

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**BÖCEK ORİJİNLİ BAKTERİLERDE BAKTERİYOSİNLERİN ARAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK MÜCADELEDEKİ ÖNEMİ**

DOKTORA TEZİ

SERPİL UĞRAŞ

ŞUBAT 2012

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÖCEK ORİJİNLİ BAKTERİLERDE BAKTERİYOSİNLERİN ARAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK MÜCADELEDEKİ ÖNEMİ**

Biyolog Serpil UĞRAŞ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.01.2012
Tezin Savunma Tarihi : 17.02.2012**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Serpil UĞRAŞ Tarafından Hazırlanan

**BÖCEK ORİJİNLİ BAKTERİLERDE BAKTERİYOSİNLERİN ARAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK MÜCADELEDEKİ ÖNEMİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 17 / 01 / 2012 gün ve 1438 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ

Üye : Prof. Dr. Nurettin YAYLI

Üye : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Üye : Doç. Dr. Kazım SEZEN

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Böcek Orijinli Bakterilerde Bakteriyosinlerin Araştırılması, Karakterizasyonu ve Biyolojik Mücadeledeki Önemi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 110T030 no’lu proje ile desteklenmiştir.

Tüm çalışmalarımı rahatlıkla sürdürebilmem için gerekli desteği sağlayan TÜBİTAK’a, KTÜ ve Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümleri’ne,

Çalışma süresinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, mütevazı kişiliği ve çalışma azmi ile örnek aldığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a,

Desteğini her zaman hissettiğim, deneyimleri ile daima bana destek olan Sayın Doç. Dr. Kazım SEZEN’e, çalışmalarım da bilgilerine ve yorumlarına başvurduğum Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI’ya, öğretici kişiliği ve samimiyeti ile her zaman yanımda olan sevgili hocam Doç. Dr. Hatice KATI’ya, KTÜ Biyoloji Bölümü öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na, Doç. Dr. İsmail DEMİR’e, mikrobiyoloji çalışma grubu arkadaşlarıma ve dertlerime ortak olan sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Ayşegül CANIKLIOĞLU’na,

Yardımları sayesinde yaşamdan tat almamı, nefes almamı, görmemi sağlayan annem’e,

Yaşamımı anlamlı kılan canım eşim’e ve oğlum’a,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

Serpil UĞRAŞ
Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “Böcek Orijinli Bakterilerde Bakteriyosinlerin Araştırılması, Karakterizasyonu ve Biyolojik Mücadeledeki Önemi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 01/03/2012.

Serpil UĞRAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri.....	3
1.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılmaları.....	6
1.4. Bakteriyosinlerin Sentezlenme Mekanizmaları.....	12
1.5. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları.....	14
1.6. Bakteriyosin Üretici Suşun Kendini Koruma Mekanizması	16
1.7. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları	16
1.7.1. Gıda Sanayisinde Kullanımı.....	16
1.7.2. Tıp ve Veterinerlik Alanında Kullanımı.....	17
1.7.3. Tarım Alanında Kullanımı	18
1.7.4. Diğer Alanlarda Kullanımı	19
1.8. Amaç.....	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Test ve İndikatör Bakterilerin Temini	21
2.2. Kullanılan Besiyerler ve Büyüme Koşulları.....	21
2.3. İzolatların Bakteriyosin Üretme Potansiyellerinin Araştırılması	24
2.3.1. Agar Nokta Ekim Yöntemi.....	24
2.3.2. Kuyu Difüzyon Yöntemi	25
2.4. İndikatör Bakteri Seçimi.....	26

2.5.	Bakteriyosinlerin Kantitatif Tayini.....	26
2.6.	Bakteriyosin Üretim Zamanının Belirlenmesi.....	27
2.7.	Ortam Koşullarının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi	27
2.7.1.	Besiyeri ve Sürenin Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi.....	27
2.7.2.	pH'ın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi	28
2.7.3.	Sıcaklığın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi	28
2.8.	Ortam Koşullarının Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	28
2.8.1.	Sıcaklığın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	29
2.8.2.	pH'nın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	29
2.8.3.	Enzim ve Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi	29
2.9.	Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmasının Belirlenmesi.....	30
2.10.	Bakteriyosinlerin Saflaştırılması	30
2.10.1.	Aktif Süpernatantın Eldesi ve Isıl İşlem Uygulaması	31
2.10.2.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	31
2.10.3.	Diyaliz ve Ultrafiltrasyon	32
2.10.4.	Jel Filtrasyon Kromatografisi	33
2.10.5.	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi.....	33
2.11.	Bakteriyosinlerin Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi ile Tanımlanması.....	34
2.12.	Veri Tabanı Analizleri.....	34
2.13.	Saflaştırılan Moleküllerin Belirlenmesi.....	34
2.13.1.	SDS-PAGE ile Belirlenmesi.....	34
2.13.2.	İnce Tabaka Kromatografisi ile Belirlenmesi	35
2.14.	Protein Miktar Tayini	37
2.15.	Bakteriyosinlerin Moleküler Karakterizasyonu.....	37
2.16.	Bakteriyosinlerin Bazı Bitki Patojenleri Üzerine Etkisi.....	38
3.	BULGULAR	39
3.1.	Bakterilerin Bakteriyosin Üretme Potansiyeli.....	39
3.2.	Hedef Bakterilerin Bakteriyosin Üretim Zamanı	47
3.3.	Ortam Koşullarının Hedef Bakteriyosinlerin Üretimleri Üzerine Etkisi.....	48
3.3.1.	Besiyeri ve Sürenin Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi.....	48
3.3.2.	Sıcaklığın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi	49
3.3.3.	pH'ın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi	51
3.4.	Ortam Koşullarının Hedef Bakteriyosinlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi	53

3.4.1.	Sıcaklığın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	54
3.4.2.	pH'ın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	55
3.4.3.	Enzim ve Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi	57
3.5.	Hedef Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması	57
3.6.	Hedef Bakteriyosinlerin Saflaştırılması	60
3.6.1.	Aktif Kültür Süpernatantının Eldesi	62
3.6.2.	Isıl İşlem Uygulanması.....	63
3.6.3.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	63
3.6.4.	Diyaliz ve Ultrafiltrasyon	65
3.6.5.	Jel Filtrasyon Kromatografisi	66
3.6.6.	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi.....	68
3.7.	Hedef Bakteriyosinlerin Tanımlanması.....	71
3.8.	Veri Tabanı Analizi	73
3.9.	Saflaştırılan Moleküllerin Belirlenmesi.....	74
3.9.1.	SDS-PAGE ile Belirlenmesi.....	74
3.9.2.	İnce Tabaka Kromatografisi ile Belirlenmesi	76
3.10.	Bakteriyosinlerin Moleküler Karakterizasyonu.....	77
3.11.	Hedef Bakteriyosinlerin Bazı Bitki Patojenleri Üzerine Etkisi	79
4.	TARTIŞMA.....	80
5.	SONUÇLAR.....	100
6.	ÖNERİLER	102
7.	KAYNAKLAR.....	103

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

BÖCEK ORIJİNLİ BAKTERİLERDE BAKTERİYOSİNLERİN ARAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK MÜCADELEDEKİ ÖNEMİ

Serpil UĞRAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilimdalı
Danışman: Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ
2012, 119 Sayfa

Bakteriyosinler bakteri, fungus gibi mikroorganizmaların büyümesini engelleyen ya da tamamen öldürerek ortadan kaldıran antimikrobiyal maddelerdir. Bu maddeler, birçok alanda yüksek uygulanabilirlik potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada, entomopatojenik bakterilerden bakteriyosin elde etmek ve biyolojik mücadeledeki önemini araştırmak amacıyla altı farklı böcekte izole edilen otuz yedi bakterinin bakteriyosin üretebilme kapasitesi araştırıldı. Bu bakteriler arasında *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *Serratia marcescens* (Sm-Mm3)'in antibakteriyal madde üretebildiği belirlendi. Hedef bakterilerin ilgili antimikrobiyal maddeleri üretebildikleri optimum koşullar belirlendi. Bu maddeler, kültür süpernatantından sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve HPLC ile saflaştırıldıktan sonra TOF-MS ile tanımlandı. Bunun sonucunda, Bt-Bn1 molekülünün, ısıya dayanıklı, pH 6-8 aralığında kararlı, proteinaz K'ya duyarlı ve 3.139 Da büyüklüğünde bir polipeptit, Sm-Mm3 molekülünün ise ısıya dayanıklı, pH 5-9 aralığında kararlı, proteinaz K'ya dirençli ve 479 Da büyüklüğünde antibakteriyal bir madde olduğu belirlendi. Bt-Bn1 molekülünün farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* ve *Listeria monocytogenes* bakterilerine karşı, Sm-Mm3 molekülünün ise farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *Enterobacter* sp., *Erwinia amylovora*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus cohnii* ve *Staphylococcus epidermidis* bakterilerine karşı inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlendi. Plazmit eliminasyon çalışmalarıyla Bt-Bn1 molekülünün kromozom kökenli, Sm-Mm3 molekülünün ise plazmit kökenli olduğu belirlendi. Bu moleküllerin, *Erwinia amylovora*, *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas syringae*, ve *Xanthomonas axonopodis* gibi bitki patojeni bakterilere karşı inhibisyon aktivitesine sahip oldukları belirlenerek biyolojik mücadelede kullanım potansiyelleri ortaya çıkarıldı.

Anahtar Kelimeler; *Bacillus thuringiensis*, bakteriyosin, biyolojik mücadele, entomopatojenik bakteriler, *Serratia marcescens*.

PhD. Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCINS FROM INSECT
ASSOCIATED BACTERIA AND THEIR SIGNIFICANCE IN BIOLOGICAL CONTROL

Serpil UGRAS

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Zihni DEMIRBAG
2012, 119 Pages

Bacteriocins kill or inhibit the growth of microorganisms such as bacteria and fungi. These substances have a highly potential applicability in many industrial areas. In this study, in order to obtain bacteriocin from entomopathogenic bacteria and to investigate their significance in biological control, thirty-seven bacteria isolated from six different insect were investigated for the capacity of bacteriocin production. Among tested bacteria, *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) and *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) were determined as antibacterial substance producing organisms. The optimum growth conditions of the target bacteria were determined. These substances were purified by ammonium sulfate precipitation, dialysis, ultrafiltration, gel filtration chromatography and HPLC respectively from the bacterial supernatants and identified by TOF-MS. Finally, Bt-Bn1 strain produces a heat and pH 6-8 range stabil, proteinase K sensitive antibacterial polipeptide, and its molecular mass was determined as a 3.139 Da. Sm-Mm3 strain produces a heat stable, pH 5-9 range stable and proteinase K insensitive active molecule, and its molecular mass was determined as a 479 Da. Bt-Bn1 molecule exhibits inhibitory spectrum against various *Bacillus thuringiensis* strains, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* and *Listeria monocytogenes*. Sm-Mm3 molecule has inhibitory activity against various *Bacillus thuringiensis* strains, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *Enterobacter* sp., *Erwinia amylovora*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus cohnii* ve *Staphylococcus epidermidis*. Plasmid elution studies shown that gene(s) responsible for bacteriocin of the Bt-Bn1 is located on chromosome and for the Sm-Mm3 located on plasmid. Studies on the biological control potential of the identified molecules have shown that they are active against *Erwinia amylovora*, *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas syringae* ve *Xanthomonas axonopodis*. Therefore, they have potential to be used in biological control.

Key Words; *Bacillus thuringiensis*, bacteriocin, biological control, entomopathogenic bacteria, *Serratia marcescens*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Bakteriyosinlerin güncel evrensel sınıflandırma şeması.....	9
Şekil 2.	Sınıf I bakteriyosinlerin regülasyon ve biyosentezleri.....	13
Şekil 3.	Sınıf II ve Sınıf III bakteriyosinlerin regülasyon ve biyosentezleri.....	14
Şekil 4.	LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki mekanizmaları.....	15
Şekil 5.	<i>E.coli</i> suşları tarafından üretilen kolisinlerin etki mekanizması.....	16
Şekil 6.	Agar nokta ekim yöntemi.....	24
Şekil 7.	Kuyu difüzyon yöntemi.....	25
Şekil 8.	Bakteriyosin aktivite testi.....	26
Şekil 9.	Bakteriyosinlerin etki mekanizmasının belirlenmesi.....	30
Şekil 10.	Bt-Bn1 bakteriyosininin bazı bakteriler üzerine olan inhibisyon aktivitesi.....	44
Şekil 11.	Sm-Mm3 bakteriyosininin bazı bakteriler üzerine olan inhibisyon aktivitesi....	44
Şekil 12.	Bakteriyosinlerin üretim zamanı.....	47
Şekil 13.	Bt-Bn1 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi.....	50
Şekil 14.	Sm-Mm3 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi....	51
Şekil 15.	Bt-Bn1 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi.....	52
Şekil 16.	Sm-Mm3 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi.....	53
Şekil 17.	Sıcaklığın hedef bakteriyosinler üzerine etkisi.....	55
Şekil 18.	pH'ın hedef bakteriyosinler üzerine etkisi.....	56
Şekil 19.	Bt-Bn1 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması.....	58
Şekil 20.	Sm-Mm3 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması.....	59
Şekil 21.	Bt-Bn1 bakteriyosininin saflaştırma stratejisi.....	61
Şekil 22.	Sm-Mm3 bakteriyosininin saflaştırma stratejisi.....	62
Şekil 23.	Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen bakteriyosinlerin aktivitesi.....	65
Şekil 24.	Kısmi saflaştırılan hedef bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi.....	66
Şekil 25.	Bakteriyosinlerin jel filtrasyon kromatografi kromotogramı.....	67
Şekil 26.	Bt-Bn1 bakteriyosininin HPLC kromotogramı.....	69
Şekil 27.	Sm-Mm3 bakteriyosininin HPLC kromotogramı.....	71
Şekil 28.	Bt-Bn1 bakteriyosininin TOF-MS spektrumu.....	72

Şekil 29. Sm-Mm3 bakteriyosininin TOF-MS spektrumu	73
Şekil 30. Bt-Bn1 bakteriyosininin SDS-PAGE ve jelde doğrudan aktivitesi.....	75
Şekil 31. Sm-Mm3 bakteriyosininin SDS-PAGE ve jelde doğrudan aktivitesi	76
Şekil 32. Sm-Mm3 bakteriyosininin ince tabaka kromatografisi.....	77
Şekil 33. Plazmit eliminasyonu sonucu Bt-Bn1 ve Sm-Mm3 bakterilerinin agar nokta ekim yöntemi ile inhibisyon aktivitesi	78
Şekil 34. Plazmit eliminasyonu sonucu Sm-Mm3 bakterisinin kuyu difüzyon yöntemi ile İnhibisyon aktivitesi	78

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bakteriyosin sınıfları ve bazı örnekler	8
Tablo 2. <i>Bacillus</i> bakteriyosinleri için önerilen sınıflandırılma	10
Tablo 3. Bakteriyosinlerin gıda sanayisinde kullanımı	17
Tablo 4. Bakteriyosinlerin tıp ve veterinerlik alanında kullanımları.....	18
Tablo 5. Bakteriyosinlerin tarım alanında kullanımları	19
Tablo 6. Test bakterileri ve izole edildikleri fındık zararlısı böcekler.....	22
Tablo 7. İndikatör <i>Bacillus thuringiensis</i> suşları.....	23
Tablo 8. Farklı indikatör bakteriler.....	23
Tablo 9. Bitki patojeni bakteriler.....	38
Tablo 10. Agar nokta ekim yöntemi ile belirlenen bakteriyosin üretici izolatlar	40
Tablo 11. Hedef bakteriyosinlerin <i>B.t'</i> ler üzerine etkisi	45
Tablo 12. Hedef bakteriyosinlerin farklı indikatör bakteriler üzerine etkisi	45
Tablo 13. Hedef bakteriyosinlerin test bakterileri üzerine etkisi.....	46
Tablo 14. Bt-Bn1 bakterisinin farklı besiyerlerinde büyümesi ve bakteriyosin üretimi	48
Tablo 15. Sm-Mm3 bakterisinin farklı besiyerlerinde büyümesi ve bakteriyosin üretimi.....	49
Tablo 16. Bt-Bn1 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi	50
Tablo 17. Sm-Mm3 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi.....	51
Tablo 18. Bt-Bn1 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi.....	52
Tablo 19. Sm-Mm3 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi	53
Tablo 20. Sıcaklığın hedef bakteriyosinler üzerine etkisi	54
Tablo 21. pH'ın hedef bakteriyosinler üzerine etkisi	56
Tablo 22. Enzim ve organik çözücülerin hedef bakteriyosinler üzerine etkisi	57
Tablo 23. Bt-Bn1 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması.....	58
Tablo 24. Sm-Mm3 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması	59
Tablo 25. Bt-Bn1 bakteri kültür süpernatının (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	64
Tablo 26. Sm-Mm3 bakteri kültür süpernatantının (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi.....	64
Tablo 27. Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen Bt-Bn1 aktif fraksiyonların aktiviteleri.....	68
Tablo 28. Bt-Bn1 bakteriyosininin saflaştırılması için HPLC optimize doğrusal gradient şartları.....	69

Tablo 29. Bt-Bn1 bakteriyosinin saflaştırılma özeti.....	70
Tablo 30. Sm-Mm3 bakteriyosininin saflaştırılması için HPLC optimize doğrusal gradient şartları	70
Tablo 31. Hedef bakteriyosinlerin bazı bitki patojeni bakteriler üzerine etkisi	79
Tablo 32. Farklı <i>B.t.</i> tarafından üretilen bakteriyosinler/BLIS ve özellikleri.....	91

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AU	: Arbitrary Unit
BHIB	: Brain Heart Infusion Broth
BLIS	: Bakteriyosin Benzeri Madde
Bt-Bn1	: <i>Balaninus nucum</i> ' dan İzole Edilen <i>Bacillus thuringiensis</i>
CFU	: Koloni Oluşturabilen Canlı Hücre
dH ₂ O	: Distile Su
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
kDa	: Kilodalton
LBB	: Luria-Bertani Broth
MA	: Moleküler Ağırlık
MHB	: Muller Hinton Broth
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
R _f	: Sürüklenme Değeri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
Sm-Mm3	: <i>Melolontha melolontha</i> ' dan İzole Edilen <i>Serratia marcescens</i>
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
TOF-MS	: Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Enfeksiyonların tedavisinde antimikrobiyal özelliklere sahip karışımların kullanımı 2000 yıl önceye dayanmaktadır (Lindblad, 2008). Antik Mısırlılar ve Eski Yunanlılar da dahil olmak üzere bir çok kadim kültür, enfeksiyonları tedavi etmek için, özel olarak seçilmiş küf, bitki materyali ve bir takım özütler kullanmıştır (Forrest, 1982; Wainwright, 1989). Farkında olmaksızın yapılan bu geleneksel uygulamalar engelleyici bir etkileşimin varlığını göstermiştir. Bilinen en eski mekanizmalardan biri olan engelleyici etkileşim (antibiyosis) ilk olarak 1877 yılında Louis Pasteur ve Robert Koch tarafından havadaki basillerin, *Bacillus anthracis*'in büyümesini engellediğini görmeleri ile tanımlanmıştır (Landsberg, 1949). Pasteur ve Koch döneminde yapılan bu bilimsel tanılar, önemli bir ihtiyaç haline gelen, çevredeki zararlı mikroorganizmaların kontrol altına alınabileceği gerçeğini ortaya çıkarmıştır (Chen ve Hoover, 2003). Bilim dünyasında büyük ses getiren bu olaydan sonra, bu konuda bir çok çalışma yapılmış ancak özellikle 1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfi tıp alanında bir çığır açmıştır. Penisilinin keşfi ile belirli bir hastalığa neden olan mikroorganizmalarla mücadele etmenin ancak tedavi edici antimikrobiyal maddelerin kullanımı ile başarılabileceği gerçeği ortaya çıkarılmış ve bu buluş Alexander Fleming'e 1945 yılında nobel tıp ödülünü kazandırmıştır. Antibiyotik terimi ise ilk olarak 1942 yılında Waksman tarafından, mikroorganizmaları öldüren ya da gelişimini engelleyen, farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen maddeler olarak tanımlanmış ve bu tanımdan yola çıkarak penisilin dünyanın bilinen ilk antibiyotiği olarak literatürdeki yerini almıştır. Antibiyotikler hem var olan bir enfeksiyonun tedavisinde hem de gelişebilecek enfeksiyonun önlenmesinde kullanılan moleküllerdir (Sayek, 1997). İnsanlığın hastalıklardan kurtuluşunda mucizevi bir anahtar olan antibiyotikler sadece insanların tedavisinde değil tarım ve hayvancılık alanlarında da kullanılmaktadır. Özellikle bitkilerin funguslardan korunması amacıyla antibiyotikler fazlaca kullanılmaktadır (Lancini ve Lorenzetti, 1993). Hayvancılık alanında ise besin üretimi içerisinde, özellikle et üretiminde antibiyotik kullanımı yaygınlaşmıştır (Wegener, 1999; Fey vd., 2000).

Yukarıda da belirtildiği gibi 1928 yılında penisilin tanınması ve sonrasında büyük ölçekli antibiyotiklerin üretimi insan sağlığı açısından büyük bir devrim niteliği taşımaktadır (Bennett ve Chung, 2001). Bazen zayıflatıcı ve bazen de ölümcül düzeydeki bulaşıcı hastalıklara karşı bireylerin tedavisi için antibiyotikler, tıbbi bir mucize özelliğine sahip moleküller olarak kabul görmüşlerdir. Örneğin, gelişmiş sanitasyon ve aşı ile birlikte antibiyotik tedavisinin kullanımı, Amerika Birleşik Devletlerinde çocukluk pnömoni mortalite oranlarını, 1939'dan 1996'ya kadar geçen 58 yıllık süre içinde %97 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Dowell vd., 2000).

İlk dönemlerde, piyasada güçlü ve etkili ilaçların mevcut olması yeni bileşiklerin keşfine ihtiyacın olmadığı durumunu ortaya çıkarmış ve ilaç şirketlerinin yeni antimikrobiklerin geliştirilmesi amacıyla yürüttükleri programların durmasına yol açmıştır (Knowles, 1997). Bu süreci izleyen dönemlerde antimikrobiyal maddelerin geniş ölçekli kullanımı sonucunda bu maddelere karşı bakteriyel dirençlerin geliştiği gözlenmiştir (Levin vd., 1998). O zamandan beri, direnç seviyeleri noktası, dramatik bir şekilde yükselmeye devam etmiştir. 2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından antibiyotiklerin kullanımı sonucunda çoklu direnç mekanizması geliştiren patojenlerin yüksek düzeyde olduğu belirtilmiş ve bulaşıcı hastalıklar gibi tedavi edilemez hale gelebilir bir sürece girildiğinin uyarıları verilmiştir (WHO, 2000). İlk başta antibiyotik direncinin, antibiyotik kullanımının en yoğun olduğu, hastanede yatan tüm hastaların yaklaşık üçte birinin gereksiz ya da yanlış seçilmiş antibiyotik kullandığı, hastane ortamlarında sınırlı olduğu düşünülmüş ancak bu durum beklenildiğinin tam aksi yönde seyretmiştir (Gaynes, 1997; Van Houten vd., 1998).

Antibiyotik kullanımının daha büyük bir sorun haline gelmesinde, özel bir güven duyulan geniş spektrumlu antibiyotiklerin büyük bir katkısı olmuştur ve bu tür antibiyotiklerin çoklu dirence sahip patojenlerin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasına öncülük ettiği tespit edilmiştir (Solomon vd., 2001; Wester vd., 2002). Antibiyotik direncini arttıran bir diğer tehdit de tarım ve gıda üretimi alanında da antibiyotiklerin kullanımının hızla artmasıdır. Tarım endüstrisinde, bitki hastalıklarının kontrolünde antibiyotiklerin, profilaktik ajanların ve büyüme düzenleyicilerinin kullanımı, hayvanlarda (Van den Bogaard vd., 1999; Barton vd., 2001) ve bitkilerde (McManus vd., 2002) dirençli patojenik bakterilerin ortaya çıkmasının en önemli sebeplerinden biri olduğu bulunmuştur. Bunların yanısıra ilginç bir şekilde, klinik ya da tarımsal anlamda yeniliklerin yapılmadığı

(uygulamaların olmadığı) alanlarda yaşayan hayvanlardan izole edilen bakterilerde de yüksek seviyelerde antibiyotik dirençliliği olduğu belirlenmiştir (Sherley vd., 2000).

Büyük olasılıkla ilerleyen dönemlerde çoklu dirence sahip bakterilerin tedavisinde günümüzde geniş faydaları olan mevcut antibiyotiklerin kullanımı yeterli olmayacaktır. Son yıllarda alarm veren bu endişe verici sorunun çözümü için çalışmalar sürmekte ancak var olan antibiyotikler bu sorunların çözümü için yeterli gelmemektedir. Bu durumu düzeltmek amacıyla acilen hem yeni hem de farklı etki mekanizmasına sahip antibiyotiklerin tanımlanması hem de alternatif antimikrobiyal ajanların tespit edilmesi gerekmektedir. Günümüzde bakteriyofajlar (Alisky vd., 1998), probiyotik bakteriler (Verschuere vd., 2000; Macfarlane, 2002), antimikrobiyal peptitler (Joerger, 2003; Papagianni, 2003) ve bakteriyosinler (Pag ve Sahl, 2002; Twomey vd., 2002) gibi çok sayıda alternatif antimikrobiyal ajanlar kabul edilmektedir. Araştırmacılar bu gibi antimikrobiyal öncülerinden optimum oranda faydalanabilmek amacıyla üzerlerinde sık sık kimyasal değişimler ya da gen mühendisliği (genetik modifikasyonlar) uygulamaları (Papagianni, 2003; Lien ve Lowman, 2003) yapmaktadırlar.

Yukarıda belirtilen antibiyotiklere alternatif olarak değerlendirilen ve antimikrobiyal ajanlar içerisinde yer alan kuvvetli toksinler olan bakteriyosinler en önde gelen grubu temsil etmektedir. Bu potansiyel antimikrobiyal ajanlar (bakteriyosinler), güçlü fakat dar inhibitör spektrumları (öldürme faaliyeti), kararlılıkları ve insanlara olan düşük toksisiteleri gibi ilgi çekici özellikleri dolayısı ile artan bir ilgi almış ve bu moleküllerle yapılan çalışmalar büyük hız kazanmıştır. Günümüzde yeni bakteriyosinlerin tespiti ve karakterizasyonu yanında, klinik ve tarım alanında kullanım imkanlarını arttırmak amaçlı var olan bakteriyosinlere yapılan genetik girişimler de önem taşımaktadır.

1.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Bakteriyosinler, ilk olarak 1925 yılında Gratia tarafından *Escherichia coli*'nin ürettiği antimikrobiyal proteinin tespit edilmesi ile keşfedilmiş ve bu molekül kolisin olarak isimlendirilmiştir (Gratia, 1925). Bakteriyosin tanımı ise ilk kez Jakob ve arkadaşları tarafından 1953 yılında yapılmıştır. Bu tanım sadece farklı türler arası antagonistik ilişkileri ve kolisinleri kapsamaktayken, daha sonra yapılan çalışmalarla buna benzer birçok maddenin bulunması sonucu terimin kapsamı da genişletilmiştir (Eckner, 1992). Bu antibiyotik özellikli moleküllerin insanlarda istenmeyen alerjik reaksiyonlara

sebeplere olabilmek terapötik antibiyotikler ile karıştırılmasına engel olmak ve endişeleri ortadan kaldırmak için özellikle antibiyotik olarak adlandırılmamıştır (Cleveland vd., 2001).

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal etkiye sahip, protein ya da proteinlerle birlikte bazı yan gruplar da içerebilen antibiyotik özellikli metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Tagg vd., 1976; Klaenhammer, 1993; Jack vd., 1995; Cleveland vd., 2001). Bu tanımdan hareketle birçok kaynakta bakteriyosinler ile antibiyotikler karıştırılmaktadır. Ancak bakteriyosinler ile antibiyotikler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Bunlar;

- i. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken, antibiyotikler ribozomal olarak sentezlenmezler (ribozom dışı peptid sentetazlar, NRPS) ile sentezlenirler) ve aktif formlarını enzimatik işlemler sonucu kazanırlar.
- ii. Bakteriyosinler, antibiyotiklere göre çok daha dar bir etki spektrumuna sahiptirler ve özellikle üretici suşa yakın akraba türlere karşı etkilidirler. Antibiyotikler ise birbirinden farklı birçok türe karşı etkilidir.
- iii. Her bakteriyosinin kendi bağışıklık proteini vardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik determinantlar ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
- iv. Bakteriyosinler genellikle bakterinin logaritmik gelişme fazında üretilen birincil metabolit kinetiğine sahip ikincil metabolitlerdir. Antibiyotikler ise, gelişimin durağan fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes vd., 2002).

Üretici suş tarafından bir ya da daha fazla sayıda sentezlenen bu antimikrobiyal bileşikler, üretici suşa üstün bir nitelik kazandırır. Şöyle ki; bir mikroorganizma ekolojik nişinde diğer organizmaları elimine eder ise büyüme ve hayatta kalma açısından büyük bir fırsat yakalamış olacaktır. Bahsedilen bu fırsatı bakteriyosin, üretici mikroorganizmaya sağlamaktadır (Chen ve Hoover, 2003). Başta *Lactobacillus* ve *Lactococcus* olmak üzere *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilere ait pek çok tür bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptirler (Gorris, 1994).

Günümüzde bakteri ve arkaea'ların önemli soyları tarafından üretilen moleküllerin içinde bulunduğu büyük ve işlevsel toksin (bakteriyosin) aileleri bulunmaktadır (Riley ve Wertz, 2002). Bu gruplara dahil olan moleküllerin ortak bazı özellikleri taşımaları

gerekmektedir. Bir molekülün bakteriyosin olarak değerlendirilmesi için ribozomal olarak sentezlenmesi, protein doğasında olması ve üretici bakteri ile yakın akraba türlere karşı inhibitör aktivitesine sahip olması gerekmektedir.

Bakteriyosin kodlayan genler kromozomal ya da plazmit kökenli olabilmektedir. Bakteriyosinler inhibisyon aktivitesini, sitoplazmik membranda por oluşturma, hücre duvarını tahrip etme ve nükleaz aktivitesi gibi farklı mekanizmalarla gerçekleştirmektedir (Braun vd., 1994; Smarda ve Smajs, 1998).

Fizikokimyasal özellikleri ve inhibisyon aktiviteleri esas alınarak sınıflandırılan ve her geçen gün yeni üyelerin ilave edildiği bakteriyosinler içerisinde, gıda katkısı olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin'dir (Zendo vd., 2003). Nisin ilk kez İngiltere'de bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve krem peynirlerde kullanımına izin verilmiştir. 40 yılı aşkın bir süredir bilinen nisin bugün 50'yi aşkın ülkede sağlık açısından güvenli bir gıda koruyucusu olarak kabul edilmiş ve birçok gıda çeşidinde kullanılmıştır (Ross vd., 2002; Delves-Broughton, 2005). Nisin, özellikle peynir, sıvı yumurta ürünleri, konserve gıdalar, çeşitli pastörize süt ürünleri gibi ürünlerin mikrobiyal kontaminantlardan korunması amacıyla kullanılmaktadır. Kullanımı ve onaylanması mümkün birçok bakteriyosinin karakterize edilmesi ve geliştirilmesine rağmen, nisin en çok ticari öneme sahip bakteriyosin olmaya halen devam etmektedir (Chikindas ve Montville, 2002).

Son yıllarda bakteriyosinlerin yoğun bir şekilde araştırılmasındaki en önemli sebeplerden biri de, insan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etki içermeyen, ancak hastalık etmeni olan mikroorganizmalara karşı güçlü bir koruma sağlayan en önemli bileşiklerden biri olmasıdır. Bakteriyosinler, insan sindirim sisteminde proteazlar tarafından hızlı bir şekilde sindirilebilen bakterisidal aktiviteye sahip polipeptidlerdir (Joerger vd., 2000). Bundan dolayı vücutta absorbe edilmezler ve kalın bağırsak florasına ulaşamazlar. Doğal kaynaklı olmaları, insan ve hayvan bağırsak sisteminde kolayca parçalanmaları ve korunacak gıdaların fizikokimyasal yapılarında herhangi bir değişime neden olmaksızın, bozulma ve hastalık etmeni bakterileri inhibe etme özellikleri ile bakteriyosinler son yıllarda üzerinde çok fazla çalışılan bir konu haline gelmiştir (Geinsen vd., 1992; Howard vd., 1993). Bakteriyosin üreten suşların doğrudan ya da dolaylı bir şekilde gıda endüstrisi, tıp alanı ve ziraat alanında kullanımının artması, bakteriyosin üretme yeteneği yüksek ya da konakçı spektrumu geniş yeni bakteriyosin üreticilerinin tanımlanması ile mümkün olacaktır.

1.3. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılmaları

Tüm dünyada yürütülen yoğun çalışmalar sonucunda bakteriyosinlerin sayı ve türünün hızla artması, bu moleküllerin genel bir sınıflandırılmaya tabi tutulmasını gerektirmiştir. Bakteriyosinlerin tanımlanmasından bu yana bir çok sınıflandırılma yapılmış (Fredericq, 1957; Reeves, 1965; Bradley, 1967), bunlar arasında Klaenhammer (1993) tarafından yapılan sınıflandırma kabul görmüştür. Bu sınıflandırılma da bakteriyosinlerin üretimindeki hakim konumlarından dolayı *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin özellikleri temel olarak alınmıştır. Klaenhammer (1993) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler; molekül ağırlıkları, ısıl kararlılıkları, enzim hassasiyetleri, etki mekanizmaları ve içerdikleri modifiye amino asitleri gibi ortak özelliklerine göre 4 ana grup altında toplanmıştır (Tablo 4).

Sınıf I bakteriyosinler: Bu sınıfın üyeleri, yapılarında lantiyonin ve β -metillantiyonin gibi translasyon sonrası modifiye olan ve ender rastlanan amino asitler bulunduran lantibiyotiklerdir (Guder vd., 2000). Sınıf I bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 1.9 kDa ile 4.6 kDa arasında değişmektedir (Oscariz ve Pisabarro, 2001). Bu gruptaki bakteriyosinler kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre Ia (elongated) ve Ib (globular) lantibiyotikleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sınıf Ia grubundaki bakteriyosinler net pozitif yüke sahip ve hidrofobik polipeptid yapısındadırlar. Membran aktif peptidler olup, bakteri zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Sınıf Ib'deki bakteriyosinlere kıyasla daha esnek bir yapıya sahiptirler (Twomey vd., 2002; Chen ve Hoover, 2003). Ortalama büyüklükleri 21-38 amino asittir. Bu grubun en bilinen üyesi nisin'dir (Guder vd., 2000). Sınıf Ib grubundaki bakteriyosinler yüksüz veya negatif yüklü olup, globular peptid yapısındadırlar. Özel enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey vd., 2002). Sınıf Ib lantibiyotikler, sınıf Ia lantibiyotiklerden oldukça küçüktür. Büyüklükleri 19 amino asiti aşmamaktadır (Guder vd., 2000; Akkoç vd., 2009).

Sınıf II bakteriyosinler: Lantiyonin içermeyen, 10 kDa'dan küçük, genelde ısıya kararlı ve translasyon sonrasında değişmeyen bakteriyosinleri içeren oldukça geniş bir gruptur. Sınıf II bakteriyosinler, IIa ve IIb olmak üzere iki alt grup altında toplanmaktadır (Ennahar vd., 2000). Sınıf IIa grubundaki bakteriyosinler özellikle *Listeria*'ya karşı aktif olup, yapılarında bulunan peptid N-terminal dizisi sonunda Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys

amino asitlerini taşımaktadır (Chen ve Hoover, 2003). IIa alt grubuna dahil bakteriyosinlerin ve dolayısı ile bu bakteriyosinlerin üreticisi olan bakterilerin *Listeria* türlerine karşı gösterdikleri yüksek antibakteriyel etki, biyokoruyucu olarak kullanımlarını esas alan çalışmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Bu gruba dahil olan bakteriyosinlere örnek olarak pediosin AcH (Bhunja, 1987), sakasin A (Schillinger ve Lucke, 1989) ve lökosin A verilebilmektedir (Hastings, 1991). Sınıf IIb grubundaki bakteriyosinler primer yapıları birbirinden farklı iki bileşenli (iki peptitli) bakteriyosinleri içerirler. Aynı ayrı aktivite gösterebildikleri gibi, etkin bir şekilde aktif hale gelebilmeleri için her ikisinin de aktif olması gerekmektedir. Bu grupta bulunan bakteriyosinlerin en önemli özelliği, tam aktivite gösterebilmeleri için her iki peptite de ihtiyaç duymalarıdır (Nes vd., 2002). Bu peptitler, tek tek oldukça zayıf inhibisyon aktivitesi gösterirken, aynı ortamda olduklarında sinerjistik etkileşim sonucu çok daha aktif moleküller haline gelmektedir (Ramnath vd., 2004). İki polipeptidin aktif hale gelmesiyle, hücre membranında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Hécharde ve Sahl, 2002). Örnek olarak *Lactococcus lactis*'den elde edilen iki peptidli bir bakteriyosin olan Laktokokkin G verilebilir (Moll vd., 1998). Sınıf IIc grubundaki bakteriyosinler ise salgı sinyallerine bağlı olarak üretilen peptitler olan sınıf IIc bakteriyosinlerdir (Guder vd., 2000). Sınıf II'deki bakteriyosinlerin özelliklerini gösteren, sınıf IIa ve IIb dışındaki diğer bakteriyosinlerdir. Bu gruptakilerin birçoğu sistein amino asit rezidüsü içermekte ve bu bakteriyosinlere tiyolbiotik'ler veya sistibiotik'ler denilmektedir. Tiyol-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteleri için indirgenmiş sistein rezidüsüne ihtiyaç duyarlar (De Martinis vd., 2002).

Sınıf III bakteriyosinler: Yüksek moleküler ağırlığa sahip (>30 kDa) ve ısıya duyarlı proteinlerden oluşmaktadır. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Bu grubun en bilinen üyeleri helvetisin J, laktisin A, laktisin B, helvetisin V-1829 ve enterolisin A'dır. Sınıf III üyesi bakteriyosinlerin çoğu ısıya duyarlı proteinler olmasına rağmen, helvetisin J gibi ısıya kararlı üyeleri de bulunmaktadır (Trotter vd., 2004). Ancak bu gruptaki bakteriyosinler henüz yeterince tanımlanamamışlardır.

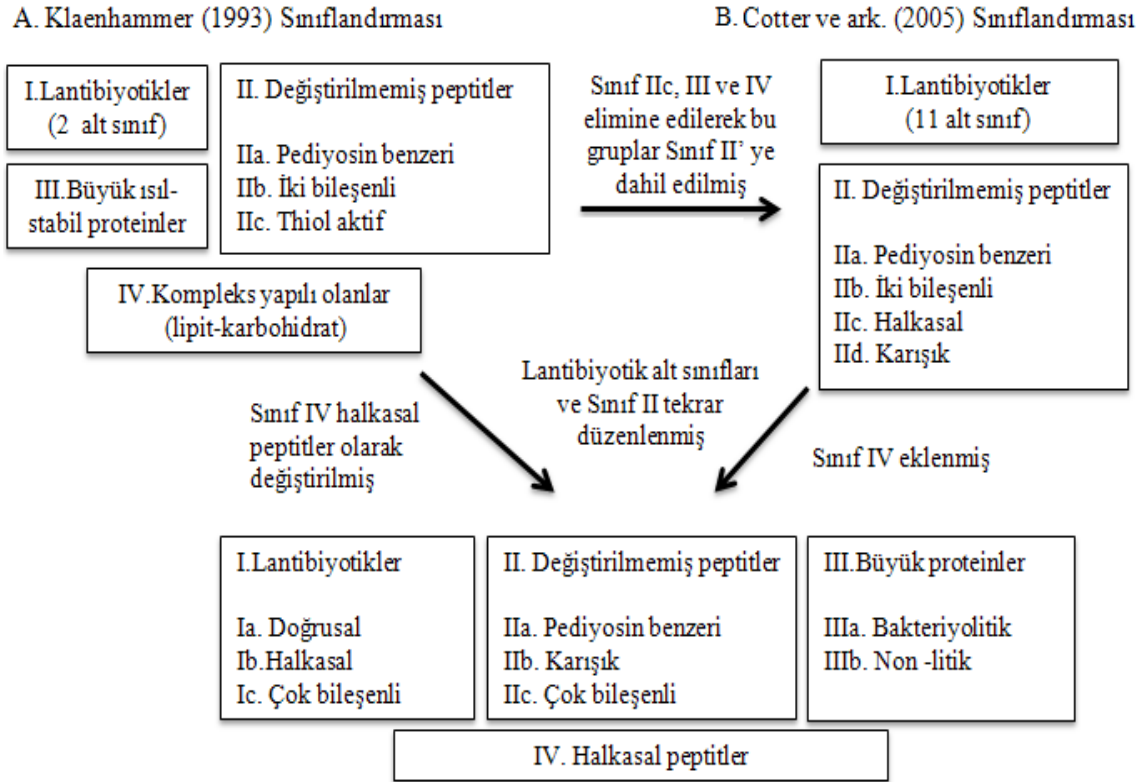
Sınıf IV bakteriyosinler: Dördüncü grup altında sınıflandırılan bakteriyosinler ise büyük ve kompleks moleküller olup, aktiviteleri için karbonhidrat veya lipid bileşenlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Bu bakteriyosinler hakkında yeterli bilgi literatürde yer almamaktadır ve biyokimyasal olarak henüz yeterince tanımlanamamışlardır. Aydınlatılabilmeleri için birçok bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (McAuliffe vd., 2001).

Bu sınıflar içerisinde sınıf II, III ve IV bakteriyosinlerinin kullanım alanları kısıtlı iken sınıf I lantibiyotik grubu bakteriyosinler birçok alanda kullanım potansiyeline sahiptirler (Tablo 1).

Tablo 1. Bakteriyosin sınıfları ve bazı örnekler (Chen ve Hoover, 2003).

Sınıf	Örnek	Üretici	Kaynak
Sınıf I			
Sınıf Ia	Nisin	<i>L. lactis</i>	Hurst, 1981
	Lactocin S	<i>L. sake</i>	Mortvedt vd., 1991
Sınıf Ib	Mersacidin	<i>B. subtilis</i>	Altena vd., 2000
	Cinnamycin	<i>S. cinnamoneus</i>	Sahl ve Bierbaum, 1998
Sınıf II			
Sınıf IIa	Sakacin P	<i>L. sake</i>	Tichaczek vd., 1992
	Enterocin A	<i>E. faecium</i>	Aymerich vd., 1996
Sınıf IIb	Lactacin F	<i>L. johnsonii</i>	Allison vd., 1994
	Plantaricin S	<i>L. plantarum</i>	Jimenez-Diaz vd., 1995
Sınıf IIc	Acidocin B	<i>L. acidophilus</i>	Leer vd., 1995
	Enterocin B	<i>E. faecium</i>	Nes ve Holo, 2000
Sınıf III			
Sınıf III	Helveticin J	<i>L. helveticus</i>	Joerger ve Klaenhammer, 1986; Vaughan vd., 1992
	Helveticin V-1829	<i>L. helveticus</i>	
Sınıf IV			
Sınıf IV	Reuterin 6	<i>L. reuteri</i>	Kawai vd., 2004
	Enterocin AS-48	<i>E. faecalis</i>	Maqueda vd., 2004

Her geçen gün yeni bakteriyosinlerin keşfedilmesi farklı özelliklere sahip bakteriyosinlerin tanımlanmasının ardından Cotter ve arkadaşları tarafından 2005 yılında var olan sınıflandırılma üzerinde bilinen özellikleri değiştirilmeksizin bir takım değişiklikler yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre, Sınıf I lantionin içeren lantibiyotik grubu bakteriyosinleri, Sınıf II ise lantionin içermeyen bakteriyosinleri kapsamaktadır. Önceki sınıflandırma sisteminde Sınıf III olarak bilinen, büyük, ısıya dayanıksız bakteriyosinler ise bakteriyolizinler olarak sınıflandırılmıştır. Klaenhammer'in sınıflandırmasında IV. sınıfta yer alan, aktivite için peptid olmayan bir kısma ihtiyaç duyan bakteriyosinler ile ilgili bilgilerin kısıtlı olması önerilen yeni sınıflandırmaya dahil edilmemesine sebep olmuştur (Cotter vd., 2005). Ardından yapılan iki farklı sınıflandırılma birlikte tam olarak değerlendirilerek son olarak Şekil 1'de görülen sınıflandırılma elde edilmiştir (Cotter vd., 2006).



Şekil 1. Bakteriyosinlerin güncel evrensel sınıflandırma şeması (Cotter vd., 2006).

Farklı özelliklere sahip moleküllerin hızla literatürdeki yerini alması sonucunda bu gibi yeni sınıflandırılmalarında gündeme geleceği ve hali hazırda böylesi sınıflandırılmaların da var olduğu unutulmamalıdır.

Bacillus cinsleri tarafından üretilen bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri moleküller BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances) değerlendirildiklerinde, *Bacillus* cinsine ait bakterilerin Laktik Asit Bakterileri (LAB)'den sonra ikinci en önemli bakteriyosin üreticileri oldukları belirlenmiştir (Abrioue vd., 2011). *Bacillus* cinsleri tarafından üretilen moleküllerin uygulama alanları ve sayıları her geçen gün hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, LAB dikkate alınarak Klaenhammer (1993) ve Cotter ve arkadaşları (2006) tarafından hazırlanan şekil 1'de bahsedilen evrensel sınıflandırmaların dışında *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen moleküller dikkate alınarak bir benzer sınıflandırılma daha yapılmıştır. *Bacillus* ve LAB tarafından üretilen moleküllerin benzer özelliklere sahip olması bakımından Tablo 2'de görüldüğü gibi sınıflandırılmaları da oldukça benzer şekilde yapılmıştır (Abrioue vd., 2011).

Tablo 2. *Bacillus* bakteriyosinleri için önerilen sınıflandırılma (Abrioue vd., 2011).

Sınıf	Özellik	Örnek
Sınıf I.	Translasyon sonrası modifiye peptitler	
Altsınıf I.1.	Tek peptit içerikli lantibiyotikler	Subtilin, Ericin S, Ericin A
Altsınıf I.2.	Diğer tek peptit içerikli lantibiyotikler	Sublancin 168, Mersacidin, Paenibacillin
Altsınıf I.3.	İki peptit içerikli lantibiyotikler	Haloduracin, Lichenicidin
Altsınıf I.4.	Diğer translasyon sonrası modifiye peptit içeren moleküller	Subtilosin A
Sınıf II.	Modifiye olmamış peptitler	
Altsınıf II.1.	Pediocin-benzeri peptitler	Coagulin, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580
Altsınıf II.2.	Thuricin benzeri peptitler	Thurincin H, Thuricin S, Thuricin 17, Bacthuricin F4, Cerein MRX1
Altsınıf II.3.	Diğer linear peptitler	Cerein 7A, Cerein 7B, Lichenin, Thuricin 439
Sınıf III.	Büyük proteinler	Megacin A-216, Megacin A 19213

Gram (-) bakterilerin ürettiği bakteriyosinler ise başlı başına ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedir. Gram (-) bakterilerin bakteriyosinleri, Gram (+) bakterilerin bakteriyosinleri ile molekül büyüklüğü açısından karşılaştırıldığında birçoğunun daha büyük olduğu bilinmektedir. Gram (-) ve Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler arasında iki temel farklılık bulunmaktadır. Bunlar; Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin; (i) genellikle hücre parçalama yoluyla serbest kalması, (ii) SOS regülasyonu gibi ana düzenleyici yollar ile regüle edilmesidir (Riley ve Wertz, 2002). Bir çok enterik bakterinin bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Son yapılan çalışmalarda çevresel enterik izolatlardan *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumonia* ve *Enterobacter cloacae* bakterilerinin %3-26 oranlarında bakteriyosin ürettikleri ortaya çıkarılmıştır (Riley vd., 2003). *E. coli* suşlarının %15-50 oranında, en çok çalışılan bakteriyosin grubu olan kolisinlerden bir veya daha fazlasını üretebildiği belirlenmiştir (Riley ve Gordon, 1992). Moleküler çalışmalar, enterik bakteriyosinlerin yeni tanımlanmış reseptörleri kullanmasına ve dar inhibitör spektrumlarını sağlayan özgül translokasyon fonksiyonlarına rağmen diğer bakteriyosinlere benzer inhibitör (öldürme) aktivitelere sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır (Riley vd., 2001; Wertz ve Riley, 2004).

'Bakteriyosinogenisite', Gram (-) bakterilerin antimikrobiyal peptid (AMP)'lerin sentez ve salgılanma yeteneğini tanımlamak için kullanılan bir terimdir (Daeschel vd., 1990; Lopez-Meza vd., 2011). Bu moleküller ilk olarak *E. coli* bakterisinde tespit edilmiş ve kolisinler olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra, bu moleküllere benzer antimikrobiyal peptitlerin Gram (+) bakteriler tarafından da üretildiği tespit edilmiş ve bu moleküller daha büyük bir ilgi ile karşılanmıştır. Özellikle, gıda zehirlenmelerine sebep olan Gram (-) bakterilere karşı faaliyet göstermesi nedeniyle gıdaların muhafazasında kullanılabileceği düşünülen Gram (+) laktik asit bakterileri tarafından üretilen AMP'ler daha da büyük bir ilgi göremek çalışılmıştır (Hardy, 1975; Tagg vd., 1976). Her ne kadar bakteriyosinlerin keşfine Gram (-) bakteriler öncülük etmiş olsa da sonraki yıllarda yapılan çalışmalar Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Gram (+) bakteriler tarafından üretilen AMP'lerin kararlı yapıları ve özellikle üretici bakterinin doğaya ve insan sağlığına zararsız olması bakteriyosin çalışmalarının Gram (+) bakteriler üzerinde odaklanmasına sebep olmuştur. Öyle ki sınıflandırılmaları bile Gram (+) bakteriler dikkate alınarak yapılmış ve bir çok farklı molekülün tanımlanmasından dolayı bir çok farklı özellik taşıyan sınıflar oluşturulmuştur. Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler ise yalnızca bir sınıf olarak değerlendirilmiştir. Gram (-) bakteri grubunda *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen Pyosin ve *Escherichia coli* tarafından üretilen Kolisin V, en iyi çalışılan iki bakteriyosin olarak kalmıştır (Jack vd., 1995; Lopez-Meza vd., 2011).

Gram (-) bakteriler tarafından üretilen AMP'ler arasında farklılıklar olmasına rağmen, kolisin bu grup üyelerince üretilen AMP'lerin temsilcisi olarak bilinmektedir. Kolisinler 29 ve 90 kDa arasındaki proteinlerdir, bağlanmaları, taşınmaları ve özel aktivite alanları, pyosin bakteriyosinleri ile aynıdır. Kolisinlerin büyük moleküller olması sebebi ile salgılanmaları üretici hücrenin parçalanarak ölümü ile gerçekleşir (Sano vd., 1993; Riley ve Wertz, 2002). *P. aeruginosa* suşları tarafından sentezlenen pyosinler de yine kolisinler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerdir. Pyosinlerin, Myoviridae ailesinin bakteriyofaj kuyruklarına benzer, R, F ve G olmak üzere üç türü tanımlanmıştır. R Tip ve F tip pyosinler proteazlara duyarlı değilken S tipi proteazlara duyarlı bakteriyosinleri içermektedir (Michel-Briand ve Baysse, 2002; Waite ve Curtis, 2009).

E. coli ve enterobakteriler tarafından üretilen AMP'lerin diğer bir türü de mikrosinler olarak isimlendirilen dairesel peptidlerdir. *E. coli* AY25 tarafından üretilen mikrosin J25 bu grup için model alınmıştır (Craik vd., 2003). Mikrosinler gastrointestinal

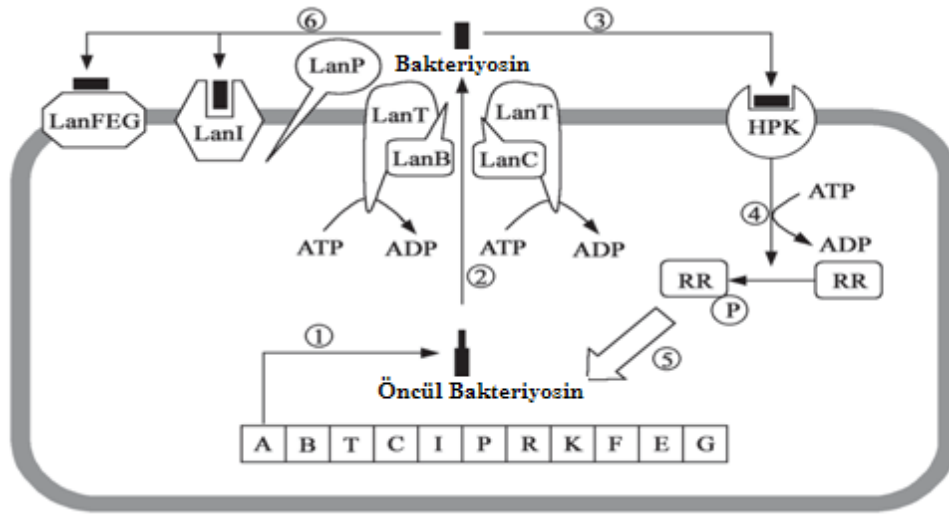
sistemin kolonizasyonunda bakteriler arasında oluşan rekabette önemli bir rol oynayan 10 kDa altında düşük molekül ağırlıklı moleküller. Aşırı pH değerlerine, proteazlara ve ısıya genel olarak kararlılık gösteren hidrofobik moleküllerdir (Duquesne vd., 2007).

1.4. Bakteriyosinlerin Sentezlenme Mekanizmaları

Bakterilerin, bakteriyosinleri veya benzeri maddeleri neden sentezledikleri ve nasıl kullanmaya başladıkları hakkında çalışmalar yapılmasına rağmen, henüz bu durum tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak, birçok bakteriyosinin üretim mekanizmaları, amino asit dizilişleri, etki mekanizmaları, üretici genlerin DNA dizilişleri belirlenmiş ve genel olarak bir çok ortak özelliklere sahip oldukları saptanmıştır. Ribozomal olarak sentezlenen bakteriyosinleri ve bağışıklanmalarını kodlayan genlerin operon kümelerinde organize oldukları bilinmektedir (Nes vd., 1996). Bakteriyosin gen kümeleri subtilin (Banerji ve Hansen, 1988) ve mersacidin (Altena vd., 2000) gibi kromozom üzerinde, devergicin A ve sakacin A gibi plazmitte ya da lacticin 481 (Dufour, 2000) gibi transpozonlar da lokalize olabilmektedir. Ancak genel olarak bakteriyosinlerin biyosentezinde temel süreçler aynıdır. Bu süreçler kısaca, polipeptit dizisinin RNA tarafından kodlanması, öncü protein olarak ayrılması, çeşitli modifikasyonlara uğrayarak sistein sayısına göre son şeklini kazanması ve sec-bağımlı mekanizma yardımıyla hücre dışına salgılanması şeklinde özetlenebilmektedir.

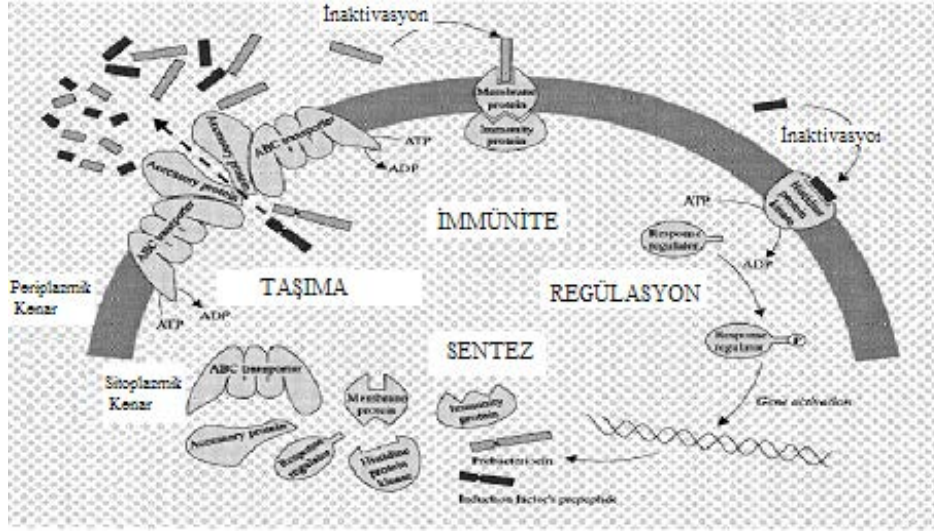
Keşfedildikleri günden bu yana sürekli yapıları, biyosentezleri, etki mekanizmaları gibi bir çok özelliklerinin aydınlatılması için bir çok çalışma yapılan subtilin ve nisin gibi daha birçok lantibiyotik grubu moleküllerin analizi ile bu genlerin işlevleri hakkında detaylı bilgilere ulaşılmıştır. Bu bilgiler diğer var olan bakteriyosinler için model olmuşlardır. Bu yüzden lantibiyotiklerin biyosentezini kavrayabilmek diğerlerinin biyosentezini anlamayı kolaylaştırmıştır. Lantibiyotiklerin biyosentetik genleri '*lan*' sembolü ile gösterilmektedir. Lantibiyotiklerin biyosentezinden sorumlu operonda genellikle, öncül peptit (Lan A), modifikasyon enzimi (Lan B, C / Lan M), lider peptidlerin taşınmasından sorumlu proteaz (Lan P), ABC (ATP'ye bağımlı kaset), taşıyıcı (Lan T), bağışıklık proteini (Lan FEG ve Lan I) ve düzenleyici proteinlerin (Lan R, Lan K) genleri yer almaktadır (Chen ve Hoover, 2003). Şekil 2'de görüldüğü gibi sırasıyla ilk olarak öncül bakteriyosin (inaktif form) sentezi gerçekleştirilir. Ardından öncül bakteriyosin Lan B ve Lan C ile modifiye (proteolitik kesim ve pentasiklik halkaların oluşumu gibi) edilir.

ABC taşıyıcı proteini Lan T tarafından olgun bakteriyosin salınımı gerçekleştirilir. Hücre dışında olgun bakteriyosin moleküllerinin birikimi kritik seviyeye ulaştığı zaman, hücre membranına bağlı kinaz fosforillenerek aktif hale geçer. Daha sonra bu fosforil grubu Lan R proteinine transfer edilir ve hücre içi yanıtı düzenleyici Lan R proteini, bağışıklık proteinleri olan Lan I ve Lan FEG genlerinin transkripsiyonunun başlamasını sağlar (Chandrapati ve O'Sullivan, 1999; Breukink vd., 2003). Böylece üretici mikroorganizma kendini ürettiği molekülün inhibisyon aktivitesinden korur.



Şekil 2. Sınıf I bakteriyosinlerin regülasyon ve biyosentezleri (Chen ve Hoover, 2003).

Yukarıda bahsedildiği gibi sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi de lantibiyotik (sınıf I) bakteriyosinlere benzemektedir. Aralarındaki tek farklılık sınıf II ve sınıf III bakteriyosinleri kimyasal modifikasyona uğramamakta ve bunun sonucu anormal aminoasitler içermemektirler. Şekil 3'te sınıf II ve sınıf III bakteriyosinlerin biyosentezi gösterilmektedir. Burada da görüldüğü gibi bakteriyosinlerin üç bileşenli regülatör sistemi tipik olarak histidin protein kinaz (HPK) enzimini, respons regülatörünü (RR) ve induksiyon faktörünü (IF) içermektedir. IF membranda bulunan HPK enzimini uyarır. Bunu takiben HPK enzimi sitoplazmada bulunan RR'yi fosforilleyerek bu uyarıyı hücreye iletir ve biyosentezin başlamasını sağlar (Montville ve Winskowski, 1997; Ennahar vd., 1999, 2000; İşleroğlu vd., 2005).



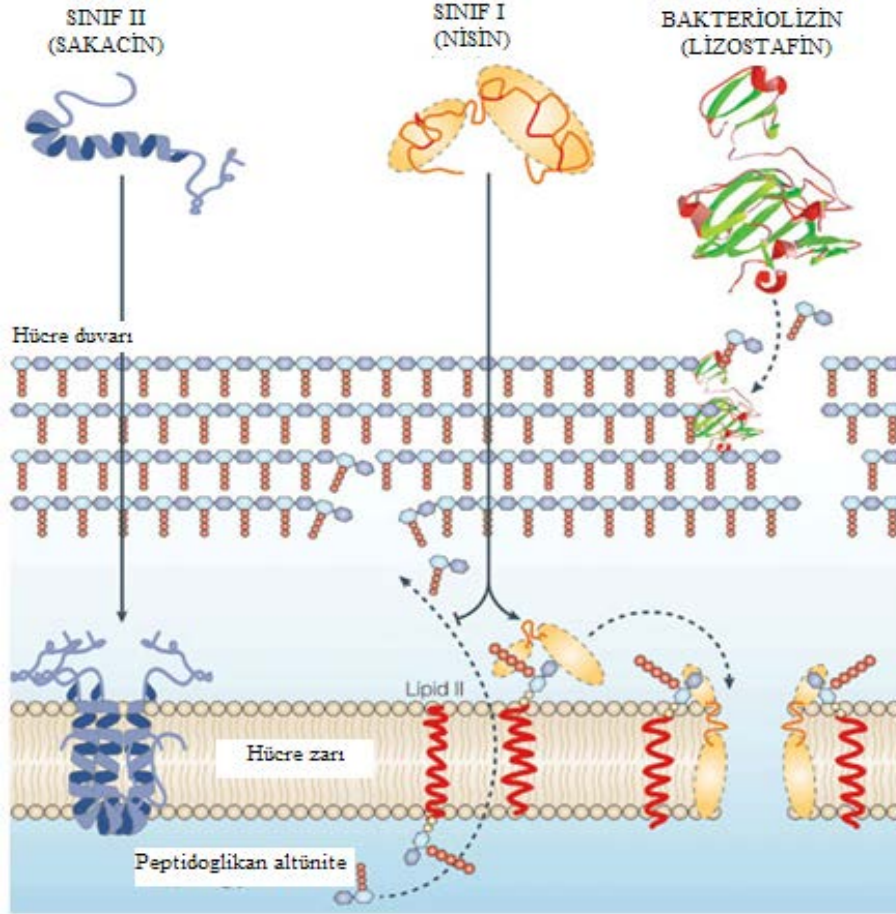
Şekil 3. Sınıf II ve Sınıf III bakteriyosinlerin regülasyon ve biyosentezleri (Asutay, 2007).

1.5. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları

Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Sitoplazmik zar da gözenekler oluşturarak, düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açarlar. Bununla birlikte, iyonların, özellikle de ATP'nin kaybı ve hücre içi pH dengesinin korunmasında etkili olan K^+ iyonunun hücre dışına sızması, hücrede enerji tüketimine neden olmaktadır. Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi olan makro moleküllerin yıkımına, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan üretimi gibi biyolojik işlemlerin inhibisyonuna yol açmaktadır (Twomey vd., 2002).

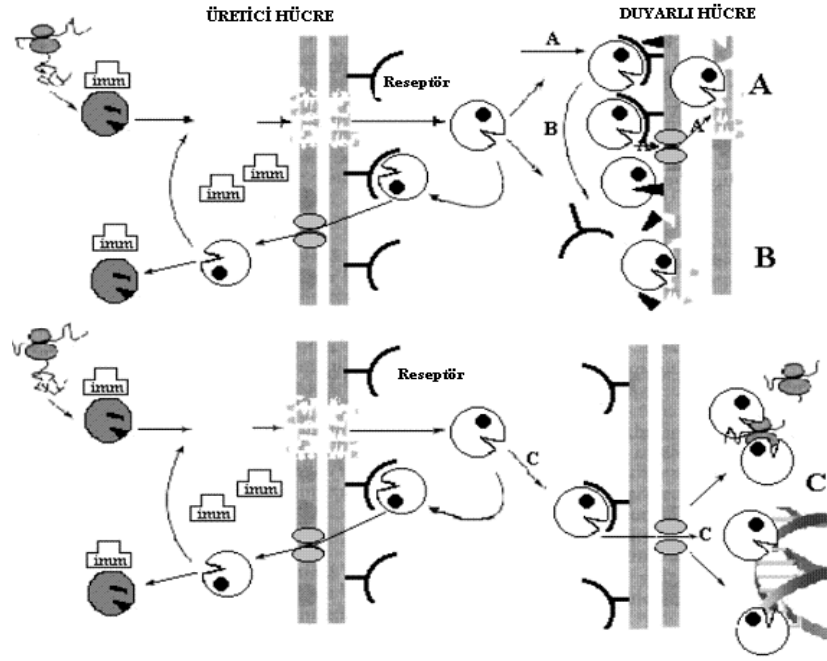
Cotter'ın 2005 yılında yapmış olduğu sınıflandırmayı dikkate alarak bu sınıflara dahil bakteriyosinlerin etki mekanizması şematize edilmiştir (Şekil 4). Buna göre Sınıf I bakteriyosinlerinin bazıları, peptidoglikan alt ünitelerini taşıyan esas molekül olan Lipid II'ye bağlanarak, sitoplazmadan hücre duvarına peptidoglikan alt üniteleri taşınmamasına bu sebeple hücre duvarı sentezinin doğru şekilde gerçekleşmemesine ve sonucunda da hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Bazılarının da, Lipid II'yi reseptör gibi kullanıp membrana bağlanma sonucunda por oluşumuna sebep olduğu, böylece, hızlı hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Yani Şekil 4'de görüldüğü gibi sınıf I (lantibiyotiklerin) bakteriyosinlerinin bir kısmı duyarlı hücre zarında por oluştururken bazıları da por oluşturmaksızın hücre ölümüne sebep olmaktadır. Sınıf II peptidler ise

amfifilik heliks yapıları sayesinde hedef hücrenin membranına yerleşerek depolarizasyona ve doğrudan hücre ölümüne neden olurlar. Büyük bakteriyolitik proteinler (bakteriyolizinler) ise doğrudan hedef hücrelerin hücre duvarına etki ederek, hücrelerin parçalanmasına ve ölümüne yol açmaktadırlar (Cotter vd., 2005; Başbülbul, 2009).



Şekil 4. LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki mekanizmaları (Cotter vd., 2005).

Gram (-) bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler için model teşkil eden, *E. coli* suşları tarafından sentezlenen, kolisinlerin etki mekanizması incelendiğinde Gram (+) bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinlere çok benzer özellikler taşıdıkları gözlenmektedir. Kolisinlerin membranda por oluşturarak ya da doğrudan peptidoglikan tabakaya zarar vererek duyarlı hücrelerin ölümüne sebep olduğu gözlenmektedir. Ve yine diğer bakterilerde olduğu gibi bağışıklıktan sorumlu proteinlerin salınımı ile ürettiği molekülün aktivitesinden kendini korumaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. *E. coli* suşları tarafından üretilen kolisinlerin etki mekanizması

1.6. Bakteriyosin Üretici Suşun Kendini Koruma Mekanizması

Üretici suşlar kendi membranlarını ürettikleri moleküllerin etkisinden korumak için çeşitli sistemler geliştirmişlerdir. I. grup bakteriyosinlerde üretici suş kendi ürettiği bakteriyosinden korunmak için iki sistem geliştirmiştir. Lan I ve Lan FEG bağışıklık proteinleri kullanılmaktadır, bu iki sistem sinerjik olarak çalışmaktadır. Lan I sitoplazmik membranın dışına bağlanarak, bakteriyosin tarafından meydana getirilecek gözenek oluşumunu engellemektedir. Lan FEG ise oluşturulan bakteriyosinlerin hücre dışına salınımından sorumludur. II. grup bakteriyosinler ise sitoplazmik membrana bağlanan bir protein ile bağışıklık sağlamaktadır (Chen ve Hoover, 2003).

1.7. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

1.7.1. Gıda Sanayisinde Kullanımı

Yiyecek ve içecek gibi ürünlerin depolanmasında antimikrobiyal bileşiklerin ilavesi geleneksel koruyucu bir araç haline gelmiştir. Bakteriyosinler, ticari gıda koruyucularının

büyük bir kısmını kapsayan bir alt grubu oluşturmaktadır (Chen ve Hoover, 2003). Üzerinde en çok çalışılmış bakteriyosinlerden biri olan nisin, FAO/WHO kuruluşu tarafından 1969 yılında gıda katkısı olarak kullanılmasına izin verilerek dünyada birçok ülkede güvenli ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Ayrıca birçok bakteriyosinin; süt ürünleri, et ürünleri, konserve ürünleri gibi birçok gıdanın yapım ve depolama aşamalarında gıda koruyucu olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Ryan vd., 2002). Bakteriyosinler birçok gıdada hastalık etmeni patojenlere karşı kullanılmaktadır (Tablo 3). Bunların yanısıra immobilize bakteriyosinlerin, gıdaların paketlenmesinde kullanılan gıda yüzeyine uygulanan filmlerde kullanılmasıdır. Protein yapısındaki biyofilmlerin polimer yapısına doğrudan katılarak elde edilen antimikrobiyal biyofilmler, temas ettikleri gıda yüzeyinde mikrobiyal gelişimi etkileyebilmektedir. (Mauriello vd., 2004; Ercolini vd., 2006). Ancak unutulmaması gereken bir nokta, doğru kullanılmadığı takdirde her yeni buluşta olduğu gibi bakteriyosinlerin kullanımında dejenerasyona uğramasıdır. Her ne kadar bakteriyosinlere karşı mikroorganizmaların direnç kazanması nadir ise de özellikle *L. monocytogenes*'in nisin ve pediosin gibi geleneksel bakteriyosinlere karşı toleransının arttığı bildirilmiştir (Rasch ve Knochel, 1998; Van Schaik vd., 1999).

Tablo 3. Bakteriyosinlerin gıda sanayisinde kullanımı

Bakteriyosin	Üretici	Kullanım Potansiyeli	Kaynak
Nisin	<i>L. lactis</i>	Risotto-tipi peynirlerde <i>L. monocytogenes</i> kontrolü	Davies vd., 1997
Sakacin P	<i>L. sake</i>	Somonlarda <i>L. monocytogenes</i> kontrolü	Katla vd., 2001
Nisin	<i>L. lactis</i>	Etlerde <i>Clostridium sporogenes</i> kontrolü	Rayman vd., 1981
Bacillocin 490	<i>B. licheniformis</i>	Gıdalardaki <i>Bacillus</i> spp. kontrolü	Martirani vd., 2002
Pediocin ACH	<i>P. acidilactici</i>	Sosislerde <i>L. monocytogenes</i> kontrolü	Degnan vd., 1992

1.7.2. Tıp ve Veterinerlik Alanında Kullanımı

Bakteriyosinlerin patojen olmayan bakteriler tarafından üretilmesi ve bu sebeple doğaya ve canlılara hiçbir zararı olmaması, tıp alanında antimikrobiyal ajan olarak kullanımını gündeme getirmiştir. Sonuç olarak tıp alanında bakteriyal kökenli hastalıkların

kontrol aşamasında bakteriyosinler kullanılmaya başlanmıştır (Riley ve Chavan, 2007). Bakteriyosinler özellikle klinik uygulamalarda geleneksel antibiyotiklere karşı artan bakteriyel direnç karşısında insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif antimikrobiyaller olarak değerlendirilmektedirler (Lawton vd., 2007). Bakteriyosinler tıp ve veterinerlik alanında hastalık etmeni patojenlere karşı kullanılmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Bakteriyosinlerin tıp ve veterinerlik alanında kullanımı (Gillor vd., 2005).

Bakteriyosin	Üretici	Kullanım Potansiyeli	Kaynak
Lantibiyotikler			
Ancovenin	<i>Streptomyces</i> spp.	Yüksek tansiyon tedavisi	Kido vd., 1983
Cinnamycin	<i>Streptomyces</i> spp.	İltahap ve alerji tedavisi	Marki vd., 1991
Epidermin	<i>S. epidermidis</i>	Deri enfeksiyon tedavisi	Allgaier vd., 1986
Lacticin 3147	<i>L. lactis</i>	Mastitis enfeksiyon tedavisi	Ryan vd., 1999
Lanthiopeptin	<i>S. cinnamoneum</i>	Herpes simplex virus tedavisi	Naruse vd., 1989
Mutacin	<i>S. mutans</i>	Diş çürükleri tedavisinde	Hillman, 2001
Kolisinler			
E1, E4, E7, E8, K ve S4	<i>E. coli</i>	Hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom tedavisi	Sable vd., 2000
Mikrosinler			
24	<i>E. coli</i>	Tavuk salmonelosis tedavisi	Wooley vd., 1999
B17	<i>E. coli</i>	Sığırlarda antibakteriyel ajan	Yorgey vd., 1994
E294	<i>K. pneumoniae</i>	Hücre proliferasyonu denetleme	Hetz vd., 2002
Pyosinler			
S-35	<i>P. aeruginosa</i>	Akciğer enfeksiyonları tedavisi	Nakayama vd.,2000

1.7.3. Tarım Alanında Kullanımı

Bakteriyosinler bitki patolojisinde önemli uygulamalara sahiptir. Bitki patojenleri bakteriyosinler ile kontrol edilebilmektedir (Vidaver vd., 1983). Literatürde bu gibi çalışmalara birçok örnek bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, *Bacillus licheniformis* P40'dan elde edilen bakteriyosinin patatesteki kök hastalığına sebep olan *Erwinia carotovora* bakterisine karşı inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda; bu bakteriyosinin hastalık sebebi bakteriyeye karşı güçlü bir inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (Cladera-Olivera vd., 2006). Bu tür çalışmalar bakteriyosinlerin mikrobiyal mücadele ajanı olarak kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir. Bakteriyosinler tarım alanında hastalık etmeni patojenlere karşı kullanılmaktadır (Tablo 5).

Tablo 5. Bakteriyosinlerin tarım alanında kullanımı (Gillor vd., 2005).

Bakteriyosin	Üretici	Kullanım Potansiyeli	Kaynak
Serracin-P	<i>S. plymthicum</i>	Ateş yanıklığı hastalığı tedavisi	Jabrane vd., 2002
Glycinicin	<i>X. campestris</i> pv. <i>glycines</i>	Siyah çürüklük, bakteriyel nokta, yaprak lekesi hastalıklarının tedavisi	Heu vd., 2001; Kim vd., 2001
Carotovoricin	<i>E. c.</i> subsp. <i>carotovora</i>	Yumuşak çürüklük hastalığı tedavisi	Beightonvd., 1982
	<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	Ateş yanıklığı hastalığı tedavisi	Sakthivel ve Mew, 1991
	<i>R. solanacearum</i>	Tütün solgunluk enfeksiyon tedavisi	Chen ve Echandi, 1984
	<i>P. syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i>	Zeytin düğümü hastalığı tedavisi	Chen ve Echandi, 1984

1.7.4. Diğer Alanlarda Kullanımı

Bakteriyosin üreten *Bacillus*'lar farklı çevresel uygulamalar için uygun olabilirler. Cereicidin üreten *B. cereus* S1 suşu ve diğer BLIS üreten bazı suşlar Brezilya'da bir yağ deposundan izole edilmiş (Korenblum vd., 2005) ve bunların SRB (sülfat indirgeyen bakteriler)'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bunların arasında, *B. firmus* H₂O-1 suşu tarafından üretilen aşırı ısı ve alkali pH'larda kararlı olarak kalabilen, küçük bir peptit olan BLIS'in petrol sondaj sırasında çevre koşullarına dayanıklı olabileceği düşünülmektedir. Bu BLIS'in, SRB'ye karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesi, petrol endüstrisinde bu gibi bakterilerle ilişkili problemleri kontrol etmek için biyosit olarak kullanım potansiyelini düşündürmüştür. Sonraki çalışmalarda H₂O-1 suşu tarafından üretilen BLIS'in SRB canlılığı ve bir SRB konsorsiyum biyofilminin oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir (Korenblum vd., 2008). Yazarlar, bu suş ya da ürettiği antimikrobiyal peptitin boru hattı temizleme teknolojilerinde biyofilm oluşumunu engellemek için kullanım potansiyeline sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bakteriyosinler birçok bakterinin spesifik işareti gibi epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Tora, 1995).

1.8. Amaç

Bakteriyosinler, herhangi bir bakteri tarafından sentezlenen ve bu bakteri ile aynı ortamı paylaşan diğer bakterilerin gelişimi üzerinde inhibisyon etkisi göstererek sentezlendiği bakteriye avantaj sağlayan protein yapılı moleküllerdir. Bakteriyosinlerin insanlığa ve çevreye zararsız bir molekül olması bilim dünyasında dikkatleri üzerine çekmiştir. Bu önemli moleküllerin, tıp alanında insan ve hayvanlarda hastalık etmeni olan patojenlerin inhibisyonunda, gıda sektöründe gıdalardaki istenmeyen mikroorganizmaların inhibisyonunda ve tarım alanında bitki patojeni bakterilerin inhibisyonunda kullanımı yoğun bir şekilde araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Özellikle çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip patojenlerin dramatik bir şekilde artışı ve birçok alanda bu dirençli patojenlerle yapılacak mücadelede çıkmazların yakın olduğu günümüz dünyasında en önemli alternatifler içerisinde değerlendirilen bakteriyosinlerin önemi daha da artmıştır. Bakteriyosinlerin keşfinden buyana geçen uzun zaman sürecinde birbirinden farklı özelliklere sahip birçok yeni molekül tanımlanmış ve her geçen gün hızla bu moleküllere yenileri eklenmiş olmasına rağmen bazı birçok bakteri grubu tarafından üretilen bakteriyosinler hakkındaki bilgiler kısıtlı kalmıştır.

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda başlıca amacım, gün geçtikçe kullanım alanları genişleyen böylesi önemli bakteriyosin moleküllerine en azından bir yenisini ekleyebilmek ve biyolojik mücadele alanında kullanım potansiyellerini belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda doktora tezinde;

- i. Karadeniz Bölgesinde yaygın olan Coleoptera grubu fındık zararlısı böceklerden izole edilen çeşitli bakterilerin bakteriyosin üretim kapasitelerinin belirlenmesi,
- ii. Tespit edilen bakteriyosinlerin saflaştırılması, biyokimyasal ve moleküler tanımlamalarının yapılması ve
- iii. Bu bakteriyosinlerin biyolojik mücadelede kullanım imkanlarının araştırılması, hedeflenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Test ve İndikatör Bakterilerin Temini

Çalışmada antimikrobiyal madde üretim potansiyelleri araştırılacak test bakterileri Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edildi. Bakteriler Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunan Coleoptera grubu fındık zararlılarından izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmıştır (Tablo 6).

Test bakterilerinin antimikrobiyal madde üretim kapasitesinin ve inhibisyon spektrumunun belirlenmesi amacıyla kullanılan indikatör *Bacillus thuringiensis* suşları Dr. Daniel R. Zeigler, (BGSC, Bacillus Genetic Stock Center)'den temin edildi (Tablo 7). Diğer indikatör bakteriler, ATCC (American Type Culture Collection)'den ve laboratuvar izolatu indikatör bakteriler Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN (Yeditepe Üniversitesi, İstanbul)'den temin edildi (Tablo 8).

2.2. Kullanılan Besiyerler ve Büyüme Koşulları

Tüm bakteriler rutin olarak %30 gliserol içerikli TSB (Triptik Soy Broth) ya da NB (Nutrient Broth) besi ortamlarında -80°C'de uzun vadede stoklandı. Deneyde kullanılacakları zaman öncelikle tek koloni düşecek şekilde TSA (Triptik Soy Agar) ya da NA (Nutrient Agar) besi ortamlarına çizgi ekimleri yapılarak +4°C'de kısa süreli muhafaza edildi. Rutinde kullanılan besi ortamlarının dışında, çalışmalar süresince BHIB (Brain Heart Infusion Broth), LBB (Luria-Bertani Broth) ve MHB (Muller Hilton Broth) ortamları kullanıldı. Test bakterileri ve indikatör bakteriler çalışmada kullanılmak üzere sıvı besiyerinde bakteri türüne göre 30-37 °C'de büyütüldü.

Tablo 6. Test bakterileri ve izole edildikleri fındık zararlısı böcekler

Zararlı Böcek	Test Bakterileri	Kaynak
<i>Anoplus roboris</i>	Ar1; <i>Bacillus circulans</i> Ar2; <i>Bacillus polymyxa</i> Ar3; <i>Enterobacter</i> sp. Ar4; <i>Bacillus sphaericus</i>	Demir vd., 2002
<i>Balaninus nucum</i>	Bn1; <i>Bacillus thuringiensis</i> Bn2; <i>Pseudomonas fluorescens</i> Bn3; <i>Micrococcus luteus</i> Bn5; <i>Escherichia coli</i>	Sezen ve Demirbağ, 1999
<i>Melolontha melolontha</i>	Mm1; <i>Pseudomonas</i> sp. Mm2; <i>Bacillus thuringiensis</i> Mm3; <i>Serratia marcescens</i> Mm4; <i>Enterobacter</i> sp. Mm5; <i>Bacillus sphaericus</i> Mm6; <i>Acinetobacter</i> sp. Mm7; <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Sezen vd., 2007
<i>Xyleborus dispar</i>	Xd1; <i>Pseudomonas fluorescens</i> Xd2; <i>Bacillus megaterium</i> Xd3; <i>Bacillus thuringiensis</i> Xd4; <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> Xd5; <i>Pantoea cedenensis</i>	Sezen vd., 2008
<i>Agelastica alni</i>	Aa1; <i>Enterobacter agglomerans</i> Aa2; <i>Listeria</i> sp. Aa3; <i>Pseudomonas chlororaphis</i> Aa4; <i>Pseudomonas flourescens</i>	Sezen vd., 2004
<i>Obera linearis</i>	O11; <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> O12; <i>Enterobacter aerogenes</i> O13; <i>Pseudomonas</i> sp. O14; <i>Flavobacterium</i> sp. O15; <i>Microbacterium</i> sp. O16; <i>Enterobacter agglomerans</i> O17; <i>Xanthomonas</i> sp. O18; <i>Pseudomonas syringae</i> O19; <i>Pseudomonas</i> sp. O110; <i>Xanthomonas</i> sp. O111; <i>Enterobacter cancerogenus</i> O112; <i>Xanthomonas maltophilia</i> O113; <i>Serratia marcescens</i>	Bahar ve Demirbağ, 2007

Tablo 7. İndikatör *Bacillus thuringiensis* suşları

Bakteriler	Kaynak
<i>B. t.</i> subsp. <i>galleriae</i> HD29	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>tolworthi</i> HD537	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>israelensis</i> HD567	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>thuringiensis</i> HD2	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>aizawai</i> HD133	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>tochigiensis</i> HD868	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>kurstaki</i> 3	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>entomocidus</i> HD9	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>canadensis</i> HD30	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>aizawai</i> HD137	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>kenyae</i> HD136	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>thompsoni</i> HD542	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>colmeri</i> IS720	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> HD146	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>morrisoni</i> HD12	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>Tenebrionis</i>	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>indiana</i> HD521	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> HD867	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>Kurstaki</i>	BGSC
<i>B. t.</i> subsp. <i>israelensis</i>	BGSC

BGSC, Department of Biochemistry, *Bacillus* Genetic Stock Center, University of Ohio, Cleveland, OH, USA.

Tablo 8. Farklı indikatör bakteriler

Bakteriler	Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC
<i>Bacillus cereus</i>	BGSC
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	ATCC
<i>Bacillus megaterium</i>	Lab. izolati
<i>Proteus mirabilis</i>	Lab. izolati
<i>Bacillus pumilis</i>	Lab. izolati
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Lab. izolati

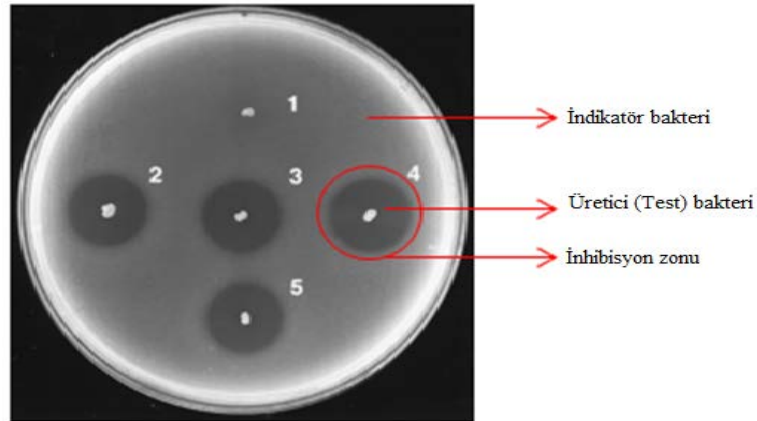
ATCC, American Type Culture Collection; BGSC, Department of Biochemistry, *Bacillus* Genetic Stock Center, University of Ohio, Cleveland, OH, USA;

2.3. İzolatların Bakteriyosin Üretme Potansiyellerinin Araştırılması

Coleoptera grubu fındık zararlısı böceklerden izole edilen test bakterilerinin (37 adet) bakteriyosin üretme kapasitesinin belirlenmesinde agar nokta ekim yöntemi ve kuyu difüzyon yöntemi kullanıldı.

2.3.1. Agar Nokta Ekim Yöntemi

Test bakterilerinin bakteriyosin üretme kapasitesinin belirlenmesi için ilk aşamada agar nokta ekim yöntemi kullanıldı (Paik vd., 1997). Bu çalışmada ilk olarak test bakterilerinin, TSA besi ortamına çizgi ekimi yapıldı ve 30°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde oluşan kolonilerden, steril kürdan aracılığı ile TSA ortamı içeren petrilere nokta ekimi yapıldı ve 30°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Aynı zamanda indikatör bakteriler de TSB besiyerinde uygun sıcaklıklarda 16-18 saat inkübe edildi. Bu indikatör bakterilerden 20'şer µL alınarak, 5 mL yumuşak agar (% 0.7 oranında agar içeren TSB) içerisine inoküle edildi. Bu şekilde hazırlanan yumuşak agar ortamı, nokta ekim sonrası gelişen kolonileri içeren TSA üzerine ikinci bir tabaka halinde homojen bir şekilde yayıldı. Ardından petrilere indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıklarda 16-18 saat inkübe edildi. Çalışmanın sonucunda, çevresinde inhibisyon zonu gözlenen bakteriler, antibakteriyal madde üretme yeteneğine sahip bakteriler olarak, yani agar nokta ekim yöntemi açısından pozitif bakteriler olarak, inhibisyon zonu gözlenmeyen bakteriler ise agar nokta ekim yöntemi açısından negatif bakteriler olarak tanımlandı (Şekil 6).



Şekil 6. Agar nokta ekim yöntemi (Chen vd., 1999).

2.3.2. Kuyu Difüzyon Yöntemi

Agar nokta ekim yöntemi ile yapılan tarama çalışmasının sonucu pozitif çıkan bakteriler tarafından üretilen molekülün aktivite spektrumunun belirlenmesi, karakterizasyonu ve sonraki çalışmalarda rutin olarak kullanılacak yöntemin zeminini hazırlamak amacıyla kuyu difüzyon yöntemi kullanıldı (Padilla vd., 1996). Bu yöntem aktif molekül içerikli süpernatantın eldesi ve elde edilen süpernatantın kuyu difüzyon yönteminde kullanılması şeklinde iki aşamadan oluşmaktadır (Şekil 7).

Birinci aşamada, nokta ekim yöntemi ile antimikrobiyal madde ürettikleri belirlenen test bakterinin ürettikleri moleküllerin kısmi şekilde saflaştırılması amacıyla, öncelikle seçilen test bakterileri 16-18 saat uygun besiyeri ve sıcaklık ortamında inkübe edildi. Ardından 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant 0.45 µm gözenekli membran filtre kullanılarak filtre edildi. Daha sonra aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

İkinci aşamada, indikatör bakterilerin gece kültürü yapıldı. 20 mL yumuşak agar (% 0.7 oranında agar içerikli broth) içerisine 10^7 hücre/mL (yaklaşık 50 µL) bakteri olacak şekilde indikatör bakteri eklendi ve petrilere bu karışım dökülerek donması beklendi. Steril pipet uçları kullanılarak açılan kuyulara 100 µL birinci aşamada anlatıldığı gibi hazırlanan, aktif molekül içerikli kültür süpernatantı eklendi. Petriler indikatör bakterilerin gelişimi için uygun sıcaklıkta 18 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda, test bakterilerinin indikatör bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelendi.



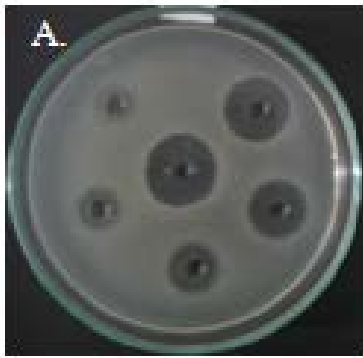
Şekil 7. Kuyu difüzyon yöntemi

2.4. İndikatör Bakteri Seçimi

İnhibisyon spektrumu belirleme çalışmalarının ardından, bakteriyosin üretiminin ölçülmesi, bakteriyosin aktivitesinde var olan değişimlerin tanımlanması, etki mekanizması ve tüm saflaştırılma aşamaları gibi molekülleri tanımlamak maksadı ile yapılan tüm çalışmalarda kullanılmak üzere, her bakteri için özel bir indikatör bakteri seçimi yapıldı. Bu seçim yapılırken bakterilerin ürettikleri maddelere duyarlılığı en yüksek olan indikatör bakteriler tercih edildi.

2.5. Bakteriyosinlerin Kantitatif Tayini

Bakteriyosin aktivitesinin kantitatif bir karşılığı olarak aktivite, AU (Arbitrary Unit) cinsinden hesaplandı. Bunun için bakteriyosin içerikli süpernatantların ve her saflaştırma aşamasında elde edilen bakteriyosin içerikli örneklerin steril saf su kullanılarak iki kat seri dilüsyonu yapıldı ve her bir seyreltiğin kuyu difüzyon metodu ile bakteriyosin etkinlik düzeyi araştırıldı. Bakteriyosinin AU cinsinden değeri Şekil 8'de gösterildiği gibi, iki kat seri dilüsyon sonrası aktivite gösteren en yüksek dilüsyon oranının kuyuya eklenen bakteriyosin miktarına bölündükten sonra sonucun 1000 ile çarpımıyla elde edildi (Van reenen vd. 1998; Todorov ve Dicks, 2005).



B.

$$\text{AU/mL} = \frac{\text{En yüksek dilüsyon oranı} \times 1000}{\text{Eklenen bakteriyosin miktarı}}$$

Şekil 8. Bakteriyosin aktivite testi. A; seri dilüsyon ile aktiviteye sahip en yüksek dilüsyon oranının belirlenmesi, B; bakteriyosinin AU cinsinden değerinin hesaplanmasında kullanılan formül.

2.6. Bakteriyosin Üretim Zamanının Belirlenmesi

Bakteriyosin üretim zamanının belirlenmesi moleküllerin karakterizasyonlarında kullanılan parametrelerden birisidir. Bu parametrenin aydınlatılması amacıyla bakteriyosin üretme kapasitesine sahip olduğu tespit edilen bakterilerin 16-18 saatlik gece kültürleri oluşturuldu ve bu gece kültüründen 500 mL NB içerisine %1 hacim olacak şekilde ekim yapıldı. Daha sonra örnekten 2 mL alındı ve geriye kalan kültür 30°C'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Ayrılan 2 mL örneğin bir kısmı bakteri yoğunluğunun ölçümü amacıyla spektrofotometrede (600 nm) ilk ölçüm yapılmak üzere kullanıldı. Diğer kısmı ise bakteriyosin aktivitesine bakılmak üzere 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve elde edilen süpernatant 0.45 µm gözenekli membran filtreden süzöldükten sonra +4°C'de muhafaza edildi. Her iki saatte bir inkübasyona bırakılan kültürden 2 mL alınarak yukarıda tanımlanan işlem yaklaşık 80 saat boyunca yapıldı. Bu süre boyunca elde edilen örneklerin seçilen duyarlı indikatör bakteriye karşı, kuyu difüzyon metodu kullanılarak bakteriyosin aktivitesi incelendi ve bu çalışma sonucunda eş zamanlı yürütülen bakteri büyüme eğrisine karşılık, bakteriyosin üretme kapasitesini AU cinsinden gösteren grafik oluşturuldu. Çalışmanın sonucunda, bakterinin aktif molekülü üretme zamanı belirlendi (Cherif vd., 2001).

2.7. Ortam Koşullarının Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Bakteriyosin üretiminde etkili olduğu bilinen farklı pH, sıcaklık, besiyortamı ve süre gibi ortam koşullarının üretilen aktif moleküllerin aktivitesine olan etkileri araştırıldı. Bu çalışmanın sonucunda aktif molekülün üretildiği optimum koşullar belirlenerek sonraki çalışmalarda belirlenen bu koşullar kullanıldı (Mandal vd., 2008).

2.7.1. Besiyeri ve Sürenin Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı besiyortamlarının ve inkübasyon sürelerinin bakteriyosin aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla, Triptik Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion Broth (BHIB), Nutrient Broth (NB), Luria-Bertani Broth (LBB) ve Müller Hinton Broth (MHB) besi ortamlarına inokülüm miktarı %2 olacak şekilde bakterilerin gece kültürlerinden

inoküle edildi ve 30 °C'de 72 saat boyunca kültüre edildi. 24 saatte bir alınan örneklerden bakteri yoğunluğunu göstermek amacıyla 600 nm'de absorbans ölçüldü ve aynı zamanda kuyu difüzyon yöntemiyle aktiviteleri hesaplandı. Bu çalışmanın sonucunda bakteriyosin üretiminin maksimum olduğu ortam ve süre tanımlandı. Tüm denemeler iki tekrarlı olarak yürütüldü.

2.7.2. pH'ın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Aktif molekül üretme yeteneğine sahip bakterilerin farklı pH'lardaki büyümesini izlemek ve bakteriyosin aktivitesinin en iyi hangi pH'da gerçekleştiğini belirlemek amacıyla, bir önceki çalışmada seçilen uygun besiyerinin pH'sı, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 ve 11.0'a ayarlandı. Aktif molekül üretme yeteneğine sahip bakterilerin gecelik kültürlerinden farklı pH değerine sahip besiyerleri içerisine % 2 oranında inokülasyon yapıldıktan sonra 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan 48 saat sonra örneklerin son pH, 600 nm'de absorbans ve kuyu difüzyon yöntemi ile aktivite değerleri belirlendi. Bu çalışmanın sonucunda bakteriyosin üretiminin maksimum olduğu pH tanımlandı. Tüm denemeler iki tekrarlı olarak yürütüldü.

2.7.3. Sıcaklığın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı sıcaklık derecelerinde bakteri büyümesinin ve bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, bir önceki çalışmalarda seçilen uygun pH ve besiyeri ortamlarına aktif molekül üretme yeteneğine sahip bakterilerin gece kültürlerinden % 2 oranında inoküle edildikten sonra bakteriler 25, 30, 35, 37, 40 ve 45°C'de inkübe edildi. 48 saat sonra örneklerin son pH, 600 nm'de absorbans ve kuyu difüzyon yöntemi ile aktivite değerleri hesaplandı. Tüm denemeler iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.8. Ortam Koşullarının Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bakteriyosinlerin literatürde var olan diğer bakteriyosinler ile kıyaslanabilmesi, dolayısıyla tanımlanabilmesi ve de elde edilen molekülün kullanım alanlarının doğru bir

şekilde seçilebilmesi amacıyla planlanan bu çalışmada farklı sıcaklıkların, pH'ların, enzimlerin ve organik çözücülerin bakteriyosin aktivitesine olan etkileri belirlendi.

2.8.1. Sıcaklığın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Aktif bakteri süpernatantı 30, 50, 70, 90 ve 100°C sıcaklıklarda 30, 60, 90'ar dakika ve 121°C'de 15 dakika süreyle bekletildi. Sıcaklığa maruz bırakılan bu örneklerin bakteriyosin etkinlikleri duyarlı indikatör bakterilere karşı kuyu difüzyon metodu ile belirlendi. Bunların yanısıra sıcaklık uygulanmamış süpernatantlar kontrol grubu olarak kullanıldı. Bakteriyosin etkinlik düzeyi AU cinsinden hesaplandı ve kontrol grubu ile kıyaslanarak aktivitede var olan değişimler belirlendi (Franz vd., 1997; Tuncer, 2005).

2.8.2. pH'nın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Aktif bakteri süpernatantının pH'sı, 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 2.0-11.0 değerleri arasında ayarlandı. pH'ları ayarlanan süpernatantlar 0.45 µm gözenekli membran filtrelerden geçirilerek steril edildi ve +4°C'de 24 saat bekletildi. pH değişimlerinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla uygun indikatör bakteriler kullanılarak kuyu difüzyon metodu uygulandı. Membran filtrelerden geçirildikten sonra hiçbir işleme tabi tutulmayan süpernatantların (kontrol) inhibisyon etkinlikleri, pH düzeyleri ayarlanan süpernatantlar ile karşılaştırılarak aktivitede var olan değişimler belirlendi. Bakteriyosin etkinlik düzeyi AU cinsinden hesaplandı (Franz vd., 1997; Tuncer, 2005).

2.8.3. Enzim ve Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

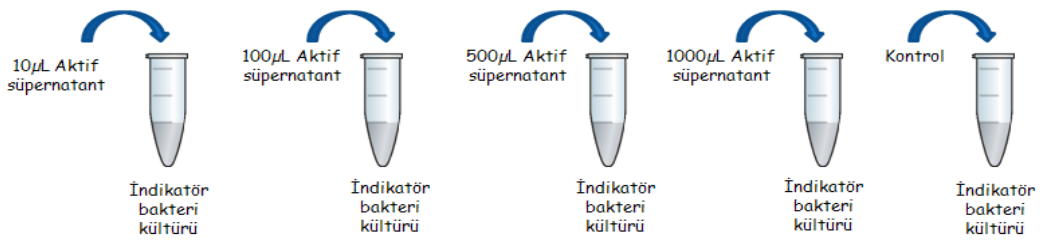
Üretilen antimikrobiyal maddenin protein doğasında olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, aktif süpernatanta son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde Proteinaz K (Sigma, USA) ilave edildi ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Enzim uygulanan ve uygulanmayan süpernatantların antimikrobiyal aktivitesi duyarlı indikatör bakterilere karşı kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edildi (Franz vd.,1997; Tuncer, 2005).

Aktif bakteri süpernatantı içerisine %10 oranında aseton, bütanol, DMSO, H₂O, etanol ve metanol eklenerek 25°C'de 1 saat inkübe edildi. Organik çözücülerin

bakteriyosin aktitesine olan etkileri kuyu difüzyon yöntemi ile duyarlı indikatör bakteri kullanarak belirlendi. Denemelerde kontrol olarak, organik çözücü ile muamele edilmemiş süpernatantlar kullanıldı. Bakteriyosin etkinlik düzeyi AU cinsinden hesaplandı (Franz vd., 1997; Tuncer, 2005).

2.9. Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmasının Belirlenmesi

Bakteriyosinlerin etki mekanizmasının bakterisidal ya da bakteriyostatik olduğunu belirleyebilmek amacıyla tasarlanan bu çalışmada, seçilen duyarlı indikatör bakterilerin gece kültürlerinden 100 mL broth ortamına %2 oranında inoküle edildi ve $OD_{600} = 0,35-0,40$ olacak şekilde büyütüldü. Ardından kültür beş farklı tüpe, 10 mL/falkon tüp olacak şekilde bölündü. Ayrılan indikatör bakteri içerikli bu tüpler içerisine aktivitesi önceden belirlenmiş aktif bakteri süpernatantından 10 μ L, 100 μ L, 500 μ L ve 1000 μ L eklendi ve bir tüp kontrol olarak kullanılmak üzere bakteriyosin eklenmeksizin yalnızca indikatör bakteri içerecek şekilde hazırlandı (Şekil 9). 24 saat süresince 2 saat aralıklarla alınan örneklerin bakteri yoğunluğunu tespit etmek amacıyla hem 600 nm'de absorbans ölçüldü hem de belli oranlarda seyreltilerek canlı hücre sayımı yapılmak üzere agar içerikli petrilere yayıldı. Bakteriyosin miktarına karşılık indikatör bakteri yoğunluğunu içeren grafik oluşturularak sonuçlar değerlendirildi (Chehimi vd., 2010).



Şekil 9. Bakteriyosinlerin etki mekanizmasının belirlenmesi

2.10. Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

Aktif moleküller kimliklendirilmek amacıyla saf bir şekilde elde edildi. Bu amaç doğrultusunda çok aşamalı bir saflaştırma metodu belirlendi. Her aşamada hem aktivite

hem de protein miktarının belirlenmesi amacıyla belirli miktarlarda (15 mL) +4°C'de muhafaza edildi ve geriye kalan miktar ile saflaştırılma işlemlerine kayıpsız devam edildi.

Saflaştırma amacıyla uygulanan yöntemler sırasıyla;

- i. Optimum şartlar dikkate alınarak bakteri kültürlerinin yapılması,
- ii. Bakteri kültürlerinden aktif süpernatant eldesi ve ısıl işlem uygulanması,
- iii. Amonyum sülfat çöktürmesi,
- iv. Diyaliz ve ultrafiltrasyon,
- v. Jel filtrasyon kromatografisi,
- vi. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)'dir.

2.10.1. Aktif Süpernatantın Eldesi ve Isıl İşlem Uygulanması

Aktif molekül üretme kapasitesine sahip olan bakterilerden üretilen bu moleküllerin saflaştırılması için bakteriler optimum koşullar altında ve büyük miktar (450 mL) besiyerinde kültür edildi. Bakterilerin kültür edilmesinin ardından, kültür sıvısı 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant 0.45 µm gözenekli membran filtre kullanılarak filtre edildi. Elde edilen örnek aktif molekül içerikli kültür süpernatantı olarak isimlendirildi.

Daha sonra bu aktif süpernatant, fizikokimyasal karakterizasyon çalışmaları ile önceden belirlenen, aktivitesini kaybetmediği ısı derecesine maruz bırakıldı ve ardından santrifüj yapılarak bu derecelere dayanamayan proteinler ortamdaki uzaklaştırıldı. Elde edilen aktif süpernatant sonraki saflaştırma aşamaları için +4°C'de muhafaza edildi.

2.10.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat [(NH₄)₂SO₄] çöktürmesi, kabaca çözeltinin tuz konsantrasyonunu artırarak proteinin çözünürlüğünün değişmesi ve bunun sonucunda denatüre olmadan çökmesine dayanan bir çöktürme yöntemidir. Bu metot hem etkili bir saflaştırma hem de örneği konsantre etme metotudur.

Bu çalışmada öncelikle aktif bakteri süpernatantına %50 doyumlukta olacak şekilde katı amonyum sülfat eklendi. %50 doyumluk için gerekli miktarda amonyum sülfat, Green ve Hughes (1955) tarafından hazırlanan amonyum sülfat tablosu kullanılarak hesaplandı ve yavaşça süpernatant üzerine bu miktar eklendi. Amonyum sülfatın

tamamının eklenmesinden sonra manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmak suretiyle bir gece +4°C'de bekletildi ve ertesi gün 30 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası, dibe çöken pellet steril dH₂O kullanılarak çözüldü ve ardından 0.45 µm gözenekli membran filtreden geçilerek +4°C'de muhafaza edildi. Çöken proteinleri uzaklaştırılan %50 amonyum sülfat doygunluğuna sahip süpernatanta %85 doygunluk için gerekli miktarda amonyum sülfat ilave edildi ve yine bir gece +4°C'de karıştırıldı. %50 doygunluk için yapılan tüm işlemler bu aşamada da tekrarlandı (Cherif vd., 2001). İki doygunluk sonrası elde edilen örneklerin aktiviteleri kuyu difüzyon metodu ile duyarlı indikatör bakteri kullanılarak ile belirlendi. İnhibisyon zonları hiçbir işleme maruz bırakılmamış aktif süpernatant (kontrol) grubu ile kıyaslanarak incelendi. Aynı zamanda protein miktarları belirlenerek spesifik aktiviteleri hesaplandı.

2.10.3. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

Diyaliz, istenmeyen küçük moleküllerden kurtulmak için yapılan bir işlemdir. Bu çalışmada amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda özellikle tuzun ve küçük moleküllerin uzaklaştırılması hedeflendi. Diyaliz amacıyla 3,5-5 kDa büyüklüğündeki molekülleri içerisinde tutabilme potansiyeline sahip membran (Spectra/Por) tercih edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örneklerin aktivite analizleri için ayrılan miktarları dışında tamamı diyaliz işlemine tabi tutuldu. Örnekler, diyaliz tüpleri içerisinde 16 saat boyunca dH₂O'ya karşı diyaliz edildi ve 4 saat aralıklarla dH₂O değiştirildi (Cherif vd., 2001).

Diyaliz sonrası elde edilen örnekler ultrafiltrasyon ile konsantre edildi. Ultrafiltrasyon, membran filtrasyon yöntemlerinden biridir ve özellikle numuneyi konsantre etmek ve sahip olduğu gözenek özelliklerine göre de küçük molekülleri uzaklaştırmak maksadıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla ultrafiltrasyon işlemi için özel hazırlanan 5 ve 3 kDa büyüklüğündeki molekülleri tutabilme potansiyeline sahip membran içerikli falkon tüpler (Sartorius) kullanıldı. Tüplere diyaliz sonrası elde edilen örnekler yüklendi ve 6000 g'de 30 dakika tüm örnek tükeninceye kadar çok kez santrifüj edildi. Falkon içerisinde var olan membranın üzerinde kalan (membrane tarafından tutulan) konsantre örnek daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

2.10.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi, moleküllerin büyüklüklerine göre ayrımını sağlayan bir saflaştırma işlemidir. Bu çalışmada, kolon dolgu maddesi olarak Sephadex G-50 ve G-10 (Sigma) kullanıldı. Dolgu maddeleri 10 mL için 1g tartılarak dH₂O içerisinde 1 saat kaynar su banyosunda kaynatıldı ve sonrasında soğutuldu. Daha sonra gazı giderilerek, 100 cm (boy) x 1cm (çap) boyutlarındaki kolona karıştırılarak döküldü. Kolon steril dH₂O ile yıkanıp kararlı hale getirildi ve dolgu maddesinin kolona tamamen yerleşmesi sağlandı. Konsantre diyalizattan 3 mL örnek kolona yüklendi ve dH₂O kullanılarak akış başlatıldı. Kolon akış hızı 30 mL/saat olacak şekilde ayarlandı. Kolondan çıkan örnekler, eppendorf tüplerine 1,5 mL hacminde toplandı. Toplanan fraksiyonun 280 nm'deki absorbansı sıfırlanana kadar fraksiyonlar toplanmaya devam edildi. Ardından toplanan bu fraksiyonların 280 nm absorbansları kullanılarak kalitatif protein tayini ve aynı zamanda kuyu difüzyon yöntemi ile aktivite tayini yapıldı. Aktivite ve 280 nm'deki absorbansları dikkate alınarak grafik oluşturuldu ve aktif molekülün kolondan çıktığı aralık belirlendi (Başbülül, 2009).

2.10.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), moleküllere çok kuvvetli bağlanan yüzeye, yüksek basınç uygulanarak moleküllerin yüzeyden çok daha hızlı geçmesi prensibine dayanan saflaştırma metodudur. Bu çalışmada, Ultraviöle (UV) detektörlü HPLC (Agilent 1260, USA) cihazı kullanıldı. Analiz için en uygun kolon, hareketli faz ve akış hızı yapılan bir çok deneme ile optimize edildi. Diğer aşamalarla kısmi olarak saflaştırılan aktif molekül içerikli 100 µL örnek (maksimum enjeksiyon hacmi), dakikada 0,5 mL akış hızına sahip Agilent Zorbax 300 SB-C18, 100-4,6 mm boyutlarındaki HPLC kolonuna enjekte edildi. Hareketli faz olarak Acetonitril-H₂O (%0,05 TFA içerikli) ve yöntem olarak ise doğrusal gradient sistemi kullanıldı. Ardından UV dedektörü 280±4 nm dalga boyuna ayarlandı ve bu aralıkta fraksiyon toplayıcı ile fraksiyonlar toplandı. Elde edilen fraksiyonların aktivitesi, duyarlı indikatör bakteriyeye karşı uygulanan kuyu difüzyon metodu ile belirlendi. Aktif fraksiyonun tespit edilmesi sonucunda, elde edilen HPLC kromatogramındaki pikler içerisinde aktif olan pik ve süresi tespit edildi.

2.11. Bakteriyosinlerin Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi ile Tanımlanması

Bu sistemde, yüklü moleküllerin yüksek bir elektrik alan ile hızlandırılması ve tüm kütlelerin aynı başlangıç enerjisine sahip olması sağlanır. Sonra bu iyonların "uçuş tüpü" denilen yaklaşık 1-1,5 metrelik bir tüp boyunca uçuşması sağlanır. Hepsi aynı başlangıç enerjisine sahip olmasına rağmen hafif olan moleküller daha hızlı, ağır olan moleküller ise daha yavaş uçar. Ve son olarak dedektöre ulaşma zamanlarına göre (uçuş zamanlarına göre) kütleler tespit edilir. Böylesi bir prensibe dayanan Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (Time-Of-Flight Mass Spectrometry, TOF-MS), moleküllerin tanımlanması için kullanılan en popüler yöntemlerden biridir.

Bu çalışmada aktif moleküllerin kesin kütlelerinin belirlenmesi ve kimliklendirilmesi uçuş zamanlı kütle spektrometresi (Agilent 6230, USA) ESI-TOF-MS ile gerçekleştirildi. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile saf bir şekilde elde edilen molekülün 1 μL 'si enjekte edildi. Elektrosprey iyonizasyonu ile hem pozitif iyon hem de negatif iyon modunda aktif moleküllerin kütleleri belirlendi. TOF-MS ölçümleri 100 ile 3200 m/z aralığında yapıldı. Data toplama işlemi Agilent firmasının "Data Acquisition" programı ile yapıldı. Kullanılan ESI-TOF-MS şartları; Kapılar voltaj: 3500 V; Nebulizatör basıncı: 20 psi; Kurutma gazı: 12.0 l/dk; Gaz sıcaklığı: 350 °C; Fragmentör voltage: 200 V'dır.

2.12. Veri Tabanı Analizleri

Elde edilen kütle bilgileri evrensel METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) ve BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>) veri tabanları kullanılarak tarandı. Veri tabanlarından elde edilen olası molekül yapıları, aktif moleküllerin tanımlanması aşamasında değerlendirildi.

2.13. Saflaştırılan Moleküllerin Belirlenmesi

2.13.1. SDS-PAGE ile Belirlenmesi

Saf olarak elde edilen aktif moleküllerin görüntülenmesi amacıyla Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem doğrultusunda %15'lik Tris-Glisin SDS-PAGE yapıldı.

Belirteç ve uygun şekilde hazırlanan örnekler iki tekrarlı olacak şekilde polimerleşmiş jel kuyularına yüklendi. Aktif moleküllerin yaklaşık büyüklüğünün gösterilmesi amacıyla iki farklı belirteç kullanıldı. Belirteçler ve içeriğindeki proteinlerin moleküler ağırlıkları sırasıyla; Broad Range Protein Moleculer Weight Marker (Promega); 225, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 ve 10 kDa ile Unstained Low Range Protein Ladder (Fermantas); 100, 30, 25, 20, 15, 10,5 ve 3,4 kDa'dur. Örneklerin yüklenmesi sonrasında yaklaşık üç saat süresince örnekler 100 voltta yürütüldü. Bu işlem bitiminde jel ikili tekrarlar dikkate alınarak düzgün bir biçimde kuyu boyunca kesildi ve her biri içerdikleri örneğin karıştırılmaması amacıyla işaretlendi. Jelin kesilen örneklerin tekrarını içeren kısmı CBB-G250 ile hazırlanmış boyama çözeltisi içerisinde protein bantları net bir şekilde görünene kadar boyandı ve ardından boyanın fazlası arıtılarak protein bantları incelendi.

Doğrudan jelde aktivite çalışmaları için jelin kesilen parçaları doğrudan %25 isopropanol ve %10 asetik asit içerikli fiksasyon çözeltisi içerisine alınarak 30 dakika bu çözelti içerisinde bekletildi ve sonra steril dH₂O içerisinde 2-3 saat toksisitesinden arındırıldı. Jeller daha sonra agar içerikli petriye yerleştirildi ve 10⁷ hücre/mL oranında duyarlı indikatör bakteri içerikli yumuşak agar (% 0,7 agar içerikli broth) jelin üzerine kaplıyacak şekilde eklendi. Ardından 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonucunda aktif bantın yer aldığı noktada var olan inhibisyon zonu incelendi. Zon oluşan kısmın jelin üst kısmına olan uzaklığı ölçülerek, jelin boyanan diğer kısmında bu mesafeye karşılık gelen protein bantı belirlendi (Bhunja vd., 1987; Cherif vd., 2001).

2.13.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Belirlenmesi

İnce tabaka kromatografisi (İTK) çok bileşimli karışımlara uygulanabilen güncel bir kimyasal ayırma ve analiz tekniğidir. Durağan bir faz üzerinde akmakta olan hareketli bir sıvı fazdan oluşan bir sistemdir. Katı bir yüzeye (durağan faz) emdirilen örnek, çözücü içerisinde yerleştirilir. Çözücü solüsyonun yüzeyde ilerlemesiyle, örnekteki moleküllerin çözünme yeteneklerine göre ayrılması temeline dayanan hızla uygulanabilen bir işlemdir. Aktif olduğu belirlenen spotlar katı ortamdan kazınarak saflaştırıldığı ölçüde saf olarak elde edilebilmekte ya da R_f değeri hesaplanarak standartlarla molekülün kıyaslanması yapılabilmektedir.

Bu çalışmada ince tabaka kromatografisinde kullanılacak hareketli faz için uygun çözücülerin tespiti amacıyla öncelikle çözücü ekstraksiyon tekniği ile moleküllerin en iyi

şekilde nüfuz edebildiği çözücü tespit edildi. Bu işlem için su ile faz oluşturabilen dietil eter, ve kloroform olmak üzere iki farklı çözücü kullanıldı. Her çözücü için; 2 mL aktif bakteri süpernatantı üzerine, 2 mL çözücü eklenerek hazırlanan tüpler 15 dakika vortekslelendikten sonra 15 dakika 3000 rpm hızda santrifüjlendi. Tüm işlemler steril koşullar altında yapıldı. Daha sonra, çözücü faz (organik) ile sulu faz birbirinden dikkatlice ayrıldı (Pelaez vd., 1998). Hem organik faz örneğinin hem de sulu faz örneğinin kuyu difüzyon yöntemi ile uygun indikatör bakteriye karşı inhibisyon aktiviteleri incelendi. Organik faza aktif molekülün tamamıyla geçtiği çözücü (inhibisyon aktivitesinin sadece organik fazda görüldüğü), ince tabaka kromatografisinde hareketli faz olarak kullanılmak üzere seçildi.

Yukarıdaki çalışma sonrası elde edilen içerisinde aktif molekül içeren organik faz örneği ince tabaka kromatografisinde kullanıldı. Bu örnek silika jel plağın en altına nokta şeklinde pastör pipeti ile yüklendi. Daha sonra bu silika jel plakası hareketli faz için tercih edilen çözelti içerikli beher içerisine yerleştirildi. Beherin ağzı sıkıca kapatılarak çözücünün silika jel üzerinde aşağıdan yukarı doğru ilemesi sağlandı. Çözücü yukarıya tam olarak ulaştığında sistem durduruldu ve silika jel plakası havada kurutuldu. Daha sonra aktif molekülün görünür hale gelmesi amacıyla 180-200°C'de (ısıtıcı tabla üzerine koyularak) 5-10 dakika süre ısıtıldı molekülün bulunduğu noktada koyu kahverengi bir noktanın varlığı gözlemlendi.

Biyootografi, ince tabaka kromatografisi sonrasında, kromatografik plakların üzerindeki spot (nokta)'ların biyolojik aktivitesini belirlemeye yarayan bir sistemdir. Bu çalışma için silika jelle örnek iki tekrarlı olarak yukarıda anlatıldığı gibi yüklendi ve uygun çözücü içerisinde yürütüldü. Ardından plaka ikiye kesildi ve bir parçası görüntülenmek üzere yakılırken diğer parçası agar içerikli petri üzerine yerleştirildi ve 10^7 hücre/mL oranında duyarlı indikatör bakteri içerikli yumuşak agar silikajel plakasının üzerini kaplıyacak şekilde eklendi. 16-24 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonucunda aktif spotun yer aldığı noktada var olan inhibisyon zonu incelendi. Zon oluşan kısım ile silika jeldeki görünür spot karşılaştırıldı. Böylece spotun aktif molekül içerikli olup olmadığı tespit edildi (Çolak, 2006; Yücel, 2007).

2.14. Protein Miktar Tayini

Tüm çalışmalarda protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı. (Bradford, 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının proteinlere bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. Bu çalışmada protein standardı olarak albumin kullanıldı. Albüminin 1 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlanarak, standart çözeltiler bu stoktan 5-200 µg/mL olacak şekilde dH₂O ile seyreltilerek hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100'er µL aktarıldı, kontrol grubuna ise 100 µL dH₂O eklendi. Bütün tüplere 5'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisinden eklenerek karıştırıldı. Standartların 595 nm dalga boyundaki absorbanları ölçüldükten sonra bu absorban değerleri kullanılarak protein standart grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak örneklerin protein miktarı belirlendi.

2.15. Bakteriyosinlerin Moleküler Karakterizasyonu

Aktif molekül üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenen bakteriler tarafından üretilen moleküllerin ekspresyonundan sorumlu genlerin kromozomal ya da plazmit kökenli olup olmadığını belirlemek amacıyla plazmit eliminasyon çalışmaları planlandı (Hardy, 1993).

Plazmit eliminasyon analizi için öncelikle etidiyum bromürün giderek artan konsantrasyonlarını içeren (1-500 µg/mL) 2 mL'lik LB besiyerlerine bakteri gece kültüründen 20 µL inoküle edildi. Bir gece üremeye bırakılan ve üremenin görüldüğü en yüksek etidiyum bromür konsantrasyonu ihtiva eden tüp (bakteri kültürü) seçildi. Seçilen bu kültür LB ile dilüsyon yapılarak agar üzerine yayma metodu ile ekildi, tek kolonilerin üremesi için 30°C'de, 16-18 saat inkübe edildi. Üreyen koloniler tek tek alınarak stok kültürleri hazırlandı ve sonra agar nokta ekim metodu ile bakteriyosin aktivitesi tarandı. 16-18 saat inkübasyondan sonra kolonilerin çevresinde inhibisyon zonu incelendi.

Bu çalışmanın sonucunda plazmitlerinin uzaklaştırılmasına rağmen çevresinde inhibisyon zonu olan, suşların ürettiği antimikrobiyal maddenin ifadesinden kromozomun sorumlu olduğu, inhibisyon zonu oluşturmayan suşların ürettiği antimikrobiyal maddenin ifadesinden ise plazmitlerin sorumlu olduğu sonucuna varıldı.

3. BULGULAR

3.1. Bakterilerin Bakteriyosin Üretme Potansiyeli

Agar nokta ekim yöntemi pratik, kolay uygulanabilir ve özellikle literatürde sıklıkla kullanılan bir metot olması sebebi ile test bakterilerinin bakteriyosin üretme kapasitesinin araştırılmasında ön tarama için tercih edildi. Bu yöntem ile otuz yedi test bakterisinin (izolat) bakteriyosin üretme yeteneği yirmidört indikatör bakteri kullanılarak belirlendi (Tablo 10). İndikatör bakteri olarak on üç farklı *Bacillus thuringiensis* suşu ve bunların yanısıra onbir farklı Gram (+) ve Gram (-) bakteri kullanıldı. Bakteriyosinler özellikle üretici bakteri ile yakın akraba türlere etki etmektedir. Bu bilgi doğrultusunda, planlanan çalışmada, antibakteriyal aktivite açısından test edilecek bakteriler içerisinde *Bacillus* cinslerinin özellikle de *B. thuringiensis* suşlarının fazla olması sebebi ile indikatör bakteri olarak özellikle *B. thuringiensis* suşları tercih edildi.

Agar nokta ekim yöntemi ile yapılan ön tarama çalışması üç kez farklı tekrarlı deneyler yapılarak sonuçlandırıldı. Tablo 10'da işaret edildiği gibi, otuz yedi test bakterisinin yirmi dört indikatör bakteriye karşı antagonistik etkilerinin taranması sonucu, beş test bakterisinin antibakteriyal etkiye sahip oldukları belirlendi. Bunlar;

- i. *Xyleborus dispar*'dan izole edilen; *Pseudomonas fluorescens* (Pf-Xd1),
- ii. *Anoplus roboris*'den izole edilen; *Bacillus polymyxa* (Bp-Ar2),
- iii. *Balaninus nucum*'dan izole edilen; *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1),
- iv. *Melolontha melolontha*'dan izole edilen; *Serratia marcescens* (Sm-Mm3),
- v. *Agelastica alni*'den izole edilen; *Pseudomonas flourescens* (Pf-Aa4)'dir.

Bu sonuçlar antibakteriyal madde üretme potansiyelleri açısından denenen entomopatojenik bakterilerde bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri madde üretim oranının %13,5 olduğunu gösterdi. Antibakteriyal madde ürettikleri belirlenen bu beş bakteri etki spektrumu ve karakterizasyonu için kuyu difüzyon metodunda kullanılmak üzere sonraki çalışmalara taşındı.

Tablo 10. Agar nokta ekim yöntemi ile belirlenen bakteriyosin üretici izolatlar

İndikatör Bakteriler	Test Bakterileri										
	Psp Mm1	Bt Mm2	Sm Mm3	Esp Mm4	Bs Mm5	Asp Mm6	Bw Mm7	Bc Ar1	Bp Ar2	Esp Ar3	Bs Ar4
<i>B. t. subsp. galleriae</i> HD29	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. thuringiensis</i> HD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. tochiensis</i> HD868	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> 3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. entomocidus</i> HD9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. canadensis</i> HD30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. aizawai</i> HD137	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. thompsoni</i> HD542	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. indiana</i> HD521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. colmeri</i> IS720	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. darmstadiensis</i> HD146	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. t. subsp. morrisoni</i> HD12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. tenebrionis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Listeria monotogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B.t.; *Bacillus thuringiensis*, (+); inhibisyon zonu var, (-); inhibisyon zonu yok.

Tablo 10'un devamı

İndikatör Bakteriler	Test Bakterileri												
	Ac O11	Ea O12	Psp O13	Fsp O14	Msp O15	Ea O16	Xsp O17	Ps O18	Psp O19	Xsp O110	Ec O111	Xm O112	Sm O113
<i>B. t. subsp. galleriae</i> HD29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. thuringiensis</i> HD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. tochiensis</i> HD868	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. entomocidus</i> HD9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. canadensis</i> HD30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. aizawai</i> HD137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. thompsoni</i> HD542	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. indiana</i> HD521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. colmeri</i> IS720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. darmstadiensis</i> HD146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. morrisoni</i> HD12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. tenebrionis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monotogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B.t.; *Bacillus thuringiensis*, (+); inhibisyon zonu var, (-); inhibisyon zonu yok.

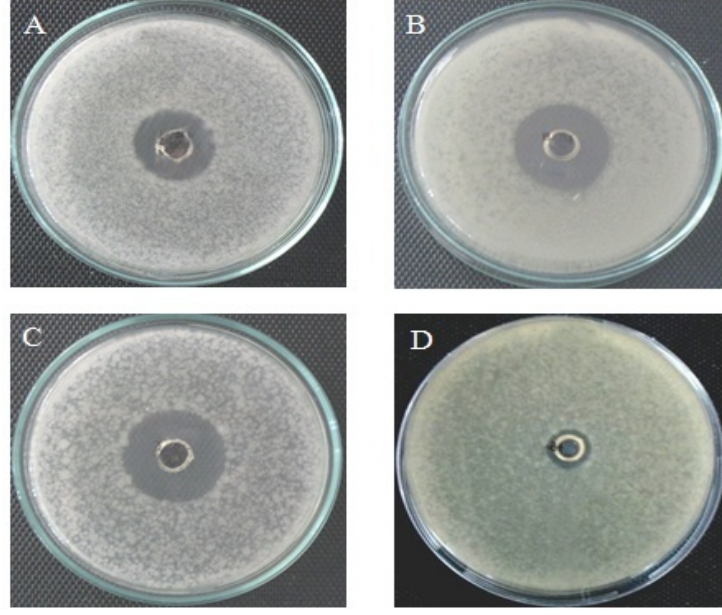
Tablo 10'un devamı

İndikatör Bakteriler	Test Bakterileri												
	Ea Aa1	Lsp Aa2	Pc Aa3	Pf Aa4	Bt Bn1	Pf Bn2	Ml Bn3	Ec Bn5	Pf Xd1	Bm Xd2	Bt Xd3	Pr Xd4	Pc Xd5
<i>B. t. subsp. galleriae</i> HD29	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. thuringiensis</i> HD2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. tochigiensis</i> HD868	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> 3	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. entomocidus</i> HD9	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. canadensis</i> HD30	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. aizawai</i> HD137	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. thompsoni</i> HD542	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. indiana</i> HD521	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. colmeri</i> IS720	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. darmstadiensis</i> HD146	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. morrisoni</i> HD12	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. t. subsp. tenebrionis</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Listeria monotogenes</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

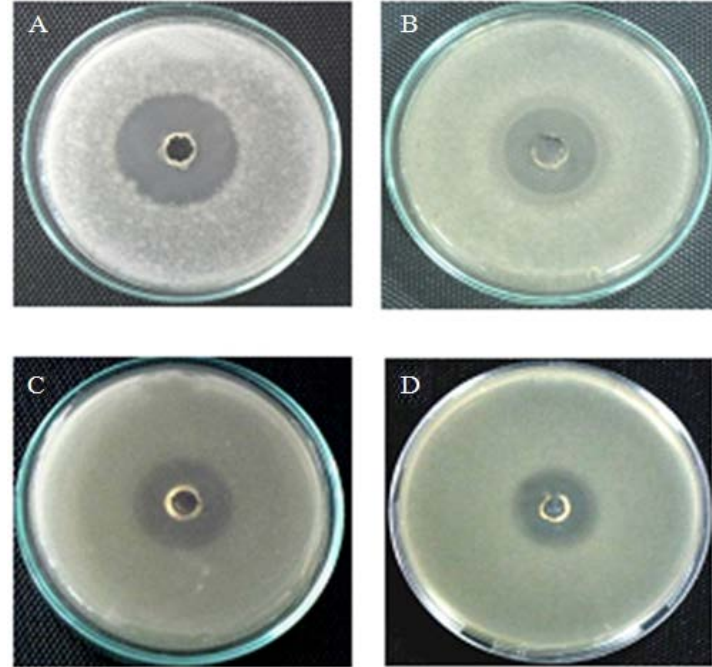
B.t.; *Bacillus thuringiensis*, (+); inhibisyon zonu var, (-); inhibisyon zonu yok.

Agar nokta ekim yöntemi sonucu pozitif çıkan beş bakterinin (Tablo 10) süpernatantında, aktif molekülün varlığının tespit edilmesi ve bu molekülün aktivite spektrumlarının belirlenmesi amacıyla kuyu difüzyon metodu kullanıldı. Bu çalışmanın sonucunda, *P. fluorescens* (Pf-Xd1 ve Pf-Aa4) izolatları tarafından üretilen moleküller, bakteri kültür süpernatantından elde edilemedi. Ön tarama çalışması sonucunda yine pozitif sonuç veren *B. polymyxa* (Bp-Ar2) tarafından üretilen molekül ise bakteri süpernatantından elde edildi ve kuyu difüzyon metodu ile aktivitesi gösterildi. Ancak inhibisyon aktivitesinin düşük ve aktivite spektrumunun dar olması sebebi ile bir sonraki karakterizasyon aşamaları için seçilmedi. *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *S. marcescens* (Sm-Mm3) bakterileri tarafından üretilen moleküller ise hem bakteri süpernatantından elde edildi hem de kuyu difüzyon metodu ile geniş aktivite spektrumuna sahip oldukları belirlendi. Aktif molekülü tanımlayabilmek için, karakterizasyonun her aşamasında hücrelerden ayrılmış kültür süpernatantlarının kullanılması bakımından, mutlaka bakteri kültür süpernatantında aktivite saptamak gerekmektedir. Bu sebeple sonraki karakterizasyon çalışmaları için agar nokta ekim yöntemi açısından pozitif olan beş izolat arasından, kuyu difüzyon yöntemi için de pozitif sonuç veren ve inhibisyon aktivite spektrumu geniş olan *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *S. marcescens* (Sm-Mm3) izolatları seçildi.

Seçilen izolatların kuyu difüzyon yöntemi ile inhibisyon spektrumlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonrasında, *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) tarafından üretilen molekülün, farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* ve *Listeria monocytogenes* gibi farklı bakterilere karşı inhibisyon aktivitesi olduğu (Tablo 11, 12 ve 13) ve toplam 65 indikatör bakteri arasında bu etkinin %18,5 oranında olduğu belirlendi. *S. marcescens* (Sm-Mm3) tarafından üretilen molekülün ise daha geniş bir inhibitör spektrumuna sahip olduğu belirlendi. Farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi farklı tür bakterilere karşı inhibisyon aktivitesi olduğu (Tablo 11, 12 ve 13) ve toplam 65 indikatör bakteri arasında bu etkinin %38,5 oranında olduğu belirlendi. Bt-Bn1 ve Sm-Mm3 tarafından üretilen moleküllerin bazı indikatör bakterilere karşı inhibisyon aktivitesi Şekil 10 ve 11’de örnek olarak gösterildi. İki bakteri tarafından üretilen moleküllerin antibakteriyal spektrumlarının gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda daha önce belirtilen indikatör bakterilerin yanısıra, test bakterileri de indikatör bakteri olarak kullanıldı (Tablo 13). Bu sayede tarama spektrumu genişletilerek aktivite spektrumları daha net bir şekilde belirlendi.



Şekil 10. Bt-Bn1 bakteriyosininin bazı bakteriler üzerine olan inhibisyon aktivitesi. İndikatör bakteriler; A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis*, B. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, C. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*, D. *Bacillus cereus*



Şekil 11. Sm-Mm3 bakteriyosininin bazı bakteriler üzerine olan inhibisyon aktivitesi. İndikatör bakteriler; A. *Bacillus thuringiensis*, B. *Bacillus subtilis*, C. *Enterococcus faecalis*, D. *Pseudomonas fluorescens*

Tablo 11. Hedef bakteriyosinlerin *B.t*'ler üzerine etkisi

İndikatör Bakteriler	İnhibisyon Zonları (mm)	
	Bt-Bn1	Sm-Mm3
<i>B. t. subsp. galleriae</i> HD29	-	30
<i>B. t. subsp. tolworthi</i> HD537	11	24
<i>B. t. subsp. israelensis</i> HD567	23	28
<i>B. t. subsp. thuringiensis</i> HD2	20	-
<i>B. t. subsp. aizawai</i> HD133	-	22
<i>B. t. subsp. tochiensis</i> HD868	-	13
<i>B. t. subsp. kurstaki</i> 3	12	-
<i>B. t. subsp. entomocidus</i> HD9	10	20
<i>B. t. subsp. canadensis</i> HD30	17	35
<i>B. t. subsp. aizawai</i> HD137	-	24
<i>B. t. subsp. kenyae</i> HD136	-	16
<i>B. t. subsp. thompsoni</i> HD542	-	35
<i>B. t. subsp. colmeri</i> IS720	-	18
<i>B. t. subsp. darmstadiensis</i> HD146	-	-
<i>B. t. subsp. morrisoni</i> HD12	25	33
<i>B. t. subsp. tenebrionis</i>	-	19
<i>B. t. subsp. indiana</i> HD521	-	-
<i>B. t. subsp. kumamotoensis</i> HD867	-	-
<i>B. t. subsp. israelensis</i>	14	-

Tablo 12. Hedef bakteriyosinlerin farklı indikatör bakteriler üzerine etkisi

İndikatör Bakteriler	İnhibisyon Zonları (mm)	
	Bt-Bn1	Sm-Mm3
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
<i>Bacillus cereus T-HT</i>	12	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	24
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	13	26
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	29
<i>Listeria monocytogenes</i>	15	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	26
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	14
<i>Bacillus pumilis</i>	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Staphylococcus cohnii</i>	-	23
<i>Escherichia coli</i>	-	-

Tablo 13. Hedef bakteriyosinlerin test bakterileri üzerine etkisi

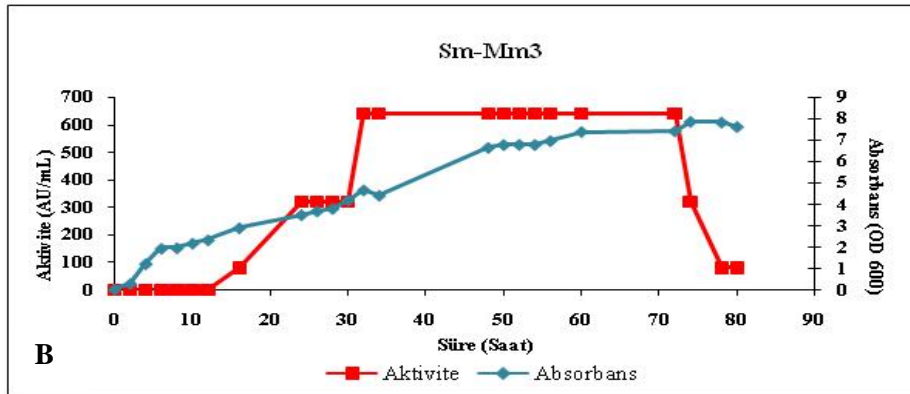
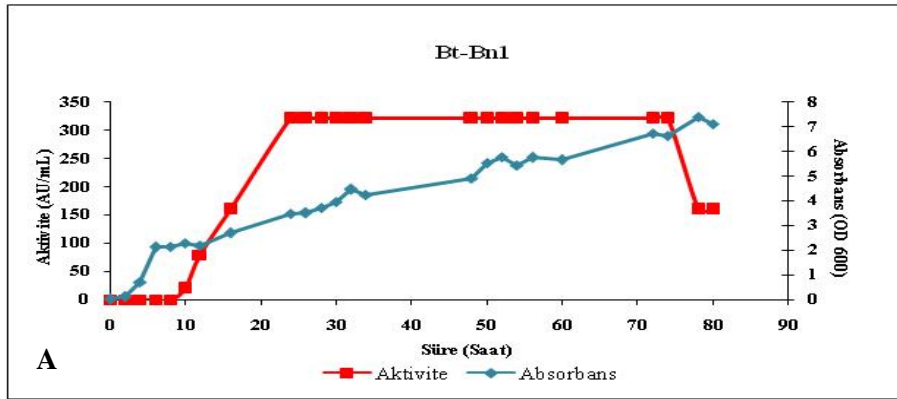
İndikatör Bakteriler	İnhibisyon Zonları (mm)	
	Bt-Bn1	Sm-Mm3
Ar2; <i>Bacillus polymyxa</i>	-	18
Ar3; <i>Enterobacter</i> sp.	-	-
Ar4; <i>Bacillus sphaericus</i>	-	-
Bn1; <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	26
Bn2; <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	20
Bn3; <i>Micrococcus luteus</i>	-	-
Bn4; <i>Serratia marcescens</i>	-	-
Bn5; <i>Escherichia coli</i>	-	-
Mm1; <i>Pseudomonas</i> sp.	-	-
Mm2; <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	22
Mm3; <i>Serratia marcescens</i>	-	-
Mm4; <i>Enterobacter</i> sp.	-	22
Mm5; <i>Bacillus sphaericus</i>	-	-
Mm7; <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	14	-
Xd1; <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
Xd3; <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	23
Xd4; <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	-	-
Aa1; <i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-
Aa2; <i>Listeria</i> sp.	-	-
Aa4; <i>Pseudomonas flourescens</i>	-	-
O11; <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-
O12; <i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
O13; <i>Pseudomonas</i> sp.	-	-
O16; <i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-
O19; <i>Pseudomonas</i> sp.	-	-
O111; <i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	-

Kuyu difüzyon yöntemi sonrasında, Bt-Bn1 ve Sm-Mm3 izolatları tarafından üretilen aktif moleküller için sonraki saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarında, tüm kuyu difüzyon metodu ile aktivite belirleme çalışmalarında rutin olarak kullanılacak indikatör bakteri seçimi yapıldı. İki bakteri tarafından üretilen antibakteriyal moleküllere en duyarlı olan indikatör bakteriler tercih edildi. *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi için *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* HD542 bakterisi, *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisi için ise *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD30 bakterisi seçildi.

3.2. Hedef Bakterilerin Bakteriyosin Üretim Zamanı

Bakteriyosin üretiminin bakterinin gelişim basamaklarından hangisine rastladığını aydınlatmak amacıyla tasarlanan bu çalışmada, kuyu difüzyon yöntemi ile inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi ve 600 nm dalga boyunda yapılan spektrometrik ölçümler ile bakteri yoğunluğunun belirlenmesi sonucunda, Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal madde üretiminin, dolayısıyla aktivitesinin; bakterinin logaritmik büyüme fazının başında bakteri büyümesine paralel olarak arttığı ve logaritmik fazın ortalarında maksimum seviyeye ulaştığı belirlendi. Durağan fazın ortalarına kadar sabitleşen antibakteriyal aktivitede durağan fazın sonlarına doğru bir düşüş gözlemlendi (Şekil 12A).

Bt-Bn1 bakterisi gibi Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal madde üretiminin de yine bakterinin logaritmik gelişme fazının başında bakteri büyümesine paralel olarak arttığı ve logaritmik fazın ortalarında maksimum seviyeye ulaştığı belirlendi. Durağan fazın ortalarına kadar sabitleşen antibakteriyal aktivitede durağan fazın sonlarına doğru ani, hızlı bir düşüş gözlemlendi (Şekil 12B).



Şekil 12. Bakteriyosinlerin üretim zamanı. A. Bt-Bn1, B. Sm-Mm3

3.3. Ortam Koşullarının Hedef Bakteriyosinlerin Üretimleri Üzerine Etkisi

Bu çalışmada bakteriyosin üretiminin en iyi olduğu ortam koşullarının belirlenmesi amaçlandı. Ortam koşullarının bakteriyosin üretimi üzerinde doğrudan etkisi olduğu bilinmektedir (Kamoun vd., 2009). Bakteriyosinin maksimum şekilde üretildiği optimum koşulların belirlenmesi, karakterizasyonu ve saflaştırılması için büyük önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda farklı inkübasyon süresi, besiortamı, pH ve sıcaklık parametreleri değerlendirilerek Sm-Mm3 ve Bt-Bn1 tarafından üretilen antibakteriyal maddelerin maksimum seviyede üretildiği optimum koşullar belirlendi.

3.3.1. Besiyeri ve Sürenin Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

Bakteriyosin üretiminin en iyi olduğu besiortamının tercih edilmesi amacıyla BHIB, NB, LBB, MHB ve TSB olmak üzere beş farklı besiyeri kullanıldı. Ayrıca zamanın optimizasyonu için de 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman aralığında aktivite tayini yapıldı. Belirlenen parametreler kullanılarak yürütülen çalışma sonucunda aktivite hesaplaması yanında bakteri yoğunluğunun belirlenmesi için 600 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Böylece bakteri yoğunluğu ile bakteriyosin üretimi arasındaki ilişki belirlendi.

Bu çalışmanın sonucunda, Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün MHB ortamında 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda en iyi şekilde üretildiği tespit edildi (Tablo 14). Özellikle uzun süren saflaştırma aşamalarında aktif süpernatantın en erken şekilde elde edilmesi gerekmektedir. Bu sebebledir ki optimum inkübasyon süresi olarak aynı aktiviteyi veren 48 saat inkübasyon süresi yerine 24 saat inkübasyon süresi tercih edildi.

Tablo 14. Bt-Bn1 bakterisinin farklı besiyerlerinde büyümesi ve bakteriyosin üretimi

İnkübasyon Besiyerleri	24 saat*		48 saat*		72 saat	
	Aktivite	OD ₆₀₀	Aktivite	OD ₆₀₀	Aktivite	OD ₆₀₀
BHIB	40	2,845	30	2,593	30	2,703
NB	100	1,302	120	1,667	60	0,745
LBB	10	1,396	10	1,414	10	1,502
TSB	30	1,658	30	1,718	30	1,349
MHB*	120	1,512	120	1,892	100	2,087

*; optimum ortam koşulları

Sm-Mm3 tarafından üretilen aktif molekülün ise en iyi üretildiği ortam olarak LBB gözlenirken, inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlendi (Tablo 15). Seçilen ortam ve inkübasyon süresi diğerleri ile kıyaslanacak olursa aktivitenin ve bakteri yoğunluğunun diğerlerinden oldukça farklı olduğu açıkça gözlemlendi.

Tablo 15. Sm-Mm3 bakterisinin farklı besiyerlerinde büyümesi ve bakteriyosin üretimi

İnkübasyon Besiyerleri	24 saat		48 saat		72 saat*	
	Aktivite	OD ₆₀₀	Aktivite	OD ₆₀₀	Aktivite	OD ₆₀₀
BHIB	240	2,965	430	3,874	1600	4,408
NB	330	1,483	400	2,634	640	3,223
LBB*	1000	2,246	1200	4,349	1600	4,520
TSB	320	2,362	430	3,507	960	4,094
MHB	320	1,747	960	2,953	1600	3,567

*; optimum ortam koşulları

Bu çalışmanın sonucunda, her zaman bakteri yoğunluğuna paralel bir bakteriyosin üretiminin söz konusu olmadığı ve besiyeri içeriğinin, üretilen molekülün aktivitesine ya da bakteri tarafından üretilmesine doğrudan bir katkısı olduğu ortaya çıkarıldı.

3.3.2. Sıcaklığın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

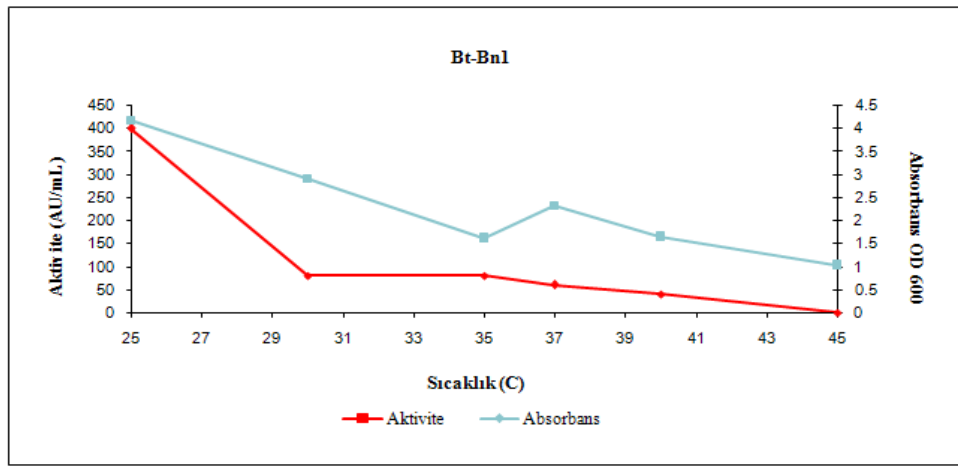
Bakteriyosin üretiminin en iyi olduğu sıcaklığın tespit edilmesi amacıyla 25, 30, 35, 37, 40 ve 45°C olmak üzere altı farklı sıcaklık denemesi yapıldı. Çalışmanın sonucu, bakteri yoğunluğunun 600 nm'de ölçülerek tespiti, üretilen aktif molekülün aktivitesi ve son pH değerleri kullanılarak değerlendirildi.

Yapılan bu çalışma sonucunda, Bt-Bn1 bakterisinin 45°C'de az da olsa büyüebildiği ancak aktif molekül üretmediği gösterildi. Diğer sıcaklıklarda da bakteri yoğunluğu yüksek olmasına rağmen üretilen molekülün aktivitesinde sıcaklıkla ters orantılı olarak bir düşüş gerçekleştiği gözlemlendi. Çalışmanın sonucunda, Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün 25°C'de en iyi şekilde üretildiği belirlendi (Şekil 13 ve Tablo 16).

Tablo 16. Bt-Bn1 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

Sıcaklık (°C)	Aktivite	OD ₆₀₀	Son pH
25*	400	4,167	6,64
30	80	2,900	6,52
35	80	1,623	6,30
37	60	2,317	6,50
40	40	1,654	6,41
45	-	1,039	5,98

*; optimum sıcaklık derecesi



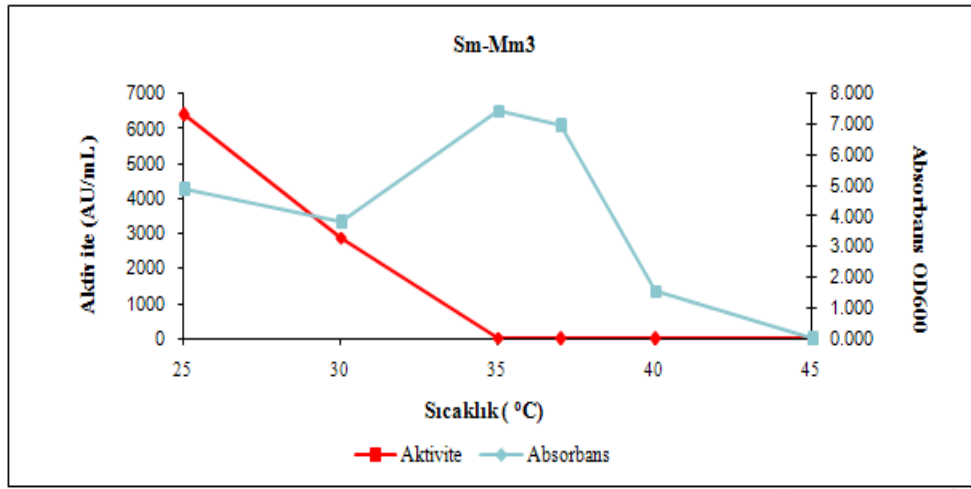
Şekil 13. Bt-Bn1 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

Sm-Mm3 bakterisi 37 ve 40°C'de büyüebilmesine rağmen bu sıcaklıklarda aktif molekül üretebilme kapasitesini kaybettiği belirlendi. 45°C'de ise bakteri büyümesinin tamamen durduğu ve dolayısıyla aktif molekül üretiminin de durduğu belirlendi. Bu çalışma sonrasında, Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün 25°C'de en iyi şekilde üretildiği belirlendi. Artan sıcaklık değerlerinde aktif molekül üretimi her ne kadar devam etsede üretilen moleküllerin aktivitesinde düşüşler kaydedildi (Şekil 14 ve Tablo 17).

Tablo 17. Sm-Mm3 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

Sıcaklık (°C)	Aktivite	OD ₆₀₀	Son pH
25*	6400	4,861	7,26
30	2880	3,795	7,12
35	20	7,468	7,68
37	-	6,945	7,84
40	-	1.552	6,61
45	-	-	7,01

*; optimum sıcaklık derecesi



Şekil 14. Sm-Mm3 bakterisinin farklı sıcaklıklarda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

3.3.3. pH'nın Bakteriyosin Üretimi Üzerine Etkisi

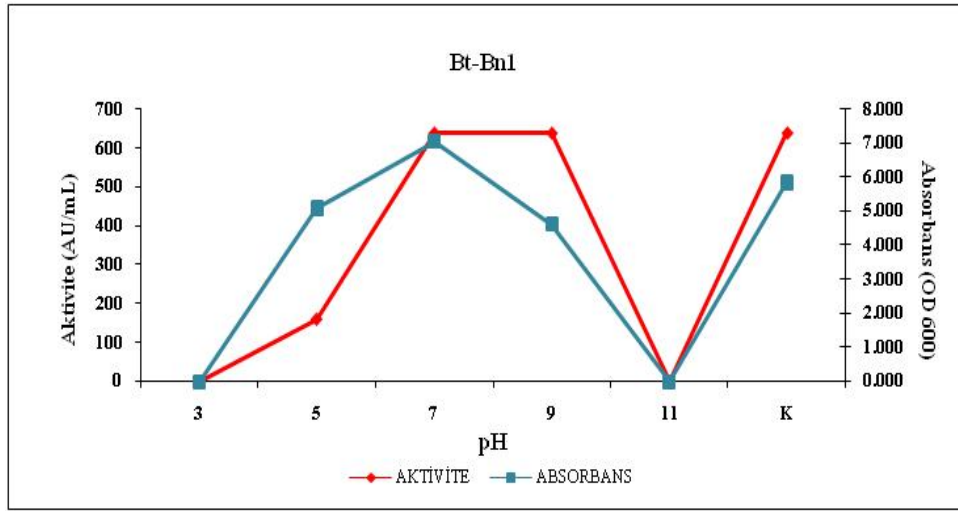
Bu çalışmada bakteriyosinlerin en iyi üretildiği pH aralığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla besiyortamlarının pH değerleri 3, 5, 7, 9 ve 11 olacak şekilde ayarlandı. Çalışmanın sonucunda aktivite, absorbans ve son pH ölçülerek her iki bakteri için de optimum pH değeri belirlendi.

Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen molekül için optimum pH aralığının 7-9 olduğu ve bu aralıkta molekülün 640 AU/mL aktiviteye sahip olduğu belirlendi. pH 5'de 160 AU/mL aktiviteye sahip molekül üretildiği ve pH 3 ile pH 11 değerlerinde bakteri büyümesinin olmadığı buna bağlı olarak da molekül aktivitesinin olmadığı gösterildi. (Tablo 18 ve Şekil 15).

Tablo 18. Bt-Bn1 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

pH	Aktivite	OD ₆₀₀	Son pH
3	-	-	2,87
5	160	5,095	6,20
7*	640	7,040	6,90
9*	640	4,614	7,44
11	-	-	9,90
Kontrol	640	5,835	6,87

*; optimum pH



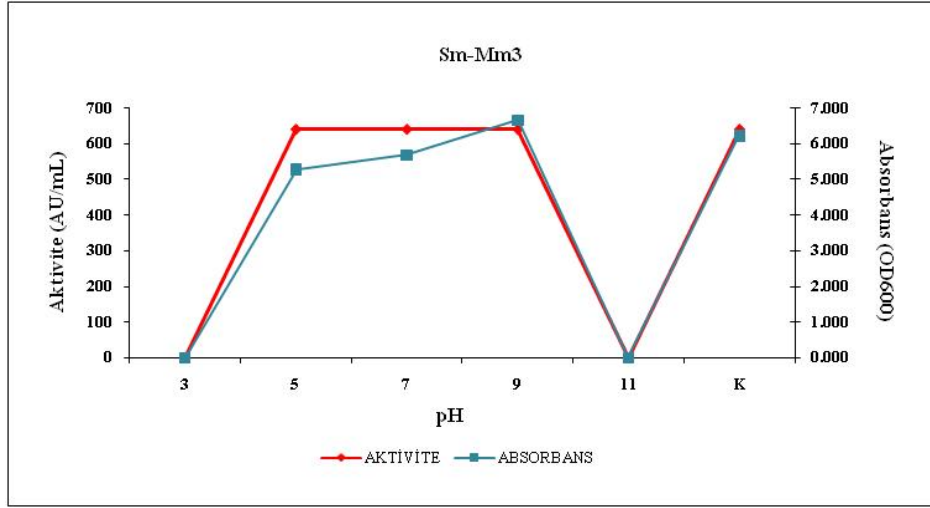
Şekil 15. Bt-Bn1 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

Bu çalışmanın sonucunda, Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen molekül için optimum pH aralığının ise 5-9 olduğu ve bu pH aralığında molekülün 640 AU/mL aktiviteye sahip olduğu bulundu. pH 3 ve 11 değerlerinde bakteri büyümesinin olmadığı ve buna bağlı olarak da molekül aktivitesinin olmadığı gözlemlendi (Tablo 19 ve Şekil 16).

Tablo 19. Sm-Mm3 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

pH	Aktivite	OD ₆₀₀	Son pH
3	-	-	2,86
5*	640	5,284	6,92
7*	640	5,699	7,24
9*	640	6,664	7,88
11	-	-	9,90
Kontrol	640	6,228	7,53

*; optimum pH



Şekil 16. Sm-Mm3 bakterisinin farklı pH'larda büyümesi ve bakteriyosin üretimi

3.4. Ortam Koşullarının Hedef Bakteriyosinlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Hedef bakteriyosinlerin, ısı, pH kararlılıkları, çeşitli kimyasalların ve enzimlerin aktivite üzerine etkileri araştırılarak fizyokimyasal karakterizasyonları yapıldı. Bu çalışmalar, hem inhibitör maddelerin yapısını aydınlatmakta hem de üzerinde çalışılan bakteriyosinin dahil olduğu sınıf hakkında bilgi vermektedir. Bunların yanısıra elde edilen moleküllerin hangi alanlarda kullanılabileceği konusunda da yine buradan elde edilecek sonuçlardan büyük ölçüde faydalanılmaktadır.

3.4.1. Sıcaklığın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

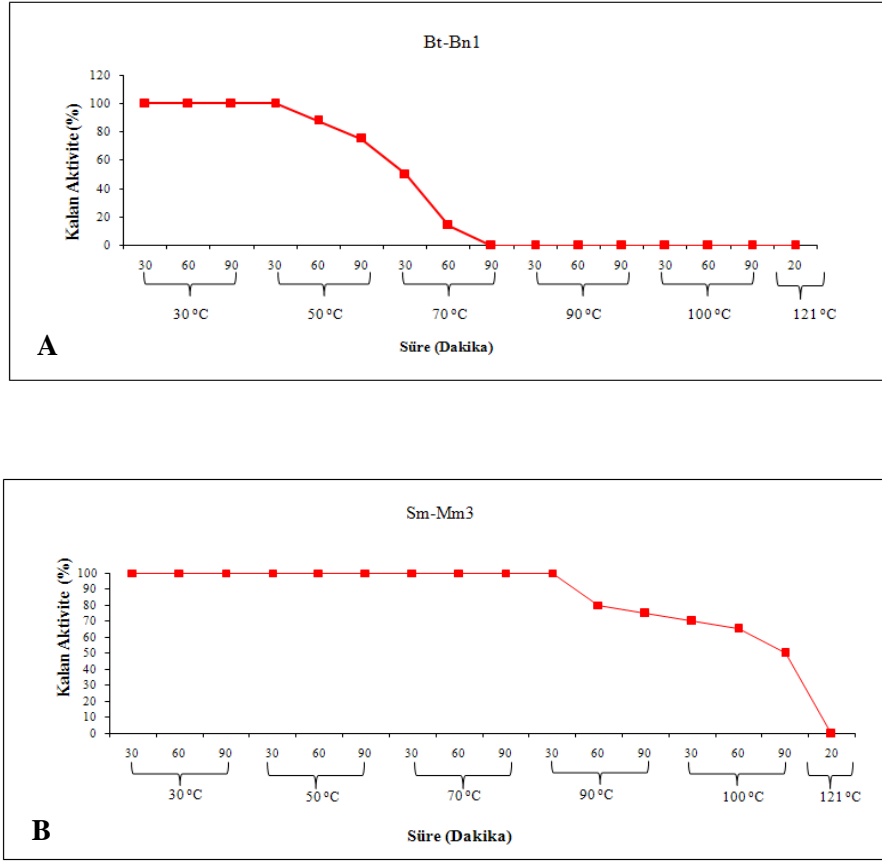
Bu çalışmada sıcaklığın bakteriyosin aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda aktif bakteri süpernatantı farklı zaman aralıklarında farklı sıcaklık derecelerine maruz bırakıldı.

Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosinin 50°C’de 30 dakika ve altındaki sıcaklıklarda aktivitesini koruduğu gösterildi. Daha yüksek sıcaklıklarda ise aktivitesini tamamen kaybettiği bulundu (Tablo 20 ve Şekil 17A).

Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün ise sıcaklığa oldukça dayanıklı olduğu belirlendi. 100°C’de 90 dakika süresince inkübe edildiğinde bile aktivitesinin yalnızca %50’sini kaybettiği, sadece otoklavlandığında aktivitesini tamamen kaybettiği yapılan çalışmalarla tespit edildi (Tablo 20 ve Şekil 17B). Yüksek sıcaklıklarda kararlılık moleküle üstün bir nitelik kazandırarak kullanım imkanlarını arttırmaktadır.

Tablo 20. Sıcaklığın hedef bakteriyosinler üzerine etkisi

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Kalan Aktivite (%)	
		Bt-Bn1	Sm-Mm3
30	30	100	100
	60	100	100
	90	100	100
50	30	100	100
	60	88	100
	90	75	100
70	30	50	100
	60	14	100
	90	0	100
90	30	0	100
	60	0	80
	90	0	75
100	30	0	70
	60	0	65
	90	0	50
121	20	0	0



Şekil 17. Sıcaklığın hedef bakteriyosinler üzerine etkisi. A. Bt-Bn1, B. Sm-Mm3

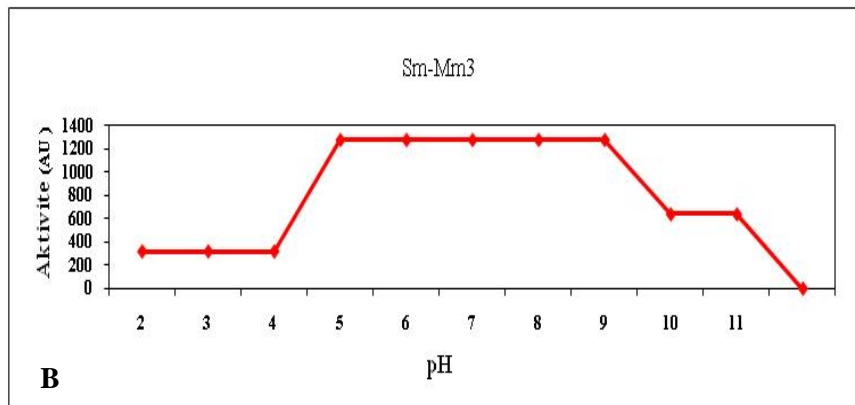
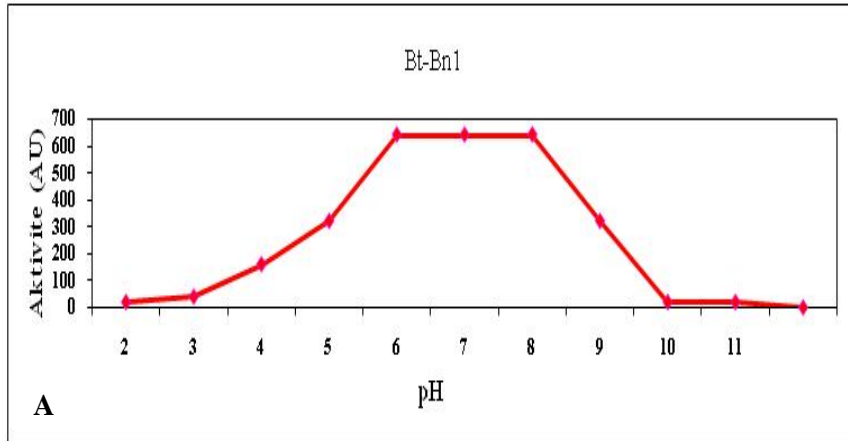
3.4.2. pH'nın Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmanın sonucunda, Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosinin, pH 6-8 aralığında aktivitesini tamamen koruduğu, pH 5 ve 9'da aktivitesinin %50'sini kaybettiği diğer pH aralıklarında ise aktivitesinin büyük bir kısmını kaybettiği belirlendi (Tablo 21 ve Şekil 18A).

Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün ise pH değişimlerine oldukça dayanıklı olduğu belirlendi. pH 5-9 aralığında aktivitesinde hiçbir değişim gözlenmezken pH 10 ve 11 değerlerinde aktivitesinin %50'sini koruduğu gözlemlendi. pH 2-4 aralığında ise aktivitesinin %25'ni koruduğu belirlendi. Her ne kadar aktivitesinde kayıplar olsa da Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosin Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosin ile kıyaslandığında pH değişimlerine karşı oldukça dayanıklı olduğu söylenebilmektedir (Tablo 21 ve Şekil 18B).

Tablo 21. pH'nin hedef bakteriyosinler üzerine etkisi

pH	Kalan Aktivite(%)	
	Bt-Bn1	Sm-Mm3
2	3	25
3	6	25
4	25	25
5	50	100
6	100	100
7	100	100
8	100	100
9	50	100
10	3	50
11	3	50



Şekil 18. pH'nin hedef bakteriyosinler üzerine etkisi. A. Bt-Bn1, B. Sm-Mm3

3.4.3. Enzim ve Organik Çözücülerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada aktif moleküllerin protein doğasında olup olmadığını anlamak amacıyla enzim olarak Proteinaz K uygulaması yapıldı. Aktif bakteri süpernatantına Proteinaz K uygulamasından sonra Bt-Bn1 tarafından üretilen antibakteriyal molekülün aktivitesinin tamamen kaybolduğu, Sm-Mm3 tarafından üretilen antibakteriyal molekülün aktivitesinde ise bir değişim olmadığı görüldü (Tablo 22).

Yine moleküllerin karakterizasyonları ve sınıflandırmaları için uygulanan diğer bir metot ise organik çözücülerin antibakteriyal moleküllere karşı etkisinin belirlenmesidir. Bu uygulamaların sonucunda hem Bt-Bn1 hem de Sm-Mm3 tarafından üretilen antibakteriyal molekülün aktivitesinde bir değişim olmadığı belirlendi (Tablo 22).

Tablo 22. Enzim ve organik çözücülerin hedef bakteriyosinler üzerine etkisi

Uygulamalar	Kalan aktivite (%)	
	Bt-Bn1	Sm-Mm3
Enzim		
Proteinaz K	0	100
Organik Çözücüler (%10)		
Aseton	100	100
Bütanol	100	100
DMSO	100	100
H ₂ O	100	100
Etanol	100	100
Metanol	100	100

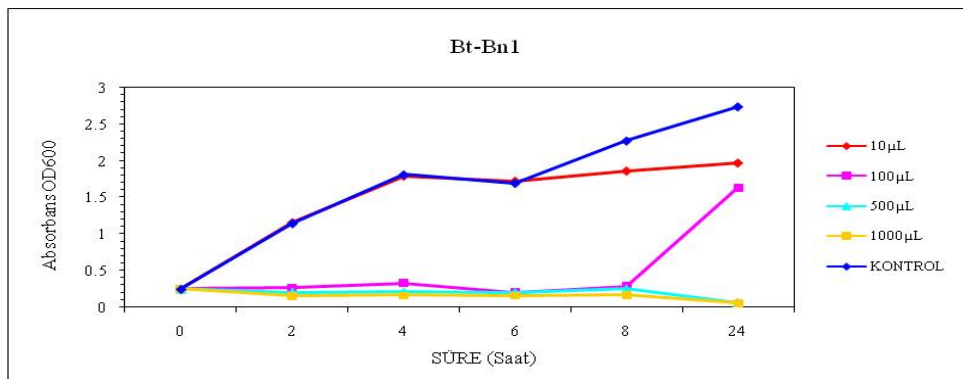
3.5. Hedef Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması

Bakteriyosinlerin indikatör bakteriye karşı bakteriosidal veya bakteriostatik etkiye sahip olup olmadığını anlamak amacıyla tasarlanan bu çalışmada, Bt-Bn1 tarafından üretilen kısmi saflaştırılmış antibakteriyal maddenin, indikatör bakteri *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD30'un logaritmik gelişme fazından önce belirli miktarlarda 10 mL'lik kültür ortamına eklenmesi, indikatör bakterinin gelişimi üzerinde uygulanan doza bağlı olarak inhibisyona sebep oldu. Ortama 1000 µL ve 500 µL aktif molekül içerikli örneğin eklenmesi ile besiyerinde gözlenen bakteri kaynaklı bulanıklığın 2 saat içerisinde yok olduğu gözlemlendi. 24 saat hatta bir hafta sonrasında bile besiyerinin

berraklığının korunduğu belirlendi ve 600 nm absorbans ölçümlerinde absorbansın sıfıra yakın olması gözlenen bu sonuçları destekledi. Aynı zamanda koloni oluşturabilen canlı hücre sayımı (CFU) çalışmanın paralelinde yürütüldü. 1000 µL ve 500 µL aktif molekül eklenen kültürlerden alınan örneklerde hiçbir şekilde koloni oluşumu gözlenmedi. Diğer tarafta 100 µL aktif molekül içerikli örnek eklenen kültürün CFU sayımında 8 saat boyunca koloni oluşumu gözlenmezken 24 saatin sonunda koloni sayısında ani bir artış gözlemlendi. 10 µL aktif molekül içerikli örneğin eklenmesi ise tamamen yetersiz bir miktar olarak değerlendirildi ve yoğun koloni oluşumu, bulanık kültür ve yüksek absorbans gibi kontrolden farksız sonuçlar elde edildi (Tablo 23 ve Şekil 19). Bu sonuçlar Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosinin düşük dozlarda bakteriyostatik, yüksek dozlarda ise bakteriyolitik bir etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bu çalışmanın yanısıra indikatör bakterinin logaritmik gelişme fazından sonra aktif molekülün eklenmesi bakteriyosin aktivitesinin düşmesine ve sonuçların değişmesine sebep olduğu belirlendi.

Tablo 23. Bt-Bn1 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması

Süre (Saat)	Eklenen miktar (µL) / OD ₆₀₀				
	0	10	100	500	1000
0	0,350	0,350	0,350	0,350	0,350
2	1,149	1,161	0,267	0,204	0,149
4	1,815	1,796	0,330	0,205	0,161
6	1,700	1,726	0,200	0,199	0,160
8	2,278	1,865	0,290	0,245	0,168
24	2,744	1,974	1,637	0,066	0,057

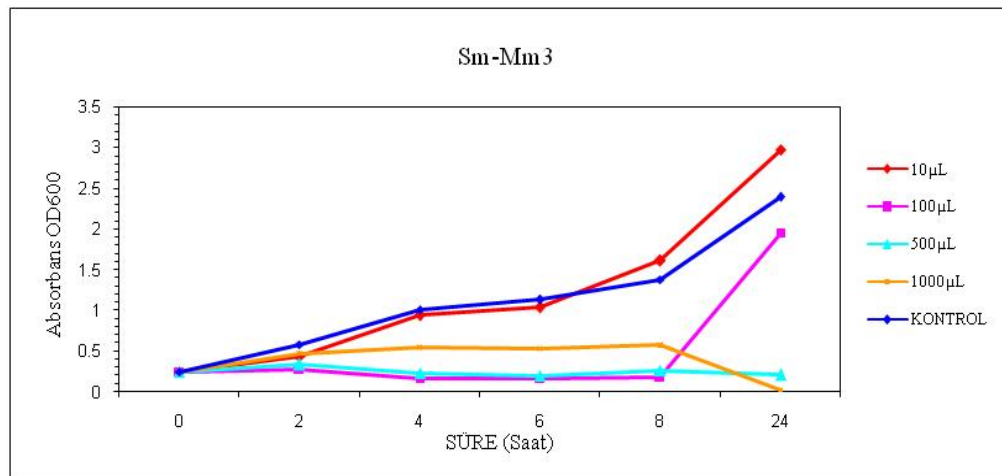


Şekil 19. Bt-Bn1 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması

Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün etki tarzını aydınlatmak amacıyla indikatör *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* HD542 bakterisinin logaritmik gelişim fazından önce farklı konsantrasyonlarda kısmi saflaştırılmış molekül 10 mL'lik kültür ortamına eklendi. 2, 6 ve 8 saat inkübasyon süresi sonucunda tüm konsantrasyonlarda kültürün bakteri yoğunluğunda bir azalma olmadığı gözlemlendi. CFU sayımlarında koloni oluşturan canlı hücrenin yoğun bir şekilde olduğu tespit edildi. İlginç bir şekilde 1000 µL kısmi saflaştırılmış aktif molekül eklenen kültürdeki bakteri yoğunluğunda, diğer 500 µL ve 100 µL gibi eklenen düşük konsantrasyonlara oranla bir artışın olduğu gözlemlendi. 24 saat inkübasyondan sonra ise beklenen durum gerçekleşti, 1000 µL ve 500 µL aktif molekül içeren kültür sıvısı berraklaştı ve yapılan canlı hücre sayımında sadece iki koloni oluşumu gözlemlendi. Diğerlerinde özellikle 100 µL eklenen kültürde ise yoğun bir koloni oluşumu gözlemlendi (Tablo 24, Şekil 20).

Tablo 24. Sm-Mm3 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması

Süre (Saat)	Eklenen miktar (µL)/ OD ₆₀₀				
	0	10	100	500	1000
0	0,250	0,250	0,250	0,250	0,250
2	0,581	0,441	0,271	0,332	0,464
4	1,013	0,94	0,165	0,229	0,542
6	1,132	1,033	0,168	0,195	0,527
8	1,380	1,606	0,187	0,258	0,570
24	2,395	2,975	1,953	0,203	0,022



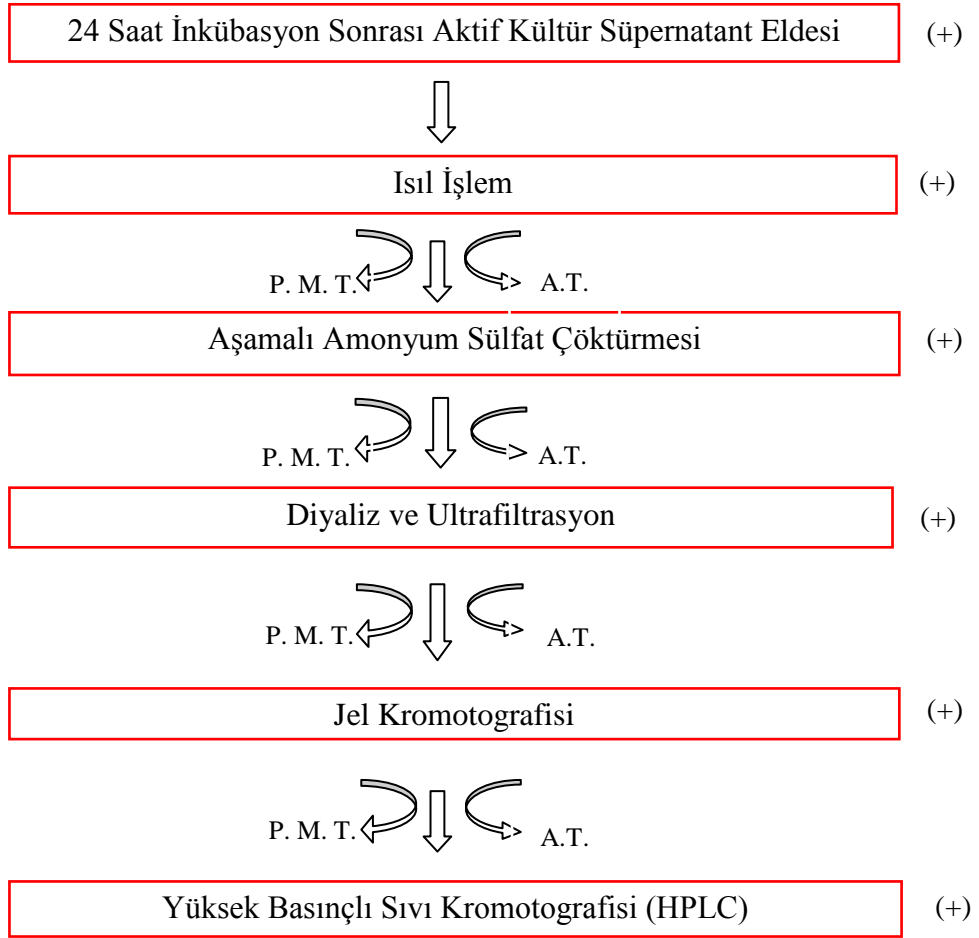
Şekil 20. Sm-Mm3 bakteriyosininin farklı konsantrasyonlarının etki mekanizması

Bu çalışmanın sonucunda, Sm-Mm3 aktif molekülünün yüksek konsantrasyonlarda (1000 µL) indikatör bakteri kültür ortamına eklenmesi, inhibisyon etkisinin ancak belirli bir süre sonra (24 saat) ortaya çıkmasına sebep olduğu belirlendi. Bu olay aktif moleküllerin birbiriyle etkileşime girmesi sebebiyle indikatör bakteri membranına tutunamaması ve sonucunda etkinlik gösterememesi şeklinde açıklanabildi. Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün etki tarzının düşük dozajlarda kısa süreli bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğu, yüksek dozajlarda ise uzun süreli bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Bakteriyolitik bir etki için yüksek ancak farklı şekilde bir uygulama gerektiği düşünülmektedir.

3.6. Hedef Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

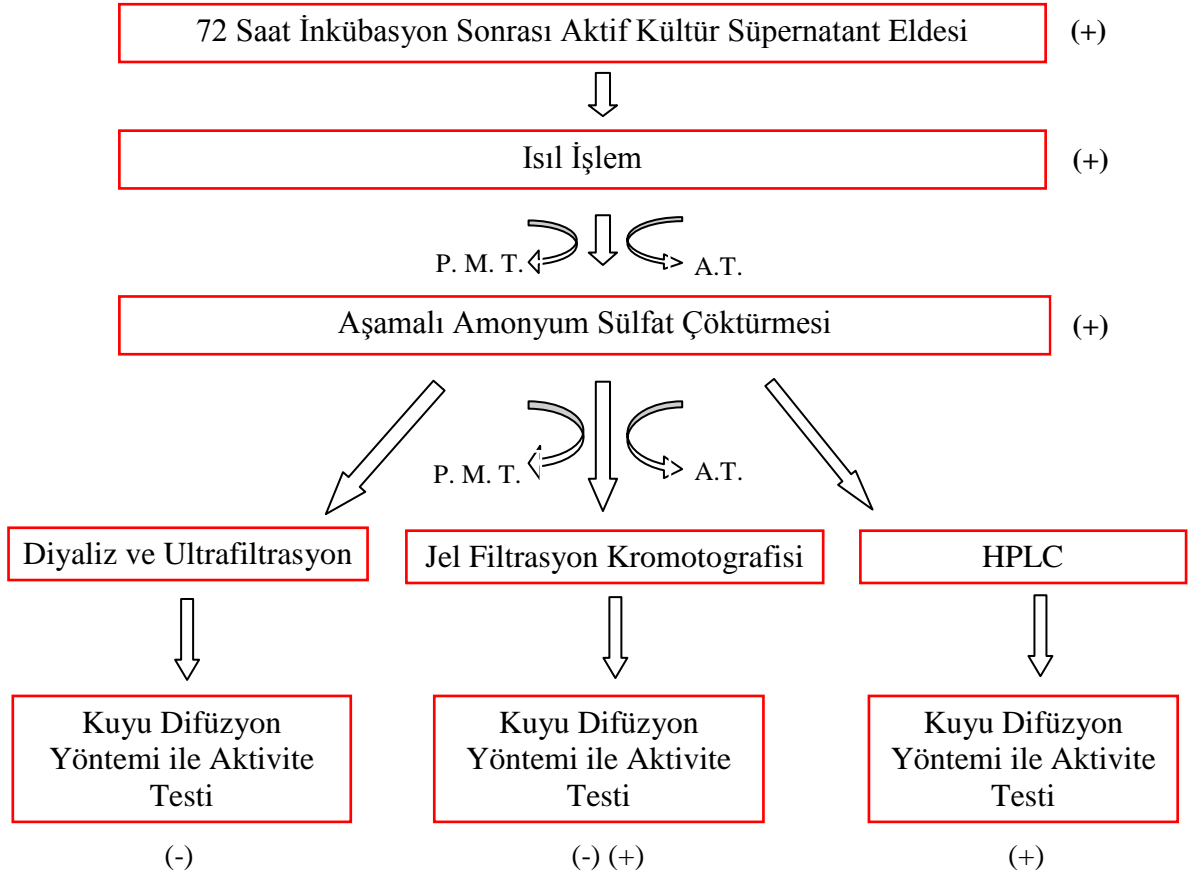
Aktif moleküllerin tanımlanabilmeleri için saf bir şekilde elde edilmeleri gerekmektedir. Bu çalışmada, antibakteriyal moleküllerin saflaştırılması amacıyla; sırasıyla bakteri kültüründen aktif süpernatantın elde edilmesi, ısıl işlem, aşamalı amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) olmak üzere birbirini takip eden çok aşamalı bir saflaştırma yöntemi kullanıldı. Ancak moleküllerin birbirlerinden oldukça farklı olması saflaştırılma aşamalarında da farklı sonuçların elde edilmesine sebep oldu. *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün saflaştırılmasında başarı kaydeden bir metodun *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün saflaştırması için uygun bir metod olmadığı yine tam tersi durumlarında ortaya çıktığı belirlendi (Şekil 21 ve 22). En başarılı sonucu elde etmek amacıyla bir takım modifikasyonlar yapılarak aynı çalışmalar iki molekül için de kullanıldı.

Şekil 21’de işaret edildiği gibi *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün saflaştırılmasında tercih edilen tüm basamaklarda başarı kaydedildi. Molekül başarı ile birbirini izleyen aşamalar sonucunda saf olarak elde edildi. Her aşamada kuyu difüzyon metodu ile aktivite tayini yapılırken bradford yöntemi ile de protein miktar tayini belirlenerek spesifik aktivite ve saflaştırılma katsayısı hesaplandı.



Şekil 21. Bt-Bn1 bakteriyosininin saflaştırma stratejisi. A.T.; Aktivite Tayini, P.M.T.; Protein Miktar Tayini, (+); çalışmanın sonucunun başarılı olduğunu göstermektedir.

Serratia marcescens (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün saflaştırması için ise yine Bt-Bn1 molekülünde takip edilen yöntemler uygulandı. Ancak Şekil 22’de görüldüğü gibi başarılı bir amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında yapılan diyaliz ve ultrafiltrasyon aşamasında başarı kaydedilemedi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında yapılan jel filtrasyon kromotografisi çalışması sonrasında aktif molekül başarılı bir şekilde elde edildi ancak aktivitesinde büyük kayıplar meydana geldi. Son olarak doğrudan amonyum sülfat çöktürmesi sonrası yapılan HPLC ile molekül başarılı bir şekilde saflaştırılarak elde edildi. Her aşamada kuyu difüzyon metodu ile aktivite tayini yapıldı ancak aktif süpernatant ve amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen örnekler dışında, bradford yöntemi ile protein miktar tayini belirlenemediği için spesifik aktivite ve saflaştırılma katsayısı hesaplanamadı.



Şekil 22. Sm-Mm3 bakteriyosininin saflaştırma stratejisi. A.T.; Aktivite Tayini, P.M.T.; Protein Miktar Tayini,(+); çalışmanın sonucunun başarılı olduğunu, (-); çalışmanın sonucunun başarısız olduğunu, (+) (-); çalışmanın hem başarılı hem de başarısız sonuçlar içerdiğini göstermektedir.

3.6.1. Aktif Kültür Süpernatantının Eldesi

Bacillus thuringiensis (Bt-Bn1) ve *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterileri tarafından üretilen moleküllerin süpernatanttan elde edilmesi amacıyla önceki optimizasyon çalışmaları ile belirlenen optimum koşullar kullanılarak bakteriler kültür edildi. Bakterilerin öncelikle gece kültürü yapıldı ve ardından bu kültürden %1 oranında, Bt-Bn1 bakterisi, pH'sında herhangi bir değişim yapılmaksızın 450 mL MHB sıvı besiyerine inoküle edildi ve kültür 25°C'de 24 saat süresince inkübe edildi. Sm-Mm3 bakterisi, yine pH'sında herhangi bir değişim yapılmaksızın 450 mL LBB sıvı besiyerine inoküle edildi. Kültür 25°C'de 72 saat süresince inkübe edildi. Sonrasında 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant 0,45 µm gözenekli membrandan süzülükten sonra bir sonraki aşamaya geçildi ya da örnek +4°C'de muhafaza edildi.

3.6.2. Isıl İşlem Uygulanması

Aktif süpernatant, fizikokimyasal karakterizasyon çalışmaları ile önceden belirlenen *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterileri tarafından üretilen moleküllerin aktivitesini kaybetmediği sıcaklık derecelerine maruz bırakıldı. Bt-Bn1 bakteri süpernatantı, 50°C’de 30 dakika, Sm-Mm3 bakteri süpernatantı 100°C’de 30 dakika süresince inkübe edildi. Ardından santrifüj yapılarak bu derecelere dayanamayan (denatüre olan) proteinler ortamdaki uzaklaştırıldı. Elde edilen örneklerin 15 mL’si kuyu difüzyon metodu ile aktivite tayini ve Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapıldı. Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen molekülün aktivitesinin 160 AU/mL ve spesifik aktivitesinin 627,5 AU/mg olduğu tespit edildi (Tablo 25). Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen molekülün aktivitesinin ise yine 160 AU/mL ve spesifik aktivitesinin 241,1 AU/mg olduğu tespit edildi (Tablo 26). Spesifik aktivite; aktivitenin protein miktarına bölünmesi ile bulundu.

3.6.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Bir derece saflaştırmak ve özellikle konsantre etmek amacıyla tasarlanan bu çalışma için, ısıl işlem sonrası elde edilen 450 mL aktif bakteri süpernatantı içerisinde %50 doyumluk için 140,85 g ve sonrasında %85 doyumluk için 115,2 g katı amonyum sülfat yavaşça eklendi. İlk doyumluk için gerekli amonyum sülfatın tamamının eklenmesinden sonra karıştırılmak suretiyle bir gece +4°C’de bekletildi ve ertesi gün santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası, dibeye çöken pellet steril 25 mL dH₂O kullanılarak çözüldü ve ardından 0,45 µm gözenekli membran filtreden geçirildi. Aynı işlemler diğer doyumluk için tekrarlandı. Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen molekülün, %50 ve %85 doyumluk sonrası elde edilen örneklerin kuyu difüzyon metodu ile aktivitelerinin sırasıyla 2560 AU/mL ve 640 AU/mL, spesifik aktivitelerinin ise 3575,3 AU/mg ve 705,6 AU/mg olduğu belirlendi. İnhibisyon zonları hiçbir işleme maruz bırakılmamış aktif süpernatantın (kontrol) aktivitesi 160 AU/mL ve spesifik aktivitesi ise 627,5 AU/mg olarak hesaplandı ve diğerleri ile kıyaslanarak sonuçlar değerlendirildi (Tablo 25 ve Şekil 23A).

Çalışmanın sonucunda, *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisi tarafından üretilen molekül %50 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi sonucu yüksek aktivite ile başarılı bir şekilde elde edildi. Sonraki saflaştırma aşamalarında kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

Tablo 25. Bt-Bn1 bakteri kültür süpernatının (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi

(NH ₄) ₂ SO ₄ Doygunluk Oranları	Aktivite (AU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (AU/mg)
%50 pellet*	2560	0,716	3575,3
%85 pellet	640	0,907	705,60
%85 Süpernatant	0	0,096	0
Kontrol	160	0,255	627,50

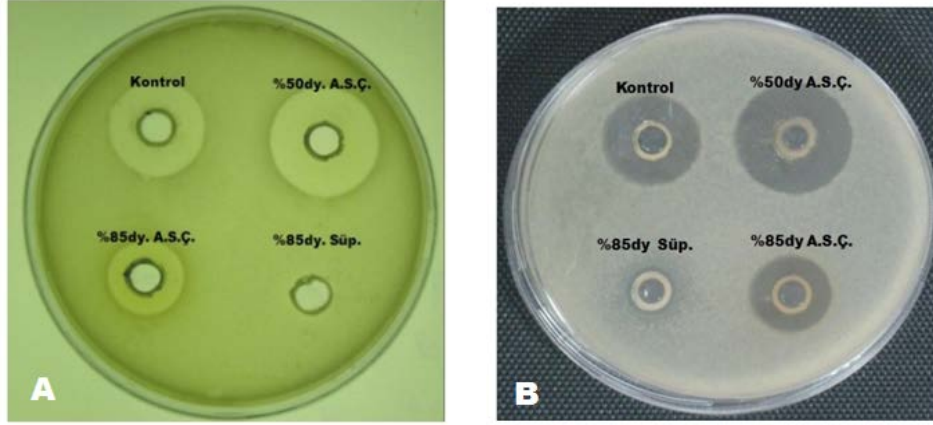
*; başarılı amonyum sülfat doyumluk oranı

Tablo 26. Sm-Mm3 bakteri kültür süpernatantının (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi

(NH ₄) ₂ SO ₄ Doygunluk Oranları	Aktivite (AU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (AU/mg)
%50 pellet*	2560	0,5230	4894,8
%85 pellet	640	0,6797	941,60
%85 Süpernatant	0	-	-
Kontrol	160	0,6636	241,10

*; başarılı amonyum sülfat doyumluk oranı

Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen molekülün, iki doyumluk sonrası elde edilen örneklerin kuyu difüzyon metodu ile aktivitelerinin sırasıyla 2560 AU/mL ve 640 AU/mL, spesifik aktivitelerinin ise 4894.8 AU/mg ve 941,6 AU/mg olduğu belirlendi. İnhibisyon zonları hiçbir işleme maruz bırakılmamış aktif süpernatantın (kontrol) aktivitesi 160 AU/mL ve spesifik aktivitesi 241.1 AU/mg olarak hesaplandı ve diğerleri ile kıyaslanarak sonuçlar değerlendirildi (Tablo 26 ve Şekil 23B). Çalışmanın sonucunda, *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen molekül %50 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi sonucu yüksek aktivite ile başarılı bir şekilde elde edildi. Sonraki saflaştırma aşamalarında kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 23. Amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen bakteriyosinlerin aktivitesi. A; Bt-Bn1, B; Sm-Mm3, A.S.Ç.; Amonyum Sülfat Çöktürmesi, dy; Doygunluk

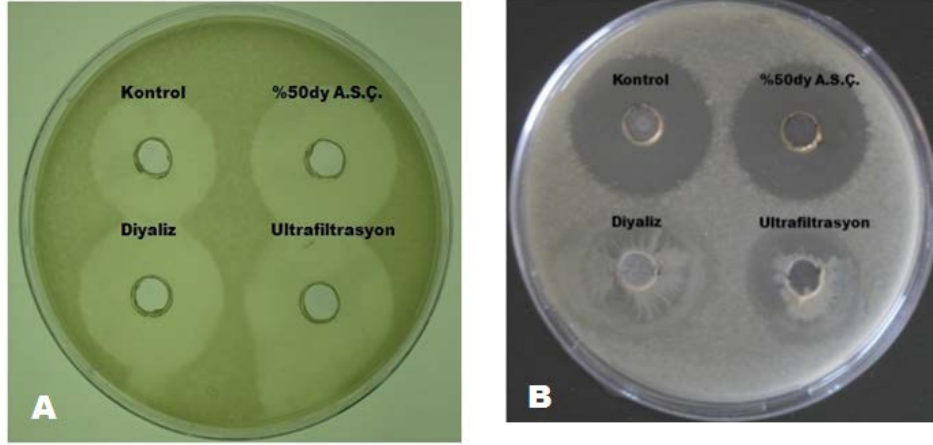
3.6.4. Diyaliz ve Ultrafiltrasyon

İstenmeyen küçük moleküllerin ve iyonların uzaklaştırılması amacıyla bu çalışmada, %50 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen örnekler 3,5-5 kDa cut off değerine sahip diyaliz tüpleri içerisinde 16 saat boyunca dH_2O 'ya karşı diyaliz edildi.

Bu çalışmanın sonucunda Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen aktif molekül, yapılan aktivite testi ile aktivitesini kaybetmeksizin elde edilebildi (Şekil 24A). AU cinsinden aktivite değeri ve protein miktarı hesaplanarak, spesifik aktivitesi tespit edildi. Ardından numuneyi konsantre etmek amacıyla, ultrafiltrasyon işlemi için özel hazırlanan 5000 MW özellikli falkon tüpü kullanıldı. Falkonlara diyaliz sonrası elde edilen örnekler yüklenildi ve santrifüj edildi. Sonrasında yapılan aktivite testi ile aktivitesini kaybetmeksizin molekül başarılı bir şekilde elde edilebildi. Aktivite, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayıları hesaplandı (Tablo 29).

Başarılı bir amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekül ise diyaliz ve ardından yapılan ultrafiltrasyon işlemlerindeki başarısızlık sebebi ile aktivitesinin hemen hemen tamamını kaybetti. Şekil 24B'de görüldüğü gibi ultrafiltrasyon ve diyaliz örneklerinde inhibisyon zonlarının 5-6 saat gibi kısa bir süre inhibisyon zonunun olduğu ancak sonraki saatlerde zonun derhal yok olduğu gözlemlendi. Bu sonuç bize, diyaliz sonrası örneğin az da olsa aktif molekül içerdiğini ancak, önceki çalışmalarda gösterildiği üzere, düşük konsantrasyonlarda

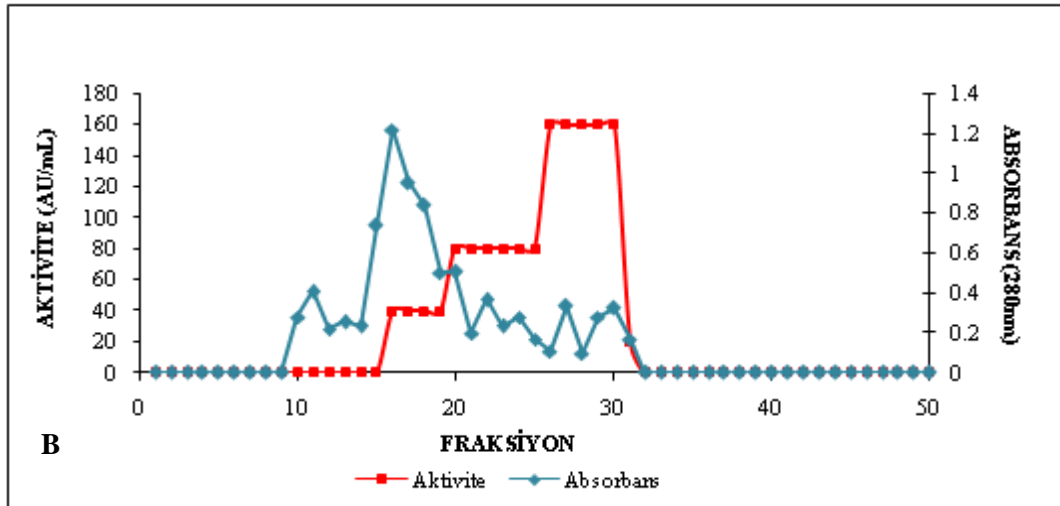
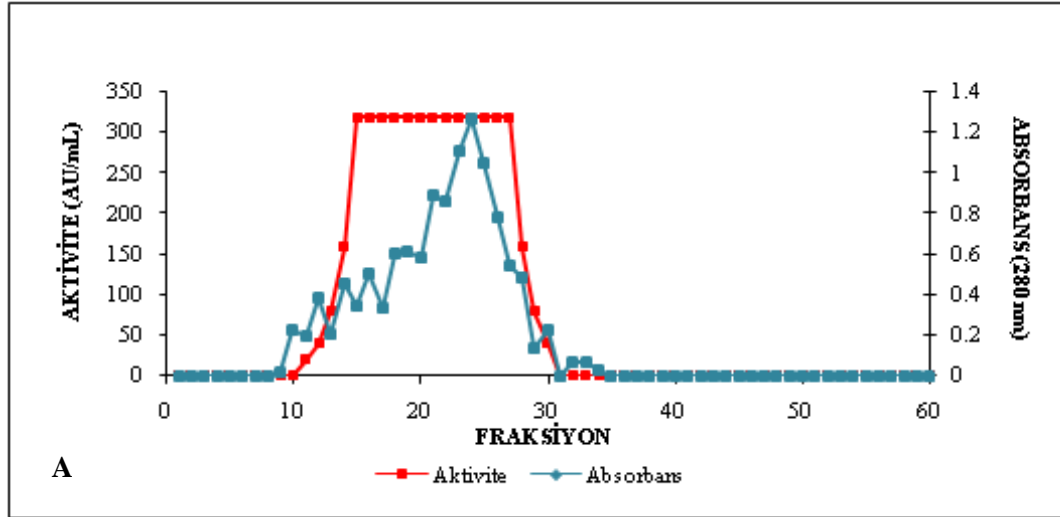
bakteriostatik etki sebebi ile inhibisyon aktivitesini kısa bir süre sonra kaybettiğini gösterdi. Burada diyaliz membranı gözeneklerinin molekülün küçük olması sebebi ile uygun olmadığı anlaşıldı. Saflaştırmanın bu aşaması Sm-Mm3 için başarısızlıkla sonuçlandı.



Şekil 24. Kısmi saflaştırılan hedef bakteriyosinlerin inhibisyon aktivitesi. A; Bt-Bn1, B; Sm-Mm3, A.S.Ç.; Amonyum Sülfat Çöktürmesi, dy; Doğunluk

3.6.5. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Bu çalışmada, kolon dolgu maddesi olarak moleküllerin özellikleri dikkate alınarak iki farklı dolgu maddesi kullanıldı. Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen molekülün saflaştırılması amacıyla Sephadex G-50, Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen molekülün saflaştırılması amacıyla ise Sephadex G-10 kullanıldı. Uygun prosedür ile hazırlanan kolon steril dH₂O ile yıkanıp kararlı hale getirildi. Bt-Bn1 için konsantre diyalizattan 3 mL örnek kolona yüklenirken, Sm-Mm3 için konsantre diyalizat örneği olmadığı için kolona başarılı %50 doğunluktaki amonyum sülfat çöktürme örneğinin 3 mL'si yüklendi. dH₂O kullanılarak akış hızı 30 mL/saat olacak şekilde akış başlatıldı ve kolondan çıkan örnekler, eppendorf tüplerine 1,5 mL hacminde toplandı. Fraksiyon toplanmasına 280 nm'deki absorbansı sıfırlanana kadar devam edildi. Ardından toplanan bu fraksiyonların 280 nm absorbansları kullanılarak kalitatif protein tayini ve aynı zamanda kuyu difüzyon yöntemi ile aktivite tayini yapıldı. Aktivite ve 280 nm'deki absorbanları dikkate alınarak grafik oluşturuldu ve aktif molekülün kolondan çıktığı aralık belirlendi (Şekil 25A).



Şekil 25. Bakteriyosinlerin jel filtrasyon kromatografi kromotogramı. A; Bt-Bn1, B; Sm-Mm3

Bu çalışmanın sonucunda, Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün 11-30 aralığındaki fraksiyonlarda toplandığı tespit edildi (Şekil 25A). Ardından bu fraksiyonlar dört grupta toplanarak ultrafiltrasyon için kullanılan özel falkonlar tüpler kullanılarak konsantre edildi. Dört konsantre kısmi saflaştırılmış örneğin, aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri belirlendi (Tablo 27). Elde edilen örneklerden konsantre C'nin hem aktivitesinin oldukça yüksek olması hem de yapılan SDS-PAGE çalışması ile şekil 30'da görüldüğü gibi saflığının oldukça iyi olduğunun gözlenmesi sonucunda HPLC çalışmasında kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen molekülün ise 15-30 arasındaki fraksiyonlarda elde edildiği belirlendi ancak aktivitenin oldukça düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 25B). Bu sebeple elde edilen örnekler sonraki saflaştırma aşamasına taşınmadı. Bu çalışma özellikle tuz yoğunluğunun ve küçük moleküllerin ortadan kaldırılması amacıyla diyalizin yerine kullanılabilir alternatif bir metot olmasıyla istekleri karşılayan pozitif bir sonuç verirken, çıkan örneklerin aktivitelerinin düşük olması (≤ 160 AU/mL) istenmeyen, negatif bir sonuç doğurdu.

Tablo 27. Jel filtrasyon kromatografisi ile elde edilen Bt-Bn1 aktif fraksiyonlarının aktiviteleri

Konsantre Örnek	Fraksiyon No	Aktivite (AU/mL)	Protein Miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	Spesifik Aktivite (AU/mL)
A	11-15	320	0,2784	1149,30
B	16-20	640	0,0543	11786,4
C*	21-25	1280	0,0650	19692,2
D	26-30	160	0,0340	4705,90

*: aktivitenin en iyi olduğu örnek

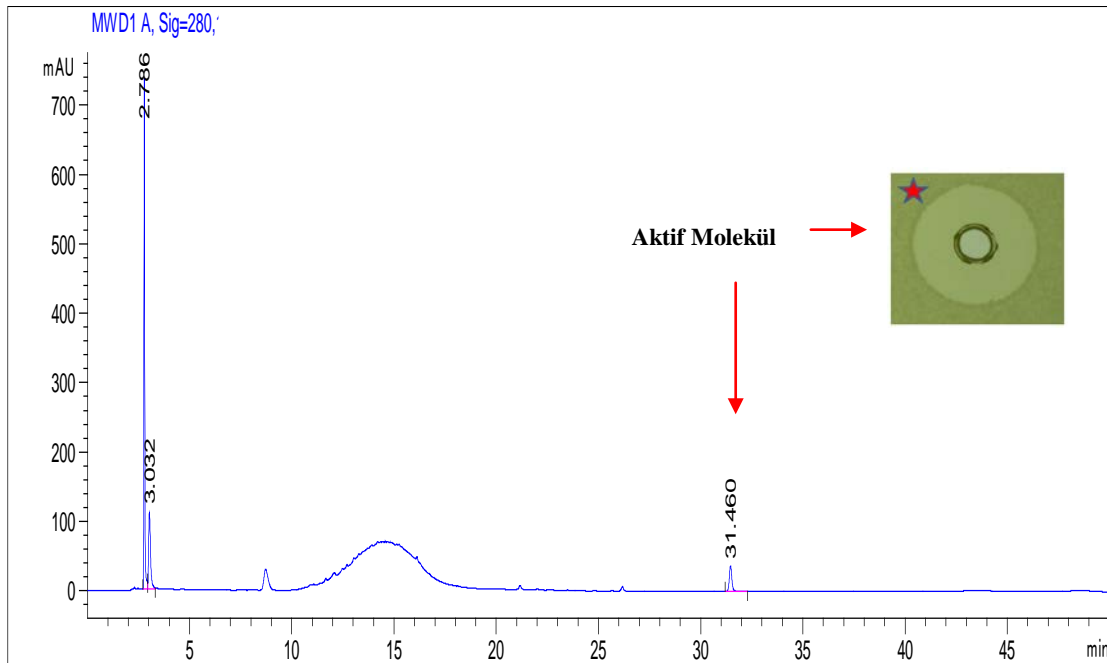
3.6.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Bt-Bn1 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün saflaştırılmasında kullanılan optimize doğrusal gradient şartları Tablo 28'de gösterildi. Bu çalışmanın sonucunda, Bt-Bn1 molekülünün bir çok saflaştırma aşaması ile başarılı bir şekilde saflaştırılması sebebi ile fraksiyon toplayıcıda sadece oniki fraksiyon elde edildi. HPLC sonrasında elde edilen oniki fraksiyonun aktivitesine kuyu difüzyon metodu ile bakıldı. Bunlar içerisinde 12. fraksiyonun aktif molekülü içerdiği belirlendi ve HPLC kromatogramında aktif pikin (aktif molekülün) 31.160 dakikada kolondan çıktığı belirlendi (Şekil 26). Saf bir şekilde elde edilen aktif molekül belirlenen aralıkta 15 kez toplandı ve liyofilize edilerek konsantre edildi. Ardından protein miktarı ve aktivitesi belirlenerek spesifik aktivite ve özellikle saflaştırma katsayısı hesaplandı (Tablo 29).

Tablo 28. Bt-Bn1 bakteriyosininin saflaştırılması için HPLC optimize doğrusal gradient şartları

Süre	Çözücü A	Çözücü B
0.00	95,0	5,00
5.00	95,0	5,00
12.00	65,0	35,0
15.00	65,0	35,0
32.00	30,0	70,0
36.00	30,0	70,0
40.00	5,00	95,0
45.00	5,00	95,0
50.00	95,0	5,00

Çözücü A; H₂O (%0,05 TFA içerikli), Çözücü B; Asetonitril



Şekil 26. Bt-Bn1 bakteriyosininin HPLC kromatogramı. (★); kuyu difüzyon yöntemi ile 31.460 dk toplanan fraksiyonun aktivitesi

Birbirini başarı ile takip eden saflaştırma aşamalarının sonrasında tüm basamakları içeren bir tablo oluşturularak saflaştırma katsayısı hesaplandı. Sonuç olarak *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün 78 kat saflaştırılarak elde edildiği gösterildi (Tablo 29). Saflaştırılan bu molekülün tanımlanması amacıyla TOF-MS ve görüntülenmesi amacıyla da SDS-PAGE çalışması yapıldı (Şekil 28 ve Şekil 30).

Tablo 29. Bt-Bn1 bakteriyosinin saflaştırılma özeti

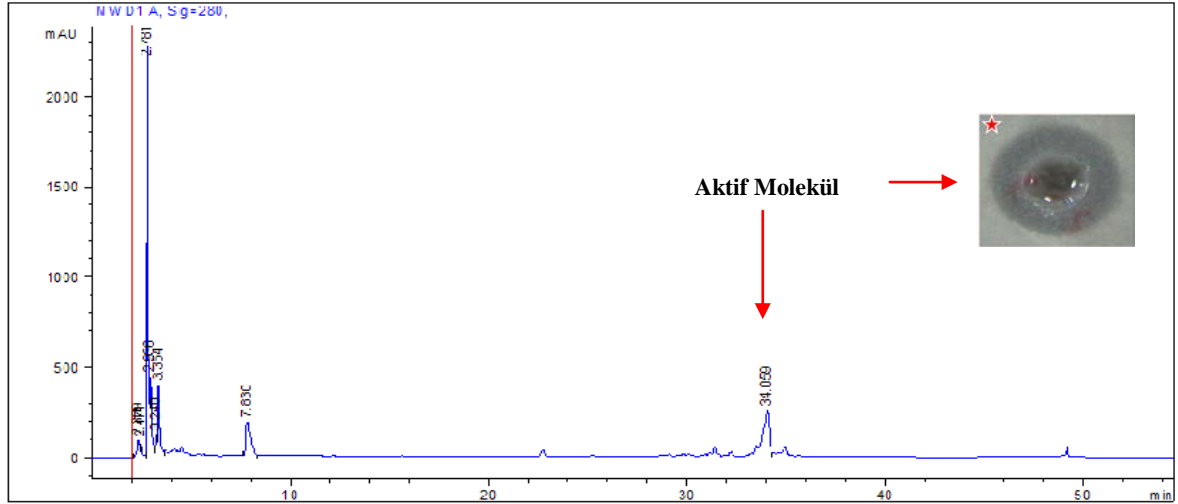
Örnek	Hacim (mL)	Aktivite (AU/mL)	Protein (mg/mL)	T. Protein (mg/mL)	T. Aktivite (AU/mg)	S. Aktivite (AU/mg)	Saf. Katsayısı
Süpernatant	450	160	0,2550	114,8	72000	627,5000	1
A.S.Ç.	025	2560	0,7160	17,90	64000	3575,300	05,70
Diyaliz	020	1280	0,0997	1,900	25600	12838,40	20,45
Ultrafiltrasyon	005	2560	0,1956	0,900	12800	13087,80	20,86
J.F.K	005	1280	0,0650	0,300	06400	19692,31	31,38
HPLC	0,30	1280	0,0260	0,030	00384	49230,80	78,46

Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen aktif molekülün saflaştırılmasında kullanılan HPLC optimize linear gradient şartları Tablo 30'da gösterildi. Diğer aşamalardaki başarısızlıklar sebebi ile %50 amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen aktif molekül içerikli örneğin 100 µL'si, HPLC kolonuna enjekte edildi. Burada saflaştırılan diğer molekülde olduğu gibi sadece 12 fraksiyon değil, saflaştırılmasında yaşanan aksilikler sebebi ile optimizasyon çalışmaları sırasında, farklı çalışmalarla 63, 40, 56, 25 gibi çok sayıda fraksiyon elde edildi. Elde edilen tüm fraksiyonların aktivitesine kuyu difüzyon metodu ile bakıldı. Şartların optimize edildiği en son HPLC çalışması sonucunda 25 fraksiyon elde edildi ve bunlar içerisinde 23. fraksiyonun aktif olduğu gösterildi (Şekil 27). Bu çalışmanın neticesinde aktif molekülün 34.059 dakikada kolondan çıktığı belirlendi. Bu çalışma ile molekülün tanımlanabilmesi için gerekli saf örnek başarılı bir şekilde elde edildi. Ancak saflaştırılan örnekte protein miktarının belirlenememesi sebebi ile Bt-Bn1 bakteriyosininde olduğu gibi saflaştırılma tablosu oluşturulamadı.

Tablo 30. Sm-Mm3 bakteriyosininin saflaştırılması için HPLC optimize doğrusal gradient şartları

Süre	Çözücü A	Çözücü B
0.00	5,00	95,0
2.00	5,00	95,0
35.00	50,0	50,0
40.00	50,0	50,0
45.00	95,0	5,00
50.00	95,0	5,00
55.00	5,00	95,0

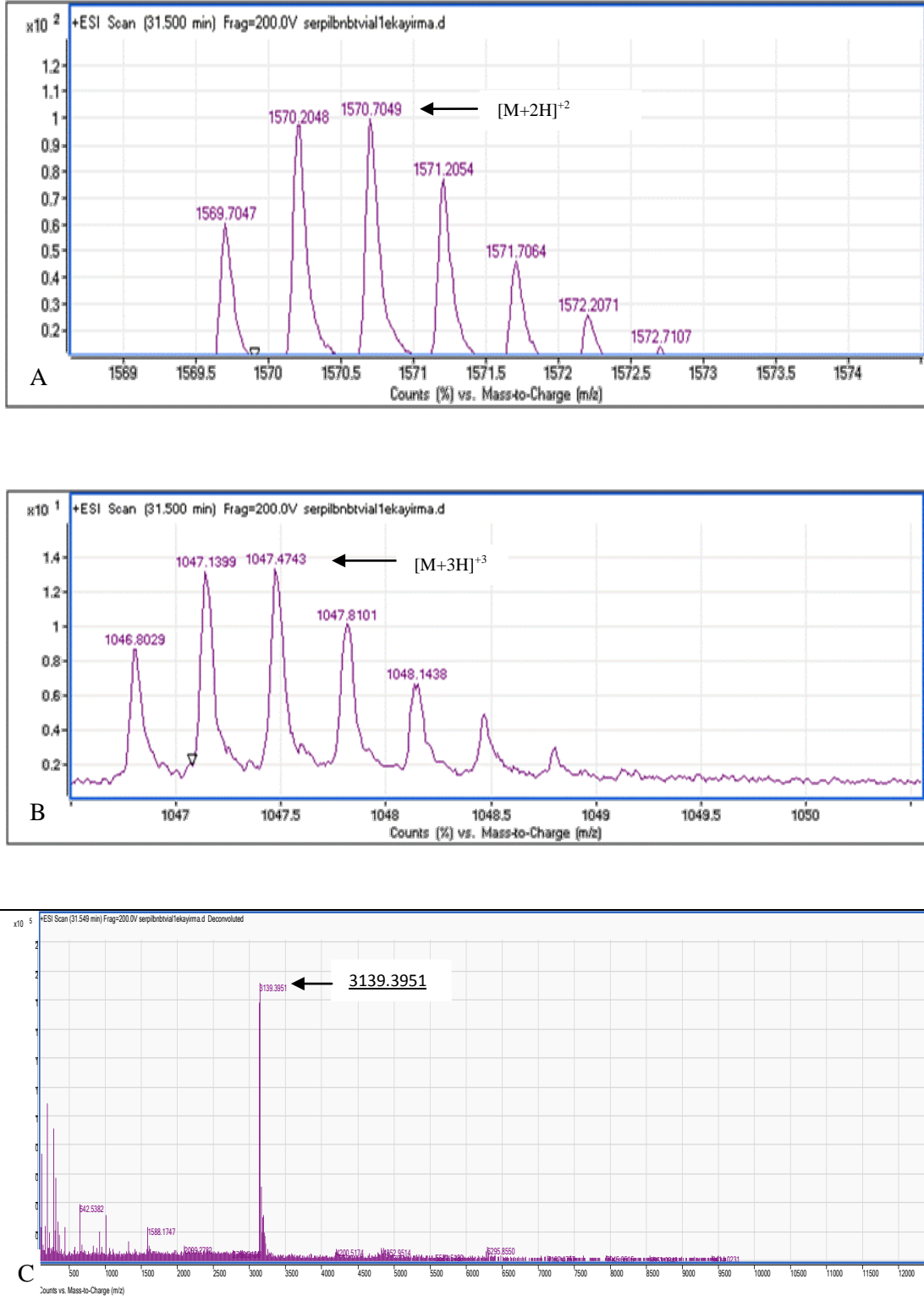
Çözücü A; H₂O (%0,05 TFA içerikli), Çözücü B; Asetonitril



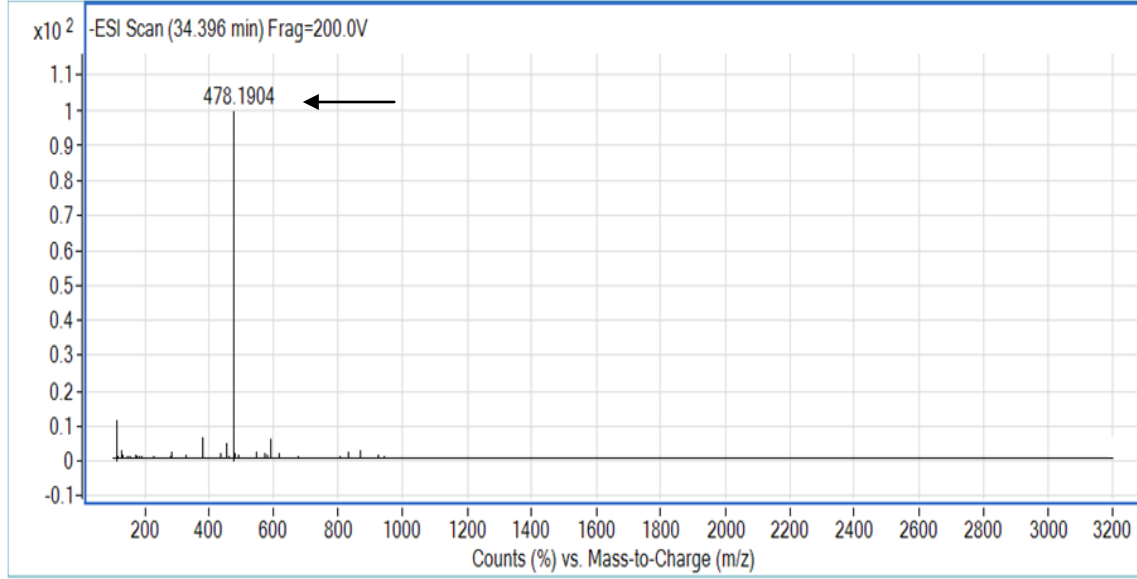
Şekil 27. Sm-Mm3 bakteriyosininin HPLC kromotogramı. (★); kuyu difüzyon yöntemi ile 34.059 dk toplanan fraksiyonun aktivitesi

3.7. Hedef Bakteriyosinlerin Tanımlanması

Moleküllerin kesin kütlelerinin belirlenerek tanımlanabilmesi amacıyla yapılan uçuş zamanlı kütle spektrometrisi sonucunda *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) tarafından üretilen molekül için iki farklı kromotogram elde edildi. Bunlardan ilki 1570 Da iki yüklü molekül (iyon) $[M+2H]^{+2}$ gösteren kromotogram (Şekil 28A), diğeri 1047 Da üç yüklü molekül (iyon) $[M+3H]^{+3}$ gösteren kromotogramdır (Şekil 28B). Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisinde kütlelerinin belirlenmesi istenen molekülün özelliği doğrultusunda sonuçlar elde edilmekte ve bu sonuçlar değerlendirilerek kesin kütle hesaplanmaktadır. Bu sistemde kullanılan elektron bombardımanı karşısında küçük moleküller kararlı bir şekilde tek iyon formunda karşımıza çıkarken Bt-Bn1 tarafından üretilen molekül gibi büyük moleküller yapılarını, tek iyon formunu, koruyamamakta ve belirli bölgelerinden kopmalar meydana gelmektedir. Bunun sonucunda ortamda çoklu iyonların oluşumu söz konusu olmaktadır. Ardından bu iyonlardan yola çıkarak gerçek kütle hesabı manual ya da var olan Agilent Mass Hunter programı yardımıyla yapılmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak HPLC ile saf bir şekilde elde edilen Bt-Bn1 tarafından üretilen antibakteriyal molekülün TOF-MS ile 3139.3951 Da büyüklüğünde olduğu belirlendi (Şekil 28C). Bu çalışmanın sonucunda negatif iyon modunda Sm-Mm3 bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün ise küçük olması sebebi ile 479 Da büyüklüğünde olduğu TOF-MS spektrumunda baskın tek bir pik ile belirlendi (Şekil 29).



Şekil 28. Bt-Bn1 bakteriyosinin TOF-MS spektrumu. A; iki yüklü iyon $[M+2H]^{+2}$ kromotogramı, B; üç yüklü iyon $[M+3H]^{+3}$ kromotogramı, C; Bt-Bn1 bakteriyosinin hesaplanan gerçek külesini gösteren TOF-MS spektrumu.



Şekil 29. Sm-Mm3 bakteriyosininin TOF-MS spektrumu

3.8. Veri Tabanı Analizi

Elde edilen kütle bilgileri evrensel METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) ve BACTIBASE (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>) veri tabanları kullanılarak tarandı.

Bacillus thuringiensis (Bt-Bn1) tarafından üretilen molekülün Bactibase veri tabanında yapılan tarama sonucunda Thuricin H (Accession no BAC201) ile eşleştiği gözlemlendi. Thuricin H, baldan izole edilen *B. thuringiensis* suşu tarafından üretilen, 3,139 kDa büyüklüğünde, anti-*Listerial* aktiviteye sahip bir bakteriyosindir. Molekül kütleleri yanında *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) tarafından üretilen molekül ile bir çok özellik açısından da benzer olduğu görüldü.

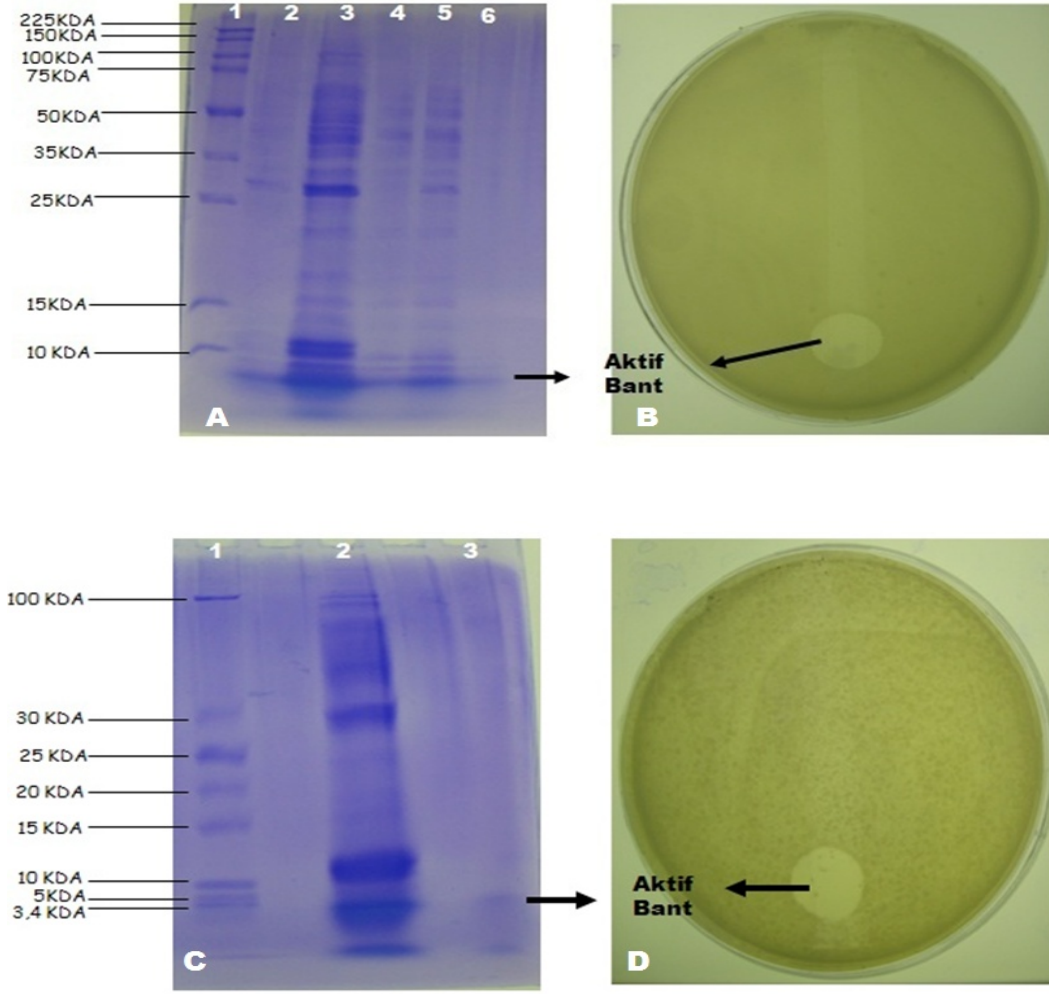
Bactibase veri tabanında yapılan tarama sonucunda, *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekül ile herhangi bir molekül eşleşmesi gerçekleşmedi. Metlin veri tabanı kullanılarak molekül büyüklüğüne göre yapılan analiz sonrasında ise 29 farklı olası molekül yapısı elde edildi. Bu moleküller arasında doğal olmayan sentetik bileşikler, bitkilerde antibakteriyal özelliği olmayan boyar maddeler gibi olasılık dahilinde olmayan, sadece molekül büyüklükleri benzer moleküllerin olduğu belirlendi. Bu ihtimal dışı moleküllerin haricinde, veriler içerisinde 12 olası molekül yapısının üç aminoasitten oluşan peptitleri işaret ettiği gözlemlendi.

3.9. Safılaştırılan Moleküllerin Belirlenmesi

3.9.1. SDS-PAGE ile Belirlenmesi

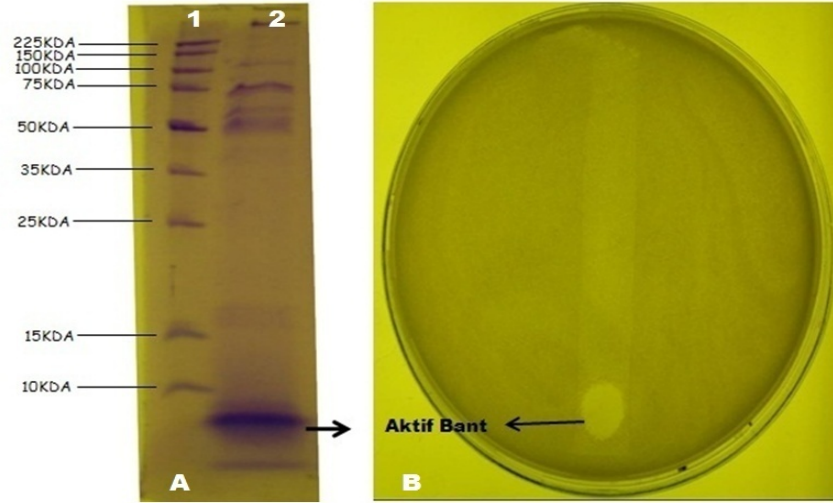
Saf olarak elde edilen aktif moleküllerin görüntülenmesi amacıyla Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem doğrultusunda %15'lik Tris-Glisin SDS-PAGE yapıldı. Marker ve uygun şekilde hazırlanan her saflaştırma aşamasında elde edilen örnekler iki tekrarlı olacak şekilde polimerleşmiş jel kuyularına yüklendi ve yürütüldü. Bu işlem bitiminde jel ikili tekrarlar dikkate alınarak düzgün bir biçimde kuyu boyunca kesildi ve her biri içerdikleri örneğin karıştırılmaması amacıyla işaretlendi. Jelin kesilen örneklerin tekrarını içeren kısmı CBB-G250 ile hazırlanmış boyama çözeltisi içerisinde alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar yaklaşık 1 saat boyunca çalkalanarak boyandı ve ardından boyanın fazlası arıtılarak beyaz ışık kaynağı altında protein bantları incelendi. Diğer tarafta doğrudan jelde aktivite çalışmaları yürütüldü ve aktif bantın yeri tespit edildi.

Yapılan çalışma sonrasında *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) tarafından üretilen molekülün saflaştırma aşamaları sonucunda elde edilen bantlar değerlendirildiğinde beklenildiği gibi sonuç verdiği gözlemlendi. 3.139 Da büyüklüğündeki molekülün en küçük 10 kDa protein içerikli marker kullanıldığında, aktif bantların bulunduğu noktanın 10 kDa'dan oldukça küçük olduğu gözlemlendi (Şekil 30A). En küçük 3,4 kDa büyüklüğünde protein içerikli marker kullanıldığında ise aktif molekülün 3,4 kDa'dan daha küçük olduğu gösterildi (Şekil 30C). Ancak molekülün çok küçük ve seyreltik olması yoğun bir bant görünümünden ziyade silik bir bant şeklinde gösterildi. Özellikle HPLC saflaştırmasında 100 µL gibi küçük bir enjeksiyon hacmine sahip olması elde edilen molekülün konsantrasyonunun düşük olmasına sebep oldu. Konsantrasyonun artırılması amacıyla çok kez HPLC işlemi tekrarlanarak aktif fraksiyonlar toplanarak birleştirildi ve ancak molekül SDS-PAGE ile görünür hale getirilebildi. Doğrudan aktivite testinde ise jelin boyanan kısmında bant görünmese dahi aktif molekülün olduğu noktada inhibisyon zonu net bir şekilde gözlemlendi (Şekil 30B ve D). Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda ve takip eden diğer çalışmalarda en yoğun bantın yine *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal moleküle ait olduğu doğrudan aktivite testi ile ortaya çıkarıldı



Şekil 30. Bt-Bn1 bakteriyosininin SDS-PAGE ve jelde doğrudan aktivitesi. A; 1. Belirteç, 2. Aktif süpernatant, 3. %50 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi, 4. Diyaliz, 5. Ultrafiltrasyon, 6. Jel filtrasyon kromatografisi (konsantre C örneği). B; Jel filtrasyon kromatografisi örneğinin (6 no'lu örnek) jelde doğrudan inhibisyon aktivitesi. C; 1. Belirteç, 2. %50 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi, 3. HPLC saflaştırması. D. HPLC örneğinin jelde doğrudan inhibisyon aktivitesi

Serratia marcescens (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün ise çok küçük (479 Da) ve konsantrasyonunun çok düşük olması sebebiyle jelde net bir bant şeklinde gösterilemedi. Ancak amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örneğin jele yüklenmesi ve yürütülmesi sonucunda molekülün bulunduğu aralık, doğrudan aktivite testi ile oluşan inhibisyon zonu sayesinde gösterilebildi (Şekil 31). Aktif molekülün yükleme boyasının hemen üstünde olduğu, yoğun olarak gözlenen bantın ise altında olduğu yapılan çalışmalarla belirlendi.



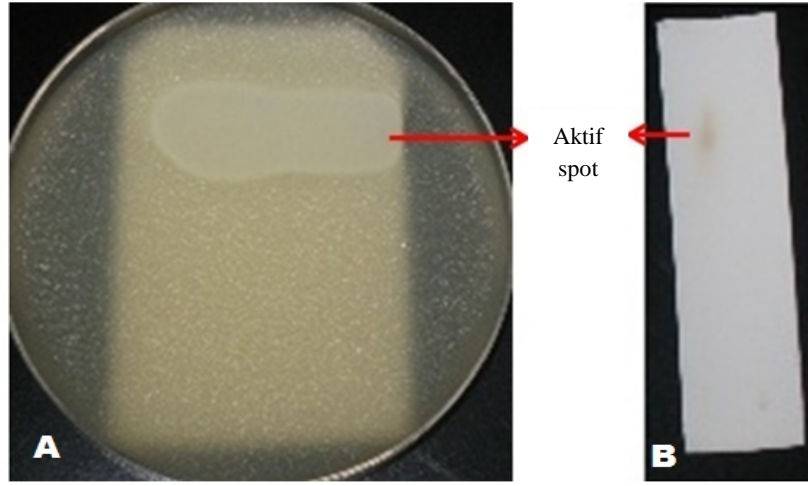
Şekil 31. Sm-Mm3 bakteriyosininin SDS-PAGE ve jelde doğrudan aktivitesi. A; 1. Marker, 2. %50 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi, B; bu örneğin jelde doğrudan inhibisyon aktivitesi.

3.9.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Belirlenmesi

Serratia marcescens (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün çok küçük olması SDS-PAGE ile net bir şekilde görüntülenmesine engel oldu. Hem daha net görüntülenmesini sağlamak hem de farklı bir saflaştırma metodunu uygulamak amacıyla böyle bir çalışma planlandı. Öncelikle böylesi küçük kütleyle sahip moleküllerin süpernatanttan ekstre edilebileceği bilgisine dayanarak (El-Naggar vd., 2001) molekülün ekstre edileceği en uygun çözücü seçildi. Kloroform, etanol ve metanol gibi farklı çözücüler arasından maksimum ekstraksiyonu sağlayan kloroform tercih edildi. Aktif süpernatant/kloroform; 500 mL/100 mL oranında ekstraksiyon yapıldı ve sulu faz ile organik faz birbirinden dikkatlice ayrıldı. Ardından kuyu difüzyon yöntemi ile hem sulu fazın hem de organik (çözücü) fazın aktivitesine bakıldı. Öncesinde aktif olduğu belirlenen sulu fazın tamamen aktivitesini kaybettiği organik fazın ise yüksek bir aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Bu sonuç bize aktif molekülün tamamının çözücüye nüfuz ettiğini gösterdi. Çözücü içerisindeki aktif molekülün konsantre edilmesi amacıyla, evaporatör ile çözücü uzaklaştırıldı ve elde edilen sarı çökelek kloroform ile çözülerek +4°C’de muhafaza edildi. Sonrasında elde edilen örnek slika jel plakaya yüklendi ve farklı konsantrasyonlardaki çözücü içerisinde yürütüldü. Bu çözücülerin kullanımı farklı sürüklenme değerlerini (R_f) ortaya çıkardı. Kloroform çözücüsü kullanıldığında R_f değeri

0,34, etanol kullanıldığında R_f değeri 0,53, etanol:kloroform (95:5) kullanıldığında ise R_f değeri 0,68 olarak hesaplandı. Bunlar içerisinde en iyi sonucu veren Etanol:kloroform karışımı tercih edildi (Şekil 32B).

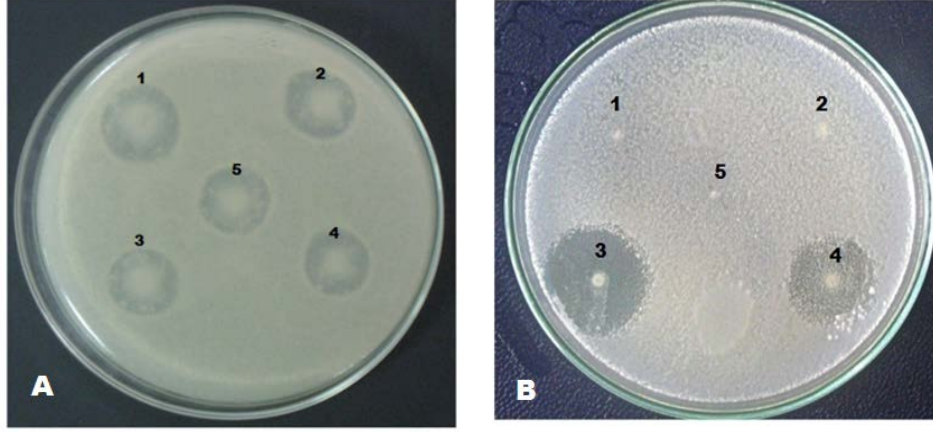
Biyootogram çalışması amacıyla, ince tabaka kromatografisinde örnek belirli bir noktaya yayılarak çizgi şeklinde yüklendi ve tercih edilen çözücü içerisinde yürütüldü. Yürüme sonrasında plakanın bir kısmı kesilerek yakıldı, diğer kısmı ise biyootogram için agar içerikli petri üzerine yerleştirildi ve üzeri indikatör bakteri içerikli yumuşak agar ile tamamen örtüldü. 16-18 saat inkübasyon süresi sonucunda yakılarak görünür hale gelen molekülün bulunduğu noktada inhibisyon zonu oluştuğu gözlemlendi (Şekil 32A).



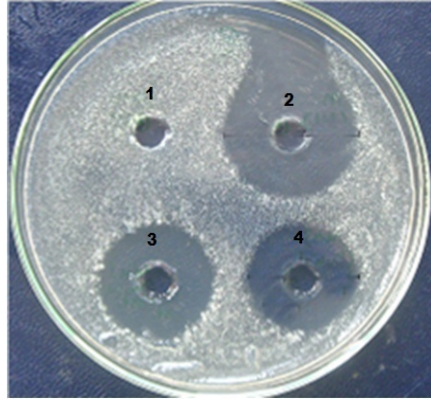
Şekil 32. Sm-Mm3 bakteriyosininin ince tabaka kromatografisi. A; biyootogram, B; ince tabaka kromatografisi.

3.10. Bakteriyosinlerin Moleküler Karakterizasyonu

Aktif molekülün ekspresyonundan sorumlu genlerin kromozomal ya da plazmit kökenli olup olmadığını anlayabilmek amacıyla tasarlanan bu çalışmanın sonucunda, *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) bakterisinin plazmit eliminasyon çalışmaları sonucunda da aktif molekülü üretebildiği gözlemlendi ve molekülün kromozomal kökenli olduğu ortaya çıkarıldı (Şekil 33A). *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen molekülün ifadesinde ise plazmitin sorumlu olduğu belirlendi. Plazmit eliminasyon çalışması sonucunda aktif molekülü üretme kapasitesini kaybeden mutant *Serratia marcescens* bakterileri elde edildi (Şekil 33B ve Şekil 34).



Şekil 33. Plazmit eliminasyonu sonucu Bt-Bn1 ve Sm-Mm3 bakterilerinin agar nokta ekim yöntemi ile inhibisyon aktivitesi. A; 1, 2, 3, 4 ve 5, aktif madde üretme yeteneğini kaybetmemiş Bt-Bn1 bakteri kolonilerini, B; 1, 2 ve 5, aktif madde üretme yeteneğini kaybeden Sm-Mm3 bakteri kolonileri, 3 ve 4, aktif madde üretme yeteneğini kaybetmeyen Sm-Mm3 bakteri kolonilerini göstermektedir.



Şekil 34. Plazmit eliminasyonu sonucu Sm-Mm3 bakterisinin kuyu difüzyon yöntemi ile inhibisyon aktivitesi. 1; plazmit eliminasyonu ile aktif madde üretme yeteneğini kaybeden bakteri kültür süpernatantı, 2; plazmit eliminasyonu yapılan (kontrol) bakteri kültür süpernatantı. 3 ve 4; plazmit eliminasyonu ile aktif madde üretme yeteneğini kaybetmeyen kolonileri göstermektedir.

3.11. Hedef Bakteriyosinlerin Bazı Bitki Patojenleri Üzerine Etkisi

Saflaştırılarak tanımlanan iki bakteri tarafından üretilen moleküllerin bitkilerde hastalık etmeni bakterilere karşı inhibisyon aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi ile test edildi (Tablo 31). Bu çalışma yapılacak alan uygulaması (in vivo) çalışmalarının ön hazırlığı olması açısından büyük önem taşımaktadır.

Tablo 31. Hedef bakteriyosinlerin bazı bitki patojeni bakteriler üzerine etkisi

Bitki Patojeni İzolatlar	İnhibisyon aktiviteleri	
	Bt-Bn1	Sm-Mm3
<i>Erwinia amylovora</i>	-	+
<i>Erwinia chrysanthum</i>	-	-
<i>Erwinia sp.</i>	-	-
<i>Erwinia sp.</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
<i>Paucimonas lemoignei</i>	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	-	-
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	-	-
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	+	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i>	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	+
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	-	-

(+);inhibisyon aktivitesi var, (-); inhibisyon aktivitesi yok.

4. TARTIŞMA

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen ve bu bakteriler ile aynı ortamı paylaşan diğer bakterilerin gelişimi üzerinde inhibisyon etkisi göstererek sentezlendiği bakteriye avantaj sağlayan protein yapıları moleküllerdir. Bakteriyosinlerin insanlığa ve çevreye zararsız bir molekül olması bilim dünyasında dikkatleri üzerine çekmiştir. Birçok farklı alanda problem oluşturan patojen bakterilerin inhibisyonunda bakteriyosinlerin kullanımı yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Özellikle çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip patojenlerin dramatik bir şekilde artışı ve birçok alanda bu dirençli patojenlerle yapılacak mücadelede çıkmazların yakın olduğu günümüz dünyasında en önemli alternatifler içerisinde değerlendirilen bakteriyosinlerin önemi daha da artmıştır.

Bakteriyosinlerin keşfinden bu yana geçen uzun zaman sürecinde birbirinden farklı özelliklere sahip birçok yeni molekül tanımlanmış ve her geçen gün hızla bu moleküllere yenileri eklenmiş olmasına rağmen birçok bakteri grubu tarafından üretilen bakteriyosinler hakkındaki bilgiler kısıtlı kalmıştır. Entomopatojenik bakterilerin bakteriyosin üretme kapasitesi hakkında literatürdeki bilgilerin oldukça sınırlı olmasına rağmen özellikle entomopatojenik özelliğe sahip *Bacillus thuringiensis* bakterilerinin çok iyi bakteriyosin üreticisi oldukları bilinmektedir (Paik vd., 1997; Cherif vd., 2003). Doğadaki bir çok farklı habitatta hemen hemen tüm bakteriler tarafından ekolojik rekabet maksadı ile üretilen bakteriyosinlerin entomopatojenik bakteriler tarafından üretilmesi beklenen bir durumdur.

Belirtilen bilgilerin ışığı altında bu tez kapsamında, gün geçtikçe kullanım alanları genişleyen böylesi önemli bakteriyosin moleküllerine yenilerini eklemek ve biyolojik mücadele alanında kullanım potansiyellerini belirlemek amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, bu çalışmada Coleoptera grubu fındık zararlısı böceklerden (6 farklı tür) izole edilen test bakterilerinin (37 bakteriyal izolat) bakteriyosin üretme kapasitelerini araştırmak amacıyla, literatürde ön tarama çalışmaları içinde en sık kullanılan ve doğrudan tarama metodlarından biri olan agar nokta ekim yöntemi kullanıldı (Paik vd., 1997). Bu yöntemin uygulanması sonucunda, farklı indikatör bakterilerin gelişimini inhibe etme özelliği gösteren yani bu yöntem açısından pozitif sonuç veren beş bakteri tespit edildi. Bunlar; *P. fluorescens* (Pf-Xd1 ve Pf-Aa4), *B. polymyxa* (Bp-Ar2), *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *S. marcescens* (Sm-Mm3) izolatlarıdır. Seçilen test ve indikatör bakteriler dikkate alındığında, entomopatojen bakteriler arasında bakteriyosin benzeri

madde üretim oranının agar nokta ekim yöntemine göre yaklaşık %13,5 olduğu görüldü. Barboza-Corona ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan benzer bir çalışmada 50 farklı *Bacillus thuringiensis* suşu antibakteriyal aktivite açısından agar nokta ekim yöntemi ile test edilmiş ve bu bakteriler arasından onbirinin bakteriyosin benzeri madde üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir ve bakteriyosin üretim oranının %22 olduğu görülmektedir. Yine farklı bir çalışmada agar nokta ekim yöntemi ile 20 farklı LAB suşundan altı izolatin bakteriyosin benzeri madde üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Mezaini vd., 2009). Bu çalışma sonrasında elde edilen bakteriyosin üretim oranının ise %30 olduğu görülmektedir. Böylesi örneklerin sayısını arttırmak mümkündür. Ancak sonuçlar kendi aralarında kıyaslandığında, beklenildiği gibi bu oran laktik asit bakterilerinde maksimum seviyelere ulaşmaktadır. Ancak entomopatojenik bakterilerinde diğer bakteriler kadar olmasa da göz ardı edilmeyecek bir oranda bakteriyosin ya da benzeri madde üretme potansiyeline sahip olduğu bu çalışmanın sonucunda görülmektedir.

Ardından indirekt tarama yöntemleri içerisinde değerlendirilen kuyu difüzyon yöntemi ile seçilen beş test bakterisinin süpernatantında bakteriyosin varlığı arandı ve varlığı tespit edilenlerin aktivite spektrumları belirlendi (Padilla vd., 1996). Kuyu difüzyon yönteminin uygulanması sonucunda, ön tarama çalışması ile pozitif sonuç veren *P. fluorescens* (Pf-Xd1 ve Pf-Aa4) izolatları tarafından üretilen moleküllerin bakteri kültür süpernatantında olmaması, *B. polymyxa* (Bp-Ar2) tarafından üretilen molekülün bakteri süpernatantından elde edilmesi ancak aktivitesinin düşük ve aktivite spektrumunun dar olması sebebi ile bir sonraki karakterizasyon aşamaları için tercih edilmediler. *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *S. marcescens* (Sm-Mm3) bakterileri tarafından üretilen moleküllerin ise hem bakteri süpernatantından elde edilebilmesi hem de kuyu difüzyon metodu ile geniş aktivite spektrumuna sahip olduklarının belirlenmesi sebebi ile sonraki karakterizasyon çalışmaları için *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) izolatları tercih edildi.

Aktif molekülü karakterize edebilmek için, bakteri kültür süpernatantında aktivitenin belirlenmesi mutlaka gerekmektedir, çünkü karakterizasyonun her aşamasında hücresiz kültür süpernatantları kullanılmaktadır. Pf-Aa4 ve Pf-Xd1 izolatlarında olduğu gibi, agar nokta ekim yöntemi ile inhibisyon açısından pozitif sonuç veren bakterilerin, kuyu difüzyon yönteminde negatif sonuç vermesi literatürde rastlanılan bir sonuçtur. Bu olayı açıklayan birçok sebep öne sürülmüştür. Ammor ve arkadaşlarının (2006) LAB ile

yaptıkları bir çalışmada, antibakteriyal aktivite açısından taranan 87 bakterinin 21 tanesinin hem agar ortamında hem de bakterilerin kültür süpernatantında pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Geri kalan izolatların ise bakteri kültür süpernatantlarında antibakteriyal bir etkiye rastlanamamıştır. Araştırmacılar, bu durumla ilgili iki hipotez öne sürmüşlerdir. Birinci hipoteze göre, bakteriyosin benzeri bileşik, N-terminal hidrofilitik kısım ve C-terminal hidrofobik kısım içeriyor olabileceği ve bu hidrofobik kısımlar, filtrenin hidrofilitik bileşeni tarafından adsorblanıyor olabileceğidir. İkinci hipotez ise bakteriyosin benzeri bileşiğin üretici hücrenin membranına yapışık olduğu ve bu yüzden, indikatör bakteri ile üretici bakteri temasta olamadığı sürece inhibisyon gözlenmeyeceği şeklindedir (Ammor vd., 2006; Başbülbul, 2009). Broth ortamında inhibitör etkinin kaybolmasının bir diğer nedeninde, gelişim sırasındaki protein inaktivasyonu olabileceği bildirilmektedir (Barefoot ve Klaenhammer, 1984; Lyon ve Glatz, 1991).

Bacillus thuringiensis (Bt-Bn1) tarafından üretilen antibakteriyal molekül;

Kuyu difüzyon yöntemi ile *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) tarafından üretilen molekülün, *Listeria monocytogenes*, farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *Bacillus cereus* ve *Bacillus weihenstephanensis* gibi farklı tür bakterilere karşı inhibitör aktivitesi olduğu belirlendi. Bu antibakteriyal molekülün, çalışmada kullanılan 65 indikatör bakteri içerisinde onikisine (%18) karşı aktif olduğu belirlendi. Spektrumunun oldukça dar olduğu belirlenen bu molekülün önemini, *Listeria monocytogenes* ve *Bacillus cereus* gibi patojen bakterilere karşı inhibisyon aktivitesine sahip olması fazlasıyla arttırmaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *Bacillus thuringiensis*'in farklı suşları tarafından üretilen Thuricin 439, Thuricin S, Thuricin H ve Thuricin 7 gibi bakteriyosinlerin oldukça farklı inhibisyon spektrumlarına sahip oldukları belirlenmiştir. Bunlar arasında, Thuricin 439 gibi sadece *B. cereus* ve *B. thuringiensis* suşlarına karşı inhibisyon aktivitesi gösteren oldukça dar inhibisyon spektrumuna sahip bakteriyosinler bulunduğu gibi, Thuricin S gibi *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. t. subsp. darmastadiensis* 10T, *B. subtilis*, *Enterococcus cloacae*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *L. monocytogenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *Salmonella choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. newport*, *Shigella flexneri* gibi bakterilere karşı inhibisyon aktivitesi gösterebilen geniş spektruma sahip bakteriyosinlerde bulunmaktadır (Ahern vd., 2003; Chehimi vd., 2007).

Bu tez kapsamında tanımlanan Bt-Bn1 bakteriyosininin inhibisyon spektrumu açısından diğer *B. thuringiensis* bakteriyosinleri karşılaştırıldığında hiçbiri ile birebir örtüşmemekle birlikte Thuricin 439 ile kıyaslandığında daha geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduğu, Thuricin S ile karşılaştırıldığında ise daha dar bir spektruma sahip olduğu söylenebilmektedir. Yine inhibisyon aktivitesi gösterdiği diğer indikatör bakteriler ve özellikle *L. monotocytogenesis*'e karşı aktif olması açısından, aktivite spektrumunun özellikle Thuricin H ve Thuricin 7'ye yüksek oranda benzerlik gösterdiği söylenebilmektedir. Dikkat edilecek diğer bir hususta bu çalışmalarda inhibisyon spektrumu aydınlatılırken kullanılan indikatör bakterilerin birbirlerinden oldukça farklı olmasıdır.

Bu çalışmada, Bt-Bn1 bakteriyosininin üretimi ve dolayısıyla aktivitesi bakterinin logaritmik gelişme fazının başında bakteri büyümesine paralel olarak arttığı ve logaritmik fazın ortalarında maksimum aktiviteye ulaştığı tespit edildi. Durağan fazın ortalarına kadar sabitleşen antibakteriyal aktivitede durağan fazın sonlarına doğru bir düşüş gözlemlendi. Elde edilen sonuç literatürde yer alan diğer *Bacillus* türleri ile yapılan birçok çalışmanın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. Cherif ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* tarafından üretilen bakteriyosinin bakterinin logaritmik gelişme fazının başında üretilmeye başladığı, durağan fazın başlarında maksimum seviyeye ulaştığı ve 50 saat boyunca sabit kaldığı gösterilmiştir. Çalışma daha sonraki saatlere taşınmamıştır, tez kapsamında yürütülen çalışmada olduğu gibi bakterinin 50 saat sonraki gelişim saatlerinde, bakteriyosin aktivitesinde bir düşüşün olacağı beklenen bir durumdur. Bakteri gelişiminde ilerleyen safhalarında bakteriyosin aktivitesindeki düşüşlerin, proteazların degradasyonu sebebiyle olduğu bilinmektedir (Kamoun vd., 2005). Yine tez kapsamında yürütülen çalışmada olduğu gibi, Thuricin (Favret ve Yousten, 1989), Tochicin (Paik vd., 1997) ve Cerein (Naclerio vd., 1993) gibi bakteriyosinlerinde logaritmik fazın başında üretilmeye başladıkları durağan faz esnasında ise aktivitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Cherif ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise *Bacillus thuringiensis* BMG1.7 tarafından üretilen bakteriyosinin, bakterinin logaritmik gelişim fazının başlarında üretilmediği ancak bu fazın ortalarında üretilmeye başladığı ve durağan fazın ortalarında maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar ile *Bacillus cereus* (Bc7) tarafından üretilen Cerein 7 (Oscariz vd., 1999) bakteriyosininin üretilme kinetiği birebir örtüşmektedir. Bakteriyosinlerin, primer metabolit kinetiğine sahip, sekonder metabolitler oldukları

bilinmektedir (Vuyst vd., 1996). Bilinen bu özellikleri sebebi ile bakteri gelişiminin logaritmik fazında bakteriyosinlerin üretilmesi gerekmektedir. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler ve diğer literatür verileri bu bilgiyi destekleyici niteliktedir.

Bu çalışmanın sonucunda, Bt-Bn1 bakteriyosininin, MHB ortamında, pH 7-9 aralığında, 25°C'de ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda en iyi şekilde üretildiği tespit edildi. Benzer bir şekilde yapılan bir çalışmada ise *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* tarafından üretilen bakteriyosinin üretiminin ve dolayısıyla aktivitesinin, TSB, LBB, BHIB, NB, T3 besiortamları kıyaslandığında TSB ve LBB ortamlarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Cherif vd., 2008). Ayrıca tez kapsamında yürütülen bu çalışmada bakteri gelişimi ve bakteriyosin üretimi arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu gözlemlendi. Ancak gelişim için geçerli optimum pH ve sıcaklık değerlerinin maksimum bakteriyosin üretimi açısından aynı olmadığı durumlar da literatürde mevcuttur (Parente vd., 1994; Lejeune vd., 1998; Moretro vd., 2000).

Bt-Bn1 bakteriyosini etki mekanizması açısından değerlendirildiğinde, bu molekülün indikatör *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD30'un logaritmik gelişme fazından önce belirli miktarlarda ortama eklenmesi, indikatör bakterinin gelişimi üzerinde uygulanan doza bağımlı olarak inhibisyona sebep oldu. Hem 600 nm'deki absorbans değerleri hem de koloni oluşturma yeteneğine sahip canlı hücre sayımı sonrasında, Bt-Bn1 bakteriyosinin düşük dozlarda (100 µL) bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğu yüksek dozlarda (500 µL ve 1000 µL) ise bakteriosidal etkiye sahip olduğu gösterildi. Literatürde benzer sonuç içerikli birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus thuringiensis* NEB17 bakterisi tarafından üretilen bakteriyosinin etki tarzının belirlenmesi amacıyla indikatör bakteri olarak *B. cereus* kullanıldığında, 100 µL bakteriyosin eklenmiş kültürde değişiklik gözlenmezken, 300 ve 600 µL bakteriyosin eklenen kültürlerde 24 saat sonucunda bile bakteriosidal bir etki gözlenmiştir. Aynı bakteriyosinin, *B. thuringiensis* ssp. *thuringiensis* Bt1627 bakterisine karşı aktivitesi ise 100 µL ve 300 µL bakteriyosin eklenen kültürlerde, canlı hücre sayısı azalmaya başlamış, ancak 24 saat sonunda, sayının arttığı gözlenmiştir yani bakteriyostatik bir etki gözlenmiştir (Gray vd., 2006). Bu tez kapsamında yürütülen çalışma sonrası elde edilen sonuçları destekler tarzda, bakteriyosinlerin etki mekanizmalarının konsantrasyona ve indikatör bakteriye bağlı olarak değişiklik gösterebileceği bu çalışmalarla da kanıtlanmıştır.

Biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları sonucunda Bt-Bn1 bakteriyosininin 70°C'de 30 dakika ve 70°C'nin altındaki derecelerde aktivitesini koruduğu, daha yüksek

derecelerde ise aktivitesini tamamen kaybettiği gösterildi. pH 6-8 aralığında aktivitesini tamamen, pH 5 ve 9'da ise aktivitesinin %50'sini koruduğu, diğer pH aralıklarında ise aktivitesinin büyük bir kısmını kaybettiği belirlendi. Organik çözücülerin Bt-Bn1 bakteriyosininin aktivitesinde bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü. Aktif molekülün protein doğasında olup olmadığını anlamak amacıyla Proteinaz K enzimi uygulanması sonrasında aktivitesini tamamen kaybettiği ve böylece molekülün protein doğasında olduğu gösterildi. Biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları ile elde edilen sonuçlar moleküllerin tanımlanması esnasında kullanılan parametrelerdir. Hemen hemen tüm bakteriyosin çalışmalarında bakteriyosinlerin biyokimyasal özellikleri araştırılmaktadır. *B. thuringiensis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinler arasında biyokimyasal özellikleri açısından oldukça farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BUPM4) tarafından üretilen Bacthuricin F4, pH 3-7 aralığında kararlılığını korurken pH 8 ve 9'da aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir. 40, 50, 60 ve 70°C'de 30 dk inkübasyon süresi sonucunda aktivitesini koruduğu 90°C'de 30 dk inkübasyon sonrasında ise aktivitesinin %80'nini kaybettiği tespit edilmiştir. Proteinaz K ile muamelesi sonucunda tüm aktivitesini kaybetmiştir (Kamoun vd., 2005). Farklı bir çalışmada, *Bacillus thuringiensis* (NEB17) tarafından üretilen Thuricin 17, pH 1,5-8 aralığında kararlılığını korurken pH 1 ve 9,25'da aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir. 45, 50 ve 80°C'de ile 30 dk ile 100°C'de 15 dk inkübasyon süresi sonucunda aktivitesini koruduğu 121°C'de ise aktivitesinin tamamını kaybettiği gözlenmiştir. Proteinaz K ile muamelesi sonucunda tüm aktivitesini kaybetmiştir (Gray vd., 2006). Yine *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (HD198) tarafından üretilen Thuricin S'nin, pH 3-10,5 aralığında stabilitesini koruduğu gösterilmiştir. 10 dk kaynatıldığında bile aktivitesini koruduğu 121°C'de ise aktivitesinin tamamını kaybettiği ve Proteinaz K ile muamelesi sonucunda tüm aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Chehimi vd., 2007). Yapılan bir diğer çalışmada ise, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 bakterisi tarafından üretilen Entomocin 110 molekülünün otoklavlandığında (121°C'de 20 dk) bile aktivitesinin %53'nü koruduğu belirlenmiştir (Cherif vd., 2008). *Bacillus* suşları arasında böylesi dikkat çekici termal ve pH kararlılığı yüksek bakteriyosinlerde bulunmaktadır.

Bu çalışmada, Bt-Bn1 bakteriyosininin saflaştırılması amacıyla sırasıyla aktif kültür sıvısının elde edilmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemleri kullanıldı. Birbirini başarı ile takip eden saflaştırma aşamalarının sonrasında, elde edilen örneğin spesifik aktivitesi ile

aktif bakteri süpernatantının spesifik aktivitesi kıyaslandığında, Bt-Bn1 bakteriyosininin 78 kat saflaştırılarak elde edildiği hesaplandı. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı kaynaklardan izole edilen *B. thuringiensis* bakterilerinden bakteriyosinlerin eldesi için yapılan saflaştırma çalışmalarında genellikle bu çalışmada uygulanan komplike sistem ya da daha basit tahmini sonuçların elde edildiği sistemler kullanılmaktadır (Tablo 32).

Tablo 32 incelendiğinde üretici *B. thuringiensis* suşlarından bakteriyosinlerin elde edilmesi, aktif bakteri süpernatantının elde edilmesi, aktif süpernatanta katı amonyum sülfat eklenerek molekülün konsantre edilmesi rutin kullanılan yöntemler arasındadır. Bazı çalışmalarda saflaştırılma burada bırakılmakta, bazılarında ise ileri saflaştırılma yöntemleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda saflaştırılma aşamalarının sonuçları değerlendirildiğinde bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, Thuricin 439 eldesi amacıyla yapılan amonyum sülfat çöktürmesinde, Thuricin 439, %80 doyumlukta en iyi şekilde elde edilirken (Ahern vd., 2003), Thuricin H molekülünün %65 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile en iyi şekilde elde edildiği belirlenmiştir (Lee vd., 2009). Bu tez kapsamında yürütülen çalışmada ise %50 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile molekül en iyi şekilde elde edildi. Molekül özelliğinin ve ortam koşullarının sonuçlar üzerinde doğrudan etkileri bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda diyaliz işlemi için farklı gözenek büyüklüklerine sahip membranların kullanıldığı gözlenmektedir. Entomocin 9'un saflaştırılmasında 3,5 kDa cut off değerine sahip membran kullanılırken, Bacthuricin F4'ün saflaştırılmasında 1.2 kDa cut off değerine sahip membran kullanıldığı gözlenmektedir. Tez kapsamında yürütülen çalışmada ise 3,5 kDa cut off değerine sahip membran kullanıldı. Yine jel filtrasyon kromatografisinde birbirinden oldukça farklı gözenek büyüklüklerine sahip kolon dolgu maddeleri kullanılmıştır. Tez kapsamında yürütülen çalışmada ise Sephadex G-50 kolon dolgu maddesi kullanıldı ve başarılı bir şekilde kısmi saflaştırılması yapıldı. Yapılan çalışmalarda, moleküllerin kimliklendirilmesi ve kesin kütle tayini yapılacak ise özellikle HPLC saflaştırılması kullanılmıştır. Birbirini takip eden aşamalar sonrasında Bacthuricin F4'ün 100 kat saflaştırıldığı (Kamoun vd., 2005), Thuricin 439'un 32 kat saflaştırıldığı (Ahern vd., 2003), Thuricin S'nin 90 kat saflaştırıldığı (Chehimi vd., 2007) gösterilmiştir. Tez kapsamında yürütülen çalışmada ise Bt-Bn1 bakteriyosini 78 kat saflaştırılarak elde edildi.

Bt-Bn1 bakteriyosininin saflaştırılmasının ardından, tanımlanması amacıyla TOF-MS yapıldı ve sonucunda 31,500. dakikada iki farklı kromatogram elde edildi. Bunlardan ilki 1570 Da büyüklüğünü işaret eden, iki yüklü molekül (iyon) $[M+2H]^{+2}$ gösteren

kromotogram, diğeri 1047 Da büyüklüğünü işaret eden, üç yüklü molekülü (iyon) $[M+3H]^{+3}$ gösteren kromotogramdır. Ardından kesin kütle program yardımıyla hesaplanarak Bt-Bn1 tarafından üretilen bakteriyosinin 3139.3951 Da büyüklüğünde olduğu belirlendi. Literatürde benzer birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus thuringiensis* SF361 bakterisi tarafından üretilen Thuricin H bakteriyosinin moleküler kütlesi NanoESI-qTOF-MS ile belirlenmiştir. Ve çalışmanın sonucunda 1047.2009 Da büyüklüğünde üç yüklü iyonu $[M+3H]^{+3}$ işaret eden ve 1570.7731 Da büyüklüğünde iki yüklü iyonu $[M+2H]^{+2}$ işaret eden kromotogramlar elde edilmiş ve analizin sonucunda molekülün kütlesi 3139.51 Da olarak hesaplanmıştır (Lee vd., 2009). Tez kapsamında yürütülen çalışma sonucunda elde edilen veriler ile kıyaslandığında bu çalışmanın sonucu oldukça dikkat çekici bir benzerlik içermektedir. Yine yapılan bir diğer çalışmada, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD198 bakterisi tarafından üretilen Thuricin S bakteriyosinin moleküler kütlesi ESI-TOF-MS ile belirlenmiş. Ve çalışmanın sonucunda 1046.88 Da molekül büyüklüğünde üç yüklü iyon $[M+3H]^{+3}$ ve 1569.81 Da molekül büyüklüğünde iki yüklü iyon $[M+2H]^{+2}$ tespit edilmiş ve molekülün kütlesi 3137.61 Da olarak tespit edilmiştir (Chehimi vd., 2007). Kesin kütle belirlenmesi amacıyla MALDI-TOF analizleride rutin olarak kullanılan işlemler arasında yer almaktadır (Kamoun vd., 2005). MALDI-TOF, LC,TOF, Q-TOF gibi belirtilen analizler moleküllerin kesin kütlesi hakkında bilgi vermektedirler. Ancak bazı çalışmalarda kesin kütle tayini yerine, daha basit saflaştırma aşamaları yapılmaktadır. Ardından kısmi saflaştırılmış moleküllerin SDS-PAGE çalışması ve beraberinde doğrudan aktivite çalışması yapılarak aktif bantın yeri ve tahmini büyüklüğü marker kullanılarak tespit edilmektedir. Entomocin 9 (Cherif vd., 2003), Thuricin 7 (Cherif vd., 2001) ve Tohicin (Paik vd., 1997) gibi bakteriyosinlerin moleküler büyüklükleri sadece SDS-PAGE ile belirlenmiştir (Tablo 32). Tez kapsamında yürütülen çalışmada Bt-Bn1 bakteriyosininin kütle tayini amacıyla TOF-MS yapılmasının yanında SDS-PAGE çalışması ve beraberinde doğrudan aktivite çalışması yapılarak da molekül büyüklüğü doğrulandı.

Bu çalışmada, elde edilen kütle bilgileri metlin (<http://metlin.scripps.edu>) ve bactibase (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>) veri tabanları kullanılarak tarandı. Metlin veri tabanında herhangi bir molekül ile eşleşme tanımlanamadı. Bakteriyosinler için geliştirilen Bactibase veri tabanında yapılan tarama sonucunda ise tanımladığımız molekül Thuricin H (Accession no BAC201) ile eşleştiği gözlemlendi. Thuricin H, Güney Dakota (ABD)'da

baldan izole edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisi tarafından üretilen bir bakteriyosindir. N-terminal- DWTXWSXL korunmuş bir dizi içermektedir. Biyosentezi ve transkripsiyonel analizi hakkında detaylı bir çalışma yapılmış ve üç yapısal geninin kromozom üzerinde lokalize olduğu belirlenmiştir. Thuricin H bakteriyosinin üretiminden sorumlu genin kromozom üzerinde lokalize olması, bu tez kapsamında yürütülen kısmi moleküler karakterizasyon çalışması ile elde edilen sonuç ile örtüşmektedir. Aynı zamanda Bt-Bn1 bakteriyosinin molekül büyüklüğü ile Thuricin H'nin molekül büyüklüğünde birbiriyle birebir örtüşmektedir. Yine inhibitör spektrumu açısından *L. monocytogenes* ve *B. cereus* gibi bakterilere karşı inhibitör aktivite göstermesi iki molekül arasındaki benzerlikleri daha da arttırmaktadır. Amerika'da baldan ve Türkiye'de böcekten izole edilen iki *B. thuringiensis*'den elde edilen iki farklı molekül arasındaki yüksek benzerlik dikkat çekici bir özelliktir. Aynı zamanda Bt-Bn1 bakteriyosininin molekül büyüklüğü ile Thuricin S, Thuricin 17 ve Bacthuricin F4 ile oldukça yakın olduğu gözlenmektedir. Bacthuricin F4 ile aktivite spektrumu ve biyokimyasal özellikleri açısından Bt-Bn1 bakteriyosini ile kıyaslandığında sonuçlar arasında büyük benzerlik olduğu sadece aralarında molekül büyüklüğü (3160.05 Da) açısından küçük bir farklılık mevcut olduğu, Thuricin S ve Thuricin 17'nin ise aktivite spektrumlarının, pH ve ısıl kararlılıklarının Bt-Bn1 bakteriyosininden oldukça farklı olduğu gösterilmektedir.

Aynı zamanda Bt-Bn1 bakteriyosini ile kıyasladığımız bakteriyosinler kendi aralarında da yüksek benzerlikler içermektedirler. Thuricin S ve Bacthuricin F4 arasında 8 N-terminal amino asit dizisinin benzer olduğu bulunmuştur (Kamoun vd., 2005). Ayrıca, Thuricin S ile Thuricin 17 arasında 18 N-terminal amino asit benzerliği bulunmuştur (Gray vd., 2006). Bu gibi benzerlikler LAB'de de bulunmaktadır (Contreras vd., 1997; Ferchichi vd., 2001; McAuliffe vd., 2001). Bu benzer dizinin hipotetik rolleri hakkında daha detaylı araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu N-terminal korunmuş dizisi *B. thuringiensis* suşlarına özgü olup olmadığı yine daha detaylı çalışmalarla belirlenmelidir. Her ne kadar N-terminal dizileri ya da molekül büyüklükleri benzerlik taşısa da moleküllerin aminoasit içeriklerinin tamamına bakıldığında farklılıkların bulunduğu, bakterilerin farklı coğrafyalardan, farklı kaynaklardan izole edilmeleri gibi sayılabilecek bir çok sebep dolayısıyla aktivitelerinde ve diğer özelliklerinde spesifik farklılıklar tespit edildiği, bu sebeple her birinin bambaşka yeni bir molekül olarak tanımlandığı gözlenmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda, entomopatojenik *Bacillus thuringiensis* bakterisi tarafından üretilen yeni bir bakteriyosin elde edildi. Bu bakteriyosinin *Bacillus* türleri

dikkate alınarak yapılan sınıflandırılmada alt sınıf II.2’de yer alan Thuricin benzeri peptidler sınıfına dahil olduğu gösterildi.

Bacillus cinsi üyelerinin peptit, lipopeptit, antibiyotik ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddelerin çok iyi üreticileri oldukları (Stein, 2005) ve özellikle LAB’den sonra en önemli bakteriyosin ve BLIS moleküllerinin üreticileri oldukları bilinmektedir (Abriouel, 2011). *Bacillus* türlerinin bu potansiyelleri 50 yıldan daha uzun bir süredir bilinmekte ve özellikle peptid antibiyotik üretiminin en önde gelen sınıfını temsil etmektedirler (Ghanbari vd., 2009). *Bacillus* cinsi endüstri ve gıda alanında güvenli kullanım öyküsüne sahip bir çok tür içermektedir (Paik vd., 1997). *Bacillus* cinsi içerisinde LAB gibi gıda, endüstri ve tarım alanında GRAS olarak tescilli önemli türler yer almaktadır. Örneğin Doğu Asya’da fermente gıdalarda *B. subtilis* suşları kullanılmaktadır (Hosoi ve Kiuchi, 2003). Yine non-toksinojenik *B. cereus* spp. *toyoi* probiyotik özelliği sebebi ile hayvan gıdalarına ek olarak kullanılmaktadır (Lodemann, 2008). Bunların yanı sıra, günümüzde *Bacillus* türlerinden elde edilen enzimler, aminoasitler, antibiyotikler ve insektisitler gibi birçok ticari ürün bulunmaktadır (Pedersen vd., 2002).

Laktik asit bakterilerinden sonra en iyi bakteriyosin ve BLIS üreticilerinin olduğu bilinen *Bacillus* cinslerinin hemen hemen her türü tarafından üretilen bakteriyosin ya da benzeri moleküllerin eldesi, karakterizasyonu fazlasıyla çalışılmış ve sonucunda birçok aktif molekül tanımlanmıştır. Hem gıdalardan hem de topraktan izole edilen *Bacillus* suşlarının iyi birer bakteriyosin üretici oldukları bilinmektedir. *Bacillus cereus* tarafından Cerein GN105 (9 kDa) (Naclerio vd., 1993), *Bacillus anthracis* tarafından Heterocycloanthracins (9.62 kDa) (Haft, 2009), *Bacillus subtilis* tarafından Subtilin (3.34 kDa) (Banerjee ve Hansen, 1988), *Bacillus licheniformis* tarafından Lichenin (1.4 kDa) (Pattnaik vd., 2001), *Bacillus atrophaeus* tarafından Subtilosin A (3.39 kDa) (Stein vd., 2004) gibi bakteriyosin örneklerini arttırmak mümkündür. *Bacillus* cinsleri arasında bakteriyosin üretimi açısından en fazla değerlendirilen türler içerisinde olan *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bakterilerinin yanında birçok farklı kaynaktan izole edilen *B. thuringiensis* bakterileri de yer almaktadır.

Bugüne kadar *B. thuringiensis* tarafından üretilen ve karakterize edilen bakteriyosinler Tablo 32’de gösterilmektedir. *B. thuringiensis* bakteriyosinlerinin endüstriyel değeri hak ettiği değeri henüz görememiştir. Yeni bakteriyosin üreten *B. thuringiensis* bakterilerinin tespiti, tarım uygulamalarında özellikle bitki patojenlerinin kontrolünde faydalı olabileceği düşünülmektedir (Jack vd., 1995). Bu kullanışlı

biyoteknolojik özelliklerine rağmen, gastrointestinal hastalıklar ve tipik *B. cereus* virulansını işaret ettiği salgınlarda ortamdan *B. thuringiensis* suşlarının izole edildiği bildirilmektedir (Hansen ve Hendriksen, 2001). Alan uygulamalarında kullanmadan önce yapılması gereken kullanılacak *B. thuringiensis* suşunun yan etkileri dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Bunların dışında *B. thuringiensis* bakterileri tarafından oluşabilecek herhangi bir tehlike bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın sonucunda farklı *B. thuringiensis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlere bir yenisi eklendi. Var olan bakteriyosinler ile benzer özellikler içermesine rağmen spesifik özellikleri ile ayırt edilmektedir. Elde edilen molekülün gıda patojenleri *L. monocytogenes* ve *B. cereus* bakterilerine karşı gösterdiği aktivite gıdalarda kullanım imkanını düşündürmektedir. Bunun dışında her ne kadar inhibisyon spektrumu dar olsa da EDTA ile kullanımı gibi farklı destek uygulamalar ile aktivite spektrumu genişletilebilmektedir. Tarım alanında, ürettiği bakteriyosin ile bitki patojenlerine karşı göstereceği inhibisyon aktivitesi sayesinde bitkilerin büyümesini dolaylı olarak teşvik edici bir ajan olarak kullanımından bahsetmek mümkündür. Bitki patojenlerine karşı aktivitesi test edilen çalışmada *P. syringae*, *P. savastanoi* gibi bakterin büyümesini inhibe ettiği gözlemlendi.

Bt-Bn1 bakterisinin, ürettiği bakteriyosin ile bitki zararlısı bakterilere karşı aktivite göstermesi, endotoksinleri sayesinde ise bitki zararlısı böceklere karşı aktivite göstermesi bitki koruma anlamında mükemmel bir biyolojik mücadele ajanını işaret etmektedir. Detaylı çalışmalar ile kullanım imkanları dahada arttırılabilecektir.

Tablo 32. Farklı *B.t.*'ler tarafından üretilen bakteriyosinler/BLIS ve özellikleri

Bakteriyosin /BLIS	Safılaştırılma prosedürleri	Tanımlama	MA (kDa)	Kaynak
Thuricin HD-2	A.S.E., ve J.F.K.	Non denatüre –PAGE ve doğrudan jelde aktivite	>950	Favret ve Yousten, 1989
Tochicin	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	10.5	Paik vd., 1997
Thuricin 439	A.S.E., A.S.Ç., J.F.K., K.K., HPLC	MALDI-TOF	2.92 ve 2.80	Ahern vd., 2003
Entomocin 9	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz, J.F.K., K.K.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	12.4	Cherif vd., 2003
Thuricin 7	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	11.6	Cherif vd., 2001
Bacthuricin F4	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz, HPLC.	MALDI-TOF	3.16	Kamoun vd., 2005
Thuricin 17	Bütanol Ekstraksiyonu, HPLC	MALDI-TOF	3.16	Gray vd., 2006
Thuricin S	A.S.E., K.K., HPLC.	Q-TOF (NanoMS/MS)	3.14	Chehimi vd.,2007
Morricin 269	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	10	Barboza-Corona vd.,2007
Kurstacin 287	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	10	Barboza-Corona vd.,2007
Kenyacin 404	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	10	Barboza-Corona vd.,2007
Entomocin 420	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	10	Barboza-Corona vd.,2007
Tolworthcin 524	A.S.E., A.S.Ç., Diyaliz.	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	10	Barboza-Corona vd.,2007
Entomocin 110	A.S.E., A.S.Ç., Bütanol ekstraksiyonu	SDS-PAGE ve doğrudan jelde aktivite	4.8	Cherif vd., 2008
Thurincin H*	A.S.E., A.S.Ç., K.K., HPLC.	NanoESI-qTOF	3.14	Lee vd., 2009
Thuricin CD	A.S.E., Propanol ekstraksiyonu, K.K., HPLC	MALDI-TOF	2.76 ve 2.86	Hill vd., 2009

A.S.E.; Aktif Süpernatant Eldesi, A.S.Ç.; Amonyum Sülfat Çöktürmesi, K.K.; Kolon Kromatografisi, J.F.K.; Jel Filtrasyon Kromatografisi, *; bu tezde Bt-Bn1 bakteriyosininin molekül büyüklüğü ve diğer özellikleri açısından benzer olduğu belirlenen bakteriyosin.

Serratia marcescens (Sm-Mm3) tarafından üretilen antibakteriyal molekül;

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda karakterizasyonunu gerçekleştirilen, Gram (-) *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *Enterobacter* sp., *Enterococcus faecalis*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus cohnii*, ve *S. epidermidis* gibi farklı tür bakterilere karşı inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Bu antibakteriyal molekülün, çalışmada kullanılan 65 indikatör bakteri içerisinde yirmi beşine (%39) karşı aktif olduğu belirlendi. Bt-Bn1 bakteriyosinine göre oldukça geniş bir inhibisyon spektrumuna sahip olduğu tespit edildi.

Sınıflandırılmasının tam anlamıyla yapılamaması ve *Serratia* bakterilerinden elde edilen antimikrobiyal moleküllerin *Bacillus* cinslerine oranla fazlasıyla sınırlı olması sebebi ile elde edilen her sonucun Bt-Bn1 bakteriyosininde olduğu gibi ayrı ayrı değerlendirilmesi yapılamamaktadır.

Sm-Mm3 antibakteriyal molekülün üretimi ve dolayısıyla aktivitesi, Bt-Bn1 bakterisinde olduğu gibi bakterinin logaritmik gelişme fazının başında bakteri büyümesine paralel olarak arttığı ve logaritmik fazın ortalarında maksimum aktiviteye ulaştığı gözlemlendi. Durağan fazın ortalarına kadar sabitleşen antibakteriyal aktivitede durağan fazın sonlarına doğru bir düşüş gözlemlendi. Bu molekül üretim açısından, primer metabolit kinetiği gösteren sekonder metabolit özelliği taşımaktadır.

Bu aktif molekülün en iyi üretildiği ortamın LBB, inkübasyon süresinin 72 saat, optimum sıcaklığın 25°C, pH aralığının 5-9 olduğu belirlendi.

Yine Sm-Mm3 aktif molekülünün etki tarzının düşük uygulanan (10 µL ve 100 µL) dozlarda kısa süreli bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğu, yüksek dozlarda ise uzun süreli olarak bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Çalışma sonrasında aktif molekülün yüksek dozda (1000 µL) birbirleri ile etkileşimde bulunarak agregatlar oluşturduğu ve bu durumun aktiviteyi perdelediği gözlemlendi, ancak uzun bir inkübasyon süresi sonucunda aktif molekülün indikatör bakteriye karşı inhibisyon aktivitesi ortaya çıktığı gözlemlendi. Agregat oluşumu engellendiği takdirde yüksek konsantrasyonlarda yapılan uygulamanın indikatör bakteriye karşı bakteriyolitik bir etki göstermesi beklenen bir durumdur.

Bu aktif molekülün sıcaklığa fazlasıyla dayanıklı olduğu gösterildi. 100°C’de 90 dakika süresince inkübe edildiğinde bile aktivitesinin yalnızca %50’sini kaybettiği sadece otoklavlandığında aktivitesinin tamamen yok olduğu yapılan çalışmalarla belirlendi. Yüksek sıcaklıklarda kararlılık moleküle üstün bir nitelik kazandırarak kullanım imkanlarını arttırmaktadır.

Aktif molekül SDS-PAGE ve ince tabaka kromatografisi yanısıra yapılan doğrudan aktivite testleri ile de görüntülendi. Molekülün çok küçük ve konsantrasyonunun az olması sebebi ile SDS-PAGE ile net bir bant şeklinde görülmedi. Ancak aktif molekül ince tabaka kromatografisi sonrasında silika jel üzerinde tek bir spot şeklinde görüntülendi. İnce tabaka kromatografisinde kullanılmak üzere yapılan, aktif kültür süpernatantından kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen aktif madde miktarı oldukça fazladır. Bu özelliğinden dolayı ileride yapılması planlanan molekülün yapısal analizleri için, ince tabaka kromatografisi kullanılabilir bir metot olarak düşünülmektedir. Ancak kloroform ile ekstre edilen örneğin yapılan ince tabaka kromatografisinde tek bir spot şeklinde sonuç vermesi çok istenen bir durum değildir. Birden fazla maddenin kloroform içerisine nüfuz etmesi ve sonucunda her maddenin slika jel üzerinde farklı spot vermesi beklenilmektedir. Bu çalışmada elde edilen tek spotun birbirinden tam olarak ayrılmayan birden fazla molekül içerip içermediği konusunda tereddütler bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, Sm-Mm3 aktif molekülü %50 doyumlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile yüksek aktiviteli olarak başarılı bir şekilde elde edildi ve sonrasında bu örnek kullanılarak yapılan HPLC ile aktif molekül saflaştırıldı. Aktif molekülün kesin kütesinin belirlenmesi amacıyla yapılan negatif iyon modunda TOF-MS ile bu molekülün 479 Da büyüklüğünde olduğu belirlendi.

Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler ilk olarak *Escherichia coli* bakterisinden tespit edilmiş ve kolisinler olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra, bu moleküllere benzer antimikrobiyal peptidlerin Gram (+) bakteriler tarafından da üretildiği tespit edilmiş ve bu moleküller daha büyük bir ilgi ile karşılanmıştır. Özellikle, gıda zehirlenmelerine sebep olan Gram (-) bakterilere karşı faaliyet göstermesi nedeniyle gıdaların muhafazasında kullanılabileceği düşünülen Gram (+) laktik asit bakterileri tarafından üretilen AMP’ler daha da büyük bir ilgi görerek çalışılmıştır (Hardy, 1975; Tagg vd., 1976). Her ne kadar bakteriyosinlerin keşfine Gram (-) bakteriler öncülük etmiş olsa da sonraki yıllarda yapılan çalışmalar Gram (+) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu sebeple Gram (-) bakteriler tarafından üretilen

bakteriyosin sayısı ve özellikleri sınırlıdır. Gram (-) bakteri grubunda *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen Pyosin ve *Escherichia coli* tarafından üretilen Colicin V, en iyi çalışılan iki bakteriyosin olarak kalmıştır (Jack vd., 1995).

Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler arasında farklılıklar olmasına rağmen, kolisin bu grup üyelerince üretilen bakteriyosinlerin temsilcisi olarak bilinmektedir. Kolisinler 29 ve 90 kDa arasındaki proteinlerdir, bağlanmaları, taşınımları ve özel aktivite alanları, Pyosin bakteriyosinleri ile aynıdır. Kolisinlerin büyük moleküller olması sebebi ile salgılanmalarında üretici hücrenin parçalanarak ölümü gerçekleşmektedir (Sano vd., 1993; Riley ve Wertz, 2002). *P. aeruginosa* suşları tarafından sentezlenen pyosinler de yine kolisinler gibi yüksek molekül ağırlıklı, moleküllerdir. Pyosinlerin, Myoviridae ailesinin bakteriyofaj kuyruklarına benzer: R, F ve G olmak üzere üç türü tanımlanmıştır. R tip ve F tip pyosinler proteazlara duyarlı değilken S tipi proteazlara duyarlı bakteriyosinleri içermektedir (Michel-Briand ve Baysse, 2002; Waite ve Curtis, 2009).

E. coli ve enterobakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin diğer bir türü de mikrosinler olarak isimlendirilen dairesel peptidlerdir. *E. coli* AY25 tarafından üretilen mikrosin J25 bu grup için model alınmıştır (Craik vd., 2003). Mikrosinler gastrointestinal sistemin kolonizasyonunda bakteriler arasında oluşan rekabette önemli bir rol oynayan ≤ 10 kDa gibi düşük molekül ağırlıklı moleküllerdir. Aşırı pH değerlerine, proteazlara ve ısıya genel olarak kararlılık gösteren hidrofobik moleküllerdir (Duquesne vd., 2007).

Yukarıda tanımlandığı üzere Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler oldukça büyük moleküllerdir (29-90 kDa). Bunlar içerisinde mikrosinler ise diğerlerine oranla oldukça küçük moleküllerdir (≤ 10 kDa).

Tez kapsamında karakterizasyonunu tamamlanan *Serratia marcescens* bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal molekülün, Gram (-) bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerden çok daha küçük bir molekül ağırlığına sahip olduğu belirlendi. Bu molekülün yapılan saflaştırma ve kütle tayin analizleri sonucunda 479 Da büyüklüğünde olduğu belirlendi ve bugüne kadar bu büyüklükte Gram (-) bakterilere ait bir bakteriyosin bilinmemektedir. Gram (-) bakterilerin bakteriyosinleri ile yapılan çalışmaların sınırlı olması bu sonucu etkileyen sebepler içerisinde incelenebilir. Bu çalışmada karakterize edilen molekülün, Proteinaz enziminden etkilenmemesi ve geniş bir aktivite spektrumuna sahip olması açısından var olan Gram (-) bakterilerin bakteriyosinlerine özellikle mikrosinlere fazlasıyla benzerlik göstermesi bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri madde

(BLIS) olarak değerlendirilmesine sebep oldu. Yine özellikle saflaştırma aşamalarında bakteriyosinler ile tamamen aynı prosedürlerin izlenmesi ve sonucunda başarılı bir şekilde elde edilmesi bu molekülün bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri bir madde olabileceğini desteklemektedir.

Serratia cinsinin bakteriyosin üretimi ilk olarak Hamon ve Peron tarafından 1961 yılında tarif edilmiş ve klinik izotlardan olan *Serratia* suşlarının %86'sının en az bir bakteriyosin üreticisi olduklarını göstermişlerdir (Gratia, 1989). Bugüne kadar oldukça sınırlı ve eski kayıtlara kadar dayanan *Serratia marcescens* bakterisi tarafından üretilen bakteriyosin moleküllerine baktığımızda; Sezen ve Demirbağ (2001) tarafından, *Balaninus nucum*'dan izole edilen *Serratia marcescens* izolatu tarafından üretilen bir bakteriyosin tanımlanmıştır. Bu çalışma ile bu bakteriyosinin, *B. subtilis*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter cloacea*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Klepsiella pneumonia*, *Neisseria flavescens*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ve *S. marcescens* bakterilerine karşı inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklara ve pH değişimlerine oldukça dayanıklı olduğu ancak proteinazlara karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Farklı bir çalışmada ise kolisin benzeri bakteriyosin 28b yine *S.marcescens*'den elde edilmiştir. Duyarlı hücrenin DNA'sına hasar veren, 45 kDa büyüklüğünde bir molekül olduğu bildirilmiştir. Bu molekül kromozom tarafından ifade edilmektedir (Guasch vd., 1995). *E. coli*'ye karşı aktif ve *S. marcescens*'e karşı aktif olmayan fraksiyon 1, *S. marcescens*'e karşı aktif *E. coli*'ye karşı aktif olmayan fraksiyon 2 olmak üzere iki grup altında incelenmektedir (Hamon ve Peron., 1961; Traub, 1980). Yine bir başka çalışmada, *S. marcescens* JF246 tarafından üretilen bakteriyosin JF246, *E. coli*'ye karşı aktif 64 kDa büyüklüğünde, sıcaklık ve proteazlara duyarlı bir molekül olduğu tespit edilmiştir (Foulds, 1972). Diğer bir çalışmada, *S. marcescens* tarafından üretilen Marcescin'in plazmit tarafından ifade edildiği (Timmis ve Winkler, 1973) ve bu molekülün daha çok klinik izotların epidemolojik çalışmalarında kullanıldığı bildirilmiştir (Traub vd., 1971). Marcescin A ve Marcescin B olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadır. Marcescin A, *S. marcescens* ve *E. coli*'ye karşı aktif tripsin, kloroform ve sıcaklık uygulamalarına karşı kararlılığını korumaktadır. Marcescin B ise *S. marcescens*'e karşı aktif değilken bazı *E. coli* ve *Aerobacter aerogenes* suşlarına karşı aktiftir. Tripsin, kloroform ve sıcaklık uygulamalarına karşı aktivitesini tamamen kaybetmektedir (Prinsloo, 1966). Marcescin B'nin 43 kDa büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir (Eichenlaub ve Winkler, 1974).

Tanımlanan *Serratia marcescens* tarafından üretilen bakteriyosinlerin her ne kadar üretici mikroorganizma, inhibisyon spektrumu, biyokimyasal davranışları gibi özellikleri açısından tez kapsamında karakterizasyonu yapılan Sm-Mm3 aktif molekülü ile benzer tarafları olsa da molekül büyüklükleri açısından hiç biri ile uyumlu görülmemektedir.

Diğer taraftan bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri bir molekül olarak düşünülen ve karakterizasyonu yapılan aktif molekülün antibakteriyal özellik gösteren farklı bir sınıf madde olma ihtimali de göz ardı edilmemelidir. Bakteriyosin eldesi amacıyla yapılan bir çalışmada önemli bakteriyosin üreticisi olan laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus amylovorus* ME1 izolatu tarafından üretilen 453 Da büyüklüğündeki antimikrobiyal molekülün proteinaz enzimlerinden etkilenmemesi dolayısıyla protein doğasında olmaması sebebi ile bakteriyosin dışında farklı bir aktif molekül olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Jung vd., 2008). Tez kapsamında yürütülen çalışmada da benzer bir sonuç düşünülmektedir. Ancak bu çalışmada öne sürüldüğü gibi moleküllerin sadece proteinazlara dirençli olması bakımından bakteriyosin sınıfına dahil edilmemesi doğru değildir. Mantovani ve arkadaşları (2002) tarafından *Streptococcus bovis* HC5 bakterisinden elde ettikleri, 2440 Da büyüklüğünde ve Edman degradasyonu ile N-terminal a.a. dizisi belirlenen Bovicin HC5 bakteriyosinin, Proteinaz K enzimine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir yine böyle proteinaz enzimlerine dirençli bakteriyosin örneklerini arttırmak mümkündür.

Bunların yanısıra *Serratia* bakterilerinin yalnızca bakteriyosin üreticileri olmadıkları bilinmektedir. *Serratia marcescens* ATCC 39006 bakterisinin karbapenem antibiyotik üreticisi olduğu bilinmektedir (Cox vd., 1998). Karbapenemler, beta laktam antibiyotiklerin en yeni grubunu oluşturan, spektrumları çok geniş antibiyotiklerdendir. 153 Da civarında bir molekül büyüklüğüne sahip olan bu karbapenem antibiyotiği, *S. marcescens* tarafından logaritmik büyüme fazı esnasında üretilmektedir (Bycroft vd., 1988). Karbapenem antibiyotiğinin üretim şekli, geniş inhibitör spektrumu gibi özellikleri ile karakterizasyonu yapılan Sm-Mm3 aktif molekülü ile benzer özellikler taşısa da molekül büyüklükleri oldukça farklıdır.

Tanımlanan aktif molekülün moleküler kütlesi kullanılarak METLIN veri tabanında yapılan tarama çalışmalarında elde edilen molekül olasılıkları değerlendirildiğinde 29 olası molekül içerisinde 17'si olabilirliği oldukça düşük, 12'si ise üç amino asitten meydana gelebilecek olası molekülleri işaret etmektedir. Amino asit olasılığının bu kadar fazla olması, elde edilen aktif molekülün üç aminoasitten oluşabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Bugüne kadar üç amino asitten oluşan aktif moleküller konusunda çok

fazla çalışma olmamasına rağmen, Rameshkumar ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada yengeç, *Thalamita crenata*, hemolenfinden 507 Da büyüklüğünde bir antimikrobiyal madde elde edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi, NMR ve kütle spektrometrisi (ESI /MS/MS) ile bu aktif molekül tanımlanmış ve çalışmanın sonucunda dört farklı amino asitten oluşan bir aktif molekül olduğu belirlenmiştir. Böylece yengecin hemolenf sıvısının antibiyotik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiye dayanılarak karakterizasyonu gerçekleştirilen Sm-Mm3 aktif molekülün üç aminoasitten oluşan bir antibakteriyal peptit olabileceği de ihtimaller arasındadır.

Wietz ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan farklı bir çalışmada iki farklı *Vibrio coralliilyticus* bakterisinden 479 Da büyüklüğünde andrimid antibiyotiği elde edilmiştir. Bu bileşik, hibrid nonribozomal, peptit-poliketit antibiyotiktir, ilk kez bir böcek endosimbiont bakterisinden tanımlanmıştır (Fredenhagen vd., 1987). Daha sonra deniz *Vibrio* cinsleri gibi (Oclarit vd., 1994; Long vd., 2005), diğer mikrobiyal cinslerde bulunmuştur (Needham vd., 1994; Jin vd., 2006). *Pseudomonas fluorescens* ve *Enterobacter* sp. bakterileri andrimid kaynağı olarak gösterilmektedir. Andrimid Asetil-KoA karboksilaz inhibitörü olarak iş yapmaktadır (Freiberg vd., 2004). Geniş antibiyotik bir aktivite spektrumuna sahiptir (Singh vd., 1997). *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio harveyi* ve *Vibrio vulnificus* gibi bakteriyel patojenlere karşı inhibisyon aktivitesi bulunmaktadır (Wietz vd., 2010). Karakterizasyonu yapılan Sm-Mm3 aktif molekülünün moleküler ağırlığı ile andrimid antibiyotiğinin moleküler ağırlığının birebir örtüşmesi dikkat çekici bir sonuçtur. Yine yapılan bir çalışmada, *Hyatella* cinsi süngerden elde edilen *Vibrio* cinsi M22-1 bakteriyel izolatu tarafından üretilen Anti-*Bacillus* aktiviteye sahip andrimid peptit antibiyotiği tanımlanmıştır (Oclarit vd., 1994). Tez kapsamında tanımlanan Sm-Mm3 aktif molekülün yüksek Anti-*Bacillus* aktiviteye sahip olması bu moleküle benzerliği açısından yine dikkat çekicidir. Sm-Mm3 aktif molekülün fındık zararlısı *Melelontha melelontha*'dan izole edilen bir *Serratia marcescens*'den elde edilmiş olduğu düşünüldüğünde yine andrimid antibiyotiğinin ilk kez pirinç zararlısı *Nilaparvata lugens*'den izole edilen endosimbiyotik *Enterobacter* sp.'den elde edilmiş olması benzerliği fazlasıyla arttırmaktadır. Ancak elde edilen Sm-Mm3 aktif maddesi ile andrimid arasında büyük benzerlikler bulunmasına rağmen uygun ileri teknikler kullanılarak yapısı tam olarak aydınlatılmadığı sürece molekülü kesin olarak tanımlamak, isimlendirmek mümkün değildir.

Bu çalışmanın sonucunda, karakterizasyonu yapılan *Serratia marcescens* (Sm-Mm3) bakterisi tarafından üretilen antibakteriyal maddenin literatürde var olan moleküller, özellikle bakteriyosinler ile karşılaştırıldığında benzer tarafları bulunduğu gibi birçok yönü ile farklı bir molekül olduğu tespit edildi. Bu molekülün literatüre kazandırılacak yeni bir antibakteriyal molekül olabileceği gibi var olan moleküllere benzer bir aktif molekül de olabileceği çalışmanın sonucunda gösterildi. Ancak molekül hakkında kesin bir sonuca varmak için, yapısının bütünüyle aydınlatılması gerekmektedir. Bunun için daha ileri kimyasal tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. NMR (Nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi, X-ray kristalografisi ve elementer analiz gibi analizler yapılarak molekülün kesin yapısı ortaya çıkarılmalıdır. Bu analizler sonucunda elde edilecek bilgiler ve tez kapsamında elde edilen bilgiler kullanılarak molekülün kesin tanısı yapılabilir. Literatürde mevcut moleküllerin dışında bir molekül tanımlaması sonucunda, oldukça kararlı, inhibisyon spektrumu geniş yeni bir antibakteriyal maddenin literatüre kazandırılması gerçekleştirilebilir. Bunun yanısıra literatürdeki mevcut moleküllere benzer bir molekül olması farklı coğrafyalarda farklı üreticilerden benzer molekülün elde edilmesi yine büyük önem taşımaktadır.

Kısmen moleküler karakterizasyonu yapılan Sm-Mm3 aktif molekülün ekspresyonundan plazmitin sorumlu olduğu tespit edildi. Bu çalışma ileriki detaylı genetik çalışmalara öncülük edecektir.

Patojen bakterilerin artan antibiyotik dirençleri karşısında mücadele etmek için karasal aktinomisetler veya mantar gibi geleneksel kaynakların dışında farklı kaynaklardan elde edilen yeni antimikrobilyallere ihtiyaç duyulmaktadır (Berdy, 2005). Bu çalışmanın sonucunda elde edilen alışılmadık böcek kökenli entomopatojenik bakteri kaynaklı moleküller inhibisyon spektrumunun geniş, kararlılığının yüksek olması sebebi ile duyulan ihtiyaçlara karşılık verebilecektir.

Tanımlanan bakteriyosinlerin biyolojik mücadeledeki önemi;

Karakterizasyonu tamamlanan bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddenin bitki zararlısı mikroorganizmaların biyolojik mücadelesinde kullanım potansiyellerinin araştırılması, bu çalışmanın önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu bölüm tarım zararlısı mikroorganizmaların mücadelesinde çeşitli ilaçların kullanımına alternatif bir yaklaşımı içermektedir. Kullanılan ilaçların doğaya verdikleri zararlar göz önüne

alındığında alternatif olarak insanlığa ve çevresine zarar vermeyen bakteriyosinlerin biyolojik mücadele materyali olarak kullanımının araştırılması son derece büyük önem arz etmektedir.

Yapılan bu çalışma sonrasında, Sm-Mm3 aktif molekülünün *Erwinia amylovora*, *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas syringae* ve *Xanthomonas axonopodis*, Bt-Bn1 aktif molekülünün ise *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas savastanoi* gibi bitki patojeni bakterilere karşı inhibisyon aktivitesine sahip oldukları laboratuvar ortamında kuyu difüzyon yöntemi ile tespit edildi. Bu çalışma bu moleküllerin bitkilerde hastalık oluşturan mikroorganizmalara karşı etkili olarak kullanılabilirliği sonucunu ortaya çıkardı ve sonraki biyoassay çalışmaları için yol gösterici oldu. Bakteriyosinlerin bu alanda kullanımı yoğun bir şekilde araştırılmakta olan güncel bir konudur. Her geçen gün bu çalışmalara bir yenisi eklenmektedir.

Bunların dışında bakteriyosinlerin bitkilerde önemli zararlara sebep olan böcekler üzerindeki etkileri konusunda literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bitki ile zararlı böcek arasındaki ilişkilerin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, normal bitki florasında bulunan bakteriler için bitki, genellikle fiziksel bir yaşam alanı dışında başka bir şey ifade etmezken aynı şekilde normal florada bulunan bakterilerin de bitki için önemsiz olduğu vurgulanmaktadır. Oysaki yapılan çalışmalarda, iki organizma için de önemsiz görülen bu simbiyotik yaşam biçiminin bitkide zarar oluşturan organizmalar (böcekler) için hayati anlamda önem arz ettiği belirlenmiştir (Drew vd., 1983; Drew ve Lloyd, 1987). Bu bilgilere dayanarak, böcek için hayati önem arz eden normal mikrobiyal floranın tanımlanan bakteriyosinlerle inhibisyonu ve dolaylı yoldan böcek ile mücadelede yeni bir mikrobiyal mücadele yolunun belirlenmesi ileri ki çalışmalarda düşünülmektedir. Diğer yandan biyopestisit olarak uygulanma potansiyeline sahip olan bir bakteriyal pestisit aynı zamanda bitki zararlısı bakterilere karşı da etkili olmaları aynı bakterinin iki farklı kontrol bakımından önemini oldukça arttırmaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmaların sonucunda iki farklı entomopatojenik bakteri tarafından üretilen iki farklı antibakteriyal madde saflaştırılarak, karakterize edildi. Elde edilen sonuçlar kısaca aşağıdaki gibi özetlenebilir.

Entomopatojenik bakterilerde bakteriyosin taraması;

- i. Otuz yedi test bakterisinin yirmi dört indikatör bakteriye karşı antagonistik etkilerinin taranması sonucu, beş test bakterisinin antibakteriyal etkiye sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlar antibakteriyal madde üretme potansiyelleri açısından test edilen entomopatojenik bakterilerde bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri madde üretim oranının %13,5 olduğunu gösterdi.
- ii. Bakteriyosin üretme potansiyeline sahip olan beş bakteriden Pf-Xd1'in etkili olduğu bakteri oranı %50, Pf-Aa4'ün etkili olduğu bakteri oranı %25, Bp-Ar2'nin etkili olduğu bakteri oranı %41,6, Bt-Bn1'in etkili olduğu bakteri oranı %58,3 ve Sm-Mm3'ün etkili olduğu bakteri oranı ise %41,6 olarak belirlendi.
- iii. Pf-Xd1, Pf-Aa4 ve Bp-Ar2 izolatları tarafından üretilen aktif moleküllerin ya bakteri kültür süpernatında var olmadığı ya da inhibisyon aktivitesinin düşük olduğu belirlendi.
- iv. Elde edilen sonuçlar, *B. thuringiensis* (Bt-Bn1) ve *S. marcescens* (Sm-Mm3) izolatlarının ise bakteri kültür süpernatantında var olan, inhibisyon aktivitesi ve aktivite spektrumu geniş, önemli antibakteriyal etkiye sahip, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddeler ürettiklerini gösterdi.

Bacillus thuringiensis (Bt-Bn1) tarafından üretilen antibakteriyal maddenin;

- i. Küçük, ısıya dayanıklı, pH 6-8 aralığında kararlı, Proteinaz K'ya duyarlı antibakteriyal bir peptit (bakteriyosin) olduğu belirlendi.
- ii. Bu maddenin üretilmesi için en uygun kültür şartlarının; MHB besiyeri, 25 °C sıcaklık, pH 7-9 aralığı ve 24 s inkübasyon süresi olduğu tespit edildi.
- iii. Bu maddenin inhibitör spektrumunun; farklı *Bacillus thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* ve *Listeria monocytogenes* olduğu gösterildi.

- iv. Plazmit eliminasyon çalışması sonucunda aktivitesinde bir değişim olmaması bu molekülün kromozomal kökenli olduğunu gösterdi.
- v. Belirlenen bakteriyosinin moleküler ağırlığı kütle spektrometrisi ile 3,139 Da olarak tespit edildi.
- vi. *Bacillus*'lar dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada, bu bakteriyosinin alt sınıf II.2'de yer alan "Thuricin" benzeri peptitler sınıfına dahil edildiği tespit edildi.
- vii. Kütle ve özellikler dikkate alınarak yapılan literatür incelemesi sonucunda Güney Dakota (ABD)'da baldan izole edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisi tarafından üretilen Thuricin H ile benzer olduğu tespit edildi.
- viii. Biyolojik mücadelede kullanım imkanlarının araştırılması doğrultusunda yapılan çalışma sonucunda, kuyu difüzyon yöntemi ile bitki patojeni *P. syringae*, *P. savastanoi* ve *P. lemoignei* bakterilerine karşı inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Böylece zirai mücadele alanında kullanım potansiyeli ortaya çıkarıldı.

Serratia marcescens (Sm-Mm3) tarafından üretilen antibakteriyal maddenin;

- i. Küçük, ısıya oldukça dayanıklı, pH 5-9 aralığında kararlı, Proteinaz K'ya dirençli antimikrobiyal (bakteriyosin benzeri) bir madde olduğu belirlendi.
- ii. Bu molekülün üretilmesi için en uygun kültür şartlarının; LBB besiyeri, 25 °C sıcaklık, pH 5-9 aralığı ve 72 s inkübasyon süresi olduğu tespit edildi.
- iii. Bu maddenin inhibitör spektrumunun, farklı *B. thuringiensis* suşları, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *E. amylovora*, *E. faecalis*, *Enterobacter* sp., *P. fluorescens*, *P. mirabilis*, *S. cohnii* ve *S. epidermidis* olduğu belirlendi.
- iv. Plazmit eliminasyon çalışması sonucunda bakterinin aktif molekülü üretme kapasitesini kaybetmesi molekülün ekspresyonundan sorumlu genlerin plazmit kökenli olduğunu gösterdi.
- v. Belirlenen antimikrobiyal bir maddenin 479 Da büyüklüğünde olduğu kütle spektrometrisi ile belirlendi.
- vi. Literatürde yapılan inceleme sonucunda özellikleri açısından birebir benzer molekül tanımlanamadı. "Yeni bir molekül" olma olasılığı bulunmaktadır. Bunun için detaylı kimyasal analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.
- vii. Bitki patojeni, *E. amylovora*, *P. lemoignei*, *P. syringae* ve *X. axonopodis* bakterilerine karşı inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Böylece, zirai mücadelede kullanım potansiyeli ortaya çıkarıldı.

6. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucunda bakteriyosin grubuna dahil olduğu belirlenen *Bacillus thuringiensis* (Bt-Bn1) tarafından üretilen antibakteriyal molekülün, amino asit dizisi belirlenerek literatürde var olan diğer bakteriyosinler ile benzerlik oranı araştırılmalıdır. Bu sayede korunmuş diziler tespit edilerek *Bacillus thuringiensis*'lerdeki bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin eldesi mümkün olabilecektir.

Serratia marcescens (Sm-Mm3) tarafından üretilen antibakteriyal molekülün ise NMR gibi ileri kimyasal teknikler kullanılarak kesin yapısı aydınlatılmalı ve sınıflandırılması gerçekleştirilmelidir.

Elde edilen moleküllerin kullanım imkanları, özellikle laboratuvar denemeleri ile sınırlı kalan biyolojik mücadele alanında kullanılabilirliği uygulamalı olarak araştırılmalıdır. *In vivo* sonuçlarda yüksek başarı elde edildiği takdirde moleküllerin ticari preparat haline getirilme yolları aranmalıdır.

Bakteriyosin üretme potansiyelleri araştırılan 37 bakterinin biyolojik mücadele alanında özellikle bitki zararlısı böceklerin kontrolünde kullanım potansiyelleri olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmişti (Demir vd., 2002; Sezen ve Demirbağ, 1999; Sezen vd., 2004, 2007 ve 2008; Bahar ve Demirbağ, 2007). Bu tez kapsamında ise bu bakterilerin bitki patojeni bakterilere karşı inhibisyon aktivitesine sahip antibakteriyal moleküller üretebildikleri belirlendi. Böylece, bu bakterilerin hem zararlı böcekleri kontrol etme hem de bitki patojeni bakterileri kontrol etme özellikleri belirlendiğinden “ideal zirai mücadele materyali” olarak kullanılma potansiyellerinin olduğu tespit edildi. Böylesi çok yönlü bir materyalin, geliştirip ticari preparat olarak kullanılma potansiyelleri araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Franz, C.M., Ben Omar, N. and Gálvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins, FEMS Microbiol. Rev., 35, 201-232.
- Ahern, M., Verschueren, S. and Sinderen, D.V., 2003. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439, FEMS Microbiol. Lett., 220, 127-131.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif gıda koruyucuları, Erciyes Üniv. FBE Derg., 25, 59-70.
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A. and Troitsky, N., 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents, J. Infect., 36, 5-15.
- Allgaier, H., Jung, G., Werner, R.G., Schneider, U. and Zahner, H., 1986. Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic, Eur. J. Biochem., 160, 9-22.
- Allison, G.E., Fremaux, C. and Klaenhammer, T.R., 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of 2 peptides encoded within the lactacin F operon, J. Bacteriol., 176, 2235-41.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C. and Bierbaum, G., 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster, Appl. Environ. Microbiol., 66, 2565-2571.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds, Food Cont., 17, 6, 454-461.
- Asutay, D., 2007., Yöresel bir gıdadan izole edilen bakteriyosin üreten bakterinin teşhisi ve bakteriyosinin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F., 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, Appl. Environ. Microbiol., 62, 1676-82.
- Bahar, A.A. and Demirbag, Z., 2007. Isolation of pathogenic bacteria from *Oberea linearis* (Coleoptera: Cerambycidae), Biologia, 62, 1, 13-18.
- Banerjee, S. and Hansen, J.N., 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic, J. Biol. Chem., 263, 9508-9514.

- Barboza-Corona, J.E., Vazquez-Acosta, H., Bideshi, D.K. and Salcedo- Hernandez, R., 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*, Arch. Microbiol., 187, 117-126.
- Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R., 1984. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, Appl. Environ. Micr., 45, 6, 1808- 1815.
- Barton, M.D. and Hart, W.S., 2001. Public health risks: Antibiotic resistance, Asian-Austral. J. Animal. Sci., 14, 414-22.
- Başbülbul, G., 2009. Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Beighton, D., Hayday, H. and Walker, J., 1982. The acquisition of *Streptococcus mutans* by infant monkeys (*Macaca fascicularis*) and its relationship to the initiation of dental caries, J. Gen. Microbiol., 128, 1881-1892.
- Bennett J.W. and Chung K.T., 2001. Alexander Fleming and the discovery of penicillin, Adv. Appl. Microbiol., 49, 163-84.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites, J. Antibiot., 58, 1-26.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B., 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. of Indust. Microbiol., 2, 319-322.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248.
- Bradley, D., 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins, Bacteriol. Rev., 31, 4, 230-314.
- Braun, V., Pilsel, H. and Gross, P., 1994. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution, Arch. Microbiol., 161, 199-206.
- Breukink, E., Van Heusden, H. E., Vollmerhaus, P. J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A. J. and De Kruijff, B., 2003. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes, J. Biol. Chem., 278, 19898-19903.
- Bycroft, B.W. and Maslen, C., 1988. The biosynthetic implications of acetate and glutamate incorporation into (3R,5R)-carbapenam-3-carboxylic acid and (5R)-carbapenam-2em-3- carboxylic acid by *Serratia* sp., J. Antibiotics, 41, 1231-1242.

- Chandrapati, S. and O'Sullivan, D. J., 1999. Nisin independent induction of the nisA promoter in *Lactococcus lactis* during growth in lactose or galactose, FEMS Microbiol. Lett., 170, 1, 191-198.
- Chehimi, S., Delalande, F., Sable, S., Hajlaoui, M.R., Van Dorsselaer, A., Limam, F. and Pons, A.M., 2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*, Can. J. Microbiol., 53, 284-90.
- Chehimi, S., Pons, A.M., Sable, S., Hajlaoui M. R., and Limam F., 2010. Mode of action of thuricin S, a new class IId bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*, Can. J. Microbiol., 56, 162-167.
- Chen, W.Y. and Echandi, E., 1984. Effects of avirulent bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tobacco, Plant Path., 33, 245-53.
- Chen, P., Qi, F., Novak, J., and Caufield, P.W., 1999. The specific genes for lantibiotic mutacin II biosynthesis in *Streptococcus mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. Appl. Envir. Microbiol. 65:1356-1360.
- Chen, H. and Hoover, D.G., 2003. Bacteriosins and their food applications, Comphrehen. Rev. In Food Sci. and Food Safety, 2, 82-100.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A., 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil, Lett. in Appl. Microbiol., 32, 243-247.
- Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Daffonchio, D. and Boudabous, A., 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD9, J. Appl. Microbiol., 95, 990-1000.
- Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D. and Boudabous, A., 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110, Microbiol. Res., 163, 684-692.
- Chikindas, M.L. and Montville, T.J., 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives, Chapter 11, Juneja, V.K. and Sofos J.N. Eds. Control of Foodborne Microorganisms, 303-321, New York.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., Motta, A., Souto, A.A. and Brandelli, A., 2006. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*, Can. J. Microbiol., 52, 533-539.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, Int. J. of Food Microbiol., 71, 1, 1-20.

- Contreras, B.G.L., De Vuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bosman, F., Sablon, E. and Vandamme, E.J., 1997. Isolation, purification and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMGP- 13139, Appl. Environ. Microbiol., 63, 13-20.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food, Microbiol., 3, 777-788.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P., 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins, Nat. Rev. Microbiol., 4, 2.
- Cox, A.R., Thomson, N.R., Bycroft, B., Stewart, G.S., Williams, P. and Salmond, G.P., 1998. A pheromone-independent CarR protein controls carbapenem antibiotic synthesis in the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens*, Microbiol., 144, 201-209.
- Craik, D., Daly, N., Saska, I., Trabi, M. and Rosengren K., 2003. Structures of naturally occurring circular proteins from bacteria, J. of Bacteriol., 185, 14, 4011-21.
- Çolak, F., 2006. Çeşitli Habitatlardan İzole Edilen Endosporlu Basillerin Antimikrobiyal Aktivite Açısından Taranarak Metabolitlerin Saflaştırılması, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Daeschel, M., McKenney, M. and McDonald, L., 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11, Food Microbiol., 7, 2, 91-98.
- Davies, E.A., Bevis, H.E. and Delves-Broughton, J., 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*, Lett. Appl. Microbiol., 24, 343-6.
- Degnan, A.J., Yousef, A.E. and Luchansky, J.B., 1992. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners, J. Food Prot., 55, 98-103.
- Delves-Broughton, J., 2005. Nisin as a food preservative, Food Aust., 57, 525-527.
- De Martinis, E.C.P., Alves, V.F. and Franco, B.D.G.M., 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Rev. Int., 18, 191-208.
- Demir, I., Sezen, K. and Demirbag, Z., 2002. The first study on bacterial flora and biological control agent on *Anoplus roboris* (Sufr., Coleoptera), J. of Microbiol., 40, 2, 104-108.
- Dowell, S.F., Kupronis, B.A., Zell, E.R. and Shay, D.K., 2000. Mortality from *Pneumonia* in children in the United States, 1939 through 1996, N. Engl. J. Med., 342, 1399-1407.

- Drew, R.A.I., Courtice, A.C. and Teakle, D.S., 1983. Bacteria as a natural source of food for adult fruit flies (Diptera: Tephritidae), Oecologia, 60, 279-284.
- Drew, R.A.I. and Lloyd, A.C., 1987. Relationship of fruit flies (Diptera: Tephritidae) and their bacteria to host plants, Ann. Entomol. Soc. Am., 80, 629-636.
- Dufour, A., Rince, A., Uguen, P. and LePennec, J.P., 2000. A novel lactococcal insertion element, forms a transposon-like structure including the lactacin 481 lantibiotic operon, J. Bacteriol., 182, 5600-5605.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J. and Rebuffat, S., 2007. Microcins, gene encoded antibacterial peptides from enterobacteria, Nat. Prod. Rep., 24, 4, 708-734.
- Eckner, K. F., 1992. Bacteriocins and food applications, Dairy Food Environment Sanit. 12, 204-209.
- Eichenlaub, R. and Winkler, U., 1974. Purification and mode of action of two bacteriocins produced by *Serratia marcescens* HY, J. of Gen. Microbiol., 83, 83-94.
- El-Naggar, M.Y., Hassan, M.A. and Said, W.Y. 2001. Isolation and Characterization of an antimicrobial substance produced by *Streptomyces violates*, Egyptian J. of Biol., 3, 11-21.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizoki, A., 2000. Class IIa Bacteriocins: biosynthesis structure and activity, FEMS Microbiol. Rev., 24, 85-106.
- Ennahar, S., Sonomoto and K., Ishizaki, A., 1999. Class IIa Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity And Food Preservation, J. Bio. Bioeng. 87, 705-716.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, FEMS Microbiol. Rev., 24, 85-106.
- Ercolini, D., La Storia, A., Villani, F. and Mauriello, G., 2006. Effect of a bacteriocin activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescens microscopy, J. of Appl. Microbiol., 100, 4, 765-772.
- Favret, M.E. and Yousten, A.A., 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*, J. Invertebr. Pathol., 53, 206-216.
- Ferchichi, M., Frere, J., Mabrouk, K. and Manai, M., 2001. *Lactococcin* MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a tunisian dairy product, FEMS Microbiol. Lett., 205, 49-55.
- Fey, P.D., Safranek, T.J., Rupp, M.E., Dunne, E.F., Ribot, E., Iwen, P.C. Bradford, B.A., Angulo, F.J. and Hinrichs, S.H., 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle, N. Engl. J. Med., 342, 1242-1249.

- Forrest, R.D., 1982. Early history of wound treatment, J. R. Soc. Med. 75, 3, 198-205.
- Foulds, J., 1972. Purification and Partial Characterization of a Bacteriocin from *Serratia marcescens*, J. of Bacteriol., 110, 3, 1001-1009.
- Franz, C.M., Du Toit, M., Von Holy, A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H., 1997. Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables, J. Basic Microbiol., 37, 3, 187-196.
- Fredenhagen, A., Tamura, S.Y., Kenny, P.T.M., Komura, H., Naya, Y., Nakanishi, K., Nishiyama, K., Sugiura, M. and Kita, H., 1987. Andrimid, a new peptide antibiotic produced by an intracellular bacterial symbiont isolated from a brown planthopper, J. Am. Chem. Soc., 109, 4409-4411.
- Fredericq, P., 1957. Colicins, Ann. Rev. Microbiol., 11, 7-22.
- Freiberg, C., Brunner, N.A., Schiffer, G., Lampe, T., Pohlmann, J., Brands, M., Raabe, M., Häbich, D. and Ziegelbauer, K., 2004. Identification and characterization of the first class of potent bacterial acetyl-coa carboxylase inhibitors with antibacterial activity, J. Biol. Chem., 279, 26066-26073.
- Gaynes, R., 1997. The impact of antimicrobial use on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria in hospitals, Infect. Dis. Clin. North Am., 11, 757-65.
- Geinsen, R., Lücke, K.K. and Kröckel, L., 1992. Starter and protective cultures for meat and Meat Products, Fleischwirtsch, 72, 6, 894-898.
- Ghanbari, M., Rezaei, M., Soltani, M. and Shah-Hosseini, Gh., 2009. Production of bacteriocin by a novel *Bacillus* sp. strain RF 140, an intestinal bacterium of Caspian Frisian Roach (*Rutilus frisii kutum*), Iranian J. of Vet. Res., 10, 3, 267.
- Gillor O., Nigro L.M. and Riley M.A., 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials, Curr. Pharmaceut. Design, 11.
- Gorris, L.G.M., 1994. Bacteriocins potential applications in food preservation. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action, 7.
- Gratia, A., 1925. Sur un remarquable exemple antagonisme entre deux souches de coilbacille, Comp. Rend. Soc. Biol., 93, 1040-1.
- Gratia, J.P., 1989. Products of defective lysogeny in *Serratia marcescens* SMG 38 and their activity against *Escherichia coli* and other enterobacteria, J. of Gen. Microbiol., 135, 23-35.
- Gray, E.J., Di Falco, M., Souleimanov, A. and Smith, D.L., 2006. Proteomic analysis of the bacteriocin thuricin 17 produced by *Bacillus thuringiensis* NEB17, FEMS Microbiol Lett., 255, 27-32.

- Gray, E.J., Lee, K.D., Souleimanov, A.M., Di Falco, M.R., Zhou, X., Ly A., Charles T.C., Driscoll B.T. and Smith D.L., 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification, J. Appl. Microbiol., 100, 545-554.
- Green, A.A. and Hughes, W.L., 1955. In methods in enzymology, Colowick, S. P. and Kaplan, N.O. Eds. 1, 67, New York.
- Guasch, J.F., Enfedaque, J., Ferrer, S., Gargallo, D. and Regue. M., 1995. Bacteriocin 28b, a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes, Res. Microbiol., 146, 477-483.
- Guder, A., Wiedemann, I. and Sahl, H.G., Biopolymers., 55, 62, 2000.
- Haft, D.H., 2009. A strain-variable bacteriocin in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* with repeated Cys-Xaa-Xaa motifs, Biol. Direct., 4, 15.
- Hansen, B.M. and Handriksen, N.B., 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis, Appl. Environ. Microbiol., 67,185-9.
- Hamon, Y. and Peron Y., 1961. Etude de la propri t  bacteriocinog ne dans le genre *Serratia*, Annales de l'Institut Pasteur, 100, 818-821.
- Hardy, K., 1975. Colicinogeny and related phenomena, Bacteriol Rev., 39, 4, 464-515.
- Hardy, K.G., 1993. Plasmids, The Practical Approach Series, 99-100.
- Hastings, J.W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E., 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*, J. Bacteriol., 173, 23, 7491-7500.
- H chard, Y. and Sahl, H.G., 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriosins from Gram-positive bacteria, Biochimie., 84, 545-557.
- Hetz, C., Bono, M.R., Barros, L.F. and Lagos, R., 2002. Microcin E492, a channel forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines, Proc. Natl. Acad. Sci., 99, 2696-2701.
- Heu, S., Oh, J., Kang, Y., Ryu, S., Cho, S.K., Cho, Y. and Cho, M., 2001. Gly gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. glycines 8ra, Appl. Environ. Microbiol., 67, 4105-4110.
- Hillman, J.D., 2001. Replacement therapy of dental caries, Oper. Dent. Suppl., 6, 39-40.
- Hosoi, T. and Kiuchi, K., 2003. Natto-a food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto), Farnworth E.R., Eds, Handbook of Fermented Functional Foods, 227-245.

- Howard, B.J., Keiser, J.F., Smith, T.F., Weissfeld, A.S. and Tilton. R.C., 1993. Clinical and Pathogenic Microbiology, 2nd Edition, Mosby, A.C.V., Imprint Of Mosby-Year Book Inc. St. Louis. 95.
- Hurst A., 1981. Nisin, Adv. Appl. Microbiol., 27, 85-123.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. and Yıldırım, M., 2005. Sınıf IIa bakteriyosinlerin biyosentezi, yapısı ve antimikrobiyal aktivitesi. Gıda Kongresi, Kongre Bildiri Kitapçığı. İzmir.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram positive bacteria, Microbiol. Rev., 59, 2, 171-200.
- Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Holo, H., Nes, I.F., Sletten, K.H. and Warner, P.J., 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of 2 peptides, Appl. Environ. Microbiol., 61, 4459-4463.
- Jin, M., Fischbach, M.A. and Clardy, J., 2006. A biosynthetic gene cluster for the acetyl-coa carboxylase inhibitor andrimid, J. Am. Chem. Soc., 128, 10660-10661.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R., 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481, J. Bacteriol., 167, 439-46.
- Joerger, R.D., Hoover, D.G., Barefoot, S.F., Harmon, K.M., Grinstead, D.A. and Nettles-Cutter, C.G., 2000. Bacteriocins. Lederberg, Ed. Encyclopedia of microbiology, 2nd edition, 1, 383-97.
- Joerger, R.D., 2003. Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages, Poult. Sci., 82, 640-7.
- Jung, B.M., Woo, S.G. and Chung, K.S., 2008. Antimicrobial substance against *Escherichia coli* O157-H7 produced by *Lactobacillus amylovorus* ME1, F. Sci. and Biotech., 17, 3, 679-682.
- Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A. and Jaoua, S., 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*, J. of Appl. Microbiol. 98, 881-888.
- Kamoun F., Zouari N., Saadaoui I. and Jaoua S., 2009. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bacteriocin production through culture conditions optimization. Preparative Biochem. and Biotech., 39, 400-412,
- Katla, T., Møretrø, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L. and Naterstad, K., 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures, Food Microbiol., 18, 431-9.

- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T. and Saito, T., 2004. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli, Appl. Environ. Microbiol., 70, 5, 2906-2911.
- Kido, Y., Hamakado, T., Yoshida, T., Anno, M., Motoki, Y., Wakamiya, T. and Shiba, T., 1983. Isolation and characterization of ancovenin, a new inhibitor of angiotensin I converting enzyme, produced by actinomycetes, J. Antibiot., 36, 1295-1299.
- Kim, Y., Cho, S.K. and Cho, M., 2001. Improvemen in the stability of glycinecin A through protein fusion of the two structural components, J. Microbiol., 39, 177-80.
- Klaenhammer, T.R. 1993., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12, 39-86.
- Knowles D.J.C., 1997. New strategies for antibacterial drug design, Trends. Microbiol., 5, 379-383.
- Korenblum, E., der Weid, I., Santos A.L., Rosado A.S., Sebastian, G.V., Coutinho, C.M., Magalhaes, F.C., Paiva, M.M. and Seldin, L., 2005. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil, J. Appl. Microbiol., 98, 667-675.
- Korenblum, E., Sebastian, G.V., Paiva, M.M., Coutinho, C.M., Magalhaes, F.C., Peyton, B.M. and Seldin, L., 2008. Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation, Appl. Microbiol. Biot., 79, 97-103.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 229, 680-685.
- Lancini, G. and Lorenzetti, R., 1993. Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. New York.
- Landsberg, H., 1949. Prelude to the discovery of penicillin, Isis, 40, 3, 225–227.
- Lawton, E.M., Ross, R.P., Hill, C. and Cotter. P.D., 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective, Mini Rev. Med. Chem., 7, 1236-1247.
- Lee, H., Churey, J.J. and Worobo R.W., 2009. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361, FEMS Microbiol. Lett., 299, 205–213.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M.B.M., van Giezen M, van Noort, J.M. and Pouwels, P.H., 1995. Genetic analysis of Acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*, Microbiol., 141, 1629-1635.

- Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbe, K. and DeVuyst L. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation, J. of Appl. Microbiol., 84, 2, 159-168.
- Levin, B.R., Antia, R., Berliner, E., Bloland, P., Bonhoeffer, S. and Cohen, M., 1998. Resistance to antimicrobial chemotherapy: A prescription for research and action, Am. J. Med. Sci., 315, 87-94.
- Lien, S. and Lowman, H.B., 2003. Therapeutic peptides, Trends Biotechnol., 21, 556-562.
- Lindblad, W.J., 2008. Considerations for determining if a natural product is an effective wound -healing agent, Internat. J. of Lower Extremity Wounds, 7, 2, 75- 81.
- Lodemann, U., Lorenz, B.M., Weyrauch, K.D. and Martens, H., 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets, Arch. Anim. Nutr., 62, 87-106.
- Long, R.A., Rowley, D.C., Zamora, E., Liu, J., Bartlett, D.H. and Azam, F., 2005. Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol., 71, 8531–8536.
- Lopez-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar J.A. and Loeza-Lara P.D., 2011. Antimicrobial peptides: diversity and perspectives for their biomedical application, Biomedical engineering, trends, research and technologies, Meksika.
- Lyon, W.J. and Glatz, B.A., 1991. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionobacterium thoenii*, Appl. Environ. Micro., 57, 3, 701-706.
- Macfarlane, G.T. and Cummings, J.H., 2002. Probiotics, infection and immunity. Curr. Opin. Infect. Dis., 15, 501-506.
- Mandal, V., Sen, S.K. and Mandal, N.C., 2008. Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 and its characterization, Indian J. of Biochem. and Biophys., 45, 106-110.
- Mantovani H.C., Hu H., Worobo R.W. and Russell J.B., 2002. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, Microbiol., 148, 3347-3352.
- Marki, F., Hanni, E., Fredenhagen, A. and van Oostrum, J., 1991. Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A, Biochem. Pharmacol., 42, 2027- 2035.
- Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G. and De Felice, M., 2002. Purification and partial characterization of Bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*, Microb. Cell Fact., 1, 1-5.
- Mauriello, G., Ercolini, D., La Stora, A., Casaburi, A. and Villani, F., 2004. Development of polythene films for food packaging acitivated with an anlisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y, J. of Appl. Microbiol., 97, 2, 314-322.

- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M. M., Sanchez-Barrena, M. J., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M. and Valdivia, E., 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins, Curr. Protein Pept. Sci., 5, 399-416.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, FEMS Microbial. Rev., 25, 285-308.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W. and Jones, A.L., 2002. Antibiotic use in plant agriculture, Annu. Rev. Phytopathol., 40, 443-65.
- Mezaini, A., Chihib, N.E., Bouras, A.D., Nedjar-Arroume, N. and Hornez J.P., 2009. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product, J. of Environ. and Public Health, 6.
- Michel-Briand, Y. and Baysse, C., 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, Biochimie., 84, 499-510.
- Moll, G., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N. and Driessen, A. J. 1998. Mechanistic properties of the two-component bacteriocin Lactococcin G. J. Bacteriol., 180, 1, 96-99.
- Montville, T.J., and Winskowski, K., 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria, Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville T. J. Eds, Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers, Washington.
- Moretro, T., Aasen, I.M., Storro, I., Axelsson, L. 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. J. of Appl. Microbiol., 88 3, 536-545.
- Mortvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I.F., 1991. Purification and amino acid sequence of Lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1829-1834.
- Naclerio, G., Ricca, E., Sacco, M. and de Felice, M., 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microb., 59, 4313-4316.
- Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, S., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H. and Hayashi, T., 2000. The Rtype pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage, Mol. Microbiol., 38, 213-231.
- Naruse, N., Tenmyo, O., Tomita, K., Konishi, M., Miyaki, T., Kawaguchi, H., Fukase, K., Wakamiya, T., and Shiba, T., 1989. Lanthiopeptin, a new peptide antibiotic. Production, isolation and properties of lanthiopeptin. J. Antibiot., 42, 837-845.

- Needham, J., Kelly, M.T., Ishige, M. and Andersen, R.J., 1994. Andrimid and moiramides A-C, metabolites produced in culture by a marine isolate of the bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Structure elucidation and biosynthesis. J. Org. Chem., 59, 2058–2063.
- Nes, I.F., Diep, B.D., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria, Anton. Leeuw. Int. J., 70, 113-128.
- Nes, I.F. and Holo, H., 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria, Biopolymers, 55, 50-61.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H. H. and Nissen-Meyer, J., 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (Class II) produced by lactic acid bacteria. Dutton, C. J., Haxell, M. A., McArthur, H. A. I. and Wax, R. G. Eds. *Peptide antibiotics; discovery, modes of action, and applications*, 81-115. Marcel Dekker, New York.
- Oclarit, J.M., Okada, H., Ohta, S., Kaminura, K., Yamaoka, Y., Iizuka, T., Miyashiro, S. and Ikegami, S., 1994. Anti-*Bacillus* substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium, Microbios., 78, 7-16.
- Oscariz J.C., Lasa I. and Pisabarro A.G., 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. FEMS Microbiol Lett., 178, 337-341.
- Oscariz, J.C. and Pisabarro, A., 2001. Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria, Int. Microbiol., 12, 123-127.
- Padilla, C., Brevis, P., Lobos, O. and Hubert. E., 1996. Bacteriocin activity of *Pseudomonas sp.* on enteropathogenic bacteria in an artificial aquatic system. Lett. Appl. Microbiol., 23, 371-374.
- Pag, U. and Sahl, H.G., 2002. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics?, Curr. Pharm. Des., 8, 815-833.
- Paik, H.D., Bae, S.S. and Pan, J.G., 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*, J. Ind. Microbiol. Biot., 19, 294-298.
- Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications, Biotechnol. Adv., 21, 465-99.
- Parente, E., Ricciardi, A. and Addario, G., 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. Appl. Microbiol. and Biotech., 41, 4, 388-394.

- Pattnaik, P., Kaushik, J.K., Grover, S. and Batish, V.K., 2001. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo, J. Appl. Microbiol., 91, 636-645.
- Pedersen, P.B., Bjrnvad, M.E., Rasmussen, M.D. and Petersen, J.N., 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp., Regul. Toxicol. Pharm., 36, 155-161.
- Pelaez, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Diez Matas, M.T., Carcia, J.B., Gonzalez Del Val, A., Gozalez, V., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Martin, I. and Vicente, F., 1998. Endophytic fungi plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity, Mycol. Res., 102, 6, 755-761.
- Prinsloo, H. E., 1966. Bacteriocins and phages produced by *Serratia marcescens*, J. Gen. Microbiol. 45, 205-212.
- Rameshkumar G., Ravichandran S., Kaliyavarathan G. and Ajithkumar T.T., 2009. Antimicrobial peptide from the crab, *Thalamita crenata* (Latreille, 1829), World J. of Fish and Marine Sci., 1, 2, 74-79,
- Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J. W. and Hechard, Y., 2004. Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*, Microbiol., 150, 2663-2668.
- Rasch, M., Knochel, S. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A, Lett. in Appl. Microbiol., 27, 5, 275-278.
- Rayman, K., Aris, B. and Hurst, A., 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats, Appl. Environ. Microbiol., 41, 375-80.
- Reeves, P., 1965. The bacteriocins. Bacteriol. Rev., 29, 24-45.
- Riley, M.A. and Gordon, D.M., 1992. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages, J. Gen. Microbiol., 138, 1345-1352.
- Riley, M.A., Pinou, T., Wertz, J.E., Tan, Y. and Valletta, C.M., 2001. Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiellapneumoniae*, Plasmid, 45, 209-21.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E., 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. Annu. Rev. Microbiol., 56, 117-137.
- Riley, M.A., Goldstone, C.M., Wertz, J.E. and Gordon, D., 2003. A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. J. Evol. Biol., 16, 690-697.
- Riley M.A. and Chavan M.A., 2007. Bacteriocins, Ecology and Evolution, Springer-Verlag Berlin.

- Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food Microbiol., 79, 3-16.
- Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P. and Meaney, W.J., 1999. The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. J. Dairy Sci., 82, 2625-2631.
- Ryan, M. P., Hill, C. and Ross, R. P. 2002. Exploitation of lantibiotic peptides for food and medical uses. Dutton, C. J., Haxell, M. A., McArthur, H. A. I. and Wax, R. G. Eds., Peptide antibiotics; discovery, modes of action and applications, 193-242, New York.
- Sable, S., Pons, A.M., Gendron-Gaillard, S. and Cottenceau, G., 2000. Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 66, 4595-4597.
- Sahl, H.G. and Bierbaum, G., 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram positive bacteria, Annu. Rev. Microbiol., 52, 41-79.
- Sakthivel, N. and Mew, T.W., 1991. Efficacy of bacteriocinogenic strains of *Xanthomonas-oryzae* pv *oryzae* on the incidence of bacterial-blight disease of rice (*Oryza-sativa*), Can. J. Microbiol., 37, 764-768.
- Sano, Y., Kobayashi, M. and Kageyama, M., 1993. Functional domains of S-type pyocins deduced from chimeric molecules, J. of Bacteriol., 175, 19, 6179- 6185.
- Sayek, İ., 1997. Periton ve peritoneal savunma mekanizmaları, Klinik Deneysel Cerrahi Dergisi, 5, 12-19.
- Schillinger, U. and Lucke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, Appl. Environ. Microbiol., 55, 8, 1901-1906.
- Sezen, K. and Demirbag, Z., 1999. Isolation and insecticidal activity of some bacteria from the hazelnut beetle (*Balaninus nucum* L.), Appl. Entomol. Zool., 34, 1, 85-89.
- Sezen, K. and Demirbag, Z., 2001. Bacteriocidal activity and partial characterization of an inhibitory compound from *Serratia marcescens* Bn10 isolated from *Balaninus nucum* L. Fresenius Environmental Bulletin, 10, 12, 850-853.
- Sezen, K., Demir, I. and Demirbag, Z., 2004. Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Agelastica alni* L. (Coleoptera: chrysomelidae), Biologia, 59, 3, 327-331.
- Sezen, K., Demir, I. and Demirbag, Z., 2007. Identification and pathogenicity of entomopathogenic bacteria from common cockchafer, *Melolontha melolontha* L. (Col., Scarabaeidae), N. Z. J. of Crop and Horticultural Sci., 35, 79-85.

- Sezen, K., Kati, H., Nalcacioglu, R., Muratoglu, H. and Demirbag, Z., 2008. Identification and pathogenicity of bacteria from european shot-holeborer, *Xyleborus dispar* Fabricius (Coleoptera: Scolytidae), Ann. of Microbiol., 58, 2, 173-179.
- Sherley, M., Gordon, D.M. and Collignon, P.J., 2000. Variations in antibiotic resistance profile in Enterobacteriaceae isolated from wild Australian mammals, Environ. Microbiol., 2, 620-631.
- Singh, M.P., Mroczenski-Wildey, M.J., Steinberg, D.A., Andersen, R.J., Maiese, W.M., and Greenstein, M., 1997. Biological activity and mechanistic studies of andrimid, J. Antibiot., 50, 270-273.
- Smarda, J. and Smajs, D., 1998. Colicins-exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. Folia Microbiol., 43, 563-82.
- Solomon, D.H., Van Houten, L., Glynn, R.J., Baden, L., Curtis, K. and Schragar, H., 2001. Academic detailing to improve use of broadspectrum antibiotics at an academic medical center. Arch. Intern. Med., 161, 1897-1902.
- Stein, T., Dusterhus, S., Stroh, A. and Entian, K.D., 2004. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster, Appl. Environ. Microb., 70, 2349-2353.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions, Mol. Microbiol., 56, 845-857.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, W.L., 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Bacteriol. Rev., 40, 3, 722-756.
- Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F. and Hammes, W.P., 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673, Syst. Appl. Microbiol., 15, 460-468.
- Timmis, K., and Winkler, U., 1973. Gene dosage studies with pleiotropic mutants of *Serratia marcescens* superactive in the synthesis of niarcescin A and certain other exocellular proteins. Mol. and Gen. Genet., 124, 207-217.
- Todorov, S.D., and Dicks, L.M.T., 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against gram negative bacteria, Enzy. and Microbial. Tech., 36, 318-326.
- Tora, S., 1995. Partial purification and characterization of bacteriocin from *Yersinia kristensenii*, J. of Appl. Bacteriol., 78, 3, 224-228.
- Traub, W.H., Raymond, E.A. and Startzman, T.S., 1971. Bacteriocin (Marcescin) typing of clinical isolates of *Serratia marcescens*, Appl. Microbiol., 21, 5, 837-840.

- Traub, W.H., 1980. Bacteriocin and phage typing of *Serratia*, Graevenits, A. and Rubin, S. J., Eds., The genus *Serratia*, 79–100, Boca Raton, Fla.
- Trotter, M., McAuliffe O.E., Fitzgerald G.F., Hill C., Ross, R.P. and Coffey A., 2004. Variable bacteriocin production in the commercial starter *Lactococcus lactis* DPC4275 is linked to the formation of the cointegrate plasmid pMRC02. Appl. Environ. Microbiol., 70, 34-42.
- Tuncer Y., 2005. Laktokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanısı ve bu özelliğin genetik doğasının belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Twomey, D., Ross, R.P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C., 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Review. Anton. Van Leeuw. 82, 165–185.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F., 1999. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, 188, 73-74.
- Van den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E., 1999. Antibiotic usage in animals - Impact on bacterial resistance and public health, Drugs, 58, 589-607.
- Van Houten, M.A., Luinge, K., Laseur, M. and Kimpen, J.L., 1998. Antibiotic utilisation for hospitalised paediatric patients, Int. J. Antimicrob. Agents, 10, 161-164.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L., 1998. Isolation purification and partial characterization of plantaricin 423 a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, J. of Appl. Microbiol., 84, 311-317.
- Van Schaik, W., Gahan, C.G.M. and Hill, C., 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3147, J. of Food Protec., 62, 5, 536-539.
- Vaughan, E.E., Daly, C. and Fitzgerald, G.F., 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. J. Appl. Bacteriol., 73, 299- 308.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64, 655-71.
- Vidaver, A. K., 1983. Bacteriocins: The Lure and the Reality. Plant Disease, 67, 471-474.
- Vuyst, L.D., Callewaert, R. and Crabbe, K., 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions, Microbiol., 142, 817-827.
- Wainwright, M., 1989. Moulds in ancient and more recent medicine, Mycologist, 3, 1, 21-23.

- Waite, R. and Curtis, M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pyocin production affects population dynamics within mixed-culture biofilms, J. of Bacteriol., 191, 4, 1349-54.
- Wegener, H.C., 1999. The consequences for food safety of the use of fluoroquinolones in food animals, N. Engl. J. Med., 340, 1581-1582.
- Wertz, J.E. and Riley M.A., 2004. Chimeric nature of two plasmids of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B, J. Bacteriol., 186, 1598-1605.
- Wester, C.W., Durairaj, L., Evans, A.T., Schwartz, D.N., Husain, S. and Martinez, E., 2002. Antibiotic resistance - A survey of physician perceptions, Arch. Intern. Med., 162, 2210-2216.
- Wietz, M., Mansson, M., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O. and Gram L., 2010. Antibacterial Compounds from Marine *Vibrionaceae* Isolated on a Global Expedition, Marine Drugs, 8, 2946-2960.
- Wooley, R.E., Gibbs, P.S. and Shotts, E.B., 1999. Inhibition of *Salmonella typhimurium* in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli*, Avian Dis., 43, 245-50.
- World Health Organization; Press Release WHO/41.<http://www.who.int>. 12 June 2000.
- Yorgey, P., Lee, J., Kordel, J., Vivas, E., Warner, P., Jebaratnam, D., Kolter, R., 1994. Posttranslational modifications in microcin B17 define an additional class of DNA gyrase inhibitor, Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 4519-23.
- Yücel, S., 2007. Mağaralardan İzole Edilen aktinomiset izolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri üzerine çalışmalar, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K., 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1616- 1619.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini 1988-1993 yılları arasında 50. Yıl General Refet Bele İlköğretim Okulunda, orta öğrenimini 1993-1996 yılları arasında Yavuz Selim İlköğretim Okulunda ve 1996-1999 yılları arasında Hayrullah Kefoğlu Lisesinde tamamladı. 2000-2004 yılları arasında Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimini, bölüm birinciliği derecesi ile tamamladı. 2005-2007 yılları arasında Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2007-2008 öğretim yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2007-2008 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine geçiş yaptı. 2008 yılından bu yana Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. İyi derecede ingilizce bilmekte olup evli ve bir çocuk annesidir.

BAŞLICA YAYINLARI

- Gumrukcuoglu, N., Ugras, S., Ugras, H.I., Cakir, U., 2011. Synthesis, extraction, and anti-bacterial studies of some new bis-1,2,4-triazole derivatives part I, J. of Appl. Polymer Sci. 123, 4, 2011–19.
- Uğraş, S., Köçkar, F., ve Yıldırım, H., 2008. TGF- β sitokininin, C/EBP δ geninin transkripsiyonel regülasyonu üzerine etkilerinin araştırılması. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon.
- Uğraş, S., Katı, H., Sezen, K. and Demirbağ, Z., 2009. Isolation and Partial characterization of a bacteriocin like substance of *Pseudomonas* sp. originated from common Cockchafer, II. Internat. Entomopath. and Microb. Cont. Symposium, Muğla.
- Uğraş, S., Katı H., Sezen, K. and Demirbağ, Z., 2010. Characterisation of an inhibitory compound (bacteriocin) from entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* isolated from Hazelnut Beetle (*Balaninus nucum*), 43th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Trabzon.
- Katı, A., Uğraş, S., Yılmaz, H. and Katı, H., 2010 Study of the bacterial flora as a biological control agent of *Lymanitor coryli* Perris (Col.:Curculionidae). 43th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Trabzon.

- Katı, A., Uğraş, S., Yılmaz, H. and Katı, H., 2010. The first study on the bacterial flora of the *Xyleborus xylographus* Say (Coleoptera: Curculionidae), 43th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Trabzon.
- Odabaşoğlu M., Uğraş S. ve Büyükğüngör O., 2010. Bazı 3-Anilinoftalidlerin sentezi moleküler yapılarının ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, 24. Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak.
- Gümrükçüoğlu, N., Uğraş, S., Uğraş, H.İ., Duyar Ö. ve Çakır, Ü., 2010. Bazı yeni bis-1,2,4-triazol türevlerinin sentezi, ekstraksiyon kabiliyeti, seçicilik ve antibakteriyal çalışmaları bölüm 1, 24. Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak.
- Gümrükçüoğlu, N., Uğraş, S., Uğraş, H.İ. ve Duyar, Ö., 2010. Bazı yeni Bis-1,2,4-Triazol türevlerinin sentezi, ekstraksiyon kabiliyeti, seçicilik ve antibakteriyal çalışmaları bölüm 2, 24. Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak.
- Uğraş, S., Katı, H., Sezen, K. ve Demirbağ, Z., 2011. Entomopatojenik *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin moleküler karakterizasyonu ve bitkilerde hastalık etmeni bakterilere karşı antogonistik etkisinin belirlenmesi, Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş.
- Uğraş, S., Katı, H., Sezen, K. and Demirbağ, Z., 2011. Identification of antimicrobial substances from enthomopathogenic bacteria and investigation of industrial areas, III. International Entomopathogens and Microbial Control Symposium, İstanbul.