

Gentamisin varlığında *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumu ve quorum sensing ilişkisi (*)

Relation of quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* strains in presence of gentamisin

Yavuz Doğan¹, Vahide Bayrakal², İ. Hakkı Bahar³, Hüseyin Baskın³

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi İzmir, ² Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İzmir, ³ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İzmir

İletişim / Correspondence: Hüseyin Baskın Adres / Address: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, 35340, İzmir Tel: 0232 412 4511 Gsm: 0 533 334 3166 E-mail: huseyin.baskin@deu.edu.tr

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa, quorum sensing [(çoğunluğu algılama, (ÇA)] sistemlerinin çözümü için üzerinde en çok çalışılan bakterilerden biridir. Bu çalışmada, yara yerinden ayrıştırılmış gentamisine orta duyarlı (GO) ve duyarlı (GD) iki klinik *P. aeruginosa* suşu ile gentamisine orta duyarlı standart ATCC 27853 (GOS) suşunun, gentamisin en düşük baskılayıcı yoğunluklarında biyofilm ve çoğunluğu algılama ilişkileri değerlendirilmiştir.

İzole edilen suşların mikrodilüsyon yöntemi ile Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak gentamisine duyarlılıkları incelenmiş; orta duyarlı klinik suş ve standart ATCC 27853 suşunda antibiyotiğin en düşük baskılayıcı yoğunluğu (MİK) 4 µg/mL olarak belirlenirken, duyarlı suş için MİK değeri 0, 25 µg/mL olarak bulunmuştur.

Kuyucuktan yayılım ve mikro açillenmiş homoserin lakton (AHL) yöntemleri ile ayrı ayrı değerlendirilen ÇA yanıtlarında ise *Chromobacterium violaceum* ile belirlenen kısa zincirli AHL salınımı (LasI/R) GD suşunda gözlenmezken, GOS ve GO suşlarında saptanmıştır. Bununla birlikte *Agrobacterium tumefaciens* ile tespit edilen uzun zincirli AHL salınımı (RhII/R) GOS suşunda gözlenmezken GO ve GD suşlarında salınım görülmüştür. Suşlar arasındaki ÇA yanıt farklılıkları suşların farklı fenotipte olabileceğini, iki ayrı ÇA sisteminin gentamisine karşı devreye girebileceğini ve bu özelliğin antibiyotik geliştirme çalışmalarında göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm, quorum sensing, çoğunluğu algılama

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is one of the most studied bacteria in examining quorum sensing (QS) systems. In this study, gentamicin intermediate standard ATCC 27853 (GOS) strain and two clinical *P. aeruginosa* strains (one was susceptible and the other was intermediate; GD, GO) were compared according to biofilm and QS responses in minimum inhibitory concentrations (MIC) of gentamicin.

Gentamicin susceptibilities of these strains were studied according to Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) microdilution technique. MICs of gentamicin for intermediate and standard ATCC 27853 strains were found to be 4 µg / mL and for susceptible strain 0.25 µg / mL.

QS responses were evaluated by well diffusion and micro N- acyl-homoserine lactone (AHL) methods; short chain AHL(LasI/R) release that was signed by *Chromobacterium violaceum* was not shown in gentamicin susceptible strain. But it was shown in gentamicin susceptible standard strain and intermediate clinical strains. Long chain AHL (RhII/R) release by *Agrobacterium tumefaciens* was not demonstrated in GOS but was shown in GO and GD strains. Different QS responses were responsible in all strains isolated from wound and in standard strain isolated from blood culture in all MIC and sub- MIC values of gentamicin.

As a result of, we may suggest that QS responses may differ phenotypically, instead of being isolated from similar infection sites. In the future, phenotypic QS properties of *Pseudomonas* may take an important part in antibiotic development studies.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, biofilm

(*) Bu çalışmanın bir bölümü XXXII Türk Mikrobiyoloji Kongresinde (12- 16 Eylül 2006, Belek- Antalya) sunulmuştur.

GİRİŞ

Makrofajların ve diğer bağışıklık sistemi hücrelerinin bakterilere ulaşmasını engelleyen, mukoid bir yapı olan biyofilmin, bakterinin yapışmasında ve antibiyotiklere direncinde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Biyofilm yapının antibiyotik geçişine engel olarak antibiyotik direncine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, antibiyotik uygulamalarının da biyofilm oluşumunu etkilediğini gösteren çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda, en düşük baskılayıcı yoğunluklarda (Minimum inhibitör konsantrasyon: MİK) kullanılan antibiyotiklerin *P. aeruginosa*'da aminoglikozidlere yanıtı düzenleyen gen olan "arr" geninin, biyofilm yapımının uyarımında gerekli olduğu ve ayrıca biyofilme özgü aminoglikozid direncinde yer aldığı gösterilmiştir (1,2).

Bakterilerin biyofilm oluşumunu, hücreden hücreye iletişim sinyalleri ile kontrol ettiği bilinmektedir. Davies ve ark (1) *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişimi için hücreler arası iletişimin gerekli olduğunu göstermiştir. Bakteriler iletişim sinyalleri ile buldukları yerdeki yoğunluklarını belirleyip değişen yoğunluğa göre davranışlarını değiştirirler ki, bu yoğunluğu algılama (quorum sensing, ÇA) olarak adlandırılmaktadır (3).

Çoğunluğu algılama kavramı ilk kez deniz hayvanlarının ışık organlarına yerleşerek simbiyoz yaşayan bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır. *V. fischeri* deniz hayvanının ışık organında yüksek yoğunluklara kadar üreyebilir. Belli bir eşik değer üzerindeki yoğunluğa kadar ürediklerinde, lux CDABEGH genlerince kodlanan lusiferaz enzimini üretirler ve bunun sonucunda bir ışımaya gerçekleşir. Bu enzimin etkinliği düşük yoğunluklarda baskılanır (4). Gram negatif bakterilerde de çoğunluğu algılama, *V. fischeri*'de ilk defa açıklanan LuxIR dizgesi aracılığıyla olabilir. LuxIR dizgesi, LuxI proteinini kullanarak "kendi kendini uyarıcı" (AI) ve buna bağlanarak gen sunumunu düzenleyen LuxR'yi birleştirir (5). Bakteri tarafında üretilen "kendi kendini uyarıcı" türe özgül olmakla birlikte na-

diren diğer türlerin LuxR tipi düzenleyicileri ile birbirlerini etkiler (6).

Gram negatif bakterilerde ÇA sisteminde açillenmiş homoserin lakton (AHL) oluşumu ile hücre-hücre iletişimi sağlanır. Fırsatçı patojen *P. aeruginosa*'da LasI/R ve RhlI/R olmak üzere iki ÇA sistemi vardır. LasI/R sistemi N-(3-oxododecanolyl)-L-homoserine lactone (3OC12-HSL) sinyal molekülü ile RhlI/R sistemi ise N-butryl-L-homoserine lactone (C4-HSL) sinyal molekülü ile çalışır. 3OC12-HSL (kısa zincirli) AHL molekülü varlığı, *Chromobacterium violaceum* (CV026)'da gösterilirken, C4-HSL (uzun zincirli) AHL molekülü varlığı da *Agrobacterium tumefaciens* (A136)'da gösterilebilir (reporter strain: tanımlayıcı suş) (7).

Çoğunluğu algılama sisteminde, bazı genler ancak belli bir işaretin yoğunluğu eşik değeri geçtiğinde etkinleşmeye (ekspresyon) başlar. Buradan yola çıkarak *P. aeruginosa*'da çoğunluğu algılama sinyalleri yeni antibakteriyel maddelerin hedefi niteliğinde olabilirler (8).

Bu çalışmada, yara yerinden ayrıştırılmış GO ve GD iki klinik suşları ile GOS suşunun biyofilm ve çoğunluğu algılama yanıtları gentamisin en düşük baskılayıcı yoğunluklarında birlikte değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yara yerinden ayrıştırılmış *P. aeruginosa* GD ve GO klinik suşları ile *P. aeruginosa* ATCC 27853 GOS suşu çalışmada kullanılmıştır. Her suş için gentamisin MİK değerleri, katyon ilaveli MHB'da mikrodilüsyon yöntemi ile gösterilmiştir. (9, 10).

AHL yöntemi için farklı kaynaklardan elde edilen bilgiler doğrularak, bir yöntem geliştirilmiştir: ELISA mikropiplaklarının her kuyucuğuna eşit miktarlarda Luria Bertani agar (LBA) dağıtılıp oda sıcaklığında 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Luria Bertani Broth (LBB) 'da 30°C de 18 saat inkube edilip McFarland 0.5'e eşit bulanıkta ayarlanan *Chromobacterium violaceum* ve *Agrobacteri-*

um tumefaciens kültürlerinden her kuyucuğa eşit miktarlarda dağıtılmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra antibiyotiklerin belirlenen 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 x MİK değerleri ile karşılaşmış GOS, GD ve GO suşlarından eşit miktarlarda dağıtılarak 37°C' de 48 saat bekletilmiştir. Kuyucuklarda makroskobik olarak "yeşil-mavi" renk görüldüğünde sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (11).

Kuyucuktan yayılım (diffusion) yönteminde, önceden ısıtılmış Luria Bertani Agar (LBA) içeren iki bölümlü Petri kutularının bir tarafına LBB' da 30°C' de 18 saat bekletilip, McFarland 0.5' e eşit bulanıkta ayarlanan *C. violaceum*, diğer tarafına da aynı şekilde üretilip hazırlanan *A. tumefaciens* bakterilerinin süspansiyonlarından alınarak yayma ekim yapılmıştır. Her iki bölüme de 5 mm çapında çukurlar açılmıştır. Her bir çukura antibiyotiklerin belirlenen 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 x MİK değerleri ile karşılaşmış ve kontrol olarak da antibiyotik ile karşılaşmamış GOS, GD ve GO suşlarından dağıtılarak 37°C' de 48 saat bekletilmiştir. AHL varlığı, mikro AHL' de yapıldığı gibi, makroskobik olarak değerlendirilmiştir (12).

Daha sonra da kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumları yine aynı ELISA plaklarında, iki katı absorbanslar pozitif kabul edilerek, 540 nm' de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir (13).

Her deney üç kez ve her örnek de üçer kez olmak üzere yinelenmiştir.

BULGULAR

İncelenen suşlarda gentamisin en düşük baskılayıcı yoğunlukları; GO ve GOS suşlarında 4 µg / mL, GD suşunda ise 0,25 µg / mL olarak belirlenmiştir.

Biyofilm oluşumunun her üç suşta da MİK değerinden itibaren sub-MİK değerlerinde başladığı saptanmıştır. *C. violaceum* içeren mikro AHL plaklarında GD suşunda AHL salınımı gözlenmezken GOS ve GO suşlarında AHL salınımı

belirlenmiştir. *A. tumefaciens* içeren mikro AHL plaklarında ise, GOS suşunda AHL salınımı saptanmazken, GO ve GD suşlarında AHL salınımı görülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1. Biyofilm- çoğunluğu algılama ilişkilerinin değerlendirilmesi

	MİK	%50			%25			%12.5			%6.2			%3.1			Kontrol	
		X MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK						
BİYOYİLM	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
CV026	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
A136	M	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
	D	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+

1: GOS; 2: GO; 3: GD; CV026: kısa zincirli AHL; A136: uzun zincirli AHL; M: Mikro AHL; D: AHL Yayılım; Kontrol: Antibiyotik uygulanmayan bakterilerden alınan sonuçlar

AHL değerlendirmelerinde, yayılım yöntemi ile mikro AHL yöntemlerinin sonuçları paralel bulunmuştur. Mikro AHL daha az malzeme harcanması nedeni ile tercih edilebilir.

TARTIŞMA

P. aeruginosa fırsatçı patojen bir bakteri olarak hastane infeksiyonlarının önemli etkenlerindedir. *P. aeruginosa* virulans faktörlerinin sunumunu çoğunluğu algılama (ÇA) olarak adlandırılan hücre yoğunluğunu düzenleyen sinyal sistemleri ile de kontrol edebilir. Virulans özelliklerinden olan biyofilm, bakteri yüzeyinde glikokaliks özelliğe, mukoid bir yapıdır ve bakteriyi antibakteriyel ajanlar ile konak bağışıklık sisteminden korur. Böylelikle kronik infeksiyonlara zemin hazırlayabilir. Shin ve ark (14) biyofilm-ÇA ilişkisini tanımladıkları çalışmalarında, *P. aeruginosa* doğal suş (PA01) ile "çoğunluğu algılamaktan yoksun" mutantların biyofilm oluşturma yönünden karşılaştırıldıklarında hemen başlangıçta biyofilm yoğunluğu yönünden aralarında farklılık yokken, ÇA özelliğini taşıyan doğal suşla biyofilm oluşumunun mantarlardan daha hızlı ilerlediğini göstermiştir.

Çalışmamızda yayılım ve mikro AHL yöntemi ile değerlendirilen AHL oluşumu sonuçlarına bakıl-

diğında: 1. Kandan izole edildiği bilinen GOS suşunda (gentamisin orta duyarlı) LasI/ R sisteminin, 2. Yara yerinden izole GD suşunda (gentamisin duyarlı) RhII/ R sisteminin, 3. Yara yerinden izole GO suşunda (gentamisin orta duyarlı) RhII/ R ve LasI/ R sistemlerinin, MİK değerlerinden başlamak üzere, antibiyotiklerin ileri sulandırımında (sub- MİK) da etkin olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, aynı infeksiyon bölgesinden izole edilse de, gentamisine karşı duyarlılık durumlarına bakılmadan, *P. aeruginosa* suşlarında gentamisine sağaltımın doz aralıklarında (MİK ve sub- MİK yoğunluklar) farklı ÇA sistemlerinin, MİK değerlerinden itibaren etkin hale gelebileceğini ve son sulandırma - bir sonraki antibiyotik dozuna - kadar da bu etkinliklerini sürdürebileceklerini göstermektedir. Çalışmada kullandığımız suşlar farklı ÇA sistemlerini kullansalar da, biyofilm oluşumu MİK değerlerinden itibaren ÇA yanıtları ile paralel başlamıştır. Bu sonuç da biyofilm oluşumunun, *P. aeruginosa*' da iki ÇA sisteminden biri ve/ veya ikisi ile düzenlendiğini göstermektedir.

P. aeruginosa suşlarında karşılaştığımız farklı ÇA sistemlerinin, suşların fenotipik farklılıklarından kaynaklandığını, gelecekte yürütülecek antibakteriyel çalışmalarında da bu özelliklerin göz önünde bulundurulması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of the cell-to cell signals in the development of a biofilm. *Science* 1998;280 (5361):295- 298.
2. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005;436:1171-1175.
3. Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* 2005; 43: 101.
4. Kaper JB, Sperandio V. Bacterial cell- to- cell signalling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 2005; 73: 3197.
5. Fugua C, Parsek RM, Greenberg PE. Regulation of gene expression by cell- to-cell communication: acyl - homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 2001; 35: 439.
6. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE, Williams P. The regulation of biofilm development by quorum

sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* 2002;4:18 -28.

7. Pesci EC, Milbanc JBJ, Pearson JP, Mcnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem* 1999;96: 11229 -11234.

8. Baskın H. Mikroorganizmalarda kimyasal temelli sosyomikrobiyoloji: Quorum sensing (Çoğunluğu algılama). *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2006;36:111- 115.

9. Baskın H, Doğan Y, Bahar İH, Yuluğ N. Effect of sub-minimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 79 -82.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (Çeviri editörü Gür: D): Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri; Onaylanmış standart-altıncı baskı, M7-A6, Cilt 23, Sayı 2, Ocak 2003.

11. Vivas J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Naharro G, Villena A. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila* aro A live vaccine. *Vet Microbiol* 2004; 101:167 -76.

12. Zhu H, Thuruthiyil SJ, Willcox MD. Production of N-acyl homoserine lactones by Gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clin Experiment Ophthalmol* 2001;29:150- 152.

13. Kanamaru S, Kurazono H, Terai A, Monden K, Kumon H, Mizunoe Y, Ogawa O, Yamamoto S. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 21- 25.

14. Shih PC, Huang CT. Effect of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 309-314.