

## Biyolüminesent *Photobacterium leiognathi* TEM04S2 Straini ile Bakterilerde Quorum Sensing 'in Kanıtlanması

Esra Ersoy<sup>1</sup>, İsmail Karaboz<sup>2</sup>, Atakan Sukatar<sup>3</sup>,  
D. Seyfettin Aldağ<sup>4</sup>, Erencan Sinecan<sup>5</sup>, Güray Güner<sup>5</sup>

### Özet

Bu çalışmada lüminoz bir bakteri olan *Photobacterium leiognathi* Boisvert et al. 1907'nin TEM04S2 straini kullanılarak bakterilerde toplu bir davranış biçimi olan "Quorum Sensing" in kanıtlanması amaçlanmıştır. Model organizma olarak kullanılan bakteri İzmir Körfezi'nden izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Quorum Sensing denemesi için Seawater Complete (SWC) ortamında geliştirilen 24 saatlik genç *Photobacterium* kültüründen  $2.1 \times 10^7$  kob/ ml düzeyde alınarak sıvı SWC ortamındaki gelişmeleri her saat başı uygun ardışık seyreltmeleri yapılarak ve yayma plaka yöntemi kullanılarak izlenmiştir. Bakterilerin ışığa gösterdiği süre ve sayı sırasıyla 7 saat ve  $7.6 \times 10^7$  kob/ ml olarak belirlendiğinden Quorum Sensing için *Photobacterium leiognathi* 'nin belli bir süre sonra ve belli bir sayıya ulaştıktan sonra ışığa oluşturduğu kanıtlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Quorum Sensing, biyolüminesens, *Photobacterium*, bakterilerde iletişim

### Giriş

Son zamanlara dek bakterilerin ayrı ayrı yaşayan ve sosyal davranışlar göstermeyen asosyal canlılar oldukları biliniyordu. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ile, bakterilerde bazı iletişim sistemleri bulunduğunu ve bu sayede çevreleri ile iletişim kurdukları gösterilmiştir. Quorum Sensing (QS) adı verilen bakterilerdeki iletişim sistemlerinin, bakterilerin hücre yoğunluğuna bağlı toplu bir davranış biçimi olduğu belirlenmiştir (1 - 4).

QS sistemleri bakteriler içinde farklılık göstermektedir. Türe özgü iletişim sistemleri bakımından Gram negatif bakterilerde Açillenmiş Homoserin Laktonlar (AHL) veya

---

<sup>1</sup>Uzman Mikrobiyolog, <sup>2</sup>Prof. Dr., Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova-İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın elektronik posta adresi: [karaboz@sci.ege.edu.tr](mailto:karaboz@sci.ege.edu.tr)

<sup>3</sup>Doç. Dr., Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 Bornova-İzmir

<sup>4</sup>Uzman Biyoloji Öğretmeni, <sup>5</sup>Öğrenci, İzmir Fen Lisesi, 35100 Bornova-İzmir

Homoserin Laktonlar (HSL) denilen otoindükleyicilerle (AI-1) indüklenen Lux I / Lux R tipinde bir QS sistemi bulunmasına karşın, Gram pozitif bakterilerdeki QS sistemi Oligopeptit/ İki komponentli tiptedir. Türler arası iletişim sistemleri ise Lux S / AI-2 tip QS sistemleri ile çalışmaktadır (2, 4 - 6).

Gram negatif bakterilerde görülen QS sistemlerinin: biyoluminesens, biyofilm oluşumu, virülens, antibiyotik üretimi, ekzo enzim salgılanması, hareketlilik, bazı pigmentlerin üretimi, nodül oluşumu, swarming v.b. davranış biçimlerini belirlemede rol oynadığı belirlenmiştir (4, 5, 7- 9).

Global bir genetik regülasyon mekanizması olan QS'in bakterilerde bilinen ilk örneği biyoluminesens (biyolojik ışımaya)'dır. Işık oluşturan bakterilerden denizel ortamlarda yaşayan örnekleri *Vibrio*, *Photobacterium* ve *Shewanella* olarak üç genus altında toplanmış olup, her üç genus üyeleri de Gram negatif bakterilerdendir. Tüm diğer Gram negatif bakterilerce oluşturulan QS sistemlerinde olduğu gibi, ışık oluşturan bakterilerde otoindükleyiciler olan AHL veya HSL'ler Lux I tipi proteinlerce oluşturulmaktadır. Sistemin diğer unsuru ise Lux R proteini olup, otoindükleyicisi ile birleşebilen sitoplazma içindeki eşleniğidir. Gram negatif bakteri kendine özgü bir AHL veya AHL'ler kombinasyonu ürettiği için, sadece kendi bireylerini tanıması ve yanıt vermesi sağlanmış olur. Dışarıya diffüzyon ile salınan AHL düzeyi belli bir eşik değere geldiğinde, otoindükleyici yine diffüzyon ile hücre membranından içeriye alınıp Lux R proteini ile bağlanır. Böylece oluşan Lux I / Lux R birleşimi özgül DNA promotor elementine bağlanarak, hedef genlerin ifade edilmesine yol açar. Biyoluminesensde hedef gen ışımaya genleri olduğu için bakterilerin belirli bir sayıya ulaştığında belirli bir dalga boyunda ve renkte ışımaya başladığı görülür. *Vibrio* ve *Photobacterium* 'larda ışığın dalga boyu ve rengi genelde 490 nm ve mavi-yeşildir. Bazı tür ve strainlerde sarı veya mavi renkte ışımaya neden olan yardımcı gen ve proteinlerin olduğu da bilinmektedir. Örneğin, *V. fischeri* 'de max. 540 nm de sarı ışık oluşumu ve YFP geni; *P. phosphoreum* ve *P. leiognathi* 'de max. 475 nm de mavi renk oluşumu ve BFP "Lumazin" geni v.b. (3, 10 - 19).

QS'in görüldüğü ilk olay lüminoz bakterilerdeki ışımaya olup, günümüzde birçok fizyolojik davranışın temelinde bu sistem yatmaktadır. Hatta son araştırmalar ile neredeyse her bakteride QS ile ilgili en az 1-2 sistemin var olduğundan söz edilmektedir. QS'in lüminoz bakterilerde gösterilmesi için, in vivo veya in vitro olarak yaşayan bakterileri ışımaya başladığı andaki konsantrasyonlarının belirlenmesine gereksinim vardır. Bu amaçla bu çalışmada in vitro olarak uygun besiyerlerine yapılan inokülasyonlar sonrası, bakterilerin zaman içinde hangi saatte ve hangi sayıda ışıldıklarının belirlenmesine çalışılmıştır.

## **Materyal ve Metot**

Bu çalışmada deney organizması olarak lüminoz bir deniz bakterisi olan *Photobacterium leiognathi* kullanılmıştır. Bu organizma Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji (TEM) kültür koleksiyonundan temin edilen *Photobacterium. leiognathi* TEM 04S2 nolu strainidir. Bu strainin karakteristik özellikleri Çizelge 1'de gösterilmiştir (20).

Çizelge 1. *Photobacterium leiognathi* Strainlerin Özellikleri (Ersoy, 2005)

Özellikler	Strainler					
	TEM0401	TEM0403	TEM0405	TEM0406	TEM04S1	TEM04S2
1-3 polar flagel	+	+	+	+	+	+
Düz çubuklar	+	+	+	+	+	+
PHB akümülyasyonu	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	+
Gram reaksiyonu	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz, gaz	-	-	-	-	-	-
Nitrat redüksiyonu	+	+	+	+	+	+
Lüminesens	+	+	+	+	+	+
Arginin dihidrolaz	-	-	-	-	-	-
İndol üretimi	+	+	+	+	+	+
Sıcaklık	+4 °C	-	-	-	-	-
	+20 °C	+	+	+	+	+
	+30 °C	+	+	+	+	+
	+35 °C	+	+	+	+	+
	+40 °C	-	-	-	-	-
Lipaz üretimi	+	+	+	+	+	+
Amilaz üretimi	+	+	+	+	+	+
K u l t ü r m e	L-Serin	-	-	-	-	-
	Maltoz	+	+	+	+	+
	D(+) Ksiloz	-	-	-	-	-
	DL-Alanin	-	-	-	-	-
	D(+) Galaktoz	+	+	+	+	+
	D-Mannoz	+	+	+	+	+
	Na-Asetat	+	+	+	+	+
	L-Prolin	+	+	+	+	+
	Glukoz	+	+	+	+	+
	Gliserol	+	+	+	+	+
	Na-Piruvat	+	+	+	+	+
	Sellobioz	+	+	+	+	+
	Mannitol	+	+	+	+	+
	N-asetil glukozamin	-	-	-	-	-
	L-arabinoz	-	-	-	-	-

+: pozitif strainler ; -: negatif strainler

Deney organizması olan *P. leiognathi*'nin saklanması, üretilmesi QS denemelerinde besiyeri olarak katı ve sıvı Seawater Complete (SWC) ortamı kullanılmıştır (10,11).

Bakterinin üretilmesi için yatık SWC agarlı tüplerde bulunan *P. leiognathi* 'den bir öze alınarak, Petri kutusunda hazırlanan SWC agarlı plaklara inoküle edilip, 20 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. SWC agarlı petriyelerde üreyen bakterilerden 1-2 öze dolusu alınıp, içinde 25 ml sıvı SWC besiyeri bulunan erlenlerde iyice karıştırılarak süspansiyon

edilmiştir. Elde edilen bu bakteri süspansiyonundan ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) aralığında hazırlanan ardışık seyreltmelerinden 0,1'er ml alınarak, önceden hazırlanmış SWC agarlı plaklara L-bağetle yaymak sureti ile yayma ekim yöntemi kullanılmış ve ekim yapılan petriyerler 20 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak ve seyreltme katsayısı ile çarpılarak bakteri süspansiyonundaki sayı hesaplanmıştır. Daha sonra, bilinen bu bakteri düzeyinden  $2,1 \times 10^7$  kob / ml 'si başlangıç (0. saat) olarak kabul edilip, içinde 25'er ml sıvı SWC ortamı bulunan 10 adet erlene 1'er ml aşılanmıştır. Erlenler 20 °C'de inkübasyona bırakılmış ve her saat başı hem karanlıkta ışımaya olup olmadığı kontrol edilmiş ve hem de yukarıda belirtildiği şekilde ardışık seyreltmeleri hazırlanıp, yayma plaka yöntemi kullanılarak SWC plaklarında büyüyen ve ışımaya gösteren bakteri sayıları hesaplanmıştır. Böylece her saat 1 ml de oluşan biyoluminesen bakteri sayıları elde edilmiştir. Deneme SWC besiyerli erlenlerde ışımaya gözleninceye dek sürdürülmüştür. Işıma, karanlıkta ve göz karanlığa uyum sağladıktan sonra çalkalanarak iyice karıştırılan sıvı ortamlı erlenler incelenerek gözlenmiştir (10 - 12, 21, 22).

## Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Deneme sonucunda lüminoz bakterilerin SWC ortamında zamana karşı oluşturdukları bakteri sayıları hesaplanmış olup, Çizelge 2'de gösterilmiştir. Deneme esnasında bakterilerin biyoluminesens gösterip ışımaya başladıkları süre 7. saat olarak belirlenmiştir. Bu nedenle bakterilerin QS yapması için gerekli minimal düzey  $7,6 \times 10^7$  kob / ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. *P. leiognathi* TEM04S2 Straininden Farklı Sürelerde Elde Edilen Ortalama Bakteri Sayıları

	$10^7 \times$ kob / ml
0. saat	2,1
1. saat	2,3
2. saat	2,6
3. saat	2,9
4. saat	3,3
5. saat	4,6
6. saat	6,0
7. saat	7,6
8. saat	10,0

Denemeler esnasında biyoluminesen bakteri sayısının başlangıçta  $2,1 \times 10^7$  kob / ml gibi yüksek düzeyde alınmasının nedeni, hem aynı gün içinde kısa sürede deneme sonucunun alınması ve hem de daha önemlisi çeşitli kaynaklarda ışımaya için gerekli bakteri sayısının  $10^7$  adet/ ml'den daha fazla olması gerektiğinin belirtilmesinden kaynaklanmaktadır (11,12). Gerçektende bakterilerde ışımaya aynı gün içinde görülmüş ve ışımaya için gerekli olan sayıya kısa sürede ulaşılmıştır. Böylece bakterilerin QS yapmasında model olarak seçilen biyoluminesens için gerekli süre 7 saat ve ışımaya için gerekli minimal düzey de  $7,6 \times 10^7$  kob / ml olarak belirlenmiştir.

Sonuçta bakterilerin biyoluminesens örneğinde olduğu gibi, bazı davranış biçimlerini göstermede QS sistemlerini kullandıkları, İzmir Körfezi'nden elde edilmiş lüminoz bir bakteri ile *Photobacterium leiognathi* TEM04S2 straini ile kanıtlanmıştır.

Denizde serbest olarak yaşarken 0,01- 40 hücre / ml gibi düşük seviyelerde bulunan lüminoz bakterilerin simbiyotik olarak çeşitli omurgasız ve omurgalı deniz canlıları içinde  $10^9$ -  $10^{11}$  hücre / ml şeklinde yüksek düzeylerde rastlanması, biyoluminesens göstermesi için QS sistemlerini çalıştırarak toplu bir davranış biçimi sergilediklerini

göstermektedir Denemelerde elde edilen sayı, bakterilerin logaritmik döneminin henüz başlarında olduğu için, denemeye devam edilseydi çok daha yüksek sayılara ulaşabileceği görülecekti. Amaç ışımının gözlenmesi olduğu için denemenin sürdürülüp daha da yüksek olan sayılara ulaşmak gerekmemiştir (11,12,15).

## Sonuç

Son yıllarda ortaya çıkarılan QS sistemleri ve bunlarda yer alan bakterileri sayıları giderek artmaktadır. Ayrıca, bazı bakterilerde farklı sistemler ile çalışan birden fazla QS sistemi olduğu da belirlenmiştir. QS sistemlerinde rol oynayan proteinlerin bulunması ve tanımlanması ile, hücrelerin fizyolojik davranışlarının anlaşılmasına ve böylece bunlarla ilgili yeni stratejilerin saptanmasına olanak sağlanacaktır. QS'in mekanizmaları aydınlatıldıkça tıp, tarım, çevre, biyoteknoloji, moleküler genetik v.b. ilgili alanlarda yeni fırsatlar yaratılabileceği görülmektedir. Yapılan yeni çalışmalar, QS'e dayalı olarak oluşan çeşitli bitki, hayvan ve insan hastalıklarındaki bazı patojenlerin virülanslarının engellenmesi, bakterilerin çeşitli yüzeylerde veya canlı içinde tek olarak ya da farklı tür ve genusların birlikte oluşturdukları biyofilmlerin engellenmesi, hastalıkların biyolojik kontrolü için yeni alternatiflerin yaratılması, patojenler için yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesi, sistemle ilgili yeni metabolitlerin üretiminin artırılması, moleküler düzeyde QS ve diğer genetik regülasyon sistemlerinin (örneğin, stres proteini) bağlantılarının ortaya konarak sistemlerin ve etkileşimlerinin anlaşılması mümkün olabilecektir (2, 5, 23 - 27).

## Kaynaklar

1. Karaboz ve Sukatar, 2004. Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları), Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 02:05, 23-32.
2. Greenberg, E.P. 2003. Bacterial communication and group behavior. The Journal of Clinical Investigation, 112 (9), 1288-1290.
3. Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2000. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall Int. Ltd. London.
4. Federle, M.J. and Bassler, B. 2003. Interspecies communication in bacteria. The Journal of Clinical Investigation, 112 (9), 1291-1299.
5. Daniels, R., Vanderleyden, J. and Michiels, J. 2003. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. FEMS Microbiology Reviews ( in press ).
6. Camara, M., Williams, P. and Hardman, A. 2002. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. The Lancet Infectious Diseases, 2, 667-676.
7. Podbielski, A. and Kreikemeyer, B. 2004. Cell density-dependent regulation: basic principles and effect on the virulence of Gram-positive cocci. International Journal of Infectious Diseases, 8 (2), 81-95.
8. Xavier, K.B. and Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more just a numbers game. Current Opinion in Microbiology, 6, 191-197.
9. Sukatar, A. ve Karaboz, İ. 2001. Sucul Canlılarda Biyoluminesens, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 18 ( 3-4), 547-554.
10. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Systematic Bacteriology, Vol.2, p. 539-544. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

11. Dunlap, P.V. and Kita-Tsukamoto, K. 2001. Luminous bacteria. Chapter 329, in Dworkin, M. Et al. (eds.), The Prokaryotes, an Evolving Electronic Resource for Microbiological Community. Academic Press, New York, NY.
12. Nealson, K. and Hastings, J.W. 1992. Luminous bacteria, pp. 625-639. In A Balows., H.G. Trüper., M. Drowkin., W. Harder., K.H.Schleifer (eds.) The Prokaryotes. Springer-Verlag.
13. Shimumuro, O. 1985. Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. Symposia of the Society for Experimental Biology, 39: 351-372
14. Rees, J.F., Wergifosse, F.B., Noiset, O., Dubuisson, B., Janssens, and Thomson, E.M. 1998. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. The Journal of Experimental Biology, 201: 1211-1221.
15. Herring, P. 2002. Marine microlights: the luminous marine bacteria. Microbiology Today, (29), 174-176.
16. Prasher, D.C., O'Kane, D.O., Lee, J. and Woodward, B. 1990. The lumazine protein gene in *Photobacterium phosphoreum* is linked to the lux operon. Nucleic Acids Research, 18:21, 6450.
17. O'Kane, D.J., Woodward, B., Lee, J. and Prasher, C. 1991. Borrowed proteins in bacterial bioluminescence. Proc. Natl. Sci. USA, 88, 1100-1104.
18. Karatani, H. and Konaka, T. 2000. Activities of the Bimodal Fluorescent Protein Produced by *Photobacterium phosphoreum* Strain bmFP in the Luciferase Reaction In Vitro. Photochemistry and Photobiology, 71 (2), 237-242.
19. Lin, J.W., Chao, Y.F. and Weng, S.F. 2001. Riboflavin Synthesis Genes ribE, ribB, ribH, ribA Reside in the lux Operon of *Photobacterium leiognathi*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 284, 587-595.
20. Ersoy, E. 2005. İzmir İli Deniz Suyu ve Deniz Canlılarındaki Lüminoz Bakterilerin İzolasyonu ve Tanılanması. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Bornova-İZMİR.
21. Makemson, J.C., Fulayfil, N. and Basson, P. 1992. Association of Luminous Bacteria with Artificial and Natural Surfaces in Arabian Gulf Seawater. Applied and Environmental Microbiology, 2341-2343.
22. Orndorff, S.A. and Colwell, R.R. 1980. Distribution and Identification of Luminous Bacteria from the Sargasso Sea. Applied and Environmental Microbiology, 983-987.
23. Delisa, M.P. and Bentley, W.E. 2002. Bacterial autoinduction: looking outside the cell for new metabolic engineering targets. Microbial Cell Factories, 1 (5), 1-9.
24. Suga, H. and Kristina, M.S. 2003. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug targeted. Current Opinion in Chemical Biology, 7. 586-591.
25. Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infection and Immunity, 68 (9), 4839-4849.
26. Perego, P., Fanara, L., Zilli, M. And Del Borghi, M. 2002. Applications of Luminous Bacteria on Environmental Monitoring. Chem. Biochem. Eng. Q. 16 (2), 87-92.
27. Ersoy, E., Karaboz, İ., Sukatar, A. 2004. İzmir Körfezi'nden Elde Edilen Biyoluminesens Özellik Gösteren Bir Bakteri. Deniz Bakteriyolojisi (25-27 Kasım 2004, İstanbul), Özet Kitabı, 24-26.