

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANATLI GASTROİNTESTİNAL SİSTEMİNDEN
ÖZGÜN LAKTİK ASİT BAKTERİ SUŞLARININ
İZOLASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK YÖNDEN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Esra BEDİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL

Haziran, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANATLI GASTROİNTESTİNAL SİSTEMİNDEN ÖZGÜN
LAKTİK ASİT BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU VE
BİYOTEKNOLOJİK YÖNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esra BEDİR tarafından hazırlanan tez çalışması 22.06.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL
Boğaziçi Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN, Üye
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Hilal AY, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Kanatlı Gastrointestinal Sisteminden Özgün Laktik Asit Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Biyoteknolojik Yönden Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Esra BEDİR

İmza



Bu çalışma, “TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’nın 118C44” numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme
ve
Heroş'a

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca beni destekleyen, değerli bilgilerini, birikimlerini ve zamanını benden esirgemeyen tezimin yürütülmesine danışmanlık ederek akademik kariyerimin temellerini atmamı sağlayan danışmanım Doç.Dr. Tülin ÖZBEK ve eş danışmanım Dr. Öğr.Üyesi Enes Seyfullah KOTİL’e teşekkürlerimi borç bilirim. Aynı zamanda bu tez çalışmasının ortaya çıkmasında büyük katkısı olan ve fikirleri ile beni yönlendirip danışmanlığını benden esirgemeyen Dr. Öğr.Üyesi Fatih ORTAKCI’ya da teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimde destekleriyle ve sağladıkları imkanlarla tezimi ilerletmemde büyük katkısı olan Prof. Dr. Nurhan ERTAŞ, Prof. Dr. Feray AYDOĞAN, Prof. Dr. Emine Nursen TOPCUOĞLU, Prof. Dr. Ayten KİMİRAN, Doç. Dr. Songül EĞLENCE BAKIR ve Vet. Hek. Dr. öğrencisi Dursun Alp GÜNDOĞ’a da çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca beni moral ve motivasyon konusunda destekleyen, deneylerim konusunda bana yardımcı olan ve yönlendiren, akademik hayatın yükünü benimle omuzlayan, karşılaştığım zorluklarla mücadele etmem konusunda bana hep yardımcı olan ve iyi ki tanışmışım dediğim Rabia HIZARCI, Hande HANÇER, Semra TAŞDURMAZLI, Berna ERDOĞDU, Arş. Gör. Senanur DOKUZ, İlknur YILMAZ, Emine SELÇUK, İlgül AKMAYAN ve KotilLab’ın tüm üyelerine çok teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen en büyük destekçim canım annem Mülkinaz BEDİR’e, maddi ve manevi olarak arkamda dağ gibi duran biricik babam Vasfi BEDİR’e, hayatta başıma iyi ki gelmiş dediğim canım ablalarım ve kardeşim Sema BEDİR, Seda BEDİR ve Berat BEDİR’e her zaman bana inandıkları ve yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte maddi desteğini benden esirgemeyen TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Esra BEDİR

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Laktik Asit Bakterileri:	1
1.1.1 <i>Lactobacillus salivarius</i>	4
1.1.2 <i>Lactobacillus reuteri</i>	5
1.2 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Metabolitler	6
1.2.1 Hidrojen Peroksit	6
1.2.2 Organik Asitler	6
1.2.3 Diasetil	7
1.2.4 Asetaldehit	7
1.2.5 Reuterin	7
1.2.6 Bakteriyosinler	8
1.3 Tezin Amacı	29
1.4 Hipotez	30
2 MATERYAL VE METOT	31
2.1 Materyal:	31
2.2 Metot:	43
3 SONUÇ	58
3.1 Deneysel Sonuçlar	58
3.2 Tartışma ve Öneriler:	84
KAYNAKÇA	93
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	107

KISALTMA LİSTESİ

H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikrometre
2,4-DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazin
bp	Baz çifti
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
g	Gram
GRAS	Generally recognized as safe
HCl	Hidrojen Klorür
HPA	Hidroksipropanaldehit
kDa	Kilodalton
KOH	Potasyum hidroksit
LAB	Laktik asit bakterisi
Lan	Lantiyonin
Lox	Laktat oksidaz
M	Molar
MeLan	Metillantiyonin
mg	Miligram
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
mm	Milimetre
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Sodyum Klorür

NADH	Nikotinamid adenin dinökleoid hidrit
NaOH	Sodyum hidroksit
Nox	NADH oksidazlar
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat Buffer Saline
pH	Potansiyel hidrojen
Pox	Pirüvat oksidaz
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforez
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TSB	Tryptic Soy Broth
v/v	Hacim/Hacim
VRSA	Vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	World Health Organization
HKO	Hücresiz kültür ortamı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Glikozun ana fermentasyon yolları a) Homofermentatif fermentasyon (Glikoliz), b) Heterofermentatif fermentasyon (Fosfoketolaz yolu) [2].	3
Şekil 1.2	Reuterin sistemi a) Reuterin hidrat, dimer ve akrolein formu, b) Reuterin sistemi ve olası etki mekanizması [35] [23]	8
Şekil 1.3	Nisin biyosentezi [73].	17
Şekil 1.4	Bakteriyosinlerin biyosentezi [54].	18
Şekil 1.5	Lipid II oluşumu ve Lipid II aracılı hedef hücre zarında gözenek oluşumu [57].	20
Şekil 1.6	Nisinin etki mekanizması [82].	21
Şekil 1.7	Sınıf II bakteriyosinlerin etki mekanizmaları [62].	22
Şekil 1.8	<i>Lactobacillus lactis</i> 'in nisinin etkisinden korunmak için kullandığı bağışıklık mekanizması [57].	24
Şekil 1.9	Lipid II ve Man-PTS hedefleyen mersasidin a) ve Laktokoksin A'nın b) bağışıklık ve taşıma mekanizmaları [54].	25
Şekil 2.1	Tavuk doku ve dışkı örneklerinden bakteri izolasyonu aşaması a) peptonlu su içerisinde doku örnekleri, b) homojenize edilmiş doku örnekleri, c) anaerobik ortam sağlamak için kullanılan anaerobik kitler	44
Şekil 2.2	a) Boyama işleminde kullanılan 2,4-Dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) yapısı, b) reuterin (3-HPA) yapısı	45
Şekil 2.4	MIC Deneyi için kullanılan antibiyotikler ve oranları	55
Şekil 3.1	Tavuk bağırsağından izole edilen farklı morfolojilere sahip bakterilerin petri resimleri	58
Şekil 3.2	Tavuk bağırsağından izole edilen bakterilerin boyama öncesi ve sonrası petri görüntüleri	59
Şekil 3.3	Biogaia'dan <i>Lactobacillus reuteri</i> bakterisinin izolasyonu ve 2,4-DNPH ile boyanması a) biogaia, b) bakterilerin tek koloni görünümüleri, c) kırmızı ile işaretlenmiş reuterin üreten <i>Lactobacillus reuteri</i> bakterileri	59
Şekil 3.4	Tek koloni ekimi yapılan c1 kolonilerinin boyama sonucu petri görüntüleri	60
Şekil 3.5	Tek koloni ekimi yapılan c2 kolonilerinin boyama sonucu petri görüntüleri	60
Şekil 3.6	Bakterilerin gram boyama sonucunda ışık mikroskobu (100x) görünümüleri; a) C1-4, b) C1-2, c) C1-7, d) C2-1, e) C2-4, f) C2-3	61
Şekil 3.7	Katalaz testi sonuçları 1) C1-4, 2) C1-2, 3) C1-7, 4) C2-1, 5) C2-4, 6) C2-3, 7) <i>S. aureus</i> (pozitif kontrol)	62
Şekil 3.8	Glukozdan gaz oluşumu deneyi sonuçları; 1) MRS Broth (Negatif Kontrol), 2) C1-4, 3) C1-2, 4) C1-7, 5) C2-1, 6) C2-4, 7) C2-3	62
Şekil 3.9	Bakteri örneklerinin <i>S. aureus</i> patojenine karşı antibakteriyal aktiviteleri 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (pozitif kontrol), 8) MRS Broth (Negatif kontrol)	63
Şekil 3.10	Bakteri örneklerinin <i>E. coli</i> patojenine karşı antibakteriyal aktiviteleri 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (Pozitif kontrol), 8) MRS Broth (Negatif kontrol)	63

Şekil 3.11 Bakteri örneklerinin <i>L. monocytogenes</i> patojenine karşı antibakteriyal aktiviteleri 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (Pozitif kontrol), 8) MRS Broth (Negatif Kontrol)	64
Şekil 3.12 Bakteri örneklerinin <i>S. Typhimurium</i> patojenine karşı antibakteriyal aktiviteleri, 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (Pozitif kontrol, 8) MRS Broth (Negatif Kontrol).....	64
Şekil 3.13 Bakteri örneklerinin a) <i>S. aureus</i> , b) <i>E. coli</i> , c) <i>S. Typhimurium</i> , d) <i>L. monocytogenes</i> indikatör mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel aktiviteleri	66
Şekil 3.14 16S rRNA PZR sonucunda agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 3.15 C1-4 suşunun 16S Sanger Dizileme sonuçları	68
Şekil 3.16 C2-3 suşunun 16S Sanger Dizileme sonuçları	69
Şekil 3.17 <i>L. salivarius</i> suş 1'in farklı pH'larda gelişim grafiği	70
Şekil 3.18 <i>L. salivarius</i> suş 2'nin farklı pH'larda gelişim grafiği	70
Şekil 3.19 <i>L. salivarius</i> suş 1'in farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim grafiği	72
Şekil 3.20 <i>L. salivarius</i> suş 2'nin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim grafiği	72
Şekil 3.21 <i>L. salivarius</i> suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişim grafikleri.....	74
Şekil 3.22 <i>L. salivarius</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi a) <i>L. salivarius</i> suş 1, b) <i>L. salivarius</i> suş 2, 1) ampicilin, 2) kanamisin, 3) vankomisin, 4) apramisin, 5) tetrasiklin, 6) MRS Broth.....	75
Şekil 3.23 <i>L. salivarius</i> suşlarının farklı patojenlere karşı antibakteriyel etkinlikleri 1-2) <i>L. salivarius</i> suş 1, 3-4) <i>L. salivarius</i> suş 2, 5) MRS Broth (negatif kontrol).....	76
Şekil 3.24 <i>L. salivarius</i> suşlarının bakteriyosin üretme yeteneklerinin agar spot testi ile tayin edilmesi; a) <i>L. monocytogenes</i> , b) <i>S. aureus</i> , c) <i>E. coli</i> , d) <i>S. Typhimurium</i>	78
Şekil 3.25 Proteinlerin amonyum sülfat çöktürme ve metanol/kloroform eklenmesi sonucunda sulu çözeltilerde oluşturduğu protein tabakası	81
Şekil 3.26 Rekombinant proteinin %16 SDS jel görüntüsü	82
Şekil 3.27 Rekombinant proteinin %20 SDS jel görüntüsü	82
Şekil 3.28 Hüresiz kültür ortamlarının amonyum sülfat çöktürme ve metanol/kloroform eklenmesi sonucunda sulu çözeltilerde oluşturduğu protein tabakası	83
Şekil 3.29 Bakteriyosinlerin %16 SDS jel görüntüsü.....	83

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 1 Bakteriyosinlerin genel özellikleri [52].	11
Tablo 1. 2 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması [54]	12
Tablo 2. 1 16S polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler	43
Tablo 2. 2 16S polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler	51
Tablo 2. 3 16S polimeraz zincir reaksiyonu içeriği	51
Tablo 2. 4 Touch Down polimeraz zincir reaksiyonu	51
Tablo 3. 1 İzole edilen bakteri suşlarının agar difüzyon testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)	65
Tablo 3. 2 İzole edilen bakteri suşlarının agar spot testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)	67
Tablo 3. 3 <i>L. salivarius</i> suşlarının farklı antibiyotiklerde MIC değerleri	75
Tablo 3. 4 <i>L. salivarius</i> suşlarının agar spot testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)	76
Tablo 3. 5 <i>L. salivarius</i> suşlarının ve hücresiz kültür ortamlarının agar spot testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)	79

Kanathı Gastrointestinal Sisteminden Özgün Laktik Asit Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Biyoteknolojik Yönden Değerlendirilmesi

Esra BEDİR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç.Dr. Tülin ÖZBEK

Eş-Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Enes Seyfullah KOTİL

Laktik asit bakterileri çeşitli fermente gıdaların üretim süreçlerinde starter kültür olarak çok uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Aynı zamanda insan vücudundaki çeşitli stres durumlarına karşı toleranslı olabilmeleri, bağırsak epiteline yapışma yetenekleri, antimikrobiyal metabolitler üretebilmeleri, insan ve hayvanlar için güvenli olmaları nedeniyle en yaygın kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterileri bu aktivitelerini gerçekleştirebilmek için bakteriyosinler gibi çeşitli antimikrobiyal metabolitler üretirler. Bakteriyosinler, hem Gram-negatif hem Gram-pozitif bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen peptit veya proteinlerdir ve genellikle üretici suşa yakın akraba olan suşlara karşı antimikrobiyal etki gösterirler.

Bu çalışmada, iyi bilinen bir probiyotik bakteri olan *Lactobacillus salivarius*, serbest dolaşan köy tavuklarının gastrointestinal sisteminden izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin morfolojik, biyokimyasal, moleküler tanımlamaları

gerçekleştirildikten sonra probiyotik özellikleri değerlendirilmiş ve farklı patojen bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinlikleri test edilmiştir. Daha sonra bu antibakteriyel etkinliğe sebep olduğu düşünülen bakteriyosin, amonyum sülfat çöktürme ve metanol/kloroform çözeltisi kullanılarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile analizi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *Lactobacillus salivarius* suşlarının; düşük pH, yüksek tuz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklık gibi olumsuz çevre şartlarına toleranslı olduğu bulunmuştur. Yapılan antibakteriyel testler sonucunda, suşların; bazı dirençli veya dirençsiz patojenler üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiş ve bu etkinliğin sebebinin bakteriyosin kaynaklı olabileceği doğrulanmıştır. Çalışmamızda <20 kDa altında iki farklı bakteriyosin varlığı tespit edilmiş olup ileriki çalışmalarda bakteriyosinlerin yüksek miktarda eldesi, saflaştırılması ve sekanslama işlemleri yapılarak sağlık, gıda ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanılmasını sağlamaktır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, Antimikrobiyal peptitler, *Lactobacillus salivarius*, Antibiyotik direnci

Isolation and Biotechnological Evaluation of Specific Lactic Acid Bacteria Strains from the Poultry Gastrointestinal System

Esra BEDİR

Department of Biotechnology

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Tülin ÖZBEK

Co-supervisor: Asst. Prof. Enes Seyfullah KOTİL

Lactic acid bacteria have a long history of use as starter cultures in the production processes of various fermented foods. At the same time, they are the most widely used probiotic microorganisms due to their tolerance to various stress situations in the human body, their ability to adhere to the intestinal epithelium, to produce antimicrobial metabolites and to be safe for humans and animals. Lactic acid bacteria produce various antimicrobial metabolites such as bacteriocins in order to carry out these activities. Bacteriocins are peptides or proteins that are ribosomally synthesized by both Gram-negative and Gram-positive bacteria and generally exert antimicrobial activity against strains closely related to the producer strain.

In this study, *Lactobacillus salivarius* a well-known probiotic bacteria was isolated from the gastrointestinal tract of free-range chickens. After performing the morphological, biochemical and molecular identification of the isolated bacteria, their probiotic properties were evaluated and their antibacterial activities were tested on different pathogenic bacteria. Then, bacteriocin which is thought to cause this antibacterial activity was purified using ammonium sulfate precipitation and methanol/chloroform solution and analyzed by SDS-PAGE.

According to the results obtained, *Lactobacillus salivarius* strains; it has been found to be tolerant of adverse environmental conditions such as low pH, high salt concentration and high temperature. As a result of antibacterial tests, strains; it has been determined that it has an antibacterial effect on some resistant or non-resistant pathogens and it has been confirmed that the reason for this activity may be caused by bacteriocin. In our study, the presence of two different bacteriocins under <20 kDa was detected and in future studies, high amounts of bacteriocins are obtained, purified and sequencing to ensure their use in various fields such as health, veterinary, agriculture, food and cosmetics.

Keywords: Bacteriocins, Antimicrobial peptides, *Lactobacillus salivarius*, Antibiotic resistance



1.1 Laktik Asit Bakterileri:

Laktik asit bakterileri (LAB); Gram-pozitif, spor oluşturmayan, anaerobik veya fakültatif aerobik, kok veya basıl şeklinde, katalaz negatif, aerotolerant, karbonhidratları ve yüksek alkollerle fermente ederek başlıca son ürün olan laktik asit üreten bakteri grubudur. Doğada süt ürünlerinde, et ve sebzelerde, insan ve hayvanların gastrointestinal ve ürogenital sisteminde, toprak ve suda yaygın olarak bulunurlar [1]. Bağırsak hücrelerine yapışma yetenekleri, bağırsakta bulunan safra tuzları ve düşük pH'lara karşı dirençli olabilmeleri, ürettikleri çeşitli asitlerle bağırsak epiteline patojen bakterilerin yapışmasını engellemeleri gibi özelliklerinden dolayı özellikle canlıların gastrointestinal sistemine iyi uyum sağlamışlardır [2]. Fermentatif özelliklerinden dolayı endüstriyel ve gıda sektöründe doğal veya starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. LAB, gelişme ortamında bulunan karbonu metabolize ederek ürettiği laktik asit ile gıdalarda asitliğin yükselmesine neden olduğundan gıdaların raf ömrünün uzamasını sağlar. Gıdalarda starter kültür olarak kullanıldığında; laktik asit üretiminin yanı sıra asetik asit, asetaldehit, etanol, diasetil gibi yan ürünler üreterek gıdaların tat ve doku özelliklerine katkıda bulunur ve gıdaların besin değerini yükseltirler [3]. LAB; gelişebilmesi için oksijene ihtiyaç duymaması, sıcaklık ve tuza toleranslı olmaları gibi özelliklerinden dolayı da et ve et ürünlerinde, zeytin, turşu gibi bitki kökenli gıdalarda, ekmek ve bira gibi fermente tahıl ürünlerinde de bulunur [4]. Aynı zamanda insan vücudunda düşük pH ve safra tuzu gibi çeşitli stres durumlarına karşı dirençli olmaları, insanlar ve hayvanlar için güvenilir olmaları ve konakçının sağlığı üzerinde çeşitli faydalı etkiler sağlamaları nedeniyle en yaygın kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* en çok kullanılan probiyotik laktik asit bakterilerindendir [5].

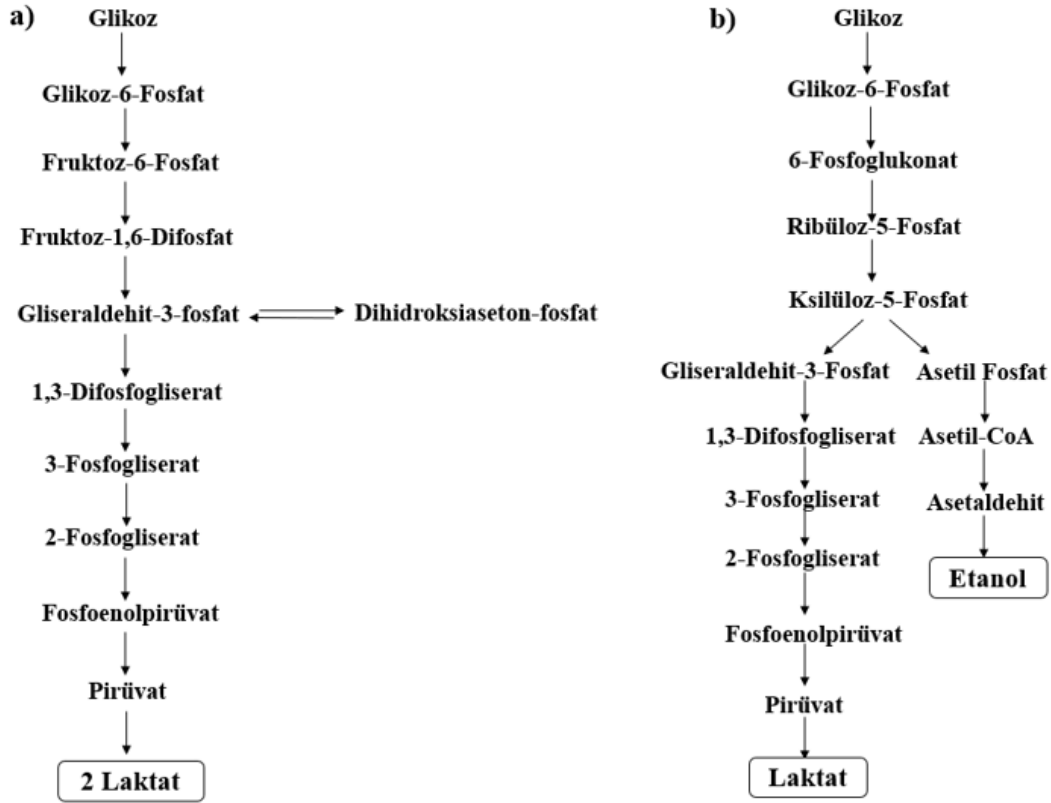
Günümüzde probiyotik kavramı insan ve hayvanların sağlığını desteklemek için gıda, gıda katkı maddeleri veya yemlere ilave edilen mikrobiyal preparatların tümünü kapsamaktadır. FAO (Food and Agriculture Organization of the United

Nations) ve WHO (World Health Organization)'a göre probiyotikler 'Yeterli miktarlarda vücuda alındıklarında insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösterebilen canlı mikroorganizmalar' olarak tanımlanmıştır [6]. Yapılan birçok çalışmada probiyotiklerin kronik hastalıklar, otoimmün hastalıklar, pediatrik hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıkların şiddetinin hafifletilmesinde aktif rol oynadığı gösterilmiştir [7]. Probiyotikler, patojenik bakterilerin bağırsakta çoğalmasını önleyebilir, patojenlerin istilasına karşı bağırsağın direncini artırabilir ve bağırsak epiteli fonksiyonunu iyileştirebilir. Aynı zamanda bağırsakta çözünür faktörlerin veya kısa zincirli yağ asitlerinin salgılanmasını ve üretimini arttırarak hastalık süreçlerini iyileştirebilirler [8], [9].

Potansiyel olarak bir suşun probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Öncelikle probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların konakçıda bulunan diğer mikroorganizmalara karşı etkin olması ve konakçıya yararlı etkiler sağlaması gerekmektedir. İnsan ve hayvanda yan etki oluşturmaması, canlılar için güvenilir olması, patojenik olmaması ve toksin maddeler üretmemesi çok önemlidir. Probiyotik mikroorganizmalar düşük pH, yüksek safra tuzu ve yüksek sıcaklık gibi olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı olmalı ve bu koşullardan etkilenmeden bağırsakta iyi bir şekilde kolonize olabilmelidir. Ürettikleri antimikrobiyal metabolitler ile konakçıda bulunan patojenik bakterilere karşı antagonistik etki gösterebilmelidirler. Aynı zamanda canlı ve çok sayıda olmalı ve bağırsak ortamında canlı kalabilmelidirler. Son olarak probiyotik mikroorganizmalar seri üretim ve depolama işlemleri sırasında canlılığını koruyarak aktivitesini yitirmemelidir [5], [10]. Laktik asit bakterileri bu kriterlerden birçoğunu karşılamasından dolayı günümüzde probiyotik mikroorganizmalar olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

Laktik asit bakterileri temelde *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* olarak dört gruba ayrılır [11]. Aynı zamanda laktik asit bakterileri karbonhidratları fermente etme şekillerine göre de homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri olarak sınıflandırılabilir. Homofermentatif laktik asit bakterileri glikoz fermentasyonunda birincil ürün olarak yalnızca laktik asit üretir. Bu bakteriler substrat düzeyinde fosforilasyon yoluyla bakteriye enerji sağlamak amacıyla ATP molekülü oluşturmak için glikoz moleküllerini iki laktik asit molekülüne dönüştürürler. *Lactococcus*, *Streptococcus* ve bazı *Lactobacillus*

cinsi laktik asit bakterileri bu gruba dahildir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise glikoz fermentasyonunda laktik aside ek olarak etanol, asetik asit, propiyonik asit, asetaldehit, diasetil, karbondioksit gibi yan ürünler üretir. *Leuconostoc*, *Weissella* ve bazı *Lactobacillus* cinsi laktik asit bakterileri bu gruba dahildir [1].



Şekil 1. 1 Glikozun ana fermentasyon yolları a) Homofermentatif fermentasyon (Glikoliz), b) Heterofermentatif fermentasyon (Fosfoketolaz yolu) [2].

Laktik asit bakterilerinden *Laktobasiller* laktik asit bakterilerinin en büyük grubunu oluşturur. İnsanlarda ve hayvanlarda en yaygın bulunan probiyotik mikroorganizmalardır. İnsan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde türe, konağın yaşına veya yere bağlı olarak değişken miktarlarda bulunmaktadır [12]. Bu cins bakteriler aynı zamanda gıda fermentasyonunda da önemli rol oynar. Hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar *Laktobasil* türlerinin enterik enfeksiyonlar, ishal, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, kolorektal kanser, huzursuz barsak sendromu gibi birçok bağırsak hastalığının tedavisini önlemede etkin rol oynadığını kanıtlamıştır. *Laktobasillerin* en çok fayda sağladığı bölge gastrointestinal sistem olmasına rağmen vücudun farklı bölgelerine de probiyotik olarak uygulamaları

bulunmaktadır. Kadınlarda ürogenital hastalıkların ve bakteriyel vajinozun önlenmesi ve tedavisinde, atopik dermatit gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve diş çürüklerinin önlenmesinde de etkin kullanımları mevcuttur [13].

Bağırsakta bulunan ve probiyotik özellikleri ile yaygın olarak bilinen başlıca laktobasil türleri *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius* ve *Lactobacillus ruminis*'dir [14].

1.1.1 *Lactobacillus salivarius*

Lactobacillus salivarius bakterisi adını ilk izole edildiği yer olan ağız boşluğunda bulunan 'salivary (tükürük)'den almıştır [15]. Bu bakteriler kaz, tavuk, hindi, güvercin, ördek, domuz ve sığırlar dahil olmak üzere kuşların ve memelilerin bağırsak ve dışkılarında yaygın olarak bulunan Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz-negatif, aerotolerant ve anaerobik basillerdir. Aynı zamanda insanların ağız boşluğunda ve vajina mikrobiyotasında, anne sütünde, üzüm şarabında ve ette de varlığı doğrulanmıştır [16]. *Lactobacillus salivarius* türleri genellikle homofermentatif laktik asit bakterileridir fakat heterofermentatif olan türleri de vardır. Birçok *Lactobacillus salivarius* türü bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, antimikrobiyal maddeler üretme, bağışıklık yanıtını uyarma, fekal enzimatik aktiviteyi inhibe etme, kısa zincirli yağ asitleri üreterek bağırsağın asiditesini düşürme gibi probiyotik özelliklere sahiptir [17]. Bazı çalışmalarda tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen *Lactobacillus salivarius* suşlarının *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter spp.* gibi patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir [16]. Çoğu *Lactobacillus salivarius* suşu Sınıf IIa, IIb ve IId sınıflarına ait olan bakteriyosinlerin üreticisi olan insan, domuz ve kuşların gastrointestinal sistemlerinden izole edilen umut verici probiyotik adaylardır [18]. İnsan ve domuz bağırsağından izole edilen suşlarda Sınıf II bakteriyosinlerden salivarisin P, T, L, CRL 1328, LS1, Abp118, tavuk bağırsağından izole edilenlerde salivarisin SMXD5, FK22, OR7 ve L-1077 tespit edilmiştir.

Lactobacillus salivarius'un insanlarda probiyotik olarak kullanıldığında çocuk ve yetişkinlerde kronik hastalıkların ve enfeksiyonların tedavisinde, diş sağlığının korunmasında, gastrointestinal problemlerin çözümünde çeşitli yararlı etkilere sahip olduğu görülmüştür [19].

1.1.2 *Lactobacillus reuteri*

Lactobacillus reuteri bakterisi adını Alman mikrobiyolog Gerhard Reuter'den alır ve ilk olarak 1962 yılında keşfedilmiştir [20]. İnsan ve hayvanların (fare, sıçan, hindi, domuz, tavuk) gastrointestinal sisteminde kolonize olan heterofermentatif laktik asit bakterileridir. Gastrointestinal sistemdeki düşük pH ve safra tuzlarına olan stabilitesi, bağırsak epitelinde iyi kolonize olabilmesi ve patojenik ajanlara karşı antagonizm etkileri sebebiyle iyi bir probiyotik aday olarak değerlendirilirler [21]. Yapılan hayvan deneyleri ile *L. reuteri* bakterilerinin Caco-2, IEC-6 ve IPEC-J2 bağırsak epitel hücre hatlarında güçlü bir yapışma etkinliğinin olduğunu kanıtlanmıştır [22]. *L. reuteri* bakterileri konakçı organizmaya faydalı etkileri olan laktik asit, hidrojen peroksit, reuterin ve reuterisiklin gibi çeşitli antimikrobiyal ürünler üretebilirler. Bu antimikrobiyal metabolitler sayesinde *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* gibi birçok enterik bakterinin etkin bir şekilde inhibisyonunu sağlarlar [21].

L. reuteri bakterilerini probiyotik olarak piyasaya süren ilk anahtar bulgu bu bakterilerin ürettiği reuterin antimikrobiyal bileşiğinin keşfi olmuştur. İlk olarak 1980 yılının sonlarında domuz bağırsağından izole edilen ilgili bakteri suşunun gliserol varlığında ürettiği bileşiğin bakteri, mantar ve protozoaları hatta virüsleri dahi etkisiz hale getirebilen bir antimikrobiyal bileşik olduğu bulunmuştur [20]. Bu antimikrobiyal bileşik reuterin veya 3-Hidroksipropanaldehit (3-HPA) olarak tanımlanmıştır ve gliserolün 1,3-Propandiole dönüştürülmesinde bir ara madde olduğu bulunmuştur. Bugüne kadar gliserolü 3-HPA'ya fermente edebilen altı bakteri türü tanımlanmıştır: *Bacillus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium* ve *Lactobacillus spp.* [23]. Fakat bunlardan *L. reuteri* yüksek seviyelerde 3-HPA'yı hücre dışına salgılaması yeteneğiyle benzersiz bir yeteneğe sahiptir.

Aynı zamanda *L. reuteri* suşları kobalamin (B12 vitamini), folik asit ve tiamin dahil olmak üzere birçok vitamin üretme yeteneğine sahiptir [24]. *L. reuteri* ekşi maya, et, süt ürünleri gibi çeşitli fermente gıdada kullanılmaktadır. 2008 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA-U.S. Food and Drug Administration) tarafından 'genel olarak güvenli kabul edilen' (GRAS) statüsü verilmiştir [25].

1.2 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Metabolitler

Laktik asit bakterileri organik asitler (laktik, sitrik, asetik, fumarik ve malik asit), hidrojen peroksit, diasetil, etanol, reuterin, asetaldehit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri inhibitörler gibi çeşitli antimikrobiyal metabolitler üretmektedir [26]. Ürettikleri bu metabolitler laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak veya çeşitli sektörlerde katkı maddesi olarak kullanımında önemli bir role sahiptir.

1.2.1 Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) esas olarak karbon ve enerji metabolizmasında pirüvat oksidaz (Pox), laktat oksidaz (Lox) ve NADH oksidazlar (Nox) dahil olmak üzere oksidazlar tarafından üretilir. Birikimi ise temel olarak katalaz ve NADH peroksidaz gibi ana hidrojen peroksit tutucu enzimlerden yoksun türlerde meydana gelmektedir. H_2O_2 katalaz enzimi tarafından parçalanmaktadır. Ancak laktik asit bakterileri katalaz enzimine sahip olmadıklarından dolayı H_2O_2 'yu parçalayamazlar ve hücre dışına parçalamadan salgırlar. Böylece laktik asit bakterileri tarafından üretilen H_2O_2 diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösterebilmektedir [27], [28].

1.2.2 Organik Asitler

Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri karbonhidrat metabolizmasının son ürünleri olarak laktik asit, asetik asit, benzoik asit, propiyonik asit gibi çeşitli organik asitler üretebilmektedirler.

Laktik asit; mayalar, küfler, mantarlar ve bakterilerin karbonhidratları (şeker ve nişasta gibi) alkol, gaz ve asitlere ayırdığı bir süreç olan fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Genellikle yoğurt, peynir, tereyağı, bira, ekmek hamuru, et ürünleri ve salamura sebzeler gibi gıdalarda bulunan doğal koruyuculardır. Yiyeceklerin raf ömrünün uzamasını sağlarken tat, doku ve besin değerinin yükselmesini sağlar. Laktik asit oluşumu, üretici bakterinin büyümesini ve gelişmesini teşvik ederken bağırsakta bulunan laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit bağırsağın asiditesini düşürerek patojen bakterilerin gelişimini engeller ve bu sayede bağışıklık sisteminin güçlenmesini sağlar. Asetik asit gıdaların asitliğini düzenlemek için gıda katkı maddesi ve koruyucu olarak gıdalara eklenmektedir. Gıdalarda tuz ve sirke gibi asit aroması vererek organoleptik kaliteyi iyileştirmek için kullanılır [29]. Propiyonik asit sağlık, kozmetik, endüstri ve gıda gibi birçok

sektörde en çok kullanılan uçucu yağ asitlerinden biridir. Özellikle ekmeğin korunmasında bir mantar büyümesini engellediği için en yaygın kullanılan ticari tahıl koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Peynir, tereyağı, unlu mamullerde mantar gelişimini önlemek için meyve suyu ve bazı meyvelerde ise bakteri ve mantarların gelişimini önlemek için gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadırlar [30]. Benzoik asit genellikle süt ürünlerinde bulunur. Antimikrobiyal aktivitesinden dolayı meyve, sebze, baharat, süt ürünleri ve peynir gibi gıdalarda gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır [31].

1.2.3 Diasetil

Laktik asit bakterilerinde pirüvat yoluyla sitratın transformasyonu sırasında oluşur. Düşük pH 'da maksimum diasetil oluşumu gözlemlenir. Gıda sektöründe tereyağının karakteristik aromasından sorumlu olan bileşendir. *Bacillus* cinsine ait Gram-pozitif bakteriler ve *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia* ve *Aeromonas* cinsi Gram-negatif bakteriler üzerinde etkilidir. Fakat koruyucu etkisinden daha çok besinlerde aroma verici olarak kullanılmaktadır [32].

1.2.4 Asetaldehit

Asetaldehit düşük moleküler ağırlığa sahip uçucu bir bileşiktir. Meyvelerin alkollü fermentasyonunun veya şeker metabolizmalarının bir ara ürünüdür. Aynı zamanda şaraptaki asetik asit bakterileri ve etanol ve fenolik bileşiklerin metabolizması ile oluşur. Doğal olarak meyve, sebze, süt ürünleri, et ve balıkta bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde çeşitli içeceklerde ve meyve ürünlerinde lezzet artırıcı veya bakterilere karşı gıdayı koruyucu olarak eklenmektedir [33].

1.2.5 Reuterin

Heterofermentatif laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus reuteri* tarafından oluşturulan antimikrobiyal bileşiktir. *L.reuteri* anaerobik koşullar altında koenzim B12'ye bağımlı gliserol dehidrataz aracılı bir reaksiyonda 3-HPA (3-Hidroksipropanaldehit) üretmek için gliserolü metabolize etmektedir [12]. Gliserol ilk olarak vitamin B12 bağımlı enzim olan gliserol dehidrataz tarafından 3-HPA'ya dönüştürülür ve bu daha sonra 1,3-propandiol oksidoredüktaz tarafından 1,3-propandiole indirgenir. *L. reuteri* büyüme ortamına gliserol eklenmesi bakterinin karbon kaynağı olarak gliserol kullanmamasına rağmen bakterinin büyüme verimini artırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir [20]. Reuterin Gram-pozitif ve

Reuterin sistemi ve olası etki mekanizması [35] [23]

Çoklu geniş spektrumlu antibiyotiklerin klinik, tarım, hayvancılık gibi alanlarda aşırı kullanımı tek ve ardından çoklu antibiyotiğe dirençli patojenlerin ortaya çıkmasına ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinin zorlaşmasına sebep olmuştur [36]. Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre çoklu ilaca dirençli

patojenlerin neden olduğu hastalıklar dünya çapında ciddi bir halk sağlığı sorunudur [37]. Endişe verici bir şekilde antibiyotiğe dirençli patojenlere karşı yeni ilaçlar üretilmezse 2050 yılına kadar enfeksiyonları tedavi edecek etkili bir antibiyotiğin bulunamayacağı tahmin edilmektedir [38]. Bu nedenle yeni antimikrobiyal ajanların özellikle çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı etkin olanların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu alternatiflerden bakterilerin rekabeti önlemek ve hayatta kalmak için popölasyondaki diğer bakterilere karşı ürettiği küçük antimikrobiyal peptitler olan bakteriyosinler insan sağlığında uygulamaları olan antimikrobiyal peptidlerin en önemli grubunu temsil etmektedir [39], [40].

Bakteriyosinler farklı bakteriyel, fungal ve viral türlere hatta bakteriyel biyofilmler gibi doğal dirençli yapılara karşı potansiyel antimikrobiyal ajan olarak oldukça ilgi görmektedir [41]. Bakteriyosinler belirli özelliklerinden dolayı klasik antibiyotiklere alternatif olarak gösterilebilirler; i) hedef hücreyi istila eden tek bir bakteriyosin molekülü hedefi öldürebilme yeteneğine sahiptir, ii) bilinen tüm insan ve hayvan patojenlerine karşı biyolojik aktiviteye sahiplerdir ve bir çok enfeksiyonda etkilidirler, iii) hem metabolik olarak aktif hem de aktif olmayan hücrelere karşı hızlı bir öldürme/engelleme mekanizmaları vardır, iv) geleneksel antibiyotiklerle karşılaştırılabilir MIC (minimum inhibitör konsantrasyon) değerlerine sahiptirler, v) çok çeşitli ekolojik faktörler (sıcaklık, pH) altında kararlı antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler, iv) dirençle ilişkili mutasyonlar için seçim gösterirler [36].

Bakteriyosinler sentez, etki mekanizmaları, antimikrobiyal etkileri, toksisite ve direnç mekanizmaları açısından klasik antibiyotiklerden ayrılır. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken antibiyotikler ikincil metabolitler olarak sentezlenirler. Bakteriyosinler genellikle patojenlerin hücre zarında por oluşturarak veya hücre duvarı oluşumunu engelleyerek etki gösterirken, antibiyotikler patojenlerin hücre zarına etki eder veya hücrenin gen ekspresyonu ve protein biyosentezini inhibe ederler. Bakteriyosinler belirli bakterilere karşı etkinlik gösterir (yalnızca kendi ile yakın akraba olan türlere etki ederler) antibiyotiklerin ise daha geniş bir etki alanı vardır. Bakteriyosinler genellikle insanlar için toksik değildir ve antibiyotiklere olduğu gibi yan etki oluşturmazlar. Bakteriyosinler antibiyotiklere kıyasla sıcaklığa daha az duyarlıdır ve aşırı pH'a dirençlidirler. Bunun sebebi çeşitli translasyon sonrası modifikasyonlarla oluşturulan karmaşık

yapılarıdır. Antibiyotiklerin aksine bakteriyosinler peptit omurgaları nedeniyle proteazlara duyarlı hale gelebilirler. Bakteriyosin üreten hücreler ürettikleri bakteriyosinlere karşı bağışıklık da kazanırlar. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler bakteriyosinlerin kodlanmasını sağlayan genlerle bağlantılıdır, fakat antibiyotiklerde bağışıklığı yöneten genetik belirleyiciler yapısal antibiyotik genleriyle bağlantılı değildir [36], [42], [43].

Bakteriyosinler ilk olarak 1925 yılında André Gratia tarafından *E. coli* suşlarının büyümesini engelleyen ısıya dayanıklı bir madde olan kolisin V'in üretimine bağlı olarak *E. coli* suşlarında tanımlanmıştır [44]. Üç yıl sonra Rogers ve Whittier laktik asit bakterileri tarafından üretilen bir antimikrobiyal madde keşfetmiş ve bu maddeyi saflaştırarak bu maddeye 'nisin' adını vermiştir [45]. Fakat daha sonra bu maddeye benzer daha fazla maddeler tespit edilince tanım genişletilmiştir. 'Bakteriyosin' kelimesi ilk olarak Jacob ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [46]. Bu dönemlerde bakteriyosinlerin biyolojilerinin anlaşılabilmesi, üretimlerindeki zorluklar ve mikrobiyal büyümeyi kontrol etmede yaşanan problemlerden dolayı bakteriyosinler antibiyotikler ile aynı düzeyde ilgi görmemiştir. Böylece 20. yüzyılın geri kalanından günümüze kadar kimyasal olarak sentezlenmiş ve geniş spektrumlu etkilere sahip olan antibiyotiklerin hakimiyeti devam etmiştir.

Bakteriyosinler genel olarak üretici suş ile benzer veya yakından ilişkili bakteri suşlarının gelişimini engellemek için bakteriyel ribozomlar tarafından sentezlenen proteinli veya peptidik toksinler olarak tanımlanır [47]. 20-60 amino asitten oluşurlar ve katyonik ve hidrofobik antimikrobiyal peptit gruplarıdır. Bakteriyosinleri kodlayan genler kromozomlar, plazmidler veya mobil genetik elementlerde bulunan operonlar halinde düzenlenirler [48]. Genellikle bu operonlar indüklenelirdir ve indüksiyon için bakteriyel peptidlerin salgılanması ve hücre dışına salgılanarak birikmesi gerekmektedir [49]. Bakteriyosinler hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakteriler ve arkeler tarafından üretilirler ve boyut, yapı, etki şekilleri, antimikrobiyal aktiviteleri, bağışıklık mekanizmaları ve hedef hücre reseptörleri açısından heterojen bir peptit grubu oluştururlar [50]. Bakteriler ürettikleri bu antimikrobiyal peptitleri hücre dışına erken durağan büyüme fazına geç üstel fazında salgırlar. Özellikle Gram-pozitif bakterilerden laktik asit bakterileri bakteriyosin üretiminde oldukça iyi bilinen bakterilerdir [51].

Tablo 1. 1 Bakteriyosinlerin genel özellikleri [52].

Kaynak	Birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri tarafından üretilen ekstrasellüler metabolitlerdir.
İnsanlar üzerinde etkileri	Sindirim proteazları tarafından inaktive edildikleri için genellikle insanlar için güvenlidirler.
Aktivite spektrumu	-Çoğu bakteriyosin yalnızca üretici suşa yakın ilişkili suşlara etki ettikleri için dar etki spektrumuna sahiptir.
Etki Mekanizmaları	-Hücre zarında gözenek oluşumu -DNA, RNA ve protein sentezinin inhibisyonu -Hücre lizisi
Kimyasal yapıları	-Basit proteinler, Glikoproteinler, Lipoproteinler
Moleküler Ağırlık	Genellikle <10 kDa'dan düşük
Amino asit sayısı	-19-80 aminoasit, genellikle 40
Özellikleri	-Hidrofobik ve ampifilik
Bakteriyosin kodlayan genlerin yerleri	-Plazmidler, kromozomlar, transpozonlar
Enzimlere karşı duyarlılık	-Tüm bakteriyosinler proteolitik enzimlere (pepsin, tripsin ve pronaz) duyarlıdır, bazı bakteriyosinler amilolitik ve lipolitik enzimlere de duyarlı olabilir.
Sıcaklığa karşı duyarlılık	-Isıya dayanıklıdır, çoğu 100-121°C sıcaklıkta 10-15 dakika ısıtmaya dahi dayanabilir
pH' karşı duyarlılık	-Çoğu bakteriyosin 3.0-9.0 arası pH'a karşı dirençlidir

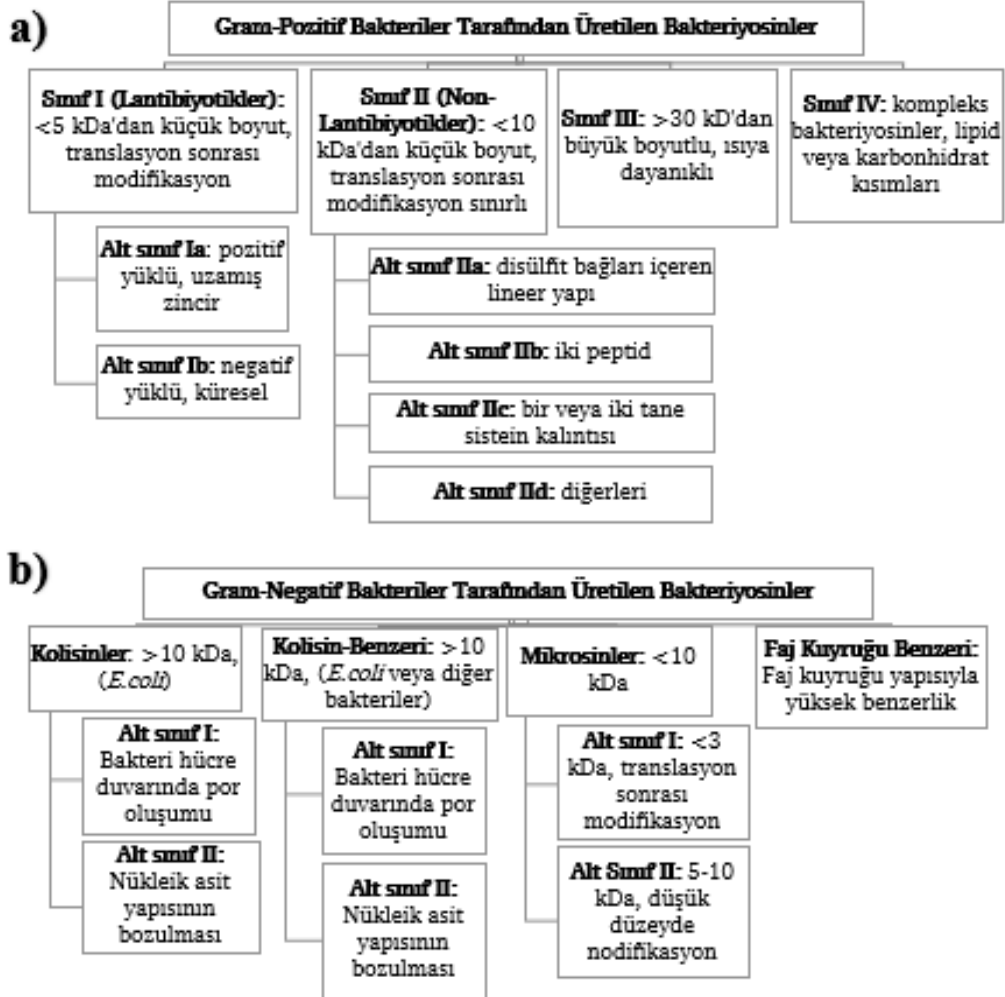
1.2.6.1 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Bakteriyosinlerin çoğu laktik asit bakterilerinden izole edilmiş ve çeşitli özellikleri göz önüne alınarak tanımlanmıştır. Bakteriyosinler farklı yapı, etki mekanizması, biyokimyasal özellik, aktivite spektrumu, hedef hücre reseptörlerine sahiptirler [48].

Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler; biyokimyasal ve genetik özellikleri, disülfid ve monosülfid bağlarının varlığı, moleküler ağırlıkları, ısı kararlılığı, enzimatik kararlılık, amino asitlerin translasyon sonrası modifikasyonlarının varlığı veya yokluğu, antibakteriyel etkilerine göre üç gruba ayrılmıştır. Başlangıçta dördüncü bir grupta tanımlanmıştır daha sonrasında bu grup

karbonhidrat ve lipid kalıntıları ile büyük kompleksler içeren biyolizinler olarak yeniden adlandırılmıştır [53].

Tablo 1. 2 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması [54]



- **Gram-Pozitif Bakterilerin Bakteriyosinleri**

Sınıf I Bakteriyosinler (Lantibiyotikler): Lantibiyotikler 19-50 aminoasitten oluşan 5 kDa'dan küçük antimikrobiyal peptitlerdir. 'Lantibiyotikler' terimi translasyon sonrası modifikasyonla oluşan, siklik yapılar oluşturan tiyoeter amino asitleri lantionin (Lan) ve metillantionin (MeLan) içeren peptitleri belirtir [55]. İçerdikleri bu amino asitler lantibiyotikleri diğer antibakteriyel peptitlerden ayırır ve ısıya, farklı pH'lara ve proteolize karşı yapısal kararlılığının sağlanmasına katkıda bulunur [56].

Kimyasal ve yapısal özelliklerine dayanarak lantibiyotikler iki grupta incelenir.

Sınıf Ia Lantibiyotikler: Bakteri zarlarında por oluşturarak ve membran bütünlüğünü bozarak etki gösteren pozitif yüklü, esnek ve uzun moleküllerden oluşan, hidrofobik peptitler içeren bakteriyosinlerdir. Bu grubun temsilcileri nisin, epidermin ve subtilin bakteriyosinleridir.

Sınıf Ib Lantibiyotikler: Negatif yüklü veya net yükü olmayan küresel ve esnek olmayan bakteriyosinlerden oluşur. Sınıf Ib bakteriyosinler baştan sona peptit bağı ile translasyon sonrası modifiye edilerek dairesel hale getirilen peptitlerdir [57]. Bu peptitler bakterilerin hayatta kalması için gerekli olan katalitik enzimleri inhibe ederek veya hücre duvarı gibi hücredeki enzimatik reaksiyonları inhibe ederek hedef bakterinin ölmesine neden olurlar [53].

Sınıf II Bakteriyosinler (Lantibiyotik olmayanlar): Ampifilik sarmal yapıya sahip 10 kDa'dan küçük ve esnek olan bakteriyosinlerdir. Bu peptitler modifiye olmuş amino asit kalıntıları (lantionin, metillantionin gibi) içermezler, pH ve sıcaklığa dayanıklıdır. Hedef hücrenin hücre zarında gözenekler oluşturarak zar bütünlüğünü bozar ve hedef hücrenin ölümüne sebep olurlar.

Yapıları ve geçirdikleri modifikasyonlara göre dört gruba ayrılırlar;

Sınıf IIa (pediyosin benzeri bakteriyosinler): Pediyosin-benzeri bakteriyosinler et ve süt ürünleri gibi çeşitli gıda ve endüstriyel ürünlerden izole edilen gıda ile ilişkili suşlar tarafından üretilir. Bu bakteriyosinlerin tümü katyoniktir ve *Listeria monocytogenes* karşı aktivite gösterirler ve hedef hücrenin hücre zarını geçirgen hale getirerek hücrenin ölümüne neden olurlar [58]. Pediyosin benzeri bakteriyosinler birincil yapılarına göre iki grupta incelenirler: hidrofilik, katyonik ve yüksek oranda korunmuş N-terminal bölgesi ve hidrofobik, ampifilik ve daha az korunmuş C terminal bölgesi [59]. N-terminal bölgesi, korunmuş 'pediyosin kutusu' denilen YGNGV/L motifini ve disülfid köprüsü ile birbirine bağlanmış iki korunmuş sistein kalıntısını içerir. Bu yapı Sınıf IIa bakteriyosinin hedef hücre zarına bağlanmasına aracılık eder. C-terminal bölgesi, hedef hücre zarının hidrofobik kısmına nüfus eder ve hücre zarı bileşenlerinin hücre zarından sızmasına neden olan saç tokası benzeri bir alan oluşturur [60].

Sınıf IIb (iki peptitli bakteriyosinler): İki peptitli bakteriyosinler, iki farklı komplementer peptit içerir. Antimikrobiyal aktivitenin gerçekleştirilebilmesi için her iki peptitin de yaklaşık olarak eşit miktarlarda üretilmesi gerekir. İki peptitten

birinin başka bir homolog bakteriyosinden gelen tamamlayıcı peptit ile kombinasyonu da antimikrobiyal aktivite sağlayabilir [57]. İki peptit yapısı hedef hücrenin zarında porlar oluşturan böylece hücrede iyonik dengesizlik oluşturan toksinler olarak işlev görür [61]. İki peptitli bir bakteriyosini tanımlayan özellikler şunlardır: i) birbirine bitişik iki ayrı gen tarafından kodlanan özdeş olmayan iki peptit içerirler, ii) bireysel peptitler çok az antimikrobiyal aktivite gösterir veya hiç göstermez, iii) iki peptit birebir olarak aynı orandadır ve birlikte hareket ederler, iv) sadece tek bir bağışıklık proteini üretici suşu korumak için yeterlidir [62].

Sınıf IIc (dairese bakteriyosinler): Bu bakteriyosinler genellikle translasyon sonrası modifikasyon ve sekresyon sürecinde rehberlik eden bir lider peptit sekansı ile inaktif bir formda sentezlenirler [57]. Lineer propeptitin N ve C terminal uçları arasında bir amid bağı ile halkasal hale getirilirler. Son derece kararlı ve proteazlara karşı dirençli bakteriyosinlerdir [62]. Dairesel bakteriyosinler, net bir pozitif yüke sahiptirler ve herhangi bir reseptör moleküle ihtiyaç duymadan direkt olarak hücre membranının negatif yükleri ile etkileşime geçerler. Sonuç olarak hedef hücre membranında porlar oluşur ve hücre bileşenlerinin dışarı akışı zar potansiyelinin bozulmasına sebep olarak hücrenin ölümüne sebep olurlar [63].

Sınıf IId (diğerleri): Bu bakteriyosin grubu diğer alt sınıfların hiçbirine uymayan özelliklere sahiptirler. Lineer, peptid benzeri olmayan ve tek peptidli bakteriyosinleri içerir. Ayrıca bu gruptaki bakteriyosinler i) Sec-bağımlı bakteriyosinler, ii) lidersiz bakteriyosinler, iii) alt gruplanmamış bakteriyosinler olarak alt gruplara ayrılan geniş bir kategoriye sahiptir [64].

Sınıf III Bakteriyosinler: Yüksek moleküler ağırlığa (>30 kDa) sahip, ısıya dayanıklı ve translasyon sonrası modifikasyona uğramayan peptitleri içeren bakteriyosinlerdir.

Sınıf IIIa (Bakteriyolizinler): Hedef hücrenin hücre duvarını parçalanmasına neden olan peptitleri içerir [65]. En iyi bilinen bakteriyolizin *Staphylococcus aureus* başta olmak üzere birçok *Staphylococcus* türünün hücre duvarını hidrolize edebilen lizostaphin peptitidir.

Sınıf IIIb (Bakteriyolitik olmayan bakteriyosinler): Hedef hücrenin glikoz alımını engelleyerek hücreyi aç bırakarak veya hücrenin zar potansiyelini bozarak

etkilerini gösterirler. Diğer bir mekanizma, hedef hücrenin DNA ve protein biyosentezini inhibe ederek hücrenin ölümüne sebep olabilirler [48].

Sınıf IV Bakteriyosinler: Lipid veya karbonhidrat parçaları içeren kompleks bakteriyosinler olarak tanımlanırlar. Bu yapısal özellikler bu peptitleri bazı enzimlere (glikolitik veya lipolitik enzimler) karşı duyarlı hale getirir [66].

- **Gram-Negatif Bakterilerin Bakteriyosinleri**

Gram-negatif bakterilerin ürettikleri bakteriyosinler Gram-pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlere kıyasla daha dar bir antimikrobiyal etki spektrumuna sahiptir ve bu özellikleri bu bakteriyosinlerin kullanımlarını kısıtlar [54].

Kolisinler: Kolisinler *E. coli* suşları tarafından sentezlenen ve diğer *E. coli* suşları için toksik olan 25-80 kDa'ya sahip yüksek moleküler ağırlıklı antimikrobiyal peptitlerdir. Kolisinler; bakteriyosinlerin yapı, fonksiyon, genetik özellikleri ve evrimi gibi özelliklerinin araştırılmasında model organizma olarak kullanılırlar [67]. Kolisinler hedef hücreye etki etmek için kullandıkları mekanizmalarına göre üç gruba ayrılırlar;

i) Por oluşturan Kolisinler: Kolisin A, B, E1, Ia, Ib, K ve N bu gruba dahildir. Bu kolisinler hücre zarında por oluşturarak veya hücre iç zarındaki madde giriş çıkışını kontrol eden kanallara etki ederek sitoplazmadaki bileşenlerin hücreden çıkışına ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olurlar.

ii) Nükleaz kolisinleri: Kolisin E2 ve E9 bu gruba dahildir. Bu kolisinler DNase, 16S rNase ve tRNase enzimlerini içerirler ve bu enzimleri kullanarak hedef hücredeki hücresel DNA veya RNA'yı yıkararak hedef hücrenin ölümüne neden olurlar.

iii) Peptidoglikanaz kolisinleri: Hedef hücrenin hücre duvarı bileşeni olan peptidoglikan sentezini önler ve hedef hücrenin ölümüne neden olurlar [68].

Kolisin Benzeri Bakteriyosinler: Kolisin benzeri bakteriyosinler (CLB'ler); proteaza duyarlı, reseptör bağlama, translokasyon ve sitotoksite ile ilgili domainlere sahip modüler proteinlerdir. Reseptör bağlama alanlarını kullanarak bakteriyel dış zar proteinlerine bağlanabilir, hücre yüzeyindeki lipopolisakkaritler ile etkileşime girebilir veya sitotoksik alanlarını kullanarak

Lipid II veya peptidoglikan sentezini indirgeyebilir ve böylece hedef hücrenin ölümüne sebep olabilirler [69].

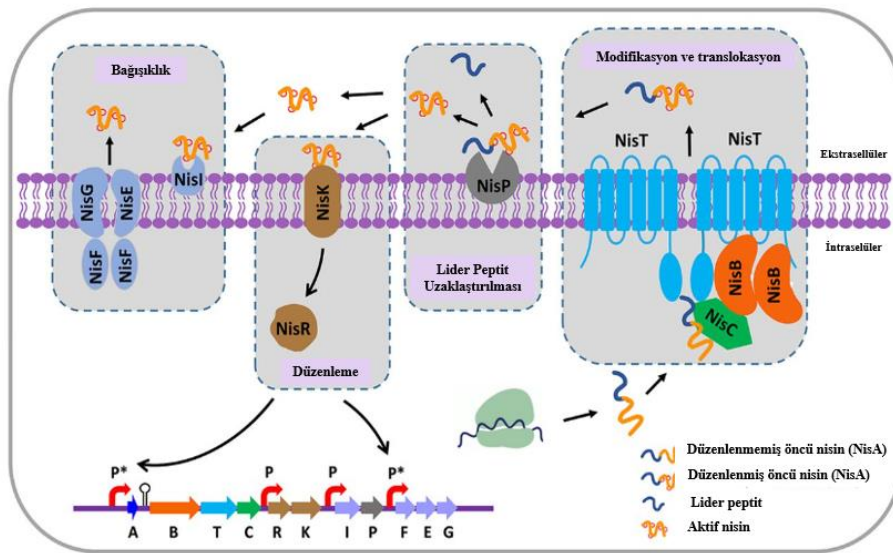
Mikrosinler: Düşük moleküler ağırlığa sahip (<10 kDa) ribozomal olarak sentezlenmiş hidrofobik antimikrobiyal peptitlerdir. Çoğunlukla ısı, yüksek pH ve proteazlara karşı büyük tolerans gösteren *Enterobacteriaceae* bakterileri tarafından üretilirler. Hedef hücre zarında porlar oluşturarak, protein sentezi veya DNA replikasyonunu inhibe ederek hücrenin ölümüne neden olabilirler [68].

Faj-kuyruğu benzeri bakteriyosinler (Tailosinler): Yüksek moleküler ağırlığa sahip bakteriyosinler olarak bilinirler ve *Myoviridae* ve *Siphoviridae* bakteriyofajları ile benzerlik gösterirler. En iyi bilinen tailosinler *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanmıştır. Bu bakteriyosinler hücre zarındaki lipopolisakkaritler ile etkileşerek veya hücre zarındaki reseptörlere bağlanıp proton hareket ettirici kuvvetin tükenmesini sağlayarak hedef hücrenin ölümüne neden olabilirler [69].

1.2.6.2 Bakteriyosinlerin Biyosentezi

Bakteriyosinlerin biyosentezi; ortam bileşimi, pH, sıcaklık ve mikroorganizmaların büyüme kinetiği gibi çeşitli kültür koşullarından etkilenebilir. Biyosentez süreci oldukça düzenli bir süreçtir ve bakteriyosin genlerinin ekspresyonu genellikle çevresel sinyaller ve hücre yoğunluğuna bağlı mekanizmalar tarafından kontrol edilir [70]. Bakteriyosinler bakterilerde ribozomal olarak sentezlenirler ve bakteriyosinlerin üretimi ve bağışıklığı için gerekli olan genler bakterilerde genel olarak operonlar olarak düzenlenmiştir. Bu operonlar yer değiştirebilen genetik elementler üzerinde, konakçı kromozomu üzerinde veya plazmidler üzerinde bulunabilirler [71]. Bakteriyosinler; C-terminal dizisine bağlı kalan ve N-terminal sinyal peptidine sahip biyolojik olarak aktif olmayan translasyon sonrası modifiye edilmek üzere pre-peptitler olarak sentezlenen ve daha sonra olgun formu oluşturmak üzere hücre dışına taşınan ve bölünen antimikrobiyal peptitlerdir [72]. Bakteriyosinlerin modifiye edilmesi ve hücre dışına aktarılması için gerekli olan genler biyosentez için gerekli olan genlerin yakınında bulunmaktadır ve bunlar bakteriyosinin tipine göre değişir. Bakteriyosinlerin hücre dışına taşınması ve salgılanması için ABC taşıyıcı sistemleri ve Sec-bağımlı salgı sistemleri gerekmektedir [49].

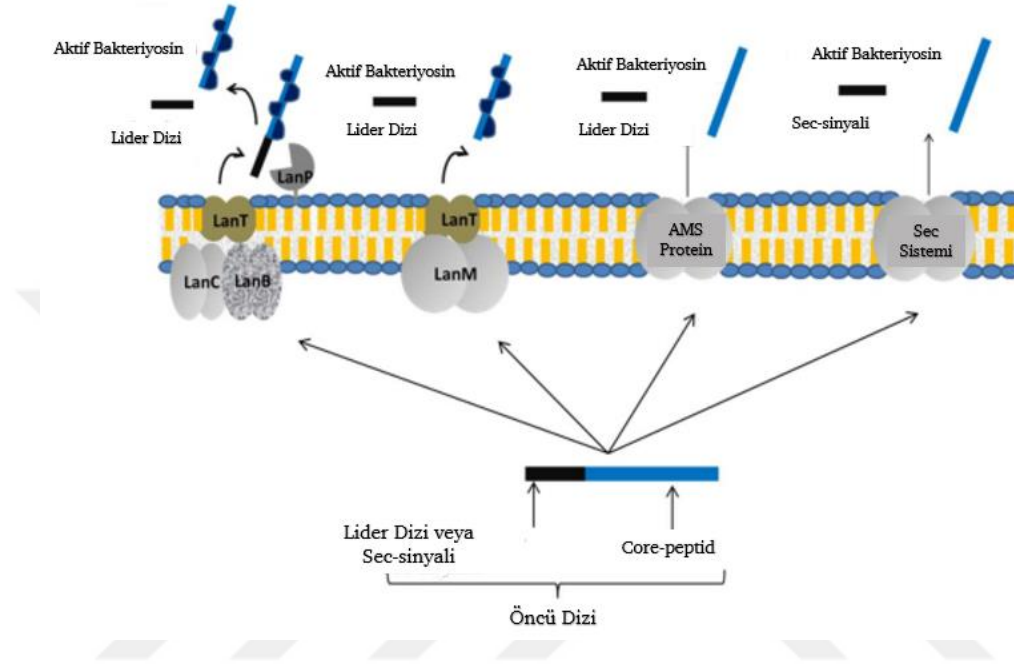
Sınıf I bakteriyosinler (lantibiyotikler)'in yapısal, düzenleyici, modifikasyon, taşıma ve doğuştan gelen bağışıklık genleri kümeler halinde bulunurlar. *Lactococcus lactis* tarafından üretilen sınıf I lantibiyotik Nisin, üzerinde en çok çalışılan ve en yaygın kullanılan lantibiyotiktir. Nisin biyosentezi için genler transkripsiyonel olarak dört operon halinde düzenlenir. Bunlar; nisABTC, nisIP, nisRK ve NisFEG şeklinde düzenlenmiştir [73]. Bu genlerden NisA geni, nisin öncüsünün modifikasyonunu ve hedefleme sürecini yönlendirmede yer alan 23 amino asitlik bir N-terminal lider peptidi içeren, 57 amino asit kalıntısından oluşan nisin A pre-peptidini kodlar. NisB ve NisC hücre içi translayon sonrası modifikasyon reaksiyonunda yer alan membranla ilişkili proteinleri kodlar. Daha sonra tamamen modifiye edilmiş öncül nisin ABC taşıyıcı NisT tarafından hücre dışına taşınır. NisP hücre dışı proteolitik aktivasyonda yer alan subtilisin benzeri bir proteazı kodlar ve nisin öncüsünün translokasyonu sırasında veya kısa bir süre sonra lider peptit hücre dışı olgun bir nisin peptidi oluşturmak için subtilisin benzeri proteaz tarafından uzaklaştırılır [74]. NisI üretici bakterinin nisine karşı kendini korumasına dahil olan bir lipoproteini kodlar ve NisFEG bir ABC taşıyıcısını kodlar. NisR ve NisK sırasıyla iki bileşenli düzenleyici sistemler sınıfına ait histidin kinaz ailesinin bir yanıt düzenleyicisini ve bir sensör kinazını kodlar. Her iki gen de nisin biyosentezinin düzenlenmesinde görevlidir [75].



Şekil 1. 3 Nisin biyosentezi [73].

Sınıf II bakteriyosinler hiçbir translayon sonrası modifikasyon için gerekli olan geni içermez. Olgunlaşma genellikle taşıma ile gerçekleşir [76]. Bazı sınıf II

bakteriyosinler ise bakterilerdeki taşıma sistemlerinden olan sec-yolu ile taşınabilmek için sec-bağımlı N-terminal lider peptit içerir. Alt birimler olan Ila ve I Ib bakteriyosinler N-terminal lider peptidi aynı anda taşıyan ve parçalayan özel ABC taşıyıcı olgunlaşma ve salgılama (AMS) proteinlerini kullanabilirler [54].



Şekil 1. 4 Bakteriyosinlerin biyosentezi [54].

Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin üretimi genellikle üretici organizmanın bulunduğu koşullara göre değişmektedir. Örneğin mikrosinler genellikle besinin az olduğu durumlarda ve stres durumlarında aşırı üretilmektedir [77]. Mikrosinler ribozomal olarak sentezlenen bir N-terminal lider dizisi içeren ve aktif olması için bölünmesi gereken pre-peptidler olarak sentezlenmektedir. N-terminal dizisi mikrosinin hücre içi stabilizasyonunu, bakteriyosinin hücre dışına taşınmasını ve katlanmasını sağlar [54]. Kolisinlerde ise genetik elementler plazmid kaynaklıdır ve daha basittir. Her bir kolisin operonu transkripsiyonu düzenleyen bir SOS promotörü nedeniyle DNA hasarı, besinin az olması veya oksijen açlığı gibi stres durumlarında indüklenebilir. Ayrıca transkripsiyonları SOS genlerinin baskılayıcısı olan LexA proteini tarafından düzenlendiğinden kolisinleri üretimi bir SOS tepkisi olarak düşünülebilir. Kolisinler translasyon sonrası modifikasyona uğramazlar ve peptit sekansları bir N-terminal translokasyon alanı, bir merkezi

reseptör bağlama alanı, bir C-terminal sitotoksik alan olmak üzere üç fonksiyonel alan içermektedir [54], [78].

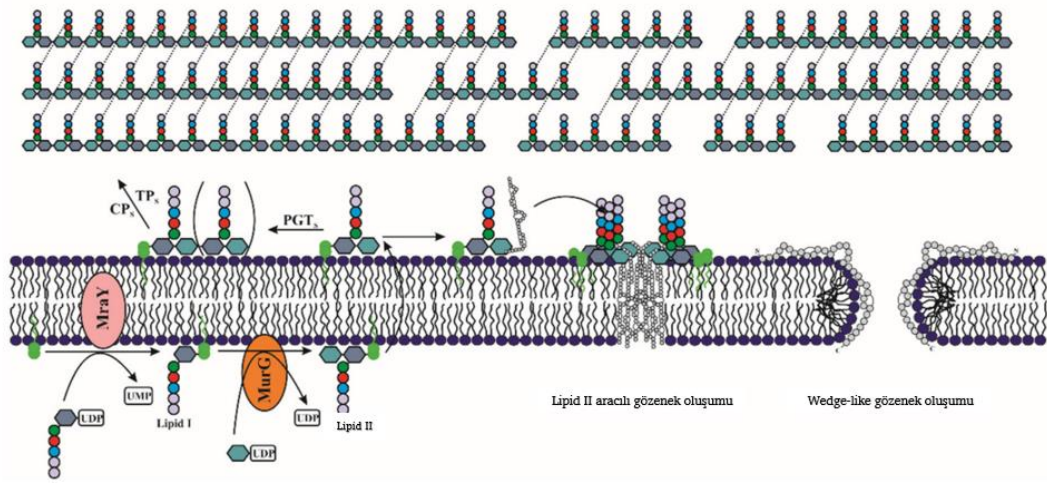
1.2.6.3 Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması

Bakteriyosinler genellikle hücre zarını geçirgen hale getiren, katyonik, ampifilik veya hidrofobik olmaları bakımından yüzeysel olarak birbirine benzerdir ancak etki mekanizmalarına göre birbirinden ayrılırlar ve bir bakteriyosin birden fazla mekanizma kullanarak hedef hücreye etki edebilir [76]. Bakteriyosinlerin etki mekanizması birincil yapıları ile ilişkilidir. Bazı bakteriyosinler hedef bakterinin sitoplazmik zarı üzerinde etki göstererek hücre lizisine sebep olabilirken bazıları sitoplazmadan hücre içine girerek hücre için hayati önem taşıyan gen ekspresyonu ve protein sentezi gibi mekanizmaları etkileyebilir [47].

- **Sınıf I Bakteriyosinlerin (Lantibiyotikler) Etki Mekanizması**

Lantibiyotikler yapıları ve etki mekanizmaları temel alınarak tip A (elongated) lantibiyotikler ve tip B (globular) lantibiyotikler olarak sınıflandırılır. Tip A lantibiyotikler (nisin, epidermin, subtilin) Lan (lantionin) köprülerinin düzeninde benzerlik gösteren katyonik ve lineer peptitlerdir ve duyarlı hücrelerin hücre zarında porlar oluşturarak sitoplazmadaki moleküllerin ve iyonların hücre dışına çıkmasına ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olurlar. Tip B lantibiyotikler (mersasidin, sinamisin) hedef hücrenin enzim fonksiyonunu bozarak hücre duvarı sentezini engelleyen küresel peptitlerdir [57], [79].

Lantibiyotikler hücre duvarı biyosentezinde öncü molekül olan Lipid II'ye bağlanarak peptidoglikan alt birimlerinin sitoplazmadan hücre duvarına taşınmasını engeller ve böylece hücre duvarı biyosentezi engellenmiş olur. Ayrıca hücre zarında gözenek oluşturmak ve hızlı bir şekilde hücre ölümünü gerçekleştirmek için Lipid II'yi bağlanma molekülü olarak da kullanabilirler [80].



Şekil 1. 5 Lipid II oluşumu ve Lipid II aracılı hedef hücre zarında gözenek oluşumu [57].

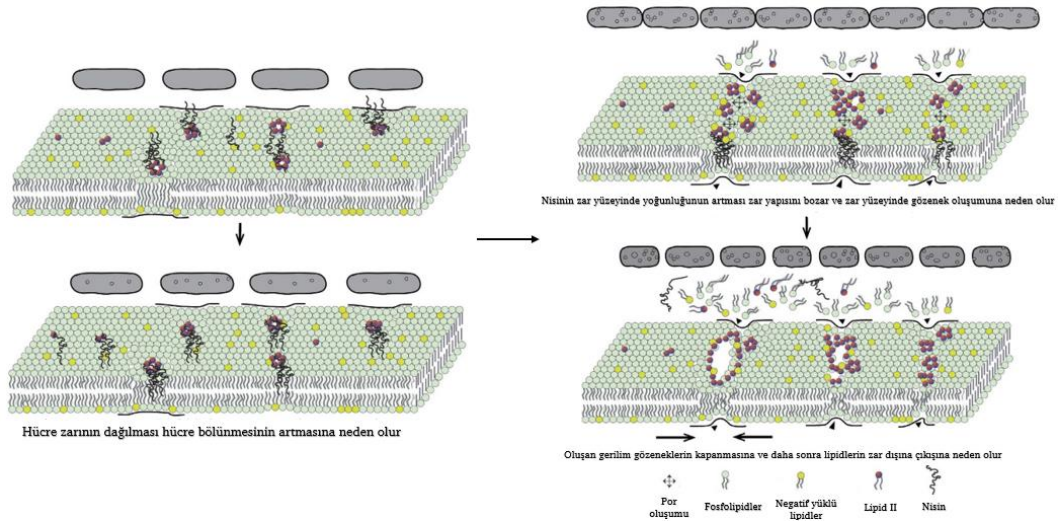
Bakteriyosinlerin etki ettiği Lipid II iki adımda oluşur; i) Bakteriyel peptidoglikan biyosentezinde anahtar bir ara madde olan UDP-N-asetilmuramil-pentapeptid (UDP-MurNAc-pentapeptid) MraY enzimi tarafından görevi polisakkaritleri hücre zarı boyunca taşımak ve hücre duvarının genel yapısına katkıda bulunmak olan molekül undekaprenil fosfata Lipid II'yi elde etmek için bağlanır, ii) daha sonra bir birim N-asetilglukosamin Lipid II'yi elde etmek için MurG enzimi tarafından N-asetilmuramile bağlanır. Oluşumundan sonra Lipid II zar boyunca hücre dışına doğru taşınır ve hücre duvarı oluşturmak için oligomerize olur.

Nisin, Pep5, Subtilin, Laktikin 3147 ve Streptokokin FF22 gibi Tip A lantibiyotikler zarla etkileşiminden başlayarak fosfolipidik çift tabakaya girmesine kadar birkaç basamaklı bir süreçten geçerek hedef hücre zarında gözenek oluşturup amino asitler, iyonlar ve ATP gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin hücre dışına salınmasına ve hedef hücrenin ölümüne neden olurlar [81]. Bu katyonik peptitlerin pozitif yüklü kalıntılarının çoğunu içeren C-terminal bölgesi elektrostatik etkileşimler ile sitoplazmik zarın anyonik fosfolipitlerin baş gruplarına bağlanırlar. Sitoplazmik membrana giriş ise genellikle N-terminal bölgelerinin hidrofobik kalıntıları sayesinde gerçekleşir [57].

En iyi bilinen lantibiyotiklerden olan Nisin; 34 amino asit içeren, uzun katyonik bir peptit olup bakterilerin Lipid II'yi inhibe ederek hücre duvarı oluşumunu engelleyebilir [82]. Başlangıçta nisin'in göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivitenin sahip olduğu dehidro kısımları sayesinde enzimlerin sülfüdril gruplarına etki ederek

hücre duvarı sentezini inhibe ettiği düşünülüyordu. Daha sonra yapılan çalışmalarla nisin hücre zarında oluşturduğu gözeneklerle hücrenin aminoasit, ATP veya küçük sitoplazmik bileşenlerinin hızlıca kaybına neden olduğu ve bu şekilde hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [79], [83]. Nisin genel olarak Gram-pozitif bakterileri üzerinde etkilidir fakat *E. coli* ve *Salmonella* gibi Gram-negatif bakterileri türlerinde de hücre zarına etki ederek hasar oluşturabilir [79].

Nisin peptit yapısı ve işlevsel olarak iki alana ayrılabilir; i) Lipid II'nin pirofosfat gruplarına bağlanmak için yüksek afinite sergileyen iki halka içeren N-terminal dizisi, ii) hücre zarında gözenek oluşumunu sağlayan C-terminal dizisi [41]. Nisin N-terminal dizisi ve Lipid II'nin pirofosfat yapısı bağlanarak Nisin-Lipid II kompleksi oluşturur ve Nisin Lipid II'yi yapıdan uzaklaştırarak hücre duvarı sentezini engeller.



Şekil 1. 6 Nisinin etki mekanizması [82].

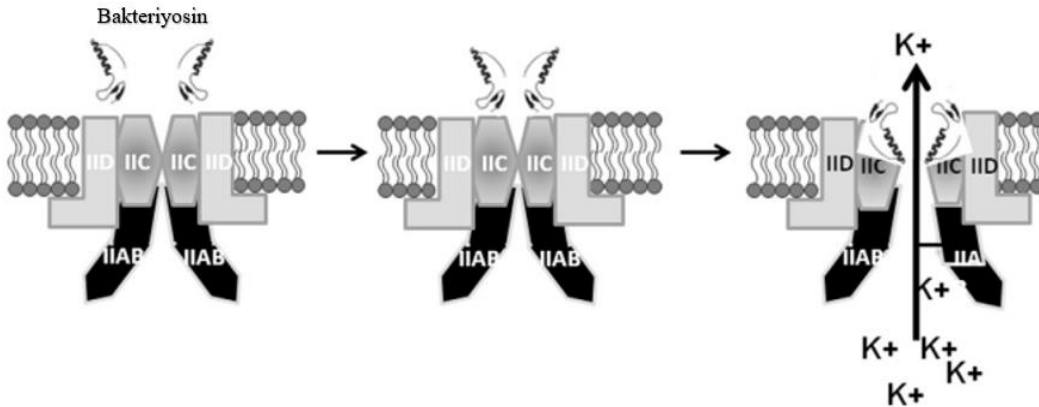
Gallidermin ve mersasidin gibi Lipid II'ye bağlanan lantibiyotikler hücre zarını geçirgen hale getirmeden Lipid II'ye bağlanır ve hücre duvarı biyosentezini inhibe ederek hedef hücrenin ölümüne sebep olurlar. Genellikle Tip B lantibiyotikler Lipid II ile bir kompleks oluşturarak peptidoglikan biyosentezi sırasında transglikosilasyon reaksiyonunu engellerler. Mersasidin Lipid II'nin disakkarit-pirofosfat fraksiyonu ile etkileşime girerek glikoz ve D-alaninin hücre duvarı sentezine dahil olmasını engeller ve böylece hücre duvarı biyosentezi durur [84].

Lantibiyotikler tarafından iki farklı gözenek oluşumu modeli önerilmiştir; i) barrel-stave ii) wedge-like modelleri. 'Barrel-stave' modelinde lantibiyotik monomerleri

membran yüzeyine elektrostatik olarak bağlanır. Zarın hidrofobik lipit çekirdeğinin bakteriyosinin polar olmayan yan zincirleri ile etkileşimi sonucunda su ile dolu bir gözenek oluşur. Oluşan gözenğin boyutu ve kararlılığı yüzeye bağlanan peptit sayısına bağlıdır. ‘Wedge-like’ modelinde katyonik bakteriyosinler ile anyonik fosfolipitlerin baş grupları etkileşir ve hücre zarında bakteriyosinin hidrofobik kalıntılarının zar içine girmesine izin veren gözenekler oluşur [85].

- **Sınıf II Bakteriyosinlerin Etki Mekanizmaları**

Sınıf IIa bakteriyosinler 60 amino asitten oluşan polipeptitler olup pediyosin benzeri bakteriyosinler olarak adlandırılırlar ve özellikle *Listeria monocytogenes* patojenine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler [57]. Bu bakteriyosinler hedef hücreyi öldürmek için hücre zarında gözenek oluşumunu hedeflemektedir. Başlangıçta Sınıf IIa bakteriyosinlerin C-terminal ucunda bulunan pozitif yüklü kalıntıların anyonik fosfolipitler aracılığıyla zar ile etkileştiği düşünülmüştür. Fakat sonrasında yapılan çalışmalar bu etkinin çok yüksek bakteriyosin konsantrasyonlarında meydana geldiği bulunmuştur [86]. Daha sonra Sınıf IIa bakteriyosinlerin hücre zarında bulunan mannoz PTS sisteminde zarla ilişkili IIC ve IID bileşenleri ile etkileşime girdiği kanıtlanmıştır [87]. Bu sistemde iki olası model geliştirilmiştir; 1) IIC-D -ilgili bakteriyosini zara getirmek için aracılık eder ve bakteriyosinin zara yerleşimi, oligomerizasyonu ve gözenek oluşumunu destekler, 2) Bakteriyosinlerin zar proteinlerine bağlanması mannoz PTS kanalının konformasyonel olarak değişmesine ve kalıcı olarak açılmasına neden olur [57]. Kanalin tamamen açılması hücre sitoplazmasında bulunan içeriklerin hücre dışına akmasına sebep olacağından hedef hücrenin ölümü gerçekleşmiş olur.



Şekil 1. 7 Sınıf II bakteriyosinlerin etki mekanizmaları [62].

Sınıf IIb bakteriyosinler hedef bakterilerin hücre zarlarını geçirgenleştirir ve hücre zarını Na^+ , K^+ , Li^+ , H^+ gibi belirli katyonlara karşı geçirgen hale getirerek hücre zarında gözenek oluşumuna sebep olurlar [88]. Sınıf IIc (dairese bakteriyosinler) net bir pozitif yüke sahip oldukları için herhangi bir reseptör moleküle gerek duymadan direkt olarak bakteri membranının negatif yükleri ile etkileşime girerler. Sonuç olarak membranda porlar oluşturarak hücre içindeki iyonların hücre dışına akışına ve zar potansiyelinin dağılarak hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olurlar [89].

- **Sınıf III Bakteriyosinlerin Etki Mekanizması**

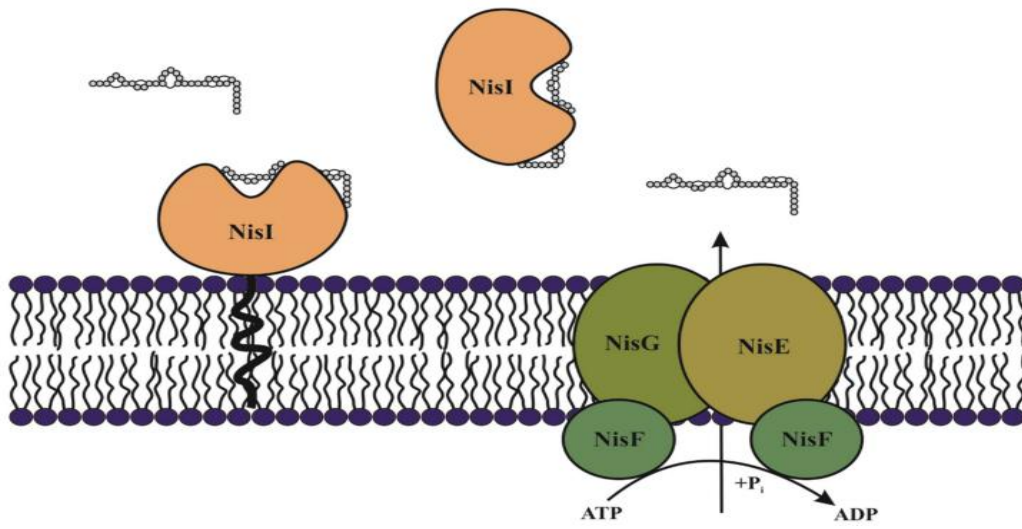
Sınıf III bakteriyosinler Sınıf IIIa (bakteriyolizinler) ve Sınıf IIIb (bakteriyolitik olmayan bakteriyosinler) olarak ayrılır. Bakteriyolizinler (Sınıf IIIa) hedef hücrenin hücre duvarının hidrolizini katalize eder ve böylece hücrenin lizisine neden olurlar [65]. Bakteriyolitik olmayan bakteriyosinler (Sınıf IIIb) ise hücreler tarafından glikoz alımını engelleyerek hücrenin aç kalmasına ve sonuç olarak hücrenin ölümüne neden olurlar. Diğer bir mekanizma ise hedef bakterinin DNA ve proteinlerinin biyosentezini inhibe ederek hücrenin ölümüne sebep olurlar [48].

1.2.6.4 Bakteriyosinlerin Bağışıklık Sistemleri

Bakteriyosin üreten suşlar genellikle bakteriyosin gen kümelerinde bulunan bağışıklık sistemini sağlayan proteinler sayesinde kendi ürünlerinin aktivitesinden korunurlar. Bu sayede bakteriyosin üreten bir suş genellikle kendi ürettiği bakteriyosinin etkisine karşı duyarlı değildir. Çoğu sistemde bakteriyosin üreten bakteriler kendini korumak için tek bir proteine ihtiyaç duyabilir. Bu proteinler ya zar yüzeyine sabitlenmiş ya da zara gömülü olarak bulunur. Bu proteinler bakteriyosinin zara girmesini engeller [90]. Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen lantibiyotiklerin koruma mekanizmaları, bir ABC taşıma sistemi ve spesifik öz bağışıklık proteinlerini içermektedir. Böylece zara bağlı bakteriyosinler üretici suşun kendi bakteriyosinleri tarafından öldürülmesini önlemek için ABC taşıyıcı sistemi tarafından zardan hızlıca uzaklaştırılır. Öz bağışıklık için kullanılan ABC taşıyıcı sistemleri ile bakteriyosin üretildikten sonra hücre dışına taşınmasında kullanılan ABC taşıyıcıları farklıdır [91].

Sınıf I bakteriyosinlerden en iyi bilinen bakteriyosin Nisin, bağışıklık mekanizmasında iki farklı mekanizma kullanılır. Birincisi Nisin'e bağlanabilen bir

lipoprotein olan ve hedef lipid II'ye erişmesini engelleyen spesifik NisI bağışıklık proteininin ekspresyonu ile gerçekleşir. İkinci mekanizmada ise gözenek oluşumundan önce Nisin'i hücre zarının dışına taşıyan ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı NisFEG görev alır. NisFEG ATP'nin bağlanması ve hidrolizi ile enerji sağlanan ve bakteri hücre zarı boyunca maddelerin taşınmasına izin veren bir ABC taşıyıcısıdır. Bu proteinin bir kısmı N-terminal ucundan hücre zarına kovalent olarak bağlanmıştır bir kısmı hücre zarının dışına doğru lokalize olmuştur. Bağışıklık sisteminin gerçekleşebilmesi için her iki proteinin de bulunması gerekmektedir[91] [92].

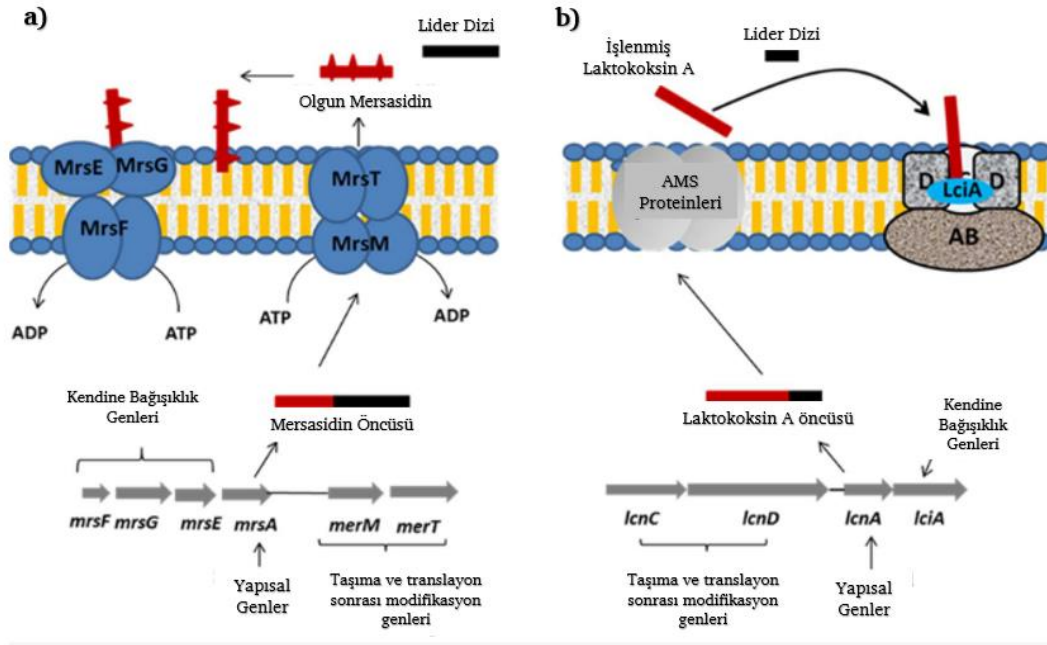


Şekil 1. 8 *Lactococcus lactis*'in nisinin etkisinden korunmak için kullandığı bağışıklık mekanizması [57].

Lipoprotein NisI zara sabitlenebilir veya ortama salınabilir her iki durumda da nisine bağlanarak gözenek oluşumunu engeller. ABC taşıyıcısı NisEFG nisini zardan dışarı atarak gözenek oluşumunu engeller.

Sınıf IIa bakteriyosinlerin bağışıklık proteinleri 88 ile 115 amino asit kalıntısından oluşan iyi yapılandırılmış α -helikal proteinlerdir. Bu proteinler bakteriyosinler ve reseptör proteini ile güçlü bir kompleks oluşturur ve hücrenin kendini öldürmesini önler. Kompleks sadece bakteriyosin varlığında oluşur. Örneğin Laktokoksin A bakteriyosini hedef hücrede Man-PTS kanalını hedefleyen bir bakteriyosindir. Kompleks, hedef hücrelerde reseptör olarak Man-PTS'nin alt birimleri IIC ve IID birimlerine bağlanarak bağışıklık proteini (LciA) ile bakteriyosin-reseptör kompleksini oluşturur ve üretici hücrelere bağışıklık kazandırır. [76][87].

Sınıf IIc ve IId bakteriyosinlerin gen kümeleri bağışıklık mekanizmasında yer alabilecek ABC taşıyıcı benzeri veya küçük hidrofobik peptit genleri içerirler [76].



Şekil 1. 9 Lipid II ve Man-PTS hedefleyen mersasidin a) ve Laktokoksin A'nın b) bağışıklık ve taşıma mekanizmaları [54].

Diğer bir bağışıklık mekanizması ise Abi protein ailesine ait zara bağlı metaloproteazların aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Bu proteinler proteazlar olduğu için Abi aracılı bağışıklıkta ya bakteriyosinler doğrudan parçalanır ya da bir reseptör proteinin modifikasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Bazı durumlarda bağışıklık mekanizması sitoplazmik membrana dışarıdan giren bakteriyosini uzaklaştırarak bakteriyosin bağışıklığına katılan çoklu ilaç taşıyıcı proteinlerin aktivitesine de bağlı olabilmektedir [90].

1.2.6.5 Bakteriyosinlerin Direnç Mekanizması

Tüm organizmalar değişen çevresel koşullara karşı uyum sağlama konusunda doğal bir eğilime sahiptir. Bu nedenle bakterilerin bakteriyosinlere sürekli maruz kalmasının sonucunda bakteriler farklı mekanizmalar ile bu bakteriyosinlere karşı direnç geliştirebilmektedir [49]. Bakteriyosin direnci gelişiminin değerlendirilmesi bakteriyosinlerin gıda ürünlerinde veya insan ve hayvanların tedavisinde kullanılmasından önce araştırılması gereken önemli bir husustur. Bakteriyosinlere karşı direnç ya doğuştan gelen ya da kazanılmış bağışıklık olarak ikiye ayrılır. Bakteriyosinlere karşı doğal direnç farklı bakteri suşları arasında farklılık

göstermektedir. Örneğin *L. monocytogenes* bakterisinin yabancı suşlarının %8’lik bir kısmı pediosin benzeri bakteriyosinlere karşı doğal bir bağışıklığa sahiptir [93]. Hem doğuştan gelen hem de kazanılmış bakteriyosin direnci bakterilerdeki çeşitli genetik lokuslarla ilişkilendirilmektedir. Doğuştan gelen dirençle ilgili genlerdeki mutasyon bakteriyosinlere karşı duyarlılığa yol açarken, duyarlılıkla ilişkili genlerin mutasyonu kazanılmış dirence katkıda bulunmaktadır [94]. Bakteriyosinlere karşı doğuştan duyarlılık farklı bakteri suşları arasında büyük farklılıklar gösterebilmektedir. ‘Bağışıklık taklidi’ özellikle bakteriyosinlere karşı korunmaya katkıda bulunan bir mekanizmadır. Bu mekanizmada bakteriyosin üretmeyen suşlar bakteriyosin bağışıklık sistemlerinin fonksiyonel homologlarını kodlayan genleri taşıyabilirler. Bu mekanizma lantibiyotikler ve sınıf II bakteriyosinlerde tanımlanmıştır [95]. Bazı nisine dirençli *Bacillus spp.* suşları nisini parçalayan ‘Nisinaz’ adlı bir enzim üretirler. Nisinaz’ın *Bacillus cereus* ve *Paenibacillus polymyxa* tarafından üretildiği gösterilmiştir. Nisinaz, lantibiyotiklerde C-terminal lantionin halkasını kırarak etkinlik gösterir [96].

Bakteriyosinlere karşı sonradan kazanılmış dirençten sorumlu mekanizmalar suşlar ve türler arasında değişiklik göstermektedir. Genellikle direnç geliştiren mikroorganizmalarda anormal hücre duvarı sentezi, daha yüksek miktarda modifiye lipoteikoik asitlerin varlığı gözlemlenmiştir [97]. Aynı zamanda Man-PTS gen ekspresyonunun bakteriyosin dirençli *L. monocytogenes*’de düşük olduğu gözlemlenmiştir. Reseptörlere düşük olarak bağlanma yoğunluğu bakteriyosin bağlanmasını etkilediği düşünülmektedir [49]. Aynı zamanda birçok Gram-pozitif bakteri hücre duvarının ana bileşeni olarak teikoik asitlere veya lipoteikoik asitlere sahiptir. D-alanin ile omurga esterleşmesi, bazik amino gruplarının eklenmesiyle hücre duvarı net yükünü azaltır. D-alanin’in teikoik ve lipoteikoik asitlere eklenmesi için gerekli olan proteinleri kodlayan genler *dlt* operonunda bulunur. Bu operondaki *dltA* genindeki mutasyonlar D-alanin’in teikoik asit ve lipoteikoik asitlere eklenmesini engeller ve bu da hücre yüzeyinde negatif yüzey yükünü artırır. Normalde teikoik asit hücre duvarına negatif yük verir ancak D-alanilasyon işleminden sonra hücre duvarına pozitif yük vererek anyonik polimerin nötralizasyonuna neden olur. Sonuç olarak bakteriyosinlerin bakteri yüzeyi ile etkileşimi artar ve hücre inhibe olur [90]. *S. aureus*’da daptomisin direncine kısmen D-alanillenmiş teikoik asit katkıda bulunmuştur [98]. Aynı zamanda bakteriyosine

dirençli varyantlarda doymuş yağ asidi oranlarında artış bakteriyosinlerin hücre duvarına nüfus etmesini önleyen daha yüksek membran sertliğine sebep olmaktadır. İlginç bir şekilde patojenler ampisilin, kloramfenikol, eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç geliştirirken de aynı stratejiyi uygulamaktadır [49].

1.2.6.6 Bakteriyosinlerin Kullanım Alanları

Son yıllarda dirençli bakteri patojenlerin sayısının artması ve yaygınlaşması nedeniyle enfeksiyonla mücadelede alternatif yöntemlerin değerlendirilmesi zorunlu bir hale gelmiştir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının dirençli bakteri oluşumuna neden olması dışında en önemli sınırlamalarından biri ilaca spesifik olarak dirençli olmayan hemen hemen tüm bakteri türlerini öldürmesidir. Antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması hem patojen bakteriler hem de vücutta bulunan yerli bakterilerin antibiyotik direnci geliştirmesine sebep olmaktadır. Bakteriyosinler bu sorunlar için alternatif bir çözüm sunar. Nispeten dar etki spektrumlarına sahip oldukları için bakteriyel patojenleri hedefleyen ‘tasarım ilaçlar’ olarak kabul edilebilirler. Doğada üretilen bakteriyosinlerin çeşitliliğine bakılacak olursa da patojenlere karşı aktif olan bakteriyosinleri bulmak nispeten kolaydır [99]. Bakteriyosinler nanomolar aralıkta yüksek aktivite göstermesi, spesifik etki mekanizmaları ve yüksek spesifik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle tıbbi kullanımda istenilen özellikler sergileyebilir. Birçok çalışma farklı bakteriyosinlerin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisin dirençli *Enterococcus*, *Clostridium difficile* gibi hastane kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu patojenlere ve Gram-negatif patojenik bakterilere karşı inhibitör etkilerinin olduğunu göstermiştir. Bu etkinlikleri açısından oral, solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistemi etkileyen bulaşıcı hastalıkların tedavisinde potansiyel aday olabilirler [93].

Bazı bakteriyosinler kanser hücrelerine karşı seçici olarak hareket ederek antikanser aktivite gösterebilir. Mikrosin E492, kolikinler (A, D, E1, E2, E3) ve nisin insan tümör hücre hatlarına karşı sitotoksik etki göstermiştir. Bakteriyosinlerin kanser hücrelerine karşı sitotoksitesine apoptozun indüklenmesi ve hücre zarında oluşan depolarizasyon sonucu gözenek oluşumları sebep olmaktadır [100]. Ayrıca bakteriyosinler antiviral etkinliğe de sahiptirler. Bakteriyosinler konakçı hücreler üzerindeki reseptör bölgelerini bloke edebilir ve viral partiküllerin toplanmasını engelleyebilir. Ayrıca bakteriyosinler hidrofobik oldukları için zarflı virüslerin

lipidik zarlarına bağlanarak hücrel ve viral zarların füzyonuna müdahale edebilir ve bu şekilde inhibitör etki sağlayabilir. Bazı bakteriyosinler Herpes simpleks (HSV) virüsüne karşı antiviral etkinlik göstermektedir [101]. Birçok bakteriyosin klinik değerlendirmelere doğru ilerlese de potansiyellerine rağmen biyoyararlanım, stabilite, fizyolojik koşullar altında çözünürlük, proteolitik enzimlere duyarlılık, yüksek üretim maliyetleri ve klinik araştırmalar için kullanımı kısıtlayan sitotoksik değerlendirme eksikliği gibi sınırlamaları vardır. Bu sebeple fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirmek için biyomühendislik yaklaşımları uygulanabilir [93].

Bakteriyosinler birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif tür tarafından üretilse de laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler gıda endüstrisi için özellikle önemlidir çünkü bu bakteriler genel olarak güvenli olarak kabul edilmiştir. Aynı zamanda bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin çoğunluğu doğal gıda izolatları olduğu için gıda uygulamaları için idealdirler. Renksiz, kokusuz, tatsız ve doğal olmaları nedeniyle gıdaların niteliklerini bozmadan kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır. Gıda endüstrisinde gıdaların korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle süt ürünleri, yumurta, sebze ve et ürünlerinde yoğun olarak araştırılmaktadır. Bakteriyosinlerin gıda endüstrisinde uygulanabilmesi için birkaç önemli kriter vardır; i) üretici suş tercihen ‘genel olarak güvenli olarak tanınan’ (GRAS) statüsüne sahip olmalı, ii) patojenlere karşı geniş bir inhibisyon spektrumuna sahip olmalı, iii) ısıya dayanıklı olmalı, iv) sağlığa zararlı olmamalı, v) gıda ürünlerine dahil edilmesi güvenlik, kalite ve lezzetin iyileştirilmesi gibi faydalı etkiler sağlamalı, vi) yüksek spesifik aktiviteye sahip olmalıdır [102].

Bugüne kadar ticari olarak üretilen bakteriyosinler *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin ve *Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen Nisaplin olarak pazarlanan pediocin PA-1’dir. Nisin bakteriyosini şu anda 48’den fazla ülkede gıda koruyucusu olarak FDA onayına sahiptir ve ticari bir ürün olan Nisaplin™ doğal bir gıda koruyucusu olarak satılmaktadır. Nisin, *Listeria monocytogenes* gibi birçok önemli gıda kaynaklı patojen dahil olmak üzere çok çeşitli Gram-pozitif bakterilerin büyümesini engeller. Konserve gıda ve süt ürünlerinde özellikle *Bacillus* ve *Clostridium* gibi ısıya dayanıklı ve spor oluşturan patojenlere karşı koruyucu olarak kullanılırlar. Aynı zamanda Laktikin 3147 ve Laktikin 481 gibi doğal koruyucu ve gıdalarda lezzet artırıcı olarak kullanım potansiyeline sahip

bakteriyosinler de mevcuttur [103], [104]. Et ve et ürünlerinde yüzey kontaminasyonunu engellemek için püskürtme işlemi ile nisin uygulanması *E. coli*, *L. casei*, *Pseudomonas fluorescens* gelişimini engelleyerek gıdanın korunmasını sağlar. Süt ürünlerine bakteriyosinlerin ilave edilmesi genellikle peynir üretiminde kullanılmaktadır. Peynir üretiminde bakteriyosinlerin kullanımı hem gıdanın korunması için hem de peynirin kendine özgü dokusu ve olgunlaşmasına katkıda bulunur [105]. Aynı zamanda çiftlik hayvanlarının büyüme performansı bu süreçte patojen bakterilerinin büyümesinin engellenmesi ile yakından ilişkilidir. Bakteriyosinler patojen bakterileri kontrol ederek veya inhibe ederek çiftlik hayvanlarının sağlığı üzerinde olumlu bir etki göstererek gelişimlerini desteklemek için kullanılabilir. Örneğin pediosin PA-1 *Clostridium perfringens* ile enfekte olmuş tavukların büyüme performansını önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir.

1.3 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında serbest gezen köy tavuklarının gastrointestinal sisteminden; özgün laktik asit bakteri suşlarının izolasyonu, probiyotik olarak kullanımının değerlendirilmesi, bakterilerin ve hücresiz kültür ortamları (HKO) antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi, bakteriyosin üretim yeteneklerinin araştırılması ve üretilen bakteriyosinlerin biyoteknolojik yönden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için belirlenen hedefler aşağıdaki gibidir:

- 1) Serbest gezen köy tavuklarının gastrointestinal sisteminden laktik asit bakterilerinin izolasyonu
- 2) Bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal analizlerinin gerçekleştirilmesi
- 3) Bakterilerin 16S rRNA gen dizi analizi ile tanımlanması
- 4) Bakterilerin probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi
- 5) Bakterilerin ve hücresiz kültür ortamlarının, çeşitli patojen bakterilere karşı antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi ve bakteriyosin üretme yeteneklerinin tespiti

1.4 Hipotez

Son yıllarda bakterilerin antibiyotiklere karşı oluşturdıkları dirençten dolayı enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaşanan güçlükler, antibiyotiğe alternatif olabilecek ajanlara yönelik araştırmalara hız kazandırmıştır. Bu alternatiflerden biri olan bakteriyosinler, sayısız avantajları nedeniyle antibiyotiklere iyi bir alternatif olarak gösterilmektedir. Bakteriyosin üreticisi olarak bilinen ve insan/hayvanların gastrointestinal sistemlerinin mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin, probiyotik olarak değerlendirilmesi oldukça muhtemeldir. Gastrointestinal sistemden izole edilen laktik asit bakterilerinin hem probiyotik olarak kullanımı hem de bakteriyosin üretme yeteneğine sahip ise bu bakteriyosinin izolasyonunun antibiyotik gibi tedavilere etkili bir alternatif olarak kullanılabileceği ve gıda, yem sanayi, hayvancılık, sağlık alanlarında potansiyel kullanımının olabileceği öngörülmektedir.

2

MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal:

2.1.1 Kullanılan Cihazlar

- PZR Cihazı- Biorad T100™ Thermal Cyclers
- PZR Cihazı- Peqlab a VWR Brand
- Yatay Elektroforez-Mini-Sub® Cell GT Systems
- Dikey Elektroforez- Mibi-PROTEAN Tetra Cell Systems
- Güç Kaynağı- Biorad Powerpac Basic
- Nanodrop- Thermo Scientific Nanodrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers
- Soğutmalı Santrifüj- Beckman Coulter- Allegra X-30R Centrifuge
- Soğutmalı Santrifüj- Hettich Universal 32R
- Hassas terazi- Shimadzu ATX224 Analitik Terazi
- Manyetik Karıştırıcı- RH Basic
- pH Metre- Mettler Toledo Seven Compact/Ion S220
- Mikrodalga- Arçelik
- UV Görüntüleme Cihazı- Vilber Lourmat UV Camera and Transilluminator
- Etüv- Memmert UN55
- Buzdolabı- Arçelik Altus
- Isı Bloğu- Inovia Dry Batch
- Vortex- IKA V1S000
- UV Spektrofotomete- Shimadzu UV1800
- Kabin- ESCO Class II
- -80°C dondurucu- Thermo Scientific FORMA 702
- Su banyosu- Stuart Shaking Water Bath SBS40
- İnkübatör- Nüve Incubator EN032
- Ultra saf su cihazı- Purelab Elga Flex
- Isıtıcı- DragonLab MS-H-S Heater
- Elektronik tartı- Shimadzu Corporation Electronic Balance

- Mikroplaka Spektrofotometre- Biotek PowerWave XS
- Anaerocult ®A (Merck #113829)
- CO₂GEN™ (Oxoid AGS)
- GASPAK EZ Anaerobik Jar
- AnaeroJar 2.5L Jar (Oxoid)

2.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Tez çalışmasında İstanbul Çekmeköy Menduh Bakkal Köy Yumurtası ve Canlı Tavuk Satış Noktası'ndan temin edilen tavuklardan izole edilen *Lactobacillus salivarius* bakterisi kullanılmıştır. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (ATCC 67101), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13833), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria monocytogenes* (gıda kaynaklı izolat) ve *Salmonella Typhimurium* (gıda kaynaklı izolat); *Pseudomonas syringae*, vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus*, kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* (klinik izolat) bakterileri Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *Lactobacillus reuteri* bakterisi ise ticari olarak alınan Biogaia probiyotik ilacından izole edilmiştir.

2.1.3 Kullanılan Besiyerleri

Deneylerde kullanılan besiyerleri De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth (Merck), modifiye De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth, Muller-Hinton Agar, Mueller-Hinton Broth (Sigma Aldrich), Mueller-Hinton Agar (Condalab) ve Tryptic Soy Broth (Merck) temin edilmiş ve üretici talimatlarına uygun olarak hazırlanmıştır.

MRS Broth

MRS Broth	52.2 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

MRS Agar

MRS Broth	52.2 g
Bakteriyel agar	15 g
Distile su	1000 mL

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Modifiye MRS Agar

MRS Broth	52.2 g
Bakteriyel agar	15 g
Fruktoz	5 g
Maltoz	10 g
Distile su	1000 mL

1 M Maltoz ve 1 M Fruktoz ve MRS Agar besiyeri ayrı ayrı hazırlanmış otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Gliserol Agar

Gliserol	20 mL
Bakteriyel agar	10 g
Distile su	1000 mL

Agar distile suda tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda ısıtılmış ve karıştırılmıştır. Tamamen çözüldükten sonra gliserol eklenmiş ve bir süre daha karıştırıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Mueller-Hinton Broth

Mueller Hinton Broth	21 g
Distile su	1000 mL

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Mueller-Hinton Agar

Mueller-Hinton Agar	38 g
Distile su	1000 mL

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

Tryptic Soy Broth

Tryptic Soy Broth	30 g
Distile su	1000 mL

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

2.1.4 Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Boyalar:

Deneyler esnasında boyama aşamasında kullanılan 2,4-Dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) (Art.803080) boyası Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Prof. Dr. Feray Aydoğan ve İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü Doç. Dr. Songül Eğlence Bakır tarafından temin edilmiştir.

Ayrıca Pepton (Multicell), gliserol (Multicell), potasyum hidroksit (Merck), hidrojen klorür (Isolab), bakteriyel agar (Multicell), lizozim enzimi (Thermo scientific), Tris-HCl (Multicell), EDTA (Multicell), TriptonX-100 (Biomatik), Maltoz (Merck), Fruktoz (Merck), Glukoz (Multicell), Hidrojen peroksit (Sigma Aldrich), Kristal viyole, Lugol, Sodyum Hidroksit (Himedia), Sodyum Klorür (Multicell), Amonyum sülfat (Merck), Potasyum Klorid (Multicell), Disodyum Fosfat (Sigma Aldrich), Potasyum fosfat monobasic (Multicell), Metanol (Merck), Kloroform (Sigma Aldrich), Tris-Acetate-EDTA (TAE) 50X Solution (Fisher Bioragents), Akrilamid (Biomatik), Bisakrilamid (Biomatik), SDS (Multicell), TEMED (Sigma), Amonyumpersülfat (APS) (Biorad), Dithiothreitol (DTT) (GoldBIO), Glisin (Multicell), Bromofenol Blue (Biomatik), Coomasie Brilliant Blue R-250 Staining (GoldBIO), asetik asit (Sigma Aldrich), ampisilin (Multicell), kanamisin (GibcoTM), tetrasiklin (Himedia), vankomisin (Panreac Applichem), apramisin (Genoxxon Bioscience) ürünleri kullanılmıştır.

Peptonlu Su

Bakteriyel pepton	1 g
Distile su	1000 mL

Bu maddeler tamamen çözölünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 20 dk steril edilmiştir.

1 M Maltoz Çözeltisi

Maltoz	18 g
Distile su	50 mL

Bileşenler tamamen çözölünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

1 M Fruktoz Çözeltisi

Fruktoz	9 g
Distile su	50 mL

Bileşenler tamamen çözölünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

2,4-Dinitrofenilhidrazin

DNPH reaktifi	0.10 g
Distile su	1000 mL
Hidrojen Klorür	17 mL

DNPH reaktifi distile su içerisinde eklenmiş ve sürekli karıştırılarak boya çözölünceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra boya tamamen çözölünce Hidrojen klorür eklenmiş ve soğumaya bırakılmıştır.

5 M Potasyum Hidroksit

Potasyum Hidroksit	28.04 g
Distile su	1000 g

Bileşenler distile su içerisinde eriyene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözölürülmüştür.

%2 NaCl Sodyum Klorür

Sodyum Klorür 2 g

Distile su 1000 mL

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve daha sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

5 M Hidrojen Klorür

Hidrojen Klorür 20.83 mL

Distile su 29.17 mL

Hidrojen klorür çeker ocakta mezür kullanılarak alınmış ve distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

1 M Hidrojen Klorür

Hidrojen Klorür 4.17 mL

Distile su 45.53 mL

Hidrojen klorür çeker ocakta pipet kullanılarak alınmış ve distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

0.1 M Hidrojen Klorür

Hidrojen Klorür 0.417 mL

Distile su 49.583 mL

Hidrojen klorür çeker ocakta pipet kullanılarak alınmış ve distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

5 M Sodyum Hidroksit

Sodyum Hidroksit 10 g

Distile su 50 mL

Sodyum hidroksit tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

1 M Sodyum Hidroksit

Sodyum Hidroksit 2 g

Distile su 50 mL

Sodyum hidroksit tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

0.1 M Sodyum Hidroksit

Sodyum Hidroksit 0.2 g

Distile su 50 mL

Sodyum hidroksit tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

1X PBS (pH: 7.4)

Sodyum Klorür 8 g

Potasyum Klorit 200 mg

Disodyum Fosfat 1.44 g

Potasyum fosfat monobasic 245 mg

Distile su 1000 mL

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve sonrasında 1 M Hidrojen Klorür ve 1 M Sodyum Hidroksit kullanılarak pH'ı ayarlanmıştır.

1X TAE Buffer

50X TAE Buffer ticari olarak alınmış ve 1X olması için uygun miktarda seyreltilmiştir.

0.5 M Tris (pH: 6.8)

Tris Base 6.05 g

Distile su 100 mL

Tris base tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra farklı molarlarda HCl ve NaOH kullanılarak pH'ı 6.8 olarak ayarlanmıştır.

1 M Tris (pH: 8.8)

Tris Base	18.17 g
Distile su	100 mL

Tris base tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra farklı molariteye sahip HCl ve NaOH kullanılarak pH'ı 6.8 olarak ayarlanmıştır.

6X SDS Loading Dye

1M Tris (pH:6.8)	3.75 mL
Gliserol	6 mL
SDS	1.2 g
DTT (Ditiotreitol)	0.93 g
Bromofenol Blue	3 mg

Bileşenler tamamen çözülünceye kadar iyice karıştırılmış ve daha sonra 10 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

5X Tank Tamponu

Tris-Base	15.19 g
Glisin	94 g
%10 SDS	50 mL
Distile su	1000 mL

Bileşenleri cam şişeye eklenmiş ve şişeye 900 mL distile su koyularak bileşenlerin tamamen çözülmesi sağlanmıştır. Tamponun pH'sı (0.1M),(1M),(5M) HCl, (0.1M),(1M),(5M) NaOH kullanılarak 8.3'e ayarlanmış ve daha sonra tampon distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve SDS-PAGE'de kullanılmak üzere distile su ile 1X'e seyreltilmiştir.

Boyama (Staining) Çözeltisi

Commasie Blue	300 mg
Metanol	200 mL
Asetik asit	35 mL
Distile su	500 mL

Bileşenleri cam şişeye eklenmiş ve daha sonra distile su ile 500 mL'ye tamamlanmış ve çalkalayarak tamamen çözümleri sağlanmıştır.

Boyayı Arındırma (Destaining) Çözeltisi

Metanol	50 mL
Asetik asit	70 mL

Bileşenler cam şişeye alınmış ve distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak çalkalanıp tamamen karışmaları sağlanmıştır.

Agaroz Jel (%10)

Agaroz	0.4 g
1X TAE Buffer	40 mL

Agaroz tartılarak üzerine TAE Buffer eklenmiş ve tamamen çözülünceye kadar yaklaşık bir dakika mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Daha sonra bir süre soğuması için beklenmiş ve uygun sıcaklığa gelince içerisine 2 µL DNA boyası eklenmiştir. Jel tepsisi ve tarak hazırlandıktan sonra agaroz jel tepsisine jel dökülmüş ve dondurulmuştur.

1 M Sodyum monofosfat

Sodyum monofosfat	12 g
Distile su	100 mL

Sodyum monofosfat tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

1 M Sodyum difosfat

Sodyum difosfat 17.8 g

Distile su 100 mL

Sodyum difosfat tartılarak distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar çalkalanmıştır.

Lizis Buffer (pH:7.8)

1 M Sodyum monofosfat 0.3 mL

1 M Sodyum difosfat 4.7 mL

Sodyum Klorür 2.3 g

Potasyum klorür 0.75 g

Gliserol 10 mL

TritonX-100 0.5 mL

İmidazol 68 mg

Bileşenler cam şişeye eklendikten sonra farklı molardaki HCl ve NaOH kullanılarak pH:7.8 olacak şekilde ayarlanmış daha sonra çözelti distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Lizozim Buffer (pH: 8.0)

Tris-HCl 1000 µL,

EDTA 80 µL

TriptonX-100 10 µL

Lizozim 200 mg

Bileşenler karıştırılmış ve daha sonra pH:8.0 olana kadar 1 M Hidrojen Klorür eklenmiştir. pH ayarlandıktan sonra buffer 10 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

%12'lik SDS-PAGE Alt Jeli

Distile su	1.6 mL
1.5 M Tris (pH: 8.8)	1.3 mL
%10 SDS	50 µL
%30 Akrilamid	2 mL
%10 Amonyumpersülfat	50 µL
TEMED	5 µL

%12'lik SDS-PAGE Üst Jeli

Distile su	1.8 mL
0.5 M Tris	0.3125 mL
%10 SDS	25 µL
%30 Akrilamid	335 µL
%10 Amonyumpersülfat	25 µL
TEMED	2.5 µL

%16'lık SDS-PAGE Alt Jeli

Distile su	1.6 mL
1.5 M Tris (pH: 8.8)	2 mL
%10 SDS	80 µL
%30 Akrilamid	4.27 mL
%10 Amonyumpersülfat	80 µL
TEMED	8 µL

%16'lık SDS-PAGE Üst Jeli

Distile su	2.6 mL
0.5 M Tris (pH: 8.8)	1.25 mL
%10 SDS	50 µL
%30 Akrilamid	1 mL

%10 Amonyumpersülfat	50 µL
----------------------	-------

TEMED	5 µL
-------	------

%20'lik SDS-PAGE Alt Jeli

Distile su	0.5 mL
------------	--------

1.5 M Tris (pH: 8.8)	2 mL
----------------------	------

%10 SDS	80 µL
---------	-------

%30 Akrilamid	5.33 mL
---------------	---------

%10 Amonyumpersülfat	80 µL
----------------------	-------

TEMED	8 µL
-------	------

%20'lik SDS-PAGE Üst Jeli

Distile su	2.6 mL
------------	--------

0.5 M Tris (pH: 8.8)	1.25 mL
----------------------	---------

%10 SDS	50 µL
---------	-------

%30 Akrilamid	1 mL
---------------	------

%10 Amonyumpersülfat	50 µL
----------------------	-------

TEMED	5 µL
-------	------

2.1.5 Genomik DNA İzolasyonu:

Bu tez çalışmasında bakterilerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirmek için GeneDirex Aspirations Life kiti talimatlara uygun şekilde kullanılmıştır.

2.1.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Reaktifleri

Polimeraz zincir reaksiyonunda 27 forward (ileri) ve 1492 geri (reverse) (SenteBioLab), DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

Tablo 2. 1 16S polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi
27 ileri primer	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492 geri primer	GGTTACCTTGTTACGACTT

2.1.7 Agaroz Jel Elektroforezi Reaktifleri

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini agaroz jelde yürütmek için GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific), DNA boyası (Ezview DNA stain) kullanılmıştır.

2.1.8 PZR Ürününün Saflaştırılması

PZR reaksiyonu ile çoğaltılan ve agaroz jelde görüntülenen ilgili gen bölgesi jelden QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) protokolüne uygun olarak kesilmiş ve saflaştırılmıştır.

2.1.9 Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi ve Boyanması

SDS-PAGE analizinde protein markeri olarak PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

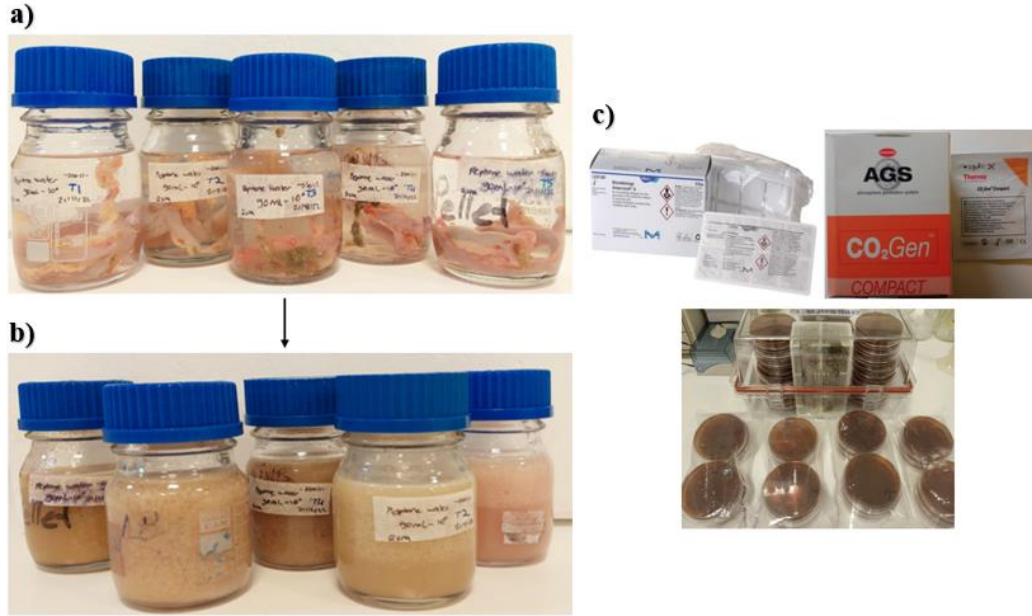
2.2 Metot:

2.2.1 Tavuk bağırsağı ve doku örneklerinden bakteri izolasyonu

Tavukların gastrointestinal sisteminden bakteri izolasyonu, İstanbul Çekmeköy Menduh Bakkal Köy Yumurtası ve Canlı Tavuk Satış Noktası'ndan tavuk kesimi sırasında alınan örneklerden gerçekleştirilmiştir. Kesim sırasında alınan doku ve dışkı örnekleri daha önce hazırlanan, içerisinde peptonlu su bulunan steril ve ağzı kapaklı cam şişeler içerisine koyulmuş ve buz üzerinde bir saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

Laboratuvara getirilen örneklerden dışkı ve bağırsak dokusu örnekleri, ayrı ayrı çalışılmıştır. Bağırsak dokusunda bulunan dışkı örnekleri; sağım işlemi ile çıkarılarak içerisinde peptonlu su bulunan steril dışkı kaplarına alınmış ve tamamen homojenize bir hale gelinceye kadar vortekslenmiştir. Daha sonra bu örneklerden 1:10 oranında peptonlu su konularak 10^{-7} 'ye kadar seyreltme işlemi

gerçekleştirilmiştir. Bağırsak dokusunun uç kısmında bulunan ve *Lactobacillus reuteri* bakterisinin bu bölgede iyi kolonize olduğu düşünülen ceca bölgesi; steril bistüri yardımıyla alınarak 10 g olacak şekilde tartılmıştır. Sonrasında bu örnek 90 mL peptonlu su içeren 100 mL'lik cam şişeler içerisine alınmış ve homojenizasyon cihazı ile tamamen homojenize bir hale gelinceye kadar yaklaşık 1 dakika maksimum hızda homojenize edilmiştir. Örneklerin süpernatant kısımlarından 1:10 oranında peptonlu su ile 10^{-7} 'ye kadar seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Her bir dilüsyondan; Laktobasil gelişimini desteklemek için ilave fruktoz ve maltoz şekerlerini içeren modifiye-MRS agar üzerine 1000 µL alınarak drigalski ile yayma ekimi yapılmış ve örnekler tamamen kuruyana kadar bekletilmiştir. Petriler, anaerobik kitler kullanılarak anaerobik jarlar içerisinde 37°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 2. 1 Tavuk doku ve dışkı örneklerinden bakteri izolasyonu aşaması a) peptonlu su içerisinde doku örnekleri, b) homojenize edilmiş doku örnekleri, c) anaerobik ortam sağlamak için kullanılan anaerobik kitler

2.2.2 Tavuk bağırsağı ve doku örneklerinden izole edilen bakterilerin boyanması

Tavuk bağırsağından ve dışkılarından izole edilen ve modifiye MRS katı besiyerinde geliştirilen bakteriler, farklı koloni morfolojilerine göre ayrılmıştır. Farklı koloni morfolojilerine sahip bakterilerden steril öze yardımı ile koloniler alınarak MRS katı besiyeri ortamına tek koloni ekimi gerçekleştirilmiştir. Bakteriler, 37°C'de 24

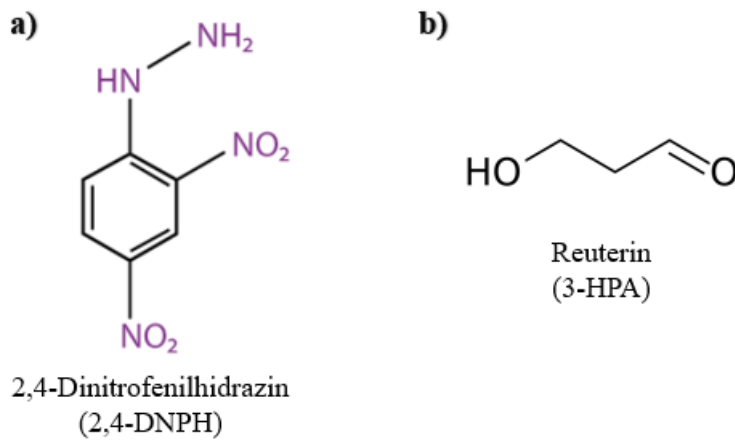
saat anaerobik ortamda geliştirilmiştir. Tek kolonilerin birbirinden bağımsız olduğu ve kolaylıkla ayırt edilebildiği petriler, 2,4-DNPH boyama işlemine alınmıştır.

Boyama işlemi için, öncelikle 2,4-DNPH boyası (100 mL), 5M KOH (50 mL), gliserol agar (100 mL) hazırlanmıştır. Daha sonra bölüm 2.2.2.1’de detaylı anlatılan protokol ile gerçekleştirilmiştir:

2.2.2.1 2,4-DNPH (2,4-Dinitrofenilhidrazin) boyası ile bakterilerin boyanması

İnsan/hayvan gastrointestinal sisteminde yoğun olarak bulunan ve bakteriyosin üretim potansiyeli bilinen *Lactobacillus reuteri* bakterisinin boyanması işleminde spesifik olarak kullanılan bu metot, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Prof. Dr. Emine Nursen Topçuoğlu’ndan temin edilen çalışma protokolü ve referans kaynak olarak Anna Greppi ve ark. çalışma protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir [106] [107].

2,4-DNPH boyama metodu; aldehit grubu içeren reuterin antimikrobiyal bileşiğini üreten *Lactobacillus reuteri* bakterisinin aldehit grubunun boyanarak tayin edilmesi prensibine dayanır. Brady Reaktifi olarak bilinen 2,4-Dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) sulu çözeltisi, karbonil bileşikler ile (aldehit ve keton) reaksiyona girerek sarı ve turuncu renkte bir çökelti oluşturur ve bu özelliğinden dolayı aldehit ve keton gruplarının ayrılması için kullanılır. *L. reuteri* tarafından üretilen reuterin antimikrobiyal bileşiği gliserolün 1,3-propanodiol’e dönüşümünde bir ara madde olduğundan bakteri bu bileşiği üretmek için ortamda gliserole ihtiyaç duyar.



Şekil 2. 2 a) Boyama işleminde kullanılan 2,4-Dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH) yapısı, b) reuterin (3-HPA) yapısı

Tavuk bağırsağı ve dışkılarından izole edilen örneklerin boyanma işlemine geçmeden önce boyama işleminin pozitif kontrol grubunu oluşturacak *L. reuteri* bakterisinin izolasyonu, genellikle bebekler için probiyotik ilaç olarak kullanılan Biogaia probiyotik ilacı kullanılarak sağlanmıştır. Biogaia'dan izole edilen bakterilerin geliştirilmesinde modifiye MRS katı ve sıvı besi ortamları kullanılmıştır. Öncelikle *L. reuteri* bakterisinin izolasyonu için Biogaia'dan 100 µL örnek alınarak 900 µL peptonlu su içerisinde vorteks yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra 10^{-7} dilüsyona kadar seyreltmeler hazırlanmış ve drigalski ile modifiye MRS katı besiyerine ekim yapılmıştır. Ekimden sonra petriler inkübatörde 37°C'de 48 saat anaerobik olarak inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda *L. reuteri* cinsine ait olduğu düşünülen ve büyüme gözlemlenen petrilerdeki koloniler modifiye MRS sıvı besiyerine alınarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda örnekler Gram boyama ve katalaz testleri yapılarak incelenmiştir.

İlk olarak Biogaia'dan izole edilen *L. reuteri* bakterileri modifiye MRS katı besiyerinde uygun koşullar altında geliştirilmiş ve tek kolonilere sahip olan petriler boyama işleminde kullanılmak amacıyla seçilmiştir. Petrilerin yüzeyine daha önceden hazırlanan 47°C sıcaklığındaki gliserol agar (%2, bakterinin reuterin üretmek için ihtiyaç duyacağı gliserolü sağlamak amacıyla) ile tamamen kaplanmış, agar donduktan sonra petrilerin kapakları yukarı bakacak şekilde inkübatöre kaldırılarak 37°C'de yaklaşık olarak 45-60 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda reuterinin aldehit grubunu boyayabilmek için daha önce hazırlanan 2,4-DNPH boyası 5 mL alınarak agar yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde petrilere dökülmüş ve 1-5 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda boya tamamen uzaklaştırılmış ve oluşan sarı-turuncu çökelti MRS agar yüzeyi de aynı renge sahip olduğundan tespiti kolaylaştırmak için aynı ortama alkalik 5M KOH (potasyum hidroksit) eklenerek boyanın renginin kırmızı-kahverengi olması sağlanmıştır. Potasyum hidroksit 1-3 dakika bekletilmiş ve süre sonunda etrafında kırmızı-kahverengi zonlar görülen koloniler, reuterin üreten *L. reuteri* olarak kabul edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile 2,4-Dinitrofenilhidrazin ile boyama protokolünün *L. reuteri* bakterisinin tayini için optimize edilmesi sağlanmış olup aynı zamanda çalışmanın pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Sonrasında tavuk bağırsağı ve dışkılarından izole edilen örneklerin boyanma işlemi aynı şekilde gerçekleştirilerek etrafında kırmızı-kahverengi zon oluşturan koloniler

pozitif olarak kabul edilmiş ve *L. reuteri* olarak tanımlanmıştır. En iyi boyamanın gözlemlendiği altı koloni seçilerek MRS sıvı besiyerine aktarılmış, 37°C’de 48-72 saat inkübasyon sonrası %25’lik son konsantrasyona sahip gliserol eklenerek -80 °C’ de stoklanmıştır.

2.2.3 Tavuk bağırsağından izole edilen bakterilerin morfolojik, biyokimyasal analizleri

Boyama işleminde en iyi boyanan koloniler; C1-4, C1-2, C1-7, C2-1, C2-4, C2-3 olarak isimlendirilerek morfolojik ve biyokimyasal analiz aşamasına geçilmiştir.

2.2.3.1 Gram Boyama

Gram boyama, bakterilerin Gram-pozitif ve Gram-negatif olarak ayrılması ve tanımlanması için kullanılan bir boyama tekniğidir. Gram boyama yapılacak bakteriler MRS sıvı besiyeri ortamında uygun koşullar altında geliştirilmiştir. Sıvı kültürlerden bir miktar alınarak lam üzerine yayılmış ve kuruması sağlanmıştır. Kuruyan preparat birkaç kez alevden geçirilerek bakterilerin lama sabitlenmesi sağlanmıştır. Preparatın üzerine kristal viyola boyası eklenerek tamamen kaplanmış ve bir dakika bekletilmiştir. Preparat bol distile su ile yıkanarak boyanın tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra preparatın üzerine lugol çözeltisi eklenerek kaplanmış ve bir dakika bekletilmiştir. Preparat tekrar bol su ile yıkanmıştır. Son olarak preparatın üzerine %70’lik etanol eklenmiş ve 30 saniye bekletilmiştir. Preparat tekrar bol su ile yıkanmıştır. Preparat bir kurutma kâğıdı üzerine koyulmuş ve tamamen kuruması sağlanmıştır. Daha sonra ışık mikroskopunda immersiyon yağı kullanılarak 100x objektif merceği altında bakteriler incelenmiş ve morfolojilerine göre değerlendirilmiştir.

2.2.3.2 Katalaz Testi

Katalaz enzimi, genellikle aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Katalaz testi sırasında; $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ kimyasal reaksiyonu gerçekleşir. Katalaz enzimine sahip olan mikroorganizmalar ortama eklenen H_2O_2 ’yu, su ve oksijene parçalayarak açığa O_2 çıkmasını sağlar. Sıvı veya katı besiyerine H_2O_2 eklendiğinde serbest oksijenin gaz kabarcıkları oluşturarak gözlemlenmesi hidrojen peroksitin ayrışmasını yani katalaz enziminin varlığını gösterir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak katalaz pozitif bir mikroorganizma olan *S. aureus* kullanılmıştır. Test bakterileri MRS sıvı besiyerinde uygun koşullar altında

geliştirildikten sonra cam tüplere 3000 µL olarak aktarılmıştır. *S. aureus* bakterisi de MHB sıvı besiyerinde 37°C’de 24 saat aerobik şartlar altında geliştirildikten sonra 3000 µL cam tüplere aktarılmıştır. Daha sonra sıvı besiyerleri üzerine 1000 µL %30 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) eklenerek hava kabarcıklarının oluşup oluşmamasına göre bakteriler katalaz pozitif veya katalaz negatif olarak ayrılmıştır.

2.2.3.3 Glukozdan Gaz Oluşumu Deneyi

Bazı bakteriler sahip oldukları enzimler ile aerobik ya da anaerobik olarak karbonhidratları ayrıştırma özelliklerine sahiptirler. Bu metabolizma sonucunda çeşitli organik asitler, nötral ürünler ve gazlar oluşabilir. Bakteriler bu oluşturdukları son ürünlere göre birbirinden ayrılabilirler. Bakterilerin glikoz içeren besiyeri ortamında durham tüpleri eklendiğinde tüpler içerisinde gaz oluşumu, fermentasyon sonucunda oluşan katabolik gaz ürünlerinin bulunduğunu gösteren bir testtir. Glikozun fermente edilmesiyle ortamda gaz oluşumunu test etmek amacıyla cam tüplerinin içerisine ters bir şekilde durham tüpleri koyulmuş ve tüpler steril edilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisine 10 mL MRS sıvı besiyeri eklenmiş ve daha önce MRS sıvı besiyerinde uygun koşullarda geliştirilen bakteri kültürlerinden 100 µL alınarak tüplerin içerisine eklenmiş ve örnekler 37°C’de 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Deneyde negatif kontrol olarak bakteri eklenmeyen sadece MRS sıvı besiyeri eklenen tüp kullanılmıştır. Inkübasyon sonunda durham tüpleri içerisindeki gaz oluşumunun varlığına göre değerlendirmeler yapılmıştır.

2.2.3.4 Bakterilerin antibakteriyal aktivite testleri

Morfolojik ve biyokimyasal analizleri gerçekleştirilen altı bakterinin ve kültür ortamlarının farklı patojenlere karşı antibakteriyal aktivitelerini belirlemek için agar difüzyon ve agar spot testleri uygulanmıştır. Bu aşamada bakterilerin, *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* patojenlerine karşı etkinlikleri değerlendirilmiştir.

Öncelikle test edilecek altı laktik asit bakterisi, MRS sıvı besiyerinde uygun koşullar altında geliştirilmiştir. Testte kullanılacak patojen bakteriler de MHB sıvı besiyerinde 37°C’de 24 saat geliştirildikten sonra spektrofotometrede OD₆₀₀’de 0.2 ± 0.02 (=1.5-3.0×10⁸) olacak şekilde ayarlanmış ve çalışma kültürü olarak kullanılmıştır [108].

- **Agar difüzyon yöntemi:**

Çalışma kültürlerinden 100 µL alınarak MHA katı besiyeri üzerine steril swaplar yardımıyla tamamen yüzeyi kaplayacak şekilde yayılmıştır. Daha sonra steril edilmiş 0.5 cm'lik cam deliciler ile petriler üzerine kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyuların içerisine MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiş bakteri örnekleri spektrofotometrede OD₆₀₀'de 1.5 ± 0.02 ($=1.2 \times 10^9$) olacak şekilde ayarlanmış ve hücresiz kültür ortamları 100 µL olacak eklenmiştir. Daha sonra petriler kapaklar yukarı bakacak şekilde 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve kuyuların etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek bakterilerin antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir [108].

- **Agar spot yöntemi:**

Çalışma kültürlerinden agar difüzyon yönteminde olduğu gibi 100 µL alınarak MHA katı besiyeri üzerine steril swaplar yardımıyla tamamen yüzeyi kaplayacak şekilde yayılmıştır. Daha sonra petrilerin yüzeyine MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiş bakteri örnekleri spektrofotometrede OD₆₀₀'de 1.5 ± 0.02 ($=1.2 \times 10^9$) olacak şekilde ayarlanmış ve agar yüzeyine 10 µL olarak damlatılmıştır. Örneklerin tamamen kuruması için bir süre beklenmiş ve petriler kapakları yukarı bakacak şekilde 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonları ölçülerek bakterilerin antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir [109].

Bu testlerde çeşitli patojen test bakterilerine karşı antibakteriyal etkinlikleri değerlendirilen altı bakteri örneğinden en iyi etkinlik gösteren C1-4 ve C2-3 bakterileri seçilerek bundan sonraki deneylerde bu iki bakteri suşu kullanılmıştır.

2.2.4 C1-4 ve C2-3 bakterilerinin genomik DNA izolasyonu

C1-4 ve C2-3 bakterilerinin genomik DNA izolasyonu GeneDirex Aspiration Life izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bakteriler DNA izolasyonu için MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 24 saat geliştirilmiş ve daha sonra aşağıdaki protokol uygulanarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kitin prosedürüne göre;

- MRS Broth besiyerinde geliştirilen bakteri kültürleri ($>10^9$) 1.5 mL steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

- Süpernatant tamamen uzaklaştırılmış ve pelet pipetlenerek 100 µL lizozim tamponundan yeniden süspanse edilmiştir daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücrelere 300 µL Buffer CC eklenerek vortekslenip karıştırılmış ve 60°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
- Örneklere 400 µL Buffer CB eklenmiş, hızlıca sallanmış ve daha sonra 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- 2 mL'lik bir toplama tüpüne bir kolon CC yerleştirilmiş önceki adımdan alınan süpernatant tamamen kolon CC'ye aktarılmış ve 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
- Tüp atılmış ve CC sütunu 2 mL'lik toplama tüpünü geri yerleştirilmiştir.
- Kolon CC'ye 400 µL Buffer W1 eklenmiş ve 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
- Tüpün içinde kalanlar uzaklaştırılmış ve CC kolonu aynı toplama tüpüne koyulmuştur.
- Kolon CC'ye Buffer W2 600 µL eklenmiş ve 14.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
- Tüpün içinde kalanlar uzaklaştırılmış ve kolon CC aynı toplama tüpüne koyulmuştur.
- Kolon içinde kalan Buffer W2'yi uzaklaştırmak için tekrar 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır.
- Kolon CC'ler 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Önceden ısıtılan Buffer BE veya TE 50-200 µL tam kolon matriksin ortasına eklenmiş ve tüpler 60°C'de 3 dk bekletilmiş daha sonra 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır.
- Daha sonra örnekler nanodrop (Thermo Scientific One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers) cihazı ile ölçülmüştür.

DNA'nın saflığı ve saflık kontrolü 260/280 ve 260/230 oranları dikkate alınarak belirlenmiş ve devam eden çalışmalarda kullanılmak üzere izole edilen DNA örnekleri -20'de muhafaza edilmiştir.

2.2.5 C1-4 ve C2-3 bakterilerinin 16S rRNA polimeraz zincir reaksiyonu

Yaklaşık 1500 bç'lik 16S rRNA gen dizilerinin çoğaltılması bakterilerin 16S rRNA gen bölgesine spesifik olan 27F ileri ve 1492R geri primerleri kullanılarak Touch-Down polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.3'de verilen bileşenler sırasıyla eklenmiş ve reaktifler/reaksiyon karışımları buz üzerinde tutulmuştur.

Tablo 2. 2 16S polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Hedef Bölgesi	Gen	Primer Dizileri (5'-3')	Tm (°C)	Çoğaltılan Bölge (bp)
16S rRNA		27 F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)	62.3	~1500 bp
		1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)	57.7	

Tablo 2. 3 16S polimeraz zincir reaksiyonu içeriği

İçerik	Kullanılan Hacim (µL)
Steril su	23 µL
27F ileri primer (10 µM)	1 µL
1492R geri primer (10 µM)	1 µL
Kalıp DNA	1 µL
Dreamtaq DNA polimeraz	25 µL
Toplam hacim	50 µL

Tablo 2. 4 Touch Down polimeraz zincir reaksiyonu

Reaksiyon Aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	15
Bağlanma	60°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Denatürasyon	95°C	30 saniye	15
Bağlanma	53°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	10 dakika	1
Soğutma	4°C	∞	1

PCR reaksiyonları Tablo 2.3' de verilen miktarlarda ve Tablo 2.4' de verilen reaksiyon koşulları kullanılarak 200 µL'lik ependorf tüplerde ve Biorad T100™ Thermal Cycler cihazından gerçekleştirilmiştir.

2.2.6 Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerinin istenilen uzunlukta ve tek bant şeklinde olup olmadığı Bölüm 2.1.4'te belirtildiği gibi hazırlanan %1'lik agaroz jel elektroforezi sisteminde yürütülerek kontrol edilmiştir.

Hazırlanan agaroz jelinin ilk kuyusuna belirteç olarak 2 µL DNA marker eklenmiş ve örnekler diğer kuyulara daha sonra jelden saflaştırılacakları için 30 µL olarak eklenmiştir. Agaroz jel elektroforezi 90V'de 40 dakika gerçekleştirilmiştir sonrasında DNA bantları UV ışık altında görüntülenmiş ve bant boyutlarına göre doğruluğu tayin edilmiştir.

2.2.7 PZR ürününün saflaştırılması ve sekanslama

UV ışığı altında DNA bantları görüntüledikten sonra 16S Sanger Dizileme için jelden DNA izolasyonu işlemi OIAquicik® Jel Saflaştırma Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protokole göre;

- Agaroz jelden DNA bantlarının bulunduğu bantlar steril bir bistüri yardımı ile kesilmiştir.
- Tüpler tartılmış ve tüplerin içerisine kesilen jel aktarılmıştır. 1 hacim jele 3 hacim Tampon QG eklenmiştir.
- Tüpler 50°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve jel tamamen çözülünceye kadar 2-3 dk vortekslenmiştir.
- Daha sonra örneğe kendi hacmi kadar izopropanol eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- 2 mL'lik bir toplama tüpüne QIAquick kolonu yerleştirilmiş, örnek kolona yüklenerek 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Kolona 500 µL Buffer QG eklenmiş ve 1 dk santrifüjlenmiştir. Tüpte kalan akış atılmış ve QIAquick kolonuna tekrar aynı tüp yerleştirilmiştir.
- Yıkama işlemleri için QIAquick kolonuna 750 µL Buffer PE eklenmiş ve 1 dk santrifüjlenmiştir. Tekrar tüpte kalan akış atılmış ve QIAquick kolonuna tekrar aynı tüpe yerleştirilmiştir.

- Kalan yıkama tamponunu çıkartmak için sağlanan 2 mL'lik toplama tüpünde QIAquick kolonuna 1 dk santrifüjlenmiştir.
- QIAquick kolonu temiz bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
- Önceden 55°C'ye koyulan steril sudan 20 µL alınarak kolona eklenmiş ve 1.5 dakika santrifüjlenmiştir.
- Elüsyonların nanodropta ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

PZR ürünlerinin çift yönlü sekans analizleri hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiş olup analiz sonuçları NCBI (National Center for Biotechnology Information) verileri ile karşılaştırılarak moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlama sonucunda tavuk bağırsak dokusundan izole edilen C1-4 ve C2-3 bakteri suşlarının *Lactobacillus salivarius* cinsi bakteri olduğu kanıtlanmıştır. C1-4 ve C2-3 bakteri suşlarının dizileme sonucuna göre bakterilerin suş bazında farklılıklarının olması ve bu farklılığın sonraki deneyleri etkileme potansiyelinden dolayı sonraki aşamalarda her iki bakteri suşu da kullanılmıştır. Bundan sonra C1-4, *L. salivarius* suş 1; C2-3, *L. salivarius* suş 2 olarak tanımlanmıştır.

2.2.8 *Lactobacillus salivarius* suşlarının probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi

2.2.8.1 Farklı pH değerlerinde büyüme deneyleri

Gastrointestinal sistemi taklit etmek için bakteriler farklı pH'larda hazırlanan MRS sıvı besiyerinde 2, 4, 6 ve 24 saat boyunca inkübe edilerek bakterilerin aside karşı toleransları değerlendirilmiştir. Öncelikle deneyde kullanılacak olan *L. salivarius* suş 1 ve suş 2 bakterileri MRS sıvı besiyerinde uygun şartlarda geliştirilmiştir. Daha sonra falkon tüplere MRS Broth besiyeri 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve steril 1M HCl ve 1M NaOH kullanılarak besiyeri pH'ları 1.5, 2, 3 ve 6.5 (kontrol) olacak şekilde ayarlanmıştır [110], [111]. Daha önce geliştirilen bakteri suşlarının sıvı kültürlerinden 100 µL alınarak farklı pH'lara sahip MRS sıvı besiyerine eklenmiştir. Örnekler 37°C'de anaerobik şartlar altında inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerden 2, 4, 6 ve 24. saatlerde örnekler alınarak 600 nm'de OD'leri ölçülmüş sonuçlara göre bakterilerin farklı pH'larda gelişimi değerlendirilmiştir.

2.2.8.2 Farklı tuz konsantrasyonlarında büyüme deneyleri

Gastrointestinal sistemi taklit etmek amacıyla bakteriler farklı tuz konsantrasyonları içeren besiyerlerinde 2, 4, 6, 24 saat boyunca inkübe edilerek bakterilerin tuza karşı toleransı değerlendirilmiştir. Deneyde kullanılacak *L. salivarius* suşları, MRS sıvı besiyerinde uygun şartlarda geliştirilmiştir. Daha sonra falkon tüplere MRS Broth besiyeri 5 mL olacak şekilde dağıtılmış bu besiyerlerinin tuz konsantrasyonları %0, %3, %6.5, %10 ve %12 olacak şekilde içerisine sodyum klorür (NaCl) eklenmiştir [112][113], [114]. Bakterilerin tuza karşı toleranslarını tespit etmek amacıyla MRS sıvı besiyerinde büyütülen kültürlerden 100 µL eklenmiş ve örnekler 37°C'de anaerobik şartlar altında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra belirtilen saatlerde örnekler alınarak 600 nm'de OD'leri ölçülmüş ve bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimleri değerlendirilmiştir.

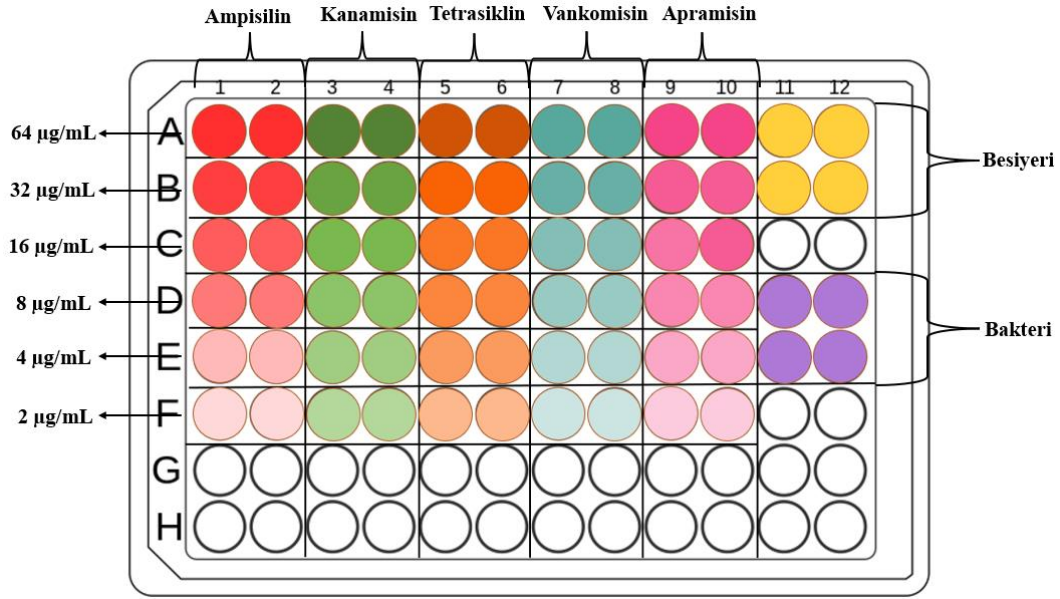
2.2.8.3 Farklı sıcaklıklarda büyüme deneyleri

MRS sıvı besiyerinde uygun şartlar altında geliştirilen *L. salivarius* suşları, 10 mL MRS sıvı besiyeri içeren tüplere 100 µL olarak eklendikten sonra 15°C'de 72 saat, 22°C 48 saat, 30-37-45-50-60°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır [110]. Bu süreler sonunda örnekler alınarak 600 nm'de OD'leri ölçülmüş ve bakterilerin farklı sıcaklıklarda gelişimleri değerlendirilmiştir.

2.2.9 *Lactobacillus salivarius* suşlarının antibiyotik direnç testi

Ampisilin (10 µg), kanamisin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), vankomisin (30 µg), apramisin (30 µg) antibiyotiklerinin laktobasiller üzerine etkileri broth mikrodilüsyon testi (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) deneyi ile belirlenmiştir [115]. Antibakteriyel test öncesinde *L. salivarius* suşları, MRS sıvı besiyerinde uygun şartlar altında geliştirilmiştir. Kültürler steril sıvı besiyeri ile 600 nm'de 0.2 ± 0.02 ($=1.5-3.0 \times 10^8$) absorbans değerlerinde olacak şekilde seyreltilmiş ve tüm deneyler boyunca çalışma kültürü olarak kullanılmıştır. Daha sonra test örneklerinin antibiyotik duyarlılık testi için farklı konsantrasyonlarda antibiyotikler uygulanarak petriyeler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilerek bakterilerin antibiyotik dirençleri değerlendirilmiştir. Aynı zamanda antibiyotiklerin laktobasiller üzerindeki inhibisyon etkilerini belirlemek için disk difüzyon yöntemi de kullanılmıştır [116]. Test örnekleri MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18-20 saat inkübe edilerek aktifleştirildikten sonra aktif

kültürlerin yoğunlukları steril sıvı besiyeri ile 600 nm’de 0.2 ± 0.02 ($=1.5-3.0 \times 10^8$) absorbans değerlerinde olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra kültürlerden 100 µL alınarak MRS agar besiyerine steril swaplar ile homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Antibiyotik diskleri birbirinden uzak olacak şekilde steril olarak agar üzerine yerleştirilmiştir. Petriler 37°C’de 18-20 saat inkübasyona bırakılmış ve sürenin sonunda antibiyotik disklerin çevresinde oluşan zonlara göre antibiyotik dirençleri değerlendirilmiştir.



Şekil 2. 3 MIC Deneyi için kullanılan antibiyotikler ve oranları

2.2.10 *Lactobacillus salivarius* suşlarının antibakteriyal aktivitelerinin değerlendirilmesi

Tavuk bağırsağından izole edilen ve çeşitli deneyler ile analizleri gerçekleştirilen *L. salivarius* suşlarının çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 2.2.3.4’ de belirtildiği gibi agar spot testi ile belirlenmiştir.

Bu aşamada patojenik test bakterileri olarak *S. Typhimurium*, *S. aureus*, vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* bakterileri kullanılmıştır.

2.2.11 *Lactobacillus salivarius* suşlarının bakteriyosin aktivitesinin değerlendirilmesi

L. salivarius suşlarının bakteriyosin aktivitelerini belirlemek için agar spot ve agar difüzyon testleri uygulanmış hücresiz kültür ortamları test örneği olarak kullanılmıştır. *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla; *L. salivarius* suşları, MRS sıvı besiyerinde anaerobik şartlarda 37°C’de bir gece inoküle edilmiştir. *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri ise MHB sıvı besiyerinde 37°C’de aerobik şartlarda bir gece inoküle edilmiştir. Daha sonra kültür ortamları, 4°C’de 10000xg’de 30 dakika santrifüjlenmiş ve kültür üst sıvısı dikkatli bir şekilde çöken peletten ayrılmış ve yeni bir steril falkon tüpe alınmıştır. Daha sonra bakterilerin inhibisyon özelliklerinde düşük pH etkisini ortadan kaldırmak için süpernatant kısım 1M NaOH ve 1M HCl çözeltileri kullanılarak pH:6.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra süpernatant kısım steril şırıngalar ile çekilerek 0,45 µL por çaplı steril membran filtrelerden geçirilmiş ve süzüntüler steril deney tüplerine toplanmıştır. Her aşamada örnekler alınarak antimikrobiyal aktivite Bölüm 2.2.3.4’te anlatıldığı gibi agar spot testi uygulanarak tespit edilmiştir.

2.2.12 Bakteriyosinlerin Saflaştırılması

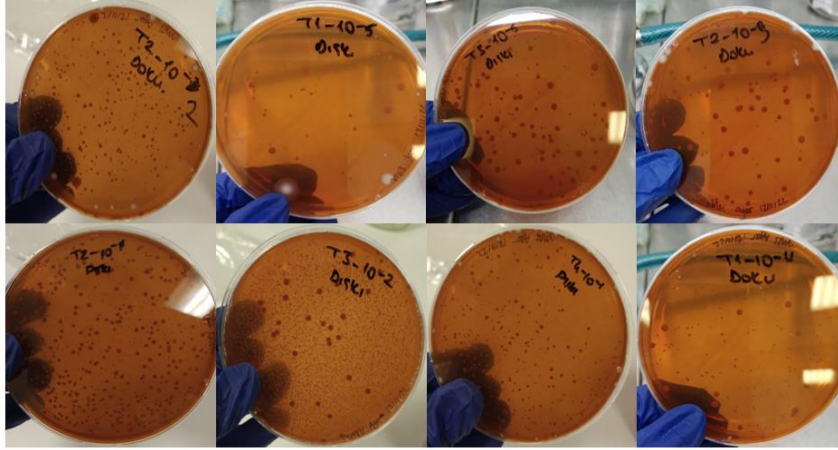
L. salivarius suşlarından bakteriyosin izolasyonu gerçekleştirmek için amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmıştır. Fakat amonyum sülfat çöktürme sonucunda pellette kalan tuzların SDS-PAGE’de iyi bir bant görüntüsü elde etmeyi zorlaştırmasından dolayı amonyum sülfat tuzunu uzaklaştırmak için metanol/kloroform çözeltisi içeren yeni bir protokol uygulanmıştır [117]. Bu aşamada saflaştırılmak istenilen proteinin moleküler ağırlığı bilinmediği için kullanılacak metodun protein saflaştırma basamağını nasıl etkilediğini gözlemlemek adına laboratuvarda daha önce saflaştırılmış ve tanımlanmış olan bir rekombinant protein kontrol amaçlı kullanılmış ve protokol bu şekilde optimize edilmiştir. Özetle metodolojik akış şu şekildedir; hücresiz kültür ortamı veya hücre lizisi sonrası süpernatant örneğine (kontrol rekombinant protein) %70 doymunlukta olacak şekilde amonyum sülfat eklenmiş ve eriyinceye kadar manyetik karıştırıcıda +4°C’de bir gece boyunca karıştırılmıştır. Sürenin sonunda örnekler, 4°C’de

10000xg'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. İşlem sonunda üst faz dökülmüş ve pelet kısım alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan çökelti 1000 µL saflaştırma PBS (pH:7.0) çözölmüş ve üzerine 15 mL metanol/kloroform (1:2 v/v) çözeltisi ilave edilerek +4°C'de bir saat bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler +4°C'de 10000xg'de 45 dakika santrifüjlendikten sonra alt faz (pelet) oda sıcaklığında kurutulmuştur. Son aşamada kurutulan çökelti 1000 µL steril ultra saf su ile çözölmüş ve -20°C'de sonraki deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır. %16 ve %20'lik SDS jellerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler Bölüm 3.1.4'te belirtildiği oranlarda karıştırılarak iki camın arasında pastör pipet yardımı ile belirli bir seviyeye kadar dökölmüş ve üzerine en üst seviyeye gelene kadar distile su eklenerek jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Jel tamamen polimerleşince su uzaklaştırılmış ve ardından %5'lik üst jel hazırlanmış polimerleşen alt jelin üzerine en üst seviyeye kadar pastör pipet yardımıyla dökölmüştür. Dökölen üst jele taraklar konularak üst jelinde polimerleşmesi için beklenmiştir. Polimerleşen jellerin bulunduğu camlar kasetlerin içerisine yerleştirilmiş ve tankın içerisine konulmuştur. Tank daha önce hazırlanan 1X'lik tank tamponu ile doldurulmuştur. Sonrasında jele yüklenecek test örnekleri 5 µL 6X SDS Loading Dye + 45 µL örnek olacak şekilde hazırlanmış ve 95°C'de 5 dakika proteinlerin denatürasyonu için bekletilmiştir. Hazırlanan jelin üzerinde taraklar dikkatli bir şekilde çekilmiş ve hazırlanan hem bakteriyosin içerdiği düşünölen süpernatant örnekleri hem de kontrol protein örneği jel kuyularına 25 µL olarak eklenmiştir. Örneklerin 80V'da yaklaşık olarak 4-5 saat aralığında yürütme işlemi gerçekleştirilmiş daha sonra jellerin boyanması işlemine geçilmiştir. Boyama işleminde tanktan alınan jeller Commasie Brilliant Blue içeren çözeltiye koyulmuş ve bir gece oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Daha sonra jel "Destaining" işlemine tabii tutularak jeldeki fazla boyalar giderilmiş ve işlem sonunda jel distile su ile yıkanarak protein bantları gözlemlenmiştir.

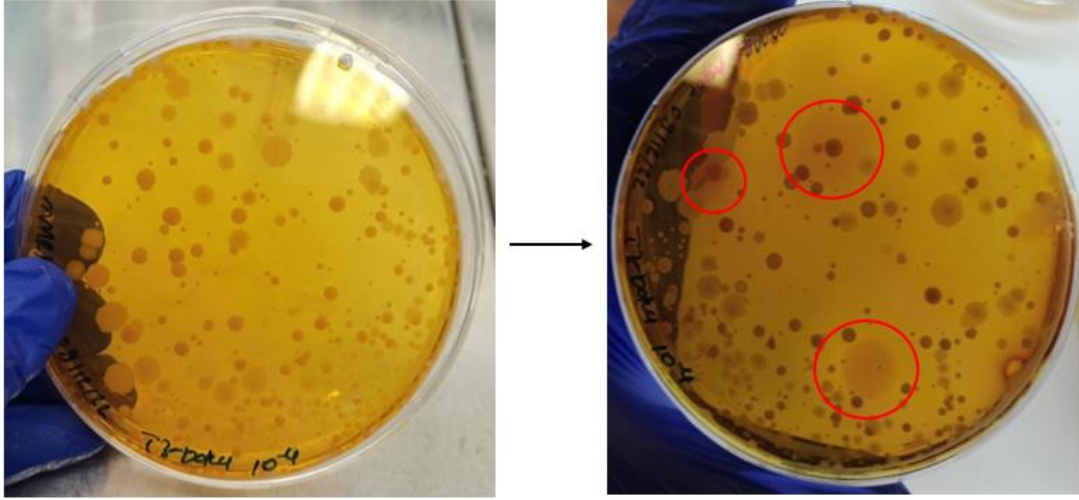
3.1 Deneysel Sonuçlar

3.1.1 Tavuk bağırsağından bakterilerin izolasyonu ve boyanması

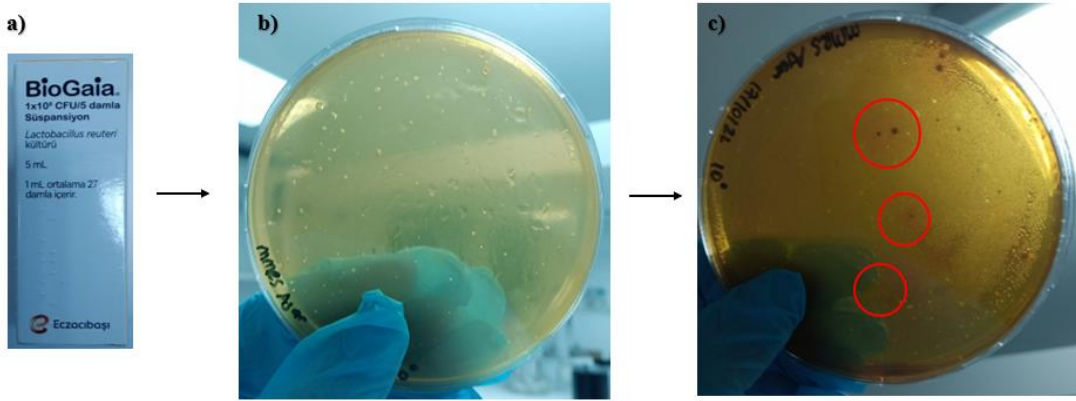
Tavuk bağırsağından izole edilen farklı morfolojilere sahip bakterilerin petri görüntüsü Şekil 3.1’ de sunulmuş olup farklı morfolojiye sahip kolonilerden saf kültür eldesi amacıyla iğne öze ile örneklem alınıp MRS agar besiyerine ekim yapıldıktan sonra 2,4-DNPH boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Çünkü boyama işlemi bakteri ölümüne sebep olmaktadır). Boyama işlemi sonrası kırmızı-kahverengi renkte değişim gözlenen (Şekil 3.2) kolonilerin *L. reuteri* bakterisi olduğu düşünülmüştür. İlaveten, boyama metot optimizasyonu amaçlı gerçekleştirilen Biogaia’dan izole edilen *L. reuteri* bakterisinin boyama işlemi de ön işlem olarak yürütülerek Şekil 3.3’ de gösterildiği gibi bakterilerin etrafında oluşan kırmızı-kahverengi zonlara göre reuterin varlığı tayin edilmiştir. Bu çalışma ile tavuk bağırsağından *L. reuteri* bakterisinin 2,4-DNPH boyama ile izolasyonu ve tayini için kullanılacak protokol optimize edilmiştir.



Şekil 3. 1 Tavuk bağırsağından izole edilen farklı morfolojilere sahip bakterilerin petri resimleri

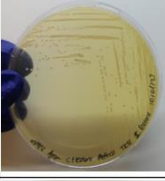
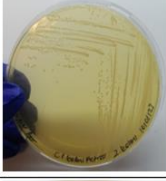
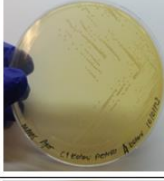
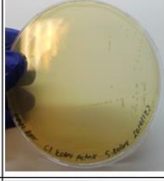
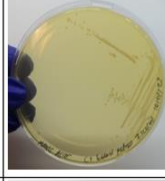
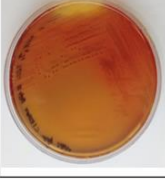
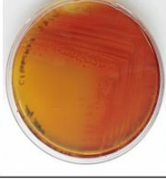
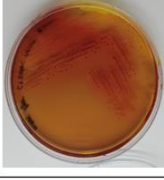
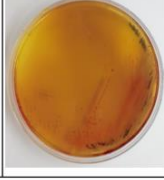
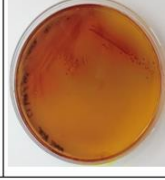


Şekil 3. 2 Tavuk bağırsağından izole edilen bakterilerin boyama öncesi ve sonrası petri görüntüleri

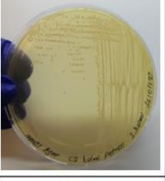
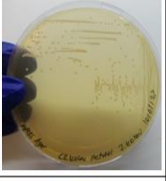
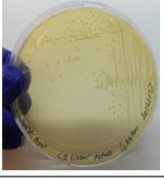
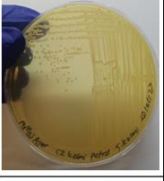
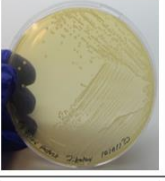
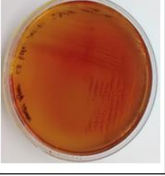
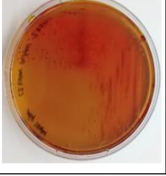
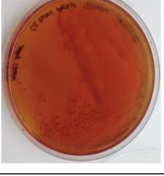


Şekil 3. 3 Biogaia'dan *Lactobacillus reuteri* bakterisinin izolasyonu ve 2,4-DNPH ile boyanması a) biogaia, b) bakterilerin tek koloni görünümü, c) kırmızı ile işaretlenmiş reuterin üreten *Lactobacillus reuteri* bakterileri

C1 ve C2 olarak kodlanan kolonilerinin belirlendiği petrilerden farklı koloniler alınarak gerçekleştirilen boyama işlemi Şekil 3.4 ve 3.5' de sunulmuş olup her koloninin boyanmaması kırmızı kısımların belirli bölgelerde yoğunlaşmış olması kültürde farklı suşların varlığını göstermektedir.

	Örnekler				
	C1-1.Koloni	C1-2.Koloni	C1-4.Koloni	C1-5.Koloni	C1-7.Koloni
2,4-DNPH ile boyamadan önce					
2,4-DNPH ile boyamadan sonra					

Şekil 3. 4 Tek koloni ekimi yapılan c1 kolonilerinin boyama sonucu petri görüntüleri

	Örnekler				
	C2-1.Koloni	C2-3.Koloni	C2-4.Koloni	C2-5.Koloni	C2-7.Koloni
2,4-DNPH ile boyamadan önce					
2,4-DNPH ile boyamadan sonra					

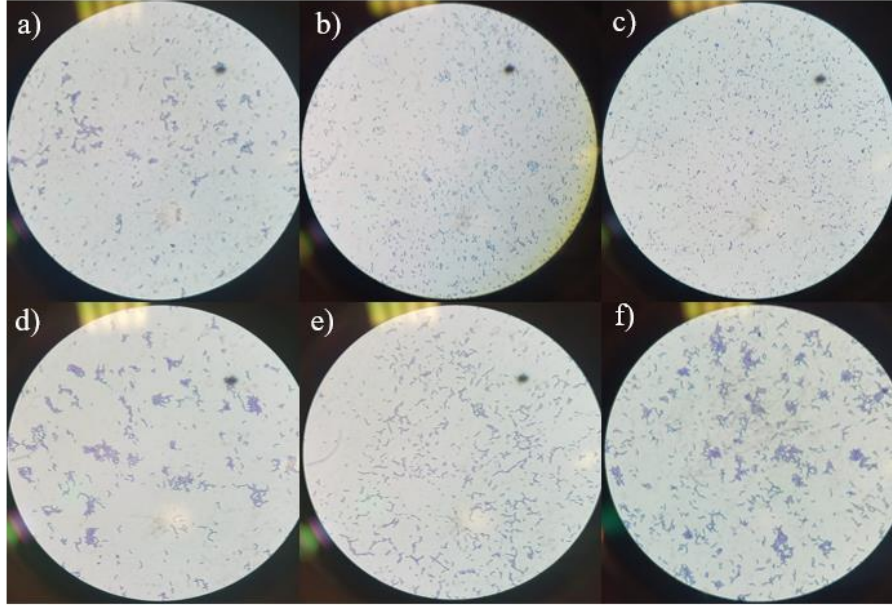
Şekil 3. 5 Tek koloni ekimi yapılan c2 kolonilerinin boyama sonucu petri görüntüleri

3.1.2 Tavuk bağırsağından izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal analizleri

Boyama işlemi gerçekleştirilen ve pozitif sonuç veren on bakteri kolonisinde boyamaların en iyi gözlemlendiği altı koloni seçilerek biyokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.1 Gram Boyama:

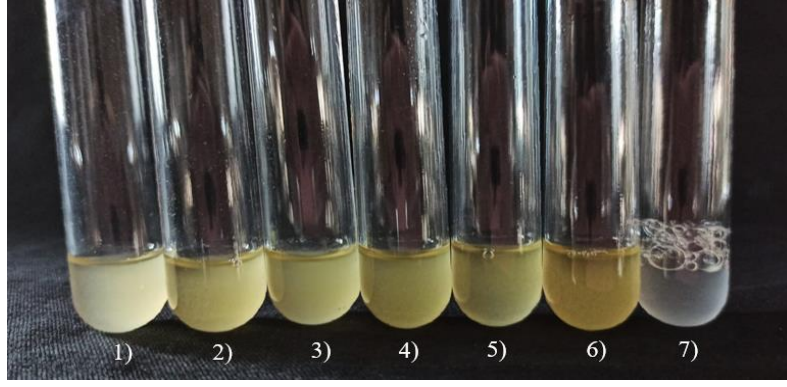
Bakterilerin morfolojik özelliklerinin tayin edilmesi için Gram boyama yapılmış ve sonrasında ışık mikroskobu ile bakterilerin morfolojik özellikleri tayin edilmiştir. Gram boyama sonucunda analiz edilen tüm bakteri suşlarının basil morfolojisine sahip ve Gram-pozitif oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 3. 6 Bakterilerin gram boyama sonucunda ışık mikroskobu (100x) görünüşleri; a) C1-4, b) C1-2, c) C1-7, d) C2-1, e) C2-4, f) C2-3

3.1.2.2 Katalaz testi:

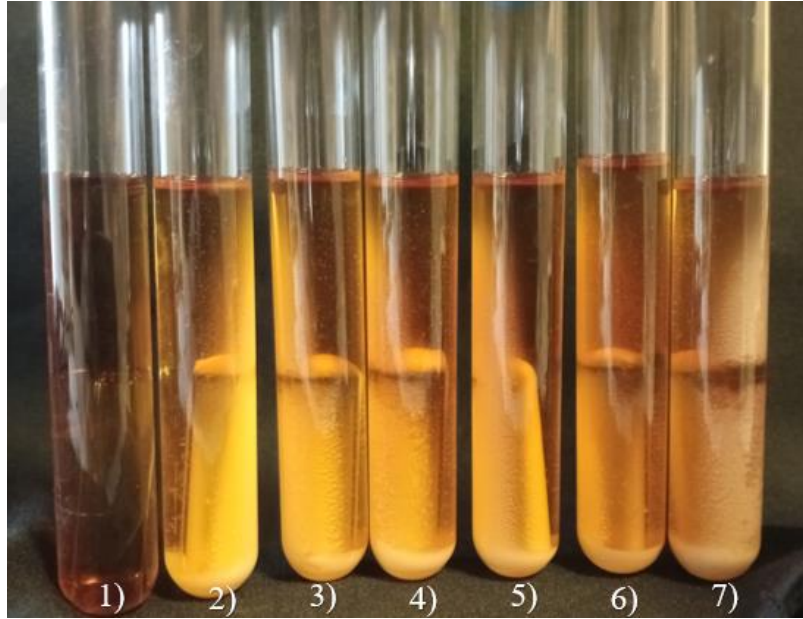
Test örneklerinin hiçbirinde H_2O_2 eklendikten sonra bir oksijen kabarcığı gözlemlenmemiştir. Laktik asit bakterileri katalaz negatif olduğu için beklenen sonuç elde edilmiştir [118]. *S. aureus* bakterisi katalaz pozitif olduğu için beklenildiği gibi gaz kabarcıkları gözlemlenmiştir.



Şekil 3. 7 Katalaz testi sonuçları 1) C1-4, 2) C1-2, 3) C1-7, 4) C2-1, 5) C2-4, 6) C2-3, 7) *S. aureus* (pozitif kontrol)

3.1.2.3 Glukozdan gaz oluşumu deneyi:

Glukozdan gaz oluşumu deneyi laktik asit bakterilerini heterofermentatif ve homofermentatif olarak ayırt edebilmek için gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde durham tüplerinde gaz kabarcıklarının oluşmaması izole edilen bakteri suşlarının homofermentatif laktik asit bakterisi özelliğine sahip olduğunu göstermiştir.

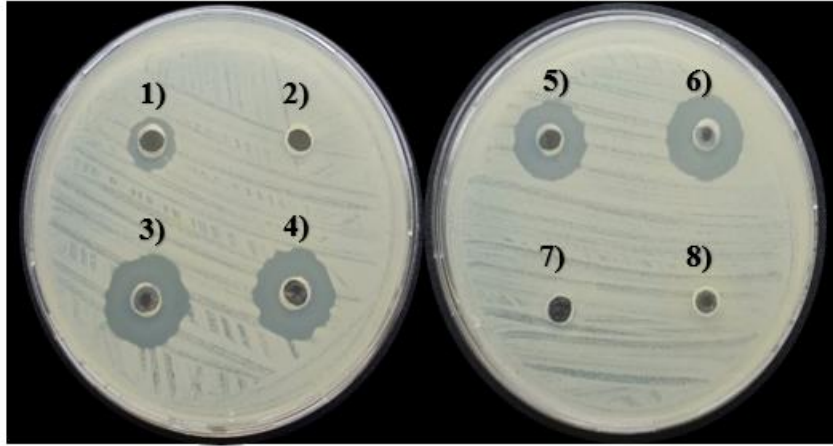


Şekil 3. 8 Glukozdan gaz oluşumu deneyi sonuçları; 1) MRS Broth (Negatif Kontrol), 2) C1-4, 3) C1-2, 4) C1-7, 5) C2-1, 6) C2-4, 7) C2-3

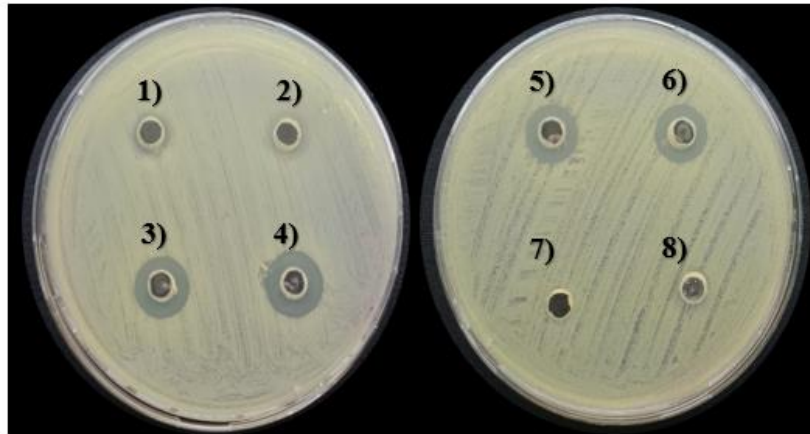
3.1.2.4 Bakterilerin antibakteriyel aktivite testleri

- **Agar Difüzyon Testi:**

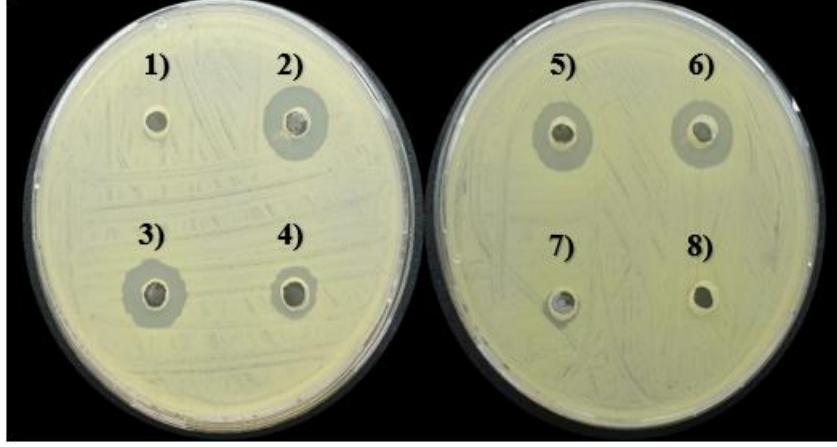
Morfolojik ve biyokimyasal analizleri gerçekleştirilen altı bakteri suşunun antimikrobiyal aktivitelerini analiz etmek için agar difüzyon ve agar spot testleri uygulanmıştır. Bu aşamada indikatör mikroorganizma olarak *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhimurium* kullanılmıştır.



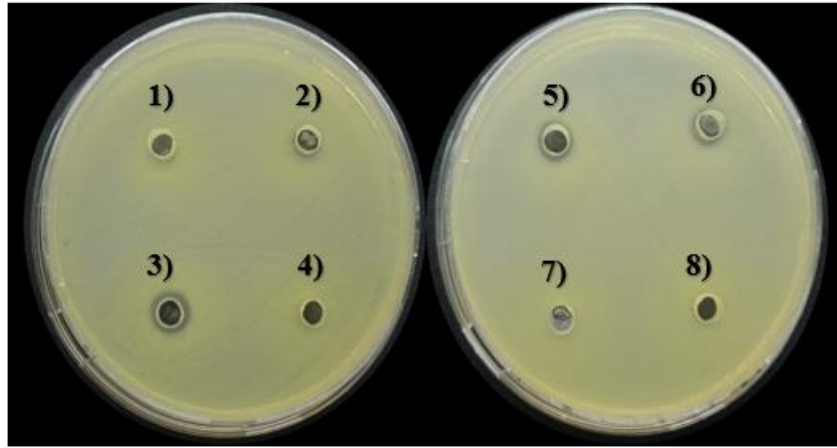
Şekil 3. 9 Bakteri örneklerinin *S. aureus* patojenine karşı antibakteriyel aktiviteleri 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (pozitif kontrol), 8) MRS Broth (Negatif kontrol)



Şekil 3. 10 Bakteri örneklerinin *E. coli* patojenine karşı antibakteriyel aktiviteleri 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (Pozitif kontrol), 8) MRS Broth (Negatif kontrol)



Şekil 3. 11 Bakteri örneklerinin *L. monocytogenes* patojenine karşı antibakteriyal aktiviteleri 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (Pozitif kontrol), 8) MRS Broth (Negatif Kontrol)



Şekil 3. 12 Bakteri örneklerinin *S. Typhimurium* patojenine karşı antibakteriyal aktiviteleri, 1) C1-2, 2) C1-7, 3) C2-3, 4) C1-4, 5) C2-4, 6) C2-1, 7) Biogaia (Pozitif kontrol, 8) MRS Broth (Negatif Kontrol)

Tablo 3. 1 İzole edilen bakteri suşlarının agar difüzyon testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)

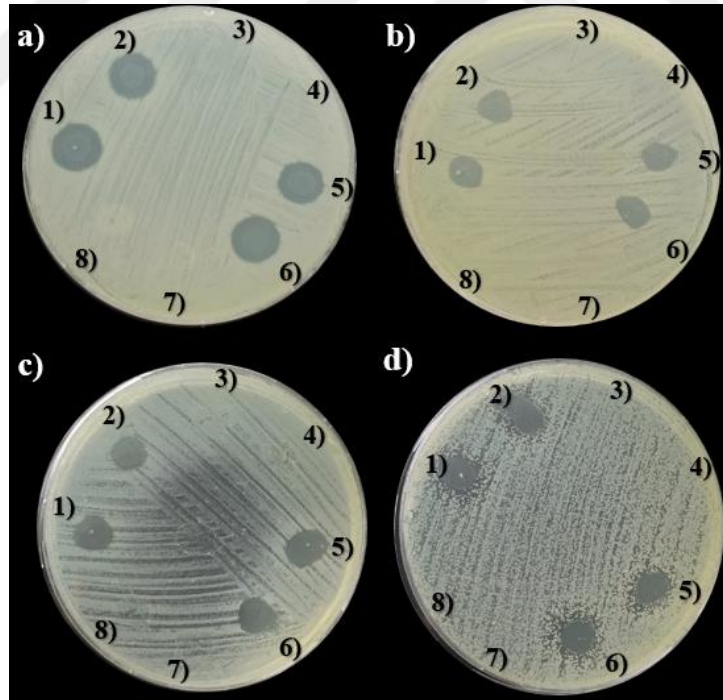
Test Bakteril eri	İnhibisyon Zon Çapları (mm)							
	1) C1-2	2) C1-7	3) C2-3	4) C1-4	5) C2-4	6) C2-1	7) Bioga ia	8) MRS Broth
<i>S. aureus</i>	9.0	-	18.0	18.0	16.0	16.0	-	-
<i>E. coli</i>	7.0	6.0	12.0	12.0	10.0	10.0	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	14.0	14.0	8.0	13.0	13.0	6.0	-
<i>S. Typhimurium</i>	6.0	6.0	8.0	-	7.0	7.0	-	-

Agar difüzyon deneyinde tavuk bağırsağından izole edilen bakteri suşlarının Gram-pozitif *L. monocytogenes* ve *S. aureus*, Gram-negatif *E. coli* ve *S. Typhimurium* patojenlerine karşı antibakteriyel etkinlikleri test edilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak probiyotik ilaç Biogaia'dan izole edilen bakteri suşları kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Deney sonucunda oluşan inhibisyon zonları Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Şekil 3.9'da gösterildiği gibi *S. aureus* patojeni üzerinde C1-7 bakterisi dışında diğer tüm suşların antibakteriyel etkinliği olduğu tespit edilmiş ve en yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olan bakteri suşlarının C2-3 (18.0 mm) ve C1-4 (18.0 mm) olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.10'da gösterildiği gibi, *E. coli* patojeni üzerinde tüm bakteri suşlarının antibakteriyel etkinlikleri olduğu tespit edilmiş ve en yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip bakteri suşlarının C2-3 (12.0 mm) ve C1-4 (12.0 mm) bakteri suşları olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda C1-2 (7.0 mm) ve C1-7 (6.0 mm) bakteri suşlarının antibakteriyel etkinliklerinin çok az olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 3.11’ de gösterildiği gibi, *L. monocytogenes* patojeni üzerinde C1-2 suşu dışında diğer tüm suşların antibakteriyal etkinliği olduğu tespit edilmiştir. En yüksek etki C1-7 (14.0 mm) ve C2-3 (14.0 mm) suşlarında gözlemlenmiştir. Aynı zamanda pozitif kontrol olarak kullanılan Biogaia ilgili patojen üzerinde çok az bir antibakteriyel etkinlik göstermiş (6.0 mm) ve Biogaia’nın antibakteriyal etkinlik gösterdiği tek patojen *L. monocytogenes* olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.12’ de gösterildiği gibi *S. Typhimurium* patojeni üzerinde C1-4 bakteri suşu dışında diğer tüm suşların çok az bir antibakteriyal etkinliği olduğu tayin edilmiştir. Deney sonucunda kullanılan patojen bakterilere karşı en yüksek antibakteriyal özellik gösteren bakteri suşları C2-3, C1-4, C2-4 ve C2-1 olduğu kanıtlanmıştır.

- **Agar Spot Testi:**

Aynı zamanda izole edilen altı bakteri örneğinin yine *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* patojenlerine karşı antibakteriyal aktiviteleri agar spot testiyle de tayin edilmiştir. Agar spot testi sonuçları Şekil 3.13’ de gösterilmiştir.



Şekil 3. 13 Bakteri örneklerinin a) *S. aureus*, b) *E. coli*, c) *S. Typhimurium*, d) *L. monocytogenes* indikatör mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel aktiviteleri

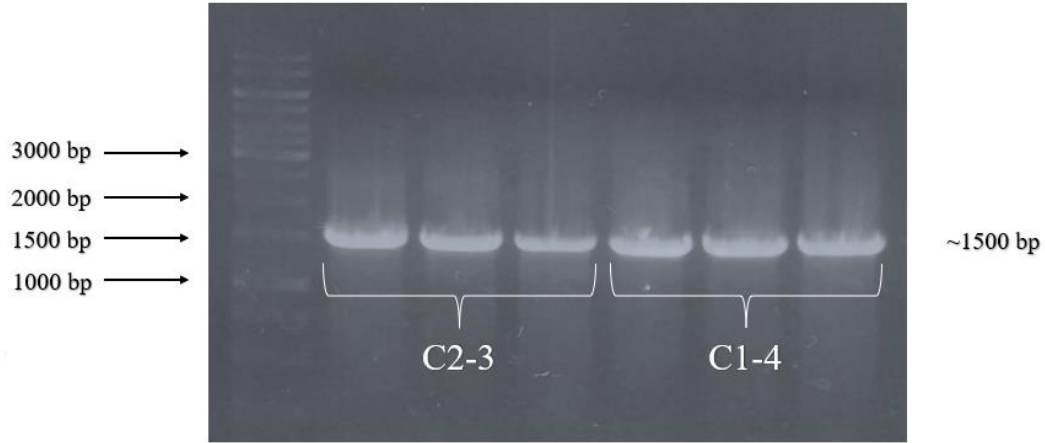
Tablo 3. 2 İzole edilen bakteri suşlarının agar spot testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)

Test Bakterileri	İnhibisyon zon çapları (mm)						
	1) C1-4	2) C2-3	3) C1-2	4) C1-7	5) C2-4	6) C2-1	7,8) MRS Broth
<i>S. aureus</i>	12.0	12.0	-	-	11.0	11.0	-
<i>E. coli</i>	9.0	9.0	-	-	8.0	8.0	-
<i>S. Typhimurium</i>	10.0	10.0	-	-	10.0	10.0	-
<i>L. monocytogenes</i>	12.0	11.0	-	-	10.0	11.0	-

Şekil 3.13’ de gösterildiği gibi, agar spot testi sonucunda C1-7 ve C1-2 olarak adlandırılan bakterilerin deneyde kullanılan hiçbir test bakterisi üzerinde antibakteriyel etkinliği gözlemlenmemiştir. Tablo 3.2’ de de gösterildiği gibi C2-1, C2-4, C1-4, C2-3 bakterilerinin deneyde kullanılan tüm test bakterilerine karşı benzer etkinlikler göstermiştir. Agar spot testinde en iyi antibakteriyel etkinlik *S. aureus* (12,0 mm) ve *L. monocytogenes* (12,0 mm) patojenlerine karşı gözlemlenmiştir. En yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip bakteri suşları ise C1-4 ve C2-3 olarak adlandırılan bakteriler olarak belirlenmiştir. Şekil 3.11’ de gösterildiği gibi agar difüzyon testinde C1-7 bakterisinin *L. monocytogenes* bakterisi üzerinde iyi bir antibakteriyel etkinliği varken agar spotta bu etkinlik gözlemlenmemiştir. Sonuçlar incelendiğinde hem agar difüzyon hem agar spot testinde kullanılan *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* patojenlerine karşı en etkin olan bakteri suşlarının C2-3, C1-4, C2-4 ve C2-1 saf kültürlerinin olduğu gözlenmiş olup en iyi etkinliği olan C2-3 ve C1-4 suşları seçilerek moleküler tanımlamaları için bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

3.1.3 C1-4 ve C2-3 bakterisinin agaroz jel elektroforezi ve sekanslama

Agar difüzyon ve agar spot testlerinde en çok etkinlik gösteren C2-3 ve C1-4 örnekleri seçilmiş ve 16S rRNA PZR reaksiyonu gerçekleştirilerek agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 14 16S rRNA PZR sonucunda agaroz jel görüntüsü

16S rRNA PZR ve hizmet alımı ile dizileme sonucunda tavuk bağırsağından izole edilen ve morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları gerçekleştirilen C1-4 ve C2-3 olarak adlandırılan bakteri suşlarının *L. salivarius* cinsi bakteri olduğu kanıtlanmıştır. Dizileme sonuçları Şekil 3.15 ve Şekil 3.16’da gösterildiği gibidir.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Ligilactobacillus salivarius strain thankcomEL57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	320	320	94%	6e-83	99.44%	1491	MZ045748.1
☒ Ligilactobacillus salivarius strain NC10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	318	318	94%	2e-82	99.43%	1433	MZ846170.1
☒ Lactobacillus salivarius strain TCMM17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	315	315	93%	3e-81	99.42%	1464	KP866924.1
☒ Lactobacillus salivarius strain TCMM17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	315	315	93%	3e-81	99.42%	1462	KP255977.1
☒ Lactobacillus salivarius strain DSPV003P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	311	311	91%	3e-80	99.42%	1433	KU295172.1
☒ Lactobacillus salivarius strain DSPV007P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	309	309	91%	1e-79	99.41%	1425	KU295176.1
☒ Ligilactobacillus salivarius strain LS-1356 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	309	309	91%	1e-79	99.41%	1429	MW709869.1
☒ Ligilactobacillus salivarius strain LS-1309 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	309	309	91%	1e-79	99.41%	1425	MW709856.1
☒ Lactobacillus salivarius strain DSPV 027SA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	309	309	91%	1e-79	99.41%	1429	JQ322208.1
☒ Lactobacillus sp. YANG-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus sp. YANG-11	326	326	97%	1e-84	98.91%	1468	KU163336.1
☒ Lactobacillus salivarius strain RG-IF2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	316	316	94%	7e-82	98.88%	1157	MF989236.1
☒ Lactobacillus salivarius strain G 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	315	315	94%	3e-81	98.87%	1469	MN448316.1
☒ Lactobacillus sp. strain UVAS RY9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus sp.	315	315	94%	3e-81	98.87%	1004	MG938653.1
☒ Lactobacillus salivarius strain DSPV006P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	315	315	94%	3e-81	98.87%	1439	KU295175.1

Şekil 3. 15 C1-4 suşunun 16S Sanger Dizileme sonuçları

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Ligilactobacillus salivarius strain thankcomel.S7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	924	924	98%	0.0	99.80%	1491	MZ045748.1
✓	Ligilactobacillus salivarius strain NC10.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	922	922	97%	0.0	99.80%	1433	MZ846170.1
✓	Lactobacillus salivarius strain DSPV003P.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	915	915	97%	0.0	99.80%	1433	KU295172.1
✓	Lactobacillus salivarius strain DSPV007P.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	913	913	96%	0.0	99.80%	1425	KU295176.1
✓	Ligilactobacillus salivarius strain LS-1356.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	913	913	96%	0.0	99.80%	1429	MW709889.1
✓	Ligilactobacillus salivarius strain LS-1309.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	913	913	96%	0.0	99.80%	1425	MW709856.1
✓	Lactobacillus salivarius strain DSPV.027SA.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	913	913	96%	0.0	99.80%	1429	JQ322208.1
✓	Lactobacillus sp. YANG-11.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus sp. YANG-11	926	926	98%	0.0	99.61%	1468	KU163336.1
✓	Lactobacillus salivarius strain RG-IF2.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	920	920	98%	0.0	99.60%	1157	MF989236.1
✓	Lactobacillus sp. strain UVAS.RY9.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus sp.	918	918	98%	0.0	99.60%	1004	MG938653.1
✓	Lactobacillus salivarius strain DSPV006P.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	918	918	98%	0.0	99.60%	1439	KU295175.1
✓	Lactobacillus salivarius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain LBS-10	Ligilactobacillus salivarius	918	918	98%	0.0	99.60%	739	AB714323.1
✓	Lactobacillus sp. strain UVAS.RY6.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillus sp.	918	918	98%	0.0	99.60%	967	MG938650.1
✓	Lactobacillus salivarius gene for 16S rRNA, partial sequence, strain LBS-21	Ligilactobacillus salivarius	918	918	98%	0.0	99.60%	763	AB714319.1
✓	Lactobacillus salivarius strain DSPV.340T.16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus salivarius	918	918	98%	0.0	99.60%	1458	FJ751785.1

Şekil 3. 16 C2-3 suşunun 16S Sanger Dizileme sonuçları

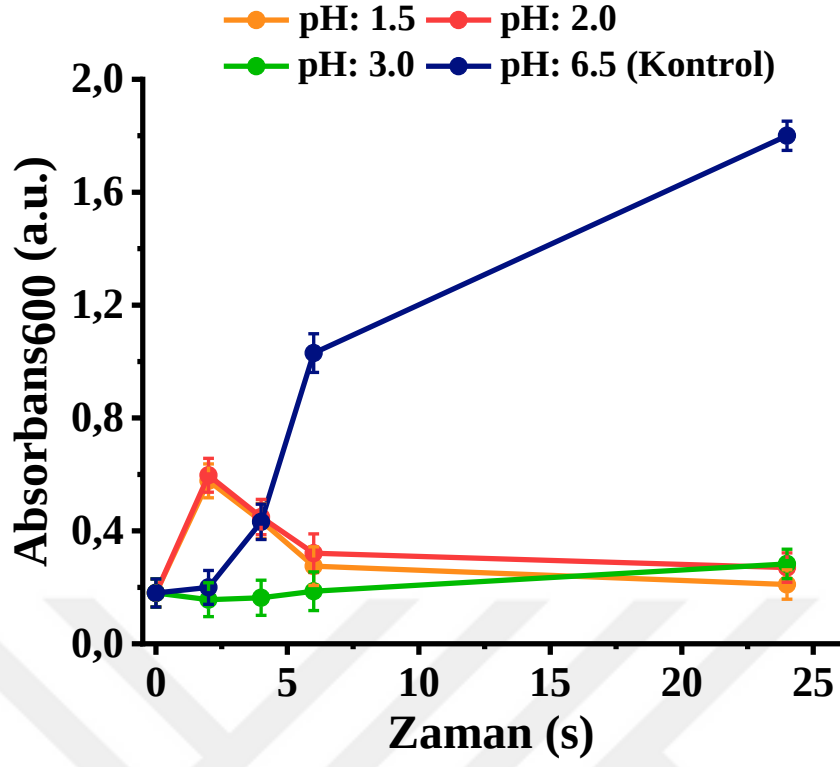
3.1.4 *Lactobacillus salivarius* suşlarının probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi

Tavuk bağırsağından izole edilen ve morfolojik, biyokimyasal ve moleküler analizleri gerçekleştirilen *Lactobacillus salivarius* suşlarının probiyotik özelliklerinin analizi için farklı pH'larda, farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı sıcaklıklarda büyüme özelliklerinin analizi için deneyler gerçekleştirilmiştir.

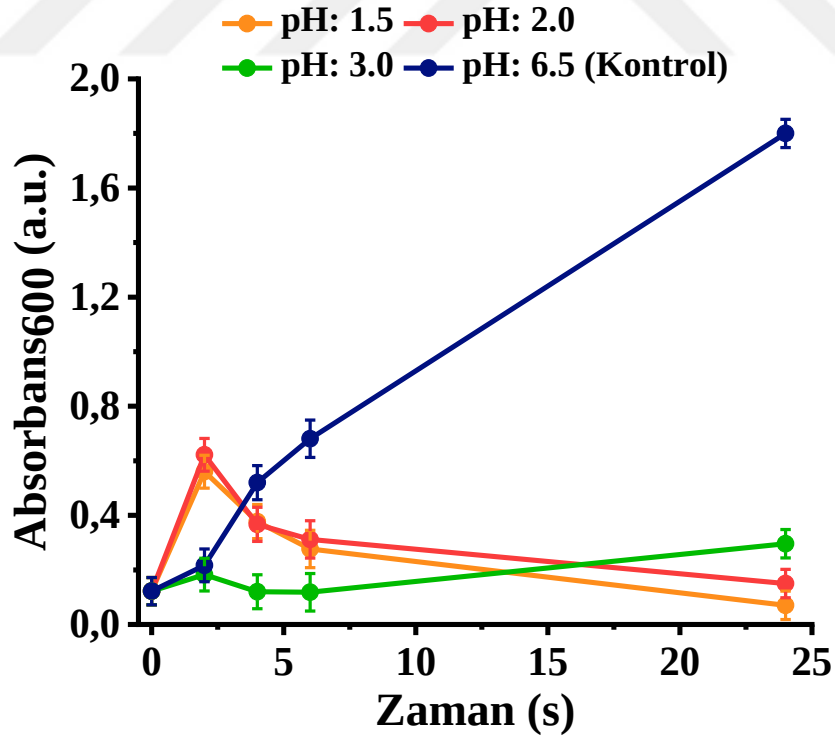
3.1.4.1 Farklı pH değerlerinde büyüme deneyleri

Bir bakteri suşunun probiyotik olarak kabul edilebilmesi için düşük pH koşullarına dayanıklı olabilmesi gerekmektedir. Ağızla başlayan gastrointestinal sistemin her bir bölgesinin farklı pH değerlerine sahip olduğu bilinmektedir (ağız pH:5-7, mide pH:1-3, kalın bağırsak pH: 5-7 ve ince bağırsak pH: 5-7) [93]. Besinlerin midede kalma süresi yaklaşık olarak üç saat olduğu için bu süre sonunda bakteri canlılığının devam etmesi probiyotik bakteri suşları için önemlidir. Probiyotik mikroorganizmaların midede bulunan düşük pH ve enzimlerden kurtularak bağırsaklara canlı bir şekilde varmaları ve yararlı işlevlerini yerine getirmek için bağırsaklara iyi bir şekilde kolonize olmaları gerekmektedir [114].

Yapılan çalışmada farklı pH'larda hazırlanan MRS sıvı besiyerinde bakterilerin gelişimini tayin edebilmek için inkübasyon öncesinde örneklerin spektrofotometrede 600 nm'de ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 2, 4, 6 ve 24. saatlerde örnekler alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. *L. salivarius* suşlarının pH:1.5, 2, 3 ve 6.5'te gelişimi Şekil 3.17 ve Şekil 3.18'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. 17 *L. salivarius* suş 1'in farklı pH'larda gelişim grafiği



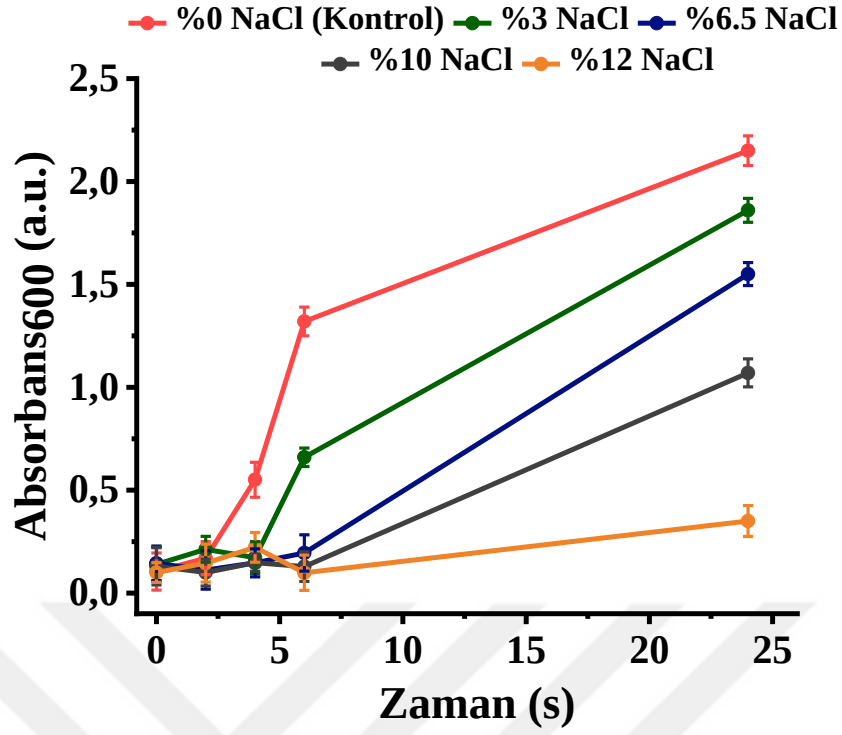
Şekil 3. 18 *L. salivarius* suş 2'nin farklı pH'larda gelişim grafiği

Şekil 3.17 ve Şekil 3.18 incelendiğinde *L. salivarius* suş 1 ve suş 2'nin farklı pH değerlerinde gelişimlerinin benzer olduğu görülmektedir. pH: 1.5 değeri için 2. saate en iyi gelişim gözlemlenirken 4 ve 6. saatlerde gelişimin azaldığı ancak devam ettiği, suş 1 için 24. saatin sonunda bile canlılığın hala devam ettiği ancak 24. saatin sonunda suş 2'de canlılığın neredeyse hiç olmadığı gözlemlenmiştir. Her iki bakteri suşunda da pH: 2.0'de gözlemlenen gelişim pH: 1.5' da gözlemlenen gelişim ile aynıdır. Suş 2'nin pH: 2.0'de 24. saatteki canlılığı pH: 1.5'te 24. saatte gözlemlenen canlıktan daha fazladır. pH: 3.0 değerinde her iki suşunda gelişimi 2, 4 ve 6. saatlerde oldukça yavaş ve stabil bir şekilde devam etmiş 24. saatte gelişimin biraz arttığı gözlemlenmiştir. Suş 2'de pH: 3.0'de 24. saat sonunda gözlemlenen gelişim suş 1 ile kıyaslandığı zaman daha fazladır. pH: 6.5 değerine sahip besiyeri kontrol olarak kullanılmış ve beklenildiği gibi bakterilerin gelişimi için optimum pH değeri olmasından dolayı her iki bakteri suşu içinde eksponansiyel bir gelişim gözlemlenmiştir.

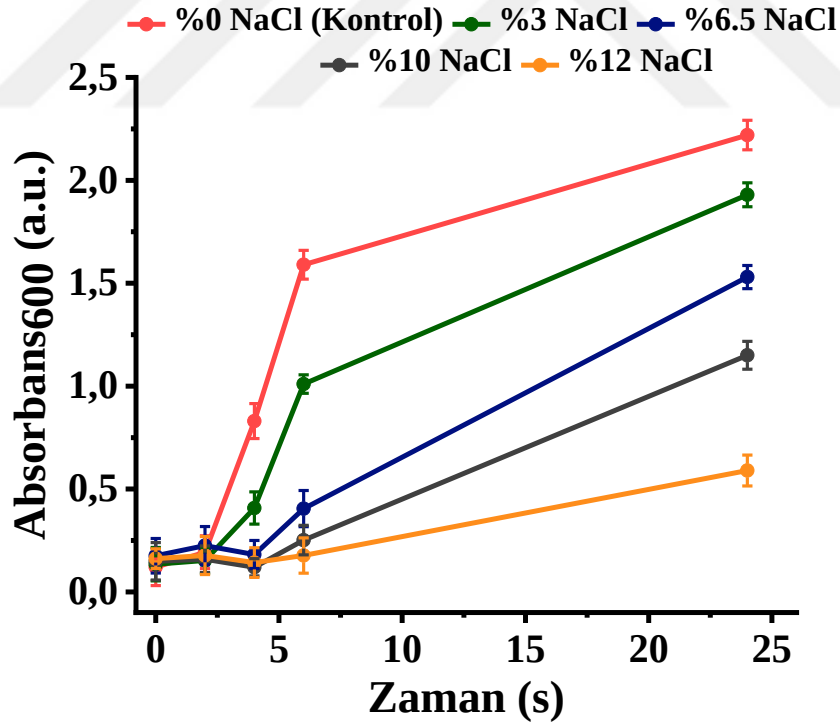
3.1.4.2 Farklı tuz konsantrasyonlarında bakterilerin büyütülmesi

Bir bakteri suşunun probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için bakterilerin gastrointestinal sistemdeki yüksek tuz konsantrasyonlarının neden olduğu ozmotik strese karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Farklı tuz konsantrasyonlarına karşı tolerans; bakterilerin canlılığını, metabolik aktivitelerini ve bağırsak epiteline yapışma yeteneklerini korumalarına yardımcı olur. Aynı zamanda yüksek tuz konsantrasyonlarına tolerans probiyotik yiyecek ve içeceklerin üretiminde önemli olabilir [113], [119].

Yapılan çalışmada farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan MRS sıvı besiyerinde bakterilerin gelişimini tayin edebilmek için inkübasyon öncesinde örneklerin spektrofotometrede 600 nm'de ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 2, 4, 6 ve 24. saatlerde aynı şekilde örnekler alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. *L. salivarius* suşlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. 19 *L. salivarius* suş 1'in farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim grafiği

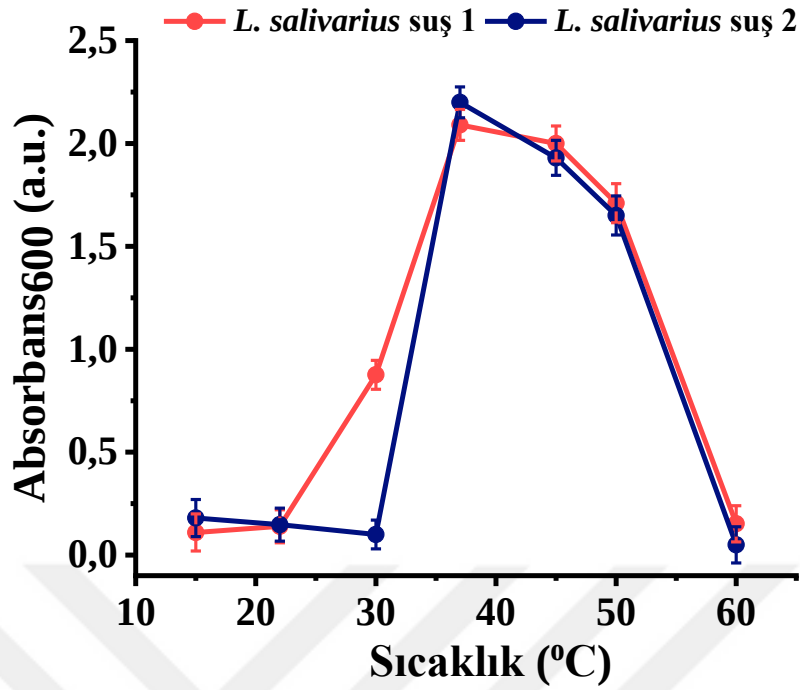


Şekil 3. 20 *L. salivarius* suş 2'nin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim grafiği

Şekil 3.19 ve Şekil 3.20 incelendiğinde *L. salivarius* suşlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi neredeyse aynıdır. %0 NaCl içeren kontrol grubundaki gelişim ile diğer tuz konsantrasyonlarındaki gelişim karşılaştırıldığı zaman suşların en iyi gelişim gösterdiği tuz konsantrasyonu %3 NaCl içeren besiyerinde gözlemlenmiştir ve bu gelişim zamana bağlı olarak artmıştır. Tuz konsantrasyonu arttıkça suşlardaki gelişim kontrole göre azalmıştır fakat her tuz konsantrasyonunda zamana bağlı olarak bakteri gelişiminde bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Suşların en düşük gelişim gösterdiği %10 ve %12 NaCl içeren besiyerlerinde bile gelişim 24. saatin sonunda bile devam etmiştir. Grafiklerde de gösterildiği gibi *L. salivarius* suşlarının yüksek tuz konsantrasyonlarında bile 24. saatin sonunda canlılığın devam ettiği gözlemlenmiştir

3.1.4.3 Farklı sıcaklıklarda bakterilerin büyütülmesi

Probiyotik bir bakterinin farklı sıcaklık değişimlerinde hayatta kalabilmesi probiyotik etkinliği açısından önemlidir. Probiyotik bakteriler çeşitli yiyecek ve içecek ürünlerinde kullanılabilir. Bu gıdalar hazırlanırken pastörizasyon, sterilizasyon veya fırınlama gibi çeşitli ısı gerektiren işlemlerden geçebilir. Yüksek sıcaklıklara toleranslı olan probiyotik bakteriler bu işlemler sonucunda canlı kalabilir. Aynı zamanda gastrointestinal sistemdeki farklı sıcaklık değişimlerine karşı probiyotik bakterilerin hayatta kalabilmesi için bakterilerin toleranslı olması gerekmektedir [120]. *L. salivarius* suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişimleri Şekil 3.21’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. 21 *L. salivarius* suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişim grafikleri

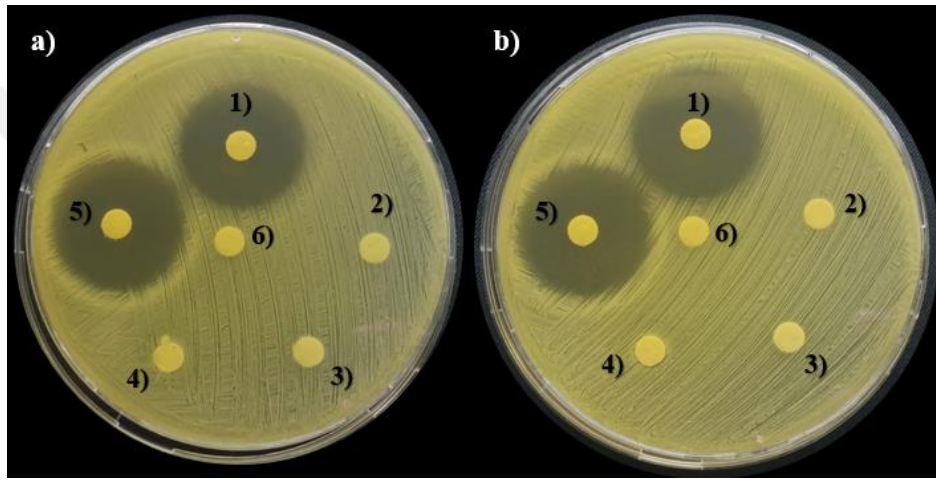
Farklı sıcaklık değerlerinde inkübe edilen *L. salivarius* suşlarının en iyi gelişim sıcaklığı 37°C'e olarak belirlenmiştir. Bakteriler 22°C, 30°C, 37°C (kontrol), 45°C, 50°C'de gelişim gösterirken 15°C ve 60°C'de canlılık yok denecek kadar azdır. *L. salivarius* suşları 50°C'de dahi canlılığını korumuştur.

3.1.5 *Lactobacillus salivarius* suşlarının antibiyotik direnç testi

Gıda, yem ve probiyotik uygulamalarda kullanılan probiyotik laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnci, bu direncin patojenik bakterilere aktarılabilmesi nedeniyle büyük bir tehlike olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple probiyotik laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç genlerini barındırmaması talep edilir [121]. *L. salivarius* suşlarının farklı antibiyotiklere karşı MIC değerleri Tablo 3.3' de ve disk difüzyon sonuçları Şekil 3.22'de gösterilmiş olup suşlar arasında farklılık tespit edilmemiştir. *L. salivarius* suşlarının ampisilin (<2 µg/mL), tetrasiklin (<2 µg/mL) antibiyotiklerine karşı duyarlı; kanamisin (>64 µg/mL), vankomisin (32 µg/mL), apramisin (64 µg/mL) antibiyotiklerine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3. 3 *L. salivarius* suşlarının farklı antibiyotiklerde MIC değerleri

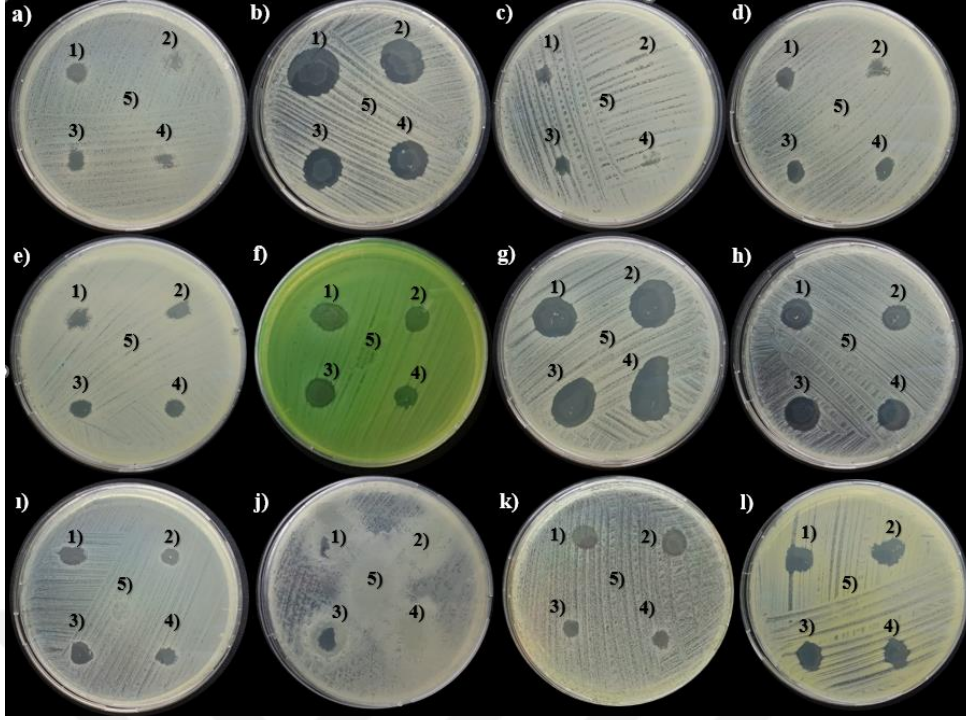
Test Örnekleri	MIC (µg/ml)	
	C1-4	C2-3
Ampisilin	<2	<2
Kanamisin	>64	>64
Tetrasiklin	<2	<2
Vankomisin	32	32
Apramisin	64	64



Şekil 3. 22 *L. salivarius* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi a) *L. salivarius* suş 1, b) *L. salivarius* suş 2, 1) ampisilin, 2) kanamisin, 3) vankomisin, 4) apramisin, 5) tetrasiklin, 6) MRS Broth

3.1.6 *Lactobacillus salivarius* suşlarının antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi

L. salivarius suşlarının çeşitli patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri agar spot testi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada *S. Typhimurium*, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae*, kolistin dirençli *K. pneumoniae*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *E. coli* ve vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) patojenleri kullanılmıştır. *L. salivarius* suşlarının farklı patojenlere karşı agar spot testi sonuçları Şekil 3.23’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. 23 *L. salivarius* suşlarının farklı patojenlere karşı antibakteriyel etkinlikleri 1-2) *L. salivarius* suş 1, 3-4) *L. salivarius* suş 2, 5) MRS Broth (negatif kontrol)

Tablo 3. 4 *L. salivarius* suşlarının agar spot testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)

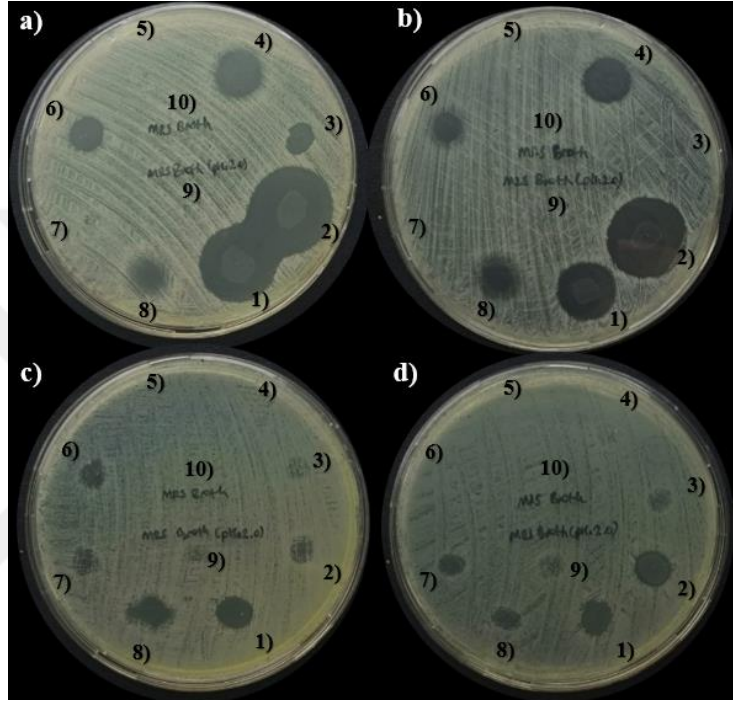
Test Bakterileri		İnhibisyon Zon Çapları (mm)	
		<i>L. salivarius</i> suş 1	<i>L. salivarius</i> suş 2
a	<i>Salmonella Typhimurium</i>	8.0	6.0
b	metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	20.0	15.0
c	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.0	5.0
d	kolistin dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.0	5.0
e	<i>Pseudomonas syringae</i>	10.0	9.0
f	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.0	10.0
g	<i>Listeria monocytogenes</i>	19.0	18.0
h	<i>Staphylococcus aureus</i>	12.0	14.0
ı	<i>Enterobacter aerogenes</i>	9.0	8.0
j	<i>Bacillus subtilis</i>	8.0	-
k	<i>Escherichia coli</i>	8.0	6.0
l	vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (VRSA)	13.0	9.0

Tablo 3.4’de gösterildiği gibi, *L. salivarius* suş 1 bakterisinin antibakteriyel aktivitesinin en yüksek olduğu patojen MRSA (20.0 mm) olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda suş 1’in *S. aureus* (12.00 mm), *L. monocytogenes* (19.0 mm) ve VRSA (13.0 mm) üzerinde de antibakteriyel etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre *L. salivarius* suş 1’in hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakteriler üzerinde özellikle *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterileri üzerinde yüksek bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. *L. salivarius* suş 2’nin antibakteriyel aktivitesinin en yüksek olduğu patojen ise *L. monocytogenes* (18,0 mm) olarak tespit edilmiştir. Suş 2’nin de suş 1’de olduğu gibi VRSA, MRSA ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etkinliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Tablo 3.4’ de de gösterildiği gibi her iki bakteri suşunun da antibakteriyel aktiviteleri oldukça benzerdir. Ancak Şekil 3.23’ deki petri görsellerinde de gösterildiği gibi, *L. salivarius* suş 1 bakterisinin agar spot testinde kullanılan patojenlere karşı antibakteriyel aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, her iki bakteri suşunun da hem Gram- pozitif hem Gram-negatif patojen bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği ve bu etkinliğin oldukça yüksek olduğu kanıtlanmıştır.

3.1.7 *Lactobacillus salivarius* suşlarının bakteriyosin aktivitesinin değerlendirilmesi

L. salivarius suşlarının bakteriyosin üretim yeteneklerini tayin etmek için agar spot testi uygulanmıştır. Örnekler Bölüm 2.2.11’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *S. aureus* patojen bakterileri için agar spot testi gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterileri organik asitler (laktik, sitrik, asetik, fumarik ve malik asit), hidrojen peroksit, diasetil, etanol, reuterin, asetaldehit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri inhibitörler gibi çeşitli antimikrobiyal metabolitler üreterek bu bileşenleri geliştirdiği kültür ortamına salgılar ve bu sayede ortamın pH’ını düşürerek patojenlerin gelişimini engellerler. Bakterilerin santrifüjleme ve filtreleme yoluyla kültür ortamından uzaklaştırılması ile ortaya çıkan hücresiz kültür ortamının (HKO) antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyeli mevcuttur [122]. Bu çalışmada, agar spot yönteminde hücresiz kültür ortamının pH’ının çok düşük olması patojen bakterilere karşı oluşabilecek inhibisyon zonlarının düşük pH kaynaklı olabileceğini düşündürebileceğinden, bakteriler santrifüjleme ile kültür ortamından

uzaklaştırılmış ve hücresiz kültür ortamının pH'ı nötr hale getirilerek daha sonra steril filtrelerden (0.45 µM) geçirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler agar spot testinde patojen bakteriler üzerinde hala inhibisyon etki gösteriyorsa bakterilerin antibakteriyel aktivitelerinin sadece düşük pH kaynaklı olmadığı hücresiz kültür ortamında bakteriyosin gibi antimikrobiyal peptitlerin de olabileceği düşünülmüştür. Agar spot testi sonuçları Şekil 3.24 ve Tablo 3.5’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3. 24 *L. salivarius* suşlarının bakteriyosin üretme yeteneklerinin agar spot testi ile tayin edilmesi; a) *L. monocytogenes*, b) *S. aureus*, c) *E. coli*, d) *S. Typhimurium*

Tablo 3. 5 *L. salivarius* suşlarının ve hücresiz kültür ortamlarının agar spot testi sonucunda inhibisyon zon çapları (mm)

Örnek:		Test Bakterileri			
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Örnek 1	Suş 2	20.0	7.0	8.0	15.0
Örnek 2	Suş 1	22.0	9.0	6.0	20.0
Örnek 3	Suş 2 HKO	7.0	6.0	5.0	-
Örnek 4	Suş 1 HKO	12.0	-	-	12.0
Örnek 5	Suş 2 HKO (pH: 6.5)	-	-	-	-
Örnek 6	Suş 1 HKO (pH: 6.5)	10.0	-	7.0	7.5
Örnek 7	Suş 2 HKO filtre	-	5.0	6.0	-
Örnek 8	Suş 1 HKO filtre	11.0	7.0	10.0	12.0
Örnek 9	MRS Broth (pH: 2.0)	-	5.0	3.0	-
Örnek 10	MRS Broth	-	-	-	-

Yapılan çalışmada *L. salivarius* suşları patojen bakterilerin bulunduğu petriler üzerine direkt olarak, hücresiz kültür ortamları (HKO) direkt olarak, hücresiz kültür ortamlarının pH'ı 6.5 olarak nötrlenerek, hücresiz kültür ortamları pH'ı nötrlendikten sonra 0,45 µM filtreden geçirilerek ayrı ayrı agar üzerine eklenmiştir. Aynı zamanda negatif kontrol olarak MRS Broth ve patojen bakteriler üzerinde düşük pH etkisini gözlemlemek amacıyla pH'ı 2.0 olarak ayarlanmış MRS Broth kullanılmıştır.

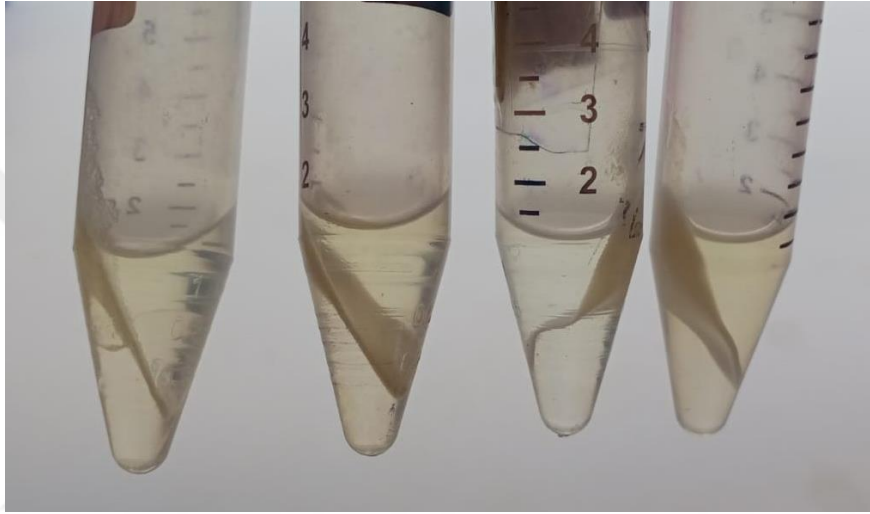
Şekil 3.24' de gösterildiği gibi *L. salivarius* suş 1'in en yüksek antibakteriyel etkinlik gösterdiği patojen *L. monocytogenes* (22,0 mm) olarak tespit edilmiştir. Suş 1'in hücresiz kültür ortamı *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerinde yüksek bir antibakteriyel etkinlik gösterirken (12,0 mm) *E. coli* ve *S. Typhimurium* üzerinde bir etkinlik gözlemlenmemiştir. Suş 1'in hücresiz kültür ortamının pH'ı nötrlendikten sonra antibakteriyel etkinliği devam etmiş ve en yüksek etkinlik yine *L. monocytogenes* üzerinde gözlemlenmiştir (10,0 mm). Hücresiz kültür ortamının pH'ı nötrlendikten ve 0,45 µM filtreden geçirildikten sonra antibakteriyel etkinlik

yükselmiş ve kullanılan her patojen bakteri üzerinde inhibisyon etki göstermiştir. Bu sonuçlara göre *L. salivarius* suş 1 bakterisinin en etkin olduğu patojen bakteri *L. monocytogenes* olarak belirlenmiş ve hücresiz kültür ortamının pH'ı değiştirilip filtreden geçirilse de etkinliğin devam ettiği kanıtlanmıştır.

L. salivarius suş 2'nin Şekil 3.24' de gösterildiği gibi en yüksek antibakteriyel etkinlik gösterdiği patojen *L. monocytogenes* (20,0 mm) olduğu gözlemlenmiştir. Suş 2'nin hücresiz kültür ortamında antibakteriyel etkinlik oldukça azalmış en yüksek etkinlik yine *L. monocytogenes* (7,0 mm) üzerinde gözlemlenmiştir. Suş 2'nin hücresiz kültür ortamının pH'ı nötrlendikten sonra hiçbir patojen üzerinde antibakteriyel etkinlik gözlemlenmemiş, pH'ı nötrlenen ve filtreden geçirilen hücresiz kültür ortamında *S. Typhimurium* ve *E. coli* üzerinde düşük de olsa bir antibakteriyel etkinlik gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre *L. salivarius* suş 2 bakterisinin en etkin olduğu patojen suş 1'de olduğu gibi *L. monocytogenes* olarak belirlenmiştir. pH'ı 2.0 olarak ayarlanan MRS Broth sıvı besiyeri sadece *S. Typhimurium* ve *E. coli* üzerinde düşük bir etki göstermiştir. Bu sayede oluşan inhibisyon zonlarının düşük pH kaynaklı olamayacağı bu etkinliğin sebebinin bakterinin ürettiği antibakteriyel bileşiklerden kaynaklı olabileceği kanıtlanmıştır. Tablo 11'de de gösterildiği gibi *L. salivarius* suş 1 ve suş 2 aynı türe ait olmasına rağmen suşların çeşitli patojenlere karşı gösterdikleri antibakteriyel etkinlikler farklıdır. Özellikle Örnek 7 ve Örnek 8'de gözlemlenen farklılık *L. salivarius* suş 1 bakterisinin bakteriyosin aktivitesinin daha yüksek olabileceğini düşündürmüştür.

3.1.8 Bakteriyosinlerin saflaştırılması

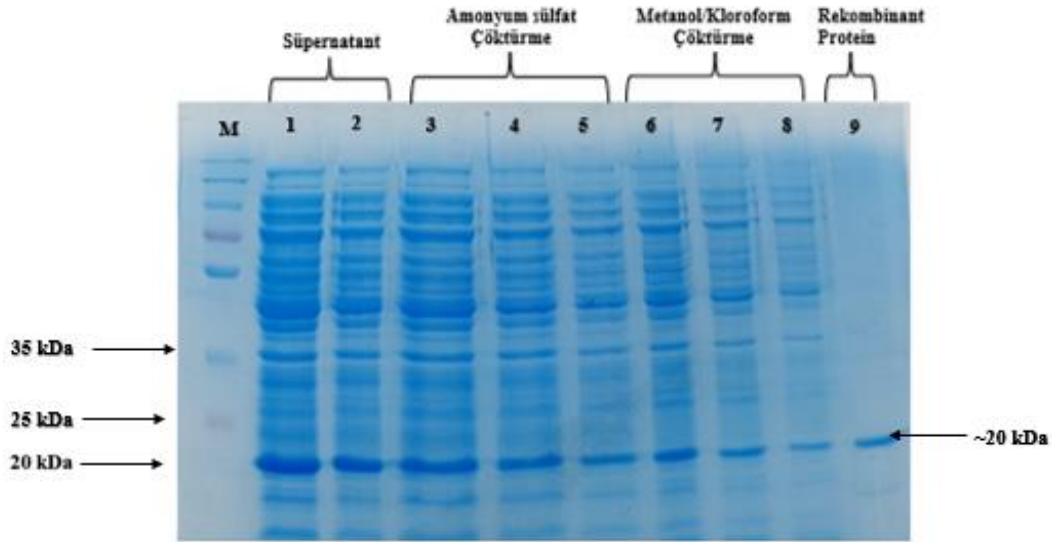
Lactobacillus salivarius suşlarından bakteriyosin izolasyonu gerçekleştirmeden önce protokolün optimize edilmesi amacıyla kullanılan kontrol rekombinant proteini ile %16 ve %20'lik SDS-PAGE gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre protokol değerlendirilmiştir. Amonyum sülfat çöktürme sonrasında örnekler eklenen metanol/kloroform çözeltisi proteinlerin sulu fazla bir katman oluşturmasını sağlamıştır. Oluşan protein katmanı Şekil 3.25' de gösterildiği gibidir.



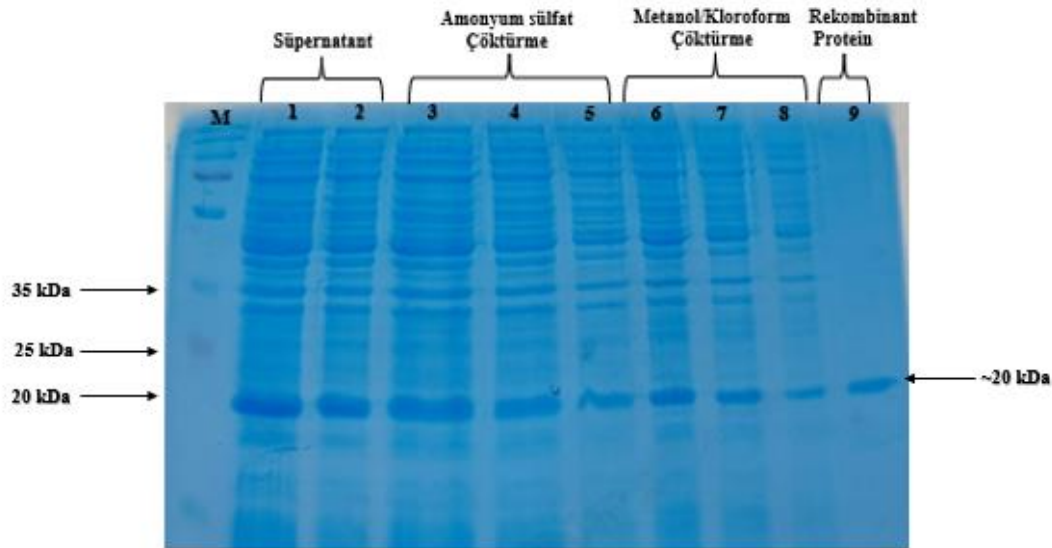
Şekil 3. 25 Proteinlerin amonyum sülfat çöktürme ve metanol/kloroform eklenmesi sonucunda sulu çözeltide oluşturduğu protein tabakası

Oluşan protein katmanı Bölüm 2.2.12' de belirtilen işlemlerden geçtikten sonra hazırlanan %16 ve %20'lik SDS jellere yüklenmiş ve elektroforezde yürütülerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Örnekler SDS jellere belirli oranlarda seyreltilerek yüklenmiştir. Jeldeki son kuyucuğa protein izolasyonu yapılmış rekombinant protein direkt olarak yüklenmiştir. %16'lık SDS jel görüntüsü Şekil 3.26, %20'lik SDS jel görüntüsü Şekil 3.27'de gösterildiği gibidir.



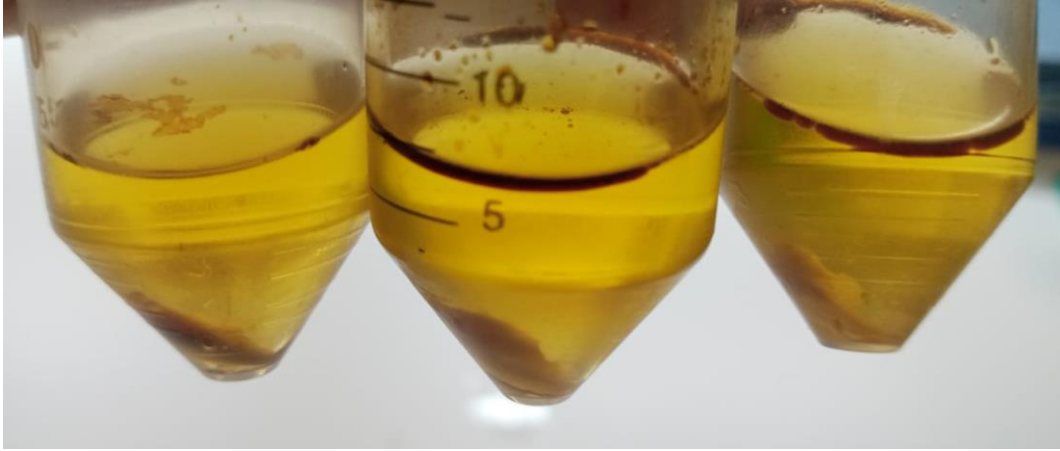
Şekil 3. 26 Rekombinant proteinin %16 SDS jel görüntüsü



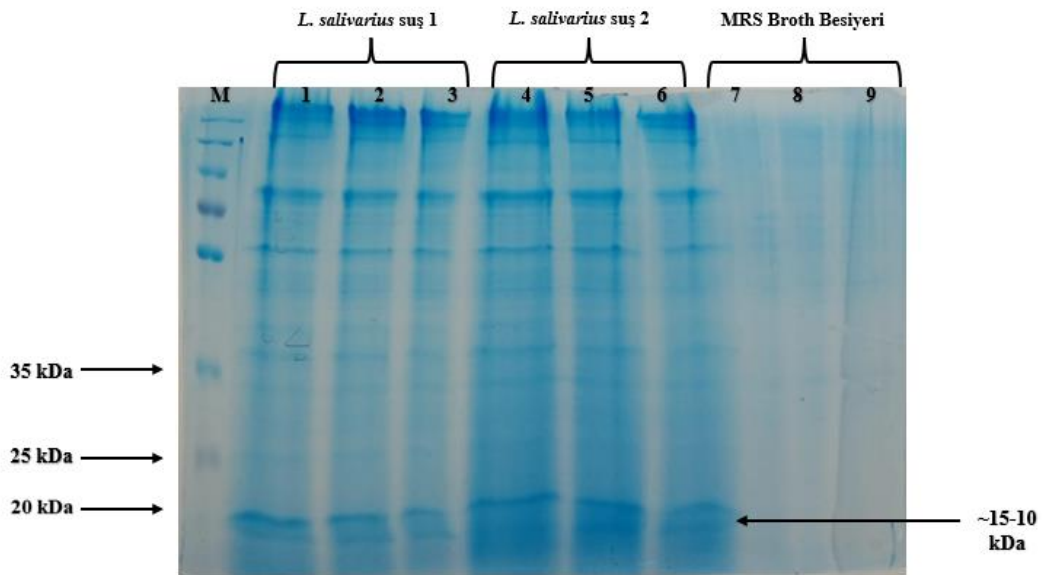
Şekil 3. 27 Rekombinant proteinin %20 SDS jel görüntüsü

SDS sonucuna göre rekombinant protein beklenildiği gibi 20 kDa' da bantlar oluşturmuştur. Direkt hücresiz kültür ortamı yüklenen bantlar ve amonyum sülfat çöktürme yapılarak yüklenen bantlar ile kıyaslandığı zaman metanol/kloroform çözeltisi kullanılarak yüklenen bantlar SDS jellerinde daha iyi bir bant görüntüsü elde etmeyi sağlamıştır. Bu sonuçlara göre bakteriyosin izolasyonu için kullanılacak protokol optimize edilmiş ve bu yöntemin amonyum sülfat çöktürmeden kaynaklanan dezavantajları tolere edebileceği doğrulanmıştır. Bu aşamadan sonra *L. salivarius* suşları Bölüm 2.2.12'de bahsedilen protokole uygun

şekilde işlemlerden geçmiş ve elde edilen ürünler %16'lık SDS jelde yürütülerek bakteriyosin olduğu düşünülen bantlar elde edilmiştir.



Şekil 3. 28 Hücresiz kültür ortamlarının amonyum sülfat çöktürme ve metanol/kloroform eklenmesi sonucunda sulu çözeltide oluşturduğu protein tabakası



Şekil 3. 29 Bakteriyosinlerin %16 SDS jel görüntüsü

L. salivarius suşlarından elde edilen hücresiz kültür ortamlarının amonyum sülfat ve metanol/kloroform çöktürme sonucunda %16'lık jelde yaklaşık olarak 10-15 kDa bantlar gözlemlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan ve aynı işlemlere tabi tutulan MRS Broth besiyerinde aynı bantlar gözlemlenmemiştir. Elde edilen bu bantların <20 kDa olması nedeniyle bakteriyosin olduğu düşünülmektedir.

3.2 Tartışma ve Öneriler:

Bu tez çalışmasında, serbest gezen tavukların gastrointestinal sisteminden *L. salivarius* bakterileri izole edilmiş ve bu bakterinin probiyotik özellikleri, farklı patojenler üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri, bakteriyosin aktiviteleri ve bu bakteriyosinlerin saflaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, model organizma olarak tavukların seçilme sebebi tavukların bağırsak mikrobiyotasının çok çeşitli olması ve birçok probiyotik laktik asit bakterisine ev sahipliği yapmasıdır. Tavuk bağırsak mikrobiyotasında gıdaların parçalanmasını ve sindirilmesini sağlayan 900'den fazla bakteri türü olduğu bilinmektedir [123]. Vücut uzunluğuna göre kümes hayvanlarının gastrointestinal sistemleri memeli hayvanlara göre daha kısadır ve bu nedenle sindirim kümes hayvanlarında memelilere göre çok daha hızlı gerçekleşir. Sindirim kanalında besinlerin daha az tutulması mukozal tabakaya yapışabilen ve hızlı büyüeyebilen bakterilerin seçimini artırmaktadır [124]. Bu sebeple tavukların bağırsak mikrobiyotası oldukça çeşitlidir ve birçok probiyotik laktik asit bakterisi içermektedir. Tavuk gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunan Laktobasil türleri *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii* ve *L. aviarius*'dur.

Bu tez çalışmasında, ilk olarak tavuk gastrointestinal sisteminden *L. reuteri* bakterisi izole edilmeye çalışılmıştır. *L. reuteri* tavuk gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunan probiyotik bakterilerden biridir. Bu bakteri tarafından gliserolün 1,3- Propandiol'e dönüşümünde ara ürün olarak üretilen reuterin (3-HPA) oldukça etkili bir antimikrobiyal bileşiktir. Reuterin; Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, mayalar, mantarlar, protozoalar, virüsler ve hatta antibiyotığe dirençli bakteriler üzerinde geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktivite sergiler. Reuterinin aldehit grubunun 2,4-Dinitrofenilhidrazin boyası ile petri üzerinde boyanarak tespit edilmesi ile ilgili literatürde çok az çalışma vardır [25], [106], [107]. Tavuk bağırsağından izole edilen bakterilerin petri üzerinde 2,4-Dinitrofenilhidrazin boyası ile boyanma işlemi gerçekleştirildikten sonra bakteri kolonilerinin boyanması, bu kolonilerin *L. reuteri* bakterilerine ait olduğunu düşündürmüştür. Fakat daha sonra bakterilerin dizi analizleri gerçekleştirildiğinde bu bakterilerin *L. reuteri* bakterisi olmadığı *L. salivarius* bakterisi olduğu kanıtlanmıştır. Bakterilerin boyama işleminde neden pozitif sonuç verdiğini anlayabilmek amacıyla *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*

bakterileri MHA besiyerinde geliştirildikten sonra 2,4-Dinitrofenilhidrazin boyası ile boyama işlemleri bu bakteriler üzerinde de denenmiştir. İlginç bir şekilde bu test bakterilerinden sadece *E. coli* kolonilerinin etrafında kırmızı-kahverengi zonlar oluşmuş ve boyama işleminde pozitif sonuç vermiştir. *E. coli*, gliserolü metabolize etmek için gliserol taşıyıcısı (*glpF* tarafından kodlanır)) ve gliserol kinaz (*glpK* tarafından kodlanır) olmak üzere iki protein kullanır. Bu proteinler harici gliserolün hücrenin içerisine girişini sağlar. Gliserol hücre içine alındıktan sonra Gliserol-3-fosfata dönüştürülür ve daha sonra Dihidroksiasetonfosfata (DHAP) dönüştürülerek glikoliz yoluna girerek çeşitli metabolitlerin (süksinik asit, asetik asit, 1,3-Propanodiol gibi) üretimi sağlar [125], [126]. *E. coli* bakterisinin gliserol varlığında ürettiği metabolitlerin de 2,4-Dinitrofenilhidrazin boyası ile boyandığında beklenen kırmızı-kahverengi zonlar oluşturduğu düşünülmüştür. Bu sonuç *L. reuteri* bakterisinin boyanmasında kullanılan protokolün, bu bakteriye özgü olmadığını göstermiştir. Özellikle bu çalışmada kullanıldığı gibi çok çeşitli bakterilerin bulunduğu karışık kültür ortamından *L. reuteri* bakterisinin izolasyonu gerçekleştiriliyorsa kullanılan boyama protokolünün verimli olamayacağı ve *L. reuteri* bakterisinin boyanarak tespit edilmesinde seçici bir sonuç veremeyeceğini kanıtlamıştır. Aynı zamanda boyama işlemi uygulanan petrilerden alınıp sıvı besiyerine aktarılan kolonilerde bir büyüme gözlemlenmemiştir. Bu sonuca göre kullanılan boya protokolü petri üzerindeki bakterilerin ölmesine neden olmaktadır bu yüzden de boyama işleminden önce boyama işlemi gerçekleştirilecek petrilerden örnek alınması oldukça zahmetli ve karmaşık bir süreç olduğu için verimli bir sonuç elde edilmesi oldukça zordur.

Tavuk bağırsağından izole edilen bakterilerin *L. salivarius* bakterisi olduğu kanıtlandıktan sonra bu bakterinin probiyotik olarak kullanımı ve bakteriyosin aktivitesi üzerine odaklanılmıştır. *L. salivarius* suşlarının probiyotik olarak kullanım potansiyelini araştırmak amacıyla bakteri farklı pH, farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı sıcaklıklarda büyüme deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Probiyotik mikroorganizmaların düşük pH, yüksek safra tuzu gibi olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı olmaları ve bu koşullardan etkilenmeden bağırsakta iyi bir şekilde kolonize olabilmeleri gerekmektedir. Aynı zamanda probiyotik mikroorganizmaların seri üretim ve depolama işlemleri sırasında farklı sıcaklık değişimlerinde canlılığını koruyarak aktivitesini yitirmemesi önemlidir [5], [10].

Bölüm 3.1.4' de gösterildiği gibi *L. salivarius* suşlarının düşük pH'larda, farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı sıcaklık değişimlerinde büyüme deneyleri gerçekleştirilmiştir. *L. salivarius* suşlarının farklı koşullarda gelişimi neredeyse aynıdır. Suşların farklı pH'larda ayarlanmış besiyerlerinde pH 1.5 ve pH 2.0'de 24. saatin sonunda dahi canlılık az olsa da devam etmiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerlerinde %10 ve %12 tuz konsantrasyonunda dahi canlılığının 24. saatin sonunda devam ettiği Bölüm 3.1.4' de yer alan grafiklerde gösterilmiştir. Aynı deneyde farklı sıcaklıklarda bakterilerin 60°C'ye kadar canlılığının devam ettiği de gözlemlenmiştir. Her iki suşunda farklı çevresel koşullarda gelişiminin aynı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar bakterilerin farklı çevresel koşullara dirençli olabileceği ve probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin olabileceği düşündürmüştür. Sonuçlar daha önce literatürde yapılmış çalışmalar ile uyumludur [127], [128].

Gıda ve yem sektöründe kullanılacak probiyotik laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnci, bu direncin patojenik bakterilere aktarılabilmesi nedeniyle büyük bir tehlike olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple probiyotik laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç genlerini barındırmaması talep edilir [121]. Yapılan çalışmada *L. salivarius* suşlarının; ampisilin (<2 µg/mL) ve tetrasiklin (<2 µg/mL) antibiyotiklerine karşı duyarlı; kanamisin (>64 µg/mL), vankomisin (>32 µg/mL) ve apramisin (>64 µg/mL) antibiyotiklere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde yapılan çalışmalar ile uyumludur [129].

Daha sonra *L. salivarius* suşlarının çeşitli patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir. Kullanılan patojen test bakterilerinden *E. coli*, *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes* tavuklarda en çok hastalığa sebep olan patojenlerdendir. Bu patojenler çeşitli semptomlarla tavuklarda hastalık hatta ölüme sebep olurken bu patojenlerin zoonotik olması nedeniyle etle veya yumurta ile insanlara geçip insanlarda da hastalığa sebep olma riski oldukça yüksektir [130]. Bu patojenler düzgün tedavi edilmezse ciddi bir ekonomik kaybın yanı sıra gıda kaynaklı zehirlenmelere de sebep olabilirler [131], [132]. Ayrıca *S. aureus*, MRSA, VRSA patojenleri için de *L. salivarius* suşlarının antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır. Giderek artan hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın sebebi olarak *S. aureus* görülmektedir ve son yıllarda dirençli suşlardan MRSA ve VRSA enfeksiyon riskini hem hastane hem de toplumda artırmıştır [133]. *S. aureus*

kaynaklı meydana gelen enfeksiyon hastalıkları çoğu organı etkileyebilir. Enfeksiyon tedavisi için kullanılan antibiyotikler ishale neden olur ve ishale bağı olarak mide asiditesinin düşmesi *S. aureus*' un mide bariyerini aşarak bağırsağa geçişine ve burada kolonize olmasına sebep olabilir [134]. Günümüzde *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde genel olarak antibiyotikler uygulanmaktadır ancak antibiyotikler dirençli bakterilerin oluşmasına sebep olduğundan yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesi gerekmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da *L. salivarius* suşlarının *S. aureus* patojenleri üzerindeki antibakteriyel etkinliği tespit edilmiştir [135]. Hastane kaynaklı diğer patojenlerden biri de hızlı direnç gelişimi ve tedavisi için sınırlı terapötik seçenekler olması nedeniyle halk sağlığı için büyük tehlike oluşturan *K. pneumoniae*'dir. Kolistinin çoklu ilaca dirençli Gram-negatif *K. pneumoniae* enfeksiyonlarına karşı kullanılması da kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur [136]. Literatürde Laktobasillerin *K. pneumoniae* patojeni üzerindeki antibakteriyel etkinliği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır [137], [138],[139], [140]. Aynı zamanda insan için çeşitli enfeksiyon hastalıklarının sebeplerinden olan *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*' e karşı da *L. salivarius* suşlarının antibakteriyel aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak en yaygın bitki patojenlerinden olan *P. syringae*'a karşı da gözlemlenen antibakteriyel aktivite izole edilen *L. salivarius* suşlarının bu patojen bakterilerin tedavisinde antibiyotikler ile kombine halde veya tek başına kullanılma potansiyelinin olabileceğini kanıtlamıştır.

L. salivarius suşlarının antibakteriyel etkinlikleri kanıtlandıktan sonra bu antibakteriyel etkinliğe bakterinin ürettiği bakteriyosin kaynaklı olup olmayacağı araştırılmıştır. Bakteriyosin üreten *L. salivarius* bakterilerinin tavuk gastrointestinal sisteminden izolasyonu ile ilgili literatürde birkaç çalışma vardır [141], [142],[143], [144]. Tavuk bağırsağından izole edilen *L. salivarius* K7'nin Gram-pozitif bakteriler üzerinde inhibisyon etkinliği gösteren FK22 bakteriyosinini ürettiği gösterilmiştir [145]. Başka bir çalışmada tavuk çekumundan izole edilen *L. salivarius* NRRL B-30514 suşunun ürettiği sınıf IId bakteriyosin OR-7'nin Gram-negatif bakteri *Camplobacter jejuni*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [142]. Svetoch ve ark. yaptıkları çalışmada tavuk bağırsağından izole edilen yeni bir *L. salivarius* 1077 suşunun sınıf IId bakteriyosin L-1077 ürettiği ve bu bakteriyosinin yine *C. jejuni*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu

göstermiştir [144]. Messaoudi ve ark. tarafından tavuk bağırsağından izole edilen *L. salivarius* SMXD51 suşunun ürettiği bakteriyosinin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [141].

Daha önce yapılan diğer çalışmalarda da bakteriyosin üreten LAB insan bağırsağında bulunan *L. monocytogenes* ve bazı enterokok gibi gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı etkili olduğu gösterilmiştir [146]. Yapılan başka bir çalışmada bir fare modelinde *Pediococcus acidilactici* UL5'in doğal bağırsak mikrobiyotasını etkilemeden anti-listerial aktivite gösteren pediosin PA-1 bakteriyosinini ürettiği gösterilmiştir [147]. Nisin bakteriyosinini içeren diyetlerin immünomodülatör etkileri değerlendirilmiş ve CD4+ ve CD8+ T lenfositlerini artırdığı ve B-lenfosit hücre sayısını düşürdüğü kanıtlanmıştır [148]. Başka bir çalışmada saflaştırılmış nisin bağırsak mikrobiyotasını etkilemeden *C. difficile*'nin gelişimini engelleyebildiği gösterilmiştir [149]. Viral enfeksiyon için gerekli olan enzimatik reaksiyonların bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddeler tarafından inhibe edildiği bazı çalışmalarda incelenmiştir. *Enterococcus faecium* CRL35 tarafından üretilen Enterocin CRL35 bakteriyosini insanlarda bağırsakla ilişkili hastalıklara neden olan herpes simpleks virüsünün replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [150]. Hayvan modeli üzerinde yapılan çalışmalar bakteriyosin üreten probiyotik kombinasyonuna sahip *Bifidobacterium* 'un kolorektal kanser şansını azalttığını göstermiştir [151]. Aynı zamanda *L. acidophilus* 'un tek başına veya kombinasyon halinde kolorektal kansere karşı bağışıklık artırdığı gösterilmiştir [152]. *L. helveticus* tarafından üretilen bakteriyosin PJ4'ün fare modelinde vücut ağırlığını azaltmada etkili olduğu kanıtlanmıştır [153]. Bakteriyosinlerle ilgili mevcut araştırmalar bakteriyosinlerin cilt mikroflorasını, cilt lipidlerinin ve bağışıklık sisteminin modülasyonuna katkıda bulunarak doğal cilt homeostazını korunmasını sağladığını göstermiştir [154]. Yapılan bir çalışmada *Enterococcus faecalis* SL-5 bakterisi tarafından üretilen ESL5 bakteriyosini akne *Propionibacterium acnes* patojeninin neden olduğu akne lezyonlarına sahip bir hastaya losyon olarak uygulanmış ve plasebo losyona kıyasla lezyonların önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir [155].

L. salivarius suşlarının çeşitli patojenler üzerindeki bu etkinliğinin sebebinin bakterinin ürettiği bakteriyosin kaynaklı olabileceği Bölüm 3.1.7'de yapılan

çalışmalarla *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* patojenleri kullanılarak test edilmiştir. Laktik asit bakterileri geliştikleri besiyeri ortamına çeşitli asitler salgıladıkları ve ortamın pH'ını düşürerek patojen bakterilerin gelişimini engellediği bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin bakteriyosin üretme yeteneklerini analiz edebilmek için organik asitlerden kaynaklı olası inhibisyon etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla bakterinin hücresiz kültür ortamlarının pH'ı nötr hale getirilir ve inhibisyon zonları buna göre değerlendirilir [156]. Bu çalışmada *L. salivarius* suşlarının hücresiz kültür ortamlarının antibakteriyel etkinliği pH'ı nötrlendikten ve 0,45 µM filtreden geçirildikten sonra da devam etmiştir. Bu sonuç tavuk bağırsağından izole edilen *L. salivarius* bakterilerinin bakteriyosin aktivitesinin olabileceğini düşündürmüştür. Fakat bakterinin bakteriyosin üretme yeteneği ortamın pH'ı, sıcaklık, kültür ortamının bileşenleri, ortamdaki oksijen miktarı ve mikrobiyal büyüme koşulları gibi birçok faktörden etkilenmektedir [157]. Bu sebeple bakterilerin antibakteriyel etkinliği her yapılan çalışmada aynı sonuçları vermemiştir. *L. salivarius* suşları Gram- pozitif ve Gram-negatif patojenler üzerinde oldukça yüksek bir antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Normalde bakteriyosinlerin genellikle kendi ile yakından ilişkili patojenlerin gelişimini engellediği bilinmektedir. Bu sebeple bu sonuç oldukça önemlidir. Suşların hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkinliği suşlar bakteriyosin üretiyor ise bu antimikrobiyal bileşiğin oldukça etkin olduğunu düşündürmüştür.

Aynı zamanda *L. salivarius* suşlarının hücresiz kültür ortamlarının da antibakteriyel etkinlikleri araştırılmıştır. Bakterilerin santrifüjleme ile kültür ortamından uzaklaştırılması antimikrobiyal maddeleri içeren hücresiz kültür ortamının elde edilmesini sağlamaktadır ve bu hücresiz kültür ortamı çeşitli antimikrobiyal metabolitler içerdiği antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Bu hücresiz kültür ortamının *E. coli* [158], *L. monocytogenes* [159], *S. Typhimurium* [160] gibi çeşitli patojenler üzerindeki antibakteriyel etkinliği literatürde yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Laktik asit bakterilerinden elde edilen hücresiz kültür ortamının gıda sektöründe gıda koruyucusu olarak kullanım potansiyeli oldukça yüksektir. Hücresiz kültür ortamı veya saflaştırılmış metabolitleri bozulabilir gıdaların duyuşal özelliklerini değiştirmeden raf ömrünü uzatmak için ambalaj malzemelerine dahil edilebilir veya gıdaların yüzeyine kaplanabilir. Aynı zamanda

antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve antibiyofilm özelliklerinden dolayı sağlık alanında kullanım potansiyeli umut vericidir [126]. Bu tez çalışmasında *L. salivarius* suşlarının hücresiz kültür ortamlarının antibakteriyel etkinlikleri Bölüm 3.1.7’de yapılan deney ile kanıtlanmıştır. Bu sonuca göre *L. salivarius* suşlarının hücresiz kültür ortamlarının da çeşitli alanlarda kullanım potansiyeli, araştırılması gereken bir konudur.

Tavuk bağırsağından izole edilen *L. salivarius* suşlarının ürettiği bakteriyosin aktiviteleri kanıtlandıktan sonra bu bakteriyosinleri izole edebilmek için amonyum sülfat çöktürme tekniği kullanılmıştır. İlgili proteinin diğer proteinlerden ayrılmasında veya proteinlerin deriştirilmesinde kullanılan bu çöktürme işlemi, proteinleri saflaştırma işlemlerinin çoğunda kullanılmaktadır. Amonyum sülfat proteinleri stabilize ederek denatürasyon, proteoliz, bakteriyel kontaminasyona karşı koruması, çözünürlüğünün yüksek olması ve ucuz olması gibi sebeplerden dolayı tercih edilmiştir [161]. Aynı zamanda laktik asit bakterileri ürettikleri bakteriyosinleri büyüme ortamına salgıladıkları için bakteriyosinler hücresiz kültür ortamında aşırı seyreltik olarak bulunmaktadır bakteriyosinleri derişik bir hale getirmek içinde amonyum sülfat tuzu tercih edilmiştir. Fakat kullanılan bu yöntemin en büyük dezavantajı ortamda bulunan diğer protein bileşenlerinin de proteinler ile çökmesidir [162]. Yapılan çalışmada *L. salivarius* suşlarının büyüme ortamı olan MRS sıvı besiyeri kazein proteini içerdiği için amonyum sülfat çöktürmede ortamda bulunan tüm proteinler çöktüğü için çöken peletten bakteriyosinlerin saf olarak izole edilmesi oldukça zorlaşmıştır. Aynı zamanda amonyum sülfat tuzunun çöken peletten tam olarak uzaklaştırılamaması SDS jellerinde düzgün bantların görüntülenmesini engellemiştir. Amonyum sülfat çöktürmenin bu dezavantajlarının üstesinden gelebilmek için genellikle diyaliz, iyon kromatografisi ve boyut dışlama kromatografisi gibi metotlar kullanılmaktadır. [162]. İlk olarak *L. salivarius* suşlarının hücresiz kültür ortamları amonyum sülfat ile çöktürme işleminden sonra diyaliz işlemine tabii tutulmuş fakat örnekler SDS jellere yüklendiği zaman düzgün bir sonuç elde edilememiştir. Bunun sebebinin üretilen bakteriyosinin aşırı seyreltik olması ve amonyum sülfat tuzunun tam olarak hücresiz kültür ortamından uzaklaştırılamamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Daha sonra amonyum sülfat çöktürme yapılan örneklerle metanol/kloroform çözeltisi eklenmesini içeren farklı bir protokol denenmiştir

[117]. Bu metot proteinlerden lipidler, nükleik asitler gibi engelleyici maddelerin uzaklaştırılması için kullanılır. Amonyum sülfat çöktürme işlemi gerçekleştirilen örnekler metanol/kloroform çözeltisi eklendiği zaman üç fazlı bir çökelti meydana gelir. Üst fazda metanol sayesinde protein çökeltisi içerisindeki tuzlar, indirgeyici maddeler ve nükleik asitler gibi bileşenler toplanır, alt fazda ise kloroform sayesinde lipidler gibi bileşenler toplanır. Oluşan ara fazda ise ortamdaki diğer bileşenlerden ayrılmış kuru protein malzemeleri bulunur. Bu yöntem seyreltilmiş numunelerden proteinlerin konsantre bir şekilde elde edilmesi için kullanılabilir aynı zamanda SDS jellerde protein çözünürlüğünü büyük ölçüde artırır [163]. Bu protokol bakteriyosinlerde kullanılmadan önce daha önce laboratuvarında analizi gerçekleştirilmiş bir rekombinant protein kullanılmıştır. Şekil 3.26 ve 3.27’de gösterildiği gibi rekombinant proteinin amonyum sülfat çöktürme sonucunda metanol/kloroform çözeltisi ile muamele edilmesi SDS jelinde daha düzgün ve daha temiz bantların gözlemlenmesini sağlamıştır. Bu metodun proteinler üzerinde kullanılabilirliği kanıtlandıktan sonra bakteriyosin saflaştırma işlemine geçilmiştir. Daha sonra *L. salivarius* suşlarının hücresiz kültür ortamlarına da amonyum sülfat çöktürme ve metanol/kloroform çözeltisi ile muamele işlemi uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak aynı işlemlere tabi tutulan MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Burada karşılaşılan sorunlardan biri bakteriyosinler aşırı seyreltik olduğu için çöken protein miktarının da çok az olmasıdır. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için *L. salivarius* suşlarının geliştiği besiyeri ortamı miktarı artırılmış bu sayede çöken protein miktarı da artırılmıştır. Deney sonucunda Şekil 3.29’da gösterildiği gibi ~15-10 kDa civarında bantlar elde edilmiştir. Literatürdeki bilgilere göre Sınıf II bakteriyosinler <10 kDa, sınıf III bakteriyosinler >30 kDa’dan oluşmaktadır [164]. Tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen *L. salivarius* bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler daha önce yapılan çalışmalarda <10 kDa olarak tespit edilmiştir [141], [142],[143], [144]. Fakat farklı kaynaklardan izole edilen *Lactobacillus* türü bakterilerden izole edilen bakteriyosinler >20 kDa olarak tespit edilmiştir [165], [166]. Bu bantların bakteriyosin olup olmadığının kesinleştirilmesi için amino asit dizileme yapılması gerekmektedir.

Elde edilen bu bilgiler doğrultusunda tavuk gastrointestinal sisteminde izole edilen *L. salivarius* suşlarının hayvan yemlerinde büyümeyi artırmak ve hastalıkları önlemek amacıyla kullanılabileceği, probiyotik olarak ilaç sektöründe kullanım potansiyelinin değerlendirilebileceği, bu suşların sağlık, veterinerlik, tarım, gıda

alanlarında doğal, kimyasal içermeyen alternatif ürünler olarak kullanılabileceği ön görülmektedir. İzole edilen *L. salivarius* bakterilerinin özellikle sağlık alanında dirençli *S. aureus*, *K. pneumoniae* bağlantılı enfeksiyonların tedavisinde tek başına veya antibiyotikler ile kombine halde kullanılabilecek potansiyel ilaçlar olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [157][158]. Aynı zamanda *L. salivarius* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin ilerleyen çalışmalarda saflaştırılması durumunda bu antimikrobiyal peptitlerin sağlık, veterinerlik, tarım, kozmetik, gıda ve yem sektörü gibi birçok alanda antibiyotiklere alternatif olarak düşünülebileceği ön görülmektedir. Bu tez çalışmasının devamında *L. salivarius* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin izolasyonu ve bakteriyosinlerin dizi analizinin gerçekleştirilerek tanımlanması, antimikrobiyal etkinliklerinin tayin edilmesi, bakteriyosinlerin biyoteknolojik yönden değerlendirilerek çeşitli alanlarda kullanım potansiyelleri araştırılması amaçlanmaktadır.



KAYNAKÇA

- [1] R. D. Ayivi *et al.*, “Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications,” *Dairy 2020, Vol. 1, Pages 202-232*, vol. 1, no. 3, pp. 202–232, Oct. 2020, doi: 10.3390/DAIRY1030015.
- [2] “Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition - Google Kitaplar.” https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=bB3OBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=lactic+acid+bacteria+microbiological+and+functional+aspects&ots=tEJxOMXUyW&sig=U9bhEYbzMMAgT8hC96K7u4aAR9s&redir_esc=y#v=onepage&q=lactic%20acid%20bacteria%20microbiological%20and%20functional%20aspects&f=false (accessed Apr. 28, 2023).
- [3] H. Karaca *et al.*, “Akademik Gıda 8 (1) (2010) 32-38 Derleme Makale / Review Paper Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri.”
- [4] E. Caplice and G. F. Fitzgerald, “Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation,” *Int J Food Microbiol*, vol. 50, no. 1–2, pp. 131–149, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.
- [5] Y. Koçak, A. Fındık, A. Çiftçi, and G. Tarihi, “Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri Probiotics: General Features and Safety,” 2016. [Online]. Available: <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez>
- [6] L. Ontario, “Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization”, Accessed: Apr. 04, 2023. [Online]. Available: <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>
- [7] Q. Guo, J. Z. Goldenberg, C. Humphrey, R. El Dib, and B. C. Johnston, “Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea,” *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Apr. 2019, doi: 10.1002/14651858.CD004827.PUB5.
- [8] “Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO FOOD AND NUTRITION PAPER”.
- [9] M. E. S. M. Net *et al.*, “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, vol. 11, pp. 506–514, 2014, doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- [10] G. V. de Melo Pereira, B. de Oliveira Coelho, A. I. Magalhães Júnior, V. Thomaz-Soccol, and C. R. Soccol, “How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria,” *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 8. 2018. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003.
- [11] E. J. Quinto, P. Jiménez, I. Caro, J. Tejero, J. Mateo, and T. Girbés, “Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review,” *Food Nutr Sci*, vol. 05, no. 18, pp. 1765–1775, 2014, doi: 10.4236/fns.2014.518190.
- [12] Q. Mu, V. J. Tavella, and X. M. Luo, “Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, no. APR. Frontiers Media S.A., Apr. 19, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00757.

- [13] S. Lebeer, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker, "Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 72, no. 4, pp. 728–764, Dec. 2008, doi: 10.1128/mmbr.00017-08.
- [14] Anjana and S. K. Tiwari, "Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 12, Frontiers Media S.A., May 16, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.851140.
- [15] B. A. Neville and P. Otoole, "Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *ctobacillus* species," *Future Microbiology*, vol. 5, no. 5, pp. 759–774, May 2010. doi: 10.2217/fmb.10.35.
- [16] M. Dec *et al.*, "Biodiversity of *ligilactobacillus salivarius* strains from poultry and domestic pigeons," *Animals*, vol. 11, no. 4, Apr. 2021, doi: 10.3390/ani11040972.
- [17] S. Messaoudi *et al.*, "Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity," *Food Microbiology*, vol. 36, no. 2, pp. 296–304, Dec. 2013. doi: 10.1016/j.fm.2013.05.010.
- [18] S. Messaoudi *et al.*, "Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity," *Food Microbiol*, vol. 36, no. 2, pp. 296–304, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.FM.2013.05.010.
- [19] B. D. Chaves, M. M. Brashears, and K. K. Nightingale, "Applications and safety considerations of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in animal and human health," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 123, no. 1, Blackwell Publishing Ltd, pp. 18–28, Jul. 01, 2017. doi: 10.1111/jam.13438.
- [20] R. A. Britton, "The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology *Lactobacillus reuteri*," 2017.
- [21] C. Hou, X. Zeng, F. Yang, H. Liu, and S. Qiao, "Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: A review," *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 6, no. 1, BioMed Central Ltd., 2015. doi: 10.1186/s40104-015-0014-3.
- [22] X. J. Li, L. Y. Yue, X. F. Guan, and S. Y. Qiao, "The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus," *J Appl Microbiol*, vol. 104, no. 4, pp. 1082–1091, Apr. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03636.x.
- [23] S. ; Vollenweider and C. Lacroix, "3-Hydroxypropionaldehyde Applications and perspectives of biotechnological production", doi: 10.3929/ethz-b-000051119.
- [24] V. C. Molina, M. Médiçi, M. P. Taranto, and G. Font De Valdez, "Lactobacillus reuteri CRL 1098 prevents side effects produced by a nutritional vitamin B12 deficiency," *J Appl Microbiol*, vol. 106, no. 2, pp. 467–473, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04014.x.
- [25] J. H. Ju *et al.*, "The biocatalytic production of 3-hydroxypropionaldehyde and evaluation of its stability," *Catalysts*, vol. 11, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/catal11101139.

- [26] S. Agriopoulou, E. Stamatelopoulou, M. Sachadyn-Król, and T. Varzakas, “Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 6. MDPI AG, pp. 1–23, Jun. 01, 2020. doi: 10.3390/microorganisms8060952.
- [27] R. Shi and B. Li, “Preparation and Characterization of Corn Starch and Lignosulfonate Blend Film with a High Content of Lignosulfonate,” *Bioresources*, vol. 11, no. 4, pp. 8860–8874, 2016, doi: 10.1128/AEM.04272-13.
- [28] W. H. Holzapfel, R. Geisen, and U. Schillinger, “Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes,” *Int J Food Microbiol*, vol. 24, no. 3, pp. 343–362, 1995, doi: 10.1016/0168-1605(94)00036-6.
- [29] A. Vidra and Á. Németh, “Bio-produced acetic acid: A review,” *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, vol. 62, no. 3. Budapest University of Technology and Economics, pp. 245–256, May 16, 2018. doi: 10.3311/PPch.11004.
- [30] U. Antone, I. Ciprova, M. Zolovs, R. Scerbaka, and J. Liepins, “Propionic Acid Fermentation—Study of Substrates, Strains, and Antimicrobial Properties,” *Fermentation*, vol. 9, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/fermentation9010026.
- [31] S. Y. Park, M. Y. Yoo, H. D. Paik, and S. D. Lim, “Production of benzoic acid as a natural compound in fermented skim milk using commercial cheese starter,” *J Dairy Sci*, vol. 100, no. 6, pp. 4269–4275, Jun. 2017, doi: 10.3168/jds.2016-12399.
- [32] L. G. Stoyanova, E. A. Ustyugova, and A. I. Netrusov, “Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties,” *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 48, no. 3. pp. 229–243, May 2012. doi: 10.1134/S0003683812030143.
- [33] H. J. Jung, S. H. Kim, K. C. Yoo, and J. H. Lee, “Changes in acetaldehyde and formaldehyde contents in foods depending on the typical home cooking methods,” *J Hazard Mater*, vol. 414, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.125475.
- [34] M. C. Sun, Z. Y. Hu, D. D. Li, Y. X. Chen, J. H. Xi, and C. H. Zhao, “Application of the Reuterin System as Food Preservative or Health-Promoting Agent: A Critical Review,” *Foods*, vol. 11, no. 24. MDPI, Dec. 01, 2022. doi: 10.3390/foods11244000.
- [35] C. Engels *et al.*, “Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin,” *Sci Rep*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep36246.
- [36] G. Gradisteanu Pircalabioru *et al.*, “Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: rising to the challenge,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 2. MDPI AG, pp. 1–15, Jan. 01, 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13020196.

- [37] S. Soltani *et al.*, “Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 45, no. 1. Oxford University Press, Jan. 01, 2021. doi: 10.1093/femsre/fuaa039.
- [38] J. M. Rolain, C. Abat, M. T. Jimeno, P. E. Fournier, and D. Raoult, “Do we need new antibiotics?,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no. 5. Elsevier B.V., pp. 408–415, May 01, 2016. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.012.
- [39] C. Ghosh, P. Sarkar, R. Issa, and J. Haldar, “Special Issue: Antimicrobial Resistance and Novel Therapeutics Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance,” 2018, doi: 10.1016/j.tim.2018.12.010.
- [40] D. F. Benítez-Chao, A. León-Buitimea, J. A. Lerma-Escalera, and J. R. Morones-Ramírez, “Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Apr. 15, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.630695.
- [41] S.-C. Park, Y. Park, and K.-S. Hahm, “The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation,” *Int. J. Mol. Sci*, vol. 12, pp. 5971–5992, 2011, doi: 10.3390/ijms12095971.
- [42] B. Biler, “*Pediococcus acidilactici* PBF suşu tarafından üretilen bakteriyosinin karakterizasyonu ve saflaştırılması,” Aug. 2009, Accessed: Apr. 13, 2023. [Online]. Available: <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/507340>
- [43] B. B. Mona ElDisougi Elyass and S. A. Professor Mohammed Taha Shigidi, “Identification of Some Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and Characterization of their Bacteriocins,” 2004.
- [44] J. I. Nagao, “Sur un remarquable exemple d’antagonisme entre deux souches de coillbacille,” *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, vol. 93, no. 3, pp. 1040–1041, 1925, doi: 10.2330/JORALBIOSCI.51.158.
- [45] A. T. R. Mattick and A. Hirsch, “Further Observations on an Inhibitory Substance (Nisin) from Lactic Streptococci,” *Lancet*, vol. 5, pp. 5–8, 1947.
- [46] E. KF., “Bacteriocins and food applications,” *Dairy Food Environ Sanit*, vol. 12, pp. 204–209, 1992, Accessed: Apr. 10, 2023. [Online]. Available: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573668926472213248>
- [47] P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill, “Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics?,” *Nature Reviews Microbiology* 2012 11:2, vol. 11, no. 2, pp. 95–105, Dec. 2012, doi: 10.1038/nrmicro2937.
- [48] J. C. Hernández-González, A. Martínez-Tapia, G. Lazcano-Hernández, B. E. García-Pérez, and N. S. Castrejón-Jiménez, “Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine,” *Animals*, vol. 11, no. 4. MDPI AG, Apr. 01, 2021. doi: 10.3390/ani11040979.
- [49] R. Kumariya, A. Kumari Garsa, Y. S. Rajput, S. K. Sood, N. Akhtar, and S. Patel, “Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and

- resistance development in food spoilage causing bacteria,” 2019, doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.002.
- [50] A. Dobson, P. D. Cotter, R. Paul Ross, and C. Hill, “Bacteriocin production: A probiotic trait?,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 78, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2012, doi: 10.1128/AEM.05576-11/FORMAT/EPUB.
 - [51] M. Hassan, M. Kjos, I. F. Nes, D. B. Diep, and F. Lotfipour, “Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance,” *J Appl Microbiol*, vol. 113, no. 4, pp. 723–736, Oct. 2012, doi: 10.1111/J.1365-2672.2012.05338.X.
 - [52] D. Józefiak and A. Sip, “Bacteriocins in poultry nutrition - A review,” *Annals of Animal Science*, vol. 13, no. 3, pp. 449–462, Jul. 2013, doi: 10.2478/aoas-2013-0031.
 - [53] V. Ahmad, M. S. Khan, Q. M. S. Jamal, M. A. Alzohairy, M. A. Al Karaawi, and M. U. Siddiqui, “Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation,” *Int J Antimicrob Agents*, vol. 49, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2016.08.016.
 - [54] A. Simons, K. Alhanout, and R. E. Duval, “microorganisms Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria”, doi: 10.3390/microorganisms8050639.
 - [55] G. Bierbaum and H.-G. Sahl, “Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering,” *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 10, no. 1, pp. 2–18, Jan. 2009, doi: 10.2174/138920109787048616.
 - [56] A. Guder, I. Wiedemann, and H.-G. Sahl, “Posttranslationally Modified Bacteriocins-The Lantibiotics,” 2000, doi: 10.1002/1097-0282(2000)55:1<62::AID-BIP60>3.0.CO;2-Y.
 - [57] A. Pérez-Ramos, D. Madi-Moussa, F. Coucheney, and D. Drider, “Current knowledge of the mode of action and immunity mechanisms of lab-bacteriocins,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 10, MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/microorganisms9102107.
 - [58] S. Ennahar, K. Sonomoto, and A. Ishizaki, “Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation,” *J Biosci Bioeng*, vol. 87, no. 6, pp. 705–716, Jun. 1999, doi: 10.1016/S1389-1723(99)80142-X.
 - [59] L. Johnsen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer, “The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 10, pp. 9243–9250, Mar. 2005, doi: 10.1074/jbc.M412712200.
 - [60] G. Fimland, L. Johnsen, B. Dalhus, and J. Nissen-Meyer, “Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action ¶,” *Journal of Peptide Science J. Peptide Sci*, vol. 11, pp. 688–696, 2005, doi: 10.1002/psc.699.

- [61] C. Oppegård, P. Rogne, L. Emanuelsen, P. E. Kristiansen, G. Fimland, and J. Nissen-Meyer, "The two-peptide class II bacteriocins: Structure, production, and mode of action," in *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, Sep. 2007, pp. 210–219. doi: 10.1159/000104750.
- [62] I. F. Nes, D. A. Brede, and D. B. Diep, "Class II Non-Lantibiotic Bacteriocins," 2013, doi: 10.1016/B978-0-12-385095-9.00016-6.
- [63] M. J. Van Belkum, L. A. Martin-Visscher, and J. C. Vederas, "Structure and genetics of circular bacteriocins," *Trends in Microbiology*, vol. 19, no. 8. pp. 411–418, Aug. 2011. doi: 10.1016/j.tim.2011.04.004.
- [64] S. Iwatani, T. Zendo, and K. Sonomoto, "Class IId or Linear and Non-Pediocin-Like Bacteriocins," *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, pp. 237–252, 2011, doi: 10.1007/978-1-4419-7692-5_13.
- [65] Z. Sun *et al.*, "Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 45, no. 3, pp. 213–227, Mar. 2018, doi: 10.1007/s10295-018-2008-6.
- [66] S. Aly, O. A. Cheik, B. H. Imael N, and T. S. Alfred, "Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview," *Afr J Biotechnol*, vol. 5, no. 9, pp. 678–683, 2006, [Online]. Available: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- [67] E. Cascales *et al.*, "Colicin Biology," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 71, no. 1, pp. 158–229, Mar. 2007, doi: 10.1128/MMBR.00036-06.
- [68] S.-C. Yang, C.-H. Lin, C. T. Sung, and J.-Y. Fang, "Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals," 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- [69] H. M. Behrens, A. Six, D. Walker, and C. Kleanthous, "The therapeutic potential of bacteriocins as protein antibiotics," 2017, doi: 10.1042/ETLS20160016.
- [70] T. Zhang *et al.*, "Biosynthesis and Production of Class II Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria," *Fermentation*, vol. 8, no. 5. MDPI, May 01, 2022. doi: 10.3390/fermentation8050217.
- [71] D. Field, P. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross, "Uncorrected proofs-not for distribution 2 Bacteriocin Biosynthesis, Structure, and Function".
- [72] P. Alvarez-Sieiro, M. Montalbán-López, D. Mu, and O. P. Kuipers, "Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 7. Springer Verlag, pp. 2939–2951, Apr. 01, 2016. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9.
- [73] J. Chen, A. van Heel, and O. Kuipers, "Subcellular Localization and Assembly Process of the Nisin Biosynthesis Machinery in *Lactococcus lactis*," *mBio*, vol. 11, no. 6, pp. e02825-20, 2020.
- [74] M. Lagedroste, S. H. J. Smits, and L. Schmitt, "Substrate Specificity of the Secreted Nisin Leader Peptidase NisP," *Biochemistry*, vol. 56, no. 30, pp. 4005–4014, Aug. 2017, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00524.

- [75] C. I. Cheigh and Y. R. Pyun, "Nisin biosynthesis and its properties," *Biotechnology Letters*, vol. 27, no. 21, pp. 1641–1648, Nov. 2005. doi: 10.1007/s10529-005-2721-x.
- [76] M. Nishie, J. I. Nagao, and K. Sonomoto, "Antibacterial Peptides 'Bacteriocins': An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications," *Biocontrol Sci*, vol. 17, no. 1, pp. 1–16, 2012, doi: 10.4265/BIO.17.1.
- [77] S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, and S. Rebuffat, "Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria," *Nat Prod Rep*, vol. 24, no. 4, pp. 708–734, Jul. 2007, doi: 10.1039/B516237H.
- [78] O. Gillor, B. C. Kirkup, and M. A. Riley, "Colicins and Microcins: The Next Generation Antimicrobials," *Adv Appl Microbiol*, vol. 54, pp. 129–146, Jan. 2004, doi: 10.1016/S0065-2164(04)54005-4.
- [79] D. B. Diep and I. F. Nes, "Ribosomally Synthesized Antibacterial Peptides in Gram Positive Bacteria," 2002.
- [80] I. Wiedemann *et al.*, "Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 1772–1779, 2000, doi: 10.1074/jbc.M006770200.
- [81] M. Kordel, F. Schiiller, and H.-G. Sahl, "Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes," 1989.
- [82] A. Prince *et al.*, "Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends on Its Crowding and Degree of Oligomerization," *Sci Rep*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37908.
- [83] R. W. Jack, J. R. Tagg, and B. Ray, "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria," 1995. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/mr>
- [84] H. Brotz, B. Brotz, G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds, and H.-G. Sahl, "The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II," 1998. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aac>
- [85] Y. Héchard and H.-G. Sahl, "Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria," 2002.
- [86] D. Drider, G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen, and H. Prévost, "The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 70, no. 2, pp. 564–582, Jun. 2006, doi: 10.1128/MMBR.00016-05/FORMAT/EPUB.
- [87] D. B. Diep, M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo, and I. F. Nes, "Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins," 2007. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/
- [88] J. Nissen-Meyer, C. Oppegård, P. Rogne, H. S. Haugen, and P. E. Kristiansen, "Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins," *Probiotics Antimicrob Proteins*, vol. 2, no. 1, pp. 52–60, Mar. 2010, doi: 10.1007/s12602-009-9021-z.

- [89] R. H. Perez, T. Zendo, and K. Sonomoto, "Circular and leaderless bacteriocins: Biosynthesis, mode of action, applications, and prospects," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, no. SEP. Frontiers Media S.A., Sep. 04, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.02085.
- [90] M. D. C. de Freire Bastos, M. L. Varella Coelho, and O. C. da Silva Santos, "Resistance to bacteriocins produced by gram-positive bacteria," *Microbiology (United Kingdom)*, vol. 161, no. 4. Microbiology Society, pp. 683–700, 2015. doi: 10.1099/mic.0.082289-0.
- [91] Z. Alkhatib, A. Abts, A. Mavaro, L. Schmitt, and S. H. J. Smits, "Lantibiotics: How do producers become self-protected?," *J Biotechnol*, vol. 159, no. 3, pp. 145–154, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.01.032.
- [92] R. Ra, M. M. Beerthuyzen², W. M. De Vos², E. J. Saris¹, and O. P. Kuipers¹, "Effects of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity," *Microbiology (N Y)*, vol. 145, p. 233.
- [93] S. Soltani *et al.*, "Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 45, no. 1. Oxford University Press, Jan. 01, 2021. doi: 10.1093/femsre/fuaa039.
- [94] M. Do Carmo De Freire Bastos, M. Lívio, V. Coelho, O. Cabral, and S. Santos, "Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria", doi: 10.1099/mic.0.082289-0.
- [95] L. A. Draper, K. Grainger, L. H. Deegan, P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross, "Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147," *Mol Microbiol*, vol. 71, no. 4, pp. 1043–1054, Feb. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06590.x.
- [96] B. Jarvis and J. Farr, "Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, vol. 227, no. 2, pp. 232–240, Feb. 1971, doi: 10.1016/0005-2744(71)90056-8.
- [97] Z. Xuanyuan *et al.*, "Loss of IrpT function in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N8 results in increased nisin resistance.," *Curr Microbiol*, vol. 61, no. 4, pp. 329–334, 2010, doi: 10.1007/s00284-010-9615-4.
- [98] U. Bertsche *et al.*, "Correlation of daptomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 55, no. 8, pp. 3922–3928, Aug. 2011, doi: 10.1128/AAC.01226-10.
- [99] M. A. Riley and J. E. Wertz, "BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application," *Annu. Rev. Microbiol*, vol. 56, pp. 117–154, 2002, doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.
- [100] K. Nishio, J. Ma, S. Arora, S. Kaur, and S. Kaur, "Bacteriocins as Potential Anticancer Agents," 2015, doi: 10.3389/fphar.2015.00272.
- [101] H. Badani, R. F. Garry, W. C. Wimley, and K. Hristova, "Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: The importance of interfacial hydrophobicity ☆," 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.04.015.

- [102] B. B. Mona ElDisougi Elyass and S. A. Professor Mohammed Taha Shigidi, "Identification of Some Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and Characterization of their Bacteriocins," 2004.
- [103] A. W. Negash and B. A. Tsehai, "Current Applications of Bacteriocin," *International Journal of Microbiology*, vol. 2020. Hindawi Limited, 2020. doi: 10.1155/2020/4374891.
- [104] L. H. Deegan, P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross, "Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension," *Int Dairy J*, vol. 16, pp. 1058–1071, 2006, doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.026.
- [105] H. Ç. Üstündağ and H. Yalçın, "Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanımı Bacteriocins and Used in Foods", [Online]. Available: <http://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/sabed/index>
- [106] E. Çağlar, N. Topcuoglu, S. K. Çildir, N. Sandalli, and G. Kulekci, "Oral colonization by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 after exposure to probiotics," *Int J Paediatr Dent*, vol. 19, no. 5, pp. 377–381, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1365-263X.2009.00989.x.
- [107] A. Greppi, P. T. Asare, C. Schwab, N. Zemp, R. Stephan, and C. Lacroix, "Isolation and Comparative Genomic Analysis of Reuterin-Producing *Lactobacillus reuteri* From the Chicken Gastrointestinal Tract," *Front Microbiol*, vol. 11, Jun. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.01166.
- [108] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 2, p. 025103, Dec. 2015, doi: 10.1088/0957-4484/27/2/025103.
- [109] * J Nowroozi, M. Mirzaei, and M. Norouzi, "Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria," 2004.
- [110] D. Uzundağ, "Tavukların gastrointestinal sisteminden izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerin ve liyofilize ekzopolisakkaritlerin (L-EPS) Bifidobakterilerin gelişimini düzenleyici etkisinin belirlenmesi," *Gazi Üniveristesi*, 2019.
- [111] B. Srinu, T. Madhava Rao, P. V. Mallikarjuna Reddy, and K. Kondal Reddy, "Evaluation of different lactic acid bacterial strains for probiotic characteristics," *Vet World*, vol. 6, no. 10, pp. 785–788, Sep. 2013, doi: 10.14202/vetworld.2013.785-788.
- [112] C. G. Vinderola and J. A. Reinheimer, "Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative 'in vitro' study of probiotic characteristics and biological barrier resistance," *Food Research International*, vol. 36, no. 9–10, pp. 895–904, 2003, doi: 10.1016/S0963-9969(03)00098-X.
- [113] A. Menconi *et al.*, "Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria in a Commercial Probiotic Culture."
- [114] M. TOKATLI, "Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi," 2013.

- [115] *Susceptibility testing, Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing.*
- [116] Y. Shao, W. Zhang, H. Guo, L. Pan, H. Zhang, and T. Sun, “Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*,” *Food Control*, vol. 50, pp. 250–258, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.003.
- [117] M. R. F. Moreno, R. Callewaert, B. Devreese, J. Van Beeumen, and L. De Vuyst, “Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources,” 2003.
- [118] R. Whittenbury, “Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria,” 1963.
- [119] A. F. Mohd Adnan and I. K. P. Tan, “Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential,” *Bioresour Technol*, vol. 98, no. 7, pp. 1380–1385, May 2007, doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.034.
- [120] U. Wendel, “Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics—A Review,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, Frontiers Media S.A., Jan. 27, 2022, doi: 10.3389/fmicb.2021.818468.
- [121] N. Karapetkov, R. Georgieva, R. Rumyan, and E. Karaivanova, “Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains,” *Benef Microbes*, vol. 2, no. 4, pp. 335–339, Dec. 2011, doi: 10.3920/BM2011.0016.
- [122] E. Mani-López, D. Arriola-Bretón, and A. López-Malo, “The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 21, no. 1, pp. 604–641, Jan. 2022, doi: 10.1111/1541-4337.12872.
- [123] J. Apa Jalahtii, A. Kettunen, and H. Graham, “World’s Poultry Science Association,” *Worlds Poult Sci J*, vol. 60, 2004, doi: 10.1079n;VPS2004.
- [124] D. Pan and Z. Yu, “Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet,” *Gut Microbes*, vol. 5, no. 1, pp. 108–119, Oct. 2013, doi: 10.4161/gmic.26945.
- [125] R. T. Voegelé, G. D. Sweet, and W. Boos, “Glycerol Kinase of *Escherichia coli* Is Activated by Interaction with the Glycerol Facilitator,” 1993.
- [126] M. Moradi *et al.*, “Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 19, no. 6, pp. 3390–3415, Nov. 2020, doi: 10.1111/1541-4337.12613.
- [127] J. Wang, M. Ishfaq, Y. Guo, C. Chen, and J. Li, “Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* Isolated From Chickens as Feed Additives,” *Front Vet Sci*, vol. 7, Jul. 2020, doi: 10.3389/fvets.2020.00415.
- [128] K. Rumjuankiat, N. Ngamyeesoon, A. Swetwiwathana, and K. Pilasombut, “Study for Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* KL-D4 Isolated from Duck Intestine,” *International Journal of Agricultural Technology*, vol. 13, no. 6, pp. 823–837, 2017.

- [129] A. Sirichoat *et al.*, “Antibiotic susceptibility profiles of lactic acid bacteria from the human vagina and genetic basis of acquired resistances,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 7, Apr. 2020, doi: 10.3390/ijms21072594.
- [130] M. A. Dar *et al.*, “Salmonella typhimurium in poultry: A review,” *Worlds Poult Sci J*, vol. 73, no. 2, pp. 345–354, Mar. 2017, doi: 10.1017/S0043933917000204.
- [131] M. S. Kalhor, A. K. Anal, D. H. Kalhor, T. Hussain, G. Murtaza, and M. H. Mangi, “Antimicrobial Activities and Biopreservation Potential of Lactic Acid Bacteria (LAB) from Raw Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk,” *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2023, 2023, doi: 10.1155/2023/8475995.
- [132] M. GÜLLÜCE *et al.*, “Pastırmadaki Potansiyel Bakteriyosinogenik Laktik Asit Bakterileri,” *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Nov. 2020, doi: 10.17714/gumusfenbil.768688.
- [133] R. B. McFee, “Nosocomial or Hospital-acquired Infections: An Overview,” *Disease-a-Month*, vol. 55, no. 7, pp. 422–438, Jul. 2009. doi: 10.1016/j.disamonth.2009.03.014.
- [134] A. E. Mergani, D. Wanes, N. Schecker, K. Branitzki-Heinemann, H. Y. Naim, and M. von Köckritz-Blickwede, “Staphylococcus aureus Infection Influences the Function of Intestinal Cells by Altering the Lipid Raft-Dependent Sorting of Sucrase–Isomaltase,” *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, Aug. 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.699970.
- [135] M. S. Kang *et al.*, “Antimicrobial activity of Lactobacillus salivarius and Lactobacillus fermentum against Staphylococcus aureus,” *Pathog Dis*, vol. 75, no. 2, Mar. 2017, doi: 10.1093/femspd/ftx009.
- [136] I. Koşar, “Investigation of double carbapenem efficiency in experimental sepsis of colistin resistant Klebsiella pneumoniae,” *North Clin Istanb*, 2020, doi: 10.14744/nci.2020.14238.
- [137] M. A. El-Mokhtar, K. M. Hassanein, A. S. Ahmed, G. F. M. Gad, M. M. Amin, and O. F. E. Hassanein, “Antagonistic activities of cell-free supernatants of lactobacilli against extended-spectrum β -lactamase producing Klebsiella pneumoniae and Pseudomonas aeruginosa,” *Infect Drug Resist*, vol. 13, pp. 543–552, 2020, doi: 10.2147/IDR.S235603.
- [138] R. Lagrèfeuille *et al.*, “Opposing effect of Lactobacillus on in vitro Klebsiella pneumoniae in biofilm and in an in vivo intestinal colonisation model,” <https://doi.org/10.3920/BM2017.0002>, vol. 9, no. 1, pp. 87–100, Oct. 2017, doi: 10.3920/BM2017.0002.
- [139] T. Y. M. Raras, A. F. Firdausy, I. R. Kinanti, and N. Noorhamdani, “Anti-Biofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir against Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae,” *J Pure Appl Microbiol*, vol. 13, no. 2, pp. 983–992, 2019, doi: 10.22207/JPAM.13.2.35.
- [140] L. Mogna, F. Deidda, S. Nicola, A. Amoroso, M. Del Piano, and G. Mogna, “Vitro Inhibition of Klebsiella pneumoniae by Lactobacillus delbrueckii Subsp. delbrueckii LDD01 (DSM 22106) An Innovative Strategy to Possibly Counteract Such Infections in Humans?,” *J Clin Gastroenterol*, vol. 50, pp. S136–S139, Dec. 2016, doi: 10.1097/MCG.0000000000000680.

- [141] S. Messaoudi *et al.*, “Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51,” *Food Microbiol*, vol. 32, no. 1, pp. 129–134, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.fm.2012.05.002.
- [142] N. J. Stern *et al.*, “Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective,” *Microb Ecol Health Dis*, vol. 20, no. 2, pp. 74–79, 2008, doi: 10.1080/08910600802030196.
- [143] W. Wajjwalku and S. Nitisinprasert, “Purification and amino acid sequence of bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine,” 2006. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/26469845>
- [144] E. A. Svetoch *et al.*, “Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 77, no. 8, pp. 2749–2754, Apr. 2011, doi: 10.1128/AEM.02481-10.
- [145] S. Flynn, D. Van Sinderen, G. M. Thornton, H. Holo, I. F. Nes, and J. K. Collins, “Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118,” 2002.
- [146] L. J. Harris, M. A. Daeschel, M. E. Stiles, and T. R. Klaenhammer, “Copyright© International Association of Milk,” 1989.
- [147] N. Dabour, A. Zihler, E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss, “In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*,” *Int J Food Microbiol*, vol. 133, pp. 225–233, 2009, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.005.
- [148] M. A. de Pablo, J. J. è Gaforio, A. M. Gallego, E. Ortega, A. M. Ga èlvez, and G. Alvarez de Cienfuegos Lo è pez, “Evaluation of immunomodulatory ejects of nisin-containing diets on mice”, doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01262.x.
- [149] Anjana and S. K. Tiwari, “Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., May 16, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.851140.
- [150] M. B. nica Wachsman *et al.*, “Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses,” *Int J Antimicrob Agents*, vol. 12, pp. 293–299, 1999, Accessed: Jun. 04, 2023. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/isc
- [151] A. O’Callaghan and D. van Sinderen, “Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. JUN. Frontiers Media S.A., 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00925.
- [152] L. Zhong, X. Zhang, and M. Covasa, “Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer,” *World J Gastroenter-ol*, vol. 20, no. 24, pp. 7878–7886, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i24.7878.
- [153] L. Bai, S. Kumar, S. Verma, and S. Seshadri, “Bacteriocin PJ4 from probiotic *lactobacillus* reduced adipokine and inflammasome in high fat diet induced

- obesity,” *3 Biotech*, vol. 10, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1007/s13205-020-02317-y.
- [154] M. Del Rocío López-Cuellar, A.-I. Rodríguez-Hernández, N. Chavarría-Hernández, M. Del Rocío López-Cuellar, A.-I. E. Rodríguez-Hernández, and N. Chavarría-Hernández, “LAB bacteriocin applications in the last decade,” *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 30, no. 6, pp. 1039–1050, Nov. 2016, doi: 10.1080/13102818.2016.1232605.
- [155] B. S. Kang *et al.*, “Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect,” *Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 1, pp. 101–109, Feb. 2009, doi: 10.1007/s12275-008-0179-y.
- [156] E. Yang, L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette, and S. Fillmore, “Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts,” *AMB Express*, vol. 2, p. 1, 2012, doi: 10.1186/2191-0855-2-48.
- [157] M. V Leal-Sánchez, R. Jiménez-Díaz, A. Maldonado-Barragán, A. Garrido-Fernández, and J. L. Ruiz-Barba, “Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 68, no. 9, pp. 4465–4471, 2002, doi: 10.1128/AEM.68.9.4465-4471.2002.
- [158] O. K. Koo, S. M. Kim, and S. H. Kang, “Antimicrobial potential of *Leuconostoc* species against *E. coli* O157:H7 in ground meat,” *J Korean Soc Appl Biol Chem*, vol. 58, no. 6, pp. 831–838, Dec. 2015, doi: 10.1007/s13765-015-0112-0.
- [159] H. A. Hartmann, T. Wilke, and R. Erdmann, “Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food,” *Int J Food Microbiol*, vol. 146, no. 2, pp. 192–199, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.031.
- [160] W. Pelyuntha, C. Chaiyasut, D. Kantachote, and S. Sirilun, “Cell-free supernatants from cultures of lactic acid bacteria isolated from fermented grape as biocontrol against *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium virulence via autoinducer-2 and biofilm interference,” *PeerJ*, vol. 2019, no. 8, 2019, doi: 10.7717/peerj.7555.
- [161] P. Wingfield, “Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate,” in *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc., 1998, p. A.3F.1-A.3F.8. doi: 10.1002/0471140864.psa03fs13.
- [162] K. C. Duong-Ly and S. B. Gabelli, “Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation,” in *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., 2014, pp. 85–94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
- [163] D. Wessel and U. I. Flügge, “A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids,” 1984.
- [164] S.-C. Yang, C.-H. Lin, C. T. Sung, and J.-Y. Fang, “Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals,” 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00241.

- [165] R. Islam *et al.*, “Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria and Extraction of Bacteriocin Protein,” *Advances in Bioscience and Biotechnology*, vol. 11, no. 02, pp. 49–59, 2020, doi: 10.4236/abb.2020.112004.
- [166] W. K. M. Al-Tememy, I. A. Al-Ani, M. Q. Al-Ani, N. T. Al-Alusi, and S. Ismail, “Isolation of *Lactobacillus salivarius* from Children and Purification of Bacteriocin to Inhibition Cancer Cell in Vitro,” *Int J Adv Sci Eng Inf Technol*, vol. 1, no. 1, p. 104, 2011, doi: 10.18517/ijaseit.1.1.24.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Bedir E., Özbek T., Kotil E., Ortakçı F., (2023) “Kanatlı Gastrointestinal Sisteminden Özgün Laktik Asit Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve Biyoteknolojik Yönden Değerlendirilmesi”, 11. Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi, 02-03 Mayıs 2023

