

**Çeşitli Fiziksel ve Çevresel Faktörlerin *Erwinia carotovora* subsp.  
*carotovora*' da Karbapenem Antibiyotiği Sentezine Etkilerinin İncelenmesi**

**Dilek ÇAVUŞOĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ISPARTA-2004**

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

**Çeşitli Fiziksel ve Çevresel Faktörlerin *Erwinia carotovora* subsp.  
*carotovora*' da Karbapenem Antibiyotiği Sentezine Etkilerinin  
İncelenmesi**

**Dilek ÇAVUŞOĞLU**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gülgün TINAZ**

**Yüksek Lisans Tezi  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA 2004**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr.Yusuf AYVAZ

Üye : Yrd.Doç.Dr. Gülgün TINAZ

Üye : Yrd.Doç.Dr. Ayşegül KUBİLAY

ONAY

Bu tez .15/02/2004 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

.../.../...  
Doç.Dr. ÇİĞDEM SAVAŞKAN  
Enstitü Müdür V.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. <i>Erwinia</i> Cinsi.....	2
2.2. ‘Yumuşak Çürüklük (Soft-rot)’ Etkeni Olan <i>Erwinia</i> ’lar.....	2
2.2.1. ‘Yumuşak çürüklük (Soft-rot)’ Etkeni Olan <i>Erwinia</i> ’ların Ekzoenzimleri.....	3
2.1.2. <i>Erwinia</i> ’ların Diğer Özellikleri.....	4
2.1.2.1. Haraket Yeteneği.....	4
2.1.2.2. Antibiyotik Üretimi.....	5
2.2. Antibiyotikler.....	5
2.2.1. $\beta$ -laktam Antibiyotikleri.....	6
2.2.1.1. $\beta$ -laktam Antibiyotiklerinin Yapısı.....	6
2.2.2. Penisilinler ve Sefalosporinler.....	7
2.2.3. Klavulanik Asit.....	8
2.2.4. $\beta$ -laktam Grubu Antibiyotiklerin Üretiminde Çevresel Parametrelerin Etkisi.....	8
2.2.4.1. Karbon Kaynağı.....	8
2.2.4.2. Azot.....	9
2.2.4.3. Fosfat.....	10
2.2.4.4. Oksijen.....	10
2.2.4.5. Amino Asitler.....	10
2.2.5. Karbapenemler.....	11
2.2.5.1. <i>Erwinia</i> ’larda Karbapenem Üretimi.....	15
2.3. Prokaryotlarda Hücre Sinyalleri.....	15
2.3.1. <i>N</i> -açıl Homoserin Laktonlar Tarafından Gen Regülasyonu.....	16
2.4. Çevreyi Algılama Sistemi.....	16
2.4.1. <i>Vibrio fischeri</i> ’ de Biyoışım (Bioluminesence).....	19
2.5. <i>Erwinia</i> ’ da Karbapenem Antibiyotik Üretiminin Düzenlenmesi.....	21
3. MATERYAL ve METOT.....	23
3.1. <i>Erwinia</i> ve <i>E. Coli</i> Suşlarının Üretim ve Saklanması.....	23
3.2. Besiyerlerinin ve Solüsyonların Hazırlanması.....	23
3.3. Karbapenem Hasasiyet Testi.....	24
3.4. Büyüme Eğrileri.....	25
3.4.1. Aerobik Büyüme Eğrileri.....	25
3.4.1.1. Sıcaklık Büyüme Eğrileri.....	25
3.4.1.2. Karbon Kaynağı Büyüme Eğrileri.....	25
3.4.1.3. Sodyum klorür (NaCl) Büyüme Eğrileri.....	26
3.4.1.4. Fosfat ve Nitrojen Büyüme Eğrileri.....	26

3.4.2. Oksijen-Sınırlı Büyüme Eğrileri.....	26
4. DENEYSEL BULGULAR.....	27
4.1. Sıcaklığın Etkisi.....	27
4.2. Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Etkisi.....	28
4.3. Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	29
4.4. Oksijen-Limitasyonunun Etkisi.....	30
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	33

## ÖZET

Fitopatojen bir bakteri olan *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* (*Ecc*)'nın GBI suşu (5R)-karbapen-2-em-3-karboksilik asit (karbapenem) adlı basit bir  $\beta$ -laktam antibiyotiğini üretebilme yeteneğindedir. *Ecc*'de karbapenem üretimi çevreyi algılama sistemi adı verilen bir mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Bu sistem *N*-(-3-oksohekzanol)-*L*-homoserin lakton (OHHL) adı verilen bir sinyal molekülü ve karbapenem üretiminden sorumlu genlerin transkripsiyonunu aktive eden, transkripsiyonel bir aktivatör olan CarR proteininden meydana gelen iki ana bileşenden oluşur.

Bu çalışmada, sıcaklık, oksijen limitasyonu, farklı karbon kaynakları, fosfat, azot ve NaCl gibi çeşitli çevresel faktörlerin karbapenem sentezi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 30, 32 ve 34°C derecelerde karbapenem üretimi gerçekleşirken, sıcaklık 36°C dereceye yükseltildiğinde üretimde büyük bir düşüş olduğu, 37°C derecede ise tamamen durduğu gözlenmiştir. Kullanılan karbon kaynağının farklı olması karbapenem üretiminde de farklılıklara yol açmıştır. Karbon kaynağı olarak fruktoz içeren ortamda antibiyotik üretimi daha fazla miktarda olmuştur. Aynı şekilde farklı tuz konsantrasyonları da antibiyotik üretimini etkilemiştir.

Bu çalışma, karbapenem üretiminin sadece genetik faktörlerin kontrolü altında olmadığını çeşitli çevresel faktörlerinde üretimde etkili olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Erwinia carotovora*,  $\beta$ -laktam antibiyotikleri, karbapenem, çevreyi algılama sistemi.

## ABSTRACT

Strain GBI of the bacterial phytopathogen, *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* (*Ecc*), produces the simple  $\beta$ -lactam antibiotic, (5R)-carbapen-2-em-3-carboxylic acid (carbapenem). In *Ecc*, carbapenem production is subject to control by a regulatory mechanism called “quorum sensing”. This system relies on two major components, a small diffusible signalling molecule *N*-(-3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) which accumulates in a population density-dependent manner and a transcriptional activator protein, CarR, which, in concert with OHHL, activates transcription of the carbapenem genes.

In this study, effects of various environmental factors, such as temperature, O<sub>2</sub>-limitation and different carbon sources on carbapenem production were investigated. While at 30, 32 and 34°C, production of carbapenem was observed, at 36°C, carbapenem production was drastically reduced when compared to that at 30°C, and it was completely abolished at 37°C. The nature of the carbon source used for growth was also affected carbapenem production. Carbapenem production was higher when fructose was used as a carbon source. Similarly, different concentrations of salt had an effect on antibiotic production.

In this study, it was shown that carbapenem synthesis is not only under control of genetic factors but also various environmental factors affect on synthesis of this antibiotic.

**Key words:** *Erwinia carotovora*,  $\beta$ -lactam antibiotics, carbapenem, quorum-sensing.

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım süresince benden ilgi, destek ve katkılarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Gülgün TINAZ'a, çalışmalarım boyunca benden maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen aileme ve sevgili eşim Kürşat ÇAVUŞOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

31.12.2004  
Dilek Çavuşoğlu



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

Şekil 2.1. Çeşitli bitkilerde <i>Erwinia</i> 'nın sebep olduğu yumuşak çürüklük hastalığı.....	3
Şekil 2.2. $\beta$ -laktam antibiyotiği üreten mikroorganizmaların dağılımı.....	7
Şekil 2.3. 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asitin üretimi için biyosentetik yol.....	13
Şekil 2.4. Karbapenem antibiyotiklerinin yapısı.....	14
Şekil 2.5. N-açıl homoserin lakton moleküllerinin yapısı.....	18
Şekil 2.6. <i>Vibrio fischeri</i> 'de ışmanın düzenlenmesi.....	20
Şekil 2.7. <i>E. carotovora</i> 'da karbapenem üretiminin düzenlenmesi.....	22
Şekil 3.1. <i>Ecc</i> 'de karbapenem antibiyotik üretiminin düzenlenmesi.....	25
Şekil 4.1. Sıcaklığın <i>E. carotovora</i> 'nın gelişimine ve karbapenem antibiyotik üretimine etkisi.....	27
Şekil 4.2. NaCl konsantrasyonunun <i>E. carotovora</i> 'nın gelişimine ve karbapenem antibiyotik üretimine etkisi.....	28
Şekil 4.3. Farklı karbon kaynaklarının karbapenem antibiyotik üretimine etkisi.....	29

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 2.1. <i>N</i> -açıl homoserin laktonlar ve fenotiplerle ilişkileri.....	17
Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan besiyeri ve solüsyonlar.....	24

## 1. GİRİŞ

*E. carotovora* cinsi, çeşitli bitkilerde hasat öncesi ve hasat sonrası çeşitli hastalıklara neden olan zararlı bir fitopatojendir. *Erwinia* türleri karakteristik olarak bitkilerin üzerinde veya içinde patojen ve saprofit olarak bulunur. Patates, havuç, şalgam, kereviz gibi zirai önemi olan bitkilerde ‘yumuşak çürüklük (soft-rot)’ adı verilen ve dokuların yumuşaması ile karakterize olan hastalığa neden olurlar.

*Erwinia* türlerinin yukarıda bahsedilen zirai önemlerine ek olarak, iki *Erwinia* türünün bazı antibiyotikleri üretebildikleri tespit edilmiştir (Parker ve ark., 1982; Axelrod ve ark., 1988; Ishimaru ve ark., 1988). Bunlardan *Erwinia herbicola* A 111 suşu’nun, lipopeptit antibiyotiklerinden olan herbicolin A ve B’ yi üretebildiği bulunmuştur (Greiner ve Winkelman, 1991). *Erwinia carotovora*’ nın bazı suşlarının ise bir  $\beta$ -laktam antibiyotiği olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asiti üretebildiği gösterilmiştir (Parker ve ark., 1982). Bu antibiyotiğin üretimiyle antibiyotiğe karşı duyarlı olan bakterilerin sayılarındaki azalmayla organizmaların rizosferdeki yaşama şanslarının arttırılabileceği düşünülmektedir (Cavalier-Smith, 1992).

Penisilin ve sefalosporinler gibi  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin üretimi, karbon kaynakları, nitrojen, amino asitler, pH ve oksijen gibi çevresel faktörler tarafından kontrol edilmektedir (Jensen ve Demain, 1995). Penisilin ve sefalosporinlerin biyosentezinde karbon kaynağı çok önemli bir yer tutmaktadır. Glukoz ve sükröz gibi karbon kaynaklarının bu antibiyotiklerin üretimi üzerinde olumsuz bir etkiye yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca lizin ve metionin gibi bazı amino asitlerin, yüksek nitrojen ve fosfat konsantrasyonlarında  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin üretiminde son derece etkili oldukları görülmüştür. Ancak literatürde, *Erwinia carotovora*’ da karbapenem üretimini kontrol eden genetik faktörler üzerine bir çok çalışmalar bulunmasına rağmen, çevresel faktörlerin etkisine ait bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada *Erwinia carotovora* tarafından üretilen karbapenemin sıcaklık, tuz (NaCl), karbon kaynakları gibi çevresel faktörlerden nasıl etkilendiği araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. *Erwinia* Cinsi

Fitopatojen bir bakteri olan *Erwinia* türü Enterobacteriaceae familyasına ait olup Gram-negatif, fakültatif anaerobik, çubuk (rod) şekilli bakterilerdir (Leliot ve Dickey, 1984). *Erwinia* cinsi, *E. amylovora*, *E. herbicola* ve *E. carotovora* olmak üzere üç ana türe ayrılır (Perombelon ve Kelman, 1980). ‘*Amylovora*’ türü damar daralmasına veya ‘kuru nekroz (dry necroses)’a sebep olan türleri ihtiva eden bir gruptur. ‘*Herbicola*’ türü tipik olarak sarı karotenoid pigmentlerini içeren epifitik türleri içine alır. ‘*Carotovora*’ grubu ise yumuşak çürüklük (soft-rot) hastalığına sebep olan peptinolitik türleri ihtiva eden bir gruptur (Perombelon, 1992).

### 2.2. ‘Yumuşak Çürüklük (Soft-rot)’ Etkeni Olan *Erwinia*’lar

‘Yumuşak çürüklük (Soft-rot)’ etkeni olan *Erwinia*’lar; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*), *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*), *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum* (*Ecb*) ve *Erwinia chrysanthemi* (*Echr*)’ yi içine alırlar (Perombelon ve Kelman, 1980). ‘Yumuşak çürüklük’ etkeni *Erwinia*’ların taksonomik olarak gruplandırılmasında konak özgüllükleri değil biyokimyasal özellikleri temel alınır. *Eca*, *Ecc* ve *Echr* optimal üreme sıcaklıkları bakımından farklılık gösterirler (Perombelon ve Kelman, 1980). Optimum üreme sıcaklıkları coğrafik dağılımlarını yansıtır. *Eca*, 25-28 °C’de optimum olarak üreyebilen, *Ecc* ve *Echr*’e göre sıcaklığa karşı daha duyarlı olan, ılıman bölgelerde yayılış gösteren ve patatesten karabacak (blackleg) adı verilen hastalığa neden olan bir türdür. *Ecc* suşları ise genellikle 28-30°C sıcaklık da gelişirler ancak bazı suşlar daha yüksek sıcaklıklara da dayanabilirler ve hem ılıman hem de tropikal bölgelerde bulunabilirler. *Ecc*, kereviz, havuç, patates ve şalgam gibi birçok önemli sebze yumuşak çürüklük hastalığına sebep olur (Şekil 2.1). Karanfil, kasımpatı, krizantem ve difenbahya gibi tropikal ve subtropikal ürünlerin patojeni olan *Echr* 34-37°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilirler (Perombelon ve Kelman, 1980).



Şekil 2.1. Çeşitli bitkilerde *Erwinia*'nın sebep olduğu yumuşak çürüklük hastalığı  
(vegetablemndonline.ppath.commell.edu/PhotoPage...)

### 2.2.1. 'Yumuşak Çürüklük (Soft-rot)' Etkeni *Erwinia*'ların Ekzoenzimleri

'Yumuşak çürüklük', özellikle patates ve havuç gibi birçok önemli tarım bitkisine zarar veren bir hastalıktır. Bu hastalık, patojen tarafından üretilen ve salgılanan ve bitki hücre duvarını tahrip edici ekzoenzimlerin neden olduğu yoğun doku yumuşaması ile kendini gösterir.

*Erwinia*'ların ekzoenzimleri arasında, pektat liyaz (Pel)'in izoformları, poligalaktüörinaz (Peh), selülaz (Cel) ve proteaz (Prt) sayılabilir ve bu ekzoenzimlerin üretimi 'yumuşak çürüklük' grubunun patojenitesinin başlıca sebebidir (Collmer ve Keen, 1986; Barras ve ark., 1994). Ekzoenzimleri üretmeyen veya salgılayamayan mutantların patojenitelerinin azaldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Boccaro ve ark., 1988, Reeves ve ark., 1993).

Pel ve Cel enzimlerinin çoğu TipII yoluyla (iki basamaklı salgılama) salgılanırlar iken (Salmond, 1994), Prt enzimleri, Tip I yoluyla (tek basamaklı salgılama) salgılanırlar (Letoffe ve ark., 1990). Bu enzimler arasında, pektinazlar doku yumuşamasında önemli bir rol oynarlar. Bunlar orta lamel ve hücre duvarının pektik bileşenlerini hidrolize etmek suretiyle doku yumuşamasına neden olurlar (Barras ve ark., 1994). ‘Yumuşak çürüklük’ etkeni olan *Erwinia*larda başlıca pektinolitik enzimler; Pel A, Pel B, Pel C, Pel D ve Pel E ve pektin metil esteraz Pem’ lerdir (Barras ve ark., 1994). Selülitik enzimler de patojenite için önemli olup hücre duvarında yumuşamaya ve kısmi bozulmalara sebep olurlar. *Ecc* ve *Echr*’ nin başlıca Cel’ leri, Cel Z (Boyer ve ark., 1987) ve Cel V (Cooper ve Salmond, 1993)’ dir.

Proteaz enzimlerinin patojenitedeki rolü çok iyi anlaşılmamış olmakla birlikte Martis ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada, *Ecc*’de *prt W* geninin inaktivasyonunun patojenitede azalmaya neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Martis ve ark., 1999).

## **2.1.2. *Erwinia*’ların Diğer Özellikleri**

### **2.1.2.1. Hareket Yeteneği**

*E. carotovora* transpozon mutantlarının axenic tütün bitkileri üzerinde patojenite azalması göstermeleri hareket yeteneklerindeki kayıpla izah edilmektedir (Pirhonen ve ark., 1991).

Benzer bir olay *Eca*’ nın hareket yeteneğine sahip olmayan mutantlarında gözlenmiştir. Bu mutantların çoğu normal düzeyde ekzoenzim üretmelerine rağmen, hareket yeteneğinin kaybından dolayı patojenitede azalma meydana gelmiştir (Mulholland ve ark., 1993). Ancak patojenitede hareket yeteneğinin rolü hala belirgin değildir.

### 2.1.2.2. Antibiyotik üretimi

*Erwinia* türlerinin zirai önemlerine ek olarak, iki *Erwinia* türünün bazı antibiyotikleri üretebildikleri tespit edilmiştir (Parker ve ark., 1982; Axelrood ve ark., 1988; Ishimaru ve ark., 1988). Bunlardan *Erwinia herbicola* A 111 suşunun, lipopeptit antibiyotiklerden olan herbicolin A ve B' yi üretebildiği bulunmuştur (Greiner ve Winkelman, 1991). *Erwinia carotovora*' nın bazı suşlarının ise bir  $\beta$ -laktam antibiyotiği olan 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asit (karbapenem)'i üretebildiği gösterilmiştir (Parker ve ark., 1982). Bu antibiyotiğin üretimiyle, antibiyotiğe karşı duyarlı olan bakterilerin sayısının azaltılarak, organizmanın rizosferdeki yaşama şansının arttığı düşünülmektedir (Cavalier-Smith, 1992).

## 2.2. Antibiyotikler

Antibiyotiklerin keşfiyle tıpta hastalıkların tedavisinde yeni bir çığır açılmıştır.

Antibiyotiklerin keşfi, tedavi edici hekimlik tarihinin en önemli buluşu olmuştur.

Antibiyotiklerin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla birlikte bakteriyel infeksiyonlarla savaşta büyük bir üstünlük sağlanmıştır. Antibiyotikler, bakterilerin üremesini engelleyen veya onları öldüren ikincil metabolitler olarak tanımlanmışlardır. Tarihçeleri, 1929 yılında Alexander Fleming'in bir küf mantarı olan *Penicillium notatum* ile kontamine olan bir bakteri kültüründe üremenin engellediğini tesadüfen fark etmesiyle başlar. Bu antibakteriyel etkinin, *Penicillium* küfünün daha sonra penisilin adı verilen bir madde üretmesinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ancak bu maddenin antibakteriyel gücü, penisilinin izole edilmesi ve saflaştırılması başarısız olduğu için 1940 yılına kadar bilinmemiştir. Penisilin üzerindeki önemli ilerlemeler, Oxford'da 1940 yılında Chain, Florey ve onların çalışma arkadaşları tarafından kaydedilmiştir. Bu araştırmacılar faredeki öldürücü bir infeksiyona karşı penisilinin son derece etkili olduğunu göstermişlerdir (Rollison, 1998). Bu sonuç penisilinin insanlarda klinik kullanımına imkan sağlamıştır.

Penisilinin tıpta kullanılmaya başlamasından sonra streptomisin, kloromfenikol, vankomisin ve kanamisin gibi diğer birçok antibiyotikte keşfedilmiştir.

### 2.2.1. $\beta$ -laktam Antibiyotikleri

$\beta$ -laktamlar ilk keşfedilen antibiyotik grubudur. İlk olarak ipliksi mantarlarda keşfedilmelerine rağmen daha sonra birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde de buldukları tespit edilmiştir (Şekil 2.2).  $\beta$ -laktam antibiyotikleri biyolojik olarak bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasının biyosentezini engelleyici bir etkiye sahiptirler. Peptidoglikan kısa peptitlerle çapraz olarak bağlanmış düz polisakkarit zincirleri içeren bir makromoleküldür. Bakteri hücre duvarının sert ve sağlam bir yapıda olmasını sağlar. Bu molekül olmazsa, bakteriler kendi yüksek iç basınçları nedeniyle patlarlar. Bakteriyel sitoplazmik membran üzerinde bulunan ve peptidoglikan biyosentezinde enzimatik rolleri olan Penisilin Bağlayan Proteinler (PBP), penisilinler ve diğer benzer antibiyotikler için direk hedef konumundadırlar.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler günümüzde tıbbi tedavide kullanılan bir çok antibiyotiği ihtiva ederler. Yüksek etkili olmaları ve düşük toksisiteleri nedeniyle oldukça geniş ölçüde çalışılmışlardır (Aharonowitz ve Cohen, 1992).

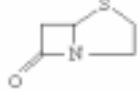
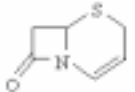
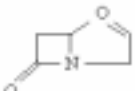
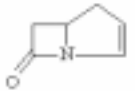

#### 2.2.1.1. $\beta$ -laktam Antibiyotiklerinin Yapısı

$\beta$ -laktamlar kimyasal yapılarına göre; penisilinler, sefalosporinler ve sefamisinler, klavamlar, karbapenemler ve monobaktamlar olarak beş grupta sınıflandırılırlar (Şekil 2.2). Yapılarında dört karbonlu bir  $\beta$ -laktam halkası ve beş yada altı karbonlu ikinci bir halka (monobaktamlar hariç) ihtiva ederler (McGowan ve ark., 1998).

Penisilinler, sefalosporinler ve sefamisinler, ikinci halkada sülfür atomuna sahip olmaları nedeniyle diğer  $\beta$ -laktam gruplarından farklılık gösterirler (Martin ve Gutierrez, 1995). Penam yapısında, dört karbonlu bir  $\beta$ -laktam halkası beş karbonlu sülfür ihtiva eden thiazolidin halkasıyla birleşirken, sefam yapısında  $\beta$ -laktam halkası altı karbonlu dihydrothiazine ile birleşir. Klavam halkası, klavulanik asitte bulunur



ve bu yapı oksijenle sülfürün yer değiştirmesi sebebiyle penam halkasından farklıdır. Monobaktamlarda bulunan monobaktam halkası,  $\beta$ -laktam halkasına birleşmiş bir halkanın olmaması ile karakterize olur. Karbapenemlerde ise sefalosporinler ve penisilinlerin thiazolidine halkasındaki sülfür atomu bir karbon atomu ile yer değiştirmiştir.

$\beta$ - laktam Antibiyotiklerinin sınıfları		Üretici mikroorganizmalar		
		Bakteri		Mantar
		Gram(+)	Gram(-)	
<b>Penam</b> 	<b>Penisilin</b>			<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
<b>Ceph-3-em</b> 	<b>Sefalosporinler</b> <b>Sefamisinler</b>	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Streptomyces chrysogenum</i> <i>Nocardia lactamdurans</i>	<i>Flavobacterium sp.</i> <i>Lysobacter lactamgenus</i>	<i>Acremonium</i> <i>Faeciomyces perniticus</i>
<b>Klavam</b> 	<b>Klavulanik asit</b>	<i>Streptomyces clavuligerus</i>		
<b>Carbapenem</b> 	<b>Tinamisinler</b> <b>Olivanik asit</b>	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>S. olivaceus</i>	<i>Erwinia carotovora</i> <i>Serratia sp.</i>	
<b>Monobaktam</b> 	<b>Monobaktamlar</b>		<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i>	

Şekil 2.2.  $\beta$ -laktam antibiyotiği üreten mikroorganizmaların dağılımı  
(Brakhage, 1998)

### 2.2.2. Penisilinler ve Sefalosporinler

Penisilin sistemik olarak kullanıma giren ilk antibiyotiktir. 1940'lı yıllarda Dr. Florey ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir ve klinik olarak insanlar üzerinde

kullanılmaya başlanmıştır. Sefalosporinler ilk defa 1945 yılında *Cephalosporium acremonium*'dan elde edilmişlerdir. Penisilinler ve sefalosporinler bugün hala klinikte kullanılan en etkili antiyotikler arasındadırlar. Bu nedenle üzerlerinde geniş ölçüde çalışılmıştır. Penisilinler bir *Streptomyces* suşu ve çeşitli küfler tarafından üretilirler. Sefalosporinler ise sadece küfler tarafından değil bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler tarafından da üretilebilirler (Aharonowitz ve Cohen, 1992).

### **2.2.3. Klavulanik Asit**

*Streptomyces clavuligerus*, klavamlar, klavulanik asit ve sefamisin C gibi  $\beta$ -laktam antibiyotiklerini üretebildiği bilinen Gram-pozitif bir toprak bakterisidir. Klavulanik asit, hem Gram-pozitif hemde Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen güçlü bir  $\beta$ -laktamaz inhibitörüdür (Reading ve Cole, 1977) ancak antibakteriyel etkisi yok denecek kadar azdır. Klinikte mevcut  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine direnç gösteren enfeksiyonlarla mücadele etmek amacıyla  $\beta$ -laktam antibiyotikleri ile birlikte kullanılmaktadır (Paradkar ve ark., 1998). Ortamda bulunan  $\beta$ -laktamazlarla kuvvetle birleşerek  $\beta$ -laktam antibiyotiğini enzimden etkisinden koruyarak antibakteriyel etki sahasını genişletir.

### **2.2.4. $\beta$ -laktam Grubu Antibiyotiklerin Üretiminde Çevresel Parametrelerin Etkisi**

$\beta$ -laktam antibiyotik üretimini kontrol eden sistemler üzerinde yapılmakta olan araştırmalar, kontrol mekanizmalarının çok karışık olduğunu göstermiştir. Genetik faktörlere ilave olarak, çeşitli çevresel faktörlerin de bu antibiyotiklerin üretimini etkilediği ortaya konmuştur (Brakhage, 1998). Aşağıda, penisilin, sefalosporin ve klavam'ların biyosentezinde etkili olan çevresel faktörler hakkında bugün sahip olduğumuz bilgiler özetlenmektedir.

#### 2.2.4.1. Karbon Kaynağı

Penisilin, sefalosporin ve sefamisin gibi  $\beta$ -laktamların üretiminde karbon kaynaklarının rolü yoğun olarak çalışılmıştır. Glikoz, antibiyotik üretebilen bakterilerin üremesi için en uygun karbon ve enerji kaynağı olarak iş görmesine rağmen birçok antibiyotiğin sentezini olumsuz yönde etkiler (Jensen ve Demain, 1995). Brakhage ve arkadaşları 1992'de, *P.chrysogenum*' da aşırı glikoz kullanımının penisilin titresinde önemli oranda azalmaya sebep olduğunu bulmuşlardır. Revilla ve çalışma grubu da, fruktoz, galaktoz ve sukrozun penisilin ve sefalosporin üretimini olumsuz yönde etkilediğini, laktozun ise söz konusu antibiyotiklerin üretimini teşvik ettiğini yaptıkları çalışma sonucunda ortaya koymuşlardır (Revilla ve ark., 1984). Espeso ve arkadaşları 1993'de, gliserol kullanımının *A. nidulans*' da penisilin üretimini tamamen ortadan kaldırdığını tespit etmişlerdir (Espeso ve ark., 1993). Benzer bir durum *C. acremonium*' da gözlenmiştir. Bu mikroorganizmada glikoz ve gliserol gibi karbon kaynaklarının sefalosporin üretimini olumsuz yönde etkiledikleri belirlenmiştir (Martin ve Aharonowitz, 1983).

Küfler de olduğu gibi, bir Gram-pozitif bakteri olan *S. clavuligerus*'da da sefamisin biyosentezinde karbon kaynağının çeşidi önemli bir etkiye sahiptir. Gliserol sefamisin sentezini baskımlarken, nişasta teşvik eder (Martin ve Aharonowitz, 1983).

#### 2.2.4.2. Azot

Aharonowitz yaptığı çalışmada, hem fungi hem de aktinomisetlerde  $\beta$ -laktam antibiyotik biyosentezinin ortamdaki azot miktarı tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur (Aharonowitz, 1980). *S. clavuligerus* ve *S. cattleya*' da aşırı miktarda amonyum varlığı  $\beta$ -laktam üretimini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (Lilley ve ark., 1981). Benzer şekilde Sanchez ve arkadaşları, *P. chrysogenum*' da yüksek amonyum düzeyinin penisilin üretimini engellediğini rapor etmişlerdir (Sanchez ve ark., 1988).

#### 2.2.4.3. Fosfat

Çeşitli çalışmalar, aşırı miktardaki fosfatın hem *C. acremonium*' da sefalosporin üretimini hem de *S. clavuligerus*' ta sefamisin üretimini olumsuz yönde etkilediğini açığa çıkarmıştır (Kuenzi, 1980, Aharonowitz, 1980). Ancak bu etkinin arkasındaki moleküler mekanizma anlaşılmış değildir.

#### 2.2.4.4. Oksijen

Penisilinlerin biyosentezinde rol olan bazı enzimler aktiviteleri için oksijene ihtiyaç duydukları için, oksijen varlığı bu antibiyotiğin sentezi için oldukça önemlidir.

Hilgendorf ve çalışma grubu, oksijen gerilimi altında sefalosporin C üretiminin azaldığını yaptıkları çalışmada ortaya koymuşlardır (Hilgendorf ve ark., 1987).

Ancak bu bulgunun tersine, Renno ve arkadaşları oksijen limitasyonunun *P. chrysogenum*' da penisilin biyosentezini düzenleyen *acvA* ve *ipnA* genlerinin ekspresyonunu dolayısıyla penisilin üretimini arttırdığını göstermişlerdir (Renno ve ark., 1992).

#### 2.2.4.5. Amino Asitler

Penisilin ve sefalosporinler, amino asit öncülerinden sentezlenmeleri bu antibiyotiklerin biyosentezinde amino asitlerin rol oynayabileceği olasılığını düşündürmüştür. Bu olasılık besiyerine farklı amino asitlerin ilavesi ile test edilmiştir. Farklı amino asitlerin ilavesinin  $\beta$ -laktam üretiminde farklı etkilere sahip olduğu görülmüştür. Brakhage ve arkadaşları 1992'de, *A. nidulans* ve *P. chrysogenum*' da lizin amino asitinin penisilin üretimini azalttığını yaptıkları çalışmada tespit etmişlerdir (Brakhage ve ark., 1992). Mehta ve çalışma grubu da, yüksek lizin konsantrasyonunun *C. acremonium*' da sefalosporin üretimini engellediğini rapor etmişlerdir (Mehta ve ark., 1979).

### 2.2.5. Karbapenemler

Penisilinler ve sefalosporinlerin birçok hastane kaynaklı enfeksiyonun tedavisindeki başarıları ispatlanmıştır (Neu, 1994). Ancak bakteriyel patojenler arasında  $\beta$ -laktam direncinin artması, geniş spektrumlu yeni antibiyotiklere ihtiyaç olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır. Karbapenemler, 1970'li yılların sonunda  $\beta$ -laktamazları inhibe eden yeni antibiyotikler bulmak amacıyla yürütülen bir program dahilinde keşfedilmişlerdir (Sykes ve ark., 1981, Imada ve ark., 1981). Karbapenemler, penisilin ve sefalosporinlerin etki edemediği anaerobik bakterilere karşı son derece yüksek aktivite gösterdiklerinden dolayı oldukça önemli bir gruptur. Geniş spektrumlu aktivitelerine ilave olarak aerobik ve fakültatif Gram-pozitif basillere karşı kullanıldıklarında post-antibiyotik bir etki gösterirler ve  $\beta$ -laktamazlar varlığında stabilitelelerini koruyabilirler (Coulton ve Hunt, 1996; Neu, 1994; Ubukata ve ark., 1990).

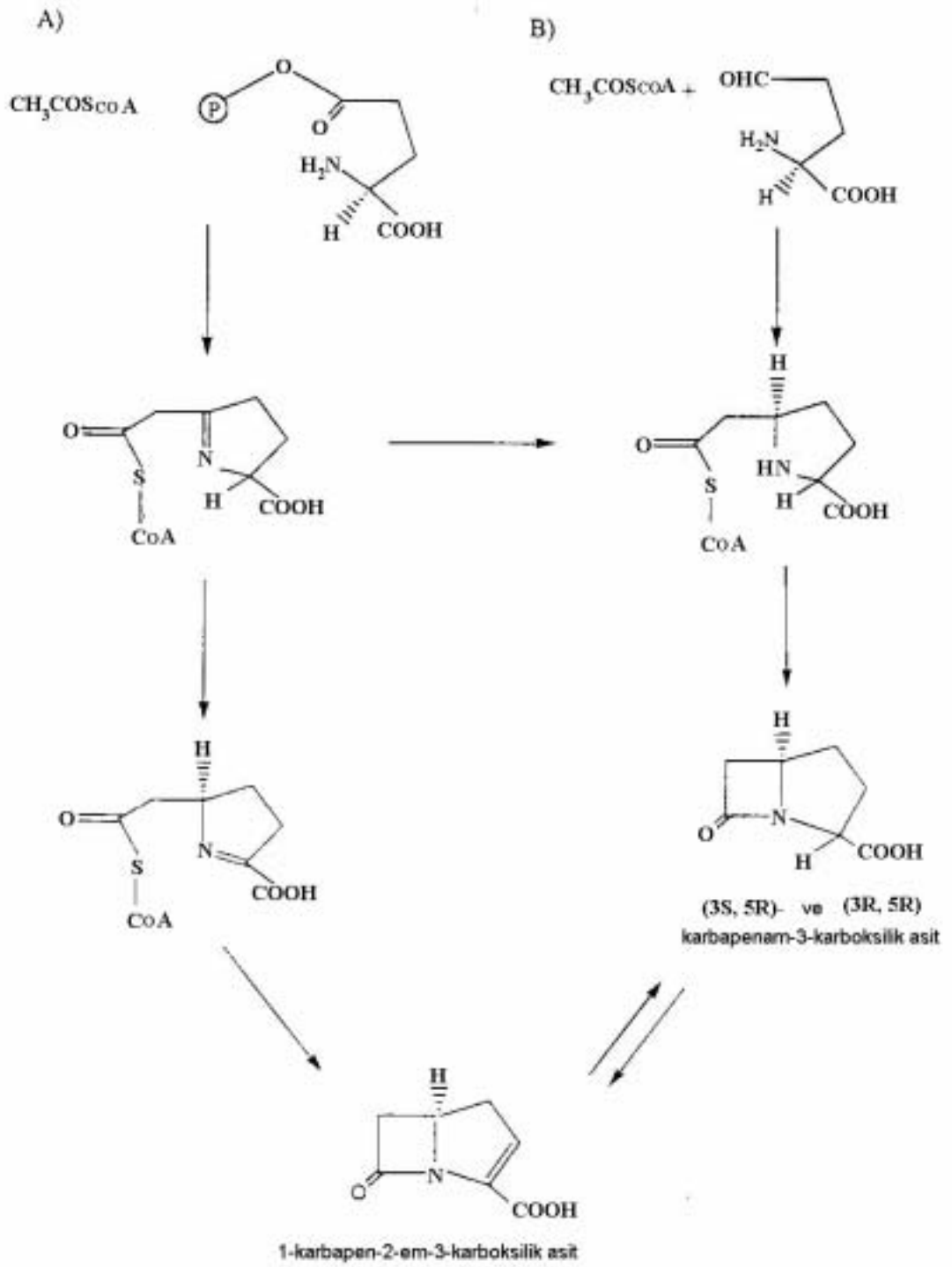
Karbapenemler, kükürt atomunun yerini bir karbon atomunun alması ve ikinci ve üçüncü karbonlar arasında bir çift bağ bulunması ile penisilinlerden ayrılırlar (Moellering ve ark., 1989). Bu grup, tienamisinler, olivanik asitler ve karpetimisin'ler gibi doğal ürünleri ihtiva ederler. Tienamisin ilk keşfedilen karbapenem antibiyotiği olup, *Streptomces cattleya* tarafından üretilmektedir (Kahan ve ark., 1979). Bu antibiyotik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı çok geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir (Buchan ve ark., 1994) ve  $\beta$ -laktamazların çoğuna direnç gösterir (Neu, 1994; Kahan ve ark., 1983). *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin üzerinde yapılan radyoaktif izotop çalışmaları, tienamisin biyosentezinin penisilin ve sefalosporin biyosentezinde rol oynayan öncülerle ilişkili olmadığını göstermiştir (Williamson ve ark., 1985). Sefalosporin ve penisilin üretiminde kullanılan öncülerle tienamisin sentezi için gerekli öncülerin farklı olması karbapenemin yeni bir biyosentetik yolla sentezlendiğinin düşünülmesine yol açmaktadır (Şekil 2.3).

Karbapenemler  $\beta$ -laktamazlara dirençli olmalarına karşın bazı dezavantajları da vardır. Katı ve sıvı halde kararsız halde olup böbrekte bulunan dehidropeptidaz-I

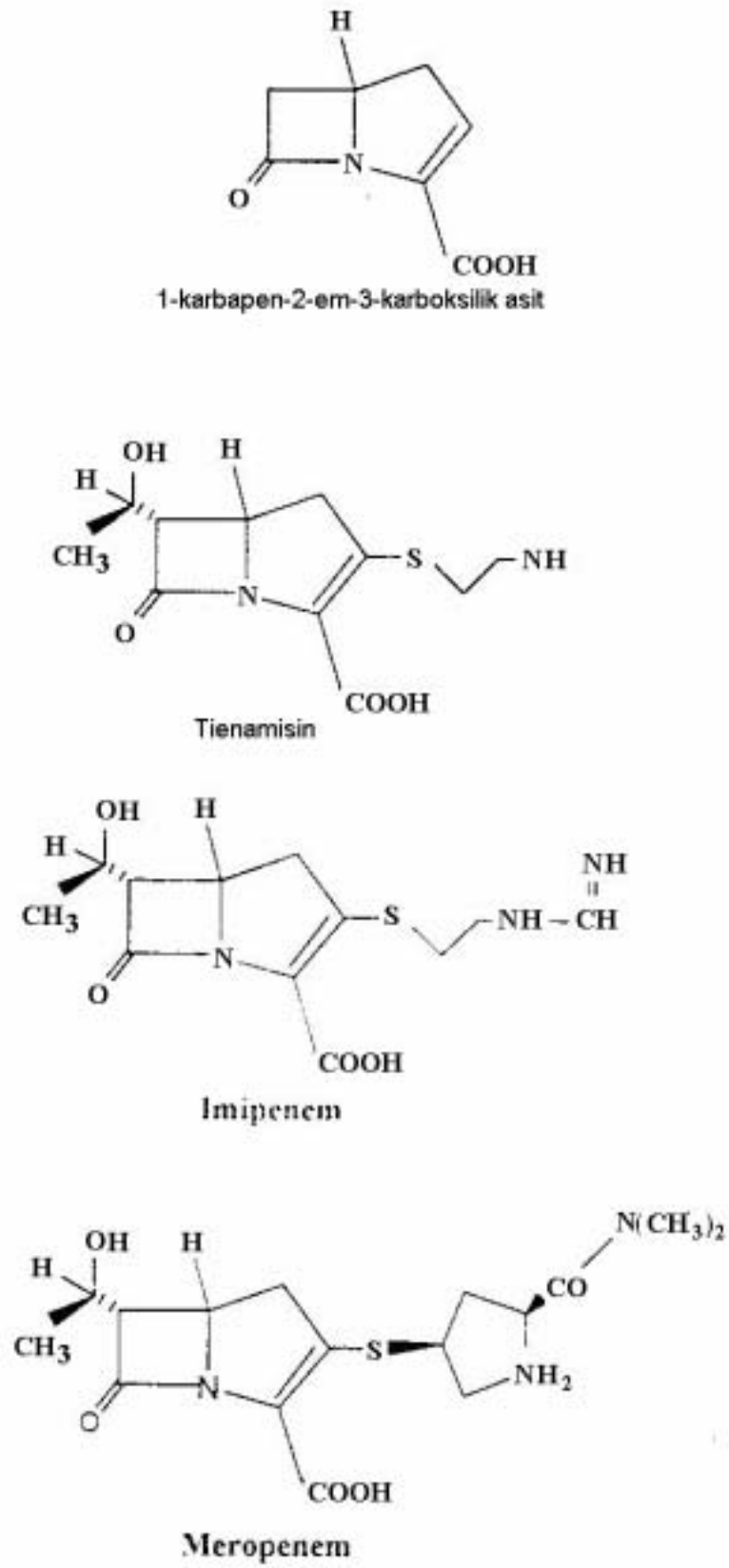
enzimi tarafından kolayca parçalanabilirler. Bu dezavantajlar yeni ve daha gelişmiş karbapenem arayışına neden olmuştur.

Keşiflerinden yaklaşık on yıl kadar sonra ilk ticari karbapenem olan imipenem (bir tienamisin türevi) ticari olarak satışa sunulmuştur (Şekil 2.4). Ancak buda bir böbrek enzimi olan dehidropeptidaz tarafından kararsız hale dönüştürülebilmekteydi.

Bu problem dehidropeptidaz-I' in etkili bir inhibitörü olan cilastatine ile çözülmüştür (Kropp ve ark., 1985, Lipman ve Neu, 1988). Karbapenem antibiyotiklerinin yeni bir üyesi olan meropenemin, imipeneme göre kararlı ve dehidropeptidaz-I'e daha dirençli olduğu bulunmuştur. Meropenem tıbbi öneme sahip olan Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahiptir (Şekil 2.4; Moellering ve ark., 1989). Karbapenemler esasen *Streptomyces* türlerinden izole edilmişlerdir. Ancak, bu organizmada karbapenem biyosentezi üzerine yapılan araştırmalar; *Streptomyces*'lerin yavaş üremesi, az ürün vermesi ve genetik çalışmalara yatkın olmaması, düşük üretim titresi ve birden fazla antibiyotik üretmeleri nedeniyle son derece sınırlı kalmıştır (Wise, 1986).



Şekil 2.3. 1-karbapen-2-em-3-karboxilik asitin üretimi için biyosentetik yol  
(Boşgelmez, 1999)



Şekil 2.4. Karbapenem antibiyotiklerinin yapısı (Boşgelmez, 1999)



### 2.2.5.1. *Erwinia*'larda Karbapenem Üretimi

Olivanik asit ve thienamycin'e ilave olarak, diğerk bir tarama programını takiben, bir seri doğal karbapenem daha keşfedilmiştir. *Serratia* ve bazı *Erwinia* türlerinden izole edilen 1-karbapen-2-em-3-karboksilik asit (karbapenem) de bunların arasındaydı (Şekil 2-4; Parker ve ark., 1982). Bu karbapenem oldukça kararsız ve aktivitesi donma veya yüksek konsantrasyon gibi koşullarda çabuk kaybolan bir maddedir (Parker ve ark., 1982). Ancak, bu antibiyotiğe duyarlı bir *E. coli* suşu kullanılarak kolayca tespit edilebilir. *Streptomyces*'ler deki çoklu antibiyotik üretiminin aksine *Serratia* ve *Erwinia* tarafından üretilen tek antibiyotiktir. Bu organizmalar tarafından üretilen tek antibiyotik olması, hızlı üremeleri ve genetik çalışmalara yatkın olmaları karbapenem antibiyotik üretiminin çalışılmasında *Serratia* ve *Erwinia* türlerini cazip hale getirmiştir. *Ecc* de karbapenem üretimi, ortamdaki bakteri yoğunluğuna ve *N*-(3-oksohekzanol)-L-homoserin lakton (OHHL) adı verilen bir sinyal molekülünün varlığına bağımlıdır (Bycroft ve ark., 1988).

### 2.3. Prokaryotlarda Hücre Sinyalleri

Bakteriler, karmaşık sinyal iletim sistemleri yardımı ile çeşitli çevresel uyarılara tepki gösterebilirler (Mekalanos, 1992; Fuqua ve ark., 1994). Bakterilerde sinyal iletimini sağlayan mekanizma, genellikle iki bileşenli bir sistemdir. Bu sistem, algılama ve yanıtlamayı düzenleyen iki protein içerir. İki bileşenli regülatör proteinler tarafından sinyal iletimine fosfotransfer reaksiyonları aracılık eder.

Proteinlerden biri (sensor) diğerkinin (response regulator) fosforilasyonunu düzenler.

Ancak çevresel uyarıları algılama her zaman fosforilasyon ile düzenlenmez.

Alternatif sinyal sistemleri de tespit edilmiştir. 1990' lı yılların başında sinyal molekülü olarak *N*-açil homoserin kullanılan yeni hücreler arası sinyal sistemi keşfedilmiştir.

### 2.3.1. *N*-açıl homoserin laktonlar Tarafından Gen Regülasyonu

Uzun bir süre sadece bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* tarafından üretildiği düşünülen *N*-açıl homoserin laktonların (AHLs), artık birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri tarafından da üretilbildiği ve çeşitli hücre yoğunluğuna bağımlı olarak sentezlenen moleküllerin sentezini kontrol ettiği günümüzde açıklık kazanmıştır (Williams ve ark., 1992; Swift ve ark., 1993). Çizelge 2.1 de bakteriyel *N*-açıl homoserin laktonlar ve kontrol ettikleri fizyolojik işlemler verilmiştir.

Şekil 2.5’ da Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen *N*-açıl homoserin lakton moleküllerinin kimyasal yapısı görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bazı bakterilerin her biri farklı fenotipleri kontrol eden birden fazla AHL molekülü ürettiklerini göstermiştir (Çizelge 2.1).

### 2.4. Çevreyi Algılama Sistemi

Birçok Gram-negatif bakterinin hücreler arası haberleşme sisteminin bir parçası olarak küçük, otoindükleyici, sinyal moleküllerini kullandıkları bilinmektedir (Swift ve ark., 1994, Salmond ve ark., 1995, Robson ve ark., 1997). Gram-negatif bakterilerde en yaygın olarak bulunan sinyal molekülleri *N*-açıl homoserine lakton türevleridir (AHLs). Bu küçük sinyal molekülleri bakteri topluluklarının kendi hücre yoğunluklarını izlemesine imkan verir. Bakterilerin hücre yoğunluğunu algılama yetenekleri ‘çevreyi algılama (Quorum-sensing)’ olarak adlandırılmıştır (Fuqua ve ark., 1994). Çevreyi algılama sistemi, bakteriye kendi hücre populasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenlenme olanağı verir.

Çevreyi algılama sisteminin elemanları, sinyal molekülünün sentezini idare eden *N*-açıl homoserin lakton sentaz ve sinyal molekülüne cevap için gerekli bir transkripsiyonel aktivatörden meydana gelmiştir (Fuqua ve ark., 1996, Hastings ve Greenberg, 1999) (Çizelge 2.1). Sinyal moleküllerinin konsantrasyonları yeterli düzeye ulaştığında transkripsiyonel bir aktivatöre bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu indüklerler. Bir çok Gram-negatif patojen enfeksiyon oluşturmak için

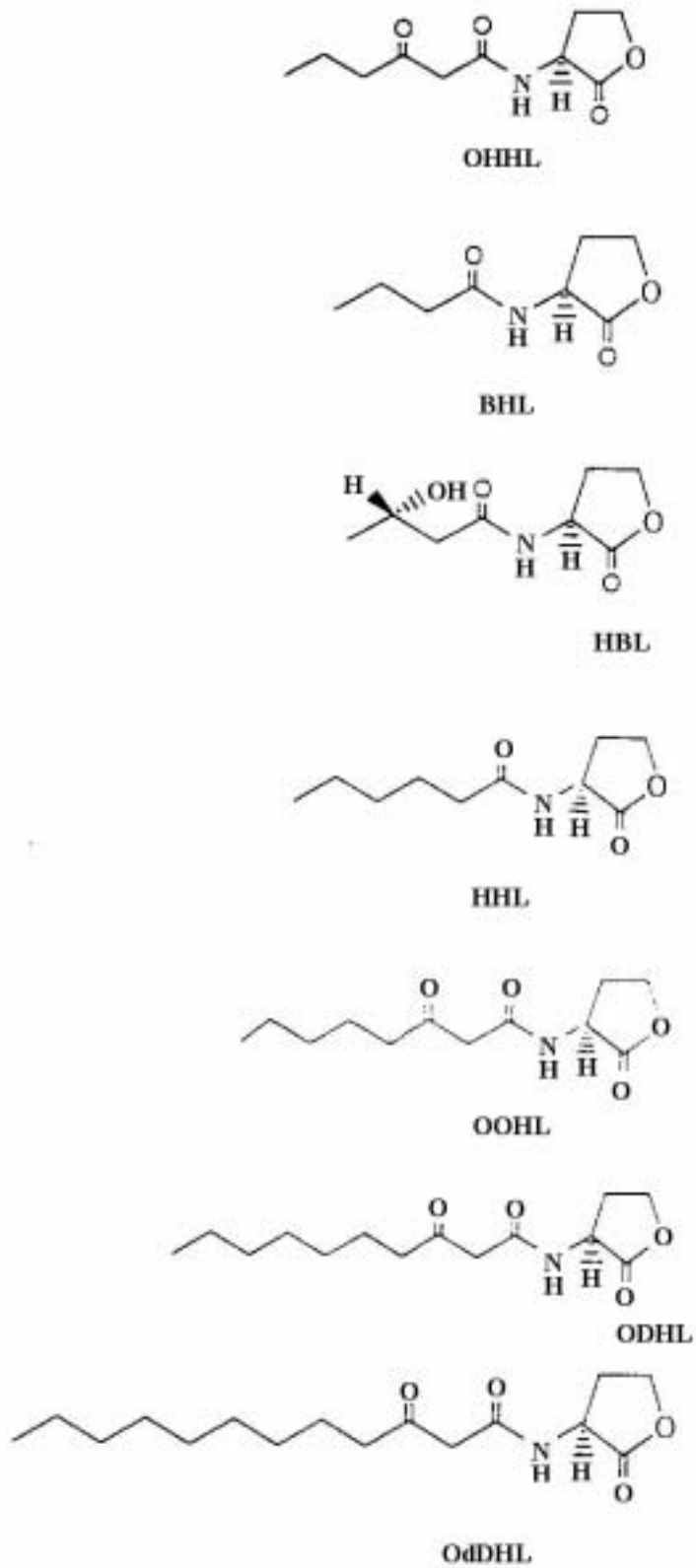
bu sistemi kullanır. Bu sistem, yalnızca hücre sayısı konağın savunma sisteminin başa çıkamayacağı bir düzeye ulaştığında, bakterinin virülens faktörlerini kodlayan genlerinin ifade edilerek başarılı bir şekilde enfeksiyon oluşturmalarını sağlar.

Çizelge 2.1. *N*-açıl homoserin laktonlar ve fenotiplerle ilişkileri (Boşgelmez, 1999)

Organizmalar	Fenotiplerin düzenlenmesi	Sinyal molekülleri	Düzenleyici proteinler	Kaynaklar
<i>Vibrio fischeri</i>	Işıma	OHHL	LuxI/LuxR	Eberhard ve ark., (1981)
<i>Vibrio harveyi</i>	Işıma	HBHL	LuxM/LuxN	Cao ve Meighen (1989)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ti plasmidin konjugal transferi	OOHL	TraI/TraR-TraM	Fuqu ve Winans (1994)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhamnolipid, siyanid, elastaz, hemolisin içeren virülens faktörler	DHL+OdDHL	LasI/LasR-RhlI/RhlR	Latifi ve ark., (1995)
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Fenazin üretimi	HHL	PhzI/PhzI	Wood ve Pierson (1996)
<i>Serratia liquefaciens</i>	Hareket	BHL	SwrI?	Eber ve ark., (1996)
<i>Yersinia enterocolica</i>	Bilinmeyen	HHL+OHHL	YenI/YenR	Throup ve ark., (1995)
<i>Erwinia carotovora</i>	(SR)-karbapen-2-em-3-karboksilik asit antibiyotisi	OHHL	CarI/CarR	Bainton ve ark., (1992)
<i>Erwinia carotovora (Eca)</i>	Virülens faktörler: proteaz, selüloz, pektinaz	OHHL	ExpI/ExpR	Jones ve ark., (1993)
<i>Erwinia stewartii (Est)</i>	Eksopolisakarit sentezi	OHHL	EstI/EstR	Beck von Bodican (1995)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rizofler genlerin ifadesi	HlDeHL	RhlI/RhlR	Schripsema ve ark., (1996) Rodenas ve ark., (1999)
<i>Escherichia coli</i>	Hücre genişlemesi	Bilinmeyen	?/SdiA	Wang ve ark., (1991)

OHHL *N*-3-(oksoheksanol)-L-homoserin lakton  
 HBHL *N*-3-(hidroksibutanol)-L-homoserin lakton  
 OOHL *N*-3-(oksooktanol)-L-homoserin lakton  
 BHL *N*-butanol-L-homoserin lakton  
 OdDHL *N*-3-(okso-dodekanol)-L-homoserin lakton

HHL *N* heksanol-L-homoserin lakton  
 HlDeHL *N* 3R-(hidroksi-7-tetradekanol)-L-homoserine lactone



Şekil 2.5. *N*-açıl homoserin lakton moleküllerinin yapısı  
(Boşgelmez, 1999)

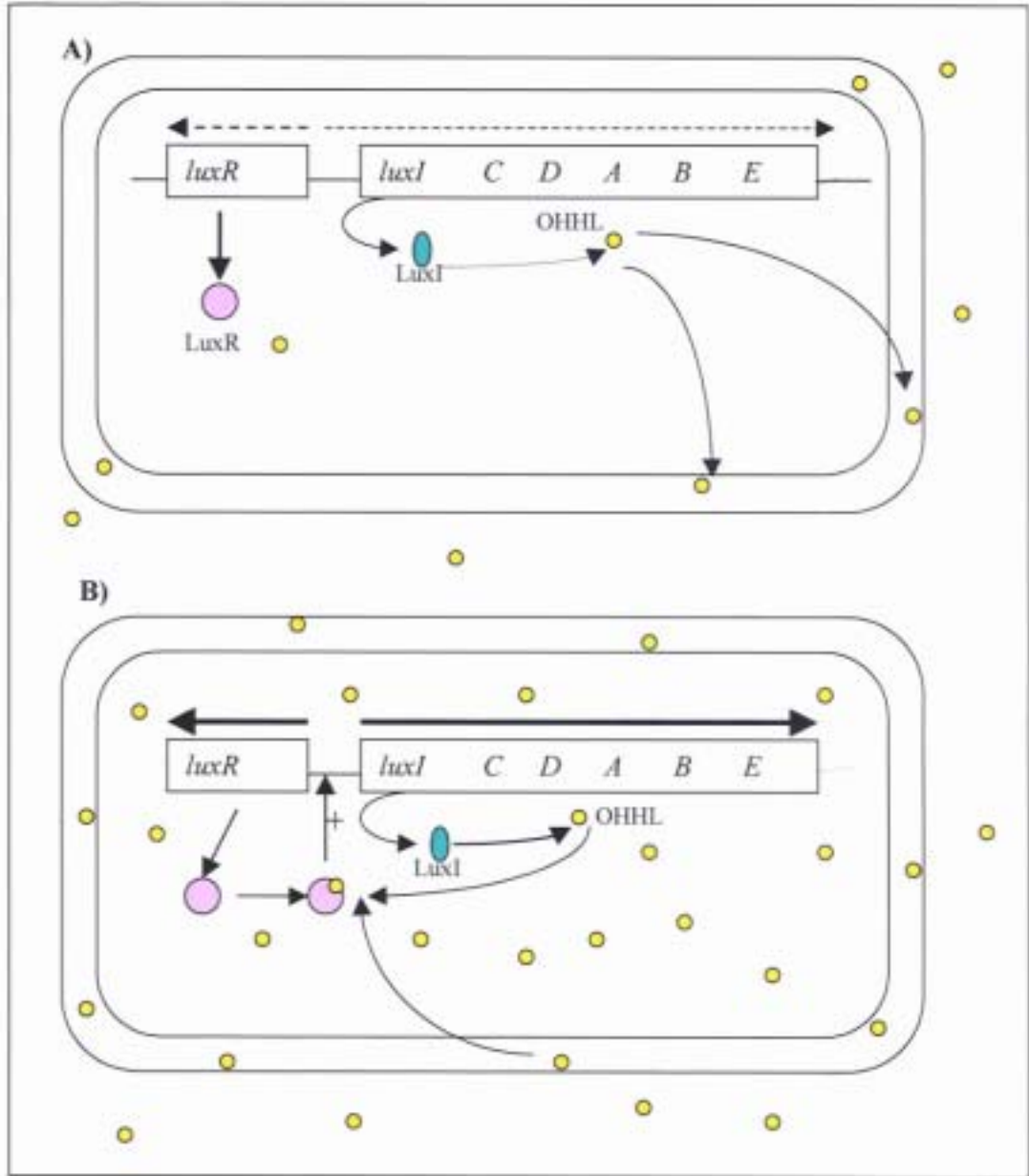
Gram-pozitif bakterilerde ise kullanılan sinyal molekülleri Gram-negatif bakterilerden ayrılırlar. Gram-pozitif çevreyi algılama sisteminde tipik olarak peptid sinyal molekülleri kullanılır. Bunlara ‘feromen’ adı verilir. Bu peptid sinyaller sitoplazmik cevap olarak regülatör proteinlerle etkileşen, aynı kökenden olan iki bileşenli sensör kinaz proteinleri tarafından tanınırlar. Bunlardan *E. faecalis*’ teki bazı peptid yapısındaki sinyal molekülleri, donör hücreler ve plazmit arasında konjugasyonu uyarır (Bassler, 1999).

Çevreyi algılama sistemi, ilk defa *V. fischeri*’de ortaya çıkarıldığından dolayı bu organizmada çevreyi algılama sistemi çok detaylı olarak çalışılmıştır. Bu sistemi kullanan diğer organizmalarla yapılan çalışmalara *V. fischeri* model etmiştir. *V. fischeri*’de biyoışımaya çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilen, fizyolojik olup çok ayrıntılı olarak çalışıldığı için bu sisteme örnek olması açısından aşağıdaki bölümde özetlenmiştir.

#### **2.4.1. *Vibrio fischeri*’ de Biyoışımaya ( Bioluminescence )**

*V. fischeri*, bazı deniz balıklarının ve kalamarların (mürekkep balığı) ışık organlarında simbiyont olarak ayrıca deniz suyunda serbest olarak bulunabilen Gram-negatif, fakültatif anaerob bir bakteridir. *V. fischeri* deniz suyunda yoğunluğu az olduğu zaman bu bakterinin kültürleri koyu renkli görülür. Ancak, ışık organları içerisindeki hücre yoğunluğu yüksek olduğu zaman, populasyon ışık yayar ve biyoışımaya (biyoluminesens) meydana gelir (Meighen, 1994). *V. fischeri*’ de ışımaya, luxI geninin ürünü olan *N*-(3-oxohexanoly) homoserine lactone (OHHL) moleküllerinin birikimine bağlıdır. OHHL ortamda yeterli konsantrasyona ulaşıncaya transkripsiyonel bir aktivatör olan LuxR proteinine bağlanır ve biyoışımaya oluşur.

Biyoışımaya oluşumunda rol alan genler ve biyoışımının mekanizması Şekil 2.6 de özetlenmiştir.



Şekil 2.6. *Vibrio fischeri*' de ışımının düzenlenmesi (Boşgelmez, 1999)

Yukarıda bahsedilen genetik faktörlerin yanında, biyoyışma oluşumunun katabolit baskılaması, besin ve oksijen yetersizliği, sıcaklık şoku, demir limitasyonu (Dunlap ve Greenberg, 1985) gibi global faktörler tarafından da kontrol edildiği gösterilmiştir (Ulitzur, 1989; Ulitzur ve Dunlap, 1995).

## 2.5. *Erwinina*' da Karbapenem Antibiyotik Üretimini Düzenlenmesi

*Ecc*'de OHHL moleküllerinin varlığının tespit edilmesi bu bakteride de karbapenem biyosentezinin, *Vibrio fischeri*' de biyoışma oluşumu ile benzer bir yolla gerçekleşebileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Daha sonraki çalışmalar bu fikri doğrulamıştır. Biyoışmada olduğu gibi karbapenem üretimi de hücre yoğunluğuna bağlıdır. Yapılan deneysel çalışmalar, antibiyotik üretiminin hücre yoğunluğunun en yüksek düzeyde olduğu logaritmik fazın sonu ile durgun fazın başlarında gerçekleştiğini göstermiştir (Bycroft ve ark., 1988). Karbapenem üretiminden sorumlu olan genler ve bu işlemin mekanizması Şekil 2.7 de verilmiştir. Üreme ortamında OHHL konsantrasyonu belli bir eşik değere ulaştığında bu molekül CarR proteinine bağlanır ve karbapenem oluşumundan sorumlu genleri aktive eder (McGowan ve ark., 1995).

Çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilen fizyolojik işlemler genellikle çevresel faktörler tarafından da etkilenirler. Örneğin; katabolit baskılaması, besin ve oksijen yetersizliği, sıcaklık şoku ve demir limitasyonun, *V. fischeri* de lux sisteminin ekspresyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Lux sistemine analog olması nedeniyle, karbapenem üretiminde de çevresel faktörlerden etkilenip etkilenmediğinin tespiti önemlidir. Ancak karbapenem biyosentezinde fiziksel ve çevresel faktörlerin etkileri hakkında rapor edilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu gözlemler doğrultusunda, bu çalışmada sıcaklık, tuz (NaCl), çeşitli karbon kaynakları, oksijen limitasyonu gibi çevresel faktörlerin karbapenem üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Şekil 2.8. *E. carotovora*' da karbapenem üretiminin düzenlenmesi



### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. *Erwinia* ve *E. coli* Suşlarının Üretim ve Saklanması

*Erwinia* ve *E. coli* suşları, LB broth ve LB agar içeren petrilere sırasıyla 30°C ve 37°C' lerde üretilmişlerdir. *E. coli* ve *Ecc* suşları kısa dönem saklama amacıyla LB agar içeren petri kaplarında 4°C' de muhafaza edilmişlerdir. Daha uzun süreli muhafaza için ise bu stok kültürleri LB agar' da üretilmiş ve % 25' lik gliserol solüsyonunda -70°C' de dondurulmuşlardır.

#### 3.2. Besiyerlerinin ve Solüsyonların Hazırlanması

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri ve solüsyonlar Millipore saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı zamanda besiyeri ve solüsyonlar otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir (Çizelge 3.1).

Karbapenem hassasiyet testleri için LB agar besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri talimatına uygun olarak hazırlanmış ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak (Selecta Steril Max 25) sterilize edilmiştir. Daha sonra steril edilen besiyeri petrilere dökülmüştür. Sonra oda sıcaklığında katılaşması için beklenmiştir. Kontaminasyon kontrolü için, içinde besiyeri bulunan petri kapları bir gece 37°C' lik etüvde (Selecta) inkübe edilmiştir.

Hiç bakteri üremesi olmayan petrilere hassasiyet testleri için kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan besiyeri ve solüsyonlar

Besiyeri ve Solüsyonlar	gram/litre
Luria Bertani (LB)	10g Bacto Tryptone 5g Bacto Yeast Extract 5g NaCl (pH 7.2)
LB Agar	10g Bacto Tryptone 5g Bacto Yeast Extract 5g NaCl 15g Agar
50xFosfat	350g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6.9-7.1)
Minimal Medium(MM)	(20ml 50xfosfat) (10ml % 10(w/v)(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) (0,41 ml 1M MgSO <sub>4</sub> ) (10ml % 20 karbon kaynağı)

### 3.3. Karbapenem Hassasiyet Testi

*Ecc*'de karbapenem antibiyotik üretimi, bir biyotest kullanılarak tespit edilmiştir.

Karbapeneme son derece duyarlı olan *E. coli* Beechams' suşu (ESS:*E. coli* süper sensitive) kullanılmıştır. *Ecc*'de üreme eğrisi boyunca karbapenem üretimini gözlemek için bir gecelik kültüründen 100µl alınarak 4ml % 0.7'lik soft-LB agar içerisinde iyice karıştırılmıştır. Daha sonra LB agar içeren bir petri kabına dökülerek 10 dk. süreyle katılaşması beklenmiştir. Bu süre sonunda petri kabının ortasında bir pastör pipeti arka kısmının yardımıyla delik açılmıştır. Antibiyotik üretimi test edilecek *Ecc* kültürü santrifüjlenmiş ve yaklaşık 100 µl süpernatant açılan bu deliğe pipetlenmiştir.

Bu petri kabı 30°C' de bir gece inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda *E. coli* ESS' nin üreyemediği test suşunun etrafında açık renkli bir zon oluşumu karbapenem üretimini ifade etmiştir.



Şekil 3.1. *Ecc*'de karbapenem antibiyotik üretimi.

### 3.4. Büyüme Eğrileri

#### 3.4.1. Aerobik Büyüme Eğrileri

##### 3.4.1.1. Sıcaklık Büyüme Eğrileri

Sıcaklığın karbapenem üretimine etkisini araştırmak için yapılan büyüme eğrilerinde 25ml LB içerisine miktarı spektrofotometrede tespit edilmiş olan *Ecc* kültürü ilave edilmiştir. Bu kültürler 30°, 32°, 34°, 36°, 37°C' lere ayarlanmış 200 rpm' lik çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Her saat başında 1ml örnek alınarak karbapenem testi için kullanılmıştır. Bu test bölüm 3.3 de tarif edildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

##### 3.4.1.2. Karbon Kaynağı Büyüme Eğrileri

Büyüme eğrileri için, *Ecc* ve *E. coli* kültürleri karbon kaynağı olarak % 20' lik glukoz, gliserol, maltoz, sükroz ve fruktoz ihtiva eden MM' de üretilmişlerdir. Bir gecelik kültürlerin spektrofotometrede okunan değerleri 25ml MM içerisine karıştırılmıştır. Bu karışımlar 30°C' ye ayarlı 200 rpm' lik çalkalamalı inkübatöre

yerleştirilmişlerdir. Her saat başında 1 ml örnek alınarak karbapenem testi için kullanılmıştır.

#### **3.4.1.3. Sodyum Klorür (NaCl) Büyüme Eğrileri**

Büyüme eğrileri için, kültürler değişik konsantrasyonlarda (0,170-0,340-0,085-0,00425-0,002125 M) NaCl içeren sıvı LB' de üretilmişlerdir. Bu karışımlar 30°C' ye ayarlı 200 rpm' lik çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmişlerdir. Her saat başında 1 ml örnek alınarak karbapenem testi için kullanılmıştır.

#### **3.4.1.4. Fosfat ve Nitrojen Büyüme Eğrileri**

Farklı fosfat ve nitrojen konsantrasyonlarının karbapenem üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması için *Ecc* suşları farklı miktarda fosfat veya nitrojen içeren MM besiyerlerinde çalkalamalı inkübatörde üretilmiştir.

#### **3.4.2. Oksijen Sınırlı Büyüme Eğrileri**

Oksijen-limitli büyüme eğrileri için, 25 ml sıvı LB üzerine 25 ml steril parafin yağı ilave edilerek 30°C' ye ayarlı 60 rpm' lik çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Her saat başında 1 ml örnek alınarak karbapenem testi için kullanılmıştır.

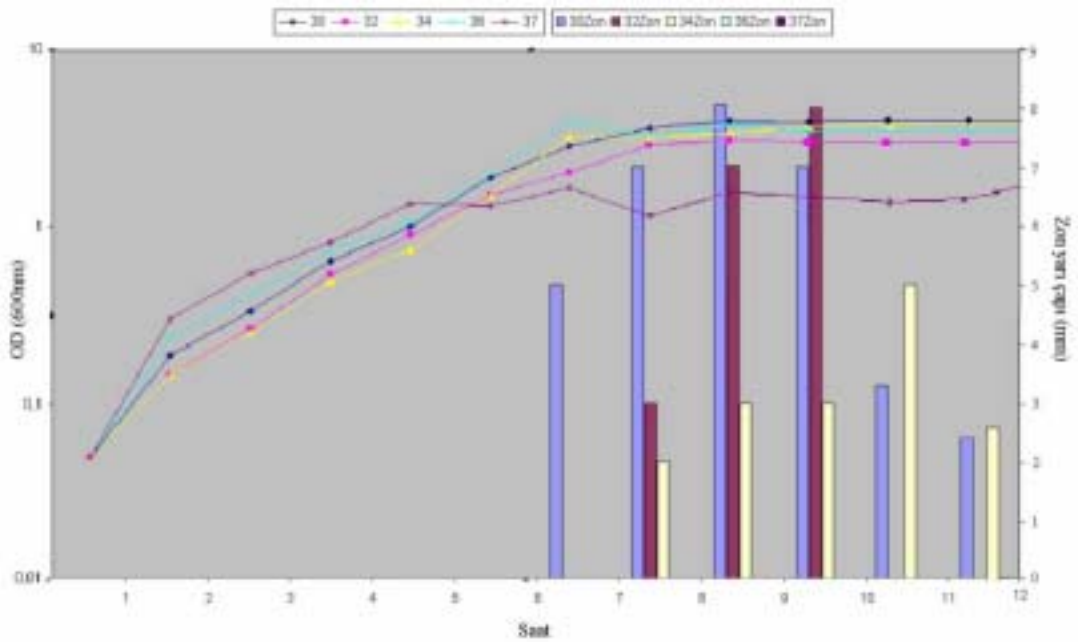
#### 4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışmada *Ecc* de sıcaklık, değişik tuz (NaCl) konsantrasyonları, oksijen-limitasyonu ve farklı karbon kaynakları gibi çevresel faktörlerin karbapenem biyosentezi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında deneylerde kullanılacak olan *Ecc* GBI suşu LB agar besiyerine ekilmiştir. Daha sonra uzun süre saklama için  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir.

##### 4.1. Sıcaklığın Etkisi

*Ecc* GBI suşunda sıcaklığın antibiyotik üretimine etkisini belirlemek amacıyla  $30-37^{\circ}\text{C}$  arasındaki farklı sıcaklık değerleri kullanılmıştır. Sıcaklığın antibiyotik üretimine etkisi Şekil 4.1' de gösterilmiştir.

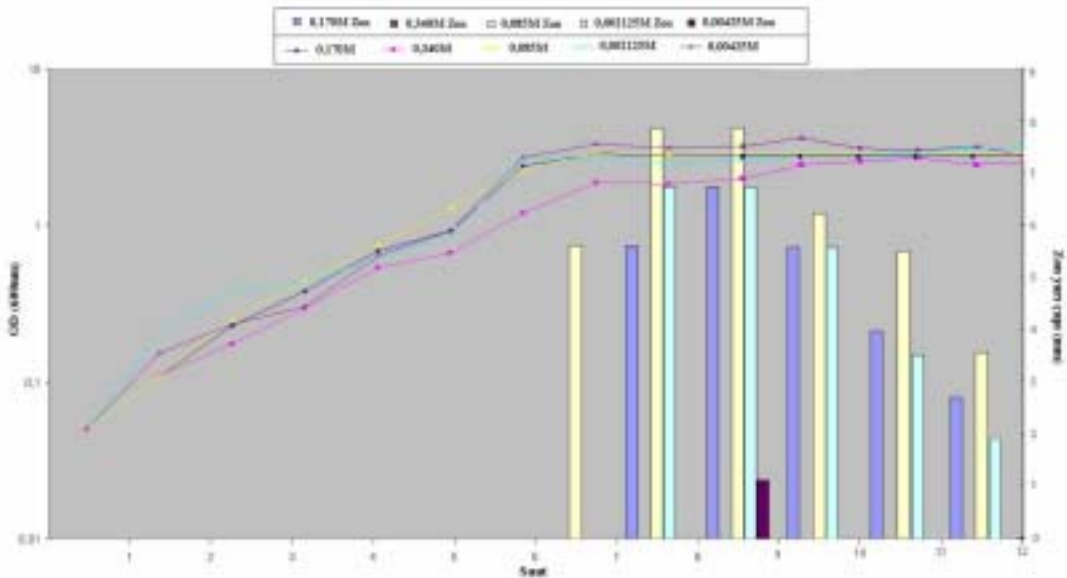


Şekil 4.1. Sıcaklığın *E. carotovora*'nın gelişimine ve karbapenem antibiyotik üretimine etkisi

Şekil 4.1. de verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere sıcaklık artışının, 37°C hariç, üreme üzerinde büyük bir etkisi görülmemiştir. Sıcaklık değerlerindeki artışa paralel olarak *Ecc'* nin antibiyotik üretiminde azalma meydana gelmiştir. 30°C de karbapenem antibiyotik üretimi en büyük değere ulaşırken, 32° ve 34°C' lerde ölçülen antibiyotik zon yarıçaplarında bir azalma meydana gelmiştir. 36° ve 37°C' lerde gerçekleştirilen üreme eğrilerinden alınan örnekler de ise zon oluşumu gözlenememiştir.

#### 4.2. Tuz (NaCl) Konsantrasyonunun Etkisi

*Ecc* GBI' da tuzun (NaCl) etkisini tespit etmek amacıyla farklı tuz konsantrasyonları kullanılmıştır. NaCl' nin *Ecc'* nin gelişimine ve antibiyotik üretimine etkisi Şekil 4.2 de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. NaCl konsantrasyonunun *E. carotovora'* nın gelişimine ve karbapenem antibiyotik üretimine etkisi

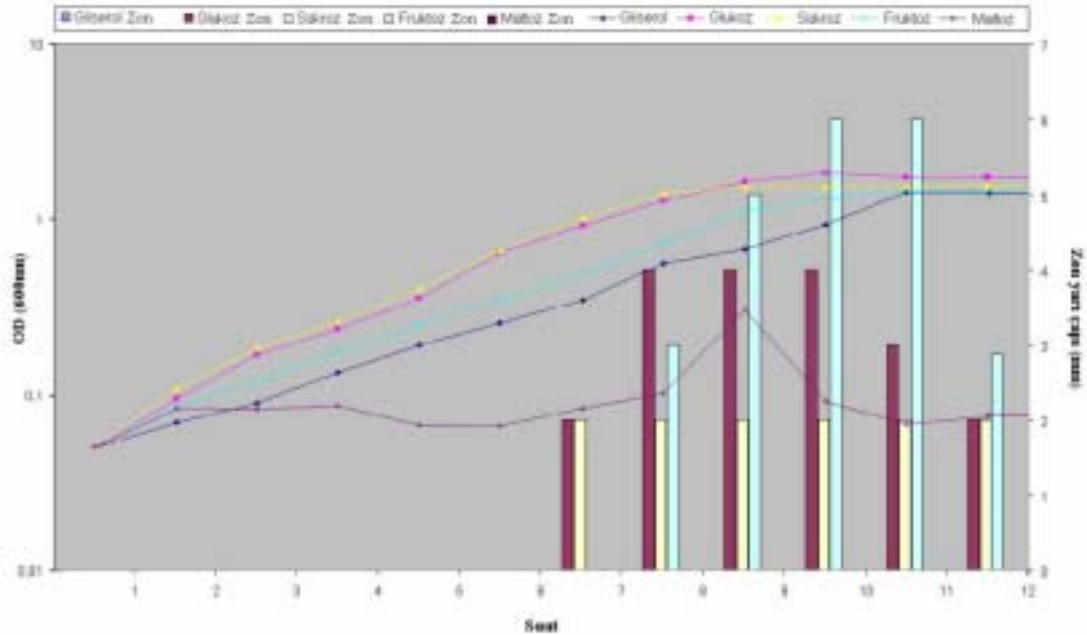
Şekil 4.2. de de görüldüğü üzere farklı tuz konsantrasyonları bakteri üremesini büyük ölçüde etkilememiştir. Normal tuz konsantrasyonu (0,085) koşullarında karbapenem antibiyotiğinin zon yarıçapı en büyük değere sahipken, bu değer altındaki (0,002125-0,00425M) ve üstündeki (0,170-0,340M) tuz konsantrasyonlarında

antibiyotik zon yarıçapında bir miktar azalma meydana gelmiştir. 0,340M NaCl içeren besiyerinde ise sadece 9. saatte antibiyotik üretimi görülmüştür.

### 4.3. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının antibiyotik üretimine etkisini tespit etmek amacıyla glukoz, gliserol, maltoz, sükröz ve fruktoz gibi karbon kaynakları kullanılmıştır.

Sözü edilen karbon kaynaklarının antibiyotik üretimine etkisi Şekil 4.3. de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı karbon kaynaklarının karbapenem antibiyotik üretimine etkisi

Şekil 4.3. de verilen sonuçlardan da görüldüğü üzere maltoz ve gliserol içeren MM besiyerlerinde üreme olumsuz yönde etkilenmiştir. Glukoz, sükröz ve fruktoz gibi karbon kaynakları ise üremeyi etkilememiştir. Maltoz ve gliserol içeren ortamlarda *Ecc* iyi üreyemediği için doğal olarak bu koşullarda antibiyotik üretimi gözlenmemiştir. Fruktoz içeren besiyerinde ise antibiyotik üretimi glukoz ve sükröz içeren ortamlara göre daha fazla olmuştur.

#### 4.4. Oksijen-Limitasyonunun Etkisi

*E. carotovora* subsp. *carotovora*'nın gelişimi ve antibiyotik üretimine oksijen-limitasyonunun etkisini tespit etmek amacıyla oksijenin kısıtlı olduğu bir ortam hazırlanarak bakteri gelişimi izlenmiştir. Bu şartlarda bakteri üremesi çok yavaş olduğundan dolayı antibiyotik üretimi tespit edilememiştir.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma öncesinde karbapenem biyosentezinin, sadece genetik faktörler tarafından düzenlendiği düşünölmekteydi. Ancak bu çalışma karbapenem sentezinde genetik faktörlerin yanında, çeşitli çevresel faktörlerinde etkili olduğunu göstermiştir. Sıcaklık, NaCl ve karbon kaynakları gibi çeşitli çevresel faktörlerin *Ecc* tarafından üretilen karbapenemin sentezi üzerindeki etkilerin ortaya çıkarılmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca bu çevresel faktörlerin karbapenem üretimi üzerine etkisinin araştırılması, farklı  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin sentezine benzer faktörlerin etkilerinin karşılaştırılmasına da olanak vermiştir.

*Ecc*' nin karbapenem üretiminin sıcaklığa karşı son derece hassas olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık değerlerindeki artışa paralel olarak karbapenem üretiminde önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Özellikle 36° ve 37°C'lerde karbapenem üretimi tamamen ortadan kalkmıştır.

Sıcaklığa ilave olarak, kullanılan çeşitli karbon kaynaklarının karbapenem biyosentezinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak kullanılan maltoz ve gliserolün karbapenem üretimini negatif yönde etkilediği, fruktozun ise karbapenem üretimini teşvik ettiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda diğer bazı  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin biyosentezi üzerinde de gliserolün olumsuz etki yaptığı belirlenmiştir. *A. nidulans* (Espose, 1993)' da penisilin ve *S. clavuligerus*' da sefalosporin üretiminin gliserol (Martin ve Aharonowitz, 1983) tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerinin bu sınıflarında, karbon kaynağının etkisinin büyüme ortamının pH ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Aynı şekilde tuz (NaCl) gibi çevresel bir faktöründe karbapenem üretiminde son derece önemli olduğu tespit edilmiştir. Tuzun normal düzeyde bulunması karbapenem üretimini teşvik ettiği, aşırı yüksek veya aşırı düşük düzeylerde bulunması durumunda ise karbapenem üretimini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma karbapenem üretiminde çevreyi algılama sisteminden başka çeşitli çevresel faktörlerinde etkili olduğunun anlaşılmasına yardımcı olmuştur.

**KAYNAKLAR**

- Aharonowitz, Y., 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis  
Annu. Rev. Microbiol, 34, 209-233.
- Aharonowitz, Y., and Cohen, G., 1992. Penicillin and cephalosporin biosynthesis  
genes: structure, organization, regulation, and evolution. Annu. Rev.  
Microbiol., 46, 461-495.
- Axelrood, P.E., Rella, M., and Schroth, M.N., 1988. Role of antibiosis in competition  
of *Erwinia* strains in potato infection Courts. Appl. Environ. Microbiol,  
54, 1222-1229.
- Barras, F., van Gijsegem, F, and Chatterjee, A.K., 1994. Extracellular enzymes and  
pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Ann. Rev. Phytopathol, 32, 201-234.
- Bassler, B. L., 1999. How Bacteria talk to each other: regulation of gene expression  
by quorum sensing, Current Opinion in Microbiology; 2, 582-587.
- Boccarda, M., Dioloz, A., Rouve, M. And Kotoujansky, A. 1988 The role of the  
individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in  
pathogenicity on *Saintpaulia* plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33:95-104.
- Boşgelmez, G., 1999. Regulation of carbapenem antibiotic synthesis genes *Erwinia*  
*carotovora* subspecies *carotovora*. University of cambridge.
- Boyer M.H., Chambost, J.P., Magnan, M., and Cattaneo, J., 1987. Characterization  
of a new endoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*. Eur. J. Biochem,  
162, 311-316.
- Brakhage, A.A., Browne, P. and Turner, G., 1992. Regulation of *Aspergillus*  
*nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA*  
and *ipnA* by glucose. J.Bacteriol, 174, 3789-3799.

- Brakhage, A.A., 1998. Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 547-585.
- Bycroft, B.W., Maslen, C., Box, S.J., Brown, A., and Tyler, J.W., 1988. The biosynthetic implications of acetate and glutamate incorporation into (3R, 5R)-carbapenem-3-carboxylic acid by *Serratia* sp. *J Antibiotics*, 41, 1231-1242.
- Cavalier-Smith, T., 1992. Origins of secondary metabolism. In *Secondary Metabolites: Their function and Evolution*. Chadwick, D.J., and Whelan, J. (eds). Chichester: Willey, 64-87.
- Collmer, A., and Keen, N.T., 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann Rev Phytopathol*, 24, 383-409.
- Cooper V.J.C., and Salmond, G.P.C., 1993. Molecular analysis of the major cellulase (CelV) of *Erwinia carotovora*: evidence for an evolutionary 'mix-and-match' of enzyme domains. *Mol. Gen. Genet*, 241, 341-350.
- Coulton, S., and Hunt, E., 1996. Recent advances in the chemistry and biology of carbapenem antibiotics. In *Progress in Medicinal Chemistry* edited by G.P. Ellis and D.K. Luscombe, 33, 100-145.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., Penalva, A., 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *The EMBO Journal*, 12, 3947-3956.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria- the *luxR-luxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 176, 269-275.

- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P., 1996. Census and consensus in *bacterial* ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 727-751.
- Greiner, M. and Winkelmann, G., 1991. Fermentation and isolation of herbicolin A, a peptide antibiotic produced by *Erwinia herbicola* strain A 111. *Appl Microbiol Biotech.*, 34, 565-569.
- Hastings, J.W., and Greenberg, E.P., 1999. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *J. Bacteriol.*, 181, 2667-2668.
- Hilgendorf, P., V. Diekman, H., and Thoma, M., 1987. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 247-251.
- Imada, A., Kitato, K., Kintaka, K., Muroi, M., and Asai, M., 1981. Sulphacecin and isosulphazecin, novel  $\beta$ -lactam antibiotics of bacterial origin. *Nature*, 289, 590-591.
- Ishimaru, C.A., Klos, E.J., and Brubaker, R.R., 1988. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 78, 746-750.
- Jensen, S.E., Demain, A.L., 1995. In *Genetics and biochemistry of antibiotic production*. Leo C. Vinning and Colin Stuart (eds), 8, 239-268.
- Kahan, J.S., Kahan, F.M., Goegelman, R., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., Miller, A.K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, Woodruff, H.B. and Birnbaum, J., 1979. Thienamycin, a new  $\beta$ -lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot*, 32, 1-12.

- Kahan, F.M., Kropp, H., Sundelof, J.G., and Birnbaum, J., 1983. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 12, D1-D35.
- Kropp, H., Gerkens, L., Sundelof, J.G., and Kahan, F.M., 1985. Antibacterial activity of imipenem: The first thienamycin antibiotic. *Rev. Infect. Diseases*, 7, 389-410.
- Kuenzi, M.T., 1980. Regulation of cephalosporin synthesis in *Cephalosporium acremonium* by phosphate and glucose. *Arch. Microbiol*, 128, 78-81.
- Leliot, R.A., and Dickey, R.S., 1984. Genus VII *Erwinia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 1*. Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds), Baltimore: Williams and Wilkins, 469-476.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C., 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: The specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli*  $\alpha$ -haemolysin. *EMBO J*, 9, 1375-1382.
- Lilley, G., Clark, A.E., and Lawrence, G.C., 1981. Control of the production of cephamicin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL8057. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 31, 127-134.
- Lipman, B., and Neu, H.C., 1988. Imipenem, a new carbapenem antibiotic. *Med. Clin. N. Am.*, 7, 567-579.
- Martin, J.F., Aharonowitz, Y., 1983. Regulation of biosynthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. In *Antibiotics containing the Beta-lactam Structure I*. a.L. Demain and N. A. Solomon (eds), 7, 229-254.
- Martin, J.F., Gutierrez, S., 1995. Genes for  $\beta$ -lactam antibiotic biosynthesis *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 181-200.

- Martis, R., Koiv, V., Laasik, E. and Mae, A., 1999. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, 145, 1959-1966.
- McGowan, S., Sebaihia, M., Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Chan, P.F., Bycroft, B. W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., and Salmond, G.P.C., 1995. Carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora* is regulated by CarR, a homologue of the LuxR transcriptional activator. *Microbiology*, 141, 541-550.
- McGowan, S.J., Bycroft, B.W., and Salmond, G.P.C., 1998. Bacterial production of carbapenems and clavams: evolution of  $\beta$ -lactam antibiotic pathways. *Trends Microbiol.*, 6, 203-208.
- Mehta, R.J., Speth, J.L., and Nash, H., 1979. Lysine stimulation of cephalosporin *Cephalosporium acremonium*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 8, 177-182.
- Meighen, E.A., 1994. Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Genet*, 28,117-139.
- Mekalanos, J.J., 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol*,174, 1-7.
- Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., and Sentochnik, D.E., 1989. The carbapenems: new broad spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 24, 1-7.
- Mulholland, V., Hinton J.C.D., Sidebotham, J.M., Toth, I.K., Hyma, L.J., et al., 1993. A pleiotropic reduced virulence (Rvi<sup>-</sup>) mutant of *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* is defective in flagella assembly proteins that are

conserved in plant and animal bacterial pathogens. *Mol. Microbiol*, 9, 343-356.

Neu, H. C., 1994. Why Carbapenems? *Curr Opin Inf Dis*, 7, 3-10.

Paradkar, A.S., Kwamena, A.A., and Jensen, S.E., 1998. A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol. Microbiol*, 27, 831-843.

Parker, W.L., Rathnum, M.L., Wells, J.S., Trejo, W.H., Principe, P.A., and Sykes, R.B., 1982. A simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*. *J Antibiotics*, 35, 653-660.

Perombelon, M.C.M. and Kelman, A., 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annu Rev Phytopathol*, 18, 361-387.

Perombelon, M.C.M., 1992. The genus *Erwinia*. In *The Prokaryotes 2<sup>nd</sup> Ed. Volume III*. Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. And Schleifer, K-H. (eds). London: Springer-Verlag, 2899-2921.

Pirhonen, M., Saarilahti, H.T., Karlsson, M.B., and Palva, E.T., 1991. Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsps. *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4, 276-283.

Reading, C., and Cole, M., 1977. Clavulanic acid: a  $\beta$ -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 11, 852-857.

Reeves, P.J., Whitcombe, D., Wharam, S., Gibson, M., Allison, G., Bunce, N., Barallon, R., Douglas, P., Mulholland, V., Stevens, S., Walker, D. And Salmond, G.P.C., 1993. Molecular cloning and characterization of 13 out genes from *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*: genes encoding



members of a general secretion pathway (GSP) widespread in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol*, 8, 443-456.

Renno, D.V., Saunders, G., Bull, A.T., and Holt, G., 1992. Transcript analysis of penicillin genes from *Penicillium chrysogenum*, 21, 49-54.

Revilla, G., Lopez-Nieto, M.J., Luengo, J.M., and Martin, J.F., 1984. Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot*, 37, 781-789.

Robson, N., Cox, A.R.J., McGowan, S.J., Bycroft, B.W. and Salmond, G.P.C., 1997. Bacterial *N*-acyl-homoserine lactone-dependent signalling and its potential biotechnological applications. *Trends Biotechnol.*, 15, 458-464.

Rollison, N.G., 1998. Forty years of  $\beta$ -lactam research *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 589-603.

Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W, Stewart, G.S.A.B., and Williams, P., 1995. The bacterial 'enigma' cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.*, 16, 615-624.

Sanchez, S., Flores, M.E., and Demain, A.L., 1988. Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations, In *Nitrogen source control of microbial processes*. S. Sanchez-Esquivel (ed). CRC Press Inc., Boca Raton. Fla, 121-136.

Skyes, R.B., Cimarusti, C.M., Bonner, D.P., Bush, K., Floyd, D.M., et al., 1981. Monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotics produced by bacteria. *Nature*, 291, 489-491.

- Swift, S., Winson, M.K., Chan, P.F. et al., 1993. A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: evidence for the wide spread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.*, 10, 511-520.
- Ubukata, K., Hikida, M., Yoshida, M., Yishiki, Y., Furukawa, Y., Tashiro, K., Konno, M., and Mitsuhashi, S., 1990. In vitro activity of LJC-10,627, a new carbapenem antibiotic with high stability to dehydropeptidase I. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 994-1000.
- Ulitzur, S., 1989. The regulatory control of the bacterial luminescence system: a new view. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 4, 317-325.
- Ulitzur, S., Dunlap, P.V., 1995. Regulatory circuitry controlling luminescence autoinduction in *Vibrio fischeri*. *Photochemistry and Photobiology.*, 62, 625-632.
- Williams, P., Bainton, N.J., Swift, S., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Stewart, G.S.A.B., Salmond G.P.C. and Bycroft, B.W., 1992. Small molecule mediated density dependent control of gene expression in procaryotes: bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics. *FEMS Letts*, 100, 161-168.
- Williamson, J.M., Inamine, E., Wilson, K.E., Douglas, A.W., Liesch, J.M., and Albers- Schonberg, G., 1985. Biosynthesis of the  $\beta$ -lactam antibiotic, thienamycin, by *Streptomyces cattleya*. *J. Biol. Chem*, 260, 4637-4647.
- Wise, R., 1986. In vitro pharmacokinetic properties of the carbapenems. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 30, 343-349.
- [Vegetablemdonline.ppath.commell.edu/PhotoPage...](http://Vegetablemdonline.ppath.commell.edu/PhotoPage...)

**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Dilek ÇAVUŞOĞLU  
Doğum Yeri : Isparta  
Doğum Yılı : 11.10.1980  
Medeni Hali : Evli

**Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise : 1994-1998 Isparta Gazi Lisesi

Lisans : 1998-2002 Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat  
Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

**İş Deneyimi** :

2002-2004 : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü Öğrenci Asistanlığı