

Aeromonas hydrophila balık patojeninde biosensör suşlar aracılığıyla çevreyi algılama sisteminin tespiti ve virülens faktörleri

Determination of quorum sensing system via biosensor strains and virulence factors in fish pathogen *Aeromonas hydrophila*

Nurdan Filik^{1*} • Ayşegül Kubilay²

¹ Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, 32260 Isparta, Türkiye

<http://orcid.org/0000-0003-4376-7298>

² Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, 32260 Isparta, Türkiye

<http://orcid.org/0000-0002-6043-2599>

*Corresponding author: nurdansal@hotmail.com

Received date: 27.03.2019

Accepted date: 06.09.2019

How to cite this paper:

Filik, N. & Kubilay, A. (2020). Determination of quorum sensing system via biosensor strains and virulence factors in fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 29-36. DOI: 10.12714/egejfas.37.1.04

Öz: Çevreyi algılama sistemi bakterilerin sinyal molekülleriyle kendi aralarında iletişim kurmalarını sağlayarak istedikleri çoğunluğa ulaştıklarını anladıkları anda da kritik virülens faktörlerini üreten, bakteriyi virulent hale getiren, sonucunda hastalık oluşturan ve bunu yöneten bir sistemdir. Araştırmada balık enfeksiyonu Hareketli *Aeromonas* Septisemisi (MAS) etkeni *Aeromonas hydrophila* (2 suş) suşlarının çevreyi algılama sistemi çalışılmıştır. Suşlarda öncelikle *N*-butanoyl-L-homoserin laktone (BHL) ve *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin laktone (OdDHL) sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biyosensör suşları aracılığıyla araştırılmıştır. *A. hydrophila*'nın *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan teste BHL sinyal molekülünü ürettiği, *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan teste OdDHL sinyal molekülünü ürettiği tespit edilmiştir. *A. hydrophila*'da BHL ve OdDHL sinyal moleküllerinin tespitiyle bu moleküllere bağımlı olan ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz, hemoliz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörlerinin varlığı bakımından fenotipik olarak araştırılmıştır. *A. hydrophila* suşlarının ramnolipid, proteaz, amilaz ve hemoliz aktiviteleri pozitif olarak bulunmuştur. *A. hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kontrol suşuna göre daha az elastaz aktivitesine sahiptir. Araştırmayla *A. hydrophila* suşlarının bir topluluk içerisinde olduğunu anladığının ve toplu olarak hareket ettiğinin göstergesi olan çevreyi algılama sistemine sahip olduğu, balıklarda hastalık oluşturan tehlikeli virülens faktörlerini ürettiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Aeromonas hydrophila*, Çevreyi Algılama Sistemi, Virülens Faktörleri, *N*-Açıl Homoserin Laktone, BHL, OdDHL

Abstract: Quorum Sensing is a system that produces critical virulence factors, virulent get bacteria and manages the disease as a result, and when they realize that the bacteria reach the majority they want by enabling them to communicate with the signal molecules themselves. In this study, Quorum Sensing system of *Aeromonas hydrophila* (2 strains) which is the causative agent of fish infection Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) disease was studied. In the strains, primarily the production of *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) and *N*-(3-octododecanoyl)-L-homoserine lactone (OdDHL) signaling molecules was investigated via *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biosensor strains. *A. hydrophila* produced BHL signaling molecule in assay committed using *C. violaceum* CV026 strain, producing OdDHL signaling molecule in assay committed using *A. tumefaciens* NT1 strain. *A. hydrophila* was investigated as phenotypically by the detection of BHL and OdDHL signaling molecules and in the presence of virulence factors controlled by quorum sensing system such as ramnolipid, elastase, protease, amylase, hemolysis production dependent on these molecules. The ramnolipid, protease, amylase and hemolysis activities of *A. hydrophila* strains were found to be positive. *A. hydrophila* has less elastase activity than *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 control strain. Research has emphasizing *A. hydrophila* strains are within a population and that they have a of quorum sensing system, shown that they act collectively that determined they produces dangerous virulence factors that cause disease in fish.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Quorum Sensing System, Virulence Factors, *N*-Acyl Homoserine Lactone, BHL, OdDHL

GİRİŞ

Bakterilerin asosyal canlılar olmadığı, moleküllerini algılayarak birbirleriyle iletişim kurdukları anlaşılmıştır. Bakteri hücreleri arasındaki popülasyon yoğunluğuna bağlı olan hücre-hücre iletişim mekanizması Çevreyi Algılama (Quorum Sensing, QS) olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda kullanılmaya başlanan QS terimi bu özelliklerden hareketle "Quorum: salt çoğunluk" ve "Sense: hissetme" kelimelerinden oluşturulmuştur (Saraçlı, 2006).

Bu sayede bakteriler birbirleriyle iletişim kurmakta, hücre sayılarını kontrol etmekte, fizyolojik ve patojenik özelliklerini değiştirmekte, virülens faktörleri gibi kritik gen ekspresyonlarını gerçekleştirmektedirler. Bakteriler arasındaki

bu iletişim, buldukları ortama sinyal molekülü sentezlemeleri olup sentezlenen bu moleküllerin yoğunluğu ile ortamdaki salt çoğunluğu algılayabilmeleri ve sonucunda sinyal moleküllerinin özel genlerin ekspresyonun da rol oynamasına dayanmaktadır (Yılmaz-Yıldırım vd., 2015). Bakteriler QS mekanizmasını kullanarak sporulasyon, toplu kaçış, pigment üretimi, konjugasyon, hücre bölünmesi, antibiyotik üretimi, biyoluminesans, lag fazından çıkma, biyofilm oluşumu, immün yanıtta kaçış, nodül sayısını sınırlama, virülens faktörlerinin üretimi, besin için diğer bakterilerle savaş, ekstrasellüler proteaz üretimi, ekzoenzimlerin üretimi gibi birçok hayati faaliyetini düzenler. (Altun ve Şener, 2008; Bruhn vd., 2005).

Bu mekanizma içerisinde yer alan sinyal moleküllerinin çeşidi ve bu moleküllerin algılanma şekline göre üç çeşit çevreyi algılama mekanizması vardır. Bunlar: 1. LuxI/LuxR Sistemi (Gram negatif bakterilerde) 2. Oligopeptit Sistemi (Gram pozitif bakterilerde) 3. Hibrit Sistemi'dir (Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde) (Yılmaz-Yıldırım vd., 2015).

Çevreyi algılama sistemini kullanan bakterilerin keşfinden sonra bakterilerle ilgili algılar çok yönlü hale gelmiştir. Nijland (2010), bakterilerin havadaki koku oluşturan kimyasalları algılayabilen moleküler bir yapılarının olduğunu keşfetmiştir. Yapılan bu araştırma ile bakterilerin bu kokuya karşı çevreyi algılama sistemiyle düzenlenen virülens faktörlerinden biyofilmi üreterek tepki gösterdiğini de bildirmiştir.

Dünyada geniş dağılım gösteren *A. hydrophila* Gram-negatif bir bakteridir ve aynı zamanda deniz ve tatlı su balık hastalıklarına neden olan bir patojendir. Hareketli *Aeromonas* türleri genellikle fırsatçı patojen ya da sekonder patojen olarak kabul edilmesine rağmen, *A. hydrophila* primer patojen olarak görülmüştür (Timur ve Timur 2003, Bastardo vd., 2012, Gong vd., 2015). *A. hydrophila* yüksek oranda hücre lizisi gerçekleştiren, Gram-negatif, çomak şekilli, sporsuz, oksidaz pozitif, fakültatif anaerobik, oportünist, hem insan hem de balıkta patojeni bir bakteridir (Hazen vd., 1978; Daskalov, 2006; De Silva vd., 2018, Dewi vd., 2019, Wilson vd., 2019). Agar üzerindeki kolonileri yumuşak, dışbükey ve yuvarlaktır (Al-Fatlawy ve Al-Hadrawy, 2014). Jelatini, hemoglobini, elastini sindirdiği ve dirençli olduğu için öldürülmesi zor olan *A. hydrophila* bakterisi hayvanlardan 100 yıldan beri, insanlardan 1950'lerin başlarından beri izole edilmiştir. (Mathewson ve Dupont, 1992).

A. hydrophila oldukça toksiktir. Hareketli *Aeromonas*'ların patojenitesi üretmiş oldukları sitotoksik (β -hemolisin) ve sitotonik (kolera benzeri) enterotoksinlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu bakterilerin bağırsak mukozasına tutunma ve buradan da kana geçme özelliğine sahip oldukları bilinmektedir. Balık veya insan vücuduna girdiğinde, kan dolaşımı yoluyla ilk organa dolaşır. En önemli virülens faktörlerinden biri olan aerolizin sitotoksik enterotoksin (Act) üretir. Toksin, hücre tarafından bir tip II salgı sisteminden üretilir. Toksin, hücre ölümü ve doku yıkımını gerçekleştirir (Albert vd., 2000; Chopra vd., 2000). Virülensin üretimi çevreyi algılama ile düzenlenebilir bir fenomendir. Çevreyi algılama sistemi *A. hydrophila*'da çeşitli virülens faktörlerinin ekspresyonunu düzenler (Chu vd., 2011). Virulent *A. hydrophila* (vAh) Motile *Aeromonas* Septisemisi (MAS) hastalığının etkenidir ve epidemik salgınlara neden olur (Abdelhamed vd., 2019). Balıklarda, bu hastalık deri ülseri, nekroz, hemorajik septisemi, ekzoftalmus, yüzgeç ve kuyruk çürüklüğü ile karakterizedir (Zhang vd., 2014; Baldissera vd., 2019).

Bu çalışmada *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemini kullanarak bakteriyel iletişim sistemine sahip olup olmadığını mutant *C. violaceum* CV026 ve mutant *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşlar aracılığıyla tespit edilmesi ve çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki virülens faktörlerinden

ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz, hemoliz üretiminin fenotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

A. hydrophila, *P. aeruginosa* PAO1, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 suşlarının kaynağı ve gelişme koşulları

Araştırmada SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı'ndan temin edilen, hasta gökkuşağı alabalıklarının iç organlarından izole edilmiş ve moleküler düzeyde identifikasyonu yapılmış olan balık patojeni *A. hydrophila*'nın 2 suşu kullanılmıştır. Suşlar kullanılmadan önce referans suş ile karşılaştırılarak geleneksel bakteriyolojik testlerle teyitleri de yapılmıştır. Suşlar kullanılmaya kadar McFarland 0.5'e göre standardize edilen miktarda -80°C'de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Depolanan suşlar günlük kullanım için -80°C'den alınarak -20°C'de bekletildikten sonra TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan suşlar 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maximum 7 gün süreyle +4°C'de saklanmıştır. SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen pozitif kontrol olarak kullanılan insan patojeni *P. aeruginosa* PAO1 (1 suş) suşu, LBA besiyerinde 30°C'de üretilmiştir ve -80°C'de ve %20 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir. AHL sinyal moleküllerinin tespiti için kullanılan *C. violaceum* CV026 (1 suş) mutant suşu ve *A. tumefaciens* NT1 (1 suş) mutant suşu da SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Bu suşlar %1,2 agar içeren katılaştırılmış ve *A. tumefaciens* NT1 suşu için gentamisin (20 µg/ml); *C. violaceum* suşu için kanamisin (20 µg/ml) LB (%1 tripton, %0,5 maya ekstraktı, %0,5 NaCl) besiyerinde 24 saat süreyle 30°C'de üretilmiştir. Bu stok kültürler farklı testler için kullanılmıştır (Ulusoy, 2007).

C. violaceum CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 biyosensör suşları aracılığıyla *A. hydrophila*'da N-Açıl Homoserin Lakton (AHL) sinyal moleküllerinin tespiti

AHL sinyal moleküllerinin araştırılmasında; Ulusoy (2007) tarafından modifiye edilen McClean vd. (1997)'nin metodundan yararlanılmıştır. TSA besiyerinde 25°C'de 24 saat *A. hydrophila* üretilmiştir. AHL molekül tespiti için *A. hydrophila* suşları TSA kültüründen Luria Bertani Agar (LBA) besiyerine 2 cm'lik çizgi olarak ekilmiş *C. violaceum* CV026 biyosensör suşu da patojen bakterilerle arasında 3 mm aralıkla aynı boyutta karşısına ekilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Böylece inkübasyon sonucunda mor renk oluşumuna bakılarak çevreyi algılama sisteminin sinyal moleküllerinden BHL'nun varlığı değerlendirilmiştir. OdDHL molekülünün varlığını araştırmak için de aynı prosedür uygulanmıştır. Yeşil renk aranırken *A. tumefaciens* NT1 suşu için tek fark olarak 20 µg X-Gal ilaveli LBA besiyeri kullanılmıştır. Sonuçlar *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak N-Açıl Homoserin Lakton (AHL) moleküllerinin tespiti için çapraz doğrulama testi yapılmıştır (Mohaddam vd., 2014).

Ramnoflipid testi

0,2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/l⁻¹ metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar petrileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Siegmond ve Wagner, 1991). *A. hydrophila* suşları ise Luria Bertani Broth (LBB) besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Bu suşların bir gecelik LBB kültürlerinden 20'şer µl alınarak M9-glutamat minimal medium agar petrilerinin ortasına damlatılmış ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon ramnoflipid aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında steril LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007). Ramnoflipid üretim testi üç paralel çalışılmıştır.

Proteaz testi

A. hydrophila suşları Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden %2 yağsız süt tozu içeren TSA petrilere açılan 3 mm'lik çukurlara 20 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Swift vd., 1999; Dong vd., 2005; Ulusoy, 2007). Suşların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki saydam zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Proteaz testi üç paralel çalışılmıştır.

Amilaz testi

A. hydrophila suşları ise TSB'de 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden %2 nişasta ilaveli TSA'ya çizgi tarzında ekim yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 5 dk içinde okunan sonuçlarda inkübasyondan sonra koloniler üzerine lugol solüsyonu dökülmüş, pozitif reaksiyonlar koloni etrafında berrak alan oluşmasıyla tespit edilmiştir. Besiyerinde mavi renk negatif sonucu, koloni etrafındaki oluşan pembe-esmer bölge şüpheli reaksiyonu ifade etmektedir (Swift vd., 1999). Amilaz testi üç paralel çalışılmıştır.

Hemoliz testi

A. hydrophila suşları, %5 kan içeren TSA petrilere çizgi tarzında ekilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon hemoliz aktivitesinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Swift vd., 1999). Hemoliz testi üç paralel çalışılmıştır.

Elastaz testi

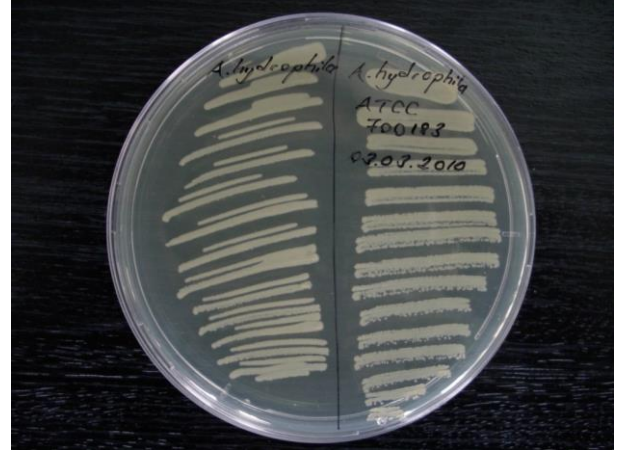
A. hydrophila suşlarına Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman vd., 1980). *A. hydrophila* suşları LBB'de 25°C'de 14 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin süpernatantlarından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7.5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 30°C'de 3 saat karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR 12000 devirde 2 dk santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatantlar 96 çukurlu yuvarlak tabanlı polyester plaklara 100 µl olarak her bir bakteri süpernatantı ilave edilerek çalışılmıştır. Plaklar OD'si 630 nm'de ELİSA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülerek hesaplanmıştır. Her suş için OD değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Steril LBB negatif kontrol, *P. aeruginosa* PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Ulusoy, 2007).

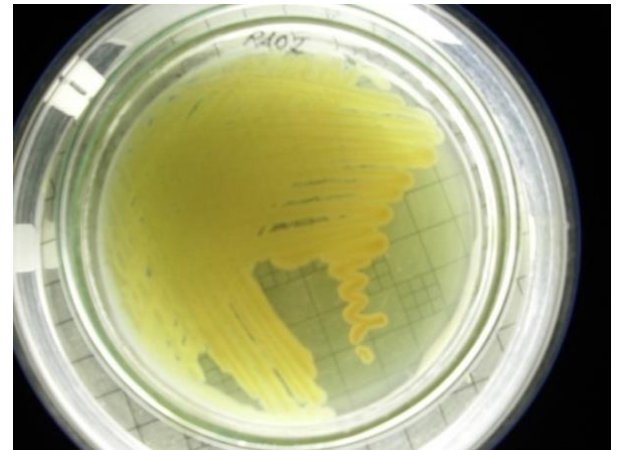
BULGULAR

Biyosensör suş *A. tumefaciens* NT1, pozitif kontrol suşu *P. aeruginosa*, balık patojeni *A. hydrophila*'da koloni yapıları

A. hydrophila'nın koloni rengi (Şekil 1)'de, pozitif kontrol insan patojen koloni rengi *P. aeruginosa* PAO1 (Şekil 2)'de OdDHL sinyal molekülünün üretimini gösteren *A. tumefaciens* NT1 mutant suşunun koloni rengi (Şekil 3)'de LBA üzerinde verilmiştir. *C. violaceum* CV026 mutant suşta pigmentizasyon koloni (Şekil 4) ve orijinal suşta *C. violaceum* 12472 (Şekil 5) mor renk koloni oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 1. TSA besiyerinde gençleştirilen *A. hydrophila*
Figure 1. *A. hydrophila* rejuvenated on TSA medium



Şekil 2. LBA besiyerinde gençleştirilen *P. aeruginosa* (+kontrol)
Figure 2. *P. aeruginosa* (+control) rejuvenated on LBA medium



Şekil 3. LBA besiyerinde gençleştirilen *A. tumefaciens* NT1 mutant suş
Figure 3. *A. tumefaciens* NT1 mutant strain rejuvinated on LBA medium



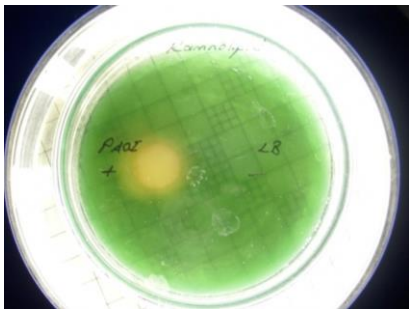
Şekil 4. LBA besiyerinde gençleştirilen *C. violaceum* CV026 mutant suş
Figure 4. *C. violaceum* CV026 mutant strain rejuvinated on LBA medium



Şekil 5. LBA besiyerinde gençleştirilen *C. violaceum* 12472 orijinal suş
Figure 5. *C. violaceum* 12472 original strain rejuvinated on LBA medium

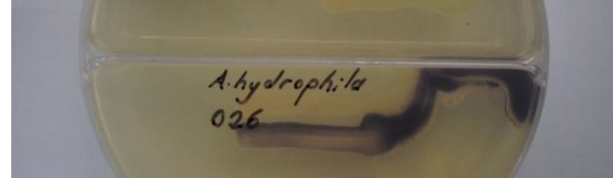
AHL molekülleri tespiti

Bakteri koloni renklerinin çok önemli olduğu bu prensipte kolonilerin renklerine özellikle dikkat edilmektedir. Bakteriyel iletişimin *A. hydrophila*'da olup olmadığı koloni renk değişimiyle belirlenmiştir. *C. violaceum* 12472 orijinal suş



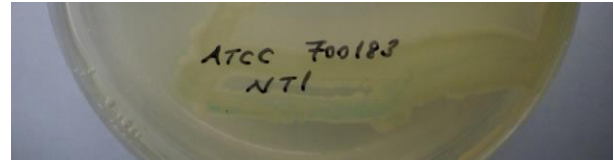
Şekil 8. *P. aeruginosa* PAO1 (+kontrol), LBB (-kontrol) ve *A. hydrophila*'da ramnolipid varlığı
Figure 8. *P. aeruginosa* PAO1 (+control), LBB (-control) and the presence of ramnolipid in *A. hydrophila*

doğası gereği mor pigment üretmektedir. *C. violaceum* 12472 orijinal suş daha önceki çalışmalarla *C. violaceum* CV026 mutant suş formatına getirilmiştir. *C. violaceum* CV026 mutant suş; *A. hydrophila*'nın BHL molekülü üretmesiyle doğasına dönerek mor pigment üretir ve krem renk yerine mor renkte koloni oluşturur. Bu durum *A. hydrophila*'da BHL sinyal moleküllerinin varlığını ispatlamıştır (Şekil 6). Aynı prensiple *A. hydrophila*'nın OdDHL molekülü üretmesiyle *A. tumefaciens* NT1 mutant suşu doğasına dönerek yeşil pigment üretir ve krem renk yerine yeşil renkte koloni oluşturur. Bu durum *A. hydrophila*'da OdDHL sinyal moleküllerinin varlığını ispatlamıştır (Şekil 7).



Şekil 6. *C. violaceum* CV026 aracılığıyla *P. aeruginosa* PAO1'de olduğu gibi *A. hydrophila*'nın kremden mor renge dönüşümüyle BHL sinyal moleküllerinin varlığı

Figure 6. Presence of BHL signaling molecules with the conversion of *A. hydrophila* from cream to purple color as are *P. aeruginosa* PAO1 via *C. violaceum* CV026



Şekil 7. *A. tumefaciens* NT1 aracılığıyla *P. aeruginosa* PAO1'de olduğu gibi *A. hydrophila*'nın kremden yeşil renge dönüşümüyle OdDHL sinyal moleküllerinin varlığı

Figure 7. Presence of OdDHL signaling molecules with the conversion of *A. hydrophila* from cream to green color as are *P. aeruginosa* PAO1 via *A. tumefaciens* NT1

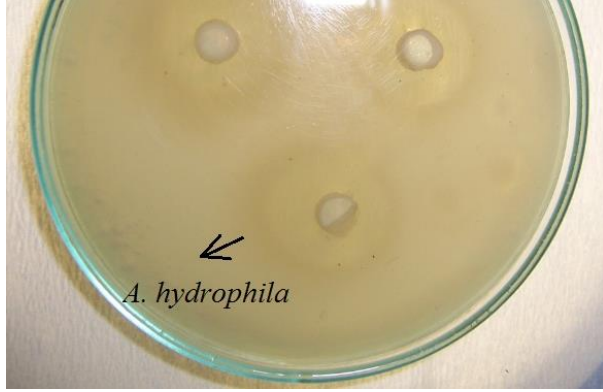
Ramnolipid testi sonuçları

Besin kaynaklarının kısıtlı olduğu durumlarda, besin kaynaklarının bulunduğu ortamlara doğru bakterinin hareketine imkan sağlayan ve bir biyosurfaktan olan ramnolipid testi *A. hydrophila*'da (Şekil 8) pozitif sonuçlanmıştır.



Proteaz testi sonuçları

A. hydrophila'da proteaz aktivitesi kolonilerin etrafındaki saydam zon görülmesi ile sonuç pozitif kaydedilmiştir (Şekil 9). *A. hydrophila* suşunun birinde ortalama 11,6 mm çap belirlenirken *A. hydrophila* suşunun diğerinde ortalama 13 mm olarak belirlenmiştir.



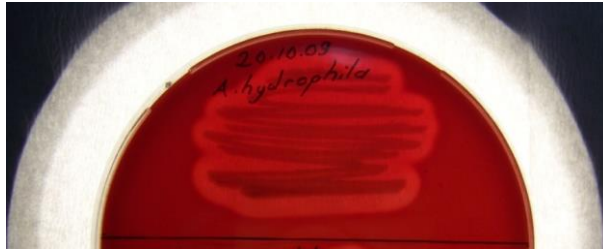
Şekil 9. *A. hydrophila*'da proteaz aktivitesi
Figure 9. Protease activity in *A. hydrophila*

Amilaz testi sonuçları

A. hydrophila'da amilaz aktivitesi pozitif tespit edilmiştir.

Hemoliz testi sonuçları

A. hydrophila'da hemoliz aktivitesi pozitif tespit edilmiştir. Çizgi tarzında yapılan ekimlerle hemoliz aktivitesinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. *A. hydrophila*'da çizgi ekiminde pozitif sonuç
Figure 10. Hemolysis zone in streaked of *A. hydrophila*

Elastaz testi sonuçları

A. hydrophila'da elastaz aktivitesi kontrol suşuna göre daha az tespit edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakterilerin iletişim mekanizması, toplu hareket yetenekleri, bakteriyel iletişimdeki moleküllerin yapısı ve işlevi çevreyi algılama sisteminin yönetimindedir. Bakteriler çevreyi algılama sistemiyle kritik gen ekspresyonlarını tetikleyerek AHL sinyal molekülleri aracılığıyla virülens faktörlerini üretmektedirler (Boşgelmez-Tınaz, 2003). Bu makalede

balıklarda ciddi hastalıklara neden olan *A. hydrophila*'da çevreyi algılama sistemi ve yönetimindeki virülens faktörleri fenotipik testlerle araştırılmıştır. Suşlarda öncelikle, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşları kullanılarak BHL ve OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi araştırılmıştır. *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *A. hydrophila* suşlarının BHL sinyal molekülünü ürettiği, *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan testte de OdDHL sinyal molekülünü üretebildikleri tespit edilmiştir.

Prensibe göre renk değişimi söz konusu balık patojeninin çevreyi algılama sistemini kullandığını ispatlamıştır. Bakterilerdeki çevreyi algılama sistemi; yeterli çoğunluğa ulaştıklarını algıladıkları anda virülens faktörlerini aynı anda aktifleştirmelerini sağlayan bir sistemdir. Çevreyi algılama bakterilerin sözde zekasıyla hareket ettiklerinin de bir ifadesidir. Aralarındaki bakteriyel iletişimin bitirilmesi balıklar üzerindeki olumsuz etkilerini de büyük oranda bitirecektir.

Schwenteit vd. (2011) *C. violaceum* (McClellan vd., 1997) ve *A. tumefaciens* pZLR4 (Cha vd., 1998) biyosensör suşlarını AHL molekülünü tespit için kullandıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da aynı iki bakteri türü biyosensör suş olarak kullanılmıştır.

Swift vd. (1997) *A. hydrophila* ve *A. salmonicidae* çevreyi algılama yoluyla gen ekspresyonunu gerçekleştirdiğini ve *A. hydrophila*'nın AHL moleküllerini ürettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada benzerlik göstermiş ve *A. hydrophila* AHL moleküllerinden BHL ve OdDHL moleküllerini üretmiştir.

Garde vd. (2010) *A. hydrophila*'nın diğer *A. hydrophila* ile çevreyi algılama sisteminin düzenlediği C4-HSL sinyal molekülünü kullanarak iletişime geçen oportünist bir gram negatif bakteri olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırma makalesinde de sonuç aynıdır ve *A. hydrophila* suşları sinyal molekülleriyle iletişime geçerek virülens faktörlerini oluşturmuştur.

Kozlova vd. (2008) *A. hydrophila*'nın ishal izolatu SSU'su, sitotoksik, enterotoksik ve hemolitik etkinlikler içeren bir sitotoksik enterotoksin üretir ifadesini kullanmışlardır. *Aeromonas* suşunun, Act'a ek olarak, T3 ve T6 salgılama sistemleri ve aynı zamanda AI-1 benzeri otoendüktörlerin, N-açıl homoserin laktonlarının üretimini modüle ettiği gösterilen karakteristiklerden oluştuğunu ve bunun QS ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada, *A. hydrophila* SSU'da S-ribosylhomocysteinase (LuxS) bazlı otoindüktör (AI)-2 QS sisteminin varlığını ve bunun bakteri virülensine katkısı olduğunu ortaya koymuşlardır. Mutajenezle hazırlanan *A. hydrophila*'nın luxS izogenik mutantının, biyofilm oluşumunda dinamikleri ve mimarisinde bir değişikliğe neden olduğunu, bakterinin hareketliliğinde bir düşüşe neden olduğunu ve septisemik durumlarda virülensini arttırdığını belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmamızda da ilgili bakteri AHL molekülünü üretmiş ve yapılan virülens testlerine olumlu cevap vermiştir.

Daha çok *P. aeruginosa* konulu çalışmalarda dikkat çeken ramnolipid hemolitik etkisi olan bir hemolizindir.

Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosülfaktan etki gösterir. Fosfolipaz C'nin etki etmesine zemin hazırlar. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eden (Karatuna ve Yağcı, 2008; Salyers ve Whitt, 1994) bu virülens faktörü araştırmamızın sonucunda balıklarda enfeksiyon oluşturan *A. hydrophila*'da görülmüştür. Ramnolipid aktivitesinin bu patojende varlığının tespitiyle ilgili patojenin virülens haritasına yeni bir bilginin eklenmesi açısından bu araştırma makalesi bir literatür kaynağı olmuştur.

Erdem vd. (2010) tatlı su balığı örneklerinin, bağırsak, solungaç, karaciğer ve deri numunelerinden izole edilen *Aeromonas* cinsine ait *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. veronii* *bv. sobria* varlığını değerlendirmişlerdir. İzole edilen 78 *Aeromonas* suşunun siderofor, hemolitik, pirazinamidaz, proteaz aktiviteleri ve antibiyotik direnç durumlarını incelemişlerdir. Siderofor üretimi *A. hydrophila*, *A. caviae* suşlarının tamamında görülürken *A. veronii* *bv. sobria* suşlarının yalnızca ikisinde gözlemlenmiştir. *A. hydrophila* ve *A. veronii* *bv. sobria* suşları hemolizin üretirken *A. caviae* suşlarını nonhemolitik olarak tespit etmişlerdir. Proteaz aktivitesi, *A. hydrophila*, ve *A. veronii* *bv. sobria* izolatlarının tamamında bulunurken *A. caviae* izolatlarının % 81,8'de saptamışlardır. Yaptığımız çalışmada buradaki araştırmayla benzer özellikler görülmüş *A. hydrophila*'da proteaz ve hemoliz testleri pozitif belirlenmiştir.

Swift vd. (1997) *A. hydrophila* ve *A. salmonicida* üzerinde yaptıkları bir çalışmada proteaz aktivitesinin pozitifliğiyle çevreyi algılama sisteminin bu bakterilerde olduğu belirtmiştir. İncelenen *A. hydrophila* suşlarında da proteaz sonuçları pozitifdir.

Rahim vd. (1984) Bangladeş'teki yaygın tatlı su balıklarından *Plotosus anguillaris*, *Lates calcarifer*, *Epinephelus megachir* ve *Telapia nilotica*'nın yüzeysel cilt ülserlerinden izole edilen *A. hydrophila* suşlarının enterotoksin üretimi, hemolizin üretimi ve bu iki virülens üretimi arasındaki ilişkiyi test etmişlerdir. *A. hydrophila* ile enfekte olmuş bu balıkların enterotoksijenik olduğu ve iyi pişirilmeden tüketilmesinin durumunda ishal salgınlarından sorumlu olabileceğinin belirtildiği bu çalışmada *A. hydrophila* suşlarının β -hemolitik virülens faktörünü üreterek enterotoksijenik olduğu bildirilmiştir. Sonuçta β -hemolizinin üretimi enterotoksijenik bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Hatha vd. (2005) izole ettikleri hareketli *Aeromonas* suşlarının tamamının kanlı besiyerinde β -hemoliz oluşturdıklarını yaptıkları çalışmayla bildirmiştir. Çalışmalarla desteklendiği gibi makalemizde araştırılan *A. hydrophila* suşlarında tespit edilen β -hemoliz aktivitesi balıklarda hastalık oluşumuna zemin hazırlayan ciddi virülens faktörlerindedir.

Allan ve Stevenson (1981) *A. hydrophila* NRC 505, alabalık içine enjekte edildiğinde patolojik etkilere neden olan hücre dışı maddeler ürettiğini belirtirler. Hücre dışı ürünlerin (EPS) proteolitik aktivite ve hemolitik aktivitesi balığın vücut sıcaklığı arttıkça balık üzerindeki etkisini kaybettiğini rapor

ettiler. Proteaz eksikli bir mutant olan G35 suşunun, gökkuşuğu alabalığı (*Salmo gairdneri*) ve benekli alabalık (*Salvelinus fontinalis*) için, ebeveyn suşundan belirgin şekilde daha toksik olduğunu görmüşlerdir. İntraperitoneal enjekte edilen benekli alabalığında *A. hydrophila*'nın hemolitik aktivitesinin öldürücü bir faktör olduğu sonucuna varmışlardır. İlgili makale de olduğu gibi bu çalışmamızda da incelediğimiz *A. hydrophila* suşlarının hemolitik aktivitelerinin üst düzeyde olduğunu rapor etmekteyiz.

Pandey vd. (2010) bakteri izolasyonundan sonra %2'lik süt tozu ve %10 jelatin içeren nutrient agara söz konusu bakteriyi inokule etmişlerdir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürecinde proteolitik aktiviteyi şeffaf zon oluşumuyla ispattırmışlardır. Hemolitik aktiviteyi ise insan kanı içeren TSA üzerinde çizgi ekimiyle belirlemişlerdir. Sonuçta patojen *A. hydrophila* suşlarında proteolitik ve hemolitik aktiviteleri belirlemişler ve SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi) ile hemolizi görüntülemişlerdir. Söz konusu çalışmayla bu araştırma da metod benzerliği göstermekle birlikte aynı sonucu vermiştir.

Sonuç olarak, çevreyi algılama bakteriye güç katan bir sistem olmakla birlikte patojenite de oldukça etkilidir. Bakterilerin organize olarak virülens faktörlerini oluşturmaları çevreyi algılama sistemiyle gerçekleşmektedir. Bu nedenle QS moleküllerinin üretiminin önlenmesi, parçalanması veya inhibisyonu, QS sinyalinin alınmasının önlenmesi stratejileri üzerinde durmak önemlidir. Bu anlamda bakteri dünyasındaki enfeksiyon güçlerinden biri olan iletişimin kesilmesi su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodu olarak önerilebilir. Bakteri hücreleri arasındaki iletişimin engellenmesi (Quorum Quenching) aracılığıyla antibakteriyel etki elde etme çalışmaları gelecek için umut vadeden bir alan olarak görülmektedir. Aynı zamanda çevreyi algılama sinyal moleküllerinin tespitiyle bu moleküllerin oluşumunun durdurulması hastalıkta erken teşhis kavramını gündeme getirmekte ve bu durumda profilaksi de çığır açması hedeflenmektedir. *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemini kullanarak virülens faktörlerini yönettiğinin tespitiyle bir sonraki adıma dikkat çekilmektedir. Sonraki çalışmalarda da bu sistemin bloke edilmesini ele alan Quorum Quenching çalışmaları dikkati çekmektedir ve dünyada gerçekleştirilmektedir. Örneğin Chen vd. (2019) bir çalışmalarında *Bacillus licheniformis* T-1 güvenli ve etkili bir quorum quenching bakterisi olabileceğini ve akuakültürde *A. hydrophila* enfeksiyonlarına karşı koruma potansiyelinin yüksek olduğunu belirtmiştir.

Bilim dünyasına katkı için farklı bir bakış açısıyla bakterilerin bu molekül sayılarını nasıl anladıkları, yeterli sayıda çoğunluğa ulaştıklarını tespit ederken kullandıkları bu AHL moleküllerini sayıp saymadıkları, basit bir matematik hesabı olan molekül sayısını saymayı nasıl yaptıkları, Hellingwerf (2005) belirttiği gibi bakterilerin bir sinir ağı özelliklerinin birçoğunu barındırdığı bulgusundan hareketle bakteriler için düşük düzeyde bir zeka yapısının mı söz konusu olduğu konuları gündeme gelmektedir.

A. hydrophila suşlarının tamamının BHL ve OdDHL sinyal molekülleriyle *A. hydrophila* suşlarının bakteriyel iletişim ağı olan çevreyi algılama sistemini kullandığı ve bu sistemin yönetimindeki virülens faktörlerinden ramnolipidi, proteazı, amilazı ve hemolizi ürettiği tespit edilmiştir. Araştırmada BHL ve OdDHL sinyal molekülleri aracılığıyla *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemini kullandığının ispatıyla insan patojenine özgü elastaz ve ramnolipid gibi patolojik etkenlerden ramnolipide *A. hydrophila*'da rastlanmasının araştırmaya orijinallik kattığını düşünmekteyiz. Bu araştırma

makalesinin *A. hydrophila*'da çevreyi algılama tespitiyle bir sonraki adım olarak bu patojenle ilgili quorum quenching çalışmalarına ve *in vivo* çalışmalara yön göstereceği kanaatindeyiz.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma makalesi Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKÇA

- Abdelhamed, H.A., Banes, M., Karsi, A. & Lawrence, M.L. (2019). Recombinant ATPase of virulent *Aeromonas hydrophila* protects channel catfish against motile *Aeromonas* septicemia. *Frontiers in Immunology*. DOI: [10.3389/fimmu.2019.01641](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01641)
- Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K.A., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A.S.G. Islam, M.S., Sack, R.B. & Molloy, R. (2000). Prevalence of Enterotoxin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Children with Diarrhea, Healthy Controls, and the Environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3785-3790.
- Al-Fatlawy, H.N.K., & Al-Hadrawy, H.A. (2014). Isolation and characterization of *A. hydrophila* from the Al-Jadrya river in Baghdad (Iraq). *American Journal of Educational Research*, 2(8), 658-662. DOI: [10.12691/education-2-8-14](https://doi.org/10.12691/education-2-8-14)
- Allan, B.J. & Stevenson, R.M.W. (1981). Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(10), 1114-1122.
- Altun, H.U. & Sener, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Abbad, L.B., Verdi, C.M., Santos, R.C.V, Da Silva, A.S. & Baldisserotto, B. (2019). Dietary supplementation with caffeine increases survival rate, reduces microbial load and protects the liver against *Aeromonas hydrophila*-induced hepatic damage in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103637.
- Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J. & Romalde, J.L. (2012). Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish & Shellfish Immunology*, 32(5), 756-761. DOI: [10.1016/j.fsi.2012.01.028](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.028)
- Boşgelmez-Tınaz, G. (2003). Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turkish of Journal Biology*. 27, 85-93.
- 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. DOI: [10.3354/dao065043](https://doi.org/10.3354/dao065043)
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D. & Farrand, S.K. (1998). Production of acylhomoserine lactone signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 1119-1129.
- Chen, B., Peng, M., Tong, W., Zhang, Q. & Song, Z. (2019). The Quorum Quenching Bacterium *Bacillus licheniformis* T-1 Protects Zebrafish against *Aeromonas hydrophila* Infection. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. DOI: [10.1007/s12602-018-9495-7](https://doi.org/10.1007/s12602-018-9495-7)
- Chopra, A.K., Xu, X.J., Ribardo, D., Gonzalez, M, Kuhl, K., Peterson, J. W. & Houston, C. W. (2000). The Cytotoxic Enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* Induces Proinflammatory Cytokine Production and Activates Arachidonic Acid Metabolism in Macrophages. *Infection and Immunity*, 68(5), 2808-2818.
- Chu, W., Jiang, Y., Yongwang, L. & Zhu, W. (2011). Role of the quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Aeromonas hydrophila*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(32), 5819-5825, DOI: [10.5897/AJMR10.684](https://doi.org/10.5897/AJMR10.684)
- Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17(6), 474-483, DOI: [10.1016/j.foodcont.2005.02.009](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.009)
- De Silva, B.C.J., Hossain, S., Dahanayake, P.S. & Heo, G.J. (2018). *Aeromonas* spp. from marketed Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*): molecular characterization, phylogenetic analysis, virulence properties and antimicrobial susceptibility. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 288-299. DOI: [10.1111/jam.14106](https://doi.org/10.1111/jam.14106)
- Dewi, A.F., Prajitno, A. & Yuniarti, A.A. (2019). Phytochemicals and The Ability of *Plantago major* Linn. Extract to Inhibit The growth of *Aeromonas hydrophila*. *The Journal of Experimental Life Science*, 9(2), ISSN:2087-2852.
- 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. DOI: [10.1111/j.1365-2958.2005.04612.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04612.x)
- Erdem, B., Kariptaş, E. & Kaya, T. (2010). Siderophore, hemolytic, protease, and pyrazinamidase activities and antibiotic resistance in motile *Aeromonas* isolated from fish. *Turkish Journal of Biology*, 34, 453-462. DOI: [10.3906/biy-0901-20](https://doi.org/10.3906/biy-0901-20)
- Gong, Y.X., Zhu, B., Liu, G.L., Liu, L., Ling, F. & Wang, G.X. (2015). Single-walled carbon nanotubes as delivery vehicles enhance the immunoprotective effects of a recombinant vaccine against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(1), 213-220. DOI: [10.1016/j.fsi.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.004)
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., & Christol, G.J.J. (2005). Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 131-134. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.017)
- Hazen, T. C., Flierman, C. B., Hirsch, R. P., & Esch, G. W. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 731-738.
- Hellingwerf, K.J. (2005). Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence?. *Trends in Microbiology*, 13(4), 152-158. DOI: [10.1016/j.tim.2005.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.001)
- İkinci, Ö. (2010). Bakteriler Koku Alıyor. Yaklaşan Saat, Bilim ve Teknik, Güncelleme: 06.09.2010, http://www.yaklasansaat.com/haberdosya/2010_haberleri/eylul_2010/eylul7.asp (20.03.2019).
- Karatuna, O. & Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing (Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and quorum sensing). *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38(1), 42-51.
- Kozlova, E.V., Popov, V.L., Sha, J., Foltz, S.M., Erova, T.E., Agar, S.L., Horneman, A.J. & Chopra, A.K. (2008). Mutation in the S-ribosylhomocysteine (*luxS*) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 45(5-6), 343-354. DOI: [10.1016/j.micpath.2008.08.007](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.08.007)
- Mathewson, J.J. & Dupont, H.L. (1992). *Aeromonas* species: role as human pathogens. In: Remington, J.S., Swartz, M.N. (Ed.), *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, (pp 26-36), Vol12e. Cambridge: Blackwell Scientific.
- McClellan, 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. DOI: [10.1099/00221287-143-12-3703](https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703)

- Moghaddam, M.M., Khodi, S. & Mirhosseini, A. (2014). Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology: Open Access*, 3(4), ISSN: 2327-5073. DOI: [10.4172/2327-5073.1000156](https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000156)
- Nijland, R. (2010). Bacteria can have a 'sense of smell'. Science Daily, Science News, 17 August 2010. <www.sciencedaily.com/releases/2010/08/100816095719.htm>.
- Ohman, D.E., Cryz, S.J. & Iglewski, B.H. (1980). Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *Journal of Bacteriology*, 142, 836- 842.
- Pandey, A., Naik, M. & Dubey, S.K. (2010). Hemolysin, Protease, and EPS Producing Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Strain An4 Shows Antibacterial Activity against Marine Bacterial Fish Pathogens. *Journal of Marine Biology*, Article ID 563205, 9 pages. DOI: [10.1155/2010/563205](https://doi.org/10.1155/2010/563205)
- Rahim, Z., Sanyal, S.C., Aziz, K.M., Huq, M.I. & Chowdhury, A.A. (1984). Isolation of enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 865-867.
- Salyers, A.A. & Whitt, D.D. (1994). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press, Washington, D. C., USA, pp. 260-268.
- Saraçlı, M.A. (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi*, 48(4), 244-250.
- Schwenteit, J., Gram, L., Nielsen, K.F., Fridjonsson, O.H., Bornscheuer, U.T., Givskov, M. & Gudmundsdottir B.K. (2011). Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. achromogenes and the effect of the autoinducer synthase AsaI on bacterial virulence. *Veterinary Microbiology*, 147, 389-397. DOI: [10.1016/j.vetmic.2010.07.020](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.020)
- Siegmund, I. & Wagner, F. (1991). New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *BioTechniques*, 5, 265-268.
- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B. & Williams, P. (1999). Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5192-5199.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Williams, P., Macintyre, S., & Stewart, G. S. A. B. (1997). Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI Homologs *AhyRI* and *AsaRI* and Their Cognate *N*-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5271-5281. DOI: [10.1128/jb.179.17.5271-5281.1997](https://doi.org/10.1128/jb.179.17.5271-5281.1997)
- Timur, G., & Timur, M. (2003). Balık Hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No: 5, s.538, İstanbul.
- Ulusoy, S. (2007). Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında *N*-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100s, Isparta.
- Yılmaz-Yıldırım, H., Karahan, A.G. & Başyigit-Kılıç, G. (2015). Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(1), 79 – 90. DOI: [10.5505/TurkHijyen.2015.04695](https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.04695)
- Wilson, J.S., Churchill-Angus, A.M., Davies, S.P., Sedelnikova, S.E., Tzokov, S. B., Rafferty, J.B., Bullough, P.A., Bisson, C. & Baker, P.J. (2019). Identification and structural analysis of the tripartite α -pore forming toxin of *Aeromonas hydrophila*. *Nature Communications*, 10(2900), 1-17. DOI: [10.1038/s41467-019-10777-x](https://doi.org/10.1038/s41467-019-10777-x)
- Zhang, X., Yang, W., Wu, H., Gong, X. & Li, A. (2014). Multilocus sequence typing revealed a clonal lineage of *Aeromonas hydrophila*, caused motile *Aeromonas* septicemia outbreaks in pond-cultured cyprinid fish in an epidemic area in central China. *Aquaculture*, 432, 1-6. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.04.017](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.017)