

Klinik *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antikandidal Aktiviteleri ve İn Vitro *Candida* Biyofilm Oluşumunun İnhibisyonu

Anti-Candidal Activity of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains and In Vitro Inhibition of *Candida* Biofilm Formation

Sema KEÇELİ ÖZCAN, Devrim DÜNDAR, Gülden SÖNMEZ TAMER

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.
Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 27.06.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.11.2011

ÖZET

Son yıllarda, iki önemli fırsatçı patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* arasında, bir tür sinyal yardımcı etkileşim ile her iki mikroorganizmanın virülans özelliklerinin etkilendiği gösterilmiştir. *P.aeruginosa*'nın özellikle piyosiyanin pigmenti nedeniyle antikandidal aktivitesi olduğu ileri sürülmektedir. Her iki mikroorganizmanın tek başına oluşturdukları biyofilmlerin yapısı, özellikleri ve biyofilmin enfeksiyon hastalıklarının patogeneziindeki rolleri geniş çapta çalışılmıştır. Buna rağmen, *P.aeruginosa* ve *Candida* türlerinin her ikisinin de bulunduğu biyofilmdeki etkileşim hakkında çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada *P.aeruginosa*'nın *Candida* türlerine karşı antikandidal aktivitesi ve *C.albicans* biyofilmi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 58 *P.aeruginosa* suşuyla birer adet *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.glabrata* ATCC 90030 ve klinik *C.tropicalis* izolatu kullanılmıştır. *P.aeruginosa* suşlarının antikandidal aktiviteleri Sabouraud dekstroz agar besiyerinde Kerr'in yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *Candida* suşlarında üremenin olmaması tam inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. Tam inhibisyon gösteren iki *Pseudomonas* suşu ve inhibisyon göstermeyen bir suşun *C.albicans* biyofilmi üzerine etkisi mikropalak yöntemiyle araştırılmıştır. *Pseudomonas* ve *C.albicans*'ın tek başına ve birlikte oluşturdukları biyofilmin değerlendirilmesi için, 90 dakika (adezyon fazı), 24 ve 48 saat (biyofilm fazı) inkübasyon sonrasında, koloni oluşturan birim (cfu/ml) değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, *Pseudomonas* ve *C.albicans*'ın birlikte oluşturdukları biyofilm ve tek başına oluşturdukları biyofilm cfu değerleriyle karşılaştırılmıştır. *Pseudomonas* suşlarının *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis*'e karşı gösterdikleri tam inhibisyon oranları sırasıyla %63.8, %75.9, %65.5 ve %72.4 olarak saptanmıştır. *Pseudomonas* ve *C.albicans*'ın ortak biyofilminde 90 dakika, 24 ve 48 saat sonraki cfu/ml değerlerinde, her iki mikroorganizmanın tek başına biyofilmlerinin cfu değerleri-

İletişim (Correspondence): Dr. Sema Keçeli Özcan, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Umuttepe Merkez Yerleşkesi 41380 Kocaeli, Türkiye. Tel (Phone): +90 262 303 7575, E-posta (E-mail): keceliozcan@yahoo.com

ne oranla belirgin azalma saptanmıştır ($p < 0.05$). *P.aeruginosa*'nın, *Candida* üremesini inhibe etmesinin yanı sıra, her iki mikroorganizma birbirlerinin biyofilm oluşumunu kantitatif olarak baskılamaktadır. Bu bulgular, *Pseudomonas* ve *Candida* türleri arasındaki sinyal yolaklı bu iletişimin moleküler temelini aydınlatılmasının gerektiğini göstermektedir. Elde edilecek veriler, bakteri-fungus eş zamanlı enfeksiyonlarının patogenezinin aydınlatılmasında önem taşıyacaktır.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida* türleri; biyofilm; inhibisyon.

ABSTRACT

It has been shown recently that signal-mediated interactions between the opportunistic pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* affect virulence features in both organisms. It has been emphasized that the anti-candidal activity of *P.aeruginosa* is especially due to its pyocyanin pigment. The structure and the properties of monospecies biofilms and their role in infectious disease have been extensively studied. However, there are only few studies on interactions between *P.aeruginosa* ve *Candida* spp. in mixed biofilms. Therefore, in this study, the investigation of anti-candidal activity of *P.aeruginosa* against *Candida* spp. and the effect on *C.albicans* biofilm were aimed. A total of 58 *P.aeruginosa* strains isolated from several clinical specimens and one of each *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.glabrata* ATCC 90030 and a *C.tropicalis* clinical isolate were included in the study. The anti-candidal activity of *P.aeruginosa* strains were investigated on Sabouraud dextrose agar using Kerr's method. The absence of the growth of *Candida* strains were evaluated as total inhibition. The effect of two *P.aeruginosa* strains showing total inhibition and one isolate without inhibition effect on *C.albicans* biofilm was investigated by microplate method. For the evaluation of monospecies or mixed species biofilms of *Pseudomonas* and *C.albicans*, the number of colony forming units (cfu/ml) after 90 minutes (adhesion phase), 24 hours and 48 hours (biofilm phase) incubation were determined. Then, cfu numbers of monospecies and mixed species of *Pseudomonas* and *C.albicans* were compared. Total inhibition rates of *Pseudomonas* strains against *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* and *C.parapsilosis* were determined as 63.8%, 75.9%, 65.5% and 72.4%, respectively. A significant reduction was determined in cfu/ml numbers of mixed species of *Pseudomonas* and *C.albicans* compared to cfu numbers in monospecies biofilm after 90 minutes, 24 hours and 48 hours ($p < 0.05$). In addition to the inhibitory effect of *P.aeruginosa* on *Candida* growth, in a dual species environment both organisms mutually suppressed eachothers' biofilm development quantitatively. These findings indicated that molecular basis of signal-mediated interaction between *Pseudomonas* and *Candida* spp. should be clarified for better understanding of the pathogenesis of mixed bacterial-fungal infections.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida* species; biofilm; inhibition.

GİRİŞ

Son yıllarda, iki önemli fırsatçı patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* arasında patojenik bir etkileşim olduğu gösterilmiştir¹. *P.aeruginosa*'nın *Candida* türlerine karşı antifungal etkisi ilk defa 1990'lı yılların başında Kerr² tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra diğer araştırmacılar *P.aeruginosa*'nın *C.albicans*'ı öldürmesinin, *C.albicans*'ın maya formuna bağlanma veya maya formunu öldürme etkisi olmadan, fungal filamentler üzerinde yoğun bir biyofilm oluşturmaya yolculuyla olduğunu göstermişlerdir¹. *Candida* biyofilm oluşumunun adezyon fazında maya formu, olgunlaşma fazında ise hifal formasyonun arttığı gözlenmektedir. *P.aeruginosa*'nın piyosyanin pigmentiyle bu hifal formasyonu cAMP'ye bağımlı bir mekanizmayla azalttığı ileri sürülmektedir³. Ayrıca,

Thein ve arkadaşları⁴, *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün belli bir konsantrasyonda *C.albicans* biyofilmini önemli düzeyde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Candida ve *P.aeruginosa*, özellikle damar içi tıbbi gereç kullanımıyla ilişkili nozokomiyal enfeksiyonların majör patojenleridir⁵. Ayrıca, yaşlı hastalarda *Pseudomonas* spp. ve *C.albicans*'ın birlikte enfeksiyonu, pnömoni gelişmesi açısından yüksek bir risk oluşturmaktadır⁶. Her iki mikroorganizmanın tek başına oluşturduğu biyofilmlerin, enfeksiyonların patogeneizindeki rolleri geniş çapta çalışılmıştır⁷. Buna rağmen, *P.aeruginosa* ve *Candida* türlerinin her ikisinin birlikte oluşturduğu biyofilimdeki etkileşimleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada *P.aeruginosa*'nın dört farklı *Candida* türünde (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis*) antikandidal aktivitesinin ve *C.albicans* ve *P.aeruginosa* biyofilminin birbirleriyle etkileşiminin kantitatif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Bu çalışmada, hastanemize başvuran hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen ve VITEK II (Biomerieux, Fransa) sistemiyle tanımlanan 58 *P.aeruginosa* suşu ile *Candida* suşları olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.glabrata* ATCC 90030 ve bir klinik *C.tropicalis* izolatu kullanıldı.

Antikandidal Aktivitenin Araştırılması

P.aeruginosa suşlarının antikandidal aktiviteleri Kerr'in² yöntemi kullanılarak incelendi. Bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden serum fizyolojik ile ml'de 10^8 ünite cfu/ml süspansiyonları oluşturuldu ve bu süspansiyonlardan 30 µl alınarak Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerinde çap boyunca eni 1 cm olacak şekilde yayıldı. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra makroskobik üreme lam ile kazındı, kalan mikroskobik atıkların yok edilmesi için kloroform emdirilmiş 5 cm çapındaki filtre kağıtları besiyeri yüzeyinde 30 dakika süreyle bekletildi. Filtre kağıtları kaldırıldıktan sonra, *Candida* suşlarının 10^6 cfu/ml süspansiyonlarından ilk inokulum bölgesine dik açı oluşturacak şekilde ekim yapıldı ve plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri ekimiyle keşilen yerde *Candida* suşlarının ürememesi tam inhibisyon, kontrole göre daha az üreme olması kısmi inhibisyon, üremenin kontrolle aynı şekilde olması ise inhibisyon olmaması olarak değerlendirildi.

Biyofilim Oluşumuna Etkinin Araştırılması

Tam inhibisyon gösteren iki ve inhibisyon göstermeyen bir *Pseudomonas* suşunun, *C.albicans* biyofilmi üzerine etkisi araştırıldı. *Candida* biyofilmi, Bandara ve arkadaşları⁸ yöntemiyle 96 kuyucuklu mikropklaklarda oluşturuldu. İlk olarak, *C.albicans* ve *P.aeruginosa*'nın standart hücre süspansiyonlarından (10^7 cfu/ml, 1/1 oranında) 100 µl kuyucuklara konuldu. Aynı şekilde, sadece *C.albicans* ve sadece *P.aeruginosa* içeren kontrol suşlarının süspansiyonları da 100'er µl farklı kuyucuklara konuldu. Mikrobiyal aderansı hızlandırmak amacıyla, mikropklaklar 37°C'de 90 dakika orbital çalkalayıcıda 75 rpm'de

inkübe edildi. Daha sonra tüm süspansiyonlar aspire edildi ve her kuyucuk fosfat tampo-
nu (PBS) ile iki kez yıkandı. Her kuyucuğa 200 µl triptikaz soy buyyon konulduktan son-
ra plaklar 24 saat ve 48 saat tekrar inkübe edildi. Kuyucuklar bu zaman aralıklarında iki
kez PBS ile yıkandı.

Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Analizi

Biyofilmin adezyon (90 dakika), kolonizasyon (24 saat) ve olgunlaşma (48 saat) fazla-
rı sonunda, her kuyucuğa 100 µl PBS konuldu ve biyofilm tabakası kuyucuk duvarından
steril plastik öze ile kazındı. Biyofilm hücreleri içeren bu süspansiyonun seri dilüsyonları
C.albicans için SDA'ya ve *P.aeruginosa* için EMB (Eosine Methylene Blue) agara inoküle
edildi. Maya ve bakterilerin cfu/ml değerleri 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrası değer-
lendirildi.

Klamidospor Oluşumuna Etkinin Araştırılması

Bu amaçla Mısır unlu-Tween 80 agar (MUA) kullanıldı. Kontrol olarak bazı plaklara
C.albicans suşu inoküle edilirken, karşılaştırma amacıyla bazı agar plaklarının yüzeyine bi-
yofilm inhibisyonu ve antikandidal aktivite göstermiş olan *P.aeruginosa*'nın 0.5 McFar-
land'a ayarlanmış süspansiyonundan ekim yapıldıktan sonra *C.albicans* inoküle edildi.
Plaklar, spor ve hif oluşumlarının değerlendirilmesi amacıyla 37°C'de 2-3 gün inkübe
edildi.

BULGULAR

P.aeruginosa suşlarının *Candida* türlerine karşı gösterdikleri tam inhibisyon ve kısmi
inhibisyon oranları Tablo I'de gösterilmiştir. *Pseudomonas* ve *C.albicans*'ın ortak biyofil-
minde 90 dakika, 24 saat ve 48 saat sonraki cfu/ml değerlerinde, her iki mikroorganiz-
manın tek başına biyofilmlerinin cfu değerlerine oranla belirgin azalma saptanmıştır
(Tablo II). İnhibisyon etkisi, özellikle 24-48. saat inkübasyon döneminde cfu/ml deęer-
lerinde 5-7 log azalma şeklinde gözlenmektedir. Ayrıca, SDA'da antikandidal aktivitesi
saptanmayan *Pseudomonas* izolatının da, mikropklarda *Candida* biyofilmini azalttığı
saptanmıştır. Tam inhibisyonun, yeşil pigment oluşturan *Pseudomonas* suşları, kısmi in-
hibisyonun ise sarı pigment oluşturan suşlarla olduğu gözlenmiştir. MUA'daki mikros-
kobik görünüm deęerlendirildiğinde, *Pseudomonas* kültürü içeren agarda, kontrol
agar plaklarına oranla daha az sayıda hif, blastospor veya klamidospor oluşumu gözlen-
miştir (Resim 1).

Tablo I. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının (n= 58) *Candida* Türlerine Karşı Gösterdikleri Antikandidal Ak-
tivite Oranları

<i>Candida</i> suşları	Tam inhibisyon (%)	Kısmi inhibisyon (%)
<i>C.albicans</i> ATCC 90028	63.8	10.3
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	72.4	10.3
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	65.5	8.6
<i>C.tropicalis</i>	75.9	6.9

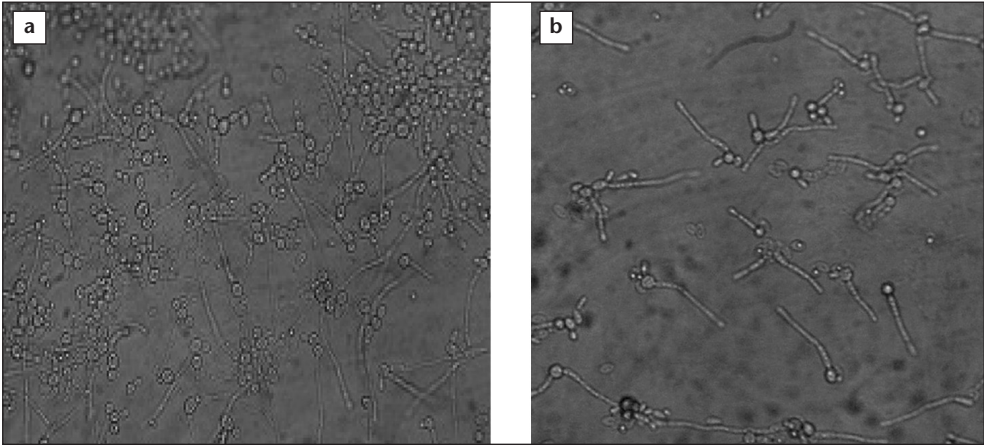
Tablo II. *Candida albicans* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının 90 Dakika, 24 ve 48 Saatte Tek Başına veya Birlikte Oluşturdukları Biyofilmden Elde Edilen Ortalama cfu/ml Değerleri ($\pm$ SD)

Zaman aralığı	<i>C.albicans</i> cfu (10^5) $\pm$ SD			<i>P.aeruginosa</i> cfu (10^5) $\pm$ SD		
	Kontrol	P + C*	p	Kontrol	P + C	p
90 dakika	2.45 $\pm$ 0.07	1.4 $\pm$ 0.35	0.01	7.1 $\pm$ 1.2	1.2 $\pm$ 0.3	0.03
24 saat	20.8 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.07	0.02	205 $\pm$ 7	50 $\pm$ 17.6	0.01
48 saat	272 $\pm$ 38	0.003 $\pm$ 0.02	< 0.001	31.250 $\pm$ 1767.7	937.5 $\pm$ 88.3	0.02

* *Pseudomonas* suşlarının *C.albicans* ile birlikte oluşturdukları biyofilmin cfu değerleri.

p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

SD: Standart sapma, cfu: Koloni oluşturan birim.



Resim 1. a. Mısır unlu agarda sadece *C.albicans*'ın (kontrol); **b.** *P.aeruginosa* üremesi olan mısır unlu agarda *C.albicans*'ın klamidiospor ve hif oluşumlarının görünümü.

TARTIŞMA

Birçok organizma aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanır. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ve "Quorum Sensing (QS)" olarak adlandırılan bu işlem ile bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verileri diğerlerine iletmesine imkan sağlamaktadır⁹. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artışla birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani biyofilm içerisindeki bakteriler, interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedir¹⁰. Biyofilm oluşum sürecinde QS molekülleri adezyonda, mikrokolonilerin oluşumunda ve sonrasında biyofilm içinde kanalcıklar açmak suretiyle biyofilmden kopan mikroorganizmaların bir başka yere gidip tutunmasında görev almaktadır¹¹.

Mantarlarda biyofilm oluşumu sürecinde QS sisteminin rolünü araştırmaya yönelik çalışmalar en fazla *C.albicans* suşları üzerindedir. *C.albicans* suşlarının oluşturdukları biyofil-

min yapısı ve kompozisyonu çeşitli çevresel koşullara göre değişebilmektedir. Biyofilm tabakası esas olarak bazal bir maya tabakasıyla çok miktarda hif ve hücre dışı matriksten oluşur. Hif oluşumu mutlak olmasa da çeşitli çevre koşullarında biyofilm oluşumu için gerekmektedir^{12,13}. Bu çalışmada, *P.aeruginosa*'nın *C.albicans* üremesini ve biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Bu etki, muhtemelen patogeneizde önemli olan maya-hif formuna geçişin azaltılması yoluyla olmaktadır. Aynı zamanda *Candida*'nın da *Pseudomonas* biyofilmini azaltması, *Pseudomonas* ve *Candida* türleri arasında sinyal molekülleri yoluyla bir iletişimin olabileceğini düşündürmektedir. Hogan ve arkadaşlarının¹⁴ çalışmasında, *P.aeruginosa* tarafından üretilen açıl homoserin laktonun *C.albicans* filamentasyonunu önlemede asıl etkili olan sinyal molekülü olduğu saptanmıştır. Hogan ve Kolter¹⁵, *P.aeruginosa* ve *C.albicans* arasındaki sinyal molekülleriyle oluşan bu patolojik ilişkinin, *Pseudomonas*'ın *C.albicans* biyofilmi üzerinde yoğun bir film oluşturmaya meydana geldiğini savunmuşlardır. Bandara ve arkadaşlarının⁸ çalışmasında, her iki mikroorganizmanın birbirlerinin biyofilmini inhibe ettikleri, mikropalak yöntemi ve scanning elektron mikroskopuyla gösterilmiştir. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da, *Candida* ve *P.aeruginosa*'nın her ikisinin de birbirlerinin biyofilm oluşumunu, biyofilm oluşumunun farklı fazlarına göre, farklı oranlarda inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmamızın en önemli bulgularından biri, *P.aeruginosa*'nın 48 saatte *C.albicans* biyofilmini büyük ölçüde inhibe etmesidir. Buna karşın bir çalışmada, *Pseudomonas*'ın *C.albicans* adezyon ve biyofilm oluşturmada etkisi olmadığı ileri sürülmüştür¹⁶. *P.aeruginosa*'nın *C.albicans* maya veya hif formuna adezyonundaki farklılıklardan dolayı¹⁵, iki mikroorganizmanın da birlikte bulunduğu bir biyofilm oluşumu, bu özelliklerin sonucu olabilir.

Antifungal aktivitenin araştırıldığı, Kaleli ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında, yoğun bakım hastalarından izole edilen 44 *P.aeruginosa* suşunun, *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.krusei* ve *C.tropicalis* kanlı agar ve SDA'daki tam inhibisyon oranları sırasıyla, %41 ve %45; %34 ve %39; %34 ve %48; %25 ve %25 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, bakteri-fungal süspansiyonların farelere verilmesiyle subkütanöz enfeksiyon oluşturulmuş ve yapılan deri kültürlerinde *Pseudomonas*'ın üremesine rağmen maya kolonilerine rastlanmamıştır¹⁷. Erturan ve arkadaşları¹⁸, kistik fibrozisli hastaların balgamından izole ettikleri 49 *P.aeruginosa* suşunun 27 (%55)'sinde; transplantasyon yapılan olguların idrarlarından izole ettikleri 48 *P.aeruginosa* suşunun ise 36 (%75)'sinde *C.albicans*'a karşı tam inhibisyon aktivitesi saptamışlardır. Yücesoy ve arkadaşları¹⁹ 50 *P.aeruginosa* suşuyla yaptıkları çalışmada, *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.krusei* türleri üzerinde kanlı agar ve SDA besiyerlerindeki tam inhibisyon oranlarını sırasıyla %14 ve %18; %4 ve %8; %6 ve %2 olarak saptamışlardır. Yiğit ve Aktaş'ın²⁰ çalışmasında ise, *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*'ya karşı SDA'daki tam inhibisyon oranları sırasıyla %52.5, %49.1 ve %48.3 olarak bulunmuştur. Buna karşın, bizim çalışmamızda, SDA'daki tam inhibisyon oranı en çok *C.parapsilosis* (%72.4) ve *C.tropicalis* (%75.9)'te saptanmış, *C.albicans* ve *C.glabrata*'da ise sırasıyla %63.8 ve %65.5 olarak izlenmiştir. Bu bulgular, diğer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, çalışmamızdaki oranların daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Bunun nedeni, çalışmamızda kullandığımız *P.aeruginosa* suşlarının farklılığı, buna bağlı olarak da *Candida* inhibisyonunda etkin olan virülans faktörlerindeki farklılık olabilir.

Grillot ve arkadaşları²¹, in vitro maya inhibisyon testlerini kullanarak saf ve karışık (*Pseudomonas* + *Candida*) kan kültürlerinde *P.aeruginosa*'nın *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata* inhibisyonunu göstermişler ve polimikrobiyal septisemi gibi bakteri + fungus enfeksiyonlarında kan kültürlerinde maya formunun az olmasını, mayanın *P.aeruginosa* tarafından inhibe olmasına bağlamışlardır. Kerr'in² çalışmasında test edilen 11 *Candida* türünün dokuzunda (*C.krusei*, *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis*, *C.albicans*, *C.glabrata*) *P.aeruginosa* tarafından inhibisyon saptanmıştır. Ayrıca, üreme inhibisyonu *C.albicans*'ta en fazla olmak üzere, bunu *C.guilliermondii* ve *C.glabrata* izlemiştir. *Pseudomonas*'ın bu antikan-didal aktivitesinin redoks-aktif piyosiyanın üretimiyle ilgili olduğu ve piyosiyanın hücrelerde cAMP ve ATP'yi azaltarak hif oluşumunu engellediği ileri sürülmüştür³. Bizim çalışmamızda, *Pseudomonas* ve *Candida* kültürü içeren mısır unlu agarda, özellikle hif oluşumunun azaldığı gösterilmiş, bu durum *C.albicans*'ın sadece hif formunun *P.aeruginosa* tarafından önlendiğini düşündürmüştür. Bu reaksiyonun daha çok yeşil pigment oluşturan *Pseudomonas* suşlarında gözlenmesi ise, hif oluşumunun azalmasında yeşil pigmentin kaynağı olan piyosiyanın rolü olduğunu vurgulamaktadır. Benzer şekilde Hockey ve arkadaşları²², in vitro model kullanarak *P.aeruginosa*'yı da içeren altı farklı bakterinin *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.glabrata* üzerine etkisini araştırmışlar ve bu üç *Candida* türünün, *P.aeruginosa* tarafından inhibe olduğunu göstermişlerdir. Bu inhibisyonun nedeninin nütrisyonel azalmaya ve bakteriyel toksin üretimine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir²². Bu sonuçlar, bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzerdir; ancak bizim çalışmamızda biyofilm ortamında da inhibisyon etkisi saptanmıştır. Ayrıca, çalışmamızda *C.albicans*'ın *P.aeruginosa* ile birlikte bulunduğu ortamda, *Pseudomonas* biyofilmini adezyon, kolonizasyon ve olgunlaşma fazında baskıladığı da gösterilmiştir. Özellikle, *C.albicans*'ın 48 saat inkübasyon sonrası, inhibisyon etkisinin daha belirgin olduğu gözlenmiştir.

Son yıllarda *Pseudomonas* ve *Candida* biyofilmi arasındaki QS molekülleri yardımcı bu etkileşim araştırılmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda, biyofilm içerisinde yeterli miktarda sinyal biriktiğinde ilgili genlerin ekspresyonunun uyarılmakta olduğu ve bazı ürünlerin ortaya çıktığı tartışılmaktadır^{23,24}. *P.aeruginosa* süpernatantlarının *C.albicans* biyofilm oluşumuna etkisinin incelendiği bir çalışmada, homoserin lakton üretiminden bağımsız bir mekanizma ile biyofilm oluşumu ve adezyon ile ilgili gen ekspresyonunda, hatta biyofilm oluşumunu önleyen proteini kodlayan YWP1 gen ekspresyonunda da artış olduğu gösterilmiştir²⁵. Bizim çalışmamızın sonuçları, bazı *Candida* türlerinin ve *P.aeruginosa*'nın birbirlerinin üreme ve faz dönemlerine göre farklı derecede biyofilm oluşumlarını inhibe ettiğini göstermektedir. Bu bulguların desteklenmesi için, farklı *Candida* türlerinin oluşturduğu biyofilm üzerine etkinin araştırıldığı ileri çalışmalara gereksinim vardır. *Pseudomonas-Candida* biyofilm inhibisyonunda rol oynayan genetik mekanizmaların araştırılması, bakteri-fungus karışık enfeksiyonlarının patogenezinin aydınlatılması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Nseir S, Jozefowicz E, Cavestri B, et al. Impact of antifungal treatment on *Candida-Pseudomonas* interaction: a preliminary retrospective case-control study. *Int Care Med* 2007; 33(1): 137-42.
2. Kerr JR. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 525-7.
3. Kerr JR, Taylor GW, Rutman A, Hoiby N, Cole PJ, Wilson R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxy-phenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol* 1999; 52(5): 385-7.
4. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival on *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol* 2006; 51(8): 672-8.
5. Pierce GE. *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and device-related nosocomial infections: implications, trends and potential approaches for control. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005; 32(7): 309-18.
6. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* 2003; 49(5): 301-9.
7. Lappin-Scott HM, Costerton JW. *Microbial Biofilms*. 1995. Cambridge University Press, UK.
8. Bandara HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol* 2010; 10: 125.
9. Camara M. Quorum sensing: A cell-cell signaling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations. <http://wmc7.liacs.nl/proceedings/WMC7Camara.pdf>
10. Arnold JW, Silvers S. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poult Sci* 2000; 79(8): 1215-21.
11. Shih P, Huang C. Effects of quorum sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(2): 309-14.
12. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001; 183(18): 5385-94.
13. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell* 2005; 4(4): 633-8.
14. Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* 2004; 54(5): 1212-23.
15. Hogan DA, Kolter R. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 2002; 296(5576): 2229-32.
16. El-Azizi MA, Starks SE, Khardori N. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl Microbiol* 2004; 96(5): 1067-73.
17. Kaleli I, Cevahir N, Demir M, Yildirim U, Şahin R. Anticandidal activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Mycoses* 2007; 50(1): 74-8.
18. Erturan Z, Kiraz N, Anđ Ö. *Pseudomonas* suşlarının antikandidal aktivitelerinin araştırılması. *Klinik Dergisi* 1997; 10(3): 125-6.
19. Yücesoy M, Mutlu E, Yuluğ N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antikandidal aktivitesi. *İnfeksiyon Derg* 2002; 16(4): 483-6.
20. Yiğit N, Aktaş EA. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antikandidal aktivitesi. *İnfeksiyon Derg* 2008; 22(4): 215-8.
21. Grillot R, Portmann-Coffin V, Ambroise-Thomas P. Growth inhibition of pathogenic yeasts by *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: clinical implications in blood cultures. *Mycoses* 1994; 37(9-10): 343-7.
22. Hockey LJ, Fujita NK, Gibson TR, Rotrosen D, Montgomerie JZ, Edwards JE Jr. Detection of fungemia obscured by concomitant bacteremia: in vitro and in vivo studies. *J Clin Microbiol* 1982; 16(6): 1080-5.
23. Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell* 2006; 5(4): 613-9.
24. Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 1999; 181(4): 1203-10.
25. Holcombe LJ, McAlester G, Munro CA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiology* 2010; 156(Pt 5): 1476-86.