

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ
ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİNE TIBBİ VE AROMATİK
BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Demet HANÇER AYDEMİR

Danışman: Doç. Dr. Gülgün TINAZ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2012**

TEZ ONAYI

Demet HANÇER AYDEMİR tarafından hazırlanan “**Klinik *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Çevreyi Algılama Sistemine Tıbbi ve Aromatik Bitki Özütlerinin Etkisinin Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Gülgün TINAZ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Doç. Dr. Bayram ÇEVİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY
Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY
Muğla Üniversitesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabiidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.1.1. Görünüm ve boyanma özellikleri.....	6
2.1.2. Üreme ve biyokimyasal özellikleri	7
2.1.3. Virülens faktörleri	9
2.1.3.1. Kirpik (flagella)	10
2.1.3.2. Pilus (fimbriae)	11
2.1.3.3. Lipopolisakkaritler	11
2.1.3.4. Alginat.....	11
2.1.3.5. Piyosiyanın.....	12
2.1.3.6. Piyoverdin	13
2.1.3.7. Alkali proteaz.....	13
2.1.3.8. Proteaz IV	14
2.1.3.9. Elastaz	14
2.1.3.10. LasA proteaz	15
2.1.3.11. Fosfolipaz C	15
2.1.3.12. Ekzotoksin A.....	16
2.1.3.13. Ekzoenzim S (ExoS) ve ekzoenzim T (ExoT)	16
2.1.3.14. Ekzoenzim Y (ExoY) ve ekzoenzim U (ExoU).....	17
2.1.3.15. Ramnolipid.....	17
2.1.4. <i>Pseudomonas</i> larda salgı sistemleri	18
2.1.4.1. Tip 1 salgı sistemi	18

2.1.4.2. Tip 2 salgı sistemi	18
2.1.4.3. Tip 3 salgı sistemi	19
2.1.5. Hareket (motilite).....	19
2.1.5.1. Yüzme hareketi (swimming).....	20
2.1.5.2. Titreme hareketi (twitching)	20
2.1.5.3. Kayma hareketi (swarming).....	21
2.1.6. Biyofilm	22
2.2. Bakterilerde Çevreyi Algılama Sistemi (Quorum Sensing).....	30
2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da çevreyi algılama.....	35
2.3. Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri	39
2.4. Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Özellikleri	43
2.4.1. Anason (<i>Pimpinella anisum</i> L.)	44
2.4.2. Ylang ylang (<i>Cananga odorata</i> Hook. F. Et Thw.).....	46
2.4.3. Adaçayı (<i>Salvia officinalis</i> L.)	47
2.4.4. Okaliptus (<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.).....	47
2.4.5. Mersin (<i>Myrtus communis</i> L.).....	48
2.4.6. Defne (<i>Laurus nobilis</i> L.)	49
2.4.7. Siyah hardal (<i>Brassica nigra</i> L.).....	50
2.4.8. Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	51
2.4.9. Civanperçemi (<i>Achillea millefolium</i> L.)	52
2.4.10. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	53
2.4.11. Karabaş otu (<i>Lavandula stoechas</i> L.)	53
2.4.12. Oğulotu (<i>Melissa officinalis</i> L.).....	54
2.4.13. Nane (<i>Mentha piperita</i> L.)	55
2.4.14. Tırşik pancarı (<i>Arum dioscoridis</i> Sm.).....	56
2.4.15. Ardıç (<i>Juniperus communis</i> L.)	57
2.4.16. Zambak (<i>Lilium candidum</i> L.)	58
2.4.17. Limon (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.).....	58
2.4.18. Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)	59
2.4.19. Vişne (<i>Prunus cerasus</i> L.)	60
2.4.20. İren (<i>Armoracia rusticana</i> L.).....	60
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	62

3.1. Deneyler Sırasında Kullanılan Bakteriyal Suşlar, Bitki Örnekleri, Kimyasal Maddeler, Besiyerleri Ve Çözeltiler, Aletler Ve Cihazlar	62
3.1.1. Bakteriyel suşlar.....	62
3.1.2. Bitki örnekleri	63
3.1.3. Kimyasal maddeler	63
3.1.4. Besiyerleri ve çözeltiler	65
3.1.5. Aletler ve cihazlar	66
3.2. Yöntemler	69
3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının üretim ve depolanması	69
3.2.2. Besiyerlerinin ve çözeltilerin hazırlanması	69
3.2.3. Bitkisel özütlerinin hazırlanması	69
3.2.4. <i>rhlI</i> , <i>lasI</i> , <i>lasR</i> ve <i>rhlR</i> genlerinin koloni PCR ile analizi.....	70
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin tespiti	72
3.2.6. Quorum sensing inhibitörlerinin (QSIs) <i>in vitro</i> tanımlanması	72
3.2.7. Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS).....	74
3.2.8. Disk difüzyon yöntemi.....	75
3.2.9. Kayma testi	76
3.2.10. Elastaz testi	76
3.2.11. Proteaz testi.....	77
3.2.12. Piyosiyanin testi	77
3.3. İstatistik.....	78
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	79
4.1.Klinik İzolatların Çevreyi Algılama Sistemi Genlerinin Araştırılması	79
4.2. Bitki Örneklerinin QSI1 Yöntemi ile Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması.....	80
4.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Bulguları	82
4.4. Disk Difüzyon Testi Bulguları.....	84
4.5. Kayma Testi Bulguları.....	88
4.6. 3-metil Alfa İyonon ve Trans-Anetolün Bakteriyel Suşların Üremeleri Üzerindeki Etkileri.....	99
4.7. Proteaz Testi Bulguları	101
4.8. Elastaz Testi Bulguları.....	110

4.9. Piyosiyanin Testi Bulguları.....	118
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	126
6. KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	166

ÖZET

Doktora Tezi

KLİNİK *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SUŞLARININ ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİNE TIBBİ VE AROMATİK BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Demet HANÇER AYDEMİR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülgün TINAZ

Pseudomonas aeruginosa, ağır seyirli hastane enfeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlar, kistik fibroz hastalarında kronik enfeksiyonlar oluşturan bir fırsatçı patojendir. Enfeksiyonların patogeneğinde; elastaz, alkalen proteaz, piyosiyenin, fosfolipaz ve ekzotoksin A gibi çeşitli virülens faktörlerinin üretimini düzenleyen, çevreyi algılama (quorum sensing) olarak adlandırılan hücreden hücreye iletişim sistemi sorumlu tutulmaktadır. *P. aeruginosa* AHL (açılhomoserin lakton) temelli ve birbiri ile ilişkili iki quorum sensing sistemine sahiptir; *las* ve *rhl*. Bu sistem ile bakteri, bulunduğu ortamda kendi populasyon yoğunluğunu algılayarak sinyal molekülleri eşik değere ulaştığında belirli virülens faktörlerinin üretimini düzenlemektedir. *P. aeruginosa*'da gözlenen yüksek antibiyotik direnci, yeni tedavi seçenekleri arayışına yol açmış ve bu amaca hizmet edebilecek çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu mercek altına alınmıştır. Bu çalışma kapsamında, 36 klinik *P. aeruginosa* suşu çevreyi algılama sisteminde rol oynayan *lasR*, *lasI*, *rhlR* ve *rhlI* genlerinin varlığı açısından analiz edilmiştir. Ayrıca çeşitli çözücüler kullanılarak elde edilen 18 bitki özütü ve aromatik bitkilerden ekstrakte edilen 15 uçucu yağ, QGIS1 biyomonitör suşu kullanılarak çevreyi algılama sistemi üzerinde engelleyici aktiviteleri bakımından taranmıştır. Bu özütlerden sadece ikisi çevreyi algılama sistemini engellemiştir: Anason (*Pimpinella anisum*) ve ylang ylang (*Cananga odorata*) uçucu yağları. GC-MS analizi ylang ylang ve anason yağlarının ana bileşenlerinin sırasıyla alfa iyonon (%14,8) ve trans-anetol (%78,4) olduğunu göstermiştir. Alfa iyonon ve trans-anetolün *P. aeruginosa*'da *las* ve *rhl* sistemlerinin kontrolünde olan elastaz, kayma, piyosiyenin ve proteaz gibi virülens faktörlerinin üretimini engelleyebildiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, virülens faktörü, çevreyi algılama, N-açıl-homoserin lakton, çevreyi algılama sistemi engelleyicileri.

2012, 166 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS OF MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS EXTRACTS ON QUORUM SENSING SYSTEM OF CLINICAL *PSEUDOMAS AERUGINOSA* ISOLATES

Demet HANÇER AYDEMİR

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülgün TINAZ

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen causing life threatening infections in immunocompromised patients, severe nosocomial infections in hospital settings and chronic infections in cystic fibrosis patients. In the pathogenesis of these infections, cell to cell communication system of the bacteria, known as the quorum sensing system, is held responsible for regulating production of various virulence factors such as elastase, alkaline protease, pyocyanin, phospholipase and exotoxin A. *P. aeruginosa* possesses AHL (acylhomoserine lactone) mediated and interrelated two quorum sensing systems; *las* and *rhl*. *P. aeruginosa* perceives local density of their population by the quorum sensing system and as the concentration of the signalling molecules passes a threshold, bacteria regulate production of certain virulence factors. Due to high resistance rate to antimicrobials of this bacteria alternative therapeutic approaches, especially related with the QS systems have been searched. In this work, 36 clinical *P. aeruginosa* strains were analysed for presence of quorum sensing genes *lasR*, *lasI*, *rhlR* and *rhlI*. In addition, 15 essential oils extracted from various aromatic plants and 18 plant extracts extracted using different solvents were screened for anti-QS activity using a biomonitor strain, QSI1. Of these extracts two showed QS inhibition: Anise (*Pimpinella anisum*) and ylang ylang (*Cananga odorata*) essential oils. GS-MS analysis revealed that alpha ionone (14,8%) and trans-anethole (78,4%) are the major constituents of ylang-ylang oil and anise oil, respectively. It is proved that alpha ionone and trans-anethole can be blocked production of virulence factors such as elastase, swarming, pyocyanin and protease which is under the influence of the systems of *las* and *rhl* in *P. aeruginosa*.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factor, quorum sensing, N-acyl-homoserine lactone, quorum sensing inhibitors.

2012, 166 pages

TEŞEKKÜR

Beni bu çalışma alanına yönlendiren, çalışmalarım esnasında her konuda yardımlarını esirgemeyen, her zaman görüşlerinden yararlandığım Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Gülgün TINAZ'a saygı ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca karşılaştığım problemlerin çözümünde değerli bilgileriyle yönlendirmeleri yapan, tecrübeleriyle destek olan Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a çok teşekkür ederim.

Her gün dostlukları ve yardımlarıyla yanımda olan, günlerimi paylaştığım Sayın Öğr. Gör. Ebru ÖNEM'e ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarım boyunca Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinin imkânlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen Sayın Müdürümüz Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a teşekkür ederim.

2214-D-10 No'lu Projemi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatımın en büyük desteği ile her zaman yanımda olan ve olacağını bildiğim sevgili eşim Recep'e ve çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteklerini, güvenlerini esirgemeyen ve bilim zevkini bana yaşatan sevgili aileme teşekkür ederim.

Demet HANÇER AYDEMİR
ISPARTA, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>P. aeruginosa</i> bakterisinin genel görüntüsü	6
Şekil 2.2. Piyosiyanin molekülünün kimyasal yapısı	12
Şekil 2.3. Ramnolipid molekülünün kimyasal yapısı	18
Şekil 2.4. Tip-IV pili ve titreme hareketi	20
Şekil 2.5. Kayma hareketi yapan <i>P. aeruginosa</i>	21
Şekil 2.6. <i>P. aeruginosa</i> PAO1'in petrideki kayma hareketi görüntüsü.....	21
Şekil 2.7. Biyofilmin şematik yapısı.....	22
Şekil 2.8. Biyofilm oluşumunun şematik görünümü	24
Şekil 2.9. İki genin aktivasyonu ile meydana gelen hücreden hücreye sinyal mekanizması.....	31
Şekil 2.10. <i>V. fischeri</i> 'de <i>luxI</i> geninin ürettiği N-(3-oksohekzanoyil)-L-homoserin lakton (OHHL) sinyal molekülü	34
Şekil 2.11. <i>V. fischeri</i> 'de LuxI/LuxR quorum sensing sistemi.....	34
Şekil 2.12. <i>P. aeruginosa</i> 'nın quorum sensing sistemi.....	37
Şekil 2.13. <i>P. aeruginosa</i> 'da AHL sinyal molekülleri.....	37
Şekil 2.14. Halojenlenmiş furanonlar A) <i>Delisea pulchra</i> 'dan izole edilmiş doğal furanon B ve C) sentetik furanon	42
Şekil 2.15. a) <i>Penicillium coprobium</i> 'dan elde edilen patulin b) sarımsak özütünden elde edilen bir quorum sensing inhibitörü.....	43
Şekil 2.16. <i>Pimpinella anisum</i> L.....	45
Şekil 2.17. <i>Cananga odorata</i> Hook. f. Et Thw.....	46
Şekil 2.18. <i>Salvia officinalis</i> L.....	47
Şekil 2.19. <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.	48
Şekil 2.20. <i>Myrtus communis</i> L.	49
Şekil 2.21. <i>Laurus nobilis</i> L. yaprak ve meyveleri	50
Şekil 2.22. <i>Brassica nigra</i> L.'ya ait tohumlar.....	51
Şekil 2.23. <i>Hypericum perforatum</i> L.	51
Şekil 2.24. <i>Achillea millefolium</i> L.	52
Şekil 2.25. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	53
Şekil 2.26. <i>Lavandula stoechas</i> L.	54

Şekil 2.27. <i>Melissa officinalis</i> L.	55
Şekil 2.28. <i>Mentha piperita</i> L.	55
Şekil 2.29. <i>Arum dioscoridis</i> Sm.	56
Şekil 2.30. <i>Juniperus communis</i> L.	57
Şekil 2.31. <i>Lilium candidum</i> L.	58
Şekil 2.32. <i>Citrus limon</i> L.	59
Şekil 2.33. <i>Carthamus tinctorius</i> L.	59
Şekil 2.34. <i>Prunus cerasus</i> L.	60
Şekil 2.35. <i>Armoracia rusticana</i> L.	61
Şekil 3.1. Quorum sensing inhibitörlerini seçen rekombinant suş (QSI1)	73
Şekil 3.2. QSI1 yöntemi.....	73
Şekil 4.1. Çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	79
Şekil 4.2. Çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	80
Şekil 4.3. Ylang ylang, civanperçemi, siyah hardal tohumu, vişne yaprağı ve tırşik pancarı için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü	81
Şekil 4.4. Nane, biberiye, zambak, limon ve anason için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü	81
Şekil 4.5. Aspir, okaliptus, adaçayı, melisa ve mersin için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü	82
Şekil 4.6. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü	82
Şekil 4.7. trans-anetol ve 3-metil alfa iyononun kimyasal yapısı	84
Şekil 4.8. İren kökü, siyah hardal tohumu ve vişne yaprağı ekstraktlarının disk difüzyon testi ile klinik PI-2 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi	85
Şekil 4.9. Vişne yaprağı, civanperçemi ve iren kök içi ekstraktlarının disk difüzyon testi ile klinik PI-21 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi	85
Şekil 4.10. Vişne yaprağı ve tırşik pancarı ekstraktlarının disk difüzyon testi ile kontrol PAO1 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi	86
Şekil 4.11. Anason ve ylang ylang yağlarının PAO1 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi	87

Şekil 4.12. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin PAO1 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi	87
Şekil 4.13. Petride, PAO-JP2 suşu ile PAO1 suşunun kayma hareketi	88
Şekil 4.14. Petride trans-anetolün kontrol PAO1 suşunun kayma hareketi üzerindeki etkisi	89
Şekil 4.15. Petride trans-anetolün PI-2 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi	89
Şekil 4.16. Petride 3-metil alfa iyonenin kontrol PAO1 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi	90
Şekil 4.17. Petride 3-metil alfa iyonenin PI-36 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi	90
Şekil 4.18. Klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre kayma hareketleri (%).....	91
Şekil 4.19. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının kayma hareketleri üzerine olan etkisi.....	93
Şekil 4.20. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin kayma hareketi üzerindeki inhibisyonları (%).....	94
Şekil 4.21. Kontrol suşların ve 6,67 mM ve %0,1 derişimlerinde anetol ve alfa iyonin ilave edilen bakteri kültürlerinin 600 nm absorbans değeriinde yapılan ölçümleri	100
Şekil 4.22. Petride 3-metil alfa iyonin ve trans-anetolün kontrol PAO1 suşunun proteolitik aktivitesi üzerine etkisi	101
Şekil 4.23. Petride 3-metil alfa iyonin ve trans-anetolün klinik PI-30 suşunun proteolitik aktivitesi üzerine etkisi	102
Şekil 4.24. Petride 3-metil alfa iyonin ve trans-anetolün klinik PI-35 suşunun proteolitik aktivitesi üzerine etkisi	102
Şekil 4.25. Klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre proteaz aktiviteleri (%)	104
Şekil 4.26. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının proteaz aktiviteleri üzerine olan etkisi	105
Şekil 4.27. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin proteaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyonları (%).....	107

Şekil 4.28. Klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre elastaz aktiviteleri (%)	111
Şekil 4.29. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının elastaz aktiviteleri üzerine olan etkisi	113
Şekil 4.30. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin elastaz aktiviteleri üzerindeki inhibisyonları (%).....	114
Şekil 4.31. Klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre piyosiyanın üretim düzeyleri (%)	119
Şekil 4.32. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik <i>P. aeruginosa</i> suşlarının piyosiyanın üretim düzeyleri üzerine olan etkisi	120
Şekil 4.33. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin piyosiyanın üretim düzeyleri üzerindeki inhibisyonları (%).....	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan suşlar.....	62
Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalar sırasında kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	65
Çizelge 3.3. <i>rhlI</i> , <i>lasI</i> , <i>lasR</i> ve <i>rhlR</i> gen bölgelerinin PCR analizi için kullanılan primerler ve oluşacak ürün büyüklükleri	71
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı	71
Çizelge 3.5. GC-MS sonuçlarının alındığı deneysel koşullar.....	75
Çizelge 4.1. Anason ve ylang ylang uçucu yağlarının GC-MS analizi sonuçları.....	83
Çizelge 4.2. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplarda gözlenen kayma hareketi düzeyleri (mm) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	95
Çizelge 4.3. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların kayma hareketi düzeyleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları	96
Çizelge 4.4. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplarda gözlenen proteaz aktivitesi düzeyleri (mm) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	108
Çizelge 4.5. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların proteaz aktiviteleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları.....	109
Çizelge 4.6. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplarda gözlenen elastaz aktivitesi düzeyleri (OD _{495nm}) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	115
Çizelge 4.7. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların elastaz aktiviteleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları.....	116
Çizelge 4.8. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplarda gözlenen piyosiyenin üretim düzeyleri (OD _{520nm}) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	123

Çizelge 4.9. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların piyosiyanin üretim düzeyleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları.....	124
---	-----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
°C	Santigrat Derece
G	Gram
kDa	Kilo Dalton
Mb	Megabaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
AHL	Açıl Homoserin Lakton
AI	Otouyarıcı
BHL	N-bütanoyil-L-homoserin lakton
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECR	Elastin Kongo Red
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EPS	Ekstaselüler Polimerik Madde
GS-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi
LBB	Luria Bertani Broth
LPS	Lipopolisakkarit
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
OD	Optik yoğunluk
OdDHL	N-(3-oxododekanoyil)-L-homoserin lakton
OHHL	N-(3-oxohekzanoyil)-L-homoserin lakton
PB	Piyosiyanin Broth
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QS	Quorum Sensing

QSI	Quorum Sensing İnhibitörü
TBE	Tris Borik Asit EDTA
UV	Ultraviyole ışığı
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid

1. GİRİŞ

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesinde yer alan Gram negatif basil morfolojisinde bakterileri kapsar (Mah and O'Toole, 2001). Doğada çok yaygın olarak bulunan *Pseudomonas*'ların bazı türleri insan, hayvan ve bitkiler için patojendirler. Bu cinste yer alan ve klinik örneklerden sıkça izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ise insan sağlığı için özel patojenite göstermektedir (Arda vd., 1997).

P. aeruginosa, nazokomiyal hastalık şeklinde yayılıp, üriner sistem, solunum sistemi, dermatitler, yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi ve çeşitli sistemik bozukluklara neden olmaktadır (Iglewski, 2002; Todar, 2002). Antibiyotik ve dezenfektanların birçoğuna kolaylıkla direnç geliştirebildikleri için tedavi ve kontrol edilmeleri sorun oluşturabilir ve hastane ortamında kolayca yerleşerek hastane kaynaklı ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (Mesaros et al., 2007). Özellikle savunma sistemi baskılanmış bireyler için önemli bir fırsatçı patojendir (Pier and Ramphal, 2005).

Bakteriler çevreleriyle ve birbirleriyle sözcükler yerine kimyasal sinyal molekülleri kullanarak etkileşim yeteneğine sahip sosyal organizmalardır (Fuqua et al., 1994; Rasmussen and Givskov, 2006). Bakteriler sinyal moleküllerini içinde bulundukları ortama salgılayabildikleri gibi bu moleküllerin ortamdaki yoğunluğunu ölçebilen bir mekanizmaya da sahiptirler. Bu mekanizmaya çevreyi algılama (Quorum Sensing) adı verilir (Fuqua et al., 1994). Bakteriler ortamdaki sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçerek aslında çevrelerindeki hücre yoğunluğu hakkında bilgi edinmiş olurlar. Yani ortamdaki sinyal molekülü yoğunluğu onu salgılayan hücrelerin miktarıyla doğru orantılıdır (Swift et al., 1994; Sperandio et al., 2002; Otto, 2004; Bassler and Losick, 2006).

Sinyal moleküllerine, üretildikleri hücrenin metabolizmasını düzenlemeleri nedeni ile otouyarıcı (autoinducer, AI) da denilmektedir. Bakterilerdeki sinyal molekülleri Gram negatif bakterilerde *N*-açıl homoserin lakton (AHL), Gram pozitif bakterilerde

küçük peptidler, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde ise “autoinducer-2”dir. Sinyal molekülleri ile mikroorganizma genetik düzenlemeler yapar, çevreye adaptasyon sağlar ve virülensini kontrol etmeyi başarır. Böylece birçok mikroorganizma konakta uygun bir bölgede etkili bir çoğunluk oluşturuncaya kadar saptanmasını geciktirebilmekte, konak yanıtından kaçabilmektedir (Hogan, 2006; Spoering and Gilmore, 2006). Bazı sinyal molekülleri bir tür ya da suşa özgü iken bazı moleküller birden fazla bakteriden salınabilmekte, hatta aynı sinyal molekülünü kullandıkları için iki bakteri birbirlerinin virülens faktörlerinin sentezine yardımcı olabilmektedir (Riedel et al., 2001).

Çevreyi algılamaya ilişkin ilk gözlemler 1970’li yıllarda *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*) ve *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) isimli iki deniz bakterisinde yapılmıştır. Bu iki bakteri türünün, bazı balık ve mürekkep balıklarının ışık üreten (biyoluminesan) organlarında yüksek yoğunlukta bulunduklarında lüsiferaz enzim sentezi aracılığıyla ışık ürettikleri gözlenmiştir. Bu bakteriler deniz suyunda 10^2 bakteri/ml yoğunluğunda saptanırken, balıkların ışık organlarında 10^{10} - 10^{11} bakteri/ml yoğunlukta bulunmaktadır ve ancak yüksek yoğunlukta bulunduklarında ışık yaymaktadırlar. Bu iki bakteri, etraflarındaki bakteri yoğunluğunu ortamdaki besin maddelerinin azalmasını saptayarak değil, aksine ortamdaki bir molekülün yüksek yoğunlukta bulunması aracılığıyla fark etmektedirler. Her *Vibrio* kendine özgü *N*-açıl homoserin lakton (AHL) molekülünü sentezlemekte, bu molekül de tür yoğunluğuna işaret eden bir indikatör rolü oynamaktadır (Akova, 2005). *Vibriolarda* tanımlanan sistemde *luxI* ve *luxR* adı verilen iki temel gen söz konusudur. *luxI*’nin kodladığı enzim bir otoindükleyici AHL sentezler. Sentezlenen AHL *Vibrio* hücresinin içine ve dışına diffüze olarak *luxR* geni tarafından sentezlenen LuxR proteinine bağlanır. Otoindükleyici ile bağlanan LuxR proteini bir yandan ışık üretimini sağlayan genlerin, öte yandan da daha fazla AHL sentezlenmesini sağlayacak LuxI proteini üretimini sağlayan genlerin ifade edilmesine neden olur (Donabedian, 2003).

Bakteriler, konağı enfekte etmek ve hastalık oluşturmak için, patojeniteye katkıda bulunan ve çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında olan bir seri virülens faktörü

üretirler (Jones et al., 1993; Bruhn et al., 2005). Bakteri hücrelerinde virülens genlerinin ekspresyonunun engellenmesinin ve bu sayede bakteri virülensinin azaltılmasının enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde önemli bir strateji olabileceği kabul edilmektedir (Hentzer and Givskov, 2003). Bu amaçla örneğin *P. aeruginosa*'da AHL sinyal moleküllerinin tahrip edilmesi veya sentezlerinin inhibisyonu veya LuxR/AHL kompleksinin oluşumunun blokajı ile “quorum sensing” inhibisyonu yeni bir tedavi şekli oluşturabilecektir (Camara et al., 2002; Hentzer and Givskov, 2003; Suga and Smith, 2003). Bu amaçla üzerinde çalışılan moleküllerden birisi halojenlenmiş furanon türevleridir. *Delisea pulchra* adı verilen bir deniz algisi tarafından üretilen doğal maddeler olan halojenlenmiş furanonlar, bu yosunlara bakterilerin kolonizasyonunu önlemektedir. Bu tipte furanon türevlerinin çeşitli bakterilerde biyofilm üretimi dahil çeşitli AHL'ler aracılığı ile gelişen virülens faktörlerinin sentezini engelleyebildiği gösterilmiştir. Bu moleküllerin temel etki mekanizması LuxR proteininin degradasyonunu artırması olarak saptanmıştır. Ne yazık ki furanon türevleri insan ve diğer memelilerde toksik etki göstermektedir (Hentzer and Givskov, 2003). Ancak temel etki mekanizmalarından hareketle toksik olmayan yeni türevlerin elde edilebilmesi için çalışmalar sürmektedir.

Diğer yandan bitkiler âlemi, çok uzun zamandan beridir ilaçlara kaynak oluşturmaktadır. Bitki özütlerinden elde edilen doğal ilaçlar, çoğunlukla çok önemli bir yan etkiye sahip olmamakla birlikte, olumlu birden fazla etkiyi bünyelerinde taşımaktadırlar ve bu durum onları sentetik ilaçlara göre daha cazip hale getirmektedir. Bundan dolayı yıllardır tıbbi etkiye sahip bitkisel ilaç araştırmaları oldukça ilgi duyulan bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bilindiği üzere, birçok aromatik ve tıbbi öneme sahip bitki türü mevcuttur. Bu bitkilerden elde edilen özütlerin veya uçucu yağların önemli insan patojenlerinde çevreyi algılama sistemine olan etkilerinin incelenmesi, bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Literatürde Gram negatif bakterilerdeki çevreyi algılama sistemine ait çok sayıda yayın olmasına rağmen konunun bu yönü ile ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışma kapsamında, tıbbi, aromatik ve diğer bazı bitki türlerinden elde edilen

özütlerin ve ticari olarak satın alınan bitkisel uçucu yağların Gram negatif bir insan patojeni olan *P. aeruginosa*'nın çevreyi algılama sistemi üzerine etkileri araştırılmış ve bu konuda literatüre önemli katkılar sağlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, Pseudomonadaceae ailesinin bir üyesi olup, Pseudomonas cinsinin en iyi tanımlanan türüdür (Erdem, 1999). Pseudomonas cinsinde, toprakta ve suda yaygın olarak bulunan, Gram negatif, nonfermentatif ve aerobik birçok basil yer alır. Bazı türleri insan, hayvan ve bitkiler için patojendir. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ve *P. stutzeri* insanlarda enfeksiyon etkeni olan önemli türlerdir. *P. solanacearum* ve *P. syringae* ise bitkilerde patojen olan türlerdir (Palleroni, 2003).

P. aeruginosa ilk kez Gessard tarafından 1882 yılında mavi yeşil cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır (Bilgehan, 2000). 1886 yılında yeni doğan kanında, 1899 yılında ise yetişkin kanında enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 19. yüzyılın sonunda insanın hemen hemen tüm anotomik bölgelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 1980'lerden sonra patojen bir mikroorganizma olarak hastane enfeksiyon etkeni olarak dikkat çekmeye başlamıştır (Kayser et al., 1997).

P. aeruginosa laboratuvarında kullanılan çoğu besiyerinde ürer, genellikle kanlı agar ve eozin-metilen-blue agar (EMB) besiyerinde üretilir. Gram negatif olması, özel koloni yapısı ve kokusu, laktozu fermente etmemesi, oksidaz pozitif olması ve yüksek sıcaklıkta (42°C) üreyebilmesi tanıma kolaylığı sağlar (Palleroni, 2003).

P. aeruginosa sağlıklı ve normal insanda nadiren hastalık oluşturur. Konak savunmasının zayıflaması halinde, ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulması, damar içi veya üriner kateter varlığı, endotrakeal tüp kullanılması enfeksiyonu hazırlayıcı faktörlerdir (Mesaros et al., 2007). *P. aeruginosa*, immun yetmezliği olan, uzun süre kemoterapi veya radyoterapi alan, metabolik veya malign hastalığı olan bireylerde, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde meydana gelen enfeksiyonlarda sık karşılaşılan etkenlerdendir. Özellikle hastane enfeksiyonlarına yol açan patojenlerin başında yer almakta ve sepsis, peritonit, endokardit, pnömoni, postoperatif enfeksiyonlar, kemik ve eklem

enfeksiyonları, üriner sistem, sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve solunum sistemi enfeksiyonları gibi yüksek mortalite ile seyreden klinik tablolara neden olmaktadır ve tedavi sırasında antibiyotiklere direnç geliştirmesi büyük problem oluşturmaktadır (Pollack et al., 1995; Carmeli et al., 1999; Karadenizli vd., 2002; Algun et al., 2004). *P. aeruginosa*'nın çok çeşitli bulaşma kaynakları vardır. Kullanılan sabunlar, göz damlaları, diyaliz sıvıları, solunum cihazları, ilaçlar, uygun koşullarda bekletilmeyen ağız açık dezenfektanlar, kullanılan temizlik bezleri ve fırçalar, havalandırma cihazları, lavabolar, duş başlıkları, hasta odalarındaki çiçekler önemli bulaşma kaynaklarıdır (Kayser et al., 1997; Bilgehan, 2000). Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (Pollack et al., 1995; Erdem, 1999; Gül vd., 2004).

2.1.1. Görünüm ve boyanma özellikleri

P. aeruginosa, Gram negatif, genellikle kapsülsüz ama bazen kapsül oluşumu görülebilen, basil veya kokobasil morfolojisinde bakterilerdir. Düz veya hafif kıvrık olabilir. Spor oluşturmazlar. 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3,0 µm boyunda, bir uçlarında tek nadiren 2-3 adet kirpik (flagella) bulunduran hareketli mikroorganizmalardır (Arda vd., 1997; Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Peabody et al., 2003) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *P. aeruginosa* bakterisinin genel görüntüsü (Science, 2005)

Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri hareketsizdir. Pigmentsiz olanları, R tipinde üreyenleri tanımlanmıştır.

P. aeruginosa'nın genom büyüklüğü 5.9 Mb'dır. Gen transferini konjugasyon veya transdüksiyonla yapar ve DNA'daki G+S oranı %67,2'dir (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000). *Pseudomonas*'larda çok sayıda plazmid bulunmaktadır. Bunlar bir yandan metabolizma ile ilgili olaylarda, diğer yandan da çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmalarında rol oynarlar (Erdem, 1999).

2.1.2. Üreme ve biyokimyasal özellikleri

P. aeruginosa, zorunlu aerobtur ancak oksijen yokluğunda da ortamda elektron alıcı olarak yeterli nitrat varsa nitratları nitritlere indirgeyerek anaerobik olarak da yaşamını devam ettirebilir (Iglewski, 2002; Anonim, 2005). En iyi 37°C'de olmakla beraber, 20-42°C arasındaki ısılarda üreyebilir. Kolay üreyen bakterilerdir. Bu ısı toleransı, fiziksel durumunun çeşitliliğinden kaynaklanan ve doğada fırsatçı patojen olmasının verdiği bir sonuçtur. Bununla beraber çoğalma için nemli yüzeylerin tercih edildiği görülmektedir (Iglewski, 2002). Ancak, yüksek NaCl konsantrasyonu veya düşük oksijenli ortam, *Pseudomonas* türlerinin kültürü yapılamayan canlı bakteriler grubuna geçmesinde etkili olmaktadır (Ayaz ve Erol, 2004). Organik üreme faktörlerine gereksinimleri yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Distile suda bile üreyerek besin maddelerine minimal ihtiyaç duyduklarını kanıtlarlar. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde kolayca üredikleri için izolasyonları kolaydır. *P. aeruginosa* kolonileri üç farklı tipte olabilir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler büyük, kaba koloniler oluşturur. Klinik materyallerden üretilenler ise iki tipte görülür. Bir tipi büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken virulansı daha yüksek olan diğer tipte alginat üretimi sonucu mukoid tipte koloniler gözlenir. Kanlı besiyerinde 1-5 mm çapında, yassı, buzlu cam görünümünde, kenarları ondulan yapıda koloniler oluşturur. Bazıları hücre dışına alginat salgıladıklarından mukoid koloniler yapar (Palleroni, 2003). Genellikle β

hemoliz oluştururlar. Eozin-metilen blue agar (EMB), McConkey agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar. İzolasyon için 24-48 saat yeterlidir (Erdem, 1999; Gr, 2003). Besiyerinde kendine özgü bir kokusu vardır. Tatlımsı aromatik meyve, tatlı zm ya da trimetilamin kokusuna benzeyen özel koku, 2-aminoasetofenon’a aittir ve *P. aeruginosa*’ya özgüdür (Deretic et al., 1995).

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz ve ksilozu, oksidasyon yoluyla parçalar fakat maltoza etkisizdir. Katalaz ve oksidaz testleri pozitifdir. Yani sitokrom C oksidaz içeren elektron transport zinciri sistemine sahiptir. L-arjinin dihidrolaz üretimi pozitifken L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz üretiminin negatif olması, indol ve hidrojen sülfür oluşturmaması, metil kırmızısı ve Voges Proskauer testlerinin negatif olması, jelatini hidrolize etmesi, üreyi parçalaması, sitratı kullanabilmesi ve nitratın gaz oluşturması,  şekerli demirli (TSI) besiyerinde reaksiyon oluşturmaması gibi özellikleri tanıda yardımcı olan diğr biyokimyasal testlerdir (Vahapoğlu ve Akhan, 2002; Gr, 2003; Koneman et al., 2006).

P. aeruginosa suşları temelde 2 çeşit pigment yaparlar: Piyosiyenin ve piyoverdin (veya floresein). Piyosiyenin bir fenazin boyası olup suda ve özellikle kloroformda erir. Bu pigment alkali pH’da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için “aeruginosa” adı verilmiştir. Piyosiyenin sadece *P. aeruginosa* tarafından meydana getirilir. Bu pigmentin oluşması üreme ortamına sıkı sıkıya bağlıdır. Ortamda $MgSO_4$, K_3PO_4 ve demir bulunması pigment için gereklidir. Piyosiyenin varlığı *P. aeruginosa* için özgün ayırıcı bir özelliktir. Piyoverdin kloroformda erimemesi ve sadece suda erimesiyle piyosiyeninden ayrılır. UV ışınları ile yeşilimsi floresan verir. Daha seyrek rastlanmakla beraber bazı suşlar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi-siyah) gibi pigmentler yapabilirler. Diğr pigmentlerin varlığı piyosiyenin pigmentinin maskelenmesi halinde söz konusu olabilir (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000; Meyer, 2000; Ra’oof and Latif, 2010).

2.1.3. Virölens faktörleri

Virölens, bir mikroorganizma grubu veya türü içerisinde hastalık oluşturma yeteneğinin (patojenitenin) derecesini tanımlamaktadır. Genel olarak iki özelliği kapsamaktadır: Mikroorganizmanın hastalık başlatabilme yeteneği (infektivite) ve ortaya çıkan hastalığın şiddeti (derecesi). Bu özellikler göz önüne alındığında patojen bir tür içerisinde az, orta ve çok virulan suşlar bulunabilmektedir. Virölens kantitatif olarak değerlendirilebilir. Örneğin, deney hayvanlarının yarısını öldürmek için gerekli mikroorganizma sayısı letal doz (LD)₅₀; deney hayvanlarının yarısında enfeksiyon oluşturmak için gerekli mikroorganizma sayısı ise enfeksiyöz doz (ID)₅₀ olarak adlandırılır. Bu değerler mikroorganizmalar arasında önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Bu değişkenliğin temel nedeni mikroorganizmanın içerdiği virölens faktörleridir (Gülay, 2010).

P. aeruginosa'nın patogeneğinde çeşitli virölens faktörleri rol oynar. Bu faktörler aracılığı ile ciddi seyirli enfeksiyonlara neden olabilir. Virölens faktörlerinin salınımı; büyümenin olduğu, hücre yoğunluğunun arttığı logaritmik fazda artar. Virölens faktörlerinin salınım ve düzenlenmesi kompleks bir düzenleyici sistem ile kontrol edilir ve koordinasyonun sağlanmasında hücreler arası iletişim sisteminin önemli rolü vardır. Virölens faktörlerinin çoğunun ekspresyonu bazı çevresel uyarılara bağlıdır: Ortamdaki demir iyonu, azot, ısı, ozmolarite gibi. Ancak virölens faktörlerinin ekspresyonu genel olarak yüksek hücre yoğunluğuna ulaşana kadar çok belirgin değildir. Hücre dansitesine bağlı olarak ortaya çıkan quorum sensing (QS), virölens genlerinin kontrol ve düzenlenmesinde önemli rol oynar (Bjarnsholt and Givskov, 2007).

Virölens faktör üretimi bakteride genetik düzeyde regüle edilir. DNA düzeyindeki regülasyonun büyük kısmı spesifik virölens faktörleri kodlayan gendeki yeniden düzenlemeleri, promotor veya diğer regülatör elemanları içeren genlerdeki değişimleri veya yeniden düzenlemeleri içerir (Woods, 2004).

Virölens faktörlerinin üretimindeki farklılığın olası bir mekanizması; virölens faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyonunun, kompleks bir düzenleyici gen ağı ile farklı çevresel uyarılara yanıt olarak düzenlenmesidir (Pier, 2007). Örneğin; Ekzotoksin-A üretimi ortamdaki demir miktarı, ısı ve belirli nütrisyonel elemanların varlığı ile regüle edilir. Bu regülasyonlar birden fazla pozitif ve negatif regülatör gen ile başarılıdır (Sitkiewicz et al., 2007). Örneğin; elastaz üretimi QS sistemindeki *las* ve *rhl* genleri ile regüle edilir (Rumbaugh et al., 1999a).

P. aeruginosa hücre yüzey komponentleri, hücre dışı enzimler ve toksinleri içeren çeşitli virölens faktörlerine sahiptir (Howard et al., 1987). Epitelyal yüzeye yapışarak kolonize olan *P. aeruginosa*'nın doğal bariyerleri geçebilmek için doku invazyonu yapmasında salgıladığı ekstraselüler enzimler ve toksinlerin rolü büyüktür. Bu yolla fizyolojik bariyerleri bozar, hücre yıkımı ile konakçıya zarar verir, organ fonksiyonlarını bozar. *P. aeruginosa*, değişik ekstrasellüler ürünler sentezleyip, hücre dışına salgılayarak ilk aşamada kolonize olmuş bakterinin doku hasarı oluşturması ve yayılmasına katkı sağlar. Histolojik olarak *Pseudomonas* enfeksiyonlarında dokuda yaygın olarak nekroz, mikro apse formasyonları ve damar yapılarında bozulma ve kanama gözlenmiştir (Pollack et al., 1995). Bu doku değişikliklerinin oluşmasında *Pseudomonas*'ın ürettiği elastaz ve *lasA* yanında alkalın proteaz, fosfolipaz C, kollajenaz, lesitinaz, jelatinaz gibi ekstrasellüler proteazlar rol oynamaktadır (Tingpej et al., 2007).

2.1.3.1. Kirpik (flagella)

Kirpik, *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantıdır ve *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Bakterinin yaşamı için gerekli değildir. Kirpik patogeneizde kritik role sahiptir, *asiolaGM1* gibi yaygın membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak adezin molekülleri ile birlikte adezyonu sağlar. Kirpik *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonunun başarısından sorumludur ve oldukça immünojeniktir (Mahenthiralingam et al., 1994; Feldman et al., 1998).

2.1.3.2. Pilus (fimbriae)

Pilus veya fimbriae *P. aeruginosa*'nın kısa, filamantöz yüzey uzantılarıdır. Çoğunlukla çoklu pilus mevcuttur ve piluslar *P. aeruginosa*'da seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. *P. aeruginosa*'nın pilusları bakteriyel harekette (motilite) rol alan nadir prokaryotik piluslardandır. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Kirpik gibi piluslar da epitel hücre yüzeyinde asialoGM1 yapılarına bağlanarak kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol alırlar. Bakteri tarafından üretilen nörominidaz enzimi gangliyozidlerdeki siyalik asit kalıntılarını kaldırır. Böylece pilusların tutunması için daha uygun bölgeler oluşur. (Gupta et al., 1994; Yagcı et al., 2007).

2.1.3.3. Lipopolisakkaritler

P. aeruginosa'da dış membranın iç yüzü tipik çift katlı fosfolipid tabakaya benzese de, dış membranın dış yüzü başlıca lipopolisakkarit (LPS) tabakadan oluşmaktadır. LPS tabaka, fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-spesifik polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. Farklı O-spesifik polisakkarit zincirleri, esas olarak *P. aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılır. LipidA komponenti ise pek çok pro-inflamatuar yolakta aktiftir (Wieland et al., 2002). LPS tabaka, TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerinin tanınması ve asialoGM1 veya CFTR (kistik fibroz transmembran regülatörü) reseptörlerine bağlanması aracılığıyla adezyonda rol alan önemli bir virülens faktörüdür (Tang et al., 1996; Kipnis et al., 2006).

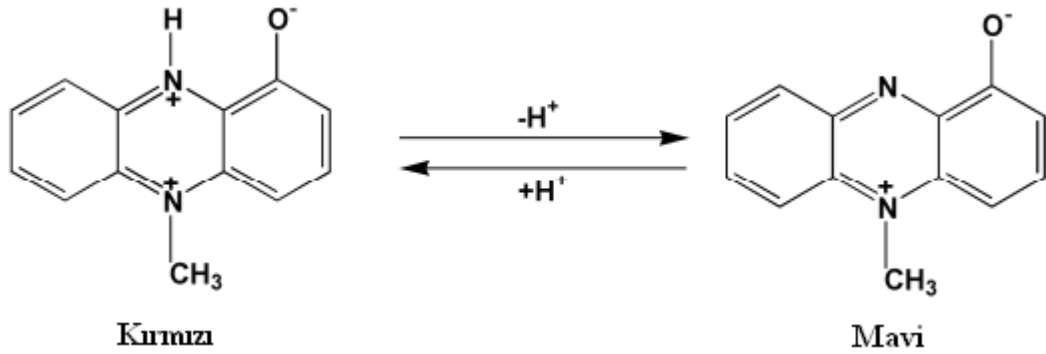
2.1.3.4. Alginat

Alginat, *P. aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapıdır, tekrarlayan D-mannuronik asit ve L-glukuronik asit polimerlerinden meydana gelir. Alginat, LPS gibi adezin fonksiyonu gösterir ve *P. aeruginosa*'nın solunum epiteline tutunarak kolonize olmasını sağlar (Hentzer et al., 2001). *Pseudomonas* enfeksiyonlarına neden olan bakteriyel biyofilmin yapısındaki matriks polimerde

önemli rol oynar (Ryder et al., 2007). Alginat, biyofilm matriksi içinde hücrelerin bir arada kalmasını sağlayan önemli bir virulens faktörüdür (Jain and Ohman, 2005). Alginatın aşırı üretimi *P. aeruginosa*'yı fagositozdan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Hentzer et al., 2001).

2.1.3.5. Piyosiyanin

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyel kolonilere mavi-yeşil renk veren piyosiyanin (N-metil-1-hidroksifenazin) pigmentini üretirler (Denning et al., 1998). Piyosiyanin molekülü geri dönüşümlü olarak okside-redükte olabilmektedir. Pigment, asit ortamda kırmızı iken alkali ortamda mavi renklidir (Şekil 2.2.) (Reszka et al., 2004). *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyanin molekülü, önemli patojenite faktörlerinden birisidir (Fuqua et al., 2001). Piyosiyanin oluşması üreme ortamına bağlı olup ortamdaki yüksek fosfat konsantrasyonlarında artarken, stoklanan kültürler pigment oluşturma özelliklerini kaybedebilirler (Bilgehan, 2000).



Şekil 2.2. Piyosiyanin molekülünün kimyasal yapısı (Reszka et al., 2004)

P. aeruginosa'nın mavi pigment metaboliti olan piyosiyanin, nötrofillerde apoptozisi uyarması, konak yanıtını baskılaması ve IL-8 artışı gibi etkilerle patogeneizde rol alır (Denning et al., 1998; Leidal et al., 2001). Yapılan *in vitro* çalışmalar, piyosiyaninin kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde oldukça fazla hücresel hasara neden olduğunu göstermektedir (Denning et al., 1998). Piyosiyaninin ökaryot hücrelerde hücre solunumu engellediği, silia aktivitesini

bozduğu, epitel hücresi ve lenfosit proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Lau et al., 2004). Piyosiyanın otooksidasyon yaparak serbest oksijen radikallerinin oluşmasına yol açar ve böylece sitotoksik etki göstererek virülense katkıda bulunur (Denning et al., 1998).

2.1.3.6. Piyoverdin

Piyoverdin bir siderofordur ve *P. aeruginosa* metabolizmasında kullanım için çevreden demir bağlayan küçük bir moleküldür. Demir bu bakterinin üremesi için gereklidir. Konakta demir çoktur fakat ulaşılamayacak şekilde hücre içinde; çözünemeyen hidroksit, karbonat, fosfat ile ferrik formunda bulunur. Konak demir metabolizması, bakterinin üremesi için gerekli demir kaynağını sağlamaz. Piyoverdin, demirin eksik bulunduğu durumlarda demiri güçlü bir şekilde bağlar ve reseptöre bağlı mekanizma ile demiri hücre içine alır. Bu mekanizmayla, *P. aeruginosa* demir için yarışarak ortamdaki diğer bakterilerin gelişmesini kısıtlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda piyoverdinin *P. aeruginosa*'nın ekzotoksin A (EkzoA) ve endoproteaz gibi diğer virülens faktörlerinin sekresyonunun düzenlenmesinde ve kendi sekresyonunda rol aldığı ve önemli bir virülens faktörü olduğu gösterilmiştir (Meyer et al., 1996; Lamont et al., 2002; Alcorn and Wright 2004).

2.1.3.7. Alkali proteaz

Alkali proteaz, *aprA* geni tarafından kodlanır. *P. aeruginosa*'nın tip 1 sekresyon sistemi tarafından salgılanan, fibrini parçalayıcı bir metalloproteazdır. 49 kDa ağırlığındaki enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında, erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir. *P. aeruginosa* proteazlarının çoğu gibi yalnızca korneal enfeksiyonların patogeneğinde rolü açıkça bilinmemektedir. Ayrıca akut akciğer hasarına neden olabilmektedir (Guzzo et al., 1991; Kipnis et al., 2004).

2.1.3.8. Proteaz IV

Proteaz IV, *P. aeruginosa* tarafından salgılanan diğer proteazlar gibi patogeneizde rol alır. Proteaz IV'ün özellikle *P. aeruginosa* keratitinin patogeneizine katıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda sürfaktan proteinleri A, D ve B'nin yıkımı aracılığıyla akciğer enfeksiyonlarının patogeneizinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Matsumoto, 2004; Malloy et al., 2005).

2.1.3.9. Elastaz

P. aeruginosa enfeksiyonlarının patogeneizinde elastaz çok önemli rol oynamaktadır. Elastaz veya lasB, *P. aeruginosa*'da tip II sekresyon sistemi ile salgılanan 33 kDa ağırlığında bir çinko metalloproteazdır. Elastaz *lasB* geni tarafından kodlanır. *lasB* geni, LasR-LasI çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki LasR regülatörü tarafından kontrol edilir (Passador et al., 1993). Elastaz; kollajeni, IgG, IgA ve komplemanı parçalayarak virülense katkıda bulunur. Fibronektini yıkar ve mukozal yüzeyde bakteri adezyonunu kolaylaştırır, reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar. Bronş epitelinin bütünlüğünü bozarak silyer aktiviteyi engeller. Damar duvarındaki kollajenin yıkılması ve damar bütünlüğünün bozulması ile hemorajik ve nekrotik lezyonların oluşmasına, akciğerde alveol yapısının bozulmasına yol açar. Elastaz, hücreler arası sıkı bağlantıların (tight-junction) yıkımı aracılığıyla solunum yolu epitellerinin parçalanması sonucu oluşmuş *P. aeruginosa* solunum yolu enfeksiyonlarının patogeneizinde rol alır, bu yüzden epitelyal geçirgenlik artar ve nötrofil göçü kolaylaşır. Ayrıca pro-inflamatuar sitokinlerden IL-8 artışına da neden olmaktadır (Alcorn and Wright 2004).

P. aeruginosa'nın elastaz üretimi çeşitli faktörlere bağlıdır: Bu faktörlerden biri *P. aeruginosa*'nın büyüme hızıdır. Elastazın büyük kısmı hücre büyümesinde geç logaritmik fazda veya hücre yoğunluğu arttığı zaman olur. Logaritmik fazda hızlı hücre büyümesi olur. Bu fazda üreme hızı sabit olup, bakterinin antibiyotik etkisine duyarlılığı yüksektir. Elastaz, elastin proteinini harap eder. Elastin insan akciğer

dokusunun majör elamanıdır, ekspansiyon ve kontraksiyondan sorumludur. Ayrıca kan damarlarının önemli bileşenidir. Böylece akciğer dokusunda hasarla pulmoner hemorajiye neden olur. Elastazın proteolitik etkisi alkalın proteazdan 10 kat, tripsinden 4 kat daha güçlüdür (Jaffar-Bandjee et al., 1995).

2.1.3.10. LasA proteaz

LasA proteaz, *lasA* tarafından kodlanan 41 kDa'luk prekürsör olarak sentezlenir ve 22 kDa'luk aktif proteini oluşturmak için kesilir. Çinko içeren bir metalloproteazdır. LasA, geniş bir pH aralığında aktivite gösterir. Elastin yanında fibrin ve kollejeni de hasara uğrattır. Kendisi elastolitik aktiviteye sahip olduğu gibi elastaz ve diğer proteinazların elastolitik etkisini artırır. Elastaz ile sinerjistik olarak çalışır. LasA geni (*lasA*) LasR-LasI sistemi ile düzenlenir (Maier and Soberon-Chavez, 2000; Grande et al., 2007).

Elastaz ve Las-A'nın sinerjik çalışmasıyla oluşan doku hasarı bakterinin doğal bariyerleri aşmasını sağladığı gibi organ yetmezliklerine de sebep olur. Elastinin parçalanması bağ dokusunu zayıflatır. Bunun sonucunda örneğin korneada ülserler oluşur, nekrotik cilt enfeksiyonları gelişir, yanık alanında nekroz görülür. Bazal membran yapısındaki elastinin parçalanması ile bütünlüğü bozularak epitelyal bariyer zedelenir (Cowell et al., 2003).

2.1.3.11. Fosfolipaz C

Hemolitik etkisi olan ısıya duyarlı hemolizindir. *P. aeruginosa*'nın *plcS* geni tarafından kodlanır. Hemolitik aktiviteleriyle ayrılan iki tipte fosfolipaz C vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve sfingomyelini hidrolize eder. Hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfatidilkolin ve fosfatidilserini hidrolize eder. Fosfolipaz C, özellikle hemolitik fosfolipaz C, *P. aeruginosa* tarafından tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir fosfolipazdır. *P. aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonunun patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir.

Patojenik etkilerinin bir kısmı elastaz gibi, sürfaktan inaktivasyonu ile olmaktadır. Konak nötrofil oksidatif patlama yanıtını baskılar (Terada et al., 1999).

2.1.3.12. Ekzotoksin A

Pseudomonas tarafından üretilen ve *toxA* geninin kodladığı ekzotoksin A toksik bir proteindir (Callahan, 1976). Tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan ekzotoksin A (EkzoA), elangasyon faktör-2 (EF-2) inhibisyonu ile protein sentezi inhibisyonu ve hücre ölümüne yol açan bir ADP-ribozil transferazdır. EkzoA'nın enfeksiyonda konak yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (Wick et al., 1990; Schultz et al., 2001; Kipnis et al., 2006). İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur (Woods and Iglewski, 1983). ExoA üretimi olmayan mutant ile sokak tipi *P. aeruginosa* kökeninin karşılaştırıldığı bir çalışmada toksin üretmeyen kökenin 20 kat daha az virülen olduğu hayvan deneyi ile gösterilmiştir (Vidal et al., 1993).

2.1.3.13. Ekzoenzim S (ExoS) ve ekzoenzim T (ExoT)

Ekzoenzim S, *exoS* geni tarafından kodlanan 43 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Ökaryotik proteinlerde ADP fosforilasyon aktivitesine sahiptir. ADP'nin ribozillenmesi için FAS (factor for activating exoenzyme S) isimli ökaryotik proteine ihtiyaç duyulur. Ekzoenzim S (ExoS), iki aktif bölgesi [C-terminal ADP-riboziltransferaz bölgesi ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP) bölgesi] bulunan iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. ExoS'nin patojenik etkilerinden esas olarak hücre iskelet organizasyonunu bozan ADP-riboziltransferaz aktivitesi sorumludur (Nicas et al., 1985). Ekzoenzim S, klinik *P. aeruginosa* izolatlarının %90'ı tarafından üretilir. Yine ExoS enzimiyle benzer molekül ağırlığına sahip, *exoT* geni tarafından kodlanan ve ExoT olarak adlandırılan diğer bir protein FAS'a bağlı ADP'yi ribozilleme özelliğine sahiptir (Iglewski et al., 1978). ExoT, *Pseudomonas* internalizasyonunda rol alan bir enzimdir. Yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de gösterilmiş olan bu enzim minör virülens faktörleri arasında yer alır (Shaver and Hauser, 2004). Bu enzimlerin her ikisi de sitotoksik etki gösterirler ve

tip III salgılama sistemi tarafından salgılanırlar (Iglewski and., 1978). Hem *exoS* hem de *exoT* genleri, *ExsA* olarak adlandırılan ve *exsA* geni tarafından kodlanan transkripsiyonel aktivatör tarafından kontrol edilir (Hovey and Frank, 1995). *P. aeruginosa*'nın patojenitesinde ADP-ribozillenmesinin rolü tam olarak bilinmemesine rağmen, *ExoS* üretiminin epitel hücre hasarı ve *P. aeruginosa*'nın enfekte ettiği konakta yayılabilmesi için gerekli olduğu bilinmektedir (Nicas et al., 1985; Kang et al., 1997).

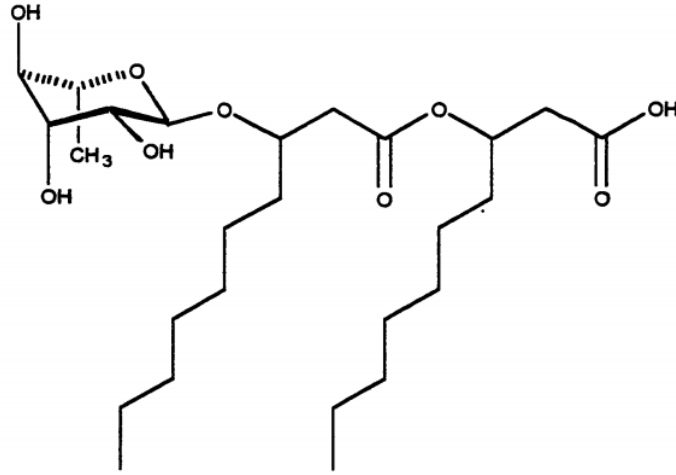
2.1.3.14. Ekzoenzim Y (ExoY) ve ekzoenzim U (ExoU)

ExoY, bir adenilat siklazdır, konak sitozolüne verilince sitozolik cAMP'yi artırır. Bu artış pulmoner vasküler hücrelerde hücreler arası boşluk oluşumunun artmasına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına neden olur (Sayner et al., 2004).

ExoU, tip 3 salgı sistemi ile konak hücresi içine salındığında fosfolipaz/lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre membranını parçalar. *ExoU*, majör virülens faktörü olarak kabul edilir. Hayvan deneylerinde tek başına *ExoU* salgılanmasının sepsise ilerleyen akciğer hasarına yol açtığı gösterilmiştir (Allewelt et al., 2000).

2.1.3.15. Ramnolipid

Hemolitik etkisi olan ısıya dayanıklı hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir (Şekil 2.3.). Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosiliyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Karatuna ve Yağcı, 2008). Hidrofilik kısmı bir veya iki ramnoz molekülü, hidrofobik kısmı ise yağ asidi yapısındadır. Ramnolipidler yüzey gerilimini azaltıcı özelliklerinden dolayı, endüstriyel ve çevreyle ilgili pek çok alanda kullanılmaktadır. Bunlar arasında hidrokarbonlar gibi düşük çözünürlüğe sahip kirleticilerin uzaklaştırılması ya da biyodegradasyonunun artırılması sayılabilir (Maier and Soberon-Chavez, 2000).



Şekil 2.3. Rhamnolipid molekülünün kimyasal yapısı (Jarvis and Johnson, 1949)

2.1.4. Pseudomonaslarda salgılama sistemi

Bakteri hücresi; toksinler, enzimler ve virülens faktörleri salgılaması yoluyla kendini koruma, hücresel taşıma faaliyetleri (moleküllerin hücre yüzeyinden, hücre duvarından ve hücre zarından taşınması) ve iletişim amacıyla salgı salgılar. Pseudomonaslarda proteinlerin dış membrana doğru salgılanmaları için üç salgılama sistemi mevcuttur (Aksoy ve Kara, 2012).

2.1.4.1. Tip 1 salgı sistemi

Bu sistemde proteinin taşınması, enerji tüketimi sırasında meydana gelen taşıyıcı bir protein tarafından gerçekleştirilir. Tip 1 sistemi; iyonların, farklı büyüklükteki (20–900 kDa) proteinlerin ve bazı toksinlerin salgılanmasında kullanılır ve doğrudan sitoplazmadan hücre dışına salgılanırlar (Aksoy ve Kara, 2012).

2.1.4.2. Tip 2 salgı sistemi

Bu sistemi oluşturan yapılar; iç zarda bulunan ve sitoplazmik olarak bir ATP'ye bağlı olan iç zar proteinleri ile dış zar proteinlerinden oluşmaktadır. Salgılanan proteinler, iki aşamalı olarak dış ortama salgılanır. İlk aşamada; salgılanan proteinler, periplazmik boşluğa aktarılır. Aktarılan bu proteinler, ikinci aşamada por

proteinleri yardımıyla dış zarın içerisinden geçerek dış ortama salgılanırlar (Aksoy ve Kara, 2012) .

2.1.4.3. Tip 3 salgı sistemi

Bakterinin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımıyla efektör proteinlerini (toksinlerini) ökaryot hücre sitoplazmasına ilettiği bir sistemdir (Kipnis et al., 2006). Bu sistem salgılama birimi, salgılanan toksinler ve kendi salgılanmalarına imkan sağlayan bağımsız bölgeler (chaperone) olmak üzere üç parçadan oluşur (Gauthier et al., 2003). *P. aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur (Kipnis et al., 2006).

2.1.5. Hareket (motilite)

Hareket bakterinin simbiyotik ve patojenik özelliklerini göstermesi için gerekli bir fonksiyondur. Hareket sayesinde bakteri besin elemanlarına ulaşır, toksik maddelerden kaçır, konak hücresine translokasyon yapar, oluşturduğu koloni içerisinde yer değiştirir, biyofilm içinde hareket eder. Hareket için bakteri flagella ve pili oluşturmaları ve gereken enerjiyi sağlamalıdır (Toutain et al., 2005).

Bakteri hareketliliği ile ilgili çalışmalar swimming (yüzme), swarming (kayma) ve twitching (titreme, seğirme) şeklinde üç farklı tip hareketi olduğunu göstermiştir. Yüzme, sıvı ortamda olur ve mikromorfolojik pattern organize değildir. Kayma, sıvı tabaka nisbeten ince olduğunda bakteri uzar, flagellalar artar ve koordineli bir hareket gösterir. Titreme, katı yüzeyde gerçekleşir ve kaymadan daha az organize dir. Bu üç hareket tipinden yüzme ve kayma flagella bağımlı, titreme ise tip IV pili bağımlıdır (Rashid and Kornberg, 2000).

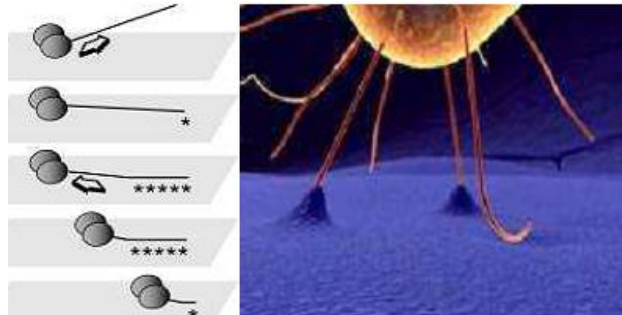
2.1.5.1. Yüzme hareketi (swimming)

P. aeruginosa'nın hücre yüzeyi elamanlarından olan flajella bakterinin sıvı ortamdaki hareketinden sorumludur (swimming). Flagella aynı zamanda kayma hareketinden de sorumludur. Hareket etme yeteneğine sahip bakterilerin sıvı ortamda yer değiştirmeleri flajellalarının dönerek hareket etmesi ile olur. *P. aeruginosa* tek polar flajellası ile sıvı ortamda yüzer (Doyle et al., 2004).

2.1.5.2. Titreme hareketi (twitching)

Titreme hareketi ilk olarak *Acinetobacter calcoaceticus*'ta 1961'de Lautrop tarafından tanımlanmıştır (Lautrop, 1961). Titreme hareketi, *S. sangius* gibi Gram pozitif bakterilerde, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilerin çoğunda da gösterilmiştir. *P. aeruginosa* kolonileri agarda karakteristik olarak kenarları düz ve buzlu cam görünümünde gelişirler. Buna karşılık titreme hareketi yeteneğine sahip mutantlar kubbeli ve yumuşak koloniler oluştururlar (Whitchurch, 2006).

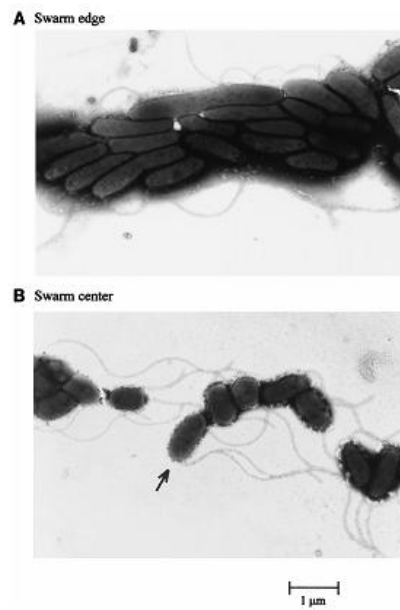
P. aeruginosa'nın katı yüzeydeki ilerlemesi titreme hareketi ile olur. Tip-IV pili ile sağlanır. Şekil 2.4.'te gösterildiği gibi titreme sırasında pilus uzayarak yüzeydeki bir noktaya tutunur. Daha sonra kısalarak bakteriyi o noktaya doğru çeker ve hücrenin yüzey üzerinde ilerlemesi sağlanır. Pili aynı zamanda epitelyal yüzeye yapışmakta da önemlidir, böylece virülense katkıda bulunur (Mattick, 2002; Patriquin et al., 2007).



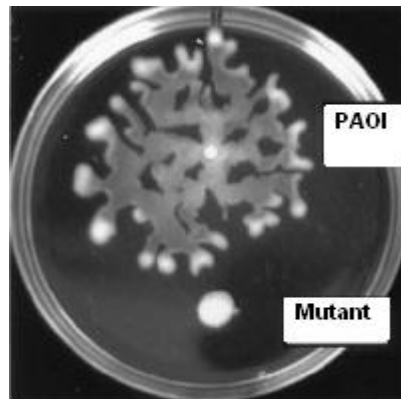
Şekil 2.4. Tip-IV pili ve titreme hareketi (Patriquin et al., 2007)

2.1.5.3. Kayma hareketi (swarming)

Bakterinin yarı katı yüzeyde ilerlemesi kayma hareketi ile olur. Şekil 2.5.' de kayma hareketi yapan *P. aeruginosa* gösterilmektedir. Şekil 2.6.'da ise kayma hareketinin makroskopik görünümünü gösterilmektedir. Kayma hareketi yapan hücrelerin boyu normal haline göre uzar ve flajella yapısı değişir. Normal şartlarda tek polar flajellası olan *P. aeruginosa* kayma hareketi yaparken çift polar flajellaya sahiptir (Shrout et al., 2006).



Şekil 2.5. Kayma hareketi yapan *P. aeruginosa* (Shrout et al., 2006)



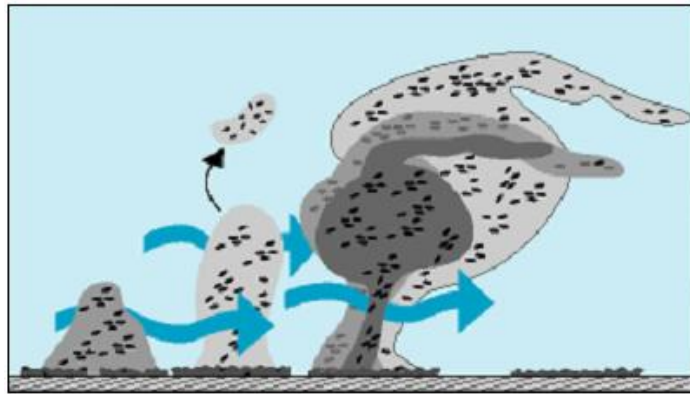
Şekil 2.6. *P. aeruginosa* PAO1'in petrideki swarm görüntüsü. Üstte swarming yapan ve altta swarming yapamayan mutant suş görülmektedir (Harunur ve Arthur, 2000)

Kayma hareketi flajella yapısındaki bu değişikliğe ek olarak tip-IV pili ve yüzey aktif madde olarak rhamnolipit sekresyonunu gerektirmekte, bunlardan birisinin eksikliği bakterinin bu tür motiliteyi yapamamasına neden olmaktadır (Kohler et al., 2000).

Kayma hareketi yapan hücrelerin karakteristikleri, elongasyon, koordine hareketle koloni ile birlikte veya bazen koloniden geçici ayrılma şeklinde yer değiştirme, polisakkarit, alginat, biyosurfaktan ve rhamnolipidten oluşan ekstrasellüler slime üretimidir (Heurlier et al., 2004).

2.1.6. Biyofilm

Biyofilm; mikrobiyal olarak değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak bakteri tarafından üretilen matriks ya da hücre dışı polimerik madde (Extracellular polymeric substances-EPS) içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden, çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan biyolojik bir oluşumdur (Rijnaarts et al., 1993; Hood and Zottola, 1997; Jenkinson and Lappin-Scott, 2000; Watnick and Kolter, 2000; Donlan, 2002). Biyofilmin EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren üç boyutlu bir yapı olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.7.) (Sutherland, 2001).



Şekil 2.7. Biyofilmin şematik yapısı (Sutherland, 2001)

Biyofilimde antibakteriyel direnç ve oksijen kullanımı açısından değişkenlik gösteren tabakalar oluştuğu ve bu tabakalı yapının, alttaki hücreleri stabilize ettiği

vurgulanmıştır. Yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin dışında, katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyellere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar (Jenkinson and Lappin- Scott, 2000; Leriche et al., 2000).

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks, biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar ve çevreden besin maddelerini (C- N- PO₄ gibi) alıkoyup su kanalları aracılığı ile bakterilerin kullanımına sunar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, mikroorganizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir (Padera, 2006). Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antimikrobiyel maddeler, yüzey gerilimini değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı direnç geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir (Donlan, 2002).

Herhangi bir yüzeyde *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturması ve hayat döngüsü aşağıdaki şekilde şekillenmektedir;

a)Yapışma:

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir prosestir (Şekil 2.8.). Mikroorganizmalar, yapışacakları doku veya malzemeye sıvı veya hava içerisinde pasif olarak taşınırlar. Bakteri yapışacağı yüzeye yaklaşır ve hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri ile geçici olarak bağlantı kurar, kendisi için yeterli besin maddesinin olduğu uygun yeri bulduğunda yüzeye olan bağlantısını kuvvetlendirmeye başlar (Pratt and Kolter, 1999). Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, “Quorum Sensing Sistemi” denilen haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler.

Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler. Yapışan bakteriyi diğer *P. aeruginosa*'lar izler ve yapışma yüzeyinde monolayer bir tabaka oluşur. Bu aşamada rol alan organeller; flagella ve tip 4 piluslardır. Bu pilus adhezinleri, mannoz spesifik, nonspesifik ve abiyotik yüzeylere bağlanabilme özelliğindedir (Pratt and Kolter, 1999; Watnick and Kolter, 2000).



Şekil 2.8. Biyofilm oluşumunun şematik görünümü (Sakugari and Kolter, 2007)

Flagellalar ilk yapışmada, pililer ise mikrokoloni oluşumunda rol oynarlar. Bunlardan herhangi birinin eksikliğinde yapışma engellenmektedir. Bunlara ek olarak, hücre yüzeyinde bulunan lipopolisakkarit (LPS) yapısında olan değişiklikler yapışmayı etkilemektedir. *P. aeruginosa*'da LPS, A ve B bandı olmak üzere iki bölümdür. A bandında bulunan mutasyonlar, yapışmaya orta derecede etkili iken, B bandının eksikliği hidrofilik yüzeylere yapışmayı azaltıp, hidrofobik yüzeylere yapışmayı artırır. Bu yapışma olayı EPS (eksopolisakkarit) yapımı için *algT* genlerini uyarır (bu genler, *algC*, *algD*, *algU*, *lacZ*'dir) ve EPS sentezi başlatılır. *AlgT*'de meydana gelen artış flagella sentezini sağlayan genleri baskılar ve tip 4 piluslar ile bakteri kayma hareketi yaparak mikrokolonileri oluşturur. Bu işlerin yapılmasını koordine eden gen ise, karbon metabolizmasını düzenleyen (Crc)

gendir. Bu gen, hem tip 4 pilusunun sentezi için, hem de etkenin karbon metabolizması için gereklidir. Bu gende olan değişiklikler, planktonik organizmaların biyofilm oluşturma özelliğini engeller (Pratt and Kolter, 1999; Lassen, 1975; Costerton et al., 1987; Costerton et al., 1999; Keene et al., 2004). Yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik bağlar, kovalent bağlar ve hidrojen bağları aracılığı ile yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan hücrelerin yüzeylerden uzaklaştırılması, fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirmektedir (Poulsen, 1999).

b) Farklılaşmış biyofilm içinde bakterilerin olgunlaşması ve kolonizasyon:

Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeyde diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Poulsen, 1999).

c) Biyofilmden planktonik hücre ayrılması ve yayılması:

P. aeruginosa'nın ürettiği EPS'nin büyük kısmı alginattan oluşur. Alginat hücre adezyonunu sağlayan önemli bir moleküldür. Alginat-liyaz ise alginat üretimini azaltarak hücrelerin biyofilmden ayrılmasına yol açar. Bu enzimi kodlayan *algL* geninin hücre ayrılması ile biyofilm yıkılmasına yol açtığı düşünülmektedir. Buna benzer polisakkarit üretiminde rolü olan enzimlerin biyofilm gelişiminin farklı dönemlerinde rol oynadığı düşünülmektedir (Sauer et al., 2002).

Biyofilmin yıkılması; aktif olarak çoğalan hücrelerin dökülmesi, besleyici elemanların azalması ile hücre ayrılması veya akım etkisi ile küçük parçalar halinde kopması ile olabilir. Aktif olarak çoğalan hücrelerin dökülme mekanizması tam

olarak anlaşılamamıştır. Hücreler bölündükçe hücre yüzeyi hidrofobisitesinde değişme olması bir neden olabilir (O'toole, 2003).

Yapışkan biyofilm toplulukları içinde akım esnasında kopup yeni yüzeylere yapışan bu yapışkan bakteri hücreleri antijenik karakterdedir ve antikor üretimini artırır. Meydana gelen antikorlar, biyofilmlı bakteriyi öldüremediği gibi, çevre dokularda da immün kompleks hasara neden olmaktadır. Bireylerin humoral ve hücrel immun yanıtı nadiren biyofilm enfeksiyonlarını yok etmede başarılı olabilir. Planktonik bakteriler, antikor, fagositoz ve antibiyotiklerle temizlenirlerken, biyofilmde bulunan hücreler, antikor, fagositoz ve antibiyotiğe dirençlidir. Bu nedenle fagositoz olayı gerçekleşmezken, fagositik hücrelerin enzimlerini salgılamaları nedeniyle, biyofilm çevresindeki dokular, oluşan immün komplekslerden zarar görürler. Bu esnada biyofilmden ayrılan bakteriler serbest kalır ve dokularda akut enfeksiyonlara neden olurlar (Lawrence et al., 1991; Mah and O'Toole 2001).

Biyofilm oluşumu türden türe, hatta suştan suşa değişmektedir. Bu farklılıkların başında bakterilerin yüzey yapısı, yüzey hidrofobisitesi ve yüzey yükü gelmektedir. Bakterilerin dış yüzeyinde yer alan flagella, pili ve glikokaliks hücrelerin yüzeylere yapışmasında rol alırlar (Houldt and Michaels, 2005). Hidrofobisite ya da tam karşıtı olarak hidrofilisite bir yüzeyin hava ortamında su ile ıslanabilirliğini tanımlar. Bakteri yüzeyinin hidrofobisitesi yapışmayı etkileyen faktörlerden biridir. Kısa mesafede yapışmayı desteklemek amacıyla yüzeyler arası su tabakasının ortadan kalkması hidrofobisite sayesinde gerçekleşmektedir. Su tabakasının iki yüzey arasında kaybolmasıyla birlikte yakın mesafe hücre-yüzey etkileşimi ortaya çıkmaktadır. Hücre yüzeyinin hidrofobik yapısı, yüzeyin hidrofobik ve non-polar özelliği ile bir örneklik göstermesiyle tutunmanın sağlandığı ortaya konmuştur (Bullitt and Makowski, 1995). Rosenberg ve Kjelleberg çoğu hücrenin negatif yük taşımakta olduğunu, bunun da sıvı akışı ile şarj olan yüzeye yapışmayı kolaylaştırdığını bildirmişlerdir (Rosenberg and Kjelleberg, 1986). Fimbria ya da pilus gibi yapıların hücrelerin hidrofobik özellikte kalmasına yardımcı olduğu hatta aynı çalışmada incelenen çoğu fimbria yapısının hidrofobik aminoasit kalıntılarına

sahip olduğu bildirilmiştir. Fimbria'nın, yzeyele arada bulunan akıma karşı gelerek tutunmayı sağladığı bildirilmiştir (Bullitt and Makowski, 1995). Hcre yzeyinin biyokimyasal yapısının da tutunmada etkili olduğu ortaya konmuştur (Fletcher et al., 1991; Williams and Fletcher, 1996). Beech ve Gaylarde, lesitinlerin tutunmayı inhibe etmelerine rağmen onleyemediklerini, glukozidaz ve N-asetilglukoaminidazın ise tutunmayı azalttığını bildirmişler, ancak mekanizmasını net olarak ortaya koyamamışlardır (Beech and Gaylarde, 1989).

Biyofilm içindeki bakteri sayısının biyofilmi etkilediği ve bunun genetik olarak kontrol edilmesi ile biyofilmin yapısı ve dayanıklılığının da kontrol edildiği gösterilmiştir (Sakugari and Kolter, 2007).

Mikroorganizmalar uygun olmayan çevre koşullarında korunma amaçlı olarak biyofilm oluşumunu hızlandırır ve arttıırırlar. Besin miktarı, pH, iz elementlerin konsantrasyonu, ortamın iyonik gücü, kalsiyum ve/veya magnezyum gibi iyonların ortamda bulunuşu ve sıcaklık bu kritik koşullardan bazıları olarak sayılabilir. Uygun koşullarda bulunan bakteri, yaşamını kendine koruyucu bir ortam yaratmadan sürdürebilmektedir. Fakat ideal koşullardan uzaklaştıka biyofilm oluşumu önem ve hız kazanmaktadır. Yapılan çalışmalarda besin yokluğuunda bakterilerin biyofilm oluşumunun, uygun besin miktarına sahip olanlardan daha fazla olduğu görülmüştür (Mueller, 1996).

Tutunma yzeyinin şekli, elektriksel yükü, yumuşaklığı, girinti ve çıkıntıların varlığı biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Pürüzlü olan yzeylerde mikroorganizma yapışma oranı düz yzeylere göre daha yoğuundur (Lewandowski, 2000). Çünkü pürüzlü yzeyde sıvının akış hızı azalır ve yzey alan artar. Yzeyin fizikokimyasal özellikleri, yapışma hızı ve yaygınlığuında rol oynar. Mikroorganizmaların plastik gibi hidrofobik ve nonpolar yzeylere cam ve metal gibi hidrofilik materyallerden daha fazla yapıştığı gösterilmiştir (Kujundzic et al., 2007).

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliği, konak cevabından kurtulup antibiyotik tedavisine direnç göstermeleridir. Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal

bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamlarını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da belirtilmektedir. Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar bildirilmekte ve bu sorunun boyutları giderek büyümektedir. Laboratuvar koşullarında (*in vitro*) yapılan testlerde, biyofilm bakterilerinin serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIC) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri bulunmuştur (Stewart and Costerton, 2001; Hoiby, 2002; Douglas, 2003).

Biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı direncini sağlayan faktörler ise çeşitlidir. Bunlar arasında yavaş büyüme, biyofilmin tabanında azalan oksijen miktarı, pozitif yüklü aminoglikozitlerin negatif yüklü alginat polimerlerine bağlanmasıyla oluşan penetrasyon bariyeri, bakteride beta laktamazların varlığı sayılabilir (Nichols et al., 1988; Anwar et al., 1992; Stewart and Costerton, 2001).

Biyofilm içindeki ozmotik çevre değişiklikleri ozmotik bir strese yol açıp bakterideki porin yapısında veya miktarında değişikliklere neden olabilir. Bu durum da özellikle beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine girişini kısıtlayabilir (Foley et al., 1999).

Biyofilmi oluşturan bakterilerin biyofilm içindeki yoğunluğu, besin maddeleri ve oksijen konsantrasyonuna göre değişkenlik göstermektedir. Biyofilmin en dış kısımlarında lokalize olan bakteriler besin maddelerine ve oksijene derinlerde olanlara göre daha rahat ulaşabilmektedir. Bu durum da bakteri popülasyonu içinde bir heterojenliğe yol açmaktadır. Antimikrobiyel ajanların metabolik olarak aktif hücreleri primer olarak hedefledikleri düşünülürse, biyofilm içindeki bu heterojenliğin antibiyotik duyarlılığında farklılıklara yol açabileceği ortadadır. Düşük üreme hızı özellikle olgun biyofilmlerde izlenmektedir. Sınırlı besin miktarları nedeniyle biyofilmlerin yavaş üreme hızına sahip olmaları direncin bir

diğer nedeni olarak ileri sürülmektedir. Biyofilm içinde yavaş üreyen veya üremenin durağan fazında bulunan *P. aeruginosa* suşlarının beta-laktamlara ve tetrasikline duyarlılığının önemli ölçüde etkilendiği, florokinolon aktivitesinin ise üreme hızıyla etkileşmediği saptanmıştır (Drenkard and Ausubel, 2002). Benzer bir sonuç *Stenotrophomonas maltophilia* biyofilmleriyle yapılan bir çalışmada da elde edilmiş ve seftazidimin hem biyofilm içine düşük difüzyonu hem de yavaş üremekte olan hücrelere karşı düşük etkinliği nedeniyle *S. maltophilia* biyofilmlerini ortadan kaldıramadığı belirtilmiştir (Di Bonaventura et al., 2004).

Biyofilm içindeki oksijen yoğunluğu direnci etkileyen bir diğer faktördür. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve dip kısımlarda anaerobik ortamın oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı antibiyotiklerin, örneğin; aminoglikozidlerin etkinliği azalmakta ve direnç gelişebilmektedir. *P. aeruginosa* biyofilmlerinde siprofloksasin ve tobramisın aktivitesinin yüzeye yakın bölgedeki suşlarda daha yüksek olmasının saptanması da oksijen yoğunluğuna bağlanmaktadır (Mah and O'Toole, 2001; Drenkard, 2003).

Biyofilm hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşimleri sonucunda ekstrasözomal DNA değişimleri olmaktadır. Bu şekilde direnç plazmidlerinin aktarılması ile genetik yapısı değişen hücreler antimikrobiyel ajanlara karşı daha fazla direnç geliştirmiş olur (Ghigo, 2001). Direnci etkileyen diğer bir faktör asidik atık maddelerden dolayı pH'nın değişmesi ve bu değişimin bazı antibiyotikler üzerine antagonistik etki yapmasıdır (Sauer et al., 2002).

Biyofilm ortamı sadece antibiyotiklere karşı değil, dezenfektanlara karşı da direnç gelişmesinde rol oynamaktadır. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler sıvı ortamda serbest üreyen bakterilere göre dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençlidir. Bu yolla oluşan direncin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte; glikokaliks bileşimi, hücre dışı enzimler, besin sınırlaması, dezenfektanın hücrelere ulaşmasında zorluk gibi çeşitli faktörlerin ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Bakteriler biyofilm tabakasından uzaklaştırılıp sıvı kültür ortamlarında serbestçe üretilirse dirençli oldukları dezenfektanlara tekrar duyarlı hale gelirler. Biyofilm üreten bakteriler

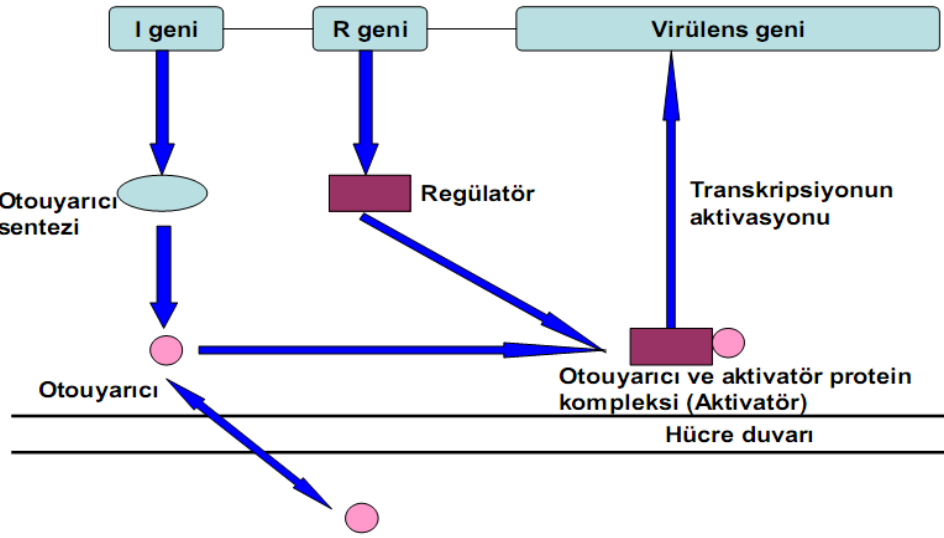
antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmektedir (Hausner and Wuertz, 1999).

Biyofilm direncini etkileyen tüm bu faktörler göz önüne alındığında, biyofilmi oluşturan bakteri türü ve kullanılan antimikrobiyel ajana bağlı olarak farklı direnç mekanizmalarının etkili olabileceği ve bu direncin multifaktöriyel olduğu görülmektedir.

2.2. Bakterilerde Çevreyi Algılama Sistemi (Quorum Sensing)

Bakterilerin izole olarak yaşamadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası haberleşme sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları giderek artan bir yaygınlıkla kabul edilmektedir. Bu tip hücreler arası haberleşmenin iyi karakterize edilmiş bir örneği, çevreyi algılamadır. Çevreyi algılama, bir bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izlemesine olanak veren otouyarıcı veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağlıdır. Değişik bakteri türlerinde, çeşitli fizyolojik işlemler, çevreyi algılama ile regüle edilir. Bu işlemlere örnek olarak, biyoluminesens, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu, konjugasyon ve hayvan, ve bitki patojenleri tarafından oluşturulan virülens etkenlerinin üretimi verilebilir (Hardman et al., 1998; Boşgelmez-Tınaz, 2003).

Çevreyi algılama, hücre popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak, bir sensör veya transkripsiyonal aktivatörle, sinyal molekülünün etkileşimiyle, genlerin ekspresyonu sonucu oluşan, bakteriler arasındaki iletişim mekanizmasıdır (Dowell et al., 2001). Bu sistemde hücreden hücreye sinyal gönderme 2 genin aktivasyonu ile mümkündür. I geni, sinyal molekülünün sentezinden sorumludur. Sinyal molekülü (çoğu zaman bir N-açıl homoserin lakton) hücre duvarından dışarıya doğru kolayca hareket edebilir. R geni çeşitli virülens genlerin transkripsiyonu için uyarıcıyla birlikte kombine olan transkripsiyonal regülatör proteini kodlar (Kayser, 2005) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. İki genin aktivasyonu ile meydana gelen hücreden hücreye sinyal mekanizması (Kayser, 2005)

QS, hücre yoğunluğuna bağımlı gen ekspresyonunun kontrolü olarak açıklanabilir (de Kievit and Iglewski, 2000). Bu tür iletişimin temeli, bakteri hücrelerinin otoindükleyici olarak işlev gören bazı sinyal molekülleri sentezleyerek çevresinde bulunan aynı türden diğer bakterilerin sayısını/yoğunluğunu izlemesine dayanmaktadır (Taga and Bassler, 2003). Belli bir ortamdaki otoindükleyici yoğunluğu, o ortamda bulunan bakteri sayısı ile doğru orantılıdır. Bu nedenle bir bakterinin ortamdaki otoindükleyici miktarını “hissetmesi” ortamdaki diğer bakterilerin sayısı hakkında fikir sahibi olmasını sağlamaktadır. Otoindükleyicilere karşı bakterinin gen ekspresyonunu değiştirerek yanıt vermesi, bir bakteri topluluğu içinde her bir hücrenin bir diğeri ile koordine bir biçimde davranması sonucunu doğurmaktadır (Akova, 2005). QS moleküllerinin "otoindükleyici" (auto-inducer) (AI) olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (Camara et al., 2002).

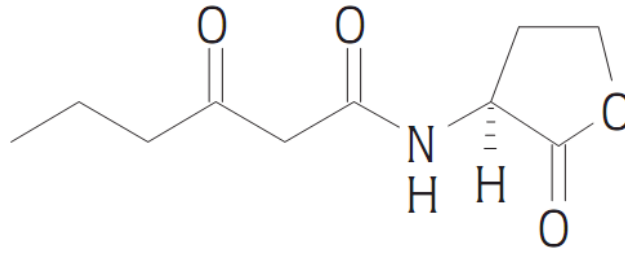
Aynen farklı insan topluluklarının farklı diller kullanmaları gibi, farklı mikroorganizma türleri de genellikle farklı QS molekülleri kullanır. Bu nedenle farklı QS moleküllerini kullanan mikroorganizmalar da birbirleri ile anlaşamamaktadır. Sinyal molekülleri; AHL, "autoinducer peptidler (AIP)" ve "autoinducer 2 (AI-2)" bileşikler başta olmak üzere birkaç farklı sınıfta incelenir.

Her bir sınıf içerisinde yan zincir uzunluk farklılığı gibi küçük değişiklikler de söz konusudur. Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır. Aynen bir dildeki farklı kelimelerin farklı anlamlar taşımaları gibi, farklı QS moleküllerinin doğurduğu yanıtlar da farklı olmaktadır. Bununla birlikte, farklı türler arasında aynı QS molekülleri aracılığıyla iletişim kurulabildiğinin delilleri de mevcuttur. Bu tarz çapraz iletişim özellikle karma mikroorganizma topluluklarının bir arada olduğu biyofilmlerde önemlidir (Raffa et al., 2005).

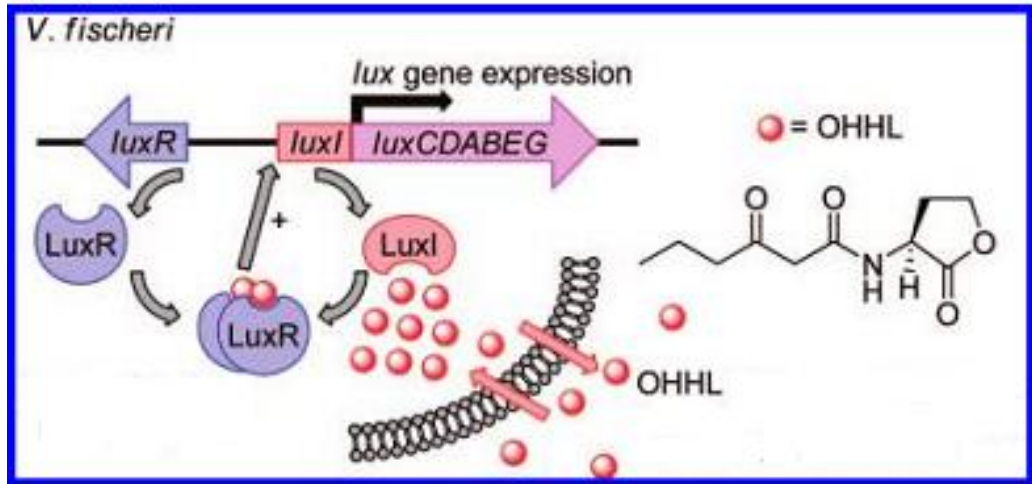
İlk Quorum Sensing (QS) incelemeleri, serbest yaşayan iki deniz *Vibriosu* olan *V. fisheri* ve *V. harveyi* üzerinde gerçekleştirilmiştir ve 1960'lara dayanmaktadır. Normalde deniz suyunun mililitresinde 100'den daha az sayıda olan bu iki bakterinin serbest yaşarken ışıma (biyoluminesans) yapamamaları, ancak bazı deniz balıkları ve mürekkep balıklarının ışık organellerinde 10^{10-11} bakteri/ml düzeyinde yoğunlaştıklarında çevreye ışık yaymaya başlamaları dikkatleri çekmiştir. Önceleri, besiyeri ortamında gerçekleştirilen deneylerde bu durum, besiyerinde mevcut olan bir inhibitörün yüksek bakteri sayılarına ulaşıldığında uzaklaştırılabilmesi ile açıklanmıştır (Kempner and Hanson, 1968). Ancak daha sonra, ışıma görülen bir kültürün dilüe edilmesi sonucunda ışımanın kayboluyor olması veya biyoluminesans görülen bir kültürün süpernatant kısmının az sayıda bakteri içeren bir başka kültüre eklendiğinde ışımanın ortaya çıkıyor olması nedeniyle ışımanın başlama sebebinin bir inhibitörün uzaklaştırılmasından değil, bir aktivatörün birikmesinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Nealson et al., 1970; Eberhard, 1972). Bakterilerce üretilen sinyal molekülü bazal seviyede normal olarak üretilmekle birlikte, mikroorganizma sayısının belirli bir düzeye ulaşması ile birlikte bir eşik değerine ulaşmakta ve daha sonra hem sinyal molekülünün kendisinin hem de kontrol edilen virülens faktörünün üretimini artmasına neden olmaktadır (Kempner and Hanson, 1968; Hentzer and Givskov, 2003). *V. fischeri* tarafından üretilen QS molekülü ilk kez 1981 yılında saflaştırılmış ve N-3-oxo-C₆(3-oxo-hekzanoyil)-homoserin lakton (açıl-HSL) yapısında olduğu gösterilmiştir (Eberhard et al., 1981). S-adenozin metiyonin türevi olan bu açıl-HSL molekülünün sentezinden sorumlu olan genler tanımlanmış ve QS araştırmaları için örnek sistem olarak kabul edilmiştir (Engebrecht et al., 1983). Esasen her iki Vibrionun ürettiği oldukları QS molekülü

de N-açıl-HSL (AHL) yapısında olmakla birlikte, yan zincir yapılarında farklılıklar gözlenmiştir (Lazazzera and Grossman, 1998; Novick and Muir, 1999; Donabedian, 2003).

V. fischeri'nin çevreyi algılama sistemi, üzerinde çok iyi çalışılmış model bir sistemdir. *V. fischeri*, deniz suyunda cansız bir organizma gibi, mürekkep balığı, kalamar, gibi deniz canlılarının ışık yayan organlarında simbiyotik olarak yaşayan, fakültatif aerob olan, biyolojik olarak ışık saçabilen (biyolüminesans) bakterilerdir (Boşgelmez-Tınaz, 2003). *V. fischeri*'de biyolüminesansın sorumlu genler karakterize edilmiş ve iki operonda organize olmuş yedi gen (*luxR*, *luxI*, *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* ve *luxE*) tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Bu genlerden *luxA* ve *luxB* genleri lusiferaz enziminin alfa ve beta alt birimlerini kodlar. *luxC*, *D* ve *E* genleri ise lusiferaz enzimi sentezinde gerekli olan aldehid substratların sentezi ve geri kazanılmasında görev alır. *luxI*, AHL sentezinde gerekli olan bir gen iken, *luxR*, AHL transkripsiyonunu kontrol eden bir regülatörü kodlar. *luxI* mutantlarına AHL sağlanması, kaybolmuş olan fonksiyonu düzeltir, ancak AHL sentez edilemez. Buna karşılık *luxR* mutantlarına AHL sağlanması fonksiyonu düzeltmez ve ölçülebilir düzeyde AHL sentezi de gerçekleşmez. LuxR proteini ile AHL'nin birleşmesi LuxR'nin üç boyutlu yapısında değişikliğe, DNA'ya bağlanabilmesine ve *lux* operonunun (*luxCDABE*) ve *luxI*'nin transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlayarak lusiferaz üretimine neden olur. Lux operonunun ve *luxI* geninin aktive olması daha fazla AHL (OHHL) üretimini doğurur (Şekil 2.10.). Üretilen AHL'nin LuxR ile birleşmesi, bir pozitif geri besleme sağlayarak ışımda hızlı bir artışa neden olur. Bu bilgiler ışığında *V. fischeri*'nin esas alındığı örnek bir AHL sistemi Şekil 2.11.'da özetlenmiştir. *V. harveyi*, *V. fischeri*'den farklı olarak iki farklı AHL QS sistemine sahiptir. Bunlardan birisi N-açıl-HSL, diğeri ise 3-hidroksi-C₄-HSL'dir. Ayrıca AHL genleri de *V. fischeri*'nin homolog *luxR* ve *luxI* genlerinden farklıdır (Raffa et al., 2005).



Şekil 2.10. *V. fischeri*'de *luxI* geninin ürettiği N-(3-oksoheksanoyil)-L-homoserin lakton (OHHL) sinyal molekülü (Boşgelmez-Tınaz, 2003)



Şekil 2.11. *V. fischeri*'de LuxI/LuxR quorum sensing sistemi (Galloway et al., 2011)

Yıllar boyunca AHL temeline dayanan QS çalışmalarının *V. fischeri* ve *V. harveyi* gibi deniz bakterileri ile sınırlı olduğu düşünülmüş, ancak antibiyotik sentezine yönelik çalışmalar bunun böyle olmadığını göstermiştir. 1990'ların başında, karbapenem antibiyotik üretemeyen *Erwinia carotovora* bakterisinin farklı bir mutant bakteri grubu ile birlikte olduğunda diğer bakteri tarafından sağlanan sinyal molekülü sayesinde antibiyotik sentezine yeniden başladığı gösterilmiş, bu molekülün *V. fischeri*'de ışımayı tetikleyen molekül ile aynı yapıda olduğunun görülmesi yeni çalışma alanları doğurmuştur (Bainton et al., 1992). Daha sonra *Enterobacter*, *Hafnia*, *Rahnella* ve *Serratia* gibi birçok bakteri cinsinde ve mantarlarda değişik QS sistemleri saptanmıştır. Ancak, kimi durumda hücresel metabolitler ile QS moleküllerinin ayırt edilmesi güçtür. Bu nedenle gerçek bir QS molekülünün bir metabolitten farklı olarak taşınması gereken özellikler şöyle özetlenmektedir:

1. QS molekülünün üretimi üremenin değişik basamaklarında, özel fizyolojik koşullar altında veya çevresel değişikliklere cevap olarak orta çıkar.

2. QS molekülü ekstrasellüler olarak birikir ve özgün reseptörler tarafından algılanır.

3. QS molekülünün birikmesi kritik bir eşik değerine ulaştığında planlanmış bir cevabı doğurur.

4. QS molekülün doğurduğu hücrel cevap, QS molekülünün metabolize veya detoksifiye edilmesinden çok daha geniştir.

Bu dört özellikten ilk üçünü birçok metabolit de gösterirken, dördüncü özellik bir QS molekülünün mutlaka taşınması gereken bir özelliktir (Winzer et al., 2002).

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*'da çevreyi algılama

Gram negatif nozokomiyal enfeksiyonlar ve kistik fibrozis başta olmak üzere kronik akciğer enfeksiyonlarında etken olan *P. aeruginosa*'nın pek çok virülens faktörü tanımlanmıştır. *P. aeruginosa*'nın virülensinde çok önemli rol oynayan ekstrasellüler enzimleri kodlayan genlerin kontrolü sinyal molekülleri ile sağlandığı için çevreyi algılama sistemlerinin anlaşılmasında üzerinde en çok çalışılan bakterilerden birisi *P. aeruginosa*'dır. Sinyal moleküllerinin saptanması, mikroçevre koşullarında *P. aeruginosa*'nın davranışları hakkında önemli ipuçları verir. Bu ipuçları bu bakterinin tanısı ve enfeksiyonun sağaltımında önemli açılımlar sağlayabilir (Bertani et al., 2003).

P. aeruginosa'da tanımlanmış iki ana QS sistemi vardır; birbirleriyle hiyerarşik ilişkileri olan bu sistemler *las* ve *rhl* sistemleridir.

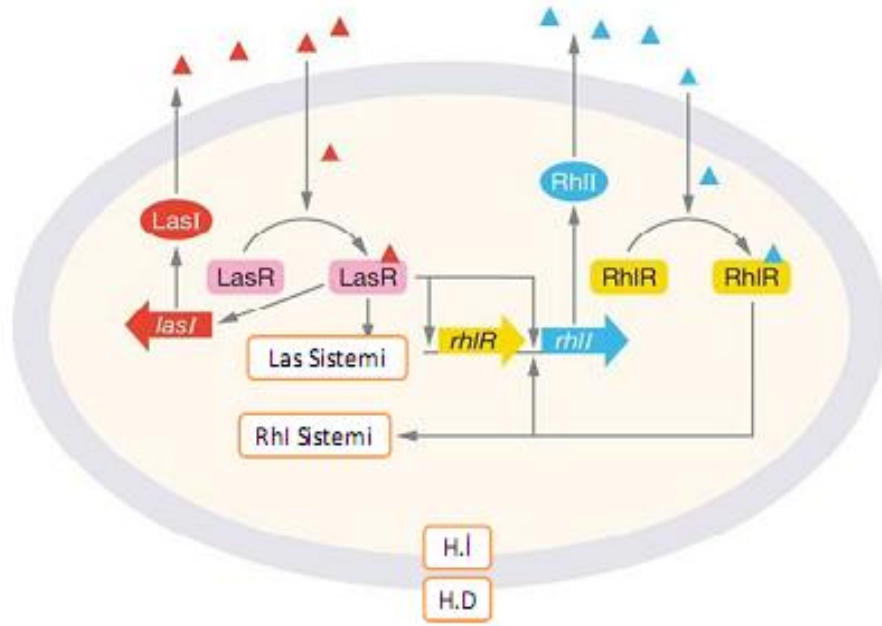
***las* QS Sistemi:** *P. aeruginosa*'da tanımlanan ilk QS sistemi ile LasB elastaz ifadesini düzenleyen sistem aydınlatıldığı için *las* QS sistemi olarak adlandırılmıştır.

Sistemin bileşenleri; sinyal molekülü sentaz geni olan *lasI*, sentaz geninin ürünü N-(3-oxododekanoyl)-L-homoserin lakton (3-oxo-C₁₂-HSL, OdDHL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *lasR* genidir (Gambello and Iglewski, 1991). *lasI*, hücre membranını iki yönlü geçebilen sinyal molekülünün sentezinden sorumludur. Artan bakteri hücresi yoğunluğu ile hücre içindeki sinyal molekülü konsantrasyonu eşik değere ulaşır ve sinyal molekülü transkripsiyonel aktivatöre bağlanır. R-protein/sinyalmolekülü kompleksi özgül hedef genlerin ifadesini uyarır (Van Delden and Iglewski, 1998) (Şekil 2.12.).

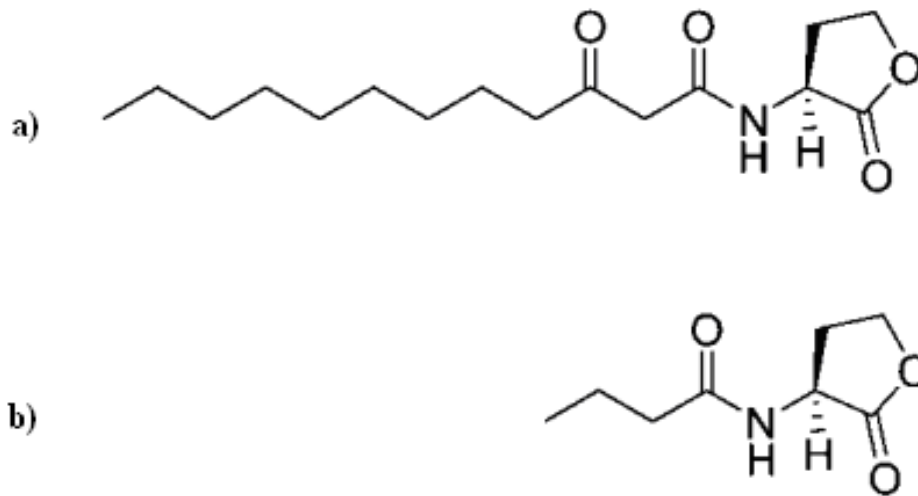
las sistemi, *lasB* ifadesini düzenler ve diğer hücre dışı virülans faktörlerinden LasA elastaz ve ekzotoksin A sentezi için gereklidir. *las* sistemi sinyal molekülü olan 3-oxo-C₁₂-HSL'nin immunomodülatör olduğu ve konak yanıtını baskıladığı da gösterilmiştir (Telford et al., 1998).

***rhl* QS Sistemi:** Ramnolipid sentezini kontrol ettiği için *rhl* adını alan bu ikinci QS sisteminde sinyal molekülü sentaz geni *rhlI*, sinyal molekülü olan N-bütanoyl-L-homoserin lakton (C₄-HSL, BHL) ve transkripsiyonel aktive edici proteini kodlayan *rhlR* geni rol alır (Pearson et al., 1995). Bu sistem ramnolipid sentezi için gerekli bir enzim olan ramnozilttransferazı kodlayan *rhlAB* operonunun ifadesini düzenler. Sistem ayrıca LasB elastazın, LasA proteazın, piyosiyanninin, siyanürün ve alkali proteazın üretimleri için de gereklidir (Pearson et al., 1997).

3-oxo-C₁₂-HSL ve C₄-HSL'un her ikisinin bakteri dışına serbest olarak diffüze olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte 3-oxo-C₁₂-HSL'un diffüzyonu, C₄-HSL'un diffüzyonuna göre önemli düzeyde yavaş olmaktadır (Smith and Iglewski, 2003) (Şekil 2.13.).



Şekil 2.12. *P. aeruginosa*'nın quorum sensing sistemi. *lasI* geninin ürettiği sinyal molekülü kırmızı üçgenlerle, *rhlI* geninin ürettiği sinyal molekülü ise mavi üçgenlerle temsil edilmektedir. H.D, hücre dışı; H.İ, hücre içi (Waters and Bassler, 2005)



Şekil 2.13. *P. aeruginosa*'da AHL sinyal molekülleri. a) *lasI* geninin ürettiği N-(3-oxododekanoyil)-L-homoserin lakton (OdDHL) molekülü b) *rhlI* geninin ürettiği N-bütanoyil-L-homoserin lakton (BHL) molekülü (Boşgelmez-Tınaz, 2003)

Son yıllarda yapılan çalışmalar *las* ve *rhl* sistemlerinin etkileşim içinde olduğunu göstermiştir (Pearson et al., 1997). R-protein/sinyal molekülü komplekslerinin belli başlatıcı (promoter) bölgeleri tercih ettiği de gösterilmiştir; LasR/3-oxo-C₁₂-HSL kompleksi *lasB*'yi *rhlA*'ya tercih ederken, RhlR/C₄-HSL kompleksi *rhlA*'yı *lasB*'ye

tercih eder. Sistemler birbirinden bağımsız değildir. LasR/3-oxo-C₁₂-HSL kompleksi *rhlR* ifadesini uyardığı için *las* sistemi hiyerarşik olarak *rhl* sisteminin üzerinde yer alır. Ayrıca 3-oxo-C₁₂-HSL, RhlR'ye bağlanabilir ve C₄-HSL'nin transkripsiyonel aktive edici proteinine bağlanmasını engelleyebilir (Pesci et al., 1997). Böylece *las* sistemi *rhl* sistemini hem transkripsiyonel seviyede, hem de translasyon sonrası aşamalarda kontrol eder.

Son zamanlarda *P. aeruginosa*'nın çevreyi algılama sisteminin bir parçası olan ve temelde Pseudomonas kinolon sinyal molekülüne (PQS, 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon) dayanan üçüncü sinyal sisteminin, varlığı ortaya konmuştur. PQS molekülünün üretimi *lasR* sistemi tarafından kontrol edilmektedir ve ekzojen PQS elastaz B'nin ve *rhlI*'nin ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyarmaktadır (McKnight vd., 2000). Bu üç sistem arasında *las* sistemi anahtar rol oynamakta ve diğerleri *las* ile hiyerarşik bir işleyiş içinde bulunmaktadır. *las* QS sistemi, *rhl* QS sistemini kontrol etmekte aynı zamanda *lasR* QS, PQS üretimini düzenlemektedir. PQS ise *rhlI* ve *rhlR* ekspresyonunu artırdığından PQS etkinliği *las* ve *rhl* QS sistemleri arasında düzenleyici bağlantı rolü oynamaktadır (Diggle vd., 2003; Wilder vd., 2011).

QS sisteminin *P. aeruginosa* virülensindeki fonksiyonel önemi *in vivo* hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda açıkça gösterilmiştir (Rumbaugh et al., 2000). Bakterinin patogenezinde çok önemli görev üstlenen QS sisteminde bir eksikliğin bakterinin virülensinde önemli azalmaya neden olacağı açıktır. Bu hipotezi destekleyen hayvan çalışmalarında Iglewski ve Howe alkali proteaz üretimi belirgin olarak azalmış mutant kökenlerin, farelerde geliştirilen travmatize göz modelinde korneayı kolonize edemediklerini ve kornea hasarına yol açamadıklarını, alkali proteazın dışarıdan eklenmesiyle ise alkali proteaz üreten kökenlerin oluşturduğu enfeksiyondan ayırt edilemeyecek bir tablo geliştiğini gözlemlemişlerdir (Wu et al., 2000). *lasR* geni mutasyona uğratılmış *P. aeruginosa* kökeninin fare akut pnömoni modelinde daha az virulan olduğu gösterilmiştir (Tang et al., 1996).

2.3. Çevreyi Algılama Sistemi Engelleyicileri

1930’larda, antibiyotiklerin keşfi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yeni bir çığır açmış ve bakteriyel enfeksiyonlardan ölüm sayısında önemli bir düşüş yaşanmıştır. Ancak 1950’lere gelindiğinde, klinik olarak sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişmeye başlamıştı bile. Günümüzde ise dirençli bakterilerin hızla yayılımı birçok hastalığın tedavisini zorlaştırmakta, bazı durumlarda mümkünsüz kılmaktadır. Uygunsuz antibiyotik kullanımı, antimikrobiyal direnç artışının en önemli nedeni olmakla birlikte, *P. aeruginosa* birçok antibiyotik grubuna da intrinsik olarak dirençlidir (Ayyıldız vd., 2002). Beta-laktamaz enzimleri ile antibiyotiklerin hidrolize edilmesi, lipopolisakkarit yapısındaki dış membran sayesinde antimikrobiyal ajanlara karşı doğal bariyer oluşturması, biyofilm oluşturabilme yeteneği, antibiyotiklere direnç genlerini taşıyan plazmidlerin ve antimikrobiyal ajanın hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompalama sistemlerinin varlığı gibi nedenler, *Pseudomonas* suşlarında birçok antibiyotiğe karşı giderek artan bir direnç gelişimine neden olmaktadır (Yorgancıgil, 1999). *Pseudomonas* suşları gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren bakteriler, tedavilerinin güç olması nedeniyle hastane ortamında ciddi problemlere yol açmaktadırlar. Bu nedenle, her yıl milyonlarca dolar yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için harcanmakta ancak hızla gelişen bakteriyel direnç daha eczane raflarına ulaşmadan önce antibiyotiklerin etkilerini kaybetmeye başlamalarına neden olmaktadır (Camara et al., 2002).

Bir yandan gelişen antibiyotik direnci, diğer taraftan yeni geliştirilen antibiyotik sayısındaki azalma enfeksiyon hastalıklarının tedavisi açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır. Araştırmacılar tarafından, bakterileri antibiyotik kullanarak öldürmek yerine, onlar arasındaki haberleşme sistemini hedef alarak antibiyotik direncine bir çözüm geliştirilebileceği önerilmiştir (Hentzer and Givskov, 2003). Bu yüzden ilaç firmaları bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek ve kontrol altında tutmak için antibiyotikler haricinde başka yeni tedavi yolları bulmaya odaklanmışlardır.

Çevreyi algılama sistemine ait sinyal moleküllerinin, mikroorganizmaların virülens faktörlerini uyarması ve biyofilm oluşumunda görev alması, yeni ilaçların geliştirilmesi için bu sinyal moleküllerini önemli bir hedef haline getirmiştir. Çevreyi algılama inhibitörleri ile ilgili araştırmalar henüz deneme aşamasında olup çalışmalar bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır (Rasmussen and Givskov, 2006).

QS inhibitörlerinin (QSIs) tanımlanabilmesi amacıyla doğal ve sentetik çok sayıda kimyasal madde taranarak inhibitör etkili birçok bileşik saptanmıştır. Bu bileşikler etkilerini üç farklı seviyede göstermektedirler: (i) AHL sentezinin engellenmesi, (ii) AHL sinyal molekülünün yıkılması ve (iii) AHL reseptör proteininin engellenmesi (Juhas et al., 2005; Rasmussen and Givskov, 2006).

a) AHL sentezinin engellenmesi:

Üzerinde en az araştırma yürütülen yaklaşım sinyal üretiminin blokajı olmuştur. Önemli QS moleküllerinden birisi olan AHL, S-adenozil metiyoninden sentezlendiğinden dolayı, bu aminoasidin analogları çevreyi algılama molekülünün sentezini önlemek için denenmektedir. Bir makrolid olan eritromisin tam bilinmeyen bir mekanizma ile ribozomal düzeyde QS sinyal molekülünün sentezini engelleyebilmektedir. Gram-negatif bakterilerde önemli bir sinyal molekülü olan AHL'nin sentezinde görevli bir enzimi inhibe eden "triclosan" dolayısıyla bu molekülün sentezini de engellemiş olur. *P. aeruginosa* izolatlarında yapılan bir çalışmada, azitromisinin sinyal moleküllerini kodlayan genin transkripsiyonunu azalttığı ve elastaz gen ekspresyonunu önleyerek enfeksiyonun şiddetini azaltarak alternatif bir tedavi yaklaşımı sağladığı gösterilmiştir (Tateda et al., 1996). Her ne kadar holo-ACP, L/D-S-adenozilhomosistein, sinefungin, bütiril-S-adenozilmetiyonin (bütiril-SAM) gibi bazı maddelerin AHL üretimini engelledikleri gösterilmişse de (Parsek et al., 1999), bakteri üzerine etkileri *in vivo* çalışılmamıştır. Ayrıca bakteri metabolizmasında önemli görevler alan bu moleküllerin diğer hücre fonksiyonlarını nasıl etkileyeceği bilinmemektedir.

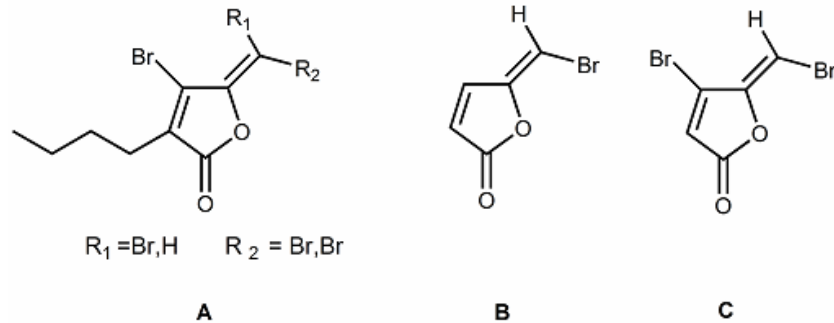
b) AHL sinyalinin yayılmasını önlemenin en bilinen yolu yıkıma uğratılmasıdır:

QS sinyalinin yayılmasını önlemenin en bilinen yolu yıkıma uğratılmasıdır. AHL molekülündeki lakton halkasının dayanıklılığı ortamın pH değerine bağlıdır ve pH 7'den yüksek değerlerde lakton halkası açılır (laktonoliz) (Yates et al., 2002). Bir bitki patojeni olan *Erwinia carotovora*'nın patolojik etkilerinden korunmak amacıyla bu bakteri ile karşılaşan bitkilerin pH değerini artırarak bakteriye karşı korunma sağladıkları gösterilmiştir (Byers et al., 2002). Laktonoliz, enzimler yardımıyla da gerçekleştirilebilir. Örneğin *Bacillus türlerinin AiiA* adında bir enzim üreterek AHL'yi parçaladığı gösterilmiştir (Dong et al., 2000, 2001; Wang et al., 2004; Lee et al., 2002), bunun yanı sıra *P. aeruginosa* PAI-A, *Arthrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Rhodococcus sp.*'de de AiiA homologu enzim üretimi gösterilmiştir (Carlier et al., 2003; Park et al., 2003; Uroz et al., 2003). İnsan solunum yolu epitel hücrelerinde de benzer bir enzimatik aktivite ile AHL moleküllerinin parçalandığı gösterilmiştir. 3-okso-C₁₂-HSL'yi etkileyen bu aktiviteden C₄-HSL etkilenmemektedir (Chun et al., 2004). Sinyalin yıkıma uğratılmasında Gram negatif bakterilerde AHL inhibitörleri olan AHL laktonaz ve AHL açılaz S52 enzimlerinin etkili olduğu gösterilmiştir (Zhang and Dong, 2004). Doğada bazı bitki ve mantarlar, birlikte simbiyotik olarak yaşadıkları bakteri popülasyonunun miktarını, bakterilerin üretmiş oldukları AHL sinyali ile iletişimini bozarak kontrol altında tutmaktadır. Bu kontrolün en bilinen örneği Avustralya sahillerinde yaşayan kırmızı bir makroalg olan *Delisea pulchra*'nın üretmiş ve veziküllerinde depolamış olduğu furanon bileşikleriyle kendisine zararlı olabilecek bakteri kolonizasyonunu önlemesidir. Bu molekülün insan patojeni *P. aeruginosa* ve *Serratia liquefaciens* QS moleküllerini de inhibe ettiği gösterilmiştir (Manefield et al., 1999).

c) AHL reseptör proteininin engellenmesi:

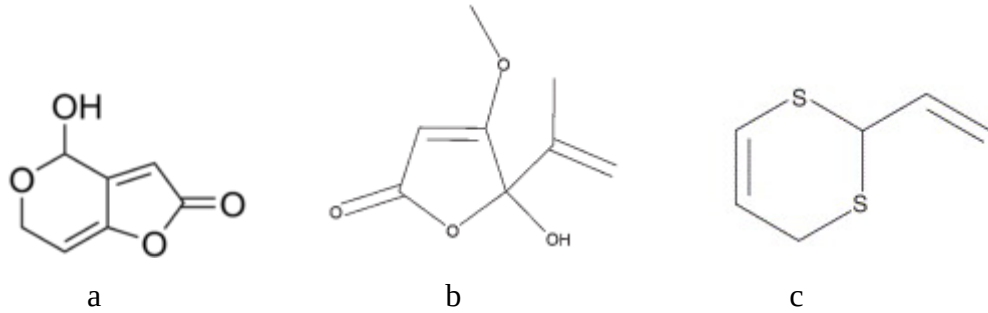
QS sistemini durdurmak için bir diğer yaklaşım, sinyalin bakteri tarafından algılanmasını engellemek olabilir. Bu amaçla reseptör proteininin, AHL sinyali ile blokajı analogu ile bloke edilmesini amaçlayan çalışmalar yürütülmüştür. QS

sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla reseptöre karşı yarışan doğal ve sentetik AHL analogları Gram negatif bakterilerle yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmışlardır (Givskov et al., 1996; McClean et al., 1997; Pesci et al., 1997; Kline et al., 1999). Bu analoglar genellikle AHL molekülünün yan zinciri ve/veya lakton halkası üzerinde yapılan modifikasyonlarla türetilmektedirler. Suga vd., yan zinciri C₄ ve 3-oxo-C₁₂ olan *P. aeruginosa*'nın sinyal moleküllerinin lakton kısımlarının keton, alkol ve aminlerini değiştirerek bu moleküllerin analoglarını sentezlemişlerdir (Ni et al., 2008). AHL molekülünün reseptörü sitoplazmik veya membranın sitoplazmik yüzünde yerleşik olan LuxR proteindir. Bu noktadan hareketle, bir makro alg olan *Delisea pulchra*'nın ürettiği ikincil metabolitlerin (doğal furanonlar) LuxR proteinine bağlanarak AHL'nin ayrılmasına neden olduğu ve böylece *Serratia liquefaciens*'in buğu tarzı üremesini (swarming hareketi) bozduğu saptanmıştır (Hentzer and Givskov, 2003; Raffa et al., 2005). Diğer taraftan doğal furanonların (Şekil 2.14. A) *P. aeruginosa*'nın QS sistemi üzerine herhangi bir etkisi yokken, bazı halojenlenmiş sentetik türevleri (Şekil 2.14. B ve C) farklı biyofilm morfolojisi göstermiştir. Daha ilginç bir mekanizma ise, bazı bitkilerin ürettikleri AHL analogu bileşiklerin *Bacillus cereus* tarafından antibiyotik sentezini tetikleyerek kendileri için zararlı olan *Pythium torulosum*'un üremesini önlemeleridir (Raffa et al., 2005). Rasmussen vd., rasgele çok sayıda molekülü tarayarak QSI etkili moleküller tanımlamış, bunların içinde en etkili bulunan 4-nitro-piridin-N-oksit'in (4-NPO), *P. aeruginosa*'da QS ile düzenlenen genlerin ifadesinde %37'lik bir azalma sağladığını göstermişlerdir (Rasmussen et al., 2005a).



Şekil 2.14. Halojenlenmiş furanonlar: A) *Delisea pulchra*'dan izole edilmiş doğal furanon, B-C) sentetik furanon (Givskov et al., 1996; Hentzer ve Givskov, 2003; Hentzer et al., 2003)

Aynı etkiyi gösterecek doğal bileşiklerin saptanması amacıyla bitkiler ve mantarlar tarandığında, araştırılan 50 *Penicillium* türünün %66'sında QSI aktivitesi gösteren ikincil metabolitler olduğu belirlenmiştir. Bunlardan penisilik asit *P. aeruginosa*'da QS ile düzenlenen genlerin ifadesinde %60'luk, patulin ise %45'lik bir azalma sağlamıştır (Rasmussen et al., 2005b). Ayrıca birçok bitkinin de (renkli burçak, havuç, soya fasulyesi, nilüfer çiçeği, domates, bezelye, kırmızıbiber ve sarımsak gibi) QSI özelliği olduğu belirlenmiştir (Rasmussen et al., 2005a). Yapılan kısıtlı sayıdaki *in vivo* çalışmalarda fare akciğer enfeksiyonu modelinde *Delisea pulchra*'dan elde edilen furanon 30 (Hentzer vd., 2003), sarımsak özütü (Bjarnsholt et al., 2005), *Penicillium coprobium*'dan elde edilen patulin (Rasmussen et al., 2005b) gibi bazı QSI molekülleri denenmiş ve moleküllerin akciğerlerdeki bakterilerin temizlenmesine, mortalitenin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir. İnsan enfeksiyonları tedavisinde QSI kullanımı için henüz erken olsa da, ümit vaat eden bulgulara erişilmiştir.



Şekil 2.15. a) *Penicillium coprobium*'dan elde edilen patulin b) penisilik asit (Rasmussen et al., 2005b) b) sarımsak özütünden elde edilen bir quorum sensing inhibitörü (Persson et al., 2005)

2.4. Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Özellikleri

Tıbbi ve aromatik bitkiler, ilaç ve gıda/gıda katkı maddesi arasında geçişlere sahip bitkilerdir. "*Tıbbi bitkiler*" genellikle belirli rahatsızlık ve hastalıkların önlenmesinde, tedavisinde ve ilaç yapımında kullanılırken "*aromatik bitkiler*" daha çok koku ve tat (aroma) özelliklerine sahip olmalarından dolayı çeşni ve gıda veya içeceklerde katkı olarak kullanılır. Hem koku hem de tat özellikleri olan, ayrıca tedavi özelliklerinden dolayı ilaç olarak kullanılan bitkilere tıbbi ve aromatik bitkiler

denilmektedir. Bitkinin kokusu, genelde sahip olduğu uçucu bileşiklerden (uçucu yağ) kaynaklanmaktadır. Aromatik bitkilerden, genelde distilasyon ile elde edilen uçucu yağlar, koku ve tat özelliklerinden başka kozmetik ve parfümeride de yaygın olarak kullanılır (Genç, 2010). Uçucu yağlar, bitkilerden elde edildiklerinde kimyasal olarak saf olmayıp birçok bileşen içermektedirler. Bazen bir uçucu yağ türünde 100 ayrı madde saptanabilmektedir (Sotomayor et al., 2004). Genel olarak uçucu yağların içeriklerinin onlara tedavi edici değeri kazandıran çeşitli alkoller, esterler, terpenler, aldehytler, kumarinlerden oluştuğu belirtilmiştir (Tanker ve Tanker, 2003). Bu maddeler uçucu yağlara; ağrı kesici, yara iyileştirici, sakinleştirici, mikrop ve mantar öldürücü, ferahlatıcı, stres giderici, zihin açıcı, uyutucu etkiler sağlamakla birlikte ayrıca, kasılma ve spazmların önlenmesinde, sindirim ve solunum sistemlerinin düzenlenmesinde, cilt hastalıklarının iyileştirilmesinde de katkıda bulunabilmektedir (Hajhashemi et al., 2000; Backhause et al., 2001). Uçucu yağlar birçok biyolojik aktiviteye sahip olup, bunlardan bazıları antibakteriyel (Cha et al., 2007), antifungal (Pyun and Shin, 2006) ve antioksidan (Kim et al., 2004; Singh et al., 2006) özellikleridir. Uçucu yağların bileşiminde yer alan terpenik bileşiklerin, kimyasal yapılarından dolayı potansiyel antioksidan aktiviteye sahip oldukları da bilinmektedir (Battino et al., 2002; Shyamala et al., 2007).

2.4.1. Anason (*Pimpinella anisum* L)

Apiaceae familyasından olan anason (*Pimpinella anisum* L.) (Şekil 2.16.), ülkemizde Ege ve Güney Anadolu'da doğal olarak yetişen, Akdeniz bölgesi ve Mısır'a özgü bir bitki olan ve aynı zamanda Türkiye'de ve Avrupa'nın her tarafında kültürü yapılan tek yıllık bir bitkidir (Santos et al., 1998).

Gerek halk arasında gerekse modern tıpta gastrointestinal sistem rahatsızlıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan anason bitkisinin çok farklı farmasötik etkileri de bulunmaktadır. Bu etkilerden bazıları antienflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antikonvülsan, kas gevşetici, tümör engelleyici, antidiüretik ve bronkodilatatör etkidir. Bitki üzerinde yapılan çalışmalarda, bahsi geçen etkilere

bağlı olarak anason özellikle kanser, astım, epilepsi ve romatizma gibi ciddi rahatsızlıkların tedavisi için ümit vaat etmektedir (Özdemir, 2010).

Geleneksel tedavi sistemlerinde *P. anisum* meyvelerden elde edilen uçucu yağ (*Anisi aetheroleum*); analjezik, hafıza güçlendirici ve uykusuzluk giderici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Jäger et al., 2006). Meyvelerden elde edilen uçucu yağın tedavi amaçlı kullanımının yanında yüksek oranda taşıdığı anetolden dolayı gıda sanayinde Rakı, Uzo, Aniset, Pernot, Ricardo, Pastis, Sambuca gibi içkilerde temel aroma olarak da kullanılmaktadır (Jurado et al., 2007).



Şekil 2.16. *Pimpinella anisum* L. (Özdemir, 2010)

Anason ve anason esansı tat verici olarak alkollü ve alkolsüz içkilerin yanı sıra donmuş süt ürünlerinde, şekerlemelerde, unlu ürünlerde, jel ve pudinglerde, et ve et ürünlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca anason yağının ilaç ve kozmetiklerin kötü kokularını maskeleyerek amacıyla, diş macunlarında, sabunlarda, deterjanlarda, krem ve losyonlarda koku verici olarak kullanıldığı da bilinmektedir (Ishikawa et al., 2002). Anason %1,3-3,7 oranında eteri yağ içerir. Bu eteri yağın da en az %78-95'i ana bileşen olan trans-anetoldür (Arslan ve ark., 2004). Trans-anetol; izoestragol, p-anetol, 1-metoksi-4-propenil benzen olarak da bilinir. $C_{10}H_{12}O$ kapalı formülüne sahiptir ve molekül ağırlığı 148,20 g/mol'dür. Yoğunluğu 0,98 g/cm³, kaynama noktası 234-239,5°C, erime noktası ise 21°C'dir. Suda çözünmezken diğer organik çözücülerde çözünür (Sigmaaldrich, 2011).

2.4.2. Ylang ylang (*Cananga odorata* Hook. f. et Thw.)

Ylang ylang yağı (*Cananga aetheroleum*), Güney Asya’da yetişen Anonaceae ailesinden *Cananga odorata* türünün ağacının taze çiçekli kısımlarından buhar distilasyonu ile elde edilmektedir (Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. *Cananga odorata* Hook. f. et Thw. (Anonim, 2011a)

Ylang ylang uçucu yağının bileşiminde, monoterpenler, terpenik ve seskuiterpenik alkoller, seskuiterpenhidrokarbonları, asetatlar, benzoatlar ve fenoller bulunmaktadır. Tatlı, etkili floral kokuya sahip olması nedeniyle parfümlerde ve şampuanlarda kullanılmaktadır. Aromatik ve ferahlatıcıdır. Cildi ve saçları yenileyicidir. Zihinsel ve duygusal olarak etkileyicidir. Tropikal Asya’da yüksek tansiyon, ishal, uykusuzluk gibi rahatsızlıklar için kullanılmıştır. Antidepresan olan Ylang ylang yağı kas gevşetici, hücre yenileyici özelliklerine sahiptir. Akciğer, kalp, kalın ve ince bağırsakların fonksiyonlarını düzenlemeye yardımcı olmaktadır. Kuru ciltleri nemlendirmekle beraber cilt çatlakları için kremlerde ve losyonlarda kullanılmaktadır. Güney Amerika ve Afrika’da Annona adı verilen meyvesi tüketilmektedir (Gaydou et al., 1986; <http1>).

2.4.3. Adaçayı (*Salvia officinalis* L.)

Akdeniz Bölgesi, Dalmaçya ve İtalya’da yetişen, Almanya, Güney Fransa ve Macaristan’da kültürü yapılan 50-60 cm boyunda, Labiatae familyasından çalımsı bir bitkidir (Şekil 2.18.). Su buharı distilasyonu ile %1,5 kadar yağ (*Salviae aetheroleum*) elde edilir (Zeybek ve Zeybek, 1994).

Adaçayı dünya genelinde gıdalarda aroma ve baharat olarak kullanılan bir bitkidir. Pek çok bitki arasında en iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu test edilmiştir. Adaçayı özütü çok etkili bir antioksidan olarak bilinir. Adaçayında diğer Labiatae familyasına ait bitki ekstraktlarında bulunan karnosol, rosmanol ve karnosik asitin çeşitli metil ve etil esterleri bulunabilir. Adaçayının esas antioksidan etkisinin karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asitten ileri geldiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Kenar, 2009).



Şekil 2.18. *Salvia officinalis* L. (Kenar, 2009)

2.4.4. Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.)

Okaliptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) (Şekil 2.19.), Myrtaceae (Mersingiller) familyasına ait bir bitkidir. Güney Anadolu’da yetişen okaliptus ağacı ‘Adana okaliptusu’ olarak bilinmektedir (Baytop, 2000). Su buharı distilasyonu ile

elde edilen uçucu yağı, renksiz veya hafif sarı renkli olup, başlıca kullanım alanları tıbbi ve farmasötik amaçlıdır (Giamakis et al., 2001). Okaliptus yağı (*Eucalypti aetheroleum*), kafur kokusunda olması nedeniyle sinir sistemini etkileyerek rahatlama sağlamaktadır. Bunun yanında lokal olarak kanamaların durdurulmasında, masaj yoluyla migren ve baş ağrısı gidermede, solunum yolları tıkanıklığında, kronik bronşitte, öksürükte, tüberkülozda, yapraklarının çiğnenmesi yoluyla dişeti ve ağız hastalıklarında, sıtmada, pansuman maddesi olarak yaralanma ve iltihaplarda kullanılmaktadır. Okaliptus yapraklarından elde edilen okaliptol (1,8-sineol), ilaç kodeksine girmiş olup günümüzde de kullanılmaktadır (Baytop, 2000; Gökçe ve Karlıkaya, 2002). Okaliptus türlerinde uçucu yağların %25- %90 aralığında en çok yapraklarda bulunduğu ve en fazla bulunan 1,8-sineolün yanı sıra, monoterpen hidrokarbonların ilk üç ana bileşen olduğu, seskuiterpen hidrokarbonları ve oksijenlenmiş monoterpenleri ise daha az miktarlarda içerdikleri bildirilmiştir (Pagula et al., 2000).



Şekil 2.19. *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (http 2)

2.4.5. Mersin (*Myrtus communis* L.)

Myrtaceae familyasına ait bir bitkidir. Akdenize özgü bir bitki olup Güney ve Batı Anadolu'da da yaygın biçimde bulunmaktadır (Şekil 2.20.). Hipoglisemik etkisi için mersin yağının günde 10 damla kullanılması önerilmektedir (Baytop, 2000).

Yapraklarının yanında daha az oranda meyve ve çiçeklerinden de elde edilebilen uçucu yağlar (*Myrti communi aetheroleum*); parfümeride, kolonya sanayinde koku verici olarak, çeşitli içeceklerde, şekerlemelerde, çeşni karışımlarında, soslarda, dondurmalarda ve fırıncılık ürünlerinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Yapraklarından elde edilen uçucu yağların bileşimi, orjinine göre farklılıklar göstermekle birlikte, Akdeniz çevresindeki ülkelerden toplanan örneklerden elde edilen uçucu yağların bileşimindeki başlıca maddelerin; mirtenol, limonen, mirtenil asetat, α -terpinol, α -pinen, 1,8-sineol (okaliptol) ve linalool olduğu bildirilmiştir (Oğur, 1994).



Şekil 2.20. *Myrtus communis* L. (http 3)

2.4.6. Defne (*Laurus nobilis* L.)

Defne (*Laurus nobilis* L.) (Şekil 2.21.), Lauraceae familyasına ait bir bitkidir. Avrupa'da yaygın bir şekilde bulunmakla birlikte, ülkemizde de Ege, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinin sahil kısımlarında bulunmaktadır. Antiseptik, antiromatizmal, diüretik, kulak ve mide ağrılarını giderici olarak geleneksel tedavi amaçlı; kuru meyveleri besinlerde tatlandırıcı olarak, kuru yaprakları çay olarak, uçucu yağı (*Lauri aetheroleum*) ise sabun yapımında, besin ve kozmetik endüstrisinde koku verici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 2000). Bitkiden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal, antifungal, haşarat uzaklaştırıcı, analjezik, antiinflamatuvar, antitümöral, asetilkolin esterase inhibisyon aktivitesi ve

antikonvülzif özellikleri bildirilmiştir (Sayyah et al., 2002; Chericoni et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Soylu et al., 2006; Loizzo et al., 2007). Yapılan farklı çalışmalarda, defne uçucu yağının ana bileşenlerinin 1,8-sineol, sabinen, α -pinen, linalool ve α -terpinil asetat olduğu saptanmıştır (Careda et al., 2002; Simic et al., 2004; Özcan and Chalchat, 2005).



Şekil 2.21. *Laurus nobilis* L. yaprak ve meyveleri (Güler, 2006)

2.4.7. Siyah hardal (*Brassica nigra* L.)

Birçok ülkede ekonomik önemi olan ve ticareti yapılan *Brassica nigra*'nın, dünya üzerindeki yayılımı Avrupa, Kuzey Afrika, Güney Batı Asya'dır. Yurdumuzda ise, genellikle Marmara Bölgesi, Akdeniz Bölgesi, Doğu Anadolu Bölgesi ve Ege Bölgesi'nde yayılım gösterir (Davis, 1965). Kullanılan kısımları tohumları ve tohumlarından elde edilen yağıdır. Tohumlar 1-2 mm uzunluğunda olup kırmızımsı siyah renktedir (Şekil 2.22.). Hardal tohumlarında müsilaj, yağ, sinapin, sinigrin isimli glikozit ve mirozinaz fermenti vardır. Çok eskiden beri tıpta kullanılmaktadır. Hafif antiseptiktir. Bu cinse ait birçok tür ve ekotip sebze, besin, tohum yağı olarak ve sos- baharat şeklinde kullanılması özellikleriyle değerli bir üründür. Ayrıca birçok türü lifli yapısı nedeniyle diyet amaçlı kullanılmaktadır (Cardoza and Stewart, 2004). Brassica sebzesi vitamin, mineral ve lif kaynağıdır. Bu cinsin yapısında kansere karşı koruyucu olduğu ispatlanan fitokimyasallar bulunmaktadır (Steinmetz and Potter, 1996).



Şekil 2.22. *Brassica nigra* L.'ya ait tohumlar (Yıldızhan, 2007)

2.4.8. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.)

Hypericaceae familyasına ait olan sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Türkiye'nin batı ve doğusunda yetişir (Şekil 2.23.).



Şekil 2.23. *Hypericum perforatum* L. (Yaldız vd., 2010)

Kantaron türlerinin metanol ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitelerinin oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir (Radulovic et al., 2007). Uçucu yağı (*Hyperici aetheroleum*), tanen, hypericine, hyperoside ve flavon türevleri içerir. Sarı Kantaron, dahilen idrar söktürücü, parazit giderici, göğüs yumuşatıcı, antispazmatik,

kabız yapıcı, haricen antiseptik ve yara iyileştirici özelliktedir. Çiçekli dalları zeytinyağında bekletildikten sonra elde edilen karışım, özellikle yanıkların tedavisinde çok etkilidir (Baytop, 1999). Eskiden birçok evde bu bitkiden birkaç sürgün güzel koku vermek için odaların duvarlarına asıldığı belirtilmektedir.

2.4.9. Civanperçemi (*Achillea millefolium* L.)

Asteraceae familyasına ait olan *Achillea millefolium* L. çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları yünlü ve parçalıdır. Boyları 5–100 cm arasında değişir (Şekil 2.24.).



Şekil 2.24. *Achillea millefolium* L. (Yaldız vd., 2010)

Ülkemizde yaklaşık olarak 40 tür *Achillea* bulunmaktadır. Civanperçemi olarak bilinen bu bitki kanamayı durduran etkisinden dolayı tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Takzare et al., 2008). Mavimtrak renkli bir uçucu yağ (*Aetheroleum millefolii*) taşır. Bu uçucu yağda azulen, limonen, sineol, borneol, pinenler, seskiterpenler vardır (Baytop, 1999). Solucan düşürücü, iltihap giderici, sinir yatıştırıcı, antiviral, gebelik önleyici, idrar söktürücü, terletici, kadınlarda adet düzenleyici, ateş düşürücü, barsak fonksiyonlarını düzenleyici, uyarıcı, baş ve boğaz ağrılarında, panik atakta, romatizma ve mide ülserinde kullanıldığı bilinmektedir. Kuvvet verici, uyarıcı, diüretik ve midevi olarak bilhassa infüzyon (%5) halinde

kullanılır. Çiçekleri çay gibi demlenip iç kanamalarda kan durdurucu olarak kullanılmaktadır (Zeynalov, 2008).

2.4.10. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)

Batı ve Güney Anadolu'da lokal olarak yetişen *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae familyasına ait bir bitki türüdür (Şekil 2.25.). Ekstreleri antioksidan ve antibakteriyel aktiviteye sahip olup et ve yağların kalitesinin bozulmadan saklanması sağlamaktadır. Biberiye uçucu yağı, biberiye yapraklarından, buhar distilasyonu ile elde edilmektedir. Verbenon etken maddesi yüksektir. Antiseptik bir yağdır. Kafurun, kanfen, pinen, sineol, borneol, bornilesetat içermektedir (Baytop, 1999).



Şekil 2.25. *Rosmarinus officinalis* L. (http 4)

2.4.11. Karabaş otu (*Lavandula stoechas* L.)

Lavandula stoechas L., Lamiaceae familyasına ait bir Lavandula üyesidir (Şekil 2.26.). *Lavandula stoechas* L., Akdeniz bölgesinde geniş bir şekilde dağılmış olup Fransa, İtalya ve İspanya'da kültürü yapılmaktadır. Bitki ağrı kesici, antiseptik, yara iyi edici, yatıştırıcı, balgam söktürücü, sinir ve kalp kuvvetlendirici gibi etkileriyle çok eskiden beri kullanılmaktadır. Genellikle çay (%2-5'lik) halinde kullanılır. Uçucu yağının (*Lavandulae aetheroleum*) kokusu lavantadan ziyade

biberiyeye benzer. Uçucu yağın içinde kafur kokusu hakimdir. Kokusu hoş olmadığından parfümeride pek kullanılmaz (Gören et al., 2002). İzmir çevresinden toplanan *Lavandula stoechas* L. bitkisinin çiçekli dal uçlarından su buharı distilasyonu ile edilen uçucu yağ bileşiminde; pinen, kamfen, limonen, kafur, fenkon, sineol, borneol, linalol ve linalil asetat bulunduğu tespit edilmiştir (Tanker et al., 1977).



Şekil 2.26. *Lavandula stoechas* L. (http 5)

2.4.12. Oğulotu (*Melissa officinalis* L.)

Lamiaceae familyasına ait olan *Melissa officinalis* L., Güney Avrupa ve Anadolu'da yaygın olarak yetişmektedir (Şekil 2.27.). Literatürde antioksidan içerik bakımında zengin olduğu ve kanser riskini azalttığı belirtilmiştir (Dastmalchi et al., 2008). Tanen ve uçucu yağ taşır. Uçucu yağ (*Melissae aetheroleum*) içinde özellikle; sitral, sitronellal, sitronellol ve linalol, boyar maddeler, reçineler, ursol, oleanol asitleri, askorbin asidi bulunur. Yatıştırıcı, midevi gaz söktürücü, terletici ve antiseptik etkilere sahiptir (Baytop, 1999). Oğulotu yağı aynı zamanda parfüm ve kozmetik sanayinin önemli maddelerinden biridir (Baydar, 2007).



Şekil 2.27. *Melissa officinalis* L. (Yaldız vd., 2010)

2.4.13. Nane (*Mentha piperita* L.)

Lamiaceae familyasına ait olan *Mentha piperita* L., su nanesi ve kıvırcık naneden melezdır (Şekil 2.28.). *Mentha piperita* L.'nin esansiyel yağ ekstraktları hem antimikrobiyal hem serbest radikalleri nötralleştirme yeteneğine sahiptir (Yadegarinia et al., 2006). Rezin, tanen ve uçucu yağ (%0.5-1) taşımaktadır. Uçucu yağ miktarı yetiştirilen ırka ve yetiştirme koşullarına göre büyük değişiklikler gösterir. Uçucu yağ içinde terpenler, serbest ve ester halinde mentol (%40-60), menton (%8-10) ve mentofuran bulunmaktadır (Tarımcılar ve Kaynak, 1996). Özellikle sinirsel kökenli mide bulantılarını kesici, gaz söktürücü ve koku verici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999).



Şekil 2.28. *Mentha piperita* L.

2.4.14. Tırşık pancarı (*Arum dioscoridis* Sm.)

Araceae familyasına ait olan *Arum dioscoridis*, ülkemizin Ege, Akdeniz, Marmara, Karadeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerindeki tarla ve bahçelerde, yol kenarlarında ve boş arazilerde kendiliğinden yabani olarak yetişir (Şekil 2.29.). Doğu Akdeniz bölgesinde tırşık pancarı bitkisinin yapraklarının yemeği de yapılmaktadır. Taze yapraklarında ve yumrusunda zamk, müsilaj, nişasta, saponin ve konisin bulunur. Bu bitkinin yaprakları acı bir tada sahip olup bu acı tadı gidermek için yaprakları kaynatılıp, süzülüp ve ondan sonra pişime hazırlanır. Bazı bölgelerde ise zehirli diye tüketilmemektedir (Baytop ve Kadioğlu, 2002). Metanol, aseton ve hekzan çözücülerini kullanılarak elde edilen bitki ekstraktlarında viteksin, p-koum, naringin, eriodiktiol, ferulik asit, kafeik asit ve linoleik asit bulunmaktadır. *Arum dioscoridis*, özellikle Asya ve Avrupa'da da yıllardır geleneksel olarak tüketilmektedir. Ancak, bu bitki üzerine sadece birkaç çalışma yapılmıştır. Bitkinin sahip olduğu yüksek antioksidant kapasitesi nedeniyle insan beslenmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Uguzlar et al., 2011).



Şekil 2.29. *Arum dioscoridis* Sm. (Kıran, 2006)

2.4.15. Ardiç (*Juniperus communis* L.)

Ardiç (*Juniperus communis* L.) (Şekil 2.30.), Cupressaceae familyasına aittir. Ardiçlar 60 türü içeren ve kuzey yarım küreden, Afrika'ya (güney Afrika) kadar çok farklı sıcaklık ortamlarında yayılan herdem yeşil ağaç veya çalılardır (Adams ve Hagerman, 1977). Ülkemizde 7 türü 10 taksonu doğal olarak yayılır. Avrupa ve Dünya'nın birçok ülkesinde, *Juniperus* (ardiç) türleri içerdiği ekstraktif maddeler nedeniyle tıpta özellikle de farmakolojide kullanımı nedeni ile büyük bir önem taşımaktadır. *Juniperus* (Ardiç) türleri, uçucu yağ, tanen, flavanoit, reçine, lignan ve triterpen yönünden zengin bitkilerdir. Ardiç yağının (*Juniperi aetheroleum*) çeşitli ve şiddetli sinir bozukluklarında özellikle ilaçların etkisiz kaldığı durumlarda baş ağrısı, ense ağrısı, genel kırgınlık, mide krampı veya mide krampında artış, migren ve sinirsel kalp rahatsızlıklarında etkili olduğu kanaati yaygındır. Bir bardak suya damlatılan ardiç yağı ile yapılan gargara kötü ağız kokularını giderir (Erenler, 1997). Wegener ve Schmidt (1995) *J. communis* L. meyvelerinin yağının diüretik özelliğinin, potansiyel etkilerinin bulunduklarını belirtmişlerdir. Halk arasında *J. communis* L.'den elde edilen uçucu yağların iştah açıcı, antiseptik, antiparazitler ve antienflamatuar özellikleri sebebi ile yaygın olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Meyve uçucu yağı ise, oda spreyleri, kolonyalar vb. gibi alanlarda koku vermede kullanılmaktadır (Singh et al., 1996).



Şekil 2.30. *Juniperus communis* L. (http 6)

2.4.16. Zambak (*Lilium candidum* L.)

Liliaceae familyasından çok yıllık otsu, monoik bir bitkidir (Şekil 2.31.). Dünyada doğal olarak Lübnan, Suriye, Filistin, Yunan Adaları, Balkanlar ve ülkemizde Güneybatı Anadolu'da yayılış göstermektedir (Davis, 1984). Beyaz zambağın tıbbi bitki olarak kullanımının uzun bir geçmişi vardır. Ancak doğada ender bulunması sebebiyle modern tıpta nadiren kullanılmaktadır. Çiçeklerinden elde edilen yağdan, koku verici olarak parfümeride yararlanılmaktadır. Taze çiçeklerin demlenmesi ile elde edilen sıvı çürükleri tedavi etmede kullanılır (Baytop and Mathew, 1984).



Şekil 2.31. *Lilium candidum* L. (http 7)

2.4.17. Limon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)

Dünyada yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan, turuncgil çeşitleri arasında büyük öneme sahip olan limon, genellikle kuzey ve güney yarımkürede, en düşük sıcaklıkların -4°C 'nin üstünde olduğu yarı kurak ve kurak subtropik iklim kuşağında yetiştirilmektedir. Limon yetiştiriciliği en yoğun Akdeniz ülkelerinde görülmektedir (Şekil 2.32.). Limon besin içeriği bakımından insan sağlığı açısından büyük öneme sahip olup yüksek miktarlarda C vitamini ve flavonoid bileşikler içermesinden dolayı da antioksidant ve kanser hastalıklarını önleyici özelliklere sahiptir. Limon çeşitlerinde, flavanone, rutinosidler, eriositrin, hesperidin, narirutin ve didymin bulunmaktadır (Coffin, 1971, Tomas et al., 1978). Limonda yoğun bir şekilde bulunan diğer bir fenolik bileşik olan limonoidler antiviral, antifungal,

antibakteriyel, antineoplast ve antimalarial gibi birçok iyileştirici özelliklere sahiptirler (Roy and Saraf, 2006).



Şekil 2.32. *Citrus limon* L. (http 8)

2.4.18. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), Compositeae (Asteraceae) familyasının değerli bir üyesidir (Şekil 2.33.). Bugün dünyada Hindistan, ABD, Meksika, Etiyopya ve Arjantin en önemli aspir üreticileridir. Türkiye’de ise aspir tarımı Balıkesir, Eskişehir ve Isparta gibi illerde geleneksel olarak yıllardır devam etmektedir.



Şekil 2.33. *Carthamus tinctorius* L. (http 9)

Aspir tohumları %90’ı doymamış yağ asitlerinden (oleik ve linoleik asit) oluşan %25-45 arasında yağ içermektedir (Weiss, 1971). Ortalama %78 linoleik asit (omega-6) içeren aspir yağı özellikle damar sertliği (atherosclerosis) tedavisinde ve yüksek kan kolesterolünün düşürülmesinde kullanılabilecek diyet bitkisel yağlardan birisidir. Margarin, mayonez ve salata yağı üretimi yanında, çabuk kuruma özelliği

nedeniyle buruşmaya ve yüksek neme dayanıklı kalitede boya üretiminde de aranan bir maddedir (Weiss, 1983). Son yıllarda yüksek oleik asit içeren tipleri de geliştirilerek yağının stabilitesi artırılmış ve endüstriyel kullanım alanı daha da genişlemiştir (Weiss, 2000).

2.4.19. Vişne (*Prunus cerasus* L.)

Vişne (*Prunus cerasus* L.), gülgiller (Rosaceae) familyasından kiraza benzeyen ve tadı kiraz tadından daha ekşi olan bir meyve türüdür (şekil 2.34.). Birçok kaynakta vişnenin muhtemel anavatanı olarak Hazar Denizi ile Kuzey Anadolu dağları arasında kalan bölge kabul edilmektedir. Vişne yaprağı metanol ekstraktında, sekiz adet fenolik asit (gallik, klorojenik, tannik, kafeik, salisilik, ferulik, kumarik ve sinamik) tespit edilmiştir (Chrzanowski, 2008).



şekil 2.34. *Prunus cerasus* L. (http 10)

2.4.20. İren (*Armoracia rusticana* L.)

Armoracia rusticana, Brassicaceae familyasına ait bir bitkidir. Akdeniz veya Doğu Avrupa kökenli olduğu düşünölmektedir ve günümüzde Orta ve Doğu Avrupa'da geniş çapta yetiştirilmektedir. Bitkinin kökü kullanılır (şekil 2.35.). Neredeyse her zaman taze iken veya turşu olarak tüketilir. Dokunulmamış iren kökü pek aroma göstermez; ancak keserken, parçalarırken ve özellikle rendelerken keskin ve göz

yaşartan çok kuvvetli bir koku salar. Bununla birlikte bu koku kalıcı olmayıp on veya yirmi dakika sonra kaybolur. İrenin keskin kokusunun temel kaynağı alil izotiyosiyanattır. Kökleri özellikle üriner sistem enfeksiyonlarına, bronşit ve sinüzite iyi gelmektedir. İçerdiği bazı bileşenlerin ise antibakteriyel özellikte olduğu bilinmektedir ([http 11](http://11)).



Şekil 2.35. *Armoracia rusticana* L. ([http 11](http://11))

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneyler Sırasında Kullanılan Bakteriyel Suşlar, Bitki Örnekleri, Kimyasal Maddeler, Besiyerleri Ve Çözeltiler, Aletler Ve Cihazlar

3.1.1. Bakteriyel suşlar

Çalışma sırasında kullanılan toplam 36 klinik *P. aeruginosa* suşu, Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Tüm *P. aeruginosa* suşları, Luria-Bertani Broth (LBB) besiyerinde 37°C’de üretilmiş, -80°C’de ve %20 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir (Ausubel et al., 1988). Bu stok kültürler farklı testler için kullanılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan suşlar Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan suşlar

Suş Adı	Özellik	Kaynak
PAO1	PT5 orijinal tip	Dr. Thilo Köhler
PAO-JP2	<i>lasI rhII</i> AHL ⁻	Michael Givskov
QSI1	Rekombinant tip	Michael Givskov
PI-1	Yara sıvısı	SDÜ
PI-2	Kan kültürü	SDÜ
PI-3	Kan kültürü	SDÜ
PI-4	Balgam	SDÜ
PI-5	Kan kültürü	SDÜ
PI-6	İdrar kültürü	SDÜ
PI-7	Kan kültürü	SDÜ
PI-8	Periton mayii	SDÜ
PI-9	İdrar kültürü	SDÜ
PI-10	Kan kültürü	SDÜ
PI-11	Kan kültürü	SDÜ
PI-12	Balgam	SDÜ
PI-13	Kan kültürü	SDÜ
PI-14	Kan kültürü	SDÜ
PI-15	Kan kültürü	SDÜ
PI-16	Balgam	SDÜ
PI-17	Kan kültürü	SDÜ
PI-18	İdrar kültürü	SDÜ
PI-19	İdrar kültürü	SDÜ
PI-20	Yara sıvısı	SDÜ
PI-21	Balgam	SDÜ

Çizelge 3.1. (devam)

PI-22	Balgam	SDÜ
PI-23	Derin trakeal aspirat	SDÜ
PI-24	Balgam	SDÜ
PI-25	Balgam	SDÜ
PI-26	Balgam	SDÜ
PI-27	Balgam	SDÜ
PI-28	Balgam	SDÜ
PI-29	Bronkoalveoler lavaj	SDÜ
PI-30	Balgam	SDÜ
PI-31	Derin trakeal aspirat	SDÜ
PI-32	Bronkoalveoler lavaj	SDÜ
PI-33	Derin trakeal aspirat	SDÜ
PI-34	Balgam	SDÜ
PI-35	Balgam	SDÜ
PI-36	Balgam	SDÜ

3.1.2. Bitki örnekleri

Tez çalışmamızda quorum sensing engelleyici özelliği araştırılacak bitkilerden siyah hardal tohumu, vişne yaprağı, civanperçemi Isparta'dan, iren kökü ile iren kök içi Trakya Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Tunay Durgun'dan, tırşik pancarı ise Osmaniye'den temin edilmiştir. 15 adet uçucu bitki yağı (sarı kantaron yağı, ardıç yağı, limon yağı, melisa yağı, mersin yağı, adaçayı yağı, biberiye yağı, defne yağı, zambak yağı, ylang ylang yağı, aspir yağı, karabaş yağı, nane yağı, anason yağı, okaliptüs yağı) ise aktardan hazır olarak satın alınmıştır.

3.1.3. Kimyasal maddeler

1. Elastin Kongo kırmızısı (Elastin-Congo Red, ECR) (Sigma)
2. Gliserol (Sigma)
3. Etil asetat (Riedel de Haen)
4. Kloroform (Merck)
5. Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
6. Metanol (Merck)
7. Glikoz (Sigma)

8. Agar (Merck)
9. Etil alkol (Riedel de Haen)
10. Tris (Merck)
11. 5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid (X-Gal) (Sigma)
12. Mueller-Hinton Agar (MHA) (BD)
13. Mueller-Hinton Broth (MHB) (BD)
14. İsopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) (Sigma)
15. Nutrient broth (NB) (BD)
16. 3-Oxo-C₆-HSL (OHHL) (Fluka)
17. Magnezyum klorür (MgCl₂.6H₂O) (Sigma)
18. Kalsiyum klorür (CaCl₂.2H₂O) (Fluka)
19. Ferrik klorür (FeCl₃.6H₂O) (Merck)
20. Bacto agar (Acumedia)
21. Kazoaminoasit (Fluka)
22. Tiamin (Sigma)
23. Ampisilin (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A. Ş.)
24. Patulin (Sigma)
25. 200 bp DNA ladder (Fermentas)
26. Yağsız süt tozu (Fluka)
27. Etidyum bromür (Sigma)
28. PCR master mix (2X) (Fermentas)
29. Trans-anetol (Sigma)
30. 3-metil-alfa iyonon (Sigma)
31. Luria Bertani agar (LB) (BD)
32. Luria Bertani broth (LBB) (BD)
33. Netilmisin (Oxoid; 30 µg)
34. Gentamisin (Oxoid; 10 µg)
35. Pepton (Merck)
36. Borik asit (Sigma)
37. Kristal viyole (Sigma)

3.1.4. Besiyerleri ve çözeltiler

Deneyisel çalışmalar sırasında kullanılan besiyerleri ve çözeltiler Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Deneyisel çalışmalar sırasında kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Besiyeri ve Çözeltiler	gram/Litre
Luria Bertani Broth (LBB)	10 g Tripton 5 g Maya özütü 5 g NaCl
Luria Bertani Agar (LB)	10 g Tripton 5 g Yeast Ekstrakt 5 g NaCl 15 g Agar
Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) (10X)	108 g Tris 55 g Borik Asit 9,3 g EDTA
Elastin Kongo Red (ECR) tamponu	100 mM Tris 1 mM CaCl ₂ , pH 7,5 20 mg Elastin Kongo Red
Kayma Testi için Agar	8 g Nutrient Broth 5 g Agar 5 g Glikoz
Proteaz Testi için Agar	LB Agar %2 Yağsız Süt Tozu
Piyosiyenin Broth (PB)	20 g Pepton 1,4 g MgCl ₂ 10 g K ₂ SO ₄

Çizelge 3.2. (devam)

B-Agar	1 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ 0,01mM FeCl ₃ %2 Bacto-agar
10XA	20 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 60 g Na ₂ HPO ₄ 30 g KH ₂ PO ₄ 30 g NaCl
BT besiyeri	1 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ 0,01 mM FeCl ₃ %10 10XA %0,025 Tiamin %0,5 Glikoz %0,5 Kazoaminoasit

3.1.5. Aletler ve cihazlar

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) cihazı

Çalışma sırasında, klinik izolatların çevreyi algılama sistemi genleri (*rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR*) Techne Genius marka PCR cihazı kullanılarak çoğaltılmıştır.

Etüv

Besiyerlerine ekilen suşlar, Selecta Marka etüvde ve Gallenkamp Marka yatay çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.

UV spektrofotometre

Yapılacak analizler sırasında sıvı bakteri kültürlerin optik yoğunlukları Shimadzu 1610 Marka UV/VIS Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Yatay elektroforez sistemi

PCR analizi gerçekleştirilen genlerle, Biolab Minicell Primo EC 320 Electrophoretic Gel System ve Biolab Power PAC 300 Marka güç kaynağı kullanılarak agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Jel görüntüleme sistemi

Jel elektroforezi uygulanan örnekler Biolab UV Tech Marka jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

Otoklav

Analizler sırasında tüm sterilizasyon işlemleri Selecta marka otoklav kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Derin dondurucu

Analiz için kullanılan suşlar uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80°C'de Heto Marka derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Döner buharlaştırıcı (evaporatör)

Analiz için kullanılan özütlerdeki çözücü, Heidolph Laborota 4001 marka evaporatör kullanılarak uçurulmuştur.

Hassas tartım cihazı

Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için MetterToledo PB303-S Marka hassas terazi kullanılmıştır.

Mini santrifüj

Analizler sırasında tüm santrifüj işlemleri, Minispinplus Eppendorf marka santrifüj kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Rondo

Kurutulmuş bitki numuneleri Tefal marka rondoda öğütölüp toz haline getirilmiştir.

Saf su cihazı

Analizlerde, Milipore Progard 2 marka saf su cihazı kullanılmıştır.

Steril kabin

Çalışmalar, Telstar CV-100 marka steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

Buzdolabı

Luria Bertani agar içeren besiyerlerine ekimleri yapılan bakteriler, Beko marka buzdolabında günlük kullanım amacıyla saklanmıştır.

Buz makinesi

PCR karışımları, Scotsman AF 100 marka buz makinesinden elde edilen buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

pH metre

Analiz için kullanılan tampon çözeltilerin pH'ı, Metler Toledo MA235 marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının üretim ve depolanması

Araştırmada kullanılan *P. aeruginosa* suşları, uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80°C'de derin dondurucuda (Heto) muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için -80°C'den alınıp -20°C'de bekletildikten sonra Luria Bertani (LB) agar içeren besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan bakteriler çoğaltılma amacıyla 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra +4°C'de günlük kullanım amacıyla saklanmıştır.

3.2.2. Besiyerlerinin ve çözeltilerin hazırlanması

Besiyerleri ve kullanılan tüm çözeltiler Millipore saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Luria Bertani Broth (LBB) sıvı besiyerleri cam kapaklı tüplere 5'er ml hazırlanarak, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır. LB agar besiyerleri ise her çalışma öncesinde steril petrilere ve her bir petriye yaklaşık 25 ml besiyeri olacak şekilde dökülmüş, oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

3.2.3. Bitkisel özütlerinin hazırlanması

Yaş olarak temin edilen iren bitkisinin kökü, iren bitkisinin kök içi, vişne yaprağı ve pancar yaprakları saf su ile iyice yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kontrollü olarak kurutulmuştur. Kurutulan bu bitkilerle kurutulmuş olarak temin ettiğimiz siyah hardal tohumu ve civanperçemi rondoda öğütülüp toz haline getirildikten sonra her bir çözücü için 10'ar gram tartılıp 100'er ml kloroform, etil alkol ve etil asetat çözücüleri kullanılarak çoklu karıştırıcıda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra özütler kaba filtre kâğıdından süzülerek döner buharlaştırıcıda çözücülerini tamamen uçurulmuştur. Hazırlanan özütler (iren kökü kloroform, iren kökü etil alkol, iren kökü etil asetat, iren kök içi kloroform, iren kök içi etil alkol, iren kök içi etil asetat, hardal kloroform, hardal etil alkol, hardal etil asetat, vişne kloroform, vişne etil asetat, civanperçemi kloroform, civanperçemi etil alkol, civanperçemi etil asetat, pancar kloroform, pancar etil alkol ve pancar etil asetat) 10 ml etil alkole alınıp steril 0.45 µm filtre kullanılarak sterilize edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.4. *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR* genlerinin koloni PCR ile analizi

Klinik *P. aeruginosa* bakteri örneklerinde *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR* genlerini tespit etmek için koloni PCR yöntemi uygulanmış ve PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu amaçla bakteri örneklerine ait 1 gecelik agar kültürden 2-3 koloni steril kürdan ile alınmış ve 1,5 ml’lik steril eppendorf tüpü içerisinde 50 µl steril saf su ilave edilerek kolonilerin saf su ile çözünmesi sağlanmıştır. Eppendorf tüp kapakları parafilmle kapatılarak hücrelerin parçalanma işlemi için kaynamakta olan suda 10 dakika bekletilmiştir. Oda sıcaklığında soğuması için bekletilmiş ve tüpler soğuyunca 14000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantın 3 µl’si PCR için kullanılmıştır.

Bu çalışma için suşlarda PCR ile yaklaşık 625, 605, 725 ve 730 bp’lik sırasıyla *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR* gen bölgelerinin varlığı araştırılmıştır. Bunun için araştırılacak gen bölgesine uygun dört çift primer kullanılmıştır (Schaber et al., 2004). Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonları için kullanılan primerlerin nükleotit dizilimleri Çizelge 3.3.’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *rhlI*, *lasI*, *lasR* ve *rhlR* gen bölgelerinin PCR analizi için kullanılan primerler ve oluşacak ürün büyüklükleri

Gen adı	İleri primer	Geri primer	Ürün (bp)
<i>lasI</i>	5'-ATGATCGTACAAATTGGTCGGC-3'	5'-GTCATGAAACCGCCAGTCG-3'	605
<i>lasR</i>	5'-ATGGCCTTGTTGACGGTT-3'	5'-GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA-3'	725
<i>rhlI</i>	5'-CTTGGTCATGATCGAATTGCTC-3'	5'-ACGGCTGACGACCTCACAC-3'	625
<i>rhlR</i>	5'-CAATGAGGAATGACGGAGGC-3'	5'-GCTTCAGATGAGGCCCAGC-3'	730

PCR reaksiyonları, reaksiyon hacmi toplam 25 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı

2X PCR karışımı	12,5 µl
Bakteriyel DNA	3 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
Steril ultra saf su	7,5 µl
Toplam hacim	25 µl

2X PCR karışımı içinde, reaksiyon tamponuna ilaveten 0,05 U/µl Taq DNA polimeraz enzimi, dNTP karışımı (0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM dGTP ve 0,4 mM dTTP), 4 mM MgCl₂ bulunduğu için ön denatürasyon basamağı atlanmıştır.

30 döngü; 95°C 45 saniye, 55°C 45 saniye, 72°C 60 saniye şeklinde gerçekleştirilmiştir. 30 döngünün sonunda 1 döngü 72°C 5 dakika şeklinde gerçekleştirilip PCR işlemi tamamlanmıştır.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin tespiti

Çalışmamızda PCR sonucunda oluşması beklenen *rhII*, *lasI*, *lasR* ve *rhIR* genlerine ait sırasıyla yaklaşık 625, 605, 725 ve 730 bp'lik gen parçalarının varlığı agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Bu amaçla %1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,5 g agaroz tartılarak 50 ml 1×TBE içerisinde mikrodalga fırında kaynatılarak çözölmüştür. Katılaşmayacak kadar soğutulan agaroz çözeltisi tarak ihtiva eden jel tablasına dökülerek jelin polimerleşmesi için beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra, tarak çıkarılarak içerisinde 250 ml 1×TBE tamponu bulunan elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. 10 µl PCR ürünü, 2 µl jel yükleme tamponu (6X) karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. PCR ürününün büyüklüğünü belirlemek için jelin ortasındaki kuyucuğa 200 bp'lik DNA markır (Fermentas) yüklenmiştir. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlanmış ve jel 1 saat süre ile 100 Volt akım uygulanarak yürütölmüştür.

Agaroz jeldeki PCR ürününü görünür hale getirmek için etidyum bromür (0,1 µg/ml) kullanılmıştır. PCR ürünleri, jel görüntöleme sisteminde incelenmiş ve görüntü alınarak kaydedilmiştir. Test sırasında negatif kontrol olarak LB kullanılmıştır. Sonuçlar PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değeriendirilmiştir.

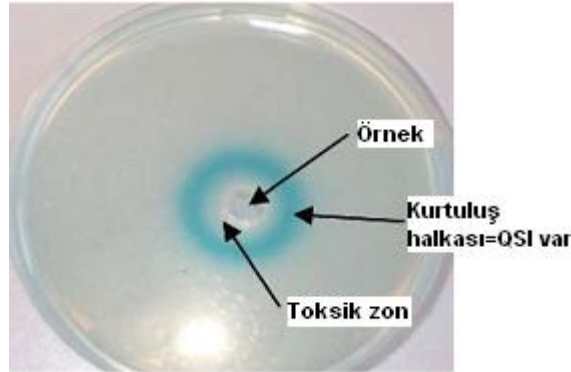
3.2.6. Quorum Sensing İnhibitörlerinin (QSIs) *in vitro* tanımlanması

Quorum sensing inhibitörlerini seçen sistemler (QSISs), sinyal molekölü varlığında ölen fakat dışarıdan ilave edilen QSIs varlığında ise büyümesine olanak veren rekombinant bir bakteriden (QSI1) temel alır (Şekil 3.1.). Bu bakteri *Escherichia coli* 1100'ün laktoz pozitif suşu içine *V. fischeri*'nin *luxRI* QS sistemini içeren pTBR2iB plazmidinin elektroporasyon yöntemiyle klonlanmasıyla oluşturulmuştur (pTBR2iB). *luxI* promotorunun kontrolü altında olan fosfolipaz A proteinini kodlayan gen (*phIA*) ifade edilirse hücre ölümüne yol açmaktadır. Eğer ortamda toksik olmayan bir QS inhibitörü mevcut ise *phIA* ifade edilemeyecek bu da normal hücre büyümesine yol açmaktadır (Rasmussen et al., 2005a).



Şekil 3.1. Quorum sensing inhibitörlerini seçen rekombinant suş (QSI1)
(Rasmussen et al., 2005a)

Yöntemin temelinde QSI1 suşu, hücre ölümüne yol açan geni aktive eden sinyal molekülü ile X-Gal içeren özel minimal besiyeri ortamına ilave edilir. Test edilecek örnekler ve pozitif kontrol ise agar üzerinde açılan kuyucuklara yüklenir. Örnekler kuyucuktan agara diffüze olur. Kuyucuğun etrafında toksik bir zon ve onun etrafında şekilenen mavi halka ile bakteriyel büyümenin gözlenmesi o kuyucuğa yüklenen bileşenin bir QSI olduğunu gösterir. Çünkü QSI varlığında, *luxI* promotorunun kontrolü altında olan fosfolipaz A proteinini kodlayan gen (*phlA*) ifade edilemeyecek bu da bakterinin büyümesine ve ortamda bulunan X-gal'i hidrolize etmesine neden olmaktadır (Şekil 3.2.) (Bjarnsholt et al., 2010).



Şekil 3.2. QSI1 yöntemi (Bjarnsholt et al., 2010)

Sonuçları karşılaştırabilmek ve QSI1 yönteminin çalıştığından emin olabilmek için bilinen bir QSI'ü pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, Quorum sensing inhibitörü olduğu önceden yayınlanmış ve ticari olarak satılan 1mM patulin veya 4-NPO kullanılabilir (Rasmussen et al., 2005a, b).

QSIs kimyasal olarak sentezlenmiş olabilir. Ancak ekstraksiyon işlemi uygulanacaksa seçilecek ekstraksiyon ve saflaştırma metodu başlangıç materyalinin doğasına ve fiziksel-kimyasal özelliklerine bağlı olarak seçilmektedir. Ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan çözücü, seçici rekombinat bakteri suşunun büyümesini

etkilediğinden QSI1 yöntemi kullanılmadan önce tamamen uçurulmuştur (Bjarnsholt et al., 2010).

QS sistemini inhibe eden bitkileri belirlemek için seçici bakteri suşu (QSI1) 10 ml BT besiyeri (0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01 mM FeCl₃, %10 10XA, %0,025 tiamin, %0,5 glikoz, %0,5 kazoaminoasit) içeren steril cam kapaklı şişeye ekilip 30°C sıcaklıkta 120 rpm’de çalkalayıcıda 14-16 saat inkübe edilmiştir.

B-agar besiyeri (0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,01 mM FeCl₃, %2 bacto-agar) hazırlanıp otoklavlandıktan sonra yaklaşık 45°C sıcaklığa ulaşınca kadar su banyosunda bekletilmiştir. Ardından besiyerine 10XA (100 mg/ml), tiamin (25 µg/ml), ampicilin (100 µg/ml), X-gal (40 µg/ml), IPTG (100 µM), %5 glikoz, %5 kazoaminoasit ve 3-oxo-C6-HSL (100 nM) ilave edilip yavaşça çalkalanmıştır. Karışım yaklaşık 43°C sıcaklığa ulaştığında 1 ml bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir. Tekrar yavaşça çalkalanıp petrilere yaklaşık 25 ml dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra pastör pipeti ile kuyucuk açılıp 50 µl bitki özütü kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra petrilere oda sıcaklığında 1 saat bekletilip 30°C sıcaklıktaki etüvde bir gece inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak QS inhibitörü olduğu bilinen 1 nM patulin kullanılmıştır (Rasmussen et al., 2005a).

3.2.7. Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS)

QSI1 yöntemiyle potansiyel QS inhibitörü oldukları belirlenen bitkisel uçucu yağların Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) analizinde, Shimadzu QP 5050 (Kyoto, Japan) marka GC/MS cihazı kullanılmıştır. 100 µl’lik kısım 1000 µl hekzanda çözülerek ve GC/MS sisteminde analiz için verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 1 µl olup anason ve ylang ylang uçucu yağların GC-MS sonuçlarının alındığı deney koşulları Çizelge 3.5.’deki gibidir.

Çizelge 3.5. GC-MS sonuçlarının alındığı deneysel koşullar

Enjeksiyon buloğu	240°C
Dedektör	250°C
Akış hızı (psi)	10
Dedektör	70 eV
İyonlaştırma türü	EI
Kullanılan gaz	Helyum
Kullanılan kolon	Cp WAX 52 CB kapiller kolon (50 m x 0,32 mm ID, df:1,2 µm) (Varian)
Sıcaklık programı	60°C'den 220°C'ye dakikada 2°C'lik artışla ulaşıyor. 220°C'de 20 dakika bekliyor.
Kullanılan kütüphaneler	Wiley, Nist, Tutor

3.2.8. Disk difüzyon yöntemi

Bitki özütlerinin *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyal aktivitesi disk difüzyon metodu kullanılarak test edilmiştir.

Disk difüzyon metodu için boş antibiyotik disklerine hazırlamış olduğumuz bitki özütlerinden (1 g/ml) ve QSI1 yöntemiyle çevreyi algılama sistemini inhibe ettikleri belirlenen uçucu yağlardan 20 µl emdirilmiş ve steril kabinde kurumaya bırakılmıştır. Diskler kuruduktan sonra Mc Farland 0,5 bulanıklığında hazırlanan 100 µl bakteri süspansiyonu, Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri bulunan petrilere yayılıp steril kabinde kurutulmuş ve özüt emdirilmiş diskler besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir. Petriler ters çevrilerek 35°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bakteri suşu için inhibisyon zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüştür. 20 µl etil alkol emdirilmiş disk negatif kontrol, netilmisin (Oxoid; 30 µg) ve gentamisin (Oxoid; 10 µg) standart diskleri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Test sonuçları, suşlar için hassas, dirençli ve orta derecede duyarlı olarak CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)'in kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2005).

3.2.9. Kayma testi

Test edilecek klinik *P. aeruginosa* suşları bir gece LBB besiyerinde çalkalamalı inkübatörde 37°C’de üretilmiştir. Her bir kültürden 1 ml steril endorf tüpüne alınıp 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 8 g nutrient broth l⁻¹, 5 g bakto agar l⁻¹ ve %0,5 glikoz içeren kayma testinin yapıldığı besiyeri otoklavdan çıkıp el yakmayacak sıcaklığa (~50°C) ulaştığında 1:1:3 oranında örnek: etil alkol: steril saf su karışımının 100 µl’si 20 ml kayma besiyeri ile karıştırılıp petrilere dökülerek oda sıcaklığında katılaşması için 10-15 dakika bekletilmiştir. Her bir petrinin ortasına bakteri supernatantından 5 µl ilave edilip steril kabinde kuruması için 10-15 dakika bekletilip 37°C’de 16-18 saat inkübe edilmiştir (Rashid and Kornberg, 2000). Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında negatif kontrol olarak *lasI-rhlI* genleri bakımından mutant olan PAO-JP2 suşu kullanılmıştır. Sonuçlar sadece besiyeri içeren PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kayma testi, 3 defa tekrarlanarak alınan sonuçların ortalama alınmıştır.

3.2.10. Elastaz testi

Klinik *P. aeruginosa* suşlarının elastaz aktivitelerini tespit etmek amacıyla Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman et al., 1980). *P. aeruginosa* suşları LBB besiyerinde çalkalamalı inkübatörde 37°C’de 14 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin optik yoğunluğu (OD) 600 nm’de okunup 5 ml LBB besiyerine 0,05 OD olacak şekilde bakteri kültüründen ve 1:1 oranında etil alkolle seyreltilmiş örnekten 10 µl ilave edilip 37°C’de 18 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Her bir kültürden 1 ml endorf tüpüne alınıp 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu kültürlerin supernatantlarından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7.5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 37°C’de 3 saat çalkalayarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve supernatantın 495 nm’de OD’si okunarak kayıt edilmiştir. Bakteri supernatani yerine 100 µl LBB konularak hazırlanan tüpler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar örnek içermeyen PAO1 suşuyla

karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Elastaz testi, örneklerde 3 defa tekrarlanarak alınan sonuçların ortalaması değerlendirilmiştir.

3.2.11. Proteaz testi

Proteaz testi için, test edilecek klinik *P. aeruginosa* suşları bir gece LBB besiyerinde 37°C'de çalkalamalı inkübatörde üretilmiştir. Bu kültürlerin 600 nm'de OD değeri belirlendikten sonra 5 ml LBB besiyerine 0,05 OD olacak şekilde bakteri kültüründen ve 1:1 oranında etil alkolle seyreltilmiş örnekten 10 µl ilave edilip 37°C'de 18 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Her bir kültürden 1 ml ependorf tüpüne alınıp 4500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Kültür supernatantları 0,2 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir. Filtre edilmiş her bir kültürden %2 yağsız süt tozu içeren LB agar petrilerinin ortalarına açılan kuyucuklara 50'şer µl ilave edilip 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır (Dong et al., 2005). Suşların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen kuyucukların çevresindeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, örnek içermeyen PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Proteaz testi, örneklerde 3 defa tekrarlanarak alınan sonuçların ortalaması değerlendirilmiştir.

3.2.12. Piyosiyanın testi

Test edilecek bakteri suşları LBB besiyerinde 37°C'de 16-18 saat üretilmiştir. 5 ml piyosiyanın broth (PB) besiyerine, 1:1 oranında etil alkolle seyreltilmiş örnekten 10 µl ve 600 nm'de OD 0,05 olacak şekilde ayarlanan bakteri kültürlerinden ilave edilip 37°C'de 16 saat çalkalanarak üretilmiştir. PB ortamında üretilen *P. aeruginosa* kültürünün 5 ml'si 3 ml kloroform ile ekstrakte edilmiş ve 2 ml organik faz temiz bir tüpe ayrılmıştır (Essar et al., 1990). Ayrılan faza, 1 ml 0,2 M HCl ilave edilerek piyosiyanın zengin organik faz ayrılmıştır. Ekstrakte edilen kısımdaki piyosiyanın miktarı 520 nm'de okunarak OD sonuçları kayıt edilmiştir. Test sırasında PAO-JP2 suşu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar PAO1

suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Piyosiyenin testi, örneklerde 3 defa tekrarlanarak alınan sonuçların ortalaması değerlendirilmiştir.

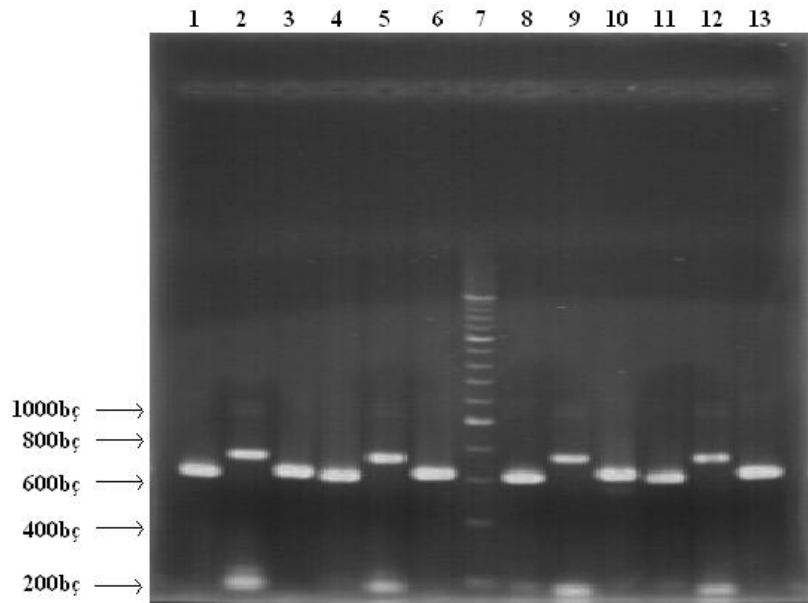
3.3. İstatistik

Örnek ilave edilmeyen (kontrol) suşlarla belirli konsantrasyonda örnek (trans-anetol, 3-metil-alfa iyonon) ilave edilen suşlara ait elastaz ve proteaz aktivitesi ile piyosiyenin üretimi ve kayma hareketi düzeyleri arasındaki karşılaştırma SPSS statistics 17.0 paket istatistik programında One Way ANOVA ile yapılmıştır. Ortalama değerlerin önem sıraları ve farklılıkları Duncan's Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Farklılıkların $p < 0,05$ seviyesinde önemli olduğu göz önüne alınmıştır.

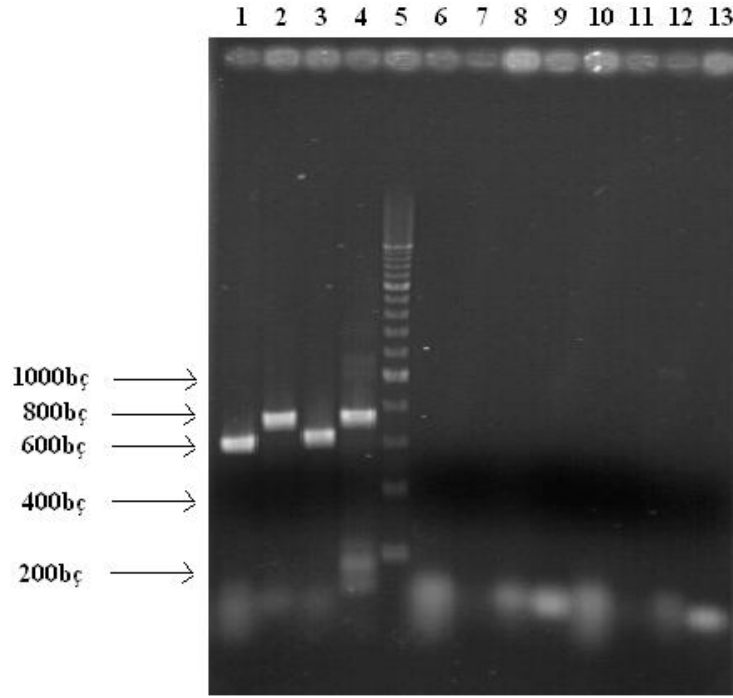
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Klinik İzolatların Çevreyi Algılama Sistemi Genlerinin Araştırılması

Çalışmalarımızda kullanılan klinik izolatların öncelikle çevreyi algılama sistemlerinin fonksiyonel olup olmadığını anlamak için, Materyal ve Metod bölümünde dizilimi verilmiş olan primerler kullanılarak *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* genleri koloni PCR yapılarak çoğaltılmış ve çoğaltılan ürünler %1'lik agaroz jelde ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra jel görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntülenmiştir. PAO1 suşu kontrol olarak kullanılmıştır. PCR analiziyle 32 klinik izolatın tamamında *lasI* (605bp), *lasR* (725bp), *rhlI* (625bp), *rhlR* (730bp) çevreyi algılama sistemi genlerinin mevcut olduğu görülmüştür. Diğer 4 izolatın ikisinde (PI-29, PI-32) çevreyi algılama sistemi genlerinin olmadığı, ikisinde ise (PI-22, PI-34) yalnızca *lasR* (725bp) geninin olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan klinik suşların bazılarına ait çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir.



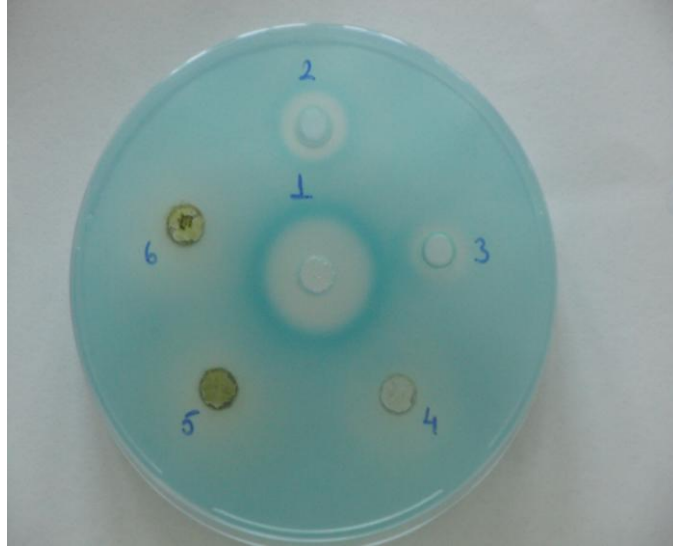
Şekil 4.1. Çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü 1: PAO1 *lasI*, 2: PAO1 *rhlR*, 3: PAO1 *rhlI*, 4: PI-35 *lasI*, 5: PI-35 *rhlR*, 6: PI-35 *rhlI*, 7: DNA Markır (200bç-6600bç), 8: PI-36 *lasI*, 9: PI-36 *rhlR*, 10: PI-36 *rhlI*, 11: PI-2 *lasI*, 12: PI-2 *rhlR*, 13: PI-2 *rhlI*



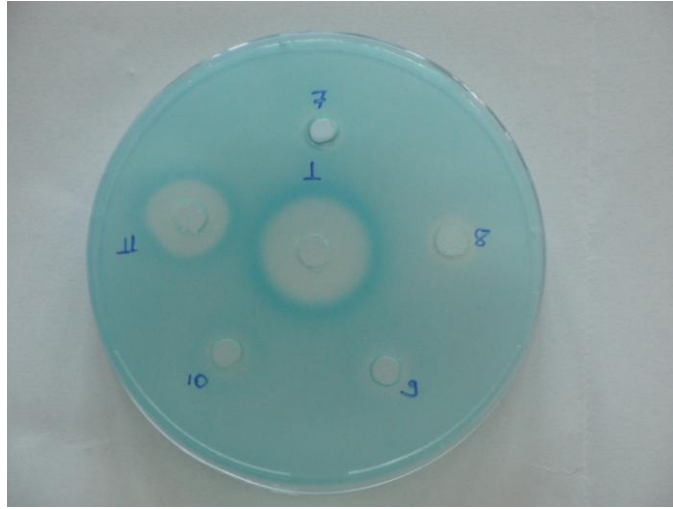
Şekil 4.2. Çevreyi algılama sistemi genlerinin agaroz jeldeki görüntüsü 1: PAO1 *lasI*, 2: PAO1 *lasR*, 3: PAO1 *rhlI*, 4: PAO1 *rhlR*, 5: DNA Markır (200bç-6600bç), 6: PI-29 *lasI*, 7: PI-29 *lasR*, 8: PI-29 *rhlI*, 9: PI-29 *rhlR*, 10: PI-32 *lasI*, 11: PI-32 *lasR*, 12: PI-32 *rhlI*, 13: PI-32 *rhlR*

4.2. Bitki Özütlerinin QGIS1 Yöntemi ile Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

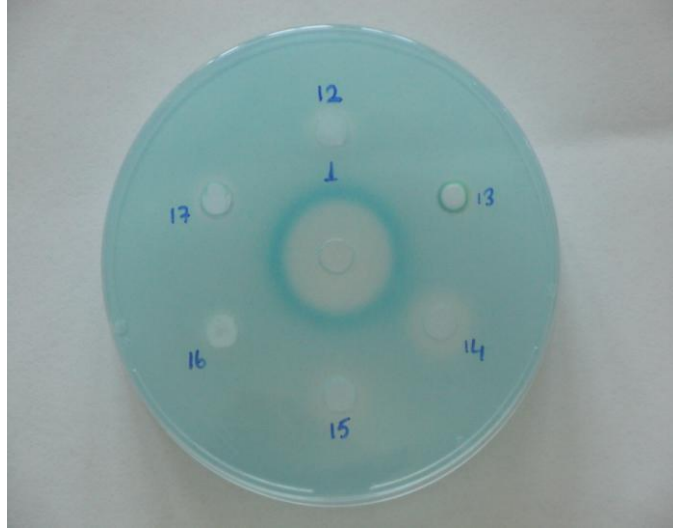
Çalışmalarımızda hazırlamış olduğumuz iren kökü, iren kök içi, vişne yaprağı, civanperçemi, siyah hardal tohumu ve tırşik pancarı bitkilerinin etil alkol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarının ve ticari olarak satın aldığımız sarı kantaron yağı, ardıç yağı, limon yağı, melisa yağı, mersin yağı, adaçayı yağı, biberiye yağı, defne yağı, zambak yağı, ylang ylang yağı, aspir yağı, karabaş yağı, nane yağı, anason yağı ve okaliptüs yağlarının çevreyi algılama sistemi üzerindeki potansiyel inhibitör etkileri QGIS1 yöntemi ile test edilmiştir. Anason ve ylang ylang uçucu yağlarının ve GS-MS analizi sonucunda bu yağların bileşiminde yüzdece en fazla bulunan trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin çevreyi algılama sistemi üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.3., 4.4., 4.5., 4.6.).



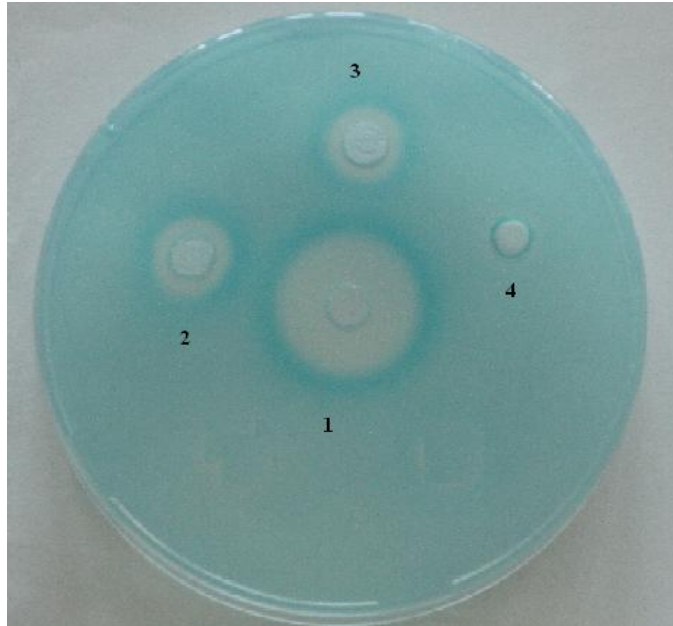
Şekil 4.3. Ylang ylang, civanperçemi, siyah hardal tohumu, vişne yaprağı ve tırşik pancarı için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü 1. Patulin 2. Ylang ylang yağı 3. Civanperçemi etil alkol ekstraktı 4. Hardal etil alkol ekstraktı 5. Vişne etil alkol ekstraktı 6. Pancar etil alkol ekstraktı



Şekil 4.4. Nane, biberiye, zambak, limon ve anason için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü 1. Patulin 7. Nane yağı 8. Biberiye yağı 9. Zambak yağı 10. Limon yağı 11. Anason yağı



Şekil 4.5. Aspir, okaliptus, adaçayı, melisa ve mersin için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü 1. Patulin 12. Etil alkol 13. Aspir yağı 14. Okaliptus yağı 15. Adaçayı yağı 16. Melissa yağı 17. Mersin yağı



Şekil 4.6. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon için QSI1 yöntemi test sonuçlarının ABT agar üzerindeki görüntüsü 1. Patulin 2. 3-metil alfa iyonon 3. trans-anetol 4. Etil alkol

4.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Bulguları

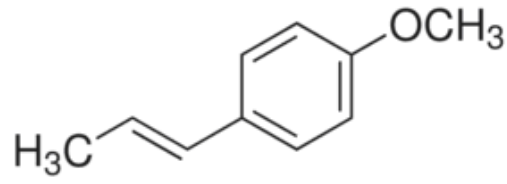
Anason ve ylang ylang uçucu yağlarının kütle spektrumlarıyla cihazda bulunan Wiley, Nist, Tutor kütüphanelerindeki kütle spektrumları karşılaştırılarak bu

yağların bileşenleri aydınlatılmıştır. Çizelge 4.1.'de bu iki bitkinin uçucu yağlarının bileşenleri yüzde olarak verilmiştir.

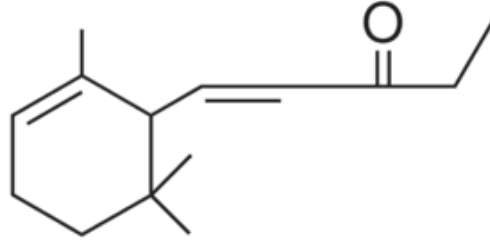
Çizelge 4.1. Anason ve ylang ylang uçucu yağlarının GC-MS analiz sonuçları

Uçucu yağ	Bileşenler	rt (dakika)	% Oran
Anason	Anetol	56,0	78,40
	Benzil alkol	58,4	21,50
Ylang ylang	Limonen	16,5	1,05
	o-metil Anisole	31,7	3,13
	Alfa-iyonen	57,3	25,76
	Asetik asit fenil metil ester	49,8	9,66
	Geranil asetat	51,0	0,80
	Linalol	37,9	18,54
	Trisiklo (4.2.1 [2,5]) dec-3-en-9-ol asetat	59,4	6,65
	Beta-iyonen	57,3	5,10
	Lilial	67,8	5,69
	Alfa-izometil iyonon	69,1	0,95
	Amil salisilikat	71,2	5,39
	2-propen-1-ol, 3-fenil asetat	73,3	4,15
	Hekzil salisilikat	76,6	13,88

GC-MS analizi sonucunda, anason ve ylang ylang yağlarında en yüksek düzeyde bulunan bileşenlerin (etken madde) sırasıyla trans-anetol ($C_{10}H_{12}O$, 148,2 g/mol) ve alfa iyonon ($C_{14}H_{22}O$, 206,331 g/mol) olduğu tespit edilmiştir. Bu etken maddeler saf olarak temin edilmiş bu iki molekülün çevreyi algılama sistemi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Şekil 4.7.'de bu bileşiklerin molekül formülleri görülmektedir.



trans-Anetol

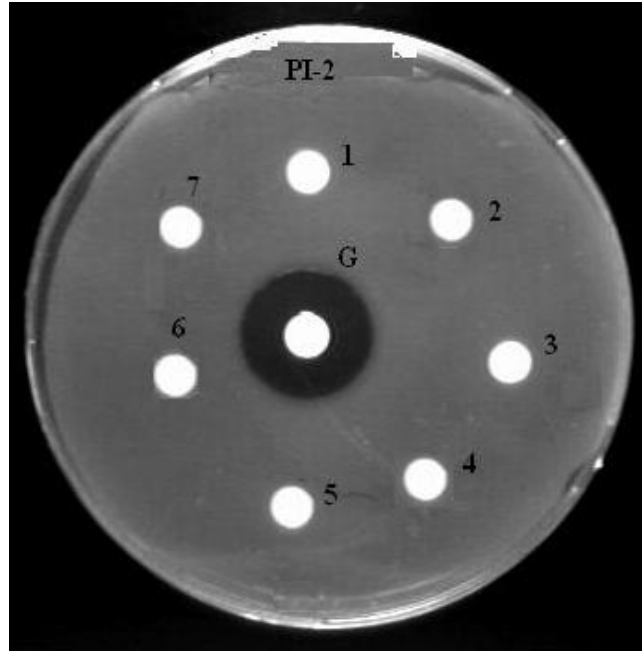


3-metil alfa iyonon

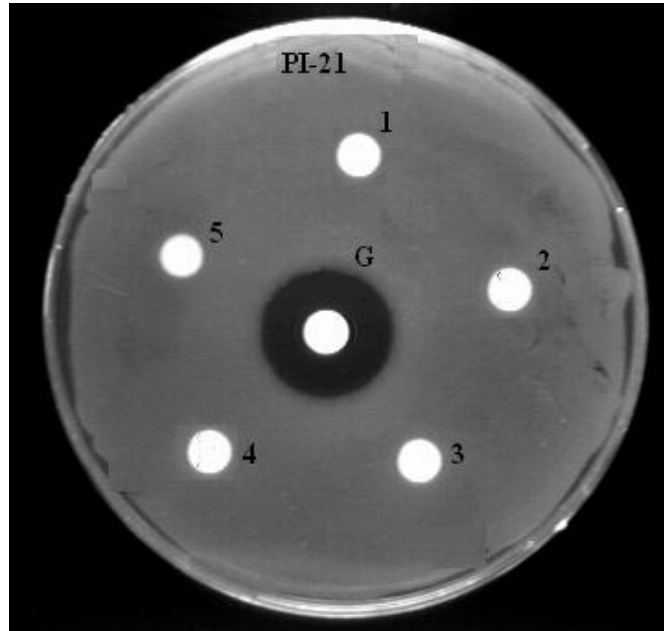
Şekil 4.7. trans-anetol ve 3-metil alfa iyononun kimyasal yapısı (Sigmaaldrich, 2011)

4.4. Disk Difüzyon Testi Bulguları

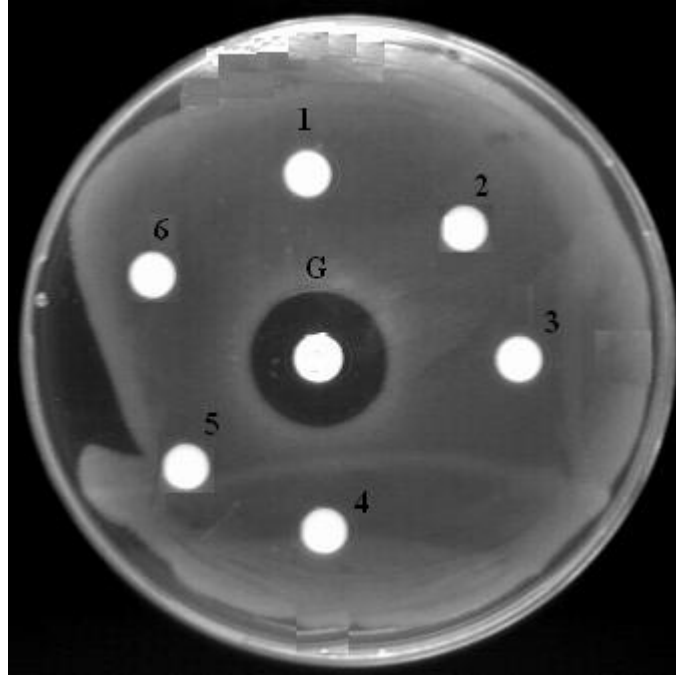
Ekstraksiyon yöntemiyle elde ettiğimiz bitki özütlerinin (iren kökü kloroform, iren kökü etil alkol, iren kökü etil asetat, iren kök içi kloroform, iren kök içi etil alkol, iren kök içi etil asetat, hardal kloroform, hardal etil alkol, hardal etil asetat, vişne kloroform, vişne etil asetat, civanperçemi kloroform, civanperçemi etil alkol, civanperçemi etil asetat, pancar kloroform, pancar etil alkol ve pancar etil asetat), çalışmalarımızda kullandığımız toplam 36 klinik *P. aeruginosa* suşu ve kontrol PAO1 suşu üzerinde antibakteriyel özelliklerinin olmadığı görülmüştür (Şekil 4.8.-4.10.).



Şekil 4.8. İren kökü, siyah hardal tohumu ve vişne yaprağı ekstraktlarının disk difüzyon testi ile klinik PI-2 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi G: gentamisin (zon çapı: 20mm), 1: iren kökü kloroform (zon yok), 2: iren kökü etil alkol (zon yok), 3: iren kökü etil asetat (zon yok), 4: hardal kloroform (zon yok), 5: hardal etil alkol (zon yok), 6: hardal etil asetat (zon yok), 7: vişne kloroform (zon yok)

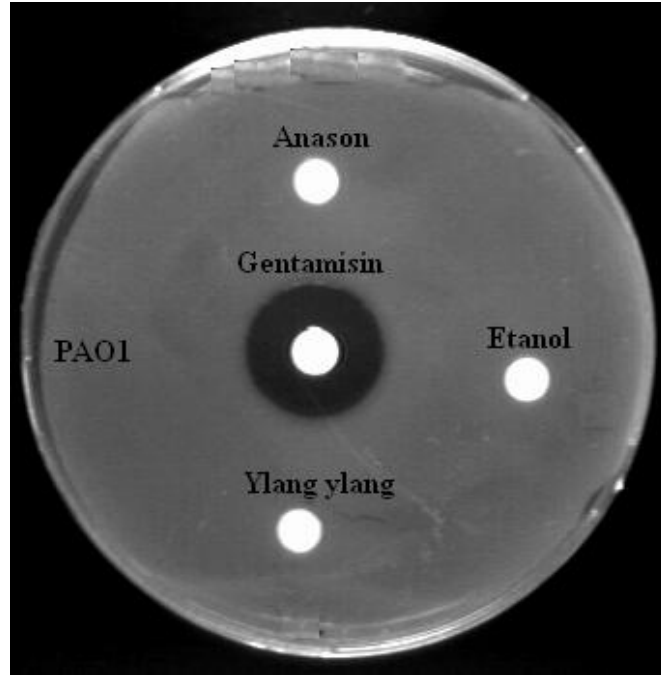


Şekil 4.9. Vişne yaprağı, civanperçemi ve iren kök içi ekstraktlarının disk difüzyon testi ile klinik PI-21 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi G: gentamisin (zon çapı: 20mm), 1: vişne etil asetat (zon yok), 2: civanperçemi kloroform (zon yok), 3: civanperçemi etil alkol (zon yok), 4: civanperçemi etil asetat (zon yok), 5: iren kök içi etil alkol (zon yok)

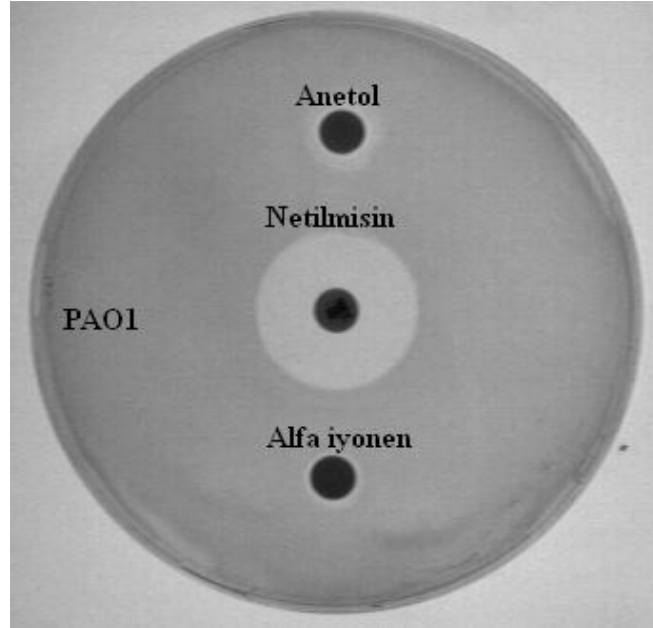


Şekil 4.10. Vişne yaprağı ve tırşik pancarı ekstraktlarının disk difüzyon testi ile kontrol PAO1 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi G: gentamisin (zon çapı: 20mm), 1: iren kök içi etil asetat (zon yok), 2: iren kök içi kloroform (zon yok) 3: pancar kloroform (zon yok), 4: pancar etil alkol (zon yok), 5: pancar etil asetat (zon yok), 6: etil alkol (zon yok)

Ayrıca, QSI1 yöntemiyle anti-quorum sensing özelliği tespit edilen anason ve ylang ylang bitkilerinden elde edilmiş uçucu yağların ve bu yağların etken maddeleri olan trans-anetol ve 3-metil-alfa iyonenin *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerindeki antibakteriyel özellikleri Disk Difüzyon Metodu kullanılarak test edilmiştir. Etil alkol emdirilmiş disk negatif kontrol, netilmisin ve gentamisin standart diskleri ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Anason ve ylang ylang yağları ile trans-anetol ve 3-metil-alfa iyonenin antibakteriyel etki göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.11., 4.12.).



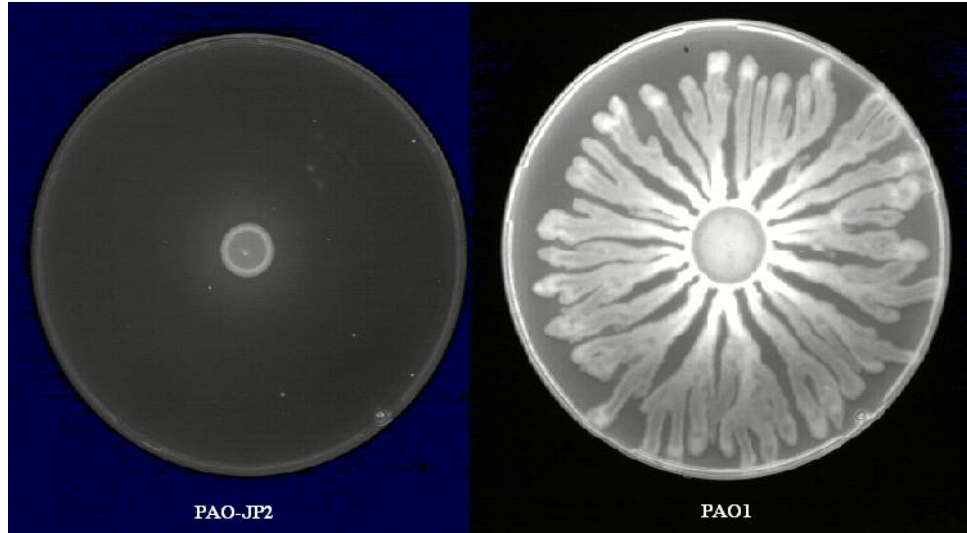
Şekil 4.11. Anason ve ylang ylang yağlarının PAO1 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi. Zon çapı; gentamisin: 20mm, anason ve ylang ylang yağı: Zon yok



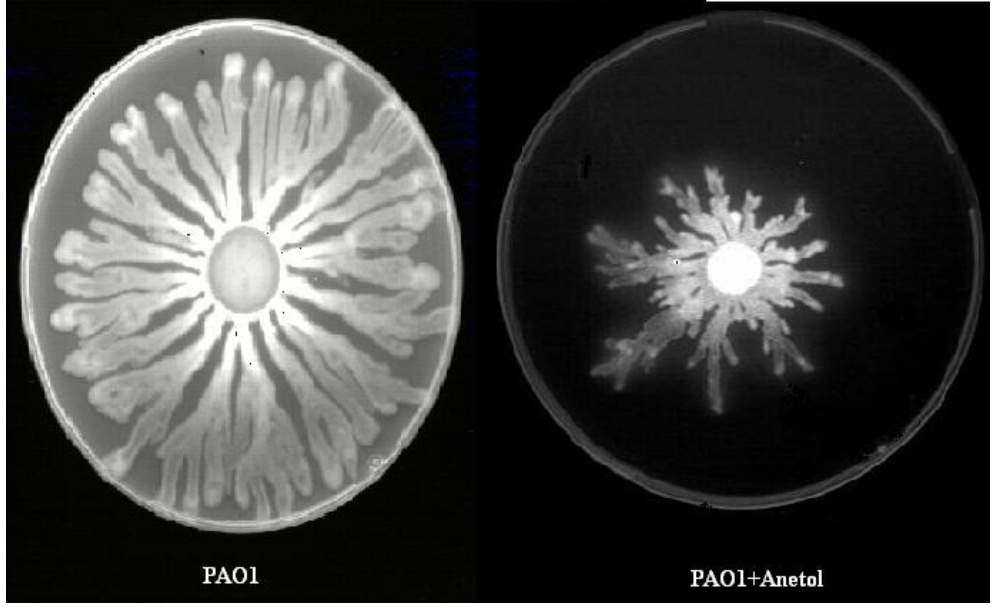
Şekil 4.12. trans-anetol ve 3-metil-alfa iyononun PAO1 suşu üzerindeki antibakteriyel aktivitesi. Zon çapı; netilmisin: 22mm, trans-anetol ve 3-metil-alfa iyonon: Zon yok

4.5. Kayma Testi Bulguları

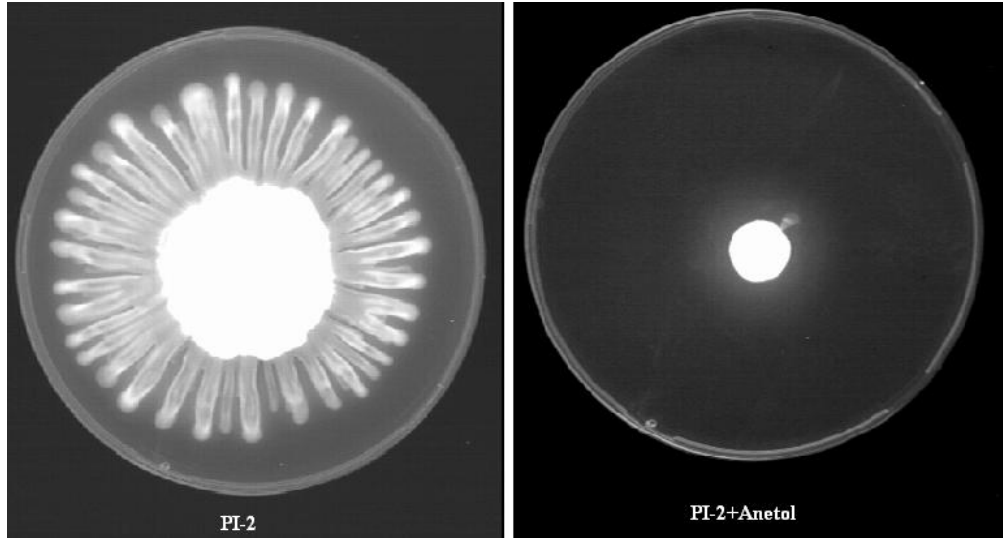
P. aeruginosa'da kayma hareketinin gerçekleştirilmesi, çevreyi algılama sisteminin tam fonksiyonel olmasıyla mümkündür. QSI1 yöntemiyle çevreyi algılama sistemi üzerinde potansiyel inhibitör adayları oldukları belirlenen anason ve ylang ylang yağlarının etken maddeleri olan trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin toplam 36 klinik *P. aeruginosa* suşunun kayma hareketleri üzerine etkisi incelenmiştir. PAO1 suşu kayma hareketinin değerlendirilmesinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *lasI* ve *rhlI* genleri mutant olan PAO-JP2 suşu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.13.). Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Şekil 4.14.-4.17.'de, trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin kontrol PAO1 ve klinik suşların kayma hareketleri üzerine etkisi petride görülmektedir.



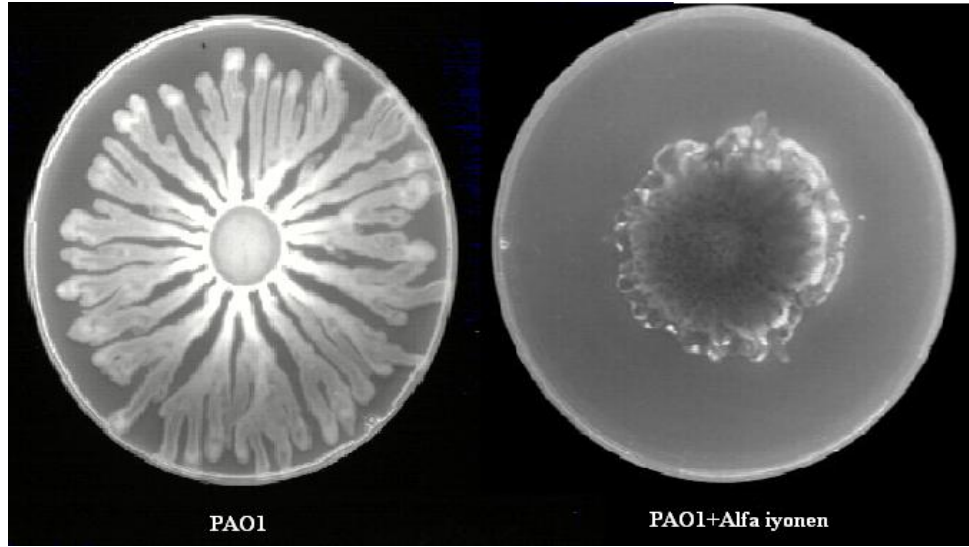
Şekil 4.13. Petride, PAO-JP2 suşu ile PAO1 suşunun kayma hareketi PAO-JP2: 12 mm, PAO1: 77,5 mm



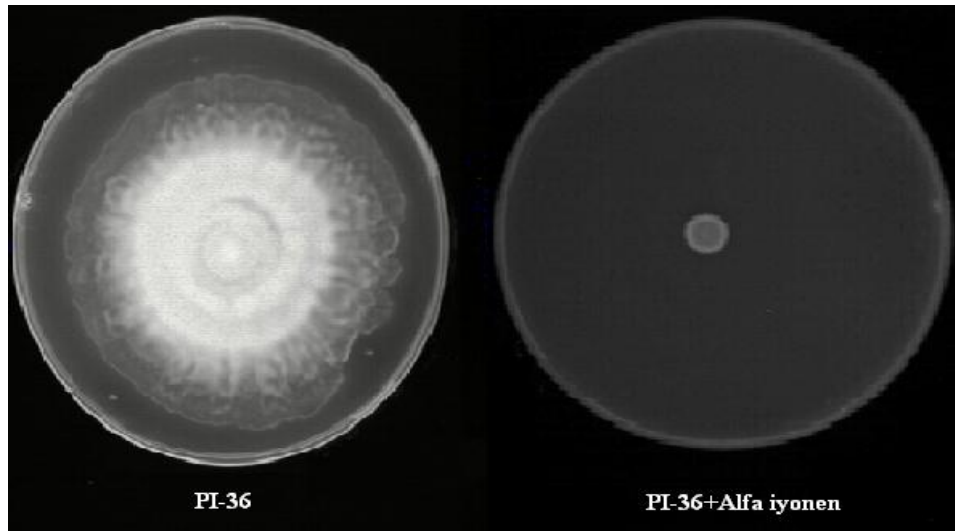
Şekil 4.14. Petride trans-anetolün kontrol PAO1 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi PAO1: 77,5 mm, PAO1+anetol: 25 mm



Şekil 4.15. Petride trans-anetolün PI-2 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi PI-2: 72,5 mm, PI-2+anetol: 11 mm

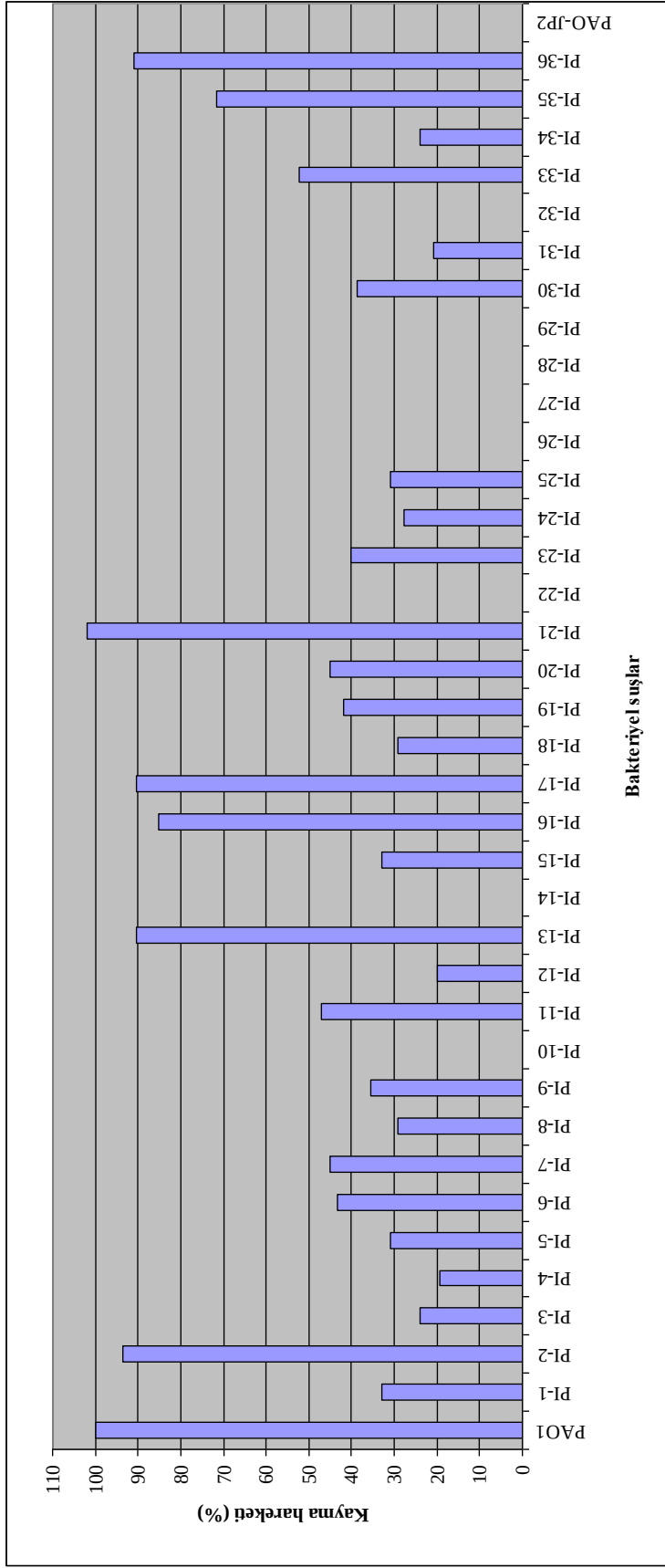


Şekil 4.16. Petride 3-metil alfa iyononun kontrol PAO1 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi PAO1: 77,5 mm, PAO1+alfa iyonon: 35 mm



Şekil 4.17. Petride 3-metil alfa iyononun PI-36 suşunun kayma hareketi üzerine etkisi PI-36: 70 mm, PI-36+alfa iyonon: 9 mm

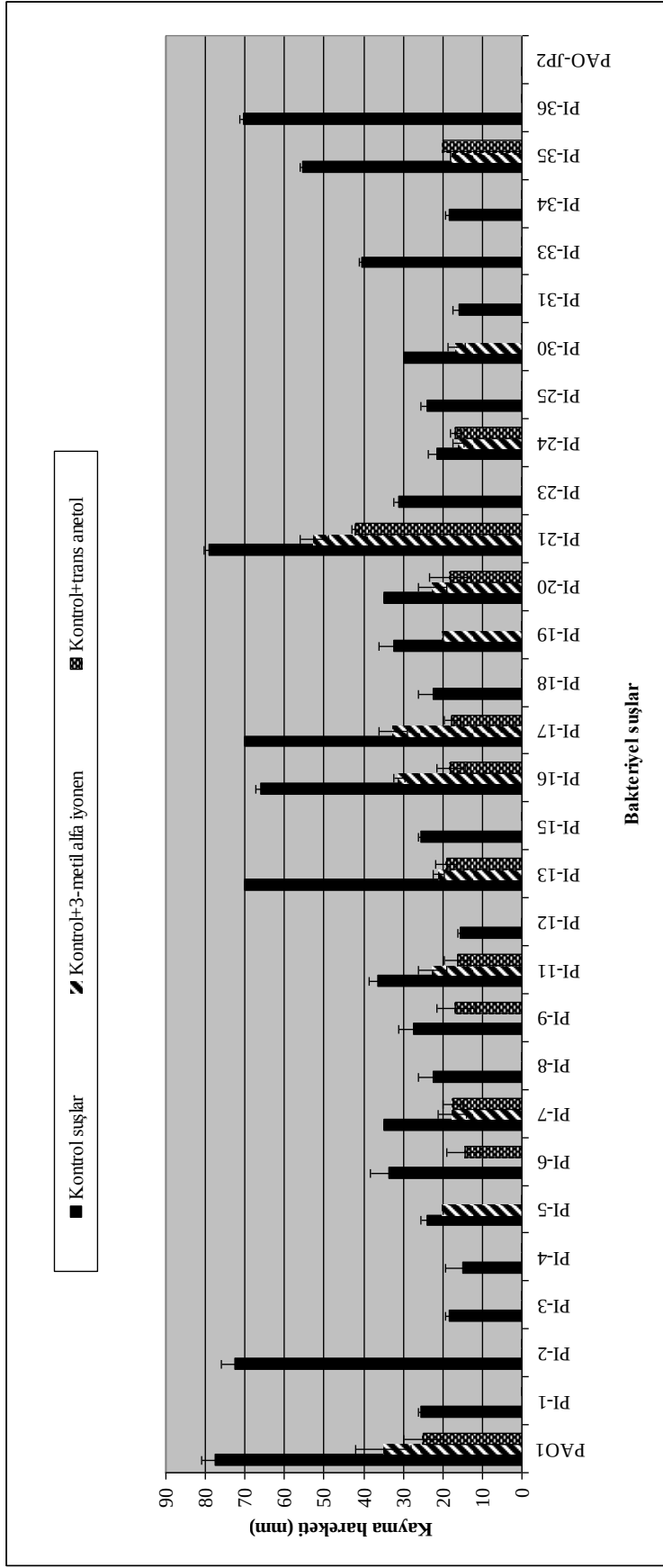
Test edilen klinik izolatların bir tanesinin (PI-21), PAO1 kontrol suşuna kıyasla yaklaşık %2 daha fazla kayma hareketinin olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra 6 izolatta (PI-2, PI-13, PI-16, PI-17, PI-35, PI-36) PAO1 suşuyla kıyaslanabilecek seviyede kayma hareketinin bulunduğu tespit edilmiştir. Test edilen klinik izolatların sekiz tanesinde (PI-10, PI-14, PI-22, PI-26, PI-27, PI-28, PI-29, PI-32) ise kayma hareketi gözlenmemiştir. Diğer suşlarda PAO1 suşuyla karşılaştırıldığı zaman kayma hareketi değerlerinin %19-52 arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.18.).



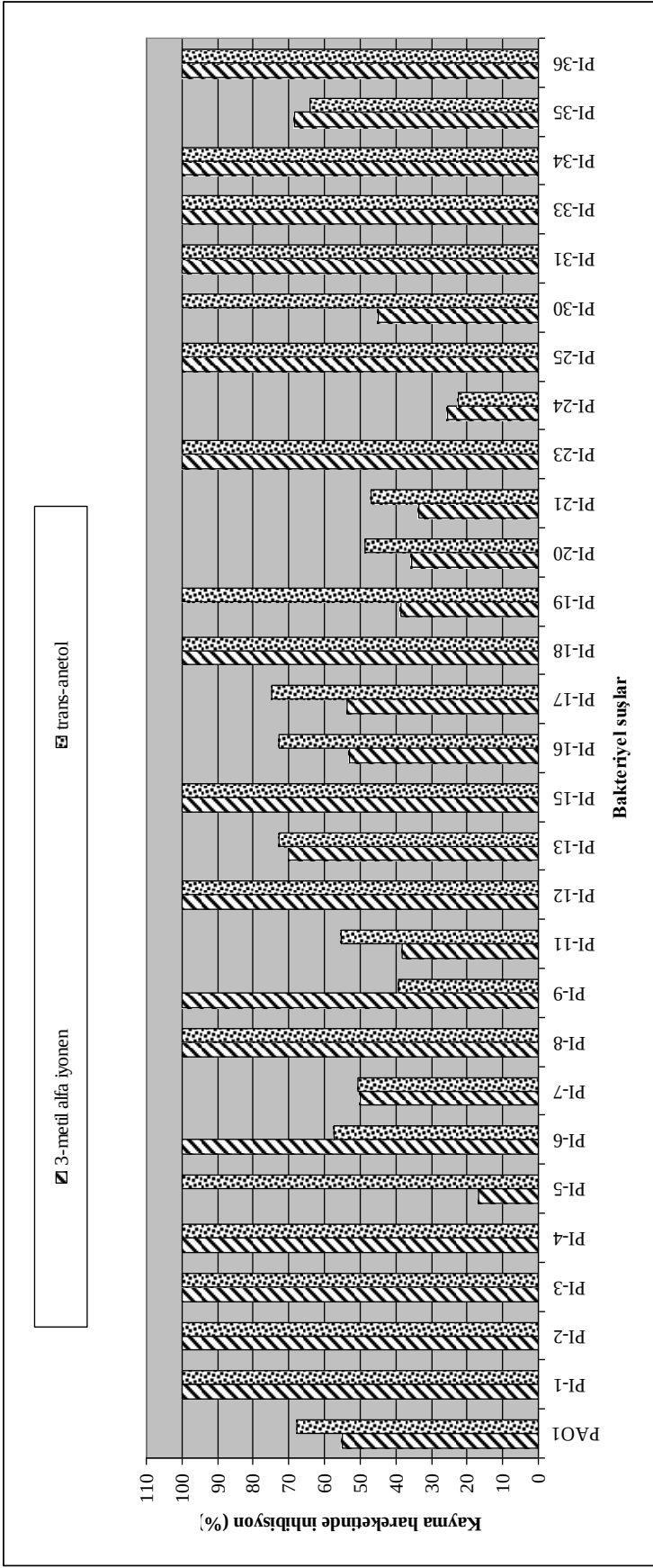
Şekil 4.18. Klinik *P. aeruginosa* suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre kayma hareketleri (%)

Şekil 4.19.'da trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik *P. aeruginosa* suşlarının kayma hareketleri üzerine olan etkisi grafik şeklinde gösterilmiştir. Hareket yeteneği olan PAO1 kontrol suşunun aktivitesi %100 kabul edilmiştir. Kayma yeteneği olmayan PAO-JP2 mutant suşu negatif kontrol olarak kullanılmış ve bu suşla yayılma çapı aynı olan klinik suşların kayma hareketinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Her bir suş için trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin kayma hareketi üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri tespit edilmiştir. 3-metil alfa iyonon, PAO1 kontrol suşu üzerinde %55 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %68 oranında inhibisyona neden olmuştur. Kayma testi için kullanılan besiyerine 6,67 mM ve %0,1 konsantrasyonda ilave edilen trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon, klinik izolatların on dört tanesinin (PI-1, PI-2, PI-3, PI-4, PI-8, PI-12, PI-15, PI-18, PI-23, PI-25, PI-31, PI-33, PI-34, PI-36) kayma hareketlerinde %100 inhibisyona neden olmuştur. Test edilen klinik izolatların 3 tanesinde (PI-5, PI-19, PI-30) trans-anetol %100 inhibisyona neden olurken 3-metil-alfa iyonon bu suşlarda sırasıyla %17, %38 ve %45 inhibisyona neden olmuş, iki tanesinde (PI-6, PI-9) yalnızca 3-metil-alfa iyonon %100 inhibisyona neden olurken trans-anetol bu suşlarda sırasıyla %57 ve %39 inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon, PI-7 izolatında %50 inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-11 izolatında %55 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %38 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-13 ve PI-16 izolatlarında %73 oranında inhibisyona neden olurken alfa iyonon bu izolatlarda sırasıyla %70 ve %53 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-17 izolatında %75 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %54 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-20 izolatında %49 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %36 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-21 izolatında %47 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %34 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-24 izolatında %23 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %26 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-35 izolatında %64 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %69 oranında inhibisyona neden olmuştur (Şekil 4.20.).



Şekil 4.19. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenein klinik *P. aeruginosa* suşlarının kayma hareketleri üzerine olan etkisi



Şekil 4.20. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin kayma hareketi üzerindeki inhibisyonları (%)

Çalışmalarımızda kullandığımız klinik suşların besiyerinde yapmış oldukları kayma hareketlerine ve bu harekete trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplarda gözlenen kayma hareketi düzeyleri (mm) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları. Her grup için n=4, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

Suş	Kontrol	Kontrol+Anetol	Kontrol+Alfa iyonin
PAO1	77,50 $\pm$ 2,887 ^c	25,00 $\pm$ 4,082 ^a	35,00 $\pm$ 5,774 ^b
PI-1	25,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-2	72,50 $\pm$ 2,887 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-3	18,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-4	15,00 $\pm$ 3,464 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-5	24,00 $\pm$ 1,155 ^c	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	20,00 $\pm$ 0,000 ^b
PI-6	33,50 $\pm$ 4,041 ^c	14,25 $\pm$ 3,686 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-7	35,00 $\pm$ 0,000 ^b	17,25 $\pm$ 2,062 ^a	17,50 $\pm$ 2,887 ^a
PI-8	22,50 $\pm$ 2,887 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-9	27,50 $\pm$ 2,887 ^c	16,50 $\pm$ 4,041 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-11	36,50 $\pm$ 1,732 ^c	16,25 $\pm$ 2,630 ^a	22,50 $\pm$ 2,887 ^b
PI-12	15,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-13	70,00 $\pm$ 0,000 ^b	19,00 $\pm$ 2,160 ^a	21,00 $\pm$ 1,155 ^a
PI-15	25,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-16	66,00 $\pm$ 1,155 ^c	18,00 $\pm$ 2,944 ^a	31,00 $\pm$ 1,155 ^b
PI-17	70,00 $\pm$ 0,000 ^c	17,50 $\pm$ 1,732 ^a	32,50 $\pm$ 2,887 ^b
PI-18	22,50 $\pm$ 2,887 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-19	32,50 $\pm$ 2,887 ^c	13,50 $\pm$ 1,291 ^a	20,00 $\pm$ 0,000 ^b
PI-20	35,00 $\pm$ 0,000 ^b	18,00 $\pm$ 4,320 ^a	22,50 $\pm$ 2,887 ^a
PI-21	79,00 $\pm$ 1,155 ^c	42,00 $\pm$ 0,816 ^a	52,50 $\pm$ 2,887 ^b
PI-23	31,00 $\pm$ 1,155 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-24	21,50 $\pm$ 1,732 ^b	16,50 $\pm$ 1,291 ^a	16,00 $\pm$ 1,155 ^a
PI-25	24,00 $\pm$ 1,155 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-30	30,00 $\pm$ 0,000 ^c	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	16,50 $\pm$ 1,732 ^b
PI-31	16,00 $\pm$ 1,155 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-33	40,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-34	18,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-35	55,50 $\pm$ 0,577 ^c	20,00 $\pm$ 0,000 ^b	17,50 $\pm$ 0,577 ^a
PI-36	70,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a

* Aynı satırdaki farklı harfler (a, b, c...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05)

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testine göre, kontrol grubundaki (anetol ve alfa iyonin ilave edilmeyen) klinik suşların kayma hareketi ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplardaki klinik suşların kayma hareketleri arasında anlamlı

istatistiksel fark olduğu ($p \leq 0,001$) gözlenmiştir (Çizelge 4.3.). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın hangi grubun test sonuçlarından kaynaklandığını belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.3. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların kayma hareketi düzeyleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları

Suş	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
PAO1	Gruplar arası	6216,667	2	3108,333	159,857	,000
	Gruplar içi	175	9	19,444		
	Toplam	6391,667	11			
PI-1	Gruplar arası	1734	2	867	7803	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	1735	11			
PI-2	Gruplar arası	14016,667	2	7008,333	2523	,000
	Gruplar içi	25	9	2,778		
	Toplam	14041,667	11			
PI-3	Gruplar arası	912,667	2	456,333	4107	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	913,667	11			
PI-4	Gruplar arası	600	2	300	75	,000
	Gruplar içi	36	9	4		
	Toplam	636	11			
PI-5	Gruplar arası	1322,667	2	661,333	1488	,000
	Gruplar içi	4	9	0,444		
	Toplam	1326,667	11			
PI-6	Gruplar arası	2261,167	2	1130,583	113,373	,000
	Gruplar içi	89,75	9	9,972		
	Toplam	2350,917	11			

Çizelge 4.3. (devam)

PI-7	Gruplar arası	828,5	2	414,25	98,762	,000
	Gruplar içi	37,75	9	4,194		
	Toplam	866,25	11			
PI-8	Gruplar arası	1350	2	675	243	,000
	Gruplar içi	25	9	2,778		
	Toplam	1375	11			
PI-9	Gruplar arası	1532,667	2	766,333	93,203	,000
	Gruplar içi	74	9	8,222		
	Toplam	1606,667	11			
PI-11	Gruplar arası	860,167	2	430,083	70,699	,000
	Gruplar içi	54,75	9	6,083		
	Toplam	914,917	11			
PI-12	Gruplar arası	640,667	2	320,333	2883	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	641,667	11			
PI-13	Gruplar arası	6674,667	2	3337,333	1668,667	,000
	Gruplar içi	18	9	2		
	Toplam	6692,667	11			
PI-15	Gruplar arası	1734	2	867	7803	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	1735	11			
PI-16	Gruplar arası	4930,667	2	2465,333	652,588	,000
	Gruplar içi	34	9	3,778		
	Toplam	4964,667	11			
PI-17	Gruplar arası	5850	2	2925	774,265	,000
	Gruplar içi	34	9	3,778		
	Toplam	5884	11			
PI-18	Gruplar arası	1350	2	675	243	,000
	Gruplar içi	25	9	2,778		
	Toplam	1375	11			

Çizelge 4.3. (devam)

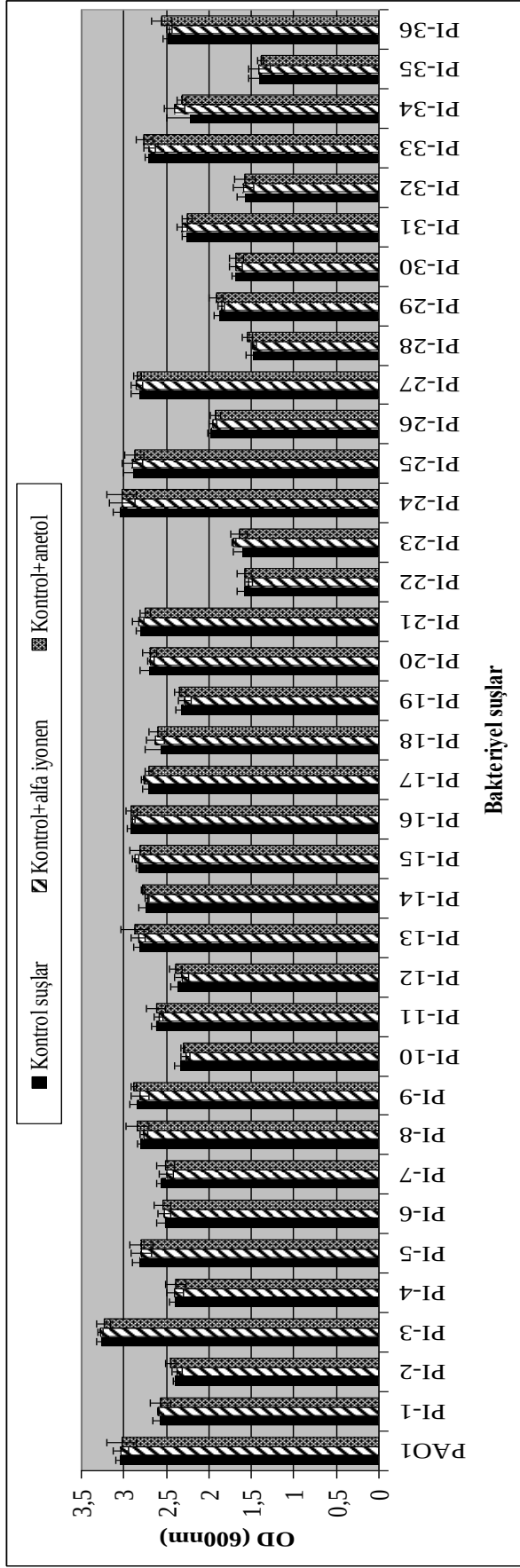
PI-19	Gruplar arası	746	2	373	111,9	,000
	Gruplar içi	30	9	3,333		
	Toplam	776	11			
PI-20	Gruplar arası	620,667	2	310,333	34,481	,000
	Gruplar içi	81	9	9		
	Toplam	701,667	11			
PI-21	Gruplar arası	2908,667	2	1454,333	422,226	,000
	Gruplar içi	31	9	3,444		
	Toplam	2939,667	11			
PI-23	Gruplar arası	2562,667	2	1281,333	2883	,000
	Gruplar içi	4	9	0,444		
	Toplam	2566,667	11			
PI-24	Gruplar arası	74	2	37,000	18,5	,001
	Gruplar içi	18	9	2,000		
	Toplam	92	11			
PI-25	Gruplar arası	1536	2	768	1728	,000
	Gruplar içi	4	9	0,444		
	Toplam	1540	11			
PI-30	Gruplar arası	1806	2	903	903	,000
	Gruplar içi	9	9	1		
	Toplam	1815	11			
PI-31	Gruplar arası	682,667	2	341,333	768	,000
	Gruplar içi	4	9	0,444		
	Toplam	686,667	11			
PI-33	Gruplar arası	4374	2	2187	19683	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	4375	11			
PI-34	Gruplar arası	912,667	2	456,333	4107	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	913,667	11			

Çizelge 4.3. (devam)

Gruplar arası	3614	2	1807	8131,5	,000
PI-35 Gruplar içi	2	9	0,222		
Toplam	3616	11			
Gruplar arası	13254	2	6627	59643	,000
PI-36 Gruplar içi	1	9	0,111		
Toplam	13255	11			

4.6. 3-metil Alfa İyonon ve Trans-Anetol'ün Bakteriyel Suşların Üremeleri Üzerindeki Etkileri

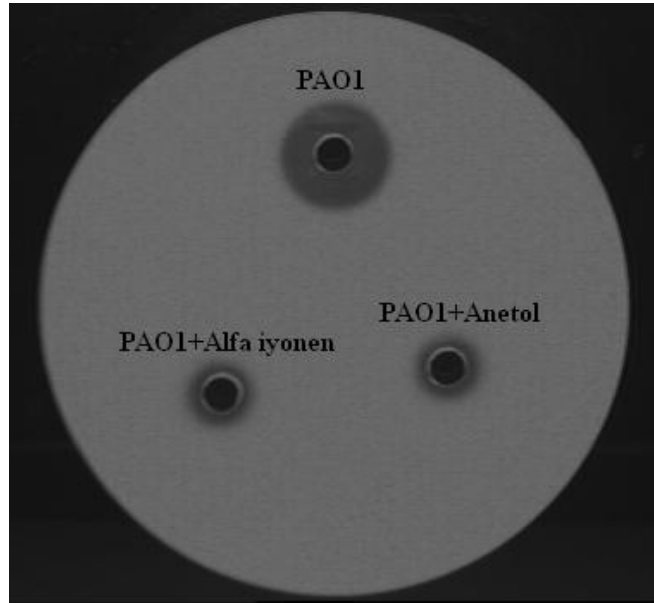
600 nm absorbans değerinde yapılan ölçümlerde, kontroldeki ve testlerde kullanılan konsantrasyonlarda anetol (6,67 mM) ve alfa iyonon (%0,1) eklenen kültürlerdeki bakteri yoğunluğundaki artış birbirine yakındır ($p>0,05$). Anetol ve alfa iyononun testlerde kullanılan konsantrasyonları suşların üremesini engellememiştir (Şekil 4.21.).



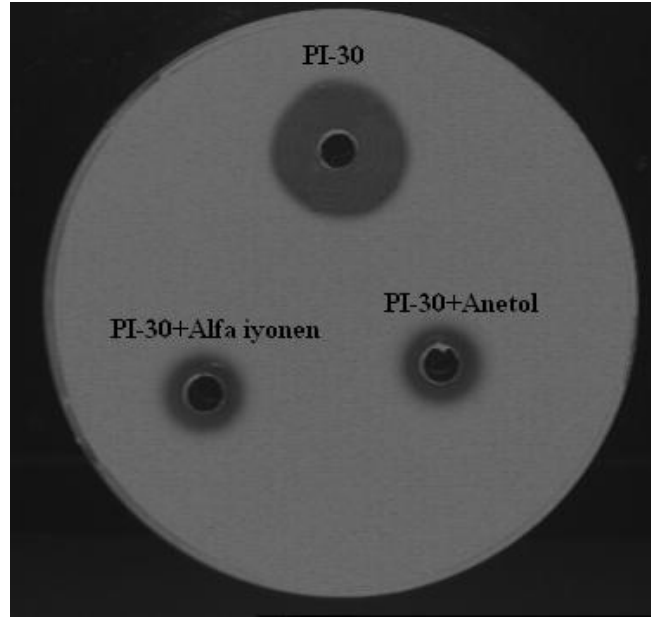
Şekil 4.21. Kontrol suşların ve 6,67 mM ve %0,1 derişimlerinde anetol ve alfa iyonon ilave edilen bakteri kültürlerinin 600 nm absorbands değeriinde yapılan ölçümleri

4.7. Proteaz Testi Bulguları

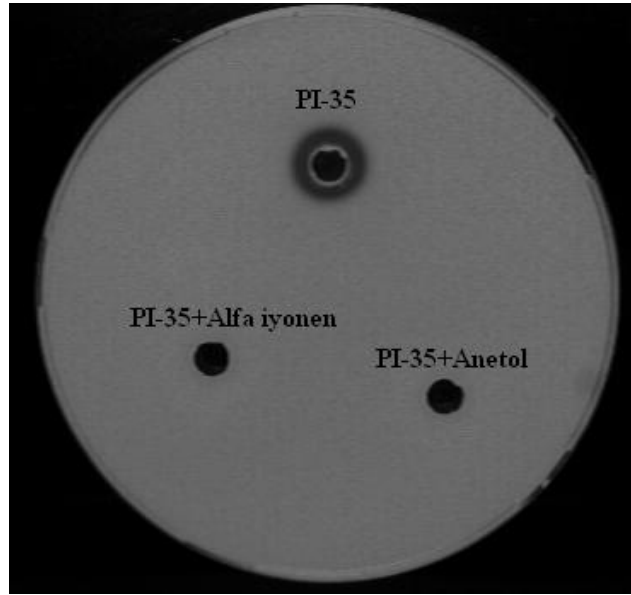
3-metil-alfa iyonon ve trans-anetolün, çalışılan suşların proteolitik aktiviteleri üzerine olan etkileri %2 yağsız süt tozu içeren proteaz besiyeri kullanılarak test edilmiştir. Suşların proteolitik aktiviteleri sadece bakteri kültürü ilave edilen kuyucukların çevresindeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. Trans-anetol ve 3-metil-alfa iyononun suşların proteolitik aktivitesi üzerindeki etkileri ise belirli konsantrasyonda trans-anetol (6,67 mM) ve 3-metil- alfa iyonon (%0,1) ile bir gece inkübe edilen bakteri kültürü ilave edilen kuyucukların çevresindeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.22.- 4.24.).



Şekil 4.22. Petride 3-metil-alfa iyonon ve trans-anetolün kontrol PAO1 suşunun proteolitik aktivitesi üzerine etkisi PAO1: 16 mm, PAO1+Alfa iyonon: 8 mm, PAO1+Anetol: 7 mm



Şekil 4.23. Petride 3-metil-alfa iyonon ve trans-anetolün klinik PI-30 suşunun proteolitik aktivitesi üzerine etkisi PI-30: 17 mm, PI-30+Alfa iyonon: 10 mm, PI-30+Anetol: 10 mm

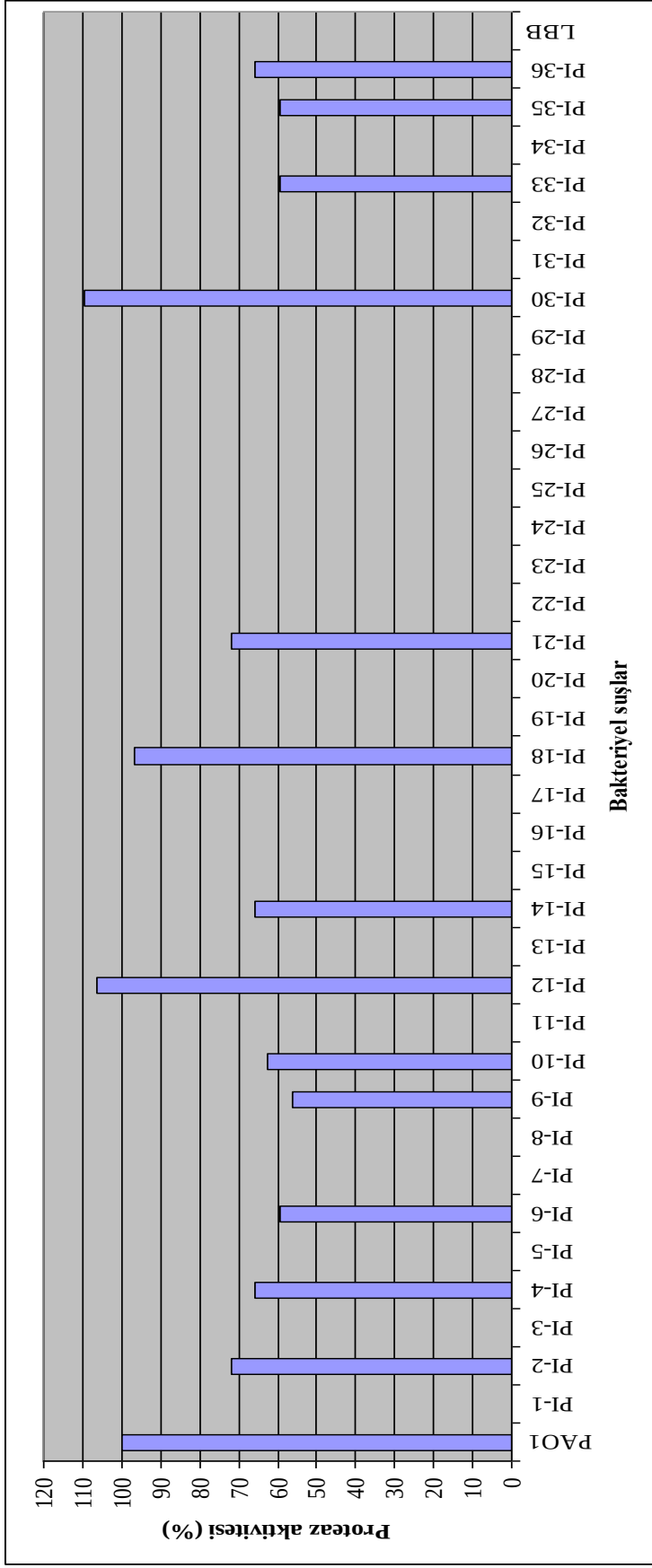


Şekil 4.24. Petride 3-metil-alfa iyonon ve trans-anetolün klinik PI-35 suşunun proteolitik aktivitesi üzerine etkisi PI-35: 9 mm, PI-35+Alfa iyonon: zon yok, PI-35+Anetol: zon yok

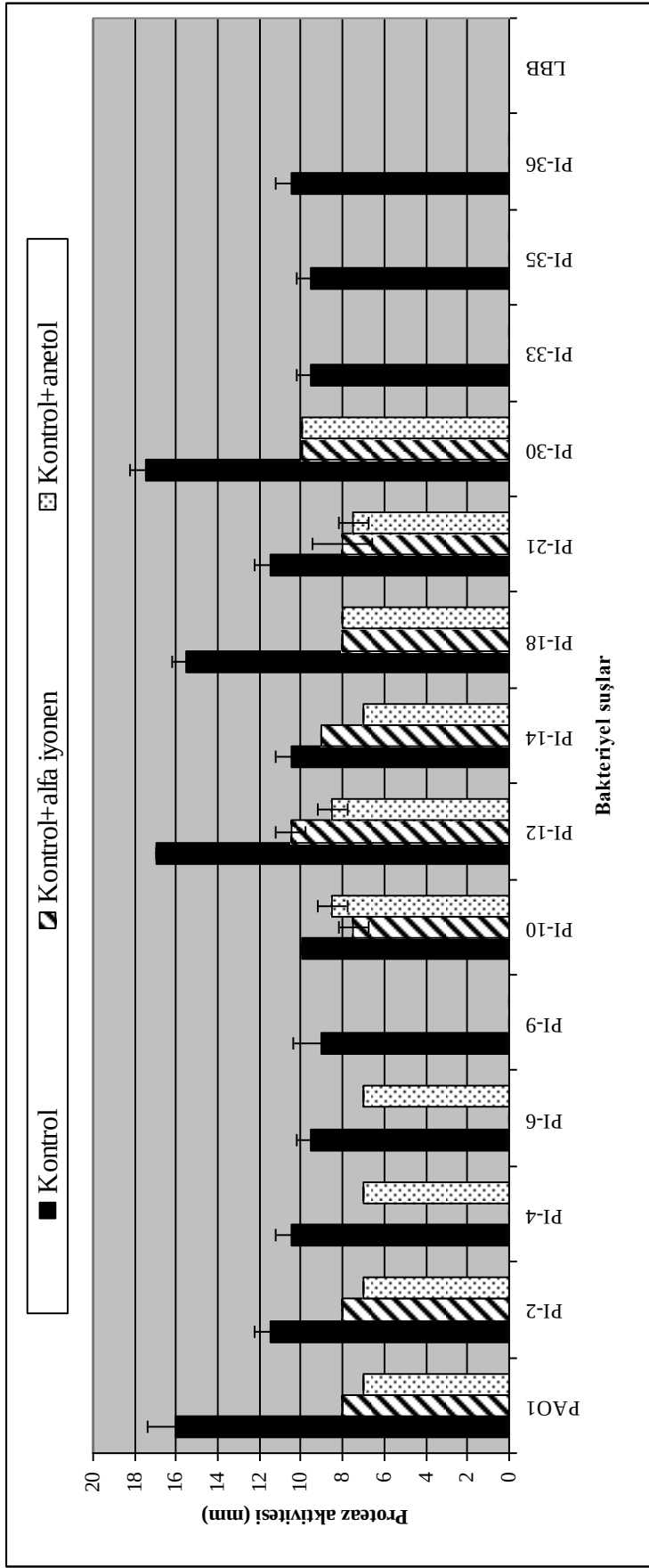
PAO1 kontrol suşunun proteolitik aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. PAO1 kontrol suşuyla karşılaştırıldığında on bir adet izolatın (PI-2, PI-4, PI-6, PI-9, PI-10, PI-14, PI-18, PI-21, PI-33, PI-35, PI-36) proteaz aktivitesinin daha az olduğu, iki izolatın (PI-12, PI-30) ise proteaz aktivitesinin PAO1 suşundan daha fazla olduğu

tespit edilmiştir. Yirmi üç adet izolatın (PI-1, PI-3, PI-5, PI-7, PI-8, PI-11, PI-13, PI-15, PI-16, PI-17, PI-19, PI-20, PI-22, PI-23, PI-24, PI-25, PI-26, PI-27, PI-28, PI-29, PI-31, PI-32, PI-34) ise proteaz aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Diğer izolatlarda PAO1 suşuyla karşılaştırıldığı zaman değerlerin %56-97 arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.25.).

Şekil 4.26.'da trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik *P. aeruginosa* suşlarının proteolitik aktiviteleri üzerine olan etkisi grafik olarak gösterilmiştir.

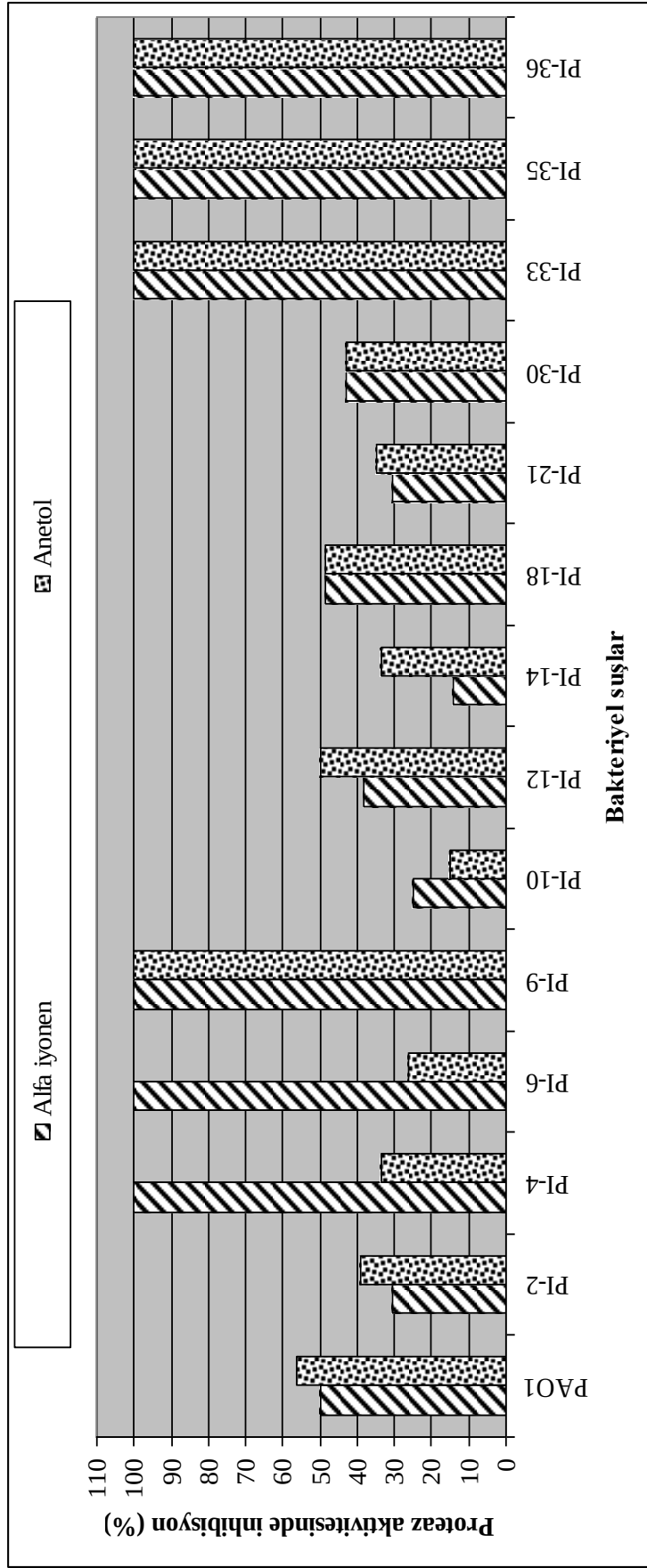


Şekil 4.25. Klinik *P. aeruginosa* suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre proteaz aktivite (%)



Şekil 4.26. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonlenin klinik *P. aeruginosa* suşlarının proteaz aktivitei üzerine olan etkisi

Her bir izolat için trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin proteaz aktiviteleri üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri tespit edilmiştir. 3-metil alfa iyonon, PAO1 kontrol suşu üzerinde %50 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %56 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon, klinik izolatların dört tanesinin (PI-9, PI-33, PI-35 ve PI-36) proteaz aktivitelerinde %100 inhibisyona neden olmuştur. Alfa iyonon, PI-4 ve PI-6 izolatında %100 inhibisyona neden olurken trans-anetol bu izolatlarda sırasıyla %33 ve %26 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-2 izolatında %39 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon %30 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-10 izolatında %15 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon %25 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-12 izolatında %50 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon %38 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol, PI-14 izolatında %33 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon, %14 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon, PI-18 izolatında %48 oranında inhibisyona olmuştur. Trans-anetol, PI-21 izolatında %35 oranında inhibisyona neden olurken 3-metil alfa iyonon %30 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon, PI-30 izolatında %43 oranında inhibisyona olmuştur (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin proteaz aktivitei üzerindeki inhibisyonları (%)

Çalışmalarımızda kullandığımız klinik suşların proteaz aktivitelerine ve bu aktiviteye trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplarda gözlenen proteaz aktivitesi düzeyleri (mm) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları. Her grup için n=4, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

Suş	Kontrol	Kontrol+Anetol	Kontrol+Alfa iyonin
PAO1	16,00 $\pm$ 1,155 ^b	7,00 $\pm$ 0,000 ^a	8,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-2	11,50 $\pm$ 0,577 ^c	7,00 $\pm$ 0,000 ^a	8,00 $\pm$ 0,000 ^b
PI-4	10,50 $\pm$ 0,577 ^c	7,00 $\pm$ 0,000 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-6	9,50 $\pm$ 0,577 ^c	7,00 $\pm$ 0,000 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-9	9,00 $\pm$ 1,155 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-10	10,00 $\pm$ 0,000 ^c	8,50 $\pm$ 0,577 ^b	7,50 $\pm$ 0,577 ^a
PI-12	17,00 $\pm$ 0,000 ^c	8,50 $\pm$ 0,577 ^a	10,50 $\pm$ 0,577 ^b
PI-14	10,50 $\pm$ 0,577 ^c	7,00 $\pm$ 0,000 ^a	9,00 $\pm$ 0,000 ^b
PI-18	15,50 $\pm$ 0,577 ^b	8,00 $\pm$ 0,000 ^a	8,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-21	11,50 $\pm$ 0,577 ^b	7,50 $\pm$ 0,577 ^a	8,00 $\pm$ 1,155 ^a
PI-30	17,50 $\pm$ 0,577 ^b	10,00 $\pm$ 0,000 ^a	10,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-33	9,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-35	9,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a
PI-36	10,50 $\pm$ 0,577 ^b	0,00 $\pm$ 0,000 ^a	0,00 $\pm$ 0,000 ^a

* Aynı satırdaki farklı harfler (a, b, c...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05)

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testine göre, kontrol grubundaki (anetol ve alfa iyonin ilave edilmeyen) klinik suşların proteaz aktiviteleri ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplardaki klinik suşların proteaz aktiviteleri arasında anlamlı istatistiksel fark olduğu (p<0,001) gözlenmiştir (Çizelge 4.5.). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın hangi grubun test sonuçlarından kaynaklandığını belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.5. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların proteaz aktiviteleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları

Suş	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
PAO1	Gruplar arası	194,667	2	97,333	219	,000
	Gruplar içi	4	9	0,444		
	Toplam	198,667	11			
PI-2	Gruplar arası	44,667	2	22,333	201	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	45,667	11			
PI-4	Gruplar arası	228,667	2	114,333	1029	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	229,667	11			
PI-6	Gruplar arası	194	2	97	873	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	195	11			
PI-9	Gruplar arası	216	2	108	243	,000
	Gruplar içi	4	9	0,444		
	Toplam	220,000	11			
PI-10	Gruplar arası	12,667	2	6,333	28,500	,000
	Gruplar içi	2	9	0,222		
	Toplam	14,667	11			
PI-12	Gruplar arası	158	2	79	355,5	,000
	Gruplar içi	2	9	0,222		
	Toplam	160	11			
PI-14	Gruplar arası	24,667	2	12,333	111	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	25,667	11			
PI-18	Gruplar arası	150	2	75	675	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	151	11			

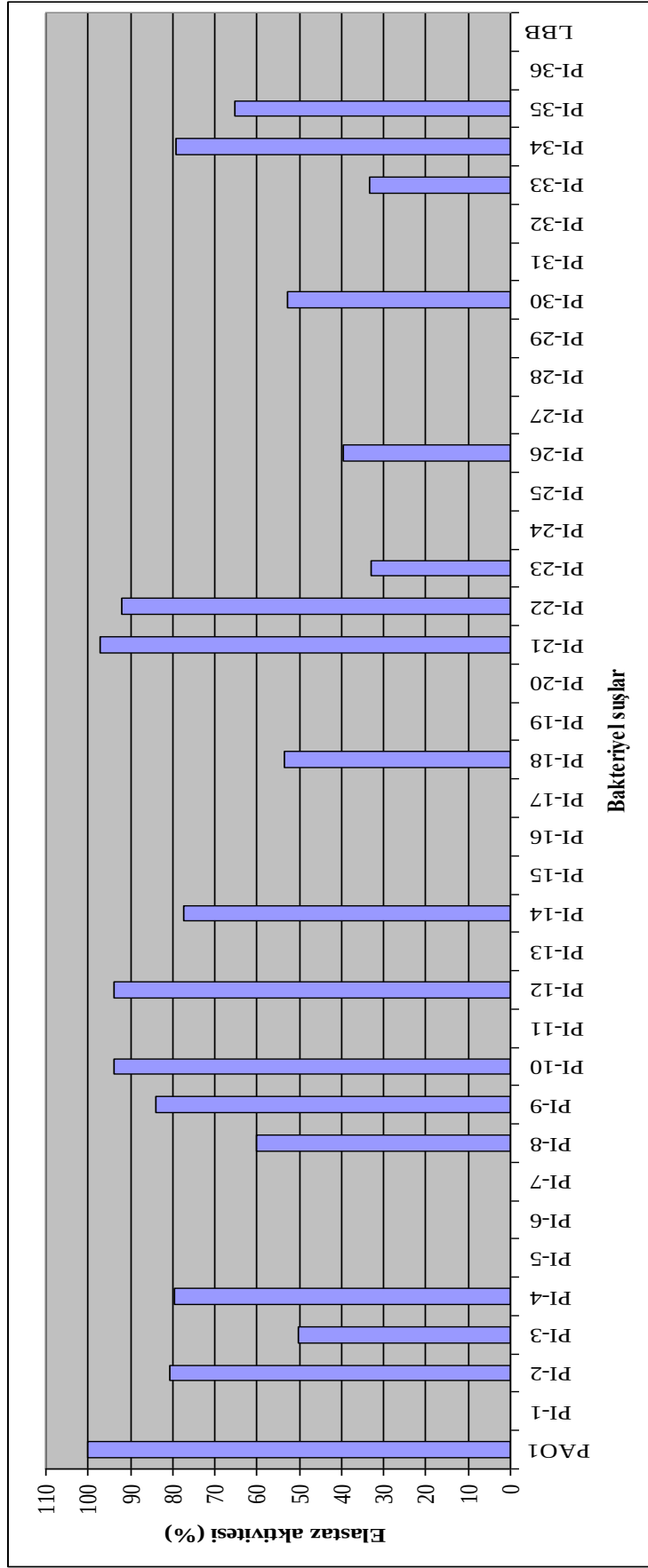
Çizelge 4.5. (devam)

PI-21	Gruplar arası	38	2	19	28,5	,000
	Gruplar içi	6	9	0,667		
	Toplam	44	11			
PI-30	Gruplar arası	150	2	75	675	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	151	11			
PI-33	Gruplar arası	240,667	2	120,333	1083	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	241,667	11			
PI-35	Gruplar arası	240,667	2	120,333	1083	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	241,667	11			
PI-36	Gruplar arası	294	2	147	1323	,000
	Gruplar içi	1	9	0,111		
	Toplam	295	11			

4.8. Elastaz Testi Bulguları

ECR testi (elastin congo red assay) uygulanarak üretimi *las* sisteminin sıkı kontrolü altında olan elastaz aktivitesi açısından da suşlar analiz edilmiştir. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

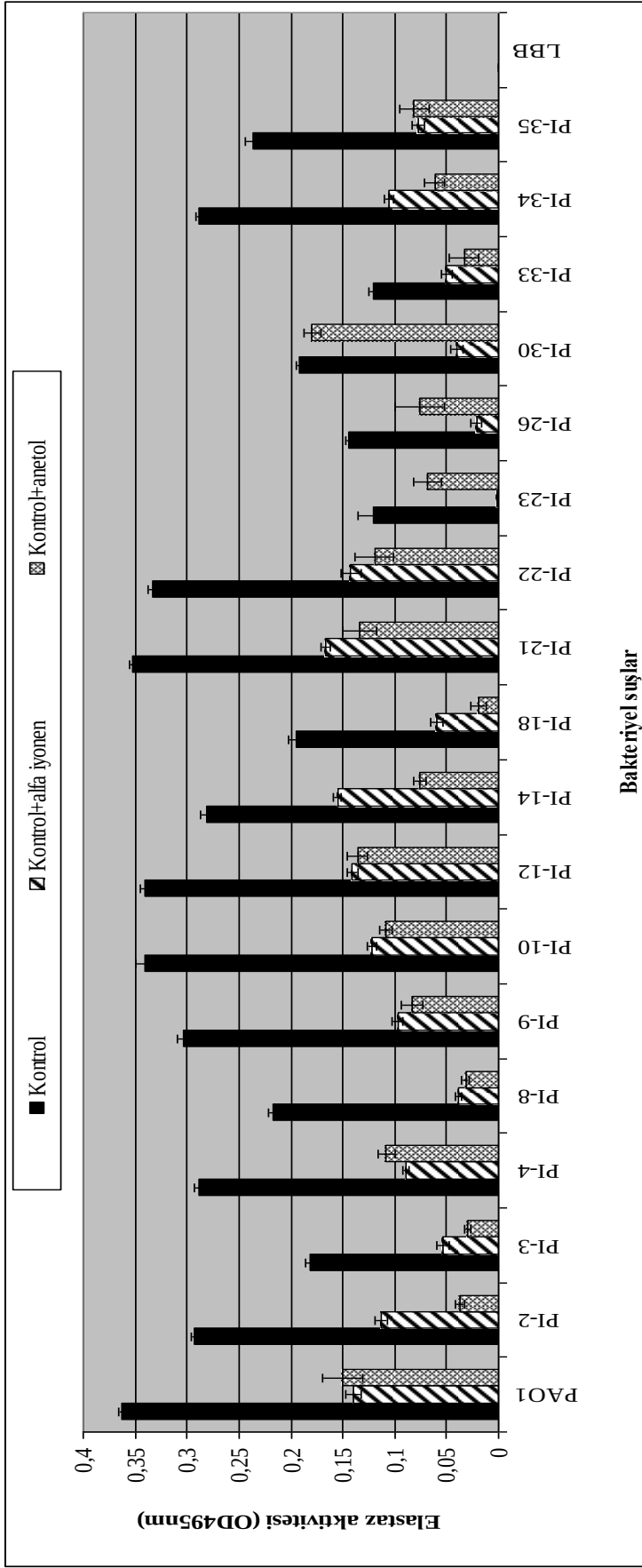
PAO1 kontrol suşunun elastolitik aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. On dokuz adet izolatın (PI-1, PI-5, PI-6, PI-7, PI-11, PI-13, PI-15, PI-16, PI-17, PI-19, PI-20, PI-24, PI-25, PI-27, PI-28, PI-29, PI-31, PI-32, PI-36) elastaz aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Üç adet izolatın (PI-23, PI-26, PI-33) elastaz aktivitelerinin PAO1 suşuna oranla %40'ın altında olduğu, diğer suşlarda (PI-2, PI-3, PI-4, PI-8, PI-9, PI-10, PI-12, PI-14, PI-18, PI-21, PI-22, PI-30, PI-34, PI-35) ise PAO1 suşuyla karşılaştırıldığı zaman değerlerin %50-97 arasında değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.28.).



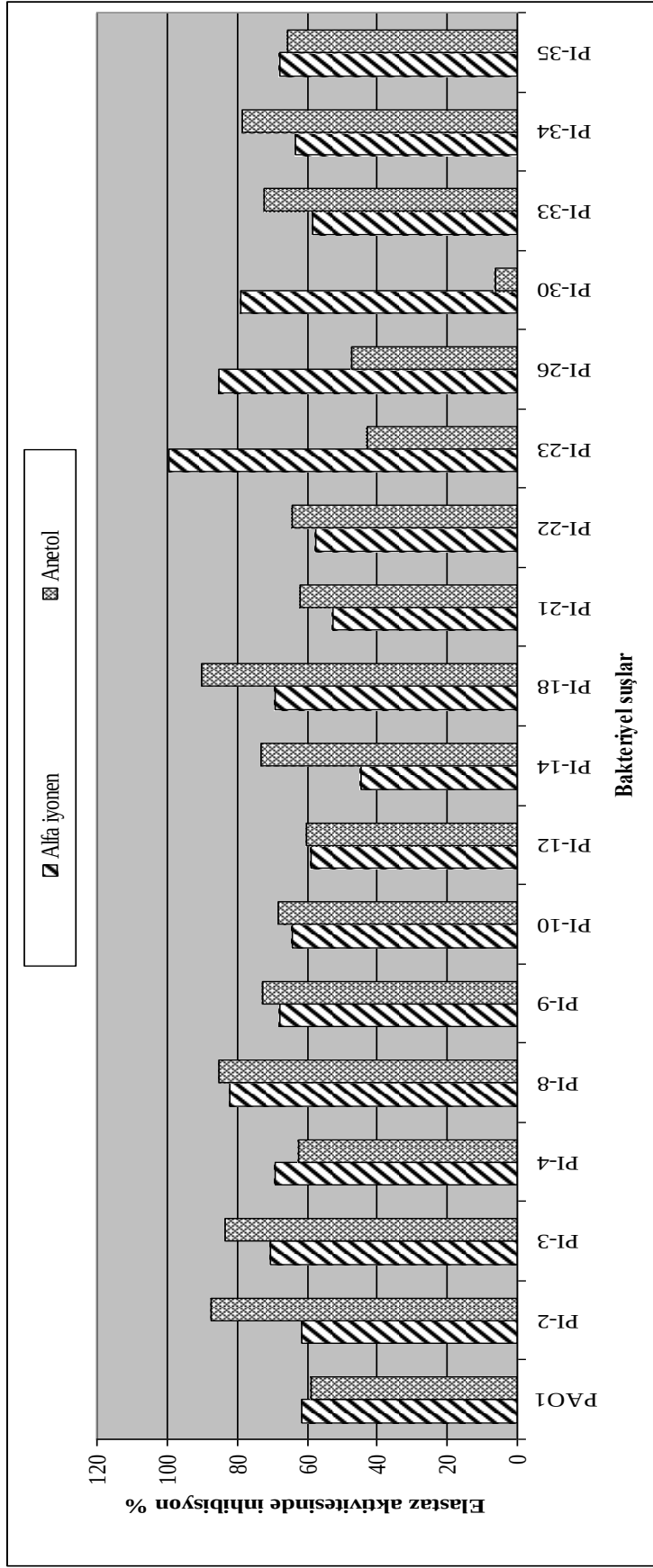
Şekil 4.28. Klinik *P. aeruginosa* suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre elastaz aktivite (%)

Şekil 4.29.'da trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik *P. aeruginosa* suşlarının elastolitik aktiviteleri üzerine olan etkisi gösterilmiştir.

Her bir suş için trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin elastaz aktiviteleri üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri tespit edilmiştir. 3-metil alfa iyonon, PAO1 kontrol suşu üzerinde %62 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %59 oranında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ve 3-metil alfa iyonon, test edilen klinik izolatların 13 tanesinin (PI-2, PI-3, PI-4, PI-8, PI-9, PI-10, PI-12, PI-18, PI-21, PI-22, PI-33, PI-34, PI-35) elastaz aktivitelerinde %53-99 oranında inhibisyona neden olmuştur. PI-14 klinik izolatında, 3-metil alfa iyonon %45 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %73 oranında inhibisyona neden olmuş, PI-23 klinik izolatında, 3-metil alfa iyonon %99 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %43 oranında inhibisyona neden olmuş, PI-26 klinik izolatında, 3-metil alfa iyonon %85 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %47 oranında inhibisyona neden olmuş, PI-30 klinik izolatında, 3-metil alfa iyonon %79 oranında inhibisyona neden olurken trans-anetol %6 oranında inhibisyona neden olmuştur (Şekil 4.30.).



Şekil 4.29. trans-anetol ve 3-metil alfa iyononun klinik *P. aeruginosa* suşlarının elastaz aktiviteeleri üzerine olan etkisi



Şekil 4.30. trans-anetol ve 3-metil alfa iyononun bakterilerin elastaz aktivitetleri üzerindeki inhibisyonları (%)

Çalışmalarımızda kullandığımız klinik suşların elastaz aktivitelerine ve bu aktiviteye trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplarda gözlenen elastaz aktivitesi düzeyleri (OD_{495nm}) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları. Her grup için n=4, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

Suş	Kontrol	Kontrol+Anetol	Kontrol+Alfa iyonin
PAO1	0,36283 $\pm$ 0,002646 ^b	0,14983 $\pm$ 0,019468 ^a	0,13958 $\pm$ 0,007676 ^a
PI-2	0,29333 $\pm$ 0,002944 ^c	0,03708 $\pm$ 0,004349 ^a	0,11308 $\pm$ 0,005620 ^b
PI-3	0,18208 $\pm$ 0,004272 ^c	0,03008 $\pm$ 0,002986 ^a	0,05383 $\pm$ 0,006028 ^b
PI-4	0,28883 $\pm$ 0,004796 ^c	0,10808 $\pm$ 0,007890 ^b	0,08908 $\pm$ 0,002872 ^a
PI-8	0,21758 $\pm$ 0,004272 ^c	0,03183 $\pm$ 0,003697 ^a	0,03883 $\pm$ 0,002646 ^b
PI-9	0,30408 $\pm$ 0,005737 ^c	0,08358 $\pm$ 0,010145 ^a	0,09733 $\pm$ 0,005715 ^b
PI-10	0,34108 $\pm$ 0,008261 ^c	0,10833 $\pm$ 0,005944 ^a	0,12208 $\pm$ 0,004992 ^b
PI-12	0,34083 $\pm$ 0,004509 ^b	0,13583 $\pm$ 0,009883 ^a	0,14058 $\pm$ 0,005058 ^a
PI-14	0,28033 $\pm$ 0,006976 ^c	0,07533 $\pm$ 0,005831 ^a	0,15533 $\pm$ 0,003742 ^b
PI-18	0,19433 $\pm$ 0,007439 ^c	0,01933 $\pm$ 0,006733 ^a	0,05983 $\pm$ 0,005802 ^b
PI-21	0,35208 $\pm$ 0,003304 ^c	0,13383 $\pm$ 0,015948 ^a	0,16683 $\pm$ 0,004655 ^b
PI-22	0,33358 $\pm$ 0,003403 ^c	0,11958 $\pm$ 0,018007 ^a	0,14208 $\pm$ 0,009878 ^b
PI-23	0,11983 $\pm$ 0,015695 ^c	0,06858 $\pm$ 0,012842 ^b	0,00083 $\pm$ 0,000577 ^a
PI-26	0,14383 $\pm$ 0,003109 ^c	0,07608 $\pm$ 0,024185 ^b	0,02133 $\pm$ 0,004690 ^a
PI-30	0,19183 $\pm$ 0,002887 ^c	0,17983 $\pm$ 0,008103 ^b	0,04058 $\pm$ 0,005737 ^a
PI-33	0,12108 $\pm$ 0,003862 ^c	0,03333 $\pm$ 0,013976 ^a	0,05033 $\pm$ 0,005354 ^b
PI-34	0,28783 $\pm$ 0,002887 ^c	0,06158 $\pm$ 0,009179 ^a	0,10608 $\pm$ 0,004646 ^b
PI-35	0,23708 $\pm$ 0,004349 ^b	0,08158 $\pm$ 0,014009 ^a	0,07683 $\pm$ 0,005802 ^a

*Aynı satırdaki farklı harfler (a, b, c...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05)

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testine göre, kontrol grubundaki (anetol ve alfa iyonin ilave edilmeyen) klinik suşların elastaz aktiviteleri ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplardaki klinik suşların elastaz aktiviteleri arasında anlamlı istatistiksel fark olduğu (p<0,001) gözlenmiştir (Çizelge 4.7.). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın hangi grubun test sonuçlarından kaynaklandığını belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.7. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların elastaz aktiviteleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları

Suş	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
PAO1	Gruplar arası	0,127	2	0,064	428,461	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,128	11			
PI-2	Gruplar arası	0,139	2	0,069	3513,131	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,139	11			
PI-3	Gruplar arası	0,053	2	0,027	1263,500	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,054	11			
PI-4	Gruplar arası	0,097	2	0,049	1560,035	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,098	11			
PI-8	Gruplar arası	0,089	2	0,044	3417,745	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,089	11			
PI-9	Gruplar arası	0,122	2	0,061	1086,705	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,123	11			
PI-10	Gruplar arası	0,136	2	0,068	1592,570	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,137	11			
PI-12	Gruplar arası	0,110	2	0,055	1144,250	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,110	11			
PI-14	Gruplar arası	0,085	2	0,043	1325,172	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,086	11			

Çizelge 4.7. (devam)

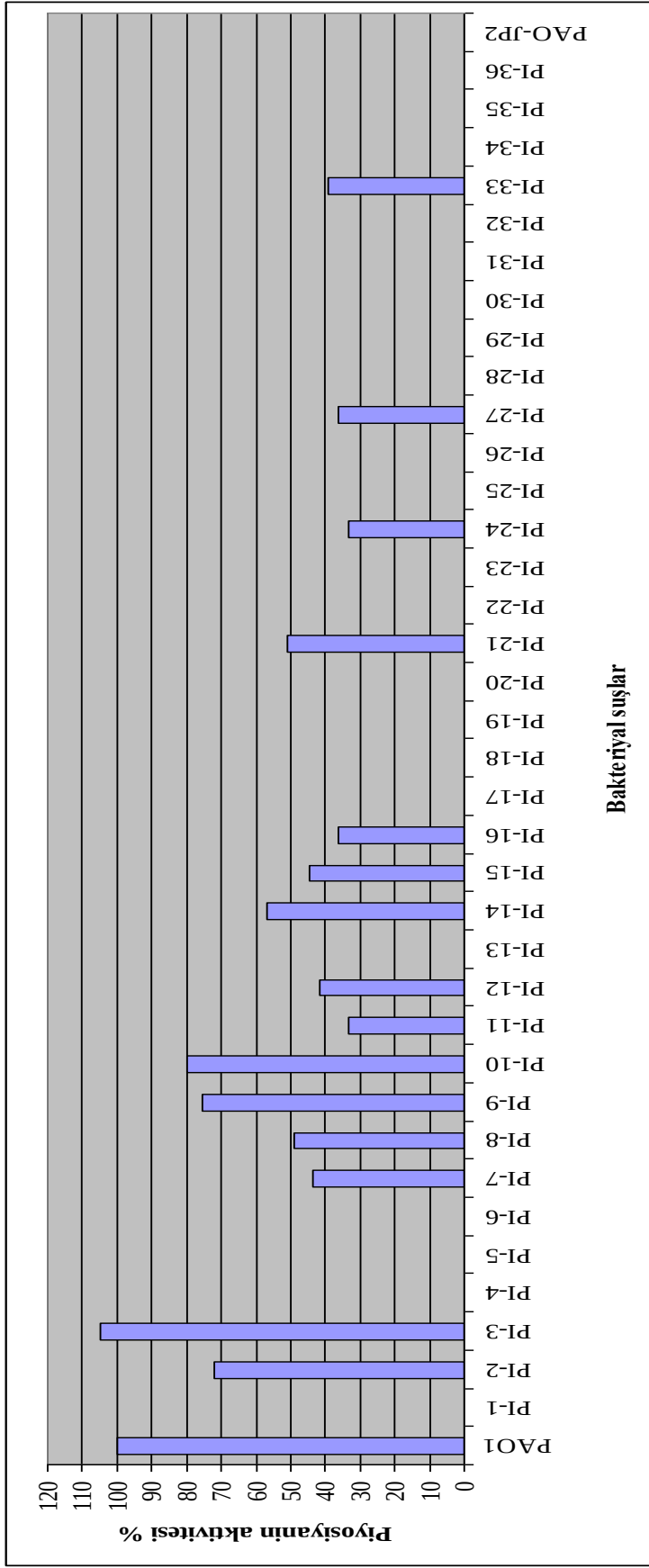
PI-18	Gruplar arası	0,067	2	0,034	749,710	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,068	11			
PI-21	Gruplar arası	0,111	2	0,055	578,841	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,112	11			
PI-22	Gruplar arası	0,111	2	0,055	382,886	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,112	11			
PI-23	Gruplar arası	0,029	2	0,014	103,880	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,030	11			
PI-26	Gruplar arası	0,030	2	0,015	73,287	,000
	Gruplar içi	0,002	9	0,000		
	Toplam	0,032	11			
PI-30	Gruplar arası	0,057	2	0,028	793,349	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,057	11			
PI-33	Gruplar arası	0,017	2	0,009	108,780	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,018	11			
PI-34	Gruplar arası	0,115	2	0,057	1510,115	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,115	11			
PI-35	Gruplar arası	0,067	2	0,033	400,934	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,067	11			

4.9. Piyosiyanin Testi Bulguları

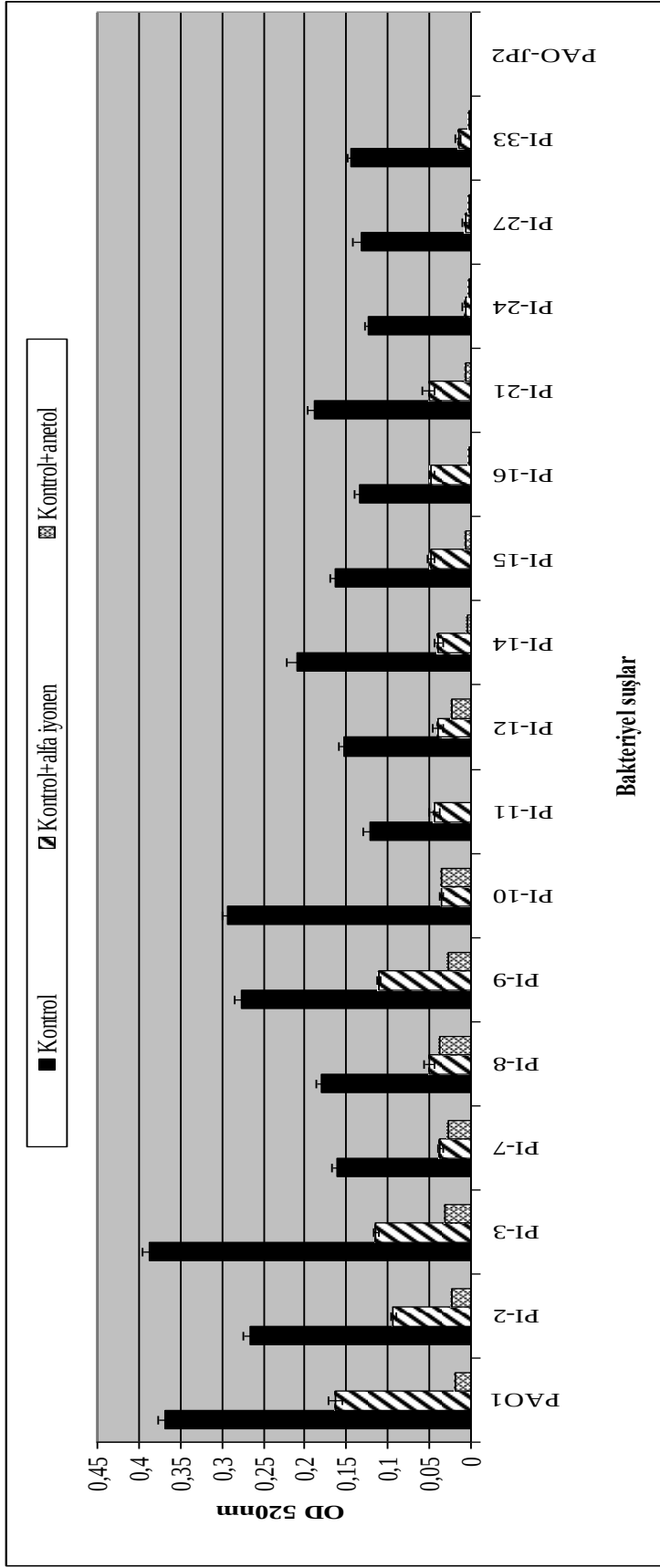
Piyosiyanin üretimi, doğrudan *rhl* sistemi tarafından kontrol edilmektedir, ancak çevreyi algılama sistemindeki hiyerarşiden dolayı *las* sisteminin aynı zamanda piyosiyanin üretimini de etkilediği bilinmektedir (de Kievit ve Iglewski, 2000).

PAO1 kontrol suşunun ürettiği piyosiyanin miktarı %100 olarak kabul edilmiştir. Piyosiyanin üretimi açısından suşlar test edilmiş ve yirmi bir adet izolatın (PI-1, PI-4, PI-5, PI-6, PI-13, PI-17, PI-18, PI-19, PI-20, PI-22, PI-23, PI-25, PI-26, PI-28, PI-29, PI-30, PI-31, PI-32, PI-34, PI-35, PI-36) piyosiyanin üretmediği, bir tane izolatın (PI-3) PAO1 kontrol suşundan fazla miktarda piyosiyanin ürettiği ve diğer suşlarda (PI-2, PI-7, PI-8, PI-9, PI-10, PI-11, PI-12, PI-14, PI-15, PI-16, PI-21, PI-24, PI-27, PI-33) piyosiyanin üretiminin PAO1 suşuna oranla %33-80 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.31.).

Şekil 4.32.'de trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin klinik *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanin üretimi üzerine olan etkisi gösterilmiştir.

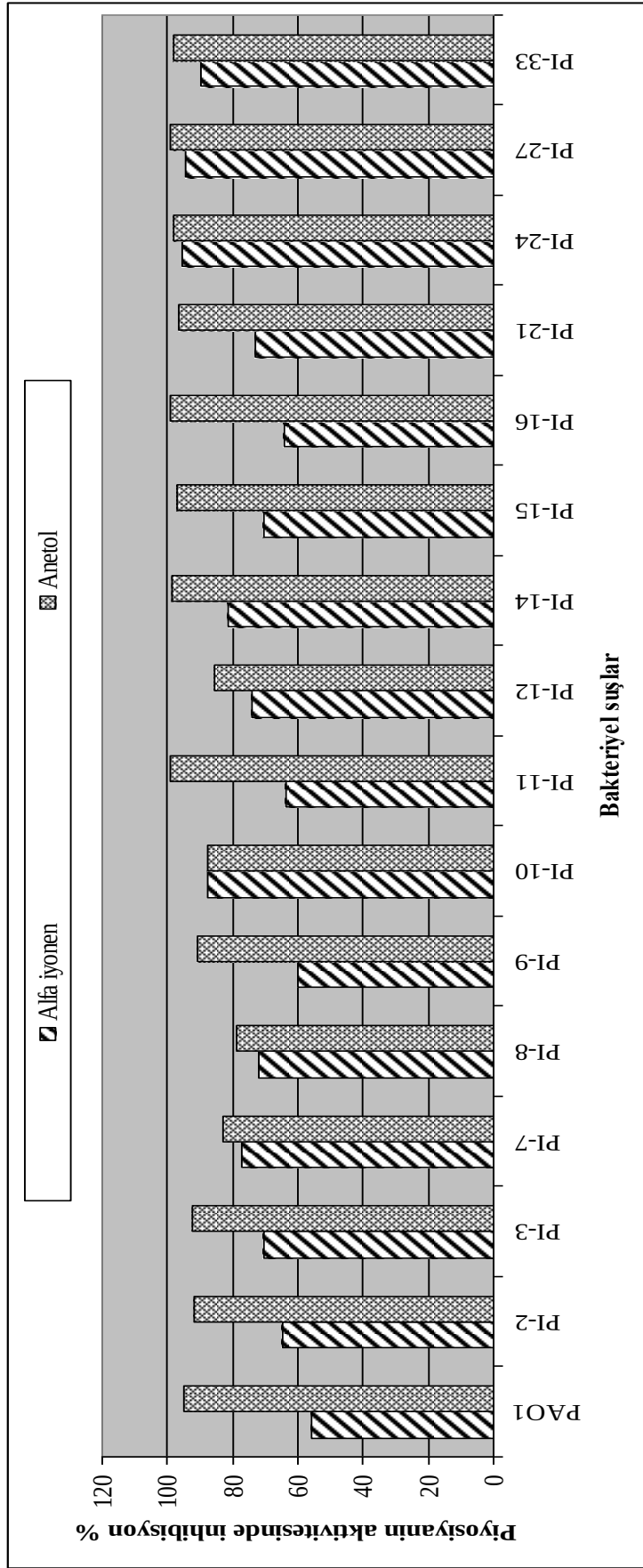


Şekil 4.31. Klinik *P. aeruginosa* suşlarının kontrol PAO1 suşuna göre piyosyanin üretim düzeyleri (%)



Şekil 4.32. trans-anetol ve 3-metil alfa iyononun klinik *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyanın üretim düzeyleri üzerine olan etkisi

Her bir izolat için trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin piyosiyanin üretimleri üzerindeki yüzde inhibisyon değerleri tespit edilmiştir. Trans-anetol, PAO1 kontrol suşu üzerinde %95 oranında inhibisyona neden olurken piyosiyanin aktivitesi olan on beş klinik izolatın tümünde (PI-2, PI-3, PI-7, PI-8, PI-9, PI-10, PI-11, PI-12, PI-14, PI-15, PI-16, PI-21, PI-24, PI-27, PI-33) %79-99 oranında inhibisyona neden olmuştur. 3-metil alfa iyonene ise PAO1 kontrol suşu üzerinde %56 oranında inhibisyona neden olurken piyosiyanin aktivitesi olan on beş klinik izolatın tümünde (PI-2, PI-3, PI-7, PI-8, PI-9, PI-10, PI-11, PI-12, PI-14, PI-15, PI-16, PI-21, PI-24, PI-27, PI-33) %60-96 oranında inhibisyona neden olmuştur (Şekil 4.33.).



Şekil 4.33. trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerin piyosyanin üretim düzeyleri üzerindeki inhibisyonları (%)

Çalışmalarımızda kullandığımız klinik suşların piyosiyenin üretim düzeylerine ve bu üretim düzeyine trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin etkisine ilişkin ortalama değerler Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kontrol grubu ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplarda gözlenen piyosiyenin üretim düzeyleri (OD_{520nm}) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları. Her grup için n=4, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir

Suş	Kontrol	Kontrol+Anetol	Kontrol+Alfa iyonin
PAO1	0,36825 $\pm$ 0,00830 ^c	0,01950 $\pm$ 0,00336 ^a	0,16350 $\pm$ 0,00812 ^b
PI-2	0,26500 $\pm$ 0,00858 ^c	0,02225 $\pm$ 0,00884 ^a	0,09325 $\pm$ 0,00320 ^b
PI-3	0,38650 $\pm$ 0,00879 ^c	0,03050 $\pm$ 0,00725 ^a	0,11425 $\pm$ 0,00298 ^b
PI-7	0,16125 $\pm$ 0,00602 ^c	0,02750 $\pm$ 0,00163 ^a	0,03700 $\pm$ 0,00341 ^b
PI-8	0,18100 $\pm$ 0,00544 ^c	0,03825 $\pm$ 0,00689 ^a	0,05075 $\pm$ 0,00590 ^b
PI-9	0,27700 $\pm$ 0,00793 ^c	0,02625 $\pm$ 0,00805 ^a	0,11100 $\pm$ 0,00251 ^b
PI-10	0,29375 $\pm$ 0,00478 ^b	0,03600 $\pm$ 0,00420 ^a	0,03650 $\pm$ 0,00216 ^a
PI-11	0,12200 $\pm$ 0,00704 ^c	0,00100 $\pm$ 0,00100 ^a	0,04425 $\pm$ 0,00694 ^b
PI-12	0,15325 $\pm$ 0,00525 ^c	0,02200 $\pm$ 0,01258 ^a	0,03950 $\pm$ 0,00697 ^b
PI-14	0,20900 $\pm$ 0,01287 ^c	0,00325 $\pm$ 0,00250 ^a	0,03900 $\pm$ 0,00519 ^b
PI-15	0,16400 $\pm$ 0,00519 ^c	0,00525 $\pm$ 0,00403 ^a	0,04850 $\pm$ 0,00454 ^b
PI-16	0,13375 $\pm$ 0,00727 ^c	0,00125 $\pm$ 0,00095 ^a	0,04775 $\pm$ 0,00330 ^b
PI-21	0,18750 $\pm$ 0,00871 ^c	0,00650 $\pm$ 0,00244 ^a	0,05100 $\pm$ 0,00732 ^b
PI-24	0,12300 $\pm$ 0,00519 ^b	0,00250 $\pm$ 0,00400 ^a	0,00550 $\pm$ 0,00583 ^a
PI-27	0,13275 $\pm$ 0,00884 ^b	0,00125 $\pm$ 0,00095 ^a	0,00725 $\pm$ 0,00411 ^a
PI-33	0,14375 $\pm$ 0,00512 ^c	0,00250 $\pm$ 0,00244 ^a	0,01500 $\pm$ 0,00310 ^b

* Aynı satırdaki farklı harfler (a, b, c...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05)

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testine göre, kontrol grubundaki (anetol ve alfa iyonin ilave edilmeyen) klinik suşların piyosiyenin üretim düzeyleri ile anetol ve alfa iyonin ilave edilen gruplardaki klinik suşların üretim düzeyleri arasında anlamlı istatistiksel fark olduğu (p<0,001) gözlenmiştir (Çizelge 4.9.). Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın hangi grubun test sonuçlarından kaynaklandığını belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.9. Kontrol grubundaki klinik suşlarla anetol ve alfa iyonon ilave edilen gruplardaki suşların piyosiyanin üretim düzeyleri arasındaki farklara ilişkin tek yönlü varyans (ANOVA) analizi sonuçları

Suş	Varyansın kaynağı	Kareler toplamı	SD	Kareler ortalaması	F	p
PAO1	Gruplar arası	0,246	2	0,123	2520,138	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,246	11			
PI-2	Gruplar arası	0,125	2	0,062	1152,723	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,125	11			
PI-3	Gruplar arası	0,277	2	0,139	2992,731	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,278	11			
PI-7	Gruplar arası	0,045	2	0,022	1321,280	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,045	11			
PI-8	Gruplar arası	0,050	2	0,025	668,628	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,050	11			
PI-9	Gruplar arası	0,130	2	0,065	1454,214	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,131	11			
PI-10	Gruplar arası	0,177	2	0,088	5861,343	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,177	11			
PI-11	Gruplar arası	0,030	2	0,015	456,073	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,030	11			
PI-12	Gruplar arası	0,041	2	0,020	259,796	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,041	11			

Çizelge 4.9. (devam)

PI-14	Gruplar arası	0,097	2	0,048	729,060	,000
	Gruplar içi	0,001	9	0,000		
	Toplam	0,097	11			
PI-15	Gruplar arası	0,054	2	0,027	1264,533	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,054	11			
PI-16	Gruplar arası	0,036	2	0,018	837,514	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,036	11			
PI-21	Gruplar arası	0,071	2	0,036	786,833	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,072	11			
PI-24	Gruplar arası	0,038	2	0,019	735,987	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,038	11			
PI-27	Gruplar arası	0,044	2	0,022	688,538	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,044	11			
PI-33	Gruplar arası	0,049	2	0,024	1750,348	,000
	Gruplar içi	0,000	9	0,000		
	Toplam	0,049	11			

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uzun yıllar boyunca, iletişim yeteneğinin çok hücreli “yüksek yapılı” organizmalara özgü bir özellik olduğu, bakteriler gibi tek hücreli canlıların ise sadece büyümek ve bölünmekten ibaret olan son derece basit bir yaşam tarzına sahip varlıklar oldukları düşünülüyordu. Ancak günümüzde, bakterilerin “asosyal”, “yalnız yaşayan”, “yalnız ölen” izole varlıklar olmadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları kabul edilmektedir (Swift vd., 1994). İlk defa *V. fischeri*’de tanımlanmış olan bu bakteriyel iletişim sisteminin daha sonra *V. fischeri* ile sınırlı olmadığı birçok Gram (-) ve Gram (+), insan, hayvan ve bitki patojeni tarafından yaygın olarak kullanıldığı keşfedilmiştir. Bakterilerin bu sistemi; antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, önemli virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde kullandığı bulunmuştur (Fuqua vd., 1994). Bakteriler birbirleriyle iletişim kurabilmek için küçük sinyal moleküllerini kullanmaktadırlar. Bu moleküller aracılığıyla yeterli çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin üretimi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenmektedir. Hücreler arası iletişimi sağlayan bu haberleşme sistemi çevreyi algılama (quorum sensing) olarak adlandırılır. Bu olay bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenlenme olanağı verir. Böylelikle, konakta enfeksiyon oluşturabilecek yeterli çoğunluğa ulaşınca kadar bağışıklık sistemi tarafından patojen bakterinin fark edilmemesi sağlanarak başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturulur.

Enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmalara karşı etkin bir mücadele oluşturulması eski çağlardan beri tıbbın önemli bir amacı haline gelmiştir. İlk defa İskoç bakteriyolog Alexander Fleming’in 1929’da gözlediği ve 1940 yılında Chain ve Flarey’in *Penicillium notatum*’un salgılarından elde ettiği ve penisilin adını verdikleri ilacın birçok mikroorganizma üzerinde öldürücü etki oluşturduğunun keşfedilmesi bir devrim olmuştur.

Bakteriyel enfeksiyonlar ile savaşta tercih edilen antibiyotik kullanımı; protein sentezi, DNA replikasyonu ve hücre duvarı sentezi gibi bakteriler için önemli işlemleri engelleyerek ve onları öldürerek yok etme temeline dayanmaktadır. Ancak bu yöntemler bir süre sonra antibiyotiklere karşı dirençli popülasyonların ortaya çıkmasına, bu da, kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalması, dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi, direncin yayılması ve ekonomik kayıplar ile sonuçlanabilmektedir. Penisilin canlılar üzerinde kullanıldıktan sadece iki yıl sonra, 1942 yılında penisilin direnci geliştiği belirlenmiştir. Takip eden yıllarda bulunan her yeni antibiyotiğin kullanıma girmesini takiben, belli bir süre sonra bakterilerin direnç geliştirmesi hemen hemen değişmez bir kural haline almıştır. Günümüzde hastalık yapan bakterilerin %70'inden fazlası klinikte kullanılan mevcut antibiyotiklerden en az birine karşı dirençlidir.

Günümüzde *P. aeruginosa* gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren mikroorganizma enfeksiyonları klinikte ciddi tedavi sorunu yaratmaktadır. Buna karşın özellikle son yıllarda yeni ve etkin antibiyotik geliştirilmesi ciddi biçimde azalmıştır. Geliştirilen antibiyotikler içinde de yeni bir antibakteriyel mekanizma ile etkinlik gösteren yeni bir molekül yoktur. Kullanılan antibiyotiklere karşı oluşan direnç gelişimi ve gelişen direncin farklı sınıftan antibiyotiklere karşı da direnç gelişimini kolaylaştırması, yeni antibakteriyel hedeflerin bulunması ve bu hedeflere yönelik ilaç ve stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Dolayısıyla bakterileri direk öldürmek yerine aralarındaki haberleşme sistemini bloke ederek bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek ve kontrol altında tutmak, patojenlerle savaşta çok umut vaat eden yeni bir strateji olarak düşünülmektedir. Bakterinin konakta enfeksiyon hastalığı oluşturmak amacıyla ürettiği çeşitli virülens faktörleri bu amaçla kullanılabilecek önemli hedef noktalarından birisidir. Bu faktörlerin çoğunun çeşitli bakteriler için özgül olması ve konak organizmada bulunmayışı tedavinin özgüllüğünü sağlayabilecektir. QS'nin doğrudan bakteri üremesi üzerine etkisinin olmaması, QS inhibisyonunun antibiyotiklerde gözlenen direnç gelişimine benzer şekilde dirençli kökenlerin seçilmesine neden olmaması da bir avantajdır. Bu çalışma kapsamında, bakterilerin direnç gösteremeyecekleri bitki özleri kullanılıp eskiden beri kullanılan ve hastalıklara iyi geldiği bilinen bitkilerin mikroorganizmalar üzerinde denenmesi ve

sonuçta herhangi bir toplum sağlığı tehlikesinden uzak, piyasada bulunan pahalı antibiyotiklerin yerine, daha ucuz, bitki veya bitki kökenli bileşiklerin araştırılması amaçlanmıştır. Antibiyotik direnci çok fazla olan *P. aeruginosa* ve bunun gibi patojenitesi yüksek bakterilerin, çevreyi algılama ile düzenlediği vir lens faktörlerini, antibiyotik yerine tıbbi öneme sahip olan bitkisel ürünlerle engellemek daha umut verici bir yaklaşım olmuştur.

QS inhibitörlerinin (QSIs) tanımlanabilmesi amacıyla doğal ve sentetik çok sayıda kimyasal madde taranarak inhibitör etkili birçok bileşik saptanmıştır. Bu bileşikler etkilerini üç farklı seviyede göstermektedirler: (i) AHL sentezinin engellenmesi, (ii) AHL sinyal molekülünün etkisizleştirilmesi ve (iii) AHL reseptör proteininin engellenmesi (Juhas et al., 2005; Rasmussen and Givskov, 2006).

şimdiye kadar yapılan bazı çalışmalarla *P. aeruginosa*'da ve diğer bazı önemli patojen bakterilerde çevreyi algılama sistemini bloke eden bazı maddeler tanımlanmıştır. Ancak bu maddelerin konağa karşı toksik olması veya konak tarafından tolere edilemeyecek konsantrasyonlarda etkili olmaları sebebiyle tedavide kullanılmaları mümkün olmamıştır. Tanımlanmış çevreyi algılama sistemini engelleyici bileşenlerin çoğu insan kullanımına uygun değildir. Toksisite ve canlı içindeki etki testleri potansiyel adayları azaltmıştır. Örneğin; halojenlenmiş furanonlar son derece toksik ve reaktif olmaları sebebiyle endüstride, tıpta ve tarımda kullanımları mümkün değildir (Saraçlı, 2006).

Bitkilerden elde edilen AHL analoglarıyla yapılan bakteriyel üremenin veya sinyal alımının engellenmesine karşı da bakteride bir direnç gelişimi söz konusu değildir. Antibiyotik olmayan bu engelleyicilerin tanımlanması, bitkiler ve hayvanlar gibi insanlarda da bakteriyel hastalıkların tedavisi için yeni fırsatlar sunabilmektedir.

Hem bitkiler hem de mantarlar milyonlarca yıldan beri çevreyi algılama sistemini kullanan bakterilerle işbirliği içindedirler. Bu mantar ve bitkilerin, çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşenleri üreterek, bu bakterilerin hastalık oluşturmalarını, kolonize olmalarını ve bulaşmalarını azalttıkları görülmüştür (Rasmussen and

Givskow, 2006). Nielsen vd., çevreyi algılama sistemini kullanarak, sarımsaktan elde edilen bileşenlerin LuxR üzerinde engelleme etkisinin olduğunu bulmuşlardır (Ni et al., 2008). Choo vd. (2006), vanilya özütüyle yaptıkları çalışma ile *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*)’da pigment üretimini engellediğini bulmuşlardır. Rasmussen vd. (2005a), bitkilerden burçak, havuç, soya fasülyesi, nilüfer, domates, bezelye tohumları, biber ve sarımsağın da bakteriyel çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşikler ürettiğini bulmuşlardır. Boşgelmez-Tınaz vd. (2006), *Scorzonera sandrasica* bitkisinin *C. violaceum* CV026, *C. violaceum* ATCC gibi indikatör bakterilerde ve *E. carotovora*’da çevreyi algılama ile düzenlenen aktiviteleri engellediğini saptamışlardır. *S. sandrasica*’dan elde edilen bileşenlerin, *E. carotovora*’da, çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen, karbapenem antibiyotiği üretimini engelleyebildiğini göstermişlerdir. Bu bitki patojeninde, patojeniteleri için gerekli olan ekstraselüler enzimler ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi çevreyi algılama sistemine bağlı olan 3-oxo-C₆-HSL tarafından düzenlenmektedir. Bu yüzden *S. sandrasica* tarafından salgılanan bileşenler aracılığıyla *E. carotovora*’nın çevreyi algılama sisteminin engellemesi, bitki hastalıklarına sebep olan bu fitopatogenlerin kontrol altında tutulmasına olanak sağlayabilir. Bu engelleyici bileşenlerin AHL reseptör proteinine bağlanarak AHL düzenleyici davranışları engelleyebildiğini rapor etmişlerdir. Girennavar vd. (2008), yaptıkları çalışma ile greyfurt suyundan elde ettikleri ve kanın pıhtılaşmasını önleyen furokumarin denen madde ile *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*’da biyofilm oluşumunu engellemişlerdir. Karanfil (*Syzygium aromaticum*) baharatının da viridans bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği, özellikle diş çürükleri ve diş eti hastalıkları ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Cai and Wu, 1996). Krishnan vd. (2012), karanfil baharatının metanol ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşunun kayma hareketini engellediğini ve piyosiyenin üretimini azalttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Khan vd. (2009), karanfil yağının da *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşunun kayma hareketi üzerinde inhibitör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da, çevreyi algılama sistemi üzerindeki potansiyel inhibitör etkileri QSI1 yöntemi ile test edilen bitkilerden anason ve ylang ylang yağlarının bu sistem üzerinde potansiyel inhibitör etkilerinin olduğu görülmüştür. Yapılan

literatür taramasında anason ve ylang ylang uçucu yağlarının veya çeşitli çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının ve bu yağların bileşiminde yüzde en fazla bulunan trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bakterilerde anti-QS özellikleri rapor edilmemiştir.

Yapmış olduğumuz GC-MS analizi sonucunda, anason ve ylang ylang yağlarında en yüksek düzeyde bulunan bileşenlerin (etken madde) sırasıyla anetol (%78,4) ve alfa iyonon (%25,76) olduğu tespit edilmiştir. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu ile edilen anason uçucu yağının, temel olarak trans-anetol (%90) içerdiği daha önce yapılmış olan çalışmalarla uyumludur (Rodrigues et al., 2003; Tabanca et al., 2004). Anason yağında tespit ettiğimiz diğer bileşen; benzil alkol (%21,5) iken, ylang ylang yağındaki diğer bileşenlerin; limonen (%1,05), o-metilanisole (%3,13), asetik asit fenil metil ester (%9,66), geranil asetat (%0,8), linalol (18,54), trisiklo (4.2.1 [2,5]) dec-3-en-9-ol asetat (%6,65), beta-iyonon (%5,1), lillal (%5,69), alfa-izometil iyonon (%0,95), amil salisilikat (%5,39), 2-propen-1-ol, 3-fenil asetat (%4,15) ve hekzil salisilikat (%13,88) olduğu tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada anason yağının anetol dışında daha az miktarda, gama-himakalen (%2-4), p-anisaldehit (<%1), estragol (%0,9-1,9), cis-pseudoisoeugenil-2-metilbütirat (%3) ve trans-pseudoisoeugenil-2-metilbütirat (%1,3) içerdiği rapor edilmiştir (Rodrigues et al., 2003). Anason uçucu yağının ayrıca mono-, sesqui- ve trinorsesquiterpenoidleri, propenilfenoller ve pseudoisoeugenoller içerdiği tespit edilmiştir (Tanca et al., 2006). Bir başka çalışmanın GS-MS analizinde, ylang-ylang yağının ana bileşenlerinin, linalol (%14,8), β -karyofilen (%13,5), γ -murolen (%15,5) ve α -trans-farnesen (%10,5) şeklinde olduğu bunun dışında kresol-metil-eter (%7,2), metil benzoat (%2,6), benzil asetat (%7,1), nerol (%0,5), geraniol (%0,8), eugenol (%0,3), geranil asetat (%3,0), α -kopaen (%1,1), metil eugenol (%0,4), β -kubeben (%0,2), β -elemen (%0,3), α -humulen (%2,6), bisiklogermakren (%0,4), α -murolen (%0,7), β -kurkumin (%1,0), δ -cadinen (%2,1), α -cadinen (%0,2), geranil bütirat (%0,3), trans-nerolidol (%0,3), kubenol (%0,3), T-murolol (%0,7), δ -cadinol (%0,3), α -cadinol (%0,8) ve benzil benzoat (%3,8) olduğu tespit edilmiştir (Tiziana et al., 1998). Farklı çalışmalarda rapor edilen uçucu yağların bileşimindeki maddelerde gözlenen bu farklılıklar, kullanılan cihaz ve yöntemin dışında distilasyon sırasında uygulanan

sıcaklık, distilasyon süresi ve bitkilerin yetiştiği ortam şartlarından kaynaklanıyor olabilir.

Yapmış olduğumuz QSI1 yöntemi neticesinde, trans-anetol ve 3-metil-alfa iyonenin de çevreyi algılama sistemi üzerinde potansiyel inhibitör etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla anason ve ylang ylang uçucu yağlarının *P. aeruginosa* suşlarının virülens faktörleri üzerindeki etkileri bu yağların ana bileşenleri olan trans-anetol ve 5-metil-alfa iyonon kullanılarak test edilmiştir.

Ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen bitki özütlerinin (iren kökü kloroform, iren kökü etil alkol, iren kökü etil asetat, iren kök içi kloroform, iren kök içi etil alkol, iren kök içi etil asetat, siyah hardal kloroform, siyah hardal etil alkol, siyah hardal etil asetat, vişne yaprağı kloroform, vişne yaprağı etil asetat, civanperçemi kloroform, civanperçemi etil alkol, civanperçemi etil asetat, tırşik pancarı kloroform, tırşik pancarı etil alkol ve tırşik pancarı etil asetat), çalışmalarımızda kullandığımız toplam 36 klinik *P. aeruginosa* suşu ve kontrol PAO1 suşu üzerinde antibakteriyel özelliklerinin olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde civanperçemi yağı ile bu bitkinin metil alkol ekstraktının da *P. aeruginosa* suşu üzerinde antibakteriyel aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Candan et al., 2003). Vişne yaprağı etanol ekstraktının da yine bizim sonuçlarımızda olduğu gibi *P. aeruginosa* suşu üzerinde antibakteriyel aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Piccirillo et al., 2010). Bu çalışmada siyah hardal tohumlarının *P. aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Benzer bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ancak bir başka çalışmada siyah hardal bitkisinin yapraklarının su ve kloroform ekstraktlarının *P. aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Jain et al., 2011). İren bitksinden elde edilen uçucu yağın *P. aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Nedorostova et al., 2009). İren kökünün ve tırşik pancarının çeşitli çözücülerdeki ekstraktlarının *P. aeruginosa* üzerindeki antibakteriyel etkisi daha önceki çalışmalarda rapor edilmemiştir.

QSI1 yöntemiyle anti-quorum sensing özelliğini tespit edilen anason ve ylang ylang bitkilerinden elde edilmiş uçucu yağların ve bu yağların etken maddeleri olan trans-anetol ve 3-metil-alfa iyonenin *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerinde antibakteriyel etki göstermediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Hammer vd. (1999), yapmış oldukları çalışmada anason ve ylang ylang uçucu yağlarının *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. Anason yağının, *P. aeruginosa* suşu üzerinde antibakteriyel etkisinin olmadığı daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Abu-Darwish et al., 2012; Prabuseenivasan et al., 2006). Benzer şekilde anason tohumunun alkol, kloroform, aseton ve etil asetat ekstraktlarının da *P. aeruginosa* suşu üzerinde antibakteriyel aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir (Ates and Erdogru, 2003; Gulcin et al., 2003). Anasonun metil alkol ekstraktının yalnızca bir dizi antibiyotiğe (gentamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, sefaleksim vs.) karşı *P. aeruginosa*'nın direncini azalttığı tespit edilmiştir (Aburjai et al., 2001).

Çalışmalarımızda kullandığımız toplam 36 klinik *P. aeruginosa* suşunun çevreyi algılama sistemi genlerinin (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*) varlığı, koloni PCR yöntemiyle araştırılmış ve 32 klinik izolatın tamamında *lasI* (605bp), *lasR* (725bp), *rhlI* (625bp), *rhlR* (730bp) çevreyi algılama sistemi genlerinin mevcut olduğu görülmüştür. Diğer 4 izolatın ikisinde (PI-29, PI-32) çevreyi algılama sistemi genlerinin olmadığı, ikisinde ise (PI-22, PI-34) yalnızca *lasR* (725bp) geninin olmadığı görülmüştür.

P. aeruginosa, kistik fibrozisli hastalarda, yanık yarası olan, bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde enfeksiyona neden olan fırsatçı bir patojendir (Bodey et al., 1983). *P. aeruginosa*'nın patojenitesi, çevreyi algılama sisteminin kontrolü altındaki hücre ilişkili ve ekstraselüler virülens faktörlerinin üretiminden kaynaklanmaktadır (Vasil, 1986). Çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında olan virülens faktörlerinin üretiminin, bitkilerden elde edilen doğal inhibitörlerle engellenmesi son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Bu çalışma kapsamında da, farklı hastalardan ve farklı enfeksiyon bölgelerinden izole edilmiş olan toplam 36 klinik *P. aeruginosa* suşunun, çevreyi algılama sisteminin kontrolü altında olan

elastaz, proteaz enzim aktivitesi, piyosiyenin pigmenti ve kayma hareketi şeklindeki virülens faktörlerinin üretim düzeyleri ile anason ve ylang ylang uçucu yağlarının ana bileşeni olan trans-anetol ve 3-metil alfa iyonenin bu suşların virülens faktörü üretimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

600nm değerinde yapılan ölçümlerde, testlerde kullanılan son konsantrasyonları sırasıyla %0,1 ve 6,67mM olan 3-metil alfa iyonin ve trans-anetolün çalışmış olduğumuz klinik suşların virülens faktörü üretim düzeyleri üzerindeki inhibitör etkileri, bakteri hücre sayısında bir azalmaya neden olmamıştır.

PI-22 ve PI-34 klinik izolatlarının *lasR* genlerinin olmadığı buna karşın; PI-22 klinik izolatının PAO1 kontrol suşuna göre %92 elastaz aktivitesinin olduğu, PI-34 izolatının ise PAO1 kontrol suşuna göre %24 kayma hareketinin ve %79 elastaz aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize *P. aeruginosa*'da elastaz enzim üretiminin yalnızca *las* ve *rhl* sistemleri ile değil aynı zamanda kinolon sistemi veya henüz keşfedilmemiş başka bir sistem tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. *P. aeruginosa*'daki QS sistemi ilk olarak, elastin proteinini hidrolize eden bir proteaz olan elastazı kodlayan *lasB* geninin ekspresyonunun 3-oxo-C₁₂-HSL ve LasR tarafından indüklendiği keşfedilmişti (Gambello ve Iglewski, 1991; Passador vd., 1993; Pearson vd., 1994). Daha sonra yapılan çalışmalarda *lasB*'nin C₄-HSL ve RhlR tarafından da kontrol edildiği rapor edilmiştir (Brint and Ohman, 1995; Pearson vd., 1995; Winson vd., 1995; Pearson vd., 1997). Hatta *P. aeruginosa*'da *lasB*'yi aktive eden üçüncü bir sinyal olan 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (PQS)'nin varlığı da gösterilmiştir (Pesci vd., 1999, McKnight vd., 2000). Elastaz üretiminden sorumlu *rhlRI* quorum sensing sisteminin LasR'den bağımsız olarak, PQS'nin üretimi ile aktive olabildiği de rapor edilmiştir (Diggle vd., 2003). Calfee vd. (2001)'de yapmış oldukları çalışmada PQS üretiminin metil-antranilat ile inhibisyonunun RhlR/C₄HSL bağımlı *lasB* ifadesini azalttığını rapor etmişlerdir. Bu da *rhl* sisteminin LasR yokluğunda PQS tarafından kontrol edilen bir mekanizma ile aktive edildiğini göstermektedir. Kayma hareketi de hem *las* hem de *rhl* sistemi tarafından kontrol edilmektedir. *lasR* ve *lasI* mutantlarında swarming hareketi azalırken *rhlR* ve *rhlI* mutantlarında kayma hareketi tamamen engellenmektedir.

Kayma hareketi için bakterinin yüzey gerilimini azaltan ramnolipitlere olan ihtiyacı göz önüne alındığında ramnolipid sentezinde görev alan ramnoziltransferaz enziminin gerekliliği akla gelmektedir. Ramnolipid molekülü ise sadece *rhl* sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu da *rhl* mutantlarında kayma hareketinin neden tamamen engellendiğini açıklamaktadır (Kohler vd., 2000, Diggle vd., 2002).

PI-29 ve PI-32 klinik izolatlarının *lasI-lasR* ve *rhlI-rhlR* genlerine sahip olmadıkları gibi test edilen virülens faktörlerini de üretemedikleri tespit edilmiştir.

Proteaz ve elastaz aktivitesi, piyosiyenin üretimi ve kayma hareketi, test edilen suşlarda PAO1 aktivitesinden ortalama olarak daha düşük saptanmış, ancak PAO1'den daha yüksek aktivite gösteren suşların mevcudiyeti de belirlenmiştir. Proteaz aktivitesi daha yüksek olan suşlar PI-12 ve PI-30; piyosiyenin üretimi daha fazla olan suş PI-3; kayma hareketi daha fazla olan suş PI-21 olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, izolasyon bölgesi ne olursa olsun bazı izolatların önemli bir şekilde yüksek veya önemli bir şekilde düşük düzeylerde elastaz üretmiş olması bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir (Rumbaugh, 1999b). Bir başka çalışmada da yine, izolasyon bölgesi ne olursa olsun bazı *P. aeruginosa* izolatlarının ya hiç elastaz aktivitesinin olmadığı ya da bazılarının çok düşük düzeylerde olduğu halde diğerlerinin çok yüksek düzeylerde olduğu rapor edilmiştir (Hamood et al., 1996). Bazı virülens faktörlerini üretemeyen suşların ise daha az virulent olduğu bulunmuştur (Pollack, 2000; Tang et al., 1996).

3-metil alfa iyonon, kontrol PAO1 suşunun kayma hareketi üzerinde %55 inhibisyona neden olurken, kayma hareketlerinin olduğu tespit edilen 28 klinik suşun 16 tanesinde (PI-1, PI-2, PI-3, PI-4, PI-6, PI-8, PI-9, PI-12, PI-15, PI-18, PI-23, PI-25, PI-31, PI-33, PI-34, PI-36) %100 inhibisyona neden olurken, diğerlerinde (PI-5, PI-7, PI-11, PI-13, PI-16, PI-17, PI-19, PI-20, PI-21, PI-24, PI-30, PI-35) %17-70 inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ise kontrol PAO1 suşunun kayma hareketi üzerinde %68 inhibisyona neden olurken klinik suşların 17 tanesinde (PI-1, PI-2, PI-3, PI-4, PI-5, PI-8, PI-12, PI-15, PI-18, PI-19, PI-23, PI-25, PI-30, PI-31, PI-33, PI-34, PI-36) %100 inhibisyona neden olurken diğerlerinde (PI-6, PI-7, PI-9,

PI-11, PI-13, PI-16, PI-17, PI-20, PI-21, PI-24, PI-35) %23-75 inhibisyona neden olmuştur.

3-metil alfa iyonon, kontrol PAO1 suşunun proteaz aktivitesi üzerinde %50 inhibisyona neden olurken, proteaz aktivitelerinin olduğu tespit edilen 13 suşdan yalnızca 6 tanesinde (PI-4, PI-6, PI-9, PI-33, PI-35, PI-36) %100 inhibisyona neden olmuştur. Diğerlerinde (PI-2, PI-10, PI-12, PI-14, PI-18, PI-21, PI-30) ise %14-48 arasında inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ise kontrol PAO1 suşunun proteaz aktivitesi üzerinde %56 inhibisyona neden olurken, PI-9, PI-33, PI-35 ve PI-36 klinik suşlarının proteaz aktiviteleri üzerinde %100, diğerlerinde (PI-2, PI-4, PI-6, PI-10, PI-12, PI-14, PI-18, PI-21, PI-30) ise %15-50 arasında inhibisyona neden olmuştur.

3-metil alfa iyonon, kontrol PAO1 suşunun elastaz aktivitesi üzerinde %62 inhibisyona neden olurken, elastaz aktivitelerinin olduğu tespit edilen 17 klinik izolatın 4 tanesinde (PI-8, PI-23, PI-26, PI-30) %79-99 inhibisyona neden olurken diğerlerinde (PI-2, PI-3, PI-4, PI-9, PI-10, PI-12, PI-14, PI-18, PI-21, PI-22, PI-33, PI-34, PI-35) %45-70 inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ise kontrol PAO1 suşunun elastaz aktivitesi üzerinde %59 inhibisyona neden olurken, PI-23, PI-26, PI-30 klinik suşları üzerinde %6-47 inhibisyona diğerlerinde ise %60-90 inhibisyona neden olmuştur.

3-metil alfa iyonon, kontrol PAO1 suşunun piyosiyanın üretim düzeyi üzerinde %56 inhibisyona neden olurken, piyosiyanın pigmentini ürettiği tespit edilen 15 klinik suşun 5 tanesinde (PI-10, PI-14, PI-24, PI-27, PI-33) %81-96 inhibisyona diğerlerinde (PI-2, PI-3, PI-7, PI-8, PI-9, PI-11, PI-12, PI-15, PI-16, PI-21) %60-77 inhibisyona neden olmuştur. Trans-anetol ise kontrol PAO1 suşunun piyosiyanın üretim düzeyi üzerinde %95 inhibisyona neden olurken, diğer suşların piyosiyanın üretim düzeyleri üzerinde %79-99 inhibisyona neden olmuştur.

Çalışmalarımızda kullandığımız klinik suşların bazılarının, çevreyi algılama sisteminde yer alan *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* genlerini taşıdıkları ancak test ettiğimiz

bazı virölens faktörlerini üretemedikleri veya kontrol PAO1 suşuna oranla daha az ürettikleri tespit edilmiştir. Bu sonuç ise bize bu genlerde mutasyon olabileceğini dolayısıyla bu virölens faktörlerinin sentezinden sorumlu genlerin mRNA'larının üretilmiyor olabileceğini düşündürmektedir, nitekim daha önce yapılmış olan çalışmalar *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* çevreyi algılama sistemlerindeki mutasyonların piyosiyanın üretiminde azalmaya sebep olduğunu ortaya koymuştur (McKnight et al., 2000; Cao et al., 2001; Gallagher et al., 2002). Bu özellikteki klinik izolatların, tam fonksiyonel çevreyi algılama sistemine sahip olmamalarına rağmen, farklı enfeksiyonları oluşturabildiklerini göstermeleri açısından, taşıdıkları *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* genleri için dizi analizlerinin yapılması bir başka çalışma konusu olarak belirlenebilir. Laboratuvar ortamında hazırlanmış ve çoğunlukla *lasR*, *lasI*, *rhlR* ve *rhlI* genlerinde mutasyon oluşturulan suşların; yanıklı, akut ve kronik akciğer hastalığı bulunan fare modellerinde enfeksiyonu başlattığı bildirilmiştir (Tang et al., 1996, Rumbaugh et al., 1999a; Pearson et al., 2000). Yine de bu çalışmaların çoğu, tek tip ve saf laboratuvar suşuyla gerçekleştirilmiş olup, farklı enfeksiyon bölgelerinden izole edilmiş klinik izolatlarla yapılmış çalışmalar çok azdır.

Kronik enfeksiyonlardan izole edilen suşların hareket yeteneklerinin daha az olduğu hatta kayma hareketi yapamadığı tespit edilmiştir (Tielen et al., 2011). Bu sonuçlar uzun süre devam eden enfeksiyonlar süresince spesifik koşullara adaptasyon sağlayabilmek için suşların evrimsel gelişimini ortaya koymaktadır.

P. aeruginosa kistik fibrozlu olsun ya da olmasın tüm solunum yolu enfeksiyonlarında çeşitli virölens faktörleri üretmektedir. Kan ve üriner sistem gibi diğer vücut bölgeleri için de benzer durum söz konusudur. Dolayısıyla *P. aeruginosa*'ya bağlı enfeksiyon gelişiminde vücut bölgesi ne olursa olsun araştırılan virölens faktörünün de az ya da çok katkısı vardır; diğer bir deyişle bu virölens faktörlerinin birbirleriyle yardımlaşmaları sonucu bir çevre mikroorganizması olan *P. aeruginosa* enfeksiyon etkeni olmayı başarabilmektedir.

Elde ettiğimiz bu bulgular, çevreyi algılama sisteminde bozukluk olabileceğini düşündüğümüz suşların bazı virölens faktörlerini üretemedikleri halde hala

şansının yüksek olduğu görüşündeyiz. Tıpta, bakterilerin antibiyotiklere karşı hızla direnç kazanması, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalmasına dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesine ve gereksiz kullanım nedeniyle hem direncin yayılmasına hem de ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Sadece insan patojenleri değil, bitki patojenlerinin de çevreyi algılama sistemini kullanarak enfeksiyonlar oluşturması, ekonomik değeri olan patates, havuç, turp, kereviz gibi zirai bitkilerde büyük miktarda yıllık ürün kaybına ve sonuç olarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dolayısıyla, bitki ve hayvanlarda Gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların önerilen yöntem ile tedavi edilmesi ulusal ekonomiye de katkıda bulunacaktır. Kısaca, bu tez çalışmasının çıktıları, tıbbi ve zirai alanda bakteriyel hastalıklarla savaşta kullanılabilecek yeni stratejilerin geliştirilmesine önemli katkılarda bulunacaktır. Direkt bakteriyi öldürmek yerine, çevreyi algılama sisteminin bloke edilmesi nedeniyle bu özütlerle karşı direnç gelişimi söz konusu olmayacaktır. Ayrıca antibiyotiklerin aksine, bitki özütleri antibakteriyel etki göstererek değil, bakterilerin haberleşme sistemini bloke ederek etki gösterdikleri için, canlılarda özellikle de insanlarda kullanıldıklarında bağırsak florası gibi vücudun normal florasına zarar verme olasılıklarının da çok düşük olması bu yaklaşımın diğer bir avantajı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abu-Darwish, M. S., Al-Ramamneh, E. A., Kyslychenko, V. S., Karpiuk, U. V., 2012. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region - South of Jordan. Pak. J. Pharm. Sci., 25 (1), 239-46.
- Aburjai, T., Darwish, M. R., Al-Khalil, S., Mahafza, A., Al-Abbadi, A., 2001. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Ethnopharmacology, 76, 39-44.
- Adams, R. P., Hagerman, A., 1977. Diurnal variation in the volatile terpenoids of *Juniperus scopulorum* (Cupressaceae). American Journal of Botany, 64 (3), 278-285.
- Akova, M., 2005. Bakteriler arası iletişimin engellenmesi: Umut vadeden yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı. Ankem, 19, 126-128.
- Aksoy, H. M., Kara, Ç., 2012. Bitki patojeni bakterilerde salgı sistemleri. Anadolu Tarım Bilim. Derg., 27 (1), 48-54.
- Alcorn, J. F., Wright, J. R., 2004. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. J. Biol. Chem., 279, 30871-30879.
- Algun, U., Arisoy, A., Gunduz, T., Ozbakkaloglu, B., 2004. The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics. Indian J. Med. Microbiol., 22, 112-114.
- Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P., Pier, G. B., 2000. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. Infect. Immun., 68, 3998-4004.
- Anonim, 2005. The pseudomonas. www.cvm.uiuc.edu/courses/vp331/pseudomonas/pseudomonas.html. Erişim Tarihi: 12.11.2010.
- Anonim, 2011. http://botanigin-b-si.blogspot.com/2011_05_01_archive.html. Erişim Tarihi: 04.06.2011.
- Anwar, H., Strap, J. L., Costerton, J. W., 1992. Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36, 1347-1351.

- Arda, M., Aydın, N., Ilgaz, A., Minbay, A., Kahraman, M., İzgür, M., Leloğlu, N., Akay, Ö., Diker, K.S., 1997. Özel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, 4, 91-96.
- Arslan, N., Gurbuz, B., Sarıhan, E. O., 2004. Variation in essential oil and composition in Turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations. Turk J. Agric. For, 28, 173-177.
- Ates, D. A., Erdogrul, O. T., 2003. Antimicrobial activity of various medicinal and commercial plants extracts. Turk J. Biol., 27, 157-162.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moor, D., Seidman, J., Smith, J. Stauhle, K., 1988. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Intersciences, New York. .
- Ayaz, D., Erol, İ., 2004. Canlı fakat kültürü yapılamayan bakteriler ve gıda güvenliği yönünden önemi. Etlik Vet. Mik. Dergisi, 15 (1-2), 66.
- Ayyıldız, A., Kocazeybek, B., Arıtürk, S., 2002. Değişik klinik örneklerden izole edilen Acinetobacter ve Pseudomonas suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Dergisi, 16 (1), 1-3.
- Backhouse, C. N., Delporte, C. L., Negrete, R. E., Erazo, S., Zuñiga, A., Pinto, A., Cassels, B. K., 2001. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with antiinflammatory and antipyretic activities. J. Ethnopharmacol., 78 (1), 27-31.
- Bainton, N. J., Stead, P., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P., 1992. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. Biochem. J., 15, 997-1004.
- Bassler, B. L., Losick, R., 2006. Bacterially speaking. Cell, 237-246.
- Battino, M., Ferreiro, M. S., Fattorini, D., Bullon, P., 2002. *In vitro* antioxidant activities of mouthrinses and their components. J. Clin. Periodontol., 29 (5), 462-467.
- Baydar, H., 2007. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, 51, 221s., Isparta.
- Baytop, T., Mathew, B., 1984. The bulbous plants of Turkey. B.T. Batsford Ltd., London.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de bitkiler ile tedavi. İ. Ü., Nobel Tıp Kitabevleri, 3255, 480s., İstanbul.

- Baytop, T., 2000. Anadolu dağlarında 50 yıl. Nobel Tıp Kitapevleri, 188s., İstanbul.
- Baytop, T., Kadioğlu D., 2002. İstanbul Bölgesi'nin tıbbi bitkileri. In: 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Beech, I. B., Gaylarde, C. C., 1989. Adhesion of bacteria to mild steel surfaces. J. Appl. Bacteriol., 67, 2017.
- Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., Venturi, V., 2003. Role of GacA, LasI, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of stationaryphase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. Archives of Microbiology, 18, 264-271.
- Bilgehan, H., 2000. Fermentasyon yapmayan gram olumsuz bakteriler. In: Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. (Bilgehan, H., -ed), Fakülteler Kitapevi, 422s., İzmir.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H-P., Rygaard, J., Moser, C., Eberl, L., Hoeiby, N., Givskov, M., 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. Microbiol., 151 (12), 3873–3880.
- Bjarnsholt, T., Givskov, M., 2007. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. Anal Bioanal Chem, 387 (2), 409-414.
- Bjarnsholt, T., van Gennip, M., Jakobsen, T. H., Christensen, L. D., Jensen, P. Ø., Givskov, M., 2010. *In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect. Nat. Protoc., 5 (2), 282-293.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, I., 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis., 5, 279–313.
- Boşgelmez-Tınaz, G., 2003. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. Turk Journal of Biology, 27, 85-93.
- Boşgelmez-Tınaz, G., Ulusoy, S., Ugur, A., Ceylan, Ö., 2006. Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*. Current Microbiology, 1-20.
- Brint, J. M., Ohman, D. E., 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer responsive LuxR-LuxI family. J. Bacteriol., 177, 7155–7163.
- Bruhn, J. B., Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buchholtz, C., Larsen J. L., Gram, L., 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in

- Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65, 43-52.
- Bullitt, R., Makowski, L., 1995. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature*, 373, 164-167.
- Byers, J. T., Lucas, C., Salmond, G. P., Welch, M., 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J. Bacteriol.*, 184, 1163–1171.
- Cai, L., Wu, C. D., 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J. Nat. Prod.*, 59, 987–990.
- Calfee, M. W., Coleman, J. P., Pesci, E. C., 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 11633–11637.
- Callahan, L. T., 1976. *P. aeruginosa* exotoxin: Purification by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and the development of a highly specific antitoxin serum. *Infection and Immunity*, 14, 55-61.
- Camara, M., Williams, P., Hardman, A., 2002. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *The Lancet Infectious Diseases*, 2, 667–676.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., Akpulat, A. H., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215–220.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., Rahme L.G., 2001. A quorum sensing associated virulence gene of *P. aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14613–14618.
- Cardoza, V., Stewart, C. N., 2004. Invited review: Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In vitro*, *Cell Development Biology in Plant*, 40, 542–551.
- Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Soro, C., 2002. Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (6), 1492-1496.
- Carrier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D., 2003. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4989–4993.

- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M., Samore, M. H., 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different anti pseudomoal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 1379-1382.
- Cha, J. D., Jung, E. K., Kil, B. S., Lee, K. Y., 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17 (12), 2061-2065.
- Chericoni, S., Prieto, J. M., Iacopini, P., Morelli, I., 2005. Essential oils of commonly used plants as inhibitors of peroxynitrite-induced tyrosine nitration. *Fitoterapia.*, 76 (5), 481-483.
- Choo, J. H., Rukayadi, Y., Hwan, J. K., 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 42, 637–641.
- Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, M. J., Zabner, J., Greenberg, E. P., 2004. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (10), 3587-3590.
- Chrzanowski, G., 2008. Infuence of phenolic acids isolated from blackcurrant and sour cherry leaves on grain aphid (*Sitobion avenae* F.). *Pestycydy*, 1-2, 127-133.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. (CLSI) document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Walley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Coffin, D. E., 1971. A method for the isolation and identification of the flavanone glycosides of citrus fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19, 513–516.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesy, G. G., Lad, T. T., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41, 435-464.
- Costerton, J. W., Steward, P. S., Greenberg, E. P., 1999. Bacteriel biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 13-18.
- Cowell, B. A., Twining, S. S., Hobden, J. A., Kwong, M. S., Fleiszig, S. M., 2003. Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology*, 149 (8), 2291-2299.

- Dastmalchi, K., Dorman, H. J. D., Oinonen, P. P., Darvis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008. Chemical composition and *in-vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. Science Direct LWT, 41, 391–400.
- Davis, P. H., 1965. Flora of Turkey. Edinburgh University, University Press, 1, 265p. Edinburgh.
- Davis, P. H., 1984. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburgh University, University Press, 8, 633p. Edinburgh.
- de Kievit, T. R., Iglewski, B. H., 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect. Immun., 68, 4839-4849.
- Deretic, V., Schurr, M. J., Yu, H., 1995. *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. Trends Microbiol, 3 (9), 351-356.
- Denning, G. M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L., Britigan, B. E., 1998. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. Infect. Immun., 66 (12), 5777-5784.
- Di Bonaventura, G., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I., Piccolomini, R., 2004. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime. Antimicrob. Agents Chemother., 48, 151-160.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. and Cámara, M. 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. J. Bacteriol., 184, 2576–2586.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M., Williams, P., 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol. Microbiol., 50, 29-43.
- Donabedian, H., 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. Journal of Infection, 46, 207-214.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H., 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 3526–3531.

- Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F. & Zhang, L. H., 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 411, 813–817.
- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H. L., Greenberg, P., Zhang, L., 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 56, 1287–1301.
- Donlan, R. M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerg. Inf. Disease*. 8, 881-890.
- Douglas, L. J., 2003. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol.*, 11, 30-36.
- Dowell, P., Affas Z., Reynolds, C., Holden, M. T. G., Wood, S. J., Saint, S., Cockayne, A., Hill, P. J., Dodd, C. E. R., Bycroft, B. W., Chan, W. C., Williams, P., 2001. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 41 (2), 503–512.
- Doyle, T. B., Hawkins, A. C., Mccarter, L. L., 2004. The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 186 (19), 6341-6350.
- Drenkard, E., Ausubel, F. M., 2002. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 740-743.
- Drenkard, E., 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.*, 5, 1213-1219.
- Eberhard, A., 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.*, 109, 1101-1105.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H., Oppenheimer N. J., 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*, 20, 2444-2449.
- Engbrecht, J., Nealson, K., Silverman. M., 1983. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32, 773-781.
- Erdem, B., 1999. Pseudomonaslar. In: Temel ve klinik mikrobiyoloji. (Ustaçelebi, Ş., -ed), Gündeş Kitabevi, 551-557, Ankara.
- Erenler, R., 1997. Yüksek ardıç (*Juniperus excelsa* Bieb.)’ın meyvelerindeki bileşiklerin izolasyonu, yapı tayini ve aktivite testleri. Gaziosmanpaşa Ün., Yüksek Lisans Tezi, 68s., Tokat.

- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., Crawford, I., 1990. Identification and Characterization of genes for a second anthranilate synthase in *P. aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J. Bacteriol.*, 172, 884–900.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A., 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.*, 66, 43-51.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L., Araújo, M. E., 2006. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacol.*, 108 (1), 31-37.
- Fletcher, M., Lessman, J. M., Loeb, G. I., 1991. Bacterial surface adhesives and biofilm matrix polymers of marine and freshwater bacteria. *Biofouling*, 4, 129-140.
- Foley, I., Marsh, P., Wellington, E. M., Smith, A. W., Brown, M. R., 1999. General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *Antimicrob. Chemother.*, 43, 164-165.
- Fuqua, C., Winans, S. C., Greenberg, E. P., 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176, 269–275.
- Fuqua, C., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., 2001. Regulation of gene expression by cell to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.*, 35, 439–468.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C., Manoil, C., 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 184, 6472-6480.
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., and Spring, D. R. 2011. Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of ahl and ai-2 quorum sensing pathways. *Chem. Rev.*, 111, 28–67.
- Gambello, M. J., Iglewski, B. H., 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.*, 173, 3000-3009.
- Gauthier, A, Thomas, N. A., Finlay, B. B., 2003. Bacterial injection machines. *J. Biol. Chem.*, 278, 25273–25276.

- Gaydou, E. M., Randriamiharisoa, R., Bianchini, J-P., 1986. Composition of the essential oil of Ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson forma genuina) from Madagascar. J. Agric. Food Chem., 34, 481-487.
- Genç, L., 2010. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları ve Etiği. Anadolu Üniversitesi, Web-Ofset Tesisleri, 2098, 345s. Eskişehir.
- Ghigo, J. M., 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature, 412, 442-445.
- Giamakis, A., Kretsi, O., Chinou, I., Spyropoulos, C. G., 2001. *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and beta-pinene by *in vitro* cultures. Phytochemistry., 58 (2), 351-355.
- Girenavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G. K., Pillai, S. D., Patil, B. S., 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. International Journal of Food Microbiology, 125, 204–208.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S., 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. J. Bacteriol., 178, 6618-6622.
- Gökçe, N., Karlıkaya, E., 2002. Okaliptüs (*Eucalyptus globulus*): Sıtma Ağacı *Eucalyptus (Eucalyptus globulus)*: Malaria Tree. Trakya Ün. Tıp Fak. Dergisi., 19 (3-4), 189-194.
- Gören, A. C., Topcu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydogmus, Z., Pezzuto, J. M., 2002. The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *Stoechas*. Z. Naturforsch., 57, 797-800.
- Grande, K. K., Gustin, J. K., Kesler, E., Ohman, D. E., 2007. Identification of critical residues in the propeptide of LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* involved in the formation of a stable mature protease. J. Bacteriol., 189 (11), 3960-3968.
- Gupta, S. K., Berk, R. S., Masinick, S., Hazlet, L. D., 1994. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. Infect. Immun., 62, 4572-4579.
- Guzzo, J., Pages, J. M., Duong, F., Lazdunski, A., Murgier, M., 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. J. Bacteriol., 173, 5290-5297.

- Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., Seber, E., 2004. Hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-Test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 34, 33-36.
- Gülay, Z., 2010. Enfeksiyon patogenezi. Solunum sistemi enfeksiyonları, 11-47, http://www.toraks.org.tr/toraks-kitap-pdf/solunum_sistemi_PDF/03.pdf. Erişim Tarihi: 14.04.2010.
- Gulcin, İ., Oktay, M., Kirecci, E., Küfrevioğlu, Ö., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food Chem., 83, 371-382.
- Güler, S., 2006. Defne (*Laurus nobilis* L.) Yaprağı Verimi Üzerinde Etkili Faktörlerin Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar (Antalya - Manavgat – Yaylaalan Örneği). Süleyman Demirel Üniv., Yüksek Lisans Tezi, 72s., Isparta.
- Gür, D., 2003. Hastane enfeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram negatif mikroorganizmalar. Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 7 (3), 111-117.
- Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A. R., Mohseni, M., 2000. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. J. Ethnopharmacol., 71 (1-2), 187-192.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86, 985-990.
- Hamood, A. N., Griswold, J. A., Duhan, C. M., 1996. Production of extracellular virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from tracheal, urinary tract, and wound infections. J. Surg. Res., 61, 425-432.
- Hardman, A. M., Stewart, G. S. A. B., Williams, P., 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 74, 199-210.
- Harunur, R. M., Arthur, K., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4885-4890.
- Hausner, M., Wuertz, S., 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by in situ analysis. Appl. Environ. Microbiol., 65, 3710-3713.
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M. R., 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. J. Bacteriol., 183, 5395-5401.

- Hentzer, M., Givskov, M., 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.*, 112 (9), 1300-1307.
- Hentzer, M, Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Høiby, N., Givskov, M., 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22 (15), 3803-3815.
- http 1: http://en.wikipedia.org/wiki/Cananga_odorata. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 2: <http://en.wikipedia.org/wiki/Eucalyptus>. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 3: <http://en.wikipedia.org/wiki/Myrtus>. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 4: <http://en.wikipedia.org/wiki/Rosemary>. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 5: http://en.wikipedia.org/wiki/Lavandula_stoechas. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 6: http://en.wikipedia.org/wiki/Juniperus_communis. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 7: http://en.wikipedia.org/wiki/Lilium_candidum. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 8: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lemon>. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 9: <http://en.wikipedia.org/wiki/Safflower>. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 10: http://en.wikipedia.org/wiki/Prunus_cerasus. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- http 11: <http://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish>. Erişim Tarihi: 05.07.2011.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P., Haas, D., 2004. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 186 (10), 2936-2945.
- Hogan, D. A., 2006. Talking to themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, 5, 613–619.
- Hoiby, N., 2002. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 235-238.
- Hood, S. K., Zottola, E. A., 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 145-153.

- Houldt, R. V., Michaels, C. W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156, 626-633.
- Hovey, A. K., Frank, D. W., 1995. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *P. aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.*, 177, 4427-4436.
- Howard, B. J., Klas, J., Rubin, S. J., Weissfeld, A. S., Tilton, R. C., 1987. Nonfermentative gram negative bacteria. In: *Clinical and Pathogenic Microbiology* (Carson, D., Bircher, S., -eds), 329-358, St Luis, Washington DC, Toronto.
- Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J., Maxwell, E. S., 1978. *P. aeruginosa* Exoenzyme S: An adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3211-3215.
- Iglewski, B. H., 2002. *Pseudomonas*. *Medmicro* Chapter 27. <http://gsbs.utmb.edu/microbook>. Erişim Tarihi: 05.11.2010.
- Ishikawa, T., Fujimata, E., Kitajima, J., 2002. Water-soluble constituents of anise: new glucosides of anethole glycol and its related compounds. *Chem Pharm Bull.*, 50 (11), 1460-1466.
- Jaffar-Bandjee, M. C., Lazdunski, A., Bally, M., Carrere, J., Chazalette, J. P., Galabert, C., 1995. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (4), 924-929.
- Jäger, A. K., Gauguin, B., Adersen, A., Gudiksen, L., 2006. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat epilepsy and convulsions. *J. Ethnopharmacol.*, 105, 294-300.
- Jain, S., Ohman, D. E., 2005. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 73 (10), 6429-6436.
- Jain, B., Kanzarkar, A., Jain, V. K., 2011. Comparative analysis of the anti-bacterial and anti-fungal activity of five selected indian medicinal plants on human pathogenic microorganisms. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2 (1), 437-442.
- Jarvis, F. G., and Johnson, M. J., 1949. A glycolipid produced by *P. aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 4124-4126.
- Jenkinson, H. F., Lappin-Scott, H. M., 2000. Biofilms adhere to stay, *Trends Microbiol.*, 9, 9-10.

- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J. R., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S., Winson, M. K., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B., Williams, P., 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. EMBO Journal, 12 (6), 2477-2482.
- Juhas, M., Eberl, L., Tümler, B., 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ. Microbiol., 7 (4), 459-471.
- Jurado, J. M., Ballesteros, O., Alcázar, A., Pablos, F., Martín, M. J., Víchez, J. L., Navalón, A., 2007. Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks by headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry and chemometrics. Talanta, 72 (2), 506-511.
- Kang, P. J., Hauser, A. R., Apodaca, G., Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J., Mostov, K., Engel, J. N., 1997. Identification of *P. aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. Mol. Microbiol., 24, 1249-1262.
- Karadenizli, A., Kolaylı, F., Gündeş, S., Ergen, K., 2002. *Pseudomonas aeruginosa*'nın tikarsilin-klavulanik aside duyarlılığının hastanede kullanıma girmeden ve kullanıma girdikten bir yıl sonraki değişiminin araştırılması. Klimik, 15, 89-91.
- Karatuna, O., Yağcı, A., 2008. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrob. Cem. Derg., 38, 42-51.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., 1997. Pseudomonadaceae. In: Tıbbi mikrobiyoloji. (Küçüker, M. A., Tümbay, E., Anđ, Ö., -eds), Nobel Tıp Kitapevleri, No: 8, 230s., İstanbul.
- Kayser F., 2005. Basic Principles of Medical Microbiology and Immunology. In: Medical Microbiology. (Kayser F., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R., -eds.) Thieme Stuttgart New York, 18-20, New York.
- Keene, E. W., Markum, A. C., Samadpour, M., 2004. Outbreak of *P. aeruginosa* infections caused by commercial piercing of upper ear cartilage. Jama, 291, 981-985.
- Kempner, E. S., Hanson F. E., 1968. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. J. Bacteriol., 95, 975-979.
- Kenar, M., 2009. Aromatik bitkilerden elde edilen doğal antioksidanların balık filetosu üzerindeki duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik etkilerinin incelenmesi. Çukurova Ünü., Yüksek Lisans Tezi, 80s., Adana.

- Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M., Ahmad, I., 2009. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, 354–360.
- Krishnan, T., Yin, W.-F., Chan, K.-G., 2012. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by ayurveda spice clove (*Syzygium aromaticum*) bud extract. *Sensors*, 12, 4016-4030.
- Kıran, Ö., 2006. Kozan yöresi florasındaki tıbbi bitkiler ve bunların halk tıbbında kullanılışı. Çukurova Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 54s., Adana.
- Kim, H. J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H. Y., Jin, Z., 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (10), 2849-2854.
- Kipnis, E., Guery, B. P., Tournoy, A., Leroy, X., Robriquet, L., Fialdes, P., Neviere, R., Fourier, F., 2004. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock* 21 (5), 444–451.
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.*, 36, 78-91.
- Kline, T., Bowman, J., Iglewski, B. H., de Kievit, T., Kakai, Y., Passador, L., 1999. Novel synthetic analogs of the *Pseudomonas* autoinducer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 3447–3452.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., Pechere, J. C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.*, 182 (21), 5990-5996.
- Koneman, E., Stephan, D. A., William, M. J., Schreckenberger, P. C., Winn, C. W. Jr., 2006. The nonfermentative Gram-negative bacilli. Konoman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia, Lippincott, 303-391.
- Kujundzic, E., Fonseca, A. C., Evans, E. A., Peterson, M., Greenberg, A. R., Hernandez, M., 2007. Ultrasonic monitoring of early-stage biofilm growth on polymeric surfaces. *J. Microbiol. Methods*, 68 (3), 458-467.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., Vasil, M. L., 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 7072-7077.

- Lassen, J., 1975. Rapid identification of gram negative rods using three tube methods combined with dictiomic key. *Acta. Path. Microb. Scand.*, 83, 525-532.
- Lau, G. W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D. J., Mavrodi, D., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.*, 72 (7), 4275-4278.
- Lautrop, H., 1961. *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl.*, 11, 107-108.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., Caldwell, D. E., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, 173 (20), 6558-6567.
- Lazazzera, B. A., Grossman, A. D., 1998. The ins and outs of peptide signalling. *Trends Microbiol.*, 6, 288-294.
- Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J., Yum, D. Y., Koo, B. T. & Lee, J. K., 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3919-3924.
- Leidal, K. G., Munson, K. L., Denning, G. M., 2001. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 25, 186-195.
- Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B., 2000. Use of ELLSA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1851-1856.
- Lewandowski, Z., 2000. Notes on biofilm porosity. *Wat. Res.*, 34 (9), 2620-2624.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., Menichini, F., 2007. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Res.*, 27 (5), 3293-3299.
- Mah, T. F. C., O'Toole, G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 9, 34-39.
- Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Speert, D. P., 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.*, 62, 596-605.
- Maier, R. M., Soberon-Chavez, G., 2000. *P. aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 625-633.

- Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A. W., Thibodeaux, B. A., O' Callaghan, R. J., Wright, J. R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 288, 409-418.
- Manefield, M., de Nys, R., Kumar, N., Read, R., Givskov, M., Steinberg, P., Kjelleberg, S., 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 145 (2), 283-291.
- Matsumoto, K., 2004. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratia keratitis. *Biol. Chem.*, 385 (11), 1007–1016.
- Mattick, J. S., 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 289-314.
- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143, 3703–3711.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H., Pesci, E. C., 2000. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *P. aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182, 2702-2708.
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plesiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., 2007. *Pseudomonas aeruginosa*. resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13 (6), 560-578.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., Holder, I. A., 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 64, 518–523.
- Meyer, J. M., 2000. Pyoverdins. pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, 174 (3), 135-142.
- Mueller, R. F., 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Wat. Res.*, 30 (11), 2681-2690.
- Nealson, K. H, Platt, T., Hastings, J. W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *J. Bacteriol.*, 104, 313-322.

- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20 (2), 157-160.
- Ni, N., Li, M., Wang, J., Wang, B., 2008. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Medicinal Research Reviews*, 65-124.
- Nicas, T., Bradley, I., Lochner, J. E., Iglewski, B. H., 1985. The role of exoenzyme S in infections with *P. aeruginosa*. *J. Infect. Dis.*, 152, 716-721.
- Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P. E., Walmsley, H. L., 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 518-523.
- Novick, R. P., Muir, W. M., 1999. Virulence gene regulation by peptides in Staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 40-45.
- Oğur, R., 1994. Mersin Bitkisi (*Myrtus Communis* L.) hakkında bir inceleme. *Gata Tıp Fak. Çevre Dergisi*, 10, Ankara.
- Ohman, D. E., Cryz, S. J., Iglewski, B. H., 1980. Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J. Bacteriol.*, 142, 836-842.
- O'toole, G. A., 2003. To build a biofilm. *J. Bacteriol.*, 185 (9), 2687-2689.
- Otto, M., 2004. Quorum-sensing control in Staphylococci—a target for antimicrobial drug therapy?. *FEMS Microbiology Letter*, 241, 135-141.
- Özcan, M., Chalchat, J. C., 2005. Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *J. Med. Food*, Fall., 8 (3), 408-411.
- Özdemir, G. E., 2010. *Pimpinella anisum* L. bitkisinin fitoterapideki önemi. Gazi üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 72s., Ankara.
- Padera, R. F., 2006. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm, *cardiovasc. Pathol.*, 15, 264- 270.
- Pagula, P. F., Baser, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., 2000. Essential oil composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from Mozambique. *J. Essent. Oil Res.*, 12, 333-335.
- Palleroni, N. J., 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*. A personal view. *Microbiology*, 149 (1), 1-7.

- Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y. and Lee, J. K., 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiol.*, 149, 1541–1550.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Greenberg, E. P., 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4360–4365.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., Iglewski, B. H., 1993. Expression of *P. aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, 260, 1127-1130.
- Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P., Poole, K., 2007. Influence of quorum-sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 189 (22), 8357-8360.
- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P., Saier MH, J. R., 2003. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149 (11), 3051-3072.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P., 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91 (1), 197–201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P., 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1490-1494.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C., Iglewski, B. H., 1997. Role of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in the control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.*, 179, 5756-5767.
- Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H., Prince, A., 2000. *P. aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.*, 68, 4331-4334.
- Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skinders, M. E., Givskov, M., Nielsen, J., 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org. Biomol. Chem.*, 3 (2), 253-62.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., Iglewski, B. H., 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 179, 3127-3132.

- Piccirillo, C., Demiray, S., Franco, A. R., Castro, P. M. L., Pintado, M. E., 2010. High added-value compounds with antibacterial properties from ginja cherries by-products. *Waste Biomass Valor.*, 1, 209–217.
- Pier, G. B., Ramphal, R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and Practise of Infectious Diseases. (Mandel, G. L., et al., -eds), 6th ed., 2587-2615, NewYork, Churchill Livingstone.
- Pier, G. B., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol.*, 297 (5), 277-295.
- Pollack, M., Koles, N. L., Preston, M. J., Brown, B. J., Pier, G. B., 1995. Functional properties of isotype-switched immunoglobulin M (IgM) and IgG monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 63 (11), 4481-4488.
- Pollack, M., 2000. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, G. L., Benett, J. E., Dolin, R. (Eds.), Principles and Practice of Infectious Deseases, pp. 2310–2335, Churchill Livingstone, NewYork.
- Poulsen, L. V., 1999. Microbial bioflm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6), 321-326.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 39.
- Pratt, L., Kolter, R., 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, 598-603.
- Pyun, M. S, Shin, S., 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine.*, 13 (6), 394-400.
- Radulovic, N., Stankov-Jovanovic, V., Stojanovic, G., Smelcerovic, A., Spiteller, M., Asakawa, Y., 2007. Screening of *in vitro* antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chemistry*, 103 (1), 15-21.
- Raffa, R. B., Iannuzzo, J. R., Levine, D. R., Saeid, K. K., Schwartz, R. C., Sucic, N. T., Terleckyj, O. D., Young, J. M., 2005. Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312, 417-423.

- Rashid, M. H., Kornberg, A., 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *P. aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 4885–4890.
- Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M., 2005a. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. J. Bacteriol., 187, 1799–1814.
- Rasmussen, T. B., Skindersoe, M. E., Bjarnsholt, T., Phipps, R. K., Christensen, K. B., Jensen, P. O., Andersen, J. B., Koch, B., Larsen, T. O., Hentzer, M., Eberl, L., Hoiby, N., Givskov, M., 2005b. Identity and effects of quorum sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. Microbiology, 151, 1325–1340.
- Rasmussen, T., Givskov, M., 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology, 152, 895-904.
- Ra'oof W. M. and Latif I. A. R., 2010. *In vitro* study of the swarming phenomena and antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different human infections. European Journal of Scientific Research, 47 (3), 405-421.
- Reszka, K. J., O'Malley, Y., McCormick, M. L., Denning G. M., Britigan, B. F., 2004. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. Free Radic. Biol. Med., 36 (11), 1448-1459.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., 2001. N-acylhomoserine lactone mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiology, 147, 3249-3262.
- Rijnaarts, H. H., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, L., Zehnder, H., 1993. Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. Appl. Environ. Microbiol., 59, 3255-65.
- Rodrigues, V. M., Rosa, P. T., Marques, M. O., Petenate, A. J., and Meireles, M. A., 2003. Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data. J. Agric. Food Chem., 51 (6), 1518-1523.
- Rosenberg, M., Kjelleberg, S., 1986. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology, 9, 353-393.
- Roy, A., Saraf, S., 2006. Limonoids: Overview of significant biactive triterpenes distributed in plant kingdom. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 29 (2), 191-201.

- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H., Hamood, A. N., 1999a. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect. Immun.*, 67 (11), 5854-5862.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Hamood, A. N., 1999b. *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. *Journal of Hospital Infection*, 43, 211-218.
- Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Hamood, A. N., 2000. The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.*, 2, 1721-1731.
- Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D. J., 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 10 (6), 644-648.
- Sakugari, Y., Kolter, R., 2007. Quorum-Sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 189 (14), 5383-5386.
- Santos, P. M., Figueiredo, A. C., Oliveira, M. M., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Deans, S. G., Younus, A. K. M., Scheffer, J. J. C., 1998. Composition of the essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*. *Phytochemistry*, 48, 455-460.
- Saraçlı, M. A., 2006. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. *Gülhane Tıp Dergisi*, 244-250.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriol.*, 184, 1140-1154.
- Sayner, S. L., Frank, D. W., King, J., Chen, H., VandeWaa, J., Stevens, T., 2004. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ. Res.*, 95 (2), 196-203.
- Sayyah, M., Valizadeh, J., Kamalinejad, M., 2002. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine.*, 9 (3), 212-216.
- Schaber J. A., Carty N. L., McDonald N. A., Graham E. D., Cheluvappa R., Griswold J. A., Hamood A. N., 2004. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *P. aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 841-853.
- Schultz, M. J., Rijneveld, A. W., Florquins, S., Speelman, P., Van Deventer, S. J. H., Van Der Poll, T., 2001. Impairment of host defence by exotoxin A in

- Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. J. Med. Microbiol., 50, 822-827.
- Science, 2005. <http://www.sciencemusings.com/blog/2005/10/talking-bacteria.html>. Erişim Tarihi: 28.12.2009.
- Shaver, C. M., Hauser, A. R., 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infect. Immun., 72 (12), 6969–6977.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R., 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. Mol. Microbiol., 62 (5), 1264-1277.
- Shyamala, B. N., Naidu, M. M., Sulochanamma, G., Srinivas, P., 2007. Studies on the antioxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. J.Agric. Food Chem., 55 (19), 7738-7743.
- Sigmaaldrich, 2011. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail>. Erişim tarihi: 09.10.2011.
- Simic, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., Marin, P. D., 2004. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. Phytother. Res., 18 (9), 713-717.
- Singh, V., Kapahi, B. K., Srivastava, T. N., 1996. Medicinal herbs of ladakh especially used in home Remedies. Fitoterapia-Elsevier Science Publisher, 67, 38-48.
- Singh, G., Marimuthu, P., de Heluani, C. S., Catalan, C. A., 2006. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. J. Agric. Food Chem., 54 (1), 174-181.
- Sitkiewicz, I., Stockbauer, K. E., Musser, J. M., 2007. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes. better living through phospholipolysis. Trends Microbiol., 15 (2), 63-69.
- Smith, R. S., Iglewski, B. H., 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. J. Clin. Invest., 112, 1460-1465.
- Sotomayor, J. A., Martínez, R. M., García, A. J., Jordán, M. J., 2004. *Thymus zygis subsp. Gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. J. Agric. Food Chem., 52 (17), 5418-5424.

- Soylu, E. M., Soylu, S., Kurt, S., 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia.*, 161 (2), 119-128.
- Sperandio, V., Torres, A. G., Kaper, J. B., 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Molecular Microbiology*, 43 (3), 809–821.
- Spoering, A. L., Gilmore, M. S., 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9, 133–137.
- Steinmetz, K. A. ve Potter, J. D., 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A Review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 96, 1027–1039.
- Stewart, P. S., Costerton, J. W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358, 135-138.
- Suga, H., Smith, K. M., 2003. Molecular mechanism of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7 (5), 586-591.
- Sutherland, I. W., 2001. Biofilm exopolysaccharites: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Swift, S., Throup, J. P., Williams, P., Salmond, G. P., Stewart, G. S., 1994. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci*, 21, 214-219.
- Tabanca, N., Khan, S. I., Bedir, E., Annavarapu, S., Willett, K., Khan, I. A., Kirimer, N., and Baser, K. H., 2004. Estrogenic activity of isolated compounds and essential oils of *Pimpinella* species from Turkey, evaluated using a recombinant yeast screen. *Planta Med.*, 70 (8), 728-735.
- Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K. H., Bedir, E., Khan, I. A., and Wedge, D. E., 2006. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *J. Chromatogr. A.*, 1117 (2), 194-205.
- Taga, M. E., Bassler, B. L., 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 14549–14554.
- Takzare, N., Mortazav, H., Safaie, S., Hossein, S. J., 2008. Assessment the effect of *Achillea millefolium* L. extract on spermatogenesis and its reversibility. *Toxicology Letters*, 180 (1), 203-204.
- Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B., Prince, A., 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa*

virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.*, 64 (1), 37-43.

Tanker, N., Şarer, E., Başaran, E., 1977. *Lavandula stoechas* L. bitkisinin uçucu yağı üzerinde farmakognozik araştırmalar. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 7 (1), 61-66.

Tanker, M., Tanker, N., 2003. *Farmokoloji*. Ankara Üniv. Ecz. Fak., 65, Ankara.

Tarımcılar, G., Kaynak, G., 1996. Karadeniz bölgesi *Mentha* L. türleri ile ilgili korolojik bir çalışma. *Ot Sistematik Bot. Derg.*, 3 (2), 49-62.

Tateda, K., Matsumoto, N., Furuya, N., Nagashima, T. 1996. Direct evidence for antipseudomonal activity of macrolids: Exposure-dependent bactericidal activity and inhibition of protein synthesis by erythromycin, clarithromycin and azithromycin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 40, 2271-2275.

Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H. F., Stewart, G. S., Bycroft, B. W., Pritchard, D. I., 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.*, 66 (1), 36-42.

Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S., Vasil, A. L., Vasil, M. L., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C supresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.*, 67, 2371-2376.

Tielen, P., Narten, M., Rosin, N., Biegler, I., Haddad, I., Hogardt, M., Neubauer, R., Schobert, M., Wiehlmann, L., Jahn, D., 2011. Genotypic and phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from urinary tract infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 282–292.

Tingpej, P., Smith, L., Rose, B., Zhu, H., Conibear, T., Al Nassafi, K., Manos, J., Elkins, M., Bye, P., Willcox, M., 2007. Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, 45 (6), 1697-1704.

Tiziana, B. M., Dorman, D. H. J., Deans, S. G., Figueiredo, C. A., Ruberto, G., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial oleoresin. *Journal of Flavour and Fragrance*, 13, 235–244.

Todar, K., 2002. *Bacteriology at UW*. Madison, University of Wisconsin –Madison, www.bact.wisc.edu. Erişim Tarihi: 12.11.2010.

- Tomas, F., Carpena Artes, O., Pastor, R., Mataix Beneyeto, J. J., 1978. Flavonoids in flowers of *Citrus limon* cv. Eureka. Proceedings of the International Society of Citriculture, 1, 74–76.
- Toutain, C. M., Zegans, M. E., O'Toole, G. A., 2005. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 187 (2), 771-777.
- Uguzlar, H., Maltas, E., Yıldız, S., 2011. Screening of phytochemicals and antioxidant activity of *Arum dioscoridis* seeds. Journal of Food Biochemistry, 1745-4514.
- Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y., 2003. Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. Microbiol., 149, 1981–1989.
- Vahapoğlu, H., Akhan, S. Ç., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., -eds), Nobel Tıp Kitapevleri, 1608s., İstanbul.
- van Delden, C., Iglewski, B. H., 1998. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Emerg. Infect. Dis., 4 (4), 551-560.
- Vasil, M. L., 1986. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J. Pediatric, 108, 800–805.
- Vidal, D. R., Garrone, P., Banchereau, J., 1993. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. Toxicon, 31, 27-34.
- Wang, L. H., Weng, L. X., Dong, Y. H. & Zhang, L. H., 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). J. Biol. Chem., 279, 13645–13651.
- Waters, C. M., Bassler, B. L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21, 319-346.
- Watnick, P. I., Kolter, R., 2000. Biofilm; city microbes. J. Bacteriol., 181 (11), 2675-2679.
- Wegener, T., Schmidt, G. P., 1995. Juniper berry oil-an aquareticum. Biologische-Medizin, 24 (2), 111-113.
- Weiss, E. A. 1983. Safflower. In: Oilseed Crops, Tropical Agriculture Series. Longman Inc., Leonord Hill Books, New York, USA.

- Weiss, E. A., 1971. Safflower. In: Castor, Sesame and Safflower. Barnes and Noble Inc., pp. 593-613, New York, USA.
- Weiss, E. A., 2000. Safflower. In: Oilseed Crops. Blackwell Sci. Ltd., pp. 93-129, Victoria, Australia, .
- Whitchurch, C. B., 2006. Biogenesis and function of type IV pili in *Pseudomonas* species. In: *Pseudomonas*. (Ramos, J. L., Levesque, R. C., -eds), 139-188, Springer, Netherlands.
- Wick, M. J., Hamood, A. N., Iglewski, B. H., 1990. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol. Microbiol.*, 4 (4), 527-535.
- Wieland, C. W., Siegmund, B., Senaldi, G., Vasil, M. L., Dinarello, C. A., Fantuzzi, G., 2002. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun*, 70, 1352-1358.
- Wilder, C. N., Diggle, S. P., Schuster, M., 2011. Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems. *ISME J.*, 5, 1332-1343.
- Williams, V., Fletcher, M., 1996. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1004.
- Winson, M. K., Cámara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B., Williams, P., 1995. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 9427-9431.
- Winzer, K., Hardie, K. R., Williams, P., 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch! *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 216- 222.
- Woods, D. E., Iglewski, B. H., 1983. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev. Infect. Dis.*, 5 (4), 715-722.
- Woods, D. E., 2004. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol*, 12 (10), 437-439.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Givskov, M., 2000. Detection of *N*-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.*, 146, 2481-2493.

- Yadegarinia, D, Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., Rasooli, I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67 (12), 1249-1255.
- Yagcı, A., Yagcı, T., Sener, B., Suzıkı, Y., Ahmed, K., 2007. Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. *New Microbiol.*, 30 (2), 167-171.
- Yaldız, G., Yüksek, T., Şekeroğlu, N., 2010. Rize ili florasında bulunan tıbbi ve aromatik bitkiler ve kullanım alanları. III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 3. cilt, 1100-1114.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., and Williams, P., 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH, temperature, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 70, 5635–5646.
- Yıldızhan, Y., 2007. *Brassica nigra* bitkisinin *in vitro* şartlarda doku kültürü ile çoğaltılması. Yıldız Teknik Üniv., Yüksek lisans tezi, 87s., İstanbul.
- Yorgancıgil, B., 1999. Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 6 (2), 176-82.
- Zeybek, N., Zeybek, U., 1994. *Farmasötik Botanik*. Ege Üniv. Ecz. Fak., 2, İzmir.
- Zeynalov, Y., 2008. *İlaç Bitkiler Tarihi Gelişimi ve Kullanımları*. ND-ADEN Yayıncılık, 242s., İstanbul.
- Zhang, L. H., Dong, Y. H., 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular Microbiology*, 53, 1563-1571.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Demet HANÇER AYDEMİR

Doğum Yeri ve Yılı: Gürün – 1982

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise : 1996-2000 İskenderun Yabancı Dil Ağırlıklı Lise (Süper Lise),

Lisans : 2000-2004 Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : 2004-2007 Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Isparta Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 2011-

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

Hancer, D., Sen, A., 2007. Brain aromatase of gilthead seabream (*Sparus aurata*) using dibenzylfluorescein. FEBS Journal, 274 (1), 275-275.