

**BAZI GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN BAKTERİYOSİN
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF BACTERIOCIN PRODUCTION FROM
SOME GRAM NEGATIVE BACTERIA**

SEBAHAT TEKCAN DÜĞENCİ

Doç. Dr. İŞİL SEYİS BİLKAY
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

12.12.2014

SEBAHAT TEKCAN DÜĞENCİ

ÖZET

BAZI GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN BAKTERİYOSİN ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SEBAHAT TEKCAN DÜĞENCİ

Yüksek lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Aralık 2014, 87 sayfa

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibakteriyel aktiviteleri araştırıldı. En yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip suşlar *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27, *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15 ve *P. aeruginosa* 22 olarak bulundu. Bu suşlardan elde edilen antibakteriyel maddelerin proteolitik enzimlere kısmen ya da tamamen hassas olduğu saptandı. Antibakteriyel aktivite belirlenmesi için damlatma, disk difüzyon ve kuyucuk yöntemleri karşılaştırılarak en uygun yöntem seçilen disk difüzyon yöntemi ile bakteriyosin üreten en verimli suşlar olarak *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 seçildi. Optimum bakteriyosin üretimleri her iki bakteri suşu için de Luria Bertani Broth besiyerinde, pH 7.0' de 37 °C'de ve 21. saatte olduğu saptandı. Çalkalamalı ya da statik koşullar bakteriyosin üretimlerini etkilemedi. *E. coli* 26S' den elde edilen bakteriyosinin 75 °C' de 30 dk ve *P. aeruginosa* 8' den elde ettiğimiz bakteriyosinin ise 90 °C' de 30 dk kararlılığını koruduğu bulundu. Metanol, butanolün her iki suşun bakteriyosin aktiviteleri üzerine etkileri olmadığı belirlendi. Etanol, aseton, SDS ve Tween 80' in *E. coli* 26S bakteriyosinine sırasıyla %25, %30, %10, %20; *P. aeruginosa* 8 bakteriyosinine ise sırasıyla %32,

%37, %5, %21 oranlarında etkili olduğu saptandı. Kloroformun, *E. coli* 26S bakteriyosini üzerine etkisi olmadığı, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerine %16 kayba neden olduğu bulundu. 4 °C' de 180.günde *E. coli* 26S' in bakteriyosin aktivitesini %70 ve *P. aeruginosa* 8' in bakteriyosin aktivitesini ise %41 oranında koruduğu belirlendi. – 20 °C' de 6. ayda bakteriyosin aktivitelerinde herhangi bir kayıp saptanmadı. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 bakteriyosinlerinin saflaştırılması için %80 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu saptandı. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' in bu çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den yapılan plazmid DNA izolasyonu sonucu plazmid varlığı saptanmadı. Sonuç olarak, *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den antibiyotiklere alternatif olabilme potansiyeli olan bakteriyosinler elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibakteriyel aktivite, bakteriyosin karakterizasyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BACTERIOCIN PRODUCTION FROM SOME GRAM NEGATIVE BACTERIA

SEBAHAT TEKCAN DÜĞENCİ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

December 2014, 87 pages

In this study, strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, which were isolated from several clinical samples, were investigated for their antibacterial activities. Strains of *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27, *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, and *P. aeruginosa* 22 were found to have the highest activity. It was established that the antibacterial substances obtained from these strains were partially or completely sensitive to proteolytic enzymes. *E. coli* 26S and *P. aeruginosa* 8 were selected as the most efficient strains producing bacteriocin by disk diffusion method which was found to be the optimal method when spot-on-lawn, disc diffusion and well-diffusion methods were compared for determining antibacterial activity. Optimal bacteriocin production was established in Luria Bertani Broth medium at pH 7.0 and 37 °C in 21 hours for both strains. It was observed that agitated and static conditions did not affect the bacteriocin production. It was also found out that the bacteriocin produced by *E. coli* 26S remained stable at 75°C for 30 minutes while bacteriocin produced by *P. aeruginosa* 8 remained stable at 90°C for the same time period. Moreover, it was determined that methanol and buthanol had no effect on the bacteriocin activities of both strains. It was observed that ethanol, acetone, SDS and Tween 80 caused

25%, 30%, 10% and 20% loss, respectively, on *E. coli* 26S bacteriocin and, 32%, 37%, 5% and 21% loss on *P. aeruginosa* 8 bacteriocin. It was also investigated that chloroform had no effect on *E. coli* 26S bacteriocin while it caused 16% loss on *P. aeruginosa* 8 bacteriocin. It was determined that *E. coli* 26S bacteriocin maintained 70% of its activity and *P. aeruginosa* 8 bacteriocin maintained 41% of its activity at 4°C after 180 days. No loss on bacteriocin activities were observed at -20°C after 180 days. It was found that precipitation of ammonium sulfate at the rate of 80% was appropriate for purification of *E. coli* 26S and *P. aeruginosa* 8 bacteriocins. It was determined that *E. coli* 26S and *P. aeruginosa* 8 were sensitive to all antibiotics used in this study. The existence of plasmid was not observed as a result of plasmid DNA isolation on *E. coli* 26S and *P. aeruginosa* 8. In conclusion, bacteriocins obtained from *E. coli* 26S and *P. aeruginosa* 8 had a potential of being alternatives to antibiotics.

Keywords: Bacteriocin, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibacterial activity, bacteriocin characterization

TEŞEKKÜR

Bana bu uzun yolda ışık tutan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili danışmanım, Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY' a teşekkürlerimi sunarım. Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilimdalı Başkanımız değerli bir bilim insanı olan Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ' e ve daima olumlu yaklaşımı ve sıcak gülümsemesiyle yanımda olan Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR' e şükranlarımı sunarım. Bilimsel ve manevi anlamda desteklerini esirgemeyen diğer değerli hocalarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Bölümümüzün yüksek lisans ve doktora öğrencilerine desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum. Her zaman yanımda olan değerli dostlarım, Demet ERDÖNMEZ, Kübra ERKAN ve Gizem GÜVEN sizin için ne kadar çok övgü yazarsam o kadar eksik kalır, her zaman aynı yolda yürüyeceğimize eminim. Tek hayalim ve hedefim olarak adlandırdığım Hacettepe Biyoloji' ye adım attığımdan beri yanımda olan bilim yoldaşım, değerli kardeşim Özgecan ERDEM, hep yanımda ol.

Başta Çiğdem TEKCAN ve Bülent TEKCAN' a, beni hayatımın başrolü yaptıkları için minnettarım. Hedeflerimizi yüksek tutmamızı nasihat eden, çok erken ebediyete uğurladığımız değerli insan, Avukat Lütfi OĞUZ ve çınar ağacımız Nezahat OĞUZ' a teşekkür ediyorum. Hepsinin adını tek tek sayamasam da kalbimdeki yerleri tartışmasız olan kocaman ailemin her ferdine ayrı ayrı şükranlarımı sunuyorum. Yanımdan bir saniye bile ayrılmadıkları ve ellerini bir saniye bile üzerimden çekmedikleri için minnettarım, biz büyük bir ekibiz. Ben olmamı sağlayan herkese ve karşılaştığım her olaya teşekkür ediyorum, hayatıma giren herkesin bana öğrettiği çok önemli şeyler var, buna yürekten inanıyorum. Her halimle baş etmek konusunda oldukça başarılı olan Osman DÜĞENCİ' ye şükranlarımı sunuyorum.

WhatsApp grubumuz 'Angara' nın bağları' hepinizi çok seviyorum. 'ABCÇDEFGHIİJKLMNOÖPRSŞTUÜVYZ' Burada adı geçen ve geçmeyen beni bütün kalbiyle sevdiğinden bir saniye bile şüphe etmediğim sevgili dostlarım ve meslektaşlarım kalbimde hepinizin yeri ayrı emin olun, hepinize yetecek kadar sevgi var içimde. Dünyadaki en şanslı insanlardan biri olmamı sağladığınız için hepinize teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Bakteriyosinler ve Bakteriyosinlerin Tarihçesi.....	3
2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri.....	4
2.3. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinleri	6
2.3.1. Kolisinler, Kolisinlerin Sınıflandırılmaları ve Etki Mekanizmaları.....	7
2.3.2. Mikrosinler, Mikrosinlerin Sınıflandırılmaları ve Etki Mekanizmaları.....	10
2.3.3. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinlerinin Safılaştırılması.....	13
2.3.4. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinlerinin Üretim Amaçları.....	14
2.3.5. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinlerinin Uygulama Alanları.....	15
2.4. Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar.....	17
2.4.1. Enterobacteriaceae.....	17
2.4.1.1. Escherichia coli	18
2.4.1.2. Klebsiella pneumoniae.....	18
2.4.2. Pseudomonas aeruginosa.....	19
3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Bakteriler.....	21
3.2. Bakterilerin Ekim Ve Üretim Koşulları.....	21
3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....	21
3.3. Çalışmada Kullanılan Suşların Antibakteriyel Aktivite Yönünden Ön Seçimi ve Proteolitik Enzim Uygulaması.....	22
3.4. Bakteriyosin Üretici Suşların Uygun Yöntemin Belirlenmesiyle Seçilmesi.....	24
3.4.1. Bakteriyosin Üretici Suşların Modifiye Damlatma Yöntemiyle Belirlenmesi.....	24
3.4.2. Bakteriyosin Üretici Suşların Kuyucuk Yöntemiyle Belirlenmesi.....	25

Sayfa

3.4.3. Bakteriyosin Üretici Suşların Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi.....	25
3.5. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in Bakteriyosinlerinin Üretimlerini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi.....	25
3.5.1. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi.....	25
3.5.2. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	25
3.5.3. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi.....	26
3.5.4. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi.....	26
3.5.5. Bakteriyosin Üretimi İçin Çalkalamalı Ve Statik İnkübasyon Koşullarının Etkisinin Belirlenmesi.....	26
3.6. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in Bakteriyosinlerinin Karakterizasyonları.....	26
3.6.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	26
3.6.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin ve Deterjanların Etkisi.....	27
3.6.3. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi.....	27
3.7. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in Bakteriyosinlerinin Kısmi Saflaştırılması.....	27
3.7.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	27
3.8. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretimi.....	28
3.8.1. Kullanılan Bakteri Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	28
3.8.2. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotik Direnç Oranlarının Belirlenmesi.....	29
3.9. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8 Suşlarından Plazmid DNA' larının İzolasyonu ve Jel Elektroforezi ile Analizi.....	29
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Antibakteriyel Aktivite Yönünden Ön Seçimi ve Proteolitik Enzim Uygulaması.....	32
4.2. Bakteriyosin Üretici Suşların Uygun Yöntemin Belirlenmesiyle Seçilmesi.....	37
4.2.1. Bakteriyosin Üretici Suşların Modifiye Damlatma Yöntemiyle Belirlenmesi.....	37

Sayfa

4.2.2. Bakteriyosin Üretici Suşların Kuyucuk Yöntemiyle Belirlenmesi.....	38
4.2.3. Bakteriyosin Üretici Suşların Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi.....	39
4.3. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in Bakteriyosinlerinin Üretimlerini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi.....	40
4.3.1. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi.....	41
4.3.2. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi.....	44
4.3.3. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi....	45
4.3.4. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi.....	47
4.3.5. Bakteriyosin Üretimi İçin Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Koşullarının Etkisinin Belirlenmesi.....	48
4.4. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in Bakteriyosinlerinin Karakterizasyonları.....	50
4.4.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	50
4.4.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin ve Deterjanların Etkisi.....	52
4.4.3. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi.....	54
4.5. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in Bakteriyosinlerinin Kısmi Saflaştırılması.....	56
4.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	56
4.6. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıkları ve Bakteriyosin Üretimlerinin Karşılaştırılması.....	57
4.6.1. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	57
4.6.2. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotik Direnç Oranlarının Belirlenmesi.....	60
4.7. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8 Suşlarından Plazmid DNA' larının İzolasyonu ve Jel Elektrofrezisi ile Analizi.....	64
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Gram negatif bakteriler tarafından üretilen kolisinler ve mikrosinler ile Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen LAB bakteriyosinleri ve genel özellikleri.....	5
Çizelge 2.2. Grup A kolisinler, Grup B kolisinler ve Sınıflandırılmayan Grup.....	9
Çizelge 2.3. Sınıf 1 ve Sınıf 2 mikrosinlerin temel özellikleri	12
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve besiyeri içerikleri.....	22
Çizelge 3.2. Proteinaz K ve Tripsin Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	24
Çizelge 3.3. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen zon tablosu.....	28
Çizelge 3.4. Plazmid DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve içerikleri.....	29
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin antibakteriyel madde üretimi ve inhibisyon zonu oluşumunun incelenmesi.....	33
Çizelge 4.2. E. coli suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	58
Çizelge 4.3. P. aeruginosa suşlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	59

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Mikrosin J25, Mikrosin B17 ve Mikrosin C7 arasındaki farklar.....	6
Şekil 3.1. Antibakteriyel aktivitenin nokta ekim yöntemi ile belirlenmesi.....	23
Şekil 4.1. Proteolitik enzim uygulaması.....	36
Şekil 4.2. Modifiye damlatma yöntemi.....	38
Şekil 4.3. Kuyucuk yönteminde kullanılan bakteri örnekleri ve inhibisyon zon çapları.....	38
Şekil 4.4. Disk difüzyon yönteminde kullanılan bakteri örnekleri ve inhibisyon zon çapları.....	39
Şekil 4.5. Escherichia coli 26S' in farklı besiyerlerinde üremesinin ölçülmesi.....	41
Şekil 4.6. Pseudomonas aeruginosa 8' in farklı besiyerlerinde üremesinin ölçülmesi.....	42
Şekil 4.7. Escherichia coli 26S' in farklı besiyerlerinde inhibisyon zonu ölçümleri.....	42
Şekil 4.8. Pseudomonas aeruginosa 8' in farklı besiyerlerinde inhibisyon zonu ölçümleri.....	43
Şekil 4.9. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in inkübasyon süresine göre üremelerinin ölçülmesi.....	44
Şekil 4.10. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in inkübasyon süresine göre inhibisyon zonu ölçümleri.....	45
Şekil 4.11. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in inkübasyon sıcaklığına göre üremelerinin ölçülmesi.....	46
Şekil 4.12. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in inkübasyon sıcaklığına göre inhibisyon zonu ölçümleri.....	47
Şekil 4.13. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in başlangıç pH' sına göre üremelerinin ölçülmesi.....	48
Şekil 4.14. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in başlangıç pH' sına göre inhibisyon zonu ölçümleri.....	48
Şekil 4.15. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarına göre üremelerinin ölçülmesi.....	49
Şekil 4.16. Escherichia coli 26S ve Pseudomonas aeruginosa 8' in çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarına göre inhibisyon zonu ölçümleri.....	50

Sayfa

Şekil 4.17. E. coli 26S' in bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	52
Şekil 4.18. P. aeruginosa 8' in bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	52
Şekil 4.19. E. coli 26S ve P. aeruginosa 8' in bakteriyosin aktivitesine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi.....	54
Şekil 4.20. E. coli 26S' in bakteriyosin aktivitesine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisinin belirlenmesi.....	55
Şekil 4.21. P. aeruginosa 8' in bakteriyosin aktivitesine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisinin belirlenmesi.....	55
Şekil 4.22. E. coli 26S ve P. aeruginosa 8' in amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan pelletlerin disk difüzyon yöntemiyle aktivitelerinin ölçülmesi.....	57
Şekil 4.23. Çalışmada kullanılan E. coli suşlarının antibiyotik direnç oranları.....	60
Şekil 4.24. Çalışmada kullanılan P. aeruginosa suşlarının antibiyotik direnç oranları.....	62
Şekil 4.25. Escherichia coli suşlarında plazmid izolasyonunun agaroz jelde görüntülenmesi.....	65

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların antimikrobiyal maddeler sentezlemeleri oldukça yaygın olarak görülmektedir. Bu antimikrobiyal maddeler içinde amonyak, hidrojen peroksit gibi metabolik maddeler, bazitrasin ve polimiksin B gibi antibiyotikler, lizozim benzeri bakteriyolitik enzimler ve bakteriyosinler yer almaktadır [1;2].

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen, peptid ya da protein yapıdaki antibakteriyel maddelerdir. Bu maddeleri üreten bakteri türleri, kendi türlerinin devamlılığı açısından tehdit oluşturan yakın akraba türlerin üremelerini engellemekte ya da öldürmektedirler. Bu maddelerin, bakteriler tarafından üretilme nedenleriyle ilgili farklı görüşler bulunmaktadır. Bu konuyla ilgili yaygın görüş ise bu maddelerin sınırlı kaynaklara ulaşmak için üretilmeleridir. Bu maddeler, genellikle, besin kıtlığı, oksijen yetersizliği, ekstrem pH gibi stres koşullarında üretilmektedirler [3;4].

Bakterilerde tür içi ve türler arası etkileşimlerin araştırılması, bakteriyosinlerin üretildiği koşulların aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Son yıllarda bakterilerin, kullanılan antibiyotiklere direnç kazanmalarından dolayı araştırmacılar farklı alternatif antibakteriyel maddelere yönelmişlerdir. Antibiyotiklerin, yanlış kullanımı yüzünden, geniş etki spektrumuna sahip antibiyotikler bile hastalıkların tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Bu durum insan sağlığı açısından pek çok olumsuz sonuç doğurmaktadır. Günümüz teknolojisindeki gelişmeler ve yapılacak yeni çalışmalar sayesinde bakteriyosinler gelecekte, geleneksel antibiyotiklerin yerine aday olarak gösterilen en güçlü maddeler olacaklardır. Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleri, antibakteriyel özelliklerinden dolayı sağlık sektörü başta olmak üzere pek çok farklı alanda kullanılmaya adaydır [1;2;3;5].

Bakteriyosinlerle yapılan araştırmalarda ortaya konan bulgulardan bir diğeri de kanser araştırmalarındaki önemleridir. Yapılan çalışmalarda bakteriyosinlerin, özellikle kanser tedavisinde önemli oldukları belirlenmiştir. Normal flora elemanı bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin, özellikle kolon kanserinin tedavisinde etkin rol almaları söz konusu olmaktadır [4]. Kanser tedavisinde, kanser oluşumuna yol açan tümör hücrelerinin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılması gerekmektedir. Hücrelerin diğer hücreleri etkilemeden yok edilmesi apoptoz mekanizmasıyla mümkün olmaktadır [4]. Bu bağlamda, yapılan çalışmalar, oldukça etkili

antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra bazı bakteriyosinlerin, kanserli hücrelerde apoptoz mekanizmasını indükleyerek oluşan tümörlü hücrelerin yok edilmesinde etkili olabildiklerini göstermektedir [4;5].

Tüm dünyada hedef hastalık etkenine yönelik tedavinin önemi ve kullanılan antibiyotiklerin etkinliklerinin azalması nedeniyle alternatif ilaçlara bir yönelim olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, antibakteriyel özellikleri açısından araştırılan bakteriyosinlerin, ileride yapılacak çalışmalar için önemli bir basamak olduğu düşünülmektedir. Bu maddelerin uygulama alanlarında daha etkin bir şekilde kullanılabilmesi için öncelikle, bakteriyosinlerin özelliklerinin tam olarak anlaşılması ve henüz keşfedilmeyen bakteriyosinlerin bulunup bu maddelerle ilgili bilinmeyenlerin en aza indirilmesi için araştırmacılar tarafından çalışmalar yapılması gerekmektedir [1;3]. Bu bağlamda çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinden verimli bakteriyosin üreticisi suşların seçilmesi, bakteriyosin üretimi için uygun optimum koşulların belirlenmesi amaçlandı. Üretilen bakteriyosinlerin karakterizasyonu da gerçekleştirildi. Bakteriyosinlerin yüksek sıcaklığa, depolama koşullarına, bazı organik çözücülere ve kimyasallara karşı duyarlılığı belirlendi. Çalışmamızda kullanılan *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve bakteriyosin üretimleri karşılaştırıldı. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibakteriyel madde üretiminin kromozom veya plazmid üzerinde kodlandığının araştırılması için antibakteriyel aktiviteye sahip örneklerden plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu çalışmaların sonucunda *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den antibiyotiklere alternatif olabilme potansiyeli olan bakteriyosinler elde edildi.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Bakteriyosinler ve Bakteriyosinlerin Tarihçesi

Bazı bakteriler, ürettikleri antibakteriyel maddelerle ortamın pH' sını, ozmotik basıncını veya yüzey gerilimini değiştirerek diğer bakterilerin üremelerine engel olmaktadır [1]. Antibakteriyel maddelerin araştırılmasında Pasteur ve Joubert (1877), farklı bakteriler arasındaki antagonistik ilişkileri ilk olarak gözlemleyen araştırmacılar olmuşlardır. Bu iki araştırmacı, idrarda bulunan bazı bakteriler tarafından üretilen maddelerin, *Bacillus anthracis'* in üremesini engelleyici etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur [6]. Bu çalışmaları izleyen dönemde, bakteriler arası ilişkiler üzerine araştırmalar yapılmaya devam edilmiştir ancak yapılmış olan çalışmalar daha çok klinik gözlemlere dayandığı için, antibakteriyel etkiye neden olan maddelerin izolasyonu ve karakterizasyonuna dair pek fazla bilgi bulunmamaktadır [1].

Son dönemde oldukça önem kazanan antibakteriyel maddelerden olan bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen protein ya da peptid yapıdaki maddelerdir. Bakteriyosin araştırmalarındaki en önemli gelişmeler, *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri tarafından üretilen kolisinlerin keşfiyle başlamıştır. Kolisinlerin genetik temeli, yapısal özellikleri ve öldürme mekanizmaları hakkında yapılan araştırmalar bakteriyosin çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. İlk olarak 1925 yılında Belçikalı bilim adamı André Gratia tarafından yapılan çalışmada *Escherichia coli'* nin bazı suşları tarafından salgılanan bir proteinin, aynı bakteri türü üzerinde bu proteini üretmeyen bireylerinin üremelerini inhibe ettiği bildirilmiştir [5]. Bu proteini üreten ve salgılayan suşların, besin ve üreme alanı gibi yaşamsal konularda rekabet etmede, bu maddeyi salgılamayan diğer bireylere göre önemli bir avantaj kazanarak bir adım öne geçtiği görülmüştür. Yeni bir madde olarak tanımlanan bu antibakteriyel maddenin protein yapıda olduğu bulunmuş ve bu madde kolisin olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmanın devamı olarak yapılan diğer çalışmalarda ise 20 kadar farklı kolisinin farklı *Escherichia coli* suşları tarafından üretildiği belirlenmiştir [1;2;5]. Jakob ve arkadaşlarına göre (1953), protein ya da proteinlerle birlikte yan gruplar içeren antibakteriyel maddeler olan bakteriyosinler, Tagg ve arkadaşlarının (1976) yaptıkları çalışmalar sonucunda duyarlı bakteriler üzerinde öldürücü etki yaratan, protein yapıda moleküller olarak tanımlanmıştır [7;8]. Klaenhammer (1988), tarafından da çalışılan bu maddeler, genellikle üretici mikroorganizma ile

yakın akrabalığı olan bakteriler üzerinde inhibitörük etkiye sahip protein veya protein kompleksleridir [9]. Bu bağlamda devam eden araştırmalar sonucunda bu maddelere benzer çok sayıda madde bulununca terimin kapsamı genişletilmiş ve bütün bu üreme engelleyici peptid ve proteinler, bakteriyosin olarak adlandırılmıştır [8;10;11]. Cotter ve arkadaşları (2005), bakteriyosinleri Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinler olarak başlıca iki farklı kategori altında toplamış ve daha sonra Gram pozitif bakteri bakteriyosinlerini kendi aralarında alt sınıflara ayırmışlardır. Ayrıca bu araştırmacılar, protein ve yan grupları içeren bileşikler bakteriyosin sınıflandırmasından çıkarmışlardır [12;13].

Bakteriyosinler, biyokimyasal özellikleri, molekül ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik özellikleri bakımından heterojen bir sınıf oluşturmaktadır ve sınıflandırılmaları ile ilgili araştırmalar da devam etmektedir. Gram pozitif bakterilerin bakteriyosinlerinin aksine, Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerle ilgili edinilen bilgiler sınırlıdır. Bu bileşiklerin sınıflandırılmasına ilişkin araştırmacılar tarafından ortak bir fikir birliği kurulamamıştır. Bu nedenle bu konudaki karışıklığın giderilmesi açısından bakteriyosinlerle ilgili çeşitli veri tabanları oluşturulmaya çalışılmaktadır, böylelikle araştırmacılar kendi çalışmalarını sonucunda elde ettikleri bilgileri bu veri tabanlarında birleştirmektedirler [14].

2.2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, özellikle yakın akraba olan türlere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip peptidler veya proteinlerdir. Bu bileşikler ve bunların taşınmasında görev alan genler kromozom veya plazmid üzerinde yer almaktadır [15;16].

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, özellikle gıda endüstrisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Gıda korunmasındaki kullanım potansiyellerinden dolayı laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosinler en iyi çalışılmış bakteriyosin grubudur. Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerden üzerinde en çok çalışılan Nisindir. Nisin, bazı ülkelerde gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda bu bileşiklerin, insan sağlığını tehdit etmeden ve çoğunlukla başka bir işleme gerek kalmadan kullanılabilmesi bu bileşiklere gıda sektöründe önemli avantajlar sağlamaktadır [16].

Gram negatif bakterilerin çoğu tarafından üretilen protein ya da peptid yapılı bakteriyosinler iki ana sınıf altında toplanmaktadır. İlk sınıf olan kolisinler, 30–80

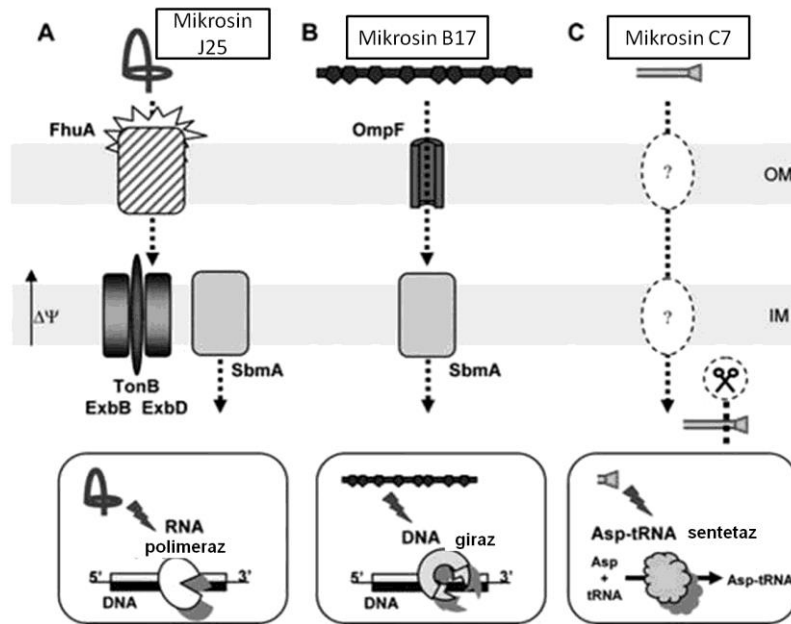
kDa arasında yüksek moleküler ağırlığa sahiptir ve protein yapıdadır. İkinci sınıf olan mikrosinler ise 1-10 kDa arasında düşük moleküler ağırlığa sahip peptidlerdir. Gram pozitif bakterilerden laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler ve Gram negatif bakteriler tarafından üretilen kolisinler ve mikrosinler, temelde pek çok ortak özellik paylaşmakla birlikte, bu maddeler, genetik sistemleri, etki mekanizmaları, hedef hücreye giriş mekanizmaları, öldürme mekanizmaları ve bağışıklık açısından farklılıklar göstermektedirler (Çizelge 2. 1) [5].

Çizelge 2. 1. Gram negatif bakteriler tarafından üretilen kolisinler ve mikrosinler ile Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen LAB bakteriyosinleri ve genel özellikleri [5]

Bakteriyosinler Özellikler	Kolisinler	Mikrosinler	LAB bakteriyosinleri
Yapı Moleküler Ağırlık	Proteinler: 30–80 kDa	Peptidler: 1–10 kDa Sınıf I: 1–3 kDa Sınıf II: 7–10 kDa	Peptidler: 1–30 kDa Sınıf I: <5 kDa Sınıf II: <5 kDa Sınıf III: >30 kDa
Genetik Sistem	Plazmid-kodlu 3 gen	Plazmid-kodlu, Kromozom-kodlu 3–10 gen	Transpozon-kodlu, Plazmid-kodlu, Kromozom-kodlu 4–13 gen
Etki Mekanizması	Truva atı mekanizması	Truva atı mekanizması	Dual mekanizması
Tanınma/ Alım	Dış membran reseptörleri (demir siderofor)/porin	Dış membran reseptörleri (demir siderofor): Sınıf I, sınıf IIb Mannoze permeaz (sınıf IIb)	Mannoze permeaz (sınıf IIa, sınıf IIb)
Hücreye Giriş Mekanizması	Tol/Pal veya Ton B sistem	Ton B sistem	-
Öldürme mekanizması	Membran geçirgenliği Nükleaz Peptidoglikan sentez inhibisyonu	Membran geçirgenliği Mannoze mekanizmasının bozulması (sınıf IIb: mikrosin E492) Enzim inhibisyonu	Membran geçirgenliği Mannoze mekanizmasının bozulması (sınıf IIb: mesenterisin Y105)
Bağışıklık	Bağışıklık proteini	Bağışıklık proteini Ekspor sistemi proteinleri	Bağışıklık proteini ABC taşıyıcı proteinleri

2.3. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinleri

Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleri daha önce belirtildiği gibi kolisinler ve mikrosinler olmak üzere iki sınıf altında toplanmaktadır. Genellikle *Enterobacteriaceae* tarafından üretilen bu bileşikler, protein büyüklükleri, genetik sistemleri, öldürme ve bağışıklık mekanizmaları açısından farklılıklar göstermektedir [5]. Örneğin; *Escherichia coli* tarafından üretilen CoIV gibi kolisinler translasyon sonrası değişikliklere uğramazlar. Mikrosin B17 ve mikrosin C7 gibi bakteriyosinler ise CoIV gibi kolisinlerden farklı olarak translasyon sonrası değişikliklere uğrarlar. Mikrosinler oldukça kararlı, hidrofobik peptidlerdir. Ancak mikrosinlerin kendi aralarında yapısal olarak farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, mikrosin B17 heterosiklik okzalit ve glisin kalıntıları içerir, mikrosin C7 ise heptapeptid yapıda bir bileşik olarak diğer mikrosinlerden farklıdır. Bu farklılıklar da hücreye giriş mekanizmaları gibi pek çok faktörü değiştirmektedir. Mikrosin J25, 58 aminoasitlik büyük bir öncü peptid halinde üretilir, translasyon sonrası değişikliğe uğrayarak 37 aminoasitlik bölge öncü peptid yapısından uzaklaştırılır ve aktif peptidin halka yapısı oluşturulur. Hangi mekanizmalar ile bu basamakların gerçekleştiği ve halka yapısının oluşmasını yöneten sinyaller henüz araştırma aşamasındadır. Üçü de mikrosin sınıfında olan mikrosin J25, mikrosin B17 ve mikrosin C7'nin hedef hücreye giriş yolları ve etki mekanizmaları da birbirinden farklıdır (Şekil 2.1) [18;19;20].



Şekil 2. 1. Mikrosin J25, Mikrosin B17 ve Mikrosin C7 arasındaki farklar [20]

2.3.1. Kolisinler, Kolisinlerin Sınıflandırılmaları ve Etki Mekanizmaları

Gram negatif bakterilerin kolisinlerinin üretimi, çoğunlukla stres koşulları altında çalışan karmaşık bir hücresel mekanizma olan SOS regülatör sistemiyle yakından ilgilidir. Kolisin üzerinde bulunan ve reseptör olarak görev yapan bir bölge, hedef hücrede ona özgü yüzey reseptörlerini belirleyerek hedefe bağlanır [21;22;23]. Hücre zarında por oluşturan kolisinlerin aminoasit sayıları ile nükleaz kolisinlerinin aminoasit sayıları birbirlerinden farklıdır [24;25;26]. Tipik bir kolisin operonu 3 çeşit gen bölgesi içerir; Kolisin aktivitesinden sorumlu kolisini kodlayan gen bölgesi, kendini korumak için kolisine karşı bağışıklık sağlayan proteini kodlayan yapısal gen bölgesi ve bakteriyosin salgılatıcı protein ya da liziz proteindir [27;28;29;30;31].

Kolisinlerle ilgili yapılan çalışmalarda, çok çeşitli kolisin tipleri tanımlanmıştır [32]. Kolisinlerin ayrıntılı sınıflandırılmasında hem öldürme mekanizması hem de kolisinin hücreye alım mekanizması önemlidir [33;34]. Kolisinler, hedef hücre üzerine üç farklı öldürme mekanizma ile etki etmektedir. Bu etki mekanizmaları aşağıdaki gibidir:

1. Mekanizma: Hedef bakteride hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek ve hücre zarında por oluşturarak etkili olur.
2. Mekanizma: Hedef bakteri sitoplazması içinde nükleaz aktivitesi oluşturarak DNA, rRNA ve tRNA' da hasara neden olur.
3. Mekanizma: Hedef bakteride peptidoglikan sentezini inhibe ederek etki göstermektedir [34;35].

Kolisinlerin aktiviteleri bir tanıma adımı gerektirir ki bu adım, bir dizi reseptör kullanılarak gerçekleşir. Normal olarak hücre için gerekli, vitamin B12 (kobalamin) gibi maddelerin, siderofor bağlı demir ya da nükleosidlerin hücreye alımı için kullanılan reseptörler, kolisinlerin hedef hücreye girişi için kullanılır. Bu bağlamda, kolisinlerin hedef hücreye girişi için kullanılan reseptörler, özellikle siderofor reseptörleri olan FhuA (hidroksamat sideroforlar), FepA, Cir ve Fiu (katekolat sideroforlar) [36] ile kobalamin reseptörü olan BtuB' dir [37]. Kolisinlerin hücreye alınımı için kullanılan bir diğer giriş yolu ise nükleosid reseptörü olan Tsx' dir [38]. Porinler ise dış membranda bulunan kanallarda spesifik metabolitlerin (şekerler, fosfatlar, aminoasit vb.) pasif difüzyonunu kontrol eden, bu metabolitlerin hücre

zarından geçişini sağlayan membran proteinleridir ve bazı kolisinler bu kanalları kullanmaktadır (Çizelge 2. 2) [39;40].

Kolisinlerin hücreye girişi için tanıma adımı bilinmemekte ancak giriş mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu yüzden kolisinlerin hücreye girişi için başka bir proteine ihtiyaç olabilir ya da kullanılan reseptör kolisinin girişini de sağlayabilir. Örneğin; Kolisin A, BtuB' yi tanıma aşaması için, OmpF' yi ise hedef hücreye giriş için kullanırken [41], Kolisin 1a, Cir reseptörünü hem tanıma hem de hücreye giriş için kullanır [42]. Tanıma basamaklarında kullanılan Ton ve Tol membran sistemleri hedef hücreye giriş mekanizmasında da kullanılmaktadır [43;44]. Bu amaçla, hedef hücre zarına bağlandıktan sonra, Ton ve Tol yolları gibi giriş mekanizmaları ile hedef hücreye taşınmaktadır. Bu iki araç, hücrenin iç zarına bağlıdır ve proton motif güç kullanılarak enerji sağlanmaktadır [45]. Ton sistemi 3 iç membran proteininden oluşur, bunlar; TonB, ExbB ve ExbD' dir. Tol sistemi ise TolA, TolQ, TolR ve bir periplazmik protein olan TolB ile dış membrana bağlı lipoprotein olan Pal gibi benzer topolojideki birçok proteini içermektedir.

Kolisinler Grup A ve Grup B kolisinler olarak iki ana sınıfa ayrılır. Grup A kolisinler, Tol proteinleri ya da bu proteinlerin bazı alt kombinasyonlarını (örneğin; Kolisin E1 için; TolA/ TolQ ve Kolisin N için TolA/TolQ/TolR) gerektirir. Grup B kolisinlerin tümü, TonB/ExbB/ExbD proteinlerine ihtiyaç duymaktadır. Grup A Kolisinler; Kolisin A, Kolisin E1- E9, Kolisin K, Kolisin N, Kolisin U [28] ve Kolisin S4 [46;47], bunlar Tol sistemiyle geçiş sağlarken, Grup B kolisinler, Kolisin B, D, Ia, M, 5 ve 10, Ton sistemini kullanır [28]. Ek olarak, Sınıflandırılmayan grupta yer alan kolisinlerin, Grup A veya Grup B' ye dahil edilmeleri araştırmacılar tarafından uygun görülmektedir. Kloasin DF13 [48;49], Klebisinler [50], Piyosin AP41 [51], Marcescin 28b [52;53;54] ve Alvesinler, A Grubu için uygun görülmektedir [55]. Pestisinler [56] ve Piyosinler (S1-S5) B Grubu için uygun görülmektedir [51].

Kolisinlerin pek çoğunun protein yapısı üç işlevsel domain halinde düzenlenmektedir. Her bir işlevsel bölge kolisinin etki mekanizmasıyla ilgilidir:

1. Merkez domain (R domain): Hedef hücre reseptörünü tanır ve böylelikle hedef hücre yüzeyinde belirli bölgelere bağlanır.
2. N-terminal domain (T domain): Hedef hücreye girişten sorumludur.
3. C-terminal domain: Bakteriyosinin, hedef hücreye sitotoksik etki gösteren aktif bölgesidir [26;34].

Çizelge 2. 2. Grup A kolisinler, Grup B kolisinler ve Sınıflandırılmayan Grup [5]

Bakteriyosin Üretici Tür	Reseptör	Hedef Hücreye Giriş Mekanizması	Öldürme Mekanizması
Grup A			
Kolisin A <i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i>	BtuB	OmpF TolA, B, Q, R	Por açıcı
Kolisin K <i>E. coli</i>	Tsx	OmpF, OmpA TolA, B, Q, R	Por açıcı
Kolisin N <i>E. coli</i>	OmpF	OmpF TolA, Q, R	Por açıcı
Kolisin U <i>E. coli</i>	OmpA	OmpF, LPS TolA, B, Q, R	Por açıcı
Kolisin S4 <i>E. coli</i>	OmpW	OmpF, TolA, B, Q, R	Por açıcı
Kolisin E1 <i>E. coli</i>	BtuB	TolC TolA, Q, R	Por açıcı
Kolisin E2 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	Por açıcı
Kolisin E3 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	DNaz
Kolisin E4 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	rRNaz
Kolisin E5 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	tRNaz
Kolisin E6 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	rRNaz
Kolisin E7 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	DNaz
Kolisin E8 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	DNaz
Kolisin E9 <i>E. coli</i>	BtuB	OmpF, TolA, B, Q, R	DNaz
Kloasin DF13 <i>Enterobacter cloacae</i>	lutA	TolA, Q, R	rRNaz
Piyosin AP41 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	TolA, B, Q, R	DNaz
Alveisin A <i>Hafnia alvei</i>	-	TolA, B, Q, R	Por açıcı
Alveisin B <i>Hafnia alvei</i>	-	TolA, B, Q, R	Por açıcı
Marcesin 28b <i>Serratia marcescens</i>	Omp4/ OmpA	OmpF TolA, B, Q, R	Por açıcı
Grup B			
Kolisin B <i>E. coli</i>	FepA	FepA TonB, ExbB, D	Por açıcı
Kolisin Ia <i>E. coli</i>	Cir	Cir, TonB, ExbB, D	Por açıcı
Kolisin Ib <i>E. coli</i>	Cir	Cir, TonB, ExbB, D	Por açıcı
Kolisin 5 <i>E. coli</i>	Tsx	TolC TonB, ExbB, D	Por açıcı
Kolisin 10 <i>E. coli</i>	Tsx	TolC TonB, ExbB, D	Por açıcı
Kolisin D <i>E. coli</i>	FepA	FepA TonB, ExbB, D	tRNaz (Arg tRNA)

Çizelge 2. 2. Grup A kolisinler, Grup B kolisinler ve Sınıflandırılmayan Grup (devam) [5]

Bakteriyosin Üretici Tür	Reseptör	Hedef Hücreye Giriş Mekanizması	Öldürme Mekanizması
Kolisin M <i>E. coli</i>	FhuA	FhuA TonB, ExbB, D	Peptidoglikan degradasyonu
Pestisin <i>E. coli</i>	FyuA	FyuA TonB, ExbB, D	Muramidaz
Piyosin S1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ferripiyoverdin reseptörü	TonB, ExbB, D	DNaz
Piyosin S2 <i>P. aeruginosa</i>	Ferripiyoverdin reseptörü	TonB, ExbB, D	DNaz
Piyosin S3 <i>P. aeruginosa</i>	Ferripiyoverdin reseptörü	TonB, ExbB, D	DNaz
Sınıflandırılmayan Grup			
Klebisin C <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i>	-	TonB	rRNaz
Klebisin D <i>K. pneumoniae</i>	-	-	tRNaz
Piyosin S4 <i>P. aeruginosa</i>	-	-	tRNaz
Piyosin S5 <i>P. aeruginosa</i>	-	-	Por açıcı
Karosin S1 <i>Herwinia carotovora</i>	-	-	DNaz

2.3.2. Mikrosinler, Mikrosinlerin Sınıflandırılmaları ve Etki Mekanizmaları

Gram negatif bakterilerin mikrosinleri, düşük moleküler ağırlığa sahip bakteriyosinlerdir. Mikrosinlerin moleküler ağırlıkları 1-10 kDa arasındadır ve genellikle proteazlara, ekstrem pH ve sıcaklıklara dirençlidir. Bu peptidler çoğunlukla plazmidler tarafından taşınır ve kodlanır, bununla birlikte kromozomlar tarafından kodlananları da vardır. Mikrosin üretimini sağlayan gen kümeleri belirli bir organizasyona sahiptir. Bu bağlamda mikrosin salgılama proteini, kendi bağımsızlık faktörleri ve bazı durumlarda, translasyon sonrası değişiklik enzimleri bu organizasyon içinde görev almaktadırlar [57;58].

Mikrosinlerin sınıflandırılmaları diğer bakteriyosinlerle kıyaslandığında oldukça zordur. Bu bileşiklerin değişkenlik gösteren yapısal özellikleri ve etki mekanizmalarındaki farklılıklar ile bu zamana kadar yapılan çalışmalarda yetersizlikler, bu peptidlerin sınıflandırılmasındaki güçlüğü başlıca sebepleridir. Ayrıca mikrosinlerin, çok çeşitli biyosentez yollarına sahip olmaları, translasyon sonrası değişikliklere uğrayıp uğramamaları ve hedef hücreye alımlarındaki farklı mekanizmalar da mikrosin sınıflandırılması yapılırken araştırmacıların zorlanmasına

neden olmaktadır. 2000' li yıllarda, Pons ve arkadaşları, ilk mikrosin sınıflandırmasını önermişlerdir. Bu sınıflandırmada, mikrosinler; translasyon sonrası değişikliğe uğrayıp uğramamalarına göre iki alt sınıfa bölünmüştür [59; 60]. 2004 yılında, Mikrosin E492, değişikliğe uğramayan bir mikrosin olarak tanımlanmıştır [61]. Ancak daha sonra değişikliğe uğrayan başka bir Mikrosin E492 tanımlanmıştır [62]. Bu sebeplerden dolayı yeni bir sınıflandırma sistemine ihtiyaç duyulmuştur [63]. Bu sınıflandırma sisteminde önemli olan 3 kriter aşağıdaki gibidir:

1. Üretimi, yapısı ve translasyon sonrası değişikliklerin durumu
2. Gen organizasyonu
3. Lider peptidin dizi analizi

Bu kriterlere göre mikrosinler iki alt sınıfa ayrılmışlardır. Moleküler ağırlıkları 5 kDa' nın altında, hücreye geçiş sonrası değişikliğe uğrayanlar birinci grup mikrosinler; B17, C7-C51 ve J25 Sınıf 1 mikrosinleri oluşturmaktadır [63;64]. Sınıf 2 mikrosinlerin moleküler ağırlıkları ise 5–10 kDa arasındadır ve bu sınıf mikrosinler kendi içinde IIa ve IIb olarak iki alt-alt sınıfa ayrılır. Sınıf IIa mikrosinler, translasyon sonrası değişikliklere uğramaksızın bir plazmid tarafından kodlanmaktadır buna ilaveten yapısında disülfid bağları oluşmaktadır bu bağlar da peptidin üç boyutlu yapısında belirleyici olmaktadır. Mikrosin L, Mikrosin V ve Mikrosin 24 sınıf IIa mikrosinlerdendir. Sınıf IIb mikrosinler, kromozom tarafından kodlanan linear peptidlerdir ve translasyon sonrası değişikliğe uğrayan, Mikrosin E492, M, H47, I47 ve G47 bu grupta yer almaktadır [65;66]. Daha pek çok mikrosin gerek yapısal gerek biyokimyasal özellikleri açısından tam olarak aydınlatılmadığı için geçici olarak bazı sınıflara alınmaktadır. Mikrosin 24, daha önce açıklanan sınıfların kriterlerine uymamaktadır; bu mikrosin saf olarak izole edilememiştir ve biyokimyasal özellikleri de bilinmemektedir ancak öncü yapısı göz önüne alınarak disülfid bağına sahip olmadığı ve translasyon sonrası değişikliğe uğramadığı belirlenmiştir. Ancak gen yapısına bakılarak sınıf IIb mikrosinlerle daha çok benzerlik taşıdığı gösterilmiştir bu nedenle de bu sınıfa dahil edilmiştir (Çizelge 2. 3) [58].

Kolisinlerde olduğu gibi, mikrosinlerin etki mekanizmasının ilk aşaması reseptörü tanıma adımıdır. Ökaryotik peptidlerde minimal inhibisyon konsantrasyonu mikromolar ölçekte değerlendirilirken, mikrosinler nanomolar ölçüde etkiye sahiptir,

bundan dolayı da çift tabakalı fosfolipid membranla doğrudan etkileşime girebilirler. Mikrosinler, hedef hücreye girişi kolaylaştırmak için öncelikli olarak madde alımı için gereken reseptörleri örneğin, sideroforları (FhuA, FepA, Cir ve Fiu) ya da OmpF porinini kullanırlar [58]. Ayrıca bu reseptörler bakteriyofajlar, antibiyotikler ve bakteriyal toksinler tarafından da kullanılmaktadır. Genellikle, mikrosinlerin hedef hücreye girişleri, TonB–ExbB–ExbD kompleksi tarafından sağlanır (Çizelge 2. 3) [58]. Bu kompleks, proton motif gücü kullanarak sitoplazmik membrandan dış membranda bulunan reseptörlere gereken enerjiyi sağlar. Bununla birlikte OmpF, Mikrosin B17'nin reseptörü olarak görev yapar ve SbmA'da bu mikrosinin yardımcı proteinidir. Başka bir mikrosin olan Mikrosin C7-C51 ise OmpF ile birlikte ABC-taşıma mekanizmasını kullanarak aktif taşınmayla iç membrana geçmektedir (Çizelge 2. 3) [67].

Mikrosinlerin öldürme mekanizmaları oldukça heterojen bir dağılım göstermektedir. Sınıf 1 mikrosinler, önemli bakteriyal enzimleri hedef almaktadırlar. Örneğin; Mikrosin B17 ve Mikrosin J25, hedef hücrenin DNA giraz ve RNA polimerazını engellemektedir (Çizelge 2. 3) [68;69;70].

Çizelge 2. 3. Sınıf 1 ve Sınıf 2 mikrosinlerin temel özellikleri [5]

Mikrosin adı	Translasyon Sonrası Değişiklikler	Reseptör	Hedef Hücreye Giriş Mekanizması	Öldürme Mekanizması
Sınıf 1				
B17	Tiazol ve oksazol halkası	OmpF	OmpF SbmA	DNA giraz inhibisyonu
C7- C51	Nükleotid modifikasyonu	OmpF	OmpF Yej A,B, E, F	Asp-tRNA sentetaz inhibisyonu
J25	Lasso yapı	FhuA	FhuA TonB, ExbB, D, SbmA	RNA polimeraz inhibisyonu Mitokondriyal protein ve lipit hasarı
Sınıf II				
Sınıf IIa				
L	2 disülfid bağı	Cir	Cir TonB, ExbB, D SdaC	Membran geçirgenliği modifikasyonu
24	Disülfid bağı bulunmuyor	-	-	Mannoz permeaz
Sınıf IIb				
E492	Siderofor	FepA, Cir, Fiu	FepA, Cir, Fiu TonB, ExbB, D	Mannoz permeaz
M	Siderofor	FepA, Cir, Fiu	FepA, Cir, Fiu TonB, ExbB, D	-
H47	Siderofor	FepA, Cir, Fiu	FepA, Cir, Fiu TonB, ExbB, D	ATP sentetaz
I47	Siderofor	FepA, Cir, Fiu	FepA, Cir, Fiu TonB, ExbB, D	-

2.3.3. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinlerinin Safılaştırılması

Bakteriyosinlerin safılaştırılmasında kullanılan teknikler, bu proteinlerin sahip oldukları özelliklere bağlı olarak geliştirilmiştir. Bu amaçla proteinlerin safılaştırılmasında sıklıkla kullanılan yöntemler bakteriyosinler için de kullanılmaktadır. Bakteriyosin safılaştırmasının ilk aşamasında uygulanan yöntemler tuzla, asitle veya diğer organik çözücülerle çöktürme, boyutlarına göre ayırma, diyaliz ve ultrafiltrasyon gibi yöntemlerdir. Bu yöntemler uygulanırken temel amaç, çalışma hacmini azaltmak, istenmeyen bazı protein ve lipid gibi bileşikleri uzaklaştırmaktır. Safılaştırma işleminin ikinci aşamasında ise iyi derecede bir arındırma sağlamak amacıyla kromatografi gibi yöntemler kullanılmaktadır [71;72]. Gram negatif bakterilerin bakteriyosinlerinin safılaştırılma işlemi sırasında karşılaşılan sorunlar bu tür moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküler maddelerle birleşmeye eğilimli olması gibi nedenlere bağlanmaktadır. Bu bağlamda bu tür bakteriyosinlerin safılaştırılmasının zor bir iş olduğu bilinmektedir [73].

Bakteriyosinler son derece heterojen gruplar oluşturduklarından dolayı her bakteriyosin için özel safılaştırma protokolleri deneysel olarak tasarlanmalıdır. Bu nedenle günümüzde sınırlı sayıda bakteriyosin tam olarak safılaştırılabilmifitir. Hücre bağımsız kültürlerden bakteriyosin elde etmek için amonyum sülfat çöktürmesi metodu öncelikli olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu yöntemde safılaştırma verimli olmamaktadır [74]. Besiyerinde yer alan birçok protein de bakteriyosinlerle birlikte çökecektir. Çöktürülen proteinlerin daha saf hallerinin eldesi, aminoasit kompozisyonu ve sekansının belirlenmesi için araştırmacılar üst düzey yöntemlerden olan çeşitli kolon kromatografi tekniklerine başvurmaktadır. Örneğin; Mikrosin B17' nin safılaştırma işlemi, sıcak asit ekstraksiyonu ile başlamaktadır. Bu yöntem uygulanırken, 100 °C sıcaklık gerektirir ve ortam pH' sı 2.9' dur. İzleyen basamaklarda ise kromatografik yöntemler kullanılarak safılaştırma işlemi sonlandırılır [75]. Mikrosin C7' nin yapısı düşük pH' dan etkilenmektedir. Bu nedenle bu mikrosinin safılaştırılmasında asitle ayırma yapılamaz sadece kromatografik yöntemler kullanılabilir [76]. Bazı bakteriyosinlerin safılaştırılmasında ise daha kompleks yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin; Mikrosin V' nin safılaştırılması, Kolter ve arkadaşları tarafından önerilen dört basamaklı bir prosedürden oluşmaktadır. Bu prosedür, trikloroasetik asit ya da

amonyum sülfat çöktürmesi, Amberlit XAD16 absorpsiyonu, katyon değiştirici kromatografi ve ters faz kromatografisini içerir. Bakteriyosinlerin saflaştırılmasında, çok basamaklı işlemler kullanılmaktadır [77].

2.3.4. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinlerinin Üretilme Amaçları

Bakteriler tarafından bakteriyosinlerin üretilme nedenleri hakkındaki yaygın görüş, bakteriyosin üretiminin bakterilerin çeşitli sınırlı kaynaklara ulaşmak için yürüttükleri bir strateji olduğu yönündedir [78;79]. Bununla birlikte, birbirleriyle yarış halinde olan türler arası ilişkilerin incelenmesi amacıyla son yapılan araştırmaların sayısı artmıştır. Bu araştırmalar sonucu edinilen bilgilere göre, bakteriyosin üretici bakteri türleri ve bu bileşiklere hassas türlerin az ve çok besin maddesi olan test ortamlarında üretilmeleri sağlanmıştır. Bakteriyosin üretici türler tarafından bu bileşiklerin üretimlerinin bol besin maddesi bulunan ortamda yoğun bir Şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir [80;81]. Frank ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise bakteriyosin üretiminin ancak zengin kaynaklar bulunan ortamlarda ortaya çıkabileceği savunulmaktadır [82]. Yaygın görüőün aksine olan bu araştırmaların sonucunda ortaya çıkan bilgiler oldukça ilginçtir. Bu araştırmalara göre, bakteriyosin üretiminin sınırlı kaynağa ulaşmaktan daha önemli bir amaç için olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmalara göre bu önemli amaç, buldukları komitede yayılmak ve sonunda baskın tür olabilmektir [83]. Bu konu bilim dünyasındaki tartışmalı konulardan biridir. Chao ve Levin ise yaptıkları bir araştırmada, kolisin üretici suşların, hareket yeteneği sınırlı çevresel koşullarda daha yaygın olarak bakteriyosin ürettiklerini gözlemişlerdir [84]. Yapılan diğer bir çalışmada ise duyarlı bakterilerin baskın olduğu bir toplulukta, sınırlı bir ortam olmadığı takdirde bakteriyosin üretici bakteriler bu ortamda yayılamamaktadırlar. Sınırlı kaynaklar sadece besin gibi kimyasal maddeler olmayabilir, üretici bakterileri kısıtlayan agar yüzeyi gibi fiziksel olarak sınırlandırılmış ortamlarda da bakteriyosin üretimi artabilir ve bu bileşiğe duyarlı olan komőu bakteriler öldürölür. Dolayısıyla bakteriyosin üretici bakteriler başlangıçta sayıca az olsalar bile, bir süre sonra ortamda baskın tür haline gelirler [85]. Bakteriyosin üretimi, bakteriyosine duyarlı bakterilerin ortadan kaldırılmasıyla besin gibi önemli kaynaklara ulaşmayı sağlamak gibi avantajları vardır ancak bakteriyosin üreticiler, bu antibakteriyel maddeyi üretirken enerji harcamak ve ortaya çıkan ürünün öldürölölüğüne karşı savunma yapmak gibi ilave bedeller ödemek zorundadır [86].

2.3.5. Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosinlerinin Uygulama Alanları

Bakteriyosinlerin başlıca kullanım alanları gıda endüstrisinde gıdaların bozulması ve gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi ve bitki hastalıklarının kontrolüdür. Bu bileşikler üzerinde son yıllarda oldukça fazla sayıda çalışma yapılmaya başlanmasının nedeni ise; bakteriyosinlerin klinik kullanım potansiyellerinin de fark edilmiş olmasıdır [4;11;88;89]. Günümüzde kullanılan antibiyotiklerde dirençle ilgili olarak yaşanan sorunlar araştırmacıları yeni antibakteriyel etkili kaynakların arayışına yöneltmiştir. Bu kaynaklar arasında yer alan ve bakterilerin çevredeki bakterilerle oluşan infeksiyonlara karşı en etkili silahlarından biri olan antibakteriyel etkili bakteriyosinler antibiyotiklere alternatif olarak görülmektedir [90;91;92].

Bakteriyosinlerle ilgili yapılan araştırmalarca ortaya konan en önemli bulgu kanser araştırmalarındaki önemleridir. Normal flora elemanı bakterilerin ürettiği bakteriyosinler özellikle kolon kanserinin önlenmesinde etkin rol almaktadır. *E. coli* türünün birçok suşu tarafından üretilen kolisinlerin, bağırsak kanserini engellemedeki rollerini belirlemek üzere, normal flora elemanı oldukları bağırsakta çalışılmıştır. Bu amaçla, Bores ve arkadaşları (1986) tarafından yapılan çalışmada kolon kanserli 77 hastada ve 160 sağlıklı kişide, kolisinojenik *E. coli* araştırılmış, kontrol grubu olan sağlıklı kişilerde, kolisin üreten *E. coli* %63.8 iken, kanserli hastalarda bu oran %41.6 olarak bulunmuştur. Araştırma sonuçları, kolisinlerin yokluğunun kolon kanserinin gelişiminde bir rolü olabileceğini göstermiştir. Diğer bazı Gram negatif bakterilerin de çeşitli kanser türlerinin tedavisinde etkili olabileceği bulunmuştur. *Pseudomonas* türleri tarafından üretilen bir ekzotoksinin, rahim ve meme kanserlerinin tedavisinde in vivo ve in vitro koşullarda başarılı olduğu gözlenmiştir [93]. Kanser oluşumuna yol açan tümör hücrelerinin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılması hücre gelişmesinde ve homeostazinin sağlanmasında merkezi bir rol oynayan apoptoz mekanizmasıyla mümkündür [87]. Bu bağlamda, yapılan çalışmalar, antibiyotik etkilerinin yanı sıra bazı bakteriyosinlerin, kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmasını indükleyerek tümör oluşumunun önlenmesi üzerinde etkili olabildiklerini göstermektedir [4;88;89]. Yapılan çalışmalar sonucu, tümör oluşumunun önlenmesinde etkili sonuçlar alınan bir bakteriyosin olan Mikrosin E492, *Klebsiella pneumoniae* türüne ait bir suş tarafından üretilmektedir ve söz konusu bakteriyosin, düşük (7,887 Da) moleküler ağırlığa sahip olup, duyarlı hücre membranında por açıcı özellikte bir mikrosindir.

Geniş antibakteriyel etki gösteren bu bakteriyosin *Enterobacteriaceae* familyası üzerinde etkili olup, özellikle *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter* ve *Enterobacter* türlerini hedef alır. Mikrosin E492'nin esas dikkat çekici özelliği ise bazı memeli hücre hatlarını apoptoza yönlendirme yeteneğine sahip olmasıdır [93;94]. Mikrosin E492, ilk olarak HeLa hücre hattında karakterize edilmiş olup, apoptoza indüklenen hücrelerde çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere neden olur. Bu değişikliklerden bazıları; hücre çekirdeğinin yoğunlaşması, hücre hacminde küçülme, DNA fragmentasyonu gibi apoptoz mekanizmasının yol açtığı değişikliklerdir [95;96].

Hetz ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmalar sonucu, aktif olarak Mikrosin E492 üreten *Klebsiella pneumoniae*' nin bu mikrosini üreten gen bölgesi klonlanmış olup, *E. coli* 'de ifade edilmiştir. Mikrosin E492' nin aminoasit dizisi bilinen hiçbir proteinle yapısal bir motif paylaşmamaktadır ve bundan dolayı da özgül bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur. Mikrosin E492, *E.coli* VCS257pJEM15 süpernatantından ekstrakte edilmiş ve saflaştırılmıştır, daha sonra ise; bu mikrosinin aktivitesi belirlenmiştir. Mikrosin E492' nin etkisi, Jurkat (lösemi), HeLa (serviks karsinoma), RJ2.25, Ramos (Burkitt's Lenfoma) gibi kanserli memeli hücre hatları ve KG-1 (monosit-makrofaj hücre hattı), AMG-3 (insan bademcik epitelyal hücreleri) gibi normal memeli hücre hatlarında denenmiştir ve etkisi en fazla Jurkat hücre hattında gözlenmiştir. Mikrosin E492' nin etkisi HeLa ve Ramos hücre hatlarında da gözlenmiştir bununla birlikte, KG-1 ve AMG-3 hücre hatlarında herhangi ise bir sitotoksik etkiye rastlanılmamıştır [97].

Brader ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda doğal olarak Mikrosin H47 ve Mikrosin M üreten bir *E. coli* suşunun bakteriyel vektör olarak ilaç taşınmasında kullanılabileceği gözlenmiştir [97]. Bu çalışmalara benzer olarak Mikrosin E492' nin, kolorektal karsinomlu deney hayvanları üzerinde ön çalışması tamamlanmış ve alınan sonuçlar kanser tedavisinin geleceğinde mikrosinle tedaviye yeşil ışık yakmıştır [98;99]. Mikrosin E492' nin kanlı agarda herhangi bir hemolitik aktivitesi olduğu saptanmamış olup, deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda bu mikrosinin herhangi bir toksik etkisi olduğu gözlenmemiştir. Mikrosin E492, günümüzde kullanılan antibakteriyel ilaçlara, tıbbi uygulamalarda alternatif olabilecek antibakteriyel peptidlerden biridir. Aynı zamanda Mikrosin E492' nin sitotoksik özelliklerinden dolayı da, bu bakteriyosin, kanser tedavisinde kullanıma

oldukça uygun bir adaydır. Mikrosin E492' nin üretiminin devamlılığının sağlanması ve güvenilirliğinin artırılmasında ise probiyotik bakteri türlerinin kullanılması uygun olabilir [94;100;101].

2.4. Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

2.4.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteri türleri çevrede, bitki, böcek, hayvan ve insanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu ailenin üyeleri, Gram negatif, peritriş flagella ile hareketli veya hareketsiz olan fakültatif anaerop, sporsuz, kısa veya uzun basillerdir. Bu aile içinde yer alan başlıca bakteriler *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Pantoea* cinsleridir [102;103]. Bu familya içerisinde tifo, basilli dizanteri etkeni olan türler, idrar yolu infeksiyonlarına ve yara infeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojenler yer almaktadır. Bu bağlamda bu bakteriler, insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bazı cinsler; *Escherichia* ve *Klebsiella* gibi gastrointestinal sistemin normal flora bakterileridir. İnsanların kendi florasında bulunan mikroorganizmalardan dolayı endojen olarak bulaşma söz konusu olmaktadır [104].

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin hücre yüzeyleri, sitoplazma zarı, peptidoglikan tabaka ve dış zar olmak üzere üç temel yapıdan oluşur. Dış zar; protein, fosfolipid, lipopolisakkarit (LPS) tabakalarından meydana gelmiştir. Ayrıca dış zarda mukoza yüzeylerine tutunmayı sağlayan pili ve hareketi sağlayan flagellaları bulunur. Bu ailede yer alan bakterilerin üç ortak özelliği vardır. Bu özellikler; sitokrom oksidazın negatif olması, nitratların nitritlere indirgenmesi ve glukoz fermentasyonunun pozitif olmasıdır [102]. Bu ailedeki bakterilerin, optimum üreme sıcaklığı 37 °C' dir ve genel üretim besiyerlerinde 18-24 saatte ürerler [105]. Endotoksin, kapsül, pilus, flagellum gibi faktörler enterik bakterilerin virulansında rol oynayan faktörler arasında yer alır. Bu familyanın antibiyotik direnç oranları ise türlere göre değişir. Bu bakteri ailesi bugün 50'den fazla cins ve yüzlerce tür içermektedir [105;106]. Tıbbi açıdan önemli olmalarından dolayı çok sayıda enterik bakteri örneği ile çalışılmış ve bunların özellikleri belirlenmiştir. Enterik bakterilerin pek çoğu yüksek oranda genomik DNA homolojisi göstermeleri ve yaygın olarak genetik rekombinasyon yapmaları nedeniyle belirgin genetik akrabalık taşırlar [107].

Enterik bakteriler içinde insan, hayvan ve bitkiler için patojen olan pek çok tür olduğu gibi, doğada her yerde bulunmalarından dolayı endüstriyel açıdan önemi olan suşlar da bulunur. *E. coli* suşları ve *Klebsiella* türlerinin salgıladıkları metabolitler sayesinde doğaya zararlı birçok bileşiğin yıkımını gerçekleştirmektedir ya da bu metabolitler başka zararlı bakterilerin ölümüne sebep olarak antibiyotik alternatifi olabilmektedir [107].

2.4.1.1. *Escherichia coli*

İlk kez 1885' de *Theodor Escherich* tarafından izole edilen bu bakteri, 1919' da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins isminin önerilmesiyle, bu tarihten itibaren *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır [108]. *Escherichia coli*, sıcakkanlı hayvanların ve insanların normal bağırsak florasını oluşturan bakteriler arasında yer alır. Bu mikroorganizma, su ve besinlerdeki fekal kirlenmenin bir göstergesidir. 1940' lı yıllarda Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşu bulunmuştur ve 1940 ve 1950' li yıllarda Amerika' da ciddi sağlık sorunlarına yol açmıştır [109]. *E. coli* Q157:H7' nin klinik önemi ise ilk olarak 1980' li yıllarda Amerika 'da açıklanmış ve bu önemli suş, birçok morbidite ve mortalite vakasından sorumlu tutulmuştur [110;111]. *E. coli* suşları, O somatik antijen ve H kirpik antijenlerine göre tiplendirilmekle birlikte bakteriyofajlarına göre de faj tiplerine ayrılmaktadırlar. Ayrıca bu suşlar, ürettikleri kolisin tiplerine göre de sınıflandırılabilir [112]. Bu bakteri türü, 18- 44.5 °C ve pH 5-8 arasında üremektedir. Bu bakterinin optimal üremesi 37°C, pH 7' de olur ve özellikle 44°C' de üremesi *Enterobacter* ve *Serratia*' dan ayrılmasını sağlar. Katı besiyerinde 24 saatte düzgün kenarlı, 2-3 mm çapında, pigmentsiz S tipi koloniler oluşturur [113]. *E. coli* dirençli bir bakteri olarak kabul edilir. Bu bağlamda bu tür, 60 °C sıcaklıkta 30 dakika canlı kalabilir ancak dezenfektanlara karşı dirençsizdir. İndol ve Metil Red testi pozitifdir. H₂S, Voges-Proskauer, sitrat testleri ile Fenilalanin deaminaz, lizin dekarboksilaz, üreaz ve DNaz aktiviteleri negatifdir. *E. coli*' nin, malaşit yeşili, brillant yeşili, sodyum tetrasyonat gibi bileşiklere karşı daha fazla duyarlı olmasından yararlanılarak *Shigella* ve *Salmonella* gibi bakterilere seçici besiortamları geliştirilmiştir [112].

2.4.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae' nin neden olduğu ağır pnömoni tablosunu, 1882 yılında ayrıntılı bir biçimde tanımlayan araştırmacı Carl Friedlander' dan dolayı, bu bakteri

yıllarca 'Friedlander basili' olarak adlandırılmıştır [115]. *Klebsiella* cinsinde, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozanae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica* türleri bulunmaktadır [116;117;118]. Bu bakteriler, insan ve hayvan gastrointestinal sistem, üst solunum yolları ile toprak ve sucul ekosistemlerde bulunur [119;120]. *K. pneumoniae*, tüm Enterik bakteriler gibi genel üretim besiyerlerinde ürer ve optimal üreme pH 7' de ve 37°C' dir. Bu bakterilerin etrafında polisakkarit yapıda geniş bir kapsül bulunur. Katı besiyerinde üretildiklerinde kolonileri, mukoid, sarımtırak gri renkte ve akıcı kolonilerdir ancak uygun olmayan koşullarda koloni şekilleri değişim gösterebilir [121]. Bu bakteriler, nişastayı en geç 4 gün içerisinde parçalamaları diğer Enterik bakterilerden ayırt edilmelerini sağlar. İndol ve Metil Red testleri negatif, Voges-Proskauer testinin sonucu pozitifdir. *K. rhinoscleromatis* hariç diğer *Klebsiella* türlerinin sitrat testleri pozitifdir. Üreaz enzimleri vardır, jelatini ise kullanamazlar. KCN' li besiyerlerinde ürerler ve lizin dekarboksilaz enzimleri vardır, oksidaz ise negatiftir [121]. *Klebsiella* cinsi bakterilerin *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* cinsi bakterilerden ayrılmasında hareket kabiliyetleri ve DNAz aktiviteleri önemlidir [121]. *Klebsiella pneumoniae*, insan sağlığı açısından oldukça önemli olan üst solunum yolu, üriner sistem ve yara infeksiyonları oluşmasında rol alan fırsatçı patojenlerdir [122;123]. Bu bakteri türü, insanlarda, genellikle pnömoni, idrar yolu infeksiyonları, otitis media, sinuzit, menenjit, prostatit, kolesistit, peritonit ve karaciğer absesi gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Piyelit, piyelonefrit ve sistit şeklinde ortaya çıkan infeksiyonların, antibiyotiklerle yapılan tedavilerde oldukça dirençli oldukları görülmüştür [124].

2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer alan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin çoğu toprak ve su ekosistemlerinde bulunmaktadır. Bu cinse ait türlerden bazıları, bitki ve hayvan patojeni olabilmektedir. *Pseudomonas* cinsi bakterilerden en sık izole edilen insan patojeni *P. aeruginosa* türüdür. Bu bağlamda bu bakteri türü, birçok hastane infeksiyonu etkeni arasında ön sıralarda yer alır. *Pseudomonas aeruginosa*, ilk olarak 1850' de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmıştır. 1862' de Lucke tarafından, bu bakteriden üretilen mavi renk oluşumundan sorumlu piyosiyanın izolasyonu yapılmıştır. 1882' de Gessard' ın çalışmaları sonucunda mavi irin etkeni

olarak saf kültürü izole edilmiş ve tanımlanmıştır [124;125;126]. Zorunlu aerob bir bakteri olmasına rağmen denitrifikasyon özelliğinde olduğundan anaerob olarak da üreyebilir. Bu bakteri türü, katı besiyerinde üretildiğinde 3 tip koloni oluşturmaktadır. 1. tip koloni, genellikle klinik örneklerden izole edilen, 2-3 mm çapında yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, beyaz renkli ve floresan özelliği olan, besiyerinin her tarafına yayılmış olan mavi-yeşil pigmentleri olan kolonilerdir. 2. tip koloni, çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilen daha küçük, kabarık, konveks ve düzensiz kolonilerdir. 3. tip koloni ise, *P. aeruginosa*'nın bazı suşlarının hücre dışı aljinat salgılaması nedeniyle mukoid görünüme sahip R tipi kolonilerdir. *P. aeruginosa* kültürlerinde, 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak tatlı üzüm kokusu veya trimetilamin kokusu şeklinde hissedilir. *P. aeruginosa*'nın oksidaz, katalaz ve sitrat testleri pozitifdir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden oksidaz testinin pozitif olmasıyla ayrılır. İndol ve H₂S testleri ile Metil Red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri negatiftir. Glukozu oksidatif yolla parçalayıp asit oluştururlar. Nitratı nitrite veya azot gazına redükte ederler. L-arjinin dihidrolaz enzimi vardır ancak lizin-dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturamazlar. Potasyum siyanüre dirençlidirler. Genellikle kanlı agarda ürettiklerinde hemoliz yapar ve kanlı agarda üreyen klinik örnekler sıklıkla beta hemolitiklerdir [126].

Pseudomonas cinsine ait türlerin çoğunda pigment üretimi görülmektedir. Pigment üretimi bakterilerin kültür koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Bakteriyel mutasyonla pigment oluşturma özelliği kaybedilebilir ya da aynı anda birden fazla pigment oluşumu gözlenebilir. Bakteriler bu pigmentleri üretebilmek için oksijene ihtiyaç duymaktadır. *P. aeruginosa*'nın bazı suşları piyosiyanın dışında, piyoverdin (sarı-yeşil), piyomelanin (kahverengi-siyah), piyorubin (kırmızı), pigmentleri üretebilmektedir [125;127].

3. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Bakteriler

Çalışmada bakteriyosin üretiminin incelenmesi amacıyla bakteriyosin üretici bakteri türleri olarak; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* türleri kullanıldı. Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilimdalı Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı'ndan alınan *Klebsiella pneumoniae* türleri ile bu türlere ilave olarak Ankara' da bulunan özel bir hastanenin mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilen *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* türleri bu çalışmalar kapsamında kullanıldı. *Escherichia coli* DH5α, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883™ suşları, Almanya' da bulunan bir mikrobiyoloji laboratuvarından alınarak çalışmaya dahil edildi.

Çalışma kapsamında kullanılan bakterilerin tümü, % 20 gliserol içeren Brain Heart İnfüzyon Broth besiyerlerinde üretilerek uygun koşullarda -20 °C' de ve Luria Bertani Agar besiyerinde üretilerek bakteriyosin çalışmalarında kullanılmak üzere +4 °C' de ayda bir pasajlanarak saklandı.

3.2. Bakterilerin Ekim ve Üretim Koşulları

3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Bakteriyosin üretim çalışmaları için, Brain Heart İnfüzyon Broth, Nutrient Broth, Luria Bertani Broth, Triptik Soy Broth besiyerleri kullanıldı. Çalışmalarda kullanılan indikatör bakterilerin üretimi için ise Nutrient Agar besiyeri kullanıldı. Yumuşak Agar besiyeri ise Bölüm 3.4.2' de açıklanan kuyucuk yönteminde kullanıldı. Müller Hinton Agar besiyeri ise Bölüm 3.8' de açıklanan antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı. Tüm besiyerleri 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl kullanılarak, oda sıcaklığında, besiyeri pH değerleri 7.0 olarak ayarlandı ve glukoz içeren besiyerleri otoklavda 1,5 atm basınçta 110 °C' de 25 dakika sterilize edilirken, diğer besiyerleri 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi. Bölüm 3.9' da açıklanan genomik ve plazmid DNA izolasyonu çalışmalarında ise 100 µg/ml Ampisilin içeren Luria Bertani Agar besiyeri kullanıldı (Çizelge 3.1) [129].

Çizelge 3. 1. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve besiyeri içerikleri [129]

Kullanılan Besiyerleri	Besiyeri içeriği (g/L)	
Luria Bertani Broth	Tripton	10.0
	Maya özütü	5.0
	NaCl	5.0
Luria Bertani Agar	Tripton	10.0
	Maya özütü	5.0
	NaCl	5.0
	Agar	15.0
Brain Heart İnfüzyon Broth (Oxoid)	Beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar	27.5
	Glukoz	2.0
	NaCl	5.0
	Na ₂ HPO ₄	2.5
Triptik Soy Broth	Tripton	17.0
	Pepton	3.0
	Glukoz	2.5
	NaCl	5.0
	K ₂ HPO ₄	2.5
Nutrient Broth (Merck)	Et pepton	5.0
	Et özütü	3.0
Nutrient Agar (Merck)	Et pepton	5.0
	Et özütü	3.0
	Agar	12.0
Yumuşak Agar	Nutrient Broth (Merck)	8.0
	Agar	7.0
Müller Hinton Agar (HIMEDIA)	Et ekstraktı	2.0
	Kazein hidrolizat	17.5
	Nişasta	1.5
	Agar	1.5

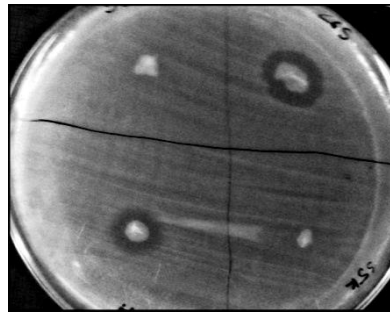
3.3. Çalışmada Kullanılan Suşların Antibakteriyel Aktivite Yönünden Ön Seçimi ve Proteolitik Enzim Uygulaması

Antibakteriyel aktivite ön seçimi çalışmasında, kullanılan bakteri suşlarının antibakteriyel madde üretimi yönünden test edilmesi amacıyla pratik bir yöntem olan nokta ekim yöntemi kullanıldı. Bakteriyosin üretmeyen *Escherichia coli* DH5 α , *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 13883[™] ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları bu çalışmada indikatör bakteriler olarak yer aldı. Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler, Nutrient Agar ortamında 37 °C' de 24 saat üretilerek oluşan kültürlerden, 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlandı. Yapılan diğer bakteriyosin çalışmalarında da bu şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları kullanıldı [130].

Bu çalışmada, ön tarama amacıyla antibakteriyel madde üretici suşlar, Pugsley' nin [130]' da belirtilen nokta ekim yöntemi modifiye edilerek, yukarıda belirtilen

indikatör bakteriler üzerine denendi. İndikatör bakteri süspansiyonlarından 1' er ml alınarak Nutrient Agara yayma ekim yapıldı. Luria Bertani Agarda 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılan antibakteriyel aktiviteleri belirlenecek suşlardan steril iğne uçlu öze yardımıyla agar yüzeyine belirli aralıklarla ekim yapıldı. İndikatör bakterilerin üretildiği en uygun koşullar olarak belirlenen 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakıldı ve inhibisyon zonu oluşumu gözlemlendi. Buna göre en yüksek antibakteriyel madde üretici suşlar belirlendi [130].

Proteolitik enzim uygulaması çalışmasında [131]' de belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Bu çalışma, bakteriler tarafından sentezlenen antibakteriyel bileşiklerin, protein yapıda olup olmadığının belirlenmesi için yapıldı. Öncelikle yukarıda belirtilen indikatör bakterilere karşı en yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlenen *Escherichia coli* den *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27 ve *Pseudomonas aeruginosa*' dan *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 22, Luria Bertani Broth besiyerinde, 37 °C' de 24 saat süreyle üretildiler. Bu süre sonunda kültürler, 12000 rpm' de 30 dakika santrifüj işleminden geçirildiler. Yeni tüplere aktarılan kültür üst sıvıları, 0.45 µm por çapına sahip steril milipor filtrelerden geçirilerek canlı hücrelerden arındırıldı. Bu süzüntülerden alınarak Nutrient Agar petri yüzeyine damlatıldı. Damlatılan süzüntülerin 1 cm uzağına son enzim konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanan proteinaz K ve 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanan tripsin enzim solusyonlarından petrilere damlatıldı (Çizelge 3.2). Damlatılan sıvıların agara nüfuz edebilmesi için 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda içerisinde indikatör bakteriler (*Escherichia coli* DH5α, *Pseudomonas aeruginosa*) olan süspansiyonlardan alınarak, hazırlanan Yumuşak Agara eklendi. Nutrient Agar bulunan petrilere üst tabaka olarak döküldü ve bu petrilere 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon zonu oluşumu incelendi (Şekil 3.1) [131].



Şekil 3. 1. Antibakteriyel aktivitenin nokta ekim yöntemi ile belirlenmesi

Çizelge 3. 2. Proteinaz K ve Tripsin Çözeltilerinin Hazırlanışı [131]

Çözelti	İçerik	Hazırlanışı
Proteinaz K Seyreltme Tamponu pH 7.2 Proteinaz K Çözeltisi (5.0 mg/ml)	0.02 M Tris HCl 10.0 ml 50.0 mg Proteinaz K	50 mg Proteinaz K 10 ml Proteinaz K seyreltme tamponunda çözülerek Proteinaz K çözeltisi hazırlandı.
Tripsin Seyreltme Tamponu pH 8.0 Tripsin Çözeltisi (1.0 mg/ml)	0.02 M Tris HCl 10.0 ml 50.0 mg Tripsin	10 mg Tripsin 10 ml Tripsin seyreltme tamponunda çözülerek Tripsin çözeltisi hazırlandı.

3.4. Bakteriyosin Üretici Suşların Uygun Yöntemin Belirlenmesiyle Seçilmesi

Uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla seçilen suşlar olan *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27 ve *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 22 suşları üzerine modifiye damlatma, kuyucuk ve disk difüzyon yöntemleri modifiye edilerek denendi [132]. Bölüm 3.3' de açıklandığı gibi antibakteriyel aktivite yönünden ön seçimi yapılan suşlar olan, Luria Bertani Broth ortamında 37 °C' de 24 saat üretildi. Daha sonra kültür sıvıları 12000 rpm' de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra, kültür üst sıvıları 0.45 µm por çaplı steril milipor filtreden süzüldü ve tüplere toplanan bu süzüntüler çalışma kapsamında kullanıldı. Bu çalışmada, indikatör bakteri olarak, literatürden edinilen bilgilere göre bakteriyosin üretmediği bilinen *Escherichia coli* DH5α suşu kullanıldı [61]. İndikatör bakterinin, 24 saatlik kültürlerinden, 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlandı [28][133].

3.4.1. Bakteriyosin Üretici Suşların Modifiye Damlatma Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu çalışmada, ilk olarak Nutrient Agar besiyeri hazırlandı ve Bölüm 3.4' de açıklanan indikatör bakteri süspansiyonlarından 1' er ml alınarak agar yüzeyine yayma ekim yapıldı. Bakteriyosin üretici bakterilerden milipor filtrasyon sonucu elde edilen süzüntülerden alınarak agar yüzeyine damlatıldı, 37 °C' de 24 saat inkübe edildi ve inhibisyon zonu oluşumu yönünden incelendi [132].

3.4.2. Bakteriyosin Üretici Suşların Kuyucuk Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu çalışmada, ilk olarak Nutrient Agar besiyeri hazırlandı ve Bölüm 3.4' de açıklanan indikatör bakteri süspansiyonlarından 1'er ml alınarak, 45 °C' ye kadar soğutulmuş Nutrient Agar besiyerine ilave edilerek steril petrilere döküldü. Ortamlar katılaştıktan sonra, agar üzerinde kuyucuklar açıldı. Hazırlanan kuyucuklara, bakteriyosin üretici bakterilerden milipor filtrasyon sonucu elde edilen süzüntülerden eklendi, 37 °C' de 24 saat inkübe edildi ve inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü [134].

3.4.3. Bakteriyosin Üretici Suşların Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu çalışmada, ilk olarak Nutrient Agar besiyeri hazırlandı ve Bölüm 3.4' de açıklanan indikatör bakteri süspansiyonlarından 1' er ml alınarak yayma ekim yapıldı. Hazırlanan petrilere uygun aralıklarla steril kağıt diskler yerleştirildi ve bu disklerle milipor filtrasyon sonucu elde edilen süzüntülerden emdirildi, 37 °C' de 24 saat inkübe edildi ve inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü [134].

3.5. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in Bakteriyosinlerinin Üretimlerini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

3.5.1. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi

E. coli 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarının bakteriyosin üretimi için uygun besiyerinin araştırılması amacıyla, seçilen bakteriyosin üretici suşlar, Triptik Soy Broth, Brain Heart Infusion Broth, Nutrient Broth ve Luria Bertani Broth besiyerlerine ekildi. 37 °C' de, 12, 16, 20 ve 24 saat inkübasyona bırakıldı ve belirli aralıklarla örnek alınarak üreme miktarları ölçüldü. Bu süre sonunda indikatör bakteri olan *Escherichia coli* DH5α üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü.

3.5.2. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

E. coli 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarının bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon süresinin araştırılması amacıyla, seçilen bakteriyosin üretici suşlar, Bölüm 3.5.1' de yapılan deneyler sonucu en uygun besiyeri olarak belirlenen Luria Bertani Broth besiyerine ekildi. 37 °C' de, 1-30 saat inkübasyona bırakıldı ve belirli aralıklarla örnek alınarak üreme miktarları ölçüldü. Bu süre sonunda indikatör

bakteri olan *Escherichia coli* DH5 α üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü.

3.5.3. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

E. coli 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarının bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon sıcaklığının araştırılması amacıyla, seçilen bakteriyosin üretici suşlar, Luria Bertani Broth besiyerine ekildi ve 10, 25, 30, 37, 45 °C 'lere ayarlanmış inkübatörlerde 21 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda indikatör bakteri olan *Escherichia coli* DH5 α , üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü.

3.5.4. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

E. coli 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarının bakteriyosin üretimi için uygun başlangıç pH' sının araştırılması amacıyla, seçilen bakteriyosin üretici suşlar, 1,0 ile 0,1 M HCl ve 1,0 ile 0,1 M NaOH kullanılarak, pH' ları 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0' a ayarlanmış Luria Bertani Broth besiyerine ekildi ve 37 °C' de 21 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda indikatör bakteri olan *Escherichia coli* DH5 α üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü.

3.5.5. Bakteriyosin Üretimi İçin Çalkalamalı Ve Statik İnkübasyon Koşullarının Etkisinin Belirlenmesi

E. coli 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarının bakteriyosin üretimi için uygun çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının araştırılması amacıyla, seçilen bakteriyosin üretici suşlar, Luria Bertani Broth besiyerine, iki paralel olacak şekilde ekildi. Birinci grup örnekler 180 rpm döngüsel çalkalama hızına sahip inkübatörde, diğer grup statik koşullarda 37 °C' de 21 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda indikatör bakteri olan *Escherichia coli* DH5 α üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü.

3.6. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in Bakteriyosinlerinin Karakterizasyonları

3.6.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Bu çalışmada, bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den elde edilen bakteriyosin örnekleri; 55, 65, 75, 90 ve 100 °C' de 10, 15, 30, 60 dakika, 110 ve 121 °C' de 15 dakika sıcaklığa maruz bırakıldı. Örneklerin aktivite kaybı Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi

kullanılarak belirlendi. Bu çalışma kapsamında kontrol örneği olarak, sıcaklık uygulaması yapılmamış bakteriyosin örnekleri kullanıldı.

3.6.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin ve Deterjanların Etkisi

Bu çalışmada, bakteriyosin aktivitesine organik çözücülerin etkisinin belirlenmesi için *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den elde edilen bakteriyosin örnekleri; etanol (% 10), metanol (% 10), butanol (% 10), kloroform (% 10), aseton (% 10) çözeltileri ile muamele edildi. Bu çözeltiler, bakteriyosin örnekleri ile karıştırılarak 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda, örneklerin aktivite kaybı Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu çalışma kapsamında kontrol örneği olarak, bakteriyosin örnekleri kullanıldı.

Bu çalışmada, bakteriyosin aktivitesine deterjanların etkisinin belirlenmesi için, sodyum dodesil sülfat (% 1) ve tween 80 (% 1) deterjanları kullanıldı. Bu çözeltiler, milipor filtrasyon sonucu elde edilen süzüntüler ile karıştırılarak 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda, örneklerin aktivite kaybı Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu çalışma kapsamında kontrol örneği olarak, bakteriyosin örnekleri kullanıldı.

3.6.3. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Depolama Sıcaklığı Ve Süresinin Etkisi

Bu çalışmada, bakteriyosin aktivitesine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisinin belirlenmesi için, *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den elde edilen bakteriyosin örnekleri, -20, +4 ve 25 °C' de 2, 7, 15 gün ve 3, 6, 12 ay süreyle bekletildi. Bu süre sonunda, örneklerin aktivite kaybı Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi.

3.7. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in Bakteriyosinlerinin Kısmi Saflaştırılması

3.7.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Bu çalışmada, bakteriyosin örneklerinin üst fazlarındaki proteinleri çöktürmek amacıyla amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bakteriyosin örneklerine, konsantrasyonları, % 40, % 60, % 80, % 90 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edildi ve eriyinceye kadar karıştırıldı. Amonyum sülfat ilave edilmiş örnekler, +4 °C' de 12000 rpm' de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu işlemin sonunda üst faz alındı ve pellet oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan kısım, 1 ml potasyum fosfat

tamponu içerisinde çözüldü ve -20 °C' de 1 saat bekletildi. Bu süre sonunda örnekler 11000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi, üst faz döküldü ve pellet kurutuldu. Son aşamada kurutulan çökelti 200 µl potasyum fosfat tamponu içinde çözüldü ve - 20 °C' de saklandı [135;136].

3.8. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretimi

3.8.1. Kullanılan Bakteri Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı olan antibiyotik duyarlılıkları Kirby Bauer Disk Difüzyon metodu kullanılarak belirlendi. Kullanılan suşlar, Çizelge 3.3' de belirtilen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen zon tablosu ile karşılaştırılarak dirençli, ılımlı ve hassas olarak bu standartlara uygun olacak şekilde belirlendi [137;138]. Bakteri kültürleri McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanarak örnekler hazırlandı ve Müller Hinton Agar besiyerine ekim yapıldı. Yüzey kuruduktan sonra antibiyotik diskleri yerleştirildi. 37 °C' de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülerek, çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşların antibiyotik duyarlılıkları belirlendi [139;140].

Çizelge 3. 3. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen zon tablosu [139]

Antibiyotik Adı	Türü	Disk içeriği	Zon çapı		
			D	I	H
Amikasin	Aminoglikozitler	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Gentamisin	Aminoglikozitler	10 µg	≤12	13-14	≥15
Ampisilin-Sulbaktam	B laktam/b laktamaz inhibitör kombinasyonu	10/10 µg	≤11	12-14	≥15
Piperasilin-Tazobaktam	B laktam/b laktamaz inhibitör kombinasyonu	100/10 µg	≤17	18-20	≥21
Sefepim	Sefemler	30 µg	≤13	14-20	≥21
Siprofloksasin	Florokinolonlar	5 µg	≤15	16-20	≥21
Norfloksasin	Florokinolonlar	10 µg	≤12	13-16	≥17
Imipenem	Karbapenemler	10 µg	≤13	14-15	≥16
Meropenem	Karbapenemler	10 µg	≤13	14-15	≥16

D: Dirençli I: İlimli H: Hassas

3.8.2. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnç Oranlarının Belirlenmesi

Escherichia coli ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre değerlendirildi. *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarının çalışmamız kapsamında kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oranları hesaplandı.

$$\text{Antibiyotiğe direnç oranı} = \frac{\text{Antibiyotiğe dirençli örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

3.9. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8 Suşlarından Plazmid DNA' larının İzolasyonu ve Jel Elektroforezi ile Analizi

Bu çalışmada, kullanılan *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının plazmid DNA izolasyonu (Alkalin Lizis Plazmid Miniprep) için [141]' de belirtilen yöntem modifiye edildi. Luria Bertani Agar'da bir gece üretilen suşlardan alınarak Antibiyotikli Luria Bertani Broth besiyerine ekildi ve 37°C' de 16 saat inkübe edildi. 1.5 ml bakteri kültürleri, 10000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılarak, pellet, 110 µl Solüsyon I ile çözüldü. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Solüsyon II' den 200 µl eklenerek yavaşça karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Buzda bekletilmiş tüpe, Solüsyon III' den 150 µl eklendi. 10000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek parçalanmış hücre kalıntıları ve DNA' nın birbirinden ayrılması sağlandı. Elde edilen supernatant, yeni bir tüpe aktarıldı. Fenol/kloroform ve etanol çöktürmesi ile elde edilen plazmid DNA' sı 30 µl steril distile suda çözülerek -20°C' de saklandı [141].

Çizelge 3. 4. Plazmid DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve içerikleri [141]

Kullanılan Çözeltiler	Çözelti İçerikleri
Solusyon I	10ml 500mM Glukoz 2ml 500mM EDTA, pH 8.0 2.5ml 1M Tris, pH 8.0 85.5ml Distile su
Solusyon II	2 M NaOH % 1 SDS İzopropanol
Solusyon III	3M KOAc, pH 6.0 60ml 5M potasyum asetat 11.5ml Glasiyal asetat 28.5ml Distile su

Kullanılan örnekler için plazmid DNA izolasyonu yapıldıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapıldı. % 0.8' lik hazırlanan agaroz jel, 50°C' ye soğutulduktan sonra, 0.5 µg/ml Etidyum bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Polimerize olan jelden tarak çıkarıldıktan sonra plazmid DNA örnekleri, yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. Plazmid DNA' larının moleküler ağırlıklarını hesaplamak amacıyla bir kuyucuğa marker DNA yüklendi. Aparata jelin yüzeyini kaplayacak şekilde yürütme tamponu ilave edildi ve 120 V/cm² voltaj uygulandı. Elektroforez sonucu DNA bantları Gel Logic 200 Molecular Imaging System (Kodak, Rochester) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi. Bu çalışmada yer alan fotoğraflar Kodak M1033 ile tarafımızca çekildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen antibakteriyel maddeler, geniş kullanım alanına sahip olmaları nedeniyle uzun yıllardan beri üzerinde çalışılmaktadır. Bakterilerin büyük bir kısmı tarafından üretilen bakteriyosinler özellikle yakın akraba türlere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip proteinler veya peptidlerdir. Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları ve ekolojik rolleri ile ilgili bilgiler yeterli düzeyde değildir. Bu bağlamda yeni yapılacak çalışmalarla bakteriler tarafından pek çok farklı çeşitte üretilen bakteriyosinlerle ilgili bilinmeyen pek çok konu açıklığa kavuşacaktır [1].

Bakteriyosinler, moleküler büyüklük, mikrobiyal hedefler, etki ve bağışıklık mekanizmaları açısından oldukça farklı özelliklere sahip proteinleri içermektedir. Bakteriyosinlerin üretilme nedenleriyle ilgili araştırmacıların ortaya attıkları farklı görüşler bulunmaktadır. Bu konudaki en yaygın görüş ise bakteriyosinlerin çeşitli kaynaklara ulaşmak için bakteriler tarafından kullanılan bir strateji olabileceği yönündedir [1;2;3].

Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleri, kolisinler ve mikrosinler olmak üzere iki sınıf altında toplanmaktadır. Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bu maddeler genellikle *Enterobacteriaceae* tarafından üretilmektedir. Bu maddeler, moleküler büyüklükleri, üretilme basamakları ve öldürme mekanizmaları açısından farklılıklar göstermektedir [1;3].

Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, uygulanabilirliklerinin kolay olması nedeni ile üzerinde çalışılan maddelerdendir [13]. Bakteriyosinlerin, pek çok kullanım alanı vardır. Özellikle son yıllarda kullanılan antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların direnç kazanması araştırmacıları yeni alternatif bileşiklere yöneltmiştir. Bu nedenle, bakterilerden, yeni bakteriyosinler üretmek ve daha önce üretilen bakteriyosinlerin verimini arttırmak açısından yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [15].

Bu çalışma kapsamında *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen antibakteriyel maddelerin araştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Antibakteriyel Aktivite Yönünden Ön Seçimi ve Proteolitik Enzim Uygulaması

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleri ile ilgili son yıllarda pek çok çalışma yapılmaktadır. Gram pozitif bakterilerin gıda endüstrisindeki önemli rollerinden dolayı yapılan çalışmalar çoğunlukla bu yönde ilerlemektedir [13]. Ancak Gram negatif bakterilerin bakteriyosinlerinin özelliklerinden dolayı farmasötik endüstrisi başta olmak üzere diğer pek çok alanda kullanım potansiyeli vardır. Bu nedenle bizim çalışmamızda Gram negatif bakterilerin bakteriyosinleri araştırılmıştır. Enterik bakterilerin çoğu bakteriyosin üretmektedir. Yapılan çalışmalarda, *Escherichia coli* suşlarında birden fazla bakteriyosin üretme kapasitesinin %15 ile % 50 arasında olduğu, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında ise bakteriyosin üretme kapasitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu suşlarda, bir ya da daha fazla farklı tip bakteriyosin üretme sıklığı % 70 ile % 90 arasındadır [51;144;145]. *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei* ve *Citrobacter freundii* ile yapılan araştırmalarda ise bu bakterilerin bakteriyosin üretme kapasitelerinin %3 ile % 26 arasında olduğu saptanmıştır [145].

Bakteriyosin üretici suşların belirlenebilmesi için öncelikle çalışma kapsamında kullanılan bakterilerin arasından indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturan suşların seçilmesi gelmektedir [5;34;50]. Bu amaçla farklı araştırmacılar tarafından önerilen pek çok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin ortak noktası ise test edilen suşların, indikatör bakterilere karşı inhibisyon zonu oluşturmaları bu bakterilerin bakteriyosin üreticisi olduklarını destekler niteliktedir [8;134;142;143].

Çalışmada kullanılan bakteriler, antibakteriyel madde üretimi yönünden incelendi. Bu çalışmada bakteriyosin üretici suşların belirlenmesi amacıyla *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerine ait klinik kaynaklı 105 bakteri örneği bakteriyosin üretimi açısından araştırıldı. Bütün bu bakteriyosin üretici suşlar, Bölüm 3.3' de belirtilen indikatör türler olan literatüre göre bakteriyosin üretmediği belirlenen *Escherichia coli* DH5 α , *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 13883™ ve çalışmalar sonucu bakteriyosin üretmediği belirlenen *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerinde denendi. Bu çalışmada kullanılan antibakteriyel madde üretici suşların, Bölüm 3.3' de açıklanan nokta ekim yöntemiyle, indikatör bakteriler üzerine antibakteriyel aktivite taramaları yapıldı. Bu

çalışma kapsamında, antibakteriyel birleşik üretimi açısından incelenen bakteri örneklerinden inhibisyon zonu oluşumu 10 mm' den büyük olan bakteri örnekleri seçildi. En yüksek antibakteriyel aktivite gösteren bakteriler, *Escherichia coli* den *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27 ve *Pseudomonas aeruginosa*' dan *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 22 olarak saptandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. Çalışmada kullanılan bakterilerin antibakteriyel madde üretimi ve inhibisyon zonu oluşumunun incelenmesi

Bakteri Örnek Numarası	Antibakteriyel Madde Üretimi	
	İnhibisyon Zonu (≤10 mm)	İnhibisyon Zonu (≥10 mm)
<i>E. coli</i> 26S		✓
<i>E. coli</i> 35K	✓	-
<i>E. coli</i> 1	-	-
<i>E. coli</i> 2	-	-
<i>E. coli</i> 3	-	-
<i>E. coli</i> 4	✓	-
<i>E. coli</i> 5	✓	-
<i>E. coli</i> 6	✓	-
<i>E. coli</i> 7	✓	-
<i>E. coli</i> 8	✓	-
<i>E. coli</i> 9	-	-
<i>E. coli</i> 10	-	-
<i>E. coli</i> 11	✓	-
<i>E. coli</i> 12	-	-
<i>E. coli</i> 13	-	-
<i>E. coli</i> 14		✓
<i>E. coli</i> 15	✓	-
<i>E. coli</i> 16	✓	-
<i>E. coli</i> 17	✓	-
<i>E. coli</i> 18	✓	-
<i>E. coli</i> 19	-	-
<i>E. coli</i> 20	-	-
<i>E. coli</i> 21	✓	-
<i>E. coli</i> 22	✓	-
<i>E. coli</i> 23	✓	-
<i>E. coli</i> 24	✓	-
<i>E. coli</i> 25	-	-
<i>E. coli</i> 26	✓	-
<i>E. coli</i> 27		✓
<i>E. coli</i> 28	✓	-
<i>E. coli</i> 29	-	-
<i>E. coli</i> 30	✓	-

* Bu çalışmanın sonuçları nokta ekim tekniği kullanılarak belirlendi.

** ✓: İnhibisyon var -: İnhibisyon yok

Çizelge 4. 1. Çalışmada kullanılan bakterilerin antibakteriyel madde üretimi ve inhibisyon zonu oluşumunun incelenmesi (devam)

Bakteri Örnek Numarası	Antibakteriyel Madde Üretimi	
	İnhibisyon Zonu (≤10 mm)	İnhibisyon Zonu (≥10 mm)
<i>E. coli</i> 31	✓	-
<i>E. coli</i> 32	-	-
<i>E. coli</i> 33	✓	-
<i>E. coli</i> 34	-	-
<i>E. coli</i> 35	-	-
<i>E. coli</i> 36	-	-
<i>E. coli</i> 37	-	-
<i>E. coli</i> 38	✓	-
<i>E. coli</i> 39	-	-
<i>E. coli</i> 40	✓	-
<i>E. coli</i> 41	-	-
<i>E. coli</i> 42	✓	-
<i>E. coli</i> 43	-	-
<i>E. coli</i> 44	✓	-
<i>E. coli</i> 45	✓	-
<i>E. coli</i> 46	-	-
<i>E. coli</i> 47	-	-
<i>E. coli</i> 48	✓	-
<i>E. coli</i> 49	-	-
<i>E. coli</i> 50	✓	-
<i>K. pneumoniae</i> 1	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 2	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 3	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 4	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 5	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 6	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 7	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 8	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 9	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 10	✓	-
<i>K. pneumoniae</i> 11	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 12	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 13	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 14	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 15	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 16	✓	-
<i>K. pneumoniae</i> 17	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 18	-	-

* Bu çalışmanın sonuçları nokta ekim tekniği kullanılarak belirlendi.

** ✓: İnhibisyon var -: İnhibisyon yok

Çizelge 4. 1. Çalışmada kullanılan bakterilerin antibakteriyel madde üretimi ve inhibisyon zonu oluşumunun incelenmesi (devam)

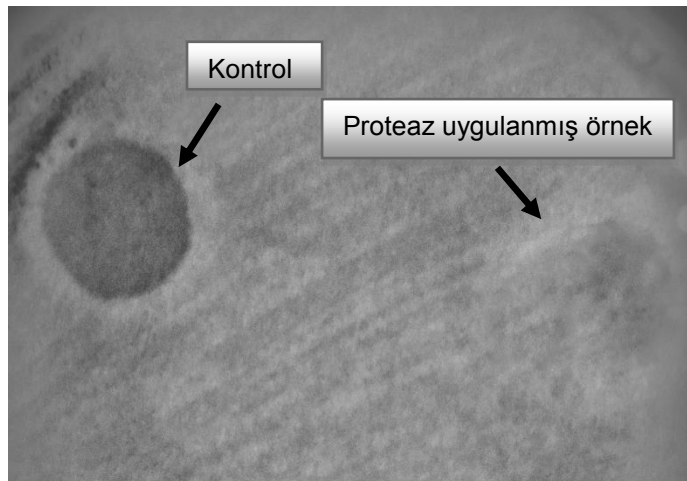
Bakteri Örnek Numarası	Antibakteriyel Madde Üretimi	
	İnhibisyon Zonu (≤10 mm)	İnhibisyon Zonu (≥10 mm)
<i>K. pneumoniae</i> 19	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 20	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 21	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 22	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 23	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 24	-	-
<i>K. pneumoniae</i> 25	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 1	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 2	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 3	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 4	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 5	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 6	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 7	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 8		✓
<i>P. aeruginosa</i> 9	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 10	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 11	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 12	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 13	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 14	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 15		✓
<i>P. aeruginosa</i> 16	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 17	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 18	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 19	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 20	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 21	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 22		✓
<i>P. aeruginosa</i> 23	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 24	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 25	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 26	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 27	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 28	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 29	✓	-
<i>P. aeruginosa</i> 30	-	-
<i>P. aeruginosa</i> PA01	✓	✓
<i>P. aeruginosa</i> PA14	✓	✓

* Bu çalışmanın sonuçları nokta ekim tekniği kullanılarak belirlendi.

** ✓: İnhibisyon var - : İnhibisyon yok

Literatüre baktığımızda Gram negatif bakterilerde antibakteriyel madde üretiminin araştırılmasında *Escherichia coli* başta olmak üzere, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın yer aldığı belirlenmiştir [5]. Bizim çalışmamızda ise *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda yüksek oranda antibakteriyel madde üretimi saptandı ancak bu çalışma kapsamında kullanılan *Klebsiella pneumoniae*'ye ait suşlar arasında yüksek verimli antibakteriyel madde üretimine rastlanılmadı (Çizelge 4.1). Çalışmada kullanılan bakterilerin ön seçimi yapılırken elde edilen inhibisyon zonu ölçümleri ile yapılan benzer çalışmalarda da bulgularımıza paralel olarak 10 mm' den büyük zon çapına sahip bakterilerin seçilmesi bakteriyosin üretimi çalışmaları için uygun olduğu görülmektedir [144;146;147].

Çalışmada kullanılan suşlar tarafından üretilen antibakteriyel maddelerin protein yapıda olup olmadıklarının belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 3.3' de açıklanan proteolitik enzim uygulaması yapıldı. Bu çalışmada *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27, *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15 ve *P. aeruginosa* 22' den elde edilen süzüntüler üzerine proteinaz K ve tripsin uygulandı. Bu çalışma sonucunda örneklerin antibakteriyel aktivitelerini kısmen ya da tamamen kaybettikleri gözlemlendi (Şekil 4.1). Bu bağlamda elde edilen antibakteriyel maddelerin protein ya da peptid yapıda oldukları sonucuna varıldı.



Şekil 4. 1. Proteolitik enzim uygulaması

* Bölüm 3.3' de açıklandığı şekilde yapıldı. Kontrol olarak proteaz uygulanmamış milipor filtrasyon sonucu elde edilen süzüntü kullanıldı.

Bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik protein veya peptid yapıdan kaynaklanmaktadır. Proteolitik enzim uygulaması sonucu inhibitör etkinin ortadan

kalkması üretilen antibakteriyel maddenin bakteriyosin olduğuna işaret etmektedir. *Escherichia coli* tarafından üretilen kolisinlerin proteazlara karşı hassas olduğunu görmekteyiz. Mikrosinlerin ise proteazlara dirençli olduğu belirlenmiştir [128;143]. *E. coli* 26S, *E. coli* 14 ve *E. coli* 27 tarafından üretilen antibakteriyel maddelerin hem tripsin hem de proteinaz K enzimlerine tamamen ya da kısmen hassas oldukları belirlendi. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen bakteriyosinler ise proteazlara direnç açısından farklılıklar göstermektedir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen R, F ve S tipi bakteriyosin tipleri vardır. R ve F tipi protein yapıdaki bakteriyosinlerde bakteriyofaj kuyruğuna benzer bir kılıf bulunmaktadır. Bakteriyosinlerden, S tipi bakteriyosinler küçük proteinlerdir ve proteazlara karşı hassastır. *P. aeruginosa* suşları ile yapılan bir çalışmada bu suşlar arasında R ve S tipi bakteriyosinlerin birlikte üretimi %38 oranında bulunmuştur [51;145;148;149]. Kullanılan *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15 ve *P. aeruginosa* 22 bakteriyosinleri değişik oranlarda olmak üzere proteazlara hassas oldukları ileri sürülebilir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre üretilen bu antibakteriyel maddelerin bakteriyosin olabileceği yönünde güçlü kanıtlar vardır.

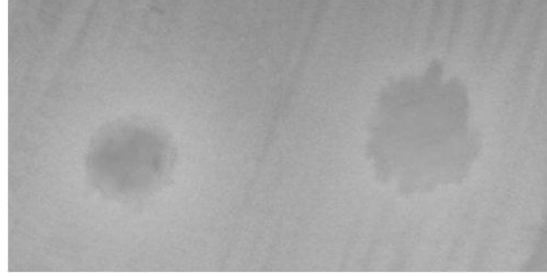
4.2. Bakteriyosin Üretici Suşların Uygun Yöntemin Belirlenmesiyle Seçilmesi

Bakteriyosin çalışmalarında antibakteriyel etkinliğin belirlenmesi açısından inhibisyon zon çaplarının ölçülmesi büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda seçilen yöntem çalışılan bakteriyosinlerin özelliklerine uygun olmalıdır. Bu çalışma kapsamında, en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenen suşlar olan *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27, *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15 ve *P. aeruginosa* 22 kullanıldı. Bu suşlardan milipor filtrasyon sonucu elde edilen süzüntülerin, indikatör bakteri üzerine inhibisyon zonu oluşumlarına göre karşılaştırılmaları sağlandı. Bakteriyosin üretmediği bilinen *E. coli* DH5 α indikatör bakteri olarak kullanıldı. Bakteriyosin çalışmalarında uygun yöntemin belirlenmesi çalışmanın devamı açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan üç farklı yöntem karşılaştırılarak, bakteriyosin üretici suşların seçilmesinde inhibisyon zonunun en iyi gözlemlendiği yöntem en uygun yöntem olarak belirlendi.

4.2.1. Bakteriyosin Üretici Suşların Modifiye Damlatma Yöntemiyle Belirlenmesi

Bakteriyosin üretici suşların uygun yöntemin belirlenmesi ile seçilmesi çalışmalarında, ilk olarak Bölüm 3.4.1' de açıklanan modifiye damlatma yöntemi

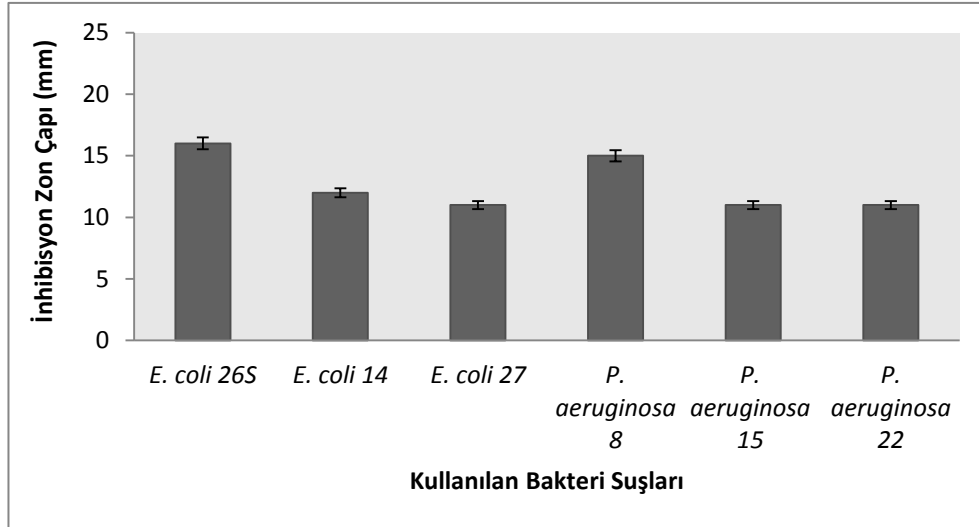
kullanıldı. Modifiye damlatma yöntemi çalışmasında kullanılan suşların, indikatör bakteriye karşı inhibisyon zon çapı ölçümleri yapılamadı. Bu yöntem, çalışmanın hızlı bir şekilde yürütülmesi için uygun olsa da inhibisyon zon çapının düzgün bir şekilde ölçülemediği belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Modifiye damlatma yöntemi
* Bölüm 3.4.1' de açıklandığı şekilde yapıldı.

4.2.2. Bakteriyosin Üretici Suşların Kuyucuk Yöntemiyle Belirlenmesi

Bakteriyosin üretici suşların uygun yöntemin belirlenmesi ile seçilmesi çalışmalarında, ikinci olarak Bölüm 3.4.2' de açıklanan kuyucuk yöntemi kullanıldı. Bu çalışma sonucunda kullanılan suşların, indikatör bakteri üzerine inhibisyon zonu oluşumları incelendi ve zon çapları ölçüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. Kuyucuk yönteminde kullanılan bakteri örnekleri ve inhibisyon zon çapları

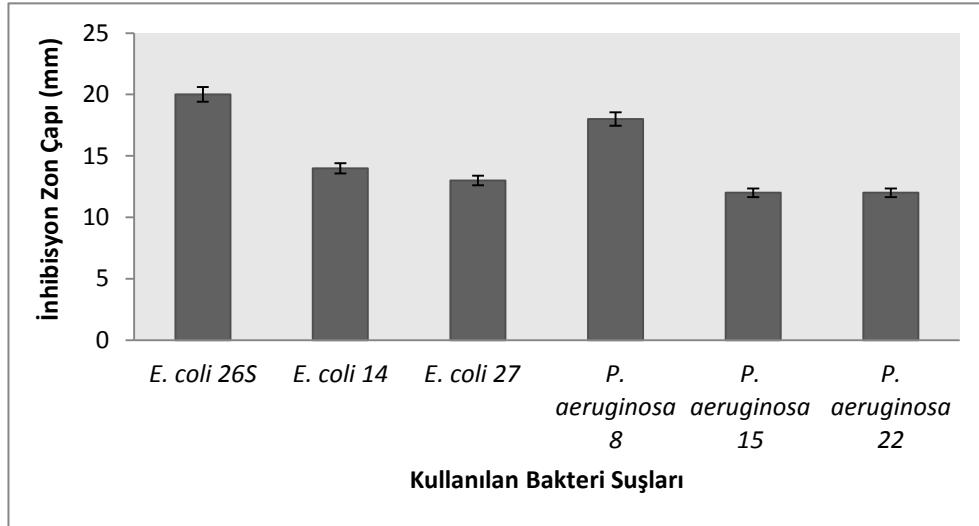
* 24 saat 37 °C' de inkübe edildi ve inhibisyon zon çapları ölçüldü. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

Bakteriyosin üretici suşların kuyucuk yöntemiyle belirlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada *Enterococcus faecium* bakterisinin diğer bakteri türlerine karşı etkileri test edilmiştir [150].

Bizim çalışmamızda en yüksek inhibisyon zonu *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarında gözlemlendi. *E. coli* 26S suşunda 16 mm zon çapı ölçülürken, *P. aeruginosa* 8 suşunda ise 15 mm zon çapı ölçüldü. Araştırmacılar tarafından kullanılan bir yöntem olan kuyucuk yöntemi bizim çalışmamızda elde edilen bakteriyosin örneğinin kuyucuktan tam olarak etki edememesi sebebiyle tercih edilmedi. Çalışılan bakteriyosin örnekleri açısından difüzyonunun bu yöntemi sınırlandırdığı gözlemlendi.

4.2.3. Bakteriyosin Üretici Suşların Disk Difüzyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Bakteriyosin üretici suşların uygun yöntemin belirlenmesi ile seçilmesi çalışmalarında, son yöntem olarak Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu çalışma sonucunda kullanılan suşların, indikatör bakteri üzerine inhibisyon zonu oluşumları incelendi ve zon çapları ölçüldü (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. Disk difüzyon yönteminde kullanılan bakteri örnekleri ve inhibisyon zon çapları

* 24 saat 37 °C' de inkübe edildi ve inhibisyon zon çapları ölçüldü. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

Lactococcus lactis ile 2013 yılında yapılan bir çalışmada *Salmonella typhi* üzerine bakteriyosin etkinliği disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [151].

Disk difüzyon yönteminde en yüksek inhibisyon zonu, kuyucuk yönteminde olduğu gibi *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarında gözlemlendi. *E. coli* 26S suşunda 20 mm zon çapı ölçülürken, *P. aeruginosa* 8 suşunda ise 18 mm zon çapı ölçüldü. Yapılan çalışmalar sonucunda bakteriyosinlerin antibakteriyel etkilerinin

saptanması için kullanılan suşların zon çapları karşılaştırıldığında disk difüzyon yöntemi en uygun yöntem olarak belirlendi.

Bakteriyosin çalışmalarında araştırmacılar tarafından damlatma, kuyucuk ve disk difüzyon yöntemlerinin kullanıldığı görülmektedir. Bu üç yöntemin de yapılan çalışmalar kapsamında avantajları bulunmaktadır [150;152;153;154]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle, kuyucuk ve disk difüzyon yöntemleri tercih edilmektedir [151;155;156;157]. Bu çalışma kapsamında, kolay uygulanabilirlik, tekrar edilebilirlik ve değerlendirmede güvenilirlik ölçütleri yönünden bu üç yöntem karşılaştırılmıştır. Çalışmamız kapsamında kolay uygulanabilirlik açısından tercih edilen damlatma yönteminde tüm örnekler açısından değerlendirildiğinde zon çapının düzgün bir şekilde ölçülemediği belirlendi. Bu çalışmada kullanılan diğer yöntemler olan kuyucuk ve disk difüzyon yöntemlerinde ölçülen inhibisyon zonu çapları farklılık göstermektedir. Bunun sebebi bakteriyosin örneklerinin kuyucuktan yeterince etki edememesi olabilir. Disk difüzyon yönteminin karşılaştırılan kriterler açısından diğer iki yönteme göre daha güvenilir olduğu belirlendi. Kuyucuk ve disk difüzyon yöntemlerinde en yüksek inhibisyon zonlarına sahip suşlar aynıdır. Ancak bu suşların indikatör bakteri üzerine oluşturdukları zon çapları farklılık göstermektedir. Kuyucuk yönteminde elde edilen inhibisyon zon çapları daha düşük bulundu.

Bu bağlamda bakteriyosinlerin, indikatör bakteri üzerine etkisinin en iyi gözlemlendiği yöntem olarak disk difüzyon yöntemi belirlendi ve inhibisyon zon çapı ölçümlerine göre en yüksek verimli bakteriyosin üretici suşlar olarak *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 seçilerek çalışmaların devamında kullanıldı.

4.3. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in Bakteriyosinlerinin Üretimlerini Etkileyen Uygun Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi

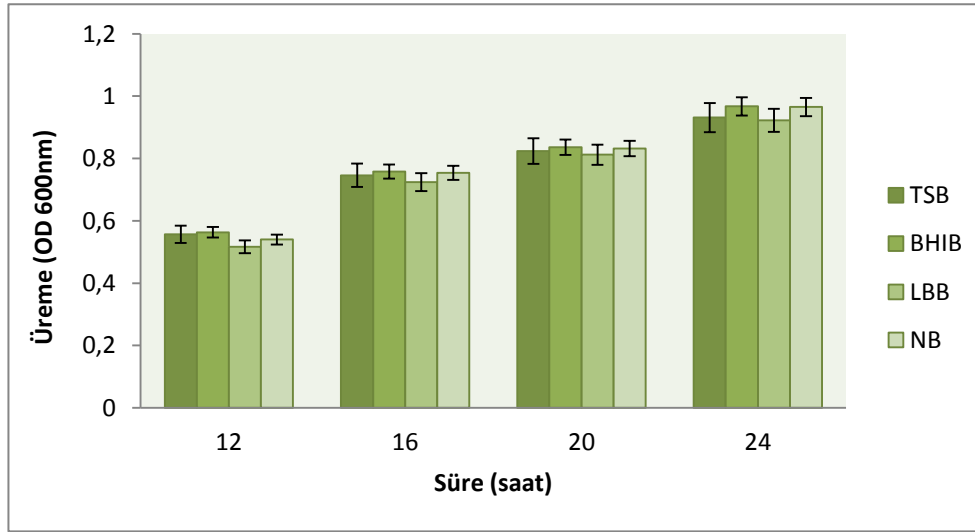
Bakteriyosin çalışmalarında inkübasyon ortamı, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH' sı gibi fizyolojik koşulların tümü üretilecek bakteriyosin aktivitesini etkilemektedir. Bu bağlamda bakteriyosin üretimini arttırmak için çevresel koşulların optimize edilmesi oldukça önem taşımaktadır [153;154].

Bu nedenle seçilen suşların bakteriyosin aktivitesini arttırmak amacıyla çalışmamızda üretim ortamındaki en uygun fizyolojik koşullar belirlendi. Bu amaçla sırasıyla inkübasyon ortamı, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç

pH' sı, çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının kullanılan suşların gelişimi ve bakteriyosin üretimi üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışma kapsamında indikatör bakteri olarak *Escherichia coli* DH5α kullanıldı.

4.3.1. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Besiyerinin Belirlenmesi

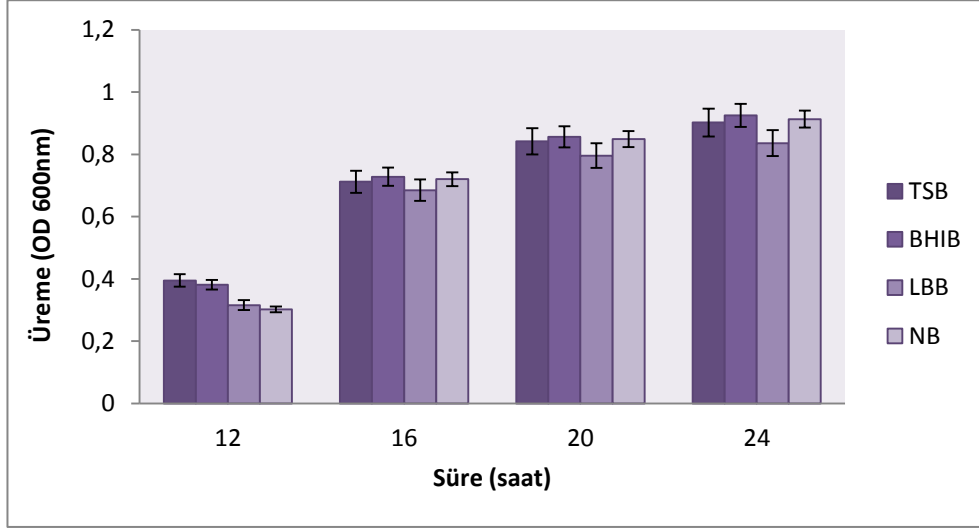
Çalışmamızda en verimli bakteriyosin eldesi için öncelikle farklı besiyerlerinde bakteriyosin üretimi incelendi. Bu çalışmada, farklı besiyerlerinin bakteriyosin üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, en yüksek aktivite gösteren bakteriyosin üreticisi suşlar olarak seçilen *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 kullanıldı. Bu bakteriler, Bölüm 3.5.1' de açıklandığı gibi Brain Heart İnfüzyon, Luria Bertani, Triptik Soy ve Nutrient sıvı besiyerlerine ekildi. 37 °C' de, 12, 16, 20 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda örnek alınarak üreme miktarları ölçüldü (Şekil 4.5;Şekil 4.6). bu sürelerin sonunda elde edilen kültür süzüntüleri kullanılarak indikatör bakteri üzerine en uygun yöntem olan Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü (Şekil 4.7;Şekil 4.8).



Şekil 4. 5. *Escherichia coli* 26S' in farklı besiyerlerinde üremesinin ölçülmesi

* Üretimler 37 °C' de 12-24 saatte gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

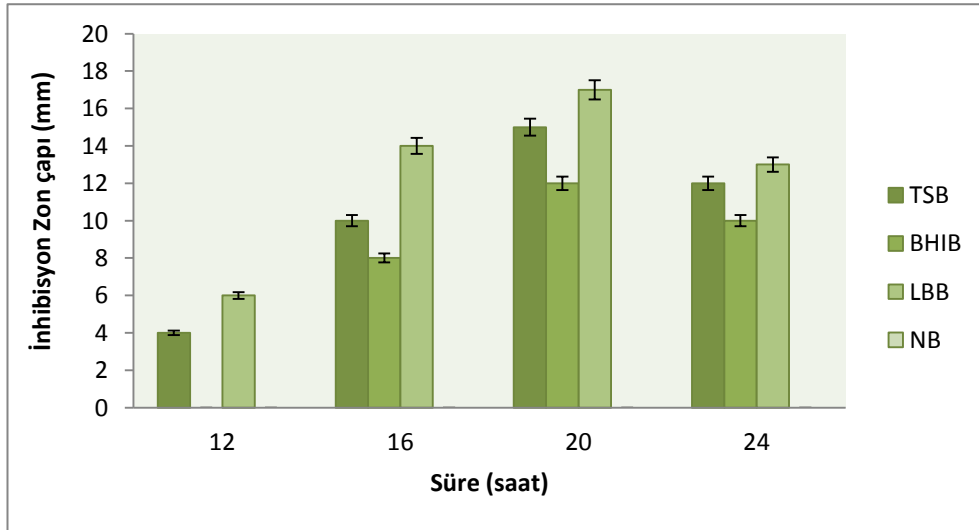
** TSB: Triptik Soy Sıvı Besiyeri, BHIB: Brain Heart İnfüzyon Sıvı Besiyeri, LBB: Luria Bertani Sıvı Besiyeri, NB: Nutrient Sıvı Besiyeri



Şekil 4. 6. *Pseudomonas aeruginosa* 8' in farklı besiyerlerinde üremesinin ölçülmesi

* Üretimler 37 °C' de 12-24 saatte gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

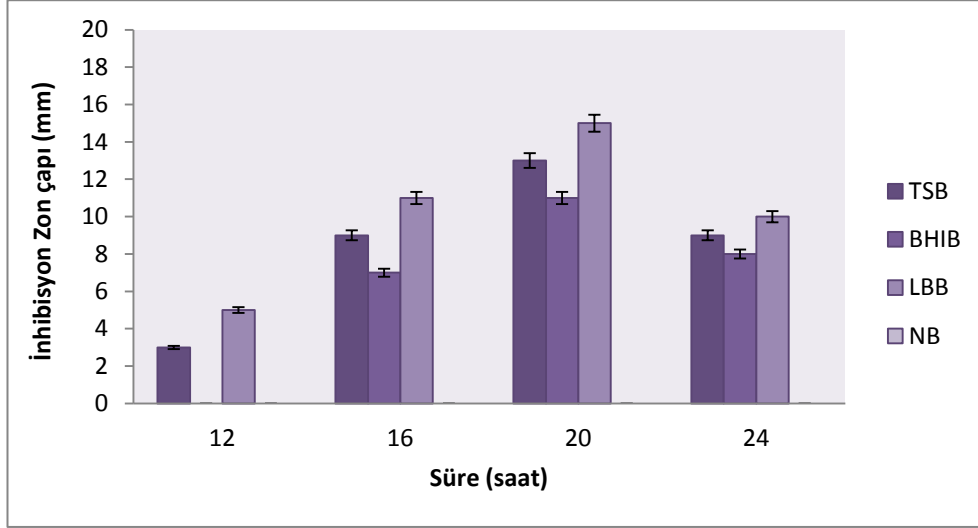
** TSB: Triptik Soy Sıvı Besiyeri, BHIB: Brain Heart İnfüzyon Sıvı Besiyeri, LBB: Luria Bertani Sıvı Besiyeri, NB: Nutrient Sıvı Besiyeri



Şekil 4. 7. *Escherichia coli* 26S' in farklı besiyerlerinde inhibisyon zonu ölçümleri

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. NB besiyerinde zon çapı ölçülemedi.

** TSB: Triptik Soy Sıvı Besiyeri, BHIB: Brain Heart İnfüzyon Sıvı Besiyeri, LBB: Luria Bertani Sıvı Besiyeri, NB: Nutrient Sıvı Besiyeri



Şekil 4. 8. *Pseudomonas aeruginosa 8'* in farklı besiyerlerinde inhibisyon zonu ölçümleri

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir. NB besiyerinde zon çapı ölçülemedi.

** TSB: Triptik Soy Sıvı Besiyeri, BHIB: Brain Heart İnfüzyon Sıvı Besiyeri, LBB: Luria Bertani Sıvı Besiyeri, NB: Nutrient Sıvı Besiyeri

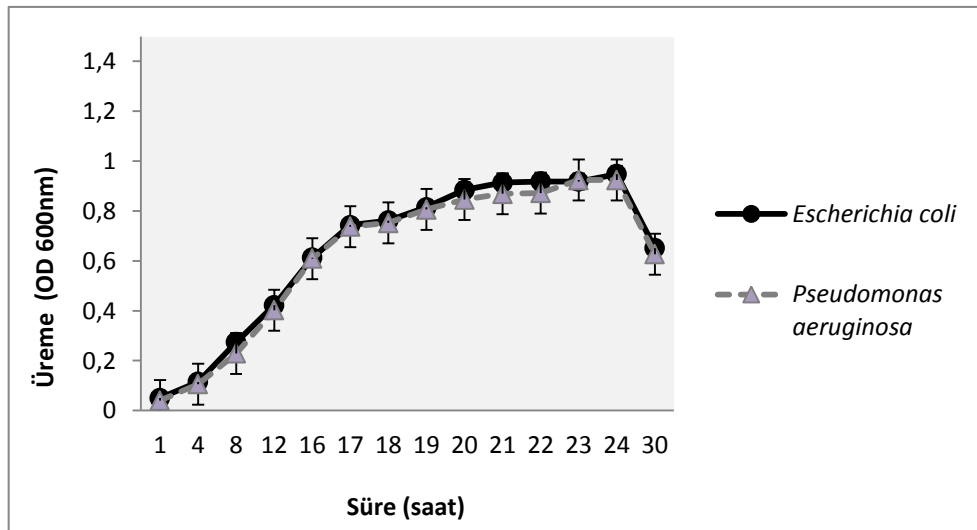
Bu çalışma kapsamında en yüksek bakteriyosin üretiminin bakterilerin üremelerinin çoğunlukla en düşük olduğu Luria Bertani sıvı besiyerinde olduğu gözlemlendi. Tüm sıvı besiyerleri açısından kullanılan her iki suşun indikatör bakteri üzerine inhibisyon zon çaplarının 20. saatte en yüksek değere ulaştığı belirlendi. *E. coli* 26S suşunda, indikatör bakteriye karşı 17 mm olarak ölçülen inhibisyon zon çapı, *P. aeruginosa 8* suşunda ise 15 mm olarak ölçüldü. Triptik Soy sıvı besiyerinde, *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa 8* suşlarında inhibisyon zon çapları, sırasıyla 15 mm ve 13 mm olarak ölçüldü. Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyerinde ise bu suşlar için inhibisyon zonu çapları sırasıyla 12 ve 11 mm olarak ölçüldü. Nutrient sıvı besiyerinde ise antibakteriyel madde üretimi saptanamadı. Bu farklılığın nedeni, besiyeri içeriğinde bulunan farklı besin maddelerinin etkisinden kaynaklanmaktadır. Besiyeri içeriğinde bulunan bazı maddelerin etkileri ile bakteriyosin üretimi artmış veya bazı maddelerin etkileri ile bakteriyosin üretimi sınırlanmış olabilir.

Çeşitli araştırmacılar farklı besiyerlerinde bakteriyosin üretimi yapmaktadır. *Pseudomonas* suşları için yapılan pek çok çalışmada Luria Bertani Broth besiyeri, bakteriyosin üretimi için kullanılmaktadır [158;159;160;161]. *Escherichia coli* suşlarıyla yapılan çalışmalarda da Luria Bertani Broth besiyeri bakteriyosin üretimi için kullanılmaktadır [162;163;164;165]. Besiyeri içeriğinde bulunan maddelerin,

bakteriyosin üretimi için gerekli şartların oluşmasını sağlaması gerekmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda ise bakteriyosin üretimi için uygun besiyeri Triptik Soy sıvı besiyeri olarak saptanmıştır. Luria Bertani sıvı besiyeri ve Triptik Soy sıvı besiyerleri içeriğinde ortak olarak bulunan tripton ve NaCl bakteriyosin üretimini desteklediği düşünülebilir [144;166;167]. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularda Luria Bertani sıvı besiyerinde en verimli bakteriyosin üretimi gerçekleştiği gözlemlendi, bu besiyerinde elde edilen inhibisyon zon çaplarına en yakın sonuçlar ise Triptik Soy sıvı besiyerinde elde edildi.

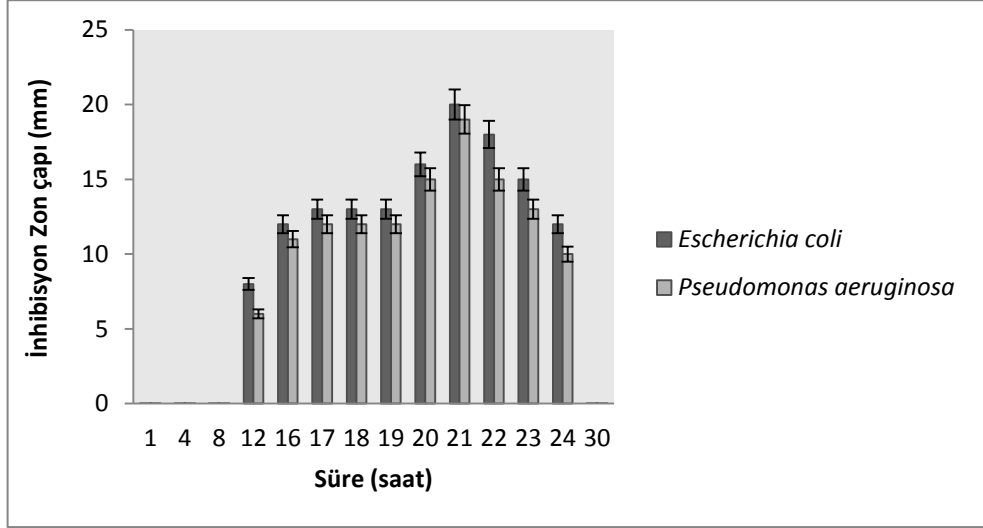
4.3.2. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

E. coli 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarından bakteriyosin üretimi çalışmalarında Luria Bertani Broth besiyerinin uygun besiyeri olarak belirlenmesinin ardından, bakteriyosin üretimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi hedeflendi. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşları, Bölüm 3.5.2' de açıklandığı gibi Luria Bertani Broth besiyerine ekildi, 37 °C' de, 1-30 saat inkübasyona bırakıldı ve belirli aralıklarla örnek alınarak üreme miktarları ölçüldü (Şekil 4.9). Bu süre sonunda indikatör bakteri olan *E. coli* DH5α üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü (Şekil 4. 10).



Şekil 4. 9. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in inkübasyon süresine göre üremelerinin ölçülmesi

* Üretimler 37 °C' de 1-30 saatte gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4. 10. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in inkübasyon süresine göre inhibisyon zonu ölçümleri

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

Bu çalışmaya göre *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarında bakteriyosin üretimi 12. saatten önce ölçülemedi ve bu iki suş için de bakteriyosin aktivitesi 21. saatte en yüksek değere ulaşmaktadır. Her iki suş için de bakteriyosin üretimi logaritmik fazın sonunda başlamaktadır ve durgunluk fazının sonlarına kadar devam etmektedir. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarında indikatör bakteri üzerine oluşan inhibisyon zon çapları, sırasıyla 20 mm ve 19 mm olarak ölçüldü.

Bakteriyosin üretiminde uygun inkübasyon süresinin belirlenmesinin oldukça önemli olduğu görülmektedir. *Pseudomonas fluorescens* ile yapılan bir çalışmada 16 saatin bakteriyosin üretimi için uygun olduğu görülmektedir [158]. *Escherichia coli*' de inkübasyon süresinin bakteriyosin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan diğer bir çalışmada 18 saatin uygun olduğu belirlenmiştir [148]. Diğer çalışmalarda da benzer şekilde 18-22 saat aralığının uygun olduğu saptanmıştır [146; 149; 150; 163]. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu sonuçlarla paralellik göstermektedir. Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz bu maddeler, bakteri üremesinin logaritmik evresinde başlamakta ve durgunluk fazının sonlarına doğru minimum düzeye gerilemektedir.

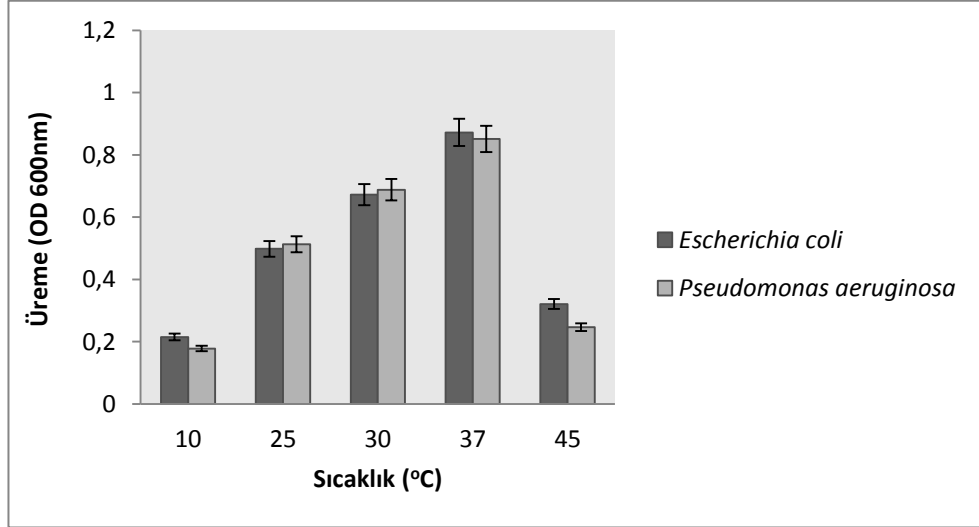
4.3.3. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Inkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Bu çalışmada, *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarından bakteriyosin üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisi araştırıldı. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşları, Bölüm 3.5.3' de açıklandığı gibi Luria Bertani Broth besiyerine ekildi ve 10, 25, 30,

37 ve 45 °C' lere ayarlanmış inkübatörlerde 21 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 4.11). Bu süre sonunda indikatör bakteri üzerine Bölüm 3.4.3' de açıklanan disk difüzyon yöntemi kullanılarak zon çapları ölçüldü (Şekil 4.12).

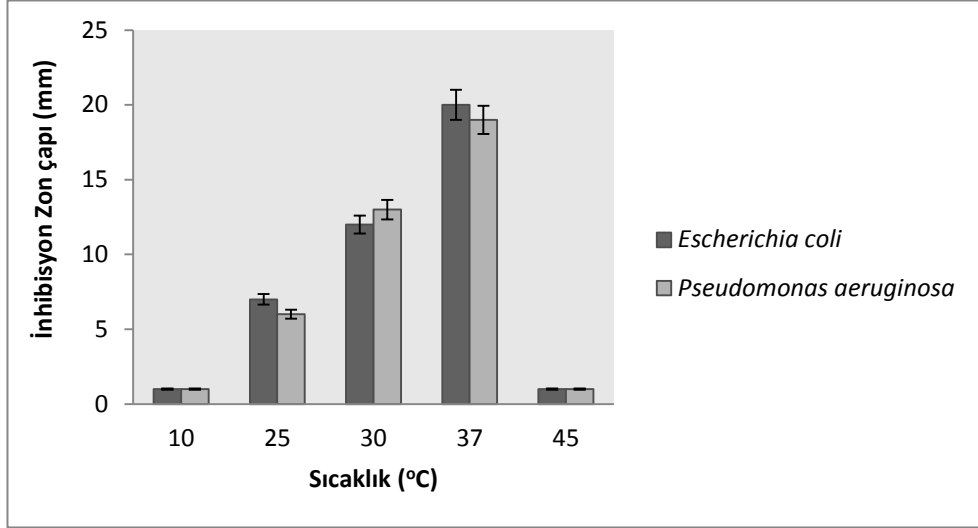
Bakteriyosin üretimine inkübasyon sıcaklığının etkisinin incelendiği çalışmada *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşları ekim sonrası 10, 25, 30, 37 ve 45 °C' lere üretilti. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' in inhibisyon zon çapları sırasıyla 20 ve 19 mm olarak ölçüldü. Bu ölçümlere göre en yüksek bakteriyosin aktivitesine 37 °C' de inkübe edilen ortamlarda rastlandı (Şekil 4.12).

Bakteriyosin üretiminin optimizasyonu için inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi çalışmalarının yapıldığı görülmektedir. Yapılan çalışmalar kapsamında *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* için en uygun inkübasyon sıcaklığı 37 °C olarak saptanmıştır [158;159;160;161;162;163;164;165;168]. Bu bulgular bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir. Bizim çalışmamız kapsamında bakteri üremesi için en uygun sıcaklık olan 37 °C' nin yapılan zon çapı ölçümlerine göre bakteriyosin üretimi için de en uygun sıcaklık olduğu belirlendi.



Şekil 4. 11. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in inkübasyon sıcaklığına göre üremelerinin ölçülmesi

* Üretimler 10, 25, 37 ve 45 °C' lere 21 saatte gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



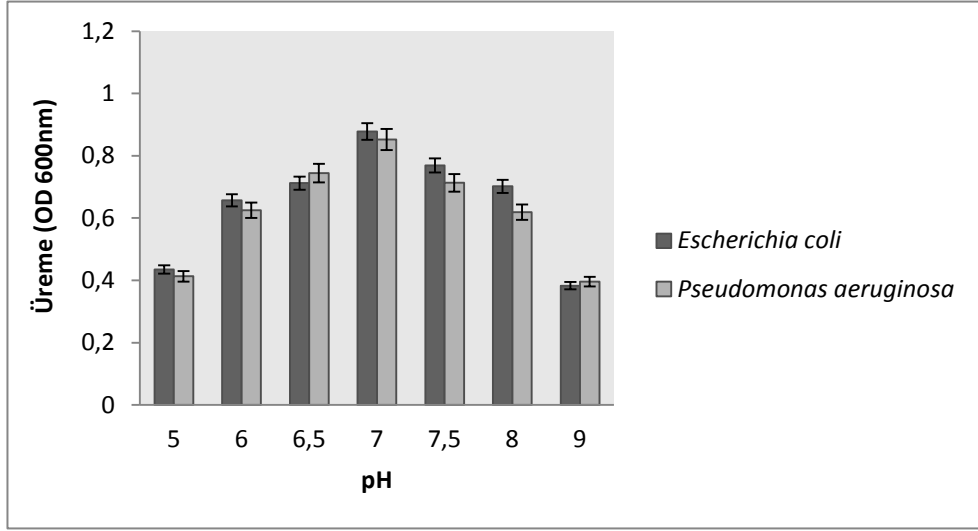
Şekil 4. 12. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in inkübasyon sıcaklığına göre inhibisyon zonu ölçümleri

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

4.3.4. Bakteriyosin Üretimi İçin Uygun Başlangıç pH Değerinin Belirlenmesi

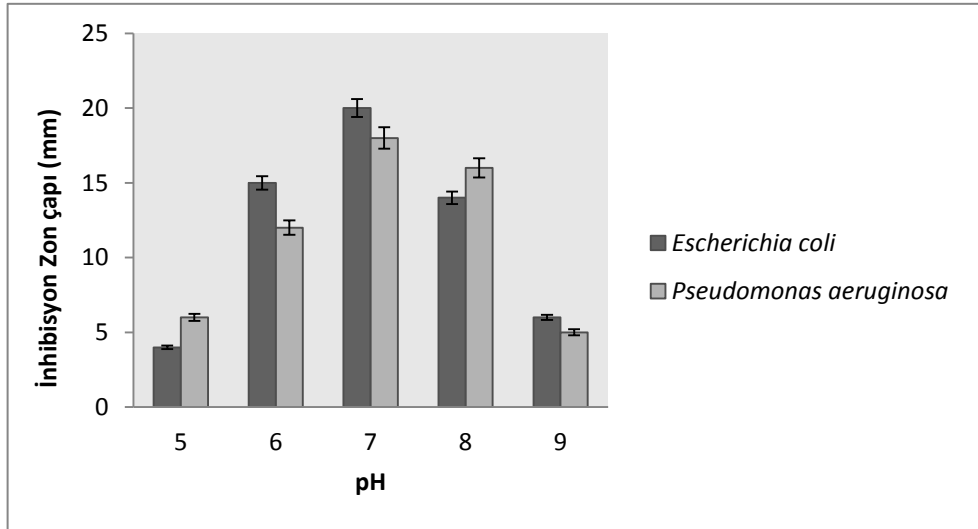
Bu çalışmada, bakteriyosin üretimi için uygun pH değerinin belirlenmesi için, 5,0 ile 8,0 arasında Luria Bertani Broth besiyerlerinde farklı pH ayarları yapıldı. Bu besiyerleri, 37 °C' de 180 rpm çalkalamalı inkübatörde 21 saat üretilen *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' in kültür ortamlarında üreme ve bakteriyosin üretimi saptandı. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' in inhibisyon zon çapları sırasıyla 20 ve 19 mm olarak saptandı. Bu ölçümlere göre en uygun pH değerinin 7,0 olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmada, pH 8' de ölçülen inhibisyon zon çapları bu iki bakteri suşu için farklılık gösterdi. *P. aeruginosa* 8 suşunun, pH 8' deki inhibisyon zon çapı 16 mm olarak ölçülürken, *E. coli* 26S' de inhibisyon zon çapı 14 mm olarak ölçüldü. Bu sonuca göre, *E. coli* 26S suşu, bazik pH' dan diğer suşa göre daha olumsuz etkilenmektedir (Şekil 4.14).

İnkübasyon ortamının pH' sı mikroorganizmaların üremesini etkilemektedir. Her bakterinin üreyebildiği minimum ve maksimum pH değerleri vardır. Literatüre baktığımızda da pH 6,0 - pH 8,0 arası değerlerin bakteri üremesi ve bakteriyosin üretimi için uygun olduğu görülmektedir [167; 169; 170; 171]. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile yapılan benzer bir çalışmada da bulgularımıza paralel olarak pH 7,0' nin bakteriyosin üretimi için uygun olduğu saptanmıştır [148]. Bu çalışma kapsamında bakteri üremesi için en uygun olan pH' nın, bakteriyosin üretimi için de en uygun koşul olan pH 7,0 olduğu saptandı.



Şekil 4. 13. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in başlangıç pH' sına göre üremelerinin ölçülmesi

* Üretimler 37 °C' de 21 saatte gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4. 14. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in başlangıç pH' sına göre inhibisyon zonu ölçümleri

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

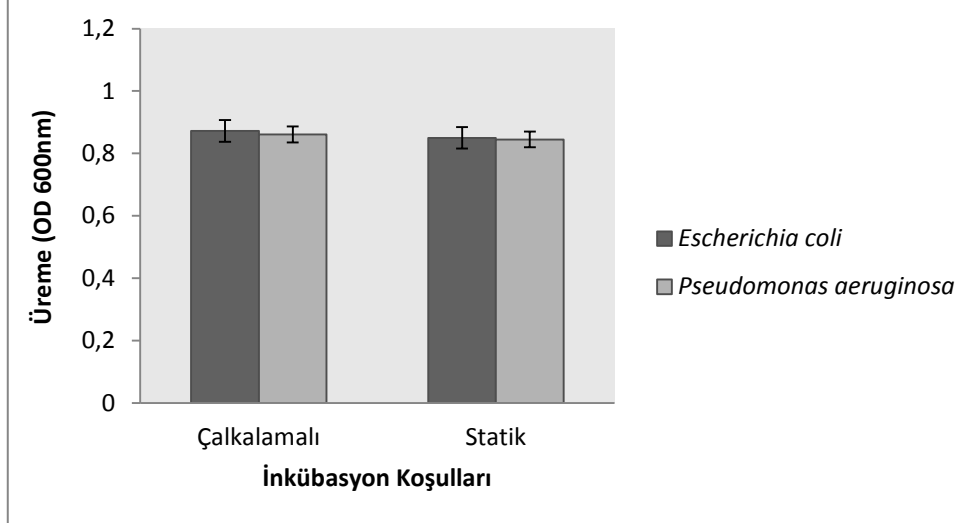
4.3.5. Bakteriyosin Üretimi İçin Çalkalamalı Ve Statik İnkübasyon Koşullarının Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, bakteriyosin üretimi üzerine çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının etkisini belirlemek amacıyla Bölüm 3.5.5' de belirtilen yöntem kullanıldı. Örneklerin bir kısmı çalkalamalı bir kısmı da statik koşullarda üretildi. Bakteriyosin üretiminin bu iki koşuldaki önemli ölçüde etkilenmediği gözlemlendi.

Bakteriyosin üretimi çalışmalarının sıklıkla çalkalamalı inkübasyon koşullarında yapıldığı gözlenmektedir [144;172]. Ancak bizim çalışmamız kapsamında çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarında bakteri üretimi gerçekleştirilip bakteriyosin üretimi açısından aktivite ölçümü yapıldığında bu iki koşul arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Ortamdaki oksijen dağılımının bakteriyosin üretimini etkilemediği belirlendi. Ancak bakteriyosin üretimi açısından endüstriyel ölçekli bir çalışma yapılırsa ortamdaki oksijen dağılımı açısından bu iki koşul değerlendirildiğinde ölçülebilir bir fark oluşabilir.

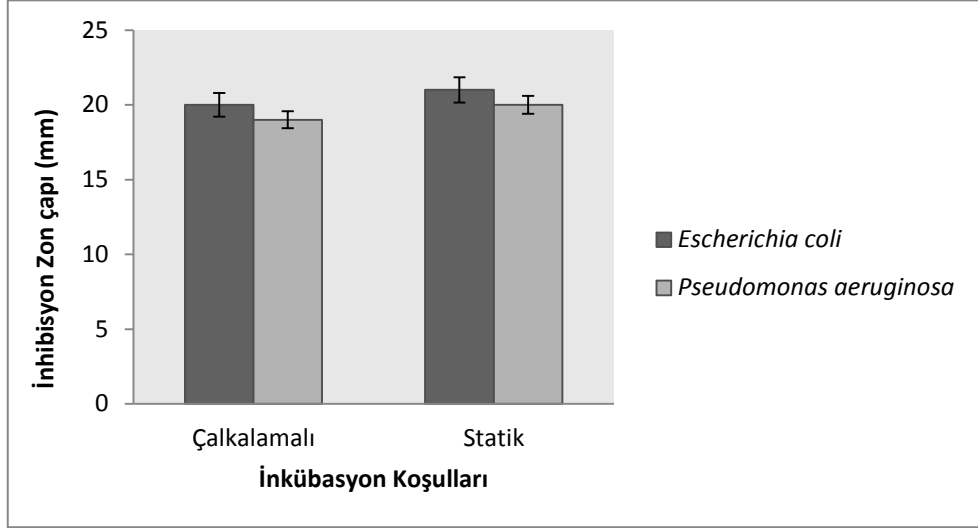
Escherichia coli 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in çalkalamalı ve statik inkübasyon koşulları açısından inhibisyon zon çapları değerlendirildiğinde statik koşullarda sırasıyla 21 ve 20 mm zon çapı ölçüldü.

Bizim çalışmamız kapsamında bakteriyosin üretimleri için çalışılan fizyolojik koşulları karşılaştırdığımızda en etkili faktörlerin inkübasyon sıcaklığı ve başlangıç pH' sı olduğu belirlendi, bu çalışma kapsamında bakteriyosin üretim çalışmalarında en az etkili faktörün ise çalkalamalı ve statik inkübasyon koşulları olduğu saptandı.



Şekil 4. 15. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarına göre üremelerinin ölçülmesi

* Üretimler 37 °C' de 21 saatte gerçekleştirildi. Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4. 16. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarına göre inhibisyon zonu ölçümleri

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

4.4. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in Bakteriyosinlerinin Karakterizasyonları

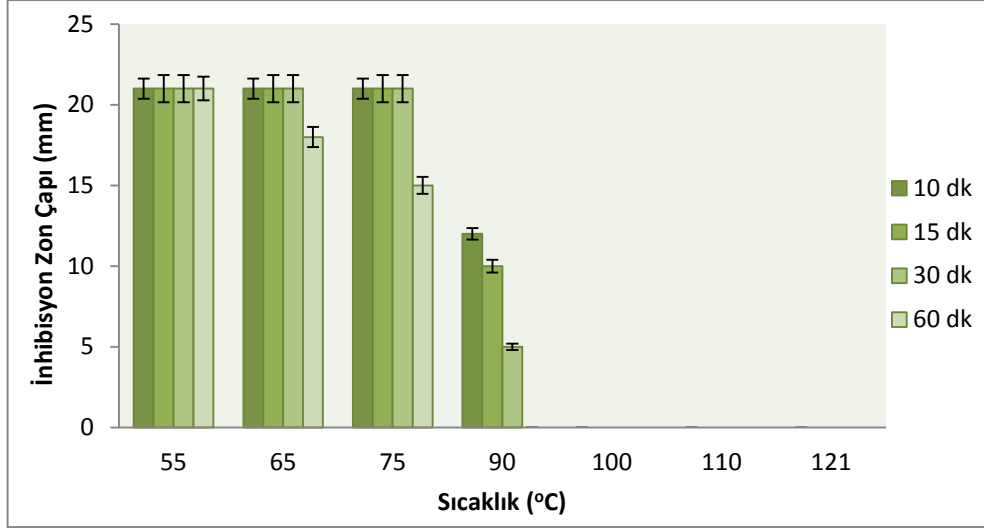
Bakteriyosin karakterizasyon çalışmaları üretilen antibakteriyel maddelerin endüstriyel olarak çeşitli alanlarda kullanılmalarına olanak sağlaması açısından önem taşımaktadır. Farmasötik ya da gıda endüstrisinde kullanım potansiyeli taşımalarından dolayı bu maddelerin yüksek sıcaklık ve depolama koşulları karşısında verdikleri tepkiler belirleyici olmaktadır. Ayrıca bakteriyosin kararlılıklarının belirlenmesi, bakteriyosin örneklerinin saflaştırma aşamalarında kullanılan yöntemlerin seçilmesi için gereklidir. Bu çalışma kapsamında en yüksek antibakteriyel etkiye sahip *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarından elde edilen antibakteriyel maddeler kullanıldı. Çalışmamızda, bu iki bakteriden elde edilen bakteriyosin örnekleri üzerine, sıcaklığın etkisi, organik çözücüler ve deterjanların etkisi ve depolama koşullarının etkisi belirlendi.

4.4.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

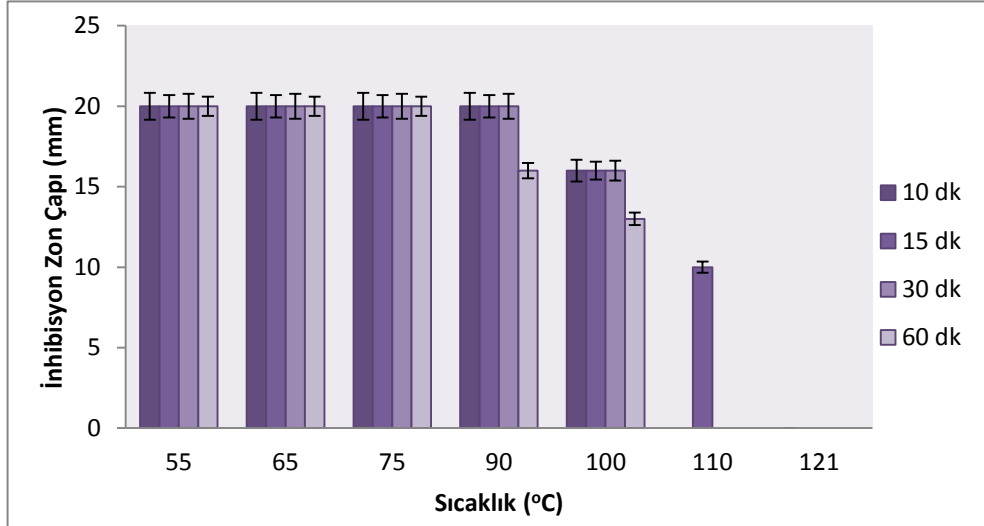
Bakteriyosinlerin, sıcaklık karşısında gösterdiklere tepkilere göre farklı endüstrilerde kullanım potansiyelleri belirlenebilir. Gıda endüstrisinde kullanım potansiyelleri bulunan Gram pozitif bakterilerin bakteriyosinlerinin sıcaklığa dirençli olması tercih edilen bir durumdur [13]. Bir bakteri suşu tarafından üretilen bakteriyosinin saf olarak elde edilebilmesi için de yüksek sıcaklık belirleyici olabilir. Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenebilmesi Bölüm 3.6.1' de

açıklanan yöntem kullanıldı. Bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için bakteriyosin örnekleri, 55, 65 ve 75 °C' de 10, 15, 30 ve 60 dk, 90 °C' de 10, 15, 30 ve 60 dk, 100 °C' de 10, 15, 30 ve 60 dk, 110 ve 121 °C' de 15 dk yüksek sıcaklığa maruz bırakıldı. Bakteriyosin örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri 3.4.3' de açıklanan disk yöntemi kullanılarak belirlendi ve kontrol örneği olarak bakteriyosin örnekleri kullanıldı. Yapılan aktivite ölçümü sonuçlarına göre üretilen bakteriyosin örneklerinin, 55 °C' de 60 dk, 65 ve 75 °C' de 30 dk sonunda aktivitelerini korudukları gözlemlendi. *E. coli* 26S' in bakteriyosininin, 90 °C' de 10. dk' da %57, 15. dk' da %48, 30. dk' da %24 kararlılığını koruduğu belirlendi. *P. aeruginosa* 8' in bakteriyosininin, 110 °C' de 15. dk' da %50 kararlılığını koruduğu belirlendi (Şekil 4.17;Şekil 4.18).

Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenebilmesi için araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalara göre, bakteriyosinler genellikle sıcaklık karşısında farklı tepkiler vermektedir. Yapılan bir çalışmada *Escherichia coli* den elde edilen bakteriyosin 100 °C' de 10 dk kararlılığını korumuştur. *Escherichia coli* ile yapılan bir diğer çalışmada ise bakteriyosin örneği 80 °C' de 30 dk kararlılığını korumuştur. *Escherichia coli* suşlarında yapılan diğer bir çalışmada ise elde edilen bakteriyosin, 121 °C' de 20 dk kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus brevis* türlerinden elde edilen bakteriyosinlerle yapılan bir çalışmada üretilen her iki bakteriyosinin de sıcaklık karşısında dirençli olduğu bildirilmiştir, bu iki bakteriyosin bileşiği de 100 °C' de 30 dk stabilitesini koruduğu saptanmıştır [124;145;158;173;174;175;176]. Bizim çalışmamızda *E. coli* 26S' den elde ettiğimiz bakteriyosinin 75 °C' de 30 dk kararlılığını koruduğu gözlemlendi. Bu bağlamda *E. coli* 26S' den elde edilen bileşiğin sıcaklık karşısında dirençli olduğu saptandı. *P. aeruginosa* 8' den elde ettiğimiz bakteriyosinin ise 90 °C' de 30 dk kararlılığını koruduğu belirlendi. Bu bağlamda *P. aeruginosa* 8' dan elde edilen bakteriyosinin yüksek sıcaklık karşısında *E. coli* 26S' in bakteriyosininden daha dirençli olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 4. 17. *E. coli* 26S' in bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisi
* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4. 18. *P. aeruginosa* 8' in bakteriyosin aktivitesine sıcaklığın etkisi
* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

4.4.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin ve Deterjanların Etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisinin araştırılması sayesinde kültür ortamından bakteriyosini ayırırken ya da bakteriyosin örneğinin saflaştırılma aşamasında, kullanılan organik çözücülerin uygunluğu belirlenebilir [177].

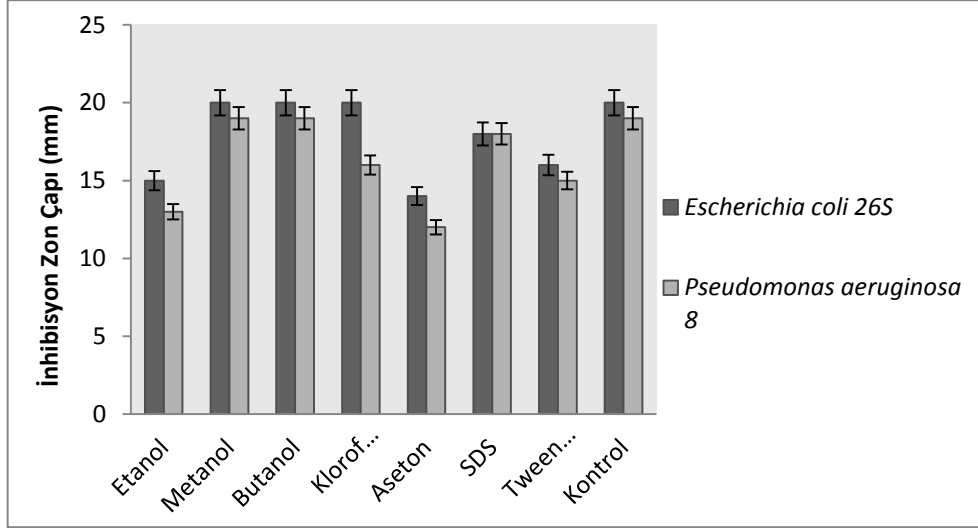
Bu çalışmada, etanol (% 10), metanol (% 10), butanol (% 10), kloroform (% 10) ve aseton (% 10) çözeltileri kullanıldı. Bu çözeltiler, milipor filtrasyon sonucu oluşan bakteriyosin süzüntüleri ile karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bu

işlemin ardından örneklerin antibakteriyel aktivitesi disk yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu çalışmada bakteriyosin örnekleri kontrol olarak kullanıldı.

Bakteriyosin süzüntüleri, sodyum dodesil sülfat ve tween 80 deterjanları % 1 oranında ilave edildikten sonra 37 °C' de 1 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda örneklerin aktivitesi saptandı. Bu çalışmada bakteriyosin örnekleri kontrol olarak kullanıldı.

Bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücüler ve deterjanların etkisi araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. *Pediococcus acidilactici* BA28 ile yapılan bir çalışmada bu bakterinin bakteriyosini, organik çözücülerden izoamil alkol ve formaldehide dirençlidir. Çalışılan diğer organik çözücülerden; etanol, fenol, aseton, asetonitril, kloroform, butanol ve propanol-2 bakteriyosinin aktivitesini sırasıyla %20, %37, %28, %31, %12, %6 ve %18 oranında azaltmıştır [177]. *Pediococcus acidilactici* LAB 5 ile yapılan diğer bir çalışmada ise kullanılan organik çözücüler bakteriyosin aktivitesinde kayba neden olmamıştır [178]. Bizim çalışmamız kapsamında kullanılan organik çözücülerden aseton ve etanol her iki suş için aktivitede ölçülebilir bir kayba neden oldu. Etanol, *E. coli* 26S bakteriyosini üzerinde %25, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerinde ise %32 oranında kayba neden oldu. Aseton, *E. coli* 26S bakteriyosini üzerinde %30, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerinde ise %37 oranında kayba neden oldu. Kloroform ise sadece *P. aeruginosa* 8 tarafından üretilen bakteriyosine etki etmektedir. Bakteriyosin aktivitesinde %16 kayba neden olduğu belirlendi. Metanol ve butanolün her iki suşun bakteriyosinleri üzerine etkisi olmadığı belirlendi. Aseton ve etanol proteinleri çöktürmede kullanılan organik çözücülerdir. Aseton ve etanolle muamele sonucu aktivitenin kısmen kaybolması çalıştığımız maddenin protein yapıda olabileceğini destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmalara göre bakteriyosinlerin deterjanlara karşı değişken karakterde oldukları belirlenmiştir [179;180]. *Pediococcus acidilactici* BA28 ile deterjanlarla yapılan bir çalışmada ise SDS' in %7, Tween 80' in ise %25 oranında kayba neden olduğu belirlenmiştir [177]. SDS' in *E. coli* 26S bakteriyosini üzerine %10, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerinde ise %5 oranında kayba neden olduğu belirlendi. Tween 80' in ise *E. coli* 26S bakteriyosini üzerinde %20, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerine ise %21 oranında kayba neden olduğu belirlendi.



Şekil 4. 19. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' in bakteriyosin aktivitesine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi

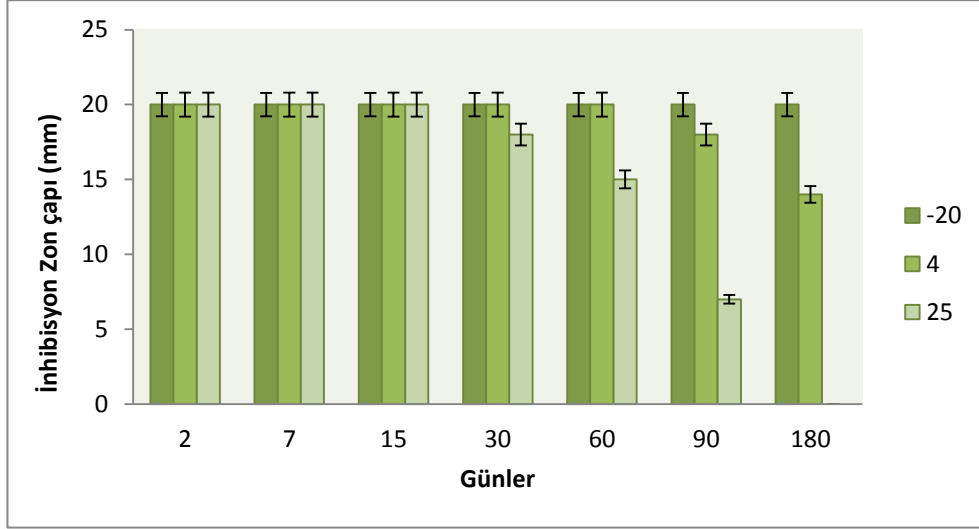
* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

4.4.3. Bakteriyosin Aktivitesine Depolama Sıcaklığı ve Süresinin Etkisi

Depolama sıcaklığı ve süresinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi, bakteriyosinlerin endüstriyel açıdan kullanımında yararlı olabilir. Bu çalışmalara göre bakteriyosinlerin kullanılabilir ömürleri belirlenebilir. Depolama sıcaklığının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde bakteriyosin örnekleri 25 °C' de 2, 7, 11 gün ve 3 ay; +4 ve -20 °C' de 1, 2, 3 ve 6 ay süreyle bekletildi. Belirli aralıklarla örnek alınarak antibakteriyel aktivitesi Bölüm 3.4.3' de açıklandığı gibi disk difüzyon yöntemiyle saptandı. İncelenen maddelerin +4 °C' de 3 aya kadar aktivitelerini kaybetmedikleri gözlemlendi. -20 °C' de ise 6. ayda yapılan inceleme sonucunda aktivitelerini kaybetmedikleri belirlendi (Şekil 4.20;Şekil 4.21).

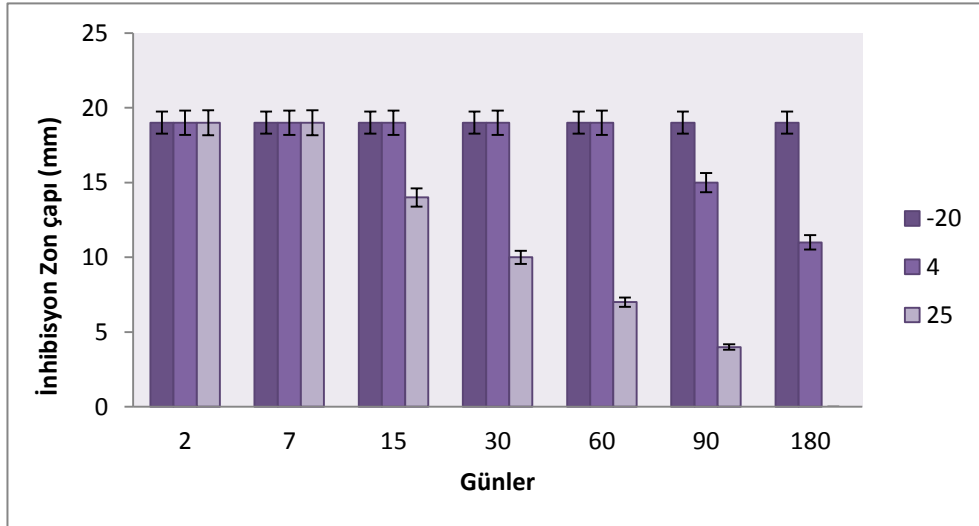
E. coli 26S' in, 25 °C' de, bakteriyosin aktivitesinin, 30. günde % 90, 60. günde % 75, 90. günde % 35 oranında korunduğu belirlendi. 4 °C' de 90. günde % 90, 180. günde ise % 70 oranında korunduğu belirlendi. -20 °C' de bakteriyosin aktivitesinde herhangi bir kayıp belirlenemedi. *P. aeruginosa* 8' in, 25 °C' de, bakteriyosin aktivitesinin,15. günde % 75, 30. günde % 53, 60. günde % 36, 90. günde % 21 oranında korunduğu belirlendi. 4 °C' de 90. günde % 79, 180. günde ise % 59 oranında korunduğu belirlendi. -20 °C' de 6 ayda bakteriyosin aktivitelerinde herhangi bir kayıp belirlenmedi (Şekil 4. 20; Şekil 4. 21).

Depolama sıcaklığı ve süresinin bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi, *P. aeruginosa*'nın bakteriyosinleri ile yapılan bir çalışmada görülmektedir. Bu maddelerin, 4 °C' de 4 ay ve -20 °C' de 8 ay kararlılıklarını korudukları saptanmıştır [180]. Bizim çalışmamız kapsamında elde edilen bakteriyosinlerde de bu çalışmaya benzer sonuçlar gözlemlendi.



Şekil 4. 20. *E. coli* 26S' in bakteriyosin aktivitesine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisinin belirlenmesi

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 4. 21. *P. aeruginosa* 8' in bakteriyosin aktivitesine depolama sıcaklığı ve süresinin etkisinin belirlenmesi

* Sonuçlar üç çalışmanın ortalamasıdır. Standart sapmalar grafik üzerinde gösterilmektedir.

4.5. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' in Bakteriyosinlerinin Kısmi Saflaştırılması

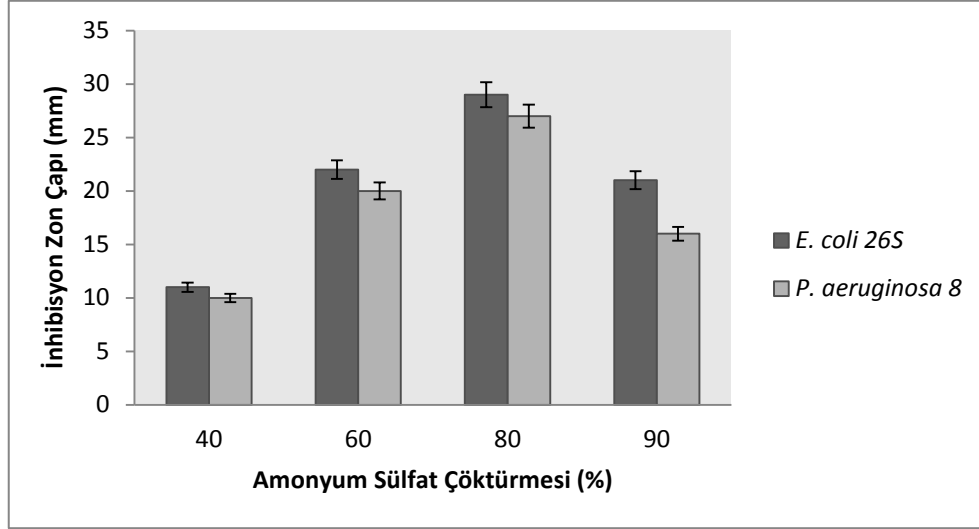
Bakteriyosinlerin, biyokimyasal yapılarının tam olarak aydınlatılması bu maddelerin homojen olarak saflaştırılmalarına bağlıdır. Bakteriyosinler saflaştırılırken ilk aşamada kullanılan amonyum sülfat çöktürmesi tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemin öncelikli amacı çalışma hacmini azaltarak saflaştırılmak istenen maddeyi yoğunlaştırmak ve ortamda istenmeyen bileşikleri çalışma ortamından uzaklaştırmaktır [71;72].

4.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Escherichia coli 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8' den elde edilen milipor filtreden geçirilmiş kültür sıvılarındaki proteinleri çöktürmek için Bölüm 3.7.1' de açıklanan yöntem kullanıldı. Bu çalışma kapsamında *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşları için değişik oranlarda amonyum sülfatla protein çöktürmesi yapıldı. Bu çalışmaya göre *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşları için %80 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu saptandı (Şekil 4.22). Aynı suşların %80 oranında amonyum sülfat uygulanmış supernatant kısımlarında da aktivite ölçüldü ve antibakteriyel aktivite saptanmadı. Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra oluşan pelletlerde disk difüzyon yöntemiyle bakteriyosinlerin aktiviteleri belirlendi.

Gram negatif bakteri bakteriyosinlerinin, amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada *Escherichia coli* gibi enterik bakteriler tarafından üretilen bir bakteriyosin olan Mikrosin J25' in saflaştırılmasında %95 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu belirlenmiştir [148]. Kolisinlerle yapılan bir araştırmada ise %60-80 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu belirlenmiştir [181]. *Pseudomonas aeruginosa* bakteriyosinleri ile yapılan bir çalışmada ise %80 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu saptanmıştır [182]. Yapılan başka bir çalışmada *Shigella sonnei* de bakteriyosin üretimi incelenmiş ve %75 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu belirlenmiştir [183]. Bu çalışmalarla paralel olarak bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' den elde edilen kısmi olarak saflaştırılmış bakteriyosin, amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında aktivitelerini arttırdıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Bu bağlamda *E. coli*

26S' in bakteriyosini aktivitesini %42 oranında arttırdığı gözlenirken, *P. aeruginosa* 8' in bakteriyosini ise aktivitesini %35 oranında arttırdığı gözlemlendi.



Şekil 4. 22. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8' in amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan pelletlerin disk difüzyon yöntemiyle aktivitelerinin ölçülmesi

4.6. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıkları ve Bakteriyosin Üretimlerinin Karşılaştırılması

Bakteriyosin üretebilen bakteriler ürettikleri antibakteriyel maddelerle, bu maddelere duyarlı bakterileri etkilemektedir. Bakteriyosin üretimi ve antibiyotik dirençliliği ile ilgili yapılan bir çalışmada bakteriyosin üreticisi *Enterococcus faecium* suşlarının klinik önemi olan antibiyotiklere karşı dirençli olmadığı saptanmıştır [184]. Bu olgudan yola çıkarak çalışmamız kapsamında kullanılan *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik dirençleri ve bakteriyosin üretme kapasiteleri arasındaki ilişki incelendi.

4.6.1. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmamız kapsamında *E. coli* suşlarının; Amikasin, Gentamisin, Ampisilin-Sulbaktam, Sefepim, Siprofloksasin, Norfloksasin, İmipenem, Meropenem ve Piperasilin-Tazobaktam ve *P. aeruginosa* suşlarının; Amikasin, Gentamisin, Sefepim, Siprofloksasin, Norfloksasin, İmipenem, Meropenem ve Piperasilin-Tazobaktam antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları belirlendi (Çizelge 4.2;Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 2. E. coli suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Suş No	Amikasin	Gentamisin	Ampisilin-Sulbaktam	Sefepim	Siprofloksasin	Norfloksasin	Imipenem	Meropenem	Piperasiilin-Tazobaktam
<i>E. coli</i> 26S	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 35K	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 1	H	H	D	D	D	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 2	H	H	D	D	D	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 3	H	H	D	D	D	D	H	H	D
<i>E. coli</i> 4	H	H	I	H	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 6	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 7	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 8	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 9	H	D	D	D	D	D	H	H	D
<i>E. coli</i> 10	H	H	D	I	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 11	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 12	H	D	I	H	D	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 13	H	H	I	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 14	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 15	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 16	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 17	H	H	I	H	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 18	H	H	I	H	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 19	H	H	D	I	D	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 20	D	D	D	D	D	D	D	D	D
<i>E. coli</i> 21	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 22	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 23	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 24	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 25	H	H	D	D	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 26	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 27	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 28	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 29	H	H	D	D	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 30	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 31	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 32	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 33	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 34	H	H	I	H	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 35	H	H	D	H	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 36	H	H	D	D	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 37	H	H	I	H	D	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 38	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 39	H	H	D	D	D	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 40	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 41	H	D	D	D	D	D	H	H	D
<i>E. coli</i> 42	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 43	H	D	D	D	H	D	H	H	D
<i>E. coli</i> 44	H	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 45	H	S	H	H	H	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 46	H	S	D	H	D	H	H	H	D
<i>E. coli</i> 47	H	S	D	D	D	I	H	H	D
<i>E. coli</i> 48	H	S	H	H	H	H	H	H	H
<i>E. coli</i> 49	H	S	D	D	H	H	H	S	D
<i>E. coli</i> 50	H	S	H	H	H	H	H	S	H

D: Dirençli I: Orta Derece Duyarlı H: Hassas

Çizelge 4. 3. *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Suş No	Amikasin	Gentamisin	Piperasilin-Tazobaktam	Sefepim	Siprofloksasin	Norfloksasin	Imipenem	Meropenem
<i>P. aeruginosa</i> 1	D	D	H	D	D	H	D	D
<i>P. aeruginosa</i> 2	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 3	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 4	D	D	D	D	D	H	D	H
<i>P. aeruginosa</i> 5	H	D	H	H	H	D	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 6	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 7	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 8	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 9	H	D	H	D	H	D	D	D
<i>P. aeruginosa</i> 10	H	D	D	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 11	H	H	H	D	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 12	H	D	H	D	H	D	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 13	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 14	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 15	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 16	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 17	D	D	H	H	H	D	H	D
<i>P. aeruginosa</i> 18	H	D	H	D	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 19	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 20	H	D	H	D	H	D	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 21	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 22	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 23	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 24	H	D	H	H	D	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 25	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 26	H	H	H	H	H	I	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 27	H	D	H	D	D	D	D	D
<i>P. aeruginosa</i> 28	H	H	H	H	H	H	H	H
<i>P. aeruginosa</i> 29	H	D	H	D	H	D	D	H
<i>P. aeruginosa</i> 30	H	D	H	D	D	D	D	H

D: Dirençli I: Orta Derece Duyarlı H: Hassas

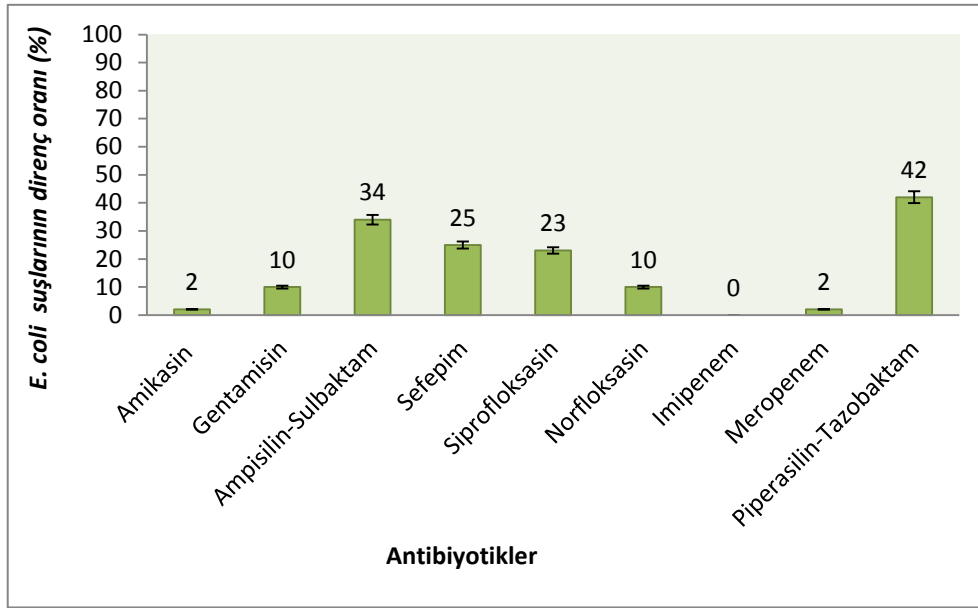
Çalışmamızda kullanılan en yüksek bakteriyosin üretimi görülen *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27 ve *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 22 suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlı oldukları belirlendi.

Escherichia coli ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları önemli nozokomiyal infeksiyonlardan (pnömoni, idrar yolu infeksiyonu, intraabdominal infeksiyonlar, deri-yumuşak doku infeksiyonları vb) sorumludur. Bu bağlamda *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi bakterilerin antibiyotiklere çoklu direnç kazanması önemli toplum sağlığı sorunlarından. Çoklu ilaç direnci kazanan Gram negatif enterik bakterilerin oluşması özellikle sağlığı tehdit eden infeksiyonların yönetiminde büyük bir problem oluşturmaktadır. Yanlış ve uygun olmayan antibiyotik kullanımı, bakterilerde direnç gelişimini arttırmakta, hastanelerdeki yoğun antibiyotik baskısı da bu dirençli suşların seçilmesine neden olmaktadır [185]. Bu nedenle yeni

antibakteriyel etkili maddelerin araştırılması ve bu maddelerin de spesifik olarak hastalık etkeni olan bakterileri etkilemesi bu suşlarla mücadelede önemlidir.

4.6.2. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Direnç Oranlarının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* suşlarının kullanılan 9 farklı antibiyotiğe direnç oranları incelendiğinde, en yüksek direnç oranının, %42 ile piperasilin-tazobaktam antibiyotiği olduğu, en düşük antibiyotik direnç oranının imipenem antibiyotiğine olduğu saptandı (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23. Çalışmada kullanılan *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç oranları

* Antibiyotik direnç oranları Bölüm 3.8.2' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

Tolun ve arkadaşları tarafından 2002' de yapılan bir çalışmada hastane kaynaklı *E. coli* suşlarında gentamisin ve amikasin antibiyotiklerine dirençleri sırasıyla %13.1 ve %1.9 olarak bulunmuştur [186]. 2002 yılında yapılan diğer bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarında, bu iki antibiyotiğe direnç oranlarını sırasıyla %29.1 ve %9.2 saptamışlardır [187]. 2012' de, 561 *E. coli* suşu ile yapılan bir çalışmada ise gentamisin antibiyotiğine direnç oranı %15.1 saptanırken, amikasin antibiyotiğine direnç oranı %1.8 olarak belirlenmiştir [188]. Bizim çalışmamızda *E. coli* suşlarında bu çalışmalarla paralel şekilde gentamisin ve amikasin antibiyotiklerine direnç sırasıyla %15 ve %2 olarak saptandı (Şekil 4.23).

Kinolonlar, komplike ve komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonları tedavisinde sık tercih edilen antibiyotiklerdir. Araştırmacılar hastane kaynaklı *E. coli* suşlarında kinolon duyarlılığını değişik oranlarda saptamışlardır. 1994 yılında yapılan bir çalışmada siprofloksasin antibiyotiğine direnç %4.4, 2000 yılında %10.3, 2002' de %35.5, 2012' de bu direnç artışının aksine %19.4 olarak saptanmıştır [186;188;189]. Çalışmamızda siprofloksasin antibiyotik direnci %31 olarak bulundu. Çalışmada kullanılan bir diğer kinolon, norfloksasin antibiyotiğidir. 2000-2004 yılları arasında *E. coli* suşlarında yapılan bir çalışmada norfloksasin antibiyotik direnci %11' den %43' e yükseldiği görülmüştür [190]. Nepal' de yapılan çalışmada siprofloksasin direncinin %45, norfloksasin direncinin %21.6 olduğu belirlenmiştir [191]. Çalışmamızda norfloksasin antibiyotik direnci %10 olarak bulundu (Şekil 4.23).

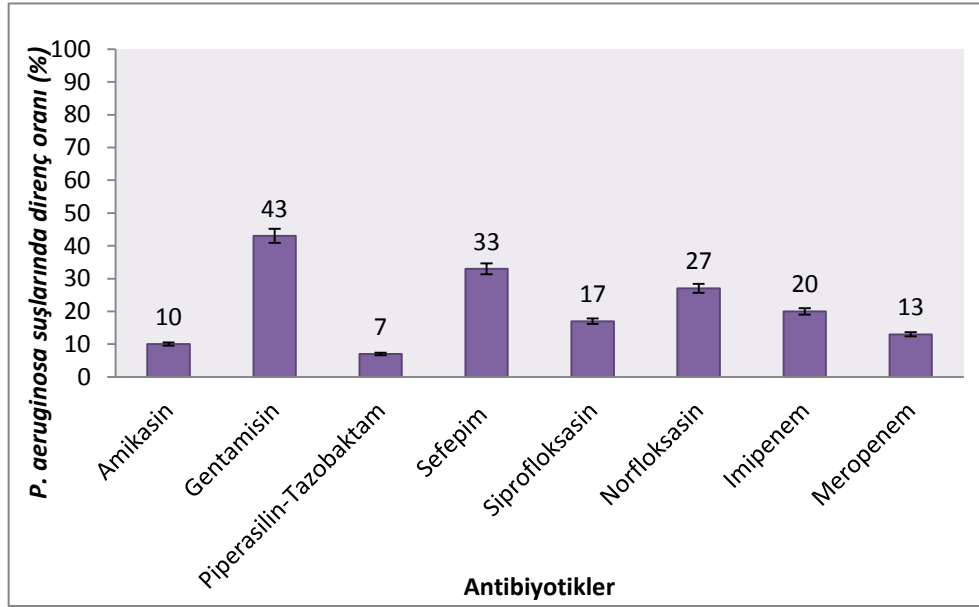
Çalışmamız kapsamında diğer bir antibiyotik grubu olan sefemlerden sefepim antibiyotiği kullanıldı. *E. coli* suşları ile yapılan çalışmada sefepim antibiyotiğine direnç oranı 1996-2001 yılları arasında %2.78, 2002-2007 yılları arasında %14.17, 2008-2012 yılları arasında %18.7 olarak bulunmuştur [192]. 2011 yılında 255 *E. coli* suşuyla yapılan başka bir çalışmada sefepim antibiyotiğine direnç oranı %28.6 olarak belirlenmiştir [193]. Bizim çalışmamız kapsamında sefepime antibiyotiğine direnç oranı %25 olarak saptandı (Şekil 4.23).

Meropenem ve imipenem antibiyotikleri klinik uygulamada en sık kullanılan karbapenem grubu antibiyotikler olarak karşımıza çıkmaktadır [194]. 2006 yılında meropenem antibiyotiğiyle yapılan bir çalışmada ise *E. coli* suşlarında antibiyotik direnç oranı %2 olarak bulunmuştur [195]. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak meropenem antibiyotiğine direnç oranı %2 olarak bulundu. *E. coli* suşları ile yapılan çalışmada imipenem antibiyotiğine direnç oranı 1996-2001 yılları arasında %4.16, 2002-2007 yılları arasında %2.66, 2008-2012 yılları arasında %2.85 belirlenmiştir [192]. Bizim çalışmamızda imipenem antibiyotiğine dirençli *E. coli* suşu saptanmadı (Şekil 4.23).

E. coli suşlarında, piperasilin-tazobaktam antibiyotiğine direnç oranları 2006' da %46.6 ve 2011' de %45 olarak belirlenmiştir [196;197]. Bizim çalışmamız kapsamında piperasilin-tazobaktam antibiyotiğine direnç oranı %42 olarak belirlendi (Şekil 4.23).

Çalışmamızda hastane kaynaklı *E. coli* suşlarında ampisilin-sulbaktam ve siprofloksasine antibiyotiklerine yüksek oranda direnç geliştiği, imipenem antibiyotiğinin ise en etkili antibiyotik olduğu saptandı (Şekil 4.23).

Çalışma kapsamında, *P. aeruginosa* suşlarının gentamisin, amikasin, piperasilin-tazobaktam, sefepim, siprofloksasin, norfloksasin, imipenem, meropenem antibiyotiklerine direnç oranları belirlendi. *P. aeruginosa* suşları, ampisilin-sulbaktam antibiyotiğine karşı dirençli olduğu bilindiği için bu antibiyotik kullanılmadı [186]. *P. aeruginosa* suşlarının kullanılan antibiyotiklere direnç oranları incelendiğinde, en yüksek direnç oranının %43 ile gentamisin antibiyotiğine olduğu, en düşük antibiyotik direnç oranının piperasilin-tazobaktam antibiyotiğine olduğu belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4. 24. Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranları

* Antibiyotik direnç oranları Bölüm 3.8.2' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

Pseudomonas aeruginosa suşları hastane ortamında yaygın olarak bulunan, özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hasta örneklerinden sık izole edilen bakterilerdir. Nemli ortamları tercih etmesi nedeniyle hastanelerde solunum destek sistemlerinde üreyebilmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlar içinde önemli bir yer alan *P. aeruginosa* hastane kaynaklı pnömonilerin %38' inden sorumlu tutulmaktadır ve karbapenem dahil pek çok antibiyotiğe direnç kazanması nedeniyle güncel bir sorun olarak önemini korumaktadır [198].

Latin Amerika'da yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* suşları için antibiyotik direnç oranlarının 1997- 2001 yılları arasında yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Antibiyotik direnç oranları 2001 yılında sefepim antibiyotiği için %45, piperasilin-tazobaktam antibiyotiği için %35, imipenem antibiyotiği için %38, amikasin antibiyotiği için %35, siprofloksasin antibiyotiği için %50 olarak bulunmuştur [199]. EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System- Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi) tarafından yayınlanan raporda Avrupa ülkelerinde *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnç oranları incelenmiştir. Bu raporda antibiyotik direnç oranları, Sefalosporinlere %3-44 arasında, florokinolonlara %1-49, aminoglikozidlere %1-56 arasında, karbapenemlere %3-48 arasında bulunmuştur [200]. Ülkemizde değişik coğrafik bölgelerinde de *P. aeruginosa* suşları ile yapılan çalışmalarda ise antibiyotik direnç oranlarında farklılıklar gözlenmektedir. Gür ve arkadaşları tarafından yapılan çok merkezli bir çalışmada, *P. aeruginosa* suşlarında, karbapenem dışı beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç oranlarını %30-97, imipeneme %29, siprofloksasine %50, aminoglikozidlere %26-73 olarak bildirmişlerdir [201]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç oranları, 1999-2002 yılları arasında aminoglikozid grubu antibiyotiklere %16.3, kinolonlara %14.9, karbapenemlere %6 ve karbapenem dışı beta-laktam antibiyotiklere %7.5, 2002' de imipenem antibiyotiğine direnç %18, meropenem antibiyotiğine direnç %17, gentamisin antibiyotiğine direnç %64, amikasin antibiyotiğine direnç %27, siprofloksasin antibiyotiğine direnç %40 ve norfloksasin antibiyotiğine direnç %30, 2004 yılında aminoglikozid grubu antibiyotiklere %20.5, kinolonlara %35.6, karbapenemlere %32.9, karbapenem dışı beta-laktam antibiyotiklere %24.6, 2011 yılında amikasin antibiyotiğine direnç %8.2, piperasilin-tazobaktam antibiyotiğine direnç %15.4, siprofloksasin antibiyotiğine direnç %20.5, sefepim antibiyotiğine direnç %25.5, meropenem antibiyotiğine direnç %43.9, imipenem antibiyotiğine direnç %61.2 olarak direnç saptanmıştır [202,203,204;205]. Bizim çalışmamız kapsamında kullanılan *P. aeruginosa* suşlarında, amikasin antibiyotiğine direnç %10, gentamisin antibiyotiğine direnç %43, piperasilin-tazobaktam antibiyotiğine direnç %7, sefepim antibiyotiğine direnç %33, siprofloksasin antibiyotiğine direnç %17, norfloksasin antibiyotiğine direnç %27, imipenem antibiyotiğine direnç %20 ve meropenem antibiyotiğine direnç %13 olarak belirlendi (Şekil 4.24). Bu sonuçlara göre *P. aeruginosa* suşları için en etkili antibiyotikler piperasilin-tazobaktam ve

amikasin olarak saptandı. Sonuç olarak *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere yüksek oranda direnç görülmektedir (Şekil 4.24). Bu direnç mekanizmalarının bilinmesi ve yayılımının önlenmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda akılcı antibiyotik kullanımı ve yeni antimikrobiyal maddelerin keşfi konuları önem kazanmaktadır.

Literatürde *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında bakteriyosin üretimleri ve antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişkinin incelenmesi bağlamında bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu bağlamda farklı suşlarla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. 2012' de *Listeria monocytogenes* dahil Gram pozitif bakteri türlerine karşı güçlü antibakteriyel etkiye sahip bakteriyosin üreticisi *Enterococcus hirae* suşları ile yapılan bir çalışmada suşların kullanılan antibiyotiklere duyarlı oldukları saptanmıştır [206]. Daha önce belirttiğimiz gibi 2013 yılında *Enterococcus faecium* suşlarında yapılan çalışmada ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, streptomisin, sülfametoksazol-trimetoprim ve vankomisin antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlenmiştir [184].

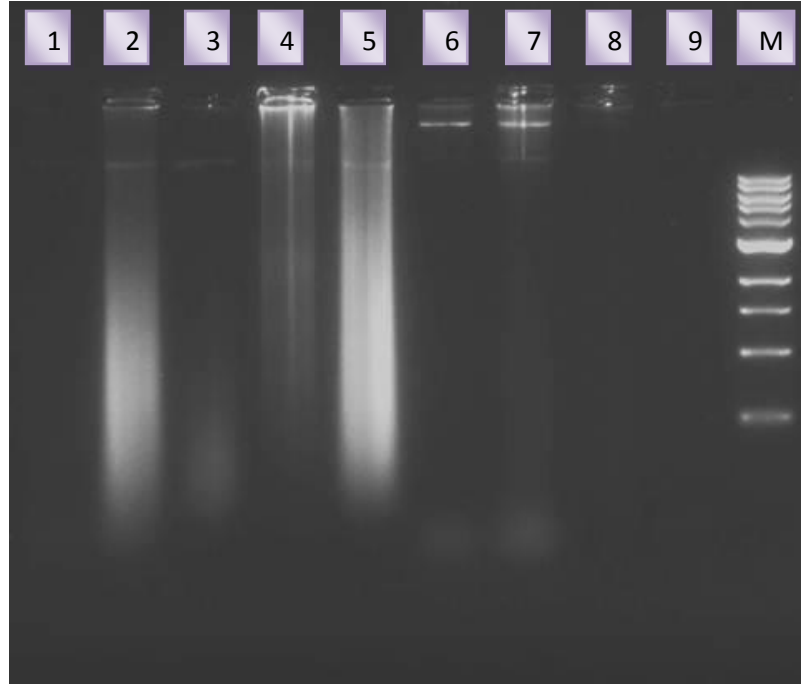
Bizim çalışmamız kapsamında kullanılan *Escherichia coli* suşlarında bakteriyosin üretimi ile antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişkinin incelenmesi sonucunda tüm en yüksek bakteriyosin üretimi görülen *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27 ve *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 22 suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlı oldukları belirlendi.

4.7. *Escherichia coli* 26S ve *Pseudomonas aeruginosa* 8 Suşlarından Plazmid DNA' larının İzolasyonu ve Jel Elektrofrezisi ile Analizi

Gram negatif bakterileri bakteriyosinlerinden en çok çalışılan *Escherichia coli* tarafından üretilen, hücre membranında por oluşturmak ya da DNA, tRNA, rRNA üzerine nükleaz aktivitesi göstermek gibi çeşitli etkileri olan kolisinlerdir. Bu maddeler, Gram negatif bakterilerin bakteriyosinlerini iyi bir şekilde temsil etmelerine rağmen bakteriyosin ailesinin alt grupları arasında farklılıklar oldukça fazladır. Bu bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler plazmid, kromozom ya da her ikisi üzerinden kodlanabilirler [18; 21; 22; 24; 26].

Çalışmamızda, antibakteriyel aktiviteye sahip *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarından plazmid DNA izolasyonu amaçlandı. *E. coli*' den *E. coli* 35K, *E. coli* 26S, *E. coli* 6, *E. coli* 14, *E. coli* 27, *E. coli* 33, *E. coli* 38, *E. coli* 48, *E. coli* 50 suşları

kullanıldı. *P. aeruginosa*' dan *P. aeruginosa* 3, *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 9, *P. aeruginosa* 10, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 16, *P. aeruginosa* 17, *P. aeruginosa* 22, *P. aeruginosa* 23 suşları kullanıldı. Bu suşlardan Bölüm 3.9' da belirtildiği şekilde plazmid DNA izolasyonu yapıldı. Agaroz jel elektroforezi sonucuna göre *E. coli* 35K, *E. coli* 6, *E. coli* 33, *E. coli* 38, *E. coli* 48, *E. coli* 50 suşlarında plazmid DNA fragmentlerinin varlığı saptandı. *P. aeruginosa* 3, *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 9, *P. aeruginosa* 10, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 16, *P. aeruginosa* 17, *P. aeruginosa* 22, *P. aeruginosa* 23 suşlarının ise herhangi bir plazmid DNA fragmenti taşımadığı belirlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4. 25. *Escherichia coli* suşlarında plazmid izolasyonunun agaroz jelde görüntülenmesi

* Çalışmada kullanılan suşlar; *E. coli* 26S (1), *E. coli* 6 (2), *E. coli* 35K (3), *E. coli* 33 (4), *E. coli* 38 (5), *E. coli* 48 (6), *E. coli* 50 (7), *E. coli* 27(8), *E. coli* 14 (9)

** Jel görüntüleme için; Gel Logic 200 Molecular Imaging System (Kodak, Rochester) kullanıldı.

*** 1 kb DNA Marker (M) [208]

Literatüre baktığımızda, *Escherichia coli* suşları bakteriyosinlerinin plazmid ya da kromozom üzerinden kodlandığı belirlenmiştir. Dizi analizi açısından kolisinlerle benzerlik gösteren, *Pseudomonas aeruginosa* suşları tarafından üretilen nükleaz

aktivitesine sahip piyosinlerin ise kendi kromozomları üzerinden üretildiği bilinmektedir [207]. Gram negatif enterik bakterilerden olan *Serratia marcesens*' in bakteriyosinleri kolisinlerle yakından ilişkilidir ancak bu bakterinin bakteriyosinleri hem plazmid hem de kromozom üzerinden üretilmektedir [53;54;208]. Bizim çalışmamız kapsamında kullanılan en yüksek verimli *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarında plazmid DNA saptanmadığı için bakteriyosin üretiminin kromozom üzerinden kodlandığı düşünülmektedir.

Özetle;

- Çalışmamızda ilk olarak, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve identifikasyonları yapılmış olan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinden 105 bakteri suşunun antibakteriyel madde üretimleri araştırıldı.
- Yapılan testler sonucunda kullanılan bakterilerden en yüksek antibakteriyel etkiye sahip suşlar olarak, *Escherichia coli* den *E. coli* 26S, *E. coli* 14, *E. coli* 27 ve *Pseudomonas aeruginosa*' dan *P. aeruginosa* 8, *P. aeruginosa* 15, *P. aeruginosa* 22 seçildi. Proteinaz K ve tripsin uygulanması sonucunda bu suşlardan elde edilen antibakteriyel maddelerin proteolitik enzimlere kısmen ya da tamamen hassas olduğu belirlendi.
- Uygun yöntemin belirlenmesi amacıyla, modifiye damlatma, kuyucuk ve disk difüzyon yöntemleri arasından en uygun yöntemin disk difüzyon yöntemi olduğu belirlendi. En yüksek verimli bakteriyosin üretici suşlar olarak *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 seçildi.
- *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarının bakteriyosin üretimleri için fizyolojik koşulların optimizasyonu gerçekleştirildi. En verimli bakteriyosin üretimleri her iki bakteri suşu için de Luria Bertani Broth besiyerinde, pH 7,0' de 37 °C ve 21 saatte gerçekleştirildi. Bakteriyosinlerin üretimleri, bakteri üremesinin logaritmik evresinde başlamakta ve durgunluk fazının sonlarında minimum düzeye gerilemektedir. Çalkalamalı ve statik koşulların ise antibakteriyel madde üretimine en az etkili faktör olduğu belirlendi.
- Bakteriyosinlerin kararlılık süreçlerini etkileyen çeşitli parametreler araştırıldı. Bu bağlamda bakteriyosinlerin, yüksek sıcaklığa, depolama koşullarına, bazı organik çözücülere, deterjanlara ve kimyasallara karşı duyarlılığı belirlendi.

- *E. coli* 26S' den elde edilen bakteriyosinin 75 °C' de 30 dk ve *P. aeruginosa* 8' den elde ettiğimiz bakteriyosinin 90 °C' de 30 dk kararlılığını koruduğu saptandı. Her iki bakteriyosin örneğinin yüksek sıcaklık karşısında dirençli ve endüstriyel uygulamalarda tercih edilebilir oldukları belirlendi.
- Kullanılan organik çözücülerden aseton ve etanol her iki suş için de kayba neden oldu. Etanol, *E. coli* 26S bakteriyosini üzerinde %25, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerinde ise %32 oranında kayba neden oldu. Aseton, *E. coli* 26S bakteriyosini üzerinde %30, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerinde ise %37 oranında kayba neden oldu. Kloroform ise *P. aeruginosa* 8 tarafından üretilen bakteriyosine etki etmektedir ve bakteriyosin aktivitesinde %16 kayba neden olduğu saptandı. Metanol ve butanolün her iki suşun bakteriyosinleri üzerine etkisi olmadığı belirlendi. SDS' in *E. coli* 26S bakteriyosini üzerine %10, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerinde ise %5 ve Tween 80' in ise *E. coli* 26S bakteriyosini üzerinde %20, *P. aeruginosa* 8 bakteriyosini üzerine ise %21 oranında kayba neden olduğu belirlendi.
- *E. coli* 26S' in, 25 °C' de, bakteriyosin aktivitesinin, 30. günde % 90, 60. günde % 75, 90. günde % 35 oranında korunduğu belirlendi. 4 °C' de 90. günde % 90, 180. günde ise % 70 oranında korunduğu belirlendi. *P. aeruginosa* 8' in, 25 °C' de, bakteriyosin aktivitesinin, 15. günde % 75, 30. günde % 53, 60. günde % 36, 90. günde % 21 oranında korunduğu belirlendi. 4 °C' de 90. günde % 79, 180. günde ise % 59 oranında korunduğu belirlendi. -20 °C' de 6 ayda bakteriyosin aktivitelerinde herhangi bir kayıp belirlenmedi.
- Üretilen bakteriyosinlerin kısmi saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 bakteriyosinleri için %80 oranında amonyum sülfat çöktürmesinin uygun olduğu saptandı.
- Kullanılan *E. coli* suşlarından tüm antibiyotiklere duyarlı olanlarda antibakteriyel madde üretimi saptandı. *E. coli* suşlarına benzer olarak *P. aeruginosa* suşlarında tüm antibiyotiklere duyarlı olan suşlarda en yüksek bakteriyosin üretimi saptandı. Ancak *P. aeruginosa* suşlarında bir ya da daha fazla antibiyotiğe dirençli suşlarda da antibakteriyel madde üretimi olduğu belirlendi.

- Plazmid DNA izolasyonu sonucunda *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarında plazmid DNA saptanmadığı için bakteriyosin üretiminin kromozom üzerinden kodlandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmaların sonucunda *E. coli* 26S ve *P. aeruginosa* 8 suşlarından antibiyotiklere alternatif olabilme potansiyeli olan bakteriyosinler elde edildi. Yapılan çalışmalar kapsamında bakteriyosinlerin antibakteriyel aktivitelerinin yanı sıra kanser araştırmalarındaki önemlerinden dolayı elde edilen bu maddeler daha sonra yapılacak çalışmalara öncülük edebilir. Bu bağlamda bakterilerin savunma mekanizmalarının önemli bir parçası olan bakteriyosinlerin, hem antibakteriyel hem de anti kanser özelliklerinden dolayı gelecekte farmasötik endüstrisinde oldukça etkin rol oynayacakları düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., Bacteriocins — A Viable Alternative to Antibiotics?, *Nature Reviews Microbiology*, 11, 95-105, **2013**.
- [2] Lohans, C.T., Vederas, J.C., Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents, *International Journal of Microbiology*, 2012, 13, **2011**.
- [3] Hawlena, H., Bashey, F., Lively, C.M., Bacteriocin-mediated Interactions Within and Between Coexisting Species, *Ecology and Evolution*, 2 (10), 2521–2526, **2012**.
- [4] Lagos, R., Tello, M., Mercado, G., Antibacterial and Antitumorigenic Properties of Microcin E492, A Pore-forming Bacteriocin, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 74-85, **2009**.
- [5] Rebuffat, S., *Prokaryotic Antimicrobial Peptides From Genes to Applications*. (eds: Drider, D.), Springer, **2011**.
- [6] Zucca, M., Scutera, S., Savoia, D., Antimicrobial Peptides: New Frontiers in the Therapy of Infections, *InTech - Open Science Open Minds*, **2011**.
- [7] Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A., Wollman, E., De´finition de Quelques Termes Relatifs a` la Lysoge´nie, *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)*, 84, 222–224, **1953**.
- [8] Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., Bacteriocins of Gram-positive Bacteria, *Bacteriological Reviews*, 40, 722–756, **1976**.
- [9] Klaenhammer, T.R., Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Biochimie*, 70, 337-349, **1988**.
- [10] Klaenhammer, T.R., Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86, **1993**.
- [11] Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., Bacteriocins of Gram Positive Bacteria, *Microbiological Reviews*, 59, 171–200, **1995**.
- [12] Cotter, P.D., Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food, *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-88, **2005**.
- [13] Zendo, T., Yoneyama, F., Sonomoto K., Lactococcal Membrane-permeabilizing Antimicrobial Peptides, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(1), 1-9, **2010**.

- [14] Carmona-Ribeiro, A. M., Carrasco, L., Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9906-9946, **2013**.
- [15] Gillor, O., Nigro, L.M., Riley, M.A, Genetically Engineered Bacteriocins and Their Potential as The Next Generation of Antimicrobials, *Current pharmaceutical Design*, 11(8), 1067-75, **2005**.
- [16] Chen, H., Hoover, D.G., Bacteriocins and Their Food Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 81-100, **2003**.
- [17] Hammami, R., Zouhir A., Hamida J., Fliss I., Bactibase: A New Web-accessible Database for Bacteriocin Characterization, *BMC Microbiology*, 17,7-89, **2007**.
- [18] Gouaux, E., The Long and Short of Colicin Action: The Molecular Basis for The Biological Activity of Channel-forming Colicins, *Structure*, 5, 313-317, **1997**.
- [19] Soudy, R., Gill, A., Sprules, T., Lavasanifar, A., Kaur, K., Proteolytically Stable Cancer Targeting Peptides with High Affinity for Breast Cancer Cells, *Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 7523-7534, **2011**.
- [20] Johnson, C.L., Ridley, H., Pengelly, R.J., Salleh, M.Z., Lakey, J.H., The Unstructured Domain of Colicin N Kills *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 89(1), 84–95, **2013**.
- [21] James, R., Kleanthous, C., Moore, G.R., The Biology of E Colicins: Paradigms and Paradoxes, *Microbiology*, 142(7), 1569–1580, **1996**.
- [22] Konisky, J., Colicins and Other Bacteriocins with Established Modes of Action, *Annual Review of Microbiology*, 36, 125-144, **1982**.
- [23] Silverstein, K.A.T., Graham, M.A., Paape, T.D., VandenBosch, K.A., Genome Organization of More Than 300 Defensin-Like Genes in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 138, 600-610, **2005**.
- [24] Pugsley, A.P., The Ins and Outs of Colicins, Part I: Production, and Translocation Across Membranes, *The Journal of Microbiology*, 1(7):168–175, **1984**.
- [25] Kolter, R., Moreno, F., Genetics of Ribosomally Synthesized Peptide Antibiotics, *Annual Review of Microbiology*, 46, 141–163, **1992**.
- [26] Braun, V., Pilsl, H, Gross, P., Colicins: Structures, Modes of Action, Transfer Through Membranes and Evolution, *Archives of Microbiology*, 161, 199–206, **1994**.

- [27] Duché, D., Letellier, L., Géli, V., Bénédetti, H., Baty, D., Quantification of Group A Colicin Import Sites, *Journal of Bacteriology*, 177, 4935–4939, **1995**.
- [28] Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobes, R., Colicin Biology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158–229, **2007**.
- [29] Braun, V., Patzer, S.I., Hantke, K., Ton-dependent Colicins and Microcins: Modular Design and Evolution, *Biochimie*, 84, 365–380, **2002**.
- [30] Van der Wal, F.J., Luirink, J., Oudega, B., Bacteriocin Release Proteins: Mode of Action, Structure and Biotechnological Applications, *FEMS Microbiology Reviews*, 17, 381–399, **1995**.
- [31] Walker, G.C., SOS-regulated Proteins in Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis, *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 416–420, **1995**.
- [32] Nomura, M., Mode of Action of Colicins, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 28, 315–324, **1963**.
- [33] Killiman, H., Videnov, G., Jung, G., Schwarz, H., Braun, V., Identification of Receptor Binding Sites by Competitive Peptide Mapping: Phages T1, T5, and Á80 and Colicin M Bind to The Gating loop of FhuA, *Journal of Bacteriology*, 177, 694–698, **1995**.
- [34] Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., Riley, M.A., Competitive Interactions in *Escherichia coli* Populations: The Role of Bacteriocins, *The ISME Journal*, 5(1), 71–81, **2011**.
- [35] Barreteau, H., Bouhss, A., Gérard, F., Duché, D., Boussaid, B., Blanot, D., Llobes, R., Deciphering The Catalytic Domain of Colicin M, a Peptidoglycan Lipid II Degrading Enzyme, *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 12378–12389, **2010**.
- [36] Ferguson, A.D., Deisenhofer, J., TonB Dependent Receptors Structural Perspectives, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565, 318–332, **2002**.
- [37] Taylor, R., Burgner, J.W., Clifton, J., Cramer, W.A., Purification and Characterization of Monomeric *Escherichia coli* Vitamin B12 Receptor with High Affinity for Colicin E3, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 31113–31118, **1998**.
- [38] Bremer, E., Middendorf, A., Martinussen, J., Valentin-Hansen, P., Analysis of The Tsx Gene, which Encodes A Nucleoside-specific Channel-forming Protein (Tsx) in The Outer Membrane of *Escherichia coli*, *Gene*, 96, 59–65, **1990**.

- [39] Nikaido, H., Vaara, M., Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability, *Microbiological Reviews*, 49, 1–32, **1985**.
- [40] Nikaido, H., Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 593–656, **2003**.
- [41] Lazzaroni, J.C., Dubuisson, J.F., Vianney, A., The Tol Proteins of *Escherichia coli* and Their Involvement in The Translocation of Group A Colicins, *Biochimie*, 84, 391–397, **2002**.
- [42] Jakes, K.S., Finkelstein, A., The Colicin Ia Receptor Cir is Also The Translocator for Colicin Ia, *Molecular Microbiology*, 75, 567–578, **2009**.
- [43] Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., Journet, L., The Tol-Pal Proteins of The *Escherichia coli* Cell Envelope: An Energized System Required for Outer Membrane Integrity?, *Research in Microbiology*, 152, 523–529, **2001**.
- [44] Krewulak, K.D., Vogel, H.J., Structural Biology of Bacterial Iron Uptake, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1781–1804, **2008**.
- [45] James, R., Kleanthous, C., Moore, G.R., The Biology of E Colicins: Paradigms and Paradoxes, *Microbiology*, 142(7), 1569-1580, **1996**.
- [46] Pilsil, H., Smajs, D., Braun, V., Characterization of Colicin S4 and Its Receptor OmpW, A Minor Protein of The *Escherichia coli* Outer Membrane, *Journal of Bacteriology*, 181, 3578–3581, **1999**.
- [47] Arnold, T., Zeth, K., Linke, D., Structure and Function of Colicin S4, A Colicin with A Duplicated Receptor-binding Domain, *Journal of Biological Chemistry*, 284, 6403–6413, **2009**.
- [48] Oudega, B., de Graaf, F.K., Enzymatic Properties of Cloacin DF13 and Kinetics of Ribosome Inactivation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 425, 296–304, **1976**.
- [49] Thomas, J.A., Valvano, M.A., Role of Tol Genes in Cloacin DF13 Susceptibility of *Escherichia coli* K-12 Strains Expressing The Cloacin DF13 Aerobactin Receptor IutA, *Journal of Bacteriology*, 175(2), 548-552, **1993**.
- [50] Chavan, M., Rafi, H., Wertz, J., Goldstone, C., Riley, M.A., Phage Associated Bacteriocins Reveal A Novel Mechanism for Bacteriocin Diversification in *Klebsiella*, *Journal of Biological Chemistry*, 284, 6403–6413, **2005**.
- [51] Michel-Briand, Y., Baysse, C., The Pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochimie*, 84, 499-510, **2002**.

- [52] Guasch, J.F., Enfedaque, J., Bacteriocin 28b, A Chromosomally Encoded Bacteriocin Produced by Most *Serratia marcescens* Biotypes, *Research in Microbiology* 146, 477–483, **1995(a)**.
- [53] Guasch, J.F., Ferrer, S., Enfedaque, J., A 17 kDa Outer-membrane Protein (Omp4) from *Serratia marcescens* Confers Partial Resistance to Bacteriocin 28b When Expressed in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 141, 2535–2542, **1995(b)**.
- [54] Enfedaque, J., Ferrer, S., Guasch, J.F., Bacteriocin 28b from *Serratia marcescens* N28b: Identification of *Escherichia coli* Surface Components Involved in Bacteriocin Binding and Translocation, *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 19–26, **1996**.
- [55] Wertz, J.E., Riley, M.A., Chimeric Nature of Two Plasmids of *Hafnia alvei* Encoding The Bacteriocins Alveicins A and B, *Journal of Bacteriology*, 186, 1598–1605, **2004**.
- [56] Rakin, A., Boolgakowa, E., Heesemann, J., Structural and Functional Organization of The *Yersinia pestis* Bacteriocin Pesticin Gene Cluster, *Microbiology*, 142, 3415–3424, **1996**.
- [57] Baquero, F., Moreno, F., The Microcins, *FEMS Microbiology Letters*, 23, 117–124, **1984**.
- [58] Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Microcins, Gene-encoded Antibacterial Peptides from *Enterobacteria*, *Natural Product Reports*, 24, 708–734, **2007(a)**.
- [59] Gaillard-Gendron, S., Vignon, D., Isolation, Purification and Partial Amino Acid Sequence of A Highly Hydrophobic New Microcin Named Microcin L Produced by *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters*, 193, 95–98, **2000**.
- [60] Pons, A. M., Lanneluc, G., New Developments in Non-post Translationally Modified Microcins, *Biochimie*, 84, 531–537, **2002(a)**.
- [61] Pons, A. M., Zorn, N., Vignon, D., Microcin E492 is An Unmodified Peptide Related in Structure to Colicin V, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 229–230, **2002(b)**.
- [62] Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Siderophore Peptide, A New Type of Posttranslationally Modified Antibacterial Peptide with Potent Activity, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 28233–28242, **2004**.
- [63] Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., Rebuffat, S., Structural and Functional Diversity of Microcins, Gene-encoded Antibacterial Peptides from *Enterobacteria*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 200–209, **2007(b)**.

- [64] Severinov, K., Semenova, E., Kazakov, A., Kazakov, T., Gelfand, M.S., Low-molecular-weight Post-translationally Modified Microcins, *Molecular Microbiology*, 65, 1380–1394, **2007**.
- [65] Poey, M.E., Azpiroz, M.F., Laviña, M., Comparative Analysis of Chromosome-encoded Microcins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1411–1418, **2006**.
- [66] Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., Peduzzi, J., Siderophore Microcins Form The First Family of Structure-related Antimicrobial Peptides from *Enterobacteriaceae*: Isolation and Characterization of Microcins M and H47, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 288–297, **2010**.
- [67] Severinov, K., Nair, S., The Action of Microcin C and Mechanisms of Bacterial Resistance to It, *Future Microbiology*, 7, 281-289, **2012**.
- [68] Heddle, J.G., Blance, S.J., Zamble, D.B., Hollfelder, F., Miller, D.A., Wentzell, L.M., Walsh, C.T., Maxwell, A., The Antibiotic Microcin B17 is A DNA Gyrase Poison: Characterisation of The Mode of Inhibition, *Journal of Molecular Biology*, 307, 1223–1234, **2001**.
- [69] Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R.M., Ebright, R.H., Antibacterial Peptide Microcin J25 Inhibits Transcription by Binding within and Obstructing The RNA Polymerase Secondary Channel, *Molecular Cell*, 14, 739–751, **2004**.
- [70] Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J.T., Borukhov, S., Wang, M.D., Severinov, K., Molecular Mechanism of Transcription Inhibition by Peptide Antibiotic Microcin J25, *Molecular Cell*, 14, 753–762, **2004**.
- [71] Yang, R., Johnson, M., Ray, B., Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3355–3359, **1992**.
- [72] Coventry, M. J., Gordon, J. B., Alexander, M., Hickey, M. W., Wan, J., A Food-grade Process for Isolation and Partial Purification of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria that Uses Diatomite Calcium Silicate, *and Environmental Microbiology*, 62, 1764-1769, **1996**.
- [73] Yıldırım, Z., Yıldırım, M., Probiyotik Özellik Gösteren Bifidobakteriler, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (ed.m Demirci), Tekirdağ, 266-271, **2000**.
- [74] Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of A Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici*, *Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 261–268, **1988**.

- [75] Bayer, A., Freund, S., Jung, G., Post-translational Heterocyclic Backbone Modifications in the 43-Peptide Antibiotic Microcin B17, Structure Elucidation and NMR Study of a ¹³C, ¹⁵N-labelled Gyrase Inhibitor, *European Journal of Biochemistry*, 234, 414-426, **1995**.
- [76] Guijarro, J.I., Gonzalez-Pastor, J.E., Baleux, F., San Millan, J.L., Castilla, M.A., Rico, M., Moreno, F., Delepierre, M., Chemical Structure and Translation Inhibition Studies of The Antibiotic Microcin C7, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 23520–23532, **1995**.
- [77] Fath, M.J., Zhang, L.H., Rush J., Kolter, R., Purification and Characterization of Colicin V from *Escherichia coli* Culture Supernatants, *Biochemistry*, 33, 6911–6917, **1994**.
- [78] Chao, L., Levin, B.R., Structured Habitats and The Evolution of Anticompetitor Toxins in Bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 78, 6324-6328, **1981**.
- [79] Ivanovska, I., Hardwick, J.M., Viruses Activate A Genetically Conserved Cell Death Pathway in A Unicellular Organism, *Journal of Cell Biology*, 170, 391–399, **2005**.
- [80] Riley, M.A., Gordon, D.M., A Survey of Col Plasmids in Natural Isolates of *Escherichia coli* and An Investigation into The Stability of Col-plasmid Lineages, *Journal of General Microbiology*, 138, 1345–1352, **1992**.
- [81] Wloch-Salamon, D.M., Gerla, D., Hoekstra, R.F., de Visser, J., Effect of Dispersal and Nutrient Availability on The Competitive Ability of Toxin-producing Yeast, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 535–541, **2008**.
- [82] Frank, S.A., Spatial Polymorphism of Bacteriocins and Other Allelopathic Traits, *Evolutionary Ecology*, 8, 369–386, **1994**.
- [83] Brown, S.P., Inglis, R.F., Taddei, F., Evolutionary Ecology of Microbial Wars: Within-host Competition and Incidental Virulence, *Evolutionary Applications*, 2, 32–39, **2009**.
- [84] Chao, L., Cox, E. C., Competition Between High and Low Mutating Strains of *Escherichia coli*, *Evolution*, 37, 125-134, **1983**.
- [85] Durrett, R., Levin, S., Allelopathy in Spatially Distributed Populations, *Journal of Theoretical Biology*, 185, 165–171, **1997**.
- [86] Kerr, B., Riley, M.A., Feldman, M.W., Bohannan, B.J., Local Dispersal Promotes Biodiversity in A Real-life Game of Rock-paper-scissors, *Nature*, 418, 171–174, **2002**.

- [87] Hetz, C., Bono, M.R., Barros, F.L., Lagos, R., Microcin E492, A Channel-forming Bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, Induces Apoptosis in Some Human Cell Lines, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 2696-2701, **2002**.
- [88] Destoumieux-Garzón, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A.M., Letellier, L., Peduzzi, J., Rebuffat, S., Microcin E492 Antibacterial Activity: Evidence for A TonB-dependent Inner Membrane Permeabilization on *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 49(4), 1031-41, **2003**.
- [89] Nolan, E.M., Walsh, C.T., Investigations of The MceJ-catalyzed Posttranslational Modification of The Microcin E492 C-terminus: Linkage of Ribosomal and Nonribosomal Peptides to Form "Trojan Horse" Antibiotics, *Biochemistry*, 47, 9289–9299, **2008**.
- [90] Gordon, D.M., Riley, M.A., A Theoretical and Empirical Investigation of The Invasion Dynamics of Colicinogeny, *Microbiology*, 145, 655–661, **1999**.
- [91] Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Class IIa Bacteriocins: Biosynthesis, Structure and Activity, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106, **2000**.
- [92] Hancock, R.E.W., Mechanisms of Action of Newer Antibiotics for Gram Positive Bacteria, *The Lancet Infectious Disease*, 5, 209-218, **2005**.
- [93] Lagos, R., Villanueva, J.E., Monasterio, O., Identification and Properties of The Genes Encoding Microcin E492 and Its Immunity Protein, *Journal of Bacteriology*, 181, 212-217, **1999**.
- [94] de Lorenzo, V., Isolation and Characterization of Microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*, *Archives of Microbiology*, 139, 72-75, **1984**.
- [95] Wilkens, M., Villanueva, J.E., Cofre, J., Chnaiderman, J., Lagos, R., Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Genetic Determinants for Production of and Immunity to Microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Bacteriology*, 179, 4789-4794, **1997**.
- [96] Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J. A., Vergara, C., Monasterio O., Structure, Organization and Characterization of The Gene Cluster Involved in The Production of Microcin E492, A Channel-forming Bacteriocin, *Molecular Microbiology*, 42, 229-243, **2001**.
- [97] Shamma, S.L., Knowles, T.P., Baldwin, A.J., MacPhee, C.E., Welland, M.E., Dobson, C.M., Devlin, G.L., Perturbation of The Stability of Amyloid Fibrils Through Alteration of Electrostatic Interactions, *Biophysical Journal*, 100, 2783-2791, **2011**.

- [98] Blanco, L.P., Evans, M.L., Smith, D.R., Badtke, M.P., Chapman, M.R., Diversity, Biogenesis and Function of Microbial Amyloids, *Trends in Microbiology*, 20(2), 66-73, **2012**.
- [99] Marcoleta, A., Gutiérrez-Cortez, S., Maturana, D., Monasterio, O., Lagos, R., Whole-Genome Sequence of the Microcin E492-Producing Strain *Klebsiella pneumoniae* RYC492, *Genome Announcements*, 1(3), 178-13, **2013**.
- [100] Brader, P., Stritzker, J., Reidl, C.T., Zanzonico, P., Cai, S., Burnazi, E.V., Ghani, E.R., Hricak, H., Szalay A.A., Fong, Y., Blasberg, R., *Escherichia coli* Nissle 1917 Facilitates Tumor Detection by Positron Emission Tomography and Optical Imaging, *Clinical Cancer Research: An official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(8), 2295-2302, **2008**.
- [101] Kelland, L.R., Of Mice and Men: Values and Liabilities of The Athymic Nude Mouse Model in Anticancer Drug Development, *European Journal of Cancer*, 40(6), 827-836, **2004**.
- [102] Somer, A., Salman, N., Yalçın, I., Ağaçfidan, A., Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Children with Community-acquired Pneumonia in Istanbul, Turkey, *Journal of Tropical Pediatrics: Oxford Journals*, 52, 173-178, **2006**.
- [103] Naylor, R., Burke, M., Aquaculture and Ocean Resources: Raising Tigers of The Sea, *Annual Review of Environment and Resources*, 30, 185-218, **2005**.
- [104] Mızrakçı, S.O., Sipahi, O.R., Tünger, A., Bilgin, A., Aytaç, H., Erdem, H.A., Uyar, M., Ulusoy S., Risk Factors for Gastrointestinal Colonization by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Anaesthesiology and Reanimation Intensive Care Unit, *Mikrobiyoloji bülteni*, 47(2), 223-9, **2013**.
- [105] Viejo, M. B., Gargallo, D., Cloning and DNA Sequence Analysis of A Bacteriocin Gene of *Serratia marcescens*, *Journal of General Microbiology*, 138, 1737-1743, **1992**.
- [106] Reingold, J., Starr, N., Maurer, J., Lee, M.D., Identification of A New *Escherichia coli* She Haemolysin Homolog in Avian *E. coli*, *Veterinary Microbiology*, 66, 125-134, **1999**.
- [107] Madigan, M.T., Martingo, J.M., *Brock Biology of Microorganisms*, 11nd Edition, Pearson Prentice Hall, New York, **2006**.
- [108] Unat, E.K., *Escherichia coli*, In: Unat E.K., *Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi*, Cilt 1, 2. Baskı İstanbul: Dergah Tıp Yayınları, 546, **1986**.

- [109] Chen, H.D., Frankel, G., Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling Pathogenesis, *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 83-98, **2005**.
- [110] Lawson, J.M., Update on *Escherichia coli* O157:H7, *Current Gastroenterology Reports*, 6 (4), 297-301, **2004**.
- [111] Töreci, K., *Escherichia türleri*. In: Topçu, W.A., Söyletir, G., Doğanay, M., eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 2. cilt, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 1564-1574, **2002**.
- [112] Bilgehan, H., *Escherichia*, *Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, Klinik Mikrobiyoloji, 10. Baskı, Barış Yayınları, İzmir, 3-17, **2000**.
- [113] Erdem, B., *Enterobacteriaceae*, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 471- 515, **1999**.
- [114] Emody, L., Kerenyi, M., Nagi, G., Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 29-33, **2003**.
- [115] Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P., Winn, W.C., *Antimicrobial Resistance*, Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology, Fifth Edition, LippincottRaven Publishers, USA (Philadelphia), 15, 798-800, **1997**.
- [116] Ustaçelebi, Ş., *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 91-109, 509-511, **1999**.
- [117] Chadwick, P., Niel, M., Transferable Antibiotic Resistance in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Canadian Medical Association Journal*, 109, 691-696, **1973**.
- [118] Hansen, D. S., Aucken, H. M., Abiola, T., Podschun, R., Recommended Test Panel for Differentiation of *Klebsiella* Species on the Basis of a Trilateral Interlaboratory Evaluation of 18 Biochemical Tests, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3665-3669, **2004**.
- [119] Erdem, B., "Enterobacteriaceae" Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, *Temel ve Klinik mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, İzmir, 1, 471-515, **1999**.
- [120] Töreci, K., "Klebsiella türleri", *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*, Nobel tıp kitapevleri, 2, 1575-1608, **2002**.
- [121] Kayser, F.H., "İnfeksiyon Hastalığı Etkeni Bakteriler", *Tıbbi Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp kitapevleri, 9, 221-350, **2002**.
- [122] Bilgehan, H., "Klebsiella", *Klinik mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, Barış yayınları, 10, 59-68, **2000**.

- [123] Shen, B., Brzezinski, A., Fazio, V.W., Remzi, F.H., Achkar, J.P., Bennett, A.E., Maintenance Therapy with A Probiotic in Antibiotic-Dependent Pouchitis: Experience in Clinical Practice?, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 22, 721–728, **2005**.
- [124] Saleem, F., Ahmed, S., Yakoob, Z., Rasool, S.A., Comparative Study of Two Bacteriocins Produced by Representative Indigenous Soil Bacteria, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(3), 252-258, **2009**.
- [125] Bilgehan, H., *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 182-184, **2004**.
- [126] Vahaboğlu, H., Akhan, S.Ç., "Pseudomonas aeruginosa ve Diğer Pseudomonas türleri", İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri, 1608- 1616, **2002**.
- [127] Koneman, E., Stephan, D.A., William, M.J., Schreckenberger, P.C., Winn, C.W., The Nonfermentative Gram-negative Bacilli, Konoman's Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia, Lippincott, 303-391, **2006**.
- [128] Schalk, I.J., Guillon, L., Pyoverdine Biosynthesis and Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Metal Homeostasis, *Environmental Microbiology*, 15(6), 1661-73, **2013**.
- de Lorenzo, V., Factors Affecting Microcin E492 Production, *The Journal of Antibiotics*, 38, 340–343, **1985**.
- [129] Media Solutions for Microbial and Molecular Genetics Research Applications, https://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_1_222880_academia.pdf (Şubat, **2014**).
- [130] Pugsley, A.P., Oudega, B., Methods for studying colicins and their plasmids, IRL Press, 105–161, **1987**.
- [131] Ryan, M. P., Mary, C. R., Hill, C., Ross, R. P., An Application in Cheddar Cheese Manufacture for a Strain of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 612–619, **1996**.
- [132] Curbelo, J.L.C., Diaz, M.G., The Purified Colicin S8 is A Multimeric Protein, *International Microbiology*, 3, 239–245, **2000**.
- [133] Chapin, K.C., Lauderdale, T.L., *Reagents, stains, and media: bacteriology*, In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 358, **2003**.

- [134] Tagg, J. R., McGiven, A. R., Assay System for Bacteriocins, *Applied and Environmental Microbiology*, 21(5), 943, **1971**.
- [135] Fernandez, B., Le Lay, C., Jean, J., Fliss, I., Growth, Acid Production and Bacteriocin Production by Probiotic Candidates Under Simulated Colonic Conditions, *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 877-85, **2013**.
- [136] O'Brien, G. J., *Molecular Analysis of Microcin 24: Genetics, Secretion and Mode of Action of A Novel Microcin*, Cellular and Molecular Biology, University of Canterbury, New Zealand, **1996**.
- [137] Birri, D.J., Brede, D.A., Tessema, G.T., Nes, I.F., Bacteriocin Production, Antibiotic Susceptibility and Prevalence of Haemolytic and Gelatinase Activity in Faecal Lactic Acid Bacteria Isolated from Healthy Ethiopian Infants, *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 504-516, **2013**.
- [138] Hombach, M., Bloemberg, G.V., Böttger, E.C., Effects of Clinical Breakpoint Changes in CLSI Guidelines 2010/2011 and EUCAST Guidelines 2011 on Antibiotic Susceptibility Test Reporting of Gram-negative Bacilli, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1-11, **2011**.
- [139] Aline Wolfensberger, A., Sax, H., Weber, R., Zbinden, R., Kuster, S.P., Change of Antibiotic Susceptibility Testing Guidelines from CLSI to EUCAST: Influence on Cumulative Hospital Antibiograms, *PLOS ONE*, 8(11), 1-8, **2013**.
- [140] Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement, <http://www.microbiolab-bq.com/CLSI.pdf> (Ocak, **2014**).
- [141] Isolation of Plasmids from *E. coli* by Alkaline Lysis, [https://www.msu.edu/course/css/451/LabProtocols/Plasmid%20Isolation%20Using%20Alkaline%20Lysis%20\(Exp%203,%20CSS451\).pdf](https://www.msu.edu/course/css/451/LabProtocols/Plasmid%20Isolation%20Using%20Alkaline%20Lysis%20(Exp%203,%20CSS451).pdf) (Ocak, **2014**).
- [142] Riley, M.A., Goldstone, C. M., Wertz, J. E., Gordon, D., A Phylogenetic Approach to Assessing The Targets of Microbial Warfare. *J Evol Biol*, 16, 690–697, **2003**.
- [143] Duport, C., Baysse, C., Michel-Briand, Y., Molecular Characterization of Pyocin S3, A Novel S-type Pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Biological Chemistry*, 14, 270 (15), 8920-7, **1995**.
- [144] Trautner, B. W., Hull, R. A., Darouiche, R. O., Colicins Prevent Colonization of Urinary Catheters, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 413–415, **2005**.

- [145] Corsini, G., Karahanian, E., Tello, M., Fernandez, K., Rivero, D., Saavedra, J. M., Ferrer, A., Purification and Characterization of The Antimicrobial Peptide Microcin N, *FEMS Microbiology Letters*, 312, 119–125, **2010**.
- [146] Riley, M.A., *Bacteriocins: Ecology and Evolution*, Springer, Berlin, **2007**.
- [147] Rasouliha, B.H., Ling, H., Ho, C.L., Chang, M.W., A Predicted Immunity Protein Confers Resistance to Pyocin S5 in A Sensitive Strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *ChemBioChem*, 14, 2444–2446, **2013**.
- [148] Sable, S., Pons, A.M., Gendron-Gaillard, S., Cottenceau, G., Antibacterial Activity Evaluation of Microcin J25 Against Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4595, **2000**.
- [149] Williams, S.R., Gebhart, D., Martin, D.W., Scholl, D., Retargeting R-Type Pyocins To Generate Novel Bactericidal Protein Complexes, *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3868–3876, **2008**.
- [150] Unakal, C., Yismaw, G., Effect of Bacteriocin Produced from *Enterococcus faecium* Against Drug Resistant Bacterial Isolates, *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 3(12), 881-886, **2012**.
- [151] Rashid, F., Sharif, N., Ali, I., Antimicrobial Potential of *Lactococcus lactis* Bacteriocin Against *Salmonella typhi*, *African Journal of Microbiology Research*, 7(6), 436-439, **2013**.
- [152] Murtaza, M.A., Shahid, M., Hafiz, I., Mueen-ud-Din, G., Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis ssp. lactis*, International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (ICEEBS'2012), Dubai, 7-8, **2012**.
- [153] Ravi, V., Prabhu, M., Subramanyam, D., Isolation of Bacteriocin Producing Bacteria from Mango Pulp and Its Antimicrobial Activity, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1 (2), 54-63, **2011**.
- [154] Şerban, E.S., Ionescu, M., Screening of The Antibacterial and Antifungal Activity of Eight Volatile Essential Oils, *Farmacia*, 59, 3, **2011**.
- [155] Pingitore, E.V., Salvucci, E., Sesma, F., Nader-Macías, M.E., Different Strategies for Purification of Antimicrobial Peptides from Lactic Acid

Bacteria (LAB), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Formatex, 557-568, **2007**.

- [156] Burns, J. L., Saiman, L., Whittier, S., Comparison of Agar Diffusion Methodologies for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1818, **2000**.
- [157] Jayachitra, A., Krithiga, N., Rajalakshmi, A., Hemalatha, N., Plasmid Profiling and BLA Gene Amplification from *Pseudomonas* Species Isolated from Hospitalized Patients, *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 4(2), 109-114, **2013**.
- [158] Fischer, S., Godino, A., Quesada, J. M., Cordero, P., Jofre, E., Mori, G., Espinosa-Urgel, M., Characterization of A Phage-like Pyocin from The Plant Growth-promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SF4c, *Microbiology*, 158, 1493–1503, **2012**.
- [159] Waite, R. D., Curtis, M. A., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Pyocin Production Affects Population Dynamics within Mixed-Culture Biofilms, *Journal of Bacteriology*, 191(4), 1349, **2009**.
- [160] Kohler, T., Donner, V., van Delden, C., Lipopolysaccharide as Shield and Receptor for R-Pyocin-Mediated Killing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, 192(7), 1921–1928, **2010**.
- [161] Elfarash, A., Wei, Q., Cornelis, P., The Soluble Pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* Bind to The Same FpvAI Receptor *MicrobiologyOpen*, 1(3), 268–275, **2012**.
- [162] Chang, W., Small, D. A., Toghrol, F., Bentley, W. E., Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Induction of Pyocin Genes in Response to Hydrogen Peroxide, *BMC Genomics*, 6: 115, **2005**.
- [163] James, S., Cariss, L., YieJ (CbrC) Mediates CreBC-Dependent Colicin E2 Tolerance in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3329–3336, **2010**.
- [164] Chen, Y.R., Yang, T.Y., Interaction of Colicin E7 with The Major Coat Protein (g8p) may Confer Limited Protection on Colicinogenic *Escherichia coli* Against M13 Bacteriophage Infection, *Microbiology* 156, 3379–3385, **2010**.
- [165] Zhang, Y., Van Kemmelbeke, M.N., Holland, L.E., Investigating Early Events in Receptor Binding and Translocation of Colicin E9 Using Synchronized Cell Killing and Proteolytic Cleavage, *Journal of Bacteriology*, 190(12), 4342–4350 **2008**.

- [166] Scholl, D., Cooley, M., An Engineered R-Type Pyocin Is a Highly Specific and Sensitive Bactericidal Agent for the Food-Borne Pathogen *Escherichia coli* O157:H7, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 3074–3080, **2009**.
- [167] Chiuchiolo, M. J., Delgado, M. A., Growth-Phase-Dependent Expression of the Cyclopeptide Antibiotic Microcin J25, *Journal of Bacteriology*, 183 (5), 1755-1764, **2001**.
- [168] Pomares, M. F., Vincent, P. A., Farias, R. N., Salomon, R. A., Protective Action of ppGpp in Microcin J25-Sensitive Strains, *Journal of Bacteriology*, 190 (12), 4328–4334, **2008**.
- [169] Kuhar, I., Zgur-Bertok, D., Transcription Regulation of the Colicin *Kcka* Gene Reveals Induction of Colicin Synthesis by Differential Responses to Environmental Signals, *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7373, **1999**.
- [170] Stein, D. C., Hebel, B. H., Young, F. E., Effect of Environment on Sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriocins, *Infection and Immunity*, 29 (2), 507-511, **1980**.
- [171] Fleming, L. R., Influence of Growth Conditions on Production of Klebicin K and Raoultellin L, Two Antimicrobial Substances Against Gram-Negative Pathogens, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2(4):1095-1099, **2011**.
- [172] Agrawal, R., Dharmesh, S., An Anti-*Shigella dysenteriae* Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* MTCC 5151 Cheese Isolate, *Turkish Journal of Biology*, 36 177-185, **2012**.
- [173] Pons, M., Delalande, F., Duarte, M., Benoit, S., Lanneluc, I., Sable, S., van Dorsselaer, A., Cottenceau, G., Genetic Analysis and Complete Primary Structure of Microcin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (2), 505–513, **2004**.
- [174] Pomares, M. F., Salomon, R. A., Pavlova, O., Severinov, K., Farias, R., Vincent, P. A., Potential Applicability of Chymotrypsin-Susceptible Microcin J25 Derivatives to Food Preservation, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5734–5738, **2009**.
- [175] Denayer, S., Matthijs, S., Cornelis, P., Pyocin S2 (Sa) Kills *Pseudomonas aeruginosa* Strains via the FpvAType I Ferripyoverdine Receptor, *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7663–7668, **2007**.
- [176] Leavitt, R. W., Braithwaite, C., Jensen, M. M., Colicin V38 and Microcin C38 Produced by *Escherichia coli* Strain 38, *Avian Disease*, 41(3), 568-77, **1997**.

- [177] Baljinder, K., Neena, G., Characteristics of Bacteriocin BA28 Produced by *Pediococcus acidilactici* BA28, *Mintage journal of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 2 (1), 17-20, **2013**.
- [178] Mandal, V., Optimized Culture Conditions for Bacteriocin Production by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 and Its Characterization, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 45, 106-110, **2008**.
- [179] Jadhav, K., Suryavanshi, D., Isolation, Inhibitory Spectrum and Properties of Bacteriocin like Antimicrobial Compound Produced by *B. cereus* Strain 06 Isolated from Soil, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3 (2), 72-76, **2013**.
- [180] Naz, S., Rasool, S., Isolation, Production and Characterization of Bacteriocins Produced by Strains From Indigenous Environments, *Pakistan Journal of Botany*, 45 (1), 261-267, **2013**.
- [181] Cavard, D., Role of Cal, The Colicin A Lysis Protein, in Two Steps of Colicin A Release and in The Interaction with Colicin A-porin complexes, *Microbiology*, 150(11), 3867-3875, **2004**.
- [182] Abdi-Ali, A., Worobec, E.A., Cytotoxic Effects of Pyocin S2 Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on The Growth of Three Human Cell Lines, *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 375-381, **2004**.
- [183] Sousa, M.A.B., Farias, L., de Oliveira, P., Moreira, J., Antagonistic Activity Expressed by *Shigella sonnei*: Identification of A Putative New Bacteriocin, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(6), 724-729, **2013**.
- [184] Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y., Occurrence of Enterocin Genes, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance in 3 Bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese, *Turkish Journal of Biology*, 37, 443-449, **2013**.
- [185] Taşova, Y., Gram Negatif Enterik Bakteri İnfeksiyonlarının Yönetimi, *ANKEM Dergisi*, 25(2), 34-44, **2011**.
- [186] Tolun, V., Akbulut, D., Çatal, Ç., Yatan ve Ayaktan Hastalardan İzole Edilen Üriner Sistem İnfeksiyonu Etkeni Gram negatif Çomakların Antibiyotiklere Duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 32, 69, **2002**.
- [187] Altoparlak, Ü., Özbek, A., Aktaş, F., Üriner Sistem İnfeksiyonlarından İzole Edilen Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 32, 167, **2002**.

- [188] Uzun, A., Gülen, D., Fosfomisin ve Bazı Antimikrobiyal Ajanların Üriner *Escherichia coli* İzolatlarına In Vitro Etkinliğinin Değerlendirilmesi, *Klinik Dergisi*, 25(2), 77-80, **2012**.
- [189] Wagenlehner, F.M., Niemetz, A., Spectrum and Antibiotic Resistance of Uropathogens from Hospitalized Patients with Urinary Tract Infections: 1994-2000, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19, 557, **2002**.
- [190] Kaya, O., Akçam, F., Uyar, C., 2000-2004 yılları arasında izole edilen üropatojen *Escherichia coli* suşlarında artan antibiyotik direnci, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(4), 22-26, **2006**.
- [191] Das, R.N., Chandrashekhar, T.S., Joshi, H.S., Gurung, M., Shrestha, N., Shivananda, P.G., Frequency and Susceptibility Profile of Pathogens Causing Urinary Tract Infections at A Tertiary Care Hospital in Western Nepal, *Singapore Medical Journal*, 47(4), 281-5, **2006**.
- [192] Aykan, Ş.B., Çiftci, İ.H., Türkiye'de İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Durumu: Bir Meta-Analiz, *Mikrobiyoloji Bulteni*, 47(4), 603-618, **2013**.
- [193] Mansouri, M., Ramazanzadeh, R., Norabadi, P., Cefepime Resistance and Associated Risk Factors among *Escherichia coli* Strains Isolated from Clinical Specimens, *Chemotherapy*, 57(2), 134-137, **2011**.
- [194] Tekin, A., Deveci, Ö., Dal, T., Tekin, R., Bacalan, F., Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* suşlarında Ertapenemin İn Vitro Etkinliği, *Anatolian Journal of Clinical Investigation*, 7(1), 10-13, **2013**.
- [195] Shivesh, P., Carbapenem Sensitivity Profile Amongst Bacterial Isolates from Clinical Specimens in Kanpur City, *Indian Journal of Critical Care Medicine*, 10 (4), 250-253, **2006**.
- [196] Yetkin, G., Kuzucu, Ç., İdrarda Üreyen *Escherichia coli* 'lerin Geniş Spektrumlu Beta Laktamazlar Yönünden İrdelenmesi, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(4), 249-252, **2006**.
- [197] Deveci, Ö., Yula, E., Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarına fosfomisin trometamolün ve bazı antibiyotiklerin in-vitro etkinliği, *Dicle Tıp Dergisi*, 38 (3), 298-300, **2011**.
- [198] Ağca, H., Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41(3), 107-110, **2011**.
- [199] Andrade, S.S., Jones, R.N., Gales, A.C., Increasing Prevalance of Antimicrobial Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Latin American Medical Centres: 5 Year Report of The SENTRY

Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 140-141, **2003**.

- [200] European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), Annual report, **2008**.
- [201] Gür, D., Ünal, S., Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere İn-vitro Duyarlılıkları, *Flora*, 1, 153-159, **1996**.
- [202] Gunduz, T., Arısoy, A., Algun, U., Borand, H., Ozbakkaloglu, B., Investigation of Resistance Rates of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Various Antimicrobials, *Clinical Microbiology and Infection*, 2003, 9 (1), 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases kongre kitabında Glasgow, UK 10-13 May 2003;132, **2003**.
- [203] Özgenç, O., *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Çeşitli Antimikrobiklere Direnç Oranlarının Araştırılması, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 16 (2), 179-182, **2002**.
- [204] Gazi, H., Kurutepe, S., Hastane Kökenli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 8(4), 299-303, **2004**.
- [205] Ekinciöğlü, P., Perçin, D., Antibiotic Susceptibilities of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates, *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 22(2), 141-149, **2013**.
- [206] Achemchem, F., Cebrián, R., Abrini, J., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., Antimicrobial characterization and safety aspects of the bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 isolated from Moroccan raw goat milk, *Canadian Journal of Microbiology*, 58(5), 596-604, **2012**.
- [207] Malekzadeh, F., Abdi-ali, A., Levin, M., Shahamat, M., Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* Pyocin and Antibiotic Biotypes in Four Tehran Hospitals, *International Journal of Environmental Health Research*, 5 (3), 229-238, **1995**.
- [208] Jayammal, D., Sivakumar, T., Antibacterial Activity of Protein Extract of Marine *Pseudomonas aeruginosa* Against Bacterial Pathogens, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2 (7), 207-216, **2013**.
- [209] <https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder>

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sebahat Tekcan Düğenci
Doğum Yeri : Bornova (İzmir)
Medeni Hali : Evli
E-posta : sebahattekan@gmail.com
Adresi : Nasuh Akar Mah. 1403.sokak 10/6 Balgat ANKARA

Eğitim

Lise : Özel Ortadoğu Fen Lisesi (Diyarbakır)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

ÜDS: 71,25

İş Deneyimi

Klinik Araştırma Saha Koordinatörü (Atlas CRO/Novo Nordisk) (Mart 2014-)

Deneyim Alanları

-

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Tekcan, S., Seyis Bilkay, I. (2012). Mikrosin E492: Kanser Tedavisinde Yeni Bir Umut [Poster]. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya.