T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Staphylococcus epidermidis ve *Staphylococcus aureus'* a AİT QUORUM SENSİNG SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN *Lactococcus lactis'*in NİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ (QUORUM SENSİNG CROSS-TALK ANALİZİ)

Murat Kemal AVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GEBZE
2008

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Staphylococcus epidermidis ve *Staphylococcus aureus'* a AİT QUORUM SENSİNG SİNYAL MOLEKÜLLERİNİN *Lactococcus lactis'*in NİSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ (QUORUM SENSİNG CROSS-TALK ANALİZİ)

Murat Kemal AVCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İ.Yavuz SEZEN

Tez İkinci Danışmanı

Doç. Dr. Filiz GÜREL

GEBZE

2008

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ	MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ JÜRİ ONAY FORMU

JÜRİ

ÜYE (BAŞKAN) : Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN

ÜYE : Doç. Dr. Filiz GÜREL

ÜYE : Yard. Doç. Dr. Yosun MATER

ÜYE : Yard. Doç. Dr. Melek ÖZKAN

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **23/06/2008** tarih ve **2008/2** sayılı kararı ile yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından düzenlenen 14/07/2008 tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde Yüksek Lisans öğrencisi **Murat Kemal AVCI**'nın çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu ...../...../..... tarih ve ..../..../..... sayılı kararıyla Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Staphylococcus epidermis ve *Staphylococcus aureus*' a ait Quorum Sensing sinyal moleküllerinin *Lactococcus lactis*'in Nisin üretimi üzerine etkisi (Quorum Sensing Cross-Talk analizi)

Murat Kemal AVCI

Quorum sensing (QS), bakterilerin "otoindükleyici" denilen sinyal molekülleri aracılığıyla, ortamdaki hücre/sinyal molekülü yoğunluğuna bağlı olarak iletişim kurabilmelerini sağlayan bir mekanizmadır.

Bu çalışmada özellikle hastane kaynaklı hastalıkların baş etmeni olmakla birlikte süt gibi gıdalarda yaygın olarak görülen *Staphylococ* suşları ve günümüzde doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan tek bakteriyosin olan Nisin antibiyotiğini üreten *Lactococcus lactis* kullanıldı.

Tez çalışması kapsamında ilk olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 ve *Staphylococcus aureus* A950227 suşlarına ait üreme eğrileri (OD_{600} x Zaman grafiği) belirlenerek, farklı bakteri yoğunluğunun elde edileceği süreler tespit edildi [örneğin lag fazı (t_1), eksponansiyel faz başlangıcı (t_2) ve sonu (t_3)]. Bakteriler, belirlenen süre sayısı kadar (örneğin t_1, t_2, t_3 sürelerinin her biri için 1 adet) sıvı besi yerinde üremeye bırakıldı. Her bir besiyeri, sırayla, belirlenen sürenin (t_1, t_2, t_3) sonunda santrifüj edildi. Kültür üst sıvıları sadece sinyal peptitleri içerecek şekilde özel filtrelerle (Centricon 3 kDa) süzüldü ve bu sinyal peptitlerin süpernatanttaki varlığı MALDI-MS yöntemiyle tespit edildi.

Bu şekilde hazırlanan kültür üst sıvıları *Lactococcus lactis* ATCC 11454 suşunun ekileceği sıvı besiyerlerine çeşitli kombinasyonlarda ilave edildi. *Staphylococcus* süpernatantı ve GM17 besiyeri karışımında bir gece üremeye bırakılan *L. lactis* ATCC 11454' ün süpernatantı alındı. *L. lactis* ATCC 11454' e ait süpernatantın indikatör suş üzerinde inhibisyon etkisi damlatma yöntemiyle incelendi ve oluşan inhibisyon zonlarının çapları değerlendirildi.

Böylece Staphylococcal süpernatanta bağlı olarak *L. lactis* ATCC 11454' ün Nisin antibiyotiğini üretim kapasitesinde bir artış veya azalış olup olmadığı araştırıldı. Sonuç olarak Staphylococcal sinyal peptitlerini içeren süpernatantın *L. lactis* ATCC 11454' te Nisin üretimini artırmadığı, diğer bir ifadeyle *Staphylococcus* genusu ile *Lactococcus* genusu arasında Quorum Sensing mekanizması açısından pozitif bir korelasyon olmadığı tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: Quorum Sensing, cross-talk, *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Lactococcus lactis,* Nisin, Sinyal peptitleri (AIPs), MALDI-MS).

SUMMARY

The effect of Quorum Sensing signal molecules of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* on Nisin production of *Lactococcus lactis* (Quorum Sensing Cross-Talk analysis)

Murat Kemal AVCI

Quorum sensing (QS) is a mechanism by which bacteria communicate each other using some signal molecules called “autoinducer” according to cell or signal molecule density.

The species used in this study have been choosen in painstakingness: *Staphylococci* are the main cause of nosocomial infections as well as exist in foods such as milk commonly. *Lactococcus lactis* produce antibiotic of Nisin which is uniqe bacteriocine have being used as a food protective, nowadays.

In this study, first of all, growth curves of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 and *Staphylococcus aureus* A950227 (OD_{600} x Time graphics) were determined. According to these graphics, the time in which different cell density could be obtained were choosen [i.e., lag phase (t_1), beginning (t_2) and end (t_3) of exponantial phase]. The strains were inoculated in batch cultures as amount as the time choosen (i.e. each cultures were inoculated just for t_1, t_2 or t_3,). Each cultures were centrifugated at the end of the time determined (t_1, t_2, t_3), by turns. Supernatants were filtrated by special filters to assure if there are signal peptides in the supernatants. Then, the presence of this molecules in supernatants were shown by MALDI-MS..

Supernatants prepared were added to the batch culteres in which *Lactococcus lactis* ATCC 11454 will be inoculated in different stages. In the combinations of Staphylococcal supernatants and GM17 broth, *L. lactis* was growth overnight and then its supernatants were obtained. The indicator strains were exposed by the

supernatant of *L. lactis* ATCC 11454 and the diameters of inhibition zones appered due to the supernatants were studied.

By means of all applications above, it was aimed to see whether there are any increase or decrease in the capacity of Nisin production of *L. lactis* ATCC 11454 related to Staphylococcal supernatants. As a result, we reach that the supernatants including Staphylococcal autoinducer peptides (AIPs) did not increase Nisin production of *L. lactis* ATCC 11454. In another words, there is no positive correlation between the genus of *Staphyloccoccus* and *Lactococcus* in respect of Quorum Sensing mechanisms.

Keywords : Quorum Sensing, cross-talk, *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Lactococcus lactis*, Nisin, autoinducer signal peptides (AIPs), MALDI-MS.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama başlamamda ve deney süreçlerinde maddi ve manevi desteklerinden dolayı Tez Danışmanım Sayın **Prof. Dr. İ.Yavuz SEZEN**'e,

Tezimin proje haline gelmesinde, deneysel süreçlerin kontrolünde yardımlarından dolayı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi, Tez Yardımcı Danışmanım Sayın **Doç. Dr. Filiz GÜREL**'e

Akademik hayata başlamamda beni yönlendiren ve cesaretlendiren, tez konumun şekillenmesinde değerli önerilerini esirgemeyen değerli Hocam, Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D. Başkanı **Prof. Dr. Sezai TÜRKEL**'e,

Quorum Sensing mekanizmasına yönelik yaptıkları çalışmalarla literatüre bir çok bilgi kazandıran, tezimde kullandığım dört *Staphylococ* suşunu gönderme nezaketinde bulunan ve konuyla ilgili sorularımıza her zaman pozitif cevaplar vererek yardımlarını esirgemeyen National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institute of Health [NIAID/NIH (USA)]'den **Dr. Michael OTTO**'ya,

Tezimin önemli bir bölümünü ilgilendiren Nisin ile ilgili deneysel aşamaları öğrenmemde ve ilgili kaynakları temin etmemde yardımcı olan Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden **Ar. Gör. Ömer ŞİMŞEK**'e,

Laboratuvar deneyimi kazanmamda büyük emekleri geçen ve tezimi başından sonuna kadar her türlü yardımlarıyla destekleyen GYTE Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuarı'ndan **Ar. Gör. Çiğdem İLERİ**, **Ar. Gör. Tuğrul DORUK**, **Ar. Gör. Fatih AKYOL**, **Ar. Gör. Mine GÜL ŞEKER** ve **Teknisyen Özlem ASKER**'e,

Deneylerime devam edebilmemde ve çeşitli akademik programlara katılmamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Bilimsel Araştırma ve Geliştirme Merkezi **(BAGEM)** yetkililerine, Sayın **Dr. Arif AVCI**'ya, değerli arkadaşlarım **Salih Değirmenci**, **Özcan BUDAK**, GYTE Kimya Bölümü'nden

Bünyamin ÇOŞUT, Pergel Yayınları Pazarlama ve Satış Müdürü **Yasin YILMAZ**'a,

Deneylerimin büyük bir kısmını yaptığım GYTE Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı yetkililerinden Sayın **Doç Dr. Aziz TANRISEVEN** ve **Doç Dr. Ali TÜRKAN**'a

Yüksek lisans tezimin bitmesini dört yıldır sabırla bekleme nezaketini gösteren annem **Medine AVCI** ve babam **Mürsel AVCI**' ya **en içten duygularımla teşekkürlerimi sunarım…**

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET iv

SUMMARY vi

TEŞEKKÜR viii

İÇİNDEKİLER DİZİNİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiii

RESİMLER DİZİNİ xiv

ŞEKİLLER DİZİNİ xviii

GRAFİKLER DİZİNİ xx

TABLOLAR DİZİNİ xxiii

1.GİRİŞ 1

1.1. Quorum Sensing (Yoğunluğa Bağlı Algılama) Mekanizması 2

1.1.1. QS Mekanizmasını Kullanan Organizma Grupları 7

1.1.2. QS Mekanizmasıyla Kontrol Edilen Davranışlar 8

1.1.3. QS Mekanizmasında Kullanılan Sinyal Molekülleri 8

1.1.4. QS Mekanizmasında Görevli Genler ve Gen Anlatımının Düzenlenmesi 9

1.1.5. QS Mekanizmasının Çeşitleri 10

1.2. Quorum Sensing Cross-Talk Mekanizması 12

1.3. Tez Konusunun Oluşumu, Özgünlüğü ve Bilime Katkısı 15

1.4. *Staphylococcus* Genusu 17

1.4.1. *Staphylococcus aureus* 17

1.4.2. *Staphylococcus epidermidis* 19

1.4.3. Staphylococcal *agr* Mutantları (Pozitif ve Negatif Kontroller) 23

1.4.4. Staphylococcal Quorum Sensing Sinyal Peptitleri (AIPs) 25

1.4.4.1. MALDI-MS **26**

1.5. Lactococcus Genusu ve *Lactococcus lactis* 27

1.6. Nisin 28

1.7. Bakteriyel Üreme Eğrileri 29

2. MATERYAL ve METOT 34

2.1. MATERYALLER 34

2.1.1. Bakteri Suşları 34

2.1.2. Besiyerleri 34

2.1.3. Malzeme ve Cihazlar 36

2.1.4. Nisaplin 36

2.1.5. Ultrafiltreler (Centricon 3 kDa) 37

2.2. Metodlar 38

2.2.1. BakterilerinÜretimi 39

2.2.2. Stok Kültürlerin Hazırlanması 41

2.2.3. Nisin AktivitesininBelirlenmesi 44

A. Genel Prosedür **44**

B. Nisin Aktivitesini Belirlemeye Yönelik Yapılan Çalışmalar **45**

B.1. *L. lactis* ATCC 11454 Suşunun Nisin Aktivitesinin İncelenmesi **45**

B.2. *L. lactis* ATCC 11454 Suşunun Nisin Aktivitesinin İncelenmesinde Farklı Ekim Yöntemlerinin Kullanımı (Ön Denemeler) **45**

2.2.4. Nisin Standart Grafiğinin Belirlenmesi 51

2.2.5. Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi **54**

A. Genel Prosedür **54**

B. Üreme Eğrilerini Belirlemek İçin Yapılan Deneyler **55**

2.2.6. Staphylococcal Süpernatantın (QS Sinyal Moleküllerini İçeren Sıvının) Elde Edilmesi **75**

A. Genel Prosedür **75**

B. Staphylococcal Süpernatantın Eldesine Yönelik Yapılan Deneyler **76**

2.2.7. Staphylococcal Süpernatantta QS Siyal Peptitlerinin Varlığının Tespit Edilmesi **78**

A. MALDI-MS Yöntemiyle Sinyal Peptitlerin Tespit Edilmesi **78**

2.2.8. Staphylococcus-Lactococcus Etkileşiminin Belirlenmesi (QS-CT Uygulaması) **81**

A. Genel Prosedür **81**

B. *Staphylococcuc – Lactococcus* Kombinasyonu Deneyleri **83**

2.2.9. İnhibisyon Zon Çaplarının Ölçümü **91**

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA **97**

4. SONUÇ **109**

EKLER **110**

KAYNAKLAR DİZİNİ **113**

ÖZGEÇMİŞ **120**

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

QS	Quorum sensing
QS-CT	Quorum sensing cross-talk
AI	Otoindükleyici (autoinducer)
AIPs	Otoindükleyici peptitler (Autoinducer peptides)
ÖK	Ön Kültür
AHL	Açil Homoserin Lakton
HSL	Homoserin Lakton
TSB	Trypticase Soy Broth
TSA	Trypticase Soy Agar
GM17B	Glukoz M17 Broth
GM17A	Glukoz M17 AGAR
MRSB	MRS Broth
MRSA	MRS Agar
MRS-SA	MRS Soft Agar
LB	Luria Bertani Broth
LBA	Luria Bertani Agar
NIAID/NIH	National Institute of Allergy and Infectious Dısease/National Institute of Health;
SDS-PAGE	Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Gel Elektroforezi
MALDI-MS	Matrix-Assisted Laser Desorbtion/Ionization Mass Spectrometry
HPLC	High Performance Liquid Chromotography
TF	Transkripsiyon faktörü
SPN	Süpernatant
g	gram
g	relative cenrifuge force (rcf)
ml	mililitre
µl	mikrolitre
IU (AU)	Uluslar arası enzim birimi (International Unit)
ºC	Santigrat derece
€	EURO

RESİMLER DİZİNİ

Resim **Sayfa**

1.1 Konuyla ilgili yurt dışı yayınlarında Quorum Sensing mekanizmasına atıfta bulunan bir karikatür: "Herkes hazır mı? Yemeğe başlayabilir miyiz!" **2**

1.2 *S. epidermidis*'in tarama elektron mikrosbu görümü. (Vuong ve ark., 2004'den alınmıştır). **20**

1.3 *S. epidermidis wt* ve izogenik *agr* mutant suşuna ait protein profilleri SDS-PAGE analizi. Ekzoproteinler: 1: *agr*+, 2: *agr* mutant. Yüzey-bağlı proteinler (SDS ile kaynatılarak hazırlanan): 3: *agr*+, 4: *agr* mutant. Yüzey-bağlı proteinler (liyostafin ile muamele edilerek hazırlanan): 5: *agr*+, 6: *agr* mutant. (Voung ve ark., 2000' den alınmıştır.) . **23**

1.4 Agar ortamında lipaz ve proteaz aktivitesi. A) Proteaz aktivitesi B) Lipaz aktivitesi. Her iki mutant türünde hem proteaz hem de lipaz aktivitisinde azalma görülmektedir (Voung ve ark., 2000'den alınmıştır.). **24**

2.1 Tez çalışmasında kullanılan bakteriyel suşlar. A) *L. lactis* ATCC 11454 (Nisin üreticisi) B) *M. luteus* RSKK 1123 (indikatör suş) C) *L. plantarum* ATCC 8014 (indikatör suş) D) *S. epidermidis* ATCC 14990 E) *S. aureus* A950227 F) *S. epidermidis* 1457 *agr* (+)) *S. epidermidis* 1457 *agr* (-). **34**

2.2 Nisaplin, Nisinin ticari olarak hazırlanan formu. A) 25 g'lık Nisaplin kutusu B) Açık halde saf Nisin. **36**

2.3 Ultrafitrasyon amacıyla kullanılan özel filtre; Centricon-3. A) Santrifüje konulmadan önce, B) Santrifüjden sonra süzülen kısım (filtrat), C) Santrifüjden sonra filtrenin üstünde kalan kısım, D) Geri kazanım için santrifüje konulmadan önce. **37**

2.4 -80 ºC'ta saklanacak stoklarının hazırlanması. A) Saf halde Gliserol, B) Gliserolle karıştırılmış bakteri kültürleri buz içerisinde, C) Numunelerin -80 ºC'ta bekletildiği özel buzdolabı. **41**

2.5 +4 ºC'ta saklanacak stoklar. Deneylerde kullanılacak her bir suşun broth ve agar besiyerlerinde beşer adet stoğu hazırlandı. A) *S. epidermidis* ATCC 14990/TSB, B) *S. epidermidis* ATCC 14990/ TSA, C) *S. aureus* A950227/TSB, D) *S. aureus* A950227/TSA, E) *S. epidermidis* 1457 wt/TSB, F) *S. epidermidis* 1457 wt/TSA, G) *S. epidermidis* 1457 agr (-)/TSB, H) *S. epidermidis* 1457 agr (-)/TSA. **42**

2.6 +4 ºC'ta saklanacak stoklar. Deneylerde kullanılacak her bir suşun broth ve agar besiyerlerinde beşer adet stoğu hazırlandı. I) *L. lactis* ATCC 11454/GM17 Broth, J) *L. lactis* ATCC 11454/GM17 Agar K) *M. luteus* RSKK 1123/LB Broth, L) *M. luteus* RSKK 1123/LB Agar M) *L. plantarum* ATCC 8014/MRS Broth, N) *L. plantarum* ATCC 8014/MRS Agar. **43**

2.7 L. *lactis* ATCC 11454 suşunda Nisin aktivitesinin belirlenmesi. A) Damlatma yöntemi sonucunda oluşan koloniler, B) Bir koloni grubunun yakın görünüm, C ve D) İndikatör suşlarda görülen inhibisyon zonları. **45**

2.8 Nisin aktivitesinin gözlendiği bir petriden görünümler. **46**

2.9 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin nokta ekim yöntemiyle incelenmesi. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası oluşan inhibisyon zonları. **48**

2.10 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin süpernatant damlatma yöntemiyle incelenmesi. Besiyeri TSA, indikatör suş ***S. epidermidis***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası üstten görünüm C) İnhibisyon zonları. **49**

2.11 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin süpernatant damlatma yöntemiyle incelenmesi. Besiyeri **GM17**, indikatör suş ***L. mesenteriodes***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) İnhibisyon zonu, yakından görünüm. **49**

2.12 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin süpernatant damlatma yöntemiyle incelenmesi. Besiyeri **MRS**, indikatör suş ***L. mesenteriodes***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası üstten görünüm C) İnhibisyon zonları. **49**

2.13 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **bakteri kültürü emdilirdi**. Besiyeri TSA, indikatör suş ***S. epidermidis***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) Disklerin yakından görünümü. **50**

2.14 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **bakteri kültürü emdirildi**. Besiyeri MRS, indikatör suş ***L. mesenteriodes***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) Disklerin yakından görünümü. **50**

2.15 *L. lactis* ATCC 11454**'**ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **bakteri süpernatantı emdirildi**. Besiyeri TSA, indikatör suş *S.epidermidis* A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) Disklerin yakından görünümü. **51**

2.16 *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **süpernatant** emdirildi. Besiyeri MRS, indikatör suş *L. mesenteriodes.* A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) İnhibisyon zonları. **51**

2.17 Ultrafiltrasyon sonucunda elde edilen Staphylococcal süpernatantlar. Ok ile gösterilen kısımlar 3 kDa'dan küçük olan molekülleri içeriyor. **78**

2.18 Üç farklı zamanda üretilen *Staphylococ* kültürlerinden elde edilen süpernatantların *L.lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimine etkinin **disk yöntemiyle** incelenmesi. A) Disk1-9, B) Disk10-18, C) Disk19-27, D) Disk28-36 E) Kontrol. [*S. aureus* A950227 suşunun 5 saatlik kültürüne ait süpernatant kullanılmadığı için 6, 18 ve 30 nolu diskler konulmadı] **86**

2.19 Üç farklı zamanda üretilen *Staphylococ* kültürlerinden elde edilen süpernatantların *L. lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimine etkisinin **damlatma yöntemiyle** incelenmesi. A) Disk1-9, B) Disk10-18, C) Disk19-27, D) Disk28-36. E) Kontrol. **86**

2.20 Üç farklı zamanda üretilen *Staphylococ* kültürlerinden elde edilen süpernatantların *L lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimine etkisinin **kuyu yöntemiyle** incelenmesi. A) Disk1-9, B) Disk10-18, C) Disk19-27, D) Disk28-36 E) Kontrol. **87**

2.21 *L.* lactis ATCC 11454'te Nisin aktivitesinin **disk yöntemiyle** incelenmesi. Üç farklı üreme fazındaki *Staphylococ* kültürüne ait süpernatantlar kullanılmıştır. A) I.GRUP/1, Disk-1-6 B) I.GRUP/2, Disk-7-12, C) II.GRUP/1, Disk-13-18, D) II.GRUP/2, Disk-19-24, E) III.GRUP/1, Disk-25-30 F) III.GRUP/2, Disk-31-36, G) V.GRUP/1, Disk-49-54, I) V.GRUP/2, Disk-55-60 **87**

2.22 *L.* lactis ATCC 11454'te Nisin aktivitesinin **damla yöntemiyle** incelenmesi. Üç farklı üreme fazındaki *Staphylococ* kültürüne ait süpernatantlar kullanılmıştır. A) I.GRUP/1, Disk-1-6 B) I.GRUP/2, SPN-7-12, C) II.GRUP/1, SPN-13-18 D) II.GRUP/2, SPN-19-24, E) III.GRUP/1, SPN-25-30 F) III.GRUP/2, SPN-31-36, G)V.GRUP/1, SPN-49-54, I) V.GRUP/2, SPN-55-60. **88**

2.23 *L.* lactis ATCC 11454'te Nisin aktivitesinin **kuyu yöntemiyle** incelenmesi. Üç farklı üreme fazındaki *Staphylococ* kültürüne ait süpernatantlar kullanılmıştır. A) I.GRUP/1, SPN-1-6 B) I.GRUP/2, SPN-7-12, C) II.GRUP/1, SPN-13-18 D) II.GRUP/2, SPN-19-24, E) III.GRUP/1, SPN-25-30 F) III.GRUP/2, SPN-31-36, G) V.GRUP/1, SPN-49-54 I) V.GRUP/2, SPN-55-60. **88**

2.24 Üç farklı üreme süresine tabi tutulan Staphylococcal kültürlere ait süpernatantların 2 ml toplam hacimde (5'li kombinasyonlu) GM17 ile karışımı sonucunda elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi. İndikatör suş olarak *M. luteus* RSKK 1123 suşu kullanıldı. **89**

2.25 Resim.20'nin tekrarıdır. Üç farklı üreme süresine tabi tutulan *Staphylococcal* kültürlere ait süpernatantların 2 ml toplam hacimde (5'li kombinasyonlu) GM17 ile karışımı sonucunda elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi. İndikatör suş olarak *M. luteus* RSKK 1123 kullanıldı. **90**

2.26 Üç farklı üreme süresine tabi tutulan *Staphylococcal* kültürlere ait süpernatantların 2 ml toplam hacimde (5'li kombinasyonlu) GM17 ile karışımı sonucunda elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi. İndikatör suş olarak *M. luteus* RSKK 1123 suşu kullanıldı. Resim 2.24 ve 2.25'den farkı *L. lactis* ATCC 11454 besiyerine eklenen Staphylococcal süpernatantın ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmamış olmasıdır. **90**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1	3-OXO-C6-HSL.	**3**
1.2	AHL moleküllerinden a) 3-oxo-C12-HSL ve b) C4-HSL.	**5**
1.3	Bazı Gram (+) türlerde kullanılan sinyal molekülleri.	**9**
1.4	Salgılanan sinyal molekülü çeşidi ve sinyal molekülünü algılama sistemlerine göre QS çeşitleri.	**11**
1.5	Gram (+) bakterilerde Oligopeptit Sistemi. (Xavier and Bassler, 2003' den alınmıştır.	**12**
1.6	Otto ve ark. (2001)' na ait QS-CT mekanizmasına yönelik yaptıkları araştırmada kullanılan, *S. epidermidis* ve *S. aureus* alt gruplarına ait QS sinyal peptitleri.	**14**
1.7	Staphylococcus genusunda *agr* sistemi. P2 operonu, RNAII aracılığıyla, sinyal iletim mekanizmasını kodlar. P3 operonunun transkripti RNAIII ise *agr* lokusunun effektör molekülü olarak görev alır. Kutu içerisindeki faktörler, yoğunluğa bağlı cevabın ve virülans genlerinin ekstra düzenleyicileri olarak gösterilmiştir. Çevresel sinyaller aracılığıyla kullanılan potansiyal düzenleyici yolaklar noktalı çizgilerle belirtilmiştir. [Yarwood and Schlievert, 2003' den alınmıştır.].	**19**
1.8	Staphylococcal *agr* sistemi. (Novick and Muir, 1999'dan alınmıştır.)	**21**
1.9	A) *Syaphyloccoccal agr* sistemi. *S. aureus* alt grupları ve *Staphylococcus lugdunensis'in ö*n görülen B) AgrB, C) AgrD ve D) AgrC proteinlerinin amino asit dizilerinin karşılaştırılması. (Ji et al, 1997'den alınmıştır)	**22**

1.10 *S. epidermidis*'e ait Quorum Sensing sinyal peptit yapısı. (Otto ve ark.,1998'den alınmıştır). **25**

1.11 Lantibiyotik nisin A'nın şematik gösterimi. **28**

2.1 Katı ve sıvı besiyerlerinin hazırlanması. **35**

2.2 Tez çalışmasında takip edilen aşamalar. **38**

2.3 GYTE Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen suşların üretimi. Benzer işlemler diğer suşlara da uygulanmıştır. **40**

2.4 *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının kuyu yöntemiyle ekimi.için agar üzerinde oluşturulan kuyuların temsili gösterimi. **44**

2.5 Nisin aktivitesinin belirlenmesinde bakteri (*L. lactis* ATCC 11454) nokta ekim yöntemi. Bu yöntemde indikatör suş soft agar halinde muamele edilmektedir.**46**

2.6 Nisin standart grafiğinin hazırlanması. **52**

2.7 Üreme eğrilerinin belirlenmesinde takip edilen işlemler. **55**

2.8 Deney-4'ün temsili gösterimi. 10-15-25 ve 30 ml'lik TSB besiyerlerine 0.1-0.5 ve 1 ml *S. epidermidis* ATCC 14990 önkültürü ekildi. **65**

2.9 Deney-5'in temsili gösterimi. 10-15-20-25 ve 30 ml'lik TSB besiyerlerine 0.1-0.5-1-2 ve 3 ml'lik *S. aureus* A950277 ön kültürü (ÖK) ekildi. **69**

2.10 Staphylococcal süpernatantların elde edilme aşamaları. (Ji ve ark., 1995'den uyarlanmıştır.). **77**

2.11 Üç farklı sürede elde edilen S*taphylococcal* süpernatantlar ve bu süpernatantların GM17 besiyerine eklenme oranları (ml/ml). 1) S. epidermidis

ATCC 14990, 2) *S. aureus* A950227 3) S. epidermidis 1457 wt *agr* (+) 4) S. epidermidis 1457 *agr* (-). **81**

2.12 Staphylococcal süpernatant (SPN) ile *L. lactis* ATCC 11454 besiyeri GM17'nin kombinasyon oranları. **82**

2.13 *Staphylococcal* süpernatant (SPN) ile *L. lactis* besiyeri GM17'nin toplam 2 ml hacimde karışım kombinasyonlarının temsili gösterimi. **82**

2.14 *Staphylococ* süpernatantlarının GM17 besiyerine ilave edilme miktarları. Yapılan ekimler Tablo 2.10'daki gibi adlandırılmıştır. **83**

2.15 *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının disk, damla ve kuyu yöntemleriyle uygulanmasında kullanılan ekim numaraları. **85**

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik **Sayfa**

1.1 Otto ve ark.'nın yaptıkları QS-CT çalışması sonucunda *S. aureus* alt grupları ile *S. epidermidis* arasında, QS mekanizmasıyla kontrol edilen delta-toksinin üretiminin inhibisyonuyla ilgili grafikler. **A)** *S. epidermidis*'e ait süpernatantın *S. aureus* alt grupları üzerindeki etkisi. **B)** *S. aureus*'a ait 4 alt grubun *S. epidermidis* üzerindeki etkisi. **14**

1.2 Bakteri populasyonuna ait tipik bir üreme eğrisi. (In Vitro Cultivation of Microorganisms, sf. 85). **31**

1.3 Üreme eğrisine paralel olarak QS sinyal peptitlerinin ve bu moleküller aracılığıyla sentezlenen ekstraselüler protein miktarının karşılaştırmalı gösterimi. **33**

2.1 Nisaplin standart grafiği:100-700 IU/ml Nisaplin. **53**

2.2 *Staphylococcal* üreme eğrileri. A) *S. epidermidis* ATCC 14990, B) *S. aureus* 950227 C) *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) D) *S. epidermidis* 1457 *agr* (-). **58**

2.3 *S. epidermidis* ATCC 14990'ın farklı başlangıç konsantrasyonlarıyla oluşturulan üreme eğrileri. A) OD_{600}: 0.1 B) OD_{600}: 0.3 C) OD_{600}: 0.5 D) OD_{600}: 0.7 E) OD_{600}: 0.9 **59**

2.4 Staphylococcal üreme eğrileri. A) *S. epidermidis* ATCC 14990 B) *S. aureus* 950227 C) *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) D) *S. epidermidis* 1457 *agr* (-) **66**

2.5 *S. epidermidis* ATCC 14990 ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi**: Aynı miktardaki besiyerlerinde** farklı konsantrasyonlardaki ekimler. 10 ml TSB'de, B) 15 ml TSB'de **0.1-0.5 ve 1 ml**'lik ön kültür ekimleri. **66**

2.6 *S. epidermidis* ATCC 14990 ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi**: Aynı besiyerinde** farklı konsantrasyonlardaki ekimler. A) 25 ml TSB'de, B) 30 ml TSB'de **0.1-0.5 ve 1 ml**'lik ön kültür ekimleri. **67**

2.7 *S. epidermidis* ATCC 14990 ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi**:** Farklı miktarlarda besiyerlerinde **aynı konsantrasyonlardaki** ekimler. **10-15-25-30 ml TSB'de** A) 0.1 ml ÖK B) 0.5 ml ÖK C) 1 ml ÖK ekimleri. **68**

2.8 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: A) **10 ml TSB'de** B) **15 ml TSB'de** 0.1-0.5 ve 1 ml ön kültür ekimleri. **70**

2.9 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: A) **20 ml TSB'de** B) **25 ml TSB'de** 0.5-1-2 ve 3 ml ön kültür ekimleri. **71**

2.10 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: **30 ml TSB'de** 0.5 ve 3 ml'lik ön kültür ekimleri. **72**

2.11 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 10 ve 15 ml TSB besiyerine **0.1 ml** ön kültür ekimleri. **72**

2.12 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 10-15-20 ve 30 ml TSB'de **0.5 ml'lik** ön kültür ekimleri. **73**

2.13 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 10-15-20 ve 25 ml TSB'de **1 ml'lik** ön kültür ekimleri. **73**

2.14 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 20 ve 25 ml TSB'de **2 ml'lik** ön kültür ekimleri. **74**

2.15 *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 25 ve 30 ml TSB'de **3 ml'lik** ön kültür ekimleri. **75**

2.16 *S. epidermidis* ATCC 14990'ın 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta AIPs varlığını gösteren MALDI-MS grafiği. **79**

2.17 *S. aureus* A950227'nin 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta AIPs varlığını gösteren MALDI-MS grafiği. **79**

2.18 *S. epidermidis* 1457 wt agr (+)'in 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta AIPs varlığını gösteren MALDI-MS grafiği. **80**

2.19 *S. epidermidis* 1457 agr (-)'in 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta MALDI-MS sonucunda AIPs varlığı görülmedi. **80**

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo **Sayfa**

1.1 *S. aureus* tarafından salgılanan ekzoproteinler. **8**

2.1 *L. lactis* ATCC 11454 suşunun Nisin aktivitesinin incelenmesinde kullanılan farklı ekim yöntemleri. **47**

2.2. Nisaplin aktivitesi (100- 700 IU/ml) sonucu elde edilen inhibisyon zonları Nisaplin aktivitesi (100- 700 IU/ml) sonucu elde edilen inhibisyon zonları. **53**

2.3 Nisaplin aktivitesi (10.000-100.000 IU/ml) sonucu elde edilen inhibisyon zonları. **53**

2.4 *Staphylococ* suşlarına ait D_{600} değerleri. **57**

2.5 *S. epidermidis* ATCC 14990 suşunun beş farklı konsantrasyonda başlatılan OD_{600} değerleri. **60**

2.6 30 ml besiyerinde dört Staphylococcal suşa ait OD_{600} değerleri. **62**

2.7 Deney-4'te yapılan ekimlerin adlandırılması. **64**

2.8 *S. epidermidis* ATCC 14990 suşuna ait 0D600 değerleri. **64**

2.9 *S. aureus* A950227 suşuna ait OD600 değerleri. **75**

2.10 Elde edilen *Staphylococcal* süpernatantların *L. lactis* ATCC 11454 besiyerine ilavesi ile ilgili yapılan deneylerden birine ait kombinasyonların numaralandırma ve adlandırılması. **84**

2.11 *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm). **91**

2.12 *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm). **92**

2.13 *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm). **93**

2.14 *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm). **94**

2.15 *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm). **95**

2.16 *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm). **96**

3.1 Süpernatant elde edilen Staphylococcal kültürlerin ekim anında ve üreme sürelerinin sonunda belirlenen OD600 değerleri. **100**

GİRİŞ

Bakterilerin birbirleri ile iletişim kurabildiklerinin keşfedilmesi yaşadığımız dünyada yer alan 'basit ve tek hücreli' organizmalarla ilgili genel görüşlerimizi değiştirmiştir. Bu küçük canlılar, bizim kullandığımız dil yerine, besiyeri ortamına salgıladıları "sinyal molekülleri" ni kullanırlar. Bakteriler, bu sinyal moleküllerini bulundukları ortama salgılamakla kalmaz aynı zamanda populasyonda bulunan sinyal moleküllerinin miktarını (konsantrasyonunu) da algılayabilirler (www.nottingham.ac.uk/quorum/).

Bakteriler, bizdeki "sözcük" lere karşılık gelen bir takım "kimyasal sinyal molekülleri"ni kullanarak iletişim kurmaktadır. Bu iletişim sürecinde, **"otoindükleyici [autoinducer, (AI)]"** denilen sinyal moleküllerini sırasıyla **salgılar**, **algılar** ve sonuçta bu moleküllere **yanıt verirler.**

Hemen hemen bakterisiz bir ortam olmadığı, herkes tarafından bilinen bir gerçektir. Bu bağlamda mikroorganizmalar, günlük hayatımızın bir parçası haline gelmiş durumdadır. Her ne kadar bazı özellikleriyle insanoğlu için faydalı olsa da karşılaştığımız bir çok çevresel sorunların, çeşitli hastalık ve ölümcül durumların kaynağı da yine bakterilerdir. Dolayısıyla, bilimsel çalışmalar, bu canlıların yararlı özelliklerini arttırmaya, zararlı özelliklerini engellenmeye yönelik araştırmalar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Quorum Sensing (QS) mekanizması, derinliklerine doğru inildikçe bakteriler arasında kullanılan bu lisanın şifrelerini daha ileri düzeylerde çözmemize yardımcı olacak, buna bağlı olarak da veterinerlik, gıda, tıp, farmakoloji, ziraat ve biyoteknoloji gibi alanlarda uygulamaya yönelik atılımlar yapmamızı sağlayacaktır.

1.1. Quorum Sensing (Yoğunluğa Bağlı Algılama) Mekanizması

Sinyal moleküllerinin algılanması, bakterinin bulunduğu ortamda düşük veya yüksek miktardaki populasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini mümkün kılmakta ve bu sayede ortamda hücre sayısındaki değişikliğe cevap olarak gen ekspresyonunun **populasyon düzeyinde** kontrolü sağlanmaktadır. Bu olay **"Quorum Sensing"** olarak ifade edilmektedir. Başka bir deyimle Quorum Sensing, bir bakteri populasyonunda gen ekspresyonunun, bütün bir popülasyonun gen ekspresyonu dikkate alınarak koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizmasıdır (Schauder ve Bassler, 2001) (Resim 1.1).

Resim 1.1: Konuyla ilgili yurt dışı yayınlarında Quorum Sensing mekanizmasına atıfta bulunan bir karikatür: "Herkes hazır mı? Yemeğe başlayabilir miyiz!".

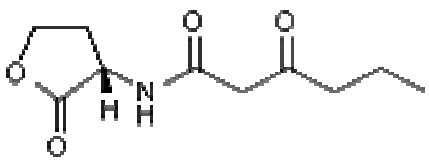
QS mekanizması, **prokaryot** ve **ökaryot** kavramları arasındaki farkın karıştırılmasına neden olmaktadır. Çünkü bu mekanizma sayesinde tek hücreli prokaryotik mikroorganizmalar, çok hücreli ökaryotik organizmalar gibi hareket etmekte ve bu da onlara tek başlarına elde edemeyecekleri bir takım avantajlar kazandırmaktadır. Birçok bakteriyel davranış, QS mekanizmasıyla kontrol edilmektedir. Simbiyozis, virülans, antibiyotik üretimi ve biyofilm oluşumu bu davranışlardan bazılarıdır (www.nottingham.ac.uk/quorum/).

Populasyon içerisindeki bakteriler, **"otoindükleyici (AI)"** denilen kimyasal molekülleri salgılayarak ve bu moleküllere yanıt vererek diğer bakterilere varlıklarını bildirirler. Quorum Sensing denilen bu iletişim mekanizması ilk kez 1960'larda deniz bakterisi *Vibrio fischeri*'de biyolüminesans olayında gösterilmiştir. Mekanizmanın keşfediliş süreci şu şekilde gerçekleşmiştir:

Yapılan çalışmalarda deniz biyolüminesans bakterisi *Vibrio fischeri* sıvı kültürlerde yetiştirilmekteydi ve bu kültürlerde ışık oluşumunun yalnızca ortamdaki bakteri sayısının çok fazla olduğu yoğunluklarda meydana geldiği gözlenmiştir (Greenberg, 1997).

Bu olayla ilgili ilk açıklamalar, kültür ortamının bir **biyolüminesans inhibitörü** içerdiği ve bu inhibitörün bakteriler tarafından çok fazla sayıya ulaşılarak **ortamdan uzaklaştırıldığı** şeklinde olmuştur (Kempner ve Hanson, 1968). Ancak ortamdaki bakteriler, üreme sürecinin başlangıcında ilgili maddelere maruz bırakılarak yetiştirildiğinde, biyolüminesans olayının düşük hücre yoğunluğunda da indüklendiği görülmüştür. Buna bağlı olarak, daha sonra biyolüminesans olayının bir inhibitör maddenin ortamdan uzaklaştırılması yoluyla değil de, bir **aktivatör molekülün** (AI) birikerek artması sonucu meydana geldiği anlaşılmıştır (Eberhard, 1972; Nealson ve ark., 1970). Bu molekül, bakteriler tarafından üretilmektedir ve yeterli konsantrasyon düzeyine ulaştığında biyolüminesansı aktive etmektedir. İlgili bakteriler otoindükleyici moleküllerin konsantrasyonunu izleyerek hücre yoğunluğunu algılayabilmektedir.

V. fischeri tarafından üretilen molekül ilk kez 1981'de Eberhard ve ark. tarafından izole edilmiş, özellikleri belirlenmiş [Açil-Homoserin Lakton (AHL veya HSL) türevi] ve N-(3-oxohexanoil)-homoserin lakton (3-oxo-C6-HSL) olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.1) (Eberhard ve ark., 1981).



Şekil 1.1 : 3-OXO-C6-HSL

V. fischeri'ye ait QS mekanizması için gerekli olan genlerin analizi ilk kez 1983'de Engebrech ve Greenberg tarafından yapılmıştır. Bu çalışma, bugün diğer QS sistemlerine örnek teşkil eden, *V. fischeri*' deki QS mekanizmasının esas modelini ortaya çıkartmıştır (Egland ve Greenberg, 1999).

Bunu takip eden yıllarda, AHL' ye bağlı çalışan QS mekanizmalarının sadece *V. fischeri* ve *V. harvei* gibi deniz bakterileriyle sınırlı olduğu zannedilmiştir. Ancak Nottingham ve Warwick'te yürütülen antibiyotik senteziyle ilgili araştırmalar, QS mekanizmasının düşünüldüğünden çok daha fazla geniş alana yayıldığını ortaya çıkartmıştır.

1990'ların başlarında Nottingham Üniversitesinden Barrie Bycroft ve Paul Williams (Nottingham, UK), Cambridge Üniversitesinden George Salmond (Warwick, UK)Carbapenem antibiyotiklerini üretemeyen *Erwinia carotovora* mutantlarıyla çalışmaktaydılar. Amaçları farklı mutantlarda hangi genlerin eksik olduğunu tespit etmek ve biyosentez yolunda gerekli olan bütün genlerin modelini çıkartmaktı.

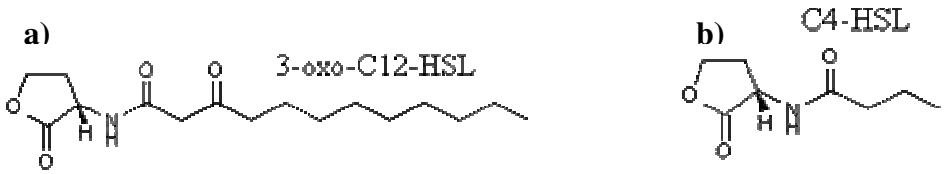
Çalışmalarında, ellerindeki bir mutant grubunun, sahip oldukları antibiyotiği üretemezken ikinci bir mutant grubuyla birlikte besi ortamına bırakıldıklarında bu antibiyotiği üretebildiğini gözlemlemiştirleri. Araştırmalar sonucunda ikinci gruptaki mutantların birinci grupta antibiyotik sentezini tetikleyen bir "sinyal molekülü" sentezlediği görülmüştür. Burada asıl keşfedilen şey söz konusu sinyal molekülünün, *Erwinia* ile tamamen ilişkisiz bir bakteri olan *V. fischeri*'de ışık oluşumunu tetiklemek için kullanılan sinyal molekülü ile aynı olmasıdır (Williams ve ark, 1992).

Bu konuyla ilgili araştırmacılar, biyolimünesans bakterilerinde kullanılan sinyal molekülüyle ilgili bir hayli deneyime sahip olan, Gordon Stewart ile aynı görüşleri paylaşmışlardır.

Aynı tarihlerde, Gambello ve Iglewski (1991) insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'nın da *V. fischeri* benzeri QS mekanizmasını kullandığını keşfetmişlerdir. Ancak bu çalışma, mekanizmanın **"ışık oluşumu"** için değil önemli

bir **virülans faktörü** olan "elastaz"ın üretimini düzenlemek için kullanıldığını ispatlamıştır. Elastaz üretiminin indüksiyonundan sorumlu AHL sinyal molekülü, 3-oxo-C12-HSL olarak isimlendirilmiştir (Şekil 1.2) (Gambello ve Iglewski, 1991).

Deniz bakterisi *Vibrio*'ların haricindeki diğer bakterilerin de AHL bağımlı QS sistemlerini kullandıklarının keşfedilmesi, farklı bakteriler tarafından üretilen AHL'lerin tespit edilmesini sağlayabilen "biyosensör"lerin gelişimine yol açmıştır (Chernin ve ark., 1998; Swift ve ark., 1993). Bu sensörler Enterobakter, Hafnia, Ranella ve Serratia cinslerindeki QS sistemlerini ortaya çıkarmak için kullanılmaktaydı. O zamandan beri, bu ve benzeri metotlar çok fazla sayıdaki QS türlerini tanımlamak için kullanılmaktadır.



Şekil 1.2 : AHL moleküllerinden a) 3-oxo-C12-HSL ve b) C4-HSL

Rhamnolipid, haemolisin ve diğer önemli virülans faktörlerinin sentezini düzenleyen ikinci bir QS mekanizması da Latifi ve ark. tarafından bulunmuştur (Latifi ve ark., 1995). Winson ve ark. bu sistemin C4-HSL üretiminden sorumlu olduğunu göstermişerdir. Bu sistem Ochsner ve ark. tarafından da bağımsız olarak keşfedilmiştir (Winson ve ark., 1995; Ochner ve ark., 1994; Ochner ve Reiser, 1995).

Mekanizmanın keşfedilmesinden ve bir takım verilerin literatüre girmesinden sonra bu konu farklı başlıklar altında sorgulanmıştır:

1. Hangi bakteri türleri QS mekanizmasını kullanıyor? Diğer bir ifadeyle hangi bakteriler hücre sayısındaki değişime bağlı olarak davranış değişikliği gösteriyor?

2. QS mekanizmasının görüldüğü bakteri türleri hangi sinyal moleküllerini kullanıyor?

3. Bu sinyal moleküllerini kodlayan genler/operonlar hangileridir?

4. Bu sinyal moleküllerinin algılanması hangi moleküllerle/mekanizmayla gerçekleşiyor?

5. Algılama mekanizmasında görevli moleküller hangi genlerden kodlanıyor?

6. İlgili tür, QS mekanizmasını hangi davranış/fenotip için kullanıyor?

Literatürde, özellikle yurt dışı kaynaklarında konuyla ilgili çok fazla sayıda ve çeşitte araştırma yapılmış ve makaleler, derlemeler (review'ler) yayınlanmıştır. Türkiye sınırları içerisinde doğrudan QS mekanizmasına yönelik araştırma sayısı ise oldukça sınırlıdır.

QS mekanizmasının genel işleyiş prensibine baktığımızda üç aşamadan oluşmaktadır (Kievit ve Iglewski, 2000):

1. **Sentezleme** (Sinyal molekülünün sentezlenmesi)
2. **Salgılama** (Sinyal moleküllerinin besi ortamına salgılanması)
3. **Algılama** (Sinyal moleküllerinin algılanması)

Birinci aşamada her türün, kendine özgü genleri kullanılarak, bakteriyel üreme eğrileri dikkate alındığında eksponansiyal fazın sonlarına doğru, giderek artan bir şekilde sinyal molekülleri üretilir. Yine türe özgü olacak şekilde sentezlenen sinyal molekülleri sitoplazmada ilgili moleküller tarafından modifiye edilerek hücre zarındaki özel bir sistem aracılığıyla ortama salgılanır. Sinyal moleküllerinin modifikasyonu ve ortama salgılanması protein yapısındaki özel moleküller aracılığıyla gerçekleşir.

Sinyal moleküllerinin algılanması iki yolla olmaktadır. Birincisi sinyal molekülünün hücre içine alınmasıyla, ikincisi ise sinyal molekülünün hücre içine alınmadan, hücre zarında bulunan bir reseptör ile etkileşimi yoluyla gerçekleşir (Schauder ve Bassler, 2001) .

1.1.1. QS Mekanizmasını Kullanan Organizma Grupları

İlk dönemlerde, QS mekanizması her ne kadar bakterilere mal edilse de yapılan araştırmalar sonucunda bu mekanizmanın hem ökaryot hem de prokaryot organizmalar tarafından kullanıldığı tespit edilmiştir. Buna göre QS iletişim mekanizması,

I. Aynı türe ait bakteriler arasında,
II. Farklı bakteri türleri arasında,
III. Prokaryot canlı ile ökaryot konağı arasında görülmektedir.

Yapılan çalışmalar bir çok bakteri türünün çeşitli amaçlarla bu mekanizmayı kullandığını göstermiştir (De Kievit ve Iglewski, 2000; Shiner ve ark., 2005).

Smith ve Iglewski (2003), *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülansında QS mekanizmasının rolünü, AHL moleküllerinin konak üzerindeki etkilerini ve bu moleküllerin *P. aeruginosa*'da patojeniteyi nasıl tetiklediğini araştırmıştır. Bu araştırmanın sonucunda QS mekanizmasının, *P. aeruginosa*'da virülansı etkileyen bir çok faktörün düzenlenmesinde rol aldığı, AHL moleküllerinin hem patojenite faktörü hem de hücre-hücre iletişiminde sinyal molekülü olarak görev yaptığı belirlenmiştir (Smith ve Iglewski,2003).

Joint ve ark., prokaryor-ökaryot hücreler arasındaki iletişim mekanizmasına yönelik bir araştırma yapmıştır. Gram negatif [Gram (-)] bakterilerin ve ökaryotik bir deniz bitkisi olan *Enteromorpha'*ya ait zoosporların kullanıldığı bu çalışmada, bakteriyel biyofilmlerin alg komünitelerinin gelişiminde önemli olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, ökaryotik alg zoosporlarının, bakteriyel sensör sistemleri olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Joint ve ark., 2002).

Valdez ve ark. (2005), probiyotik bir tür olan *Lactobacillus plantarum'*un *in vitro* ve *in vivo* olarak, *P. aureginosa*'da patojeniteyi inhibe etme özelliğini araştırmıştır. *L. plantarum*'un hem hücre kültürü hem de süpernatantının *P. aeruginosa* üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışma sonucunda, *L. platarum* ve/veya bu türe ait ürünlerin, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında lokal tedavi amacıyla terapötik ajan olarak kullanılabileceği ispat edilmiştir (Valdez ve ark., 2005).

1.1.2. QS Mekanizmasıyla Kontrol Edilen Davranışlar

Her türün QS mekanizmasını kullanma amacı farklıdır. Bu farklılık temelde genetik bilginin farklı olmasına dayanmaktadır. Bu mekanizma ile sporulasyon (Miller ve Bassler, 2001), konjugasyan (Fuqua ve ark., 1996; Piper ve ark., 1999), biyolüminesans (Greenberg,1997), hücre bölünmesi (Sitnikov, 1996), Lag fazından çıkma (Batchelor, 1997), nodül sayısını sınırlama (Gray, 1996; Rosemeyer, 1998), biyofilm oluşturma (Hammer ve Bassler, 2003; Davies, 1998), ekstraselüler enzimlerin salgılanması (Chapon-Hervé ve ark., 1997; Passador ve ark., 1993) , virülans faktörlerinin oluşumu (Booth ve ark., 1995), antibiyotik üretimi (Pierson, 1994; Wood ve ark., 1997), kommensal-patojen formlar arasında dönüşüm (Voung ve Otto, 2002; Arevalo-Ferro ve ark., 2003) vb. bir çok türe özgü davranış kontrol edilmektedir.

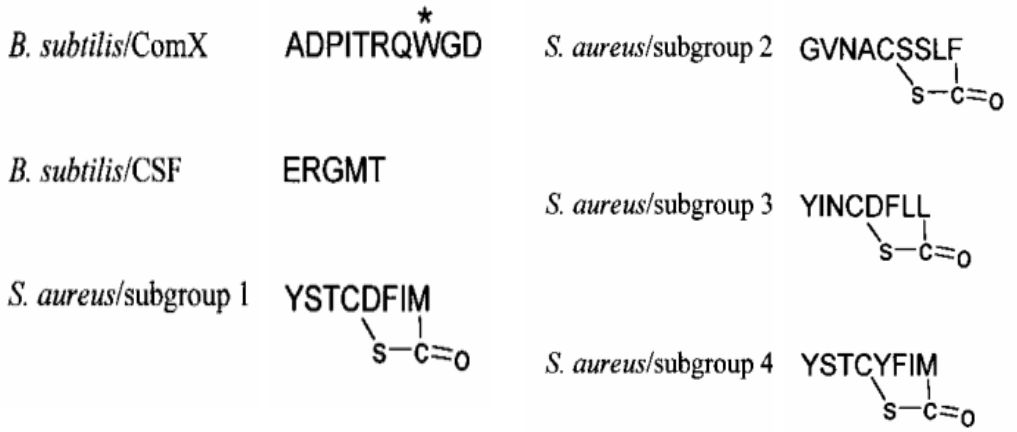
1.1.3. QS Mekanizmasında Kullanılan Sinyal Molekülleri

QS mekanizmasında kullanılan sinyal molekülleri türden türe değişmekle birlikte bakterilerin Gram (+) ve Gram (-) olma özelliği dikkate alınarak üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

1. Açil-Homoserin Lakton (AHL veya HSL) türevleri
2. Oligopeptitler
3. Furanosil borat diester türevleri

AHL sinyal molekülleri Gram (-) türler tarafından kullanılırken oligopeptit grubu sinyal molekülleri Gram (+) bakteriler tarafından kullanılır. Furan türevleri ise bazı Gram (-) veya Gram (+) türlerde ikinci sinyal molekülü olarak görev alır.

Bu tez çalışmasında Gram (+) bakteri türleri üzerinde çalışılmıştır. Gram (+) bakteriler 9-10 aminoasitten oluşan sinyal moleküllerine sahiptir. Aminoasit sayısı, sırası ve kompozisyonu türden türe değişmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 : Bazı Gram (+) türlerde kullanılan sinyal molekülleri.

Otto ve ark., *S. epidermidis'*e ait QS sinyal molekülünün yapısını belirlemeye yönelik yaptıkları bir çalışmada, 8 aminoasitten oluşan ve merkezi sistein residüsü ile C-terminali arasında bir tiolester bağı bulunan oligopeptit molekülünün *S. epidermidis'*e ait QS sinyal molekülü olduğunu tespit etmiştir (Otto ve ark., 1998).

Lyon ve ark. (2002)' nın *S. aureus*'a ait dört alt grubu kullanarak QS sinyal peptidinin reseptör aktivasyonunda gerekli anahtar determinantları belirlemeye yönelik yaptıkları araştırmada, bazı residülerin aktivasyon için şart olduğu, oligopeptidin lineer ve halkasal kısımlarının reseptörle fiziksel uyum açısından önemli ve aktivasyonda etkili olduğu sonuçlarını ortaya koymuşlardır (Lyon ve ark., 2002).

1.1.4 QS Mekanizmasında Görevli Genler ve Gen Anlatımının Düzenlenmesi

Bir bakteri türünün QS mekanizmasını kullanabilmesi, diğer bir ifadeyle kültürde bulunan bakterilerin populasyon yoğunluğuna bağlı olarak davranış değiştirmeleri, bu mekanizmayla ilgili genlere/operonlara sahip olmaları ile mümkündür. Dolayısıyla her bir tür QS mekanizmasıyla ilgili olarak kendi türüne özgü genleri kullanmaktadır. Bu genlerin ifade edilmesi çoğunlukla operon halinde gerçekleşmektedir.

QS mekanizmasıyla ilgili bulunan ilk genler *V. fischeri*'ye ait olan *lux* I/*lux* R genleridir. *V. fischeri*'de biyolüminesans olayının gerçekleşmesini kontrol eden ve ilk kez bulunması nedeniyle model sistem olarak kabul edilen LuxI/LuxR sisteminde, her bir gen, sürecin baştan sona eksiksiz gerçekleşmesini sağlayan moleküllerin/yapıların oluşumu için gerekli genetik bilgiyi taşımaktadır.

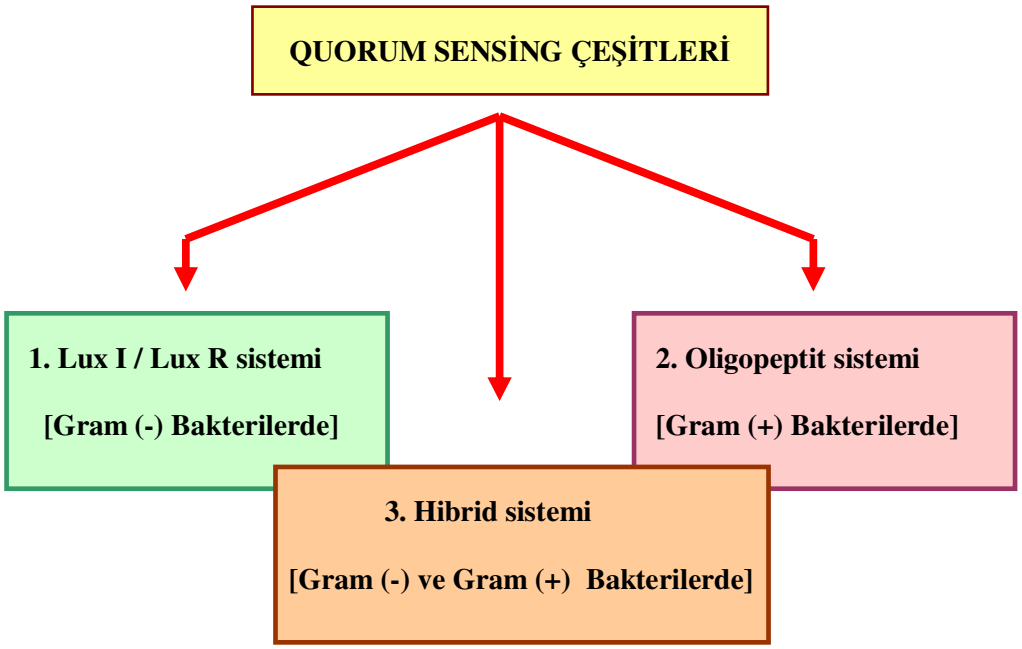
QS mekanizmasına yönelik çalışmalarda, bu mekanizmayla ilgili genin/genlerin belirlenmesi başlı başına bir araştırma alanıdır. Bu bağlamda, sinyal moleküllerini ve/veya sinyal moleküllerini kodlayan enzim sistemlerini (Li ve ark., 2004; Otto, 2001), algılama sistemlerini ve/veya bu sistemleri sentezleyen enzim sistemlerini (Freeman ve Bassler, 1999; Mok ve ark., 2003) kodlayan genleri belirlemek amacıyla ayrı ayrı çalışmalar yapılmış ve uygulamaya yönelik veriler elde edilmiştir.

1.1.5. QS Mekanizmasının Çeşitleri

QS mekanizmasında kullanılan sinyal moleküllerinin çeşidi ve bu moleküllerin algılanma mekanizmaları dikkate alındığında üç çeşit QS mekanizması vardır (Şekil 1.4) (Bassler, 1999);

1. LuxI/LuxR Sistemi [Gram (-) Bakterilerde]
2. Oligopeptit Sistemi [Gram (+) Bakterilerde]
3. Hibrit Sistem [Gram (-) ve Gram (+) Bakterilerde]

Bu tez çalışmasında Gram (+) bakteriler kullanılmıştır. Gram (+) bakteriler oligopeptit sistemine sahiptir. Bu sistemin iki önemli özelliği vardır: Birincisi, sinyal molekülü olarak ortalama 8-9 amino asitten oluşan kısa peptit zincirlerinin salgılanmasıdır. Bu kısa peptitler, önce pro-peptit olarak sentezlenir. Ardından sitoplazmada bulunan özel enzimlerle kesilip özgün uzunluğa kısaltılır ve son olarak türe özgü modifikasyonlara uğratıldıktan (gerekiyorsa halkasal yapı kazandırıldıktan) sonra hücre dışına salgılanır.



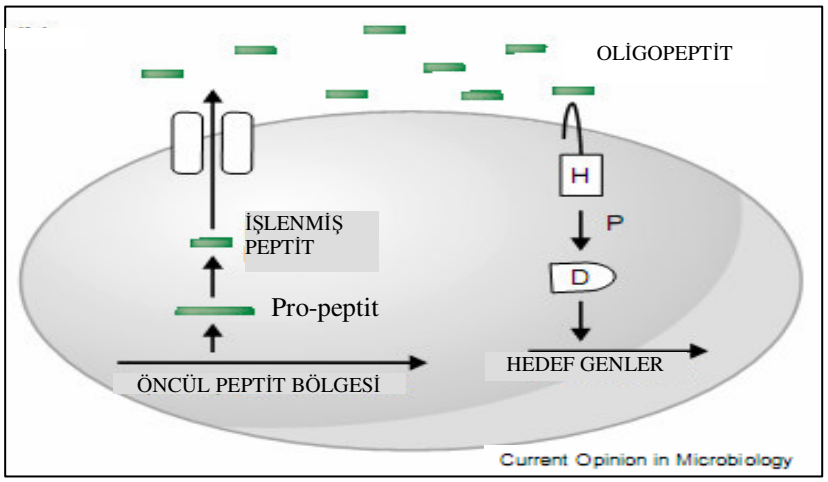
Şekil 1.4 : Salgılanan sinyal molekülü çeşidi ve sinyal molekülünü algılama sistemlerine göre QS çeşitleri.

.

Oligopeptit sisteminin diğer bir özelliği ise sinyal moleküllerinin algılanma mekanizmasıdır. Bu algılama mekanizması **"iki-bileşenli algılama sistemi"**nden oluşur. Bu sistemi oluşturan proteinlerden biri hücre zarına yerleşmiş olan bir **histidin kinaz'**dır. Diğeri ise histidin kinazın aktif olmasına bağlı olarak aktive olan bir **tanskripsiyon faktörü (TF)'**dür.

Besi ortamındaki sinyal molekülü konsantrasyonu eşik değeri aştığında hücre yüzeyinde reseptör-sinyal molekülü etkileşimi sonucu histidin kinaz proteinleri fosforile olur. Aktifleşen yüzey reseptör proteinleri hücre içerisinde ilişkili oldukları, sistemin ikinci bileşeni olan diğer proteini (TF) fosforlayarak aktive eder. Fosforilasyon-defosforilasyon yoluyla aktive olan TF'ler ilgili genleri aktive ederek gen ekspresyonunu sağlar. Buna bağlı olarak da Gram (+) bakterilerde QS mekanizmasına bağlı davranışlar gerçekleşir (Şekil 1.5) (Reading ve Sperandio, 2005; Xavier ve Bassler, 2003) .

Zatürre (pnömoni), kalp iç zarı iltitabı (endokardit) ve kemik iliği iltihabı (osteomiyelit) gibi hastalıklara neden olan *S. aureus*'ta ve gastrointestinal implantasyon malzemelerinde en sık görülen *Enterococcus faecalis'* te patojenite özelliği ve *Streptococcus pneumoniae'* de kompetens özelliği bu sistem tarafından kontrol edilir.



Sekil 1.5 : Gram (+) bakterilerde Oligopeptit Sistemi. (Xavier and Bassler, 2003' den alınmıştır.)

1.2. Quorum Sensing Cross-Talk Mekanizması

Mikroorganizmalar yalnızca kendi türlerine ait bireylerle değil farklı türlere ait diğer canlılarla da etkileşim halindedir. Bu nedenle QS mekanizması,

a. Aynı türe ait bireyler arasında (Species-spesific QS)

b. Farklı türe ait bireyler arasında (Interspecies QS) gerçeklemektedir.

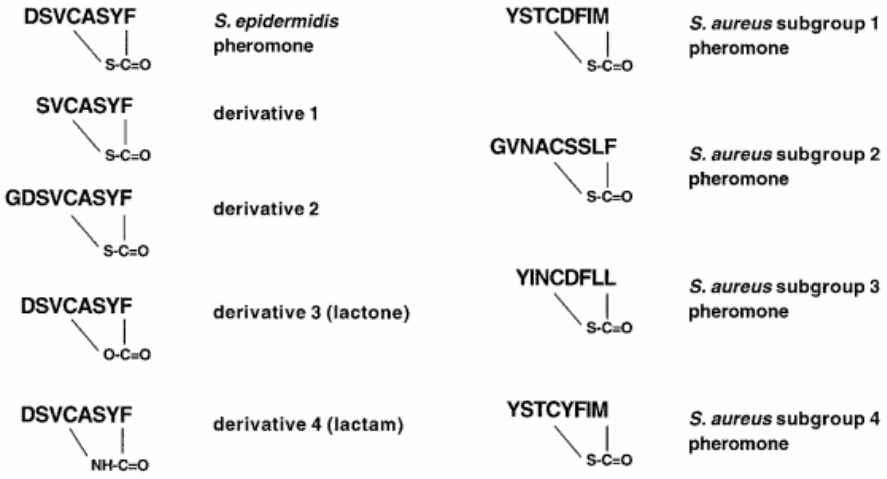
Farklı türler arasında geçekleşen QS mekanizması **Quorum Sensing Cross-Talk (QS-CT)** terimiyle ifade edilmektedir. QS-CT mekanizmasının, birçok mikrobiyolojik araştırma alanında uygulamaları bulunmaktadır. Özellikle biyofilm gibi karışık türlerin bulunduğu populasyonlarda hemen hemen her zaman bulunan doğal bakteriler üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır (March ve Bentley, 2006; www.nottingham.ac.uk/quorum/).

Türe özgü QS mekanizmasında Gram (-) bakteriler kendi aralarında AHL sinyal molekülleri ile haberleşirken, Gram (+) bakteriler kısa amino asit zincirlerini kullanmaktadır. QS-CT mekanizmasında ise Gram (-) ve Gram (+) bakteriler arasında, karışık kültürlerde otoindükleyici-2 (AI-2) denilen furanosil borat diester molekülleri aracılığıyla iletişim kurulmaktadır. 2004' de yayınlanan *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica* arasında hücre-hücre sinyal iletişim sistemi ile ilgili bir derlemede AI-2 moleküllerine işaret edilmektedir (Ahmer, 2004).

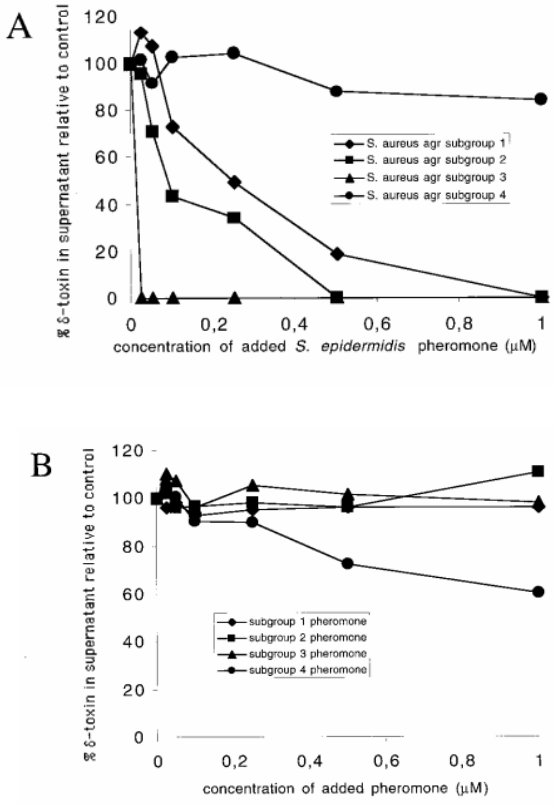
Gray (1997)' in bakterilerde hücrelerarası iletişim ve grup davranışı üzerine hazırladığı bir derlemede farklı bakterilerin ürettikleri otoindükleyici moleküllerin benzer veya kısmen benzer olmaları nedeniyle, bu moleküllerin yalnızca aynı türe ait bakteriler arasında değil farklı gruplara ait bakteriler tarafından da algılanabileceği, bu sayede bakterilerin tür içinde bir koordinasyon sağlamalarının yanı sıra aynı ortamda etkileşim halinde bulundukları, adeta "komşuları" diyebileceğimiz diğer türlere "kulak misafiri" olup metabolizmalarını ayarlayabilecekleri belirtilmektedir (Gray, 1997).

Marchand ve Bentley'in hazırladıkları bir derlemede QS-CT mekanizmasının biyoteknolojik uygulamaları açıklanmıştır. Bu kapsamda, QS mekanizmasının çeşitli fenotipler üzerindeki etkisi, deneysel olarak bazı uygulamalarda QS mekanizmasının ölçülebilir bir araç olarak kullanılabileceği, patojenlerle ve pestisitlerle mücadelede QS mekanizmasından yararlanılabileceği belirtilmiştir (March ve Bentley, 2006).

National Institute of Allergy and Infectious Dısease/National Institute of Health (NIH/NIAID, USA)' den Dr. Michael OTTO ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları QS-CT mekanizmasına yönelik bir araştırmada aynı cinse ait iki farklı tür (*S. aureus* ve *S. epidermidis*) arasında çapraz-inhibisyon durumu incelenmişdir. Bu çalışmada, bir yandan 1998'de yayınlanan farklı bir makalelerinde (Otto ve ark, 2008) *S. epidemidis*'e ait olduğunu tespit ettikleri sinyal molekülünün kimyasal yöntemlerle 4 farklı türevini oluşturup, *S. aureus*'a ait 4 alt grup üzerine muamele ederek *S. aureus*'un delta toksin üretimindeki aktivasyon/inhibisyon durumunu gözlemlemişlerdir. Diğer yandan da *S. aureus*'a ait dört alt gruptan ayrı ayrı elde edilen süpernatantların *S. epidermidis* üzerine muamele edilerek yine delta-toksin üretim özelliğindeki aktivasyon/inhibisyon durumu incelenmiştir (Şekil 1.6). Araştırmalarının sonucunda *S. epidermidis'*e ait sinyal peptidin *S. aureus*'a ait grup 1-2 ve 3 üzerinde delta-toksin üretimini inhibe edici etki gösterirken, alt grup-4 üzerinde aynı inhibisyon etkisini göstermediği belirlenmiştir. Bununla beraber, *S. aureus* alt gruplarından, grup 1-2 ve 3'e ait süpernatantlar *S. epidermidis*'de delta-toksin üretimini baskılamazken, alt grup-4'e ait süpernatant inhibisyon etkisi göstermiştir (Grafik 1.1) (Otto ve ark., 2001).



Şekil 1.6 : Otto ve ark. (2001)' na ait QS-CT mekanizmasına yönelik yaptıkları araştırmada kullanılan, *S. epidermidis* ve *S. aureus* alt gruplarına ait QS sinyal peptitleri.



Grafik 1.1: Otto ve ark.'nın yaptıkları QS-CT çalışması sonucunda *S. aureus* alt grupları ile *S. epidermidis* arasında, QS mekanizmasıyla kontrol edilen delta-toksinin üretiminin inhibisyonuyla ilgili grafikler. **A)** *S. epidermidis*'e ait süpernatantın *S. aureus* alt grupları üzerindeki etkisi. **B)** *S. aureus'*a ait 4 alt grubun *S. epidermidis* üzerindeki etkisi.

Bu tez çalışması, Dr. Michael OTTO ve arkadaşlarının yaptıkları yukarıdaki araştırmaya paralel bir QS-CT çalışması olup, bu çalışmadan farklı olan yönü, tercih edilen türler arasındaki farklılığın "tür" düzeyinde değil, "cins" düzeyinde olmasıdır (Yukarıdaki araştırmada *Staphylococcoccus* cinsine ait iki farklı tür ele alınırken, bu çalışmada *Staphylococcus* ve *Lactococcus* olmak üzere iki cinse ait türler tercih edilmiştir). Diğer bir ifadeyle, bu tez çalışmasının amacı "cins düzeyinde" QS-CT analizini yapmaktır. Sonuçların değerlendirilmesinde, Otto ve ark.'nın çalışmalarında süpernatanttaki delta toksin miktarı kriter alınırken, bu çalışmada Nisin aktivitesine bağlı olarak oluşan inhibisyon zonları dikkate alınmıştır.

1.3. Tez Konusunun Oluşumu, Özgünlüğü ve Bilime Katkısı

Tez/proje çalışmamızın ana çatısını yukarıda bahsedilen Otto ve ark.'nın 2001'de yayınlanan araştırmaları/makeleleri oluşturmaktadır. Buraya kadar yapılan açıklamalardan da anlaşıldığı gibi QS mekanizmasına sahip her bir türün bu mekanizmaya yönelik fenotipik özellikleri, ilgili bütün genleri ve bu genlerin anlatım durumları, sinyal molekülleri ve algılama mekanizmaları vs. gibi bütün bilinmeyenlerini belirledikten sonra, özellikleri belirlenen farklı türler arasındaki iletişim (inhibisyon/aktivasyon) mekanizmalarını araştırmak da ayrı bir öneme sahiptir. Diğer bir ifadeyle türe özgü QS mekanizmalarının keşfedilişi, ardışık olarak türler arası QS-CT araştırmalarını beraberinde getirmektedir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, QS-CT mekanizmasına yönelik, Otto ve ark.'nın makalelerine paralel bir şekilde fakat onlardan farklı olarak **aynı cinse ait türler değil farklı cinslere ait türler** tercih edilmiştir ve bu türler arasında **cins düzeyinde** QS-CT açısından pozitif veya negatif bir korelasyon (aktivasyon veya inhibisyon etkisi) olup olmadığını belirlemek hedeflenmiştir. Çalışmanın, cins düzeyinde QS-CT mekanizmasına yönelik olması ve tercih edilen cinslerin özellikleri açısında özgün olduğu düşünülmektedir.

Gram (+) cinsler içerisinde *Staphylococcus* ve *Lactococcus* cinslerinin tercih edilme nedeni, Bölüm 1.3 ve Bölüm 1.4'de görüldüğü gibi veterinerlik, gıda, tıp, endüstri ve biyoteknoloji uygulamaları açısından öneme sahip türlerin kullanılmasının, yapılan çalışmanın bilimsel niteliğinin yanı sıra ileriye dönük çalışmalara zemin hazırlaması açısından da konunun önemini arttıracağının öngörülmesidir.

Bu nedenle araştırmamızda kullanılacak mikroorganizma olarak, insan sağlığı ve süt gibi değerli ürünler ile doğrudan ilişkili *S. aureus* ile *S. epidermidis* ve yine sütte bulunan bir laktik asit bakterisi olup günümüzde besin koruyucusu olarak kullanılan tek bakteriyosini (nisin) üreten *L. lactis* seçildi.

Konunun özgünlüğünü farklı açılardan ifade etmek mümkündür. QS mekanizmasının 1960'lı yıllarda keşfedilmesine ve yurt dışı yayınlarda konuyla ilgili geniş çaplı bir araştırma zenginliği görülmesine rağmen Türkiye'de henüz bu konuyla ilgili kapsamlı bir araştırma yapılmamış ve geniş çaplı bir literatür oluşmamıştır. Belli başlı bazı üniversitelerde konuyla ilgili tez kapsamında yapılan çalışmalar bu konudaki eksikliğimizi ölçüde olsa azaltmaktadır. Bu açıdan bakıldığında konunun QS mekanizmasına yönelik olması ülkemiz sınırları içerisinde konuyla ilgili çalışmalara küçük bir destek sağlaması (veya destek olacağını düşünmemiz) açısından önemlidir.

QS-CT mekanizması açısından bakıldığında; QS mekanizmasının ilk keşfedildiği günden bugüne kadar her bir bakteri türünün Bölüm.1.1'de bahsedilen özellikleri tür kapsamında araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda elde edilen veriler ışığında bir sonraki adım olarak türler arası kombinasyonlar, etkileşimler incelenmeye başlanmıştır. Ancak literatürde cross-talk merkezli veri birikimi henüz çok fazla değildir. Bu açıdan, yaptığımız tez/proje çalışması literatüre, QS-CT mekanizmasına yönelik veri kazandırma ihtimali açısından da ayrıca öneme sahiptir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan türlere yönelik araştırmalar birbirinden bağımsızdır. Şöyle ki; *Staphylococ*'larla ilgili çalışmalar genellikle *S. aureus ve S. epidermidis'*in patojenite ve biyofilm özellikleri etrafında yoğunlaşırken, *L. lactis'*e yönelik çalışmalar genellikle nisin antibiyotiğini üretmesi ve gıda

sanayisinde ön kültür (starter suş) olarak kullanım potansiyeline yönelik yapılmaktadır. Hem yurt içi hem de yurt dışı literatüründe bu iki genusa ait türleri QS-CT mekanizmasıyla ilgili tek bir çalışmada aynı anda ele alan herhangi bir araştırmanın olmaması, veterinerlik, tıp, gıda, farmakoloji ve biyoteknoloji alanlarında öneme sahip bu türlerin aynı çalışma içerisinde ortak bir mekanizma açısından çalışılarak ileriye yönelik potensiyel uygulamalara zemin hazırlanması yönünden de tez konusunun bilime katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Nisin gibi günümüzde gıda koruyucusu olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosin olan ve temin edilmesi yüksek maliyete neden olan bir antibiyotiğin, üretim potansiyelinin arttırılması, kolaylaştırılması ve iyileştirilmesine yönelik araştırmalar açısından da yaptığımız çalışmanın bir ön araştırma olması yine konuya önem kazandıran faktörlerden biridir.

1.4. *Staphylococcus* Genusu

- Gram (+)
- Yuvarlak (kok)
- Mikroskobik olarak üzüm salkımı görünümünde
- Sporsuz
- Hareketsiz ve
- Kapsülsüz bakterilerdir.

QS mekanizmasına yönelik yapılan bir çok çalışmada *Staphyloccoccus* cinsi tercih edilmiştir. Bu grubun en önemli üyeleri *S. aureus* ve *S. epidermidis*'tir.

1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, Staphylococcus genusu içerisinde en yaygın görülen, adeta cinsi temsil eden bir türdür. *Staphylococcus* genusu içerisinde tür tayini için ilk olarak yapılan test koagülaz testidir. Bu testin pozitif çıkması halinde test edilen tür doğrudan *S. aureus* olarak kabul edilmektedir.

İnsan deri florasının normal üyeleri olmakla birlikte, hücre sayısının veya bu hücreler tarafından salgılanan maddelerin artması sonucunda hastalıklara neden olmaktadır. Koagülaz pozitif olması nedeniyle Staphylococcal hastalıklarda, bu cinse ait üyelerden akla ilk gelen tür *S. aureus* türüdür.

S. aureus, çok sayıda ve çeşitte ekzoprotein (toksin, enzim ve yüzey proteinleri) üreten bir insan patojenidir (Tablo 1.1). Bu ürünler, memeli konaklarında koloni oluşturması ve hastalıklara neden olması için büyük bir avantaj sağlar. Bu nedenle Stahylococcal hastalıkların çoğunda *S. aureus* baş roldedir (Dınges ve ark., 2000).

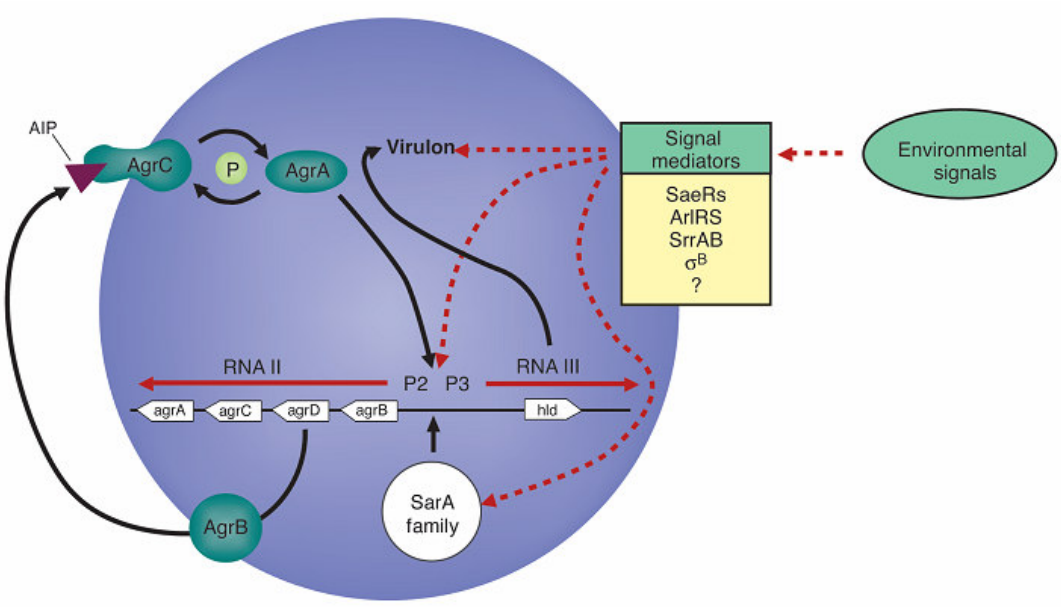
Tablo 1.1 : *S. aureus* tarafından salgılanan ekzoproteinler.

TOKSİNLER	ENZİMLER	YÜZEY PROTEİNLERİ
1. α-toksin 2. β-toksin 3. γ-toksin 4.Eksfolyatif toksin A ve B 5. Pantom-Valendin toksin 6.Toksik Şok Sendrom Toksini (TSST)	1. B-Laktamaz 2. Katalaz 3. Koagülaz 4. Sistein proteaz 5.V8 proteaz 6.Metalloproteaz/aureolisin 7.Staphopain 8.Lipaz 9.Nükleaz 10.Termonükleaz 11.PI-fosfolipaz C 12. Stafilokinaz 13.Hyaluronidaz 14.Lipaz/Esteraz 16.Serin benzeri proteinler	1.Kümelenme faktörü A/B 2.Kollajen bağlanma proteini 3. Fibrinojen bağlanma proteini 5. Laktoferrin bağlanma proteini 6. Protein A 7.Laminin bağlanma proteini

S. aureus, patojenite faktörlerinin sentezini QS ile kontrol etmektedir. Bu mekanizmayla ilgili genler *agr* operonunu (Accessory Gen Regulatory System) oluşturmakta, ancak bu operonun kontrolü birden çok faktöre bağlı olarak gerçekleşmektedir (Şekil 1.7-1.8) (Yarwood ve Schlievert, 2003).

*S.aureus'*un bu kadar çok hücre dışı proteine sahip olması bu tez çalışması açısından problem oluşturmuştur. Çünkü, materyal-metod kısmında görüleceği gibi,

araştırmanın önemli bir kısmını Staphylococcal sinyal moleküllerinin (süpernatantlarının) elde edilme süreci oluşturmakta ve tez çalışmasının sonucuna karar verirken, elde edilen bu süpernatantların *L. lactis* besiyerine eklenmesine bağlı olarak nisin üretim kapasitesindeki değişimler (zon çapları) dikkate alınmaktadır. Dolayısıyla, *L. lactis'*in nisin üretimine etki eden faktörün bu ekstraselüler proteinler mi yoksa QS sinyal peptitleri mi bundan emin olunmalıdır. Bu konudaki şüpheleri ortadan kaldırmak ve Staphylococcal sinyal peptitleri saf olarak elde etmek için de ultrafiltrasyon yöntemleri uygulanmıştır.

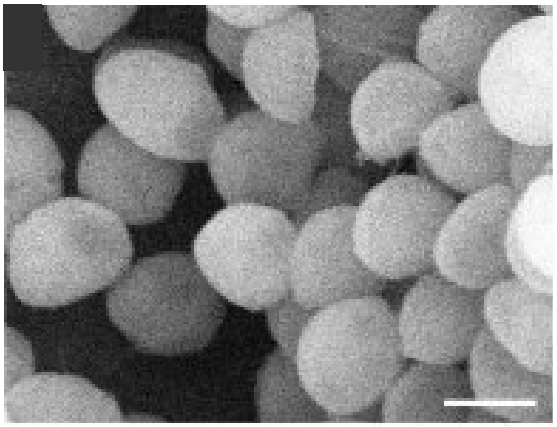


Şekil 1.7 : Staphylococcus genusunda *agr* sistemi. P2 operonu, RNAII aracılığıyla, sinyal iletim mekanizmasını kodlar. P3 operonunun transkripti RNAIII ise *agr* lokusunun effektör molekülü olarak görev alır. Kutu içerisindeki faktörler, yoğunluğa bağlı cevabın ve virülans genlerinin ekstra düzenleyicileri olarak gösterilmiştir. Çevresel sinyaller aracılığıyla kullanılan potansiyal düzenleyici yolaklar noktalı çizgilerle belirtilmiştir. [Yarwood ve Schlievert, 2003' den alınmıştır.]

1.4.2. *Staphylococcus epidermidis*

Micrococcaceae familyasının, *Staphylococcus* genusunun bir üyesi olup, Gram (+), yuvarlak görünümlü, mikroskobik olarak üzüm salkımı görünümünde, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz bir bakteri türüdür. Fakültatif aerop, fermentatif (laktik asit) ve *S. aureus*'tan farklı olarak koagülaz negatiftir (Resim 1.2).

İnsan deri florasında baskın olarak, buna karşılık daha az oranda mukozal ortamlarda, barsak ve üregenital sistemlerde yer alır. Normalde kommensal olan bu tür uygun şartlar oluştuğunda patojen hale gelir. Bu nedenle "fırsatçı patojen" olarak kabul edilir. Özellikle hastane kaynaklı hastalıkların asıl etkenidir. İnsanlarda hafif hastalıklardan ölümcül hastalıklara kadar çok çeşitli etkiler gösterebilmektedir.



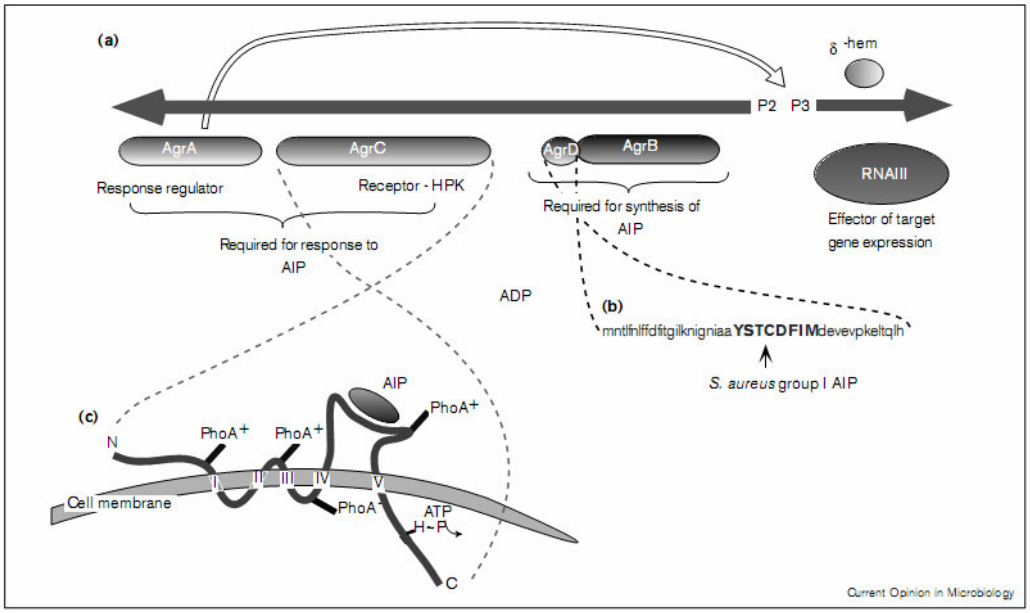
Resim 1.2 : *S. epidermidis*'in tarama elektron mikrosbu görümü. (Vuong ve ark., 2004'den alınmıştır)

Aynı zamanda süt ve süt ürünlerinde de bulunmakta ve besin zehirlenmelerine neden olmaktadır.

S. epidermidis'in kommensal veya patojen olması QS mekanizmasıyla kontrol edilmektedir. QS mekanizmasıyla ilgili genler *agr* operonunu oluşturur (Şekil 1.7-1.8). *agr* operonunun inaktif olması kommensal olmayı sağlarken, aktivasyonu ise patojen olmaya neden olmaktadır.

agr lokusunda, P2 ve P3 promotorlarının kullanıldığı divergent iki transkripsiyon birimi bulunur (Şekil 1.7). P2 operonu dört gen içerir: *agrA*, *agrB*, *agrC* ve *agrD*. ***agr*D**, AIP sinyal moleküllerini pro-peptit halinde kodlar, ***agrB*** tarafından kodlanan AgrB bir transmembran proteini olup **i)** *agr*D geninden üretilen pro-peptitin oktapeptite dönüşümünde, **ii)** AIP'in karboksi terminali ile internal sistein residüsü arasında tiolakton halkası oluşturarak modifikasyonunda ve **iii)** otoindükleyici sinyal peptidin (AIP) hücre dışına salgılanmasında görevli olduğu düşünülmektedir. ***agr*A ve *agr*C**, iki-bileşenli düzenleyici sistemi oluşturur. Bu

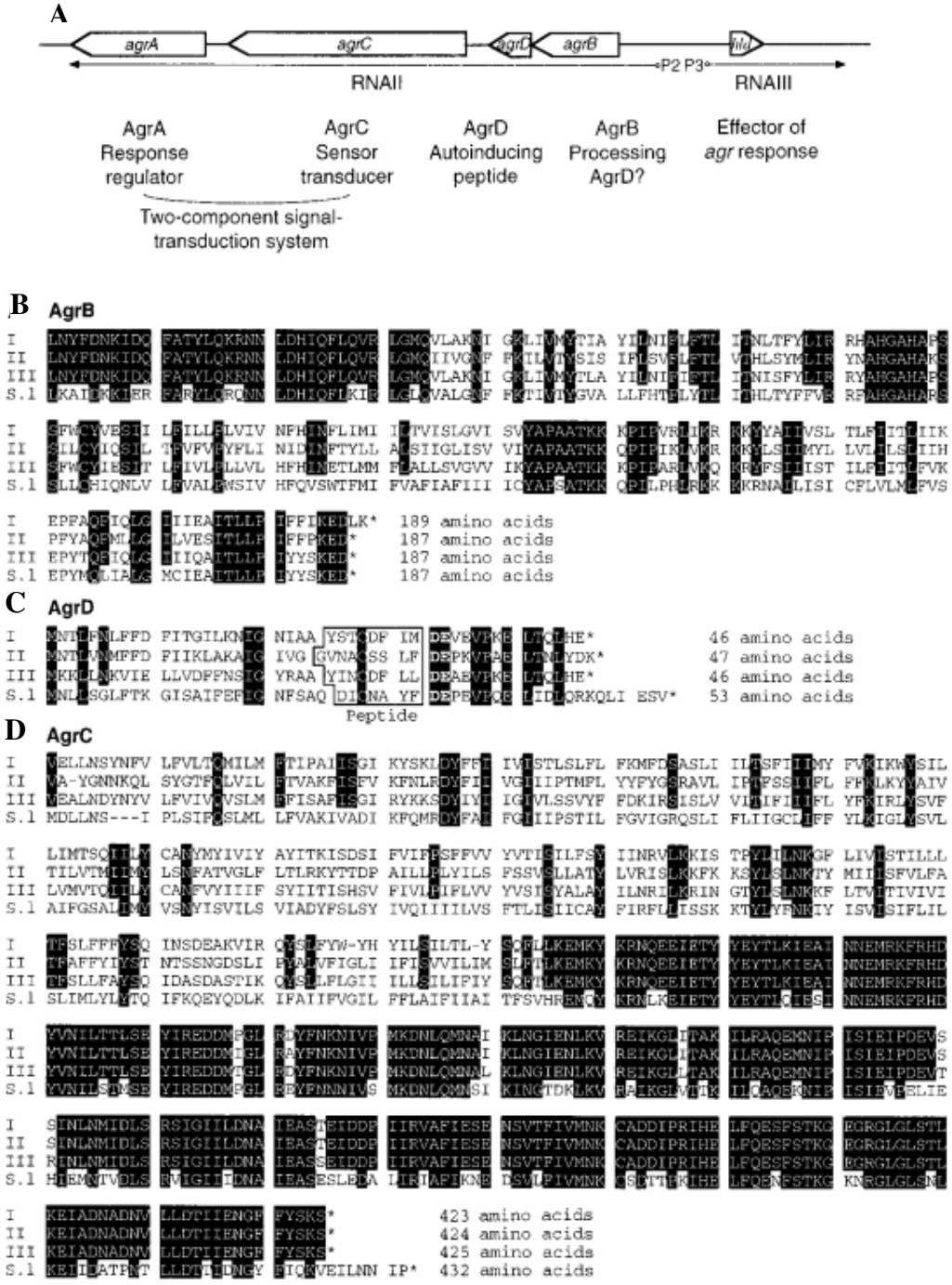
sistemde transmembran bileşeni olan AgrC (histidin kinaz) ekstraselüler AIP'ye bağlanarak korunmuş histidin residüsünden fosforilasyon yoluyla aktive olur ve takiben cevap düzenleyici (response regulator) molekül AgrA'nın aktivasyonunu sağlar. Besiyerinde sinyal moleküllerin konsantrasyonu yüksek olduğunda, aktif hale gelen AgrA, henüz tam bilinmeyen bir mekanizmayla, üremenin geç-log fazında P2 ve P3 transkripsiyonunun aşırı derecede artışına neden olur. AgrA/AgrC sinyal iletim yolu her iki *agr* promotorunun (P2 ve P3) üst-regülasyonunu (up-regulation) sağlar.



Şekil 1.8 : Staphylococcal *agr* sistemi. (Novick and Muir, 1999'dan alınmıştır.)

agrB, agrD ve *agrC* dizilerindeki farklılıklar en az dört farklı *S. aureus agr* spesifik alt grubun tanımlanmasını sağlamıştır. Bu alt gruplardan birinde üretilen AIP diğer gruplardaki *agr* ekspresyonunu inhibe etmektedir (Şekil 1.9) (Ji ve ark., 1997).

agr operonunun aktivasyonu populasyon yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Üremenin erken dönemlerinde, lag fazında, hücre sayısı azdır. Buna bağlı olarak ortamda bulunan sinyal moleküllerinin konsantrasyonu da azdır. Bu nedenle *agr* operonunun aktivasyonunu sağlayacak sinyal iletimi gerçekleşmez ve bu genler çok düşük seviyede ifade edilirler. Log fazın başlamasıyla hücre sayısı giderek artar.



Şekil 1.9 : A) *Syaphyloccoccal agr* sistemi. *S. aureus* alt grupları ve *Staphylococcus lugdunensis'in ö*n görülen B) AgrB, C) AgrD ve D) AgrC proteinlerinin amino asit dizilerinin karşılaştırılması. (Ji ve ark., 1997'den alınmıştır)

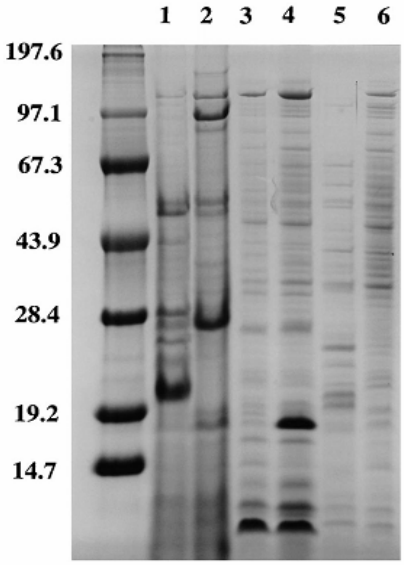
Buna bağlı olarak da ortama salınan sinyal molekülü konsantrasyonu artar. Ortamda giderek artan sinyal molekülleri belirli bir eşik değere ulaşıncaya kadar hücreler tarafından algılanmaz. Ancak bu eşik değere ulaştığında populasyondaki bütün hücreler sinyal moleküllerini algılamaya başlar. Bu algılama sayesinde *agr*

operonu aktifleşir ve yukarıda anlatıldığı gibi bir yandan daha çok miktarda sinyal molekülü üretilirken, eş zamanlı olarak diğer yandan da delta toksin üretilir (Yarwood ve Schlievert, 2003).

P3 operonu 512 nükleotitlik bir transkript kodlar; RNA III. Bu molekül, *agr* operonunun effektör molekülü olup, regülasyonda görev almayan delta-toksin (delta-hemolizin) molekülünü kodlar. RNA III, ekstraselüler proteinleri kodlayan genlerinin transkripsiyonunun üst-regülasyonunu, yüzey proteinlerinin transkripsiyonunun alt-regülasyonunu kontrol eder. Bu kontrol mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir(Ji ve ark., 1997).

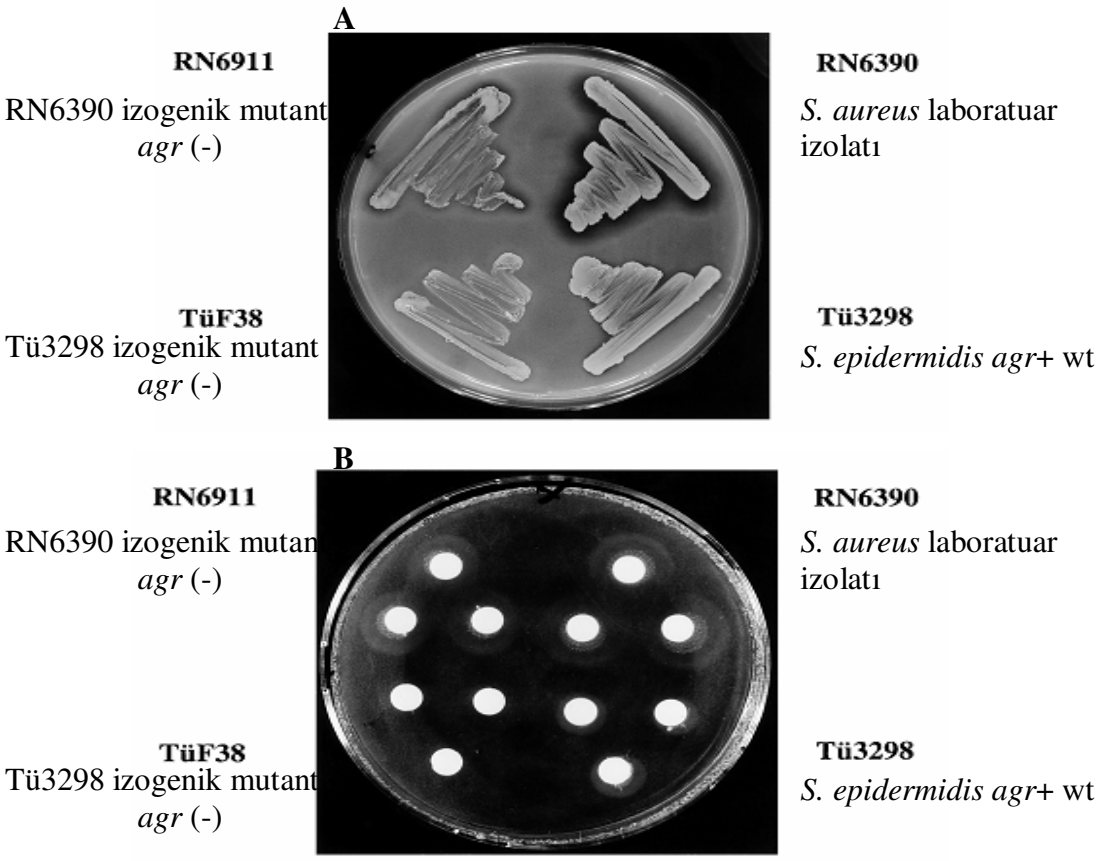
1.4.3. Staphylococcal *agr* Mutantları (Pozitif ve Negatif Kontroller)

Voung ve ark. yabani tip *S. epidermidis'* te *agr* delesyon mutantlarının oluşturulması ve *agr* delesyonunun hem genel olarak hem de sadece virülans faktörlerinin üretimine yönelik protein sentezi mekanizmasına etkisini araştırmışlardır. Bu kapsamda ayrıca, virülans belirleyici önemli iki ekzoproteinin, (lipaz ve proteazın) analizi yapılmıştır. **(Resim 1.3)**.



Resim 1.3 : *S. epidermidis wt* ve izogenik *agr* mutant suşuna ait protein profilleri SDS-PAGE analizi. Ekzoproteinler: 1: *agr*+, 2: *agr* mutant. Yüzey-bağlı proteinler (SDS ile kaynatılarak hazırlanan): 3: *agr*+, 4: *agr* mutant. Yüzey-bağlı proteinler (liyostafin ile muamele edilerek hazırlanan): 5: *agr*+, 6: *agr* mutant. (Voung ve ark., 2000' den alınmıştır.)

Bu çalışma sonucunda, *S. epidermidis'*deki *agr* sisteminin *S. aureus'*takiyle aynı role sahip olduğu belirlenmiştir; enfeksiyonun erken dönemlerinde, hücre yoğunluğu halen düşük ve hücreler planktonik halde bulunuyorken, konak dokularında kolonizasyonun sağlanması için yüzey-bağlanma proteinleri sentezlenir, patojenite faktörleriyle ilgili genler ise baskılanır. Konak dokusunda veya deride, hücre kümeleri oluştuğunda ve hücre konsantrasyonu yüksek olduğunda, *agr* QS sistemi aktifleşerek, yüzey bağlanma proteinlerinin üretimini baskılarken hücrelerin doku parçalayıcı proteinleri ve diğer ekzoproteinleri sentezlemelerine izin verir ve böylece değişen fizyolojik şartlara hücrelerin cevap vermesini sağlar. *S. aureus*'un virülansının ana kontrolü *agr* sistemiyle düzenlenen proteinler aracılığıyla yapılmakta ve *agr* sisteminin delesyonu *S. aureus* ve *S. epidermidis*'te virülansı azalmış mutantların oluşmasına neden olmaktadır (Resim 1.4) (Voung ve ark., 2000).

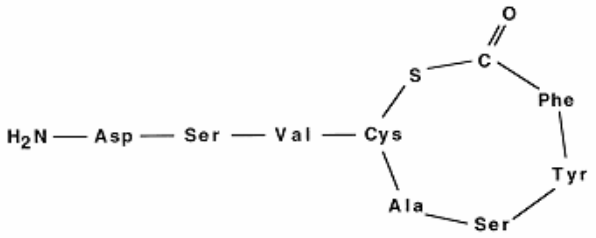


Resim 1.4 : Agar ortamında lipaz ve proteaz aktivitesi. A) Proteaz aktivitesi B) Lipaz aktivitesi. Her iki mutant türünde hem proteaz hem de lipaz aktivitisinde azalma görülmektedir (Voung ve ark., 2000'den alınmıştır.)

Bu tez çalışmasında pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan Staphylococlar suşlar, yukarıdaki çalışmada oluşturulan/kullanılan *S. epidermidis* 1457 wt *agr* (+) ve *S. epidermidis* 1457 *agr* (-) suşları olup Dr. Michael OTTO tarafıdan temin edilmiştir.

1.4.4. Staphylococcal Quorum Sensing Sinyal Peptitleri (AIPs)

Otto ve ark.' nın *S. epidermidis* agr sistemine ait QS sinyal peptidin yapısıyla ilgili çalışmalarında normal ve mutant suşlar kullanarak kloramfenikol asetil transferaz (CAT) aktivitesini incelenmiş ve buna bağlı olarak *agr* operonunun aktivitesi belirlenmiştir. Bu araştırma sonucunda farklı uzunluklarda (7, 8 ve 9 amino asitlik) normal ve modifiye olmuş (tio-lakton halkası oluşturulmuş) sinyal peptitlerden CAT aktivitesine en çok etki eden sinyal molekülünün modifiye olmuş 8 amino asitlik oligopeptit olduğu bulunmuştur (Şekil 1.10) (Otto ve ark.,1998).



Şekil 1.10 : *S. epidermidis*'e ait Quorum Sensing sinyal peptit yapısı. (Otto ve ark.,1998'den alınmıştır)

Bu tez çalışmasında, QS-CT uygulaması amacıyla Staphylococcal sinyal peptitleri içeren süpernatantlar elde edildi. Süpernatant içeriğinde bu sinyal moleküllerinin varlığının belirlenmesi ve diğer ekstraselüler proteinlerin mümkün olduğu kadar uzaklaştırılması çapraz etkileşim sonuçlarını sağlıklı değerlendirebilmemiz açısından son derece önemlidir. Söz konusu sinyal moleküllerinin moleküler ağırlıklarının normal protein moleküllerine göre çok daha küçük olmasından yararlanarak ultrafiltrasyon yöntemleriyle bu izolasyon sağlamıştır. Ultrafiltrasyon sonucu elde edilen süpernatantlarda, teorik olarak bulunması beklenilen sinyal peptitlerin varlığı MALDI-MS yöntemiyle analiz ederek doğrulanmıştır (bkz. Bölüm 2.2.7).

1.4.4.1. MALDI-MS

Staphylococcal süpernatantta sinyal moleküllerinin varlığını göstermek için genel olarak iki yöntem kullanılmaktadır (Otto ve ark., 2001; Ji ve ark.,1995):

1.Doğrudan tespit yöntemleri (HPLC, MALDI-MS, MALDI-TOF)

2.Dolaylı tespit yöntemleri (SDS-PAGE, Kromotoğrafik Yöntemler)

Sinyal moleküllerini doğrudan tespit etmeye yönelik kullanılan yöntemler arasında HPLC, MALDI-TOF veya MALDI-MS gibi yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemlerde doğrudan bakteriyel süpernatanttaki sinyal moleküllerinin gösterilmesi amaçlanır. Ancak sinyal moleküllerinin 8-10 amino asit gibi çok küçük moleküller olması ve elde edilme yöntemlerinin zor olması, bunların yanı sıra söz konusu cihaz ve yöntemlerin temin edilme ve uygulama olanaklarının her zaman mümkün olmaması gibi nedenlerle doğrudan sinyal moleküllerinin tespiti ikinci planda düşünülmesi gereken bir analizdir.

Şekil 1.7 ve 1.8'de görüldüğü gibi bakteriler tarafından pro-peptit halinde üretilen sinyal molekülleri işlenip, 8 amino asite kısaltılıp modifiye edilerek halkasal yapı kazandırılmakta ve hücre dışına salgılanmaktadır. Bu moleküllerin salgılanması, üreme periyoduna paralel bir şekilde hücre konsantrasyonuyla orantılı olarak artacağından üreme sürecinin farklı aşamalarından (lag fazı, erken log fazı ve geç log fazı) alınan süpernatantlarda bu sinyal moleküllerinin miktarı da giderek artacaktır. Örneğin, üreme sürecinin lag fazından alınan bir kültürde, yukarıda açıklandığı gibi, QS sistemi (*agr* operonu) inaktif olduğu için bu kültürden alınacak süpernatantta çok az miktarda QS sinyal molekülü olacaktır. Ancak eksponansiyal fazın başlamasıyla birlikte, hücre sayısındaki artışa paralel olarak, *agr* operonu aktifleşeceği için, ortamdaki sinyal molekülü konsantrasyonu artacaktır. Bu nedenle lag fazı, log faz başlangıcı ve log faz sonundaki kültürlerden alınan süpernatantlarda sinyal molekülü miktarı, sırasıyla, daha fazla olacaktır.

Bu tez kapsamında yapılan QS-CT analizinde, bu sinyal moleküllerini içeren Staphylococcal süpernatantları, *L. lactis* besiyerine ilave ettiğimizde, *L. lactis'*in nisin aktivitesinde meydana gelecek değişiklikleri Staphylococcal QS sinyal peptitleriyle ilişkilendirebilmek için, çapraz kombinasyon öncesinde bu

süpernatantlarda QS sinyal peptitlerinin varlığı MALDI-MS yöntemiyle tespit edildi (bkz. Bölüm 2.2.7).

1.5. *Lactococcus* Genusu ve *Lactococcus lactis*

Lactococ'ların süt şekeri laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaları, kazein hidrolizi (proteolitik aktivite), faj dirençlilik düzeyleri, sitrattan diasetil oluşturmaları (yalnız *L. lactis subsp. lactis biovar. diasetylactis*) ve ekzopolisakkarit üretme yetenekleri bu bakterilerin süt endüstrisinde ön kültür olarak kullanımlarını sağlamaktadır.

Lactococ'ların endüstriyel açıdan önem taşıyan diğer bir özelliği bakteriyosin üretme yetenekleridir. Bakteriyosinler, gıdaların bakteriyel kontaminasyonlardan korunmasını esas alan çalışmalarda, özellikle insan ve çevre sağlığı açısından risk taşımaması nedeniyle büyük önem arz etmektedir.

Nükleik asit hibridizasyonu, karşılaştırmalı serolojik çalışmalar, lipit kompozisyonu ve hücre duvarı kimyasal yapısının belirlenmesi sonucu elde edilen veriler ışığında *Streptococcus* cinsine ait bazı türler *Lactococcus* cinsi altında sınıflandırılmıştır.

N grubu *Streptococ'*ların hareketsiz üyelerini oluşturan *Lactococ*'lar *L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. gavriae*, *L. piscium* ve *L. plantarum* olmak üzere beş türe sahiptir. Bu cinsin üyeleri Gram (+), katalaz (-), kemoorganotrof, fakültatif anaerob, hareketsiz ve endospor oluşturmayan bakterilerdir.

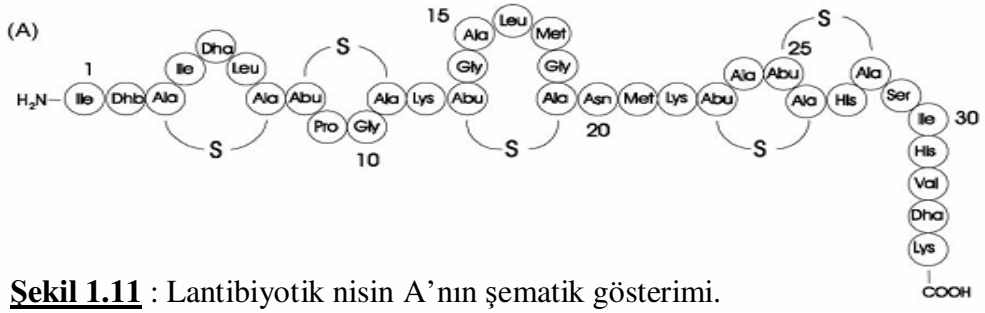
L. lactis türü üç alt tür ve bir varyeteye sahiptir. Bunlardan *L. lactis subsp.lactis*, *L. lactis subsp. cremonis* ve *L. lactis subsp. lactis biovar. diasetylactis* peynir, tereyağı, krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanımlarından dolayı ekonomik öneme sahiptir (Tuncer, 2005).

Tuncer, Y. (2005) doktora tezi olarak yaptığı araştırmada 100 adet *L. lactis* suşunda bakteriyosin üretim yeteneğini ve bu özelliğin genetik determinantlarını

araştırmıştır (yayınlanma aşamasında olduğu için sonuçlar belirtilmedi) (Tuncer, 2005). Çelik, O., *L. lactis subsp. lactis* suşlarına ait bakteriyosinlerin identifikasyon ve karakterizasyonlarına dair doktora tez çalışmasında sütten izole ettikleri suşlar (*L. lactis* subsp. *lactis* OC1 ve OC2) tarafından üretilen bakteriyosinlerin nisin ve laktisin 481 olduğunu belirleyerek bu antibiyotiklerin çeşitli özelliklerini incelemiştir (Çelik, 2004).

1.6. Nisin

Nisin, 1957 yılında Mattick ve Hirsch tarafından izole edilmiş, tanımlanmış ve isimlendirilmiştir. Nisin polipeptiti 34 amino asit içermekte ve bu amino asitler arasında 5 tioeter bağı bulunmaktadır. Moleküler ağırlığı 3500 Da olup, üreme ortamında monomer yapıdan çok, 7000 Da moleküler ağırlığa sahip iki monomerden oluşan homodimer halinde bulunmaktadır (Şekil 1.11) .



Şekil 1.11 : Lantibiyotik nisin A'nın şematik gösterimi.

pH 2.0-10 gibi geniş bir pH aralığında aktivite gösterebilen nisin, 121 ºC' ta 15 dk ısıl işleme dayanıklı, α-kemotripsin ve proteinkinaz K uygulamasına karşı duyarlıdır. Nisinin, nisin A, nisin Z ve nisin Q olmak üzere üç doğal çeşidi vardır.

L. lactis subsp. lactis tarafından üretilen nisin, letal etkisi ve geniş aktivite spektrumu nedeniyle en çok çalışılan ve halen doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan tek bakteriyosindir. Bu bakteriyosin *L. lactis subsp. cremonis* gibi yakın akraba türlere ilave olarak *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus, Mycobacterium, S. aureus* ve *Streptococcus* türlerinin de dahil olduğu geniş bir konakçı spektrumunda inhibisyon etkisi göstermektedir (Tuncer, 2005).

Nisin üreten *Lactococcus* üyeleri, bu antibiyotiğin sentezini QS mekanizmasıyla kontrol etmektedir. Nisin molekülünün biyosentezi ve etki mekanizmasıyla ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. He ve Chen, nisin ve *Bacillus liceniformis* ZJU12'ye ait hücreden arındırılmış süpernatantın (CFSb, Cell-Free Supernatant of *B. licheniformis* ZJU12) besin kaynaklı üç farklı bakteri üzerinde ayrı ayrı ve kombinasyon halinde sinerjik etkilerini araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonuncunda, nisinin CFSb ile karıştırılması halinde, CFSb'nin nisin etkinliğinde artış olduğu gösterilmiştir (He ve Chen, 2006).

Nisin ticari olarak, 1-5 ve 25 mg'lık ambalajlar halinde temin edilmektedir. Maliyet olarak oldukça pahalı (yaklaşık 800-900 €) ve günümüzde gıda koruyucu olarak kullanımına izin verilen tek bakteriyosindir. Bu nedenle nisin üretimini artırmaya, etki mekanizmasını belirlemeye ve etkinliğini arttırmaya, izolasyon ve tanımlamaya yönelik çok çeşitli başlıklar altında araştırmalar yapılmaktadır.

Yukarıda bahsedilen özellikleri/öneminden dolayı ve laboratuvar ortamında deneysel olarak gözlemlenmesi hem pratik hem de zaman kazandırıcı olması nedeniyle bu tez çalışmasında nisin üreten bir cins/tür tercih edilmiştir.

1.7. Bakteriyel Üreme eğrileri

Mikrobiyal üreme, hücreyi meydana getiren bileşenlerinin düzenli bir şekilde artmasıdır. Yapı taşlarındaki bu artış, yeni hücrelerin oluşumuyla sonuçlanır. Bakterilerin çoğu, enine ikiye bölünerek iki kardeş hücre oluşturur. Sıvı ortamda bulunan bir bakteri kültüründe üreme sürecinde farklı fazlar görülür:

i. Lag fazı (Latent Phase)

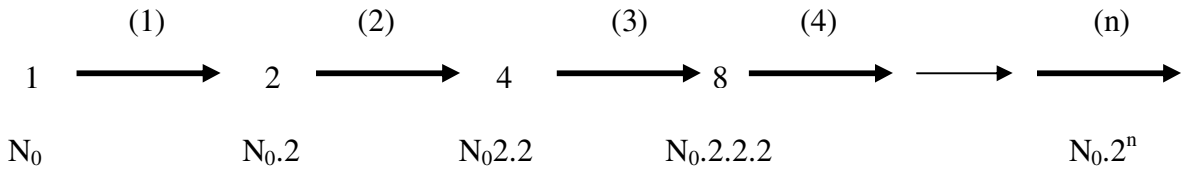
ii. Log fazı (Exponantial Phase)

iii. Durağan faz (Stationary Phase)

iv. Ölüm fazı (Death Phase)

Başlangıçta, üreme genellikle hiç görülmez veya yavaştır (lag fazı[1]). Ardından, eksponansiyal üreme fazı[2] gelir. Bu fazda hücre sayısında/biyokütlesinde dik bir artış görülür. Eksponansiyal faza (Log faza[3]) paralel olarak toksik metabolitler oluşturulur ve besin kaynağı tüketilir. Buna bağlı olarak üreme hızında azalma görülür ve bir süre sonra üreme durur (stationary phase[4]). Sonunda, hücrelerin kendi kendilerine enerji dönüşümleri bittiğinde, bakteriler ölürler (ölüm phase) (In Vitro Cul. Mic., sf. 80-106).

Bu fazların alacağı süre, çoğunlukla ortamdaki organizmaya ve üreme ortamının şartlarına bağlıdır. Hücre sayısındaki değişiklik ikiye bölünmeden kaynaklanır ve basit bir formülle ifade edilebilir. Başlangıçtaki hücre sayısını "N_0" olarak dikkate alır ve üremeyi tek bir hücreyle başlatırsak (N_0=1):



Dolayısıyla eksponansiyal olarak üreyen populasyona ait bir üreme periyodundan "t" süre sonra hücre sayısını (Nt) şu şeklinde ifade edebiliriz:

$$N_t = N_0\, 2^n$$

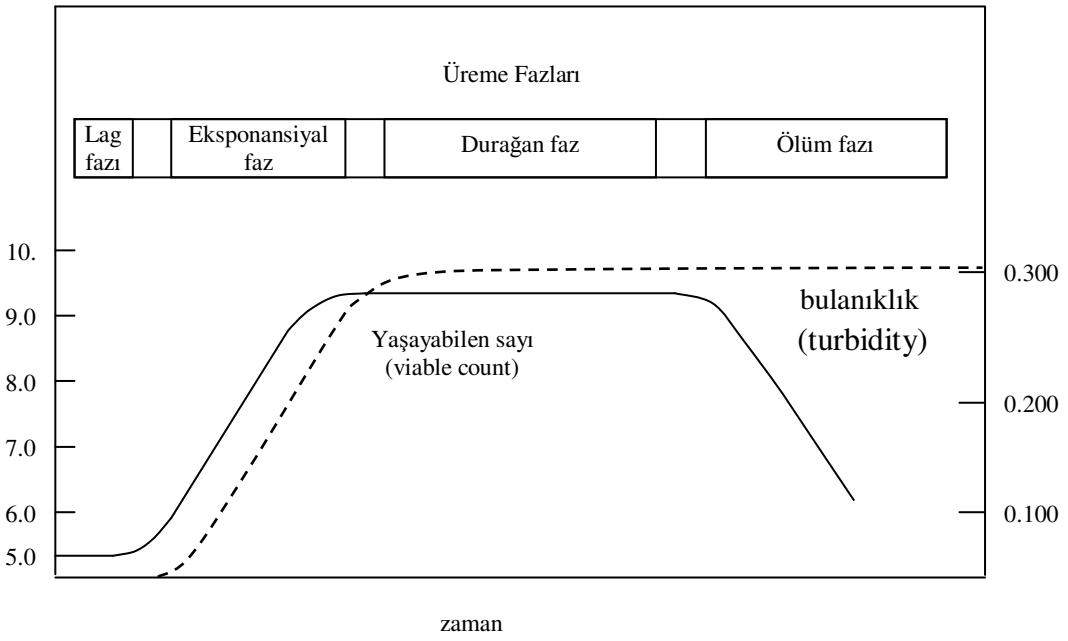
No : Başlangıçtaki hücre miktarı
n :Bölünme sayısı
Nt : Belirli bir süre sonundaki hücre miktarı

Bakteriyel üreme döngüsü grafiklerle açıklanmakta ve bu grafiklere **"Bakteriyel Üreme Eğrileri"** denilmektedir. Bir üreme eğrisinde, yukarıda bahsedilen birbirinden farklı ardışık fazlar görülür. Bu fazlar, tek tek hücreler için geçerli değildir, bilakis populasyonda meydana gelen olayları yansıtır (dolayısıyla bir hücre için "hücre, lag fazında, durağan fazda" vs. denmese de populasyon için bu ifadeleri kullanılabilmektedir).

---

[1] Lag phase : **La**tent **G**rowth phase
[2] Exponential phase : Üslü üreme evresi
[3] Log phase : **Lo**garithmic **G**rowth phase
[4] Stationary phase : Sabit (Durağan) faz

Üreme eğrileri QS mekanizmasının anlaşılmasında **"temel taşı"** niteliğindedir. Çünkü QS, bakteriyel genlerin, populasyonun durumuna (konsantrasyonuna) göre ve populasyon düzeyinde koordineli bir şekilde kontrolünü (aktivasyonunu veya inhibisyonunu) sağlar. Populasyonun durumunu açıklamak amacıyla da üreme eğrileri kullanılır. Dolayısıyla üreme eğrilerinden yararlanılarak doğrudan QS mekanizmasını açıklamak mümkündür.



Grafik 1.2 : Bakteri populasyonuna ait tipik bir üreme eğrisi. (In Vitro Cultivation of Microorganisms, sf. 85)

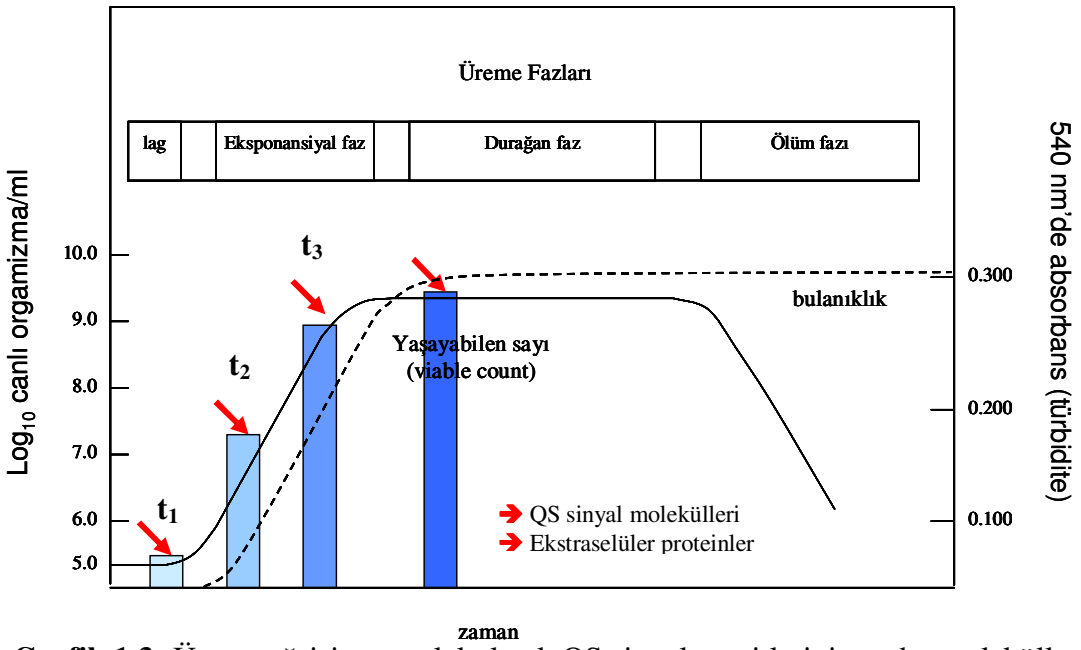
Mikrobiyal populasyon lag fazında, algılanabilicek derecede bir üreme göstermez. Lag fazının süresi, çeşitli faktörlere bağlı olmakla birlikte ne kadar hacimde besiyerine hangi miktarda bakteri ekildiğine de bağlıdır. Eğer eksponansiyel fazdaki bir populasyondan alınan hücreler ekilirse hiç lag fazı görülmeyebilir. Fakat eski bir kültürden (durağan fazdan) alınan hücrelerin çoğu, bölünmek için belirli bir süreye ihtiyaç duyarlar. Bu süre içerisinde, populasyon yoğunluğunda (grafik üzerinde) herhangi bir değişiklik gözlenmez. Hücreler, üreme ortamına uyum sağladıkların da bölünmeye başlarlar. Bölünme hızı başlangıçta yavaşken, eksponansiyel faza doğru gidildikçe artar (Grafik 1.2).

Bu aşamada hücre yoğunluğu az olduğu (buna bağlı olarak ortamdaki QS sinyal moleküllerinin yoğunluğu eşik değerin altında olduğu) için QS genleri inaktiftir. Bu nedenle lag fazından alınan bir kültüre ait süpernatantta bu mekanizmaya ait ürünler ya bulunmayacak ya da çok az miktarda olacaktır.

Eksponansiyel üreme fazı, ikiye bölünmeyle üremenin tipik özelliklerinden biri olup bu fazda üreme hızı giderek artar. Hücre sayısındaki artışa paralel olarak ortamda QS sinyal molekülü ve bu mekanizmanın kontrolü altında sentezlenen moleküllerin (örneğin, patojenite faktörlerinin, ekstraselüler proteinlerin) konsantrasyonları da giderek artar.

Durağan faza gelindiğinde ortamdaki hem sinyal molekülleri hem de bu moleküller sayesinde sentezlenen diğer moleküller en yüksek konsantrasyonda bulunur.

Eğer durağan fazda olan bir kültür veya bu kültürden alınan süpernatant taze bir besiyerine eklenecek olursa, ortamda biriken QS sinyal moleküllerinin etkisi gözlemlenebilir. Örneğin, *V. fischeri*'de biyolüminesans olayını inceleyecek olursak: *V. fischeri*'ye ait üreme eğrisinde lag fazına (t_1), log faz başlangıcına (t_1) ve log faz sonuna (t_1) karşılık gelecek üç süre (t_1, t_2, t_3) belirlenir ve bu sürelerde üç farklı kültür oluşturulup süpernatantlar elde edilir. Elde edilen süpernatantlarda teorik olarak sırasıyla QS sinyal molekülü miktarı daha fazla olacaktır. Bu süpernatantları aynı miktarda yeni besiyerlerine, eşit hacimlerde ilave edip yeniden bakteri ekecek olursak, teorik olarak birinci tüpten üçüncü tüpe doğru gidildikçe biyolüminesans oluşumunun daha fazla oldu görülecektir. Burada ekim yapılan besiyeri çeşidinin ve miktarının, bununla birlikte ekim yapılan bakteri türü ve miktarının aynı olmasına karşın biyolüminesans olayının farklı şiddetlerde olması, besiyerlerine ilave edilen süpernatantlardaki sinyal molekülü konsantrasyonlarının farklı olmasından (1-2-3 yönünde artmasından) kaynaklanmaktadır. Bu durumu sf. 31'deki Grafik 1.2 üzerinde Grafik 1.3' teki gibi şu şekilde gösterebiliriz (Grafik 1.3).



Grafik 1.3: Üreme eğrisine paralel olarak QS sinyal peptitlerinin ve bu moleküller aracılığıyla sentezlenen ekstraselüler protein miktarının karşılaştırmalı gösterimi.

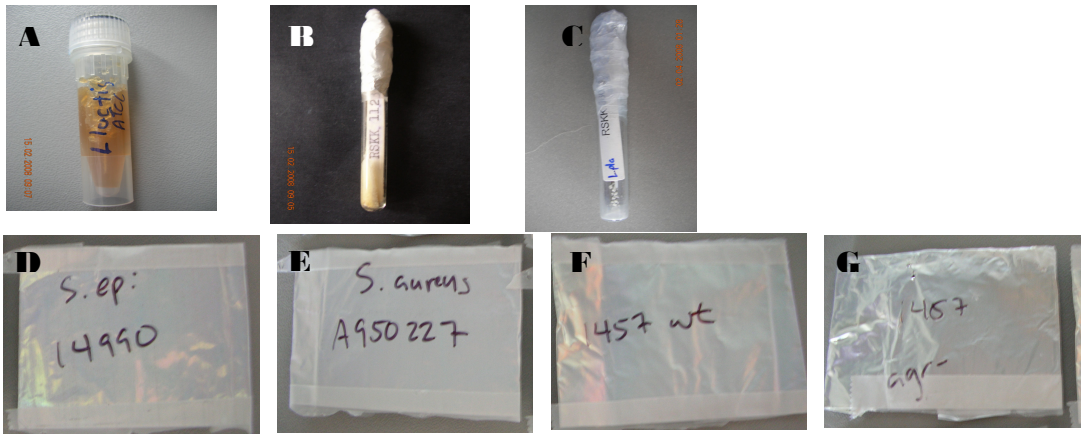
Bu tez çalışmasında, yukarıda açıklanan bilgiler ışığında bir deney prosedürü izlenerek *Staphylococ* suşlarından elde edilecek sinyal moleküllerinin *Lactococcus lactis* bakterisinde Nisin üretimini artırıp artırmadığı incelenecektir.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. MATERYALLER

2.1.1. Bakteri Suşları

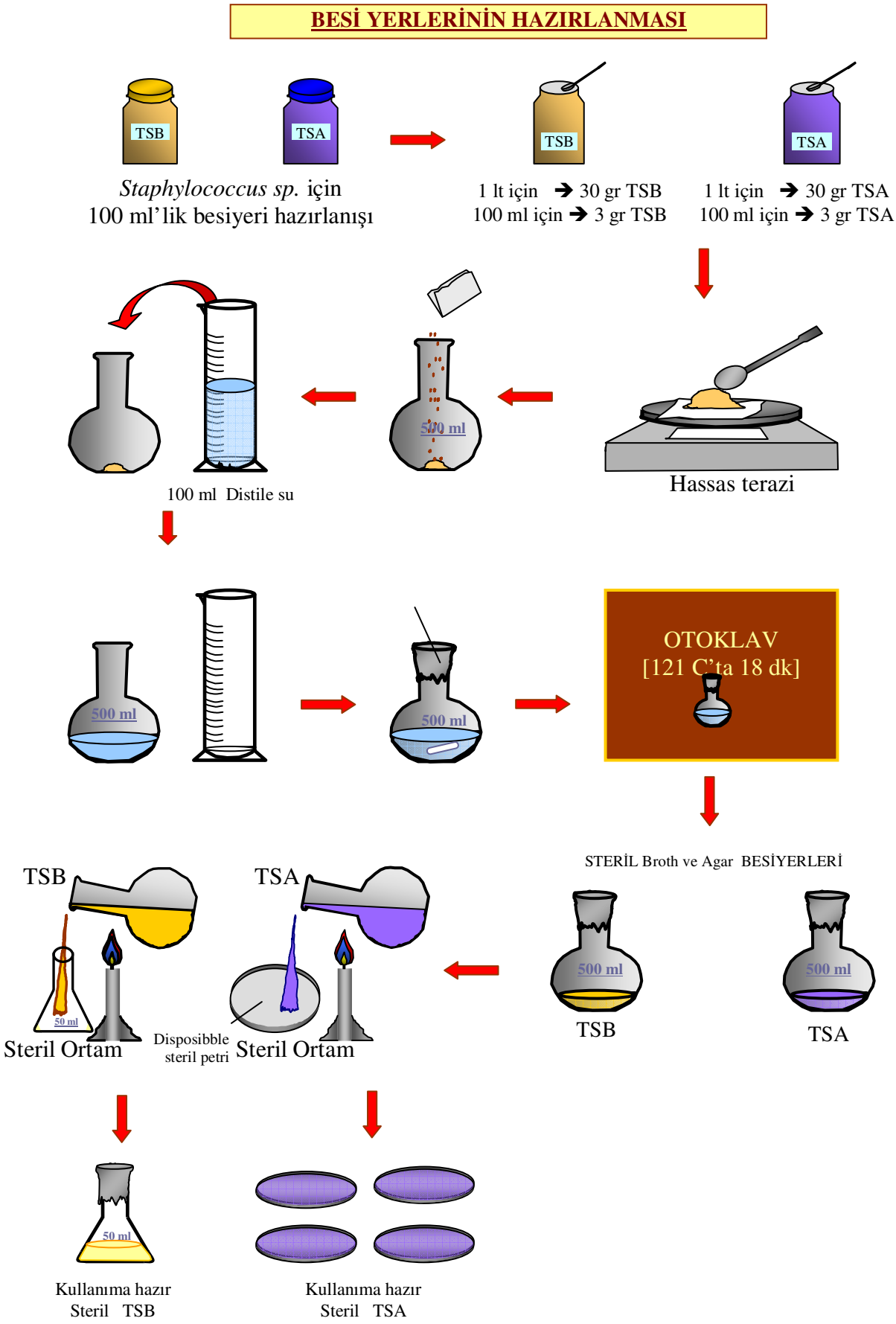
Tez çalışması kapsamında Nisin üretici soy olarak, Ankara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi kültür koleksiyonundan temin edilen *Lactococcus lactis* ATCC 11454 suşu; indikatör suş olarak Refik Saydam Hıfzıssıha Merkezi'nden (RSHM) ticari olarak alınan *Micrococcus luteus* RSKK 1123 ve *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 suşları; sinyal moleküllerinin kaynağı olarak Dr. Michael OTTO [National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institute of Health, (NIAID/NIH)] tarafından temin edilen *Staphylococcus* suşları [*S. aureus* A950277, *S. epidermidis* 14990, *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) ve *S. epidermidis* 1457 *agr* (-)] kullanıldı **(Resim 2.1)**.



Resim 2.1: Tez çalışmasında kullanılan bakteriyel suşlar. A) *L. lactis* ATCC 11454 (Nisin üreticisi) B) *M. luteus* RSKK 1123 (indikatör suş) C) *L. plantarum* ATCC 8014 (indikatör suş) D) *S. epidermidis* ATCC 14990 E) *S. aureus* A950227 F) *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) G) *S. epidermidis* 1457 *agr* (-).

2.1.2. Besiyerleri

Nisin üreticisi *L. lactis* ATCC 11454 suşu GM17 broth ve agar (SİGMA) besiyerlerinde, indikatör suşlardan *M. luteum* RSKK 1123 LB, LB agar ve LB soft agar (SİGMA), *L. plantarum* ATCC 8014 MRS broth, MRS agar ve MRS soft agar (SİGMA) besiyerlerinde, Staphylococcal suşlar ise TSB (Trypticase Soy Broth) ve TSA (Trypticase Soy Agar) (SİGMA) besiyerlerinde 30 ºC'ta üretilmiştir (Besiyeri hazırlanışı için bkz. **Şekil 2.1,** besiyeri içerikleri için bkz. **Ek-1)**.



Şekil 2.1: Katı ve sıvı besiyerlerinin hazırlanması

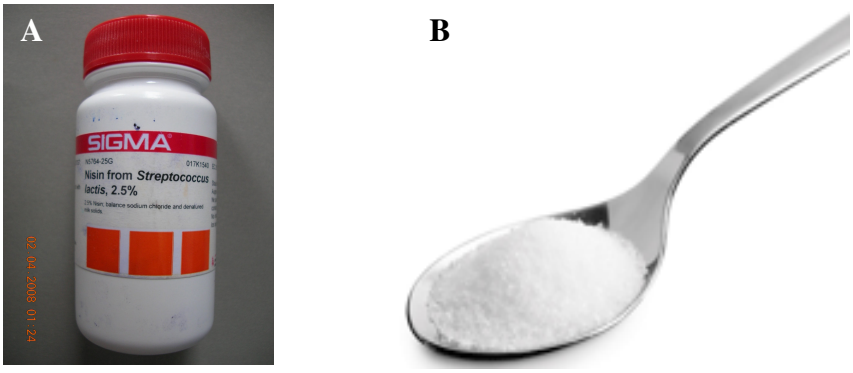
2.1.3. Malzeme ve Cihazlar

Bu çalışma kapsamında çeşitli sarf malzemelerine ve cihazlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla çok sayıda erlen (50, 250, 500 ve 1000 ml'lik), falkon tüp (15 ve 50 ml'lik), balon joje (250, 500 ve 1000 ml'lik), manyetik balık, antibiyogram diskleri (Whatmann, 6mm), petriler (5 ve 9 ml çaplı), Nisaplin (25 gr, % 2.5 saflıkta, SİGMA), tüp ve ependorf standları (20-30 adet), Centricon-3 (3 kDa) ultrafiltreler, disposabl UV spektro küvetleri, pipetler (5, 10 ve 25 ml'lik) kullanıldı.

Bunun yanı sıra cihaz/ekipman olarak etüv, UV spektrometre, vorteks, çalkalamalı etüv, su banyosu, sıcak oda, soğuk oda, etüv ve santrifüj kullanıldı (bkz. **Ek-2**).

2.1.4. Nisaplin

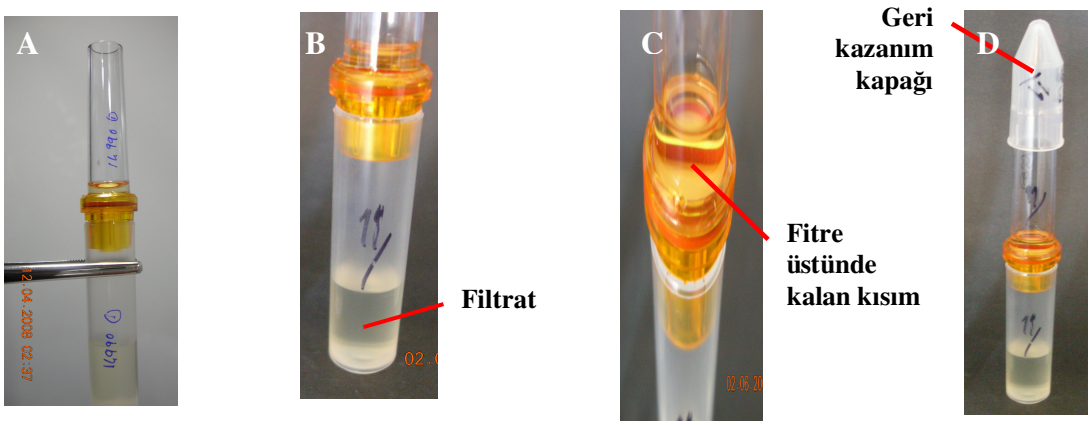
Nisaplin, Nisin antibiyotiğinin ticari formu olup eski adıyla *Streptococcuc lactis* yeni adıyla *Lactococcus lactis* suşundan elde edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan nisaplin SİGMA'dan 25 g'lık ürün halinde alınmıştır **(Resim 2.2)**.



Resim 2.2: Nisaplin, Nisinin ticari olarak hazırlanan formu. A) 25 g'lık Nisaplin kutusu B) Açık halde saf Nisin.

2.1.5. Ultrafiltreler (Centricon 3 kDa)

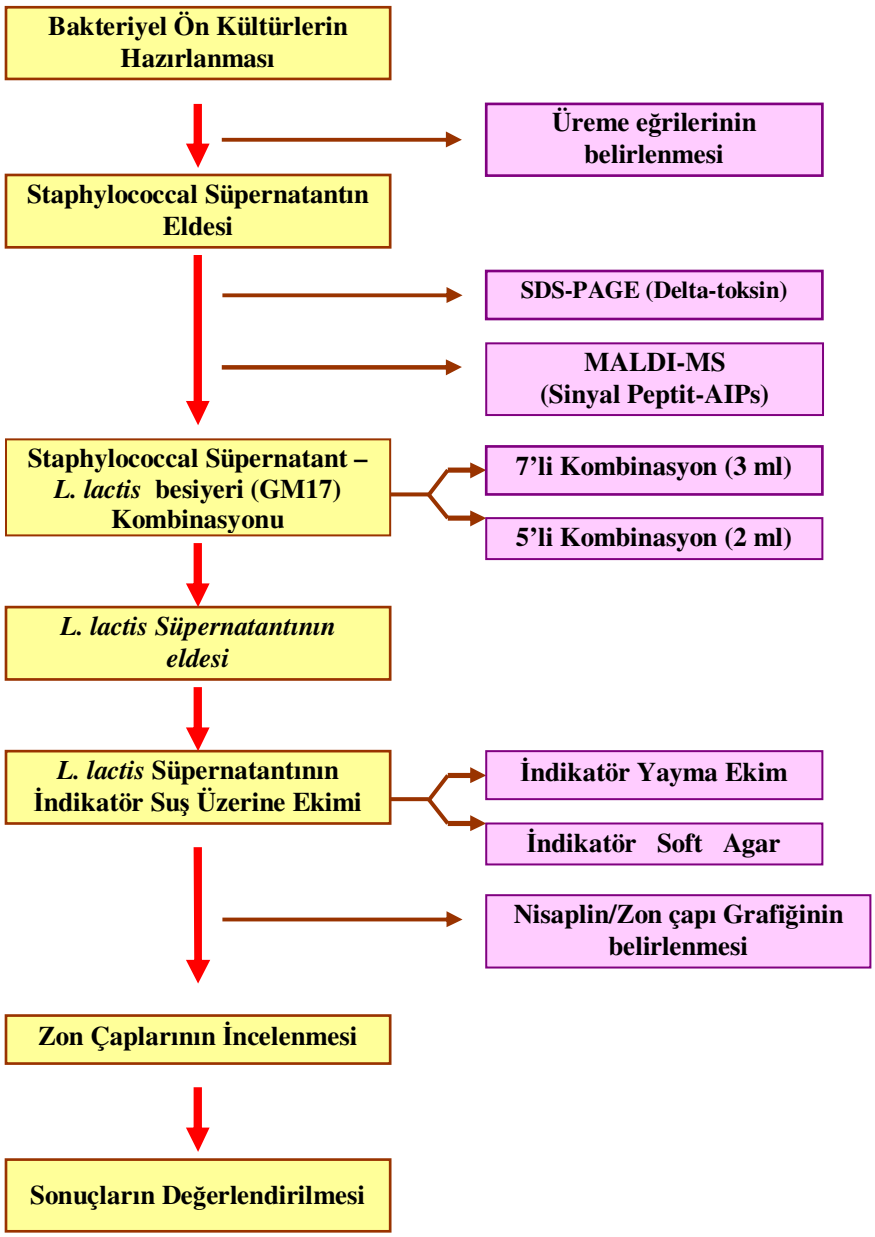
Staphylococcus genusunda QS mekanizmasının faaliyeti sonucunda üretilen sinyal peptitler ortalama 8-9 aminoasitten oluşmaktadır. Dolayısıyla molekül ağırlıkları yaklaşık 900-1300 daltona karşılık gelmektedir. Bilindiği üzere Staphylococcus genusunda ekstraselüler olarak bir çok enzim, toksin, protein vs. üretilmektedir. Elde ettiğimiz süpernatantta hemen hemen sadece QS sinyal peptitlerinin bulunduğundan emin olmak için literatürde de önerilen Centricon-3 ultrafiltreleri kullanıldı **(Resim 2.3)**



Resim 2.3: Ultrafitrasyon amacıyla kullanılan özel filtre; Centricon-3. A) Santrifüje konulmadan önce, B) Santrifüjden sonra süzülen kısım (filtrat), C) Santrifüjden sonra filtrenin üstünde kalan kısım, D) Geri kazanım için santrifüje konulmadan önce.

2.2. METOTLAR

Tez çalışması sürecinde takip edilen işlem basamakları özet olarak aşağıda belirtilmiştir (Şekil 2.2):



Şekil 2.2 : Tez çalışmasında takip edilen aşamalar.

2.2.1. Bakterilerin Üretimi

Çalışmanın yapıldığı GYTE Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı zamanlarda gelen suşlar **(Resim 2.1)** steril şartlar altında numune kablarından alınarak ilgili broth besiyerlerine ekildi **(Şekil 2.3)**. Üretilen ön kültürler (ÖK'ler) daha sonraki çalışmalarda stok olarak kullanıldı. Bakterilerin üretilmesi için kullanılan besi yerleri şunlardır:

1. *Staphylococ*'lar için TSA (Triptycase Soy Agar) ve TSB (Triptycase Soy Broth)
2. *L. lactis* ATCC 11454 için GM17 Agar ve GM17 Broth,
3. *M. luteum* RSKK 1123 için LB Broth, LB Agar ve LB Soft Agar
4. *L. plantarum* ATCC 8014 için MRS Broth, MRS Agar ve MRS Soft Agar

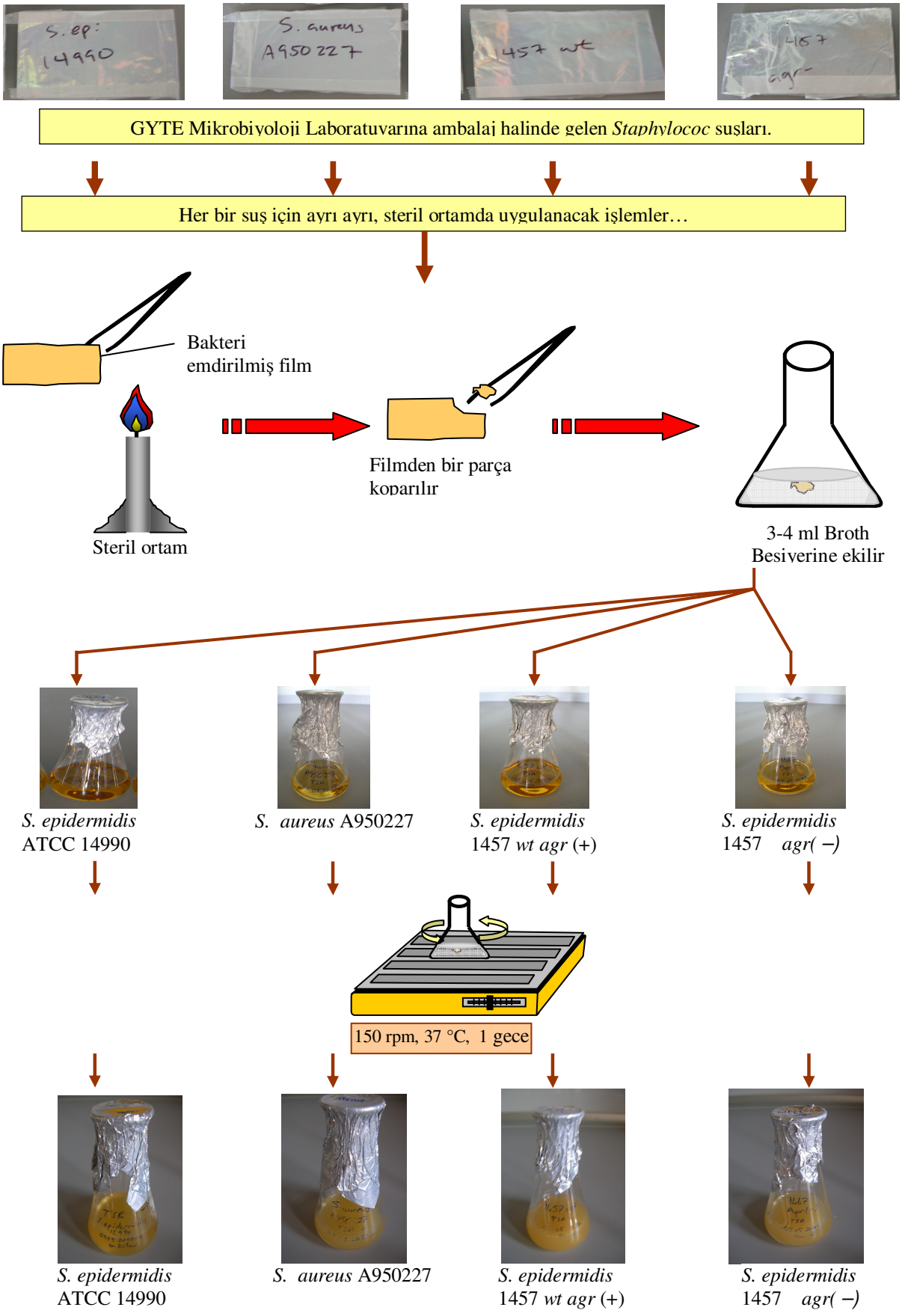
Suşların ilk üretilmelerini takiben, -80 ºC'ta saklanacak stoklar gliserol içerisinde, +4 ºC'ta saklanacak stokları broth ve agar besiyerlerinde hazırlandı. Deneylere stoklar hazırlandıktan sonra başlanıldı.

Çalışma kapsamında bakterilerin üretimi üç farklı amaçla yapılmıştır:

1. Bakterilerin üreme eğrilerini belirlemek
2. Bakterilerin süpernatantını elde etmek
3. Nisin üretmek (inhibisyon zonu oluşturmak)

Üreme eğrisini belirlemek amacıyla yapılan ekimlerde, birinci gün 50 ml'lik erlene 10 ml broth besiyeri ilave edildikten sonra üzerine agar besiyerinden özeyle bir miktar veya broth besiyerinden pipetle 0.1-1 ml bakteri ekildi. Bakteriler 130 rpm'de 30 °C'ta bir gece üremeye bırakıldı. İkinci gün (OD_{600} absorbans değerlerinin ölçüleceği gün) yine 50 ml'lik erlene 24 ml steril broth besiyeri eklenip üzerine 3 ml ön kültür (8:1 oranında) ekildi.

Süpernatant elde etmek için yapılan bakteri üretimlerinde, aynı şekilde, birinci gün 50ml'lik erlene 10-30 ml broth besiyeri ilave edip üzerine agar besiyerinden özeyle bir miktar veya broth besiyerinden pipetle 0.1-1 ml bakteri ekilip 130 rpm'de



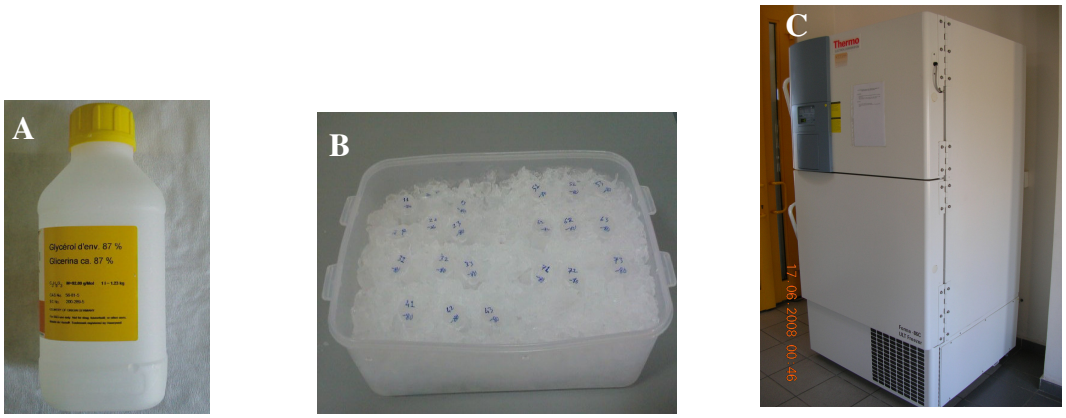
Şekil 2.3: GYTE Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen suşların üretimi. Benzer işlemler diğer suşlara da uygulanmıştır.

30 °C'ta bir gece üremeye bırakıldı. İkinci gün, *Staphylococ* suşları deneyin amacına ve elde edilmek istenen süpernatantın miktarına göre, aynı miktarda besiyeri içeren birden fazla erlene ekildi. Yapılan ekimler deney süresince 130 rpm'de 30 °C'ta üremeye bırakıldı.

Nisin üretimini incelemek için yapılan üretimlerde yukarıdaki işlemler takip edilmiştir. Farklı olarak *L. lactis* için kullanılan sıvı besiyerlerine farklı kombinasyonlarda staphylococcal süpernatant ilave edilmiştir.

2.2.2. Stok Kültürlerin Hazırlanması

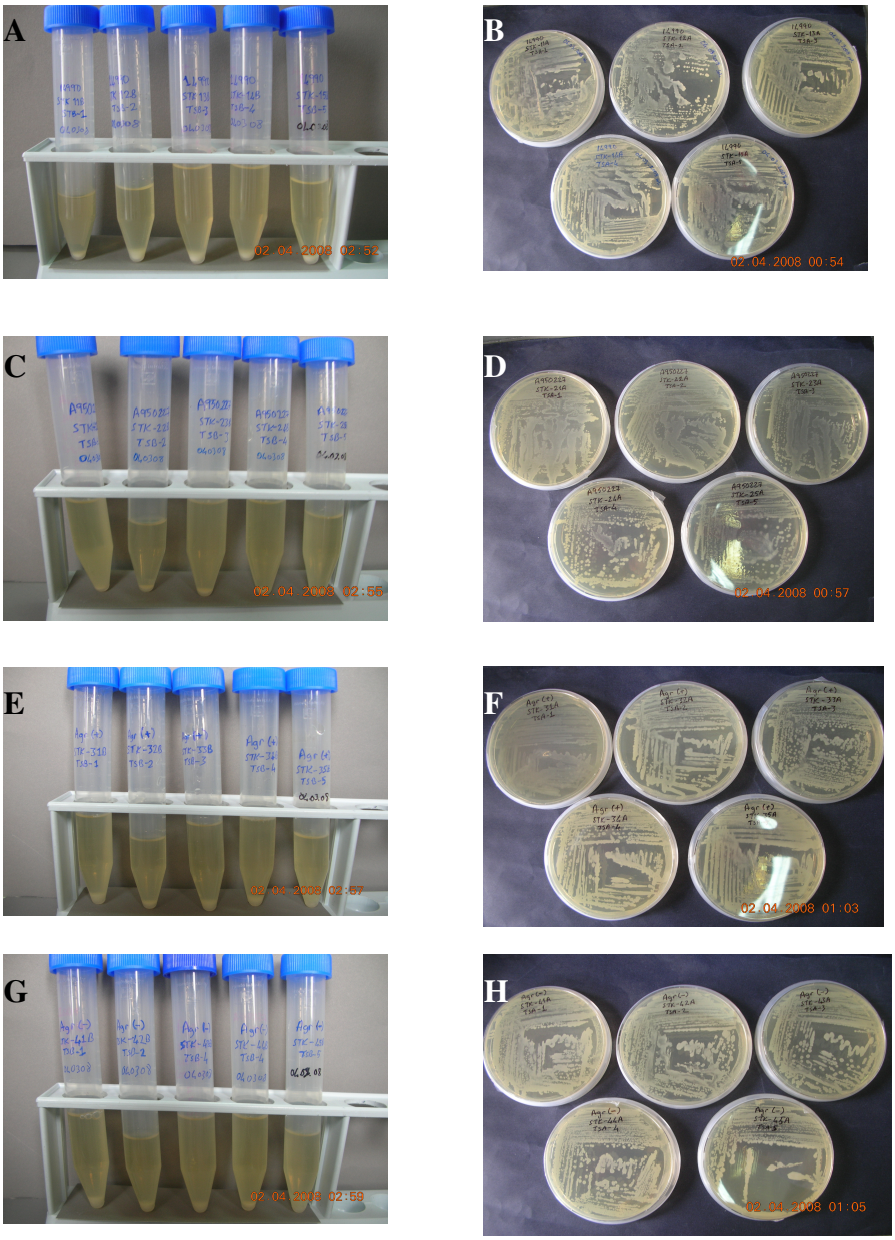
-80 ºC'ta saklanacak stokların hazırlanması için % 80'lik gliserol (Sigma) kullanıldı. 1.5 ml'lik ependorf tüplere % 80'lik gliserolden 650 ml dolduruldu, üzerine bir gecelik bakteri kültüründen 350 ml eklendi ve hemen buz içerisine konularak en kısa sürede – 80 ºC'ta soğuma sağlayan özel buzdolabına aktarıldı. Bu stoklar uzun vadede ihtiyaç duyulduğunda kullanıldı **(Resim 2.4)**.



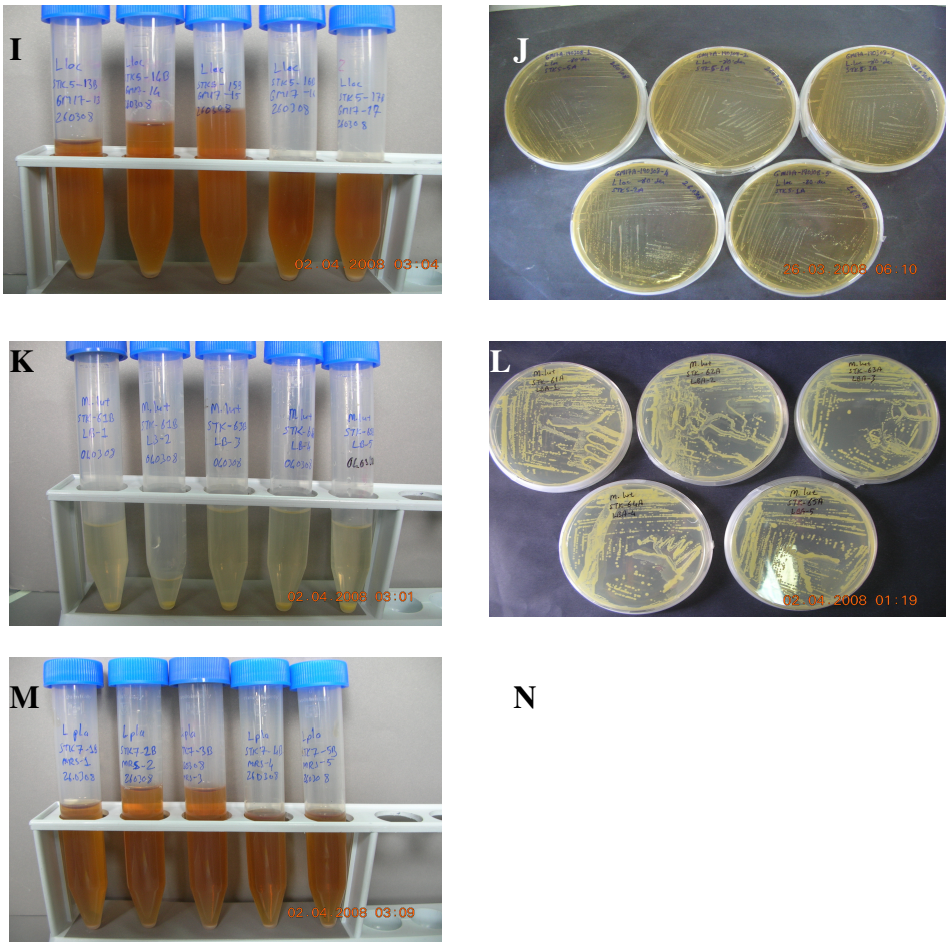
Resim 2.4: -80 ºC'ta saklanacak stoklarının hazırlanması. A) Saf halde Gliserol, B) Gliserolle karıştırılmış bakteri kültürleri buz içerisinde, C) Numunelerin -80 ºC'ta bekletildiği özel buzdolabı.

+ 4 ºC'ta saklanacak kültür stokları broth ve agar besiyerlerinde hazırlandı. Her bir suş için ilgili broth besiyerinden 5 ml alınarak beş ayrı falkon tüpe (15 ml'lik) dolduruldu. Eski kültürlerden 0.1 ml alınarak bu steril besiyerlerine ekildi.

130 rpm'de 30 ºC'ta bir gecelik üremeden sonra kültürler buzdolabında veya soğuk odada saklandı. Deneyler için bu kültürler kullanıldı **(Resim 2.5-2.6)**.



Resim 2.5: +4 ºC'ta saklanacak stoklar. Deneylerde kullanılacak her bir suşun broth ve agar besiyerlerinde beşer adet stoğu hazırlandı. A) *S. epidermidis* ATCC 14990/TSB, B) *S. epidermidis* ATCC 14990/ TSA, C) *S. aureus* A950227/TSB, D) *S. aureus* A950227/TSA, E) *S. epidermidis* 1457 wt/TSB, F) *S. epidermidis* 1457 wt/TSA, G) *S. epidermidis* 1457 agr (-)/TSB, H) *S. epidermidis* 1457 agr (-)/TSA.



Resim 2.6: +4 ºC'ta saklanacak stoklar. Deneylerde kullanılacak her bir suşun broth ve agar besiyerlerinde beşer adet stoğu hazırlandı. I) *L. lactis* ATCC 11454/GM17 Broth, J) *L. lactis* ATCC 11454/GM17 Agar K) *M. luteus* RSKK 1123/LB Broth, L) *M. luteus* RSKK 1123/LB Agar M) *L. plantarum* ATCC 8014/MRS Broth, N) *L. plantarum* ATCC 8014/MRS Agar

2.2.3. Nisin Üretiminin Belirlenmesi

A. Genel Prosedür

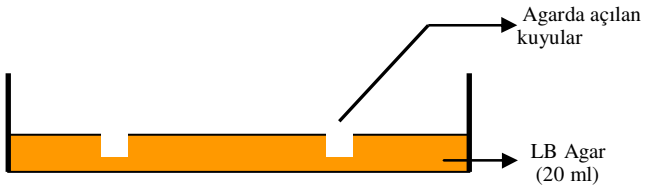
Nisin aktivitesinin belirlenmesinde, temel prensip olarak agar besiyerine doğrudan *L. lactis* ATCC 11454 kültürü ekilerek bir gecelik üreme periyodunu takiben üzerine soft agar halinde indikatör suş eklenir **(Şekil 2.5 ve Resim 2.8)** veya *L. lactis* ATCC 11454 suşunun süpernatantı elde edilip, yayma ekim yapılan indikatör suş üzerine muamele edilir. Her iki yöntemde de indikatör suşun üremesi için bir gece beklenir ve oluşan inhibisyon zonları incelenir.

Nisin aktivitesinin belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılabilir. Bu çalışma kapsamında hangi yöntemin daha uygun olduğunu belirlemek amacıyla çok sayıda ön deneme yapılmıştır. Ön denemeler sonucunda softa agar üzerine damlatma yönteminin en iyi sonucu (düzgün zon oluşmu) verdiği gözlendi. Nisin aktivitesini belirlemeye yönelik yöntemler şunlardır:

1. Disk Yöntemi: Bu yöntemde iki çeşit disk kullanılmıştır; birincisi kurutma kağıtlarından hazırlanan (standart olmayan) diskler, ikincisi ticari olarak alınan standart diskler. Ekimler **Şekil 2.15**'deki gibi yapılmıştır **(Resim 2.18 ve 2.21)**.

2. Damla Yöntemi: Disk yöntemindeki ekimlerle benzer şeklide numaralandırılan noktalara 10 µl *L. lactis* süpernatantı damlatıldı. Ekimler **Şekil 2.15** 'deki gibi yapılmıştır **(Resim 2.19 ve 2.22)**.

3. Kuyu Yöntemi: Bu yöntemde agar besiyerine **Şekil 2.4**' de görüldüğü gibi kuyular açıldı ve her bir kuyuya 25 µl *L. lactis* süpernatantı ilave edildi. Ekimler **Şekil 2.15**'deki gibi yapılmıştır **(Resim 2.20 ve 2.23)**.



Şekil 2.4 : *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının kuyu yöntemiyle ekimi.için agar üzerinde oluşturulan kuyuların temsili gösterimi.

Tez/proje kapsamında, Nisin aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan deneyleri üç grupta toplayabiliriz:

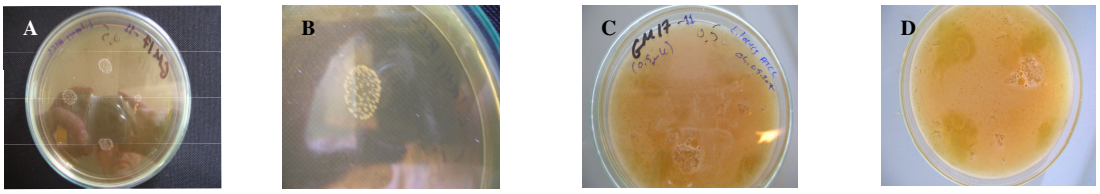
1. *L. lactis* ATCC 11454 suşunun kendi kendine Nisin üretiminin belirlenmesi (Kontrol)
2. Ticari olarak alınan saf Nisinin (NİSAPLİN) konsantrasyon/zon çapı grafiğinin belirlenmesi (Standart)
3. Staphylococcal süpernatantlar eklendikten sonra *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin üretiminin belirlenmesi.

B. Nisin Üretimine Yönelik Yapılan Çalışmalar

B.1. *L. lactis* ATCC 11454 Suşunun Nisin Aktivitesinin İncelenmesi

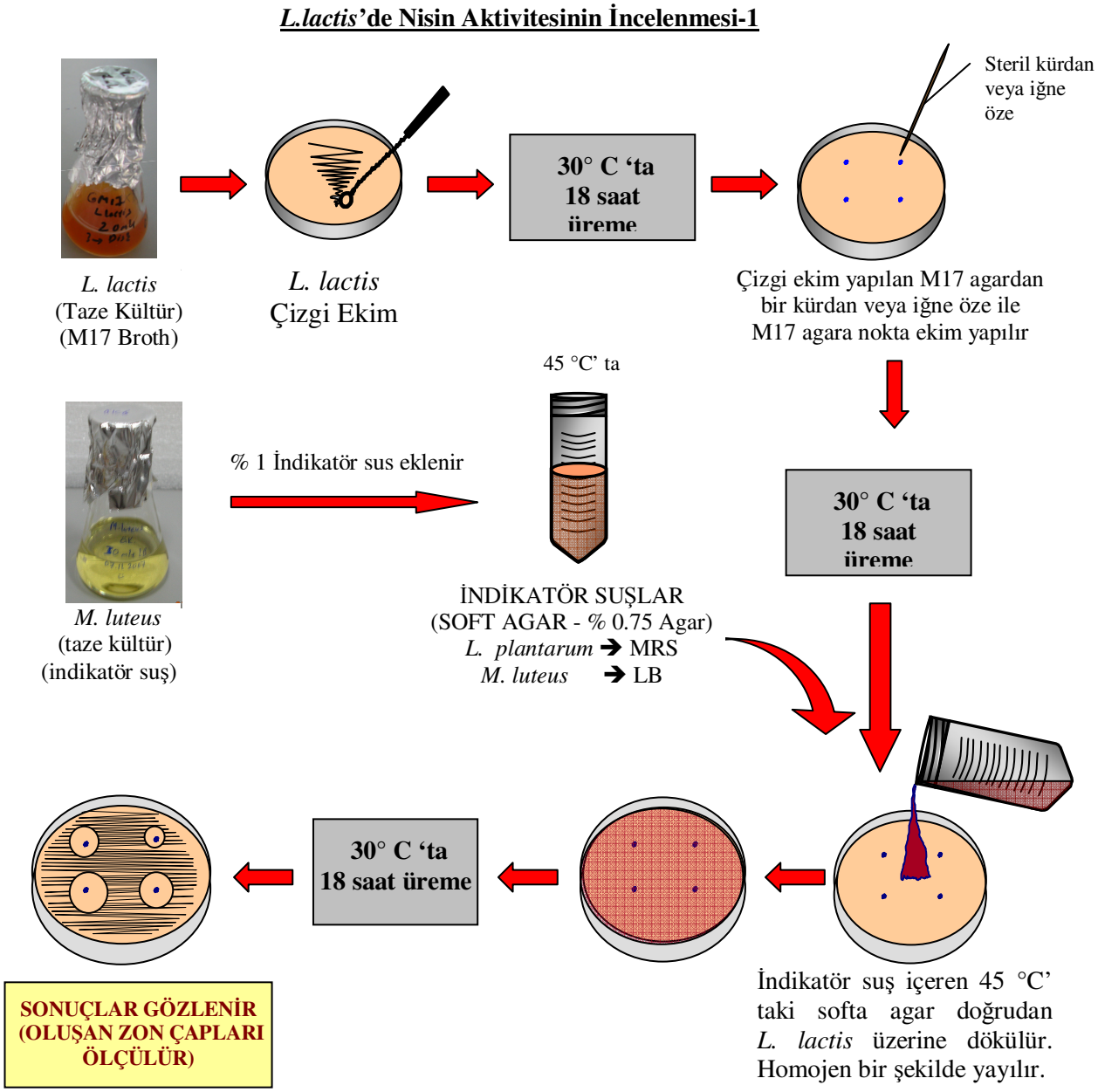
<u>Deney.1:</u> *L. lactis* ATCC 11454 Suşunun Nisin Üretim Özelliğinin Belirlenmesi (Kontrol)

Daha önce bahsedilen yöntemlerden "damlatma yöntemi" kullanıldı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi **(Resim 2.7)**.

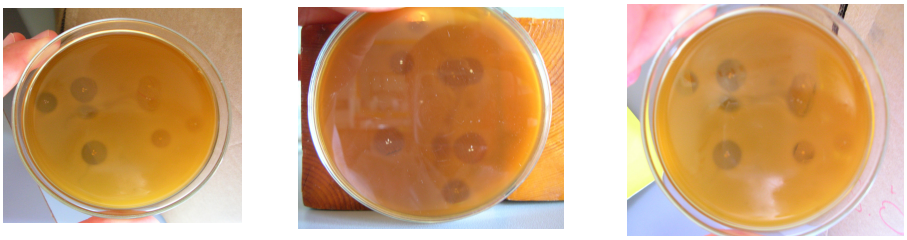


<u>Resim 2.7:</u> *L. lactis* ATCC 11454 suşunda Nisin aktivitesinin belirlenmesi. A) Damlatma yöntemi sonucunda oluşan koloniler, B) Bir koloni grubunun yakın görünüm, C ve D) İndikatör suşlarda görülen inhibisyon zonları

Bu deney Nisin aktivitesini belirlemeye yönelik yaptığımız ilk deney olması açısından önemli olup sadece inhibisyon zonunun oluşup/oluşmaması gözlenmiştir.



Şekil 2.5: Nisin aktivitesinin belirlenmesinde bakteri (*L. lactis* ATCC 11454) nokta ekim yöntemi. Bu yöntemde indikatör suş yarı-katı agar halinde muamele edilmektedir.



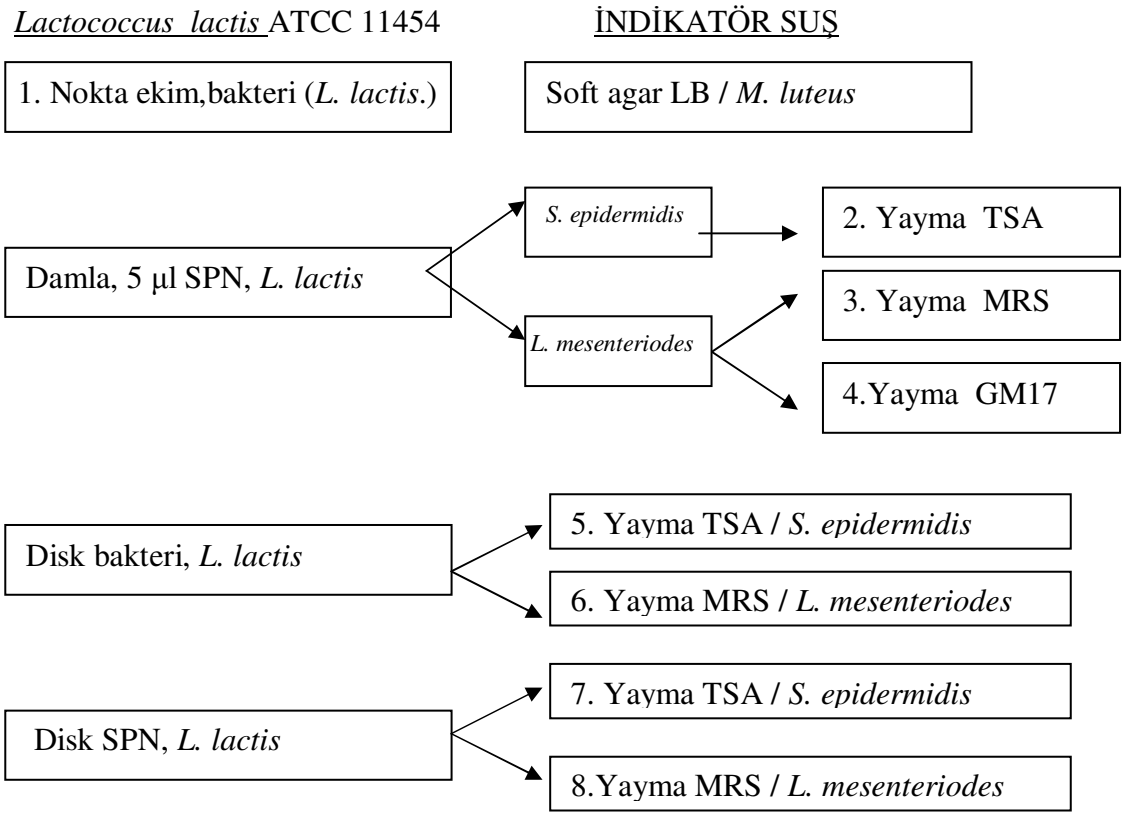
Resim 2.8: Nisin aktivitesinin gözlendiği bir petriden görünümler.

B.2. *L. lactis* ATCC 11454 Suşunun Nisin Aktivitesinin İncelenmesinde Farklı Ekim Yöntemlerinin Kullanımı (Ön Denemeler)

Deney.2: *L. lactis* ATCC 11454 Suşunun Nisin Üretim Özelliğinin Çeşitli Yöntemlerle Belirlenmesi.

Elimizdeki *L. lactis* ATCC 11454 suşunun Nisin üretim özelliği olduğunu tespit ettikten sonra, Nisin aktivitesini belirlemede kullanılan diğer yöntemler uygulandı. Bu amaçla *L. lactis* ATCC 11454 suşunun agar besiyerine nokta ekimi, süpernatantının damlatılması veya kuyuya doldurulması, doğrudan *L. lactis* ATCC 11454'ün veya süpernatantının diske emdirilmesi olmak üzere 5 olasılık; indikatör suş olarak *S. epidermidis, Leuconostoc mesenteriodes* ve *M. luteus* olmak üzere 3 olasılık; besiyeri olarak ise TSA, GM17 agar ve MRS olmak üzere 3 olasılık dikkate alındı. Bu kriterler doğrultusunda 8 farklı ekim yapıldı (**Tablo 2.1**). Böylece Nisin aktivitesini belirlemek için kullanılacak optimum kriterler belirlendi

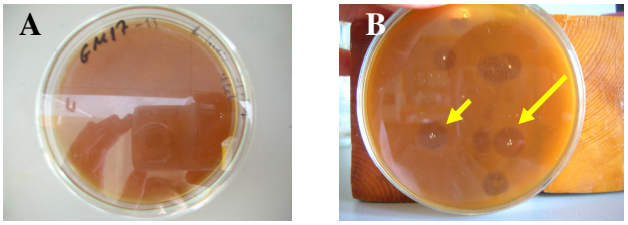
Tablo 2.1: *L. lactis* ATCC 11454 suşunun Nisin aktivitesinin incelenmesinde kullanılan farklı ekim yöntemleri.



i. Nokta Ekim Yöntemi:

GM17 agar besiyerine *L. lactis* ATCC 11454 suşunun çizgi ekimi yapıldı ve 30 °C'ta bir gece üremeye bırakıldı. Üreme periyodunun sonunda, oluşan kolonilerden steril kürdan veya iğne öze yardımıyla GM17 agar besiyerine nokta ekim yapıldı. Aynı şartlarda (30 °C'ta) bir gece üremeye bırakıldı.

Diğer yandan indikatör suş olarak *S. epidermidis*'in, sıvı besiyerinde ön kültürü hazırlanıp 30 °C'ta 130 rpm'de bir gece üremeye bırakıldı. Üreme periyodunun sonunda soft TSA besiyerine %1 oranında indikatör suş eklenip nokta ekim halindeki *L. lactis* ATCC 11454 üzerine homojen bir şekilde yayıldı. Yine 30 °C'ta bir gece üremeye bırakıldı ve üreme sürecinin sonunda oluşan inhibisyon zonları kontrol edildi **(Resim 2.9)**



Resim 2.9: *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin nokta ekim yöntemiyle incelenmesi. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası oluşan inhibisyon zonları.

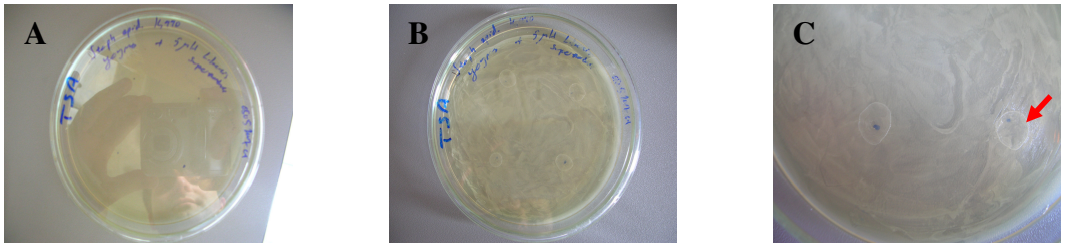
ii. Damla Yöntemi:

Bu deneyde, Nisin üretici suş olarak *L. lactis* ATCC 11454, indikatör suş olarak *S. epidermidis* ve *L. mesenteriodes* (laboratuvar izolatları), besiyeri olarak TSA, MRS ve GM17 kullanıldı.

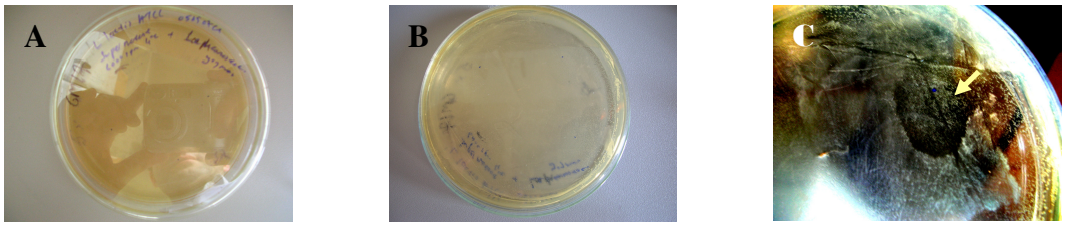
10 ml GM17 broth besiyeri içeren 50 ml'lik erlene GM17 agardan öze ile bir miktar [veya GM17 brothdan pipetle (0.1 ml)] *L. lactis* ATCC 11454 ekilerek ön kültür hazırlandı. Yapılan ekim 30°C'ta 130 rpm'de bir gece üremeye bırakıldı.

Üretilen ön kültürden 1-2 ml alınıp 10-30 ml GM17 broth içeren 50 ml'lik erlene ekildi ve aynı şartlarda (30 °C'ta 130 rpm'de) bir gece üremeye bırakıldı. Üreme periyodunun sonunda *L. lactis* ATCC 11454 kültürü 4°C'ta 4000 g'de 40 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant alınıp pelet atıldı.

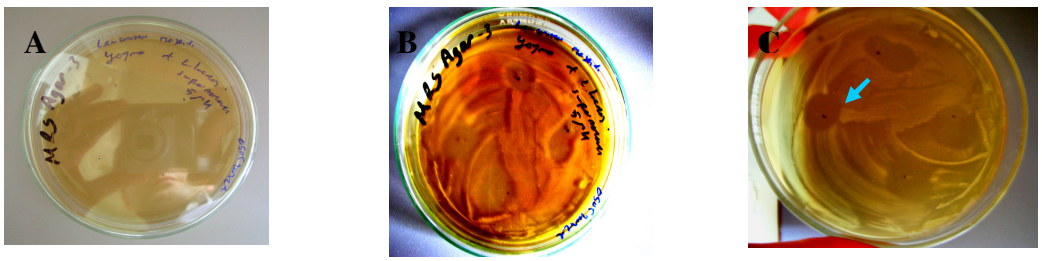
Elde edilen süpernatanttan 10'ar µl alınıp TSA'da yayma ekim yapılan *S. epidermidis* **(Resim 2.10)**, GM17 ve MRS besiyerlerinde yayma ekim yapılan *L .mesenteriodes* **(Resim 2.11-1.12)** üzerine damlatıldı. Bir gecelik (30°C'ta) üreme periyodundan sonra oluşan inhibisyon zonları incelendi. Zon çapının büyüklüğü, ortama salınan Nisin miktarının göstergesi olarak değerlendirildi.



Resim 2.10: *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin süpernatant damlatma yöntemiyle incelenmesi. Besiyeri TSA, indikatör suş ***S. epidermidis***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası üstten görünüm C) İnhibisyon zonları



Resim 2.11: *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin süpernatant damlatma yöntemiyle incelenmesi. Besiyeri **GM17**, indikatör suş ***L. mesenteriodes***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) İnhibisyon zonu, yakından görünüm

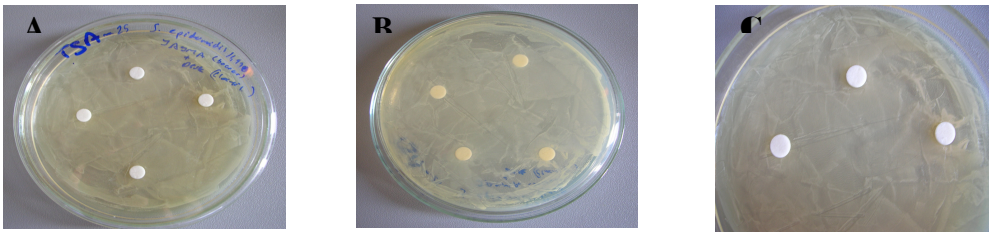


Resim 2.12 : *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinin süpernatant damlatma yöntemiyle incelenmesi. Besiyeri **MRS**, indikatör suş ***L. mesenteriodes***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası üstten görünüm C) İnhibisyon zonları

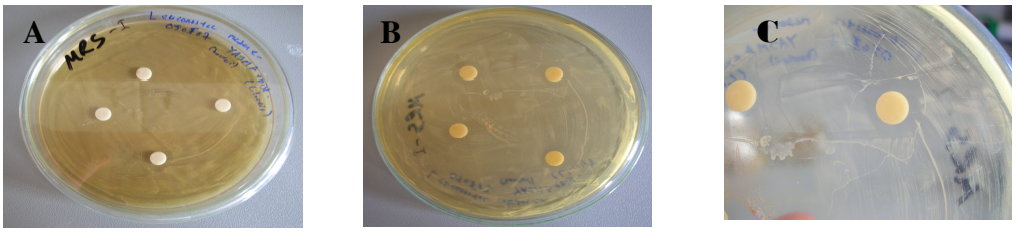
iii. Disk Yöntemi :

Bu yöntemde disklere doğrudan *L. lactis* ATCC 11454 bakteri kültürü **(Resim 2.13-1.14)** veya *L. lactis* ATCC 11454'ten elde edilen süpernatant **(Resim 2.15-2.16)** emdirildi. İndikatör suş olarak *L. mesenteriodes* ve *S. epidermidis* kullanıldı.

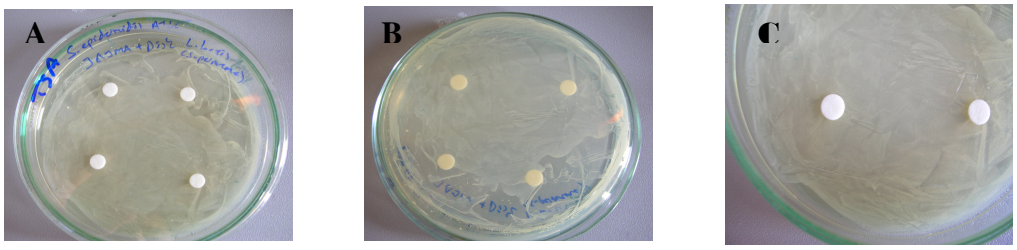
MRS agarda *L. mesenteriodes* ve TSA besiyerinde *S. epidermidis* yayma ekim yapıldı. 30 °C'ta bir gece üremesi sağlanan *L. lactis* ATCC 11454 ön kültürü ve bu kültürden 4 °C'ta 40 dk 4000 g'de santrifüj ile elde edilen süpernatant disklere emdirildi. Diskler yayma ekim yapılan petrilere yerleştirildi. İndikatör suşlar bir gece (30 °C'ta) üremeye bırakıldı. Üreme periyodunun sonunda inhibisyon zonları incelendi.



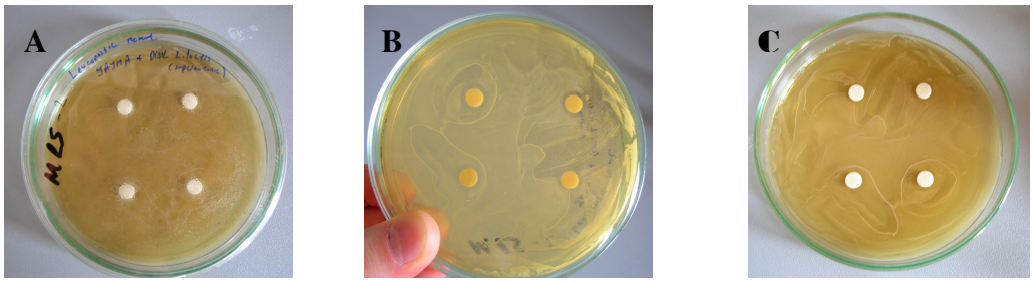
Resim 2.13 : *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **bakteri kültürü emdilirdi**. Besiyeri TSA, indikatör suş ***S. epidermidis***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) Disklerin yakından görünümü



Resim 2.14: *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **bakteri kültürü emdirildi**. Besiyeri MRS, indikatör suş ***L. mesenteriodes***. A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) Disklerin yakından görünümü



Resim 2.15: *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **bakteri süpernatantı emdirildi**. Besiyeri TSA, indikatör suş *S.epidermidis* A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) Disklerin yakından görünümü



Resim 2.16: *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin aktivitesinde disk yönteminin uygulanması. Disklere **süpernatant** emdirildi. Besiyeri MRS, indikatör suş *L. mesenteriodes.* A) Ekim öncesi petrinin üstten görünümü. B) Ekim sonrası alttan görünüm C) İnhibisyon zonları

2.2.4. Nisin Standart Grafiğinin Belirlenmesi

Nisin, doğal olarak *Lactococcus* genusundan ekstraselüler olarak sentezlenmesinin yanı sıra **Nisaplin** adıyla ticari olarak da temin edilmektedir. Nisin aktivitesini değerlendirmek amacıyla Nisinin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanıp oluşturdukları inhibisyon zonu çapları ölçüldü (Tablo 2.2-2.3). Elde edilen verilerle Nisin konsantrasyonuna karşı zon çapı standart grafikleri belirlendi (Şekil 2.6, Grafik 2.1).

NİSAPLİN (SİGMA)

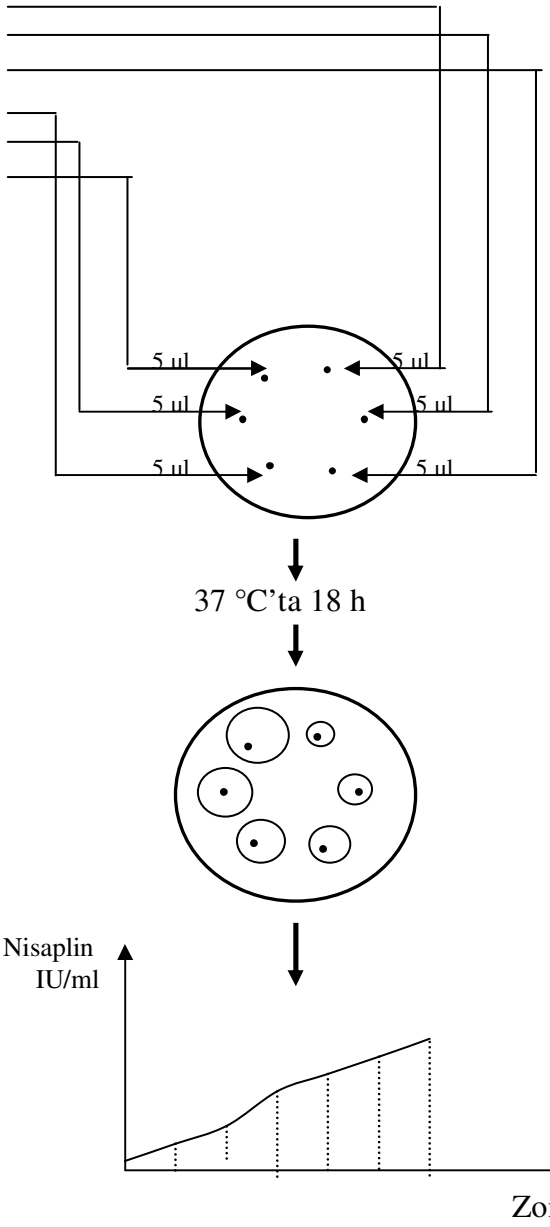
% 2.5 oranında saf Nisin
dH_2O pH 2.5 % 0.1 Tween 80

1 µg Nisaplin = 40 IU (veya AU)

Ana Stok ➔ 10.000 IU/ml

1. 100 IU/ml
2. 200 IU/ml
3. 300 IU/ml
4. 400 IU/ml
5. 500 IU/ml
6. 600 IU/ml

- 20 °C'ta saklanır)



Şekil 2.6 : Nisin standart grafiğinin hazırlanması.

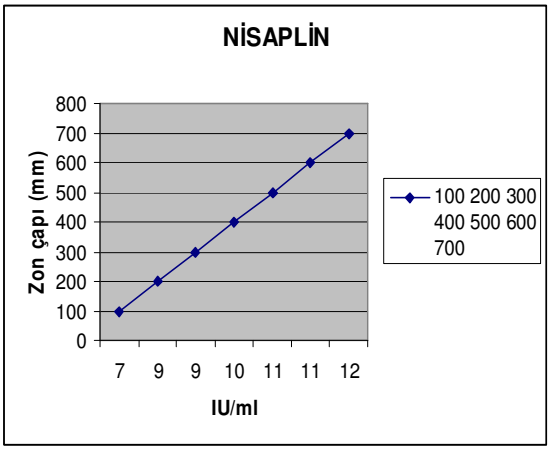
Yapılan ölçümler sonucunda **Tablo 2.2** ve **2.3**'deki veriler elde edildi:

Tablo 2.2 : Nisaplin aktivitesi (100-700 IU/ml) sonucu elde edilen inhibisyon zonları

IU/ml	İnhibisyon Çap (mm)
100	7
200	9
300	9
400	10
500	11
600	11
700	12

Tablo 2.3 : Nisaplin aktivitesi (10.000- 100.000 IU/ml) sonucu elde edilen inhibisyon zonları

	Damla miktarı (µl)		
IU/ml	0.5	1	1.5
10.000	15	16	17
100.000	22	23	23
L. lac	11		



Grafik 2.1 : Nisaplin standart grafiği:100-700 IU/ml nisaplin

2.2.5. Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

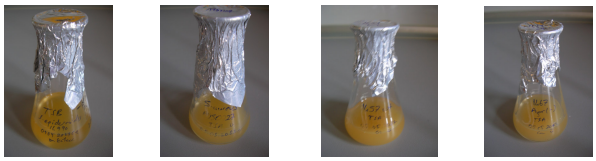
A. Genel Prosedür

Kullanılan suşlardan sadece Staphylococcus'lara ait üreme eğrileri belirlendi. Bu amaçla, hazırlanan ön kültür (ÖK)'lerden 1:8 oranında olacak şekilde alınıp steril besiyerine ilave edildi (3 ml Ö.K. / 25 ml broth besiyeri). Ekimin yapıldığı anda (t_0) ortam iyice karıştırılıp 1 ml alınarak UV Spektrometre'de (BioRad) OD_{600} değeri ölçüldü.

İlk ölçümden itibaren besiyeri 130 rpm'de 30 °C'ta üremeye bırakıldı. Bir saat aralıklarla besiyerinden 1 ml numune alınıp OD_{600} değerleri belirlendi. Deney sonucunda elde edilen veriler yardımıyla, Excel programında bakterilerin üreme eğrileri çıkarıldı. Oluşan grafiklerden yararlanarak her bir suşun dublikasyan zamanı, lag fazı, eksponansiyal faz ve durağan faz süreleri belirlendi. Üreme eğrilerinin oluşturulmasına yönelik işlemler Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

Üreme eğrileri bu tez/proje çalışmasının önemli noktalarından birini oluşturmaktadır: Tezin/projenin ana konusu olan QS mekanizması, hücre yoğunluğuna bağlı olarak aktive olan veya baskılanan bir mekanizmadır. Bu aktivasyon, hücre yoğunluğuyla orantılı olarak, ortama salgılanan sinyal moleküllerinin yeterli miktarda (eşik düzeyinin üstünde) olmasına, baskılanması ise sinyal moleküllerinin eşik düzeyinin altında olmasına bağlıdır. Dolayısıyla elde edeceğimiz Staphylococcal süpernatantların içerisindeki sinyal molekülü miktarını değerlendirebilmek, diğer bir ifadeyle Staphylococcal süpernatantın *L. Lactis* ATCC 11454 suşu üzerinde QS mekanizması açısından bir etkisi olup olmadığını yorumlayabilmek için, üreme eğrilerinin belirlenmesi son derece önemlidir. Üreme eğrilerinden yararlanarak bir suşa ait kültürün, üreme sürecinin herhangi bir noktasındaki populasyon yoğunluğunu ve sinyal molekülü konsantrasyonunu değerlendirmek mümkün olmaktadır.

ÜREME EĞRİLERİNİN BELİRLENMESİ



S. epidermidis ATCC 14990 | *S. epidermidis* A950227 | *S. epidermidis* 1457 *wt agr* (+) | *S. epidermidis* 1457 *agr* (-)

Aşağıdaki işlemler ön kültürlerin (ÖK) her biri için ayrı ayrı yapılacaktır

3 ml *Staphylococcus sp.* TSB-Bir gecelik ön kültür

24 ml Triptycase Soy Broth (TSB)

3 ml + 24 ml → 1:8 (ÖK:TSB)

UV ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILACAK KÜLTÜR

1 ml → 1:8 *Staphylococcus sp ön kültürü/Yeni TSB*

t_o → 1. ÖLÇÜM (ekim anında)

24 ml → 1 ml'lik UV kuveti

DİĞER ÖLÇÜMLER İÇİN → Çalkalamalı etüvde (30^oC,130 rpm) bekletilir

1 saatlik aralıklarla numune alınır

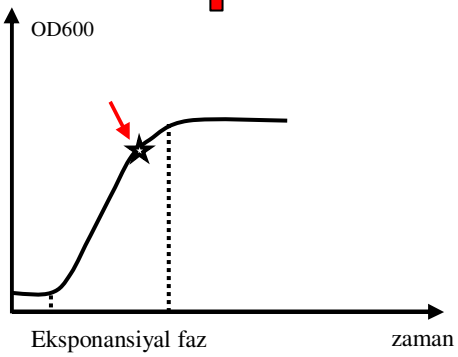
UV spectometrede OD_{600} değeri ölçülür

---------- O ----------

3 zaman noktası belirlenir:

1. Eksponansiyel faz başlangıcı (t_1)
2. Eksponansiyel faz sonu (t_2)
3. Durağan faz (t_3)

t_1 ➔ 130 dk (1' 10'')
t_2 ➔ 280 dk (4' 40'')
t_3 ➔ 560 dk (9' 20'')



OD_{600}-zaman grafiği çizilir

t_o ➔ 09:00-10:00, OD_{600} = A
t_1 ➔ 10:00-11:00, OD_{600} = B
t_2 ➔ 11:00-12:00, OD_{600} = C
t_3 ➔ 13:00-14:00, OD_{600} = D
t_4 ➔ 15:00-16:00, OD_{600} = E
t_5 ➔ 16:00-17:00, OD_{600} = F
t_6 ➔ 17:00-18:00, OD_{600} = G

Şekil 2.7 : Üreme eğrilerinin belirlenmesinde takip edilen işlemler.

B. Üreme Eğrilerini Belirlemek İçin Yapılan Deneyler

Üreme eğrileri belirlenirken bir çok faktör dikkate alınır. Bunlar besiyeri miktarı, besiyerine ekilecek ön kültür miktarı, ön kültürün yoğunluğu, ortam sıcaklığı vb. faktörlerdir.

Burada üreme eğrileri belirlenirken sırasıyla şu kriterler dikkate alındı:

1. **Bir suşa ait farklı başlangıçta OD_{600} değerleri:** Bir suşun aynı miktardaki besiyerlerinde farklı konsantrasyonlarda üremeye başlamasıyla oluşan üreme eğrileri.
2. **Bir suşa ait farklı miktarlarda besiyeri:** Farklı miktarlardaki besiyerlerine aynı miktarda ön kültür ekilmesiyle oluşan üreme eğrileri
3. **Aynı besiyerinde farklı miktarda ön kültür ekimi:** Aynı miktarlarda besiyerlerine farklı miktarda ön kültür ekilerek başlatılan üreme eğrileri.

1. DENEY : Dört Suşun Tek Başlangıçlı Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi-1

Bu deneyde *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* A950227, *S.epidermidis* 1457 *agr* (+) ve *S.epidermidis* 1457 *agr* (-) olmak üzere 4 *Staphylococ* suşunun üreme eğrilerinin belirlenmesi hedeflendi ve ölçümlere t_o anında 0.5-0.9 arasındaki herhangi bir OD_{600} değerinden başlanıldı.

1.GÜN :

1. *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* 950227, *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) ve *S. epidermidis* 1457 *agr* (-) suşlarının ön kültürleri hazırlandı. TSB besiyerlerinden **10 ml** alınıp 50 ml'lik steril erlenlere eklendi. Üzerlerine **0.1 ml** bakteri ekildi. Ekimler 30 ˚C'ta 130 rpm'de üremeye bırakıldı.

2.GÜN :

2. Ön kültürlerden **3 ml** alınıp **25 ml** steril besiyeri içeren 50'lik erlenlere ekildi (1:8 oranında).
3. Ekimi takiben her bir erlenden hemen 1 ml alınıp (t_0) OD_{600} değerleri ölçüldü.
4. Bakteriler aynı şartlarda (30 ˚C'ta 130 rpm'de) üremeye bırakıldı.

5. Birer saatlik periyotlarla her bir suştan 1 ml numune alınıp UV Spektrometre (BioRad) cihazıda OD_{600} değerleri tespit edildi (Tablo 2.4)[5].

6. Elde edilen verilerle, yarı logaritmik kağıt üzerinde ve bilgisayar ortamında Excel progamıyla her bir bakterinin üreme eğrisi belirlendi (Grafik 2.2).

7. Üreme eğrileri üzerinden suşlara ait lag fazı, logaritmik faz başlangıcı ve sonu, durağan faz süreleri ve duplikasyon zamanları (t_d) belirlendi.

Ekimler:

S. epidermidis ATCC 14990 ➔ 25 ml TSB + 3 ml ÖK

S. aureus 950277 ➔ 25 ml TSB + 3 ml ÖK

S. epidermidis 1457 *agr* (+) ➔ 25 ml TSB + 3 ml ÖK

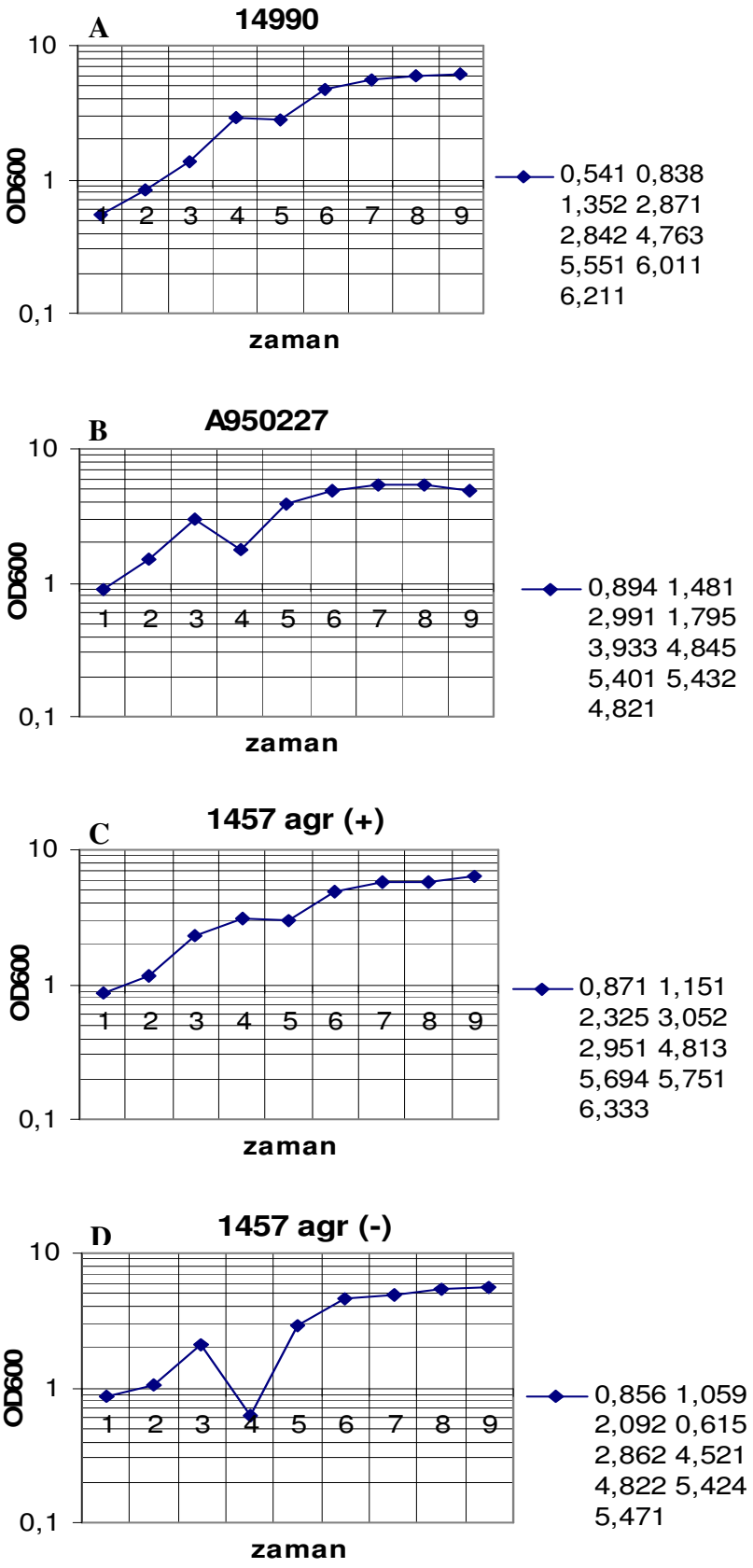
S. epidermidis 1457 *agr* (-) ➔ 25 ml TSB + 3 ml ÖK

Tablo 2.4 : *Staphylococ* suşlarına ait D_{600} değerleri.

		Staphylococcal Suşlar			
Ölçüm (t)	**Zaman (h)**	***S. epidermidis* ATCC14990**	***S. aureus* A950227**	***S. epidermidis* 1457 *agr* (+)**	***S. epidermidis* 1457*agr* (-)**
t_0	0'	0,541	0,894	0,871	0,856
t_1	0.5'	0,838	1,481	1,151	1,059
t_2	1'	1,352	**0,299**	**0,235**	**0,209**
t_3	1.5'	**0,287**	**0,179**	**0,305**	**0,061**
t_4	2'	**0,284**	**0,393**	**0,295**	**0,286**
t_5	2.5'	**0,476**	**0,484**	**0,481**	**0,452**
t_6	3'	**0,555**	**0.540**	**0,569**	**0,482**
t_7	3.5'	**0,601**	**0.543**	**0,575**	**0,542**
t_8	4'	**0,621**	**0.482**	**0,633**	**0,547**

Not: Koyu harflerle yazılan değerler, numune 1/10 seyreltildikten sonra ölçüm alınan değerlerdir. Kullanılan cihazın OD_{600} 1.000 değerini aştıktan sonra güvenilir sonuç vermemesi nedeniyle seyreltme yapılmıştır.

[5] Kullandığımız cihazın özelliği nedeniyle OD_{600} değeri 1,000 'ın üzerine çıktığında 1:9 oranında sulandırma yapıldı. Bu şekilde elde edilen değerler koyu harflerle belirtilmiştir.



Grafik 2.2: *Staphylococcal* üreme eğrileri. A) *S. epidermidis* ATCC 14990, B) *S. aureus* 950227 C) *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) D) *S. epidermidis* 1457 *agr* (-)

2. DENEY : *S. epidermidis* ATCC 14990 Suşuna ait Beş Farklı Başlangıç Konsantrasyonu

Bu deneyde, daha önce üreme eğrileri belirlenen suşlardan sadece bir tanesi (*S. epidermidis* ATCC 14990) ele alındı ve başlangıçtaki OD_{600} değerleri farklı, miktarları ise aynı olan 5 kültür hazırlandı. Bu sayede, üreme eğrileri belirlenirken **başlangıç konsantrasyonunun etkisi**nin olup olmadığının tespit edilmesi hedeflendi.

1.GÜN :

1. *S. epidermidis* ATCC 14990 suşunun ön kültürü hazırlandı. Bu amaçla TSB besiyerinden **10 ml** alınıp 50 ml'lik steril erlenlere eklendi. Üzerlerine **0.1 ml** bakteri ekilip 30 ˚C'ta 130 rpm'de üremeye bırakıldı.

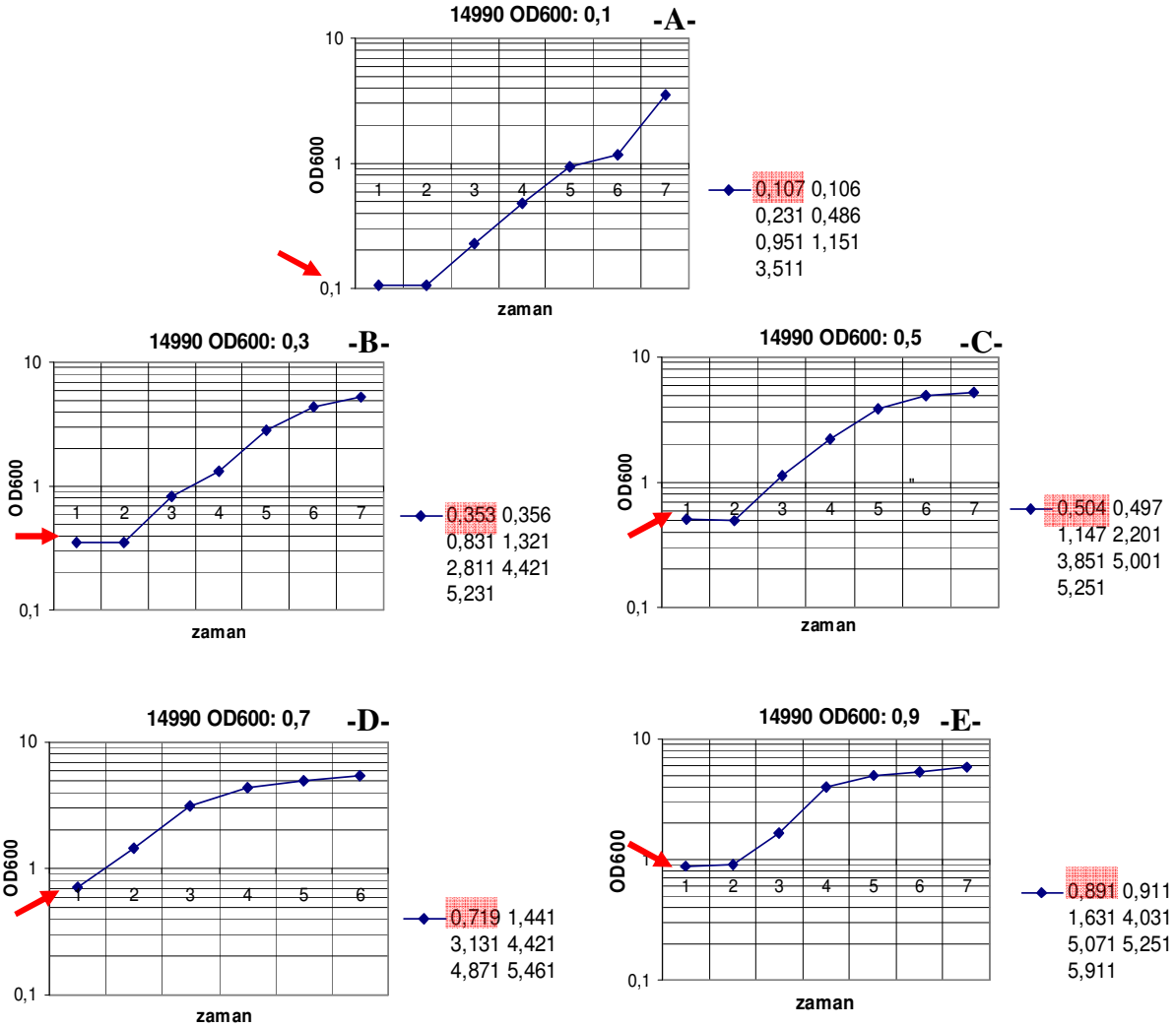
2.GÜN :

2. Ön kültürden farklı miktarlarda numune alıp **25 ml** steril TSB besiyeri içeren 50 ml'lik **5 ayrı erlene**, OD_{600} (t_0) değerleri sırayla **0.1-0.3-0.5-0.7-0.9** olacak şekilde ekim yapıldı.
3. İlk ölçümün ardından ekimler 30 ˚C'ta 130 rpm'de üremeye bırakıldı.
4. Birer saatlik periyotlarla her bir suştan 1 ml numune alınıp UV Spektrometre (BioRad) cihazında OD_{600} değerleri tespit edildi (Tablo 2.5).
5. Elde edilen verilerle, hem manuel olarak yarı logaritmik kağıt üzerinde hem de bilgisayar ortamında Excel progamıyla her bir bakterinin üreme eğrisi belirlendi (Grafik 2.3).
6. Üreme eğrilerinden yararlanarak, bir suşa ait üreme eğrisinde farklı başlangıç konsantrasyonlarının etkisi incelendi.

Tablo 2.5: *S. epidermidis* ATCC 14990 suşunun beş farklı konsantrasyonda başlatılan OD_{600} değerleri.

		S. epidermidis 14990 - OD600 DEĞERLERİ				
Ölçüm	**Zaman**	**0,1**	**0,3**	**0,5**	**0,7**	**0,9**
t_0	0'	0,107	0,353	0,504		0,891
t_1	1'	0,106	0,356	0,497	0,719	0,911
t_2	2'	0,231	0,831	1,147	1,441	1,631
t_3	3'	0,486	1,321	**2,201**	**3,131**	**4,031**
t_4	4'	0,951	**2,811**	**3,851**	**4,421**	**5,071**
t_5	5'	**1,151**	**4,421**	**5,001**	**4,871**	**5,251**
t_6	7'	**3,511**	**5,231**	**5,251**	**5,461**	**5,911**

Not: Koyu harflerle yazılan değerler, numune 1/10 seyreltildikten sonra ölçüm alınan değerlerdir. Kullanılan cihazın OD_{600} 1.000 değerini aştıktan sonra güvenilir sonuç vermemesi nedeniyle seyreltme yapılmıştır.



Grafik 2.3: *S. epidermidis* ATCC 14990'ın farklı başlangıç konsantrasyonlarıyla oluşturulan üreme eğrileri. A) OD_{600}: 0.1 B) OD_{600}: 0.3 C) OD_{600}: 0.5 D) OD_{600}: 0.7 E) OD_{600}: 0.9

3.DENEY: Dört Suşun Tek Başlangıçlı Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi-2

Bu deney, daha önce yapılan Deney-1'in tekrarıdır. Ancak bire bir aynısı olmayıp bazı farklılıklar bulunmaktadır (Bu farklılıklar koyu yazılarak belirtilmiştir). Başlangıç besiyeri miktarı, elde edilecek süpernatantın da miktarını ifade eder. Daha sonraki deneylerde doğrudan Staphylococcal süpernatant elde edeceğimiz için bu deneyler kriter alınacaktır

1.GÜN :

1. *S. epidermidis* 14990, *S. aureus* 950227, *agr* (+) ve *agr* (-) suşlarının ön kültürleri hazırlandı. TSB besiyerlerinden 10 ml alınıp 50 ml'lik steril erlenlere eklendi. Üzerlerine 1 ml bakteri (ön kültür) ekildi. Ekimler 30 ˚C'ta 130 rpm'de üremeye bırakıldı

2.GÜN :

2. Ön kültürlerden **1 ml** alınıp **30 ml** steril besiyeri içeren 50 ml'lik erlenlere ekildi.
3. Ekimi takiben her bir erlenden hemen 1 ml alınıp (t_0) OD_{600} değerleri ölçüldü.
4. Bakteriler aynı şartlarda (30 ˚C'ta 130 rpm'de) üremeye bırakıldı.
5. Birer saatlik periyotlarla her bir suştan 1 ml numune alınıp UV Spektrometre (BioRad) cihazında OD_{600} değerleri tespit edildi **(Tablo.7)**.
6. Elde edilen verilerle yarı logaritmik kağıt üzerinde manuel olarak, bununla birlikte bilgisayar ortamında Excel programıyla her bir bakterinin üreme eğrisi belirlendi **(Grafik.7)**.
7. Üreme eğrileri, bir önceki deneyde elde edilen grafiklerle karşılaştırıldı.

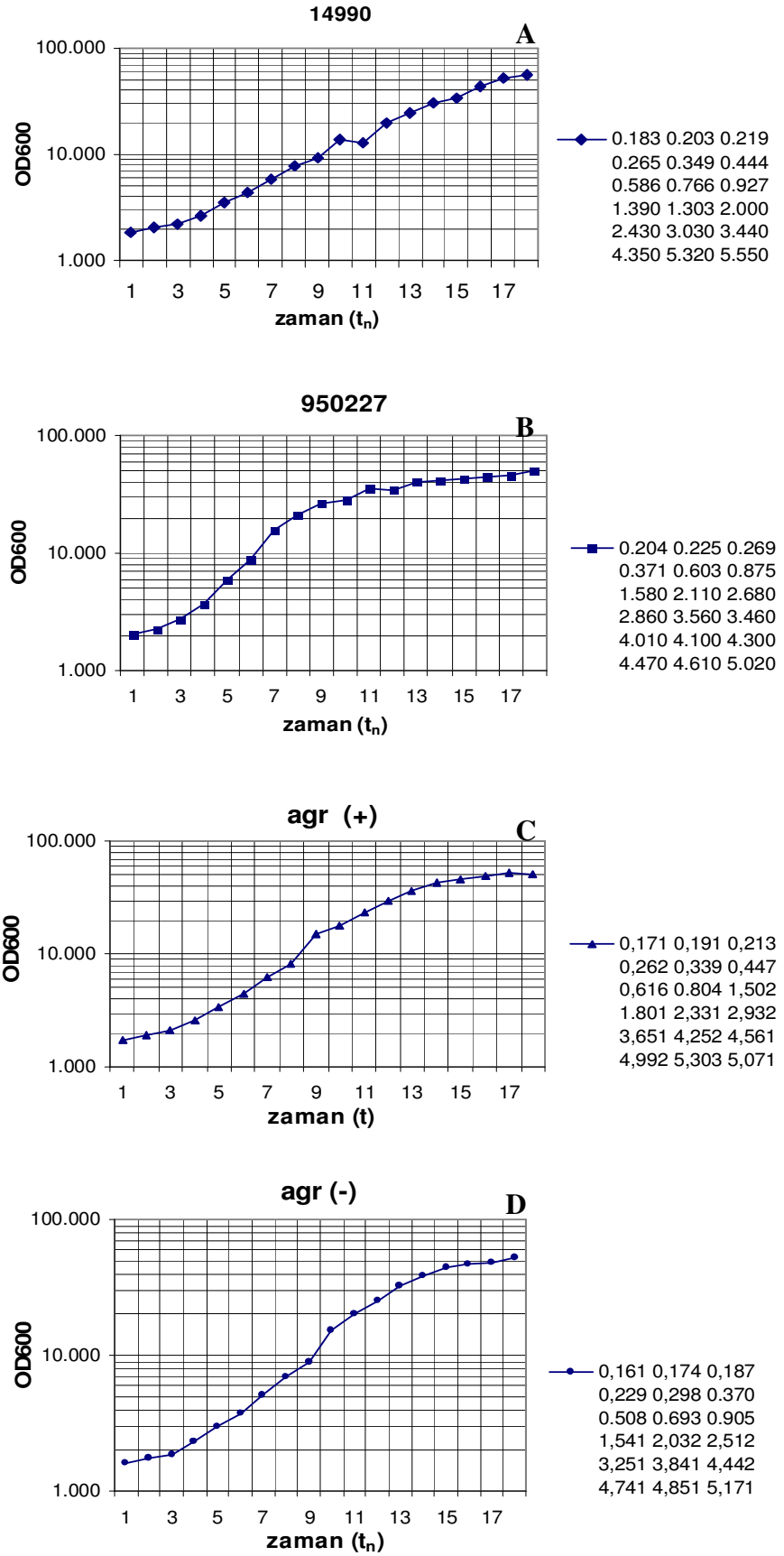
Ekimler:

S. epidermidis ATCC 14990 ➔ 30 ml TSB + 1 ml ÖK
S. aureus 950277 ➔ 30 ml TSB + 1 ml ÖK
S. epidermidis 1457 *agr* (+) ➔ 30 ml TSB + 1 ml ÖK
S. epidermidis 1457 *agr* (-) ➔ 30 ml TSB + 1 ml ÖK

Tablo 2.6: 30 ml besiyerinde dört Staphylococcal suşa ait OD_{600} değerleri.

		BAKTERİLER & OD600 DEĞERLERİ			
Ölçüm	**Zaman**	***S. epidermidis* ATCC 14990**	***S. aureus* A950227**	***S. epidermidis* 1457 *agr* (+)**	***S. epidermidis* 1457 *agr* (-)**
t_0	0'	0.183	0.204	0,171	0,161
t_1	0.5'	0.203	0.225	0,191	0,174
t_2	1'	0.219	0.269	0,213	0,187
t_3	1.5'	0.265	0.371	0,262	0,229
t_4	2'	0.349	0.603	0,339	0,298
t_5	2.5'	0.444	0.875	0,447	0.370
t_6	3'	0.586	**1.580**	0,616	0.508
t_7	3.5'	0.766	**2.110**	0.804	0.693
t_8	4'	0.927	**2.680**	**1,502**	0.905
t_9	4.5'	**1.390**	**2.860**	**1.801**	**1,541**
t_{10}	5'	**1.303**	**3.560**	**2,331**	**2,032**
t_{11}	5.5'	**2.000**	**3.460**	**2,932**	**2,512**
t_{12}	6'	**2.430**	**4.010**	**3,651**	**3,251**
t_{13}	6.5'	**3.030**	**4.100**	**4,252**	**3,841**
t_{14}	7'	**3.440**	**4.300**	**4,561**	**4,442**
t_{15}	7.5'	**4.350**	**4.470**	**4,992**	**4,741**
t_{16}	8'	**5.320**	**4.610**	**5,303**	**4,851**
t_{17}	8.5'	**5.550**	**5.020**	**5,071**	**5,171**

Not: Koyu harflerle yazılan değerler, numune 1/10 seyreltildikten sonra ölçüm alınan değerlerdir. Kullanılan cihazın OD_{600} 1.000 değerini aştıktan sonra güvenilir sonuç vermemesi nedeniyle seyreltme yapılmıştır.



Grafik 2.4: Staphylococcal üreme eğrileri.
A) *S. epidermidis* ATCC 14990 B) *S. aureus* 950227 C) *S. epidermidis* 1457 *agr* (+) D) *S. epidermidis* 1457 *agr* (-)

4.DENEY: *S. epidermidis* ATCC 14990 Suşuna Ait Farklı Miktarlardaki Besiyerlerinde Farklı Konsantrasyonlarda Başlayan Üreme Eğrileri

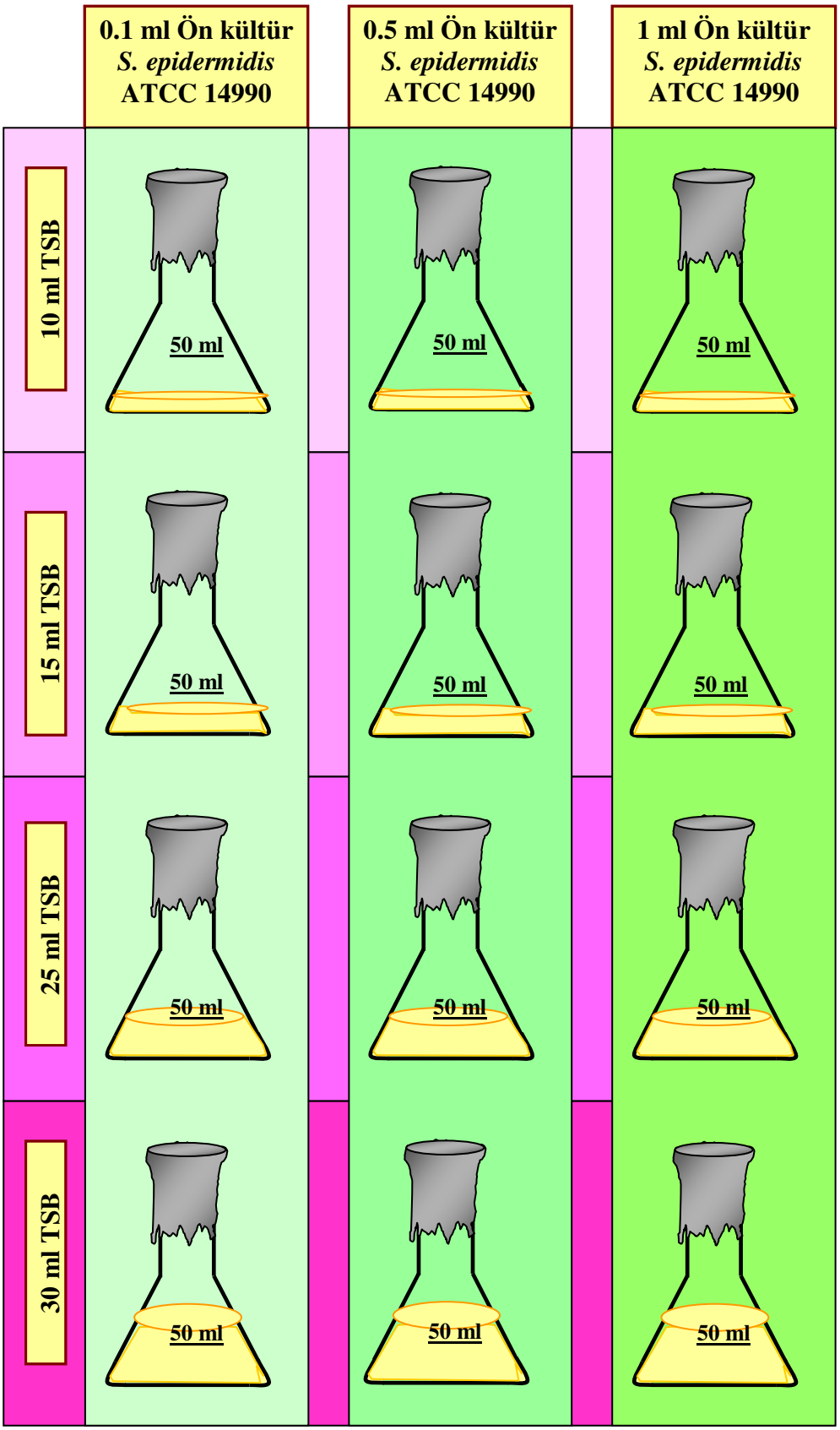
Bu deneyin amacı, hem **besiyeri miktarı**ndaki hem de t_0 anında besiyerine ekilen **ön kültür miktarı**ndaki değişikliğin üreme sürecine etkisini belirlemektir. Bunun için 50 ml'lik 12 erlene üçer üçer olmak üzere **10-15-25 ve 30 ml TSB** besiyeri eklendi **(Tablo 2.7, Şekil 2.8)**. Her bir besiyerine sırasıya **0.1-0.5 ve 1 ml ön kültür** ekildi ve yukarıdaki işlemler aynen takip edilerek OD_{600} değerleri belirlendi **(Tablo 2.8)**. Bu veriler yardımıyla üreme eğrileri çıkarıldı **(Grafik 2.5-2.6-2.7)**.

Tablo 2.7: Deney-4'te yapılan ekimlerin adlandırılması.

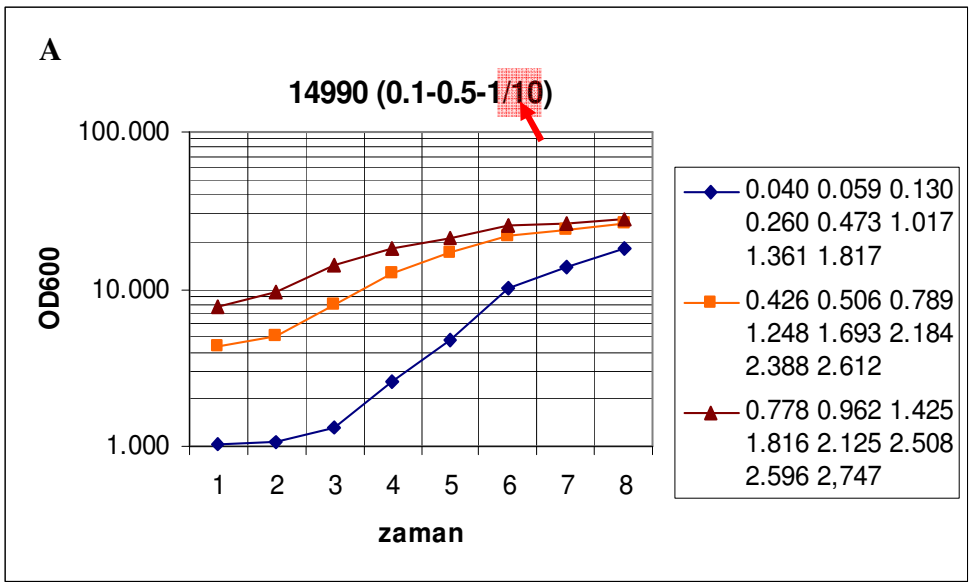
	Besiyeri Miktarı	Ön kültür miktarı
1.	10 ml TSB	**0.1 ml 14990**
2.	10 ml TSB	*0.5 ml 14990*
3.	10 ml TSB	1 ml 14990
4.	15 ml TSB	**0.1 ml 14990**
5.	15 ml TSB	*0.5 ml 14990*
6.	15 ml TSB	1 ml 14990
7.	25 ml TSB	**0.1 ml 14990**
8.	25 ml TSB	*0.5 ml 14990*
9.	25 ml TSB	1 ml 14990
10.	30 ml TSB	**0.1 ml 14990**
11.	30 ml TSB	*0.5 ml 14990*
12.	30 ml TSB	1 ml 14990

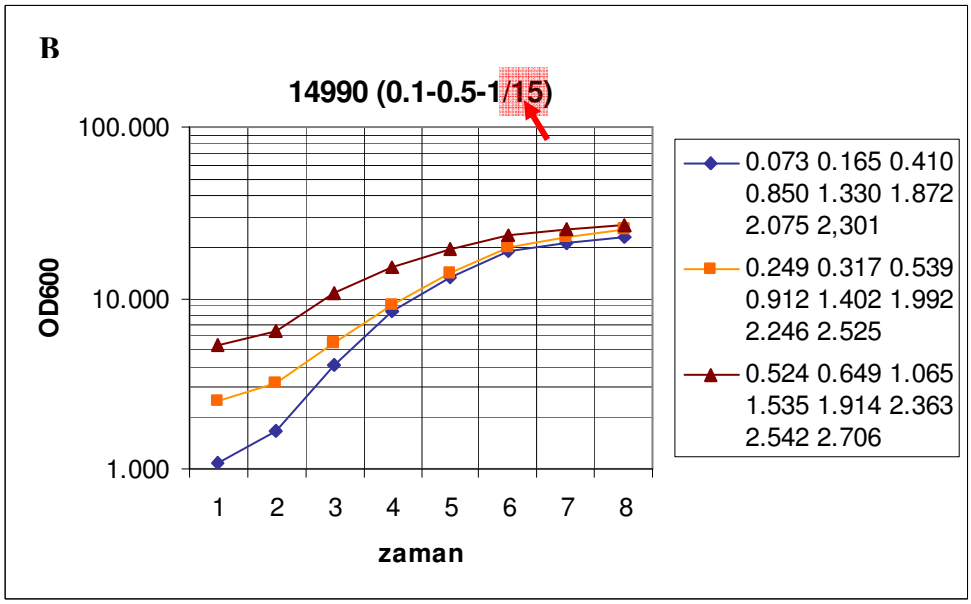
Tablo 2.8: *S. epidermidis* ATCC 14990 suşuna ait 0D600 değerleri.

	Ölçümler							
	1.	**2.**	**3.**	**4.**	**5.**	**6.**	**7.**	**8.**
1.	0.040	0.059	0.130	0.260	0.473	1.017	1.361	1.817
2.	0.426	0.506	0.789	1.248	1.693	2.184	2.388	2.612
3.	0.778	0.962	1.425	1.816	2.125	2.508	2.596	2,747
4.	0.073	0.165	0.410	0.850	1.330	1.872	2.075	2,301
5.	0.249	0.317	0.539	0.912	1.402	1.992	2.246	2.525
6.	0.524	0.649	1.065	1.535	1.914	2.363	2.542	2.706
7.	0.011	0.005	0.016	0.063	0.151	0.496	0.672	1,112
8.	0.129	0.165	0.290	0.523	0.905	1.508	1.883	2,255
9.	0.299	0.391	0.582	0.952	1.374	1.886	2.069	2,294
10.	0.018	0.016	0.005	0.047	0.125	0.412	0.597	0,996
11.	0.105	0.133	0.233	0.430	0.778	1.480	1.770	2,145
12.	0.261	0.306	0.498	0.822	1.229	1.812	2.010	2,173

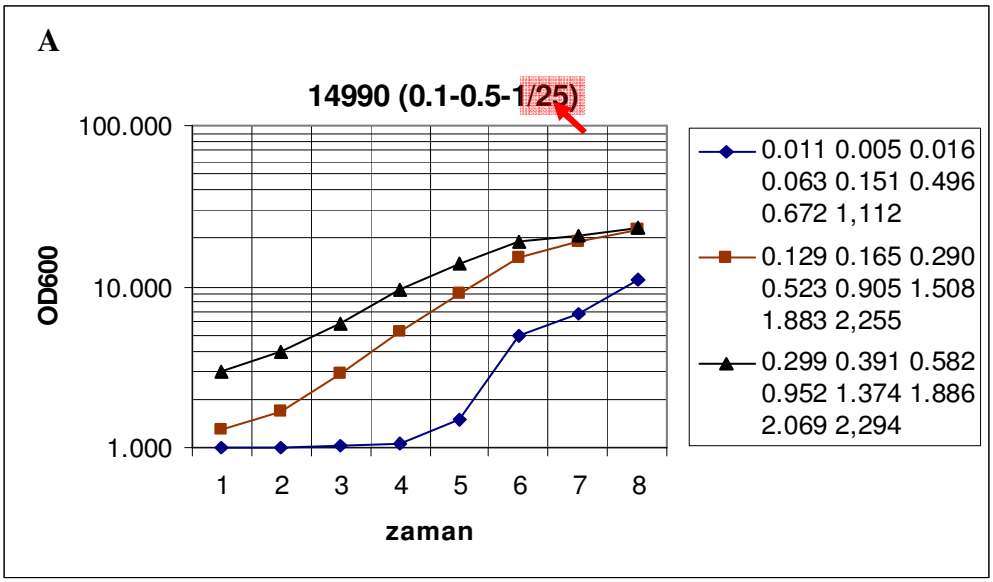


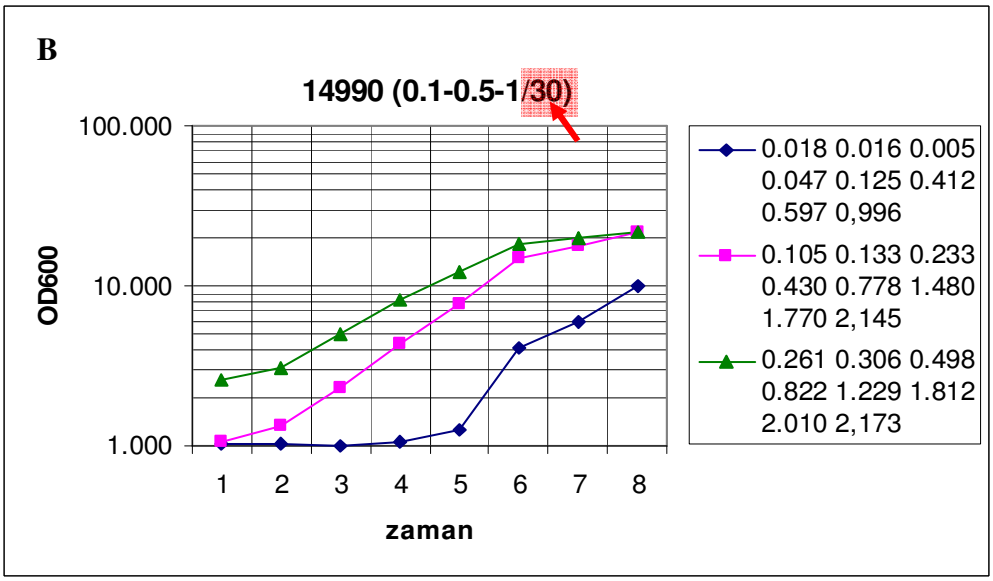
Şekil 2.8 : Deney-4'ün temsili gösterimi. 10-15-25 ve 30 ml'lik TSB besiyerlerine 0.1-0.5 ve 1 ml *S. epidermidis* ATCC 14990 önkültürü ekildi.



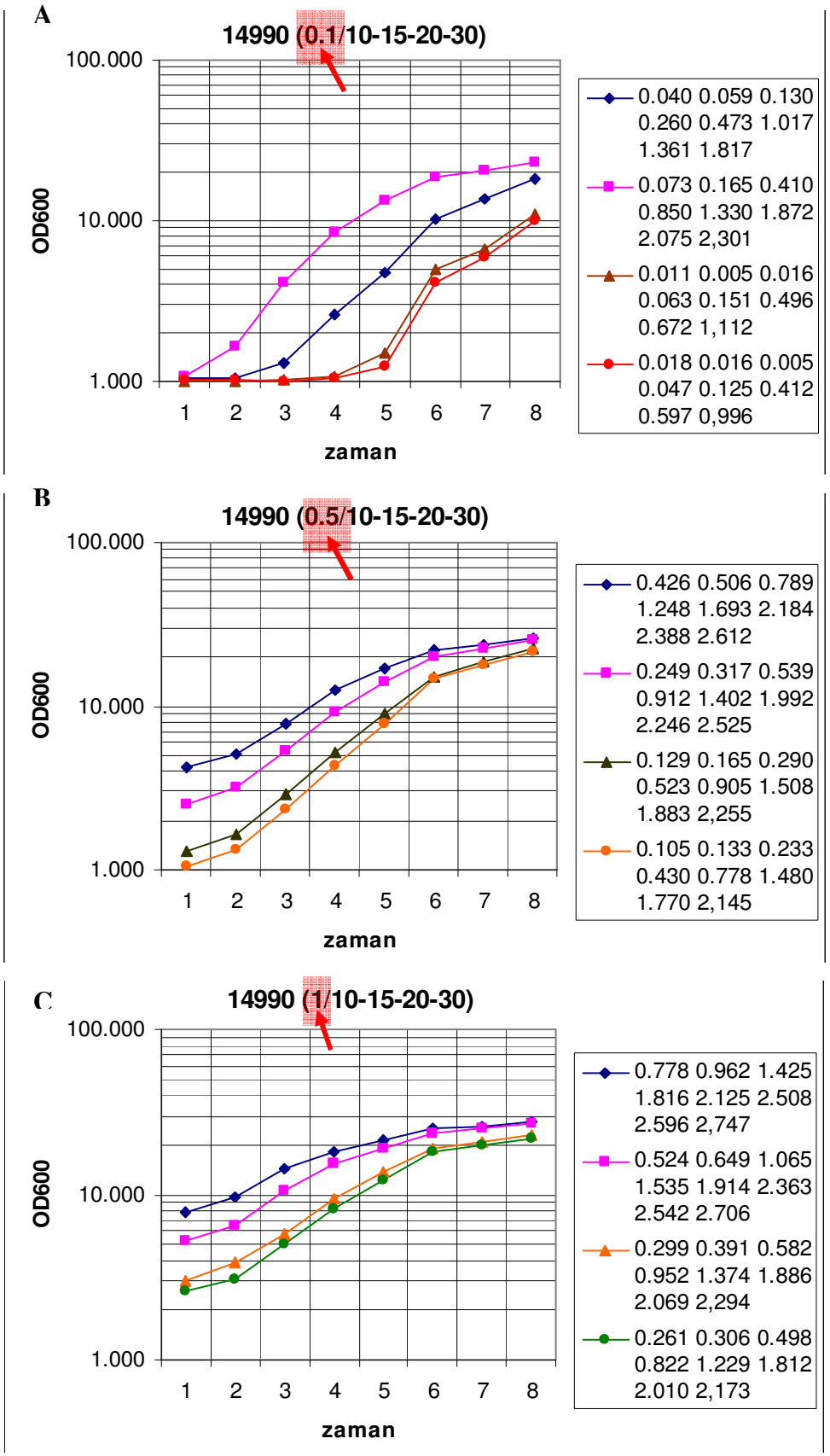


Grafik 2.5: *S. epidermidis* ATCC 14990 ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi**: Aynı miktardaki besiyerlerinde** farklı konsantrasyonlardaki ekimler. 10 ml TSB'de, B) 15 ml TSB'de **0.1-0.5 ve 1 ml**'lik ön kültür ekimleri.





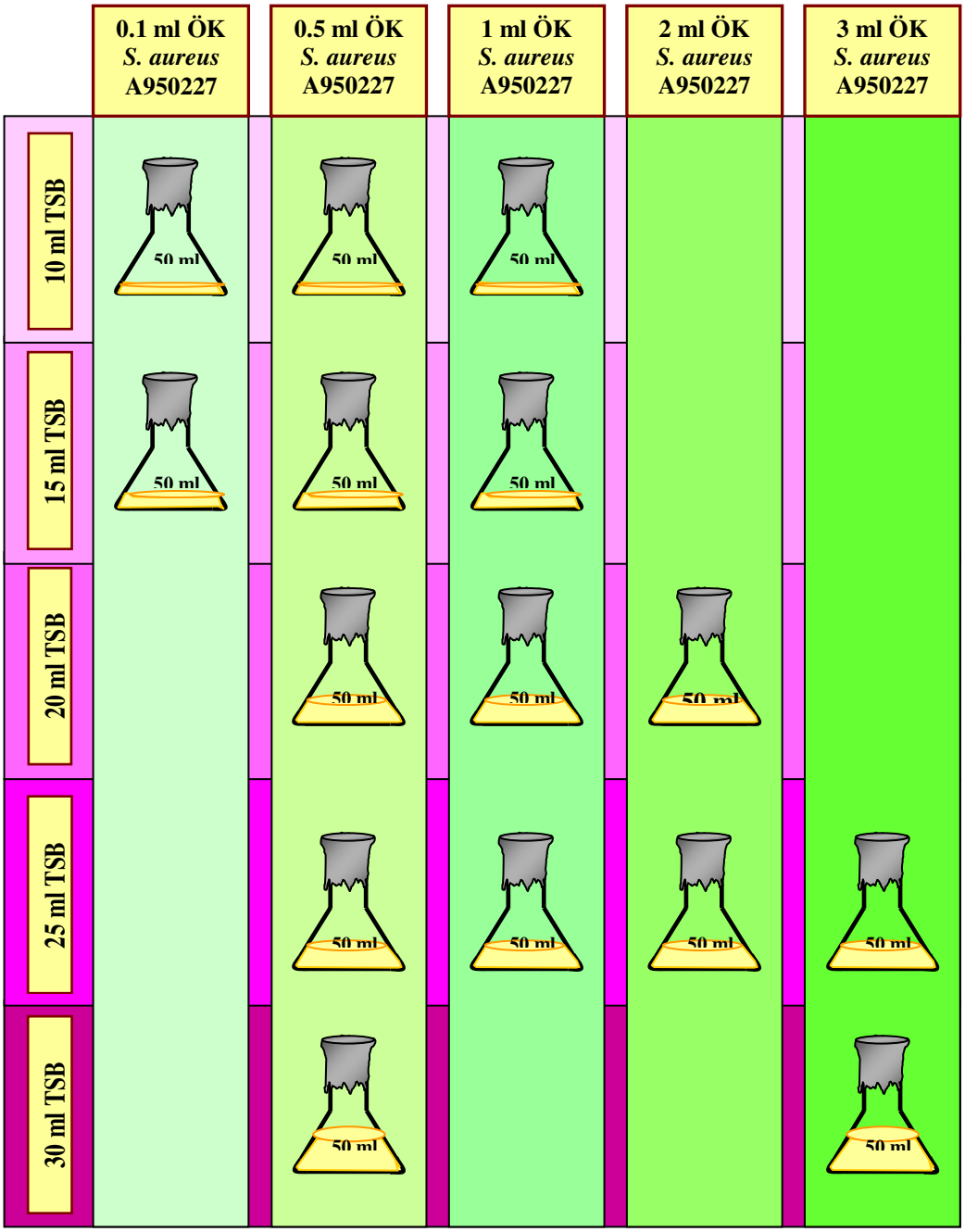
Grafik 2.6: *S. epidermidis* ATCC 14990 ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi**: Aynı besiyerinde** farklı konsantrasyonlardaki ekimler. A) 25 ml TSB'de, B) 30 ml TSB'de **0.1-0.5 ve 1 ml**'lik ön kültür ekimleri.



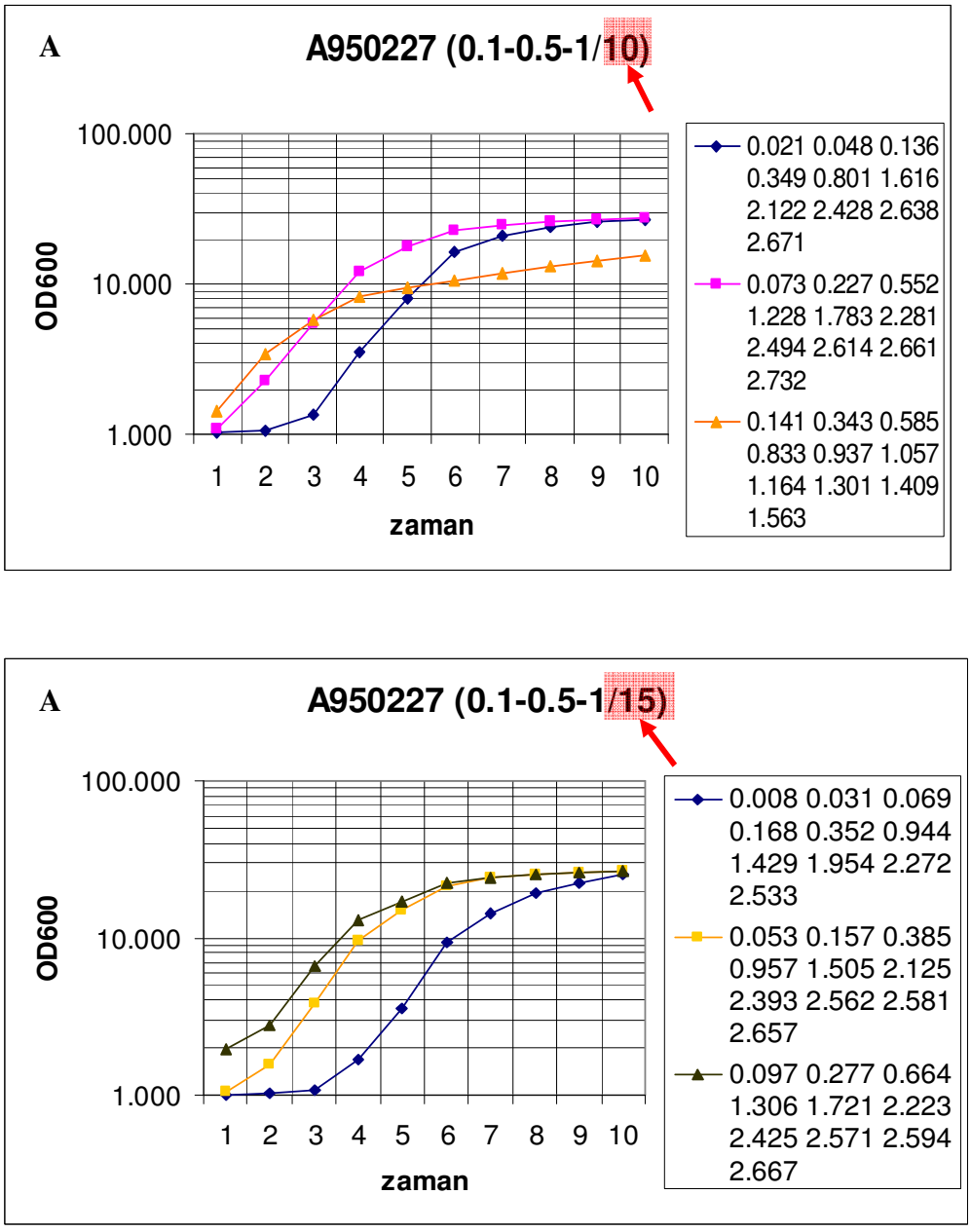
Grafik 2.7: *S. epidermidis* ATCC 14990 ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi**:** Farklı miktarlarda besiyerlerinde **aynı konsantrasyonlardaki** ekimler. **10-15-25-30 ml TSB'de** A) 0.1 ml ÖK B) 0.5 ml ÖK C) 1 ml ÖK ekimleri.

5.DENEY : ***S. aureus*** **A950227 Suşuna Ait Farklı Miktarlardaki Besiyerlerinde Farklı Konsantrasyonlarda Başlayan Üreme Eğrileri**

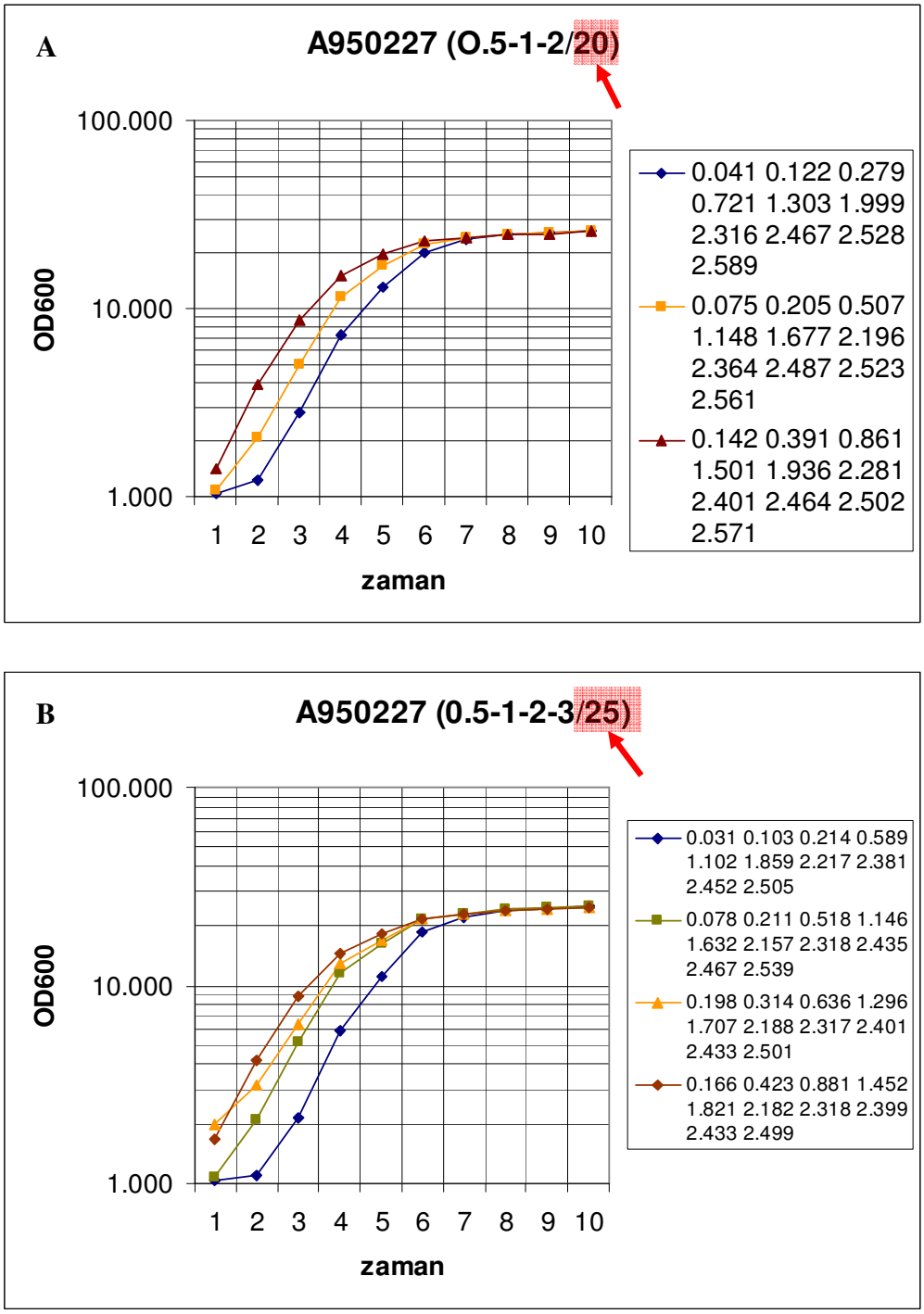
4. deneyin benzeri olan bu deneyde suş olarak *S. aureus* A950227 kullanılmıştır. Yapılan işlemler ve deney süreci aynıdır (**Şekil 2.9, Grafik 2.8-2.14, Tablo 2.9**).



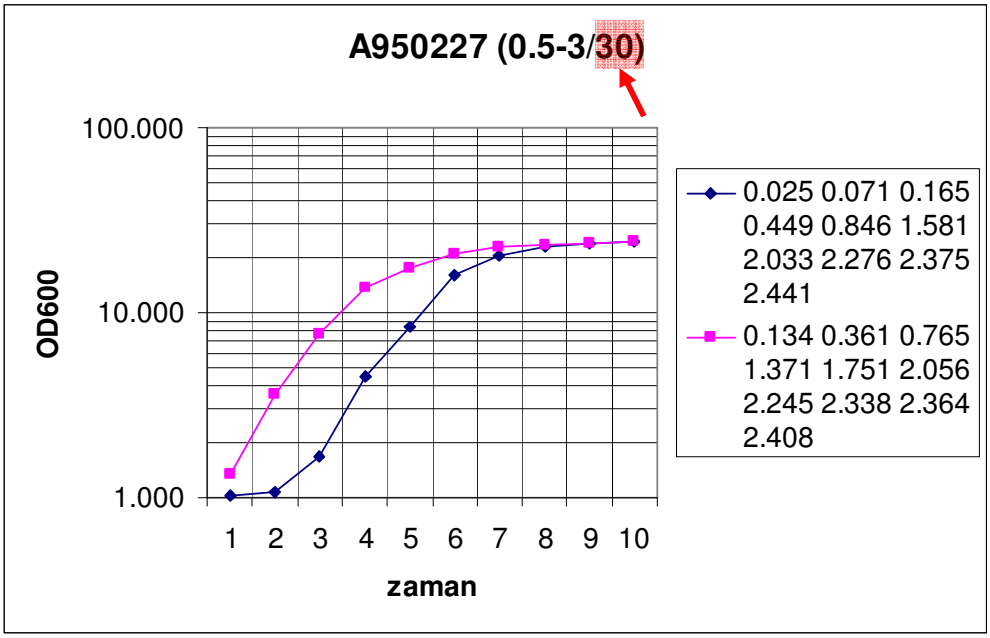
Şekil 2.9 : Deney-5'in temsili gösterimi. 10-15-20-25 ve 30 ml'lik TSB besiyerlerine 0.1-0.5-1-2 ve 3 ml'lik *S. aureus* A950277 ön kültürü (ÖK) ekildi.



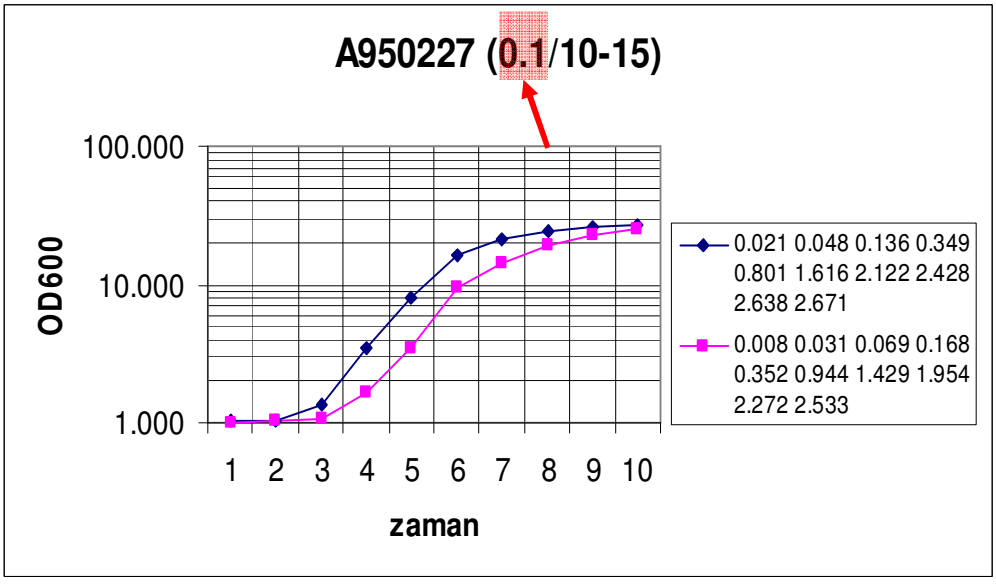
Grafik 2.8 : *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: A) **10 ml TSB'de** B) **15 ml TSB'de** 0.1-0.5 ve 1 ml ön kültür ekimleri.



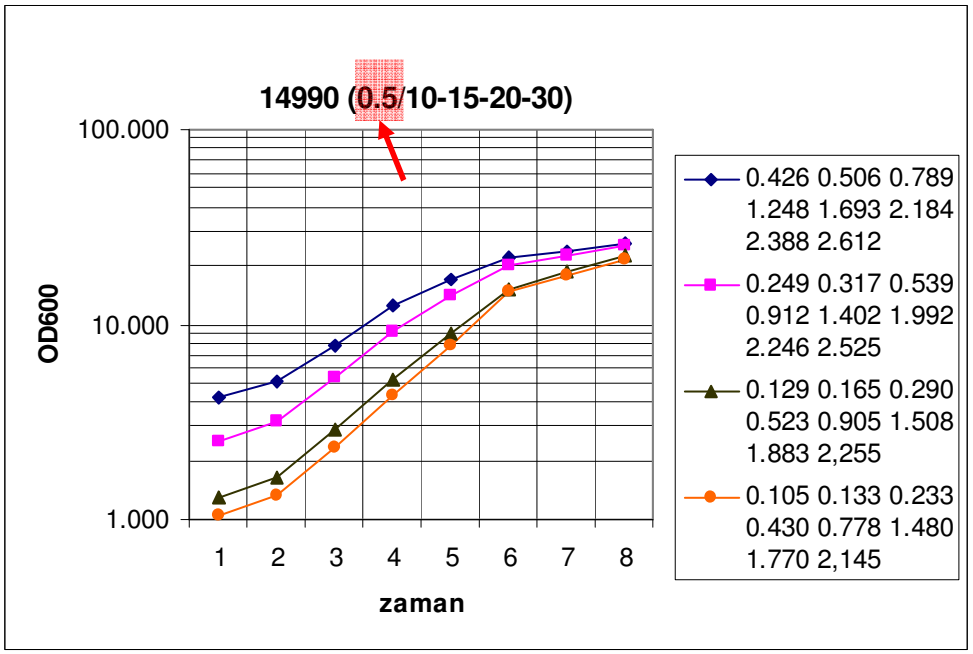
Grafik 2.9: *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: A) **20 ml TSB'de** B) **25 ml TSB'de** 0.5-1-2 ve 3 ml ön kültür ekimleri.



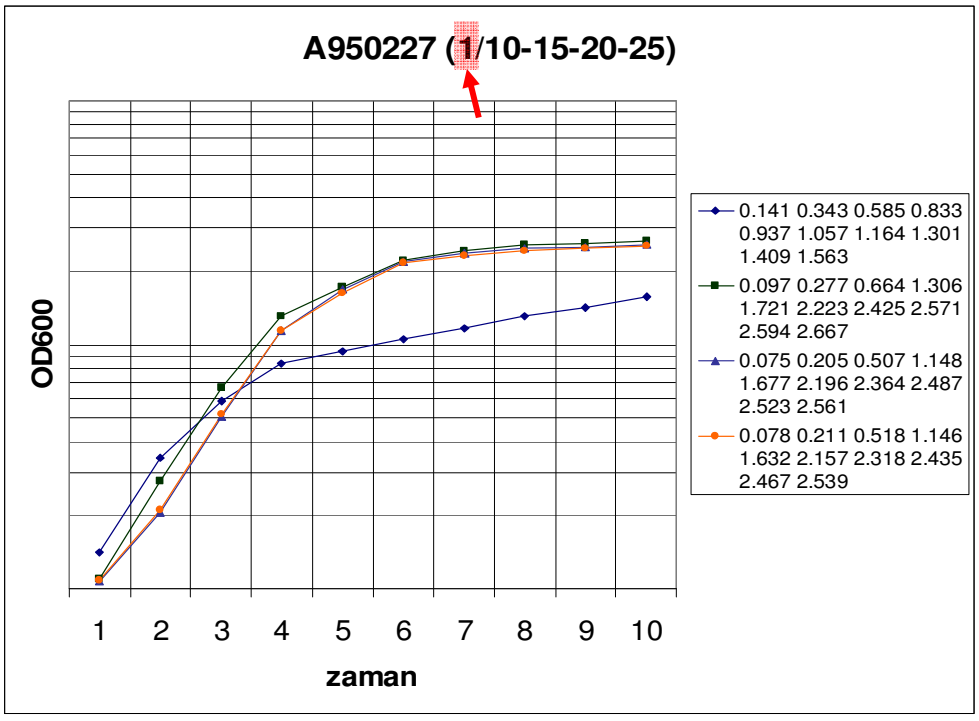
Grafik 2.10 : *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: **30 ml TSB'de** 0.5 ve 3 ml'lik ön kültür ekimleri.



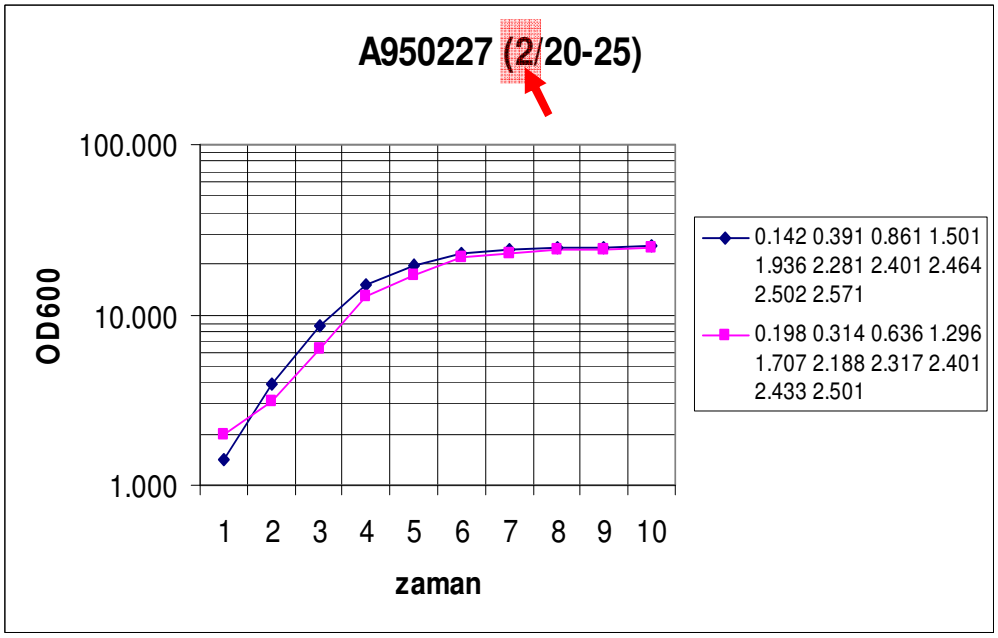
Grafik 2.11: *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 10 ve 15 ml TSB besiyerine **0.1 ml** ön kültür ekimleri.



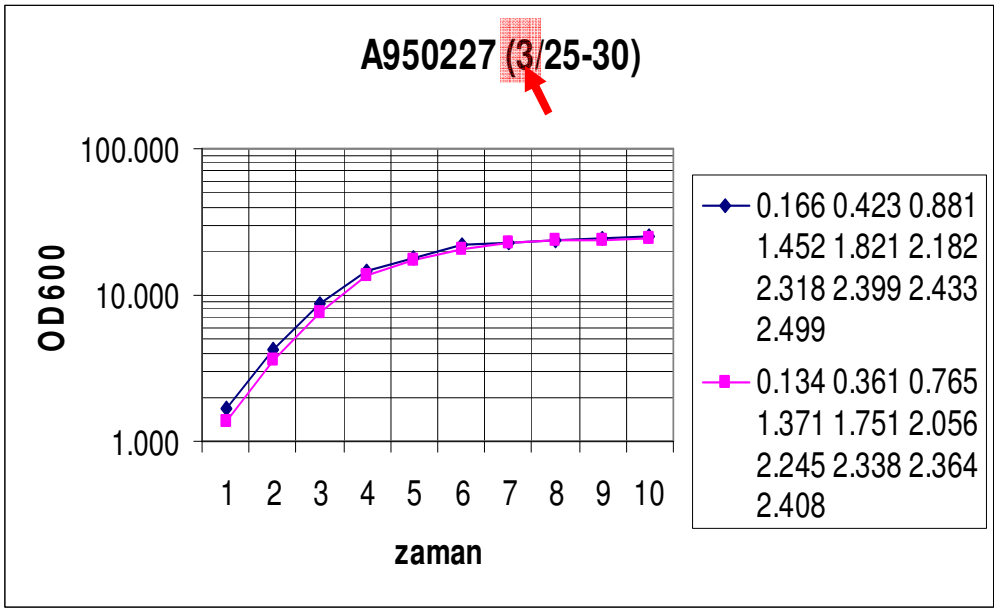
Grafik 2.12: *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 10-15-20 ve 30 ml TSB'de **0.5 ml'lik** ön kültür ekimleri.



Grafik 2.13: *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 10-15-20 ve 25 ml TSB'de **1 ml'lik** ön kültür ekimleri.



Grafik 2.14: *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 20 ve 25 ml TSB'de **2 ml'lik** ön kültür ekimleri.



Grafik 2.15 : *S. aureus* A950227'ye ait üreme eğrilerinin birlikte gösterimi: 25 ve 30 ml TSB'de **3 ml'lik** ön kültür ekimleri.

Tablo 2.9: *S. aureus* A950227 suşuna ait OD600 değerleri.

			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1.	10 ml TSB	0.1 ml ÖK	0.021	0.048	0.136	0.349	0.801	1.616	2.122	2.428	2.638	2.671
2.		0.5 ml ÖK	0.073	0.227	0.552	1.228	1.783	2.281	2.494	2.614	2.661	2.732
3.		1 ml ÖK	0.141	0.343	0.585	0.833	0.937	1.057	1.164	1.301	1.409	1.563
4.	15 ml TSB	0.1 ml ÖK	0.008	0.031	0.069	0.168	0.352	0.944	1.429	1.954	2.272	2.533
5.		0.5 ml ÖK	0.053	0.157	0.385	0.957	1.505	2.125	2.393	2.562	2.581	2.657
6.		1 ml ÖK	0.097	0.277	0.664	1.306	1.721	2.223	2.425	2.571	2.594	2.667
7.	20 ml TSB	0.5 ml ÖK	0.041	0.122	0.279	0.721	1.303	1.999	2.316	2.467	2.528	2.589
8.		1 ml ÖK	0.075	0.205	0.507	1.148	1.677	2.196	2.364	2.487	2.523	2.561
9.		2 ml ÖK	0.142	0.391	0.861	1.501	1.936	2.281	2.401	2.464	2.502	2.571
10.	25 ml TSB	0.5 ml ÖK	0.031	0.103	0.214	0.589	1.102	1.859	2.217	2.381	2.452	2.505
11.		1 ml ÖK	0.078	0.211	0.518	1.146	1.632	2.157	2.318	2.435	2.467	2.539
12.		2 ml ÖK	0.198	0.314	0.636	1.296	1.707	2.188	2.317	2.401	2.433	2.501
13.		3 ml ÖK	0.166	0.423	0.881	1.452	1.821	2.182	2.318	2.399	2.433	2.499
14.	30 ml TSB	0.5 ml ÖK	0.025	0.071	0.165	0.449	0.846	1.581	2.033	2.276	2.375	2.441
15.		**1 ml ÖK**		**İ**	**P**	**T**	**A**	**L**				
16.		3 ml ÖK	0.134	0.361	0.765	1.371	1.751	2.056	2.245	2.338	2.364	2.408

2.2.6. Staphylococcal Süpernatantın (QS Sinyal Moleküllerini İçeren Sıvının) Elde Edilmesi

Tezin/projenin en önemli noktalarından biri Staphylococcal QS sinyal peptitlerinin elde edilmesidir **(Şekil 2.10)**. Bakteriler, üreme sürecinin lag fazında ve eksponansiyel faz başlangıcında minumum düzeyde sinyal molekülü üretmekle birlikte, asıl olarak logaritmik fazın sonlarına doğru bol miktarda sinyal molekülü üreterek bulundukları ortama salgılamaktadır. QS mekanizmasını kullanan gram negatif bakteriler salgıladıkları sinyal moleküllerini hücre içine alarak uyarılırken, bu projede kullanılan suşlar gibi, gram pozitif bakteriler sinyal molekülünü hücre yüzeyi ile algılamaktadır. Dolayısıyla süpernatantı elde ettiğimiz kültürün hangi üreme fazında olduğu, elde edilen süpernatanttaki sinyal molekülü miktarı ve süpernatantın saflığı araştırmayı doğrudan etkilemektedir.

Ayrıca çalışmanın en son aşamasında, *L. lactis* ATCC 11454 tarafından üretilen Nisinin indikatör suşlar üzerinde meydana getireceği inhibisyon zonlarını değerlendirebilmek için Staphylococcal süpernatantın içeriğini son derece iyi analiz edebilmemiz gerekmektedir. Aksi halde çalışmanın asıl amacı olan "cross-talk analizi" açısından tutarlı bir sonuç elde edilemeyecektir.

A. Genel Prosedür

1.GÜN:

1. *Staphylococ* suşlarının ön kültürü hazırlandı: Bunun için 10 ml TSB besiyeri 50 ml'lik steril erlene eklendi. Üzerlerine 0.1 ml bakteri ekilip 30 ˚C'ta 130 rpm'de üremeye bırakıldı.

2.GÜN:

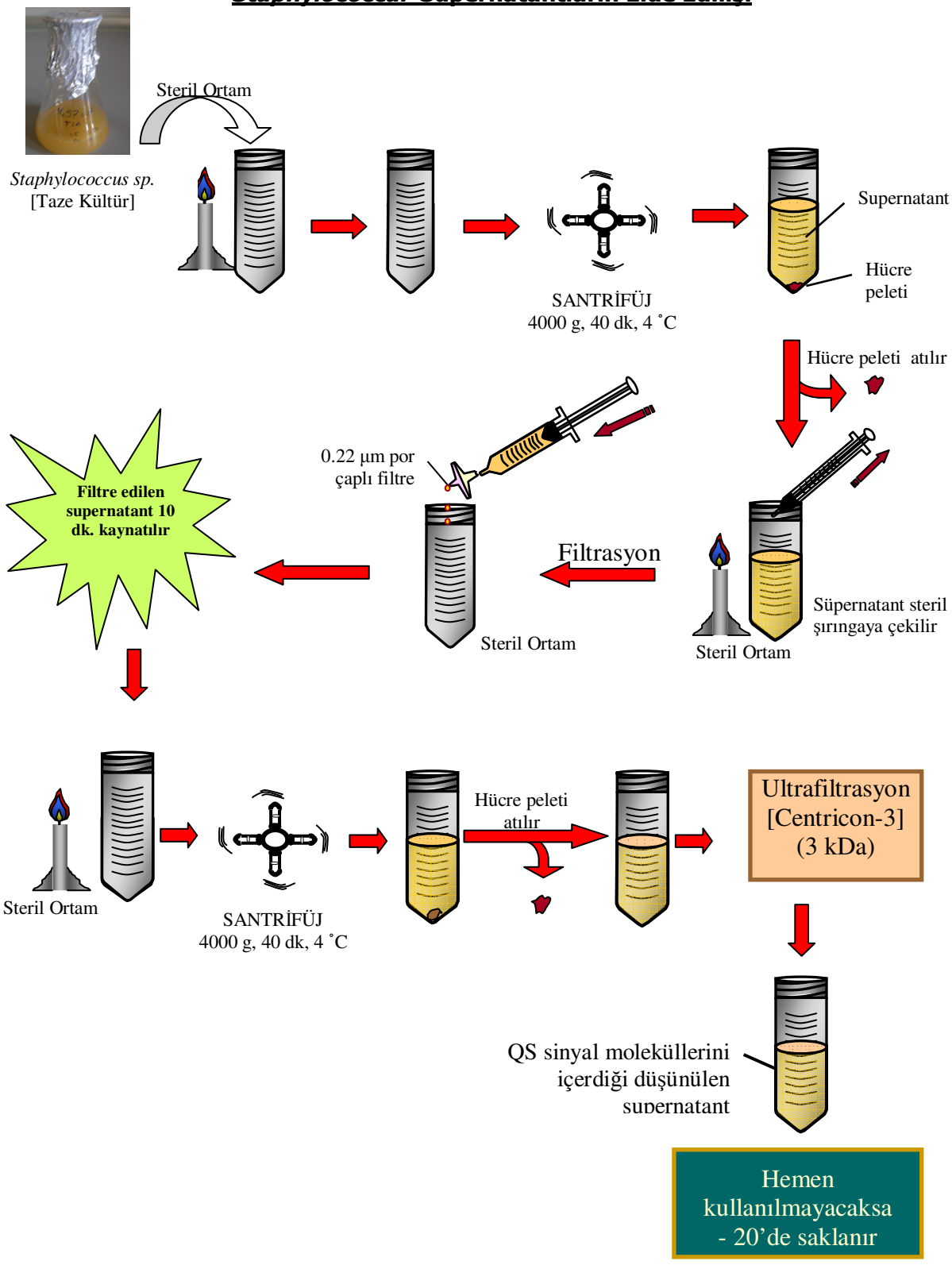
2. 10 ml TSB içeren 50 ml'lik erlene *Staphylococ* ön kültüründen 1 ml ekildi.
3. Belirli bir süre (üreme eğrisinde belirlenen süreye göre 2-6 ve 15 saat) 30˚C'ta 130 rpm'de üremeye bırakıldı.
4. Üreme sürecinin sonunda sıvı kültür, steril falkona aktarılarak 4 ˚C'ta 4000 g'de 40 dk santrifüj edildi (1.Santrifüj).
5. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant alındı, pelet atıldı.
6. Steril bir şırınga ve 0,22 µm por çaplı filtre ile süpernatant filtre edildi (1. Filtrasyon).
7. Filtre edilen süpernatant, kaynar suda 10 dk bekletildi.
8. 3 kDa'luk ultrafiltrelerle (Centricon-3) 10 ºC'ta 3 saat santrifüj edildi (2.Santrifüj).
9. Oluşan filtrat yeni bir falkon tüpe aktarıldı.
10. Elde edilen süpernatant belirlenen stratejilerde **(bkz. Bölüm. 2.2.8)**, *L lactis* ATCC 11454 suşu üzerine muamele edildi.

B. Staphylococcal Süpernatantın Eldesine Yönelik Yapılan Deneyler

Yapılan çalışmalarda, ilk deneyden son deneye doğru gidildikçe, elde ettiğimiz süpernatant miktarı azalmaktadır: 30 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml vs.. Bunun nedeni, elde edilen staphylococcal süpernatantın, *L. lactis* üzerine nasıl ve hangi miktarlarda uygulanacağının, deneyler ilerledikçe belirlenmesidir. Büyük hacimler, cihazların sınırlı hacmi nedeniyle zaman kaybına ve daha fazla malzeme sarfiyatına neden olmaktadır. Bu nedenle daha kısa sürede daha kapsamlı bir deney için hacimlerin küçük ölçekte olması (zaman kazanmak açısından) önemlidir.

Yapılan deneylerde, elde edilmek istenilen süpernatant miktarının farklı olmasının haricinde genel prosüdür aynen uygulandı **(Şekil 2.10)**.

Staphylococcal **Süpernatantların Elde Edilişi**



Şekil 2.10: Staphylococcal süpernatantların elde edilme aşamaları. (J ve ark., 1995'den uyarlanmıştır.)

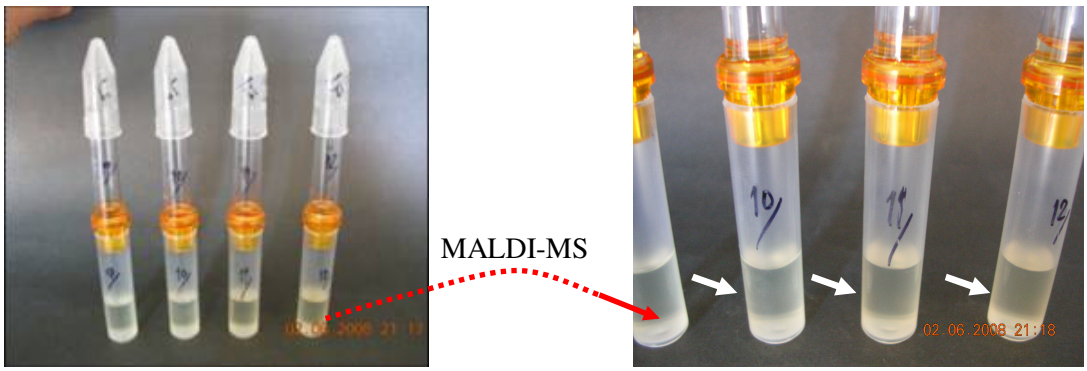
2.2.7. Staphylococcal Süpernatantta QS Siyal Peptitlerinin Varlığının Tespit Edilmesi

Staphylococcal süpernatantta QS sinyal peptitlerinin varlığını göstermek için iki yöntem kullanılabilir. Birincisi ekstraselüler olarak üreme ortamına salgılanan ve hücre sayısındaki artışa paralel olarak ortamda biriken sinyal moleküllerin doğrudan MALDI-TOF veya MALDI-MS gibi yöntemlerle tespit edilmesidir. Diğeri ise sinyal moleküllerine ait genlerle eş zamanlı olarak ifade edilen genlerden kodlanan delta toksinin (proteinin) SDS-PAGE veya kromotoğrafik yöntemlerle dolaylı olarak tespit edilmesidir. Bu çalışmada MALDI-MS yöntemi kullanılmıştır.

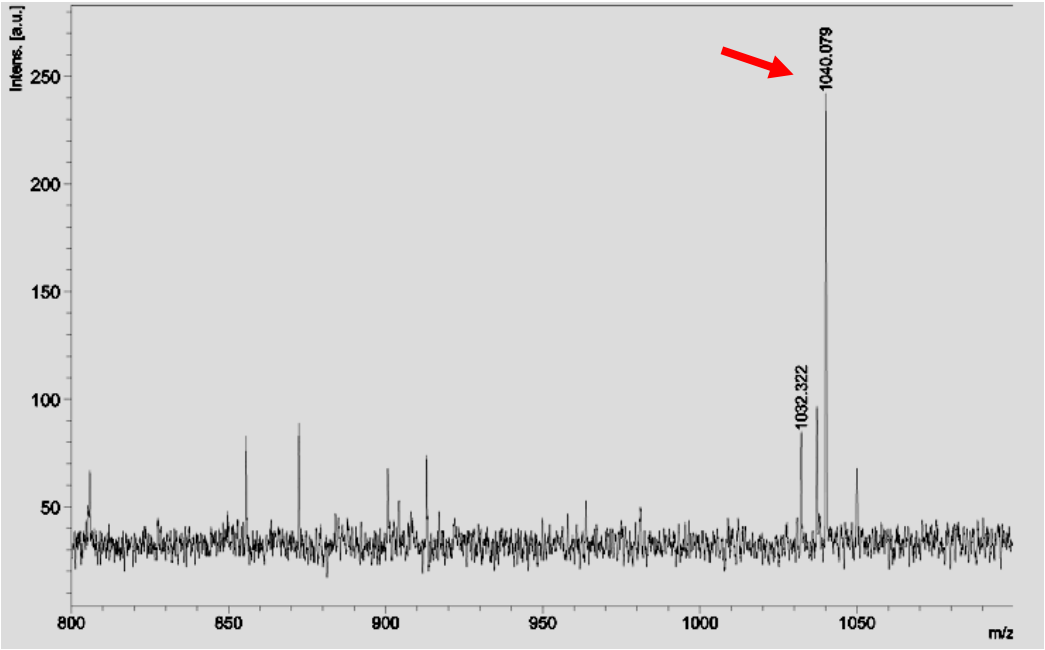
A. MALDI-MS Yöntemiyle Sinyal Peptitlerin Tespit Edilmesi

Staphylococcal süpernatantın elde edilmesi sürecinde uygulanan işlem basamaklarından biri de sinyal moleküllerinin varlığını MALDI-MS ile göstermek üzere süpernatant numunesi hazırlamaktır **(Resim 2.17)**.

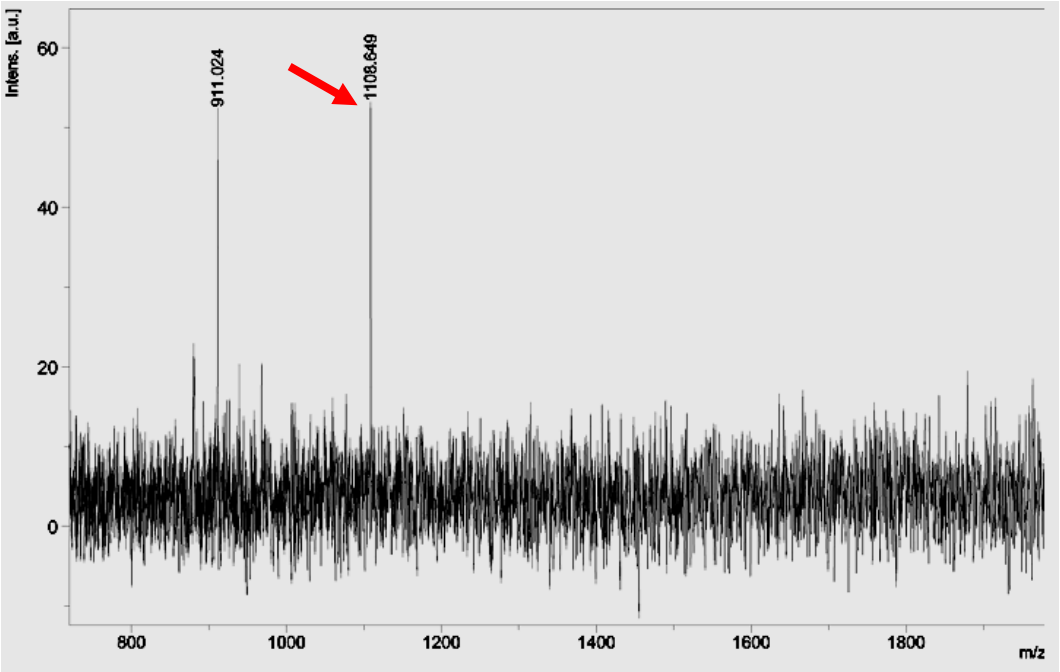
Bu amaçla ultrafiltrasyon işleminden sonra Centricon-3 filtrelerinin alt haznesinde oluşan filtrattan 1 ml alınıp GYTE KİMYA A.B.D.'nda MALDI-MS yöntemiyle analiz yaptırıldı. Elde edilen sonuçlar **Grafik 2.16-2.17-2.18-2.19'**de verilmiştir.



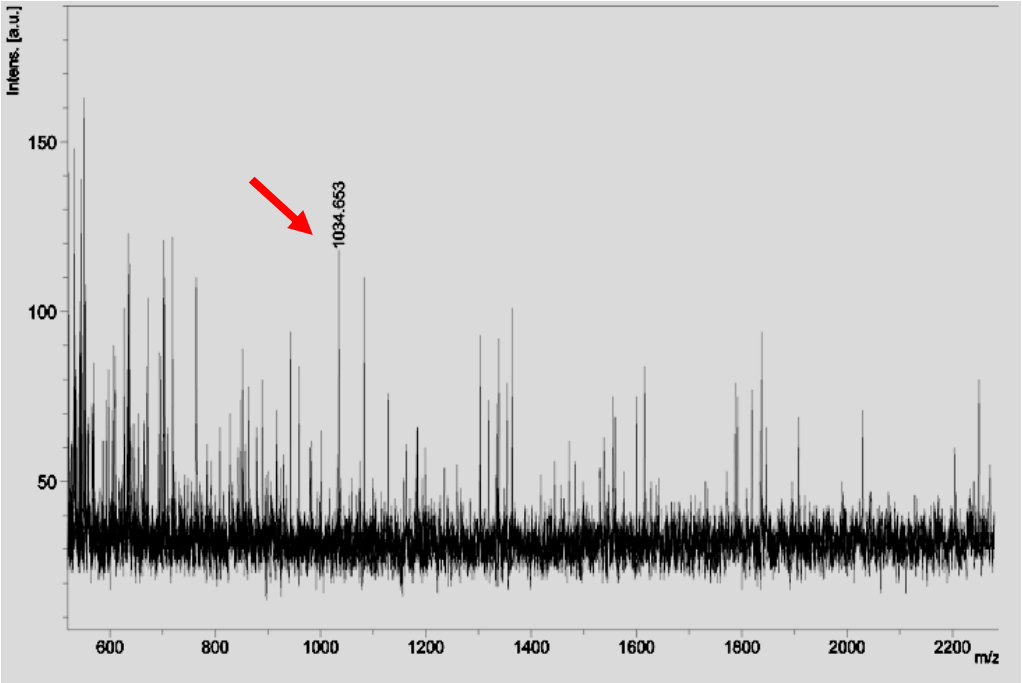
Resim 2.17 : Ultrafiltrasyon sonucunda elde edilen Staphylococcal süpernatantlar. Ok ile gösterilen kısımlar 3 kDa'dan küçük olan molekülleri içeriyor.



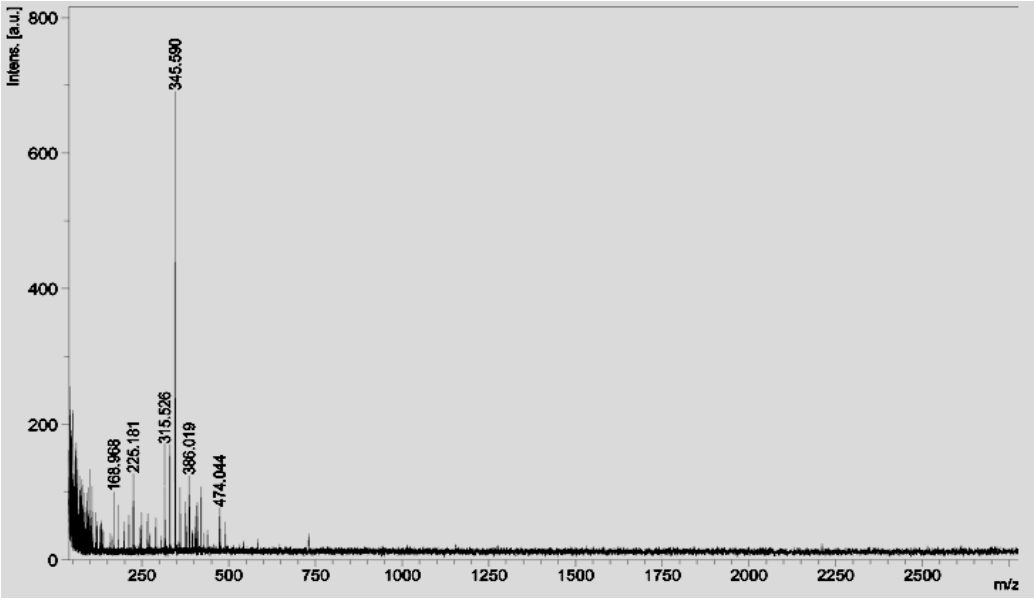
Grafik 2.16: *S. epidermidis* ATCC 14990'ın 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta AIPs varlığını gösteren MALDI-MS grafiği.



Grafik 2.17: *S. aureus* A950227'nin 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta AIPs varlığını gösteren MALDI-MS grafiği.



Grafik 2.18: *S. epidermidis* 1457 wt agr (+)'in 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta AIPs varlığını gösteren MALDI-MS grafiği.



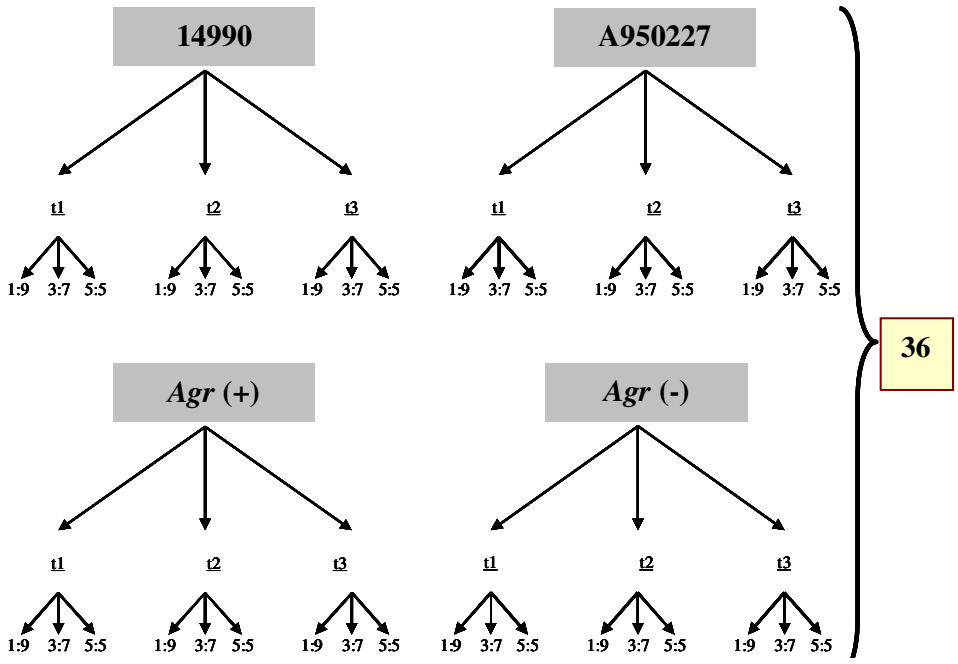
Grafik 2.19: *S. epidermidis* 1457 agr (-)'in 16 saatlik (t_3) kültüründen elde edilen süpernatantta MALDI-MS sonucunda AIPs varlığı görülmedi.

2.2.8. *Staphylococcus - Lactococcus* Etkileşiminin Belirlenmesi (Quorum Sensing Cross-Talk Uygulaması)

A. Genel Prosedür

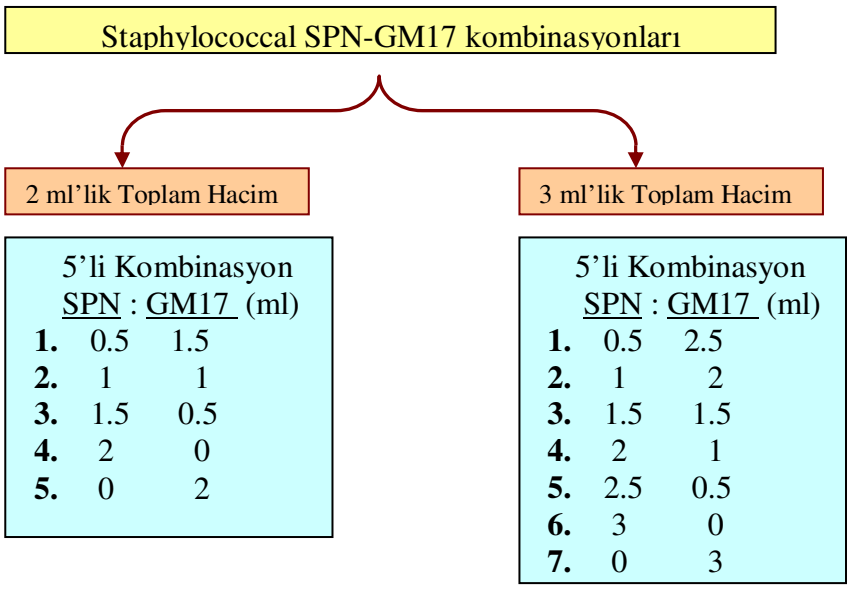
Farklı üreme sürelerinde üretilen *Staphylococ* kültürlerinden, daha önce bahsedilen yöntemle süpernatantlar elde edildi. Elde edilen *Staphylococcal* süpernatantlar *L. lactis* ATCC 11454 suşunun üretildiği GM17 broth besiyerlerine belirlenen farklı stratejilerde ilave edildi. Karışım halindeki bu besiyerlerinde *L. lactis* ATCC 11454 bir gece üremeye bırakıldı. Üreme sürecinin sonunda Nisin aktivitesi incelendi.

Araştırma kapsamında sinyal moleküllerinin farklı yoğunluklarda elde edileceği Staphylococcal kültürler için her bir suşun birden fazla (üç tane) kültürü üretildi. Her bir suşun farklı üreme sürelerinde elde edilen kültürleri, bu kültürlerden elde edilen süpernatantlar ve bu süpernatantların *L. lactis* besiyeri ile farklı oranlarda kombinasyonları dikkate alındığında kültür sayısı daha da fazla olmaktadır. Yapılan bir deneyde elde edilen *Staphylococcus* süpernatant çeşitleri ve bunların GM17 besiyeri ile uygulanan kombinasyonları şöyledir **(Şekil.22)**.

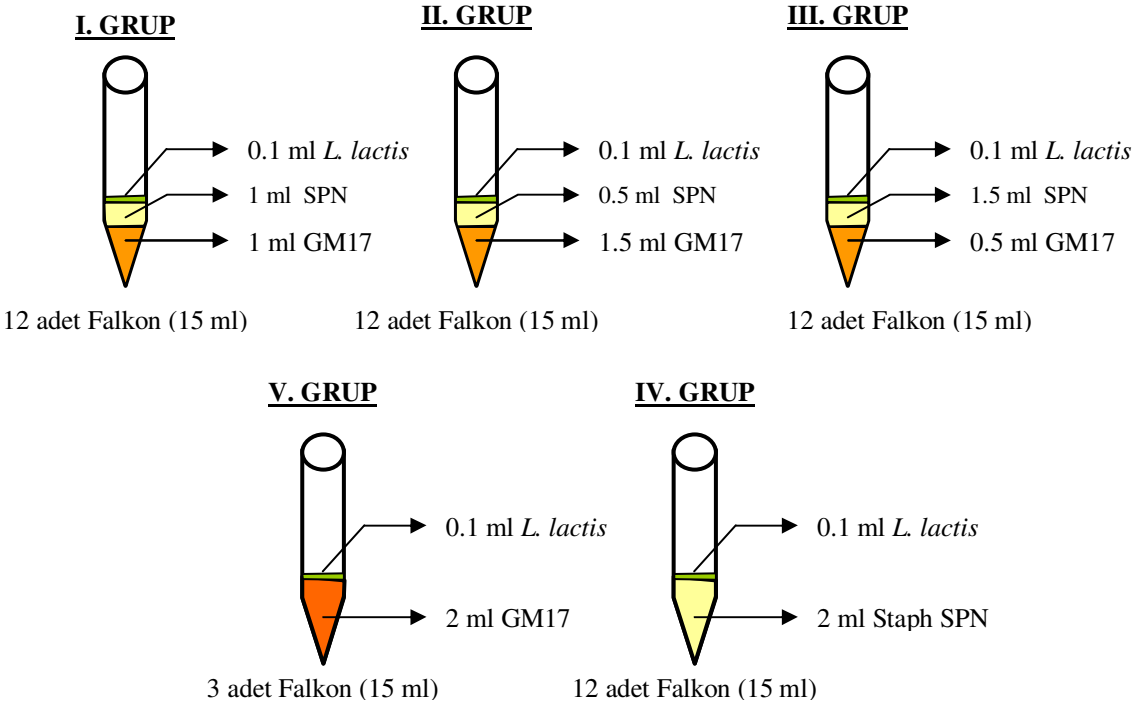


Şekil 2.11: Üç farklı sürede elde edilen S*taphylococcal* süpernatantlar ve bu süpernatantların GM17 besiyerine eklenme oranları (ml/ml). 1) S. epidermidis ATCC 14990, 2) *S. aureus* A950227 3) S. epidermidis 1457 wt *agr* (+) 4) S. epidermidis 1457 *agr* (-)

Staphylococcal süpernatantı *L. lactis* ATCC 11454 besiyerine ilave ederken toplam hacim dikkate alınarak kombinasyon oluşturuldu. Tez çalışmasının başlangıç dönemlerinde 20-30 ml gibi büyük hacimlerde kombinasyon yaparken sonraki deneylerde bu hacim 2 veya 3 ml olarak tercih edildi. Bu hacimler dikkate alındığında aşağıdaki kombinasyonlar oluşturuldu **(Şekil 2.12-2.13).**



Şekil 2.12: Staphylococcal süpernatant (SPN) ile *L. lactis* ATCC 11454 besiyeri GM17'nin kombinasyon oranları.

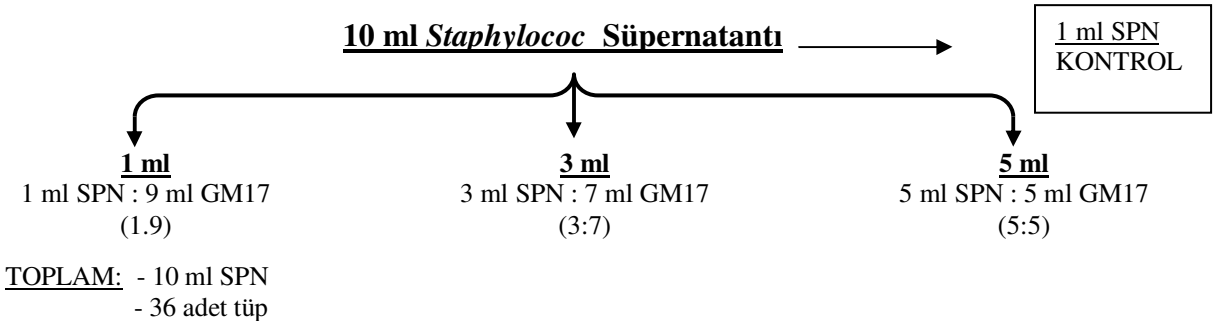


Şekil 2.13 : *Staphylococcal* süpernatant (SPN) ile *L. lactis* besiyeri GM17'nin toplam 2 ml hacimde karışım kombinasyonlarının temsili gösterimi.

B. *Staphylococcuc – Lactococcus* Kombinasyonu Deneyleri

Daha önce bahsedilen yöntemlerle Staphylococcal süpernatantlar elde edildi ve belirlenen kombinasyon stratejilerine (Şekil 2.12-2.13-2.14) göre *L. lactis* ATCC 11454 besiyeri GM17 ile karıştırıldı. Her bir karışıma 0.1 ml *L. lactis* ATCC 11454 ön kültürü ekilip 30 ºC'ta 130 rpm'de bir gece üremeye bırakıldı (Tablo 2.10). Ürem süresi sonunda kültürler 4000 g'de 4 ºC'ta 40 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından oluşan hücre peleti atılıp süpernatantlar yeni steril falkonlara alındı.

Nisin aktivitesine yönelik yapılan deneyler sonucunda en ideal yöntemin süpernatant damlatma yöntemi olduğu tespit edildi. Bu nedenle, takip eden deneylerde nokta ekim, disk ve kuyu yöntemleri kullanılmadı. İndikatör ekimi olarak yayma ve softa agar yöntemleri uygun olmakla birlikte benzer sonuçları vermeleri ve daha düzgün inhibisyon zonlarının oluşması nedeniyle soft agar yöntemi tercih edildi **(bkz. Bölüm 2.2.3)**.



Şekil 2.14: *Staphylococ* süpernatantlarının GM17 besiyerine ilave edilme miktarları. Yapılan ekimler Tablo 2.10'daki gibi adlandırılmıştır.

Tablo 2.10: Elde edilen *Staphylococcal* süpernatantların *L. lactis* ATCC 11454 besiyerine ilavesi ile ilgili yapılan deneylerden birine ait kombinasyonların numaralandırma ve adlandırılması.

1 : 9 Oranında karışım

1. 14990 **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
2. 14990 **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
3. 14990 **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]

4. A950227 **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
5. A950227 **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
6. A950227 **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]

7. *Agr* (+) **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
8. *Agr* (+) **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
9. *Agr* (+) **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]

10. *Agr* (-) **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
11. *Agr* (-) **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]
12. *Agr* (-) **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [1:9.1]

3 : 7 Oranında karışım

13. 14990 **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
14. 14990 **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
15. 14990 **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]

16. A950227 **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
17. A950227 **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
18. A950227 **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]

19. *Agr* (+) **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
20. *Agr* (+) **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
21. *Agr* (+) **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]

22. *Agr* (-) **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
23. *Agr* (-) **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]
24. *Agr* (-) **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [3:7:1]

5 : 5 Oranında karışım

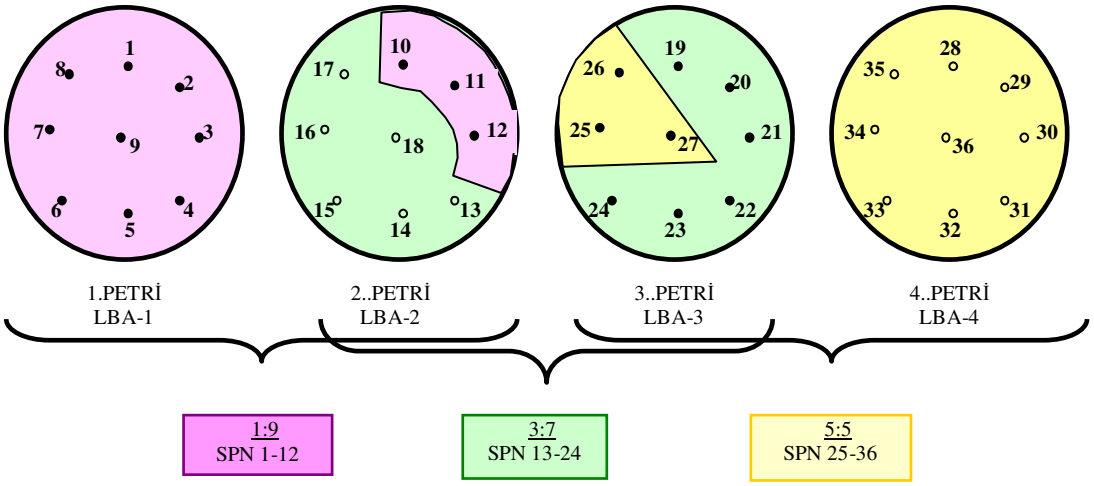
25. 14990 **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
26. 14990 **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
27. 14990 **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]

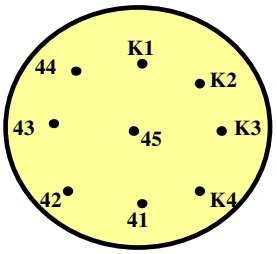
28. A950227 **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
29. A950227 **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
30. A950227 **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]

31. *Agr* (+) **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
32. *Agr* (+) **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
33. *Agr* (+) **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]

34. *Agr* (-) **SPN1** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
35. *Agr* (-) **SPN2** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]
36. *Agr* (-) **SPN3** / GM17 / *L. lactis* [5:5:1]

Yukarıda numara ve adları belirtilen 36 falkondan alınan *L. lactis* süpernatantlarının indikatör suşların bulunduğu petrilere ekilmelerinde uygulanan numaralandırma sistemi aşağıda şematik olarak gösterilmiştir. Petri ve besiyeri israfını önlemek ve daha az malzemeyle daha fazla gözlem yapabilmek açısından çok sayıdaki *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantı, değerlendirme sürecinde en kolay anlaşılabilecek bir sistem içerisinde numaralandırılmıştır **(Şekil 2.15)**.





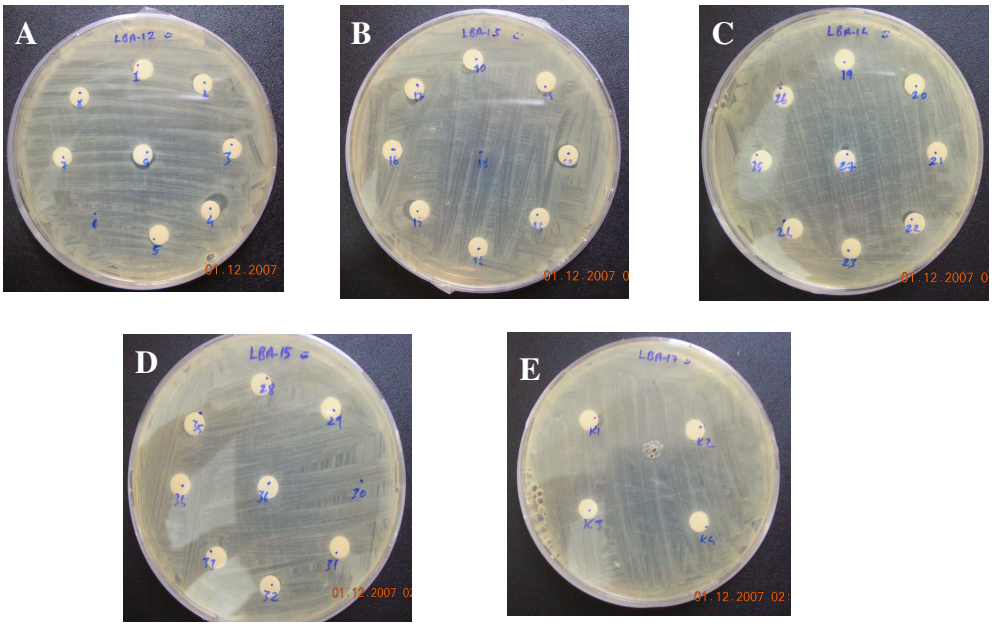
Şekil 2.15 : *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının disk, damla ve kuyu yöntemleriyle uygulanmasında kullanılan ekim numaraları.

1. ve 2. Petriler ➔ 1-12 nolu ekimler 4 *Staphylococ* suşunun üç farklı üreme sürecinden elde edilen toplam 12 süpernatantın GM17 besi yeri ile **1:9 oranındaki** kombinasyonları sonucu elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarıdır.

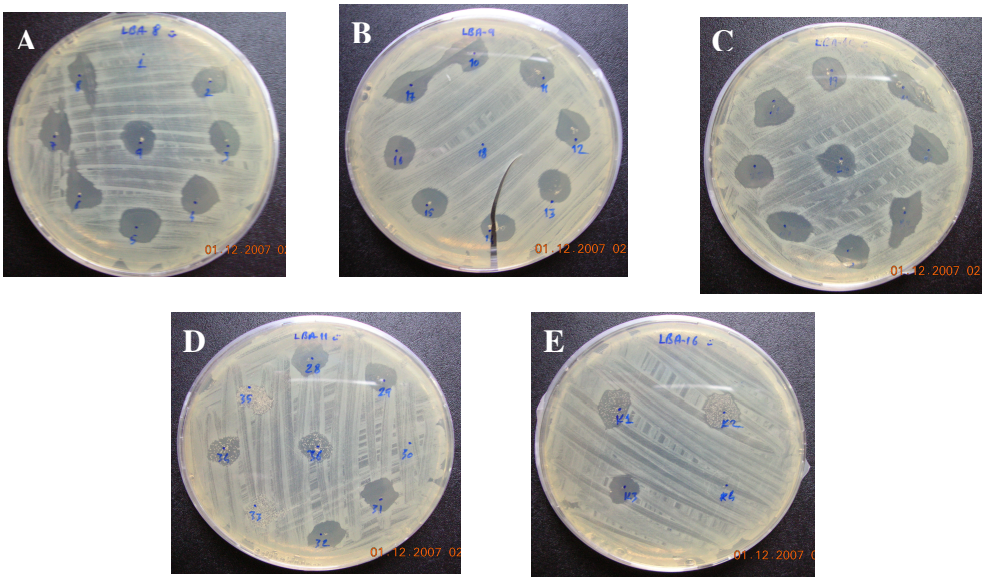
2. ve 3. Petriler ➔ 13-24 nolu ekimler 4 *Staphylococ* suşunun üç farklı üreme sürecinden elde edilen toplam 12 süpernatantın GM17 besi yeri ile **3:7 oranındaki** kombinasyonları sonucu elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarıdır.

3. ve 4. Petriler ➔ 24-36 nolu ekimler 4 *Staphylococ* suşunun üç farklı üreme sürecinden elde edilen toplam 12 süpernatantın GM17 besi yeri ile **5:5 oranındaki** kombinasyonları sonucu elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarıdır.

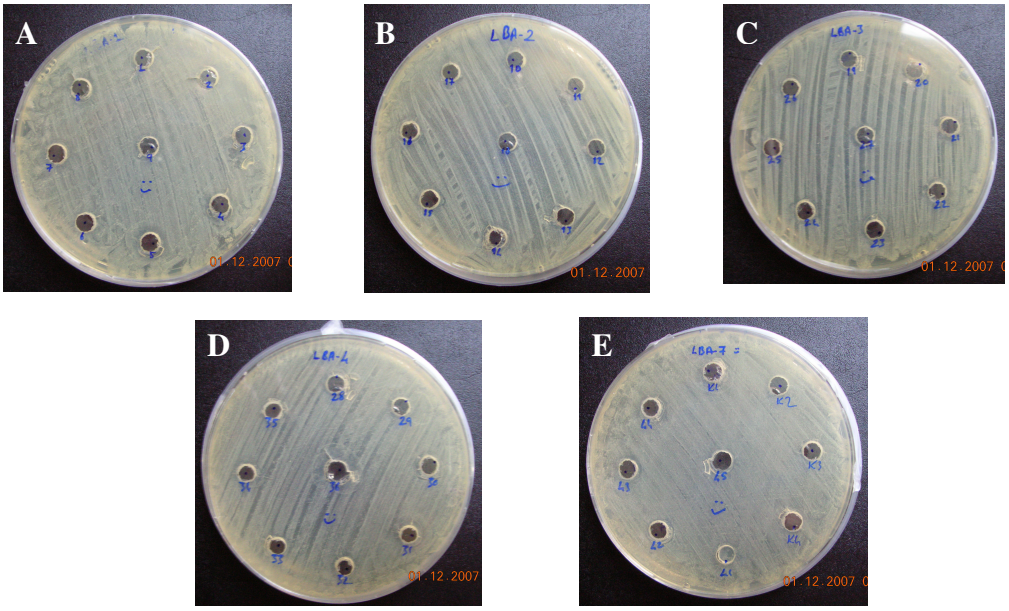
Yukarıdaki numaralandırma işleminden sonra beş petriye üç farklı ekim yöntemi uygulandı **(Resim 2.18-2.19-2.20)**.



Resim 2.18: Üç farklı zamanda üretilen *Staphylococ* kültürlerinden elde edilen süpernatantların *L.lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimine etkinin **disk yöntemiyle** incelenmesi. A) Disk1-9, B) Disk10-18, C) Disk19-27, D) Disk28-36 E) Kontrol. [*S. aureus* A950227 suşunun 5 saatlik kültürüne ait süpernatant kullanılmadığı için 6, 18 ve 30 nolu diskler konulmadı]

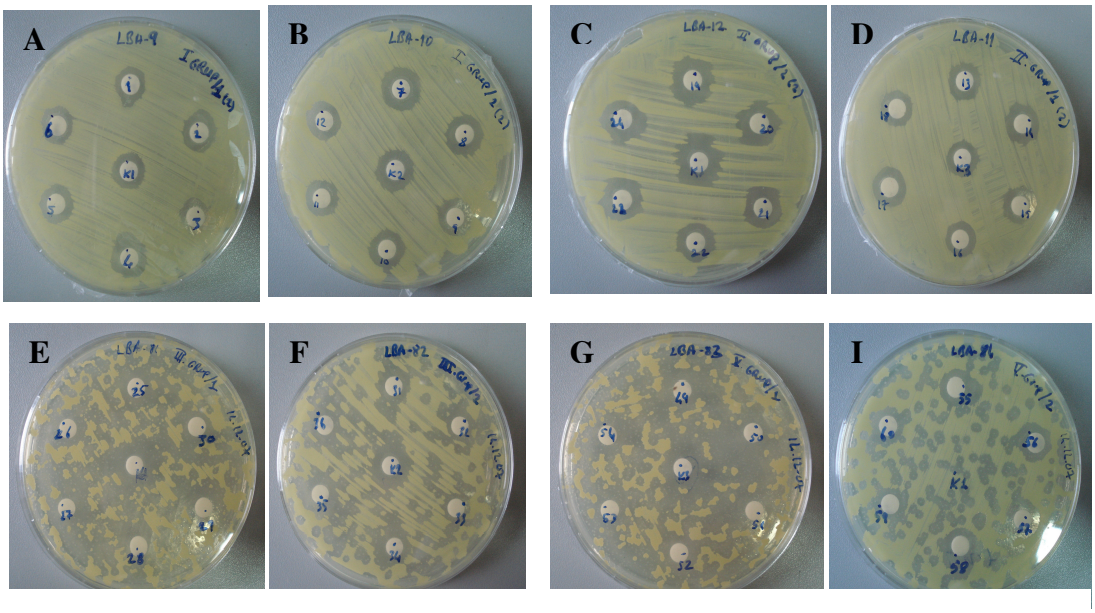


Resim 2.19: Üç farklı zamanda üretilen *Staphylococ* kültürlerinden elde edilen süpernatantların *L. lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimine etkisinin **damlatma yöntemiyle** incelenmesi. A) Disk1-9, B) Disk10-18, C) Disk19-27, D) Disk28-36. E) Kontrol

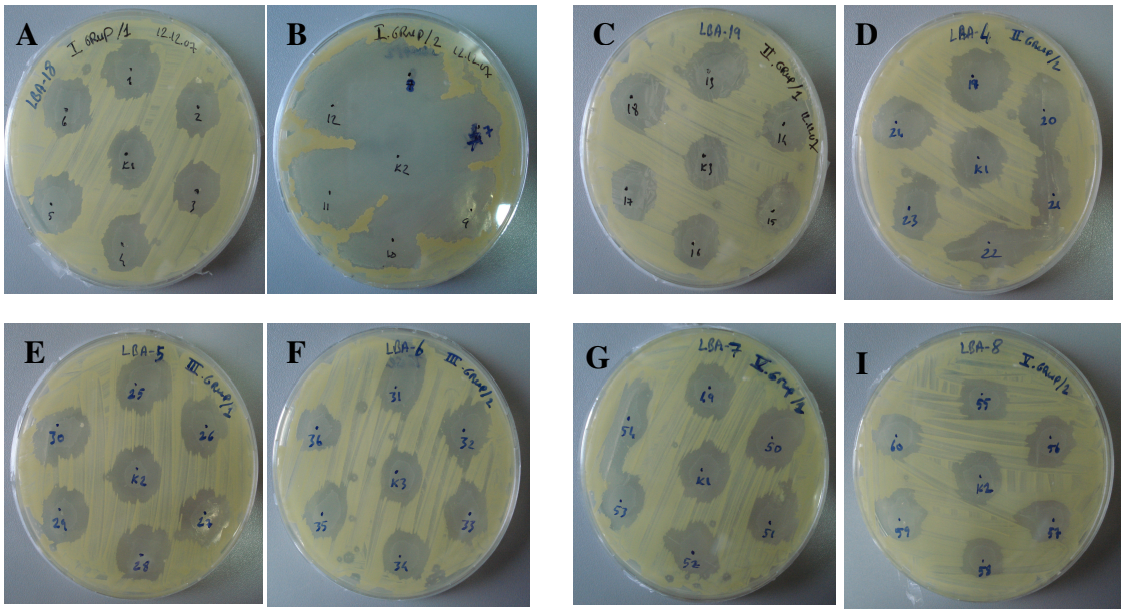


Resim 2.20: Üç farklı zamanda üretilen *Staphylococ* kültürlerinden elde edilen süpernatantların *L lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimine etkisinin **kuyu yöntemiyle** incelenmesi. A) Disk1-9, B) Disk10-18, C) Disk19-27, D) Disk28-36 E) Kontrol.

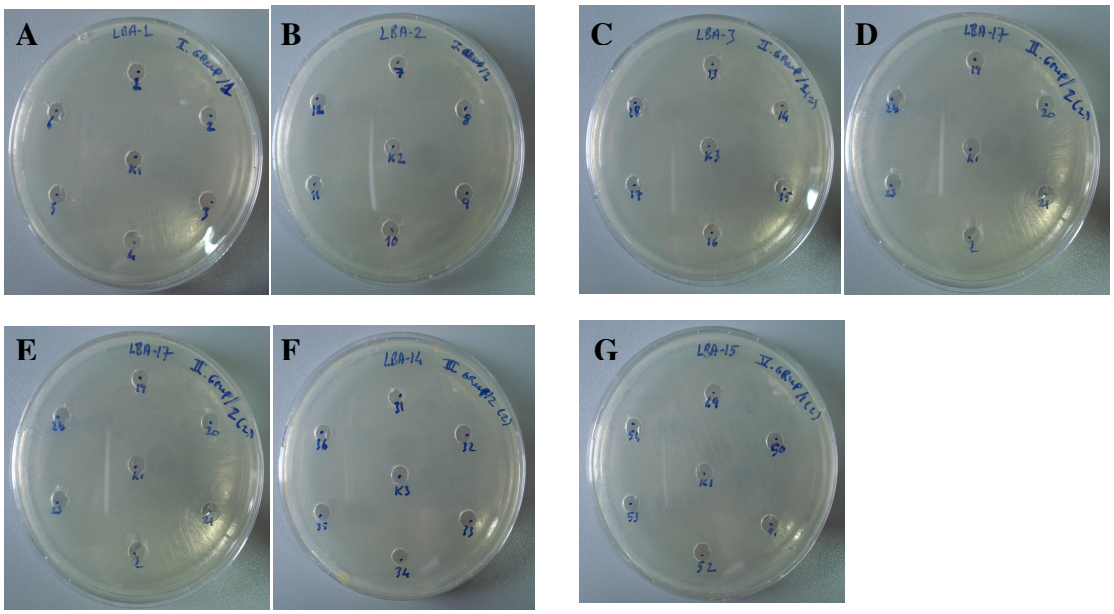
Diğer bir deneyde yine aynı şekilde üç farklı zamanda üretilen Staphylococ kültürlerinden süpernatant elde edildi. 5'li kombinasyon **(Şekil 1.12-2.13)** uygulanarak disk, damlatma ve kuyu yöntemleriyle ekim yapıldı **(Resim 1.21-2.22-2.23)**.



Resim 2.21 : *L.* lactis ATCC 11454'te Nisin aktivitesinin **disk yöntemiyle** incelenmesi. Üç farklı üreme fazındaki *Staphylococ* kültürüne ait süpernatantlar kullanılmıştır. A) I.GRUP/1, Disk-1-6 B) I.GRUP/2, Disk-7-12, C) II.GRUP/1, Disk-13-18 D) II.GRUP/2, Disk-19-24, E) III.GRUP/1, Disk-25-30 F) III.GRUP/2, Disk-31-36, G) V.GRUP/1, Disk-49-54, I) V.GRUP/2, Disk-55-60.

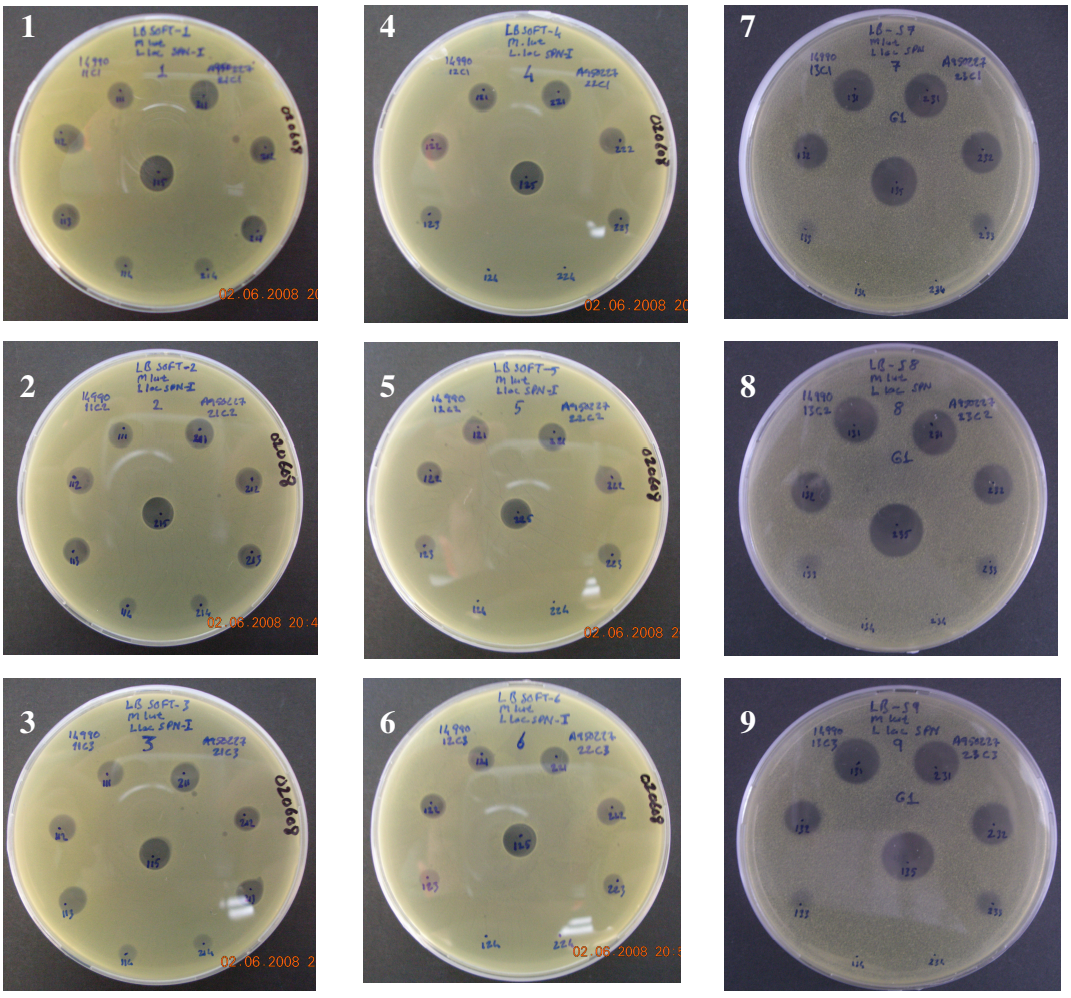


Resim 2.22: *L.* lactis ATCC 11454'te Nisin aktivitesinin **damla yöntemiyle** incelenmesi. Üç farklı üreme fazındaki *Staphylococ* kültürüne ait süpernatantlar kullanılmıştır. A) I.GRUP/1, Disk-1-6 B) I.GRUP/2, SPN-7-12, C) II.GRUP/1, SPN-13-18 D) II.GRUP/2, SPN-19-24, E) III.GRUP/1, SPN-25-30 F) III.GRUP/2, SPN-31-36, G)V.GRUP/1, SPN-49-54 I) V.GRUP/2, SPN-55-60.

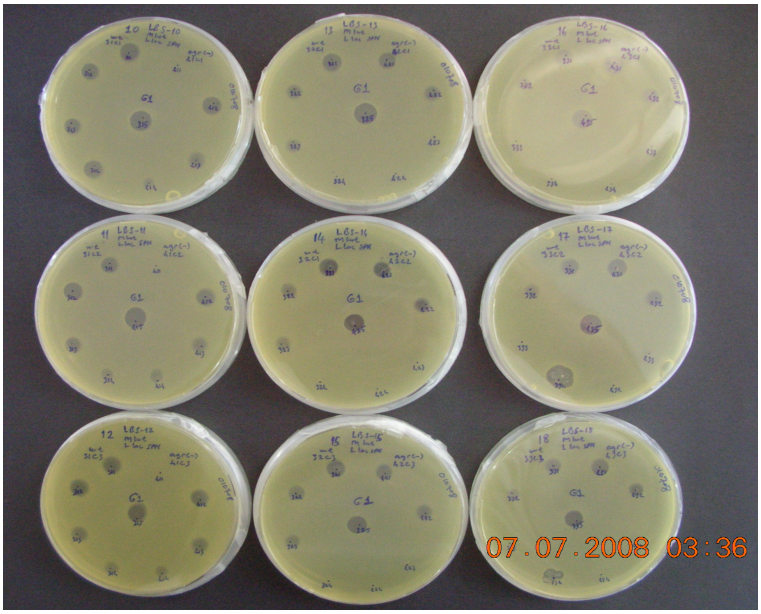


Resim 2.23: *L.* lactis ATCC 11454'te Nisin aktivitesinin **kuyu yöntemiyle** incelenmesi. Üç farklı üreme fazındaki *Staphylococ* kültürüne ait süpernatantlar kullanılmıştır. A) I.GRUP/1, SPN-1-6 B) I.GRUP/2, SPN-7-12, C) II.GRUP/1, SPN-13-18 D) II.GRUP/2, SPN-19-24, E) III.GRUP/1, SPN-25-30 F) III.GRUP/2, SPN-31-36, G) V.GRUP/1, SPN-49-54 I) V.GRUP/2, SPN-55-60.

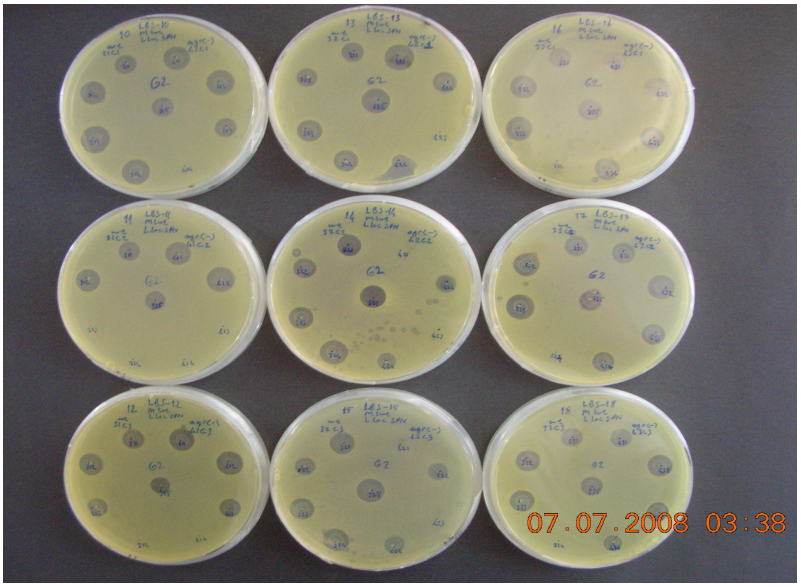
Yapılan diğer bir deneyde Staphylococcal kültürler 2, 6 ve 16 saatlik üreme periyotlarına tabi tutulup bu süreler sonunda prosedüre uygun olarak süpernatantlar elde edildi (Dört suşa ait üçer kültürden toplam 12 süpernatant). Elde edilen süpernatantlar toplam hacim 2 ml olacak şekilde GM17 ile 5'li kombinasyon halinde karıştırıldı (12 SPN x 5 = 60 falkon). Her bir karışıma 0.1 ml *L. lactis* ATCC 11454 ekildi. Bir gecelik üreme süreci sonunda oluşan *L. lactis* ATCC 11454 kültürleri 4000 g'de 4 ºC'ta 40 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. LB softa agar besiyerlerinde indikatör suş üzerine 0.5 µl damlatılarak inhibisyon zonlarının oluşması için 30 ºC'ta bir gece üremeye bırakıldı. Süre sonunda oluşan inhibisyon zonları incelendi **(Resim 2.24-2.25-2.26)**.



Resim 2.24: Üç farklı üreme süresine tabi tutulan Staphylococcal kültürlere ait süpernatantların 2 ml toplam hacimde (5'li kombinasyonlu) GM17 ile karışımı sonucunda elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi. İndikatör suş olarak *M. luteus* RSKK 1123 suşu kullanıldı.



Resim 2.25: Resim.20'nin tekrarıdır. Üç farklı üreme süresine tabi tutulan *Staphylococcal* kültürlere ait süpernatantların 2 ml toplam hacimde (5'li kombinasyonlu) GM17 ile karışımı sonucunda elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi. İndikatör suş olarak *M. luteus* RSKK 1123 kullanıldı.



Resim 2.26: Üç farklı üreme süresine tabi tutulan *Staphylococcal* kültürlere ait süpernatantların 2 ml toplam hacimde (5'li kombinasyonlu) GM17 ile karışımı sonucunda elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi. İndikatör suş olarak *M. luteus* RSKK 1123 suşu kullanıldı. Resim 2.24 ve 2.25'den farkı *L. lactis* ATCC 11454 besiyerine eklenen Staphylococcal süpernatantın ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmamış olmasıdır.

2.2.9. İnhibisyon Zon çaplarının ölçümü

Staphylococcal süpernatantın *L. lactis* besiyerine (GM17 Broth) farklı kombinasyonlarda ilavesi sonucu elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantında Nisin aktivitesi incelendi ve aşağıdaki veriler elde edildi:

Tablo 2.11: *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm).

Üreme süresi		Ekim Kodu	*Staphylococ* Süpernatantı	GM17 besiyeri	Deney tekrarı			Ortalama
					C1	C2	C3	
t 1	*S. epidermidis* ATCC 14990 [11C1-C2-C3]	111	0.5	1,5	9	7	8	8,00
		112	1	1	11	11	10	10,67
		113	1,5	0.5	13	12	12	12,33
		114	2	0	5	4	6	5,00
		115	0	2	15	15	14	14,67
	S. aureus A950227 [21C1-C2-C3]	211	0.5	1,5	13	12	12	12,33
		212	1	1	12	12	11	11,67
		213	1,5	0.5	12	12	11	11,67
		214	2	0	7	3	7	5,67
		215	0	2	15	15	15	15,00
t 2	*S. epidermidis* ATCC 14990 [12C1-C2-C3]	121	0.5	1,5	12	11	11	11,33
		122	1	1	10	10	10	10,00
		123	1,5	0.5	8	7	7	7,33
		124	2	0	0	0	0	0,00
		125	0	2	14	14	15	14,33
	S. aureus A950227 [22C1-C2-C3]	221	0.5	1,5	13	13	12	12,67
		222	1	1	10	10	9	9,67
		223	1,5	0.5	7	7	7	7,00
		224	2	0	0	0	0	0,00
		225	0	2	14	14	14	14,00
t 3	*S. epidermidis* ATCC 14990 [13C1-C2-C3]	131	0.5	1,5	11	12	12	11,67
		132	1	1	9	11	9	9,67
		133	1,5	0.5	2	5	3	3,33
		134	2	0	0	0	0	0,00
		135	0	2	13	15	13	13,67
	S. aureus A950227 [23C1-C2-C3]	231	0.5	1,5	12	13	13	12,67
		232	1	1	11	11	11	11,00
		233	1,5	0.5	7	6	7	6,67
		234	2	0	0	0	0	0,00
		235	0	2	13	15	13	13,67

Not: t_1 , t_2 , t_3 ➔ Üreme süreleri (sırasıyla, Lag fazı, Log fazı başlangıcı, Log fazı sonu)
GM17 ➔ *L. lactis* besiyeri
C_1, C_2 , C_3 ➔ Deney Tekrar sayısı

Tablo 2.12: *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm).

Üreme süresi		Ekim Kodu	*Staphylococ* Süpernatantı	GM17 besiyeri	Deney tekrarı			Ortalama
					C1	C2	C3	
t 1	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [31C1-C2-C3]	311	0.5	1,5	12	12	12	12,00
		312	1	1	12	12	12	12,00
		313	1,5	0.5	12	10	12	11,33
		314	2	0	8	8	8	8,00
		315	0	2	13	13	13	13,00
	S. epidermidis 1457 agr (-) [41C1-C2-C3]	411	0.5	1,5				
		412	1	1	12	12	12	12,00
		413	1,5	0.5	9	10	11	10,00
		414	2	0	8	8	8	8,00
		415	0	2	13	13	13	13,00
t 2	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [32C1-C2-C3]	321	0.5	1,5	10	12	11	11,00
		322	1	1	9	10	9	9,33
		323	1,5	0.5	8	9	8	8,33
		324	2	0	0	0	0	0,00
		325	0	2	13	13	13	13,00
	S. epidermidis 1457 agr (-) [42C1-C2-C3]	421	0.5	1,5	10	11	11	10,67
		422	1	1	10	9	10	9,67
		423	1,5	0.5	8	7	8	7,67
		424	2	0	0	0	0	0,00
		425	0	2	13	13	13	13,00
t 3	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [33C1-C2-C3]	331	0.5	1,5	13	12		12,50
		332	1	1	9	10		9,50
		333	1,5	0.5	10	10		10,00
		334	2	0	0	0		0,00
		345	0	2	13	13		13,00
	S. epidermidis 1457 agr (-) [43C1-C2-C3]	431	0.5	1,5	12	12		12,00
		432	1	1	10	10		10,00
		433	1,5	0.5	6	5		5,50
		434	2	0	0	0		0,00
		435	0	2	13	13		13,00

Not: t_1 , t_2 , t_3 ➔ Üreme süreleri (sırasıyla, Lag fazı, Log fazı başlangıcı, Log fazı sonu)
GM17 ➔ *L. lactis* besiyeri
C_1, C_2 , C_3 ➔ Deney Tekrar sayısı

Tablo 2.13: *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm).

Üreme süresi		Ekim Kodu	*Staphylococ* Süpernatantı	GM17 besiyeri	Deney tekrarı			Ortalama
					C1	C2	C3	
t 1	*S. epidermidis* ATCC 14990 [11C1-C2-C3]	111	0.5	1,5	6	6	7	6,33
		112	1	1	7	7	7	7,00
		113	1,5	0.5	5	7	7	6,33
		114	2	0	0	0	0	0,00
		115	0	2	10	10	9	9,67
	S. aureus A950227 [21C1-C2-C3]	211	0.5	1,5	9	9	7	8,33
		212	1	1	8	8	7	7,67
		213	1,5	0.5	7	7	7	7,00
		214	2	0	0	0	0	0,00
		215	0	2	10	10	9	9,67
t 2	*S. epidermidis* ATCC 14990 [12C1-C2-C3]	121	0.5	1,5	6	7	7	6,67
		122	1	1	6	6	6	6,00
		123	1,5	0.5	4	4	3	3,67
		124	2	0	0	0	0	0,00
		125	0	2	10	10	10	10,00
	S. aureus A950227 [22C1-C2-C3]	221	0.5	1,5	8	7	7	7,33
		222	1	1	6	6	7	6,33
		223	1,5	0.5	4	5	4	4,33
		224	2	0	0	0	0	0,00
		225	0	2	10	10	10	10,00
t 3	*S. epidermidis* ATCC 14990 [13C1-C2-C3]	131	0.5	1,5	6	7	7	6,67
		132	1	1	6	7	6	6,33
		133	1,5	0.5	0	0	0	0,00
		134	2	0	0	0	0	0,00
		135	0	2	9	10	10	9,67
	S. aureus A950227 [23C1-C2-C3]	231	0.5	1,5	7	7	7	7,00
		232	1	1	5	7	7	6,33
		233	1,5	0.5	0	0	0	0,00
		234	2	0	0	0	0	0,00
		235	0	2	9	10	10	9,67

Not: t_1 , t_2 , t_3 ➔ Üreme süreleri (sırasıyla, Lag fazı, Log fazı başlangıcı, Log fazı sonu)
GM17 ➔ *L. lactis* besiyeri
C_1, C_2 , C_3 ➔ Deney Tekrar sayısı

Tablo 2.14: *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm).

Üreme süresi		Ekim Kodu	*Staphylococ* Süpernatantı	GM17 besiyeri	Deney tekrarı			Ortalama
					C1	C2	C3	
t 1	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [31C1-C2-C3]	**311**	**0.5**	**1,5**	8	7	7	7,33
		312	**1**	**1**	7	9	8	8,00
		313	**1,5**	**0.5**	7	6	7	6,67
		314	**2**	**0**	8	4	5	5,67
		315	**0**	**2**	10	9	9	9,33
	S. epidermidis 1457 agr (-) [41C1-C2-C3]	**411**	**0.5**	**1,5**				
		412	**1**	**1**	8	7	7	7,33
		413	**1,5**	**0.5**	5	5	6	5,33
		414	**2**	**0**	3	4	4	3,67
		415	**0**	**2**	10	9	9	9,33
t 2	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [32C1-C2-C3]	**321**	**0.5**	**1,5**	8	9	8	8,33
		322	**1**	**1**	6	6	6	6,00
		323	**1,5**	**0.5**	4	5	5	4,67
		324	**2**	**0**	0	0	0	0,00
		325	**0**	**2**	9	8	8	8,33
	S. epidermidis 1457 agr (-) [42C1-C2-C3]	**421**	**0.5**	**1,5**	6	7	6	6,33
		422	**1**	**1**	5	6	5	5,33
		423	**1,5**	**0.5**	0	0	0	0,00
		424	**2**	**0**	0	0	0	0,00
		425	**0**	**2**	9	8	8	8,33
t 3	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [33C1-C2-C3]	**331**	**0.5**	**1,5**	6	6	5	6,00
		332	**1**	**1**	3	4	3	3,50
		333	**1,5**	**0.5**	0	0	0	0,00
		334	**2**	**0**	0			0,00
		345	**0**	**2**	8	8	8	8,00
	S. epidermidis 1457 agr (-) [43C1-C2-C3]	**431**	**0.5**	**1,5**	8	8	7	8,00
		432	**1**	**1**	5	6	6	5,50
		433	**1,5**	**0.5**	0	0	0	0,00
		434	**2**	**0**	0	0	0	0,00
		435	**0**	**2**	8	8	8	8,00

Not: t_1 , t_2 , t_3 ➔ Üreme süreleri (sırasıyla, Lag fazı, Log fazı başlangıcı, Log fazı sonu)
GM17 ➔ *L. lactis* besiyeri
C_1, C_2 , C_3 ➔ Deney Tekrar sayısı

Tablo 2.15: *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm).

Üreme süresi		Ekim Kodu	*Staphylococ* Süpernatantı	GM17 besiyeri	Deney tekrarı			Ortalama
					C1	C2	C3	
t 1	*S. epidermidis* ATCC 14990 [11C1-C2-C3]	111	0.5	1,5	9	8	9	8,67
		112	1	1	9	10	8	9,00
		113	1,5	0.5	9	8	9	8,67
		114	2	0	8	9	8	8,33
		115	0	2	13	13	13	13,00
	S. aureus A950227 [21C1-C2-C3]	211	0.5	1,5	12	13	12	12,33
		212	1	1	10	10	9	9,67
		213	1,5	0.5	11	11	11	11,00
		214	2	0	10	9	8	9,00
		215	0	2	13	13	13	13,00
t 2	*S. epidermidis* ATCC 14990 [12C1-C2-C3]	121	0.5	1,5	11	11	11	11,00
		122	1	1	10	10	10	10,00
		123	1,5	0.5	10	10	10	10,00
		124	2	0	7	5	5	5,67
		125	0	2	11	10	10	10,33
	S. aureus A950227 [22C1-C2-C3]	221	0.5	1,5	12	11	11	11,33
		222	1	1	9	9	9	9,00
		223	1,5	0.5	11	12	12	11,67
		224	2	0	8	8	8	8,00
		225	0	2	13	10	10	11,00
t 3	*S. epidermidis* ATCC 14990 [13C1-C2-C3]	131	0.5	1,5	11	12	12	11,67
		132	1	1	10	10	10	10,00
		133	1,5	0.5	12	12	12	12,00
		134	2	0	0	0	0	0,00
		135	0	2	9	9	9	9,00
	S. aureus A950227 [23C1-C2-C3]	231	0.5	1,5	10	9	9	9,33
		232	1	1	11	11	11	11,00
		233	1,5	0.5	9	10	10	9,67
		234	2	0	7	6	6	0,00
		235	0	2	9	9	9	9,00

Not: t_1 , t_2 , t_3 ➔ Üreme süreleri (sırasıyla, Lag fazı, Log fazı başlangıcı, Log fazı sonu)
GM17 ➔ *L. lactis* besiyeri
C_1, C_2 , C_3 ➔ Deney Tekrar sayısı

Tablo 2.16: *L. lactis* ATCC 11454 suşuna ait Nisin aktivitesi sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm).

Üreme süresi		Ekim Kodu	*Staphylococ* Süpernatantı	GM17 besiyeri	Deney tekrarı			Ortalama
					C1	C2	C3	
t 1	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [31C1-C2-C3]	311	0.5	1,5	9	9	9	9,00
		312	1	1	11	11	11	11,00
		313	1,5	0.5	13		9	7,33
		314	2	0	13			4,33
		315	0	2	9	8	8	8,33
	S. epidermidis 1457 agr (-) [41C1-C2-C3]	411	0.5	1,5	11	11	11	11,00
		412	1	1	12	12	12	12,00
		413	1,5	0.5	9		9	6,00
		414	2	0	0			0,00
		415	0	2	9	8	8	8,33
t 2	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [32C1-C2-C3]	321	0.5	1,5	9	10	10	9,67
		322	1	1	9	9	8	8,67
		323	1,5	0.5	10	10	10	10,00
		324	2	0	10	12	11	11,00
		325	0	2	12	11	12	11,67
	S. epidermidis 1457 agr (-) [42C1-C2-C3]	421	0.5	1,5	13			4,33
		422	1	1	10	9	8	9,00
		423	1,5	0.5				0,00
		424	2	0		7	8	5,00
		425	0	2	12	11	12	11,67
t 3	*S. epidermidis 1457* wt *agr* (+) [33C1-C2-C3]	331	0.5	1,5	9	9	9	9,00
		332	1	1	11	11	10	11,00
		333	1,5	0.5	11	12	10	11,50
		334	2	0				0,00
		345	0	2	10	9	9	9,50
	S. epidermidis 1457 agr (-) [43C1-C2-C3]	431	0.5	1,5	9	9	9	9,00
		432	1	1	12	11	11	11,50
		433	1,5	0.5	10	10	10	10,00
		434	2	0	10	9	8	9,50
		435	0	2	10	9	9	9,50

Not: t_1 , t_2 , t_3 ➔ Üreme süreleri (sırasıyla, Lag fazı, Log fazı başlangıcı, Log fazı sonu)
GM17 ➔ *L. lactis* besiyeri
C_1, C_2 , C_3 ➔ Deney Tekrar sayısı

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

i. Bakteri suşları: Tez çalışması kapsamında kullanılan, özellikle *Staphylococcus* cinsine ait, suşların özellikleri sonuçların değerlendirilmesinde önemli bir dayanak teşkil etmektedir. Çünkü "cross-talk" etkisini belirlemek için gösterge olarak, Nisin aktivitesinden kaynaklanan "inhibisyon zonları" nın çapları dikkate alınmıştır. Yapılan deneyler, Nisin üretiminin artması veya azalmasında, Staphylococcal QS sinyal moleküllerinin etkisini ölçecek şekilde tasarlanmıştır. Dolayısıyla elde edilen Staphyloccoccal süpernatantlarda bir yandan QS sinyal moleküllerinin varlığının, diğer yandan Staphylococ türlerine ait çeşitli ekzoproteinlerin süpernatantta bulunmadığının deneysel olarak gösterilmesi, sonuçların "QS sinyal molekülleri"ne bağlı olarak değerlendirilebilmesi için yapılması zorunlu bir işlemdir.

Staphylococcus cinsinde QS mekanizmasıyla ilgili olan, diğer bir ifadeyle QS sinyal moleküllerinin üretimi için gerekli olan, genetik bilgiyi taşıyan genler, ***"agr* operonu"**nda yer almaktadır. Bu operonun aktivasyonu, bakteri kültüründeki hücre yoğunluğuna paralel olarak gerçekleşmektedir; lag fazında minimum düzeyde ifade edilirken log fazın başlamasıyla birlikte geç log fazına doğru giderek daha fazla ifade edilir. Dolayısıyla üremenin başlangıcından durağan faza doğru ortama salgılanan QS sinyal molekülü miktarı giderek artar. Eğer *agr* operonu mutasyona uğrayacak olursa (doğal veya yapay mutant suşlarda) yukarıda açıklanan durum gerçekleşmeyecek ve teorik olarak üremenin hangi safhasından alınırsa alınsın (lag fazı , log faz ve durağan faz) Staphylococcal süpernatantta QS sinyal moleküllerine rastlanılmayacaktır.

Bu açıdan bakıldığında, *Staphylococcus* cinsine ait *S. epidermidis* 1457 wt *agr* (+) suşunun pozitif kontrol olarak, *agr* lokusunun tamamen delesyonu ile oluşturulan *S. epidermidis* 1457 *agr* (-) suşunun ise negatif kontrol olarak kullanılması sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir. Normalde Staphylococcal sinyal moleküllerinin süpernatanttaki varlığı MALDI-MS, MALDI-TOF, HPLC, SDS-PAGE gibi yöntemlerle doğrudan veya dolaylı olarak tespit edilmesi gerekirken, elimizde *agr* (+) ve *agr* (-) suşların bulunması sayesinde sinyal

moleküllerinin analizi yapılmasa bile sonuçların değerlendirilmesi teorik olarak mümkün görünmektedir.

Ancak yapılan deneylerde, *agr* (+) ve *agr* (-) suşlar arasında teorik olarak beklenen farklı etkiler yeterli düzeyde gözlenememiştir. Tez kapsamında, teorik stratejide herhangi bir eksiklik görülmemesine karşın, pozitif ve negatif suşlar arasında beklenen farklılığın yetersiz düzeyde olması, bu çalışmanın daha kapsamlı bir şekilde, mekanizmasının moleküler temellerine inerek, daha hassas kontroller dikkate alınarak yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

S. epidermidis ATCC 14990 ve *S. aureus* A950227 suşları hem teorik hem de pratik olarak beklenen ihtimaller çerçevesinde sonuçlar vermiştir. Ancak bu suşlarda, ön denemeler sürecinde *agr* lokusunun aktivitesinin çeşitli yöntemlerle (delta-toksin üretimi, biyofilm oluşumu vs. ile) doğrulanması, elde ettiğimiz sonuçların dolaylı olarak daha güvenilir olmasını sağlamaktadır.

L. lactis ATCC 11454 suşunun, Nisin üretme kapasitesine sahip olduğu ön denemeler sürecinde gösterilmiştir. Dolayısıyla normal şartlarda (sadece GM17 besiyerinde) üretilen Nisin miktarı ve buna bağlı oluşan inhibisyon zonları kontrol olarak değerlendirilmiştir. Sadece GM17 besiyerinde üretilen *L. lactis* ATCC 11454 kültüründen elde edilen süpernatantın oluşturduğu inhibisyon çaplarına bakılarak, Staphylococcal süpernatant eklenmiş GM17 besiyerinden elde edilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının oluşturduğu inhibisyon zonlarında "artış" veya "azalış" durumları değerlendirilmiştir.

Nisin geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu için çok çeşitli cins ve türler bu antibiyotikten etkilenmektedir. Tez/Proje çalışmasının başlangıç dönemlerinde (ön denemler sürecinde) indikatör suş olarak elimizde mevcut bulunan *S. epidermidis, L. mesenteriodes, M. luteus* suşları kullanıldı. Daha sonraki deneylerde ticari olarak alınan *Lactobacillus plantarum ATCC 8014* ve *Micrococcus luteum RSKK 1123* kullanıldı. Yapılan son deneylerde ise sadece *M. luteum RSKK 1123* kullanıldı. Bu sayede bir yandan indikatör suş sayısına bağlı olarak aşırı derecede artan deneysel işlem basamakları minimum ve yeterli düzeye indirildi, diğer yandan indikatör suşlar arasında, sadece, Nisine karşı en duyarlı olan suş kullanılarak daha güvenilir sonuçlar elde edildi.

ii. Üreme eğrileri. Staphylococcal üreme eğrilerini belirlemeye yönelik yapılan deneyler sonucunda bakterilerin lag fazı, eksponansiyal faz başlangıcı ve sonu olmak üzere farklı hücre yoğunluklarını elde edeceğimiz süreler belirlendi. Elde edilen veriler dikkate alınarak ve Staphylococcal süpernatantların eldesine yönelik çalışmalarda ihtiyaç duyulan süpernatant miktarına bağlı olarak besiyeri miktarı, besiyerine ekilen ön kültür miktarı ve üreme süreleri belirlendi. Bu hesaplamalar yapılırken çalışmanın sürdürüldüğü laboratuardaki mesai süreleri de dikkate alındı.

Örneğin, 35 ml TSB besiyerine üç farklı noktadan numune almak amacıyla 0.5 ml ön kültür ekildi. Ekimin yapıldığı anda *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* A950227, *S. epidermidis* 1457 wt *agr* (+) ve *S. epidermidid* 1457 agr (-) suşlarına ait hücre yoğunlukları (OD_{600}) sırasıyla 0.050, 0.058, 0.026, 0.041 olarak ölçüldü. Lag fazından numune almak amacıyla ilk grup (t_1) 2 saatlik üreme periyoduna tabi tutuldu ve süre sonunda elde edilen hücre yoğunlukları sırasıyla 0.136, 0.291, 0.305 ve 0.693 olarak ölçüldü (Tablo 3.1). Bu değerler üreme eğrileri dikkate alındığında lag fazına karşılık gelmektedir.

Eksponansiyal fazın başlangıcından numune almak için aynı şekilde 35 ml TSB besiyerine 0.5 ml ön kültür ekildi ve 6 saat (t_2)üremeye bırakıldı. İlk ekim anında alınan OD_{600} değerleri sırasıyla 0.031, 0.031, 0. 095 ve 0.149 olarak ölçüldü. Üreme sürecinin sonunda alınan OD_{600} değerleri ise 1.855, 1.946, 1. 753 ve 1. 870 olarak ölçüldü (Tablo 3.1). Bu veriler de daha önce belirlenen üreme eğrilerinde eksponansiyal fazın ortalarına denk gelmektedir.

Son olarak eksponansiyel fazın sonlarına doğru numune almak için aynı şekilde 35 ml besiyerine 0.5 ml ön kültür ekildi. Ekim anında alınan OD_{600} değerleri sırasıyla 0.021, 0.021, 0.011 ve 0.017 olarak belirlendi. 16 saatlik (t_3) üreme periyodu sonunda alınan numunelerde OD_{600} değerlerinin 2.090, 2.481, 2.402 ve 2.345 olduğu tespit edildi (Tablo 3.1). Bu değerlerde log fazının sonuna gelindiğini ve durağan faza doğru gidildiğini göstermektedir.

Bu verilere dayanarak elde ettiğimiz Staphylococcal süpernatantlardan birinci grupta minimum düzeyde QS sinyal peptitleri bulunurken, ikinci ve üçüncü grupta bu moleküllerin göreceli olarak çok daha fazla bulunacağı ön görüldü (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Süpernatant elde edilen Staphylococcal kültürlerin ekim anında ve üreme sürelerinin sonunda belirlenen OD600 değerleri.

t	Bakteriler	KOD	OD600	
			to	t1/t2/t3
t1	***S. epidermidis* ATCC 14990**	**11**	0.050	0.136
	***S. aureus* A950227**	**21**	0.058	0.291
	***S. epidermidis* 1457 wt**	**31**	0.026	0.305
	***S. epidermidis* 1457 agr (-)**	**41**	0.041	0.693
t2	***S. epidermidis* ATCC 14990**	**12**	0.031	1.855
	***S. aureus* A950227**	**22**	0.031	1.946
	***S. epidermidis* 1457 wt**	**23**	0.095	1.753
	***S. epidermidis* 1457 agr (-)**	**24**	0.149	1.879
t3	***S. epidermidis* ATCC 14990**	**13**	0.021	2.090
	***S. aureus* A950227**	**23**	0.021	2.481
	***S. epidermidis* 1457 wt**	**33**	0.011	2.402
	***S. epidermidis* 1457 agr (-)**	**43**	0.017	2.345

Staphylococcal üreme eğrilerini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde besiyeri miktarı, t_o anında besiyerine ekilen ön kültür miktarı, başlangıç OD_{600} değeri gibi değişkenlerin etkisini belirlemeye yönelik stratejiler uygulandı. 25 ml TSB besiyerine 3 ml Staphyloccocus ön kültürü 8:1 oranında ekilerek üreme başlatıldığında, hemen hemen hiç lag fazı görülmeden ortalama 9 saat sonra durağan faza ulaşıldı. Bu grafikler dikkate alındığında 2-5 ve 8 saatlik kültürlerden alınacak süpernatantlarda farklı konsantrasyonlarda QS sinyal moleküllerinin elde edileceği anlaşılmaktadır.

Benzer şekilde yapılan diğer bir deneyde, 30 ml TSB besiyerine 1 ml ön kültür ekilerek üreme başlatıldı. Bu deneyde ekim oranı bir önceki deneyden farklı olarak 30:1, besiyeri miktarı ise 30 ml'dir. Bu şartlar altında elde edilen üreme eğrilerinde ortalama 3 saatlik bir lag fazı, 12 saat süren eksponansiyal faz ve 16. saatten sonra ulaşılan durağan faz süreleri belirlendi. İki deney dikkate alındığında t_o anındaki besiyeri/ön kültür oranının aynı suşa ait üreme periyodunda görülen benzer evrelere farklı sürelerde ulaşılabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bu deneylerde besiyeri miktarının ve başlangıç OD_{600} değerinin etkisini yorumlamak mümkün değildir.

Başlangıç OD_{600} değerinin üremeye etkisini belirlemek amacıyla sadece *S. epidermidis* ATCC 14990 suşu ile deney yapıldı (bkz. sf.59-60, Grafik 2.3) . Bu deneyde 25 ml besiyerine ekim (t_o) anında OD_{600} değerleri sırasıyla 0.1 , 0.3 , 0.5 , 0.7 ve 0.9 olacak şekilde ön kültür ekildi. Beş kültürde de yaklaşık 1 saatlik lag fazı görüldü. Üremenin başlangıcında benzer durum sergilemelerine rağmen log faz ve durağan faz sürelerinin farklı olduğu gözlendi. OD_{600} 0.1 değeriyle başlayan üreme eğrisi 7 saatten sonra halen log fazında görülürken, diğer kültürlerde, sırasıyla, durağan faza doğru daha fazla bir eğilim görüldü. Dolayısıyla belirli miktardaki bir besiyerinde üreme evrelerine daha kısa sürede ulaşmak için üremeyi daha yüksek OD_{600} değerlerinde başlatmak gerektiği belirlendi.

Üreme sürecinde, besiyeri ve ön kültür miktarlarının, bununla beraber besiyeri/ön kültür oranının etkisini belirlemek amacıyla *S. epidermidis* ATCC 14990 ve *S. aureus* A950227 suşlarına ait üreme eğrileri belirlendi. *S. epidermidis* ATCC 14990 ile yapılan deneyde (bkz. sf. 64-66, Grafik 2.5-2.6-2.7) 10-15-25 ve 30 ml olmak üzere farklı miktarda dört besiyeri kullanıldı ve 0.1-0.5-1 ml olmak üzere üç farklı miktarda ön kültür ekimi yapıldı. Burada bir yandan besiyeri miktarı artarken, diğer yandan ekilen ön kültür miktarı arttırıldı. Dolayısıyla grafikler iki farklı açıdan değerlendirilebilir; örneğin, 10 ml besiyerine ekilen ön kültür miktarı arttırılırsa (0.1-0.5-1 ml) üreme süreci nasıl etkilenir? (Aynı şekilde 15-25 ve 30 ml besiyerlerinde durum ne olur?) veya 0.1 ml ön kültür 10-15-25 ve 30 ml besiyerine ekilirse üreme süreci nasıl etkilenir? (Aynı şekilde 0.5 ve 1 ml ön kültür ekilirse durum ne olur?). Bu deneylerde elde edilen sonuçlar, daha önce elde edilen verilere paraleldir: Her bir besiyeri tek tek dikkate alınacak olursa ön kültür miktarı 0.1-0.5 ve 1 ml olarak arttırıldıkça lag fazı süresi kısalmış, log fazının eğimi azalmış ve durağan faza daha erken sürede ulaşılmıştır. Örneğin 25 ml besiyerinde 0.1 ml ön kültür ekildiğinde 4 saatlik bir lag fazı görülürken, 0.5 ml ön kültür ekildiğinde bu süre 1 saate inmekte, 1 ml ön kültür ekildiğinde ise hemen hemen hiç görülmemektedir. Aynı besiyerinde Log fazına bakıldığında, ön kültür miktarı arttıkça eğim giderek azalmakta ve durağan faza daha erken ulaşılmaktadır (Grafik 2.6-A).

Aynı durumlar besiyerinin arttırılmasıyla da elde edilmiştir. Örneğin, 0.1 ml ön kültür, sırasıyla 10-15-25 ve 30 besiyerlerine ekildiğinde 10 ml besiyerinde doğrudan log faza geçilirken, 15 ml besiyerinde yaklaşık 1 saatlik lag fazından sonra

log fazına geçildiği, 25 ve 30 ml besiyerlerinde ise lag fazının 4-5 saat sürdüğü gözlendi **(Grafik 2.7-A)**. Ekilen ön kültür miktarı 0.5 ve 1 ml olduğunda lag fazı süresi giderek azalmış ve daha az eğime sahip log faz görülmüştür **(Grafik 2.7-B ve C)**. Bu deney de bize, daha öncekileri destekleyerek, besiyeri miktarı ile ön kültür oranını ayarlayarak üreme sürecindeki belirli evrelerin farklı sürelerde elde edilebileceğini göstermiştir. Ancak besiyeri/ön kültür oranlarını bu deneyde karşılaştırmamız mümkün değildir. Çünkü 10 ml besiyerindeki oranlar 100:1, 50:1 ve 10:1, 15 ml besiyerindeki oranlar 150:1, 30:1 ve 15:1 vs. şeklinde farklı oranlar olup sadece göreceli olarak artışı-azalışı yansıtmaktadır. Bu nedenle *S. aureus* A950227 suşuyla yapılan deneyde sayısal olarak karşılaştırma yapacak şeklide benzer oranlar belirlendi.

S. aureus A950227 suşu ile yapılan deneyde 10-15-20-25 ve 30 ml besiyerleri kullanıldı ve 0.1-0.5-1-2 ve 3 ml ön kültür ekimleri yapıldı. Bu deneyde elde edilen veriler ile *S. epidermidis* ATCC 14990 ile elde edilen veriler benzerdir. Farklı olarak burada besiyeri/ön kültür oranlarının üreme üzerindeki etkilerini karşılaştırmak mümkündür. Örneğin, 10 ml besiyerine 1 ml ön kültür, 20 ml besiyerine 2 ml ön kültür ve 30 ml besiyerine 3 ml ön kültür ekildiğinde hem besiyeri miktarının hem de ön kültür miktarının farklı olmasına rağmen besiyeri/ön kültür oranı her üçünde de 10:1'dir. Dolayısıyla bu üç besiyerini karşılaştırmak suretiyle, tez çalışmasının ileri aşamalarında Staphylococcal süpernatant elde edilirken gerekli olan besiyeri miktarı ne olursa olsun besiyeri/ön kültür oranını ayarlayarak ilgili üreme fazlarını istenilen sürelerde yakalamamız mümkün oldu. Sadece 10:1 oranındaki ekimler dikkate alındığında her üç kültüre ait eğriler hemen hemen aynı yapıya sahiptir. Bu da gösteriyor ki besiyeri/ön kültür oranı sabit olduğu sürece üreme eğrisi aynı kalacaktır. Bu bilginin önemine ileride (süpernatant elde etme aşaması değerlendirilirken) değinilecektir.

iii. Staphylococcal süpernatantların elde edilmesi. Tez çalışmasının en kritik noktalarından biri de Staphylococcal süpernatantların elde edilme yöntemidir. Çünkü tezin asıl amacı olan QS-CT analizini yapabilmemiz bu süpernatantlardaki sinyal moleküllerinin varlığına ve miktarına bağlıdır.

Deneysel olarak elde edilen süpernatantın miktarı da çok önemlidir. Çünkü istenilen nitelikte staphylococcal süpernatantlar üreme eğrileri dikkate alınarak elde edilse bile, *L. lactis* besiyerine (GM17'ye) farklı kombinasyonlarda ilave edileceğinden süpernatantın gereken miktardan az olması deneyin eksik yapılmasına neden olacaktır. Burada hangi kombinasyonların kullanılması gerektiğini ve bu kombinasyonlara bağlı olarak Staphylococal süpernatanttan hangi miktarlarda elde edilmesi gerektiğinin belirlenmesi tez çalışmasının başlangıcında karşımıza çıkan önemli soru(n)lardan biriydi. Bu noktada sabit ve güvenilir bir sistem oluşturmak amacıyla yukarıda bahsedilen üreme eğrilerini belirlemeye yönelik çeşitli deneyler yapılmıştır. Dolayısıyla deneyin yapılacağı süre ve kombinasyon için gerekli süpernatant miktarı göz önüne alınarak *Staphylococ* suşlarının üretileceği besiyeri (TSB) miktarıları ve bu besiyerlerine ekilecek ön kültür miktarları ayarlanmıştır.

Staphylococcal süpernatantlarda elde edilmek istenen moleküller QS sinyal peptitleridir. Ancak *Staphylococcus* cinsine ait türlerde, özellikle *S. aureus* A950227'de, çok sayıda ekstraselüler proteinler salgılanmaktadır. Dolayısıyla *L. lactis* ATCC 11454 üzerindeki etkinin QS sinyal moleküllerinden mi yoksa bu ekstraselüler proteinlerden mi kaynaklandığı kesin olarak ortaya konulmalıdır. Bu amaçla, 3 kDa por çaplı Centricon-3® ultrafiltreler kullanılarak büyük yapılı ekstraselüler proteinler ile ortalama 1000 dalton moleküler ağırlığa sahip Staphylococcal QS sinyal molekülleri birbirinden ayrıldı. Dolayısıyla (ön denemeler hariç) *L. lactis* ATCC 11454 besiyeri GM17'ye eklenen Staphylococcal süpernatantlar sadece 1000 Da'dan küçük molekülleri içermektedir.

iv. Staphylococcal süpernatantlar ve QS sinyal peptitlerin bu süpernatanttaki varlığı. Çalışma sonunda iki genus arasında QS mekanizması açısından pozitif veya negatif korelasyon olup olmadığını değerlendirebilmek için staphylococcal süpernatantlarda QS sinyal peptitlerinin kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmesi gerekmektedir. Yukarıda üreme eğrileri yardımıyla elde ettiğimiz sonuçlar bu yönde atılan ilk adımdır. Çünkü sinyal moleküllerinin süpernatanttaki varlığı/miktarı kültürün hangi üreme fazında olduğuna bağlıdır. Dolayısıyla süpernatantı elde ettiğimiz üreme fazı (lag fazı, log faz başlangıcı ve log faz sonu) teorik olarak süpernatanttaki sinyal molekülü konsantrasyonunu yansıtmaktadır.

Aynı zamanda MALDI-MS, MALDI-TOF gibi yöntemlerle de süpernatanttaki sinyal peptitlerinin molekül ağırlıklarını yakalamak veya bu moleküllerle eş zamanlı ifade edilen delta toksini SDS-PAGE yöntemiyle tespit etmekde mümkündür. Bu çalışmada sadece MALDI-MS yöntemiyle doğrudan sinyal moleküllerinin varlığı tespit edildi. Teorik olarak hesaplanan QS sinyal moleküllerinin moleküler ağırlıkları olan 1034, 1034 ve 1108 Da değerleri MALDI-MS analiziyle belirlendi ve bu verilere göre, sırasıyla, pozitif kontrol *S. epidermidis* 1457 wt *agr* (+), *S. epidermidis* ATCC 14990 ve *S. aureus* A950227 süpernatantında teorik olarak bulunması beklenen QS sinyal moleküllerinin var olduğu belirlendi. *S. epidermidis* 1457 wt *agr* (+) suşunun *agr* lokusunun delesyonuyla oluşturulan *S. epidermidis* 1457 *agr* (-) suşunda ise beklenen değerlerin görülmemesi bu suşa ait süpernatantta QS sinyal moleküllerinin bulunmadığını ortaya koymaktadır. Bu veriler daha sonra yapılan inhibisyon deneylerinde zon çaplarını değerlendirmek ve QS mekanizmasıyla ilişkilendirmek açısından temel dayaklardır.

Bu verilerin güvenilirliğini azaltan, diğer bir ifadeyle çalışmanın bu noktada zayıf kalan tarafı MALDI-MS ve SDS-PAGE yöntemlerinde kullanılmak üzere alınan numunelerin yeterli derecede saf olmama ihtimali ve bu yöntemlerde orjinal pozitif kontrollerin temin edilememesidir. QS sinyal peptitlerin varlığını tespit etmek için yapılan analizlerde kontrol grubu olarak iki ürüne ihtiyaç vardır: Birincisi, MALDI-MS yönteminde kontrol olarak kullanılacak olan saf halde Staphylococcal QS sinyal peptitleri, ikincisi SDS-PAGE yönteminde kontrol olarak kullanılacak olan delta toksindir.

Bu çalışmada iki kontrol de kullanılmadı. Bunun nedeni delta-toksinin ticari olarak satılan bir ürün olmaması, özel üretiminin bu çalışmanın bütçesini fazlasıyla aşması, bununla beraber QS sinyal moleküllerinin üretiminin günümüzdeki tekniklerle oldukça zor olması, ticari olarak bulunamaması ve yetkili kişiler tarafından temin edilse bile beraberinde ciddi bir maliyet getirmesi nedeniyle tedarik edilememesidir.

Bu nedenle sadece MALDI-MS yöntemiyle doğrudan sinyal molekülü analizi yapılmış ve bu analizde *agr* (+) ve *agr* (-) suşlar dikkate alınmıştır. Konuyla ilgili

ileride yapılacak daha geniş bütçeli araştırmalarda çalışmanın bu yönü tamamlanırsa sonuçların güvenilirliği daha da artacaktır.

v. *Staphylococcuc – Lactococcus* kombinasyonu. Staphylococcus süpernatantları ile *L. lactis* ATCC 11454 besiyeri GM17'nin hangi oranlarda karıştırılacağı yapılan ön denemeler sonucunda belirlendi. Çalışmanın başlangıç dönemlerinde 15 ml *Staphylococcus* süpernatantı ile 15 ml GM17 besiyeri 1:1 oranında karıştırıldı. Toplam hacmin 30 ml olduğu bu deneylerde 50 ml'lik falkon tüpler kullanıldı. Ancak söz konusu hacimler çalışmanın amacı için oldukça fazla olup, hem mevcut cihazların daha uzun süre kullanılmasına hem de ciddi bir madde sarfiyatına neden olmuştur. Bu nedenle çalışmanın başlangıç demlerinden sonlarına doğru bu kombinasyonlar için kullanılan hacimler giderek azalmıştır (30-20-10-5-3-2 ml). Çünkü Nisin aktivitesini gözlemlemek için kullanılan *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının miktarı 25-20-2-1 veya 0.5 µl'dir. Bu nedenle toplam kombinasyon hacminin 2 ml olması fazlasıyla yeterlidir.

Yukarıda belirtildiği gibi, Staphylococcal süpernatant-GM17 besiyeri kombinasyonlarında hangi miktarların kullanılması gerektiği noktasında dikkate alınan faktörlerden biri, indikatör suş üzerine damlatılacak (yada disk kuyu yöntemiyle eklenecek) toplam *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının miktarıdır. Diğer bir faktör ise *Staphylococ* süpernatantı ile GM17 besiyerinin hangi oranlarda karıştırılacağıdır. Örneğin 3 ml toplam hacimde süpernatant/GM17 oranları **0.5**:2.5, **1**:2, **1.5**:1.5, **2**:1, **2.5**:0.5, **3**:0 ml olacak şekilde ayarlanırsa 10.5 ml (0.5+1+1.5+2+2.5+3= 10.5 ml) Staphylococcus süpernatantı gerekir. Eğer 2 ml toplam hacim tercih edilir ve karışım oranları **0.5**:1.5, **1**:1, **1.5**:0.5, **2**:0 ml olacak şeklide ayarlanırsa gerekli olan Staphylococ süpernatant miktarı 5 ml olacaktır. Aynı zamanda süpernatanttaki QS sinyal moleküllerinin varlığını tespit etmek amacıyla MALDI-MS veya SDS-PAGE gibi yöntemlerde kullanılmak üzere 1'er ml ayırmak gerektiği dikkate alınacak olursa bir deney için gerekli olan Staphylococcal süpernatant miktarı 12.5 veya 7 ml olacaktır.

Bu çalışmada, daha önce belirtildiği gibi, toplam kombinasyon hacmi için başlangıçta 30-20-15 ml gibi büyük hacimler kullanıldı. Ancak ön denemeler

sonucunda *L. lactis* ATCC 11454 besiyerinin toplam hacmi 3 ve 2 ml olacak şekilde miktarlar belirlendi.

Staphylococcal süpernatantların *L. lactis* ATCC 11454 üzerine muamelesi sonucunda elde edilen inhibisyon zonlarının çapları incelendiğinde, *L. lactis* ATCC 11454'ün Nisin üretim kapasitesinde azalma görüldü. Staphylococcal süpernatantların elde edilme yöntemleri ve bu yöntemler kullanılarak elde edilen veriler dikkate alındığında Staphylococcal süpernatantın *L. lactis* ATCC 11454'te Nisin üretimini baskıladığı söylenebilir. Ancak bu çalışmada, bu baskılamanın bakterilerin üremelerinin engellenmesi nedeniyle mi yoksa sinyal iletimi yoluyla Nisin genlerinin ekspresyonlarının baskılanması nedeniyle mi olduğu açık olarak ortaya konmamıştır. Eğer Staphyloccoccus süpernatant ile GM17 besiyeri karışımında üretilen *L. lactis* ATCC 11454 kültürlerinden süperntant elde edilmeden önce 1 ml numune alınıp OD_{600} değerleri alınarak hücre konsantrasyonları belirlenirse, çalışmanın eksik olan bu yönü netleşmiş olacaktır. Çünkü, kültür konsantrasyonu sadece GM17 besiyerinde üretilen kültürle aynıysa, inhibisyon etkisinin, sinyal moleküllerine bağlı olarak meydana geldiği söylenebilir. Ancak GM17 besiyerine eklenen Staphylococcal süpernatant miktarı arttıkça (0.5, 1, 1.5, 2 ml) OD_{600} değeri azalıyorsa, bu durumda inhibisyon etkisinin, sinyal moleküllerine (QS mekanizmasına) bağlı olarak Nisin genlerinin ekspresyonlarındaki baskılanmadan değil de üremenin inhibisyonuna bağlı olarak ortamda daha az hücre bulunması ve beraberinde daha az Nisin üretilmesinden kaynaklandığı anlaşılır.

vi. İnhibisyon Zonlarının Değerlendirilmesi. "İnhbisyon zon çapları" ile "üretilen Nisin miktarı"nı ilişkilendirmek için ticari olarak alınan Nisin (Nisaplin) kullanılarak farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltilerin oluşturdukları zon çapları Nisin miktarını değerlendirmek amacıyla referans alındı.

Standart Nisin grafiklerinde 100-200-300-400-500-600 ve 700 IU/ml çözeltiler hazırlandı ve indikatör suş üzerine 0.5 µl damlatıldı. Oluşan inhibisyon zonları karşılık gelen Nisin konsantrasyonları dikkate alınarak "Zon çapı/Nisin Konsantrasyonu" standart grafikleri belirlendi. *L. lactis* ATCC 11454 kültürlerinden elde edilen süpernatanttaki Nisin aktivitesi ile standart grafikler karşılaştırıldı.

Staphylococcal süpernatant/GM17 kombinasyonlarında üretilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantıyla elde edilen inhibisyon zonları iki yönde incelendi (Tablo 2.11-2.16). Birincisi, GM17 besiyerine eklenen staphylococcal süpernatantın üremenin hangi safhasında bulunan kültürden alındığına bakıldı. Burada, dört Staphylococcus türünün ayrı ayrı üç farklı kültüründen (t_1, t_2, t_3; sırasıyla lag fazı, log fazı başlangıcı ve log fazı sonu) süpernatant elde edildi. Üç rakamdan oluşan kod numaralarındaki 2. rakamlar kültür çeşidini ifade etmektedir: 1**1**1, 14990 suşunun lag fazından; 1**2**1, 14990 suşunun log fazından; 1**3**1 ise 14990 suşunun geç log fazından elde edilen süpernatantların GM17 besiyerine ilave edildiğini göstermektedir. İkinci olarak ise, her bir Staphylococ kültüründen elde edilen süpernatantların GM17 besiyerine hangi oranlarda eklenmiş olduğu dikkate alındı. Tabloda kullanılan 3 rakamlı kod numaralarında 3. rakam kombinasyon çeşidini, diğer bir ifadeyle GM17 besiyerine ne kadar süpernatant eklendiğini gösterir: 11**1**, 11**2**, 11**3**, 11**4** ve 11**5** kodlu kültürlerde sırasıyla SPN/GM17 karışım oranları 0.5:1.5, 1:1, 1.5:0.5, 2:0 ve 0:2 ml dir.

Tablo 2.11'de görüldüğü gibi 115, 125, 135, 215, 225 ve 235 kodlu kontrol kombinasyonlarında (0:2, sadece GM17 besiyerinde) inhibisyon zon çapları en fazlayken, GM17 besiyerine eklenen staphylococcal süpernatant miktarı arttıkça inhibisyon zon çapları giderek azalmaktadır. Aynı durum pozitif ve negatif kontrollerde de benzer şekilde görüldü.

S. epidermidis ATCC 14990 suşuna ait süpernatantın ilave edildiği GM17 besiyerinde üretilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantının Nisin aktivitesini inceleyecek olursak, bu şusa ait üç kültür elde edildi ve 11X, 12X ve 13X (X: 1,2,3,4 veya 5) şeklinde kodlandı. Üç kültürün her biri ayrı ayrı GM17 besiyerine toplam hacim 2 ml olacak şekilde 0.5 ml (1.GRUP), 1 ml (2. GRUP), 1.5 ml (3. GRUP), 2 ml (4. GRUP, Kontrol-I) ve 0 ml (5. GRUP, Kontrol-II) ilave edildi. Üç kültüre ait 5 kombinasyon sonucu elde edilen toplam 15 adet SPN/GM17 besiyerine 0.1 ml *L. lactis* ilave edildi ve sırasıyla birinci Staphylococcus süpernatantı eklenen kültürler 111,112,113, 114, 115; ikinci Staphylococcus süpernatantı eklenen kültürler 121, 122, 123, 124 ,125; üçüncü Staphylococcus süpernatantı eklenen kültürler 131, 132, 133, 134, 135 şeklind kodlandı. Bu üçlü kodlama sisteminde **1. rakam**, tez çalışması

kapsamında kullanılan suş kodunu [**1**XX. *S. epidermidis* 14990, **2**XX. *S. aureus* A950227, **3**XX. *S. epidermidis* 1457 wt *agr* (+), **4**XX. *S. epidermidis* 1457 *agr* (-)] , **2. rakam**, Staphylococcal süpernatantın elde edildiği kültürün hangi üreme safhasından alındığını [X**1**X. lag fazı (t_1), X**2**X. Erken log fazı (t_2), X**3**X. Geç log fazı (t_3),] yansıtır. Elde edilen inhibisyon zonları bu kodlama sistemi göz önünde bulundurularak incelendiğinde her üç kültüre ait süpernatantlarda kod numarası 5-1-2-3-4 yönünde gittikçe oluşan inhibisyon zonlarının çaplarında azalma görülmektedir. Aynı zamanda 11X, 12X ve 13X zonları karşılıklı olarak incelendiğinde yine zon çaplarında azalma görülmektedir. Örneğin 113, 123 ve 133 zonları sırasıyla 12.33, 7.33, 3.33 mm'lik çaplara sahip olup giderek azalmıştır.

Bu sonuçlar, bir suşa ait üreme periyodunda, lag fazından geç log faza doğru gidildikçe, Staphylococcal süpernatantta daha fazla miktarda QS sinyal peptitlerinin bulunduğunu, buna bağlı olarak da Nisin aktivitesi ve/veya üretiminin daha fazla baskılandığını ortaya koymaktadır.

Aynı durum *S. aureus* A95022 suşuna ait süpernatantların kullanıldığı GM17 besiyerinde üretilen *L. lactis* süpernatantlarına ait inhibisyon zonlarında da görülmektedir. Bir yandan, 21X, 22X, 23X kültürlerine ait süpernatantların kombinasyonda kullanılan staphylococcal süpernatant miktarları arttıkça (koddaki 3. rakam 5-1-2-3-4 şeklinde ilerledikçe) inhibisyon zonlarının çaplarında azalma görüldü. Diğer yandan 21X, 22X, 23X şeklinde aynı X değerine karşılık gelen zonlar incelendiğinde yine çap genişliğinin azaldığı görüldü. Örneğin, 213, 223 ve 233 zonlarına ait çaplar, sırasıyla, 11.67, 7.00, 6.67 mm olarak belirlendi.

İnhibisyon zonlarının çaplarıyla ilgili verilen tablolardaki diğer veriler de yukarıda açıklandığı gibi karşılaştırmalı olarak incelendi. Staphylococcus süpernatant/GM17 besiyeri kombinasyonlarında üretilen *L. lactis* ATCC 11454 süpernatantlarında Nisin aktivitesi sonucunda elde edilen ihnibisyon zonlarının çaplarındaki değişimler bir bütün olarak incelendiğinde, genel etkinin "inhibisyon" yönünde olduğu görüldü. Ancak bu etkinin üremenin baskılanmasından mı, Nisin üretim kapasitesinin azalmasından mı yoksa üretilen Nisinin aktivitesinin azalmasından mı kaynaklandığı henüz net değildir. Bu soruların cevaplanması ileride yapılacak daha kapsamlı araştırmaları gerektirmektedir.

4. SONUÇ

Bu tez çalışmasında farklı bakteri türleri arasında "Quorum Sensing" mekanizması baz alınarak etkileşim olup olmadığı ve bunun önemli bir endüstriyel antibiyotik olan Nisin üretimine etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Sonuç olarak, *Staphylococcus* genusuna ait *S. epidermidis* ve *S. aureus* ile *Lactococcus* genusuna ait *L. lactis* suşları arasında QS mekanizması açısından pozitif bir korelasyon olmadığı belirlenmiştir.

EKLER

EK-1

BESİYERİ İÇERİKLERİ

GM17 Broth ve Agar

Polipepton ……. 5 g

Fitopepton ……. 5 g

Maya ekstraktı …….. 2.5 g

Et ekstraktı …… 5 g

β-Na-Gliserofosafat …..…….. 19 g

Lactoz (%10) ……50 ml

$MgSO_4$ .7 H_2O (1 M) …….. 1 ml

Askorbik asit ……. 0.5 g

Agar …….. 15 g (% 0.15)

d H_2O …… 950 ml

pH (sterilizasyon öncesi) …….. 6.9 ± 0.2

Besi yeri içeriği 950 ml distile suda çözüldü.. 121 ºC'ta 15 dk sterilize edildi.

MRS Broth ve Agar

Tripton ……. 20 g

Jelatin ……... 2.5 g

Dekstroz …….. .2.5 g

Lactoz (%1) ……. 100 ml

NaCI …… 4.0 ml

Sodyum asetat ……. 1.5 g

Askorbik asit …….. ..0.5 g

$CaCl_2$. 6 H_2O …….. 10 ml

Bromocresolpurple (%0.004) ...10 ml

Agar ……..15 g

H_2O ……...880 ml

pH (sterilizasyondan önce)……6.8

Besi yeri içeriği 950 ml distile suda çözüldü. 121 C'ta 15 dk sterilize edildi.

LB Broth ve Agar

Pepton …….. 10 g

NaCI …… 10 g

Yeast ekstrakt …….. 5 g

Agar ……. 15 g (% 0.15)

Agar (soft) …… .. 7.5 g (% 0.075)

Trypticase Soy Broth (TSB) ve Agar (TSA)

Pepton (kazein) ……17

Pepton (Soya fasülyesi) ……3

D(+)glukoz ……...2.5

Sodyum Klorid…….5

Di-potasyum hidrojen fosfat….2.5

Besi yeri içeriği 950 ml distile suda çözüldü. 121 C'ta 15 dk sterilize edildi.

Ek-2. Kullanılan araç ve cihazlar.

Araç / Cihaz	**Marka**	**Model**
UV Spektrofotometre	GBC (Northbrook, ABD)	Cintra-20
UV Spektrofotometre	BioRad	SmartSpect 300
Ph metre	İno-Lab (Kladno, Çek Cumhuriyeti)	Ph Level-1
Mekanik karıştırıcı	Heidolph (Schwabach, Almanya	Promax 2020
Magnetik karıştırıcı	Heidolph (Schwabach, Almanya	MR 3003
Hassas terazi	Sartorius (Goerringen, Almanya	BA 110 S
Termostatlı su banyosu	Gesselschaft Für Labortechnick (Burladingen, Almanya)	1086
Santrifüj	Heraeus (Hanau, Almanya)	Laborafuge 400R
Etüv	Seraus	
Çalkalamalı etüv	Excella	E25
Otomatik pipet (1000 µl)	Pluripete Kartell (Welshpool, Avusturalya)	P 1000
Otomatik pipet (200 µl)	Pluripete Kartell (Welshpool, Avusturalya)	P 200
Otomatik pipet (20 µl)	Pluripete Kartell (Welshpool, Avusturalya)	P 20

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Schauder, S., and Bassler, B. L. (2001) The languages of bacteria. *Genes & Development*, 15:1468–1480

2. Nottingham QS web site: www.nottingham.ac.uk/quorum/

3. Greenberg, E. P. (1997) Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News* 63, 371-377.

4. Kempner, E. S. and Hanson, F. E. (1968) Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol*. **95**, 975-979.

5. Eberhard, A. (1972) Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol*. **109**, 1101-1105.

6. Nealson, K. H., Platt, T. and Hastings, J. W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system. *J. Bacteriol*. **104**, 313-322.

7. Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. and Oppenheimer, N. J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.* **20**, 2444-2449.

8. Egland, K. A. & Greenberg, E. P. (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: Elements of the *luxI* promoter. *Mol. Microbiol*. **31**, 1197-1204.

9. Williams, P., Bainton, N. J., Swift, S., Chabra, S. R., Winson, M. K., Stewart, G. S. A. B., Salmond, G. P. C. and Bycroft, B. W. (1992) Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes: Bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 161-168.

10. Gambello, M. J. and Iglewski, B.H. (1991) Cloning and characterisation of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol*. **173**, 3000-3009.

11. Chernin, L. S., Winson, M. K., Thompson, J. M., Haran, S., Bycroft, B. W., Chet, I., Williams, P. and Stewart, G. S. A. B. (1998) Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. Bacteriol*. **180**, 4435-4441.

12. Swift S., Winson, M. K., Chan, P. F., Bainton, N. J., Birdsall, M., Reeves, P. J., Rees, C. E. D., Chhabra, S. R., Hill, P. J., Throup, J. P., Bycroft, B. W., Salmond, G. P. C., Williams, P. and Stewart, G. S. A. B. (1993) A novel strategy for the isolation of *luxI* homologues: Evidence for the widespread distribution of a LuxR:LuxI superfamily in enteric bacteria. *Mol. Microbiol*. **10**, 511-520.

13. Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol*. **17**, 333-343.

14. Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P. (1995) Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9427-9431.

15. Oschner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. and Reiser, J. (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**, 2044-2054.

16. Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *P. aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 6424-6428.

17. De Kievit, T. R., and Iglewski, B. H. (2000) Bacterial Qourum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infectıon and Immunıty*, Sept-2000, Vol.68, No.9, p.4839-4849.

18. Shiner, E. K., Rumbaugh, K. P., Williams S. C. (2005) Interkingdom signaling: Deciphering the language of acylhomoserine lactones. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 935-947.

19. Smith, R. S., and Iglewski, B. H. (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 2003 6:56-60.

20. Joint, I., Tait, K., Callow, M. E., and Callow J. A., Milton, D., and William, P., Camara, M. (2002) *Science,* vol.298, 8 Nov 2008, p.1207.

21. Valdez, J. C., Peral, M. C., Rachid, M., Santana, M. and Perdigon, G. (2005) Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonasaeruginosa in vitro* and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clinical Microbiology and Infection*,Vol.11, Number6, June2005, p. 472-479.

22. Miller, M. B. And Bassler, B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, p.165-199.

23. Fuqua, C. and Winans, S. C. (1996) Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol*. 178, 435-440.

24. Piper, K. R., Beck von Bodma, S., Hwang, I., and Farrand, S. K. (1999) Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: Controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol*. 32, 1077-1089.

25. Greenberg, E. P. (1997) Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News* **63**, 371-377.

26. Sitnikov, D. M., Schineller, J. B. and Baldwin, T. O. (1996) Control of cell division in *Escherichia coli*: Regulation of transcription of *ftsQA* involves both *rpoS* and SdiA-mediated autoinduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 336-341.

27. Batchelor, S. E., Cooper, M., Chhabra, S. R., Glover, L. A., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. and Prosser, J. I. (1997) Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidising bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2281-2286.

28. Hammer, B. K. and Bassler, B. L. (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* 2003 50(1), 101-114.

29. Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J .P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E. P. (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science,* vol.280, APRIL 1998, p.295-298.

30. Chapon-Hervé, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A. and Bally, M. (1997) Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol*. 24, 1169-1178.

31. Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. and Iglewski, B. H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-cell communication. *Science* **260**, 1127-1130.

32. Booth, M. C., Atkuri, R. V., Nanda, S. K., Iandolo, J. J., and Gilmore, M. S., (1995) Accessory gene regulator Controls Staphylococcus aureus virulence in Endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, August 1995, Vol. 36, No. 9, p.1828-1836.

33. Pierson, L. S., Keppenne, V. D. and Wood, D. W. (1994) Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 34-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J. Bacteriol*. **176**, 3966-3974.

34. Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P. and Pierson, L. S. (1997) *N*-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by

Pseudomonas aereofaciens 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol*. **179**, 7663-7670.

35. Vuong, C., and Otto, M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4 (2002) 481–489.

36. Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K., and Eberl, L. (2003) Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa by proteomics. *Environmental Microbiology* (2003) 5(12), 1350-1369.

37. Otto, M., Sumuth, R., Jung, G., and Gotz. F. (1998) Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. FEBS Letters 424 (1998) 89-94.

38. Lyon, G. J., Wright, J. S., Muir, T. W., and Novick, R. P. (2002) Key Determinants of Receptor Activation in the agr Autoinducing Peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 2002, 41, 10095-10104.

39. Li, M., Guan, M., Jiang, X. F., Yuan, F. Y., Xu, M., Zhangand, W.Z., and Lu, Y. (2004) Genetic polymorphism of the accessory gene regulator (agr) locusin Staphylococcus epidermidis and its association with pathogenicity. *Journal of Medical Microbiology* 53,545–549.

40. Otto, M. (2001) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory generegulator agr system. *Peptides,* 22 1603-1608.

41. Freeman, J. A., and Bassler, B. L. (1999) A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi* . *MolecularMicrobiology* 31 (2), 665-677.

42. Mok, K. C., Wingreen, N. S., and Bassler, B. L. (2003) *Vibrio harvei* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The EMBO Journal*, vol. 22, No. 4 p. 870-881.

43. Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* , 2:582–587.

44. Reading, N. C., and Sperandio, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* xx (2005) 1-11.

45. Xavier, K. B. and Bassler, B. L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion. Microbiology* 6; 191–197. [QS-332]

46. Marchand, J. C. and Bentley, W. E. (2006) Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 2004, 15:495–502.

47. Ahmer, B. M. M. (2004) Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology* 52(4), 933-945.

48. Gray, K. M., Intercellular communication and group behavior in bacteria. *Trends in Microbiology,* vol.5, no.5, May-1997, p.184-188.

49. Otto, M., Echner, H., Voelter, W and GOTZ, F. (2001) Pheromone Cross-Inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infectıonand Immunıty,* Mar.2001,p.1957-1960 Vol.69, No.3.

50. Dınges, M. M., Orwın, P. M. and Schlıevert, P. M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus. Clınıcal Mıcrobıology Reviews,* Jan-2000, p.16-34 Vol.13,No.1.

51. Yarwood, J. M. and Schlievert, P. M. (2003) Quorum sensing in Staphylococcus infections. *The Journal of Clinical Investigation*, Dec- 2003, Vol. 112, Number 11.

52. Ji, G., Beavis, R., and Novick, R. P. (1997) Bacterial Interference Caused by Autoinducing PeptideVariants. *Science* (1997) vol.276 p. 2027-2030. [QS-320]

53. Vuong, C., Gotz, F., and Otto, M. (2000) Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis. Infectıonand Immunıty*, Mar.2000, p.1048-1053 Vol.68, No.3.

54. Ji, G., Beavıs, R. C. and Novıck,R. P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. Proc. Natl. Biochemistry, Dec-1995, Vol. 92, pp.12055-12059.

55. Tuncer, Y., (2005) Laktokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanısı ve bu özelliğin genetik doğasının belirlenmesi. Ankara Üniv., Fen Bil. Enst., Gıda Müh. A.B.D., Doktora tezi.

56. Akçelik, O, (2004) Characterization and identification of bacteriocins from two *Lactcoccus lactis* subsp. *lactis* strains. METU, Dep. of Biotech., Ph.D. Thesis.

57. He, L., and Chen, W. (2006) Synergetic activity of Nisin with cell-free supernatant of *Bacillus licheniformis* ZJU12 against food-borne bacteria. *Food Research International* 39 (2006) 905-909.

ÖZGEÇMİŞ

Murat Kemal AVCI, 26 Ekim 1981'de Bursa'da doğdu. İlkokulu Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu'nda, Orta öğretimini İnegöl Kaşıkçıoğlu İlköğretim Okulu'nda, Lise eğitimini 1995-98 yıllarında Bursa Erkek Lisesi (BEL)'nde tamamladı. 2004 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezup olup aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN ve Doç. Dr. Filiz GÜREL danışmanlığında yüksek lisans tez çalışmasını tamamladı. Yüksek lisans eğitimi süresince Milli Eğitim Müdürlüğü'ne bağlı çeşitli Dersanelerde ve Tuzla Tuğrul Bey Lisesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak görev aldı. Yabancı dili İngilizcedir.