

Gıda Kökenli *Bacillus cereus* Strainlerinin Bakteriyosin Üretme Kapasitelerinin Araştırılması¹

Şebnem Eliçevik², Füsün Uçar³, H. Tansel Yalçın⁴

Özet

Bu çalışmada gıdadan izole edilmiş 25 adet *Bacillus cereus* straininin serein olarak adlandırılan bakteriyosini üretme kapasiteleri araştırılmış ve bu strainler arasında çapraz antagonistik aktivitelerin taraması gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, serein'e durgunluk fazındaki hücrelerin kültür filtratlarında saptanmış ve sadece 5 strain önemli düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Serein preparasyonlarının sıcaklığa kısmen dirençli oldukları ve bir proteaz olan kimotripsin ile hidrolize uğradıkları bulunmuştur. Ancak, serein preparasyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin organik çözügenlere karşı dirençli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bu preparasyonların 4 °C'de 1 ay depolamanın ardından biyolojik aktivitelerini korudukları ve -20 °C'de 3 ay sonunda ise biyolojik aktivitelerini kaybettikleri görülmüştür. Serein'in dar bir inhibisyon sektrumuna sahip ve molekül ağırlığının Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) sonucu yaklaşık 9 kDa olduğu saptanmıştır.

Giriş

Bakteriler gıdalarda patojen veya bozulma etkeni mikroorganizmaların büyümesini önleyebilen veya onları öldüren birçok inhibe edici bileşik üretmektedir. Bunlar arasında bakteriyosin adı verilen antogonistik bileşikler de yer almaktadır. Ancak bakteriyosinlerin doğada gerçek rolleri belirsizdir. Muhtemelen, üretici olmayan mikroorganizmalar üzerinde rekabet açısından bir üstünlük sağlamaktadırlar (1,2). Bazı mikroorganizmalar ürettikleri bu inhibitör etkili maddeler ve değiştirdikleri çevre faktörleriyle aynı ortamdaki diğer mikroorganizmaların ölümüne neden olabilmekte veya gelişimlerini engelleyebilmektedir.

¹ Bu çalışma Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Prof. Dr. Füsün Uçar danışmanlığında hazırlanıp, Mart 2003 tarihinde tamamlanan "Gıda Kökenli *Bacillus cereus* Strainlerinin Bakteriyosin Üretme Kapasitelerinin Araştırılması"adlı yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

² Uzm., ³Prof. Dr., ⁴Dr. Ege Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AbD Bornova/İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: fusun.b.ucar@ege.edu.tr

Sonuç olarak bu mikroorganizma ortama hakim olmaktadır (3). Ancak bir mikroorganizma kendi ürettiği bakteriyosinden etkilenmemektedir.

Bakteriyosinlerin çoğu hücre içindeki plazmitler tarafından kodlanmaktadır ve genel olarak ısıya dayanıklıdır. Bakteriyosinlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır (4).

Bacillus thuringiensis, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* ve *B. cereus* strainlerinin bakteriyosin ürettikleri rapor edilmiştir. Bunlar arasında; en yaygın biçimde çalışılmış olanı *B. subtilis* ATCC 6633 tarafından üretilen bir lantibiyotik olan subtilin'dir (5).

B. cereus gıdalarda intoksikasyon oluşturan *Bacillaceae* familyasının *Bacillus* genusuna ait aerobik spor oluşturan bir bakteri olup toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Toprak kökenli olması nedeniyle tarla ve bahçe ürünlerine rahatlıkla bulaşabildiği gibi sporları nedeniyle et ve süt ürünlerinde de bulunabilmektedir. Özellikle uzun ömürlü içme sütlerinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (6). *B. cereus*'un çok sayıda ($>10^6$ cfu/g) alınması ile bireylerde gıda zehirlenmesi gözlenebilmektedir. *B. cereus* gıda zehirlenmesinde aracı gıdalar olarak; pişmiş pirinç, makarna, et, kümes hayvanları, sebze yemekleri, çeşitli çorbalar, pudingler, baharat ve soslar sayılabilir (7).

Kimyasal koruyucuların kullanılmasına bir alternatif olarak; mikroorganizmalar arası ortak yaşam tarzlarından birisi olan ve antagonizma olarak bilinen bu mikrobiyal etkileşimden gıdaların muhafazasında yararlanılması konusunda son yıllarda yoğun çalışmalar mevcuttur (3,4).

Gıda güvenliği, önemi gittikçe artış gösteren uluslararası bir konu halini aldığından, toksik veya diğer zararlı etkilere yol açmaksızın sadece gıda patojenlerini hedefleyen ve özellikle laktik asit bakterilerine ait antimikrobiyal peptidlerin uygulanması büyük ilgi uyandırmıştır. Son yıllarda gıdalla taşınan hastalık vakalarında görülen artışlar; gıda endüstrisinin ve halkın, mevcut gıda muhafaza yöntemlerinin etkinliğinden şüphe duymasına yol açmıştır. Ayrıca tüketicilerin kimyasal koruyucularla gıdaların muhafazasına yönelik endişelerinin artması; gıda sektöründe gerek tüketicilerin gerekse yetkili kişilerin " %100 doğal" ve "az işlem görmüş" gıdalara karşı ilgilerini arttırmıştır. Sonuç olarak, doğal antimikrobiyal ajanlara (inhibitörlere) yönelik bir talep söz konusudur (8,9).

Bakteriyosin üretici bakteriler veya saflaştırılmış bakteriyosinler; saklama süresini uzatmak ve gıda güvenliğini arttırmak amacıyla biyo koruyucular olarak kullanım potansiyeline sahiptirler (10). Bakteriyosinlerin doğal gıda koruyucuları olarak kullanımını sınırlayan faktörler; genelde bozulma etkeni gram negatif bakteriler ile maya ve küflere karşı etkisiz olmaları veya çok az etkili olmaları ve söz konusu bakteriyosine duyarlı olmayan suşların ortamda hızla gelişerek baskın hale geçmesi şeklinde sıralanabilir. Sonuncu faktör, özellikle uzun süre depolanan gıdalar için önemli bir sorun olarak değerlendirilmektedir (3).

Naclerio ve çalışma arkadaşları (1993) tarafından gıdadan izole edilmiş olan bir *B. cereus* strainine ait sıvı kültürlerin steril filtratında bakterisidal aktivite sergileyen bir protein saptanmıştır. Serein olarak adlandırılmış olan bu bakteriyosinin gerek gıda izolatlarına gerekse laboratuvar koleksiyonundaki diğer *B. cereus* strainlerine karşı

etkili ancak test edilen diğer bakterilere karşı etkisiz olduğu gözlenmiştir. Sereinin *B. cereus* strainlerine karşı gösterdiği bu spesifite ve çeşitli fiziksel ve kimyasal uygulamalara sergilediği dirençlilik, bu bakteriyosinin gıdalarda diğer bakterilerin büyümesine engel olmaksızın sadece *B. cereus*'un kontrolünde potansiyel bir antimikrobiyal ajan olarak değerini arttırmaktadır (11).

Yukarıda değinilmiş olan bilgiler ışığında bu çalışmada, çeşitli gıdalardan izole edilen *B. cereus* strainleri arasında bakterisidal aktiviteden sorumlu olan protein yapısındaki bakteriyosini üretme kapasitesini saptamak, farklı bakteri türlerinin bu bakteriyosine karşı duyarlılık profillerini ortaya koymak ve bu bakteriyosinin moleküler büyüklüğünün belirlenmesi için poliakrilamid jel elektroforez tekniğinden yararlanmak amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Mikroorganizma

Bakteriyosin üretim özelliğinin taranmasında kullanılan *B. cereus* ATCC 7064, *B. cereus* ATCC 13061 ve *B. cereus* CCM 99 tip türlerine ilaveten, 25 adet gıda kökenli *B. cereus* izolatu Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında sonuçlandırılmış olan bir yüksek lisans araştırmasından elde edilmiş ve bu kültürlerin *B. cereus* olduklarından emin olmak amacıyla; kültürel tanı, mikroskopik inceleme ve biyokimyasal testler yapılarak doğrulanmıştır (12,13). Ayrıca toplam 28 adet *B. cereus* straininin disk difüzyon testi kullanılarak çapraz-antagonistik aktiviteleri incelendikten sonra; diğer gram pozitif ve gram negatif bakterilere ilişkin antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi amacıyla *B. subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *P. fluorescens* dahil olmak üzere toplam 9 adet test bakterisi kullanılmıştır.

Büyüme eğrisinin çıkarılması

Bu amaçla, nişasta, krema, çorba, puding ve un olmak üzere toplam 5 farklı kuru gıda grubundan izole edilmiş strainler arasından her gruptan bir strain temsilci olarak seçilmiştir. Buna göre, çorbadan 120, nişastadan 108, kremadan 46, pudingden 52 ve undan 56 no'lu *B. cereus* strainlerinin büyüme eğrileri çıkarılmıştır (12).

Sıvı ortamda bakteriyosin üretimi ve serein preparasyonu

Bir bakterinin büyüme eğrisinin çıkarılması; bu bakterinin bakteriyosin üretme kapasitesini belirlemek için gereklidir. Çünkü, bakteriyosinlerin biyosentezi üretici bakteriyal strainin büyüme fazına bağlıdır. Sonuç olarak, *B. cereus*'un belli strainleri tarafından üretilen bir bakteriyosin olan serein'in biyosentezi de erken durgunluk fazında gözlenmektedir. Her bir *B. cereus* kültürü aktive edildikten sonra 50 ml BHI broth ortamına ekim yapılmış ve bu ortamlar 30 °C'lik etüvde, manyetik çalkalayıcıda

(200 devir/dk) durgunluk fazının başlangıcından sonraki 2 saat dahil olmak üzere toplam 11 saat inkübe edilmiştir (11).

Serein üretme kapasitesi yönünden test edilen 25 izolat ve 3 tip strain toplam 28 adet *B. cereus* suşuna ait her fermentasyon ortamı 11 saat sonra, aseptik koşullar altında 1,5ml'lik eppendorf tüplerine paylaştırılmıştır. Her bir izolata ait örnek; fermentasyon ortamından vejetatif hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 12000g'de +4 °C'de 10dk. boyunca santrifüj edilmiş ve takiben 0,45µm por çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Elde edilen hücresiz sıvı kültür-steril filtratlar; bakteriyosin içerip içermediği yönünden hemen test edilmek üzere +4 °C'de saklanmıştır (11,14).

Serein aktivitesinin saptanması

Bu amaçla; aseptik koşullar altında petrilere 10ml % 1.5 Tripton-Yeast Ekstrakt (TY) Agar dökülmüştür. İlk tabaka olan % 1.5 agarlı ortam tamamen katılaştıktan sonra, üzerine daha önceden sayımı yapılmış ve ml'sinde yaklaşık olarak 10 canlı test organizması içerdiği bilinen %0.7 agarlı TY Agar ortamı 6ml oranında dökülmüştür. Bu ikinci tabaka için; 30 °C'de büyütülmüş olan test suşuna ait 24 saatlik Nutrient broth kültürünün 0.1ml'si 45 °C'ye soğutulmuş olan test ortamı ile karıştırılmıştır. İkinci tabakanın da oda sıcaklığında donmasından sonra, petrilerin ortasına steril kağıt diskler yerleştirilmiş ve bu disklerle analize edilene kadar buz dolu bir kabın içinde bekletilmiş olan, olası üretici straine ait hücresiz filtrat örnekleri 20µl oranında emdirilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış olan serein preparasyonu 30 °C'de yaklaşık 16 saatlik inkübasyon periyodunun ardından kağıt disklerin etrafında inhibisyon zonu varlığı yönünden incelenmiştir. Disklerin çevresinde şeffaf zonların oluşumunun gözlenmesi inhibisyon (+) olarak kaydedilmiştir (11,15).

Enzim, organik çözügenler ve sıcaklığın serein aktivitesine etkisi

Bir proteolitik enzimin (Kimotripsin), çeşitli organik çözügenlerin (aseton, bütanol, etanol ve metanol) ve sıcaklığın (60, 75 ve 121 °C) bakteriyosin üzerine etkisini saptamak amacıyla; bakteriyosin üretme kapasitesi taşıyan *B. cereus* strainlerinin serein preparasyonlarının 150µl'sine, enzim 100 µg/ml ve organik çözügenler, %10 oranında katılmıştır. Enzim muameleli örnekler 37 °C'de 1 saat ve organik çözügenlerle muamele edilmiş örnekler ise 25 °C'de 1 saat tutulmuştur. Bu periyodu takiben her bir örnek, steril kağıt disklerle 20µl oranında emdirilerek duyarlı oldukları bilinen indikatör *B. cereus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite yönünden test edilmiştir. Serein'in sıcaklık stabilitesini belirlemek için; her bir preparasyon 60 °C, 75 °C ve 121 °C'de 15 dakika bekletildikten sonra, *B. cereus* içeren ortamlarda antimikrobiyal aktivite yönünden analiz edilmiştir (11).

Saklama koşulları ile ortam ve inkübasyon koşullarının etkisi

Her bir *B. cereus* kültürüne ait serein preparasyonunun kararlılığı üzerine saklama koşullarının etkisini incelemek amacıyla iki farklı prosedür uygulanmıştır. İlk olarak bu preparasyonlar +4 °C'de 3 ay süresince depolanmış ve her ay sonunda duyarlı oldukları saptanmış *B. cereus* test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite yönünden tekrar test edilmiştir. Eş zamanlı olarak, aynı preparasyonlar -20 °C'de de 3 ay

boyunca tutularak her ay bitiminde duyarlı indikatör *B. cereus* bakterilerine karşı yeniden denemeye alınmıştır (16).

Serein biyosentezi üzerine çeşitli büyüme koşullarının etkisini incelemek amacıyla; her bir *B. cereus* kültürü sırasıyla Trypton-Yeast Ekstrakt Broth ve Brain Heart Infusion Broth olmak üzere iki farklı üretim ortamına aşılınmış ve her bir kültürün aşılandığı bu ortamlar 25, 30 ve 37 °C şeklinde üç farklı inkübasyon sıcaklığında durgunluk fazının başlangıç periyodu tamamlanıncaya kadar geliştirilmiştir. Her bir ortam-sıcaklık kombinasyonu ardından hazırlanan serein preparasyonu antimikrobiyal aktivite yönünden test edilmiştir (11).

Denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Sodyum dodesil sülfat – poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) polipeptitlerin ilerleme hızları sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır. Ayrıca, moleküle negatif bir yük de kazandırmaktadır (17,18).

Elektroforetik profillerin incelenmesi için ayırma jeli, analiz edilmek üzere gümüş boyama işlemine tabi tutulmuştur.

Boyama sonrasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir edinilebilmektedir. Ayrıca, bu tip bir ayrışmanın sonuçlarını matematiksel olarak da değerlendirmek de olasıdır. Bu amaçla jeldeki göç hızının bir fonksiyonu olan rölatif göç hızı (R_f değeri) hesaplanmıştır. Polipeptidin molekül ağırlığının logaritması ile R_f değeri arasında doğrusal bir ilişki vardır (17).

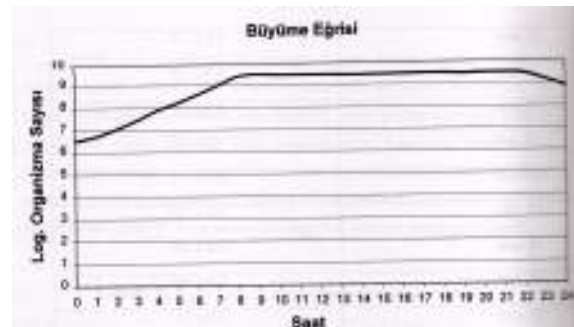
Bulgular

Mikroorganizmaların Kontrolü

Gıda kökenli *B. cereus* izolatlarının Gram reaksiyonunun (+), hücre morfolojisinin çubuk, hücrelerin teker teker veya oldukça uzun zincirler halinde ortaya çıkabildikleri ve sporların vejetatif hücre içindeki pozisyonunun sentral veya subterminal yapıda olabildiği gözlenmiştir.

Büyüme Eğrisi

Farklı gıda gruplarına ait temsilci 5 adet *B. cereus* suşunun büyüme eğrileri çıkarılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

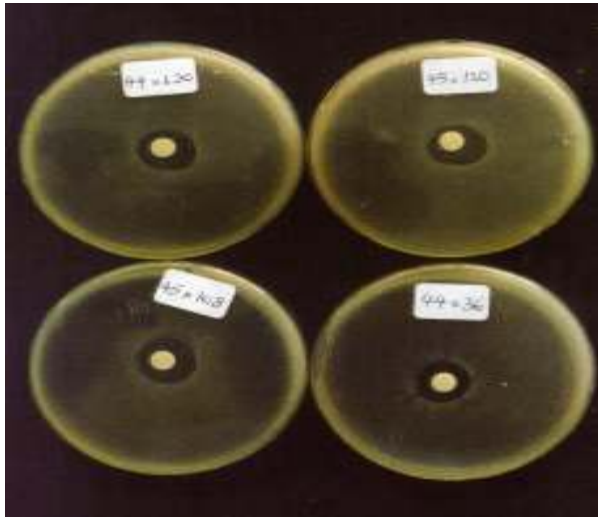


Şekil 1. 120 no'lu *B. cereus* straininin büyüme eğrisi

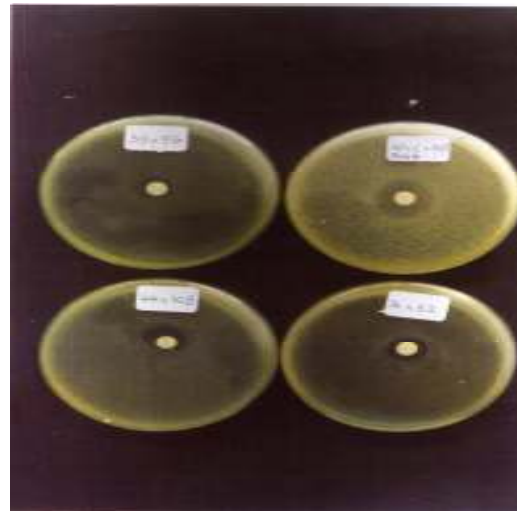
Bakteriyosin Üretme Kapasitesinin Araştırılması

Antimikrobiyal aktivite sergileyen gıda kökenli *B. cereus* suşlarını saptamak amacıyla, çeşitli kuru gıdalardan izole edilmiş olan 25 adet suş ve 3 adet tip türün, disk difüzyon testi kullanılarak çapraz-antagonistik aktiviteleri incelenmiş ve 11 tanesinin serein üretme kapasitesi taşıdığı ancak bunların arasından sadece 36, 52, 105, 108 ve 120 no'lu suşların daha yüksek düzeyde antagonistik aktivite sergiledikleri saptanmıştır. Bu denemede her bir *B. cereus* suşu öncelikle diğer *B. cereus* suşlarının serein preparasyonlarına duyarlılığını saptamak amacıyla test bakterisi olarak ve ardından, serein üretme kapasitesini belirlemek amacıyla serein preparasyonu hazırlanarak kullanılmıştır.

B. cereus'un büyümesi boyunca serein üretimini araştırmak amacıyla; bakteriyosin üretim ortamından logaritmik ve durgunluk fazı boyunca farklı zamanlarda alınan örneklerden hazırlanmış olan serein preparasyonları indikatör mikroorganizma olarak tüm *B. cereus* strainlerine karşı test edilmiştir. Bu deneme sonucunda, logaritmik faz boyunca serein aktivitesi saptanmamıştır. Ancak, durgunluk fazının başlangıcında alınan örneklerde serein aktivitesi gözlenmiştir.



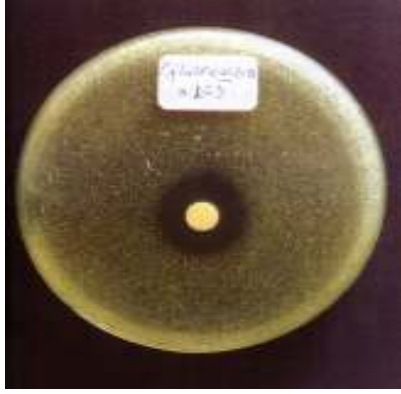
Şekil 2. 44 ve 45 no'lu *B. cereus* suşlarına karşı 120, 108 ve 36 no'lu serein preparasyonlarının etkisi



Şekil 3. 33, ATCC 7064, 44 ve 36 no'lu *B. cereus* suşlarına karşı 56, 105, 108 ve 52 no'lu serein preparasyonlarının etkisi

Serein'in Antimikrobiyal Etki Aralığı

En yüksek antimikrobiyal aktivite sergileyen 36, 52, 105, 108 ve 120 no'lu *B. cereus* suşlarına ait hücresiz filtratların *B. cereus* dışındaki diğer bazı gram pozitif ve negatif bakterilere karşı da etkili olup olmadıklarını saptamak amacıyla; test bakterisi olarak bu bakterileri tek tek içeren TY Agar ortamlarına her bir filtrat örneğinden 20 µl emdirilmiş kağıt disk yerleştirilmiş ve bu disk çevresinde test bakterisinin inhibe olup olmadığı analiz edilmiştir. Bu çalışmada serein'e duyarlılıklarını saptamak amacıyla test edilmiş olan 5 adet Gram (+) ve 4 adet Gram (-) bakteriyal strain çizelge 1'de gösterilmiştir.



Çizelgede ifade edilmiş olan büyüme inhibisyonlarından *P. fluorescens*'in duyarlılığı şekil 4'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 105 no'lu *B. cereus* straini hariç diğer 4 straine ait serein preparasyonları test edilen bakterilere karşı etkisizdir.

Şekil 4. *P. fluorescens*'in 105 no'lu *B. cereus* straininin serein preparasyonuna duyarlılığı

Çizelge 1. 105 no'lu serein preparasyonlarının antimikrobiyal etki spektrumu

Mikroorganizma	Büyümenin İnhibisyonu	Zon Çapı (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	YOK	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	YOK	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	YOK	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	YOK	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	ZAYIF	<10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	YOK	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	YOK	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	VAR	17,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	YOK	-

Enzim, organik çözümler ve sıcaklığın serein aktivitesine etkisi

Çizelge 2. Enzim, organik çözümler ve sıcaklığın serein aktivitesine etkisi

Muamele	Aktivite ^a
Kontrol	10-13
Enzim ^b	
Kimotripsin	0
Organik çözümler ^c	
Aseton	10-13
Butanol	10-13
Etanol	10-13
Metanol	10-13
Sıcaklık Uygulaması (15 dk.)	
60 °C	10-13
75 °C	10
121 °C	0

Enzim ve organik çözümlerle muamele edilmiş örneklerin emdirildiği steril kağıt disklerin etrafında daha önceden bu örneklerle duyarlı oldukları saptanmış *B. cereus* strainlerine karşı yeniden analiz edilmiştir. Her bir örnekten elde edilen sonuçlar aynı olup çizelge 2'de gösterilmiştir.

Saklama koşulları, ortam ve inkübasyon koşullarının etkisi

Serein preparasyonunun stabilitesi üzerine saklama koşullarının etkisi incelendiğinde, her bir fraksiyondan elde edilen sonuca göre; serein preparasyonu +4 °C'de 1 ay boyunca kararlılığını korumuştur. Ancak, -20 °C'de 3 ay depolamanın ardından aktivite gözlenmemiştir. Çeşitli büyüme koşullarının serein üretimine etkisi çizelge 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. Çeşitli büyüme koşulları altında serein üretimi

Ortam	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Serein Üretimi
Tripton-Yeast Ekstrakt Broth	30	Yok
Brain Heart Infusion Broth	25	Yok
Brain Heart Infusion Broth	30	Var
Brain Heart Infusion Broth	37	Zayıf

Protein miktarı

En yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 36, 52, 105, 108 ve 120 no'lu *B. cereus* suşlarına ait protein karakterinde serein akteriyosinini içerdiği düşünülen hücresiz filtrat örneklerinin 595 nm'dek OD değerleri sırasıyla 0.470, 0.510, 0.460, 0.520 ve 0.534'tür. Bu değerlere karşılık gelen protein miktarları ise; sırasıyla 0.025, 0.027, 0.024, 0.028 ve 0.030 mg/ml şeklindedir.

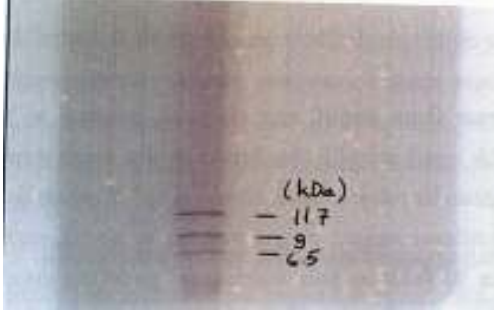
Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

36, 52, 105, 108 ve 120 no'lu *B. cereus* strainlerine ait hücresiz filtrat örneklerinde proteinik serein bakteriyosininin varlığını molekül ağırlığına dayanarak ortaya koymak amacıyla, her bir örnek 6.5k Da'luk Aprotinin ve 11.7 kDa'luk sitokrom c protein markerları kullanılarak denatüre jelde elektroforetik ayırma tabi tutulmuştur. Takiben, her bir örneğe ait jelle protein bandlarını görünürleştirmek için gümüş boyama uygulanmıştır. Bu uygulama sonunda; yukarıdan aşağıya doğru gözlenen bandların Rf değerlerinin sırasıyla 0.33, 0.42, 0.58, 0.67, 0.75 ve bu değerlere karşılık gelen molekül ağırlıklarının 35, 22, 11.7, 9 ve 6.5 kDa olduğu hesaplanmıştır (Grafik 1). 120 no'lu örneğin analiz edildiği ayırma jelinde molekül ağırlıkları düşük olan protein markerlarına ait bandlar arasında ve yaklaşık 9 kDa'luk serein bakteriyosinine ait olduğu düşünülen band gözlenmiştir. Şekil 5'de 120 no'lu *B. cereus* suşuna ait ve Şekil 6'da ise 105 no'lu *B. cereus* suşuna ait prearasyonun protein markerlarıyla gerçekleştirilmiş olan elektroforez denemesinin sonuçları gösterilmiştir.

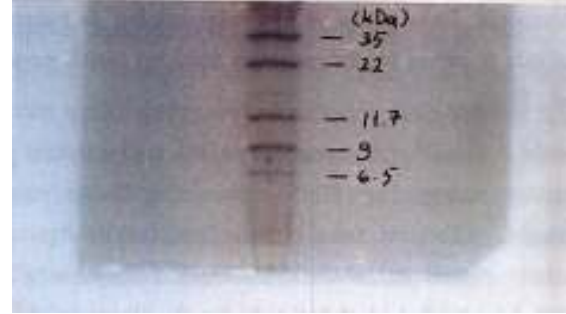
Tartışma ve Sonuç

B. cereus yaygın bir toprak saprofiti olup fırsatçı patojen olarak artan bir öneme sahiptir. Gıdayla taşınan bir patojen olarak dikkate alınan *B. cereus* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu gıda zehirlenmesine neden olabilmektedir. Zehirlenme tehlikesini elimine etmek amacıyla kontamineli gıdaya genellikle sıcaklık uygulaması etkili bir çözüm yöntemi değildir. Çünkü, işlem sonrası canlılığını koruyan

sporlar; somatik hücreler ve toksinler oluşturmak üzere çimlenebilmektedir. Özellikle bazı gıda ürünleri *B. cereus* kontaminasyonu açısından daha büyük risk taşımaktadır. Bunlar arasında, işlenmemiş tahıllar, nişastalı besin maddeleri, et ve süt ürünleri, kuru gıdalar ile baharatlar yer almaktadır (19, 20).



Şekil 5. 120 no'lu *B. cereus* suşuna ait hücresiz filtrat örneğinin SDS-PAGE analizi



Şekil 6. 105 no'lu *B. cereus* suşuna ait hücresiz filtrat örneğinin SDS-PAGE analizi

Gıdalarda *B. cereus*'un saptanmasına yönelik konvansiyonel prosedürler kültürel sayım ve EMS yöntemleridir. Bu çalışmada tüm *B. cereus* kültürleri kültürel, mikroskopik ve biyokimyasal karakteristikleri yönünden yeniden kontrol edilerek doğrulandıktan sonra denemelere başlanmıştır. Son yıllarda gıdalla taşınan bakteriyal patojenlerin identifikasyonu veya hızlı saptanmasına ilişkin birçok metot geliştirilmiştir. *B. cereus* için rapor edilmiş olan böyle yöntemler arasında; lesitin hidrolizasyonundan sorumlu olan yapısal genin saptanmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve *B. cereus*'un hücre yüzeyi antijenine karşı antikorların kullanıldığı enzim-Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) tekniği yer almaktadır (19).

Bakteriler tarafından üretilen ribozomal olarak sentezlenen peptit antibiyotikler genellikle bakteriosin olarak isimlendirilmektedir. (21-22). Bakteriosinlerin çoğu, küçük, katyonik ve membran-aktif bileşikler olup hedef hücreler üzerinde porlar oluşturmak suretiyle membran potansiyelini yok ederek hücrenin ölümüne yol açmaktadırlar. Antibakteriyal aktivite taşıyan küçük, katyonik peptidlerin biyosentezi; her bakterinin ve hatta aynı bakterinin bütün suşlarının sahip olamadığı ekolojik bir savunma stratejisi olup aynı ekolojik nişi paylaşan türler arasında rekabete dayalı bir üstünlük sağlamaktadır. Ancak, bir bakteriyosinin inhibitör etkisi farklı genuslar, farklı türler ve hatta farklı çevresel koşullar altındaki aynı türler arasında büyük oranda değişkenlik gösterebilmektedir (23).

Günümüze değin saptanmış olan bakteriyosinler; çeşitli araştırmacılar tarafından farklı kriterler temel alınarak sınıflandırılmıştır. Ancak, genel sınıflandırma kriterleri arasında bakteriyosinlerin fiziksel ve kimyasal karakteristikleri ile etki mekanizmaları bulunmaktadır. Bu sınıflandırma sistemlerinden en yaygın olarak kabul görmüş olanı Klaenhammer (1993) tarafından geliştirilmiştir. Bu sistemde bakteriyosinler; molekül ağırlıkları, termostabilite, enzimatik duyarlılık, posttranslasyonel olarak modifikasyona uğrayan amino asitler ve etki tarzları gibi özellikleri yönünden 4 sınıfa ayrılmaktadır (24). *B. cereus* bakterisinin sadece belli suşları tarafından sentezlenen ve serein olarak adlandırılmakta olan bakteriyosin ise düşük molekül ağırlığı, sıcaklık muamelelerine dirençli oluşu, proteaz (tripsin, kimotripsin, proteaz K) enzimlerine

duyarlılık sergilemesi, modifiye amino asit içermemesi ve hedef hücrenin sitoplazmik membranında etki göstermesi şeklinde karakteristikler taşımasından dolayı Sınıf II bakteriyosinlerin bir üyesi olarak kabul edilmektedir (25-26).

Son birkaç yıl içinde metabolik son ürünleri, antibiyotik benzeri bileşikler ve bakteriyosinleri kapsayan çeşitli antogonistik faktörler gıda katkıları olarak kullanım potansiyellerinden dolayı büyük ilgi çekmektedir. Ancak bir bakteriyosinin gıda koruyucusu olarak kullanılabilmesi için; kimyasal açıdan tanımlanmış ve karakterize edilmiş olması, etki tarzının ve üretim sürecinin açıklanması, kantitatif analizi ve standardizasyonuna ilişkin testler yapılması, toksikolojik verilerinin ve vücuda alındıktan sonraki akıbetinin bilinmesi gerekmektedir. Hedef spesifiteleri ve dayanıklılıkları bakımından, sınıf I ve sınıf II bakteriyosinler gıda uygulamalarında kullanılmaya daha uygundurlar (26). Bakteriyosinlerin gıda sistemlerindeki etkililikleri ise birçok faktöre bağlıdır. Bu etkililik; gıdanın endogonik mikroflorasından kaynaklanan proteolitik enzimler nedeniyle düşebileceği gibi bakterilerin bakteriyosinlere uzun süre maruz kalması bu bileşiklere karşı direnç oluşmasını teşvik edebilmektedir (23). Ayrıca gıdada kararsızlık göstermeleri, düşük üretim potansiyeli ve gıdanın her tarafında homojen dağılımlarının sağlanmasındaki güçlük gibi sorunlar da bakteriyosinlerin "biyolojik gıda koruyucuları" olarak kullanımlarını sınırlayan nedenler arasındadır (2,27).

Serein olarak adlandırılan bakteriyosini üretme kapasitesinin saptanması için 28 adet *B. cereus* straininin kullanıldığı bu çalışmada da ; *B. cereus* hücre büyümesinin farklı zamanlarında alınan örneklerden hazırlanan hücresiz filtrat örnekleri antimikrobiyal aktivite yönünden test edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da; logaritmik faz boyunca serein aktivitesi gözlenmemiştir. Ancak, bu fazın tamamlanmasının ardından durgunluk fazının başlangıç peryodunda saptanan serein üretimi bu fazın sonuna doğru yeniden durmaktadır. Elde edilen bu "hücre büyüme fazına bağlı biyosentez" bulgusu, Mayr-Harting ve arkadaşları tarafından ileri sürülen klasik bakteriyosin tanımına da uygunluk göstermektedir (28).

28 adet *B. cereus* straininin serein üretme kapasitesini belirlemek amacıyla analiz edildikleri bu çalışmada; test bakterisi olarak sırasıyla her bir *B. cereus* hücresi diğer *B. cereus* strainlerine ait sıvı kültürden santrifüj ve filtrasyon basamakları sonucu hazırlanan serein preparasyonlarına karşı test edildikleri zaman; 11 farklı *B. cereus* satrainine ait hücresiz filtrat örneğinin diğer 16 farklı *B. cereus* suşunun büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir (11).

Jack ve arkadaşları (1995) tarafından gram pozitif bakterilerin bakteriyosinlerine yönelik yayımlanmış diğre bir çalışmada " bir bakteri türüne ait bazı strainler bu türün diğer strainleri tarafından üretilen bakteriyosine karşı dirençli olabildiği halde, birkaçı duarlılık gösterebilir " şeklinde bir gözlem rapor edilmiştir (29). Çalışmamızda serein üretme kapasitesi yönünden test edilen, 3 tanesi tip tür ve 25 tanesi gıda kökenli olmak üzere toplam 28 adet *B. cereus* suşu arasından sadece 11 tanesinin antibakteriyal aktivite göstermesi ve her bir üretici suşa duyarlılık sergileyen diğer *B. cereus* suşlarının değişkenlik göstermesi; serein biyosentezinin ve etki spekturumunun ne kadar büyük bir spesifite taşıdığını ortaya koymakta ve literatür bulgusunu desteklemektedir. Gelecekte serein yapısal geninin ve ilgili diğer düzenleyici gen ürünlerinin saptanması ve izolasyonlarının; bu prosesin anlaşılmasını kolaylaştıracığı açıktır.

Oscariz ve arkadaşları tarafından yapılmış diğer bir çalışmada toprak kökenli bir *B. cereus* izolatının bakteriyosin üretme kapasitesi taşıdığı belirlenmiş ve serein 7 olarak adlandırılan bu bakteriyosinin test edilen diğer *B. cereus* strainleri dışında etki spektrumunu saptamak amacıyla yapılan deneme sonunda; serein 7'nin test edilen neredeyse tüm gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ettiği ancak gram negatif bakterilere karşı etkisiz olduğu gözlenmiştir (5).

Naclerio ve arkadaşları (1993) tarafından yapılan diğer bir çalışmada gıda kökenli bir *B. cereus* suşunun ürettiği ve serein olarak adlandırılan bakteriyosinin diğer *B. cereus* suşlarının ürettiği ve serein olarak adlandırılan bakteriyosinin diğer *B. cereus* strainleri dışında antimikrobiyal etki spektrumunu belirlemek amacıyla *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sp.*, *Streptococcus cremoris*, *S. diacetolactis*, *S. lactis* ve *Staphylococcus aureus* türleri test edilmiştir. Ancak bu bakterilerin tamamı serein bakteriyosinine dirençlilik göstermişlerdir (11).

Aynı amaca yönelik benzer bir deneme gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda ise; antibakteriyal aktiviteye sahip *B. cereus* suşlarının etki spektrumlarını belirlemek amacıyla 5 adet Gram pozitif (*B. subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *S. epidermidis* ATCC 12228) ve 4 adet Gram negatif (*E. coli* ATCC 12229, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318) bakteriyal suşları kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; test edilen bakteri türleri arasından sadece *S. aureus* ATCC 6538-P zayıf ve *P. fluorescens* 105 no'lu serein preparasyonuna yüksek duyarlılık göstermiştir.

Çalışmamızda serein üretme kapasitesi taşıdıkları ve antimikrobiyal etki spektrumları saptanmış olan *B. cereus* suşlarına ait serein preparasyonları, normal şartlar altında duyarlı olduğu bilinen bir suşa karşı, proteolitik bir enzim olan kimotripsin ile muamele edildikten sonra test edildikleri zaman duyarlılık gözlenmemesi; serein'in protein tabiatında bir bakteriyosin olduğu şeklindeki literatür bulgusuna uygunluk taşımaktadır.

Ayrıca bu preparasyonların çeşitli organik çözümler ile 60 ve 75 °C'lik sıcaklık denemeleri ardından bile, normal duyarlılık gösterdikleri bilinen suşlara karşı test edildikleri zaman, inhibisyon zonlarının yine gözlenebilmesi; serein'in bu çözümlere, 60 ve 75 °C sıcaklık değerlerine maruz kaldıktan sonra bile kararlılıklarını koruduklarına ilişkin literatür bulgularına uygunluk taşımaktadır. Buna karşılık, otoklavlandıktan sonra, normalde antibakteriyal aktivite sergiledikleri suşlara karşı test edilen serein preparasyonlarında aktivite gözlenmemiştir.

Çalışmamızda optimum serein biyosentezine sadece glukoz katkılı BHI Broth içinde ve 30 °C'de büyütülen *B. cereus* hücrelerinin durgunluk fazlarının başlangıç periyodlarına ait kültür süpernatantlarında rastlanması; serein üretiminin kompleks bir düzenleyici proses tarafından kontrol edildiği sonucunu doğrulamaktadır. Buna karşılık, Tripton- Yeast Ekstrakt Broth içinde 30 °C'de büyütülen ve durgunluk fazının başlangıç periyodunda sonlandırılan denemeye ait hücresiz ekstraktlarda antimikrobiyal aktiviteye rastlanmaması; ortam cinsinin bakteriyosin biyosentezini etkileyen önemli bir parametre olduğu şeklindeki literatür bulgusunu destekler niteliktedir.

Ayrıca bakteriyosin üretim ortamı olarak glukoz katkılı besiyerine aşılana ancak 25 °C'de inkübe edildikten sonra test edilen hücresiz ekstraktlarda antimikrobiyal aktivite gözlenmemesi ve 37 °C'de inkübasyon sıcaklığı uygulandığında ise zayıf bir aktivite gözlenmesi; ortam cinsi kadar inkübasyon sıcaklığının da sereinin üretimi üzerine etki eden bir büyüme faktörü olduğu şeklindeki literatür bulgusuna paralellik taşımaktadır.

Naclerio ve arkadaşları (1993) tarafından sereinin bakteriyosininin moleküler ağırlığını saptamak amacıyla gerçekleştirilmiş olan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde, % 15 T oranında poliakrilamid jel kullanılmış ve analiz sonucunda sereinin'ın molekül ağırlığının yaklaşık olarak 9kDa olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda en yüksek antimikrobiyal aktivite sergileyen 36, 52, 105, 108 ve 120 no'lu beş *B. cereus* suşu dikkate alınarak denatüre koşullar altında gerçekleştirilmiş olan protein elektroforezi denemesinde, bu beş suşun durgunluk fazı kültürlerinden hazırlanmış olan preparasyonlardaki proteinik yapıya sahip sereinin bakteriyosininin molekül ağırlığını ve saflık düzeyini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Naclerio ve arkadaşları (1993) tarafından gerçekleştirilmiş elektroforez denemesinde, protein markerlarını ve total protein konsantrasyonu 1.5 mg/ml olan örnekleri içeren jel Coomassie brilliant blue R250 ile boyanarak analiz edilmiştir. Çalışmamızda elektroforez tamamlandıktan sonra; yükleme jeli kesilerek uzaklaştırılmış ve molekül büyüklüklerine göre ayrılmış olan protein örnekleri ile protein markerlarını ayırma jeli içinde çökelterek hareketsizleştirmek ve sonraki boyama işleminin etkinliğini arttırmak amacıyla fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Ayırma jelinin fiksasyonu için; genel amaçlı en iyi fiksatif olan asetik asitin etanol içeren solüsyonu kullanılmıştır.

Takiben, elektroforetik profillerin incelenmesi aşamasında iki farklı boyama tekniği denenmiştir. Bu tekniklerden biri olan Coomassie Boyama ile jelde ayrılmış proteinler etkin bir şekilde boyanamamasına karşın, bu yöntemle göre 200 kat daha duyarlı olan Gümüş boyama tekniği ile proteinler görünürleştirilebilmiştir. Çalışmamızda kullanılan preparasyonlardaki protein miktarlarının oldukça düşük (0.025-0.030 mg/ml) olması, jelin literatür bulgusundan farklı bir şekilde analiz edilmesinin nedeni olabilir.

Ayrıca jelin mm'si başına 0.05-0.1ng kadar az miktarda protein saptanmasını sağlayan bu teknikle eser düzeydeki safsızlıkların saptanması da olası olduğundan, 120 no'lu suşa ait jel analiz edildiğinde 6.5 kDa'luk Aprotinin ve 11 kDa'luk Sitokrom c protein markerlarına ait bantlar arasında yaklaşık 9 kDa'luk sereinin bakteriyosinine ait olduğu düşünülen bant gözlenmiştir.

Bu suş dışındaki diğer dört suşa ait ayırma jelinde molekül ağırlıkları düşük olan protein markerlar arasında beliren ve yaklaşık 9kDa'luk sereinin bakteriyosinine ait olduğu düşünülen banda ilaveten, 11,7kDa'luk Sitokrom c protein markerına ait bantın üstünde yüksek molekül ağırlıkları nedeniyle göç hızları düşük ve minör safsızlığın belirtisi olan proteinler de boyanarak bant oluşturmuşlardır. Kontaminasyonun göstergesi olan bu bantlar ilgi alanı dışında dikkate alınmıştır. Bulunan bu sonuçlar sereinin'ın yaklaşık 9kDa molekül ağırlığına sahip bir bakteriyosin olduğu şeklindeki literatür bulgusunu destekler nitelik taşımaktadır.

Bu denemeler sonucunda yaklaşık 9 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanan sereinin bakteriyosininin daha ileri düzeydeki çalışmalarda saflaştırılması düşünülmekte ve elde edilecek saf proteinin, gıdalarda *B. cereus* bakterisinin hızlı bir

şekilde saptanabilmesini sağlayan lesitin hidrolizasyonundan sorumlu yapısal genin belirlenmesine dayanan PCR tekniği gibi, bir identifikasyon aracı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Bennik, M.M.J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Gorris, L.G.M., and Smid, E.J., 1997, Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100-fold differences in bacteriocin sensitivity, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.63, I.9, P. 3628-3636.
2. Hill, C., 1995, *Bacteriocins: Natural Antimicrobials from Microorganisms: New methods for food preservation*, Blackie Academic&Professional, London, P. 457.
3. Temiz, A., 1998, *Gıdalarda Mikrobiyal Gelişmeyi Etkileyen Faktörler: Gıda Mikrobiyolojisi*, Mengi Tan Basımevi, İzmir, P.605.
4. Ünlütürk, A., 1998, *Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu: Gıda Mikrobiyolojisi*, Mengi Tan Basımevi, İzmir, P.605.
5. Oscariz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A.G., 1999, Detection and Characterization of cerein 7, a New Bacteriocin Produced by *Bacillus cereus* with a Broad Spectrum of Activity, *FEMS Microbiology Letters*, V.178, P. 337-341.
6. Anonymus, 1998, *Merck Gıda Mikrobiyolojisi 98*, Armoni Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, P. 68.
7. Kaleli, D., Durlu-Özkaya, F., 2000, *Bacillus cereus: Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Armoni Matbaacılık, Ankara, P. 395-400.
8. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, L.F., Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation, *International Journal of Food Microbiology*, V. 71, P. 1-20.
9. De Vuyst, L., 2000, Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures, *Food Technology and Biotechnology*, V. 38, P.105-112.
10. Rose, N., Sporns, P., and McMullen, L.M., 1999, Detection of Bacteriocins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 65, I. 5, P. 2238-2242.
11. Naclerio, G., Rica, E., Sacco, M., and De Felic, M., 1993, Antimicrobial Activity of a Newly Identified Bacteriocin of *Bacillus cereus* with a Broad Spectrum of Activity, *FEMS Microbiology Letters*, V. 178, P. 337-341.
12. Sneath, P.H.A., Nicholas, S.M., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA, V.2, P. 1599.
13. Balows, A., Trupper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., 1992, *The Prokaryotes Second Edition*, New York, P.2140.
14. Cintas, L., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, P.E., and Nes, I.F., 1997, Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel sec-Department Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.63, I.11, P. 4321-4330.
15. Voldes-Stauber, N. And Schere, S., 1994, Isolation and Characterization of Linocin M18, a Bacteriocin Produced by *Brevibacterium linens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, V.60, I.10, P.3809-3814.

16. Stoffels, G., Nissen-Mayer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H., and Nes, I.F., 1992, Purification and characterization of a New Bacteriocin Isolated From a *Cornobacterium sp.*, Appl. Environ. Microbiol., V.58, I.5, P.1417-1422.
17. Ertan, H., Arda, N., 1999, Protein Elektroforezi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, P.226.
18. Schagger, H., and von Jagow, G., 1987, Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa, Anal. Biochem., V.166, P.368-379.
19. Chen, C.H., Ding, H.C., and Chang, T.C., 2001, Rapid Identification of *Bacillus cereus* Based on the Detection of a 28,5-Kilodalton Cell Surface Antigen, J. Food Prot., V.64, I.3, P. 348-354.
20. Banerjee, C., Bustamante, C.I., Wharton, R., Talley, E., and Wade, J. C., 1998, *Bacillus* Infections in Patients with Cancer, Arch. Intern. Med., V.148, P. 1769-1774.
21. Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., and Donk, W.A., 2005, Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics., Chem. Rev., V.105, 663-683.
22. Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K., 2006, Lantibiotics: Insight and Foresight for New Paradigm., Journal of Bioscience and Bioengineering, V. 102, I.3, P. 139-149.
23. Bennik, M.M.J., Verheul, A., Abee, T., Naaktgeboren-Stoffels, G., Gorris, L.G.M., and Smid, E.J., 1997, Identification of Nisin and Pediocin PA-1 with Closely Related Lactic Acid Bacteria That Manifested over 10-Fold Differences in Bacteriocin Sensitivity, App. Environ. Microbiol., V.63, I.9, P. 3628-3656.
24. Klaenhammer, T.R., 1993, Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, FEMS Microbiol. Rev., V.12, P.39-85.
25. Oscariz, J.C., and Pisabarro, A.G., 2001, Classification and Mode of Action of Membrane-Active Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria, Review article, P.5-15.
26. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation, International Journal of Food Microbiology, V.71, P. 1-20.
27. McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001, Lantibiotics: Structure, Biosynthesis and Mode of Action, FEMS Microbiology Reviews, V.25, P. 285-308.
28. Mary-Harting, A., Hedges, A.J., and Berkeley, R.C.W., 1972, Methods for Studying Bacteriocins: Methods in Microbiology, Academic Press, London and New York, V.7A, P. 315-422.
29. Jack, R.W., Tagg, J.R., and Ray, B., 1995, Bacteriocins of Gram Positive Bacteria, Microbiol. Rev., V.59, I.2, P.171-200.