

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERMOFİLİK *GEOBACILLUS* ÜYELERİNİN HÜCRESİZ
SÜPERNATANTLARININ ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN TARANMASI
VE POTANSİYEL BAKTERİYOSİN BENZERİ BİR TERMOSTABİL
PEPTİDİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Deniz ABACI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TERMOFİLİK *GEOBACILLUS* ÜYELERİNİN HÜCRESİZ SÜPERNATANTLARININ ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN TARANMASI VE POTANSİYEL BAKTERİYOSİN BENZERİ BİR TERMOSTABİL PEPTİDİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Deniz ABACI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Bu çalışmada *Geobacillus* cinsine özgü türlerin (11 referans, 8 izolat) termostabil bakteriyosin üretim potansiyellerinin taranması amaçlanmıştır. Yapılan tarama sonucunda, *Geobacillus* sp. C304 izolatının gösterdiği antimikrobiyal etkinliğin kaynağının yeni bir bakteriyosin olarak tanımlanabilecek bir antimikrobiyal peptid olduğu, proteinaz K uygulaması ve kültür süpernatantının nötralizasyonu işlemleriyle dolaylı yollardan kanıtlanmıştır. Söz konusu izolatın ürettiği antimikrobiyal peptidin etkinliğini artırmak adına birtakım optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu bağlamda farklı inkübasyon sürelerinde (0., 4., 8., 12., 16., 20., 24., 30., 36., 48., 60., 72.) inkübasyon sıcaklıklarında (50°C, 55°C, 60°C, 65°C) ve farklı besiyeri pH değerlerinde (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5) bakteriyosin üretim etkinlikleri test edilmiştir. 16 ila 20. saatlerde, 60 °C'de pH 7.5'ta tespit edilen optimum koşulların uygulanması sonrası elde edilen C304 süpernatantının; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* 23, *Enterococcus faecalis* ATCC 25912, *Bacillus subtilis* DSM 1971, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Staphylococcus carnosus*, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13311, *S. Typhimurium* DMC4, *Escherichia coli* ATCC 35150, *Salmonella* Infantis DMC12, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella* sp. ve *Candida albicans* patojen suşları üzerindeki antimikrobiyal etkinliği damlatma tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. C304 süpernatantının inhibisyon etki gösterdiği suşlar için ayrıca MİK değerleri ve antibiyofilm etkinlik de belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen antimikrobiyal içeriğin pH ve sıcaklık toleransları da değerlendirilmiştir. Son olarak C304 süpernatantının referans bir termofilik suş olan *Geobacillus toebii* DSM 14590 üzerinde sergilediği antimikrobiyal aktivite, Native-PAGE (N-PAGE) analizinde görülen belirgin şeffaf inhibisyon zonu ile teyit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlarla, *Geobacillus* sp. C304 izolatında tespit edilen bu termostabil bakteriyosinin endüstriyel süreçlerde kullanım potansiyelinin olabileceği gündeme gelmiştir.

Haziran 2022, 58 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik, Bakteriyosin, *Geobacillus*

ABSRTACT

Master Thesis

SCREENING OF ANTIMICROBIAL EFFECTS OF CELL-FREE SUPERNATANTS OF MEMBERS OF THERMOPHILIC *GEOBACILLUS* AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A POTENTIAL BACTERIOCINE-LIKE A THERMOSTABLE PEPTIDE

Deniz ABACI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

In this study, the potential of thermostable bacteriocin production by species of the genus *Geobacillus* (11 references, 8 isolates) was investigated. As a result of monitoring, *Geobacillus* sp., the source of antimicrobial activity of isolate C304 is an antimicrobial peptide that might be defined as a new bacteriocin, which was indirectly demonstrated by the application of proteinase K and neutralisation of the culture supernatant. A series of optimisation studies were carried out to increase the efficacy of the antimicrobial peptide produced by the isolate. In this context, bacteriocin production activities were tested at different incubation times (0., 4., 8., 12., 16., 20., 24., 30., 36., 48., 60., 72.), incubation temperatures (50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C) and different pH values of the media (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 and 9.5). C304 supernatant obtained after applying optimal conditions at pH 7.5 at 60 °C for 16 to 20 hours; Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* 23, *Enterococcus faecalis* ATCC 25912, *Bacillus subtilis* DSM 1971, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348, MRSA ATCC 43300, *Bacillus licheniformis* DSM 13, *Staphylococcus carnosus*, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13311, *Salmonella* Typhimurium DMC4, *Escherichia coli* ATCC 35150, *Salmonella* Infantis DMC12, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 7006003, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella* sp. and *Candida albicans* pathogenic strains were analysed using the drop technique. The MIC values and antibiofilm activity were also determined for the strains where the supernatant of C304 had an inhibitory effect. In addition, the pH and temperature tolerances of the antimicrobial content obtained were also evaluated. Finally, the antimicrobial activity of the C304 supernatant on a thermophilic reference strain, *Geobacillus toebii* DSM 14590, was confirmed by the clear zone of inhibition in the Native-PAGE (N- PAGE) analysis. With these results, it became clear that this thermostable bacteriocin detected in isolate C304 has the potential to be used in industrial processes.

June 2022, 58 Pages

Key Words: Thermophilic, Bacteriocin, *Geobacillus*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerileri ile bilimsel gelişmeye başından sonuna kadar katkıda bulunan; hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan, bilgi ve deneyimlerini her zaman bizimle paylaşan Hocam Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı),

Çalışmalarım süresinde yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Başar KARACA'ya (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deniz ABACI
Ankara, Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	3
2.1 Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri.....	3
2.2 Bakteriyosinlerin Potansiyel Kullanım Alanları.....	6
2.2.1 Gıda koruma ve bağırsak enfeksiyonlarının sağaltımı.....	6
2.2.2 Nanoteknoloji.....	9
2.2.3 Sistemik enfeksiyonlar ve ağız bakımı.....	9
2.2.4 Kadın sağlığı.....	10
2.2.5 Cilt sağlığı ve cilt bakımı.....	11
2.2.6 Kanseri.....	11
2.2.7 Farmasötik.....	12
2.2.8 Veterinerlik.....	12
2.2.9 Ticari kullanımda bakteriyosinler.....	13
2.3 Termotabil Proteinler.....	16
2.4 Antimikrobiyal Proteinlerin İşlevleri.....	17
2.5 Termotabil Bakteriyosinler.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Bakteri kültürleri.....	22
3.1.2 Tezin deneysel çalışmalarında kullanılan çözeltiler.....	23
3.1.3 Tezin deneysel çalışmalarında kullanılan besiyerleri.....	25
3.2 Yöntem.....	25
3.2.1 <i>Geobacillus</i> üyelerinin hücrelerinin ve hücresiz kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi.....	25
3.2.2 Hücresiz kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinliklerinin peptid tabanlı (Bakteriyosin) olup olmadığının araştırılması.....	26
3.2.3 Bakteriyosin aktivite ünitesinin belirlenmesi.....	28
3.2.4 Bakteriyosin üretiminin optimizasyonu.....	28
3.2.4.1 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon zamanının belirlenmesi...	28
3.2.4.2 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi...	29
3.2.4.3 Bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi.....	29
3.2.5 Agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin içeren kültür süpernatantının antimikrobiyal etkinliğini belirlenmesi.....	29
3.2.6 Bakteriyosin içeren kültür süpernatantının minimum inhibisyon dilüsyon değerinin ve antibiyofilm etkinliğinin değerlendirilmesi.....	31
3.2.7 Çevresel parametrelerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkileri.....	32

3.2.7.1 Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi....	32
3.2.7.2 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi.....	33
3.2.7.3 Enzimatik uygulamaların bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi.....	33
3.2.8 Native-poliakriamid jel elektroforezi ile bakteriyosin varlığının kanıtlanması.....	33
4. SONUÇLAR.....	35
4.1 <i>Geobacillus</i> Üyelerinin Hücrelerinin ve Hücresiz Kültür Süpernatantlarının Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	35
4.2 Hücresiz Kültür Süpernatantlarının Antimikrobiyal Etkinliklerinin Peptid Tabanlı (Bakteriyosin) Olup Olmadığının Araştırılması.....	37
4.3 Bakteriyosin Aktivite Ünitesinin Belirlenmesi.....	38
4.4 Çevresel Parametrelerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	38
4.4.1 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon zamanının belirlenmesi.....	38
4.4.2 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	39
4.4.3 Bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi.....	40
4.4 Agar Difüzyon Yöntemi ile Üretimi Optimize Edilen Bakteriyosinin Patojen Bakteriler Üzerinde Antimikrobiyal Etkinliğinin Test Edilmesi....	41
4.5 Bakteriyosin İçeren Kültür Süpernatantının Minimum İnhibisyon Dilüsyon Değerinin ve Antibiyofilm Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	41
4.6 Çevresel Parametrelerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	44
4.6.1 Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi.....	44
4.6.2 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi.....	44
4.6.3 Enzimatik uygulamaların bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi.....	45
4.7 Native-poliakriamid jel elektroforez (N-PAGE) antimikrobiyal peptid varlığının gösterilmesi.....	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	58

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
%	Yüzde
μ L	Mikrolitre
ml	Mililitre
L	Litre
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
$^{\circ}$ C	Derece Santigrad
Log	Logaritma

Kısaltmalar

vd.	ve diğerleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
kDa	Kilo Dalton
RNA	Ribonükleik asit
sp.	Tür
ATP	Adenozin trifosfat
spp.	Alt tür
LR	Kontrol grubuna göre logaritmik azalma
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
KOB	Koloni oluşturan birim
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
MRSA	Metisilin dirençli <i>S. aureus</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
TEMED	Tetrametiletilediamid
TSA	Triptik soy agar besiyeri
TSB	Triptik soy sıvı besiyeri
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
UV	Ultraviyole
mm	Milimetre
CFS	Hüresiz kültür üstfazi
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
mM	Milimolar
AU	Aktivite ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nisin kaplı gıda filminin <i>Micrococcus luteus</i> 'a karşı antimikrobiyal etkinliği a) Muamele edilen film, b) Uygulanan nisin solüsyonu, c) Sarma işleminden sonra muamele edilen film, d) Muamele edilmeyen film.....	8
Şekil 2.2 Bakteriyosinlerle ilgili farklı uygulamala alanlarını kapsayan bilimsel çalışmaların dağılımı (López vd 2016).....	13
Şekil 2.3 Bakteriyosin teknolojisinin geliştirilmesinde öncü ülkeler ve patent sayıları (2004-2015), (López vd 2016).....	13
Şekil 2.4 Bakteriyosinin kullanımının patent aldığı uygulama alanları (2004 2015), (López vd 2016).....	14
Şekil 4.1 Minimum inhibisyon dilüsyon konsantrasyonlarından elde edilen logaritmik sayım ve logartitmik yüzde azalma sonuçları.....	43
Şekil 4.2 Antibiyofilm etkinliği a) <i>B. licheniformis</i> DSM 13 b) <i>B. subtilis</i> DSM 1971 c) <i>Geobacillus</i> sp. A353 d) <i>G. toebi</i> DSM 14590.....	43
Şekil 4.3 a) C304 süpernatantı yüklü N-PAGE'de 0.1 McFarland ve b) 0,5 olarak aşıl原因arak yayılmış DSM14590 indikatör suşuna karşı oluşan inhibisyon zonu.....	46
Şekil 4.4 N-PAGE'de C304 süpernatantında saptanan protein bantları.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bazı bakteriyosinler ve etki spektrumları.....	4
Çizelge 2.2 Bakteriyosinlerin genel sınıflandırması.....	6
Çizelge 2.3 Gıda endüstrisinde kullanımı olan bakteriyosinler.....	8
Çizelge 2.4 Antibakteriyel etkinliğin insanlar ve hayvanlar için patojenik olan maya ve fungus türü üzerindeki etkileri.....	18
Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında değerlendirilmiş olan <i>Geobacillus</i> referans suşları ve izolatları.....	22
Çizelge 3.2 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi.....	23
Çizelge 3.3 Ayırma jeli (%10).....	23
Çizelge 3.4 Örnek tamponu (4X).....	23
Çizelge 3.5 Coomassie blue boyama çözeltisi.....	23
Çizelge 3.6 Boya giderme solüsyonu.....	23
Çizelge 3.7 Serum fizyolojik çözeltisi.....	24
Çizelge 3.8 Kristal viyole çözeltisi (%0,1).....	24
Çizelge 3.9 Metanol çözeltisi (%95).....	24
Çizelge 3.10 Etanol:aseton (70:30).....	24
Çizelge 3.11 %8'lik H ₂ O ₂ çözeltisi.....	24
Çizelge 3.12 1 M NaOH çözeltisi.....	24
Çizelge 3.13 1 M HCl çözeltisi.....	24
Çizelge 3.14 1 mg/mL proteinaz K çözeltisi.....	25
Çizelge 3.15 TSB besiyeri.....	25
Çizelge 3.16 TSA besiyeri.....	25
Çizelge 3.17 Antimikrobiyal etkinlik değerlendirmesine tabi tutulan mikrobiyal suşları.....	30
Çizelge 4.1 <i>Geobacillus</i> suşlarının kültür süpernatantlarının ve hücrelerinin antimikrobiyal etkinliklerinin test edilmesi.....	35
Çizelge 4.2 Kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinliklerinin peptid tabanlı (bakteriyosin) olup olmadıklarının araştırılması.....	37
Çizelge 4.3 H ₂ O ₂ Uygulaması ve katalaz enzimi aktivitesinin tespit edilmesi.....	37
Çizelge 4.4 Bakteriyosin aktivite ünitesi sonuçlarının indikatör suşlar üzerindeki etkileri.....	38
Çizelge 4.5 Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi için uygun inkübasyon zamanının belirlenmesi.....	39
Çizelge 4.6 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi.....	40
Çizelge 4.7 Bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi.....	40
Çizelge 4.8 Agar difüzyon antimikrobiyal etkinlik testi ile belirlenen inhibisyon zon çapları.....	41
Çizelge 4.9 Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi.....	44
Çizelge 4.10 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi.....	45
Çizelge 4.11 Enzimatik uygulamaların bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi.....	45

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların çeşitli mikrobiyal savunma sistemleri vardır. Bu sistemlere geniş spektrumlu antibiyotikler, laktik asitler gibi metabolik ürünler, lizozimler gibi litik ajanlar, protein yapısındaki ekzotoksinler ve bakteriyosinler dâhil edilebilir. Bu biyolojik bileşenler hem çeşitliliğiyle hem bolluğuyla da dikkat çekmektedir. Bakteriyosinler, bugüne kadar tanımlanmış birçok bakteri türünde bulunmaktadır ve bir bakteri ailesi içerisinde dahi onlarca, hatta yüzlerce farklı bakteriyosin tipi bulunabilmektedir. Bakteriyosinler, geniş spektrumlu antibiyotiklerden farklı bir şekilde dar bir antimikrobiyal etki spektrumuna sahiptirler ve çoğunlukla üretici mikroorganizma ile evrimsel açıdan yakından ilişkili mikroorganizmalar üzerinde etkili olurlar.

Bakteriyosinler insan ve hayvan sağlığını ilgilendiren uygulamalarda ve tarımsal teknolojilerdeki potansiyelleri açısından sürekli araştırma konusu olmaktadır. Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen doğal antimikrobiyal maddelerdir ve protein yapısında olup, genellikle kısa zincirli, küçük molekül ağırlığa sahiptirler. Birçoğu ısı stabilitesine sahip olup, asidik gıdalarda aktivite gösterebilmekte ve sindirim sistemi orijinli proteolitik enzimlerle parçalanabilmektedir (Cherif vd 2003). Biyokimyasal özellikleri ve etki spektrumları üretici mikroorganizmalara bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bakteriyosinler *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Staphylococcus* gibi birçok mikroorganizma tarafından sentezlenmekle birlikte, laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler gıda endüstrisinde gıda koruyucuları olarak da kullanılmaktadır. Laktik asit bakterisi orijinli bakteriyosinlerin *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* ve *Salmonella spp.* gibi birçok patojen mikroorganizma üzerinde etkili olmaları nedeniyle, gıdalarda kullanım potansiyelleri gün be gün artmaktadır. Bununla birlikte, gıdaların korunmasında diğer koruyucu maddeler veya koruyucu işlemlerle birlikte tercih edilmeleri daha etkili sonuçlar doğurmaktadır (Riley vd 2002).

Bakteriyosinlerin gıdalarda koruyucu olarak ilk kullanımları resmi olarak 50'li yılların başında olsa da insanoğlu fermante süt ürünleri kullandığından beri farkında olmadan

bakteriyosinlerden istifade etmektedir. Bu antimikrobiyal özelliklerle sahip moleküller ilk olarak 1928 yılında keşfedilmiş, 1933 yılında bu moleküllerin protein yapıda olduğu ortaya çıkartılmış ve 1947 yılında ilk defa “nisin” olarak isimlendirilen, tanımlanmış ve karakterize edilmiş bakteriyosin tanımlanmıştır. Nisinin 1969 yılında Gıda ve Tarım Örgütü ile Dünya Sağlık Örgütü tarafından gıdalarda kullanımının güvenli olduğu onaylanmıştır. Nisin, 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesinde E234 olarak numaralandırılmış (EEC 1983) ve 1988’de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından peynir üretiminde kullanımına izin verilmiştir (Cotter vd 2005).

Geobacillus, *Bacillaceae* ailesine dahil bir cinstir. Bu cinsin üyeleri termofilik özelliklere sahiptir ve sporlu Gram-pozitif bakterilerdir. *Geobacillus* türleri genellikle sıcak su kaynaklarında bulunur. Bu türlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyonları endüstriyel çevrelerde duruma göre istenen duruma göre istenmeyen türler olmalarına neden olmaktadır. *Geobacillus* türleri, biyoteknolojik işlemler ile değerlendirilip endüstriye dahil edilebileceği gibi termostabil enzimleri ve yüksek sıcaklık adaptasyonlarından ötürü ısı işlem gerektiren gıdaların bozulmalarına neden olabilmektedir.

Termofilik antimikrobiyal peptidler Türkiye gibi sıcak su kaynaklarının fazlaca olduğu yerlerde yeni türlerin keşfedilmesi, bu türlerin ekonomik potansiyelleri ve araştırma sahasına katkı sunulması açısından kıymetli olduğu gibi; literatüre sunulacak yeni veriler sayesinde çevrecekı yaklaşımlarla yeni araştırma sahalarının ortaya çıkarılmasına ön ayak olabilecektir.

Bu bağlamda termofilik orijinli bakteriyosinler henüz yeni bir alan sayılmaktadır. Literatürde henüz yeterince karşılıklarının bulunmaması ve taşıdığı potansiyeller düşünüldüğünde mutlak surette çalışılmaya değer potansiyelde bakteriyosinlerdir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Bakteriyosinlerin çoğunlukla Gram-pozitif bakteriler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Gram-negatif bakterilerin bakteriyosinleri ise çoğunlukla mikrosin olarak adlandırılmaktadır. Mikrosinler post-translasyonel modifikasyon basamakları sayesinde, ortalama 58 amino asitli ilk sentez formlarından türevlenerek farklı etki mekanizmalarına sahip yeni bakteriyosinler ortaya çıkarmaktadırlar (Gouaux vd 1997). *E. coli* tarafından sentezlenen “kolisin” üzerinden örnek vermek gerekirse, bütün Gram-negatif orijinli bakteriyosinler küçük protein gövdelerinden oluşmamaktadır. Hücre zarında por oluşturan kolisinlerin büyüklükleri 449–629 amino asit arasında değişim göstermektedir. Nükleaz kolisinlerinin amino asit sayısı ise daha geniş bir değişim aralığına (178 ile 777 amino asit içerirler) sahiptir. Gram-negatiflerden izole edilen bakteriyosinlerin çoğunun benzer şekilde birbirlerinin rekombinasyonları oldukları, protein dizi analizleri neticesinde anlaşılmıştır. Gram-pozitif bakterilerde bakteriyosinin salınmasından sorumlu transport mekanizması, Gram-negatif bakterilerin mekanizması ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bazı bakteri grupları bakteriyosin taşınması için spesifik sistemler geliştirmiş iken, bazıları sadece salgı-bağımlı salınım yolunu kullanmaktadır. Bakteriyosin üretimi hücre çoğalmasına değil, hücre sayısının belirli bir yoğunluğa erişmesine bağlıdır. Aslında bu sebepten hücrelerin iletişim yollarıyla (QS; Quorum Sensing, Yeter Sayı Algılama) da bakteriyosin üretiminin bağlantılı olduğu düşünülebilir (Silverstein vd 2005). Aşağıdaki tabloda sentezleyen bakteri ve etki spektrumlarına göre bazı bakteriyosin örnekleri verilmiştir (Çizelge 2.1 ve Şekil 2.1), (Kurt ve Zorba 2005).

Çizelge 2.1 Bazı bakteriyosinler ve etki spektrumları

Bakteriyosin	Sentezleyen	Etki Spektrumları
Grup I A		
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Streptococcus</i> ssp., <i>Micrococcus</i> ssp., <i>Mycobacterium</i> ssp., <i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium</i> ssp., <i>Clostridium</i> ssp., <i>Bacillus</i> ssp., <i>Listeria</i> ssp.
Lactocin S	<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Epidermin		<i>Staphylococcus epidermis</i>
Gallidermin		<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Lacticin 481	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ,
Grup I B		
Mersacidin		<i>B. subtilis</i>
Cinnamycin		<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Ancovenin		<i>Streptomyces</i> ssp.
Duramycin		<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Actagardin		<i>Actinoplanes</i> ssp.
Grup II A		
Pediocin PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Pediococcus</i> ssp., <i>L. monocytogenes</i>
Pediocin AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>Listeria innocua</i>
Sakacin A	<i>L. sake</i>	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>L. Monocytogenes</i>
Sakacin P	<i>L. sake</i>	<i>Enterococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovi</i>
Leucocin A-UAL 87		<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mesentericin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Enterocin A		<i>E. faecium</i>
Divercin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Enterococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovi</i>
Lactococcin MMFII	<i>L. lactis</i>	<i>Enterococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Lactococcus</i> ssp., <i>L. ivanovi</i>
Grup II B		
Lactococcin G		<i>L. lactis</i>
Lactococcin M		<i>L. lactis</i>
Lactacin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. leichmanni</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. fermentum</i> 1750, <i>E. faecalis</i>
Plantaricin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paramesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>

Çizelge 2.1 Bazı bakteriyosinler ve etki spektrumları (devam)

Plantaricin S	<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Leuconostoc</i> ssp., <i>Pediococcus</i> ssp.
Plantaricin EF		<i>L. plantarum</i>
Plantaricin JK		<i>L. plantarum</i>
Grup II C		
Acidocin B		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Carnobacteriocin A		<i>Carnobacterium piscicola</i>
Divergicin A		<i>Carnobacterium divergens</i>
Enterocin P		<i>E. faecium</i>
Enterocin B		<i>E. faecium</i>
Grup III		
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>L. helveticus</i> 1846 ve 1244, <i>L. bulgaricus</i> 1373 ve 1489, <i>L. lactis</i> 970, <i>Lactobacillus casei</i>
Helveticin V-1829		<i>L. helveticus</i>

Gram-pozitif orijinli peptid tabanlı antimikrobiyal bileşikler disülfid ve monosülfid (lantiyonin) bağları ve etki spektrumları temelinde 4 gruba ayrılır. En çok araştırılmış bakteriyosinler, gıda koruyucuları olarak kullanılabilmelerinden dolayı laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Klaenhammer bu bakteriyosinleri; etki mekanizmalarını, enzimatik ve ısı duyarlılıklarını, sentezlendikten sonra modifiye olan amino asitlerin varlığını ve moleküler ağırlıklarını esas alarak 4 grup altında sınıflandırmıştır (Klaenhammer 1988), (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Bakteriyosinlerin genel sınıflandırması (López vd 2016)

Tip	Sınıflandırma	Ağırlık	Peptid niteliği	Örnek
Post-translasyonel modifikasyona uğrayanlar; lantionin	Ia	Yaklaşık 3,5 kDa	Net yük pozitif	Nisin
	Ib	Yaklaşık 3,5 kDa	Negatif yüklü ya da yüksüz	Mersacidin
Post-translasyonel modifikasyona uğramayanlar;	IIa	3-10 kDa	Katyonik, ısı stabil	Pediocin PA-1, pediocin CP2, pediacin AcH, enterocin A, Lactocin Ga1 ve Gb
	IIb	25 ve 65 kDa	İki farklı peptid	
	IIc	5-7 kDa	Halkasal	Uberolysin A, camocyclin, circularin A ve AS-48
			i. Net pozitif yük Yüksek izoelektrik nokta ii. Yüksüz	Gassericin A/reutericin A
	III	>30 kDa	Isı duyarlı, sec-bağımlı sistem ile salınmaktadır.	Enterolysis A, Helveticin J
	IV	30 kDa	Tanımlanmamış protein, lipit ve karbohidrat karışımlarıdır.	

2.2 Bakteriyosinlerin Potansiyel Kullanım Alanları

2.2.1 Gıda koruma ve bağırsak enfeksiyonlarının sağaltımı

Bakteriyosinler, gastrointestinal sistemde probiyotik suşların patojenlerle olan rekabetine yardımcı olan unsurlardır. Bu bakteriyosinler peptid duyarlı patojenlere karşı bir silah görevi görür. Bakteriyosinler ayrıca bağışıklık sisteminin aktivasyonu için sinyal peptidleri olarak da fonksiyon gösterebilirler. Bakteriyosinlerin gıda koruyucu

olarak kullanılmaları en çok çalışılan konuların başında gelmektedir. Bakteriyosin ihtiva eden bazı kültür özütleri taze sebze ve sığır etlerinin korunmasında test edilmiştir. Ham özütler daha geniş *ex situ* uygulamalara imkân vermektedir. Güvenli gıda işleme yöntemleri ile birlikte taze sebze örneklerine ham bakteriyosin özütlerini eklenmesi aerobik, mezofilik ve psikrotrofik bakterilerin gelişimini baskılamaktadır (Bodaszevska-Lubas vd 2012).

De Souza Barbosa vd (2015) *Lactobacillus curvatus* tarafından üretilen “sakasin” bakteriyosinini içeren bir özüt test etmişlerdir. Bu özüt, *L. monocytogenes* ile inoküle edilmiş salamın olgunlaşması sürecinde kullanılmıştır. Bu çalışmada, test grupları kontrol ile karşılaştırıldığında, 30 günlük salam olgunlaşması sonunda *L. monocytogenes*’in 2 logartmik sayıda azaldığı saptanmıştır.

Bazı çalışmalar ise bakteriyosinlerin (nisin, enterocin A ve B ve sakacin K) çeşitli gıda işlem koşulları altındaki etkinlik verimliliklerini karşılaştırmıştır. Örneğin yüksek basınç işleme teknolojilerinin (HPP) kullanılması halinde bile bakteriyosinler et, sebze ve süt ürünlerinde belirli patojenlere karşı koruma hala etkili kalabilmektedir (Jofré vd 2008).

Bakteriyosinlerin kullanımı ilk olarak fermente ürünlerin tüketimiyle başlamaktadır. Bakteriyosinler süt ürünlerinin üretildiği ortamlarda gıda patojenlerinin gelişimlerini baskılayarak güvenli bir gıda ortamının oluşumuna katkı sağlarlar. Günümüzde süt ürünlerinde doğrudan bakteriyosin kullanılmasının nedenlerinden biri de budur. Bugüne kadar FDA tarafından gıdalarda kullanımına izin verilmiş tek bakteriyosin nisindir (Jones vd 2005).

Kırmızı etlerdeki gıda bozulmalarında ve ciddi hastalıklara sebep olabilecek *L. monocytogenes* gibi patojenlere karşı nisinden farklı olarak da bakteriyosinlerin kullanım potansiyelleri vardır (López vd 2016). Gıda koruyucusu olarak kullanılan bazı bakteriyosinler, “pediocin” gibi paketleme yüzeylerini kaplayarak kullanılsa da krem peynir gibi birçok peynir çeşidinde de doğrudan hammadde içine formüle edilerek kullanılmaktadır (Şekil 2.1, Çizelge 2.3).



Şekil 2.1 Nisin kaplı gıda filminin *Micrococcus luteus*'a karşı antimikrobiyal etkinliği
a) Muamele edilen film, b) Uygulanan nisin solüsyonu, c) Sarma işleminden sonra muamele edilen film, d) Muamele edilmeyen film (Mauriello vd 2005).

Çizelge 2.3 Gıda endüstrisinde kullanımı olan bakteriyosinler (López vd 2016)

Bakteriyosin	Ticari adı	Firma	Uygulamalar	Hedef mikroorganizmalar
Nisin A	Nisaplin®	Danisco, Copenhagen, Denmark	Süt, mutfak, et, hamurışı ve içecek	<i>Listeria</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Clostridium</i> spp.
Natamycin	Natamax®	Danisco, Copenhagen, Denmark	Peynir, taze süt ürünleri, işlenmiş et ve içecek	Mayalar ve küfler
Micocin Nisin	Micocin*II	CanBiociln, Edmonton, Canada	Et ürünleri	<i>L. monocytogenes</i> ,
	Chrisin®	Chr. Hansen, Horsholm Denmark	Et, sos ve peynir	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Pediocin	ALTA® 2351 2341	Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Cork, Ireland	Et ürünleri	<i>L. monocytogenes</i>
Nisin A, NisinZ	Nisin A® Nisin Z®	Handary, Brussels, Belgium	Süt ürünleri, hamurışı, içecek, et	<i>Listeria</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacillus cereus</i>
Pediocin	Fargo 23®	Quest International, B.B., Naerden, The Netherlands	Et ürünleri	<i>L. monocytogenes</i>
Pediocin, Sakacin	Bactoferm F LC®	Chr. Hansen, Horsholm Denmark	Et ürünleri	<i>L. monocytogenes</i>

Uzun raf ömrüne sahip yüksek kaliteli gıda talepleri, gıda israfını azaltmak gibi kaygılarla birlikte, biyolojik katkı maddeleri içeren yenilebilir kaplamalar üzerindeki araştırmaları da teşvik etmektedir. Örneğin; bakteriyosin kaplı ambalajlar, depolama ve dağıtım sırasında istenmeyen mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamak olarak

sağlamaktadır. Son yıllarda ayrıca bakteriyosinlerin çeşitli biyopolimerler ile etkileşimleri araştırılmaktadır. Örneğin, nisin/kitosan kombinasyonları, kapalı gıda yüzeylerinde daha yüksek olan etkili anti-listeriyal etki gösterebilmektedir.

2.2.2 Nanoteknoloji

Nanoemülsiyonlar, nanolipozomlar, nanopartiküller ve nanofiberler ile elde edilen bakteriyosin nano kapsülleri, gıda ve tıbbi uygulamalarda cazip olanaklar göstermiştir. Bakteriyosin nanoemülsiyonları (örneğin nisin, pediocin ve subtilisin) dahil olmak üzere, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *Candida lusitaniae* ve *E. coli*'ye karşı curcumin, carvacrol ve cymene ile kombinasyon halinde test edilmiştir. De Mello vd nisin, pediocin ve BLS P34'ü içeren kapsül nano-vezikülleri test etmiş ve emülsiyonların stabilitesini ve *L. monocytogenes*'e karşı aktivitelerini değerlendirmiştir. *S. aureus* ile enfekte olan derin yaralarda etilen oksitin ve poli (d, l-laktik asit) içeren nano liflerin kullanılabilir olduğu, ancak bu teknolojinin optimize edilmesi gerektiği başka bir çalışmada ortaya konulmuştur (de Mello vd 2013).

2.2.3 Sistemik enfeksiyonlar ve ağız bakımı

S. aureus birçok solunum yolu enfeksiyonunda önemli bir patojendir. Bu nedenle etkili anti-stafilokok ajanlarının geliştirilmesi çok önemlidir. De Kwaadsteniet vd (2005) *L. lactis* tarafından elde edilen F10-nisin F hem bağışıklık sistemi baskılanmış hem de baskılanmamış sıçanlarda solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde değerlendirmiştir; *S. aureus* ile aşılınmış modeller 8192 birim (AU) nisin F ile tedavi edilebilmiştir. De Mello vd *S. aureus* xen 36 (biyoluminesan aktiviteye sahip bir suş) ile karıniçi olarak enfekte edilmiş fareler ile çalışmıştır ve modelleri yedi gün boyunca nisin (2139 AU) uygulayarak tedavi edebilmişlerdir. Bu sonuç bakteriyostatik bir etkiden ziyade bakteriyosidal etki ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca nisin ile muamele edilen gruplarda nisinin bağışıklık sistemini uyarıcı etkileri olduğu da anlaşılmıştır. Ayrıca, *Lactobacillus sp.* tarafından üretilen bazı bakteriyosinlerin prostanoidlerin oluşumundan sorumlu bir enzim olan siklooksijenazın (Cox) inhibisyonuna imkân vererek antienflamatuvar etkinlik gösterdikleri de bilinmektedir (Mathews vd 2015)

P. aeruginosa, bebeklerde otitis media (orta kulak iltihabı) ile ilişkili, uzun süreli işitme güçlüklerine ve konuşma gecikmesine ve akciğer enfeksiyonuna neden olabilecek patojenik bir bakteridir. *Enterococcus mundtii* bir sınıf IIa peptidi olan ST4SA'yı üretir, bu termostabil bakteriyosinin akciğer enfeksiyonlarına ve orta kulak iltihabına sahip hastalardan izole edilmiş *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. faecium*, *S. aureus* ve diğer Gram-pozitif bakterilere karşı etkili olduğu saptanmıştır (Al-Mathkhury vd 2011).

Streptococcus salivarius K12 suşu, *Streptococcus mutans*'ın sebep olduğu karyojenik etkileri (diş çürütme etkisi) ve ayrıca *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus pneumoniae*'nin neden olduğu solunum problemlerini azaltan bakteriyosin üreticisi bir suştur. Bu suş aynı zamanda antibiyofilm etkinlik sergileyen salivarisin A ve B bakteriyosinlerini üretir. (Ishijima vd 2012) salivarisinin, bazı patojen bakteriler üzerindeki antibiyofilm etkinliğini değerlendirerek, yaşlıları ve bağışıklık sistemi zayıflamış bireyleri etkileyen ve ciddi enflamasyona neden olabilen biyofilmlere karşı etkilerini kanıtlamıştır. Salivarisinin *C. albicans*'a karşı bir fare modelinin ağız boşluğunda *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmeleri yapılmış ve bunun sonucunda *Candida* kolonizasyonunun önlendiği görülmüştür (Tamura vd 2009).

2.2.4 Kadın sağlığı

İnsan popülasyonunu kontrol etme yöntemleri arasında kontraseptif kimyasal spermisitler mevcuttur; ancak spermisitlerin kullanımı normal floranın bozulmasına ve böylece idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Bakteriyosinler, sperm hareketliliğini etkileme yeteneklerinden dolayı potansiyel spermisidal ajanlardır. Laktasin ve fermentisin HV6b, insan spermatozoasının hareketliliğinin azalmasında önemli bir etki göstermiştir; bu bakteriyosinler yüksek konsantrasyonlarda, spermlere hasar vermektedir. Ayrıca Fermentisin HV6b'nin, *Gardnerella vaginalis* gibi patojenik vajinal bakterilerin gelişimini inhibe ettiği de gösterilmiştir. *P. pentosaceus* SB83 tarafından üretilen SB83, *E. faecium* tarafından üretilen enterocin 62-6 gibi bazı bakteriyosinler ve *Lactobacillus rhamnosus* tarafından üretilen laktosin 160 (peptid benzeri bir bakteriyosin), *G. vaginalis*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*

spp. ve *Prevotella bivia* gibi vajinal enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen patojenlere karşı inhibe edici etkiler sergilemektedir (Silkin vd 2008).

2.2.5 Cilt sağlığı ve cilt bakımı

Cilt bakımı için potansiyel arz eden bakteriyosinler, cilt sağlığı ve cilt bakımı anlamında pazar olarak değerlendirilmektedir. Bakteriyosinlerin topikal formülasyonları aynı zaman da yaşlanma karşıtı faydalar da içerebilmektedir. Ayrıca yaşlanma belirtilerinin yanı sıra, akne ve rosacea gibi bakteriyel ve maya orijinli enfeksiyonlar, sedef hastalığı ve dermatit gibi cilt hastalıkları da çeşitli bakteriyosinlerin uygulanmasıyla tedavi edilebilmektedir (Cinque vd 2011; López-Cuellar vd 2016). Bakteriyosinlerle ilgili olarak, mevcut araştırmalar, bakteriyosinlerin cilt mikroflorası, cilt lipitleri ve bağışıklık sisteminin modülasyonuna katkıda bulunduğunu ve doğal cilt homeostazının korunmasını sağladığını göstermektedir. Salivarisin, nisin A, mersasidin, laktisin 3147 ve lökosin A, çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmekte kullanılabilir; ayrıca yaygın görülen patojenik aknenin sorumlusu *Propionibacterium acnes* aknelere karşı ve deri ve mukozal yaraların hastane enfeksiyonlarının tedavisinde tip IIa bakteriyosinleri immün modülatörler olarak kullanılmıştır. *E. faecalis* SL-5 tarafından üretilen bir bakteriyosin olan ESL5, *P. acnes*'in neden olduğu iltihaplı sivilce lezyonları olan bir hastada ESL5 losyon olarak uygulanmış ve plasebo losyonuna kıyasla önemli ölçüde iltihaplı lezyonlar ve püstüllerde azalma meydana getirmiştir (Kang vd 2009).

2.2.6 Kanser

Bakteriyosinlerin anti-kanser terapisindeki potansiyel kullanımı, tümör hücrelerinde apoptozu veya sitotoksiteyi indükleyen DNA ve membran protein sentezini inhibe etmelerinden kaynaklanmaktadır (Joo vd 2012). Nisinin, baş ve boyunda skuamöz hücreli karsinom tedavisinde, seyreden apoptozis sırasında, hücre döngüsünü durdurduğu ve primer keratinositlerle karşılaştırıldığında, kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür. Nisinin, test edilen koşullarda hem düşük (%20) hem de yüksek (%90) konsantrasyonlarda in vivo ve in vitro cilt kanseri tümör

oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber onkoloji için diğer bir önemli bakteriyosin, *Eenterococcus mundtii* tarafından üretilmekte olup, bu bakteriyosin oral kanser HSC3, meme kanseri MCF7, akciğer kanseri H1299 ve kolon kanseri HCT116 gibi kanser hücre hatlarına karşı etkin bulunmuştur (Sand vd 2010).

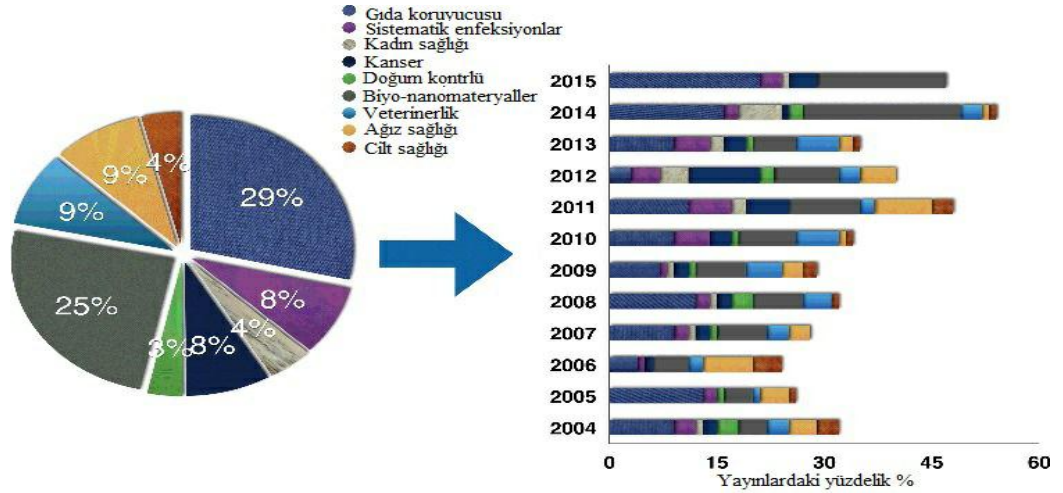
2.2.7 Farmasötik

Yüksek saflıkta yapılandırılmış nisin şelatları ülserle karşı koruyucu olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca laboratuvar ortamında denenmiş cilt kanseri hücre soy hatlarına karşı etkili farklı bakteriyosinler de bulunmaktadır. Bu çalışmalar henüz gerekli fazları tamamlamamışlardır. Farmasötik alanında gerekli fazlar tamamlandıktan sonra *S. aureus* gibi Gram-pozitif bakterilerin de enfeksiyonlarına müdahale edebilecek yeni bakteriyosinler markete sunulabilmektedir (Piper vd 2016).

2.2.8 Veterinerlik

Mastitis (meme yangısı) hayvancılıkta ve süt endüstrisinde ekonomik kayıpların temel sebeplerden birisidir. Bu bağlamda Nisin A, lacticin 3147, aureocin A70, nisin Z ve macedocin ST91KM bakteriyosinleri bu ekonomik kayıpları kontrol altında tutmak için test edilmişlerdir. Şu anda Nisin türevleri, mastitise karşı kullanılmaktadır. Farklı çalışma gruplarından ise bakteriyosinlerin endüstriyel potansiyel kullanımları için gut florasının kontrolü örnek verilebilir. *C. divergens* tarafından üretilen divercin AS7 molekülü; *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *S. Enteritidis*, *Salmonella* Wien, *Shigella flexneri*, *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas stutzeri* patojenlerine karşı yüksek etkinlik göstermiştir (Wu vd 2007).

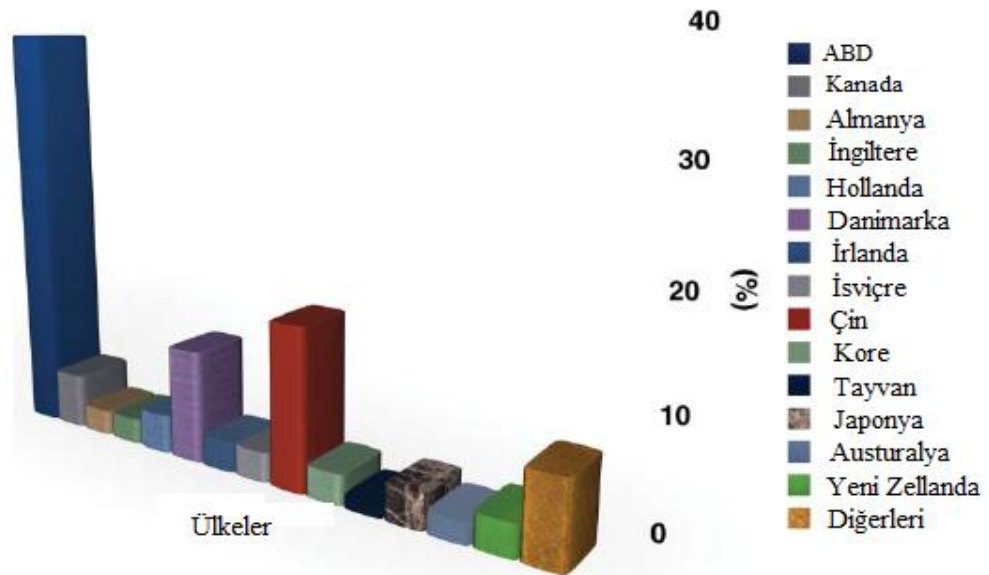
Bunlarla beraber bakteriyosinler çok geniş bir kullanım potansiyeline sahiplerdir. Bu sebepten her geçen gün bu konu üzerine araştırmalar artmakta ve her gün potansiyel endüstriyel kullanımlarına bir yenisi eklenmektedir. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Bakteriyosinlerle ilgili farklı uygulamalar alanlarını kapsayan bilimsel çalışmaların dağılımı (López vd 2016)

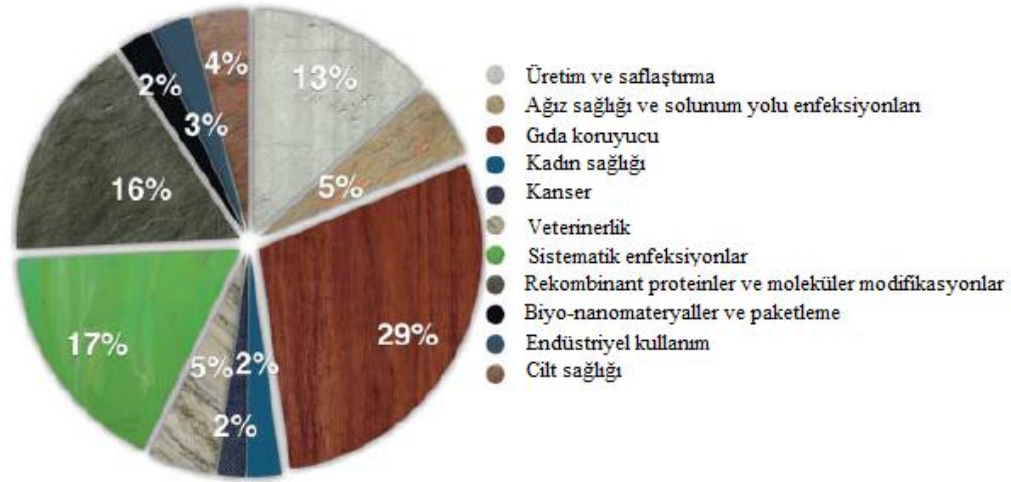
2.2.9 Ticari kullanımda bakteriyosinler

Bakteriyosin pazarı son 10 yılda, temel olarak FDA ve Avrupa mevzuatı tarafından genel olarak güvenli-tanır olarak kabul edilen ürünleri içeren hem farmasötik hem de gıda endüstrisinin taleplerine cevap olarak, önemli bir büyüme göstermiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Bakteriyosin teknolojisinin geliştirilmesinde öncü ülkeler ve patent sayıları (2004-2015), (López vd 2016)

1969'da nisin (E234), Ortak Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) tarafından gıda kullanımı için güvenli olduğu belirlenmiş ve 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesine eklenmiştir. Günümüzde, nisin yaklaşık 60 ülkede kullanılmaktadır; bununla birlikte, uluslararası mevzuatta irmik, tapyoka peyniri ve işlenmiş peynir (krem peynir, labne) gibi gıda maddelerinde yer alan nisin düzeyleri konusunda farklılıklar vardır. Ticari olarak, nisin, spor oluşturabilen mikroorganizmaların gelişmesini inhibe etmede kullanılmıştır. Birleşik Krallık'ta, sığır etine, işlenmiş ve pastörize edilmiş peynirlere, meyvelere ve sebzelere nisin eklenmesi, iyi üretim uygulamaları içeren İngiliz Standartları Enstitüsü Metotları tarafından düzenlenmektedir. Söz konusu standartlar dâhilinde azami 250 ppm nisin kullanımına izin verilmektedir. Bu nedenle, dünyanın belirli bölgelerinde bakteriyosin uygulamaları için patentler alınmıştır. Amerika Birleşik Devletleri, verilen patentlerin %42'sine sahiptir. Bakteriyosin teknolojisinin geliştirilmesinde lider ülkeler, ABD'nin ardından sırasıyla %12 ile Çin ve %10 ile Danimarka'dır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4), (Abriouel vd 2011).



Şekil 2.4 Bakteriyosinin kullanımının patent aldığı uygulama alanları (2004-2015), (López vd 2016)

Şekil 2.3 ve 2.4 incelendiğinde görülmektedir ki, 2010-2015 döneminde bakteriyosinlerle ilgili 154 patent alınmış olup, bu rakamın önceki yıllara göre %66 daha fazla olduğu görülmektedir (örneğin 2004–2009'da yalnızca 81 patent alınmıştır), (Şekil 2.2.3). Yani son yıllarda biyoteknolojide bir alternatif olarak bakteriyosinlerin

dikkat çekici bir araştırma hızı ivmesi bulunmaktadır. Tüm bu teknoloji gelecekte uygulanıyor olacaktır ve sektörde ciddi bir büyüme beklenmektedir. 2004'ten beri verilen bakteriyosin patentlerinin %31'i biyomedikal kullanımı, %29'u gıda koruyucusu olarak kullanımı, %5'i veteriner kullanımı, %13'ü üretim arıtma sistemlerinde kullanımı ve %16'sı rekombinant proteinler veya üretici suşların da moleküler modifikasyonlarını içeren kullanımların patentlerine karşılık gelmektedir. Küçük bir oranda patentleme, biyo-nanomalzeme-ambalajlama ve endüstriyel uygulamalar ile ilgilidir. Bakteriyosin uygulamaları için verilen patent sayısındaki artış yavaş olmasına rağmen, net bir artış eğilimi vardır ve önümüzdeki yıllarda ciddi bir artış olması beklenmektedir. Bakteriyosinlerin tek başına veya kombinasyon halinde sunduğu geniş spektrum, önemli sayıda hedef organizma ile mücadelede güçlü alternatifler sunmaktadır. Bu alanda çalışan şirketler, gıda, biyomedikal ve diğer alanlarda bakteriyosinlerin daha geniş ve yenilikçi uygulamalarını geliştirmiştir. Bactoferm-LC®, fermente edilmiş sosislere uygulanan Christian Hansen tarafından üretilen karışık bir preparattır (pediocin ve sakacin A üreten Laktik asit bakterileri). Aynı şekilde şirket, et ürünlerinin korunmasında kullanılmak üzere *Lactobacillus sakei* ve *Leuconostoc carnosum* 4010'un karıştırılmasıyla esas olarak nisin üretimine dayalı kültürler de üretmektedir. Danisco, esas olarak Gram-pozitif patojenlerin yanı sıra mayaları ve küfleri, *heterofermentatif* bakterileri ve enterokokları kontrol etmeyi amaçlayan koruyucu kültür karışımları (HOLDBAC®) üretmektedir. Bakteriyosinlerin kullanımı ile ilgili mevzuatlar konusunda yapılan düzenlemelerin en önemlisi Amerika'da yapmıştır. 2011 yılında Kanada Sağlık Kuruluşu, yemeye hazır gıdalarda *Listeria* riskini azaltmak için bir düzenleme yapmıştır. Alberta Üniversitesi, *L. monocytogenes*'e karşı bir *Carnobacterium maltaromaticum* bakteriyosini olan Micocin® isimli bir ürün piyasaya sürmüştür. Bugün Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Meksika, Kosta Rika ve Kolombiya'da, et ürünleri de dâhil olmak üzere işlenmiş ürünlerde *Listeria*'nın kontrolüne yardımcı olmak için Micocin® kullanmak yasaldır (Miller vd 2010).

Yönlendirilmiş mutagenез veya vektörlerin yerleştirilmesi, hücrelerde trans-membran etkileşimleri ve metabolit stabilitesi ile elde edilen rekombinant bakteriyosin proteinleri için alınan patentlerin sayısında da bir artış vardır. Bu patentler şimdiye kadar,

moleküler modifikasyonlardan kaynaklanan biyoteknolojik gelişmelere alınan patentlerin %18'ine tekabül etmektedir (Cebrián vd 2014).

2.3 Termostabil Proteinler

Proteinlerin günümüzdeki en geniş kullanım alanları enzimlerdir. Mikro organizmalardan elde edilen enzimler günümüzde hemen her sahada kullanılmaktadır. Diğer kaynaklardan elde edilen enzimlere göre hem pratik hemde ekonomik olarak avantajları vardır. Ayrıca bu enzimlerin ekstrem koşullarda da çalışması kontaminasyon riskini azaltır. Termostabil proteinler, farklı denatürasyon şartlarına karşı direnç gösterirler. Bu proteinlerin içeriğindeki α heliks ve β tabakası mezofilik proteinlere göre daha çoktur. Bu proteinlerin katlanma hızı düşüktür bu sayede denatürasyona karşı tolerans gösterirler. Ayrıca termostabil enzimler çevre kirliliğinin ortaya çıkmasından kaçınmak üzere de kullanılabilirler (Van Den Burg 2003).

Termofilik bakterilerden elde edilen enzimlerin keşfinde son yıllarda artış olmuştur çünkü endüstride enzimlerin kullanıldığı alanlar genellikle yüksek sıcaklık gerektirmektedir. Biyoteknolojik işlemlerin yüksek sıcaklıklarda yapılması yan faydalar sağlar. Organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanımları genellikle sıcaklığa bağlıdır. Viskozitenin düşmesi kimi zaman sıcaklıkla sağlanır böylece organik bileşilerin difüzyon katsayısı artmış olur. Böylelikle alan daraltılarak reaksiyonlar hızlandırılabilir (Kristjansson 2002).

Yüksek sıcaklığa dirençli enzimlerde termostabilite genellikle bir kombinasyon ile ortaya çıkar. Artan hidrojen sayısı ve tuz köprüleri, hidrofobik merkezin en muntazam şekilde katlanması, artan prolin aminoasit sayısı ve gömülü olan amino asitlerde artış gibi. Temel adaptasyonun temel anahtarı enzim proteininin esnekliğinin sağlanması gibi görünmektedir (Fitter vd 2001).

Proteinlerin konformasyonel dayanıklılığı iki zıt faktör arasındaki dengenin sonucudur. Bunlar esneklik ve sertliktir. Termostabil enzimler mezofilik olanlara nazaran oda sıcaklığında

daha fazla sert yapıdadırlar. Bu sertlik onları bozulmadan korur ve katalitik olarak aktif yapıyı korumalarını sağlar. Bundan dolayı zorlu denatüre edici şartlar altında optimal olarak daha aktiftirler (Bruins vd 2001).

2.4 Antimikrobiyal proteinlerin işlevleri

Antimikrobiyal proteinler bakteri enfeksiyonlarının ortadan kaldırılması için mekanizmalarla ortaya çıkartırlar. Konvansiyonel antibiyotiklerin aksine bu peptidler bakterinin gelişmesini engelleyici değil bakteri öldürücü olarak rol almaktadırlar. AMP'lerin antibakteriyal aktiviteleri yanında, antiviral (bazı zarflı virüsler), antiparaziter (tripanozom, plazmodium gibi), antifungal, antikanser aktiviteleri de vardır (Wang 2014).

2.5 Termotabil Bakteriyosinler

Günümüze dek yürütülen çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda endospor üreticisi termofilik Gram-pozitif bakterilerin endüstriyel önemi ve değeri nispeten göz ardı edilmiştir. Bir bakteriyosini endüstriyel ve ekonomik açıdan önemli kılan bazı faktörler vardır. Bunların faktörlerin başında bakteriyosinin termotabil olup olmaması gelmektedir. Çünkü hem pastörizasyon hem de sterilizasyon işlemleri gibi patojenlerin elimine edildiği yüksek sıcaklık gerektiren işlemlerde endüstriyel kullanımı olacak bir bakteriyosinin dayanıklı olması tercih nedenidir. Bir bakteriyosinin ısıl direncinden sonra gelen bir diğer önemli özelliği geniş bir pH dizgesine de stabilite gösterebilmesidir. Çünkü başta gıda endüstrisindekiler olmak üzere endüstriyel ürünler, geniş bir pH dizgesi gerektirebilen süreçler ile işlenmektedir. Daha stabil bir yapıya sahip olduklarından dolayı termofilik bakterilerin ürettiği bakteriyosinlere gün geçtikçe daha çok yönelinmektedir. Termofilik bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler üretildikleri çevredeki istilacı türlere karşı son derece spesifik antimikrobiyal etkinlikleri ile ön plandadır. Ayrıca subtilosin gibi bazı bakteriyosinlerin patojenlere karşı MİK değerinin altındaki konsantrasyonlarda yeter sayı algılama (quorum-sensing) mekanizmasını inhibe ettiği raporlanmıştır. Daha geniş bir bakış açısıyla hem sitotoksik olmayan hem de quorum-sensing mekanizmasını inhibe eden bir bakteriyosinin

termostabil özellik taşıması araştırmacıları hem farmasötik alanında yapılabilecek çalışmalar hem de gıda alanında yapılacak çalışmalar için teşvik etmektedir (Pranckutė vd 2015; Algburi vd 2017).

Bacillus cinsine üye bakterilerden tanımlanan bakteriyosinler ya da bakteriyosin benzeri bileşenler geniş dizgede inhibe edici etki göstermelerinden ötürü mütemadiyen artan bir ilgi odağındadır. Zira termofilik basil orijinli bakteriyosinler günümüze dek laktik asit bakterilerinden izole edilip tanımlanan birçok bakteriyosinden daha geniş bir pH ve sıcaklık dizgesinde etkinlik gösterebilmektedirler. Ayrıca antibakteriyel etkinliğin yanı sıra insanlar ve hayvanlar için patojenik olan birçok maya ve fungus türü üzerinde de etkilidirler (Abriouel vd 2011). Termofilik basillerin ürettiği termofilik bakteriyosinlere ilişkin literatürde oldukça kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Bunlardan başlıcalarına değinmek gerekirse (Çizelge 2.4):

Çizelge 2.4 Antibakteriyel etkinliğin insanlar ve hayvanlar için patojenik olan maya ve fungus türü üzerindeki etkileri (Abriouel vd 2011)

Termostabil peptid	Organizma	Referans
<i>Geobacillin</i>	<i>G. thermophilus</i>	(Pokusaeva vd 2009)
<i>Bacillocin Bb</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	(Saleem vd 2009)
<i>Megacin</i>	<i>Bacillus megatherium</i>	(Khalil vd 2009)
<i>Toebicin</i>	<i>G. toebii</i>	(Özdemir ve Biyik 2012)
<i>Geobacillin NG80-2</i>	<i>G. thermodenitrificans NG80-2</i>	(Garg vd 2012)
<i>Toebicin 218</i>	<i>G. toebii</i>	(Ceylan-Başbülbul 2016)
<i>Karakterize edilmemiş</i>	<i>Geobacillus</i> sp. suşları	(Pranckutė vd 2015)
<i>Geobacillin (Genom dizileme)</i>	<i>Geobacillus</i> sp. suşları	(Kaunietis vd 2016)

Termofilik basillerden ilk kez saflaştırılan ve etkinliği test edilen bakteriyosin *G. stearothermophilus* RS93 suşundan izole edilen thermocin 93'tür. Söz konusu bakteriyosin birçok termofilik basilin gelişimini inhibe etmektedir (Sharp vd 1979). Bu çalışmayı müteakip *G. stearothermophilus* NU-10 suşundan thermocin 10 bakteriyosini izole edilmiş ve oldukça yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilen, proteolitik enzimlere

dirençli bu bakteriyosinin DNA, RNA, ATP sentezini inhibe ettiği ve hücre hareketliliğini kısıtladığı saptanmıştır (Fikes vd 1983).

Geobacillus thermoleovorans S-II ve *Geobacillus thermoleovorans* NR-9 suşlarından kartakterize edilen thermoleovorin bakteriyosini yüksek sıcaklık ve pH dizgesinde aktivite göstermiş olup test edilen tüm *G. thermoleovorans* suşları ve *Salmonella Typhimurium*, *Branhamella catarrhalis*, *E. faecalis*, *Thermus aquaticus* gibi hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkinlik sergilemiştir (Novotny ve Perry, 1992).

Paenibacillus polymyxa P13 suşunun ürettiği polyxin 90°C’de aktivite gösterebilen ve *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *E. coli*, *Proteus vulgaris* ve *Klebsiella pneumoniae*’nin de dahil olduğu birçok gıda patojeni üzerinde antimikrobiyel etki göstermiştir (Piuri vd 1998).

B. licheniformis’in termofilik bir suşunda tanımlanan ve geniş sıcaklık-pH dizgesinde aktivite içeren *bacillocin 490*, *G. stearothermophilus*, *Bacillus smithii*, *B. subtilis*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* ve *B. licheniformis* gibi yakın akraba türler üzerinde yüksek antimikrobiyal etkinlik göstermiştir (Martirani vd 2002).

Yine *B. licheniformis*’te tanımlanan bakteriyosin benzeri bir bileşen, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* gibi önemli gıda patojenleri ve *Streptococcus* spp.’nin klinik izolatları üzerinde yüksek antimikrobiyel etkinlik göstermiştir. *Bacillocin P40* adı verilen bileşenin whey ve peynir gibi gıda ürünlerine uygulanması neticesinde koruyucu özellik gösterdiği kanıtlanmıştır (Cladera-Olivera vd 2004).

Pokusaeva vd (2009) yürüttüğü çalışmada *G. thermophilus* bakterisinden dört farklı bakteriyosin benzeri peptid tanımlanmıştır. Tanımlanan bu peptidlerin hem yakın akraba termofilik türler üzerinde hem de *Bacillus cereus* hem de *Staphylococcus haemolyticus* gibi önemli gıda patojenleri üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. İlgili çalışmada karakterize edilen termofilik bakteriyosinlerin oldukça geniş bir pH (pH 4,0-

10,0) ve sıcaklık (100°C'ye kadar) değeri dizgesinde etkin olduğu belirtilmiş ve söz konusu bakteriyosin benzeri bileşenlerin özellikle gıda endüstrisinde geniş bir kullanım potansiyeline sahip olabilecekleri vurgulanmıştır.

Brevibacillus brevis'in ürettiği bacillocin Bb bakteriyosin benzeri bir peptid olup, pH 1,0-9,0 arasında aktif, 100°C'de 30 dakikaya stabil, deterjanlara ve organik çözücülere dirençli bir bileşendir. Ayrıca *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium xerosis* ve *Corynebacterium hoffmanni* gibi gıda patojenleri üzerinde son derece etkili olduğu için Saleem vd (2009) tarafından gıda endüstrisinde kullanılmasının son derece yararlı olabileceği vurgulanmıştır.

Bacillus megatherium'un ürettiği ve megacin adı verilen bakteriyosinler A, B ve C olmak üzere üç sınıfta toplanmıştır. Görece yakın bir tarihte karakterize edilen iki megacin bakteriyosininin *Salmonella* Typhimurium ve *S. aureus* dahil olmak üzere birçok gıda patojeninde etkili olduğu saptanmıştır (Khalil vd 2009a, 2009b).

Termofilik basillerden karakterize edilen bakteriyosin benzeri bileşenlerin yerinde uygulamasına iyi bir örnek vermek gerekirse Abdel-Mohsein vd (2011) gerçekleştirdiği çalışma örnek verilebilir. Bu çalışmada *B. licheniformis* H1 suşundan izole edilen antimikrobiyel peptid kompost üretiminde sorun teşkil eden ve çiftlik hayvanlarının hastalanmasına neden olan birçok patojenin gelişimini inhibe etmiştir. Kısmen saflaştırılan ve karakterize edilen peptid doğrudan komposta karıştırılmış ve çarpıcı neticeler alınmıştır.

Özdemir ve Biyik (2012) ise geniş bir termofilik basil koleksiyonu ile yürüttükleri çalışmada, termal kaynaktan izole ettikleri *G. toebii* bakterisinin bakteriyosin benzeri peptidinde yine yakın akraba termofilik basillere ve *Enterococcus faecalis*, *Listeria* sp., *E. avium*, *Clostridium pasteurianum*, *Cellulomonas fimi* gibi gıda patojenlerine karşı etkinlik saptamışlardır.

Garg vd (2012) yürüttükleri fonksiyonel ve yapısal genom analizinde, *G. thermodenitrificans* NG80-2 bakterisinde *nisin* benzeri bir lantibiyotiğin analogu saptanmış ve bu analoga *geobacillin I adı* verilmiştir. Saflaştırılan ve karakterize edilen bu lantibiyotiğin uzun yıllardır gıda endüstrisinde kullanılmasına izin verilen nisinden çok daha fazla sayıda tiyoeter bağı bulundurduğu ve daha stabil olduğu kanıtlanmıştır. Söz konusu bakteriyosin bazı önemli gıda patojenleri üzerinde de yüksek antimikrobiyel etkinlik göstermiştir. İlgili çalışmada ayrıca oldukça dar bir pH dizgesinde stabil aktivite sergileyen nisinden farklı olarak, karakterize edilen geobacillinin geniş bir pH dizgesinde stabil ve aktif kaldığı belirtilmiştir.

Pranckutė vd (2015) petrol kuyularından ve havuzlarından izole ettikleri termofilik basillerden karakterize ettikleri bakteriyosin benzeri bileşenlerin 19 farklı gıda patojeni üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Kısmen karakterize edilen bileşenlerin yine diğer çalışmalarda da saptandığı üzere oldukça geniş bir sıcaklık ve pH dizgesinde fonksiyonel olduğu görülmüştür.

Kaunietis vd (2016) petrol kuyularından izole ettikleri *Geobacillus* suşları ile yürüttükleri genom dizileme çalışmalarıyla bu bakterilerin genomunda çok sayıda bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri bileşenin determinantı tanımlamıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Geobacillus* cinsine dahil 11 referans suş ve 8 izolat, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3.1). -86°C’de, %60’lık gliserollü stoklarda muhafaza edilen *Geobacillus* suşları TSA (Tyryptic Soy Agar; Triptik Soy Agar, Merck, Almanya) besiyerine aşılandıktan sonra 18 saat süresince 55°C’de geliştirilerek, 4°C stokları hazırlanmıştır. Bu stoklar ilerleyen çalışmalarda kullanılmış ve birer haftalık periyotlarda stoklardan yeni kültürler açılarak yenilenmiştir.

Çizelge 3.1 Tez çalışması kapsamında değerlendirilmiş olan *Geobacillus* referans suşları ve izolatları

Referans suşlar	Cins/Tür adı
DSM 22625	<i>G. thermodentrificans</i>
DSM 22628	<i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i>
DSM 22629	<i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i>
ATCC 12980	<i>G. stearothermophilus</i>
DSM 5934	<i>G. stearothermophilus</i>
DSM 2542	<i>G. thermoglucosidans</i>
DSM 463	<i>G. themodentrificans</i>
DSM 14590	<i>G. toebii</i>
DSM 5366	<i>G. thermoleouorans</i>
DSM 7263	<i>G. kaustophilus</i>
DSM 13174	<i>G. vulcanii</i>
İzolatlar	Cins/Tür adı
B84a	<i>G. thermoglucosidans</i>
D195	<i>G. thermodentrificans</i>
A113	<i>G. stearothermophilus</i>
A353	<i>Geobacillus</i> sp
C304	<i>Geobacillus</i> sp.
D413	<i>Geobacillus</i> sp.
E134	<i>G. toebii</i>
E173b	<i>Geobacillus</i> sp.

3.1.2 Tezin deneysel çalışmalarında kullanılan çözeltiler

Çizelge 3.2 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi

Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi	Miktar
Akrilamid	29,2 g
Bisakrilamid	0,8 g
dH ₂ O	100 mL

Çizelge 3.3 Ayırma jeli (%10)

Ayırma Jeli (%10)	Miktar
Akrilamid/Bisakrilamid	5,78 mL
dH ₂ O	7,13 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)	4,33 mL
APS	86,7 µL
TEMED	8,16 µL

Çizelge 3.4 Örnek tamponu (4X)

Örnek Tamponu (4X)	Miktar
0.5 M Tris-HCl (pH6,8)	5,12 mL
Gliserol	8 mL
dH ₂ O	3 mL
Bromofenol blue	2.10 ⁻⁴ g

Çizelge 3.5 Coomassie blue boyama çözeltisi

Coomassie blue boyama çözeltisi	Miktar
Coomassie Brilliant Blue R250	1,5 g
İzopropil alkol	250 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
dH ₂ O	650 mL

Çizelge 3.6 Boya giderme solüsyonu

Boya giderme çözeltisi	Miktar
İzopropil alkol	250 mL
Glasiyel asetik asit	100 mL
dH ₂ O	650 mL

Çizelge 3.7 Serum fizyolojik çözeltisi

Serum fizyolojik çözeltisi	Miktar
NaCl	0,9 g
dH ₂ O	100 mL
121 °C’de 15 dakika süresince otoklavda sterilize edilir.	

Çizelge 3.8 Kristal viyole çözeltisi (%0,1)

Kristal viyole çözeltisi (%0,1)	Miktar
Kristal viyole	0,1 g
dH ₂ O	100 mL

Çizelge 3.9 Metanol çözeltisi (%95)

Metanol çözeltisi (%95)	Miktar
Metanol	95 mL
dH ₂ O	5 mL

Çizelge 3.10 Etanol:aseton (70:30)

Etanol:aseton (70:30)	Miktar
Etanol	70 mL
Aseton	30 mL

Çizelge 3.11 %8’lik H₂O₂ çözeltisi

%8’lik H ₂ O ₂ çözeltisi	Miktar
%20’lik H ₂ O ₂ çözeltisi	40 mL
dH ₂ O	60 mL

Çizelge 3.12 1 M NaOH çözeltisi

1 M NaOH çözeltisi	Miktar
NaOH	40 g
dH ₂ O	1 L

Çizelge 3.13 1 M HCl çözeltisi

1 M HCl çözeltisi	Miktar
%37’lik HCl çözeltisinden 82 mL alınır son hacim distile su ile 1 L’ye tamamlanır.	

Çizelge 3.14 1 mg/mL proteinaz K çözeltisi

1 mg/mL proteinaz K çözeltisi	Miktar
20 mg/mL'lık proteinaz K stok çözeltisi 50 mM Tris-HCl-1,5 mM kalsiyum asetat çözeltisiyle seyreltilir.	
<u>50 mM Tris-HCl-1,5 mM kalsiyum asetat tamponu</u>	
Tris-HCl	4,44 g
Tris-base	2,65 g
Kalsiyum asetat	0,24 g
dH ₂ O	1 L
pH 8.0'e ayarlanır.	

3.1.3 Tezin deneysel çalışmalarında kullanılan besiyerleri

Çizelge 3.15 TSB besiyeri

Serum fizyolojik çözeltisi	Miktar
Ticari olarak temin edilen TSB besiyerinden 30 g tartılır 1 L dH ₂ O içerisinde çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavla sterilize edilir.	

Çizelge 3.16 TSA besiyeri

Serum fizyolojik çözeltisi	Miktar
Ticari olarak temin edilen TSB besiyerinden 30 g tartılır 1 L dH ₂ O içerisinde çözüldükten sonra 15 g agar ilave edilir. İçerik 121 °C'de 15 dakika otoklavla sterilize edilir.	

3.2 Yöntem

3.2.1 *Geobacillus* üyelerinin hücrelerinin ve hücresiz kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi

Çizelge 3.1'de verilen tüm *Geobacillus* üyelerinin aktif kültürlerinden elde edilen hücrelerinin ve hücresiz kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinlikleri ilgili çalışmada değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal tarama çalışması, cinse üye bakterilerin birbirlerine karşı etkinlikleri değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda *Geobacillus* üyeleri hem TSB (Tryptic Soy Broth, Triptik Soy sıvı besiyeri, Merck, Almanya) hem de TSA (Tryptic Soy Agar, Triptik Soy Agar, Merck, Almanya)

besiyerlerine inoküle edilmiştir. Üyeler, 5 mL’lik TSB besiyerlerine %4 oranında inoküle edilerek, 55 °C’de çalkalamalı koşullarda (170 rpm) 18 saat süresince aktive edilmiştir. TSA besiyerlerine ise çizgi ekim tekniğiyle inokülasyon yapılan petriler ise 55 °C’de 18 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere gelişen koloniler toplanarak 0.5 MacFarland standardının esas alınmasıyla steril serum fizyolojik içerisinde (%0.9 NaCl) süspanse edilmiştir (*Geobacillus* hücrelerinin antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesi). TSB besi ortamında geliştirilen kültürlerden ise 1’er mL alınarak 15.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz (süpernatant) alınarak 0.22 µm por çaplı filtrelerden (Sartorius, Fransa) geçirilerek sterilize edilmiş ve canlı hücrelerden arındırılmıştır. 19 *Geobacillus* üyesinin her biri söz konusu çalışma kapsamında hem indikatör hem de antimikrobiyal etkenin araştırılacağı bakteri olarak test edilip değerlendirilmiştir.

Geobacillus hücrelerinin ve hücresiz süpernatantlarının antimikrobiyal etkinlikleri “spot on lawn” (damla plak) yöntemi esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Her bir üyenin 0,5 MacFarland standardına göre ayarlanmış kültür süspansiyonu 14 cm’lik TSA agar içeren plakalara yayılmıştır. Süspansiyonun fazlası uzaklaştırıldıktan sonra petriler kurutulmuştur (indikatör özelliği). Her bir üyenin petrilere hazırlandıktan sonra petriler eşit alanlara taksim edildikten sonra hazırlanan hücre süspansiyonları ve süpernatantları 10’ar µL hacimde petri yüzeylerine uygulanmıştır. Petriler 18 saat süresince 55 °C’de inkübe edildikten sonra muhtemel inhibisyon zonları tespit edilmiş ve zon çapları ölçülmüştür. Böylelikle her bir üyenin hücresinin ve hücresiz süpernatantının birbirine karşı antimikrobiyal etkinliği saptanmıştır. Yüksek antimikrobiyal etkinlik ihtiva eden *Geobacillus* üyeleri seçilerek ileri çalışmalara geçilmiştir.

3.2.2 Hücresiz kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinliklerinin peptid tabanlı (bakteriyosin) olup olmadığının araştırılması

Bir önceki çalışma dâhilinde, antimikrobiyal etkinlik gösterdiği saptanan süpernatantlar esas alınarak süpernatant nötralizasyonu (antimikrobiyal etkinliğin bakterinin ürettiği asidik bileşenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlamak üzere), proteinaz K uygulaması (geniş spektrumlu bu enzimin muamelesiyle peptid tabanlı antimikrobiyal

bileşenin etkinliği kaybolacaktır) ve katalaz enziminin varlığının araştırılması gibi çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Kültüre alma işlemi ve hazırlıkları bir önceki basamakta anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilmiştir. Aktif kültürden elde edilecek hücresiz süpernatantlar öncelikle nötralize edilmiştir. Nötralize edilen süpernatantlar yine bir önceki basamakta izah edildiği şekliyle indikatör bakterinin yayıldığı petriler üzerine uygulanmıştır. Elde edilen süpernatantlara ayrıca süspansiyonun son konsantrasyonunda 1 mg/mL proteinaz K (Sigma-Aldrich, ABD) olacak şekilde enzim uygulaması yapılmıştır (37°C’de 90 dakika). Enzim uygulamasından sonra süpernatant, indikatör bakteriyi içeren petri yüzeyine uygulanmıştır. Her iki uygulamada da herhangi bir işlemde geçirilmemiş (nötralize edilmemiş ve proteinaz K uygulanmamış) süpernatant örnekleri kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Kontrol gruplarına göre inhibisyon zonlarında meydana gelecek olası değişimler (inhibisyon zonunda azalma ya da zonun tamamen kaybolması) değerlendirilmiştir.

Katalaz testi ise petri yüzeylerinde gelişen koloniler üzerine doğrudan %8’lik H₂O₂ çözeltisinin damlatılmasıyla değerlendirilmiştir. Açığa çıkan O₂ moleküllerine (gözle görülür hava kabarcıkları) göre test edilen kültürler katalaz enzimi üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Böylelikle katalaz enzimi üreten bakterinin kültür ortamındaki antimikrobiyal etkinliği bilinen H₂O₂’i inhibe ettiği ve etkinliğin bu molekülden kaynaklanmadığına kanaat getirilmiştir.

Böylelikle her üç uygulama neticesinde antimikrobiyal etkinlik gösterdiği daha önce saptanmış kültür süpernatantlarının etkinliklerinin peptid tabanlı (bakteriyosin) olduğu dolaylı yoldan kanıtlanmıştır. Çalışma sonunda bu özelliği gösteren ve geniş spektrumda aktivite gösteren bir *Geobacillus* üyesi seçilerek çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.3 Bakteriyosin aktivite ünitesinin belirlenmesi

İyi bir bakteriyosin üreticisi olduğu saptanan *Geobacillus* sp. C304 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite ünitesi ilgili çalışma kapsamında hesaplanmıştır. Aktivite ünitesi (AU/mL) Biswas vd (1991) tarafından kullanılan ve temeli ham bakteriyosinin steril distile suyla 1:10-1:250 aralığında seyreltmelere tabi tutulduğu yöntemle hesaplanmıştır. Seri seyreltme işleminin ardından her bir seyreltme faktörü daha önceden yarı katı besiyerinin kullanımı neticesinde indikatör suşun ekilmiş olduğu katı yüzeye nokta ekim yöntemiyle ekilmiştir. Uygun koşullarda inkübasyonun ardından sonuçlar seyreltme faktörlerinde zon oluşumunun varlığına/yokluğuna göre değerlendirilmiştir. Aktivite ünitesi ise inkübasyonun ardından 2 mm veya daha fazla büyüme inhibisyon zonu veren en yüksek seyreltme değerinin 200'le çarpılması sonucunda hesaplanmıştır $[AU/mL = \text{seyreltme faktörü} \times (1000 \mu L / 5 \mu L)]$ (Yang vd 1992).

3.2.4 bakteriyosin üretiminin optimizasyonu

3.2.4.1 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon zamanının belirlenmesi

Bu çalışmada azami aktivitede bakteriyosin üretiminin belirlenebilmesi için ideal inkübasyon zamanı belirlenmiştir. Bu amaçla 100 mL TSB besiyerine bakteriyosin üreticisi bakterinin kültüründen %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Farklı inkübasyon sürelerinde 55°C'de dörder saat aralıklarla kültürlerden örnekler alınmıştır. Eş zamanlı olarak gelişen kültürün bulunduğu her bir besiyerinin pH'sı ölçülüp, bakteriyel gelişim 600 nm'de gerçekleştirilen okumalardan elde edilen optik yoğunlukla belirlenmiş ve ham (crude) bakteriyosin ekstraktı daha önce izah edildiği şekliyle elde edilerek indikatör suşa karşı aktivite ünitesi tespit edilmiştir. Böylelikle çalışılan suşun maksimum aktivitede bakteriyosin ürettiği uygun inkübasyon zaman aralığı belirlenmiştir (Yang ve Ray 1994).

3.2.4.2 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

İlgili çalışmada bakteriyosin üreticisi *Geobacillus* üyesinin 100 mL'lik TSB sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve kültürler 50 °C, 52 °C, 55 °C, 60 °C ve 65 °C'lık farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Bir önceki çalışmada maksimum aktivitenin elde edildiği ideal inkübasyon süresi esas alınarak inkübasyon sonunda, farklı sıcaklıklarda inkübe edilen besiyerlerinin son pH'sı ve 600 nm'de yoğunluğu ölçülmüştür, hazırlanacak ham bakteriyosin ekstraktının ise aktivite ünitesi uygun bir indikatör suşa karşı belirlenmiştir. AU/mL değerlerinin yüksek olduğu sıcaklık bakteriyosin üretimi ve aktivitesi için optimum sıcaklık olarak seçilmiştir.

3.2.4.3 Bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi

Bakteriyosin üreticisi *Geobacillus* üyesi pH değerleri (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0, 9.5) ayarlanmış TSB besiyerlerine %1 oranında inoküle edilmiş ve bir önceki aşamada belirlenecek uygun sıcaklıkta ve inkübasyon süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, farklı pH'lardaki besiyerlerinin son pH'sı ve 600 nm'de optik yoğunluğu, elde edilen ham bakteriyosin ekstraktının ise aktivite ünitesi indikatör suşa karşı daha önce belirtildiği şekliyle belirlenmiştir (Nel vd 2001).

3.2.5 Agar difüzyon yöntemi ile bakteriyosin içeren kültür süpernatantının antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi

İlgili yöntem dâhilinde bakteriyosin içeren kültür süpernatantı geniş dizgede Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriyal türler üzerinde antimikrobiyal etkinliği itibarıyla değerlendirilmiştir. Çalışma ayrıca bir adet ökaryotik örnek değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında antimikrobiyal taramaya tabi tutulan mikrobiyal türler Çizelge 3.17'de verilmiştir. Suşlar Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Çizelge 3.17 Antimikrobiyal etkinlik değerlendirmesine tabi tutulan mikrobiyal suşlar

Suş kodu ve adı
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Enterococcus faecium</i> 23
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 25912
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 1971
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 5348
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13
<i>Staphylococcus carnosus</i>
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13311
<i>Salmonella</i> Typhimurium DMC4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150
<i>Salmonella</i> Infantis DMC12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 7006003
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Shigella</i> sp.
<i>Candida albicans</i>

Çizelge 3.17’de listelenen suşların -86 °C’de muhafaza edilen kültür stokları açılarak TSA besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile inoküle edilmiştir. 37 °C’de 18 saatlik bir inkübasyonu müteakip aktiveleştirilen kültürler tekrar kullanılarak ikinci kez pasajlama işlemine geçilmiştir. İkinci kültürasyon yine aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrasında çizgi ekimle tek düşürülen koloniler, her bir suş için, toplanarak serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içerisinde süspanse edilerek 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır ($\approx 1,0 \times 10^8$ KOB/mL). Hazırlanan kültür süspansiyonları yayma ekim yöntemiyle TSA agar plaklarının üzerine inoküle edilmiştir. Petriler aseptik koşullarda kurutulduktan sonra agar yüzeylerinde kuyu açma aparatı aracılığıyla 9 mm’lik kuyular açılmıştır (her bir suş için iki paralel). Açılan kuyulara 50’şer µL bakteriyosin içeren kültür süpernatantı (*Geobacillus* sp. C304) transfer edilmiştir. Petriler 37 °C’de 18 saat süresince inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon bitiminde inhibisyon zon çapları “mm” cinsinden ölçülerek kaydedilmiştir.

3.2.6 Bakteriyosin içeren kültür süpernatantının minimum inhibisyon dilüsyon değerinin ve antibiyofilm etkinliğinin değerlendirilmesi

İlgili çalışma kapsamında *Geobacillus* sp. C304 suşunun bakteriyosin içeren kültür süpernatantının etkinliği iki adet duyarlı termofilik suş (*Geobacillus* sp. A353, *G. toebi* DSM 14590) ve iki mezofilik suş üzerinde (*B. subtilis* DSM 1971, *B. licheniformis* DSM 13) değerlendirilmiştir. Söz konusu suşları ideal inkübasyon koşullarında geliştirildikten sonra (*Geobacillus* sp. A353 ve *G. toebi* DSM 14590 için 55 °C’de, sırasıyla %1,0 ve %0,5 NaCl içeren TSB besiyerlerinde, aynı zamanda ideal biyofilm üretim koşulları, 18 saat; *B. subtilis* DSM 1971 ve *B. licheniformis* DSM 13 37 °C’de, %1,0 NaCl içeren besiyerlerinde, aynı zamanda ideal biyofilm üretim koşulları, 18 saat) yine 0,5 McFarland standardına göre daha önce belirtildiği şekliyle kültür süpernatantları hazırlanmıştır. Minimum inhibisyon dilüsyon değerlerinin belirlenebilmesi adına 96-kuyulu mikrotitre plakalarından (LP Italiana, İtalya) istifade edilmiştir. Mikrotitre plaka kuyularına öncelikle 140’ar µL steril TSB (Tryptic Soy Broth, Merck, Almanya) besiyeri transfer edilmiştir. Plaka düzeninde test edilen suş için ilk sütuna 140’ar µL bakteriyosin içeren kültür süpernatantı ilave edilerek çok kanallı pipet yardımıyla dilüsyona başlanmıştır (2-kat; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Yalnızca inokülüm ve besiyeri ihtiva eden kuyulara pozitif kontrol, yalnızca besiyeri ihtiva eden kuyular ise negative kontrol grupları olarak tasarlanmıştır. Dilüsyon işleminden sonra test kuyularına (etken içeren) ve pozitif kontrol kuyularına kültür süspansiyonlarından 10’ar µL transfer edilmiştir. Plakalar 24 saat süresince test edilen her bir suş için uygun inkübasyon sıcaklıklarında inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon bitiminde yine her bir suş için test ve pozitif kontrol kuyularından 100’er µL alınmış ve serum fizyolojik içersinde bir seri dilüsyon yapılmıştır (10-kat). Dilüsyon faktörlerinden TSA besiyerlerine damla plak yöntemiyle inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Petriler aseptik koşullarda kurutulduktan sonra yine her bir suş için ideal inkübasyon koşullarına kaldırılmıştır. İnkübasyon bitiminde sayıma uygun dilüsyon faktörlerinden koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol gruplarına göre koloni oluşturan birimlerdeki azalma $(1-10^{-LR}) \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır (LR; kontrol grubuna göre logaritmik azalma). Logaritmik değişimler arasındaki ortalama farkları Tek Yönlü Varyans Analizi ve Tukey Testi ile değerlendirilmiştir.

Aynı plakalar yukarıda bahsi geçen işlemlerden sonra biyofilm üretim miktarlarındaki muhtemel değişimleri tespit adına da kullanılmıştır. Bu bağlamda kristal viyole bağlanma yöntemi esas alınmıştır (Stepanvic vd 2000). Plaka kuyuları aseptik koşullarda boşaltıldıktan sonra iki kez serum fizyolojik ile (%0,9 NaCl) ile planktonik fazdaki hücrelerin uzaklaştırılması için yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kurutulan plaka kuyularına 140'ar µL %95'lik methanol çözeltisi (Merck, Almanya) transfer edilmiş ve kuyulardaki biyofilm örnekleri fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra kuyular boşaltılıp kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra kuyulara 140'ar µL %0,1'lik kristal viyole çözeltisinden transfer edilmiştir. Plakalar 30 dakika süresince oda koşullarında inkübe edilmiştir. Boyama işlemini müteakip plakalar, akan musluk suyunun altında nazikçe yıkanarak tutunmayan boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Plakalar tekrar kurutulduktan sonra kuyu tabanlarında ve çeperlerinde boya tutan biyofilm örnekleri 140'ar µL etanol:aseton (70:30) çözeltisi ile 15 dakika muamele edilmiştir. Bu işlem sonrasında plakalar 595 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucusunda okutulmuştur. Etken içeren kuyulardaki olası biyofilm üretimindeki azalmalar $[(C-B)-(T-B)/C-B]*100$ formülüne göre hesaplanmıştır (C; pozitif kontrol gruplarından gelen absorbans değerleri, B; kör olarak tasarlanan kuyulardan gelen absorbans değerleri, T; test gruplarından gelen absorbans değerleri). Biyofilm üretimindeki yüzde azalma değerleri standart sapma ($\pm$) değerleri ile hesaplanmıştır.

3.2.7 Çevresel parametrelerin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkileri

3.2.7.1 Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine farklı sıcaklıkların etkisi ham bakteriyosin ekstraktının kullanılmasıyla tanımlanmıştır. Nötralize edilmiş steril kültür üst sıvısı 80, 90 ve 100°C'de 5, 10, 15, 20 dakika ve 121°C'de 15 dakika süreyle sıcaklığa tabi tutulmuştur. Kontrol olarak sıcaklıkla muamele edilmeyen nötralize edilmiş kültür üst sıvıları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite; duyarlı indikatör bakteriye karşı nokta ekim yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Bhunja vd 1988).

3.2.7.2 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi ham bakteriyosin ekstraktının kullanılmasıyla tanımlanmıştır. Daha önce belirtildiği şekilde hazırlanan bakteriyosin örneklerinin pH'sı, 1 M NaOH ve 1 M HCl ile pH 2-12 değerleri arasında ayarlanmıştır. Numuneler, 24 saat 25°C'de inkübe edilecektir. İnkübasyon ardından numunelerin pH değeri pH 7 olacak şekilde nötralize edilmiştir. pH uygulamalarının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi pH'nın hiçbir işlemine tabi tutulmayan kültür üst sıvısının inhibisyon etkinliğinin, pH düzeyleri ayarlanan kültür üst sıvılarının inhibisyon etkinlikleri ile karşılaştırılması neticesinde duyarlı indikatör bakteriye karşı nokta ekim yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Bhunja vd 1988).

3.2.7.3 Enzimatik uygulamaların bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

Üretilen bakteriyosinin protein doğasını açıklığa kavuşturmak adına nötralize edilmiş steril kültür üst sıvılarına, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM Tris (pH 8,0)-1,5 mM kalsiyum asetat tamponunda hazırlanmış olan proteinaz K (Sigma, Amerika), tripsin (Sigma, Amerika), α -amilaz (Sigma, ABD), Alkalen proteaz (Sigma, ABD) ve lizozim (Sigma, ABD) enzimleri ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 100 °C'de 5 dakika ısı uygulaması ile enzim aktiviteleri sonlandırılmıştır. Denemelerde kontrol olarak, enzim muamele edilmemiş kültür üst sıvıları kullanılmıştır ve bakteriyosin aktiviteleri esas alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Bhunja vd 1988; Todorov ve Dicks 2005). Enzim uygulanan ve uygulanmayan ham bakteriyosin ekstraktındaki antimikrobiyal aktivite; duyarlı indikatör bakteriye karşı damlatma ekim yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.8 Native-Poliakriamid Jel Elektroforezi ile Bakteriyosin Varlığının Kanıtlanması

Laemmli (1970)'e göre yapılan N-PAGE'de %4'lük yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşullarda inkübe edilerek hazırlanan *Geobacillus* sp. C304 süpernatantı, inkübasyon sonrasında filtre edilerek 1 X örnek tamponu ile 1:1

oranında karıştırılmış ve preparatif olarak hazırlanan N-PAGE'in her bir kuyucuğuna 10'ar μ L olacak şekilde yüklenmiştir. Daha sonra sırasıyla yığma ve ayırma jelinde 25 ve 30 mA'de +4 °C'de elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez işlemi bitiminde jelin yarısı TSA besiyeri üzerine yerleştirilmiş, diğer yarısı da Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi ile boyanma solüsyonuna alınmıştır. Coomassie ile boyanan jel kısmı ardından boya giderme solüsyonunda 10 dakika tutulduktan sonra, %7'lik asetil asit içerisine alınarak görüntülenmiştir. C304 süpernatantının antimikrobiyal etkinliğini gözlemleyebilmek adına, besiyeri üzerine yerleştirilen iki farklı N-PAGE jelinin üzerine %0,7'lik agar içeren TSA soft besiyerine 0,1 ve 0,5 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde aşılanmış *G. toebii* DSM 14590 indikatör suş kültürü yayılmıştır. 55 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında, jel üzerinde oluşan inhibisyon zonunun varlığı gözlemlenmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1 *Geobacillus* Üyelerinin Hücrelerinin ve Hücresiz Kültür Süpernatantlarının Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi

Bu deneyle beraber süpernatantı çok sayıda bakteri üzerine etki gösteren suş test suşu olarak sonraki çalışmaları sürdürmek adına seçilmiştir. Bu bağlamda genel antimikrobiyal tarama sonuçları ele alındığında ***Geobacillus sp. C304*** izolatu sonraki deneyler için tercih edilmiştir. Her bakteri çapraz bir şekilde diğer *Geobacillus* suşları ile karşılaştırılarak antimikrobiyal tarama yapılmıştır. Her bir bakterinin hem hücreleri hem de kültür süpernatantları potansiyel antimikrobiyal içerik hem de bakterinin bizzat kendisi indikatör olarak dikkate alınmıştır. Her bir üyenin petrilere hazırlandıktan sonra petrilere eşit alanlara taksim edildikten sonra hazırlanan hücre süspansiyonları ve süpernatantları 10'ar µL hacimde petri yüzeylerine uygulanmıştır. İnhibisyon zon oluşumu esas alınarak antimikrobiyal etkinlik değerlendirilmiş ve Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Çizelge 4.1'de tez çalışmasına dahil edilen tüm *Geobacillus* suş ve izolatları birbirlerine karşı test edilmiş ve sonuçlar çizelge halinde özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 *Geobacillus* suşlarının kültür süpernatantlarının ve hücrelerinin antimikrobiyal etkinliklerinin test edilmesi

İndikatör bakteri	Süpernatantı etki gösteren izolatlar/suşlar	Hücresi etki gösteren izolatlar/suşlar
<i>G. stearothermophilus</i> A113	<i>Geobacillus sp. C304</i> , <i>G. thermoglucosidans</i> -DSM 2542, <i>G. thermodentrificans</i> DSM 463	<i>Geobacillus sp. C304</i> , <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84b, <i>G. thermodentrificans</i> DSM 463, <i>G. toebii</i> DSM 5366
<i>G. thermodentrificans</i> A333	<i>Geobacillus sp. C304</i> , <i>G. toebii</i> DSM 14590	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus sp. C304</i> , <i>G. toebii</i> E134, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84b, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermodentrificans</i> D195, <i>G. thermoleouorans</i> DSM5366, <i>G. kasustophilus</i> DSM5366, <i>G. vulcanii</i> DSM13174
<i>Geobacillus sp. A353</i>	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus sp. C304</i> , <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. toebii</i> DSM 14590	<i>Geobacillus sp. C304</i> , <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>Geobacillus sp. C304</i>	Sonuç elde edilemiştir.	<i>G. thermodentrificans</i> A333, <i>Geobacillus sp. A353</i> , <i>Geobacillus sp. D413</i> , <i>G. toebii</i> E134, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84b, <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermodentrificans</i> DSM 463, <i>G. thermodentrificans</i> D195, <i>G. toebii</i> DSM 14590, <i>G. vulcanii</i> DSM 13174

Çizelge 4.1 *Geobacillus* suşlarının kültür süpernatantlarının ve hücrelerinin antimikrobiyal etkinliklerinin test edilmesi (devam)

<i>Geobacillus</i> sp. D413	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermodentrificans</i> DSM 463, <i>G. toebii</i> -DSM 14590	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. toebii</i> E134, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a, <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. toebii</i> E134	Sonuç elde edilemiştir	<i>Geobacillus</i> sp.-(izolat)-C304, <i>G. thermoglucosidans</i> -DSM 2542
<i>Geobacillus</i> sp. E173b	Sonuç elde edilemiştir	Sonuç elde edilemiştir.
<i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a	Sonuç elde edilemiştir	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. toebii</i> E134, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84b, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84b	<i>Geobacillus</i> sp. A353, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM2542, <i>G. thermodentrificans</i> DSM463, <i>G. toebii</i> DSM14590	<i>Geobacillus</i> sp. A353, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. toebii</i> E134, <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 1298, <i>G. stearothermophilus</i> DSM5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. kasustophilus</i> DSM 7263	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. toebii</i> DSM14590
<i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermodentrificans</i> DSM 463, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. toebii</i> 14590, <i>G. vulcanii</i> DSM 13174	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus</i> sp. C304
<i>G. thermodentrificans</i> DSM 463	<i>Geobacillus</i> sp. D413, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. toebii</i> E134, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84a, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84b, <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. thermodentrificans</i> D195, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. toebii</i> DSM 14590, <i>G. vulcanii</i> DSM 13174	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>Geobacillus</i> sp. D413
<i>G. thermodentrificans</i> D195	<i>Geobacillus</i> sp. C304	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. toebii</i> DSM 14590	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a	<i>G. stearothermophilus</i> A113, <i>G. thermodentrificans</i> A333, <i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. toebii</i> E134
<i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. toebii</i> DSM 14590	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermodentrificans</i> spp. <i>calidus</i> F84b, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. kaustophilus</i> DSM 7263	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. thermodentrificans</i> DSM 463, <i>G. thermoglucosidans</i> B84a, <i>G. toebii</i> DSM 14590, <i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. toebii</i> DSM 14590
<i>G. vulcanii</i> DSM 13174	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. thermoglucosidans</i> -DSM 2542, <i>G. toebii</i> DSM 14590	<i>Geobacillus</i> sp. C304, <i>G. stearothermophilus</i> DSM 5934, <i>G. thermoglucosidans</i> DSM 2542, <i>G. toebii</i> DSM 14590

Çizelge 4.1'den de anlaşılacağı üzere özellikle kültür süpernatantlarının *Geobacillus* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkinliğine bakıldığında ***Geobacillus C304*** izolatının hemen hemen tüm *Geobacillus* suşları üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu gerekçeyle söz konusu suş ön tarama sonuçları da dikkate alınarak sonraki çalışmaların yürütülmesi adına tercih edilmiştir.

4.2 Hücresiz Kültür Süpernatantlarının Antimikrobiyal Etkinliklerinin Peptid Tabanlı (Bakteriyosin) Olup Olmadığının Araştırılması

Bu çalışmanın sonucunda seçilen test suşunun kültür süpernatantı içeriğindeki antimikrobiyal etkenin peptid tabanlı bir ajan olduğu dolaylı yoldan kanıtlanmıştır. Nötralize edilen ve edilmeyen süpernatant örneklerinin antimikrobiyal etkinlikleri arasında anlamlı bir fark görülmezken proteinaz K enzim uygulaması yapılan süpernatantta etkinlik kaybı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2). Test suşu için ayrıca katalaz aktivitesi de pozitifdir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.2 Kültür süpernatantlarının antimikrobiyal etkinliklerinin peptid tabanlı (bakteriyosin) olup olmadıklarının araştırılması

İndikatör bakteri	Test bakterisi	Enzim uygulaması yapılan ve nötralize edilmiş süpernatanttan elde edilen zon çapları (mm)	Yalnızca nötralize edilmiş süpernatanttan elde edilen zon çapları (mm)	Kontrol grubu zon çapları (mm)**
<i>Geobacillus</i> sp. A353	<i>Geobacillus</i> sp. C304	-*	9	9
<i>G. toebii</i> DSM14590	<i>Geobacillus</i> sp. C304	-	15	14
<i>G. kaustophilus</i> DSM13174	<i>Geobacillus</i> sp. C304	-	3	4

*İnhibisyon zonunun görülmediği anlamına gelmektedir.

** Kontrol:

Çizelge 4.3 H₂O₂ Uygulaması ve katalaz enzimi aktivitesinin tespit edilmesi

H ₂ O ₂ Uygulaması Suş	Katalaz aktivitesi
<i>G. stearothermophilus</i> A113	Negatif
<i>Geobacillus</i> sp. C304	Pozitif
<i>G. thermoglucosidans</i> DSM2542	Pozitif
<i>G. thomodentrificans</i> DSM463	Pozitif
<i>G. thermoglucosidans</i> B84a	Pozitif
<i>G. toebii</i> DSM14590	Negatif
<i>G. vulcanii</i> DSM13174	Negatif

Çizelge 4.3'ten de görüleceği üzere *Geobacillus* C304 izolatının katalaz enzim aktivitesi bulunmaktadır. Bu sonuca göre kültür süpernatantı içerisinde H₂O₂'den kaynaklı muhtemel bir antimikorabiyal etkinlik söz konusu değildir.

4.3 Bakteriyosin Aktivite Ünitesinin Belirlenmesi

Geobacillus sp. C304 izolatının süpernatantının aktivite ünitesinin belirlenmesi amacıyla farklı oranlarda dilüe edilen süpernatant damlatma yöntemiyle 10'ar µL hacimde olacak şekilde indikatör bakteriler üzerine uygulanmış ve sonuçlar aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Bakteriyosin aktivite ünitesi sonuçlarının indikatör suşlar üzerindeki etkileri

Dilüsyon Faktörü	<i>Geobacillus</i> sp. A353 İnhibisyon zon çapı (mm)	<i>G. toebii</i> DSM 14590 İnhibisyon zon çapı (mm)
1	24,50	22,00
½	18,00	13,25
¼	15,50	10,50
1/8	13,50	4,50
1/16	7,50	-
1/32	-*	-
1/64	-	-

*İnhibisyon zonunun görülmediği anlamına gelmektedir

Çizelge 4.4'te inhibisyon zon çapları esas alınarak *Geobacillus* C304 izolatının bakteriyosinin aktivite üniteleri değerlendirmeye tabi tutulan indikatör suşlar için hesaplanacak olursa, *Geobacillus* sp. A353 izolatı için 3200 AU, *G. toebi* DSM 14590 içinse 1600 AU olarak tespit edilmiştir.

4.4 Çevresel Parametrelerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkileri

4.4.1 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon zamanının belirlenmesi

Geobacillus sp. C304 izolatının süpernatantının ideal antimikrobiyal etkinlik gösterdiği inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla farklı saat aralıklarında inkübe edilen

kültürlerden elde edilen süpernatantlar damlatma yöntemiyle 10'ar µL hacimde indikatör suşlar üzerine uygulanmıştır ve sonuçları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Bakteriyosin üretimi ve aktivitesi için uygun inkübasyon zamanının belirlenmesi

Örnekleme saati	Kültürün OD (optik dansite) değeri	Kültür pH'sı	İnhibisyon zon çapı- <i>Geobacillus</i> sp. A353 (mm)	İnhibisyon zon çapı- <i>G. toebii</i> -DSM 14590 (mm)
0	0,011	7,32	-**	-
4	0,082	7,22	-	-
8	0,369	6,89	11,4	-
12	0,928	6,20	25,5	22
16	0,682	6,43	26,8	24
20	0,789	6,83	36	23,8
24	0,757	7,22	22,9	23
30	0,721	7,55	28	23,8
36	0,438	7,86	28	24,6
48	0,501	8,10	25,5	21,8
60	0,623	8,19	26	22,4
72	0,696	8,26	27,5	21,8

Çizelge 4.5'e bakıldığında bakteriyosin aktivitesi için ideal inkübasyon süresine bakıldığında her iki indikatör suş için de azami antimikrobiyal aktivite 20. saatin sonunda elde edilen ham bakteriyosinde görülmüştür. Bu aşamadan sonra bakteriyosin içeren kültür süpernatantının eldesi için kültürler 20 saat süresince inkübe edilmiştir.

4.4.2 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

Geobacillus sp. C304 izolatının süpernatantının ideal antimikrobiyal etkinlik gösterdiği inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklıklarda geliştirilen kültürlerden elde edilen süpernatantlar damlatma yöntemiyle 10'ar µL hacimde uygulanmıştır ve sonuçları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi

	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C
<i>Geobacillus</i> sp. A353				
İnhibisyon zon çapı (mm)	19	23	29	17,4
<i>G. toebii</i> DSM 14590				
İnhibisyon zon çapı (mm)	14,9	21	21,7	13

Her iki indikatör suş için de elde edilen en yüksek antimikrobiyal aktivite 60 °C'lik inkübasyon sıcaklığında elde edilen ham bakteriyosinde saptanmıştır. Bu aşamadan sonrasında ideal inkübasyon sıcaklığı olarak 60 °C olarak belirlenmiştir.

4.4.3 Bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi

Geobacillus sp. C304 izolatının süpernatantının ideal antimikrobiyal etkinlik gösterdiği besiyeri pH'sının belirlenmesi amacıyla farklı pH'larda inkübe edilen kültürlerden elde edilen süpernatantlar nötralize edildikten sonra damlatma yöntemiyle 10'ar µL hacimde uygulanmıştır ve sonuçları aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi

pH	<i>Geobacillus</i> sp. A353				<i>G. toebii</i> DSM 14590			
	İnhibisyon zon çapı (mm)				İnhibisyon zon çapı (mm)			
5,50	-*	-	-	-	-	-	-	-
6,00	-	-	-	-	-	-	-	-
6,50	-	-	-	-	-	-	-	-
7,00	11,5	12	11	11	12,5	9,5	13	14
7,22	23	24	25	24	21,5	21,5	21,5	20
7,50	26	26	25	25,5	22,5	20,5	21	22
8,00	31	30	29,5	29	21	21,5	20	20
8,50	20	21	19	19	12,5	13	14	13
9,50	15	15	15	15	9	10	10	9

*İnhibisyon zon çapı gözlenmemiştir.

Çizelge 4.7'de görüleceği üzere alkali pH değerlerinin bakteriyosin üretimini teşvik ettiği görülmektedir. Her iki indikatör suşun inhibisyonuna bakarak bundan sonraki aşamalarda besiyerinin pH'sı 8,0'e ayarlanmıştır.

4.4 Agar Difüzyon Yöntemi ile Üretimi Optimize Edilen Bakteriyosinin Patojen Bakteriler Üzerinde Antimikrobiyal Etkinliğinin Test Edilmesi

Agar difüzyon yöntemi itibariyle elde edilen inhibisyon zon çapları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Agar difüzyon antimikrobiyal etkinlik testi ile belirlenen inhibisyon zon çapları

Suş kodu ve adı	İnhibisyon zon çapı
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-*
<i>E. faecium</i> 23	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 25912	-
<i>B. subtilis</i> DSM 1971	13 mm
<i>L. monocytogenes</i> NCTC 5348	-
MRSA ATCC 43300	-
<i>B. licheniformis</i> DSM 13	12 mm
<i>S. carnosus</i>	-
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13311	-
<i>S. Typhimurium</i> DMC4	-
<i>E. coli</i> ATCC 35150	-
<i>S. Infantis</i> DMC12	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 7006003	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-
<i>Shigella</i> sp.	-
<i>C. albicans</i>	-

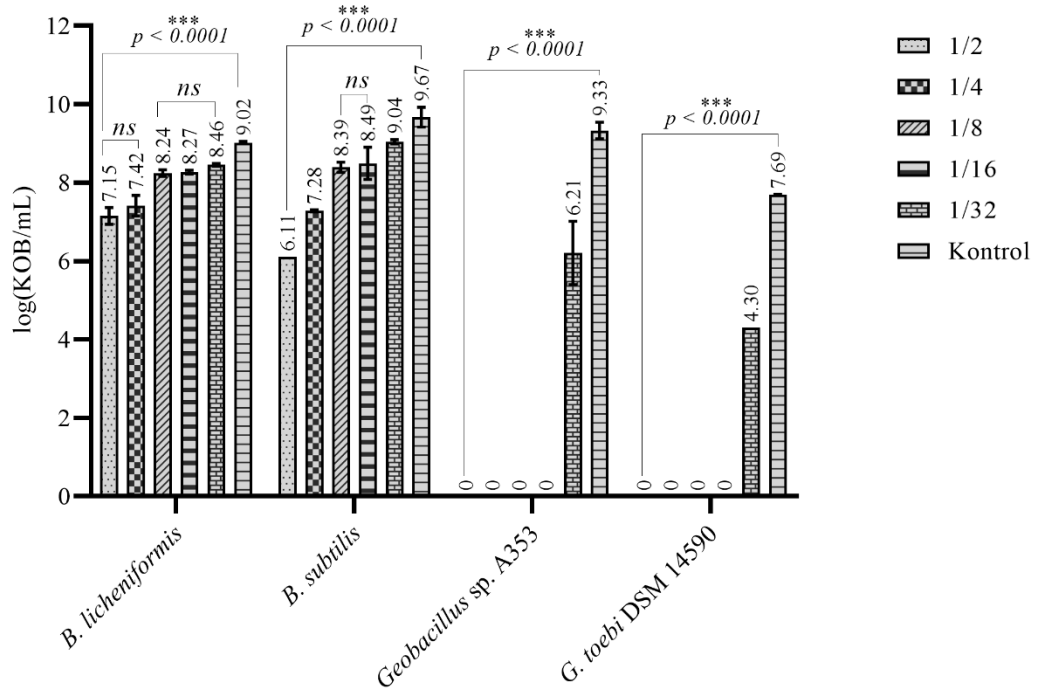
--; inhibisyon zonu saptanmamıştır.

Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere söz konusu bakteriyosinin etki spektrumunun dar olduğu görülmektedir. Antmikrobiyal etkinlik yalnızca test paneline dahil edilen *B. licheniformis* ve *B. subtilis* gibi yakın akraba türler üzerinde gözlenmiştir.

4.5 Bakteriyosin İçeren Kültür Süpernatantının Minimum İnhibisyon Dilüsyon Değerinin ve Antibiyofilm Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Minimum inhibisyon dilüsyon konsantrasyonlarından elde edilen logaritmik sayım ve logaritmik yüzde azalma sonuçları Şekil 4.1’de verilmiştir. Minimum İnhibisyon dilüsyon değerleri bakteriyosine duyarlı olan iki *Bacillus*, iki *Geobacillus* suş ve

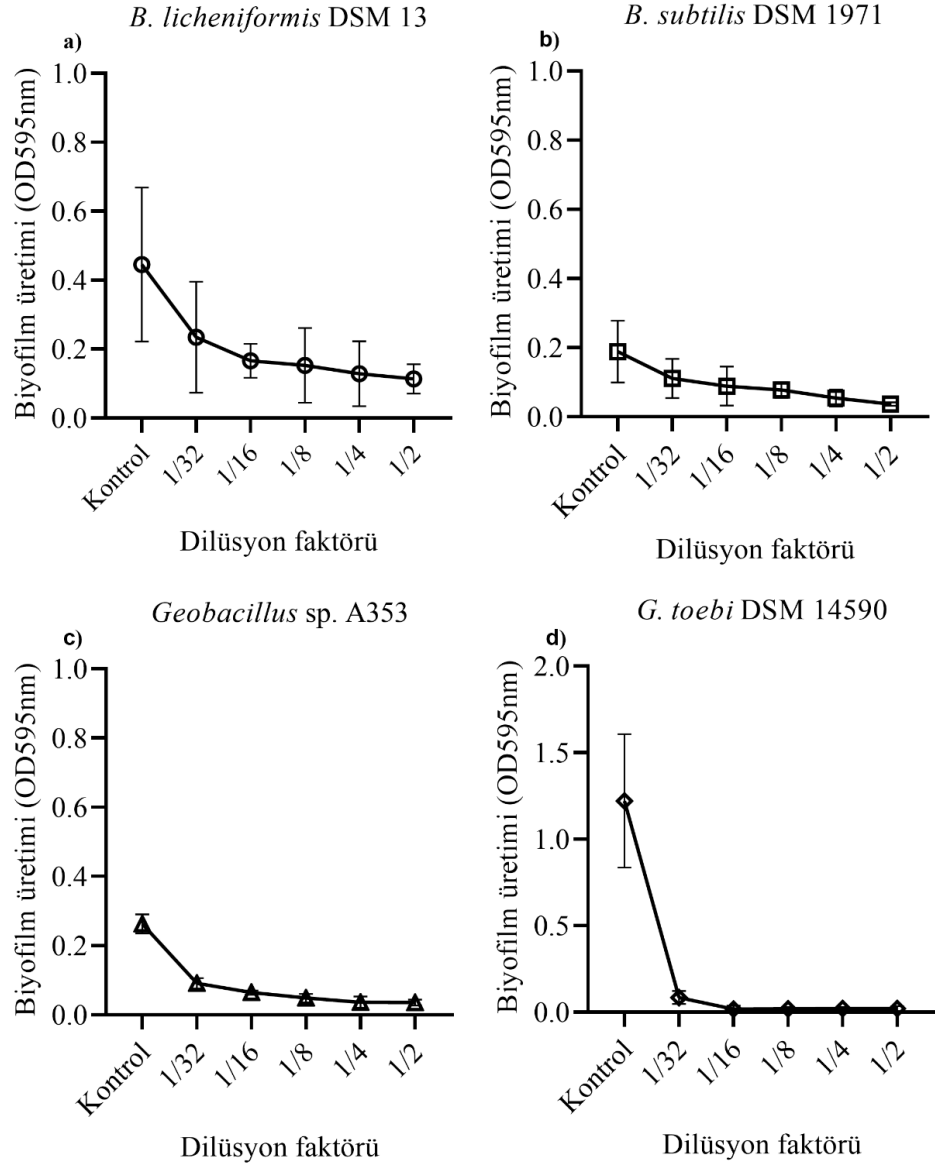
izolatlarına karşı değerlendirilmiştir. Logaritmik yüzde azalma sonuçları pozitif kontrol gruplarına göre koloni oluşturan birim sayılarındaki değişimi yansıtmaktadır.



Logaritmik yüzde azalma log(KOB/mL)					
Dilüsyon faktörü					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>B. subtilis</i>	98.57±0.67	97.28±1.55	83.33±3.37	82.37±2.02	72.85±2.02
<i>B. licheniformis</i>	99.97±0.00	99.59±0.03	94.63±1.52	91.84±6.68	76.37±3.04
<i>Geobacillus</i> sp. A453	100	100	100	100	99.85±0.19
<i>G. toebi</i> DSM 14590	100	100	100	100	99.96±0.00

Şekil 4.1 Minimum inhibisyon dilüsyon konsantrasyonlarından elde edilen logaritmik sayım ve logaritmik yüzde azalma sonuçları

Bakteriyosin içeren süpernatantın termofilik türler üzerinde son derece etkili olduğu görülürken mezofilik türler dahilinde minimum bakterisidal konsantrasyona yalnızca *B. Licheniformis* türünde ulaşılmıştır (%99,97). Bakteriyosin içeren süpernatantın ilgili dört tür üzerindeki antibiyofilm etkinliği ve biyofilm üretimindeki yüzde azalmalar Şekil 4.2’de verilmiştir. En yüksek antibiyofilm etkinliği *Geobacillus* sp. A453 izolatu ve *G. Toebi* DSM 14590 referans suşu üzerinde görülmüştür.



	Biyofilm üretimi % azalma				
	Dilüsyon faktörü				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>B. licheniformis</i>	64.67±13.10	60.09±19.21	52.56±13.70	48.37±15.29	27.25±7.75
<i>B. subtilis</i>	80.42±2.52	71.03±12.83	58.73±11.74	52.91±	41.01±19.95
<i>Geobacillus</i> sp. A453	100	100	100	75.57±2.43	65.30±5.55
<i>G. toebi</i> DSM 14590	100	100	100	100	93.04±3.09

Şekil 4.2 Antibiyofilm etkinliği **a)** *B. Licheniformis* DSM 13 **b)** *B. Subtilis* DSM 1971 **c)** *Geobacillus* sp. A353 **d)** *G. Toebi* DSM 14590

4.6 Çevresel Parametrelerin Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Etkileri

4.6.1 Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi

İdeal inkübasyon koşullarından elde edilen süpernatantlar farklı sıcaklıklara farklı sürelerde maruz bırakıldıktan sonra etkinlikleri yine indikatör bakteriler üzerinde sınanmış ve sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir. İlgili bulgular bakteriyosin içeriğinin yüksek sıcaklıklarda dahi aktivitesini yitirmediğini göstermektedir. Yüksek sıcaklıklarda ve farklı temas sürelerinde bakteriyosin aktivitesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Çizelge 4.9 Sıcaklığın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi

		<i>Geobacillus</i> sp. A353 için			<i>G. toebii</i> DSM 14590 için		
		inhibisyon zon çapı (mm)			inhibisyon zon çapı (mm)		
Sıcaklık °C		80	90	100	80	90	100
Süre	5dk	31,0	30,1	30,5	30,5	30,5	30,4
	10dk	31,8	30,6	29,1	30,5	30,5	30,2
	15dk	30,0	30,3	30,3	30,2	30,2	30,2
	20dk	29,6	28,9	29,8	29,4	29,4	29,4

4.6.2 pH’nın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi

Geobacillus sp. C304 izolatının süpernatantı farklı pH’lara maruz bırakıldıktan sonra indikatör suşlar üzerine uygulanmıştır ve sonuçları inhibisyon zon çapı olarak Çizelge 4.10’da verilmiştir. Sonuçlardan da görüleceği üzere test edilen bakteriyosin çok geniş bir pH skalasında ve ekstrem pH değerlerinde dahi aktivitesini yitirmemektedir.

Çizelge 4.10 pH'nın bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkisinin belirlenmesi

	<i>Geobacillus</i> sp. A353 için inhibisyon zon çapı (mm)	<i>G. toebii</i> DSM 14590 için inhibisyon zon çapı (mm)
Kontrol	27,4	28,8
pH		
2	20,1	14,4
3	21,1	14,8
4	24,6	24,8
5	25,1	22,6
5,5	-	-
6	18,8	13
6,5	26	22,6
7	24,3	20,5
7,5	26,4	23
8	27,3	25,6
8,5	26,8	22,6
9	23,1	18,8
10	24,1	20
11	25,4	22,6
12	23,4	18

4.6.3 Enzimatik uygulamaların bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

Geobacillus sp. C304 izolatının süpernatantının ideal antimikrobiyal etkinlik gösterdiği koşullarda elde edilen süpernatantlar Çizelge 4.11'de belirtilen enzimlerle muamele edilmiş ve indikatör suşlar üzerinde test edilmiştir (Çizelge 4.11). Antimikrobiyal etkinlik gösteren içerik alkalin proteaz ve proteinaz K gibi proteolitik enzimlerle muamele sonucunda etkinliğini bütünüyle yitirmektedir.

Çizelge 4.11 Enzimatik uygulamaların bakteriyosin aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

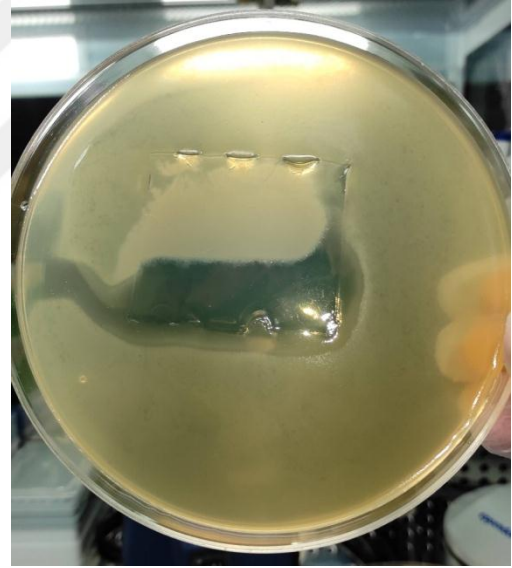
	Antimikrobiyal etkinlik	
Uygulanan enzim	<i>Geobacillus</i> sp. A353	<i>G. toebii</i> DSM 14590
Negatif kontrol	Yok	Yok
α -amilaz	Yok	Yok
Alkalin proteaz	Var	Var
Lizozim	Yok	Yok
Proteinaz-K	Var	Var
Tripsin	Yok	Yok

4.7 Native-poliakriamid jel elektroforez (N-PAGE) antimikrobiyal peptid varlığının gösterilmesi

Besiyeri üzerine yerleştirilen N-PAGE'in üzerine yayılan örneğin antimikrobiyal etkinliğini gözlemleyebilmek için, 0,1 McFarland (Şekil 4.3a) ve 0,5 McFarland (Şekil 4.3b) kültür yoğunluğuna getirilmiş %0,7 agar içerikli soft besiyeri (TSA) içerisindeki *G. Toebii* DSM 14590'n in üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösterilmiştir. Jellerin Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi ile boyanan kısmı Şekil 4.4'te gösterilmiştir. C304 süpernatantının, DSM 14590 referans suşu üzerindeki antimikrobial etkinliği, jel üzerinde görülen inhibisyon zonuyla gözlemlenmiştir. Ayrıca, özellikle Şekil 4.3'teki inhibisyon zonunun, Şekil 4.4'teki jelin alt fraksiyonunda Coomassie Brilliant Blue boyaması ile görünür hale getirilen protein bantlarından ileri geldiği gözlemlenmiştir.

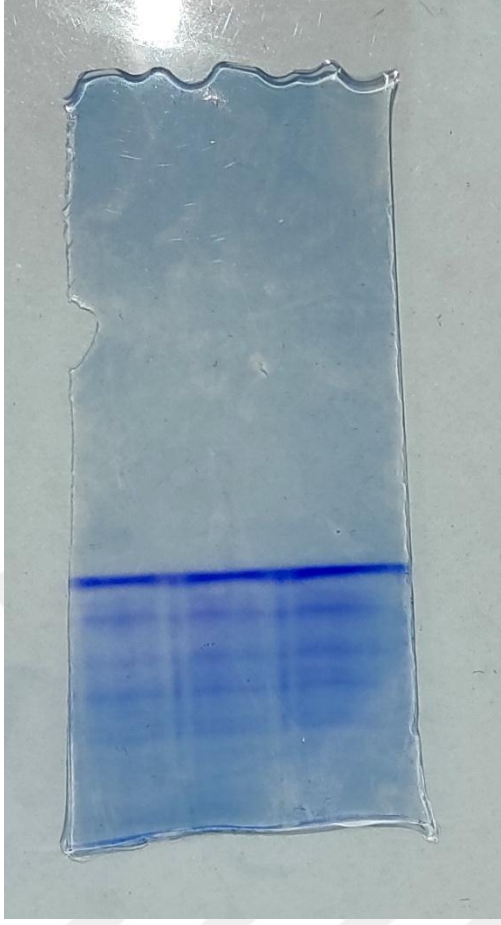


a



b

Şekil 4.3 a) C304 süpernatantı yüklü N-PAGE'de 0.1 McFarland ve b) 0,5 olarak aşılanarak yayılmış DSM14590 indikatör suşuna karşı oluşan inhibisyon zonu



inhibisyon zonuna neden olan
düşük moleküler ağırlıklı
protein fraksiyonları

Şekil 4.4 N-PAGE’de C304 süpernatantında saptanan protein bantları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada farklı sıcak su kaynaklarından izole edilen termofilik bakteriler ile uluslararası koleksiyonlardan referans suşlar kullanılmıştır. *Geobacillus* sp. C304 izolatının süpernatantı tarama yaptığımız bakterilerin 14'ü üzerine etki göstermiştir. Bu sebeple genel olarak bir bakteriyosin potansiyeli taşıdığına kanaat getirilmiş, bu bakteriyosinin kısmi tanımlaması için gerekli deneyler etrafında çalışma şekillenmiştir. Katalaz aktivitesi ölçümlerinde *Geobacillus* sp. C304 her ne kadar pozitif çıksa da proteolitik enzimlerin kullanıldığı denemelerde etkinlik tamamen kaybolurken diğer enzimlerde etkinlik kaybı oluşmadığından katalaz testi sonuçları göz ardı edilmiştir. Bakteriyosin aktivite ünitesi ölçümlerinde ise 1/16 dilüsyon faktöründen daha çok dilüe edildiğinde herhangi bir etkinlik gösterilememiştir. Optimizasyon deneyleri sırasında da C304 izolatının doğal ortamındaki stres koşulları çerçevesinde optimum antimikrobiyal etkinlik gösterdiği anlaşılmıştır. Çizelge 4.5.1'de de görüldüğü üzere bakteriyosin içeren süpernatant *B. licheniformis* ve *B. subtilis* gibi yakın akraba türler üzerinde antimikrobiyal etkinlik sergilemiştir. Antibiyofilm etkinliği değerlendirildiğinde ise antimikrobiyal etkinlik ile paralel sonuçlara ulaşılmıştır. Bakteriyosinin sıcaklığa direnci ise 100°C'de 20dk'ya kadar değerlendirilmiş ve anlamlı bir etkinlik kaybı görülmemiştir.

pH toleransı incelenirken özellikle pH 5.5'te bir antimikrobiyal etkinlik görülmemiş olması ilgi çekicidir. Bu sebeple proteinin bu pH değerinde konformasyon değişimi gösterdiği düşünülürken endüstriyel uygulamalar çerçevesinde rölatif olarak kullanım potansiyelini göstermiştir.

Bakteriyosinin proteolitik enzim uygulamalarında tamamen etkinliğini yitirmesi ise sindirim açısından herhangi bir problem teşkil etmediğini ve gıda uygulamalarında kullanım potansiyelini göstermektedir. Yine de proteinin yıkımından ortaya çıkacak olan daha küçük fragmantların sitotoksik etkinliğinin gözden geçirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Tezin deneyleri aşamasında öncelikle SDS-PAGE deney tasarımı yapılmış fakat SDS proteinde yıkıma sebep olduğundan ve etkinlik gözlemlenemediğinden sadece N-PAGE yapılarak etkinlik gösterilmiş ve Coomassie Brilliant Blue boya çözeltisi ile boyanan jelin içerğindeki protein gösterilmiştir. Bu sonuç ile bakteriyosinin kuarterner yapısı olmaksızın herhangi bir antimikrobiyal etkinliği olmadığı anlaşılmıştır.

Koleksiyon suşlarının ve izolatların akrabalık ilişkileri incelendiğinde *Geobacillus* sp. C304'ün etkinlik gösterdiği suşlar ve izolatlar, akrabalık ilişkileri ile korelasyon içerisindedir (Cihan vd 2011). Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında kemotaksonomik bakış açısıyla da bu verilerin uyumlu olduğu düşünülmüştür. Bakteriyosinlerin genellikle yakın akraba türlere karşı etkinlik gösteriği görülmüştür.

Kısmi olarak tanımladığımız bu bakteriyosine geniş çerçeveden bakıldığında endüstriyel kullanım alanları olabileceği açıkça görülmektedir. Ama bakteriyosinlerin etki spektrumunun kısıtlı olması ve genellikle yakın akraba türler üzerine etkili olması elimizdeki olanakları oldukça kısıtlamaktadır. *Geobacillus* sp. C304'nin ürettiği bakteriyosinin modifiye edilebilmesi veya modifiye halinin doğrudan bakteriden sentezletilmesi gibi yollar için yenilikçi genetik mühendisliği yöntemleri ile daha radikal sonuçlar elde edilebileceği düşünülmüştür.

Gıda koruma yöntemleri çoğunlukla tuzlara ve kimyasal maddelere dayanmaktadır. Bu yöntemlerin ise insan sağlığı üzerine negatif etkileri olabilmektedir. Doğal gıda koruma yöntemlerinin ise herhangi bir negatif etkisi olmadığından şu anda bu araştırmaya konu olan sıcaklık ve pH toleransı gösteren bakteriyosinler bir ihtiyaç haline gelmektedir.

Gıda endüstrisinde pastörizasyon sıkça kullanılan bir yöntemdir. *Geobacillus* sp. C304'ün ürettiği bakteriyosinin sıcaklık toleransı akıllara pastörizasyon işlemi sonrasında sıvı yumurta ürünlerinde, bira ve şarapçılık endüstrisinde, meyve sularında ve pH toleransı sebebiyle turşularda ve sirkelerde kullanım potansiyelleri olabileceğini getirmektedir.

Özellikle süt endüstrisinde termofilik basillerin gıda kalitesini etkilediği ve ciddi ekonomik kayıplara sebep olabildiği bilinmektedir. *Geobacillus* sp. C304'ün ürettiği bakteriyosinin süt endüstrisindeki proseslerde kullanımı ekonomik kayıpları azaltabilecek potansiyele sahiptir (Ceylan vd 2019) .

Çalışma çerçevesinde denenen saflaştırma yöntemlerinden bir tanesi de Amonyum sülfat çöktürmesi olmuştur. Fakat çok yüksek konsantrasyonlara kadar çıkılmasına karşın bir sonuç alınamaması neticesinde *Geobacillus* sp. C304'ün ürettiği bakteriyosinin saflaştırması laboratuvarımız imkanlarında gerçekleştirilememiştir. Kütle kromatografisi yöntemiyle saflaştırma için ileri çalışmalar tasarlanmıştır.

Geobacillus sp. C304'ün ürettiği bakteriyosinin saflaştırması aşamasından sonra gıda koruma gibi alanların üzerine gidilebileceği gibi farklı endistürilerde farklı kullanım potansiyelleri de ortaya çıkabilecektir. Örneğin de Mello vd 2013 çalışmada gösterdikleri gibi farklı komponentlerle bir bakteriyosinin kombinatif olarak denenmesi kaplama olarakda potansiyelleri olduğunu göstermektedir.

Bakteriyosinler, sperm hareketliliğini etkileme yeteneklerinden dolayı potansiyel spermisidal ajanlardır. Laktasin ve fermentisin HV6b, insan spermatozoasının hareketliliğinin azalmasında önemli bir etki göstermiştir; bu bakteriyosinler yüksek konsantrasyonlarda, spermlere hasar vermektedir (Kumar vd 2012; Lopez vd 2016). *Geobacillus* sp. C304'ün ürettiği bakteriyosinin ilk etapta Laktasin gibi bir bakteriyosinle kombinatif olarak ve neticede kendi başına denemeleri yapılarak spermisit etkisi potansiyelleri değerlendirilebilir. *Lactobacillus rhamnosus* tarafından üretilen laktosin 160 (peptid benzeri bir bakteriyosin), *G. vaginalis*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus* spp. ve *Prevotella bivia* gibi vajinal enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen patojenlere karşı inhibe edici etkiler sergilemektedir (Silkin vd 2008). Bu tip inhibisyon etkileri de yine potansiyeller çerçevesinde görülmektedir.

Bakteriyosinlerin anti-kanser terapisindeki potansiyel kullanımı, tümör hücrelerinde apoptozu veya sitotoksisiteyi indükleyen DNA ve membran protein sentezini inhibe

etmelerinden kaynaklanmaktadır (Joo vd 2012). *Geobacillus* sp. C304'ün ürettiği bakteriyosininde kullanım potansiyelleri bu bağlamda potansiyel taşımaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada *Geobacillus* sp. C304'ün ürettiği bakteriyosinin protein yapısında olduğu gösterilmiş termostabil bir antimikrobiyal peptid olduğu anlaşılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda daha ileri çalışmalar ile bu bakteriyosinin saflaştırması yapılmalı, moleküler yapısı aydınlatılmalı ve aldığımız sonuçlara göre gıda dışındaki diğer endistürilerde kullanım potansiyelleri ilk olarak literatürdeki örnekleriyle karşılaştırılmalı sonrasında deneysel olarak gösterilmelidir.



KAYNAKLAR

- Abdel-Mohsein, H. S., Sasaki, T., Tada, C., Nakai, Y. 2011. "Characterization and partial purification of a bacteriocin-like substance produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* H1 isolated from cow manure compost", *Animal Science Journal*, 82, 340-51.
- Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*, 35(1), 201-232.
- Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M., & Chikindas, M. L. (2017). Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(3), e02508-16.
- Al-Mathkhury, H. J. F., Ali, A. S., & Ghafil, J. A. (2011). Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *North American journal of medical sciences*, 3(8), 367.
- Bodaszevska-Lubas, M., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T., & Heczko, P. B. (2012). Antibacterial Activity of Selected Standard Strains of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins-Pilot Study. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 66.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(3), 238.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray Jr, P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International journal of antimicrobial agents*, 22(5), 465-478.
- Brogden, N. K., & Brogden, K. A. (2011). Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals. *International journal of antimicrobial agents*, 38(3), 217-225.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E., & Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 90(2), 155.
- Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M., Flint, S. H. 2009. "The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*", *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1012-8.
- Cebrián, R., Rodríguez-Ruano, S., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Montalbán-López, M. (2014). Analysis of the promoters involved in enterocin AS-48 expression. *PloS one*, 9(3), e90603.
- Ceylan, A. A., Başbülbul, G., Biyoloji Bölümü, A., Rekombinant, D. N. A., Merkezi, R. P., & REDPROM, A. (2019). *Geobacillus toebii* HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Konserve Gıdalarda *Bacillus coagulans* ve *Geobacillus stearothermophilus*'u Engellemek Amacıyla Uygulanması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 140.

- Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Daffonchio, D., & Boudabous, A. (2003). Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 990-1000.
- Chopra, A. K., Mathur, D. K. 1984. "Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products", *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 263-71.
- Cihan, A. C., Ozcan, B., Tekin, N., & Cokmus, C. (2011). Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2683-2696.
- Cinque B , La Torre C , Melchiorre E , et al. Use of probiotics for dermal applications. In: Liong MT , editor. *Probiotics, biology, genetics and health aspects*. Vol. 21, *Microbiology monographs*. Berlin : Springer-Verlag; 2011. p. 221–241.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., Brandelli, A. 2004. "Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40", *Letters in Applied Microbiology*, 38, 251-6.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. "Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential", *Current Protein and Peptide Science*, 6, 61-75.
- de Kwaadsteniet, M., Todorov, S. D., Knoetze, H., & Dicks, L. M. T. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 433-444.
- de Martinis, E. C. P., Alves, V. F., & Franco, B. D. G. D. M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18(2-3), 191-208.
- de Mello, M. B., da Silva Malheiros, P., Brandelli, A., da Silveira, N. P., Jantzen, M. M., & da Motta, A. D. S. (2013). Characterization and antilisterial effect of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide pediocin. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(1), 43-50.
- de Souza Barbosa, M., Todorov, S. D., Ivanova, I., Chobert, J. M., Haertlé, T., & de Melo Franco, B. D. G. (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, 46, 254-262.
- Fikes, J. D., Crabtree, B. L., Barridge, B. D. 1983. "Studies on the mode of action of a bacteriocin produced by *Bacillus stearothermophilus*", *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1576-82.
- Fitter, J., Herrmann, R., Dencher, N. A., Blume, A., & Hauss, T. (2001). Activity and stability of a thermostable α -amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. *Biochemistry*, 40(35), 10723-10731.
- Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., Crawford, R. 2001. "The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel", *Journal of Applied Microbiology*, 90, 151–7.

- Garg, N., Tang, W., Goto, Y., Nair, S. K., van der Donk, W. A. 2012. "Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 5241-6.
- Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C. 2002. "Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria", *Biochimie*, 84, 577-92.
- Gouaux, E. (1997). The long and short of colicin action: the molecular basis for the biological activity of channel-forming colicins. *Structure*, 5(3), 313-317.
- Guder, A., Wiedemann, I., & Sahl, H. G. (2000). Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics. *Peptide Science*, 55(1), 62-73.
- Hammami, R., Zouhir, A., Hamida, J. B., & Fliss, I. (2007). BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *Bmc Microbiology*, 7(1), 89.
- Hancock, R. E. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37-42.
- Ishijima, S. A., Hayama, K., Burton, J. P., Reid, G., Okada, M., Matsushita, Y., & Abe, S. (2012). Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Applied and environmental microbiology*, 78(7), 2190-219
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381-390.
- Jofré, A., Aymerich, T., Monfort, J. M., & Garriga, M. (2008). Application of enterocins A and B, sakacin K and nisin to extend the safe shelf-life of pressurized ready-to-eat meat products. *European Food Research and Technology*, 228(1), 159.
- Jones, E., Salin, V., & Williams, G. W. (2005). Nisin and the market for commercial bacteriocins (No. 1406-2016-117331).
- Joo, N. E., Ritchie, K., Kamarajan, P., Miao, D., & Kapila, Y. L. (2012). Nisin, an apoptogenic bacteriocin and food preservative, attenuates HNSCC tumorigenesis via CHAC 1. *Cancer medicine*, 1(3), 295-305.
- Kang, B. S., Seo, J. G., Lee, G. S., Kim, J. H., Kim, S. Y., Han, Y. W., ... & Park, Y. M. (2009). Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *The Journal of Microbiology*, 47(1), 101-109.
- Kaunietis, A., de Jong, A., Pranckutė, R., Buivydas, A., Kuipers, O. P. 2016. "Draft genome sequences of two *Geobacillus* species strains, isolated from oil wells and surface soil above oil pools", *Genome announcements*, 4, 5.
- Khalil, R., Djadouni, F., Elbahloul, Y., Omar, S. 2009a. "The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain", *African Journal of Food Science*, 3, 011-022.
- Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S. 2009b. "Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain", *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 242-50.

- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337-349.
- Kristjánsson, M. M., & Ásgeirsson, B. (2002). Properties of extremophilic enzymes and their importance in food science and technology. *Handbook of Food Enzymology*, 77-100.
- Kumar, B., Balgir, P. P., Kaur, B., Mittu, B., & Garg, N. (2012). Antimicrobial and spermicidal activity of native and recombinant pediocin CP2: a comparative evaluation. *Archives of Clinical and Microbiology*, 3(3), 2012.
- Linde A., Ross C.R., Avis E.G., Di L., Blecha F., Melgarejo T., Journal of Veterinary Internal Medicine, 22,247, 2008.
- López-Cuellar, M. D. R., Rodriguez-Hernandez, A. I., & Chavarria-Hernandez, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1039-1050.
- Margaret A. Riley, Milind A. Chavan, Margaret A. Riley, Milind A. Chavan. Publisher: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, "Bacteriocins: Ecology and Evolution". Year: 2007, ISBN: 978-3-540-36603-4,978-3-540-36604-1.
- Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., De Felice, M. 2002. "Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*", Microbial cell factories, 1, 1.
- Mathews, S., Panicker, S., Arunkumar, G., & Mathew, T. (2015). Detection of anti-inflammatory activity of Lactobacilli producing bacteriocins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 598-606.
- Mauriello, G. D. L. E., De Luca, E., La Stora, A., Villani, F., & Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in applied microbiology*, 41(6), 464-469.
- Miller, P., Haveron, M. E., Solichova, K., Merkl, R., McMullen, L. M., Mikova, K., & Chumchalova, J. (2010). Shelf life extension of liquid whole eggs by heat and bacteriocin treatment. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 280-289.
- Novotny, J. F., Perry, J. J. 1992. "Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species", *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2393-6.
- Oscáriz, J. C., Lasa, I., Pisabarro, A. G. 1999. "Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity", *FEMS Microbiology Letters*, 178, 337-41.
- Özdemir, G. B., Biyik, H. H. 2012. "Isolation and characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Geobacillus toebii* strain HBB-247", *Indian Journal of Microbiology*, 52, 104-8.
- Pálffy, R., Gardlik, R., Behuliak, M., Kadasi, L., Turna, J., & Celec, P. (2009). On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Molecular medicine*, 15(1), 51.

- Piper, C., Casey, P. G., Hill, C., Cotter, P. D., & Ross, R. P. (2012). The lantibiotic lacticin 3147 prevents systemic spread of *Staphylococcus aureus* in a murine infection model. *International journal of microbiology*, 2012.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S. M. 1998. "A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages", *Letters in Applied Microbiology*, 27, 9-13.
- Pokusaeva, K., Kuisiene, N., Jasinskyte, D., Rutiene, K., Saleikiene, J., Chitavichius, D. 2009. "Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*", *Open Life Sciences*, 4, 196-203.
- Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kananavičiūtė, R., Lebedeva, J., Kuisienė, N., Šaleikienė, J. 2015. "Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus* sp. bacteria isolated from different environments", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food sciences*, 155-61.
- Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual review of genetics*, 32(1), 255-278.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015). Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491-509.
- Saleem, F., Ahmad, S., Yaqoob, Z., Rasool, S. A. 2009. "Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria", *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22, 3.
- Sand, S. L., Oppegård, C., Ohara, S., Iijima, T., Naderi, S., Blomhoff, H. K., & Sand, O. (2010). Plantaricin A, a peptide pheromone produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes the cell membrane of both normal and cancerous lymphocytes and neuronal cells. *Peptides*, 31(7), 1237-1244.
- Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. R., Flint, S. H. 2007. "The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder", *International Journal of Dairy Technologies*, 60, 109-17.
- Seale, R. B., Dhakal, R., Chauhan, K., Craven, H. M., Deeth, H. C., Pillidge, C. J., Powell, I. B., Turner, M. S. 2012. "Genotyping of present-day and historical *Geobacillus* species isolates from milk powders by high-resolution melt analysis of multiple-variable-number tandem-repeat loci", *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 7090-7.
- Sharp, R. J., Bingham, A. H. A., Comer, M. J., Atkinson, A. 1979. "Partial characterization of a bacteriocin (Thermocin) from *Bacillus stearothermophilus* RS93", *Microbiology*, 111, 449-51.
- Silkin, L., Hamza, S., Kaufman, S., Cobb, S. L., & Vederas, J. C. (2008). Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(10), 3103-3106.

- Silverstein, K. A., Graham, M. A., Paape, T. D., & VandenBosch, K. A. (2005). Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 138(2), 600-610.
- Şükrü, K. U. R. T., & ZORBA, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *Yüziüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 77-83.
- Tamura, S., Yonezawa, H., Motegi, M., Nakao, R., Yoneda, S., Watanabe, H., ... & Senpuku, H. (2009). Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral microbiology and immunology*, 24(2), 152-161.
- Tzeng, Y. L., Ambrose, K. D., Zughaier, S., Zhou, X., Miller, Y. K., Shafer, W. M., & Stephens, D. S. (2005). Cationic antimicrobial peptide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5387-5396.
- Upreti, G. C., & Hinsdill, R. D. (1975). Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 7(2), 139-145.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.
- Vaughan, E. E., Daly, C., & Fitzgerald, G. F. (1992). Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *Journal of applied bacteriology*, 73(4), 299-308.
- Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, 7(5), 545-594.
- Wu, J., Hu, S., & Cao, L. (2007). Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(9), 3131-3135.