginosa* PA01'in neden olduğu hastalıklara katkı sağladığını ileri sürmüşlerdir [167] .

Chang ve ark., Malezya'da bulunan küresel balık tedarikçisinden alınan ve hastalıklı Tilapia balıklarından *Bacillus* sp. W2.2, *Klebsiella* sp. W4.2, *Pseudomonas* sp. W3 ve W3.1 ve *Serratia* sp. W2.3 bakterilerini izole etmişler ve *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NTL1 biyosensör suşu ile sinyal moleküllerinin varlığını da saptamışlardır. Bu araştırmada ayrıca LC-MS ile sinyal moleküllerinin farklılığı da gösterilmektedir. Bu çalışma ile *Pseudomonas* türlerinde uzun zincirli N-(3-oxohexadecanoyl)-homoserin lakton (3-okso-C16-HSL) varlığı da gösterilmiştir. *Serratia* sp W3.1 türlerinde ise N-dodekanoyil-homoserin lakton (C12-HSL) olduğu belirlenmiş, dolayısı ile çalışma *Serratia* sp. ve *Pseudomonas* türlerinde sıra dışı uzun zincirli AHL üretimi gösterilmiştir [168] .

Schwentet ve ark, balık patojeni *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* ile yaptıkları çalışmada, bu bakterinin LuxR tipi quorum sensing sistemine benzer

olan AsaIR sistemini iletişimde kullandığını ve C4-HSL molekülünü sinyal molekülü olarak kullandığını belirtmişlerdir[169] .

Chen ve ark., Malezya'nın tropikal topraklarından izole edilen *A9 Burkholderia* suşunda AHL üretimini çapraz doğrulama testi uygulayarak *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Escherichia coli* [pSB401] ile tespit etmişleridir. *A9 Burkholderia* suşunun sensör bakterilerin yardımıyla uygulanan ince tabaka kromatografisi sonucunda N-hexanoylhomoserine lakton (C6-HSL) ve N-octanoylhomoserine lakton (C8-HSL)'nu üretebildiğini göstermişlerdir [170] .

Rodelas ve ark., topraktan izole edilen ve bezelye gibi baklagillerin kök nodüllerinde yaygın olarak bulunan *Rhizobium leguminosarum* *bv. Viciae* bakterisinin N-(hexanoyl)-L-homoserin lakton (C6-HSL) ve N -(octanoyl)-L-homoserin lakton (C8-HSL) moleküllerinin üretebildiğini ve moleküllerin bakterinin enfektivitesinde aktif rol oynadığını göstermişlerdir [171] .

Trivedi ve ark., tarıma elverişli narenciye ürünlerinin üretiminde yararlı bakterilerin rollerini ve tarımsal ekosistemlerin üretim kapasitesini ve sürdürülebilirliğini artırmak için yaptıkları çalışmada *Paenibacillus validus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, *Microbacterium oleivorans*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas maltophila*, *Pantoea agglomerans*, *Serratiasp.* Ve *Serratia plymuthica* türlerini narenciye köklerinden izole etmişler ve bu bakterilerin sinyal moleküllerinin varlığını çapraz doğrulama testi ile *C. violaceum* 026'yı kullanarak tespit etmişlerdir [172] .

Degrassi ve ark., bitki büyümesine etki eden bir patojen olan *Pseudomonas putida* WCS358'nin sinyal moleküllerini başta *C. violaceum* 026 olmak üzere birçok biyosensör bakteri aracılığıyla saptamışlar ve iletişim molekülleri üzerine diketopiperazin bileşiğinin etkili olduğu göstermişlerdir [173] .

Bu konuda yapılan başka çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Atkinson ve ark., *Caenorhabditis elegans* üzerinde *Yersinia pseudotuberculosis* türünün oluşturduğu biyofilmin içeriğindeki sinyal moleküllerini tespit etmişler ve toprak solucanının bu molekülleri etkisizleştirme mekanizmalarını genetik olarak nasıl düzenlediğini belirlemişlerdir [174] .

Benzer çalışmalar algler üzerinde de gerçekleştirilmiştir. Rivas ve ark., tek hücreli mikroalg olan *Botryococcus braunii* nin gelişiminde etkili olan bakteriyel biyofilimde *Pseudomonas sp.* ve *Rhizobium sp.* türlerinin ürettikleri C4-AHL ve C6-AHL moleküllerinin varlığının önemini vurgulamışlardır [175] .

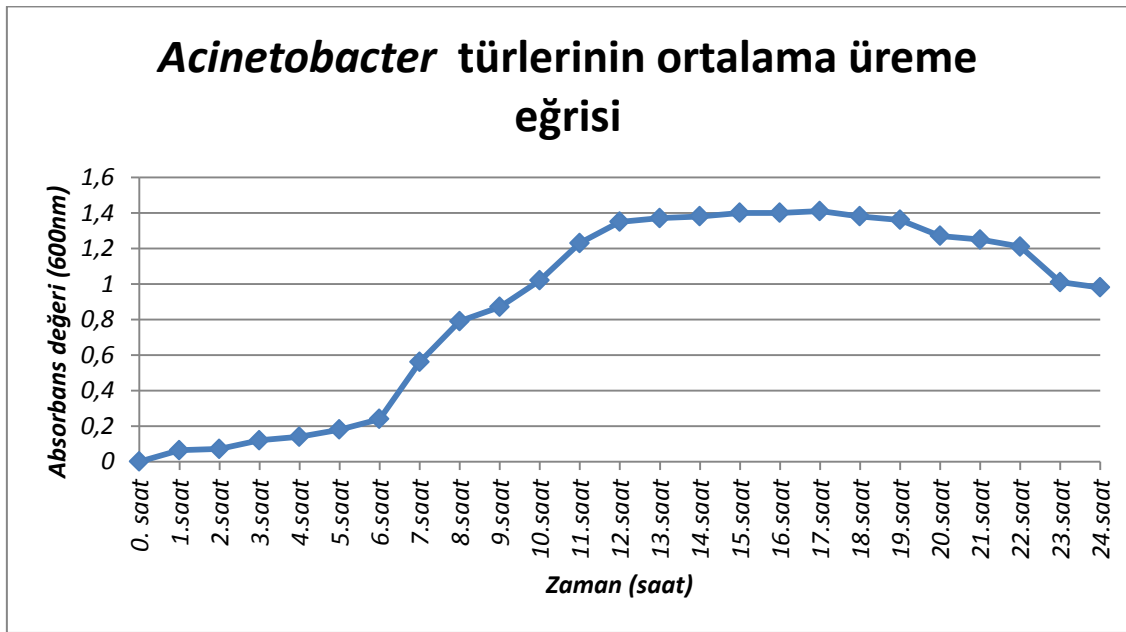
Yukarıda özetlenen çeşitli çalışmalara benzer olarak tez çalışmamızda *Agrobacterium tumefaciens* NTL1, *Agrobacterium tumefaciens* A136, *Agrobacterium tumefaciens* WCF47 ve *Chromobacterium violaceum* 026 suşları ile elimizde bulunan 70 *Acinetobacter* türünde sinyal molekülü varlığı çapraz doğrulama ile belirlenmiştir. Toprak veya klinik örneklerden izole edilen tüm suşların uzun zincirli sinyal moleküllerini üretebildikleri gözlemlenmiştir. Oysa kısa zincirli AHL'ların biyosensör suşlar aracılığıyla saptanamadığı bulgusu yukarıda da söz konusu edildiği gibi bu moleküllerin kesin olarak sentezlenmediğini göstermemektedir. Bu moleküllerin sentezlenmiyor olması mümkün olduğu gibi sentezlenen molekül miktarının çok az olması ya da degrade ediliyor olması da söz konusu olabilir. Ancak her üç durumda da izolatlarımızın virulansında kısa zincirli iletişim moleküllerinin etkin olmadığı, iletişim ve patojenite için uzun zincirli sinyal moleküllerinin üretildiği saptanmıştır.

4.5. *Acinetobacter* Türlerinin Üreme Eğrisinin Türbidometrik Yöntemle Belirlenmesi

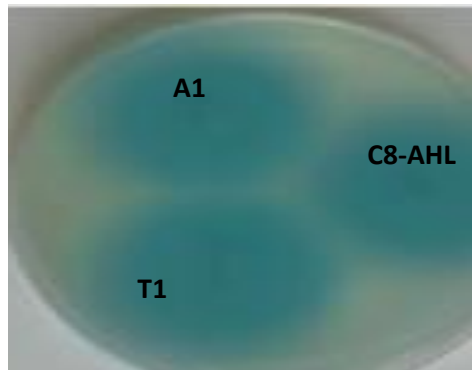
Quorum sensing sinyal molekülü üreten tüm suşların üreme eğrisi için 3.10.1'de belirtildiği gibi Triptik soy broth besiyeri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre oluşturulan üreme grafiği Şekil 4.9.'da yer almaktadır. Bu sonuçlara göre 6. Saatten itibaren bakterinin üreme hızının arttığı, 12. Saate ise en yüksek değerine ulaşarak üremenin durgunluk dönemine girdiği görülmektedir. Üreme eğrisinin oluşturulması bol miktarda sinyal molekülü elde etmek için gereklidir. Zira bu bakteriler sinyal moleküllerini logaritmik artış dönemlerinde üretmektedirler. Bu nedenle sinyal moleküllerinin ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalarda bakterilerin 12. Saat'lik kültürleri kullanılmıştır.

4.6. *Acinetobacter* Türlerinden N-Açıl Homoserin Laktonun Ekstraksiyonu ve İnce Tabaka Kromatografisi'nde Moleküllerin Ayrımı

12 saat üremeye bırakılan *Acinetobacter* kültürlerinden 3.10.2'de belirtildiği N-açıl homoserin lakton türü sinyal molekülleri ekstrakte edildi ve ince tabaka kromatografi yöntemi uygulanarak birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Ekstrakte edilen sinyal molekülleri %0.9 agar içeren 25 ml AB mineral yumuşak agar besiyeri (50°C) + 10ml *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218)(pCF372) + X-gal (60µg/ml) bulunan petrilere açılan kuyucuklara 10µl olacak şekilde bırakıldı. Sinyal molekülü ekstraksiyonun yapıldığı doğrulandı (Şekil 4.10.).

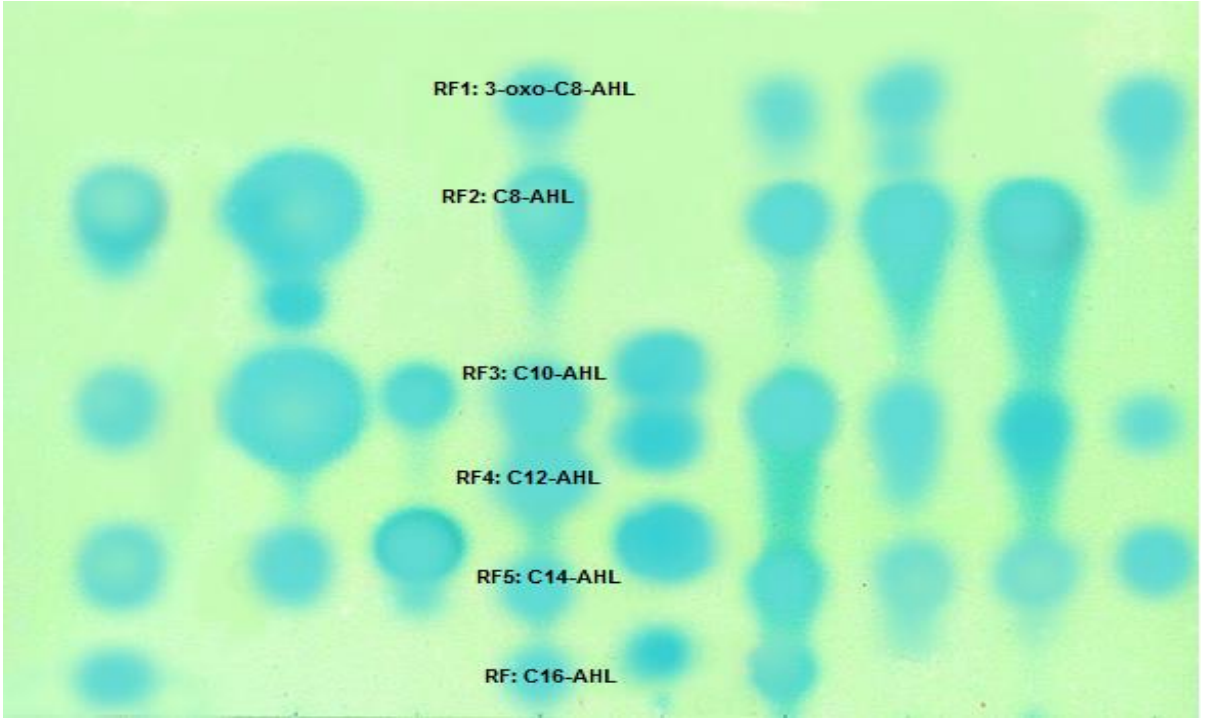


Şekil 4.9. Bakterilerin Ortalama Üreme Eğrisi



Şekil 4.10. A1 ve T1 izolatlarından ekstrakte edilen sinyal moleküllerinin *A. tumefaciens* A136 suşu ile kontrolü

Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7 de standart olarak kullanılan sinyal molekülleri ile nozokomiyal ve topraktan izole edilen *Acinetobacter* türlerinin ürettiği sinyal moleküllerinin Rf değerleri gösterilmektedir. Çapraz doğrulama ile kısa zincirli C4-AHL ve C6-AHL sinyal moleküllerini *Acinetobacter* türleri tarafından üretildiği saptanamadığından ince tabaka kromatografisinde standart olarak kullanılmamıştır. *Acinetobacter* türlerinden izole edilen sinyal moleküllerinin Rf değerleri saptandıktan sonra, standartların Rf değerleri aralıklarına uygunlukları göz önüne alınarak moleküllerin sınıflandırılmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11) . Örneğin Çizelge 4.6'da A1 izolatının ürettiği sinyal molekülünün Rf1 değeri 0,58 olduğundan ve 3-oxo-C8-AHL standartının Rf aralığı 0,58 ile 0,63 olarak bilindiğinden bu Rf değerine denk gelen molekül 3-oxo-C8-AHL olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.11. İnce tabaka kromatografisi ile sinyal moleküllerinin ayrılması

ÇİZELGE 4.6. Nozokomiyal *Acinetobacter* suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü

İzolat no	CV026 ile AHL Tespiti	A136, WCF47, NTL1 ile AHL tespiti	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	3-oxo-C8 AHL	C8-AHL	C10-AHL	C12-AHL	C14-AHL	C16-AHL
									Ortalama Rf değerleri					
									0,62	0,40	0,31	0,22	0,16	0,02
A1	-	+++	0,58	0,41	-	0,21	-	-	X	X	-	X	-	-
A2	-	+	-	0,40	-	-	0,18	0,02	-	X	-	-	X	X
A3	-	++	-	-	0,31	0,24	-	-	-	-	X	X	-	-
A4	-	+++	0,60	0,42	-	0,22	-	-	X	X	-	X	-	-
A5	-	++	-	0,43	0,34	-	-	-	-	X	X	-	-	-
A6	-	++	-	-	0,29	-	0,16	0,03	-	-	X	-	X	X
A7	-	++	-	-	0,31	-	-	-	-	-	X	-	-	-
A8	-	+++	0,63	0,41	-	0,23	-	-	X	X	-	X	-	-
A9	-	++	0,61	-	-	-	0,18	0,02	X	-	-	-	X	X
A10	-	+++	0,62	0,42	0,28	0,21	0,19	0,03	X	X	X	X	X	X
A11	-	++	-	-	-	0,22	0,16	0	-	-	-	X	X	X
A12	-	++	-	0,44	0,33	-	-	-	-	X	X	-	-	-
A13	-	++	-	0,38	-	0,20	-	-	-	X	-	X	-	-
A14	-	++	-	0,40	0,29	-	-	-	-	X	X	-	-	-
A15	-	++	-	0,37	-	-	0,17	-	-	X	-	-	X	-
A16	-	++	-	0,41	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
A17	-	+++	0,62	0,43	0,32	0,22	-	-	X	X	X	X	-	-
A18	-	+++	0,61	0,41	0,30	-	0,18	-	X	X	X	-	X	-

+++; yoğun renk, ++; orta renk, +: az renk,

3-oxo- C8-AHL ; 0,58-0,63 , C8-AHL; 0,37-0,44 , C10-AHL;0,28-0,34 , C12-AHL; 0,20-0,24, C14-AHL; 0,16-0,19, C16-AHL; 0-0,03

Çizelge 4.6. Nozokomiyal *Acinetobacter* suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü (devamı)

İzolat no	CV026 ile AHL Tespiti	A136, WCF47, NTL1 ile AHL tespiti	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	3-oxo-C8 AHL	C8-AHL	C10-AHL	C12-AHL	C14-AHL	C16-AHL
									Ortalama Rf değerleri					
									0,62	0,40	0,31	0,22	0,16	0,02
A19	-	++	-	0.42	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
A20	-	+++	0,62	0.43	-	0.23	0.19	0	X	X	-	X	X	X
A21	-	+++	0,60	0.40	0.32	-	0.17	-	X	X	X	-	X	-
A22	-	++	-	0.40	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
A23	-	++	-	-	-	0.24	0.16	0	-	-	-	X	X	X
A24	-	++	-	0.42	-	-	-	0	-	X	-	-	-	X
A25	-	++	-	-	0.31	0.22	-	-	-	-	X	X	-	-
A26	-	+	-	-	0.32	0.23	-	-	-	-	X	X	-	-
A27	-	+	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	-	-	X
A28	-	+	-	-	-	0.21	-	-	-	-	-	X	-	-
A29	-	++	-	0.40	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
A30	-	+	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	X
A31	-	+++	-	0.41	-	0.22	-	-	-	X	-	X	-	-
A32	-	+	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-	X	-	-
A33	-	+	-	-	0.30	-	-	-	-	-	X	-	-	-
A34	-	+++	0,63	0.43	0.33	0.21	0.17	0.02	X	X	X	X	X	X
A35	-	+	-	-	0.30	-	-	0	-	-	X	-	-	X

+++; yoğun yeşil renk, ++; orta yeşil renk, +; az yeşil renk,

3-oxo- C8-AHL ; 0,58-0,63 , C8-AHL; 0,37-0,44 , C10-AHL;0,28-0,34 , C12-AHL; 0,20-0,24, C14-AHL; 0,16-0,19, C16-AHL; 0-0,03

Çizelge 4.6. Nozokomiyal *Acinetobacter* suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü (devamı)

İzolat no	CV026 ile AHL Tespiti	A136, WCF47, NTL1 ile AHL tespiti	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	3-oxo-C8 AHL	C8-AHL	C10-AHL	C12-AHL	C14-AHL	C16-AHL
									0,62	0,40	0,31	0,22	0,16	0,02
A36	-	+++	0,61	0,42	0,31	0,20	-	-	X	X	X	X	-	-
A37	-	+++	0,63	0,43	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
A38	-	++	-	-	0,32	-	0,17	-	-	-	X	-	X	-
A39	-	+++	0,61	0,41	0,33	-	0,18	-	X	X	X	-	X	-
A40	-	+	-	-	-	0,22	-	-	-	-	-	X	-	-
A41	-	++	-	-	0,3	0,21	-	-	-	-	X	X	-	-
A42	-	+	-	-	0,31	-	-	-	-	-	X	-	-	-
A43	-	+++	0,60	0,42	0,34	0,21	0,16	-	X	X	X	X	X	
A44	-	+	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	X
A45	-	+++	0,63	0,40	-	0,25	-	-	X	X	-	X	-	-
A46	-	++	-	-	-	0,21	-	0	-	-	-	X	-	X
A47	-	+++	-	0,41	-	0,23	0,17	0	-	X	-	X	X	X
A48	-	+++	-	0,41	0,32	0,23	0,18	0,02	-	X	X	X	X	X
A49	-	+++	-	0,42	0,31	0,22	0,16	0,01	-	X	X	X	X	X
A50	-	++	-	-	0,32	0,2	-	-	-	-	-	X	X	-
PA01	+	+++	0,63	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-

+++; yoğun yeşil renk, ++; orta yeşil renk, +: az yeşil renk,

3-oxo- C8-AHL ; 0,58-0,63 , C8-AHL; 0,37-0,44 , C10-AHL;0,28-0,34 , C12-AHL; 0,20-0,24, C14-AHL; 0,16-0,19, C16-AHL; 0-0,03

Çizelge 4.7. Toprakta izole edilen *Acinetobacter* suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü

İzolat no	CV026 ile AHL Tespiti	A136, WCF47, NTL1 ile AHL tespiti	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	3-oxo-C8 AHL	C8-AHL	C10-AHL	C12-AHL	C14-AHL	C16-AHL
									Ortalama Rf değerleri					
									0,62	0,40	0,31	0,22	0,16	0,02
T1	-	++	0,63	0,44	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T2	-	+++	0,60	0,42	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T3	-	++	-	0,40	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
T4	-	++	0,62	0,41	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T5	-	++	-	0,44	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
T6	-	++	0,63	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
T7	-	+++	0,65	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
T8	-	++	0,63	0,45	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T9	-	++	0,61	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
T10	-	+	0,62	0,40	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-

+++; yoğun yeşil renk, ++; orta yeşil renk, +; az yeşil renk,
 3-oxo- C8-AHL ; 0,58-0,63 , C8-AHL; 0,37-0,44 , C10-AHL; 0,28-0,34 , C12-AHL; 0,20-0,24, C14-AHL; 0,16-0,19, C16-AHL; 0-0,03

Çizelge 4.7. Toprakтан izole edilen *Acinetobacter* suşlarının TLC sonucunda sinyal moleküllerinin Rf değerleri ve sahip oldukları sinyal molekülü (devamı)

İzolat no	CV026 ile AHL Tespiti	A136, WCF47, NTL1 ile AHL tespiti	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	RF6	3-oxo-C8 AHL	C8-AHL	C10-AHL	C12-AHL	C14-AHL	C16-AHL
									Ortalama Rf değerleri					
									0,62	0,40	0,31	0,22	0,16	0,02
T11	-	++	-	0,43	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
T12	-	+	-	0,41	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
T13	-	+++	0,63	0,47	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T14	-	++	-	0,40	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
T15	-	++	-	0,46	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
T16	-	+++	0,64	0,42	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T17	-	+	-	0,47	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
T18	-	+	-	0,44	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
T19	-	++	0,63	0,43	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-
T20	-	+	-	0,45	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
PA01	+	+++	0,62	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-

+++; yoğun yeşil renk, ++; orta yeşil renk, +; az yeşil renk,
3-oxo- C8-AHL ; 0,58-0,63 , C8-AHL; 0,37-0,44 , C10-AHL;0,28-0,34 , C12-AHL; 0,20-0,24, C14-AHL; 0,16-0,19, C16-AHL; 0-0,03

Yaptığımız çalışmada ince tabaka kromatografisi sonucunda nozokomiyal etken olan ve biyokimyasal testler ile *A. baumannii* olarak tanımlanan türlerin birden fazla sinyal molekülü taşıdığı saptanmıştır. Toprakten izole edilen *Acinetobacter* türleri incelendiğinde ise nozokomiyal *Acinetobacter* türlerine göre daha az sayıda sinyal molekülü üretebildikleri gözlemlendi. Özellikle sinyal molekülü olarak 3-oxo-C8-AHL ve C8-AHL moleküllerini üreten toprak kaynaklı *Acinetobacter*'lerin bu sinyal moleküllerinin ya ikisini birden ya da tek tek üretebildiği görülmüştür.

González ve ark. genetik olarak tanımlanmış ticari 20 *Acinetobacter* ve kendilerinin izole ettiği klinik 23 *Acinetobacter* türünün sinyal moleküllerini incelemişler, çalışma sonucunda nozokomiyal etken olarak tanımlanan *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* komplekslerinin sinyal moleküllerini diğer türlere göre daha farklı sayıda ürettiklerini, bu türlerde C8-AHL molekülünün en yaygın üretilen sinyal olduğunu ve toplamda 3 farklı sinyal molekülü üretildiğini saptamışlardır [139].

Harshad ve ark., biyoreaktör membranı üzerinde biyofilm oluşturan *Aeromonas*, *Enterobacter sp*, *Serratia*, *Leclercia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Raoultella* ve *Citrobacter* türlerinin C6-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C12-HSL ve C14-HSL sinyal moleküllerini üretebildiklerini, ayrıca bu çalışmayla atık su içeriğinde bulunan bakteriyel birliktelikte etkin olan bakterilerin *Aeromonas* ve *Enterobacter sp*, türlerinin olduğunu saptamışlardır [92].

González ve ark., çalışmalarında kullandıkları *A. calcoaceticus* BD413 suşunun MMAT besiyerinde dört farklı sinyal molekülü üretebildiğini ve çalışmada kullandıkları *Acinetobacter* türlerinde N-(3-oxo) dodecanoil L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) türü sinyal molekülünün oldukça yaygın olduğunu saptamışlardır [137].

Bir diğer çalışmada çoğul dirençli *A. baumannii* türlerinin oluşturduğu biyofilmde N-(3-hydroxydodecanoil)-L-homoserin lakton (3-hidroksi-C12-AHL) sinyal molekülünün yoğun üretildiğini ve bu molekülün AbaR gen bölgesi üzerinde etkin olduğunu ileri sürülmüştür. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar genetik olarak AbaR gen bölgesi baskılanmış suşlarda quorum sensing mekanizması ile düzenlenen biyofilm etkinliğinde düşüş gözlemişlerdir [140].

Anbazhagan ve ark., klinik izolat olan *Acinetobacter*'deki sinyal moleküllerini Mass Spektrofotometre ile belirlemişler, çoklu ilaç direnci görülen suşlarda sinyal molekülünün farklı ve fazla sayıda olduğunu ayrıca biyofilm gibi mikroorganizmanın patojenitesinde önemi büyük olan bir özelliğin *N*-decanoyl homoserine lactone (C12-AHL) ile ilişkili olduğunu belirtmişler [141] .

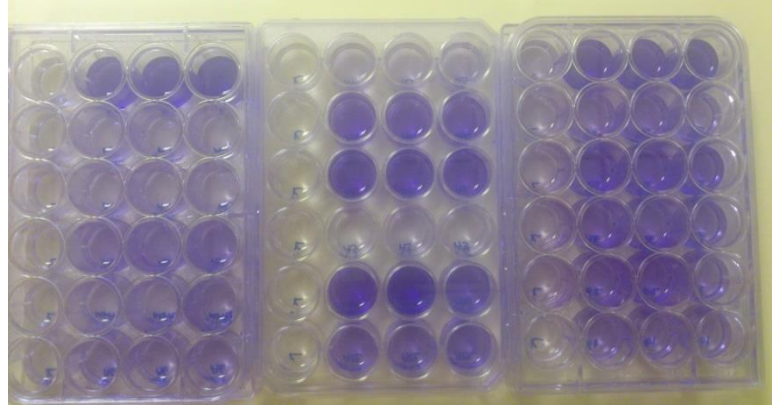
Bakteriyel iletişim sistemi *Acinetobacter* türleri ile sınırlı değildir. Nozokomiyal etken olan ve çevredende sıklıkla izole edilebilen birçok türde görülmektedir. Bunlar arasında en sık çalışılan tür *Pseudomonas aeruginosa* türleridir. Venturi yaptığı çalışmayla *Pseudomonas* türlerinde quorum sensing mekanizmasının iki farklı tip de düzenlendiğini, bunların lasR ve rhIR olduğunu göstermiştir [176] . De Kievit *Pseudomonas aeruginosa* türünün oluşturduğu biyofilm içerisinde bakteriyel iletişim molekülünün biriktiğini, bu sayede biyofilm yapısının sürekli artırılabilirliğini ileri sürmüştür [177] . AHL'ler ile ilgili yapılan çok sayıda araştırma vardır. Örneğin; Yin ve ark, insan dil yüzeyinden izole ettikleri *Klebsiella pneumoniae* suşlarının, *Klebsiella* türleri bakteriyel sinyal molekülü olarak otoindükleyici-2 üretir sözünün aksine *N*-octanoylhomoserin lakton (N-C8-AHL) ve *N*-3-dodecanoyl-L-homoserine lakton (3-oxo-C12-AHL) sinyal moleküllerini üretebildiğini tespit etmişlerdir [178] .

Yukarıda nozokomiyal veya doğadan izole edilen birçok Gram negatif bakterinin sinyal moleküllerinin özetlendiği çalışmalara benzer olarak çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre *Acinetobacter* türleri de farklı sinyal moleküllerini üretebilmektedir. Bu durum *Acinetobacter*'lerin biyotik veya abiyotik ortamlara hakim olmasında önemli bir özelliktir. Veriler incelendiğinde *Acinetobacter* türlerinin 3-oxo-C8-AHL, C8-AHL, C10-AHL ve C12-AHL moleküllerinin tamamını ya da bir kaçını üretebildiğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma ile nozokomiyal etken olan *Acinetobacter baumannii* türlerinin C14-AHL ve C16-AHL sinyal moleküllerini de üretebildiği saptanmıştır.

4.7. *Acinetobacter* spp. İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yetenekleri ve Siderofor Üretiminin Tespiti

Bakteriyel iletişim sistemi tarafından düzenlenen ve *Acinetobacter* gibi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan birçok türde patojenite sonucunda biyofilm oluşturma yetenekleri bakteriye avantaj sağlar. Yapılan birçok araştırmanın verilerine göre bakterilerin biyofilm oluşturarak bir yüzeyde çoğalmalarının onları

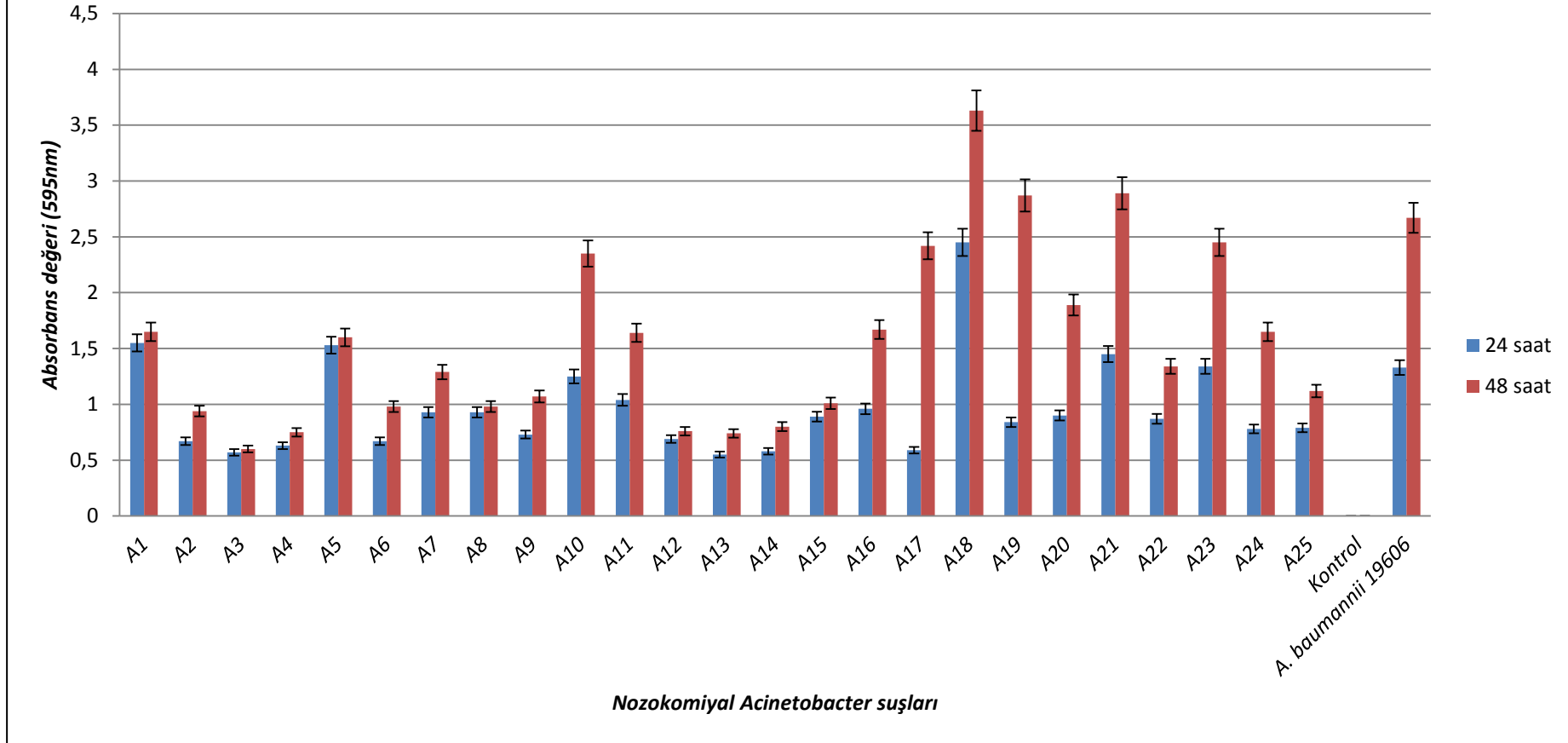
fiziksel ve kimyasal etkilerden örneğin antibakteriyel maddelerden ve canlının bağışıklık sisteminden koruyabildiğini göstermiştir. Biyofilm'in bakteriye sağladığı avantajlar arasında kolay besin maddesi bulabilmek, farklı bakteri türleri ile kontakt kurarak gen aktarımı yapabilmek, en önemlisi de enfeksiyon sırasında daha etkin bir kolonizasyon sağlanması sayılabilir. Biyofilm oluşumları başta sağlık sektörü olmak üzere gıda sektörü gibi canlıların yaşamı için önemli alanların bir çoğunda sorun oluşturabilmektedir. *Acinetobacter* türleri de biyotik ve abiyotik çok sayıda ortama kolay adapte olabildiği için bu bakterilerin virülansında biyofilm oluşumu önemli bir yere sahiptir. Oluşturdukları biyofilmler sayesinde *Acinetobacter*'ler gen aktarımı yaparak birçok ilaca direnç geliştirmişler ve konak savunmasından kolaylıkla kaçabilmişlerdir. Günümüzde kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençli *Acinetobacter* türlerinin sayıları her geçen gün artmaktadır ve tedavi olanakları sınırlanmaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşturma mekanizmasının işleyişinde önemli bir yere sahip olan bakteriyel iletişim sisteminin aydınlatılması ve biyofilm oluşumunda etkin sinyal moleküllerinin neler olduğu saptanmalıdır. Çalışmamızda sinyal molekülleri tespit edilen tüm *Acinetobacter* türlerinin biyofilm oluşturma yetenekleri abiyotik yüzey üzerinde 24 ve 48 saat'lik bakteri inkübasyonu sonucunda belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. 24 kuyucuklu polistren plaklarda biyofilm oluşumu

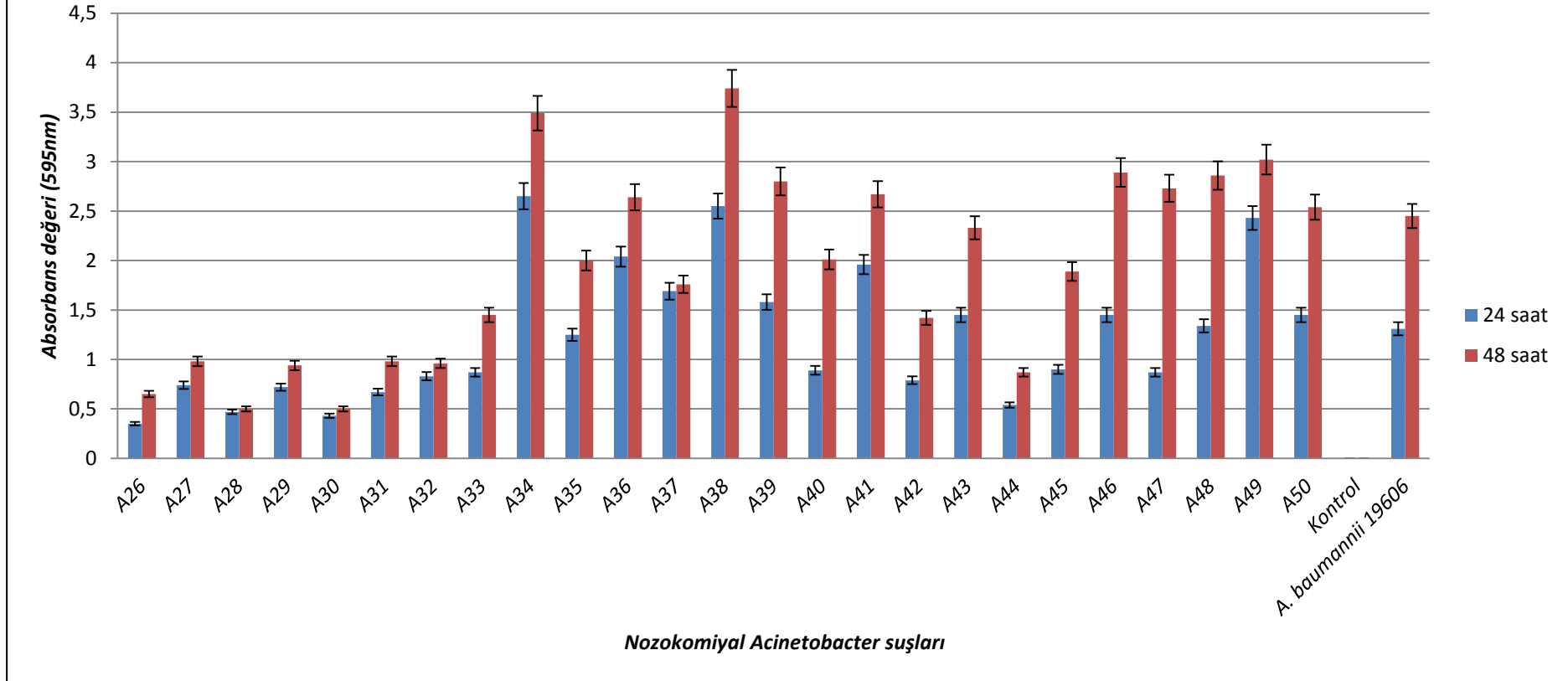
Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'deki veriler incelendiğinde tüm bakterilerin biyofilm oluşturabildiği görüldü. Nozokomiyal etken olarak elde edilen klinik izolatların ise topraktan izole edilen *Acinetobacter* türlerinde göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturabildiği gözlemlendi. Oluşan biyofilm miktarının tüm bakterilerin inkübasyon sürelerindeki değişime göre arttığı da elde edilen diğer bir sonuçtur.

Nozokomiyal *Acinetobacter* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri



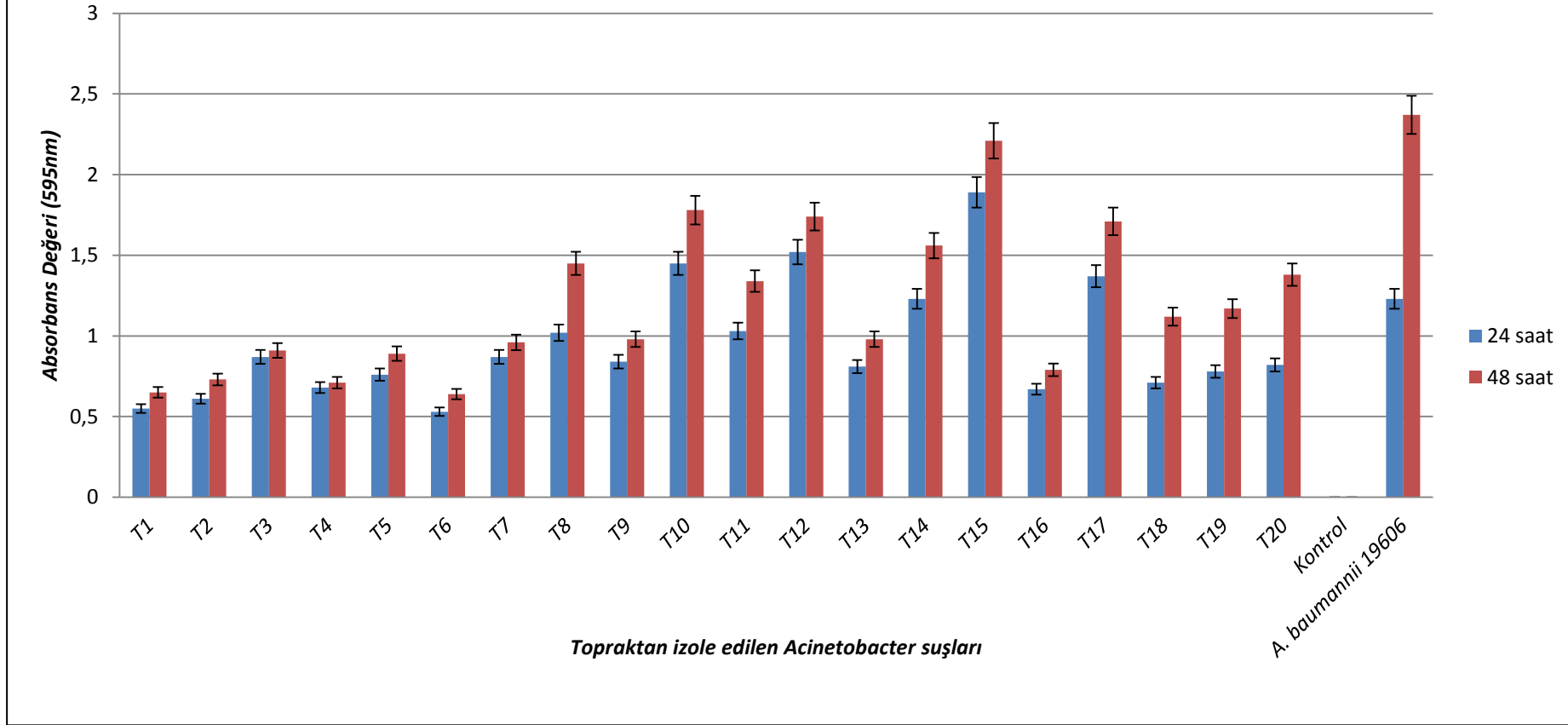
Şekil 4.13. Nozokomiyal *Acinetobacter*'lerde biyofilm oluşumu

Nozokomiyal *Acinetobacter* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri



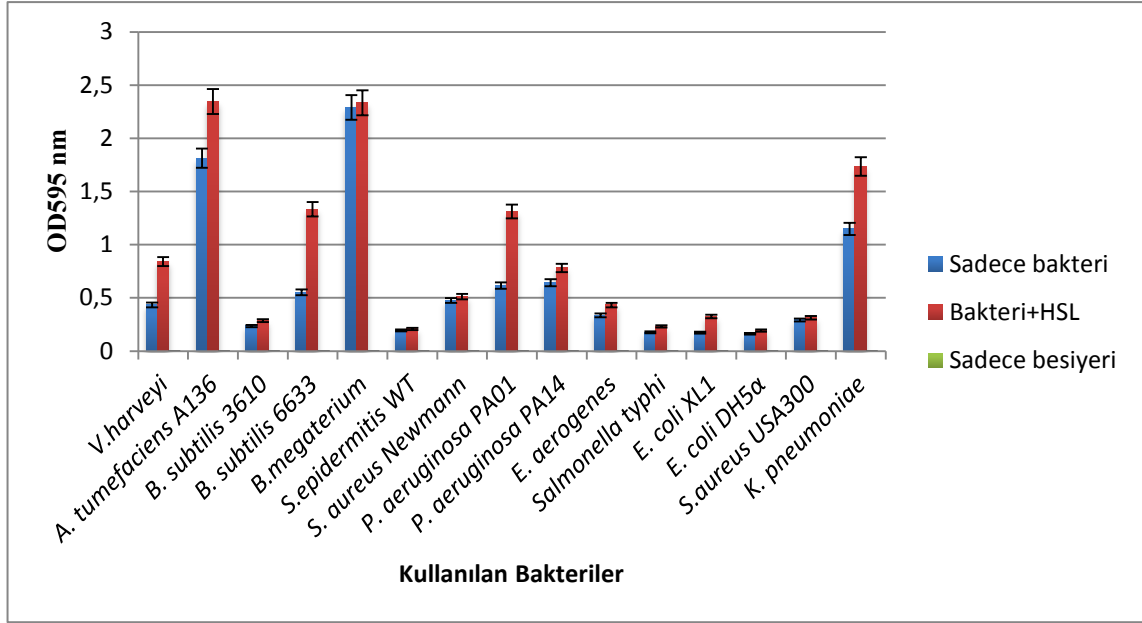
Şekil 4.13. Nozokomiyal *Acinetobacter*lerde biyofilm oluşumu (devamı)

Topraktan izole edilen *Acinetobacter* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri



Şekil 4.14. Toprak kaynaklı *Acinetobacter*'lerde biyofilm oluşumu

Bu çalışmalara ek olarak yaptığımız bir diğer çalışma ise C6-AHL molekülünün diğer bakteri türlerinin biyofilm oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisi belirlenmiş, ortamda sinyal molekülü olduğunda biyofilm oluşumunda bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).



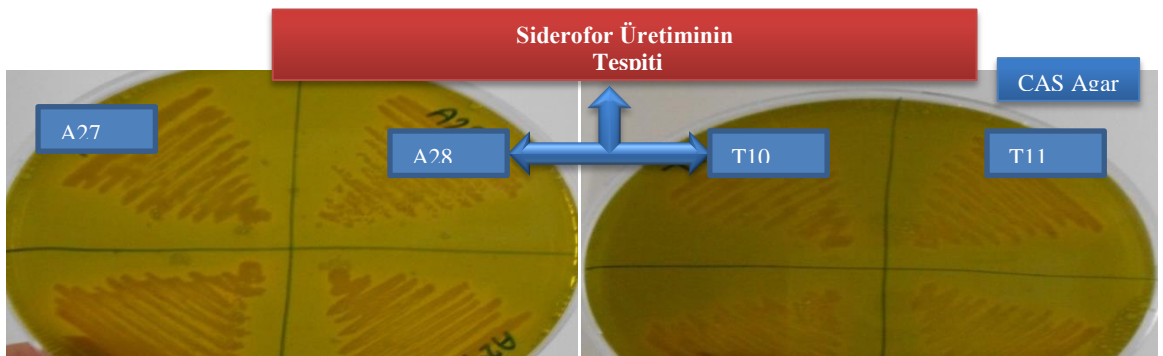
Şekil 4.15. C6-HSL türü iletişim molekülünün bakterilerin biyofilm yetenekleri üzerine etkisi

Pour ve ark. idrar yolu enfeksiyonuna neden olan üriner kateter kaynaklı *Acinetobacter* türlerinin farklı yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneklerini ışık mikroskobu, Floresans mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu ile araştırmışlar ve çalışma sonucunda bu bakterilerin üriner kateterler üzerinde yüksek oranda biyofilm oluşturabildiklerini saptamışlardır [179]. Biyofilm oluşumu ile ilgili olarak yapılan bir diğer çalışmada M'hamedi ve ark., tıbbi cihazlardan izole ettikleri 30 *A.baumannii* türünün biyofilm oluşturma yeteneklerini araştırmışlar, bu suşların 30°C'ye göre 37°C'de daha yüksek biyofilm oluşturdıklarını saptamışlardır [180]. Bu veri patojenitede sıcaklığın etkisinin olduğunu belirtmektedir. Bakteriyel biyofilm oluşumu ile patojenin immun sistem ile ilgisi açısından yaklaşımlar gösteren çalışmalara da rastlanmaktadır. Örneğin De Breij ve ark., savaşlarda ağır travması olan hastalardan *A. baumannii* bakterisinin sıklıkla izole edildiğini ve sebep olduğu enfeksiyonların yaygın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmayla *Acinetobacter baumannii* patojenin

insan hücrelerinde adezyonunun ve birçok ortamda biyofilm oluşturma yeteneklerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir [181] . Biyofilm oluşumu ortam şartları ile de ilişkili görülmektedir. Espinal ve ark., *A. baumannii* bakterisinin nemli ortamlara göre kuru ortamlarda daha yüksek oranda biyofilm oluşturabildiklerini belirtmişlerdir [182] .

Rao ve ark., *Acinetobacter*'lerin biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemek için tüp ve mikropate yöntemiyle nicel ve nitel olarak belirlemişlerdir. Ayrıca klinik olan bu *Acinetobacter*'lerin antimikrobiallere karşı dirençlilikleri ile biyofilm oluşturma yeteneklerinin birbirleri ile ilişkili olduğunu saptamışlardır [183] . Benzer olarak; Dheepa ve ark., *Acinetobacter*'lerin tedavisinde uygun antibiyotiklerin kullanılmamasının bu bakterinin virülansını arttırdığını ve biyofilm gibi oluşumlarla her ortama uyum sağlayabileceklerini ifade etmişlerdir [184] . Bhargava ve ark.'da, *Acinetobacter*'lerin biyofilm oluşumunda otoindüktör-reseptör mekanizmasının yani bakteriyel iletişim sisteminin aktif yer aldığını söylemişlerdir [185] .

Nozokomiyal enfeksiyonlarda biyofilmin önemli olmasının yanısıra sideroforların da patojenitede yer aldığı bilinmektedir. Bakterilerin canlılığının devamı için gerekli olan demiri ürettikleri sideroforlar aracılığıyla temin eden bakterilerde bu mekanizma yine bakteriyel iletişim sistemi tarafından düzenlenmektedir. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan *Acinetobacter* türlerinin tamamı siderofor üretebilirken, topraktan izole edilen T2,T4,T8,T13 ve T17 suşlarının siderofor üretmedikleri fakat diğer toprak izolatlarının ise üretebildikleri saptanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. CAS agar üzerinde izolatların siderofor üretimi

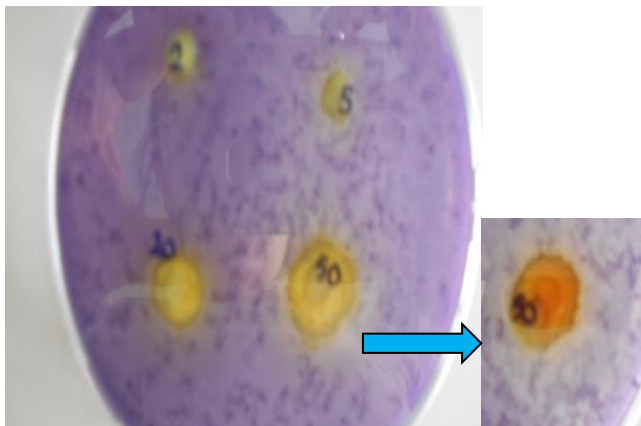
Siderofor üretimi saptanamayan T2,T4,T8,T13 ve T17 suşlarının biyokimyasal test sonuçları ve hemoliz yapma yetenekleri bu izolatların *A. baumannii* olmadıklarını *A. haemolyticus* olarak tanımlanan türler olduğunu göstermektedir.

4.8. Quercetin Molekülünün Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi

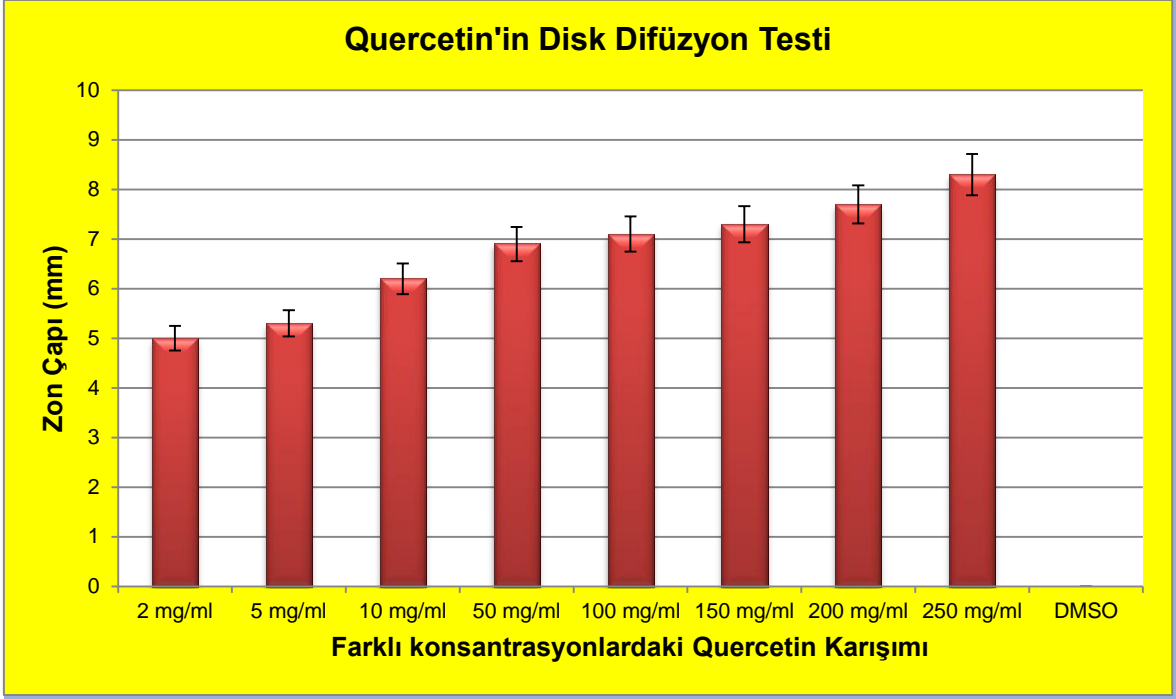
Bölüm 3.13. 'te belirtildiği şekilde quercetin'in 2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 mg/ml 'lik konsantrasyonları dimetilsulfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek hazırlandı.

Çalışma sonucunda canlı bünyesinde pozitif etkisi görülen antioksidan özellikteki Quercetin'in aynı zamanda bakteriyel iletişim molekülü olan C6-HSL üzerinde de etkili olduğu saptandı. Hem agar difüzyon testi hem de disk difüzyon testi sonucunda quercetin'in farklı konsantrasyonlarının viyolasin pigment üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

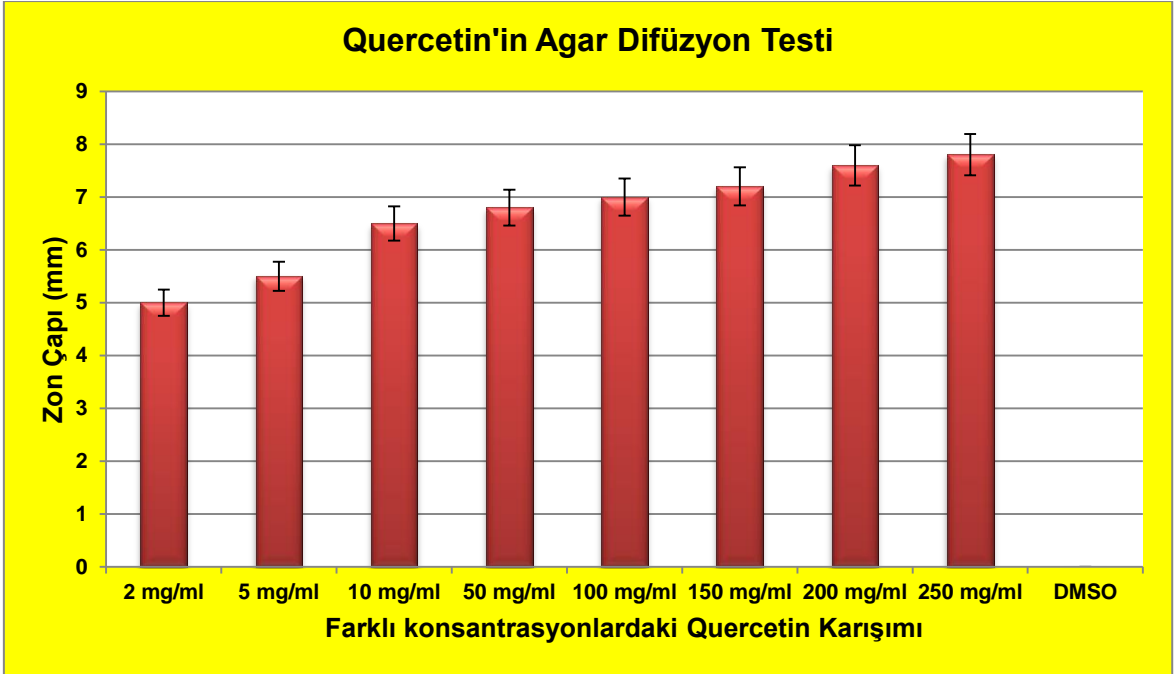
Gerek agar difüzyon, gerekse disk difüzyon testleri sonrasında oluşan zonlar içinde kısmen de olsa bakteri üremesinin engellendiği görüldüğünden anti-quorum sensing etkisinin bakteri üreme azalması sonucunda oluşabileceği gibi bu etkinin quercetin'in C6-AHL üzerine inhibitörük etki yapması sonucunda da gelişebileceği noktasından hareketle yukarıdaki çalışmalara ek olarak viyolasin pigment miktarı spektrofotometrik yolla saptandı. Bu çalışma sonucunda viyolasin pigmentinin üretiminde düşüş olduğu bir başka ifade ile quercetin'in C6-AHL molekülünü inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 4.20).



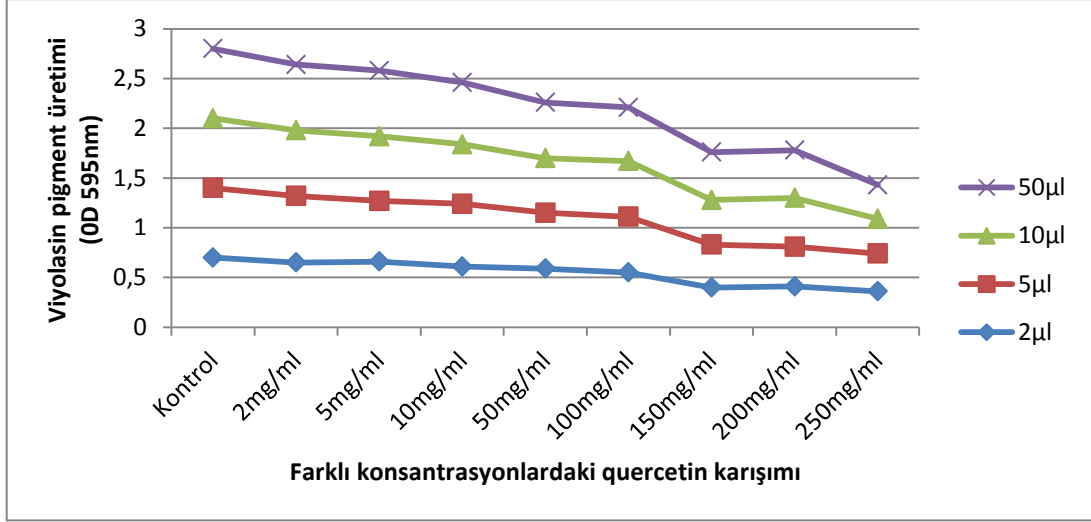
Şekil 4.17. Quercetin'in disk difüzyon testi. Disk etrafında bakteri üremesinin de az miktarda etkilendiği görülmektedir.



Şekil 4.18. Quercetin'in Disk Difüzyon Testi Sonuçları



Şekil 4.19. Quercetin'in Agar Difüzyon Testi Sonuçları



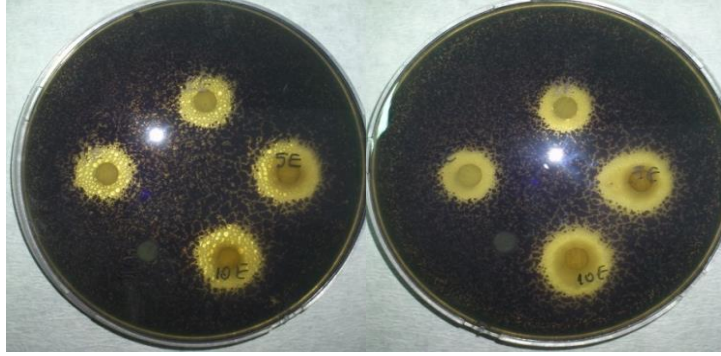
Şekil 4.20. Ortamdaki viyolasin pigmenti üzerine farklı konsantrasyonlardaki quercetin'in etkisi

C. violaceum 026 biyosensör suşu ortamda iletişim molekülü olan C6-AHL varlığında viyolasin pigmentini üretmekte ve bu üretim quorum sensing denen bakteriyel iletişim mekanizması ile düzenlenmektedir. Bilindiği gibi C6-AHL birçok Gram negatif patojen (*Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* gibi) bakteri tarafından iletişim molekülü olarak kullanılmaktadır. Şekil 4.18'de görüldüğü gibi quercetin konsantrasyonu arttıkça viyolasin pigment üretimi azalmakta diğer bir ifade ile quercetin bakteriyel iletişim sistemini inhibe etmektedir. Dolayısıyla quercetin gibi antioksidan özellikteki bir molekülün, bakteriyel iletişimi kesmesi, antibakteriyel çalışmalar için yeni bir umut ve boyut kazandırmaktadır.

Antibakteriyel ajanlara karşı patojen bakterilerin direnç kazanması hem tedavilerin yanlış uygulanmasına dolayısıyla tedavi sürecinin uzamasına hem de büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Aynı zamanda antibakteriyel ajanların canlı bünyesine de çok büyük yan etkileri olmaktadır. Bakteriyel iletişim kesilmesine yönelik yapılan çalışmalar sayesinde bakteriler kullanılan moleküllere direnç geliştiremeyecek dolayısıyla hastaların tedavi olanakları artacaktır. Bu araştırma göstermektedir ki antioksidan özellikteki quercetin molekülün anti-quorum sensing aktivitesi söz konusudur ve C6-HSL gibi Gram negatif patojen bakteriler tarafından sıklıkla kullanılan bakteriyel iletişim molekülü bu yolla engellenmektedir.

4.9. Resveratrol Molekülünün Anti-Quorum Sensing Aktivitesinin Belirlenmesi

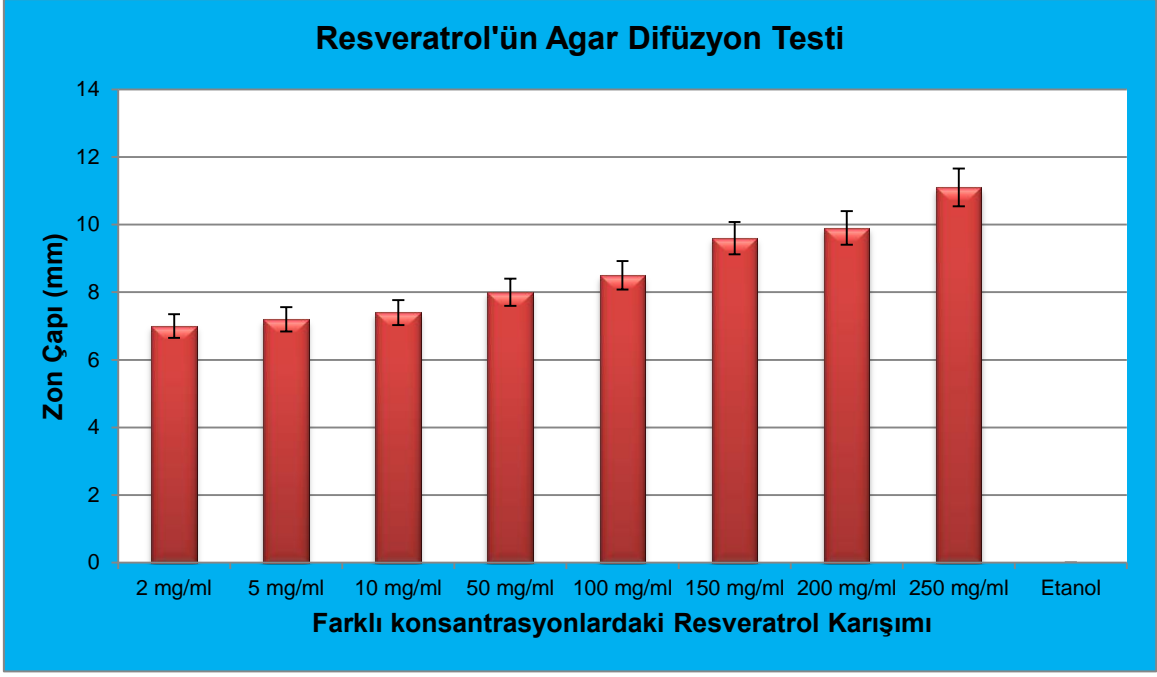
Bölüm 3.13.'te belirtildiği şekilde resveratrol'ün 2, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 mg/ml'lik konsantrasyonları etanol içerisinde çözülerek hazırlandı. Anti-quorum sensing aktivite çalışması için disk difüzyon ve agar difüzyon testleri yapılmış, zon çapları ise mm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.20).



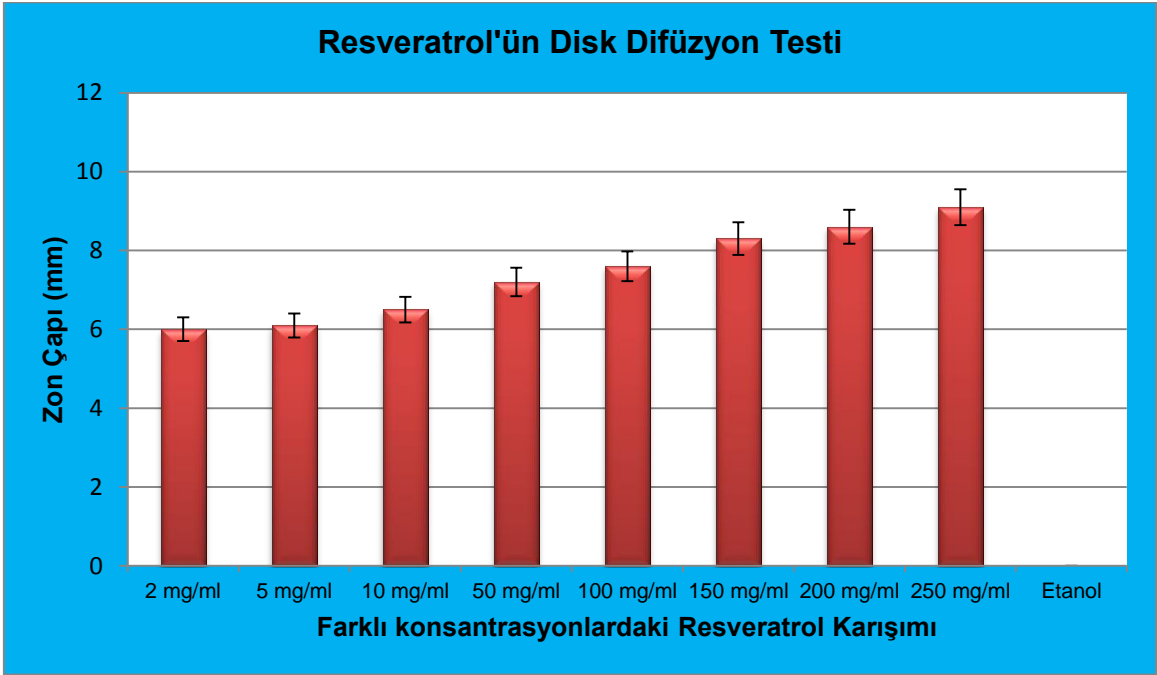
Şekil 4.21.Resveratrol'ün disk difüzyon testi sonucu

Resveratrol sağlık üzerinde olumlu etkisi yüksek olan antioksidan moleküller arasında ön sıralarda yer almaktadır. Sahip olduğu güçlü antioksidan özellikten dolayı serbest radikallerin hasarlarından hücreyi korur. Resveratrol özellikle bazı fungus ve bakterilerin etkilerini azaltabilir, bu özellikten yola çıkarak çalışmamızda resveratrol'ün bakteriyel iletişim sistemi üzerinde de etkinliği araştırılmıştır. Bakteriyel iletişim de Gram negatif türlerin yaygın olarak kullandığı C6-AHL molekül üzerinde resveratrol'ün anti-quorum sensing aktivitesi belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan resveratrol'ün konsantrasyonu arttıkça sinyal molekülü üzerindeki etkisinde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

Anti-quorum sensing aktivite çalışmalarının çoğunda agar difüzyon ve disk difüzyon çalışmalarına ek olarak violasin pigment izolasyonu da yapılmaktadır. Bunun amacı oluşan etkinin antibakteriyel mi yoksa gerçekten sinyal molekülünün inhibisyonundan mı meydana geldiğini anlamaktır. Çalışmamız sonucunda antioksidan bir bileşik olan resveratrol'ün bakteriyel iletişim sisteminde de etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). Anti-qorum sensing aktivite çalışmaları bakterilerin antibakteriyel ajanlara karşı geliştirdikleri direnç karşısında uygulanabilir bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 4.22. Resveratrol'ün Agar Difüzyon Testi Sonuçları



Şekil 4.23. Resveratrol'ün Disk Difüzyon Testi Sonuçları

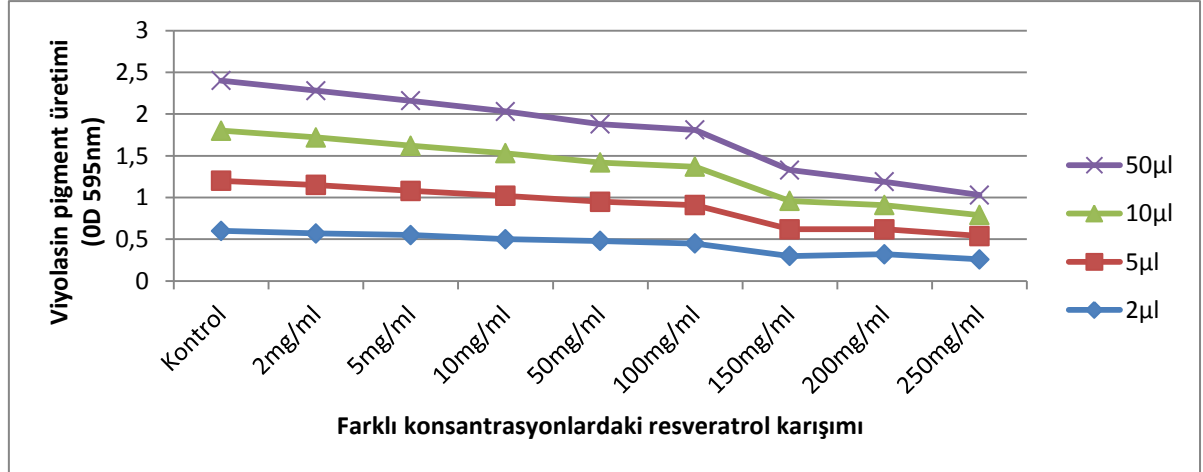
Kerekes ve ark., adaçayı, ardıç, limon ve mercanköşk'ünden elde ettikleri uçucu yağların bakteri ve mayaların oluşturdukları biyofilm ve bakteriyel iletişim sistemi molekülü olan C6-AHL üzerinde etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda AHL-

aracılı QS mekanizmasının engellenmesi için bu uçucu yağların iyi birer aday olabileceğini belirtmişlerdir [186] . Uçucu yağların antimikrobiyal etkilerinin olduğu bilinmektedir [187] . Bu etkinin sinyal moleküllerini inhibe etme yolu ile ortaya çıktığı ileri sürülebilir.

Adonizio ve ark., Güney Florida'da dan izole ettikleri tıbbi önemi yüksek 50 bitkinin anti-quorum sensing aktivitesini araştırmışlar. 6 bitki türünün yüksek anti-qs aktivitesi olduğunu saptamışlardır [188] .

Alvarez ve ark., çay ağacı ve propolis'in viyolasin pigmenti üzerindeki etkinliğini saptamışlar, bu bileşiklerin anti-quorum sensing aktivitesi olduğunu ileri sürmüşlerdir [189] .

Bu çalışmalara benzer olarak Priya ve ark., çin otu olarak bilinen *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn bitkisinden elde ettikleri metanolik ekstraları *E. coli* [pSB401] , *E. coli* [pSB1075] ve *Chromobacterium violaceum* CVO26 sensör bakterileri üzerinde denemişler ve ortamdaki sinyal moleküllerinin inhibe olabildiğini belirlemişlerdir [12] .



Şekil 4.24. Ortamdaki viyolasin pigmenti üzerine farklı konsantrasyonlardaki resveratrol'ün etkisi

Geleneksel ilaç olarak kullanılan bitki ekstralarının ve benzerlerinin quorum sensing mekanizması üzerindeki etkilerini göstermeye yönelik bir diğer çalışma Chu ve ark. tarafından yapılmış ve *Rhubarb*, *Fructus gardeniae* ve *Andrographis paniculata* bitkilerinin anti-quorum sensing aktivite gösterdiklerini

Chromobacterium violaceum CV12472 ve *Pseudomonas aeruginosa* PA01 kullanarak ispatlanmıştır [190] .

Yukarıda sayılan birçok çalışmada görüldüğü gibi patojenlerle iç içe olan birçok bitkide bunlara karşı bazı moleküller üretilmekte ve bakterilerin etkileri azaltılmaktadır. Bitkilerin geliştirdiği bu özellikler sadece antibakteriyel etkiyle sınırlı değildir, bakterilerin iletişimini keserek onların virülans özelliklerinin de engellenmesini sağlamaktadırlar. Yapılan çalışmalar incelendiğinde araştırmacıların çalışmalarında kullandıkları bitki ekstraktlarının içeriğinde çeşitli bileşikler bulunduğu görülmektedir, bu nedenle anti-quorum sensing aktiviteden hangi molekülün sorumlu olduğu açıklanmamaktadır. Yaptığımız çalışmada ise saf olarak elde edilen quercetin ve resveratrol bileşiklerinin bakteriyel iletişimde etkin olduğu saptanmıştır.

Genel olarak çalışmamız değerlendirildiğinde nozokomiyal ve toprak kaynaklı *Acinetobacter* türlerinin bakteriyel iletişimde farklı sinyal moleküllerini kullandıkları ortaya çıkmıştır. 3-oxo-C8-AHL ve C8-AHL molekülleri *Acinetobacter*'ler için bakteriyel iletişimde birbirlerini tanımak için kullandıkları bir molekül olabilir. Sadece nozokomiyal izolatlarda görülen C10-AHL, C12-AHL, C14-AHL ve C16-AHL'ların ise virülansta etkin olan moleküller olabileceği düşünülmektedir. Farklı sinyal molekülü üretimi fazla olan türlerde biyofilm oluşumunun yüksek olması ve siderofor üretiminin gözleniyor olması bu moleküllerin virülansta etkin olduğunun bir göstergesidir. Bu çalışmada nozokomiyal enfeksiyon etmeni olarak izole edilen ve *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanan türlerin çok sayıda iletişim molekülü sentezlediği gösterilmiştir. Bunun yanısıra çok farklı kaynaklardan izole edilmiş olan bu bakterilerin birçok ortama kolay adapte olmalarında bu moleküllerin görevli olduğu fikrini de vermektedir. Ayrıca antioksidan özellikleri ile dikkat çeken quercetin ve resveratrol'ün bakteriyel iletişim sistemi inhibisyonunda kullanılabileceği, dolayısıyla antibakteriyel ajanların yerini alabilecek ve konağa zararı olmayacak moleküller oldukları saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M. ve diğeri. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of Violacein Production and Inhibition For The Detection of n-acylhomoserine Lactones. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 12), 3703-3711, **1997**
- [2] Yin, W.-F.F., Purmal, K., Chin, S., Chan, X.-Y.Y., Chan, K.-G.G. Long chain N-Acyl homoserine lactone Production by *Enterobacter sp.* Isolated from Human Tongue Surfaces. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12 (11), 14307-14314, **2012**
- [3] Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Rinehart, K.L. ve diğeri. Detecting and Characterizing N-Acyl-homoserine lactone Signal molecules by Thin-layer Chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America(PNAS)*, 94 (12), 6036-6041, **1997**
- [4] Greenberg, W.C.F.S.C.W.E.P. Quorum sensing in bacteria: The luxR-luxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology*, 176 (2), 269-275, **1994**
- [5] Zhu, J., Beaber, J.W., Moré, M.I., Fuqua, C., Eberhard, A., Winans, S.C. Analogs of The Autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone Strongly Inhibit Activity of The traR Protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 180 (20), 5398-5405, **1998**
- [6] Hogan, D.A. Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell*, 5 (4), 613-619, **2006**
- [7] Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., Fink, G.R. Tyrosol is a Quorum-sensing Molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (14), 5048-5052, **2004**
- [8] De Kievit, T.R., Iglewski, B.H. Bacterial Quorum sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 68 (9), 4839-4849, **2000**
- [9] Bozkurt, F., Kaya, S., Tekin, R., Gulsun, S., Deveci, O., Dayan, S. ve diğeri. Analysis of Antimicrobial Consumption and Cost in a Teaching Hospital. *Journal Of Infection And Public Health*, 7 (2), 161-169, **2014**
- [10] Ertek, M. Hastane Enfeksiyonları: Türkiye Verileri. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, 60, 9-14, **2008**
- [11] Tariq, T.M. Bacteriologic Profile and Antibiogram of Blood Culture Isolates from a Children's Hospital in Kabul. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 24 (6), 3396-3399, **2014**
- [12] Priya, K., Yin, W.-F.F., Chan, K.-G.G. Anti-quorum sensing Activity of the Traditional Chinese Herb, *Phyllanthus amarus*. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13 (11), 14558-14569, **2013**
- [13] Zahin, M., Hasan, S., Aqil, F., Khan, M.S., Husain, F.M., Ahmad, I. Screening of Certain Medicinal Plants from India for Their Anti-quorum

- sensing Activity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48 (12), 1219-1224, **2010**
- [14] Schreckenberger PC, Von Graevenitz A. *Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes*. In: Baron E.J., Pfaller M.A.; Tenover F.C., Tenover R.H. *Manual of Clinical Microbiology*, 749-760., **2000**
- [15] Howard A., O'Donoghue M., Feeney A., Sleator R.D. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Opportunistic Pathogen. *Virulence*, 3 (3), 243-250, **2012**
- [16] Towner, K.J. *Acinetobacter*: An old friend, but a new enemy. *The Journal of Hospital Infection*, 73 (4), 355-363, **2009**
- [17] Gilardi, G.L. Characterization of The Oxidase-negative, Gram-negative Coccobacilli (the *Achromobacter-Acinetobacter* group). *Antonie van Leeuwenhoek*, 35 (1), 421-429, **1969**
- [18] Kılıç, A., Li, H., Mellmann, A., Başustaoğlu, A.C., Kul, M., Şenses, Z. ve diğerleri. *Acinetobacter septicus* sp. nov. Association with a Nosocomial Outbreak of Bacteremia in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (3), 902-908, **2008**
- [19] Baumann, P. Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology*, 96 (1), 39-42, **1968**
- [20] Valentine, S.C., Contreras, D., Tan, S., Real, L.J., Chu, S., Xu, H.H. Phenotypic and Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Nosocomial Outbreaks in Los Angeles County, California. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (8), 2499-2507, **2008**
- [21] Goel, V., Kapil, A. Monoclonal Antibodies Against the Iron Regulated Outer Membrane Proteins of *Acinetobacter baumannii* are Bactericidal. *BMC Microbiology*, 1 (1), 16, **2001**
- [22] Goel, V., Kapil, A., Das, B., Rao, D. Influence of Iron on Growth and Extracellular Products of *Acinetobacter baumannii*. *Japanese Journal Of Medical Science And Biology*, 51, 25 - 33, **1998**
- [23] Vahaboglu, H., Coskun, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksali, I. ve diğerleri. Clinical Importance of Extended-spectrum Beta-lactamase (per-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal Of Medical Microbiology*, 50 (7), 642-645, **2001**
- [24] Cerqueira, G.M., Peleg, A.Y. Insights into *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *IUBMB Life*, 63 (12), 1055-1060, **2011**
- [25] Tatman-Otkun M, G.Ş., Özer B, Türe M. Nosokomiyal *Acinetobacter baumannii* Kökenlerinde 1994'den 2000'e Yıllık Antibiyotik Direnç Değişimi. *Ankem dergisi*, 17, 1-6, **2003**
- [26] Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J. *Acinetobacter* spp. As Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9 (2), 148-165, **1996**
- [27] Ayan, M., Durmaz, R., Aktaş, E., Durmaz, B. Bacteriological, Clinical and Epidemiological Characteristics of Hospital-acquired *Acinetobacter*

- baumannii* Infection in a Teaching Hospital. *The Journal Of Hospital Infection*, 54 (1), 39-45, **2003**
- [28] Kaul, R., Burt, J.A., Cork, L., Dedier, H., Garcia, M., Kennedy, C. ve diğeri. Investigation of a Multiyear Multiple Critical Care Unit Outbreak Due to Relatively Drug-sensitive *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors and Attributable Mortality. *The Journal of infectious diseases*, 174 (6), 1279-1287, **1996**
- [29] Mulin, B., Talon, D., Viel, J.F., Vincent, C., Leprat, R., Thouverez, M. ve diğeri. Risk Factors for Nosocomial Colonization with Multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 (7), 569-576, **1995**
- [30] Yücesoy, M., Yulug, N., Kocagöz, S., Ünal, S., Çetin, S., Calangu, S. Antimicrobial Resistance of Gram-negative Isolates from Intensive care units in Turkey: Comparison to Previous Three Years. *Journal Of Chemotherapy*, 12 (4), 294-298, **2000**
- [31] Agodi, A., Auxilia, F., Barchitta, M., Brusaferrò, S., D'Alessandro, D., Montagna, M.T. ve diğeri. Building a Benchmark Through Active Surveillance of Intensive Care Unit-acquired Infections: The Italian Network spin-uti. *The Journal Of Hospital Infection*, 74 (3), 258-265, **2010**
- [32] D'Arezzo, S., Capone, A., Petrosillo, N., Visca, P., Grab, Ballardini, M. ve diğeri. Epidemic Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Related to European Clonal types I and II in Rome (Italy). *Clinical microbiology and infection*, 15 (4), 347-357, **2009**
- [33] Pardesi, K.R., Yavankar, S.P., Chopade, B.A. Plasmid distribution & Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Acinetobacter* Genospecies from Healthy Skin of a Tribal Population In Western India. *The Indian journal of medical research*, 125 (1), 79-88, **2007**
- [34] Quale, J., Bratu, S., Landman, D., Heddurshetti, R. Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Endemic in New York City. *Clinical Infectious Diseases*, 37 (2), 214-220, **2003**
- [35] Joshi, S.G., Litake, G.M., Ghole, V.S., Niphadkar, K.B. Plasmid-borne Extended-spectrum β -lactamase in a Clinical Isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*, 52 (12), 1125-1127, **2003**
- [36] Hanlon, G.W. The Emergence of Multidrug Resistant *Acinetobacter* species: A Major Concern In the Hospital Setting. *Letters In Applied Microbiology*, 41 (5), 375-378, **2005**
- [37] Yıldırım Mİ, Tuğrul, H. M. Sefoperazon-sulbaktam, İmipenem ve Sefepimin Antibiyoterapi Etkinliklerinin Çoğul Dirençli ve Duyarlı *Acinetobacter baumannii* ile Oluşturulan Deneysel İkili Apse Modelinde Karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45 (3), 422-429, **2011**
- [38] Shehata, A.I. Phenotypic and Genotypic Typing of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by Plasmid Profiles and Multiplex-PCR Typing. *Science Journal of Microbiology*, 274, **2012**

- [39] Abbott, I., Cerqueira, G.M., Bhuiyan, S., Peleg, A.Y. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies. *Expert review of anti-infective therapy*, 11 (4), 395-409, **2013**
- [40] Evans, B.A., Hamouda, A., Amyes, S.G. The Rise of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Current Pharmaceutical Design*, 19 (2), 223-238, **2013**
- [41] D'Arezzo, S., Principe, L., Capone, A., Petrosillo, N., Petrucca, A., Visca, P. Changing Carbapenemase Gene Pattern in an Epidemic Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Lineage Causing Multiple Outbreaks in Central Italy. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (1), 54-61, **2011**
- [42] Gaddy, J.A., Tomaras, A.P., Actis, L.A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 ompA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. *Infection and immunity*, 77 (8), 3150-3160, **2009**
- [43] Tomaras, A., Flagler, M., Dorsey, C., Gaddy, J., Actis, L. Characterization of a Two-component Regulatory System from *Acinetobacter baumannii* that Controls Biofilm Formation and Cellular Morphology. *Microbiology*, 154, 3398 - 3409, **2008**
- [44] Aşık, G. *Acinetobacter baumannii* virülansının açıklanmasında güncel yaklaşımlar. *Mikrobioloji Bülteni*, 45 (2), 371-380, **2011**
- [45] Choi, C.H., Lee, E.Y., Lee, Y.C., Park, T.I., Kim, H.J., Hyun, S.H. ve diğerleri. Outer Membrane Protein 38 of *Acinetobacter baumannii* Localizes to the Mitochondria and Induces Apoptosis of Epithelial cells. *Cell Microbiology*, 7 (8), 1127-1138, **2005**
- [46] Lee, H.W., Koh, Y.M., Kim, J., Lee, J.C., Lee, Y.C., Seol, S.Y. ve diğerleri. Capacity of Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* to form Biofilm and Adhere to Epithelial Cell Surfaces. *Clinical Microbiology And Infection*, 14 (1), 49-54, **2008**
- [47] Rodriguez-Bano, J., Marti, S., Soto, S., Fernandez-Cuenca, F., Cisneros, J.M., Pachon, J. ve diğerleri. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Associated Features and Clinical Implications. *Clinical Microbiology And Infection*, 14 (3), 276-278, **2008**
- [48] Nait Chabane, Y., Mlouka, M., Alexandre, S., Nicol, M., Marti, S., Pestel-Caron, M. ve diğerleri. Virstatin Inhibits Biofilm Formation and Motility of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 14 (1), 62, **2014**
- [49] Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L., Molin, S. In vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of Environmental and Genetic factors. *Journal of Bacteriology*, 188 (10), 3572-3581, **2006**
- [50] Wandersman, C., Delepelaire, P. Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review Of Microbiology* 58, 611 - 647, **2004**
- [51] Dorsey, C., Tolmasky, M., Crosa, J., Actis, L. Genetic Organization of an *Acinetobacter baumannii* Chromosomal Region Harboring Genes Related

- to Siderophore Biosynthesis and Transport. *Microbiology*, 149, 1227 - 1238, **2003**
- [52] Zimble, D., Penwell, W., Gaddy, J., Menke, S., Tomaras, A., Connerly, P. *ve diğerleri*. Iron Acquisition Functions Expressed by the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals*, 22, 23 - 32, **2009**
- [53] Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., Soo, H.-M.L., Greenberg, E.P., Zhang, L.-H. The Two-component Response Regulator pprB Modulates Quorum-sensing Signal Production and Global Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 56 (5), 1287-1301, **2005**
- [54] Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. Quorum sensing in Bacteria: The luxR-luxI Family of Cell Density-responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology*, 176 (2), 269-275, **1994**
- [55] Sperandio, V., Li, C.C., Kaper, J.B. Quorum-sensing *Escherichia coli* Regulator a: A Regulator of the lysR Family Involved in the Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island in Enterohemorrhagic *E. coli*. *Infection and immunity*, 70 (6), 3085-3093, **2002**
- [56] Otto, M. Quorum-sensing control in *Staphylococci* - a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiology Letters*, 241 (2), 135-141, **2004**
- [57] Bassler, B.L., Losick, R. Bacterially Speaking. *Cell*, 125 (2), 237-246, **2006**
- [58] Miller, M.B., Bassler, B.L. Quorum sensing in Bacteria. *Annual Review Of Microbiology*, 55, 165-199, **2001**
- [59] Yong, Y.-C., Zhong, J.-J. (2013). Impacts of Quorum sensing on Microbial Metabolism and Human Health. Zhong, J.-J. (Ed.). Future trends in Biotechnology (c. 131, s. 25-61): Springer Berlin Heidelberg
- [60] Schauder, S., Bassler, B.L. The Languages of Bacteria. *Genes And Development*, 15 (12), 1468-1480, **2001**
- [61] Greenberg, E.P. Acyl-homoserine lactone Quorum sensing in Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 38, 117-121, **2000**
- [62] Kempner, E.S., Hanson, F.E. Aspects of Light Production by *Photobacterium fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 95 (3), 975-979, **1968**
- [63] Eberhard, A. Inhibition and Activation of Bacterial Luciferase Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 109 (3), 1101-1105, **1972**
- [64] Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *Journal of Bacteriology*, 104 (1), 313-322, **1970**
- [65] Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J. Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium fischeri* Luciferase. *Biochemistry*, 20 (9), 2444-2449, **1981**
- [66] Eglund, K.A., Greenberg, E.P. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Elements of the luxI Promoter. *Molecular Microbiology*, 31 (4), 1197-1204, **1999**

- [67] Williams, P. Quorum sensing, Communication and Cross-kingdom Signalling in the Bacterial World. *Microbiology (Reading, England)*, 153 (Pt 12), 3923-3938, **2007**
- [68] Gambello, M.J., Iglewski, B.H. Cloning and Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR Gene, a Transcriptional Activator of Elastase Expression. *Journal of Bacteriology*, 173 (9), 3000-3009, **1991**
- [69] Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R. ve diğerleri. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the luxRI Homologs ahyRI and asaRI and Their Cognate N-Acylhomoserine lactone Signal Molecules. *Journal of Bacteriology*, 179 (17), 5271-5281, **1997**
- [70] Hirakawa, H., Tomita, H. Interference of Bacterial Cell-to-cell Communication: A New Concept of Antimicrobial Chemotherapy Breaks Antibiotic. *Frontiers in Microbiology*, 4 **2013**
- [71] Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes Requires Cell-to-cell Communication. *Science*, 260 (5111), 1127-1130, **1993**
- [72] Joint, I., Tait, K., Wheeler, G. Cross-kingdom Signalling: Exploitation of Bacterial Quorum Sensing Molecules by the Green Seaweed *Ulva*. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences*, 362 (1483), 1223--1233, **2007**
- [73] Valdez, J.C., Peral, M.C., Rachid, M., Santana, M., Perdigon, G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in Infected Burns: The Potential Use of Probiotics in Wound Treatment. *Clinical Microbiology And Infection*, 11 (6), 472-479, **2005**
- [74] Zhang, Z., Pierson, L.S. A Second Quorum-sensing System Regulates Cell Surface Properties But Not Phenazine Antibiotic Production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 **2001**
- [75] Cataldi, T.R., Bianco, G., Palazzo, L., Quaranta, V. Occurrence of N-Acyl-homoserine lactones in Extracts of Some Gram-negative Bacteria Evaluated by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 361 (2), 226-235, **2007**
- [76] Ortori, C.A., Halliday, N., Camara, M., Williams, P., Barrett, D.A. LC-MS/MS Quantitative Analysis of Quorum Sensing Signal Molecules. *Methods In Molecular Biology*, 1149, 255-270, **2014**
- [77] Steindler, L., Bertani, I., De Sordi, L., Schwager, S., Eberl, L., Venturi, V. LasI/R and rhlI/R Quorum sensing in a Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Beneficial to Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (15), 5131-5140, **2009**
- [78] Stauff, D.L., Bassler, B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA Recognition and Gene Regulation by the cviR Receptor. *Journal of Bacteriology*, 193 (15), 3871-3878, **2011**
- [79] Farrand, S.K., Qin, Y., Oger, P. Quorum-sensing System of *Agrobacterium* Plasmids: Analysis and Utility. *Methods Enzymology*, 358, 452-484, **2002**

- [80] Zhu, J., Chai, Y., Zhong, Z., Li, S., Winans, S.C. *Agrobacterium* Bioassay strain for Ultrasensitive Detection of N-Acyl homoserine lactone-type Quorum-sensing Molecules: Detection of Autoinducers in *Mesorhizobium huakuii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (11), 6949-6953, **2003**
- [81] Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H. ve diğ erleri. Structure of the Autoinducer Required for Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes. *PNAS*, 91 (1), 197-201, **1994**
- [82] Llamas, I., Keshavan, N., Gonzalez, J.E. Use of *Sinorhizobium meliloti* as an Indicator for Specific Detection of Long-chain N-Acyl homoserine lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6), 3715-3723, **2004**
- [83] Khan, S.R., Mavrodi, D.V., Jog, G.J., Suga, H., Thomashow, L.S., Farrand, S.K. Activation of the phz Operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 Requires the luxR Homolog phzR, n-(3-oh-hexanoyl)-l-homoserine lactone Produced by the luxI Homolog phzI, and a cis-acting phz Box. *Journal of Bacteriology*, 187 (18), 6517-6527, **2005**
- [84] Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jørgensen, F., Chhabra, S.R. ve diğ erleri. Construction and Analysis of luxCDABE-based Plasmid Sensors for Investigating N-Acyl homoserine lactone-mediated Quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 163 (2), 185-192, **1998**
- [85] Lindsay, A., Ahmer, B.M. Effect of Sdia on Biosensors of N-Acylhomoserine lactones. *Journal of Bacteriology*, 187 (14), 5054-5058, **2005**
- [86] Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H. ve diğ erleri. N-acylhomoserine-lactone-mediated Communication Between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in Mixed Biofilms. *Microbiology*, 147 (Pt 12), 3249-3262, **2001**
- [87] Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B. ve diğ erleri. Gfp-based N-Acyl homoserine-lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (2), 575-585, **2001**
- [88] Bromberg, N., Duran, N. Violacein Biotransformation by *Basidiomycetes* and Bacteria. *Letters In Applied Microbiology*, 33 (4), 316-319, **2001**
- [89] Durán, N., Menck, C.F. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. *Critical reviews in microbiology*, 27 (3), 201-222, **2001**
- [90] Reilly, J., Pyne, G. On the Pigment Produced by *Chromobacterium violaceum*. *Biochemical Journal*, 21 (5), 1059-1064, **1927**
- [91] Tobie, W.C. The Pigment of *Bacillus violaceus*: I. The Production, Extraction and Purification of Violacein. *Journal of Bacteriology*, 29 (3), 223-227, **1935**
- [92] Lade, H., Paul, D., Kweon, J.H. Isolation and Molecular Characterization of Biofouling Bacteria and Profiling of Quorum sensing Signal Molecules from Membrane Bioreactor Activated Sludge. *International journal of molecular sciences*, 15 (2), 2255-2273, **2014**

- [93] Charrier, T., Durand, M.J., Affi, M., Jouanneau, S., Gezekel, H., Thouand, G. Bacterial Bioluminescent Biosensor Characterisation for On-line Monitoring of Heavy Metals Pollutions in Waste Water Treatment Plant Effluents. *Biosensors*, pp. 302, February, INTECH, Croatia, **2010**
- [94] Drees, B., Reiger, M., Jung, K., Bischofs, I.B. A Modular View of the Diversity of Cell-density-encoding Schemes in Bacterial Quorum-sensing Systems. *Biophysical Journal*, 107 (1), 266-277, **2014**
- [95] Galloway, W.R., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., Spring, D.R. Quorum sensing in Gram-negative Bacteria: Small-molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum sensing Pathways. *Chemical Reviews*, 111 (1), 28-67, **2011**
- [96] Petersen, F.C., Fimland, G., Scheie, A.A. Purification and Functional Studies of a Potent Modified Quorum-sensing Peptide and a Two-peptide Bacteriocin in *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology*, 61 (5), 1322-1334, **2006**
- [97] Tateda, K., Ishii, Y., Matsumoto, T., Furuya, N., Nagashima, M., Matsunaga, T. *ve diğerleri*. Direct Evidence for Antipseudomonal Activity of Macrolides: Exposure-dependent Bactericidal Activity and Inhibition of Protein Synthesis by Erythromycin, Clarithromycin and Azithromycin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 40 (10), 2271-2275, **1996**
- [98] Zhang, L.H., Dong, Y.H. Quorum sensing and Signal Interference: Diverse Implications. *Mol Microbiol*, 53 (6), 1563-1571, **2004**
- [99] Rasmussen, T.B., Givskov, M. Quorum-sensing Inhibitors as Anti-pathogenic Drugs. *International Journal Of Medical Microbiology*, 296 (2-3), 149-161, **2006**
- [100] Rasmussen, T.B., Givskov, M. Quorum sensing Inhibitors: A Bargain of Effects. *Microbiology*, 152 (Pt 4), 895-904, **2006**
- [101] Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandl, H., Bachofen, R. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology*, 4, 25, **2004**
- [102] Smith, R.S., Iglewski, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *The Journal Of Clinical Investigation*, 112 (10), 1460-1465, **2003**
- [103] Smith, R.S., Iglewski, B.H. P. *Aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion Microbiology*, 6 (1), 56-60, **2003**
- [104] Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O. *ve diğerleri*. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*, 151 (Pt 5), 1325-1340, **2005**
- [105] Muh, U., Schuster, M., Heim, R., Singh, A., Olson, E.R., Greenberg, E.P. Novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. *Antimicrobial Agents Chemother*, 50 (11), 3674-3679, **2006**
- [106] Muh, U., Hare, B.J., Duerkop, B.A., Schuster, M., Hanzelka, B.L., Heim, R. *ve diğerleri*. A structurally unrelated mimic of a *Pseudomonas aeruginosa*

- acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal. *PNAS*, 103 (45), 16948-16952, **2006**
- [107] Geske, G.D., O'Neill, J.C., Miller, D.M., Mattmann, M.E., Blackwell, H.E. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: Systematic evaluation of n-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (44), 13613-13625, **2007**
- [108] Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H., Kato, J. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by N-acyl cyclopentylamides. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (10), 3183-3188, **2007**
- [109] Kim, C., Kim, J., Park, H.Y., McLean, R.J., Kim, C.K., Jeon, J. ve diğ erleri. Molecular modeling, synthesis, and screening of new bacterial quorum sensing antagonists. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17 (10), 1598-1606, **2007**
- [110] Hoffmann, N., Lee, B., Hentzer, M., Rasmussen, T.B., Song, Z., Johansen, H.K. ve diğ erleri. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in cftr(-/-) mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51 (10), 3677-3687, **2007**
- [111] Frezza, M., Souler, L., Reverchon, S., Guilian, N., Jerez, C., Queneau, Y. ve diğ erleri. Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (7), 3550-3556, **2008**
- [112] Jakobsen, T.H., Bragason, S.K., Phipps, R.K., Christensen, L.D., van Gennip, M., Alhede, M. ve diğ erleri. Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (7), 2410-2421, **2012**
- [113] Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Phipps, R.K., Shanmugham, M.S., Christensen, L.D., Alhede, M. ve diğ erleri. Ajoene, a sulfur-rich molecule from Garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (5), 2314-2325, **2012**
- [114] Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J. ve diğ erleri. Small-molecule inhibitor binding to an n-acyl-homoserine lactone synthase. *PNAS*, 108 (29), 12089-12094, **2011**
- [115] Gutierrez, J.A., Crowder, T., Rinaldo-Matthis, A., Ho, M.C., Almo, S.C., Schramm, V.L. Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nature Chemical Biology*, 5 (4), 251-257, **2009**
- [116] Lamson, D.W., Brignall, M.S. Antioxidants and cancer, part 3: Quercetin. *Alternative Medicine Review : A Journal Of Clinical Therapeutic*, 5 (3), 196-208, **2000**

- [117] Anisimova, N., Kiselevsky, M., Sosnov, A., Sadovnikov, S., Stankov, I., Gakh, A. Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: A comparative study. *Chemistry Central Journal*, 5 (1), 88, **2011**
- [118] Patwardhan, R.B., Dhakephalkar, P.K., Niphadkar, K.B., Chopade, B.A. A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acinetobacter baumannii* harbouring multiple plasmids. *The Indian Journal of Medical Research*, 128 (2), 178-187, **2008**
- [119] Willumsen, S.S. Acquisition of foreign DNA by natural transformation in *Acinetobacter baylyi*: Quantitative estimates and molecular characterization of the introgression process. *Universitetet i Tromsø* **2008**
- [120] Lahiri, K.K., Mani, N.S., Purai, S.S. *Acinetobacter spp* as nosocomial pathogen: Clinical significance and antimicrobial sensitivity. *Medical Journal Armed Forces India*, 60 **2004**
- [121] Nasr, R.A., Attalah, M.F. Molecular epidemiology of nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates. *Nature & Science* **2012**
- [122] Azam F. Tayabali, A.F., Nguyen, K.C., Shwed, P. S., Crosthwait, J., Coleman, G. Seligy, V. L. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *PloS one*, 7 (5), **2012**
- [123] Pajand, O., Hojabri, Z., Nahaei, M.R., Hajibonabi, F., Pirzadeh, T., Aghazadeh, M. *ve diğerleri*. In vitro activities of tetracyclines against different clones of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from two Iranian hospitals. *International journal of antimicrobial agents*, 43 (5), 476-478, **2014**
- [124] Evaluation of chromagar acinetobacter for detection of enteric carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in samples from critically ill patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (7), 2249-2251, **2009**
- [125] Jawad, A., Hawkey, P.M., Heritage, J., Snelling, A.M. Description of leeds acinetobacter medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter spp.*, and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal of clinical microbiology*, 32 (10), 2353-2358, **1994**
- [126] Comparison of disk diffusion and e-test methods for doripenem susceptibility of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 6 (3) **2014**
- [127] Steel, K.J. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *Journal of General Microbiology* **1961**
- [128] Taylor, W.I., Achanzar, D. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. *Applied microbiology* **1972**
- [129] Beck-Sagué, C.M., Jarvis, W.R., Brook, J.H., Culver, D.H., Potts, A., Gay, E. *ve diğerleri*. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. *American Journal of Epidemiology*, 132 (4), 723-733, **1990**
- [130] Gündoğan, N., Çıtak, S., Turan, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk,

- pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control*, 17 (5), 389392, **2006**
- [131] Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., Gram, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of ahl-production kinetics. *Journal of microbiological methods*, 44 (3), 239-251, **2001**
- [132] Hua, Z., Sophy, J.T., Mark, D.P.W. Production of n-acyl homoserine lactones by gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 29, **2001**
- [133] Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., Ikeda, T. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiology Letters*, 279 (1), 124-130, **2008**
- [134] McLean, R.J., Pierson, L.S., Fuqua, C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *Journal of Microbiological Methods*, 58 (3), 351-360, **2004**
- [135] Quorum sensing in bacteria: The luxR-luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176 (2), 269-275, **1994**
- [136] Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R. *ve diğerleri*. Quorum quenching by an n-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and immunity*, 74 (3), 1673-1682, **2006**
- [137] González, R.H., Nusblat, A., Nudel, B.C. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiological research*, 155 (4), 271-277, **2001**
- [138] Pina, P., Guezenec, P., Grosbuis, S., Guyot, L., Ghnassia, J.C., Allouch, P.Y. An *Acinetobacter baumannii* Outbreak at the Versailles Hospital Center. *Pathologie-biologie*, 46 (6), 385-394, **1998**
- [139] González, R.H., Dijkshoorn, L., Van den Barselaar, M., Nudel, C. Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Revista Argentina de microbiología*, 41 (2), 73-78, **2009**
- [140] Stacy, D.M., Welsh, M.A., Rather, P.N., Blackwell, H.E. Attenuation of quorum sensing in the pathogen *Acinetobacter baumannii* using non-native n-acyl homoserine lactones. *ACS Chemical Biology*, 7 (10), 1719-1728, **2012**
- [141] Anbazhagan, D., Mansor, M., Yan, G.O., Md Yusof, M.Y., Hassan, H., Sekaran, S.D. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *PLoS One*, 7 (7) **2012**
- [142] Saroj, S.D., Rather, P.N. Streptomycin inhibits quorum sensing in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 57 (4), 1926-1929, **2013**

- [143] Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L., Gram, L. C. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms* **2005**
- [144] Quorum sensing in *Aeromonas* species isolated from patients in Malaysia. *Current microbiology*, 62 (1), 167-172, **2011**
- [145] Favre-Bonté, S., Köhler, T., Van Delden, C. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: Role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (4), 598-604, **2003**
- [146] Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis. *Journal of Bacteriology*, **1996**
- [147] Wang, X., Preston, J.F., Romeo, T. The PGAABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186 (9), 2724-2734, **2004**
- [148] Plessner, O., Klapatch, T., Guerinet, M. Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1688 - 1690, **1993**
- [149] Eijkelkamp, B., Hassan, K., Paulsen, I., Brown, M. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*, 12 (1), 126, **2011**
- [150] Yamamoto, S., Okujo, N., Sakakibara, Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Archives Of Microbiology*, 162, 249 - 254, **1994**
- [151] Mihara, K., Tanabe, T., Yamakawa, Y., Funahashi, T., Nakao, H., Narimatsu, S. *ve diğerleri*. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. *Microbiology*, 150, 2587 - 2597, **2004**
- [152] Miethke, M., Marahiel, M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 71, 413 - 451, **2007**
- [153] Chong, Y.M., Yin, W.F., Ho, C.Y., Mustafa, M.R., Hadi, A.H., Awang, K. *ve diğerleri*. Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits anti-quorum sensing activity. *Journal of Natural Products*, 74 (10), 2261-2264, **2011**
- [154] Siddiqui, M.F., Sakinah, M., Singh, L., Zularisam, A.W. Targeting n-acyl-homoserine-lactones to mitigate membrane biofouling based on quorum sensing using a biofouling reducer. *Journal of Biotechnology*, 161 (3), 190-197, **2012**
- [155] Norizan, S.N., Yin, W.-F.F., Chan, K.-G.G. Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13 (4), 5117-5129, **2013**
- [156] Zaki, A.A., Shaaban, M.I., Hashish, N.E., Amer, M.A., Lahloub, M.-F.F. Assessment of anti-quorum sensing activity for some ornamental and

- medicinal plants native to Egypt. *Scientia pharmaceutica*, 81 (1), 251-258, **2013**
- [157] Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to Clove oil. *Letters in applied microbiology*, 49 (3), 354-360, **2009**
- [158] Dortet, L., Legrand, P., Soussy, C.J., Cattoir, V. Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (12), 4471-4478, **2006**
- [159] Yıldırım, M.İ. Sefaperazon-sulbaktam, İmipenem ve sefepimin antibiyoterapî etkinliklerinin çoğul dirençli ve duyarlı *Acinetobacter baumannii* ile oluşturulan deneysel ikili apse modelinde karşılaştırılması, **2006**
- [160] Trottier, V., Segura, P.G., Namias, N., King, D., Pizano, L.R., Schulman, C.I. Outcomes of *Acinetobacter baumannii* infection in critically ill burned patients. *Journal Of Burn Care And Research*, 28 (2), 248-254, **2007**
- [161] Chan, K.-G.G., Atkinson, S., Mathee, K., Sam, C.-K.K., Chhabra, S.R., Cámara, M. ve diğerleri. Characterization of n-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: Co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiology*, 11, 51, **2011**
- [162] Czajkowski, R., Jafra, S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta biochimica Polonica*, 56 (1), 1-16, **2009**
- [163] Boşgelmez-Tınaz, G., Ulusoy, S., Arıdoğan, B., Eroğlu, F., Kaya, S. N-butanoyl-l-homoserine lactone (bhl) deficient *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an intensive care unit. *Microbiological Research*, 160 (4), 399-403, **2005**
- [164] Şentürk, S., Ulusoy, S., Boşgelmez-Tınaz, G., Yağcı, A. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **2012**
- [165] Chan, K.-G., Cheng, H.J., Chen, J.W., Yin, W.-F., Ngeow, Y.F. Tandem mass spectrometry detection of quorum sensing activity in multidrug resistant clinical isolate *Acinetobacter baumannii*. *The Scientific World Journal*, 2014, 6, **2014**
- [166] Morgan-Sagastume, F., Boon, N., Dobbelaere, S., Defoirdt, T., Verstraete, W. Production of acylated homoserine lactones by *Aeromonas* and *Pseudomonas* strains isolated from municipal activated sludge. *Canadian Journal of Microbiology*, 51 (11), 924-933, **2005**
- [167] Borlee, B.R., Geske, G.D., Robinson, C.J., Blackwell, H.E., Handelsman, J. Quorum-sensing signals in the microbial community of the cabbage white butterfly larval midgut. *International Society for Microbial Ecology*, 2 (11), 1101-1111, **2008**

- [168] Chang, C.-Y., Koh, C.-L., Sam, C.-K., Chan, X.-Y., Yin, W.F., Chan, K.G. Unusual long-chain acyl homoserine lactone production by and presence of quorum quenching activity in bacterial isolates from diseased Tilapia fish. *PLoS ONE*, 7 (8), e44034, **2012**
- [169] Schwenteit, J., Gram, L., Nielsen, K.F., Fridjonsson, O.H., Bornscheuer, U.T., Givskov, M. *ve diğerleri*. Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase asai on bacterial virulence. *Veterinary Microbiology*, 147 (3-4), 389-397, **2011**
- [170] Chen, J.W., Koh, C.-L.L., Sam, C.-K.K., Yin, W.-F.F., Chan, K.-G.G. Short chain n-acyl homoserine lactone production by soil isolate *Burkholderia sp.* Strain A9. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13 (10), 13217-13227, **2013**
- [171] Rodelas, B., Lithgow, J.K., Wisniewski-Dye, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A. *ve diğerleri*. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (rhi) genes in *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*. *Journal Of Bacteriology*, 181 (12), 3816-3823, **1999**
- [172] Trivedi, P., Spann, T., Wang, N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial Ecology*, 62 (2), 324-336, **2011**
- [173] Degrassi, G., Aguilar, C., Bosco, M., Zahariev, S., Pongor, S., Venturi, V. Plant growth-promoting pseudomonas putida wcs358 produces and secretes four cyclic dipeptides: Cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Current Microbiology*, 45 (4), 250-254, **2002**
- [174] Atkinson, S., Goldstone, R.J., Joshua, G.W.P., Chang, C.-Y., Patrick, H.L., Cámara, M. *ve diğerleri*. Biofilm development on *Caenorhabditis elegans* by *Yersinia* is facilitated by quorum sensing-dependent repression of type iii secretion. *PLoS Pathogens*, 7 (1), e1001250, **2011**
- [175] Rivas, M.O., Vargas, P., Riquelme, C.E. Interactions of *Botryococcus braunii* cultures with bacterial biofilms. *Microbial Ecology*, 60 (3), 628-635, **2010**
- [176] Venturi, V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev*, 30 (2), 274-291, **2006**
- [177] De Kievit, T.R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 11 (2), 279-288, **2009**
- [178] Yin, W.-F., Purmal, K., Chin, S., Chan, X.-Y., Koh, C.-L., Sam, C.-K. *ve diğerleri*. N-acyl homoserine lactone production by *Klebsiella pneumoniae* isolated from human tongue surface. *Sensors*, 12 (3), 3472-3483, **2012**
- [179] Pour, N.K., Dusane, D.H., Dhakephalkar, P.K., Zamin, F.R., Zinjarde, S.S., Chopade, B.A. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62 (3), 328-338, **2011**
- [180] Imane M'hamedi, H.H., Samia Bellifa, Meriem Lachachi, Ibtissem Kara Terki and Ryad Djeribi. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the university hospital of tlemcen (algeria). *African Journal of Microbiology Research*, 8 (3), 270-276, **2014**

- [181] De Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G. *ve diğerleri*. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii* *PLoS ONE*, 5 (5), e10732, **2010**
- [182] Espinal, P., Martí, S., Vila, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *The Journal Of Hospital Infection*, 80 (1), 56-60, **2012**
- [183] Rao, R., Karthika, R., Singh, S., Shashikala, P., Kanungo, R., Jayachandran, S. *ve diğerleri*. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* . *Indian Journal Of Medical Microbiology* ,(c. 26), **2008**
- [184] Dheepa M., Rashme V.L, Appalaraju B. Comparision of biofilm production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in South India *Int J Pharm Biomed Sci.*, 2 (4), 103-107, **2011**
- [185] Bhargava, N., Sharma, P., Capalash, N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: An emerging pathogen. *Critical Reviews In Microbiology*, 36 (4), 349-360, **2010**
- [186] Kerekes, E.B., Deak, E., Tako, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vagvolgyi, C. *ve diğerleri*. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115 (4), 933-942, **2013**
- [187] Gür, S. D., Özyürek, S.B., Aksöz, N., Bilkay, I.S. Klinik örneklerden İzole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına bitkisel yağların antimikrobiyal etkileri. *22. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 770, **2014**
- [188] Adonizio, A.L., Downum, K., Bennett, B.C., Mathee, K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in Southern Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 (3), 427-435, **2006**
- [189] Alvarez, M.V., Moreira, M.R., Ponce, A. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *Journal of Food Safety*, 32 (3), 379-387, **2012**
- [190] Chu, W., Zhou, S., Jiang, Y., Zhu, W., Zhuang, X., Fu, J. Effect of traditional chinese herbal medicine with antiquorum sensing activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 7, **2013**
- [191] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter>
- [192] <http://www.galliganfamilydentistry.com/minimally-invasive-dentistry/>
- [193] http://2008.igem.org/Team:Chiba/about_qs
- [194] http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/working_versionOld/contents/chapters/chapter002/section006/blue/page001.html
- [195] <http://firstlook.pnas.org/wp-content/uploads/2013/02/basslerlab.png>

[196] http://www.cheme.caltech.edu/groups/fha/old_website_2010.6.25/quorum.html

[197] <https://www.nottingham.ac.uk/quorum/index.htm>

[198] <http://www.studyblue.com/notes/n/micro-final-exam-for-lab/deck/8803749>

[199] <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue1/art-11.html>

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Demet Erdönmez

Doğum Yeri: Emirdağ / AFYONKARAHİSAR

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: demet.erdonmez@hacettepe.edu.tr

Adresi: H.Ü. Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Beytepe Kampüsü ANKARA

Eğitim

Lise: Eskişehir Anadolu Lisesi

Lisans-Tezsiz Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği (ALM)

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

Almanca- ÜDS (75.00)

İş Deneyimi

10.2007 - 04.2008: Araştırma Görevlisi, Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Aksaray

04.2008 - ... : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

04.2012 - 11.2012: Araştırmacı, Julius Maximilians Universität Würzburg, Zentrum für Infektionsforschung (Research Center for Infectious Diseases), Dr. Daniel LÓPEZ LAB Almanya

Deneyim Alanları

2014 Tübitak BİDEB-2237 Uygulamalı Ulusal ve Avrupa Birliği Projeleri Hazırlama Eğitimi 12-14 Nisan 2014 ANTALYA

2014 "From Gene to Protein" Interlab and Sigma Aldrich Seminar Series 18 Mart, ANKARA

2014 Uygulamalı Real Time PCR Kursu 04-05 Şubat ODTÜ Kimya Bölümü Akkaya Bitki Moleküler Biyoloji ve Genetik Lab. Biyoakademi, ANKARA

2013 Biyosensör Tasarımı ve Uygulamalarında Son Gelişmeler Lisansüstü Yaz Okulu 01-08 Eylül 2013 Ege Üniversitesi, BODRUM

2013 3.Yorumlu ve Kısıtlı Antibiyogram Kursu, 1-2 Haziran 2013 Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) Çalışma Grubu ve Klimud) ANKARA

2013 Bilimsel Araştırmalarda Deney Hayvanları Kullanımına Ait Eğitim Sertifikası Programı- Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. Yerel Etik Kurulu/ANKARA

2013 Deney Hayvanları Laboratuvar Standartları ve Hayvan Sağlığı- Charles River/ANKARA

2013 İlaç Araştırmalarında Uygulamalı Moleküler Modelleme ve Simülasyon Teknikleri Kursu- H.Ü. Medisinal Kimya Araştırma,Geliştirme ve Uygulama Merkezi/ANKARA

2010 Biyolojik Bilimler İçin Uygulamalı Elektron Mikroskopi Teknikleri Kursu- Anadolu Üniversitesi/ESKİŞEHİR

2010 Internationalen Sommerkurs Tübingen- Eberhard Karls Universität Tübingen/ALMANYA

2009 Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulamalı Eğitimi- Tübitak MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü/GEBZE

2009 XII. Uygulamalı Lisansüstü Enzim Safılaştırmada Temel Yöntemler Eğitimi- Tübitak MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü/GEBZE

2009 İleri Elektroforez Teknikleri Uygulamalı Eğitimi- Çukurova Üniversitesi/ADANA

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından bütçesi 20.000,04 TL olan 013BİYP604002 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

(-)

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Erdönmez D. , Rad Y.A., Sağlam N., Aksöz N.,2013 “Detection of Quorum Sensing Signal Molecules and Identification of Biofilm Formation by Using Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, July 21-25, 2013 (Poster Sunumu)

Erdönmez D., Sağlam N., Aksöz N. “Determination of the effects of different concentration of Quercetin on the Quorum Sensing Signal Molecule”.Uluslararası Katılımlı 2. Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi 15-18 Kasım 2012, Antalya (Poster Sunumu)

EKLER

1. Kullanılan Besiyerleri ve Test Kimyasalları

Luria Bertani Agar Besiyeri (Merck®)	İçerik (g/L)
Tripton/Pepton	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml pH 7,4

Luria Bertani Broth Besiyeri (Merck®)	İçerik (g/L)
Tripton/Pepton	10 g
Yeast ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml pH 7,4

Leeds Acinetobacter Besiyeri	İçerik (g/L)
Bakteriyolojik agar	10 g
Asid kazein hidrolizat	15 g
Nötralize soy pepton	5 g
NaCl	5 g
D-(-)-fruktoz	5 g
Sukroz	5 g
D-mannitol	5 g
L-phenylalanine	1 g
Ferric amonyum sitrat	0.4 g
Phenol red	0.02 g
Distile su	1000 ml pH 7,0

BBL™ MacConkey Agar Besiyeri	İçerik (g/L)
Pancreatic Digest of Gelatin	17.0 g
Peptones (meat and casein)	3 g
Papaic digest of soyabean meal	5 g
NaCl	5 g
Laktoz	10 g
Maltoz	10 g
Üre tuzu	1.5 g
Neutral Red	0.03 g
Crystal Violet	1.0 mg
Agar	13.5 g

Endo Agar Besiyeri (Merck®)	İçerik (g/L)
Pepton	10.0 g
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.5 g
Laktoz	10.0 g
Sodyum 110ülfite, anhydrous	3.3 g
Pararosanilin (fuchsin)	0.3 g
Agar-agar	12.5 g
Distile su	1000 ml
	pH: 7.4 ± 0.2

Triptik Soy Broth (Merck)	İçerik (g/L)
Kazein pepton	17 gr
Soy pepton	3 gr
D(+) Glucose	2,5 gr
NaCl	5,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,5 gr

AB Medium	İçerik (ml/L)
20X Phosphate stock	20 mL
20X Nitrogen salt stock	20 mL
Glucose	1 mL
Agar	15 g (veya 7 gr)
X-Gal	40 g/mL
Distile su	900 mL ml

20X Phosphate stock	İçerik (g/L)
K ₂ HPO ₄	60 g/L
NaH ₂ PO ₄	20 g/L
	Otoklavlandıktan sonra oda ısısında saklandı

20X Nitrogen-salts stock	İçerik (g/L)
NH ₄ Cl	20 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	6 g/L
KCl	3 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.2 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g/L
	Otoklavlandıktan sonra oda ısısında saklandı

Glukoz stok:	İçerik (g/L)
Glukoz	0.2 – 0.5 %

Oksidaz Testi	İçerik (g/L)
tetrametil-p-fenilendiamin (Sigma Aldrich)	%0.5

Katalaz Testi	İçerik (g/L)
Hidrojen peroksit (Merck)	%3

BD Triple Sugar Iron Agar	İçerik (g/L)
Kazeinin Pankreatik Dijesti	10 gr
Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	10 gr
Sodyum Klorür	5 gr
Laktoz	10 gr
Sükroz	10 gr
Glikoz	1 gr
Ferröz Amonyum Sülfat	0,2 gr
Sodyum Tiyosülfat	0,2 gr
Fenol Kırmızısı	0,025 gr
Agar	13,0 gr
pH	7,3± 0,2

Chrome azurol S (CAS) Agar		
Blue Dye	Solüsyon-1	0,06gr CAS (Fluka) + 50ml ddH ₂ O
	Solüsyon-2	0,0027gr FeCl ₃ -6H ₂ O + 10ml 10Mm HCl
	Solüsyon-3	0,073 gr hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) + 40ml ddH ₂ O
Solüsyon 1'in üzerine 9 ml solüsyon- 2 eklendi, bu karışımda solüsyon 3'ün üzerine eklenerek otoklavlandı.		
Stok	Minimal Media 9 (MM9)	15 gr KH ₂ PO ₄
karışımlar		25 gr NaCl
		50 gr NH ₄ Cl
		500 ml ddH ₂ O
	NaOH	25gr NaOH

	150ml ddH ₂ O
20% Glukoz	20gr
	100ml ddH ₂ O
Casamino asid soluyonu	3 gr Casaminoasid + 27 ml ddH ₂ O
	Fitre ile sterilizasyon yapıldı.

CAS agar

100ml MM9 mineral besiyerinin üzerine 750ml ddH₂O eklendi. Karışımın içerisine 32.24 gr piperazine-N,N'-bis(2- ethanesulfonic acid) PIPES (pH 6,8 'i aşmamalı) ve 15 gr Bakteriyolojik agar ilavesinin ardından 110°C 'de 25 dk otoklavlandı. Elde edilen MM9/ PIPES karışımı 50 °C'ye soğutulduktan sonra üzerine 30 ml steril Casamino asid solüsyonu ve 10 ml steril 20% glukoz solüsyonu eklendikten hemen sonra yavaşça hazırlanan 100ml Blue Dye solüsyonu ilave edildi. Petrilere eşit şekilde paylaştırılan besiyerlerine Acinetobacter türleri inoküle edildi ve siderofor üretimleri değerlendirildi.

2. KULLANILAN CİHAZLAR

CİHAZ ADI	MARKASI
VORTEKS	İKA VORTEKS GENIUS- 3
STATİK ETÜV	MEMMERT UNB 100
ÇALKALAMALI ETÜV	İKA KS 4000İ CONTROL
OTOKLAV	MİDAS
SU BANYOSU	MEMMERT WNB 14L
SPEKTROFOTOMETRE	SCHİMADZU UV 1700
SANTRİFÜJ	HETTİCH 220
MİKROSANTRİFÜJ	EPPENDORF 5417C
pH METRE	HENNA BENCH METERS HI221
BUZDOLABI	BOSCH KDV52X00NE
DERİN DONDURUCU	BOSCH
LAMİNAR FLOW (ÇEKER OCAK)	HERAUS HERASAFE
ISITICILI MANYETİK KARIŞTIRICI	İKA RCT BASİC
HASSAS TERAZİ	DENVER INSTRUMENT TP-303
IŞIK MİKROSKOBU	LEICA DM3000