

ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTEYE SAHİP TERMOFİLİK BAKTERİLERİN 16S *rRNA* ANALİZİ İLE TANILANMASI

Gamze BAŞBÜLBÜL¹, Z.Burcu BAKIR ATEŞLİER¹, Bülent BOZDOĞAN², Kubilay METİN¹, Erman ORYAŞIN¹, H.Halil BIYIK¹

1 Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü AYDIN

2 Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, AYDIN

ÖZET

Son yıllarda biyokimyasal yöntemler yanında moleküler yöntemler bakteri tanılanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bakterilerden 16S rRNA çoğaltılmasını sağlayan universal primer kullanılarak bu genin çoğaltılması ve sekanslanması filojenik çalışmalarda standard yöntem olarak yerini almıştır. Bu çalışmada Aydın ve Denizli illeri ve çevresindeki sıcak su kaynakları ve topraktan izole edilen ve antimikrobiyal aktivite gösteren termofilik bakterilerden 14 tanesinin 16S *rRNA* sekans analizi yapılarak tür tanısı amaçlanmıştır. Suşlar 65 C de gelişen, Gram pozitif çubuk morfolojide bakterilerdir ve tümü *Geobacillus stearothermophilus* DSMZ 22 suşuna karşı inhibitör etki göstermektedirler.

Yenicekent ve Gölemezli (Denizli) de bulunan sıcak su kaynakları ve topraktan izole edilen suşların genomik DNA'ları Ronimus ve ark. tarafından önerilen metot kullanılarak izole edilmiştir. Universal primerler kullanılarak çoğaltılan 16S rRNA geni aynı primerlerle CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) kullanılarak sekanslanmıştır. Sekanslar gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) ile Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homologiler belirlenmiştir.

Gen bankasında yapılan blast analizlerinde 7 izolattan bir tanesi (HBB-270) *Geobacillus thermoglucosidasius*, iki tanesi (HBB-244, HBB-245) *Geobacillus pallidus*, iki tanesi (HBB-215, HBB-218) *Geobacillus toebii*, bir tanesi (HBB-225) *Anoxybacillus flavithermus* ve bir tanesi de (HBB-246) *Anoxybacillus kestanboliensis* ile homolog olarak saptanmışlardır.

Denizlideki sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteriler Türkiye'de daha önceden bildirilmiş sıcak su florası raporlarıyla uyumlu bulunmuştur. Pahalı bir yöntem olmasına karşın 16S *rRNA* analizinin bakteri tanılanmasında klasik yöntemlerle kullanılabilecek bir yöntemdir.

GİRİŞ

Gıda bilimindeki pek çok araştırma, yeni koruma teknolojilerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır, fakat bunlardan pek azı endüstriyel anlamda kullanılabilir hale getirilmiştir. Yüzyıllardan beri pek çok gıda koruma yöntemi bulunmakla birlikte, günümüzde yeni olarak adlandırılabilen pek çok teknoloji ve uygulama geliştirilmiştir. Bunlar arasında ısı olmayan inaktivasyon metotları (yüksek hidrostatik basınç, pulsed elektrik alanları), yeni paketlenme sistemleri, doğal antimikrobiyal bileşikler ve biyo-koruma yöntemleri sayılabilir. Doğal antimikrobiyal bileşiklerin gıda endüstrisinde kullanımı ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmaktadır. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen bu antimikrobiyal ajanlar, üretici organizmada bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkmışlardır. Bunlar arasında laktoperoksidaz (süt), lizozim (yumurta beyazı), saponin ve flavonoidler (bitki ve baharat), bakteriyosinler (laktik asit bakterileri) ve kitosan sayılabilir (1).

Bakteriyosinler özellikle üretildikleri bakteriye yakın türleri doğrudan etkileyen, bakterisidal aktiviteye sahip protein veya protein kompleksleridir (2). Antibiyotiklerin etki mekanizmalarından biri de mikroorganizmaların gelişimini protein sentez mekanizmasını bozarak inhibe etmeleridir, ancak pek çok dirençli suşun oluşumuna da yol açmaktadırlar. Bakteriyosinlere karşı dirençli suş gelişimi oldukça nadirdir. Ayrıca bakteriyosinlerin toksisitesine dair pek az veri vardır, araştırmalar ve bakteriyosinlerin uzun süreli kullanımı bu bileşiklerin güvenle kullanılabilceğini göstermektedir (3). Kısaca belirtmeye çalışılan bu sebeplerden dolayı bakteriyosinler üzerinde son yıllarda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Bakteriyosin üretimi ile ilgili olarak en fazla çalışılmış mikroorganizma grubu laktobasiller (LAB) olmakla birlikte, pek çok bakteri özellikle de gıda kökenli olanlar bu özellik açısından araştırılmakta ve yeni potansiyeller aranmaktadır. Ayrıca bakteriyosinlerin özellikleri ve genetik temelleri incelenerek bunların organizma tarafından sentezlenmesi ve düzenlenmesinden sorumlu biyokimyasal yollar aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Son yıllarda biyokimyasal yöntemler yanında moleküler yöntemler bakteri tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Tüm bakterilerden 16S *rRNA* çoğaltılmasına sağlayan üniversal primer kullanılarak bu genin çoğaltılması ve sekanslanması filojenik çalışmalarda standard yöntem olarak yerini almıştır. Bu çalışmada Aydın ve Denizli illeri ve çevresindeki sıcak su kaynakları ve topraktan izole edilen 201 termofilik bakteri antimikrobiyal aktiviteleri açısından taranmış ve içlerinden seçilen 14 tanesinin 16S *rRNA* sekans analizi yapılarak tür tanısı amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Termofilik Bakterilerin İzolasyonu

Aydın ve Denizli’de bulunan sıcak su kaynaklarından ve topraktan örnekler alınmıştır. Örnekler alınırken suyun sıcaklığı ve pH’ı ölçülmüştür. Su örnekleri 200-500 ml’lik steril koyu renkli şişelere; toprak örnekleri steril poşetlere; birikintiler ise steril kaplara alınmıştır. Örnekler alındıktan yaklaşık 4 saat sonra laboratuara getirilmiştir.

Laboratuara getirilen örnekler zenginleştirme amacıyla sıvı Thermus ortamlarına inokule edilmiştir. Daha sonra Caso Agar içeren petrilere ekim yapılmıştır. İzolatların saf kültürleri elde edildikten sonra % 20’lik skim milk içeren tüplere aktararak -20°C’de saklanmıştır.

Antimikrobiyal madde taraması

İzolatların antimikrobiyal madde üretip üretmediklerini belirlemek amacıyla tarama testleri yapılmıştır. Bakteriyosin taraması yapılırken çeşitli metotlar denenmiş ve taramalar bu yöntemlerden en uygun olanı ile (4) yapılmıştır. İzolatların skim milkdeki kültürlerinden Caso agar plaklarına kürdanla çizgi ekim yapılmıştır. Petriler 65 °C de 24 saat inkübe edilmiş ve ertesi gün petriler 15 dakika boyunca 254 nm UV ışınına maruz bırakılmıştır. UV ile ışınlanmış petrilerin üzerine içerisinde indikatör bakteri bulunan 5 ml soft agar (%1 agar) dökülmüştür. Soft agarlara eklenen indikatör bakteri yoğunluğu 0.5 MacFarland bulanıklığına göre ayarlanmış ve bu süspansiyondan soft agara 100 µl eklenmiştir. 24 saat 65 °C de inkübasyondan sonra bazı kolonilerin etrafında zonlar gözlenmiştir. Zonların büyüklüğüne göre; +: zayıf; ++:orta; +++:güçlü antimikrobiyal etki olarak değerlendirilmiştir.

DNA İzolasyonu ve Moleküler Tanı

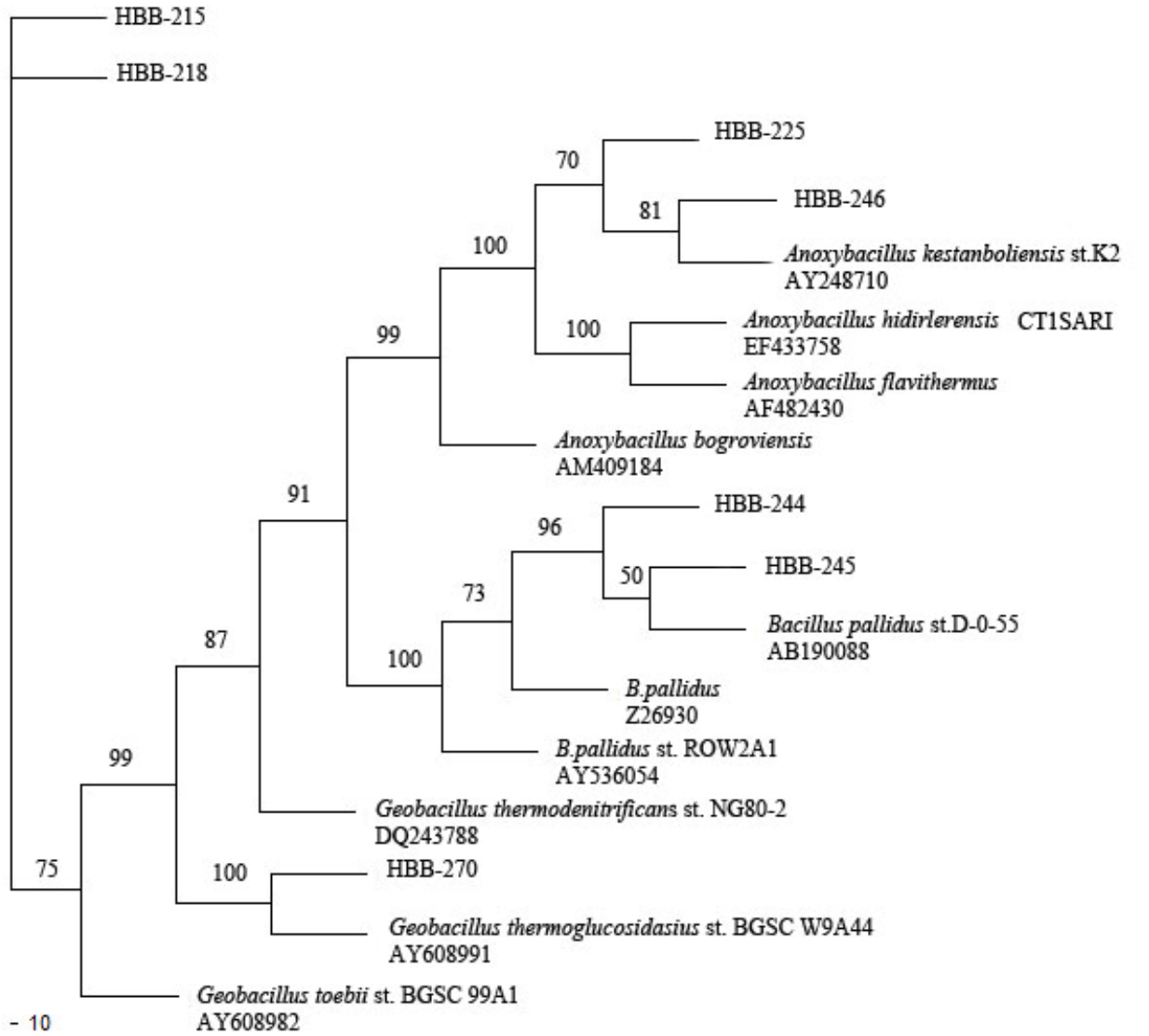
DNA’sı izole edilecek suşlardan CASO agar içeren petrilere ekim yapılmıştır. Ertesi gün gelişen tek kolonilerden triptik soy broth içeren tüplere inoküle edilmiş ve 65°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Sıvı ortamda gelişen kültürlerin genomik DNA’ları Ronimus ve ark. tarafından önerilen metot (5) kullanılarak izole edilmiştir. Ünlversal primerler kullanılarak çoğaltılan 16S rRNA geni aynı primerlerle CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) kullanılarak sekanslanmıştır. Sekanslar gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) ile Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homolojiler belirlenmiştir.

İzolatların kendi aralarındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek üzere PAUP* v. 4.0b10 programı kullanılarak neighbor-joining algoritma analizi yapılmıştır. Sekansların

hizalamasında Bioedit programı kullanılmıştır. Yalnızca %50 (%95 CI'ya eşdeğer) 'den yüksek bootstrap değerleri önemli bulunmuş ve NJ ağacında bu değerler belirtilmiştir

SONUÇLAR

√ İzolatların 16S rDNA geninin kısmi (433 bp) sekansı ile genbankasından elde edilen sekans verileri kullanılarak NJ ağacı oluşturulmuştur (Şekil 1). Ağaç oluşturulurken Kimura 2-parameter substitution modeli kullanılmıştır.



√ Gen bankasında yapılan blast analizlerinde 7 izolattan bir tanesi (HBB-270) *Geobacillus thermoglucosidasius*, iki tanesi (HBB-244, HBB-245) *Geobacillus pallidus*, iki tanesi (HBB-215, HBB-218) *Geobacillus toebii*, bir tanesi (HBB-225) *Anoxybacillus flavithermus* ve bir tanesi de (HBB-246) *Anoxybacillus kestanboliensis* ile homolog olarak saptanmışlardır.

√ Denizli'deki sıcak su kaynaklarından izole edilen bakteriler Türkiye'de daha önceden bildirilmiş sıcak su florası raporlarıyla uyumlu bulunmuştur. Pahalı bir yöntem olmasına karşın 16S *rRNA* analizi bakteri tanılanmasında klasik yöntemlerle birlikte kullanılabilir bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. **Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J., (2004).** New preservation technologies. *International Dairy Journal*. 14: 273-285
2. **Klaenhammer, T.R., (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70: 337-379
3. **Mishra C., Lambert J., (1996).** Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition*, 5: 20-24
4. **Martirani L., Varcamonti M., Naclerio G., Felice M.D. (2002).** Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell factories* 1:1
5. **Ronimus R.S., L.E. Parker, H.W.Morgan (1997).** The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 47: 75-79.
6. **Saitou, N and Nei, M., (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol Evol.*, 4, 406–425.
7. **Swofford, D.L., (2002).** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA.