

**ANTİBİYOTİK TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR THE DETECTION
OF ANTIBIOTIC**

NAZİFE NUR KARAÇAĞLAR

DOÇ. DR. ALİ TOPCU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

NAZİFE NUR KARAÇAĞLAR' ın hazırladığı "Antibiyotik Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI' nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur TAMER

Başkan



Doç. Dr. Ali TOPCU

Danışman



Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Üye



Doç. Dr. Birce MERCANOĞLU TABAN

Üye



Yrd. Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenkle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 01/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

19 / 06 / 2017

Nazife Nur KARAÇAĞLAR



Oğluma...

ETİK

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

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

beyan ederim.

19/06/2017



Nazife Nur KARAÇAĞLAR

ÖZET

ANTİBİYOTİK TAYİNİNE YÖNELİK BİYONSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Nazife Nur KARAÇAĞLAR

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali TOPCU

Haziran 2017, 144 Sayfa

Antibiyotikler, sağlık sektöründe en fazla kullanılan ilaç türlerinden biridir. Fakat yeterlilikleri gün geçtikçe yaygınlaşan bakteriyel direnç olgusundan dolayı sektöre uğramaktadır. İnsanlar tarafından antibakteriyel ilaçların yetersiz kullanımı, hayvanlarda antibakteriyellerin yaygın olarak kullanılması veya çevre ve gıdada antibakteriyel maddelerin bulunması antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının artmasına neden olmuştur. Antibiyotikler hayvanları tedavi etme, hastalıktan koruma amacı ile verilmekte ise de bazı durumlarda büyüme ve beslenme verimliliklerini artırma amacı ile de verilebilmektedir. Bu yüzden hayvanlarda ve hayvansal kaynaklı gıdalarda antibiyotiğin kontrolü son derece önemlidir. Bu kapsamda kalıntı antibiyotik düzeyinin kolayca saptanabileceği, hızlı ve hassas tayin sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Antibiyotiklerin basit, hızlı ve hassas tayini, sağlık riskleri oluşturabilecek dirençli bakteri suşlarının artmasının engellenmesi ayrıca teknolojik açıdan gıda proseslerinde fermentasyon basamağında sorun oluşmasının engellenmesi açısından oldukça önemlidir. Özellikle gıda daha işlenmeden, çiftlikte veya fabrikada bu analizlerin hızlı bir şekilde yapılabilmesi önemlidir. Gıdalarda antibiyotik tayini için sıklıkla kullanılan immunoassayler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi (LC/MS) gibi yöntemler oldukça

hassas olmakla birlikte yüksek maliyetli olup, gelişmiş ve uzmanlık gerektiren ekipmanlara ihtiyaç duymaktadır.

Bu tez kapsamında, antibiyotik tayinine yönelik basit, hızlı, düşük maliyetli ve Avrupa Birliği (EU) tarafından belirlenen maksimum kalıntı limiti (MKL) düzeyindeki hassasiyette bakteri temelli bir biyosensör sistemi geliştirilmesi hedeflenmektedir. Çalışmanın odağında süt hayvancılığında en çok kullanılan antibiyotik gruplarının tayini bulunmaktadır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle, biyoanaliz sisteminde kullanılacak floresans özelliğe sahip bakteri hücrelerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu nedenle, yeşil floresans proteininin (Green Fluorescence Protein-GFP) rekombinasyon yoluyla *Escherichia coli* hücrelerinde ekspresyonu sağlanmıştır. Bu aşamada, optimizasyon çalışmaları ile analiz sistemi antibiyotik tayini için iyileştirilmiştir. Antibiyotik tayini, canlı bakteri hücrelerinin antimikrobiyal varlığındaki inhibisyonu takip edilerek yapılmıştır. Analiz sisteminde floresans intensitesindeki değişim izlenmiştir. Bu kapsamda, ampisilin, basitrasin A, benzilpenisilin, furazolidon, gentamisin, linkomisin, neomisin, sefazolin, spektinomisin, spiramisin, streptomisin, sulfadiazin ve tetrasiklin antibiyotikleri denenmiştir. Değişen antibiyotik konsantrasyonlarına karşılık, floresans intensitesindeki artışın hızı belirlenerek denenen her antibiyotik için kalibrasyon eğrisi, gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, geliştirilen yöntem ampisilin, benzilpenisilin, gentamisin, neomisin ve tetrasiklin 60 dakika içerisinde başarılı bir şekilde tayin edilebilmektedir. Bu antibiyotikler için elde edilen LOD değerleri sırası ile 3.33 ppb, 0.29 ppb, 28.00 ppb, 618.36 ppb ve 33.17 ppb olup, elde edilen bu değerler herbir antibiyotik için izin verilen MKL değerlerinden daha düşük düzeydedir.

Tezde antibiyotik tayini için model sistem ve kalıntı antibiyotik açısından büyük risk oluşturan ve en çok denetime tabii gıda olan süt ele alınmış ve gerçek örnek denemeleri süt ile yapılmıştır. Bu kapsamda, ampisilin, benzilpenisilin, sefazolin, tetrasiklin, gentamisin ve neomisin antibiyotikleri içeren süt örnekleri kullanılmıştır. Elde edilen geri kazanım değerleri, % 91.00 ile % 105.85 arasındadır.

Geliştirilen antibiyotik tayinine yönelik biyosensörün validasyon çalışmaları için doğruluk ve kesinlik değerleri incelenmiştir. Bu kapsamda gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik dataları incelenmiştir. Doğruluk için bias, kesinlik için bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır. Bias değerleri % -8.00 ile % 0.64 arasında iken, RSD değerleri % 1.30 ile % 7.34 arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik tayini, yeşil floresans proteini, plazmid, biyosensör, süt

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF ANTIBIOTIC

NAZİFE NUR KARAÇAĞLAR

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Ali TOPCU

June 2017, 144 pages

Antibiotics are one of the most used drug type in pharmaceutical. But the efficiency of these drugs comes to a standstill point because of the bacterial resistance fact that has become widespread day after day. Inefficient usage of antibacterial drug by human being, widespread usage of antibacterials in animals or existence of antibacterials in environment and food caused increment in antibiotic resistant bacterial strains. Even antibiotics can be given for the purpose of healing and preventing animals from sickness they can also be given for the enhancement of growth and nutritional productivity. Therefore, examining of antibiotic in animals or foodstuffs of animal origin is so important. In this scope, sensitive and fast detection systems are needed for the detection of residual antibiotic level. Simple, fast and sensitive detection of antibiotics is highly important because of the prevention of resistant bacterial strains that may cause health risks and also from the technological point of view prevention of problems at the fermentation step in the food processes. Especially, it is important to perform these analyses fastly at the farm or at the plant, before processing of food. Antibiotic detection methods that are often used in foods such as immunoassays, high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) are very sensitive as well as they are over costing and they need some improved or specialization-required equipment.

In the scope of this thesis, development of a simple, fast, cost-efficient and sensitive as the maximum residual levels (MRL) that have been set by the European Union (EU), whole cell based biosensor is aimed. Detection of commonly used antibiotic groups in dairy farming is present in the focus of this study. In accordance with this purpose firstly, it is aimed to form the bacteria, which have a fluorescens feature and will be used in the bioanalysis system. Therefore, expression of green fluorescence protein in the cells of *Escherichia coli* by the recombination was provided. At this stage, analysis system was improved by the optimization studies for the detection of antibiotic. Antibiotic detection was carried out by following the inhibition of viable bacteria cells at the presence of antibiotic. Changes in fluorescent intensity were pursued in the analysis system. In this context, ampicillin, bacitracin A, benzylpenicillin, furazolidone, gentamicin, lincomycin, neomycin, cefazolin, spectinomycin, spiramycin, streptomycin, sulfadiazine, and tetracycline antibiotics were tested. The calibration curve, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were obtained for each tested antibiotic by determining the rate of increment in fluorescent intensity versus varying antibiotic concentrations. According to obtained results; developed method can be successfully used for the detection of ampicillin, benzylpenicillin, gentamicin, neomycin and tetracycline within 60 minutes. LOD values for the these antibiotics are 3.33 ppb, 0.29 ppb, 28.00 ppb, 618.36 ppb and 33.17 ppb, respectively and these values are lower than the allowed MRL for each antibiotic.

In the thesis, model system and milk, which poses great risk and is the most audited food from the standpoint of antibiotic level, are investigated and real sample trials were done with milk. Within this scope, milk samples that contain ampicillin, benzylpenicillin, cefazolin, tetracycline, gentamicin and neomycin are used. Obtained recovery results were in the range of 91.00% and 105.85%.

On behalf of the validation studies of the developed biosensor for the detection of antibiotic, accuracy and precision values were investigated. In this context, in a day and inter day repeatability data were examined. Bias values for accuracy, relative standard deviation values for precision were calculated. While bias values were found in the range of -8.00% and 0.64%, RSD values were found in the range of 1.30% and 7.34%.

Keywords: Determination of antibiotic, green fluorescent protein, plasmid, biosensor, milk

TEŞEKKÜR

Tezimin bütün aşamalarında değerli katkılarını esirgmeden yol gösteren, motivasyonumu her daim artırmam için beni yüreklendiren, karşılaştığım zorluklarda bilgi ve tecrübesi ile yanımda olan, önerileri ve hayat felsefesi ile sadece tezime değil hayatıma da yön veren değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ali TOPCU'ya,

Tezin planlanmasından itibaren hoşgörü ve ilgisi ile her konuda bana yardım eden, tez çalışmasında karşılaştığım sorunlara yaratıcı fikirleri ile çözümler bulan, başarılı bilim kadını rolü ile örnek aldığım, akıl hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER'e ve onun nezdinde plazmidli hücrelerin temini konusunda yardımlarından ötürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak ŞEKER'e

Bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, her zaman değerli fikirleri ile beni araştırmaya teşvik ederek bunun için her türlü imkanı ve ortamı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Yorumları ile çalışmalarına farklı perspektiflerden bakma imkanı veren, bilgi ve yardımlarını hiç esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Uğur TAMER'e,

Bu tez çalışmasını, öncelikli alanlara yönelik doktora programı kapsamında değerlendirip, '2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı' adı altında maddi destek sunan TÜBİTAK BİDEB'e,

Maddi ve manevi desteklerinden ötürü tüm Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü çalışanlarına, Antibiyotik tayin kitlerinin temininde Maysa Gıda ve çalışanlarına, Eğlenceli ve huzurlu bir çalışma ortamı yaratan laboratuvar arkadaşlarım Sattar EGHBALIAN ve Reyhaneh GHAVAM'a, desteklerini ve sevgilerini her zaman hissettiğim canım hocam Yelda ZENCİR ve arkadaştan öte kardeşlerim olan Arş. Gör. Dr. Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN ve Arş. Gör. Dr. Tuğba BULAT'a,

Tüm fedakarlıkları, bugünlere gelmemdeki tüm emekleri ve bitmeyen sonsuz sabrı için canım annem Asiye YAZĞAN'a, çalışma azmini ve dürüstlüğünü her daim örnek aldığım, varlığı ile huzur veren canım babam Hasan Hüseyin YAZĞAN'a, mutsuzken bile beni bir şekilde neşelendirmeyi başaran, bir tanecik kardeşim Halime YAZĞAN'a,

Manevi desteğini sadece tezde değil her zaman hissettiğim, hayata bakış açısı ile geleceğe her zaman ümitle bakmamı sağlayan hayat arkadaşım, eşim Dr. Semih KARAÇAĞLAR'a ve bu tez döneminde hayatıma girerek doktor unvanından daha değerli olan anne unvanını almama sebep olan, en değerli varlığım, hayat enerjim, yaşama sebebim OĞLUM MERT'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Antibiyotikler	4
2.1.1 Antibiyotiklerin Tarihi.....	4
2.1.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	6
2.1.2.1 β-laktamlar.....	11
2.1.2.2 Makrolidler	11
2.1.2.3 Linkozamidler.....	12
2.1.2.4 Tetrasiklinler.....	12
2.1.2.5 Sülfonamidler	12
2.1.2.6 Aminoglikozitler.....	12
2.1.2.7 Polipeptidler	12
2.1.2.8 Nitrofuranlar	13
2.1.2.9 Amfenikoller.....	13
2.1.2.10 Diğer Antibiyotik Grupları	13
2.1.3 Antibiyotik Direnci.....	15
2.2 Hayvansal Gıdalarda Antibiyotik	19

2.3	Antibiyotik Analiz Yöntemleri.....	21
2.3.1	Mikrobiyal İnhibisyon Testleri.....	22
2.3.2	İmmunoassay Metodları.....	24
2.3.3	Biyosensörler.....	25
2.3.4	Ticari Antibiyotik Test Kitleri.....	27
2.4	Yeşil Floresans Proteini (Green Fluorescent Protein).....	29
2.4.1	GFP'nin keşfi.....	30
2.4.2	GFP'nin üç boyutlu yapısı ve florofor.....	31
2.4.3	GFP Uyarma ve Emisyon Bandları.....	32
2.4.4	GFP Mutasyonları.....	33
3.	MATERYAL VE METOT.....	35
3.1	Materyal.....	35
3.2	Analiz Yöntemi.....	36
3.3	Optimizasyon Çalışmaları.....	37
3.3.1	Kültür pH'sının Etkisi.....	37
3.3.2	Besiyeri pH'sının Etkisi.....	37
3.3.3	Yıkamanın Etkisi.....	37
3.3.4	Çalkalamalı Kültür Eldesinin Etkisi.....	38
3.3.5	Besiyerindeki Tuz Konsantrasyonu.....	38
3.3.6	Yıkama Tamponu Tuz Konsantrasyonu.....	38
3.3.7	Analize Alınacak Kültür Konsantrasyonu.....	38
3.3.8	Plazmidin <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinden Eldesi ve <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Aktarılması.....	39
3.3.8.1	<i>E. coli</i> DH5 α hücrelerinden plazmid eldesi.....	39
3.3.8.2	Kompetant hücre hazırlama.....	40
3.3.8.3	Plazmidin <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücrelerine aktarılması.....	41

3.3.9	Pasaj Sayısının ve Kültür İnokülasyon Oranının Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	42
3.3.10	Besiyeri Bileşen Optimizasyonu	42
3.3.11	Analiz İçin Besiyeri Miktarı (Oksijen Etkisi).....	42
3.4	Üreme Eğrisi.....	42
3.5	Antibiyotiklerin Analizi.....	43
3.6	Antibiyotik Kalibrasyon Eğrileri ve LOD, LOQ Değerleri.....	43
3.7	Gerçek Örnek Denemeleri	44
3.7.1	Charm CowSide II® ile Kalıntı Antibiyotik Tayini.....	44
3.8	Validasyon Çalışmaları	45
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1	Optimizasyon Çalışmaları	46
4.1.1	Kültür pH'sının Etkisi	46
4.1.2	Besiyeri pH'sının Etkisi	49
4.1.3	Yıkamanın Etkisi	50
4.1.4	Çalkalamalı Kültür Eldesinin Etkisi	53
4.1.5	Besiyerindeki Tuz Konsantrasyonu.....	55
4.1.6	Yıkama Tamponu Tuz Konsantrasyonu	59
4.1.7	Analize Alınacak Kültür Konsantrasyonu.....	60
4.1.8	<i>E. coli</i> BL21(DE3) ile <i>E. coli</i> DH5 α Hücrelerinin Karşılaştırılması	62
4.1.9	Pasaj Sayısının ve Kültür İnokülasyon Oranının Hücre Yoğunluğuna Etkisi.....	63
4.1.10	Besiyeri Bileşen Optimizasyonu	67
4.1.11	Analiz İçin Besiyeri Miktarı (Oksijen Etkisi).....	73
4.2	Üreme Eğrisi.....	74
4.3	Antibiyotiklerin Analizi, Kalibrasyon Eğrileri, Tespit Değerleri.....	75
4.3.1	Ampisilin Analizi	76
4.3.2	Basitrasin A Analizi	77

4.3.3	Benzilpenisilin (Penisilin G) Analizi.....	79
4.3.4	Furazolidon Analizi	81
4.3.5	Gentamisin Analizi	83
4.3.6	Linkomisin Analizi	85
4.3.7	Neomisin Analizi.....	87
4.3.8	Sefazolin Analizi	89
4.3.9	Spektinomisin Analizi	91
4.3.10	Spiramisin Analizi	93
4.3.11	Streptomisin Analizi.....	95
4.3.12	Sulfadiazin Analizi	97
4.3.13	Tetrasiklin Analizi	99
4.4	Gerçek Örnek Denemeleri.....	101
4.4.1	Charm CowSide II® ile Kalıntı Antibiyotik Tayini.....	103
4.5	Validasyon Çalışmaları	106
4.5.1	Gün İçi Tekrarlanabilirlik.....	106
4.5.2	Günler Arası Tekrarlanabilirlik	107
5.	SONUÇ.....	109
	KAYNAKLAR.....	117
	EKLER	132
	ÖZGEÇMİŞ.....	144

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 4.1. Farklı kültür oranlarında kontrol eğiminin antibiyotik eğimine oranı	62
Çizelge 4.2. <i>E. coli</i> BL21(DE3) kültürünün inkübasyon sürecindeki farklı zamanlarda elde edilen canlı hücre sayımları	75
Çizelge 4.3. Süt örneğinde geri kazanım ve RSD değerleri	103
Çizelge 4.4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik dataları.....	108
Çizelge 5.1. Antibiyotiklerin geliştirilen yöntem ile elde edilen LOD, LOQ değerleri ve izin verilen MKL değerleri	111



ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. GFP'nin üç boyutlu yapısının yandan ve üstten görünümü [166]	32
Şekil 3.1. Analiz yönteminin şematik gösterimi.....	37
Şekil 3.2. Plazmidin <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücrelerine aktarımının şematik gösterimi.....	41
Şekil 4.1. 18 saatlik kültürün pH'sı değiştirilerek, elde edilen uyarma spektrumu.....	46
Şekil 4.2. Farklı pH'larda elde edilen uyarma intensitesi.....	46
Şekil 4.3. Farklı pH'larda elde edilen GFP'li kültürün uyarma dalga boyları	47
Şekil 4.4. 18 saatlik kültürün pH'sı değiştirilerek, elde edilen emisyon spektrumu	47
Şekil 4.5. Farklı pH'larda elde edilen emisyon intensitesi	48
Şekil 4.6. Farklı pH'larda elde edilen GFP'li kültürün emisyon dalga boyu	48
Şekil 4.7. Farklı pH'larda hazırlanan besiyerlerine ekim yapılan GFP'li <i>E. coli</i> kültürünün inkübasyon süresi boyunca 545 nm'deki optik dansitesinde meydana gelen değişim.....	49
Şekil 4.8. Farklı pH'larda hazırlanan besiyerlerine ekim yapılan GFP'li <i>E. coli</i> kültürünün inkübasyon süresi boyunca pH'sında meydana gelen değişim	50
Şekil 4.9. Başlangıç pH'sı 7 ve 8.5 olan ve inkübasyon sonrası pH'sı 8.5'a çıkarılan örneklerin emisyon spektrumları	50
Şekil 4.10. pH 8.5 fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen uyarma spektrumları	51
Şekil 4.11. pH 8.5 fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen emisyon spektrumları... 51	
Şekil 4.12. pH 8.5 besiyeri, kültür, fosfat tamponu ve pH 8.5'lik fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen uyarma spektrumları	52
Şekil 4.13. pH 8.5 besiyeri, kültür, fosfat tamponu ve pH 8.5'lik fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen emisyon spektrumları.....	52
Şekil 4.14. Normal ve çalkalamalı kültürlerin ($\frac{1}{4}$ oranında seyreltilmiş) besiyerinde ve fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen optik dansiteleri.....	53
Şekil 4.15. Normal ve çalkalamalı kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen floresans spektrofotometresindeki uyarma spektrumu	54

Şekil 4.16. Normal ve çalkalamalı kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen floresans spektrofotometresindeki uyarma spektrumu	54
Şekil 4.17. LB-Luria, LB-Lennox ve LB-Miller besiyerlerinde elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) 545 nm'deki optik dansiteleri	55
Şekil 4.18. LB-Luria, LB-Lennox ve LB-Miller besiyerlerinde elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) emisyon intensiteleri.....	56
Şekil 4.19. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) 545 nm'deki optik dansiteleri.....	57
Şekil 4.20. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki uyarma spektrumu	57
Şekil 4.21. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki emisyon spektrumu	58
Şekil 4.22. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki emisyon intensiteleri	58
Şekil 4.23. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30 g/L) yıkama tamponunda yıkama sonrası elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki uyarma spektrumları.....	59
Şekil 4.24. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30 g/L) yıkama tamponunda yıkama sonrası elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki emisyon spektrumları	59
Şekil 4.25. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30 g/L) yıkama tamponunda yıkama sonrası elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) 513 nm'deki emisyon intensiteleri	60
Şekil 4.26. Farklı kültür oranlarındaki (% 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0) kinetik analizler	61
Şekil 4.27. <i>E. coli</i> DH5 α ve <i>E. coli</i> BL21 hücrelerinin a) uyarma spektrumu, b) emisyon spektrumu	62

Şekil 4.28. <i>E. coli</i> DH5 α ve <i>E. coli</i> BL21(DE3) hücrelerinin a) optik dansite değerleri b) emisyon intensiteleri.....	63
Şekil 4.29. Stok kültürden elde edilen a) O.D. değerleri b) emisyon intensiteleri	64
Şekil 4.30. İkinci pasajdaki kültürlerin farklı inokülasyon oranlarındaki LB ve 2xLB besiyerinde elde edilen a) O.D. değerleri b) emisyon intensiteleri	65
Şekil 4.31. Stok ve 2. pasajdaki kültürlerden LB ve 2xLB besiyerlerinde elde edilen O.D. değerleri.....	66
Şekil 4.32. Stok ve 2. pasajlardaki kültürden LB ve 2xLB besiyerlerinde elde edilen emisyon intensiteleri.....	66
Şekil 4.33. LB besiyerine, laktoz glukoz, pepton ve maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin optik dansiteleri	67
Şekil 4.34. LB besiyerine, laktoz glukoz, pepton ve maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri	68
Şekil 4.35. LB besiyerine, vitamin mineral kompleksi ve % 5 maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin optik dansiteleri	71
Şekil 4.36. LB besiyerine, vitamin mineral kompleksi ve % 5 maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri.....	71
Şekil 4.37. LB, 2xLB, 3xLB ve 4xLB besiyerlerinde elde edilen kültürlerin optik dansiteleri	72
Şekil 4.38. LB, 2xLB, 3xLB ve 4xLB besiyerlerinde elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri	72
Şekil 4.39. Erlenlerdeki farklı besiyeri hacimlerinde (5, 10 ve 20 mL) elde edilen kültürlerin a) optik dansiteleri, b) emisyon intensiteleri.....	73
Şekil 4.40. <i>E. coli</i> BL21(DE3)' in zamana karşı elde edilen üreme eğrisi.....	74
Şekil 4.41. Farklı ampisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20 ppb) elde edilen kültürün optik dansite değerleri.....	76
Şekil 4.42. Farklı ampisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20 ppb) elde edilen kültürün emisyon intensiteleri	76

Şekil 4.43. Ampisilin konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 15, 20 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri.....	77
Şekil 4.44. Farklı basitrasin A konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürün optik dansite değerleri	78
Şekil 4.45. Farklı basitrasin A konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürün emisyon intensiteleri	78
Şekil 4.46. Basitrasin A konsantrasyonlarına (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	79
Şekil 4.47. Farklı benzilpenisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri.....	80
Şekil 4.48. Farklı benzilpenisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürün emisyon intensiteleri	80
Şekil 4.49. Benzilpenisilin konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri.....	81
Şekil 4.50. Farklı furazolidon konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürün optik dansite değerleri.....	82
Şekil 4.51. Farklı furazolidon konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri.....	82
Şekil 4.52. Furazolidon konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri.....	83
Şekil 4.53. Farklı gentamisin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri.....	84
Şekil 4.54. Farklı gentamisin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri	84
Şekil 4.55. Gentamisin konsantrasyonlarına (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	85
Şekil 4.56. Farklı linkomisin konsantrasyonlarında (0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb) elde edilen optik dansite değerleri.....	86
Şekil 4.57. Farklı linkomisin konsantrasyonlarında (0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri	86

Şekil 4.58. Linkomisin konsantrasyonlarına (0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	87
Şekil 4.59. Farklı neomisin konsantrasyonlarında (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb) elde edilen optik dansite değerleri	88
Şekil 4.60. Farklı neomisin konsantrasyonlarında (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri	89
Şekil 4.61. Neomisin konsantrasyonlarına (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	89
Şekil 4.62. Farklı sefazolin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) elde edilen optik dansite değerleri.....	90
Şekil 4.63. Farklı sefazolin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri	90
Şekil 4.64. Sefazolin konsantrasyonlarına (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri.....	91
Şekil 4.65. Farklı sefazolin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) elde edilen optik dansite değerleri.....	92
Şekil 4.66. Farklı spektinomisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri	92
Şekil 4.67. Spektinomisin konsantrasyonlarına (0, 200, 400, 600, 800 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	93
Şekil 4.68. Farklı spiramisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri.....	94
Şekil 4.69. Farklı spiramisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri	94
Şekil 4.70. Spiramisin konsantrasyonlarına (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	95
Şekil 4.71. Farklı streptomisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen optik dansite değerleri.....	96
Şekil 4.72. Farklı streptomisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri	96

Şekil 4.73. Streptomisin konsantrasyonlarına (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	97
Şekil 4.74. Farklı sulfadiazin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen optik dansite değerleri.....	98
Şekil 4.75. Farklı sulfadiazin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri	98
Şekil 4.76. Sulfadiazin konsantrasyonlarına (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri	99
Şekil 4.77. Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200 ppb) elde edilen optik dansite değerleri	100
Şekil 4.78. Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri.....	100
Şekil 4.79. Tetrasiklin konsantrasyonlarına (0, 50, 100, 150, 200 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri.....	101
Şekil 4.80. Antibiyotik içermeyen süt ve 5 ppb ampisilin, 5 ppb benzilpenisilin, 50 ppb sefazolin, 50 ppb tetrasiklin, 100 ppb gentamisin, 500 ppb neomisin içeren sütlerin optik dansite değerleri.....	102
Şekil 4.81. Antibiyotik içermeyen süt ve 5 ppb ampisilin, 5 ppb benzilpenisilin, 50 ppb sefazolin, 50 ppb tetrasiklin, 100 ppb gentamisin, 500 ppb neomisin içeren sütlerin emisyon intensiteleri.....	102
Şekil 4.82. (Soldan sağa sırası ile) Besiyeri, antibiyotik içermeyen süt, 50 ppb tetrasiklin içeren süt, 5 ppb ampisilin içeren süt, 5 ppb benzilpenisilin (penisilin G) içeren süt, 50 ppb sefazolin içeren süt, 100 ppb gentamisin içeren süt ve 500 ppb neomisin içeren sütlerin Charm® testi sonucu	104
Şekil 4.83. Gün içi ölçüm optik dansite değerleri	106
Şekil 4.84. Gün içi ölçüm emisyon değerleri	107
Şekil 4.85. Günler arası (5 gün) optik dansite değerleri.....	107
Şekil 4.86. Günler arası (5 gün) emisyon intensiteleri	108
Şekil Ek.1 <i>E. coli</i> K12 ve GFP'li <i>E. coli</i> kültürlerine ait ışık mikroskobu ve floresans mikroskobu görüntüleri	132

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Alanin
Å	Angstrom
ADI	Kabul edilebilir günlük alım
Ala	Alanin
Asp	Aspartik Asit
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
b	Kalibrasyon eğrisinin eğimi
BİDEB	Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı
Cyc	Sistein
CVMP	Veteriner Tıbbi Ürünler Komitesi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmunassay
EU	Avrupa Birliği
F	Fenilalanin
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FIA	Fluoroimmunoassay
G	Glisin
GFP	Yeşil Floresans Proteini
Gly	Glisin
Glu	Glutamik Asit
His	Histidin
His-6	Hekzahistidin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC50	Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Yarısı
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri için Ortak Uzman Komitesi
K	Lizin
kDa	Kilo Dalton
k _n	Katsayı
KOB	Koloni Oluşturan Birim

L	Lösin
LB	Luria Bertani
LC/MS	Sıvı Kromatografisi / Kütle Spektrometresi
Leu	Lösin
LOD	Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantification)
Lys	Lizin
M	Metiyonin
Met	Metiyonin
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MKL	Maksimum Kalıntı Limiti
Mn	Mangan
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
O.D.	Optik Dansite
OPD	o-fenilendiamin dihidroklorid
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
Phe	Fenilalanin
ppb	Milyarda bir (parts per billion)
PRSP	Penisilin dirençli <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PVDF	Polivinilidenprolid
R	Arjinin
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
RSD	Bağlı Standart Sapma
S	Serin
Sb	Standart sapma (kör)
Ser	Serin
SPFIA	Katı Destekli Floroimmunoassay
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
T	Treonin
Thr	Treonin
Tm	Erime Sıcaklığı
TMB	Tetrametilbenzidin

TRFIA	Zamana Bağlı Floroimmunoassay
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
UV-vis	Ultraviyole-görünür bölge
V	Valin
Val	Valin
VRSA	Vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
Y	Tirozin



1. GİRİŞ

Antibiyotikler, bakteri üremesini engelleyen veya bakterileri öldüren maddelerdir. Antibiyotikler 1941 yılında penisilinin keşfinden bugüne kadar bakteri enfeksiyonunu engellemek için sıklıkla kullanılmaktadır [1]. Kolay erişimi ve güçlü etkilerinden dolayı özellikle hayvan yetiştiriciliğinde aşırı kullanımı nedeni ile bakterilerde direnç gelişimine neden olmaktadır. İnsanların sürekli olarak aldıkları gıdalar ile kalıntı antibiyotiğe maruz kalması veya antibiyotiğin çevreden kontaminasyonla insanlara geçmesi neticesinde, çağımızın en büyük sorunu olan antibiyotik dirençli mikroorganizmalar oluşmaktadır. Antibiyotik direnci, özellikle son yıllarda önlem alınması gereken oldukça ciddi bir konudur. Bu direnç bütün dünya için tehdit oluşturmaktadır. İnsan vücudunda antibiyotik direnci gelişen mikroorganizmalar bulunduğu, var olan antibiyotiklerle tedavi mümkün olamamakta ve sağlık açısından büyük riskler doğmaktadır.

Antibiyotik direncinin gelişmesine neden olan üç olgu bulunmaktadır. Bunlardan ilki, insanlar tarafından antibiyotiklerin gereksiz ve bilinçsizce kullanımı, ikincisi antibiyotiklerin hayvanlarda sıklıkla kullanılması sonucu antibiyotiklerin hayvansal gıdalarda kalıntı şeklinde bulunması, üçüncüsü ise özellikle antibiyotik üretimi yapan fabrikalar vasıtası ile çevrenin kontamine olmasıdır. Bakteriler tarafından oluşturulan antibiyotik direnci için çözüm yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi veya akılcı antibiyotik kullanımı ve kalıntı antibiyotik düzeyinin düşürülmesidir. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi uzun zaman ve maliyet gerektirmesi ve bu yeni geliştirilen antibiyotiğe de direnç gelişiminin görülebilmesi bakımından antibiyotik direncinin uzun vadeli çözümü yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesi değildir. Etkin çözüm, antibiyotiklerin akılcı kullanımı ve kalıntı antibiyotik düzeyinin düşürülmesidir. Bu ise, insanlarda ve hayvanlarda gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi, hayvansal gıdalardaki ve çevredeki kalıntı antibiyotik miktarlarının sürekli denetlenmesi ile mümkündür. Bu yüzden hızlı antibiyotik tayini bu kapsamda oldukça önemlidir.

Hayvansal gıdalar içerisinde süt, kalıntı antibiyotik bakımından büyük öneme sahiptir. Hayvanlara verilen antibiyotik kan dolaşımı yolu ile süte geçmektedir. Sütteki antibiyotik, antibiyotik direncini artırması bakımından önemli olduğu kadar, süt endüstrisi için teknolojik ve ekonomik nedenlerle de oldukça dikkat çeken bir konudur. Sütte antimikrobiyal bulunması durumunda, fermentasyon proseslerinde görev alan starter mikroorganizmaların çalışması engellenerek istenen ürünün oluşması imkansız olmaktadır. Antibiyotik kalıntısı, starter kültürlerin çalışmasını engelleyerek veya yavaşlatarak

fermentasyon ürünlerinin oluşumunu (laktik asit vb) kısmen veya tamamen inhibe etmektedir. Dolayısı ile antibiyotik kalıntısı özellikle fermente süt ürünlerinde sorunlara neden olmaktadır. Örneğin peynirde ve yoğurttta yetersiz fermentasyon nedeni ile istenilen yapıda üretim yapılamamaktadır ya da hiç ürün oluşmamaktadır. Bu durum süt endüstrisi için büyük ekonomik kayıplar doğurmaktadır. Kalıntı antibiyotik, sadece ekonomik kayıplar bakımından değil, ayrıca kalıntı antibiyotik içeren hayvansal kaynaklı gıdaların tüketilmesi durumunda insanlarda antibiyotik alerjilerinin gözlenmesine neden olması bakımından da önem taşımaktadır. Toplum sağlığının sürdürülebilmesi, ekonomik kayıpların minimize edilemesi için kalıntı antibiyotik düzeyinin sürekli kontrolü oldukça önemlidir. Bu yüzden sütler fabrikaya alınmadan antibiyotik açısından rutin bir şekilde ve hızlıca test edilmelidir.

Antibiyotik tayini için genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi / kütle spektrometresi (LC/MS) gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin maliyetleri daha yüksek olup, hem uzman personel hem de uzun zaman gerektirmektedir. Şu an özellikle süt fabrikalarında antibiyotik tayini için test kitleri kullanılmaktadır. Bu kullanılan test kitlerinden bazıları inhibisyon esasına dayanırken bazıları antijen antikor ilişkisine dayanmaktadır. İnhibisyon esasına dayanan test kitlerinde analiz süreleri yaklaşık 3 saat iken, antikor antijen ilişkisine dayananlarda süre kısalarak genelde yaklaşık 15 dk olmaktadır. İnhibisyon esasına dayananlarda süre oldukça uzun iken, antijen antikor ilişkisine dayanan test kitlerinde süre kısa fakat hem maliyet yüksek olmakta hem de her antibiyotik için farklı test kitleri kullanılması gerekmektedir. Süt endüstrisi için, kısa sürede, düşük maliyetli ve çoğu antibiyotik için sonuç verebilen analiz sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez kapsamında antibiyotik tayini için hızlı ve maksimum kalıntı limitleri (MKL) düzeyinde hassasiyette, hücre temelli biyosensör hazırlanması hedeflenmiştir.

Yöntemin prensibi mikrobiyal inhibisyonun yeşil floresans protein (GFP; green fluorescent protein) ile izlenmesidir. GFP'nin biyomarker olarak kullanımı yaygın olup, herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymadan üretilebilmesi önemli bir avantajdır. Bu kapsamda GFP geni ve kloroamfenikol direnç geni taşıyan konstitutif promoterli plazmid *E. coli* hücrelerine aktarılmıştır. Konstitutif promoterli plazmid GFP geninin herhangi bir indükleyici ajana gerek kalmadan sürekli olarak üretilmesine olanak tanımaktadır. Bu sistemde, antimikrobiyal varlığındaki inhibisyon, zamana karşı floresans intensitesindeki artışın eğiminin azalması ile takip edilmektedir. Geliştirilen yöntemin gerçek örnek denemeleri

sütte yapılmıştır. Süte belirli konsantrasyonda eklenen antibiyotiklerin geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Floresansa dayalı biyosensörün, çalışma kapsamında validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyonda doğruluk ve kesinlik değerlerinin incelenmesi için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır.

Sonuç olarak, kalıntı antibiyotik tayini için hızlı, kolay uygulanabilir bir analiz sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem tek bir antibiyotiğin tayinine yönelik olmayıp, sütte bulunan antimikrobiyal özellikteki maddelerin tespitine de olanak vermektedir. Geliştirilen yöntemde, süt daha işlenmeden, sütün üreticiden alımı ve/veya işletmeye kabulü esnasında antibiyotik varlığı hızlı bir şekilde tespit edilebilecektir. Böylece, gereksiz kayıpların önüne geçilecek ve ulusal ekonomiye katkı sağlanacaktır. Ayrıca, geliştirilen yöntemin süt dışında diğer alanlarda da uygulama imkanı bulunmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Antibiyotikler

Antibiyotikler, mikroorganizmaların gelişimlerini veya metabolik aktivitelerini inhibe eden mikrobiyal orijinli kimyasal moleküller olarak tanımlanmaktadır [1]. Antibiyotikler doğal orijinli olup, birçok küf ve bakteriler tarafından üretilmekte ve buldukları ortama salınmaktadır. Antibiyotik terimi ilk kez Waksman ve arkadaşları tarafından 1942 yılında kullanılmış olup, bu tarihten itibaren yaygın şekilde kullanılmıştır [2].

Antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarında kullanımlarından önce bir çok insan bulaşıcı hastalıklar yüzünden ölmekte idi. Tarihsel süreç göz önüne alındığında, tıp tarihinde en önemli başarılarından biri bulaşıcı hastalıklarda antibiyotiklerin kullanılmasıdır. Antibiyotiğin keşfinden bu yana, hiç bir ilaç türü hastalıkların tedavisi ve ölüm oranını düşürmesi bakımından antibiyotiklerle rekabet edememiştir.

2.1.1 Antibiyotiklerin Tarihi

İnsanlık tarihinde eski zamanlarda, bakteriyel enfeksiyonlar bitkilerle tedavi edilmekteydi fakat bu tedavinin etki mekanizması ne doktorlar ne de hastalar tarafından anlaşılabilmiş değildi. Bu dönemdeki tedavilerin çoğu bakterilerden ziyade protozoon enfeksiyonlarına etki etmeye yönelikti. 1619 yılının başlarında, sıtmanın kinin ekstresi ile, amipik dizanterinin ise emetin ile tedavi edilebileceği biliniyordu [3]. Fakat bitkisel terapiler çoğu enfeksiyonların tedavisi için yetersiz kalmakta ve bakteriyel enfeksiyonlar ciddi hastalıklara ve yüksek mortalite oranının görülmesine neden olmaktaydı.

Gerçek kemoterapi dönemi başladığında, frenginin tedavisinde kullanılan cıva gibi sadece birkaç tane antibakteriyel kullanılmaktaydı. 19. yy'ın sonlarında, Louis Pasteur ve Robert Koch tarafından mikroorganizmaların varlığı ve bunların çeşitli hastalıkların sorumlusu olduğunun keşfi, enfeksiyon hastalıklarının tedavisine yaklaşımda devrim yaratmıştır ve ilgiyi antimikrobiallere çekmiştir [4]. Aynı zamanlarda, Avrupa'da devam etmekte olan endüstriyel ve bilimsel devrim de, büyük miktarlarda saf kimyasallar üretebilen kimya endüstrisine ilgiyi artırmıştır. Kemoterapinin kurucusu olan Paul Ehrlich bu kimya fabrikalarından birinde enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmek için, enfeksiyona sebep olan mikroorganizmayı selektif bir şekilde öldüren fakat insana zararı olmayan 'sihirli kurşun' olarak anılacak, bir kimyasal arayışını başlatmıştır [5]. Paul Ehrlich, boyaların da antimikrobiyal ilaçlar olarak kullanılabileceğini ilk kez 1900'lerin başında ortaya çıkarmıştır. 1904 yılında Ehrlich ve Shiga, trypanosomalara karşı kullanılabilen trypanrot olarak adlandırılan kırmızı bir boya keşfetmişlerdir [6]. 1909 yılında, Paul Ehrlich ve

Sahachiro Hata, sifiliz spiroketine karşı etkili Salvarsan olarak adlandırılan bir arsenik bileşimini keşfetmişlerdir [5]. Bu keşif, antimikrobiyal aktiviteye sahip diğer küçük moleküllerin arayışını teşvik etmiştir. Bu araştırma 1930 yıllarında bulunan ve halen kullanılmakta olan önemli bir sentetik ilaç sınıfı olan sülfonamidlerin antibakteriyel aktivitesinin keşfedilmesine yol açmıştır [4]. Gerhard Domagk tarafından keşfedilen sülfonamidler, ilk gerçek etkili antimikrobiyal sınıftır [6]. 1932 yılında, Bayer firmasında çalışan Mietzsch ve Klarer, sülfonamid grubundan Prontosil kırmızısını sentezlemişlerdir. Domagk, 1935 yılında farelerdeki hemolitik streptokok enfeksiyonunun Prontosil kırmızısı ile tedavi edilebildiğini göstermiştir [3]. Fakat sonrasında yapılan *in vitro* çalışmalarda Prontosil kırmızısının antibakteriyel aktivitesinin olmadığı ortaya konmuştur. Tréfouël ve arkadaşları, *in vivo* şartlarda Protosil kırmızısının boya ve aktif antibakteriyel ajan olan sulfanilamid bileşenlerine bölündüğünü bu yüzden antibakteriyel etki gösterdiğini ortaya koymuştur [3]. Bu gelişmeden sonra bir çok firma, sulfanilamid üretimi yaparak, molekülün performansını artırma ve yan etkilerini azaltma yönünde çalışmalar yapmıştır.

Enfeksiyonların antimikrobiyallerle tedavisinde ikinci bir devrim de 1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfidir. Penisilin ilk keşfedilen doğal antibiyotik olmasına rağmen, mikroorganizma hücrelerinin enfeksiyon tedavisinde kullanımı yeni değildir. Küfler yaraların tedavisinde uzun yıllardır kullanılmakta idi. 1899 yılında yaraların tedavisinde *Pseudomonas aeruginosa*'dan ekstrakte edilen piyosiyonaz kullanılmıştır [7]. Fleming, mikroorganizmaların kendisinin antibiyotik olarak adlandırılan antibakteriyel madde üretebildiklerini ilk kez göstermiştir [8].

Fleming penisilini keşfetmesine rağmen, herhangi bir kullanım için yeterli düzeyde penisilin izole etmeyi ve saflaştırmayı gerçekleştirememiştir. 1941 yılında Chain ve arkadaşları da penisilinin terapötik etkisini göstermelerine rağmen, ticari kullanım için yeterli düzeyde penisilin üretememişlerdir [9]. Moyer ve Coghill çalışmaları ile penisilin üretiminde daha yüksek üretim randımanına ulaşmışlardır [10]. Raper ve Fennell yerel bir markette küflü bir kavunda daha yüksek penisilin üretim verimi elde edilebilen *Penicillium chrysogenum* suşunu bulmuşlardır [11].

Penisilinin 2. Dünya Savaşı'nda başarılı tıbbi uygulamaları, diğer doğal antibiyotiklerin araştırılmasına ilgiyi artırmış ve farklı antibiyotikler kısa sürede keşfedilmiştir. 1940 yılında Selman Waksman toprak mikroorganizmaları tarafından üretilen antibiyotik bileşenlerini araştırmaya başlamıştır [12]. 1943 yılında, Waksman'ın öğrencilerinden biri streptomisini keşfetmiş ve bu olay yeni antibiyotiklerin keşfi için araştırmacıları her türlü

maddeyi taramaya yönlendirmiştir [13]. Bu kapsamda toprak dışında, ilginç ve alışılmadık kaynaklardan mikroorganizmalar izole edilmeye başlanmıştır. Örneğin, bir yara enfeksiyonundan, kanalizasyondan, tavuğun boğazından ve Paris'teki ıslak bir duvar kenarından antibiyotik üreten bakteri izolasyonları yapılmıştır [7]. 1941 yılında, Gram pozitif bakterilere etkili ilk antibiyotik gramisidin keşfedilmiştir [14]. Klortetrasiklin, kloramfenikol ve diğer antibiyotikler de hemen arkasından keşfedilmeye başlanmıştır [7].

1950'lere gelindiğinde bugünkü bilinen antibiyotiklerin yarısı keşfedilmiş ve antibiyotiklerin 'altın çağı' yaşanmıştır [15]. Daha sonraki çalışmalar doğal antibiyotiklerin daha iyi farmakinetik ve farmadinamik özellikler gösterecek şekilde sentetik veya yarı sentetik türevlerini geliştirmeye yönelmiştir. 1962 yılında, ilk tanımlanan kinolon olan sentetik ilaç nalidiksik asit tanımlanmıştır. Nalidiksik asitin kendi başına bir terapötik etkisi bulunmazken, modifikasyonu ile terapötik etkisi fazla olan florokinolon oluşmaktadır. Bu sınıfta, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde çok önemli hale gelen siprofloksasin, norfloksasin, enrofloksasin ve ofloksasin gibi antibiyotikler bulunmaktadır [6]. 1960'dan sonra, yeni antibiyotik gelişimi oldukça sınırlı sayıda olmuştur. Yeni geliştirilen ilaçlar da var olan ilaçların kimyasal modifikasyonla oluşturulmuş türevleridir. Bu modifikasyonlar sonucunda, patojenlerin öldürülmesinde daha etkili, etki spektrumu daha fazla, toksisitesi ve yan etkileri azaltılmış ilaçlar enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için uygun hale gelmiştir. Ne yazık ki, 1970 yılından sonra sadece bir yeni antibiyotik sınıfı, oksazolidinonlar keşfedilebilmiştir [16].

Antibiyotiklerin etkilerini artırmak ve antibiyotik direnci probleminin üstesinden gelmek için antibiyotik tedavisindeki yeni trend farklı etki mekanizmasına sahip ilaçların birlikte kullanılmalarıdır. Antibiyotiklerin modern tıptaki yeri halen oldukça önemli olup, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde terapötik olarak, çoğu transplant ameliyatı ve kanser tedavisinde profilaktik olarak kullanımlarına devam edilmektedir [4].

2.1.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki mekanizmalarına, kaynaklarına, hücredeki inhibisyon şekline göre farklı sınıflara ayrılmaktadırlar. Antibiyotikler

Etki mekanizmalarına göre;

- Bakteriyostatikler
- Bakteriyositler

Kaynaklarına göre;

- Sentetik
- Doğal (mikroorganizmalardan)
- Yarı sentetik

Hücredeki inhibisyon şekline göre;

- Hücre duvarına etki edenler
- Hücre membranına etki edenler
- Protein sentezine etki edenler
- DNA veya RNA'ya etki edenler
- Folik asit metabolizmasına etki edenler

şeklinde farklı sınıflara ayrılmaktadırlar.

Etki mekanizmalarına göre ayırmda bakteriyostatikler bakteri hücrelerinin gelişmesini ve bakterinin bölünmesini engellerken, bakteriyositler bakterileri direk olarak öldürmektedir. Amfenikoller, sülfonamidler, tetrasiklinler, makrolidler, okzasolidinonlar, linkozamidler, bakteriyostatik etki gösterirken, β -laktamlar, aminoglikozitler, glikopeptidler, ansamisinler, streptograminler, kinolonlar ve lipopeptidler bakteriosit etki göstermektedir.

Antibiyotikler, sentetik, doğal veya doğal antibiyotiklerin modifikasyonu ile elde edilen yarı sentetik olarak farklı sınıflara ayrılmaktadır. Sulfonamidler ve kinolonlar sentetik antibiyotiklerdir. Günümüzde klinik açıdan çoğu antimikrobiyaller, antibakteriyal aktivitelerinin artırılması ve toksik yan etkilerinin azaltılması nedeni ile yapısal olarak modifiye edildiğinden antimikrobiyallerin sentetik veya doğal olarak klasik ayırımları önemini kaybetmiştir.

Hücredeki inhibisyon şekline göre, antibiyotikler farklı sınıflara ayrılmaktadır. Hücre duvarı biyosentezini inhibe edenler β -laktam, glikopeptid ve fosfomisin antibiyotik gruplarıdır. Bakteriyel hücre duvarı sentezi kompleks metabolik basamaklar içermektedir. Bu basamaklar, sitoplazmik membranın dış yüzeyine taşınmadan önce enzimatik olarak bir çok kimyasal reaksiyonda işlev gören sitoplazmadaki öncü moleküllerle başlamaktadır [17]. Elde edilen D-Ala-D-Ala terminal dipeptid içeren N-asetilmuramil-pentapeptid yapısı büyüyen peptidoglikan yapısı içerisine dahil olmaktadır. Bakteriler bölünürken, spesifik

transglikozilazlar ve transpeptidazlar kullanılarak peptidoglikan yapısı çapraz bağlanma ile hücre duvarını oluşturmaktadır [18]. Bakteri hücre duvarları ökaryot hücre membranından tamamen farklı olup, toksik antibiyotikler için açık bir hedefirler. β -laktamlar içerisinde penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler bulunmaktadır. Bütün β -laktamlar benzer antibakteriyel aktivite mekanizması göstermektedir. Bu antibiyotiklerin enzimatik hedefleri bakteriyel hücre duvarı sentezinin son basamağında etki göstermekte ve hücre duvarındaki peptidoglikan ile çapraz bağ yapan penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanmaktadır [19]. Membrana bağlı PBP'ler hücre duvarı biyosentezinde önemli rol oynamaktadırlar. PBP'ler transpeptidaz ve transglikozilaz veya transpeptidaz ve karboksipeptidaz aktiviteleri kombinasyonları ile bifonksiyonel enzim işlevi göstermektedir [20]. β -laktam antibiyotikleri uzayan peptidoglikan yapısının terminal D-Ala-D-Ala birimine bağlanarak çapraz bağlanmayı önleyerek hücre duvarı sentezine etki etmektedir [21]. Bakteriyel PBP'lerin hepsinin enzimatik aktif bölgelerinde serin aminoasiti bulunmaktadır. Serin aminoasiti bakteriyel büyüme sırasında β -laktamlar tarafından açılınmaktadır [20]. Aktif bölgedeki serinin hızlı açılması sonrası oldukça yavaş deaçılma görülmektedir. Bunun sonucunda, PBP'lerin inaktivasyonu ile bakteriyel hücre ölümleri görülmektedir. Ayrıca, Gram negatif hücrelerde, kolayca kopabilen kırılğan sferoplast oluşumu görülmekte, Gram pozitif hücrelerde ise lipoteikoik asitin serbest kalması ile otoliz tetiklenmektedir [12].

Glikopeptidler de vankomisin, avoparsin vb. gibi açıl-D-Alanil-D-Alanine bağlanan antibiyotiklerdir. Bu bileşene bağlanma, hücre duvarı oluşumunda büyüyen peptidoglikana yeni alt birimlerin eklenmesini engellemektedir [18]. Antibiyotik ve peptid kompleksi peptidoglikan zincirinin tamamlanması için gerekli olan transglikozilasyon ve transpeptidasyon reaksiyonlarını engellemekte ve bu durum tamamlanmamış hücre duvarına ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu antibiyotikler büyük moleküller olup, Gram negatiflerin dış membranı tarafından içeri alınmamakta böylece etkileri Gram pozitif organizmalarla sınırlı olmaktadır [3]. Telavansin (lipoglikopeptid) D-Ala-D-Ala peptidi ile interaksiyonunun yanında hücre membranının sitoplazmik tarafındaki hücre duvarı öncüsü olan lipid II'ye bağlanmaktadır. Bu interaksiyon membran depolarizasyonuna neden olmakta ve sonunda membran yapısı bozulmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir [22].

Fosfomisin hücre duvarı sentezleyen enzim MurA'yı inhibe etmektedir. Bu enzim peptidoglikan sentezinin ilk basamağını katalizleyen enol pirüvik transferazdır [23].

Bakteriyel hücre duvarı oluşumunda bu enzim önemli olduğundan, fosfomisin geniş spektrumda bakteriyel türlerin üremesini engellemektedir. Gram negatif bakterilerde sadece bir gen MurA işlevselliğine sahip enzimi kodlarken [24], Gram pozitif bakterilerde farklı nükleotid dizilimine sahip benzer biyokimyasal özelliklerde iki MurA geni bulunmaktadır. Hücrenin canlı kalabilmesi için en az bir MurA proteinin işlevsel kalması gerekmektedir [25]. Bu yüzden bir murA gen ürünü inaktive edilse bile, hücre canlılığı devam edebilmektedir.

Hücre membranı fonksiyonları üzerine etki gösteren antibiyotikler lipopeptid sınıfından daptomisin, peptidik antibiyotiklerden kolistin ve polimiksin B ve iyonofor antibiyotiklerden monensin ve salinomisin [17]. Halen medikal kullanımına izin verilen tek lipopeptid daptomisinidir. Daptomisin yüksek molekül ağırlıklı siklik lipopeptittir. Gram pozitif koklara karşı hızlı bakterisidal etki göstermektedir [26]. Başlangıçta peptidoglikan sentezi inhibitörü olarak adlandırılan daptomisinin [26] sonraları kalsiyuma bağlı membran depolarizasyonuna neden olduğu açığa çıkmıştır [27]. Bu depolarizasyon makromolekül sentezinin duraksamasına ve hücre membranının bozulmasına neden olarak bakteri ölümünü gerçekleştirmektedir. Bu sonuçlar daptomisin uygulanan *S. aureus*'un transkripsiyonel profil çalışmaları ile de doğrulanmış olup, hem hücre duvarı uyarını hem de membran depolarizasyon genlerinin etkilendiği kanıtlanmıştır [28].

Bakteriyel protein sentezini inhibe eden birçok antibiyotik türü vardır. Bu antibiyotikler bakteriyel ribozomlar ile ökaryotik ribozomlar arasındaki farklılıktan yararlanmaktadır. Aminoglikozitler, etki mekanizması tam olarak anlaşılamayan bir antibiyotik grubudur. Streptomisinler, neomisinler ve kanamisinler aminoglikozit sınıfındaki antibiyotik gruplarıdır. Bu ilaçlar bakteri hücrelerine kinonları içeren aktif transport ile girmektedir. Anaeroblarda ve streptokoklarda kinonlar olmadığından, bu antibiyotikler bu mikroorganizmalara etki edememektedir. Streptomisinler, 30S ribozomal alt birime bağlanarak etki göstermektedir. Kanamisin ve neomisin ise hem 50S alt birime, hem de 30S alt birimdeki streptomisinin bağlandığından farklı bir bölgeye bağlanmaktadır [12]. Hücrenin ölmesine neden olan hücre membranı proteinlerinin aktivitesi bu antibiyotiklerin etki mekanizmasında rol oynamakta fakat bu durum tam olarak açıklanamamaktadır [12, 29]. Kloroamfenikol 70S ribozomlarda peptid bağı oluşumunu inhibe etmektedir [29]. Tetrasiklinler hücre içine aktif transport ile alınmakta ve alındığında 30S alt birime bağlanarak aminoasil tRNA'nın bağlanmasını engellemektedir [30]. Önceleri makrolid grubunda bulunan eritromisinin ribozomal bağlanma bölgeleri için aminoasitlerle

yarışarak, protein sentezini inhibe ettiğine inanılmaktaydı. Fakat yapılan yeni çalışmalar başka mekanizmaların da etkili olduğunu göstermektedir [7]. Şu an makrolidlerin, tRNA'nın ribozomdan ayrılmasını teşvik ederek peptid bağı oluşumunu inhibe ettiğine ve aminoasit zincir uzamasını engellediğine inanılmaktadır [31]. Bakteriyel protein sentezini inhibe eden diğer bir antibiyotik sınıfı ise streptograminlerdir. Streptograminler Gram negatif mikroorganizmaların dış membranının geçirgenliği az olduğundan daha çok Gram pozitif mikroorganizmalarda protein sentezini inhibe etmektedir. Bu antibiyotikler aslında sinerjik etki gösteren yapısal olarak farklı iki ilaç türünün (Tip A ve Tip B) kombinasyonudur. Bu bileşenler 50S altbirimdeki farklı bölgelere bağlanmaktadır. Tip A 50S altbirimdeki iki bölgeye substratların bağlanmasını bloke ederken, Tip B protein zincirinin eksik sentezlenmesine neden olur. Sinerjik etki, Tip A'nın bağlanması ile konformasyonel değişim indüklenmekte ve bu durum Tip B'nin afinitesini artırması şeklinde gözlenmektedir [32].

DNA veya RNA'ya etki eden antibiyotikler ise kinolonlar ve ansamisinlerdir. Kinolonlar DNA giraz ve topoizomeraz IV'e etki ederek bakteri üremesini inhibe etmektedir. Bu enzimler, DNA süpersarımının doğru çalışması için gereklidir [12]. Kinolonlar her iki enzimi hedef almasına rağmen, Gram negatiflerde birincil hedef DNA girazken, Gram pozitiflerde ilk hedef topoizomeraz IV'dür [33]. Ansamisinler ise RNA polimeraza etki ederek RNA sentezini inhibe etmektedir.

Nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotiklerden olan sülfonamidler ve diaminopirimidinler birlikte değerlendirilmelidir. Sülfonamid ve diaminopirimidinler tek başına etki edebildikleri gibi, birlikte kullanıldıklarında sinerjik etki göstermektedirler. Bu antibiyotikler folat sentezini inhibe ederek dolaylı olarak nükleik asit sentezini inhibe etmektedirler. Folat, purinlerin ve pirimidinlerin sentezinde gerekli olan bir koenzimdir. Sülfonamidler p-aminobenzoik asit analogu gibi davranmaktadır. Bu yüzden folat sentezindeki ilk basamağı kompetitif olarak inhibe etmektedir. Diaminopirimidinler arasında yaygın kullanılan trimetoprim ise dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe etmektedir. Bu enzim folat sentezindeki son basamağı katalizlemektedir [12].

Antibiyotiklerde, yukarıdakiler dışında daha birçok faktöre göre farklı sınıflandırma yapılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan sınıflandırma ise kimyasal yapılarına göre olan sınıflandırmadır. Benzer molekül yapısındaki antibiyotikler aynı sınıfta yer almaktadır. Bu sınıflandırma, β -laktamlar, makrolidler, tetrasiklinler, kinolonlar, sülfonamidler, aminoglikozitler, kloroamfenikol, glikopeptidler, oksazolidinonlar, ansamisinler,

streptograminler, linkozamidler vb. şekilde yapılmaktadır. Aşağıda, bazı antibiyotik grupları ile ilgili kısa bilgiler verilmiştir.

2.1.2.1 β -laktamlar

Dünya çapında enfeksiyon kontrolünde en çok kullanılan ve klinik açıdan en önemli ilaç grubudur. β -laktam antibiyotikleri 70 yıldan fazla Gram pozitif kokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde efektif ve güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır [34]. Geniş spektrumlu β -laktamların keşfi ile Gram negatif anaerobik ve aerobik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar da bu antibiyotik grubundaki ilaçlar ile tedavi edilmektedir [35]. Bu grup oldukça geniş olup içerisinde dar spektrumlu penisilinler ve sefalosporinler, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler, geniş spektrumlu karbapenemler ve sadece Gram negatif patojenlere etki gösteren monobaktamlar bulunmaktadır [17]. Benzilpenisilin fermentasyon yoluyla izole edilen doğal bir orijinli bir antibiyotik olmasına rağmen, diğer yaygın kullanılan β -laktam antibiyotikleri 6-aminopenisilanik asit veya 7-aminosefalosporanik asit orijinli yarı sentetik moleküllerdir [36, 37]. Ampisilin de β -laktam grubu antibiyotikleri arasında bulunmaktadır.

β -laktamlar bakteri hücre duvarına, peptidoglikan zinciri oluşurken en sondaki peptidlerin çapraz bağlanmasını inhibe ederek etki etmektedir [4]. Bütün β -laktam antibiyotikleri β -laktam halkası içermektedir. Bu antibiyotikler özellikle penisilinler ve sefalosporinler, sadece insanlarda değil evcil hayvanlarda da enfeksiyonların tedavisinde yaygın kullanılmıştır [38].

2.1.2.2 Makrolidler

Makrolidler genellikle Gram pozitif ve hücre içi bakteriyel patojenler için kullanılmaktadır [3]. Eritromisin makrolid sınıfındaki ilk antibiyotik olup, klaritromisin, azitromisin gibi diğer önemli makrolidler de eritromisinden sonra keşfedilmiştir. Azitromisin uzun plazma yarı ömrü olduğundan bazı patojenlerde tek doz veya günlük bir doz tedavisi uygulanmaktadır. Klaritromisinin emilimi daha iyi olup, daha az gastrointestinal rahatsızlığa neden olmaktadır [31]. Bu grup içerisinde en çok kullanılan antibiyotik eritromisindir. Bunların dışında, spiramisin de bu grup içerisinde yer almaktadır.

Makrolidler ribozomdaki protein sentezine etki etmektedirler [4]. Makrolidlerin etkileri, penisilinlerden daha geniş olup, penisilinlerin etki edemediği bazı bakteri türlerine karşı etkilidirler. Bazı bakteri türleri makrolidlere karşı direnç geliştirmiş olsa da, en çok reçete edilen ikinci antibiyotik grubudur [39].

2.1.2.3 Linkozamidler

Linkomisin, klindamisin ve pirlimisin bu grup içerisindeki antibiyotiklerdir. Linkomisin, *Streptomyces linconensis* tarafından üretilen doğal bir antibiyotiktir. Linkozamidler, amino asit ve bir sülfür içeren galaktozid derivatıdır. Linkomisin tavuk çiftliklerinde bakteriyel enterik enfeksiyonları engellemek için, bazen de performans artırıcı olarak kullanılmaktadır [40]. Klindomisin ise, linkomisindeki bir hidroksil grubu yerine bir klor atomu eklenmiş yarı-sentetik bir antibiyotiktir. Linkozamidler 50S ribozomal alt birimlere bağlanarak, protein sentezini inhibe etmektedirler.

2.1.2.4 Tetrasiklinler

Tetrasiklinler geniş spektrumlu olup, hem Gram pozitif hem Gram negatiflere etki etmektedirler [39]. Tetrasiklinler aracılığı ile aminoasıl t-RNA'nın 30S ribozoma bağlanması engellenmekte ve protein sentezi önlenmektedir [4]. Bakteriyel direncin artmasından dolayı tetrasiklinlerin kullanımları azalmakta ise de, akne, idrar yolu ve solunum sistemi enfeksiyonlarının yanı sıra klamidya enfeksiyonlarında halen kullanım alanı bulmaktadır [39].

2.1.2.5 Sülfonamidler

1930 yılında keşfedilen sülfonamidler, günümüzde hala genellikle trimetoprimlerle beraber kullanılmaktadır. Her iki antibiyotik de nükleik asit sentezi için gerekli olan folik asit metabolizmasına etki etmektedir [4]. Sülfonamid grubunda bulunan Prontosil 1932 yılında geliştirilip ticari olarak ilk kullanılan antibiyotiktir [39]. Sülfonamidler tıpta yaygın olarak kullanılmamakta fakat trimetoprim-sülfametaksozol kombinasyonu olarak idrar yolu enfeksiyonlarında bazen kullanılabilir [3].

Günümüzde sülfonamidlerin kullanımı, bakteriyel direnç gelişmesi ve ayrıca, hastalarda karaciğer hasarı gibi istenmeyen etkilerinden dolayı oldukça sınırlıdır [39].

2.1.2.6 Aminoglikozitler

Aminoglikozitler, bakterideki protein sentezini inhibe ederek, hücre ölümüne neden olmaktadır. Tüberkülozun tedavisinde etkili olan ilk ilaç grubu olmasına rağmen, günümüzde toksisitesinden dolayı kullanımı sınırlıdır [39]. Bu grup içerisinde, gentamisin, spektinomisin, neomisin ve streptomisin antibiyotikleri bulunmaktadır.

2.1.2.7 Polipeptidler

Polipeptid grubunda, basitrasin A, kolistin ve polimiksin B antibiyotikleri bulunmaktadır. Basitrasin hücre duvarı sentezinin inhibisyonu şeklinde etki etmektedir. Basitrasin siklik

polipeptid olup *Bacillus subtilis* var Tracy'nin licheniformis grubu tarafından üretilmektedir. Basitrasin 55-karbonlu bifosfat lipid transport molekülü olan C55-izoprenil pirofosfatın defosforilasyonuna girişim yaparak etki göstermektedir. C55-izoprenil pirofosfat peptidoglikan bakteriyel hücre duvarı yapıtaşlarını taşımaktadır. Basitrasin, iki değerli geçiş metali iyonlarına (Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2}) bağlanarak ve oksidatif olarak DNA'yı parçalayarak da etki göstermektedir [41].

2.1.2.8 Nitrofuranlar

Nitrofuranlar sentetik antibiyotik olup, bu grup içerisinde furazolidon, furaltadon, nitrofurantoin ve nitrofurazon bulunmaktadır. Bu antibiyotiklerin hepsinde 5-nitofuran halkası bulunmaktadır. Nitrofuranların çiftlik hayvanlarında kullanımı kalıntılarının karsinojen olduğu endişesi nedeniyle 1995 yılında, Avrupa Birliği tarafından yasaklanmıştır. Nitrofuranlar yasaklanmadan önce furazolidon Avrupa ülkelerinde sıklıkla kullanılmaktaydı. Özellikle çiftlik hayvanlarının yemlerinde büyüme artırıcı olarak, deniz canlılarında ve arı kolonilerinde bakteriyel ve protozoa kaynaklı enfeksiyonlar için profilaktik ve terapötik amaçlarla kullanılmıştır [42].

2.1.2.9 Amfenikoller

Bu grup içerisinde kloroamfenikol ve tiamfenikol bulunmaktadır. Bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanırlar ve tRNA'nın bağlanmasını engellerler. Bu şekilde protein sentezi durur. Kloroamfenikol geniş spektrumlu olup, doğal olarak bulunmasına karşılık kimyasal sentez yoluyla da üretilebilmektedir [29]. Kloroamfenikol protein sentezini inhibe ederek, büyümeyi ve çoğalmayı engellemektedirler. Bu antibiyotik, ökaryotik hücrelere ve beyin omurilik sıvısına geçerek, menenjit ve intraselüler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Fakat, potansiyel ölümcül yan etkilerinden dolayı örneğin aplastik anemi gibi, kullanımı yaygın değildir [12]. Ciddi toksik etkilerinden dolayı, gelişmiş ülkelerde sadece enfeksiyonun hayatı tehlikeye attığı durumlarda kullanılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise, ucuz ve kolay ulaşılabilir olmasından dolayı kullanımı daha yaygındır [39]. Türkiye'de de kullanımı oldukça sınırlı olup, gıdalarda kalıntı olarak bulunmasına izin verilmemektedir [43].

2.1.2.10 Diğer Antibiyotik Grupları

Kinolonlar, gonore ve şarbon gibi birçok hastalıkların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotik sınıfıdır. Nalidiksik asit, norfloksasin ve siprofloksasin bu sınıf içerisinde yer alan antibiyotiklerdir [3]. Bu antibiyotikler özellikle siprofloksasin yaygın kullanılan ilaçlardandır [44]. Kinolonlar DNA replikasyonunda gerekli enzime etki

etmektedirler. Üriner sistem enfeksiyonlarında ve daha önceki antibiyotiklere direnç kazanmış hastane kaynaklı enfeksiyonlarda kinolonlar kullanılmaktadır. Kinolonlar 2002 yılında ABD’de en çok reçetelenen antibiyotik grubu olması, gereksiz koşullarda veya viral enfeksiyonlarda da kullanılması dolayısı ile kinolonlara karşı direncin hızlı gelişeceği düşünülmektedir [39].

Glikopeptid sınıfında vankomisin antibiyotiği bulunmaktadır. Glikopeptidlerin etkili oldukları bakteriler sınırlı olup, glikopeptidler bakterileri direk öldürmek yerine, büyüme ve çoğalmalarını inhibe etmektedirler [39]. Gram pozitif koklardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilk glikopeptid olan vankomisin ilk yıllarda kullanımı başta geniş çapta kabul görmemiştir. Vankomisin doğal antibiyotik olup, *Streptomyces orientalis* (*Amycolatopsis orientalis*) tarafından fermentasyon yolu ile üretilmektedir. Vankomisin için ilk yıllarda izlenen izolasyon prosedürleri yeterli olmayıp, hazırlık aşamasındaki safsızlıklar giderilememektedir. Bu durum ise nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Bu yüzden kullanılan doza toksisite limiti konulmasını zorunlu kılmıştır. Bu yüzden vankomisin kullanımı da sınırlı kalmıştır [45]. Fakat zamanla saflaştırma konusundaki gelişmelerle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) enfeksiyonlarında yaygın kullanılan ve minimal toksik bir antibiyotik haline gelmiştir [46]. Vankomisin, diğer ilaçlar başarısız olduğunda son çare olarak kullanılmaktadır. Vankomisin kullanımında direnci geciktirmek için katı kurallar bulunmaktadır. Diğer glikopeptidler teikoplanin, avoparsin ve telavansindir. Veterinerlikte kullanılan avoparin Avrupa’da antimikrobiyal büyüme teşvik edici olarak 1974 yılında onaylansa da 1997 yılında hasta hayvanlardan izole edilen *E. faecium*’un vankomisin direnci ile ilişkilendirildiği için tüm kıtada kullanımı yasaklanmıştır [47]. VanA fenotipinin hayvan kaynaklarından insanlara taşınması ve dolayısıyla insan popülasyonunda glikopeptid direncinde artış endişeleri gündeme gelmiştir [47].

Oksazolidinonlar, Gram pozitif bakterilere etkilidir. Protein sentezini inhibe ederek, büyüme ve çoğalmayı engellemektedirler. 2000 yılında kullanımına onay verilen linezolid, bu sınıfta satış için piyasaya sunulan ilk antibiyotik olup, direnç gelişimi yavaş ilerlemektedir [39].

Ansamisin grubundaki antibiyotikler Gram pozitif bakterilere ve bazı Gram negatif bakterilere etkilidirler. Tüberküloz ve cüzzam tedavisinde, bu sınıftaki rifampisin kullanılmaktadır. Rifampisin RNA polimeraza etki ederek RNA sentezini inhibe etmektedir [4]. Ansamisinler nadiren, anti viral aktivite de gösterebilmektedir [39].

Streptograminler, genellikle aynı sınıf içindeki iki ayrı, antibiyotiği kombinasyonu şeklinde verilmekte ve sinerjik etki ile direk olarak bakteri hücrelerini öldürmektedir. Streptograminlere karşı direnç gelişmiş olmasına rağmen, genellikle dirençli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadırlar [39].

1987 yılında keşfedilen lipoproteinler en yeni antibiyotik sınıfıdır. Daptomisin bu sınıf içerisinde en yaygın kullanılan antibiyotiktir. Daptomisin bakteri hücre membranı fonksiyonları üzerine bozucu etkisi bulunmaktadır. Diğer antibiyotiklerin etki mekanizmasından farklı olan bu özelliği sayesinde bu antibiyotiğe geliştirilmiş direnç raporlanmış olsa da oldukça nadir görülmektedir [39]. Daptomisin, *S. aureus*'un neden olduğu karmaşık cilt enfeksiyonlarının tedavisinde ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında (bakteriyemi) kullanımı onaylanmıştır [48].

2.1.3 Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler sağlık sektöründe en fazla kullanılan ilaç türlerinden biridir. Fakat yeterlilikleri ve etkinlikleri gün geçtikçe yaygınlaşan bakteriyel direnç olgusundan dolayı sektöre uğramaktadır. İnsanlar tarafından antibakteriyel ilaçların yetersiz veya rasgele kullanımı, ayrıca çiftlik hayvanlarında antibiyotik ve antimikrobiallerin yaygın şekilde kullanımı bakteriyel direnç olgusuna zemin hazırlayan etmenlerdir. Antibiyotik dirençli mikroorganizmalar şuan dünyadaki her ekosistemde çok sayıda bulunmaktadır. Bakteriler yeni antibiyotikler keşfedildikçe de bunlara karşı savunmak için yeni direnç mekanizmaları geliştirmektedirler. Daha fazla mikrobiyal tür ve suş dirençli hale geldikçe çoğu hastalığın tedavisi imkansız hale gelmektedir. Bu yüzden son yıllarda antibiyotik direncine olan ilgi oldukça artmıştır.

Bakteriler β -laktam antibiyotiklerine karşı direnci farklı yollarla geliştirebilmektedir [49]. Bu direnç mekanizmalarından biri β -laktam halkasını kıran enzim β -laktamaz üretimidir. β -laktam halkasının hidrolizi ile antibiyotikler inaktive olmaktadır. Birçok bakteride hücre duvarı üretimi için kromozomal olarak kodlanmış β -laktamazlar bulunmaktadır. Bu enzimlerin aşırı ekspresyonu direncin gelişmesine neden olmaktadır [12]. β -laktamazların plazmidler veya diğer aktarılabilen elementler tarafından kodlanması aşırı ekspresyona neden olmakta ve direnç gelişmektedir [50]. Ayrıca bazı Gram pozitif bakteriler değişmiş ve yaygın β -laktamlara karşı düşük afinite gösteren PBP'ne sahiptir ve bu durum penisilin bağlanmasını azaltmaktadır [12, 51]. Bu durumun önde gelen örneklerinden birisi *Staphylococcus aureus*'ta görülmektedir. Bakteride PBP2a kodlayan *mecA* geninin

bulunması yakın geçmişte geliştirilmiş tüm β -laktamlara karşı düşük afinite göstermesine ve MRSA gelişimine neden olmaktadır [52]. Bununla birlikte, PBP2a üreten stafilocokların tanımlanmasından önce, stafilocoklarda penisilin direnci daha sık penisilinaz aktivitesinin üretilmesine bağlanmıştır [53]. *mecA* geni bulunduğunda penisilinaz üretimi gereksiz olmasına rağmen her iki mekanizma da MRSA'da görülmektedir [54]. *S. aureus*'tan daha kısıtlı olmasına rağmen pnömokokların da β -laktam direncini düşük afiniteye PBP ile edindiği görülmektedir. Penisilin dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), farklı β -laktamlara karşı farklı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) gösterebilmektedir [55]. Bu durum MRSA'nın tüm β -laktamlara karşı dirençli iken PRSP izolatlarının bazı seçilmiş sefalosporinlere karşı duyarlı olabileceğini göstermektedir [56]. MRSA'nın tüm β -laktamlara dirençli doğması yeni anti-MRSA β -laktamları ile değişmektedir. Örneğin 'Gıda ve İlaç Dairesi' (FDA) tarafından son zamanlarda onaylanan anti-MRSA sefalosporin seftarolin antibiyotiği gibi [57]. Enterokokların da düşük afiniteli PBP'ler ile, özellikle *Enterococcus faecium*'da PBP5 ile direnç geliştirdikleri bilinmektedir [58, 59]. 1980 yılında enterokokların da stafilocoklar gibi penisilinaz ürettiği bildirilse de yeni çalışmalarda bu durum nadiren görülmüştür [60, 61]. Gram negatif bakterilerde asıl direnç mekanizması ise PBP'lerin modifikasyonu yerine β -laktamaz üretimidir [49]. Ayrıca porin işlevinin akışı, modifikasyonu veya silinmesi spesifik β -laktamlara direnç gelişmesinde rol oynayabilmektedir. Porin fonksiyon kaybı, tüm β -laktamlara karşı yüksek dirence yol açan β -laktamaz üretimi ile birlikte görülebilmektedir [62]. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi bazı bileşenlerin tersinmez olarak β -laktamazlara bağlanarak aktivitelerini inhibe edebilme kabiliyetlerinin olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bu bileşenlerin β -laktamlarla beraber verilmesi tedavide başarıyı artırmaktadır [29, 63]. β -laktam direnci kapsamında, 1000'den fazla farklı moleküler ve işlevsel özelliklere sahip özgün β -laktamazlar substrat tercihleri ve inhibitör profilleri bakımından tanımlanarak incelenmiştir [64, 65]. Moleküler seviyede β -laktamazlar ikiye ayrılmaktadır; ilki aktif bölgesinde serin amino asiti bulunanlar (A,C ve D sınıfları) ve diğeri β -laktam hidrolizini kolaylaştıran bir veya iki çinko iyonu gereksinimi olanlar (B sınıfı) [66-68]. Bu gruplandırma β -laktamları hidrolize eden enzim ve enzimlerin inhibitör profilini açıklamak bakımından önemlidir. Örneğin klavulanik asit A sınıfında bulunan çoğu β -laktamazların inhibitörü iken B, C ve D sınıfı β -laktamazlara etki edememektedir. Aynı şekilde etilen diammin tetra asetik asit (EDTA) metallo β -laktamazları inhibe ederken, serin enzimlerine

etkisi bulunmamaktadır. β -laktamazlar dünyada Gram negatif bakterilerde plazmidlerdeki integronlar ve transpozonlar vasıtası ile yayılmaktadır.

Makrolid direnci için iki ana mekanizma tanımlanmıştır. Birincisi, hücreden antibiyotiği uzaklaştıran akış pompası diğeri ise ribozom modifikasyonudur. Akış pompaları antibiyotik hücre içerisine girer girmez antibiyotiği tekrar geri çıkarmaktadır. Bu pompaları kodlayan farklı genler bulunmaktadır. Diğer mekanizmada ise ribozomun farklı yerlerindeki mutasyonlar makrolidlerin bağlanmasını allosterik olarak önlenmektedir. Yaygın görülen değişimlerden biri 23S rRNA'da bir nükleotidin dimetillenmesidir. Bu dimetillenme sadece makrolid bağlanmasını engellemekle kalmaz, ayrıca linkozamid ve streptogramin antibiyotiklerine karşı direnç de sağlamaktadır [31].

Tetrasiklinlere karşı direnç üç farklı mekanizma ile olmaktadır. Bunlardan ilki, membran akış pompası üretimidir. İkinci mekanizma, ribozom koruyan proteinlerin tetrasiklinlerin ribozoma bağlanmasını engellemesidir. Üçüncüsü, tetrasiklinlerin enzimatik olarak inaktivasyonu olup sadece Bacteroides türlerinde bulunan direnç mekanizmasıdır [30].

Anti folat ilaçlarına karşı farklı direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Örneğin, p-aminobenzoik asitin aşırı ekspresyonu veya değişmiş dihidropteroat sentetaz üretimi ile sulfonamidler etkisiz hale gelmektedir. Dihidropteroat sentetazın substratı p-aminobenzoik asit olup, enzimin değişmiş formu sulfonamidlere p-aminobenzoik asitten daha düşük afinite göstermektedir [69]. Trimetoprim direnci de dihidrofolat redüktazın aşırı ekspresyonu veya değişmiş antibiyotik dirençli yapılar gibi farklı mekanizmalarla oluşmaktadır [29]. Ayrıca her iki antibiyotiğin enzimatik olarak inaktivasyonu ile de direnç gelişebilmektedir [69].

Aminoglikozitlere karşı bugüne kadar tanımlanmış üç direnç mekanizması bulunmaktadır. Birincisi sadece streptomisine özgüdür. Streptomisin ribozomda sadece tek bir proteine bağlandığından, bu proteinin yapısındaki sadece tek bir amino asit değişikliği streptomisine karşı yüksek düzeyde direnç oluşumuna neden olmaktadır [29]. Diğer direnç mekanizmaları antibiyotiğin hücre içine alımındaki azalış ile ilgilidir. Bu direnç mekanizmalarında, antibiyotiklerin aktif taşınımı ya hücre membranı değişerek ya da antibiyotik hücre içine girdiğinde enzimler tarafından blok oluşturularak önlenmektedir [29].

Kloroamfenikol direnci kloroamfenikol asetil-transferaz enzimi ile sağlanmaktadır. Bu enzimler kloroamfenikol molekülünü değiştirerek bakteriyel ribozoma bağlanmasını

önlemektedir. Gram negatif hücrelerde kloroamfenikol direnci ayrıca hücrenin dış membran geçirgenliğinin değiştirilerek antibiyotiğin hücre içerisine girmesinin engellenmesi şeklinde de görülebilmektedir [29].

Fosfomisin veya ilk bilinen ismi ile fosfonomisin epoksit içeren basit bir antibiyotik olup streptomyceteslerden izole edilmektedir [70]. Fosfomisin için farklı direnç mekanizmaları bulunmaktadır [71]. Bu mekanizmalardan biri *murA* geninin fosfomisin için düşük afiniteli bir enzim üretmek üzere mutasyon yapmasıdır [72]. Diğeri, büyüme inhibisyonu için daha yüksek konsantrasyonlarda fosfomisin gerektiren MurA düzeylerinde artış olmasıdır. Ayrıca transport sistemlerinde meydana gelen değişikliklerden dolayı hücre alış verişinde bozukluk yaratan daha genel bir direnç mekanizması da görülmektedir [73, 74]. Ek olarak, antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu da bu direnç mekanizmalarından biridir [75, 76]. FosA enzimi ile inaktivasyon Mn bağımlı reaksiyonda fosfomisinin C1'e glutatyon sisteinil sülfidrilin kovalent bağı ile olmaktadır [77, 78]. *Listeria monocytogenes*'de fosfomisini inaktive eden FosX enziminin de farklı *Listeria* türlerinde farklı varyantları bulunmaktadır [79]. Diğer fosfomisin inaktive eden FomA ve FomB enzimleri, fosfomisinin fosfonat işlevini mono ve di fosforulasyona uğratmakta ve bu şekilde diğer bir direnç mekanizması sağlamaktadır [80]. Bu direnç mekanizmalarından en çok bildirilen ise *murA* geni aşırı ekspresyonu ile transport bozuklukları kombinasyonudur [71].

Glikopeptid direncinin uzun zamandır nadir olduğu düşünülmekteyken son zamanlarda yapılan çalışmalarla oldukça yaygın olduğu gösterilmiştir [29]. Glikopeptidlerin birincil inhibisyon mekanizması hücre membranının dış yüzeyi üzerindedir. Bu yüzden glikopeptidlerin bakterilerin üstesinden gelmek için bir zar bariyeri bulunmamaktadır ve bu antibiyotikler enzim hedefleri yerine bunların substratları ile interaksyona girmektedir. Bu nedenle direnç, C terminal açıl-D-alanil-D-alaninin, D-alanil-D-laktat veya D-alanil-D-serin ile yer değiştirmesi ve böylece vankomisinin bağlanma afinitesini düşürerek hücre duvarı sentezinin devam etmesine olanak tanıyan enzimler ile gerçekleşmektedir [18, 81]. Diğer direnç mekanizmaları antibiyotik etkisini ortadan kaldıran peptidoglikan prekürsörlerinin aşırı üretimi ile olmaktadır [12]. 1980'lerin sonunda çeşitli enterekoklarda vankomisin ve teikoplanin direnci ilk olarak transpozona bağlı direnç olarak açıklanmıştır [18]. Glikopeptid direnci herbir profil için harflerle adlandırılan fenotiplerle karakterize edilmiştir. VanA ve VanB fenotipleri geniş plazmidlerde veya kromozomdan kromozoma transfer edilebilen gen kümeleri ile ilgili iken, diğer vankomisin direnç mekanizmaları indüklenebilir veya konstitütif kromozomal mutasyonlarla ilişkilidir [81]. Telavansin,

vankomisin veya teikoplaninden daha az etkilenmesine rağmen, VanA fenotipi gösteren izolatlar tipik olarak tüm glikopeptidlere karşı dirençlidir [82]. Stafilokoklarda vankomisine tam direnç çok nadir olarak gözlenmektedir. Vankomisin dirençli *S.aureus* (VRSA), Dünya çapında yalnızca bir düzine vakada bildirilmiştir [83]. Yüksek düzeyde glikopeptid direnci genellikle vankomisin dirençli enterekoklarda görülen *vanA* gen kümesinden kaynaklanmaktadır [84].

Streptogramin direnci farklı formlarda bulunabilmektedir. Tip A ve Tip B streptograminler için akış pompası mekanizması tanımlanmıştır. Tip A streptograminler virginiamisin asetil-transferazla inaktive olabilmektedir. Bakteriyel ribozomal proteinlerin veya RNA'nın değişimi de direnç sağlayabilmektedir. Makrolid ve linkozamidlerdeki gibi 23S rRNA'daki nükleotidin dimetillenmesi yaygın bir mutasyon olup, Tip B antibiyotiklerine karşı direnç sağlamaktadır [32].

Kinolonlara karşı direnç için üç farklı mekanizma tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan ilki azalmış membran porin ekspresyonudur. Bazı kinolonlara karşı direnç, bu mekanizma ile oluşmaktadır. Ayrıca bu azalmış porin ekspresyonu, porin gereksinimi olan diğer antibiyotiklere karşı çapraz direnç gelişimine de neden olmaktadır. İkinci direnç mekanizması hem Gram negatif hem de Gram pozitif mikroorganizmalarda görülebilen akış pompası ekspresyonudur [50]. Üçüncüsü ise hedef enzimlerin değişimidir. Bazı mutasyonlar ile kinolonlara azalmış bağlanma afinitesine sahip hedef proteinler tanımlanmıştır [33]. Yüksek düzeyde kinolon direncinin, hedef genlerde tek bir mutasyondan ziyade, ardışık seri mutasyonlarla olduğu düşünülmektedir [50].

Daptomisine karşı direnç enterekokal ve stafilokokal izolatlarda nadir görülmektedir [85]. *S. aureus*'larda daptomisine karşı direnç lizilfosfatidilgliserol sentetaz enzimi üretiminden sorumlu MprF geninde nokta mutasyonu ile, ve histidin kinaz enzimi üretiminden sorumlu YycG genine nükleotid eklenmesi ile gelişmektedir [86]. Daptomisine dirençli *S. aureus*'larda artmış membran akışkanlığı, azalmış polarizasyon ve permeabilite, ve artmış net pozitif yüzey yükü görülmektedir [87].

2.2 Hayvansal Gıdalarda Antibiyotik

Dünyadaki antibiyotik kullanımının önemli bir bölümünden hayvancılık işletmeleri sorumludur [88]. Şuana kadar 40000 antibiyotik keşfedilmiş olup bunlardan 80 tanesi hayvancılık ve balıkçılıkta kullanılmaktadır [89]. Bu alanda en çok kullanılan antibiyotik grupları, sulfonamidler, fluoroquinolonlar, fenikoller, aminoglikozitler ve β -laktamlardır. Tetrasiklin, klorotetrasiklin, oksitetrasiklin, penisilin, streptomisin, enrofloksasin, tilosin,

basitrasin, neomisin sülfat, eritromisin, linkomisin, oleandomisin, virginamisin ve bambermisin kümes ve çiftlik hayvanlarının beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [90]. Mikrobiyal orijinli bu antibiyotiklerin dışında, kimyasal olarak sentezlenen antimikrobiyal ajanlar da hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Bu ajanlar üç ana grup altında toplanmaktadır; arsenik içerenler, nitro-furanlar ve sulfonamid içerenler. Arsenik içerenler, arsanalik asit, 3-nitro-4-hidroksifenilarsenik asit ve sodyum arsanilat, nitro-furanlar, furazolidon ve nitro furazon, sulfonamid içerenler ise, sulfametazin, sulfatiazol ve suldaquinoksalin gibi antimikrobiyal ajanlardır [90].

Yoğun hayvancılık işletmelerinde, kommensal flora ve patojenler hayvanlar arasında paylaşmakta bu durum enfeksiyonların hızlı yayılmasına neden olmaktadır [91]. Bu yüzden bu gibi işletmeler, antibiyotik terapisi gibi, agresif enfeksiyon yönetme stratejileri kullanmaktadır. Antibiyotikler hayvanlarda hem hastalığın tedavi edilmesi ve yaygın hastalık vakalarının kontrolünde kullanılmakta iken [88], hem de hayvan beslenmesinde büyümeye yardımcı ajan olarak veya performans/verim artırıcı olarak kullanılmaktadır [92]. Örneğin, tavuk yemlerinde tetrasiklin ve penisilin yumurta üretiminde, önemli gelişme göstermektedir. Fakat son zamanlarda gelişen antibiyotik direncinden dolayı antibiyotiklerin hayvan yemlerinde büyümeye yardımcı olarak kullanılması yasaklanmıştır. 21 Ocak 2006 26056 sayılı kanun ile "Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğ"ın EK-1 No'lu listesinin "C-ANTİBİYOTİKLER" başlığı altında yer alan antibiyotiklerin tümü listeden çıkarılmıştır [93].

Hayvanlarda koruyucu, tedavi edici veya büyümeyi hızlandırıcı amaçlarla veteriner ilaçlarının kullanımından dolayı hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntıları bulunabilmektedir [94]. Bu yüzden, tüketici sağlığını korumak için hayvansal gıdalarda veteriner ilaçlarının kontrolü oldukça önemlidir. Sığır ve tavuk etlerinde, balıklarda, yumurtada, balda ve sütte antibiyotik kalıntıları bulunabilmekte ve bu ürünler kalıntı bakımından izlenmektedir. Süt, antibiyotik bakımından en çok izleme tabi tutulan gıdaların başında gelmektedir. Birçok ülke gıdalarda antibiyotik düzeylerini izleme programı oluşturmakta ve izin verilen maksimum kalıntı limiti (MKL) düzeyleri için ilgili yasal düzenlemeler yapmaktadır.

Hayvansal gıdalarda, antibiyotiklerin farklı kullanım amaçları terapötik, profilaktik ve subterapötik olarak adlandırılmaktadır [88]. Antibiyotikler tek bir hayvanın tedavisi için bireysel kullanılabileceği gibi, bir grup hayvan için de uygulanabilmektedir. Örneğin,

ABD’de süt ineklerinin % 16’sı, her yıl mastitis tedavisi için antibiyotik almakta iken, neredeyse bütün süt inekleri laktasyondan sonra mastitisin engellenmesi veya kontrol altına alınması için profilaktik dozda meme içi infüzyon ile antibiyotik almaktadır. Bu amaçla özellikle penisilinler, sefalosporinler ve β -laktamlar kullanılmaktadır. Ayrıca, besiye yeni giren buzağıların % 15’i solunum hastalıklarının tedavisi için antibiyotik almakta iken, beklenmeyen solunum hastalıkları salgınlarını azaltmak için sağlıklı buzağıların da % 10’una terapötik dozlarda antibiyotik uygulanmaktadır [88]. ABD’de 1989 yılında yaklaşık 31,9 milyon poundluk antimikrobiyalin hayvanlarda terapötik amaç dışında kullanıldığı belirtilmiştir [95]. Yeni çalışmalarda ise, insanlarda sadece 3 milyon pound değerinde antimikrobiyal kullanımına rağmen 24,6 milyon poundluk miktarın terapötik amaçlar dışında, tavuk, sığır ve domuzlarda kullanıldığı bildirilmektedir [88].

Bir kamu sağlığı problemi olarak antibiyotik direncinin önemi göz önüne alındığında, birçok hkmet mevcut bilimsel bulguları gözden geçirerek hayvansal gıdalardaki kalıntı antibiyotik düzeyi için sınırlar getirmiştir. Türkiye’de de, gıda güvenilirliğinin sağlanması amacıyla ‘Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği’ nin güncel hali 07.03.2017 tarihinde resmi gazetede yayınlanmıştır [43]. Örneğin, ampisilin antibiyotiği MKL süt için 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iken, kas, yağ, karaciğer ve böbrek için 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlenmiştir. Basitrasin için sığır sütünde MKL 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ iken, süt dışındaki diğer dokularda MKL’nin gerekmediği bildirilmektedir. Bunların dışında sütte MKL benzilpenisilin için 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, gentamisin için 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, linkomisin için 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, neomisin için 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sefazolin için 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, spektinomisin için 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, spiramisin için 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, streptomisin için 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sulfonamidler için 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tetrasiklin için 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlenmiştir. Furazolidon ve kloroamfenikol yasaklı maddeler kapsamında olup, bunlar için MKL oluşturulamaz ibaresi yer almaktadır.

2.3 Antibiyotik Analiz Yöntemleri

Gıdalarda antibiyotik tayinininde en sık kullanılan konvansiyonel yöntem sıvı kromatografisi / kütle spektrometresi (LC/MS)’dir. Bu yöntemin uzun analiz süresi, eğitimi personel ihtiyacı, pahalı kimyasal ve ekipman gereksinimi nedeniyle, özellikle gıda alanında alternatif yönteme ihtiyaç duyulmaktadır.

Antibiyotik tayini için oldukça farklı analiz sistemleri önerilmiş olup bu sistemler genel olarak e ayrılmaktadır. Bunlar; immünoassay metodları, mikrobiyolojik testler ve

biyosensörlerdir. İmmünoassay metodları kısa analiz süreleri, yüksek hassasiyet ve seçicilik özellikleri bakımından avantajlı yöntemler olmalarına karşın, pahalı sistemlerdir. Analiz yalnızca tek bir antibiyotiğe karşı seçici olup, ortamda bulunan diğer antibiyotikler aynı zamanda analiz edilememektedir. Mikrobiyolojik testler ise kolay uygulanabilir ve ucuz olmalarına karşın uzun zaman gerektirmektedir. Biyosensörler ise, son yıllarda önerilen analiz metodu olup, birbirinden farklı prensiplerde çalışan çok fazla sayıda biyosensör uygulamaları bulunmaktadır.

2.3.1 Mikrobiyal İnhibisyon Testleri

Mikrobiyal inhibisyon testleri özellikle gıda endüstrisinde kullanılmakta olup, LC/MS ile karşılaştırıldığında bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Mikrobiyal inhibisyon testlerinde ortamda antimikrobiyal aktiviteye sahip herhangi bir antibiyotik veya metabolit tayin edilebilmekte iken, LC/MS sistemlerinde, daha önceden hedef olarak seçilen antibiyotik tayin edilebilirken, ortamda bulunabilecek diğer antibiyotikler tayin edilememektedir. Mikrobiyal inhibisyon testlerinin ucuz, kolay uygulanabilir ve çoğu antibiyotik için kullanılabilir olmalarının yanı sıra bu testlerin en önemli dezavantajı uzun inkübasyon süresi gereksinimi ve düşük spesifiktir.

Literatürde, mikrobiyal inhibisyona dayalı farklı prensiplerde metodlar önerilmiştir. Bunlar kondüktometrik ölçüm, luminesans, UV-vis, inhibisyon zonu ölçümü vb. gibi yöntemlerdir. Mikrobiyal inhibisyona dayalı çoğu yöntem agar difüzyonuna dayalı, inhibisyon zonunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu testlerde, test mikroorganizması, Petri kutularındaki besiyerine inoküle edilmekte ve antibiyotik örnekleri bu Petri kutularına kuyucuk açarak veya disk yerleştirilerek, test mikroorganizması ile karşı karşıya getirilmektedir. Test mikroorganizması olarak genelde, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* var. *mycoides* veya *Streptococcus thermophilus* kullanılmaktadır [96]. Antibakteriyel maddenin agarda difüzyonu, üremenin gözlenmediği inhibisyon zonlarının oluşmasına neden olmaktadır. Yöntem bu inhibisyon zonlarının ölçülmesine dayanmaktadır. β -laktam tayini yapılan bir yöntemde Petri'de inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek dedeksiyon yapılmıştır. Gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri 2 - 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak bulunmuştur [97]. *Sarcina lutea* ile inhibisyon testinde, β -laktamlar, tetrasiklinler ve sülfonamidler, *Sarcina lutea* ATCC 9341 suşu ile 30°C'de 18 saat inkübasyon süresi sonrası tayin edilebilmektedir [92].

UV-vis spektrofotometrik yöntemde ise, prensip antibiyotiğin olmadığı veya gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of detection) düzeyinden daha az bulunduğu durumda, mikroorganizma besiyerinde gelişerek asidik bileşenler oluşturmakta, oluşan bu asidik bileşenler besiyeri ortamında bulunan indikatörün renk değiştirmesine yol açmaktadır. Bu şekilde görsel veya fotometrik dedeksiyon mümkün hale gelmektedir. β -laktamlar için geliştirilen bir yöntemde mikrotiter plaka kullanılmakta, renk değişimi UV-vis spektrofotometre ile tayin edilmektedir. LOD değerleri 2 - 336 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bulunmuştur [98]. β -laktam grubu dışındaki antibiyotiklerin tayini için önerilen bir çalışmada mikrotiter plaka kullanılarak, renk değişimi UV-vis spektrofotometre ile dedekte edilmiştir. Önerilen yöntemde elde edilen LOD değerleri 1.1 – 482 $\mu\text{g}/\text{kg}$ arasında bulunmuştur [99].

Hem inhibisyon zonunun ölçüldüğü, hem de renk değişiminin gözlemlendiği çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Örneğin, bir çalışmada sulfadiazine/trimetoprim tayininde dört *Micrococcus luteus* inoküle edilmiş besiyeri ve Premi® test kullanılmıştır. Petri veya kağıt disk metodu kullanılarak inhibisyon zonu çapı ölçümü ve Premi® testteki renk değişimi tayin metodu olarak kullanılmıştır. Kağıt diskteki LOD değeri 1.95 ng olarak belirtilmiştir [100]. Sulfametazin tayini için yapılan bir çalışmada Petri veya kağıt disk ve Premi® testleri kullanılmıştır. Renk değişimi ve inhibisyon çapları ölçümü tayin yöntemi olarak kullanılmış ve LOD değeri 50 - 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak bulunmuştur [101]. Başka bir çalışmada, sulfonamidlerin tayininde hızlı antibiyotik tayin testi (FAST) ve agar plaka ve kağıt disk metodları kullanılmış ve aynı şekilde renk değişimi ve inhibisyon zon çaplarının ölçümü tayin yöntemi olarak kullanılmıştır [102]. Furazolidon antibiyotiği tayini için yapılan başka bir çalışmada hem test tüplerinde renk değişimi, hem de Petri'de inhibisyon zon çaplarının ölçümü yapılmış olup LOD değeri 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir [103].

Tetrasiklinlerin tayini için önerilen diğer bir çalışmada mikrotiter plaka formatında biyosensör sistemi hazırlanmıştır. Luminesans ve inhibisyon çapı ölçümü tayin için kullanılmıştır. LOD değerleri 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak verilmiştir [104].

Sığır karkasında hızlı kalıntı antibiyotik tayini için, agar-difüzyon testlerine alternatif olarak indirek kondüktometrik görüntüleme metodu önerilmiştir. Bu yöntemde β -laktamlar, tetrasiklinler ve aminoglikozitlerin tayini için üç farklı test bakterisi/besiyeri kombinasyonu geliştirilmiştir. Zamana karşı kondüktanstaki değişim grafiği elde edilerek, tayin gerçekleştirilmiştir. LOD değerleri 10 - 760 $\mu\text{g}/\text{kg}$ değerleri arasında bulunmuştur [105].

2.3.2 İmmunoassay Metodları

İmmunoassay metodları, yüksek spesifiklik, yüksek hassasiyet ve kolay uygulanabilirlik açısından oldukça avantajlı yöntemlerdir. Bu testler antijen-antikor ilişkisine dayalı testlerdir. İmmunoassayler tayin prensiplerine göre ayrılmaktadır. Bunlardan ilki enzim bağlı immunoassaydir (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA). ELISA testi, enzim reaksiyonu ve UV-vis dedeksiyona dayanmaktadır. ELISA testinde enzim-ikincil antikor konjugasyonu inkübe edilip, o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) veya tetrametilbenzidin (TMB) substrat solüsyonu eklenmektedir [92, 106]. Renk oluşumundan sonra 492 nm veya 450 nm'de absorbans ölçümü yapılmaktadır. İmmunoassaylerin diğer bir uygulama şekli ise floreoimmunoassay'dir (Fluoroimmunoassay, FIA). FIA, ELISA'nın yüksek arka plan absorbansı, fazla miktarda inkübasyon ve yıkama basamakları, enzim degradasyonu gibi problemlerini gidermek için önerilmiş bir yöntemdir. Fakat bu yöntemde de, fazla arka plan floresans düzeyi sinyal/gürültü oranının düşmesine neden olmakta ve sınırlı hassasiyet görülmektedir. Zamana bağlı floreoimmunoassay (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) ise, FIA'daki bu problemleri gidermek için uygulanmaktadır. Yöntem uzun-sürelili floroforlarla (lantanit şelat, platinum, pallyyum gibi) işaretlenmiş moleküllere dayanmaktadır. Bu yöntemde örnek matriksinden gelen girişim elimine edilmiştir [92].

Immunoassayler, mikropilaka veya manyetik partikül yüzeyinde gerçekleşebilmektedir. Lamar et al. [107] farklı gıda matrikslerinde bulunda β -laktam türü antibiyotiklerin tayini için protein reseptör prensibine dayalı mikropilaka assay geliştirmiştir. Bu yöntemin en önemli avantajı penisilinler ve sefalosporinler aynı anda tespit edilmektedir. Ayrıca bu çalışmadaki dedeksiyon limitleri 0.5 MKL düzeyindedir.

Mikrotiter plakada UV ölçümüne dayalı indirek yarışmalı ELISA testi uygulanan farklı çalışmalar bulunmaktadır; gatifloksasin tayini için yapılan çalışmada LOD değeri 0.05 $\mu\text{g/L}$ [108], sülfonamid tayini için yapılan çalışmada LOD değerleri 0.6 - 1.0 $\mu\text{g/L}$ arasında [109], perfloksasin tayini için yapılan çalışmada LOD 0.16 $\mu\text{g/L}$ [110] olarak bulunmuştur.

Mikrotiter plakada UV ölçümüne dayalı direk yarışmalı ELISA testi uygulanan çalışmalarda, fluoroquinolon için LOD değeri 1.0 $\mu\text{g/kg}$ [111], nitrofurazonların metaboliti olan semikarbazid için LOD değeri 0.25 $\mu\text{g/kg}$ [112], kloroamfenikol için LOD 0.1 $\mu\text{g/L}$ [113, 114], furazolidon metaboliti olan 3-amino-2-okzazolidinon için LOD 0.05 $\mu\text{g/kg}$ [115] bulunmuştur.

Oksitetrasiklin tayini için yapılan bir çalışmada, mikrotiter plakada indirek yarışmalı TRFIA testi uygulanmış ve LOD değeri 0.08 µg/kg olarak bulunmuştur [116].

Streptomisin ve dihidrostreptomisin tayini yapılan bir çalışmada, örnek ve reaktif, karışım tablasında karıştırılmakta, katı destek ile reaksiyon sonrası floresans ölçümü yapılmaktadır. Bu yüzden bu yöntem katı destekli floroimmunoassay (solid-phase fluoroimmunoassay, SPFIA) olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemde LOD 100-150 µg/kg bulunmuştur [117].

Mikroplaka dışında, manyetik partiküllerin yakalama/zenginleştirme amacı ile kullanılması ile matriks girişiminin azaldığı ve bu sayede metodun doğruluğunun arttığı belirtilmiştir. Yüzey alanının artması ve bu nedenle artan reaksiyon kinetiğinden dolayı analiz performansı da artış göstermektedir. Manyetik nanopartiküllerin kullanılması farklı immunoassay tekniklerin geliştirilmesini sağlamıştır. Font et al. [106] süt örneklerinde sülfonamidlerin saptanması için karşılaştırmalı iki farklı ELISA yöntemi geliştirmiştir; birincisinde manyetik nanopartiküller kullanarak ikincisinde ise mikrotiter plaka kullanarak analiz düzeneği hazırlanmıştır. Çalışmada, maksimum inhibisyon konsantrasyonu yarısı (half maximal inhibitory concentration, IC50) manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı sistemde 7 µg/L'nin altında bulunmuşken, mikrotiter plakanın kullanıldığı sistem 10 µg/L'nin altında bulunmuştur. Manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmada matriks girişiminin düşüklüğünden dolayı doğruluk daha yüksek çıkmıştır.

2.3.3 Biyosensörler

Antibiyotik tayini için önerilen diğer bir analiz sistemi biyosensörlerdir. Biyosensör, biyolojik tanıma elemanı (enzimler, proteinler, nükleik asitler, hücreler, dokular,vb.) ve bu tanıma elemanına bağlı bir sinyal dönüştürücü elemanından oluşmaktadır. Biyosensörler, kullanılan biyolojik tanıma elemanının izin verdiği ölçüde spesifiktirler. İn-situ çalışmalarda hızlı, sürekli kontrol sağlamaktadırlar. Bu avantajlarına rağmen biyosensör dizaynının iki limitasyonu bulunmaktadır. Bunlar; biyolojik tanıma elemanının kararsızlığı ve biyosensörlerde kullanılan fiziko-kimyasal sinyal dönüştürücülerin boyutlarıdır. Biyolojik tanıma elemanı bulunduğu çevrenin pH'sı, sıcaklığı veya iyonik etkileri nedeniyle aktivitesini zamanla kaybedebilmektedir. Sinyal dönüştürücülerin boyutları ise en küçükleri bile µm - mm aralığında bulunmaktadır [92].

Biyosensörler farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar kullanılan biyolojik elemente göre; enzimatik, immünosensör ve mikrobiyolojik, kullanılan sinyal dönüştürücüye göre; piezoelektrik, elektrokimyasal, optik, termal, impedimetrik ve kalorimetrik, biyolojik elementin immobilizasyon tekniğine göre; adsorpsiyon, kovalent bağlanma, çapraz

bağlanma, tutuklama, enkapsülasyon şeklinde farklı dizaynda biyosensörler bulunmaktadır [92].

Biyolojik elementi mikrobiyolojik hücre veya oligonükleotid, sinyali elektrokimyasal ölçüm olan, biyolojik elementi antikor, sinyali impedimetrik ölçüm olan, biyolojik elementi mikrobiyolojik hücre, sinyali optik ölçüm olan yöntemler bulunmaktadır. Literatürde biyolojik elementi antikor sinyali optik ölçüm özellikle de yüzey plazmon rezonansı (SPR) olan yöntemler çoğunluktadır [118-121]. SPR yöntemlerinde işaret kullanılmasına gerek kalmadan biyomoleküllerin interaksyonu gerçek zamanlı tayin edilebilmektedir.

Antibiyotik kalıntılarının tayin edilmesi için biyosensörlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar 1980 yıllarından sonra hız kazanmıştır [94]. Virolainen et al. [104] tarafından önerilen bir biyosensör uygulamasında tetrasiklinlerin tayini için bakteri hücresi kullanılarak luminesans ölçümü yapılmıştır (TetLux testi). Yöntemde inhibisyon takip edilmektedir. Bu yöntemde analiz süresi toplam dört saat olup oksitetrasiklin ve tetrasiklinin her ikisi için de LOD değeri 25 µg/kg olarak bulunmuştur. Bu yöntemin en önemli avantajları ucuz, hızlı ve çoklu analiz yapabilme olanağıdır. Ayrıca degradasyon ürünleri ve metabolitleri de tayin edilebilmektedir. Ferrini et al. [122] tarafından önerilen yöntemde süt örneklerinde β-laktamların tayini için bakteri hücresi ile elektrokimyasal ölçüm alınmıştır. Yöntem test mikroorganizmasının mikrobiyal üremesi sonrası açığa çıkan CO₂'nin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bakteri kültürüne bağlanmış karbondioksit sensörü ile elektrokimyasal ölçümler alınmıştır [122].

Aminoglikozitlerin, sülfonamidlerin, amfenikollerin, fluoroquinolonların tayini için önerilen bir yöntemde mikroarray analiz platformunda SPR ölçümü alınmıştır. Kısa sürede, yüksek spesifiklikte kantitatif sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntemde birden fazla antibiyotik aynı anda tayin edilebilmektedir [118]. Kloroamfenikol tayini için önerilen bir yöntemde yarışmalı inhibisyon analizi ile SPR ölçümü alınmıştır. Bu yöntemde LOD değeri 0.1 µg/L bulunmuştur [119]. Fluoroquinolonların tayini için önerilen bir yöntemde yarışmalı inhibisyon analizi ile 12 farklı fluoroquinolon tayini SPR ile gerçekleştirilmiştir [120]. Fenikollerin tayini için önerilen başka bir yöntemde yarışmalı inhibisyon analizi ile SPR ölçümü alınmıştır ve LOD 0.1 – 250 µg/kg arasında bulunmuştur [121]. β-laktamların tayin edildiği bir yöntemde, yarışmalı biyospesifik interaksyon ile SPR ölçümleri alınmıştır. Yöntemin LOD değerleri 5 – 20 µg/L arasında bulunmuştur [123].

Son zamanlarda, çiftlikteki örneklerde ve gıda ürünlerinde herhangi bir laboratuvar ekipmanına ve uzman personele gerek kalmadan antibiyotik miktarının belirlenmesi ihtiyacı doğmuştur. Bu yüzden, kullanımı kolay dipstik temelli test yöntemleri dizayn edilmiştir. Bu metodlar, yüzeyi kaplanmış dipstik üzerine reseptör bağlanmış yapılardan oluşmaktadır. Link et al. [124] dipstik metodu ile gıdalarda tetrasiklinlerin, streptograminlerin ve makrolidlerin tayinini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada kullanılan dipstik, nitroselüloz, naylon veya polivinilidenprolid (PVDF)'den yapılmaktadır. Bu yöntemde dipstik streptavidin ile kaplanmış ve üzerine biyotin işaretli tanıyıcı DNA bağlanmıştır. Tanıyıcı DNA heksahistidin (His-6) işaretli biyosensör proteinine bağlanmaktadır. Bağlanma sonucu kromojenik substrat renk değiştirmektedir. Spesifik antibiyotiklerin bulunması tanıyıcı DNA ile biyosensör proteini arasındaki etkileşimi azaltmakta ve sinyalde düşüşe neden olmaktadır. Burada ölçüm düzeneği olarak UV-vis spektrofotometre kullanılmıştır. Yöntemin LOD değerleri MKL'den daha düşük olup, 5 – 10 µg/L arasındadır. Balda ve yumurtada tetrasiklinlerin tayini için önerilen bir başka yöntemde yine dipstik metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde işaretlenmiş reseptör ile örnek solüsyonu karıştırılmakta ve dipstik viyal içerisine konarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrasında dipstik, pozitif ve negatif kontrolleri ile karşılaştırılarak sonuca karar verilmektedir [125].

2.3.4 Ticari Antibiyotik Test Kitleri

Sütte kalıntı antibiyotik tayini için, farklı firmalar tarafından piyasaya sürülen farklı isimlerde birçok ticari test kiti bulunmaktadır. Bu testlerden bazıları mikrobiyel inhibisyona dayanırken, bazıları ise antijen-antikor / enzim-substrat ilişkisine dayanmaktadır. Mikrobiyal inhibisyon test kitlerinde süre uzun ve yöntem çoğu antimikrobiyel için kullanılabilir. Antijen-antikor / enzim-substrat ilişkisine dayanan test kitlerinde süre kısa fakat hem kit maliyeti daha yüksek hem de kitler tek bir antibiyotik için selektif olmaktadır. BR, Eclipse, Copan, Delvotest, Lumac, Arla, Charm, Penzyme ve Premi test bunlardan bazılarıdır. Bu testler ile çoğu antibiyotik, izin verilen maksimum kalıntı antibiyotik düzeyinde test edilebilmektedir. Bu testler bilinen limitlerde tayin yapan kalitatif testlerdir. Piyasada şuan farklı isimlerde çok fazla sayıda test kiti bulunmaktadır. Aşağıda bunlardan ancak bazılarına değinilebilmiştir.

Delvotest® P, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* test mikroorganizması ile çalışan bir test kitidir. Bu test kitinde 64°C'de gelişimini sürdüren test bakterisi asit üretmekte ve bakteri gelişimine bağlı olarak indikatör olarak kullanılan bromkresol moru

mordan sarı renge dönmektedir. Ortamda antibiyotik bulunduğu durumda, bakteri üreyememekte ve asit oluşturamamaktadır, dolayısıyla indikatörde renk değişimi gözlenmemektedir. Bu testte analiz süresi 2.5 saattir [126].

BR test® AS-Brillant testinde, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* sporları kullanılmaktadır. Bu test ile geniş spektrumlu antibiyotikler tayin edilebilmektedir. Analiz mikroplakalarda 65°C'de 2.5 saat sürmektedir. Bu testte renk indirgenmesi gözlenmektedir. Kalıntı antibiyotik içeren süt örneklerinde, inkübasyon süresi boyunca bakteri metabolizması inhibe olmakta ve renk mavi kalmaktadır. Antibiyotik içermeyen sütlerde ise, ortamdaki oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucu renk maviden sarıya dönmektedir [127].

Charm inhibisyon testleri ile aminoglikozitler, β-laktamlar, tetrasiklinler, sülfonamidler ve makrolidler tayin edilebilmektedir. Bu testte test bakterisi olarak *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* suşu kullanılmakta ve analiz 64°C'de 2 veya 3 saatte tamamlanmaktadır [128].

Eclipse testinde, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* suşu test bakterisi olarak kullanılmakta olup, geniş spektrumlu antibiyotikler tayin edilebilmektedir. Analiz mikroplakalarda 65°C'de 2.5 saat sürmektedir [129].

CMT-Copan test ile aminoglikozitler, β-laktamlar, tetrasiklinler, sülfonamidler ve makrolidler tayin edilebilmekte olup, test bakterisi olarak *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* suşu kullanılmaktadır. Analiz mikroplakalarda 65°C'de üç saatte gerçekleşmektedir [130].

Valio T101 testi ile geniş spektrumlu antibiyotikler tayin edilebilmektedir. Analiz öncesi örneğe 95°C'de beş dakika ısı işlem uygulanmaktadır. Bu testte test bakterisi olarak *Streptococcus thermophilus* T101 suşu kullanılmaktadır. Analiz tüpte veya mikroplakalarda 42°C'de 4.5 saat sürmektedir [92].

Premi test, hayvansal ürünlerde antibiyotik kalıntılarını termofilik bir bakteri olan *Bacillus stearothermophilus*'un inhibisyonu ile 4 saatten daha kısa sürede belirleyebilen bir test kitidir. Bu test kitinde *Bacillus stearothermophilus*'un sporları kullanılmaktadır. Sıcaklık 64°C'ye getirildiğinde spor formlar çimlenerek vejetatif hale gelmektedir. Ortamda inhibitör madde olmadığında, vejetatif hale gelen hücreler üreyerek asit meydana getirmekte ve indikatörün rengi mordan sarı renge dönüşmektedir. İnhibitör bulunduğu

durumda sporlar çimlenemeyecek ve indikatör rengi değişmeden kalacaktır. Premi test ile β -laktamlar, sefalosporinler, makrolidler, tetrasiklinler, aminoglikozitler, kinolonlar, amfenikoller ve polipeptidler et, balık, yumurta böbrek, karaciğer, bal, idrar ve yemde tayin edilebilmektedir [131].

Charm II β -laktam testinde, β -laktam türü antibiyotikleri bağlayan spesifik reseptör bölgeleri olan bir ajan eklenmektedir. Bu bağlayıcı ajan ile birlikte işaretli penisilin ortama eklenmektedir. Eğer örnekte penisilin varsa bağlanma bölgesine bağlanmak için işaretli penisilin ile yarışacaktır. Penisilin miktarı arttıkça, ortamda serbest işaretli penisilin miktarı artmaktadır. Örnekte penisilin bulunmadığı durumda, işaretli penisilinler bağlanma bölgesine bağlanacak ve daha az serbest işaretli penisilin bulunacaktır. Bu test ile sonuçlar 10-15 dakikada alınabilmektedir [96, 132]. Charm II® testleri, β -laktamlar dışında tetrasiklinler, aminoglikozitler, amfenikoller, sulfonamidler, makrolidler içinde ayrı ayrı bulunmaktadır [133].

Penzyme®/ Penzyme® III testi, DD-karboksiptidaz enziminin β -laktam antibiyotiğine yarışmalı bağlanması prensibine göre çalışmaktadır. Enzim ve örnek $47\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika inkübe edilmekte ve ardından [(R)-D-AIa-D-AIa] substratı ilave edilmektedir. Antibiyotiğe bağlanmadan kalan enzim, bu substratla reaksiyona girmektedir. Substrat tablet halinde olup, çözünmeye başladıkça ortama sarı renk vermektedir. Tablet aynı zamanda D-alanin piruvat ve H_2O_2 'nin oluşması ve H_2O_2 'nin okside olduğunda renk değiştirmesi için gerekli kimyasalları içermektedir. Tablet eklendikten sonra $47\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika inkübasyona devam edilmektedir. Pembe renk oluşumu β -laktam türü antibiyotiğin bulunmadığını, sarı renk ise β -laktam türü antibiyotiğin bulunduğunu göstermektedir. Bu test ile çiğ sütte 0.01 IU/mL düzeyindeki β -laktamlar tayin edilebilmektedir [96, 134].

2.4 Yeşil Floresans Proteini (Green Fluorescent Protein)

Davenport ve Nicol 1955 yılında deniz anası *Aequorea victoria*'nın uzun dalga boylu ultraviyole ışınları ile uyarıldığında yeşil floresans yaydıklarını keşfetmişlerdir [135]. Shimomura ve ark. 1962 yılında, bu yeşil floresansın kaynağı olan proteini *Aequorea victoria*'dan ekstrakte etmiştir [136]. Bu protein yeşil floresans protein (Green Fluorescent Protein, GFP) olarak tanımlanmıştır. Prasher ve ark. GFP'nin gen dizisini tanımlamışlar [137] ve sonrasında Chalfie ve ark. tarafından GFP ekspresyonu ökaryotik (*Caenorhabditis elegans*) ve prokaryotik (*Escherichia coli*) hücrede gerçekleştirilmiştir [138].

GFP çok çeşitli çalışmalarda yaygın kullanım alanı bulmuştur. Örneğin; hücrede kalsiyum seviyesinin ölçülmesinde [139-141], hücrede transmembran voltajının ölçülmesinde [142], intra-selüler protein ve interaksiyonlarının izlenmesinde [143, 144], rekombinant proteinlerin çözünürlüklerinin *in vivo* incelenmesinde [145], hücre içerisinde incelenmek istenen proteinin katlanma ve çözünürlük durumlarının incelenmesinde, özellikle Alzheimer hastalığında rolü önemli olan protein agregasyonunun izlenmesinde [146, 147], tek hücre lokasyonunun izlenmesinde [148, 149], pH değişiminin, spesifik iyonların (Cl veya Ca^{+2}), reaktif oksijenin, redoks durumunun ve spesifik peptidlerin izlenmesinde [150-160], hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rolü olan GTPaz aktivitesinin izlenmesinde [161], antioksidan aktivitenin belirlenmesinde [162] kullanılmıştır.

2.4.1 GFP'nin keşfi

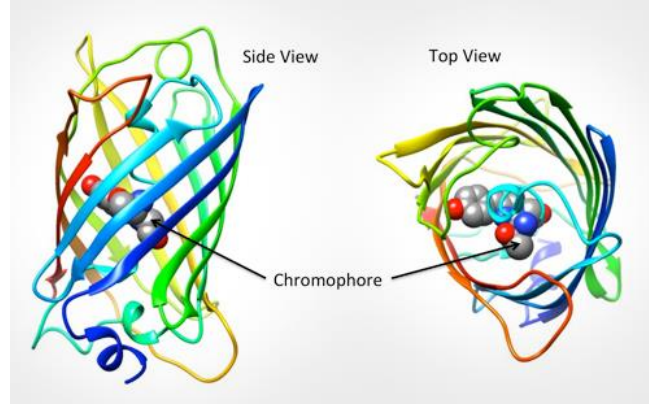
Dr. Frank Johson ve Dr. Osamu Shimomura, 1961 yılının Haziran ayında denizanası *Aequorea victoria*'nın biyoluminesans özellikleri üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar, sonradan 'aequorin' olarak adlandırılan, denizanasından ışık emisyonu yapan maddeyi izole etmek için pratik bir metod araştırmışlardır. Deneylerin gidişatı sırasında, canlı örneklerdeki yeşil luminesansa benzer yeşil emisyon yerine, ekstraktan emisyon yapan ışığın mavi olduğunu gördüklerinde oldukça şaşırılmışlar fakat bunun sebebinin ancak 10 yıl sonrasında anlayabilmişlerdir [163].

Dr. Osamu Shimomura çalışmalar sonrasında denizanası ekstraktlarından, ışık saçan maddeyi saflaştırmıştır. Bu madde aequorin adında bir protein olup, Ca^{+2} varlığında ışık emisyonu yapabilmektedir. Aequorin'in saflaştırılması sırasında, denizanası ekstraktlarında yeşil floresans proteininin varlığı keşfedilmiştir. Kolon kromatografisinde, Sephadex G-100 kolonunda yeşil floresans band aequorin bandı ile birlikte hareket ederken, DEAE-selüloz kolonunda aequorin bandının önünde ilerlediği tespit edilmiştir. Yeşil floresans veren maddenin denizanasında varlığı daha öncesinden bilinmesine rağmen [135], bu madde ilk kez izole edilerek protein olduğu tespit edilmiştir [136]. Bu keşiften sonra aequorinin luminesans spektrumu ve yeşil proteinin floresans spektrumu ile ilgili ilk çalışmalar hızla yayınlanmıştır [164]. Aequorinin luminesans spektrumu geniş olup 460 nm'de iken, yeşil proteinin floresans spektrumu ise keskin olup 508 nm'de pik şeklinde gözlenmektedir [163]. Deniz anasında bu iki protein de bulunmakta olup, aequorin Ca^{+2} varlığında mavi emisyon yaparken, yeşil protein uyarıldığında yeşil floresans emisyonu yapmaktadır. İlk ekstraksiyon çalışmalarında, canlı örneklerdeki yeşil luminesansa benzer

yeşil emisyon yerine, mavi emisyonun görülmesinin nedeni ancak bu çalışmalar sonucunda anlaşılabilmiştir. Bundan sonraki yıllarda ise, GFP ile ilgili çalışmalar hızla artmıştır.

2.4.2 GFP'nin üç boyutlu yapısı ve florofor

GFP, günümüzde, biyolojik marker olarak proteinleri, hücreleri, organizmaları işaretlemek için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kadar yaygın şekilde GFP kullanımının en önemli sebeplerinden biri, proteinin hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymadan floresans ışması yapmasıdır. Florofor peptidin siklizasyonu sonucu kendiliğinden oluşmaktadır. GFP'nin diğer bir özelliği ise, bulunduğu hücrede herhangi bir değişime neden olmamasıdır. Ayrıca GFP'nin yüksek stabilitesi marker olarak kullanımını arttırmaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra düşük maliyetli ve kolay kullanım avantajlarından dolayı daha önce biyolojik marker olarak kullanılan lusiferaz ve β -galaktosidazın yerine kullanılmasına yol açmıştır. GFP'nin termal stabilite ve proteolize karşı direnç gibi özelliklerinin nedeni, GFP'nin merkezdeki kromoforunun 11 adet β -sheet yapısındaki peptid zinciri ile korunmuş konserve kutusu şeklindeki eşsiz üç boyutlu yapısıdır. Bu konserve kutusu şeklindeki silindirin içerisinde ise bir adet α -heliks, silindirin alt üst kısmını ise kısa halkalar ve bozulmuş α -heliks yapıları kapatmaktadır. Dışarıda β yapısı içeride ise α -heliks yapısı bulunan bu motif yeni bir protein katlanması olup, bu yapıya Yang ve ark. tarafından " β -can" ismi verilmiştir [165]. Silindirin çapı 30 Å, boyu ise 40 Å'dur ve içerisinde su molekülleri bulunmaktadır. Florofor oluşumunu sağlayan kritik dizilim içerideki Ser-Tyr-Gly'dir. Bu dizilimin siklizasyonu sonucu florofor oluşmaktadır. Florofor oluşumu için iki faktör gereklidir. İlki 65 ve 67 pozisyonlarındaki aminoasit atomlarının birbirlerine oldukça yakın konumlanması, diğeri ise siklizasyonu katalizleyen asit-baz dengesidir [163]. Siklizasyon, 67 pozisyonundaki Gly'nin azot atomunun 65 pozisyonundaki Ser'nin karbonil karbon atomuna nükleofilik atağı ile oluşmaktadır. Bu reaksiyon beş üyeli imidazolon halkası oluşumuna neden olmaktadır. Floroforun etrafında aminoasitlerin polar ve apolar yan zincirleri ve immobilize su molekülleri bulunmaktadır. Doğal fenotip GFP'de zayıf da olsa dimerizasyon görülmektedir. Dimer bağlanma noktaları merkezde her iki monomerin de Ala206, Leu221 ve Phe223 hidrofobik yan zincirlerinden ve bunun dışında Tyr39, Glu142, Asn144, Asn146, Tyr151, Arg168, Glu172, Tyr200, Ser202, Gln204 ve Ser208 içeren bir sürü hidrofilik kontakt noktalarından oluşmaktadır [165].



Şekil 2.1. GFP'nin üç boyutlu yapısının yandan ve üstten görünümü [166]

GFP'deki kromofor oluşumu için moleküler oksijen gereksinimi bulunmaktadır. Ayrıca, GFP'nin hüresiz ortamda ekspres edilebilmesi, apoproteinin siklizasyonu için başka kofaktör veya enzim gereksinimi olmadan kromoforun floresans hale geldiği konusundaki inanışları kuvvetlendirmektedir [167].

GFP'nin izoelektrik noktası 4.6 – 5.1 arasında olup, asidik globüler bir moleküldür. Monomerin molekül ağırlığı 27 kDa'dur [163]. Tam boy doğal fenotik rekombinant bir GFP'de 238 adet aminoasit bulunmakta olup C-terminal aminoasit dizilimi His-Gly-Met-Asp-Glu-Tyr-Lys'dir [137]. GFP proteinin proteolize dirençli iç kısmı hariç, C-terminal kuyruğu karboksipeptidaz ve diğer proteazlar tarafından hidrolize olabilmektedir [163].

GFP'deki floroforun korunması o kadar güçlüdür ki akrilamidler, halidler ve moleküler oksijen gibi klasik floresans sönmüleyicileri bile GFP'nin floresansına etki edememektedir [168]. GFP'nin T_m (floresansın yarıya düşmesi için gerekli sıcaklık) değeri yaklaşık olarak 76°C'dir [163]. Isı ile denaturasyon dışındaki diğer denaturasyon işlemleri sonucunda GFP tekrar renature olabilmektedir. pH 5.5 ve 10 arasında kararlı olup, pH 4.5-5.5 arasında floresans yarı kararlıdır ve zamanla sönmülenme gerçekleşmektedir. pH 10 ve üzerinde ise uyarma dalgaboyunda büyük kaymalar gözlenmektedir. pH'ya bağlı spektral kaymaların olası sebebi kromofor imidazolündeki enol formunun stabilizasyonunu sağlayan kromofordaki tirozin aminoasitinin iyonizasyonu ve/veya arjininin deprotonasyonudur [163]. Asit ve baz denaturasyonu sonucunda GFP çoğunlukla renature olmaktadır.

2.4.3 GFP Uyarma ve Emisyon Bandları

GFP, aequorin ve lusiferaz gibi diğer proteinlerin mavi kemilüminesansını yeşil floresans ışığına çevirmektedir [169]. Doğal fenotip GFP'nin emisyon bandı genellikle 490-520 nm arasında olup çoğunlukla maksimum değeri 508-509 nm'dir. Uyarma bandı ise 395-498 nm gibi daha geniş bir aralıktadır. Uyarma pikinin ilki 395 nm'de diğeri ise omuz şeklinde

yaklaşık 475 nm'de gözlenmektedir [163]. 395 nm'de devamlı uyarma, 395 nm'deki uyarma dalgaboyunda düşüşe, 475 nm'deki dalgaboyunda artışa neden olmaktadır [138]. Bu ara çevirim GFP UV ışınları ile uyarıldığında daha belli olmaktadır. Bu yüzden GFP üzerine çalışan çoğu araştırmacı uyarma dalgaboyu olarak minör pik olan 475 nm'yi kullanmayı tercih etmektedirler.

2.4.4 GFP Mutasyonları

GFP'nin kristal yapısı anlaşıldıktan sonra, florofordaki veya florofora yakın konumdaki aminoasitlerin değiştirilmesi ile farklı GFP mutantlarının geliştirilebileceği anlaşılmıştır. Florofordaki veya florofora yakın konumdaki aminositlerin modifikasyonu ile GFP'nin uyarma ve emisyon dalgaboylarında kaymalar ve intensitelerinde değişimler de gözlenmektedir. Örneğin, ortadaki Tyr66'nın Phe veya His ile değişmesi uyarma bandında kaymaya ve intensitede azalmaya neden olmakta, Ser65'in Thr ile değişmesi ise floresansta artışa neden olmaktadır [167, 170]. Yine, Phe99'nin Ser ile, Met153'nin Thr ile, Val1'nin Ala ile değişmesi sonucu oluşan GFP, doğal fenotip GFP'nin floresans intensitesinin yaklaşık 42 katı intensiteye sahip olmaktadır [171]. Ser65'in Gly, Ala, Cys, Thr veya Leu gibi nötr aminoasitlerle mutasyonu, floroforun temel enerji düzeyinde iyonlaşmasına neden olarak uyarma spektrumunu sadeleştirmektedir. Bu spektrumda 470 – 490 nm arasında tek bir uyarma piki gözlenmekte ve bu pik doğal fenotip GFP'nin 475 nm'deki minör pikten yaklaşık 6 kat daha fazla intensite göstermektedir. Bu durumun sebebi doğal fenotip GFP'de iyonlaşma mutant GFP'lerin altıda biri kadar olmasıdır [170].

Araştırmacılar özellikle GFP mutasyonu ile uyarma bandını daha aşağı yerine yukarı dalgaboylarına kaydırmayı tercih ederler. Bunun sebebi, kısa dalgaboylu UV ışınlarının hücrelere zararlı etkisi ve UV ışınlarının hücresel kaynaklı otofloresansı daha da artırmasıdır. Ayrıca daha kısa dalgaboylu ışınlar daha pahalı optik ve dedeksiyon sistemlerine ihtiyaç duymaktadır [163].

Az sayıdaki GFP mutanı hem uyarma hem de emisyon dalgaboylarında kaymalara neden olmaktadır. Bu konudaki çalışmalarda esas amaç uzun dalgaboylu mutantlar elde etmektir. Bu mutantlara 'red-shifted' denilmektedir. T203Y mutanı, Thr203'ün florofora oldukça yakın konumlası nedeni ile dizayn edilmiştir. Floroforun yanındaki alifatik yan zincirin aromatiklerle değişmesi kromoforun lokal polarlanabilirliğini artırmaktadır. T203Y uyarma ve emisyon dalgaboylarında, S65T mutantına göre sırası ile 24 ve 16 nm artışa neden olmuştur. [172]. Diğer bir mutant M153A da uyarma ve emisyon dalgaboylarında S65T mutantına göre sırası ile 15 ve 3 nm artışa neden olmuştur [173].

Mutasyonların büyük bir kısmı spektral özellikleri değişmeden doğru katlanıp floresans hale gelen GFP moleküllerinin oranını artırmaya yöneliktir. *A.victoria*'nın ürettiği floresans proteininde sıcaklık 15-20°C'nin üzerine çıktığında üretilen protein miktarı azalmaktadır. Bu durum bakteri veya hücre ile çalışıldığında dezavantaj olmaktadır. Bunun dışında, *E. coli*'de yüksek miktarda protein üretimi ise hücreler arasında floresans özellikte olmayan proteinlerin birikimine neden olmaktadır [174]. Bu iki problem de GFP'ye uygun aminoasitler konarak giderilebilmektedir [171, 173-177]. F99S ve M153T mutasyonlarında yan zincirler dışa dönerek yüzey hidrofobitesi azaltmakta ve agregasyon engellenerek, parlaklıkta artışa neden olmaktadır. Bu mutantlar doğal fenotipe göre 37°C'de floresans oluşum hızında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır [171]. V163A ve S175G mutasyonları birlikte protein üretimini artırmasına rağmen, aerobik floresans oluşumunu yavaşlatmaktadır [174].

GFP'nin dimerizasyonu da A206, L221 ve F223 pozisyonlarındaki hidrofobiklikten kaynaklanmaktadır. Bu aminoasitlerin pozitif yüklü aminoasitlerle örneğin; A206K, L221K ve F223R mutasyonu sonucu GFP monomerleri interaksiyona girememekte ve dimerizasyon oluşmamaktadır [178].

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Tez kapsamında kloroamfenikol (Sigma C0378), ampisilin (Sigma A9393), basitrasin A (Fluka 31626), benzilpenisilin (penisilin G) (Sigma 13752), furazolidon (Fluka 46297), gentamisin (Sigma G1914), linkomisin (Sigma 62143), neomisin (Fluka 72133), sefazolin (Sigma C5020), spektinomisin (Fluka 46738), spiramisin (Fluka 46745), streptomisin (Sigma S6501), sulfadiazin (Sigma S8626), tetrasiklin (Sigma 87128), antibiyotikleri kullanılmıştır. Kloroamfenikol, kullanılan hücredeki plazmidte kloroamfenikol direnç geni olduğundan, bütün analizlerde besiyeri ortamına ilave edilirken, diğer antibiyotikler, geliştirilen yöntem ile analiz edilmek amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada kıyaslama amacıyla kullanılan Charm CowSide II antibiyotik tayin kiti Maysa Gıda San. ve Tic. A.Ş.(İstanbul) den temin edilmiştir.

Besiyeri olarak Luria Bertani (LB) Broth-Lennox (Conda, Pronadisa) kullanılmıştır. Besiyeri bileşiminde tripton, maya ekstraktı ve sodyum klorür bulunmaktadır. Bu besiyeri rekombinant *E. coli*'lerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Besiyeri içeriğindeki tripton büyüme için gerekli nitrojen, vitamin, mineral ve amino asitin kaynağını oluşturmaktadır. Maya ekstraktı özellikle B grubu vitaminlerin kaynağını oluşturmaktadır. Sodyum klorür, osmotik denge ve transport için gerekli olan elektrolitleri karşılamaktadır. LB besiyeri hazırlandıktan sonra, 121°C 15 dk otoklavda sterilize edilmekte, ve kullanmadan önce içerisine son konsantrasyonu 25 µg/mL olacak şekilde membran filtrasyon ile sterilize edilmiş kloroamfenikol çözeltisi eklenmektedir. LB-Lennox agar besiyeri ise, plazmid aktarımı sonrası, hücrelerin seçilmesinde kullanılmıştır. Bileşimi LB Broth-Lennox besiyeri ile aynı olup içerisinde sadece ilavaten katılaştırıcı ajan olan agar bulunmaktadır.

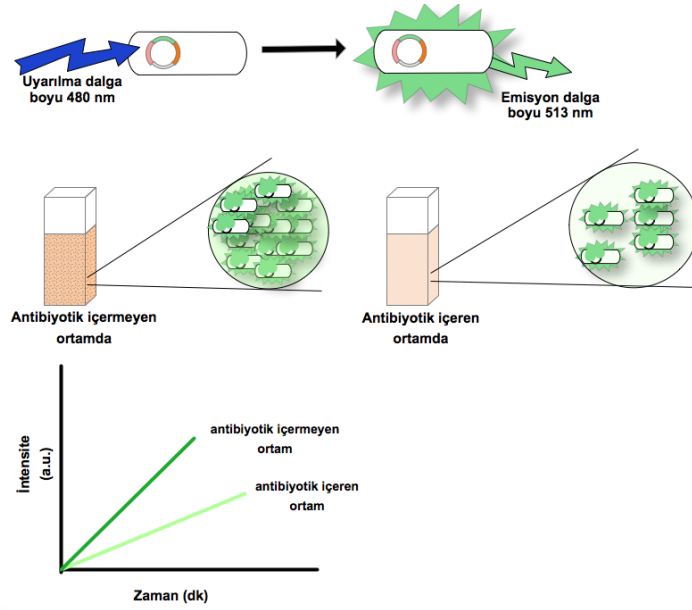
E. coli BL21(DE3) hücreleri, kloroamfenikol direnç ve GFP geni taşıyan konstitutif promoterli plazmid içeren *E. coli* DH5α hücreleri Yrd. Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak Şeker tarafından hediye edilmiştir. GFP, uyarıldığında floresans ışması yapabilme özelliği nedeniyle antibiyotik tayini için geliştirilen yöntemde sensör olarak kullanılmaktadır (Basit ışık ve floresans spektrofotometresinde *E. coli* için elde edilen görüntüler EK 1'de verilmiştir). Kullanılan plazmidte GFP herhangi bir indükleyici ajana gerek kalmadan konstitutif promoter sayesinde kendiliğinden oluşmaktadır. Hem GFP'li *E. coli*'nin seçilmesi hem de gerçek örnekler denemelerindeki kontaminasyonu engellemek için antibiyotik (kloroamfenikol) direnç geni de *E. coli* plazmidinde bulunmaktadır. Gerçek

örnek denemelerinde süttten gelen diğer mikroorganizmaların analiz sistemine etki etmemesi için inhibe edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla kloroamfenikol, besiyeri ortamına eklenmiş ve süt kaynaklı diğer mikroorganizmalar olası etkileri elimine edilmiştir. Besiyerinde diğer mikroorganizmalar inhibe olurken, tayin sistemindeki GFP'li *E. coli*, kloroamfenikol direnç geni sayesinde bundan etkilenmemiştir. Kloroamfenikol, yasaklı maddeler kategorisinde olup, hayvansal gıdalarda bulunmaması gerekmektedir [43].

3.2 Analiz Yöntemi

GFP geni ve aynı zamanda kloroamfenikol direnç geni taşıyan *E. coli* hücrelerinin analiz öncesinde 18 saatlik kültürü elde edilmiştir (inkübasyon 37°C'lik su banyosunda gerçekleştirilmiştir). Bu amaçla, erlende 25 µg/mL kloroamfenikol içeren 20 mL LB broth ortamı kullanılmıştır. Analiz için erlendeki kloroamfenikol içeren LB broth besiyerine antibiyotikler farklı konsantrasyonlarda eklenerek ve 37°C'lik su banyosunda inkübasyon devam ederken zamana karşı UV-vis spektrofotometrede optik dansite, floresans spektrofotometresinde ise floresans ölçümleri alınmıştır. Her bir antibiyotik konsantrasyonu için zamana karşı elde edilen floresans intensitesi grafiklerinin eğimi karşılaştırılarak örneklerdeki antibiyotik düzeyi belirlenmiştir.

Optik dansite ölçümleri Thermo Scientific Evolution 201 UV-vis spektrofotometre kullanılmıştır (Thermo, Shanghai, China). Optik dansite için 545 nm'deki absorbans değerleri alınmıştır. Floresans ölçümleri için Varian Cary Eclipse spektrofotometre kullanılmıştır (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA.). Uyarmadaki ışık kaynağı ksenon lambasıdır. Ölçümler scan modunda; uyarma 480 nm, emisyon aralığı 488 – 700 nm, simple read modunda; uyarma dalgaboyu 480 nm, emisyon dalgaboyu 513 nm'de alınmıştır. Uyarma ve emisyon slit aralıkları; 18 saatlik kültür için her ikisi de 5 nm iken, kinetik ölçümlerde sırası ile 5 nm ve 10 nm'dir. Floresans görüntüleri, 100x objektifle LEICA DM14000 B floresans mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir (Leica, Wetzlar, Germany).



Şekil 3.1. Analiz yönteminin şematik gösterimi

3.3 Optimizasyon Çalışmaları

3.3.1 Kültür pH'sının Etkisi

18 saatlik GFP'li kültürün pH'sı değiştirilerek (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5) floresans spektrofotometresinde, uyarma ve emisyon spektrumları alınmıştır.

Uyarma grafiği için, emisyon 513 nm, start 300 nm, stop 509 nm, Uyarma slit aralığı 5 nm, Emisyon slit aralığı 10 nm parametreleri kullanılmıştır.

Emisyon grafiği için, uyarma 480 nm, start 488 nm, stop 700 nm, Uyarma slit aralığı 5 nm, Emisyon slit aralığı 10 nm parametreleri kullanılmıştır.

3.3.2 Besiyeri pH'sının Etkisi

25 µg/mL kloroamfenikol içeren LB Broth besiyerinin pH'sı (pH 7.0, 8.0, 8.5, 9.0) ayarlanarak, inkübasyon bu pH'larda yapılmıştır. Belirli zaman aralıklarında UV-vis spektrofotometrede 545 nm'de optik dansite ve pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.3 Yıkamanın Etkisi

Yıkama için pH 8.5 fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen kültür 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant (besiyeri) uzaklaştırılmış, hücre peleti üzerine pH 8.5 fosfat tamponu eklenmiştir. Yıkamanın etkisini gözlemlemek için, 18 saatlik GFP'li *E. coli* hücresi geliştirilerek, dört yıkama aşamasında hem supernatant kısmının hem de kültürün floresans ölçümleri alınmıştır. Yıkama öncesi ve sonrası ölçümleri karşılaştırmak için floresans spektrofotometresinde uyarma ve emisyon spektrumları alınmıştır.

3.3.4 Çalkalamalı Kültür Eldesinin Etkisi

Çalkalamanın etkisini gözlemleyebilmek için, daha geniş kültür kaplarında, çalkalamalı su banyosunda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda, elde edilen kültürlerin optik dansitesi 545 nm dalgaboyunda UV-vis spektrofotometre ile floresans intensitesi floresans spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

3.3.5 Besiyerindeki Tuz Konsantrasyonu

Besiyerindeki farklı tuz konsantrasyonunun optik dansite ve floresans intensitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla farklı tuz oranlarında bulunan LB besiyerleri kullanılmıştır. Bunlar;

- LB-Luria Broth: Besiyeri hazır karışım halinde bulunmadığından, içerisindeki maddeler ayrı ayrı temin edilerek besiyeri hazırlanmıştır. Bileşimi: 10 g/L tripton, 5 g/L maya ekstraktı, 0.5 g/L NaCl
- LB-Lennox Broth: Besiyeri hazır karışım halinde bulunmaktadır (Conda, Pronadisa). Bileşimi: 10 g/L tripton, 5 g/L maya ekstraktı, 5 g/L NaCl
- LB-Miller Broth: Besiyeri hazır karışım halinde bulunmaktadır (Merck). Bileşimi: 10 g/L kazein peptonu, 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L NaCl

Farklı besiyerleri dışında, tuzun etkisini incelemek için besiyeri bileşenleri sabit tutularak NaCl miktarı artırılmıştır. Bu amaçla, 10 g/L maya ekstraktı, 5 g/L tripton bileşenleri ile farklı NaCl konsantrasyonlarında (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerleri hazırlanmıştır.

3.3.6 Yıkama Tamponu Tuz Konsantrasyonu

Yıkama tamponu olarak farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15 ve 30 g/L) pH 8.5 fosfat tamponunun floresans spektrumuna etkisi incelenmiştir.

3.3.7 Analize Alınacak Kültür Konsantrasyonu

Analize alınacak kültür miktarının belirlenmesinde farklı oranlarda (% 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 ve 5) 18 saatlik GFP'li kültür kullanılmıştır. Farklı oranlarda kültür ilavesi ile, optimum oranı saptamak için analiz için kontrol (antibiyotik içermeyen) ve belirli bir miktar antibiyotik içeren örnek (bu çalışmada 200 ppb tetrasiklin kullanılmıştır) analize alınmıştır. Her bir oranda kontrol ve antibiyotikli örnek için eğim değerleri elde edilmiştir. Elde edilen bu eğim değerlerinden kontrolün eğim değerinin antibiyotikli eğim değerine oranı en yüksek çıkan oran, optimum oran olarak belirlenmiştir.

3.3.8 Plazmidin *E. coli* DH5 α Hücrelerinden Eldesi ve *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Aktarılması

3.3.8.1 *E. coli* DH5 α hücrelerinden plazmid eldesi

NucleoSpin[®] Plazmid Saflaştırma Kit Prosedürü

- 18 saatlik kültür / 37°C su banyosu

20 mL LB besiyeri steril erlen içerisine 500 μ L kloroamfenikol + 200 μ L GFP'li DH5 α inoküle edilir.

- Kültür elde etme

Elde edilen kültür, 11000 g 30 sn santrifüj edilerek, supernatant uzaklaştırılır.

- Hücre lizisi

Pelet üzerine, 250 μ L A₁ tamponu eklenir ve vortekslenir. A₁ tamponu RNAz içerir. Tamamen çözündükten sonra üzerine, 250 μ L A₂ tamponu eklenir ve vortekslemeden 6-8 kez alt üst edilerek karıştırılır. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. Bu arada bu karışım mavi renk almaktadır. A₂ tamponu NaOH, SDS içermektedir. Bu yöntemle lizis gerçekleşmekte plazmid açığa çıkmaktadır. Vortekslenmemesinin nedeni, DNA'nın parçalanmadan eldesini gerçekleştirmektir. Bu karışım üzerine, 300 μ L A₃ tamponu eklenir ve yine vortekslemeden, alt üst ederek karıştırılır. Bu işlem sırasında renk maviden, renksiz dönmektedir. A₃ tamponu KCH₃COO (potasyum asetat), CH₃COOH (asetik asit) içermekte olup nötralizasyon için kullanılmaktadır (pH 7.0'ye getirilir). Bu işlem sonunda plazmid açıkta kalır, diğer hücre organelleri presipite olur.

- Lizat temizlenmesi

11000 g'de 5 dk santrifüj edilir ve santrifüj sonrası plazmid üst berrak kısımda kalır.

- DNA'nın bağlanması

2 mL toplama tüpünün içerisine Nucleospin[®] Plazmid kolonu yerleştirilir ve santrifüj sonrası elde edilen supernatant (maks. 750 μ L) kolona eklenir. Sıvı kısım kolondan geçerken plazmid kolona bağlanır. 11000 g'de 1 dk santrifüj edilir ve alttaki sıvı kısım atılır.

- Silika membranın yıkanması

Opsiyonel: Kolona, 500 µL A_w tamponu eklenerek 11000 g'de 1 dk santrifüj edilir. A_w tamponu tuz içermekte olup, kolonda kalan kontaminantları gidermek için kullanılmaktadır.

600 µL A₄ tamponu eklenerek, 11000 g'de 1 dk santrifüj edilir. Supernatant uzaklaştırılarak, kolon tekrar tüpe yerleştirilir. A₄ tamponu, % 70 etanol içermektedir. DNA % 70'lik alkolde çözünmemektedir.

- Silika membranın kurutulması

11000 g'de 2 dk santrifüj edilir ve toplama tüpü atılır.

- DNA'nın kolondan alınması

Genel Prosedür: Kolon eppendorfa alınır, 50 µL A_E tamponu kolona verilir. 1 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 11000 g'de 1 dk santrifüj edilir. Bu işlem ile plazmid membrandan alınır.

Uygulamadaki Değişiklik:

- A_E tamponu ~60°C'ye ısıtılmaktadır.
- 30 µL A_E tamponu kullanılmaktadır.
- Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmektedir.

3.3.8.2 Kompetant hücre hazırlama

Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetant bakteri denilmektedir. Bakterilerin kompetant hale getirilmeleri için kimyasal veya fiziksel yöntemlerin uygulanması gerekmektedir. Bu yöntemlerle membranın geçirgenliği kısa süreli olarak değiştirilerek DNA'nın hücreye girişi sağlanmaktadır. Tez kapsamında Ca²⁺ kompetant bakteriler hazırlanmıştır. Bu amaçla;

- 18 saatlik kompetant *E. coli* hücrelerinden 250 µL alınarak 25 mL LB Broth besiyerine aktarılır ve 3.5 saat 37°C'de karıştırıcılı su banyosunda inkübe edilir
- Kültür falkon tüpüne aktarılarak buz içerisinde 10 dk inkübe edilir
- 4°C'de 6000 rpm'de 3 dk kültür santrifüj edilir
- Supernatant uzaklaştırılarak, pelet 10 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözündürülür
- Buz içerisinde 20 dakika daha inkübe edilir
- 4°C'de 6000 rpm'de 3 dk kültür santrifüj edilir

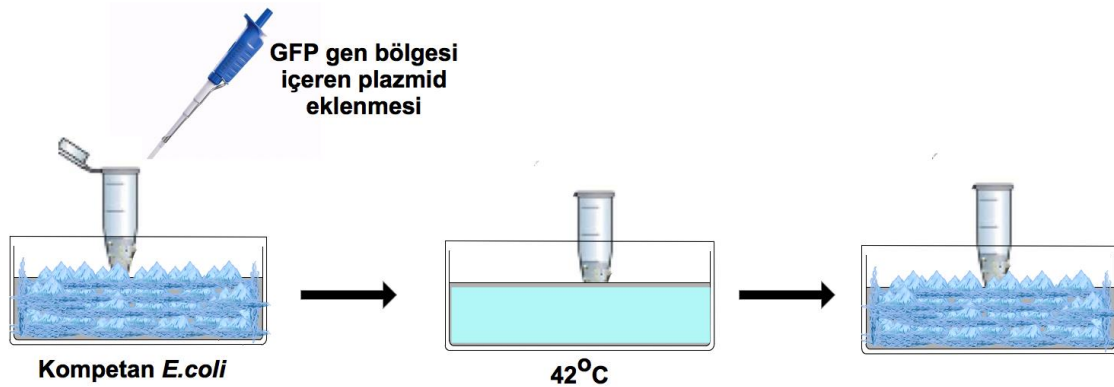
- Süpernetant uzaklaştırılarak, pelet 5 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözündürülür.

Elde edilen kültür çözeltilisi, 500 µL'lik eppendorflara paylaştırılarak, üzerine eşit hacimde gliserol konulup -80°C'de saklanmaktadır.

3.3.8.3 Plazmidin *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarılması

Bu amaçla aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

- *E. coli* BL21(DE3) kompetant hücre stoğundan 50 µL alınarak transformasyon tüpüne konulmaktadır.
- Üzerine yaklaşık 10 µL plazmid eklenir ve vorteks kullanmadan 4-5 kez alt üst edilerek karıştırılmaktadır.
- 30 dk buz içinde bekletilmektedir.
- 42°C'de 10 sn ısı şoku uygulanmaktadır.
- Tekrar buz içinde 5 dk bekletilmektedir.
- Üzerine 950 µL oda sıcaklığında LB Broth eklenmektedir.
- Su banyosunda 37°C'de 250 rpm karıştırma hızında 60 dk inkübasyona bırakılmaktadır.
- İnkübasyon sonunda, kloroamfenikol içeren LB agar Petrilere 100 µL aktarılarak yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmaktadır.
- 37°C'de 1 gece inkübasyon sonrası üreme görülen Petrilere, tek koloni seçimi yapılarak kültür hazırlanmaktadır (1 koloni, 20 mL LB + 500 µL kloroamfenikol içeren besiyerine aktarılmaktadır.).



Şekil 3.2. Plazmidin *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarımının şematik gösterimi

Bu işlemler sonrasında daha önce kullanılan *E. coli* DH5α ve yeni elde edilen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin hem yoğunluğunun hem de birim hücre başına elde edilen GFP

miktarının karşılaştırılması için, her iki hücreden ekim yapılmaktadır. 18 saat sonra elde edilen kültürlerin UV spektrofotometresinde 545 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Ayrıca, her iki kültürün absorbans değerleri, yaklaşık olarak 1.2 değerine ayarlanarak floresans spektrofotometresinde floresans ölçümleri yapılmıştır.

3.3.9 Pasaj Sayısının ve Kültür İnokülasyon Oranının Hücre Yoğunluğuna Etkisi

Stok gliserol kültüründen ve 2. pasajdaki kültürden LB ve 2xLB besiyerlerine farklı inokülasyon oranlarında (% 0.25, % 0.5 ve %1.0) ekimler gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde hem pasaj sayısı hem de kültür inokülasyon oranının etkisi birlikte incelenmiştir.

3.3.10 Besiyeri Bileşen Optimizasyonu

LB Broth besiyerine, laktoz (son konsantrasyon % 1 olacak şekilde), glukoz (20 mM), pepton (son konsantrasyon % 2 olacak şekilde), maya ekstraktı (son konsantrasyon % 1 ve %5 olacak şekilde) ve piyasadan alınan farklı markaların vitamin mineral kompleksi (Solgar, Elevit, Decavit, Sunday) eklenmiştir. Bu denemelerin dışında 2xLB, 3xLB ve 4xLB denenmiştir. 2xLB, LB broth besiyeri bileşimi 2 katına, 3xLB'de 3 katına, 4xLB'de ise 4 katına çıkarılarak hazırlanmıştır.

UV-vis spektrofotometrede optik dansite ölçümleri, floresans spektrofotometresinde ise emisyon spektrumu alınmıştır. Floresans ölçümleri scan modunda; uyarma 480 nm, emisyon aralığı 488 – 700 nm, uyarma ve emisyon slit aralığı 5nm'dir.

3.3.11 Analiz İçin Besiyeri Miktarı (Oksijen Etkisi)

Analiz için kullanılan besiyeri miktarının optimizasyonu için, aynı hacimdeki erlende farklı besiyeri miktarları (5, 10 ve 20 mL) denenmiştir.

3.4 Üreme Eğrisi

E. coli BL21(DE3) hücresinin 2xLB besiyerinde, % 0.5 inokülasyon oranında, üreme eğrisi elde edilmiştir. Üreme eğrisinde birer saat aralıklar ile UV-vis spektrofotometrede 545 nm'de optik dansite ve floresans emisyonları ölçülmüştür. Aynı zamanda farklı zamanlardaki canlı hücre sayısı için kültürel sayım yapılmıştır.

Deneyde, 250 mL erlen içerisine 20 mL kloroamfenikol içeren 2xLB besiyeri eklenerek, % 0.5 inokülasyon oranında BL21(DE3) hücresi inoküle edilmiş ve 37 °C deki çalkalamalı su banyosunda inkübasyona alınmıştır. Bu işlemden sonra birer saat aralıklar ile ölçüm yapılmıştır.

E. coli BL21(DE3) hücresinin jenerasyon süresi eksponansiyel aralıkta aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$G = t / (3.3 \times (\log b/B))$$

G : Jenerasyon süresi (dk)

t: Zaman aralığı (dk)

B: Zaman aralığının başlangıcındaki bakteri sayısı

b: Zaman aralığının sonundaki bakteri sayısı

3.5 Antibiyotiklerin Analizi

Seçilen optimum parametrelerde antibiyotik analizleri yapılmıştır. Bu amaçla;

- ampisilin 0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb, 20 ppb
- basitrasin A 0 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb, 500 ppb
- benzilpenisilin (penisilin G) 0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb, 20 ppb, 25 ppb
- furazolidon 0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 15 ppb, 20 ppb, 25 ppb
- gentamisin 0 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb, 500 ppb
- linkomisin 0 ppb, 150 ppb, 300 ppb, 450 ppb, 600 ppb, 750 ppb
- neomisin 0 ppb, 500 ppb, 1000 ppb, 1500 ppb, 2000 ppb, 2500 ppb
- sefazolin 0 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 150 ppb, 200 ppb, 250 ppb
- spektinomisin 0 ppb, 200 ppb, 400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1000 ppb
- spiramisin 0 ppb, 200 ppb, 400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1000 ppb
- streptomisin 0 ppb, 200 ppb, 400 ppb, 600 ppb, 800 ppb, 1000 ppb
- sulfadiazin 0 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb, 500 ppb
- tetrasiklin 0 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 150 ppb, 200 ppb

konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Bu amaçla her bir konsantrasyon için 60 dakikalık inkübasyon süresince her 15 dakikada bir UV-vis spektrofotometrede optik dansite, ve floresans spektrofotometresinde 513 nm'deki emisyon floresans intensitesi alınmıştır.

3.6 Antibiyotik Kalibrasyon Eğrileri ve LOD, LOQ Değerleri

Zamana karşı elde edilen floresans intensiteleri grafiğe geçirilip, her bir konsantrasyon için eğim değeri hesaplanmıştır. Elde edilen eğim değerleri her bir antibiyotik konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinden gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of detection) ve tayin alt sınırı (LOQ; Limit of quantification) değerleri hesaplanmıştır. Konsantrasyon birimi olarak ifade edilen gözlenebilme sınırı, körden ayırt edilebilen en düşük konsantrasyonu tanımlamaktadır [179]. Kalibrasyon eğrisinin eğimi (b) ve regresyon standart sapması (Sb),

IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)' ne göre LOD ve LOQ değerleri hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Eşitlikler:

$$\text{LOD} = k_1 \times S_b / b$$

$$\text{LOQ} = k_2 \times S_b / b$$

k_n , istenilen güven aralığı için seçilen sayısal değerdir. Bu çalışmada % 95 güven aralığında k_1 ve k_2 değerleri sırasıyla 3.3 ve 10.0 olarak alınmıştır.

3.7 Gerçek Örnek Denemeleri

Gerçek örnek denemeleri kapsamında, antibiyotik içermeyen, yağsız UHT süt örneği kullanılmıştır. Bu süt örneğine, sonradan farklı antibiyotikler eklenmiştir. Son konsantrasyonu 5 ppb olacak şekilde ampicilin ve benzilpenisilin, 50 ppb olacak şekilde sefazolin ve tetrasiklin, 100 ppb olacak şekilde gentamisin ve 500 ppb olacak şekilde neomisin eklenmiştir. Elde edilen bu süt örnekleri geliştirilen yöntem ile tayin edilmiştir. Her bir antibiyotik için tayin edilen konsantrasyon değerleri ve eklenen konsantrasyon değerleri vasıtası ile geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, her antibiyotik için bağıl standart sapma (% RSD) hesaplanmıştır. Bunlar için kullanılan eşitlikler:

$$\text{Geri kazanım değeri (\%)} = 100 \times b / a$$

a = Eklenen antibiyotik konsantrasyonu

b = Tayin edilen antibiyotik konsantrasyonu

$$\text{RSD (\%)} = S_d / \text{ortalama} \times 100$$

Sd = Elde edilen değerlerin standart sapması

Ortalama = Elde edilen değerlerin ortalaması

Gerçek örnek uygulamaları, ayrıca piyasada hazır ticari kit olarak satılan Charm CowSide II® antibiyotik test kitleri ile de denenmiştir.

3.7.1 Charm CowSide II® ile Kalıntı Antibiyotik Tayini

Charm CowSide II® kalıntı antibiyotik test kiti, mikrobiyel inhibisyon esaslı tayin yöntemidir. Test kitindeki tüp içerisinde, bakteriyel sporlar, besiyeri ve pH indikatörü bulunmaktadır. Süt örnekleri (0°C-15°C), test kitinden çıkan tüplere 100 µL konulmakta ve 64°C'lik etüvde üç saat inkübasyona bırakılmaktadır. Süre sonunda tüpte meydana gelen renk değişimleri izlenmektedir.

3.8 Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışmaları kapsamında kesinlik (gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik) ve doğruluk değerleri incelenmiştir.

Kesinlik için, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik, ölçümlerin standart bir antibiyotik konsantrasyonunda gün içi için üç kez, günler arası için beş kez yapılması ile elde edilmiştir. Standart antibiyotik konsantrasyonu olarak, 50 ppb tetrasiklin kullanılmıştır. Aynı şartlar altında ve aynı analiz koşullarında antibiyotik analizi gün içi ve günler arasında yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik RSD olarak verilmiştir.

Doğruluk, test sonucunun gerçek değere olan yakınlığıdır. Doğruluk için, bias değerleri hesaplanmıştır. Bias test sonucunun gerçek değerden ne kadar farklı olduğunu gösteren değerdir. Bias değeri 0'a yaklaştıkça doğruluk artmaktadır. Gün içi ve günler arası yapılan ölçümlerde tayin edilen antibiyotik konsantrasyonunun gerçek değere olan yakınlığı bias değeridir. Bu amaçla aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$\text{Bias} = (b - a) / a \times 100$$

a = Gerçek antibiyotik konsantrasyonu

b = Tayin edilen antibiyotik konsantrasyonu

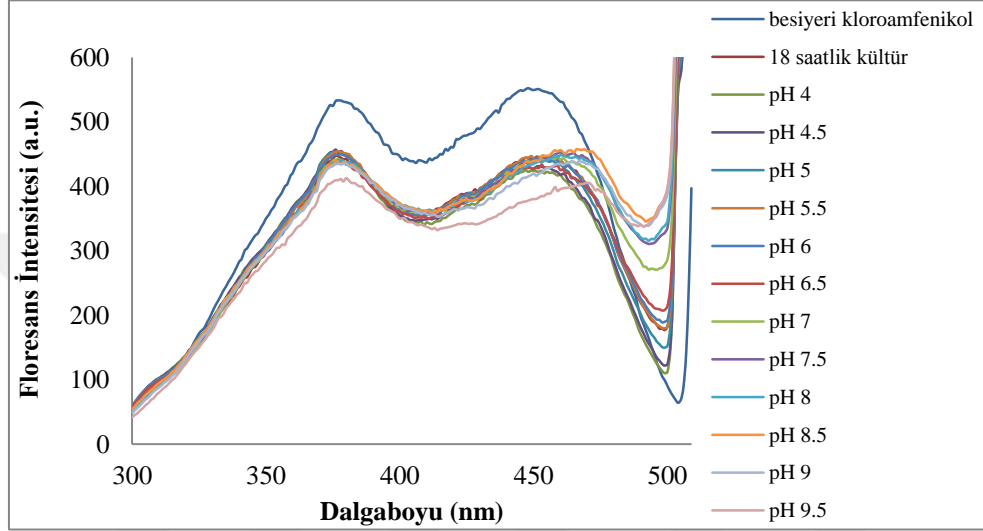
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Optimizasyon Çalışmaları

4.1.1 Kültür pH'sının Etkisi

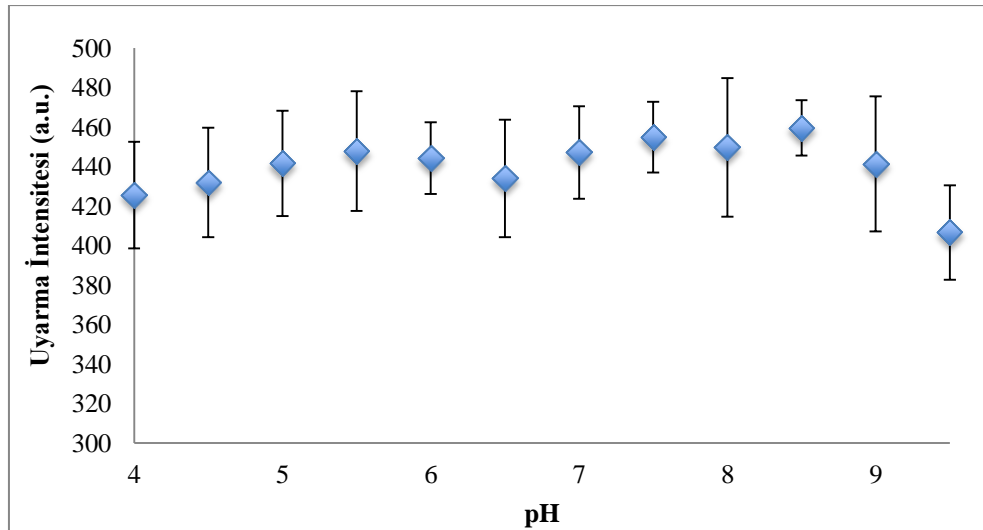
18 saatlik GFP'li E. coli elde edildikten sonra, kültür pH'sı değiştirilerek uyarma ve emisyon spektrumları alınmıştır.

Uyarma Spektrumu

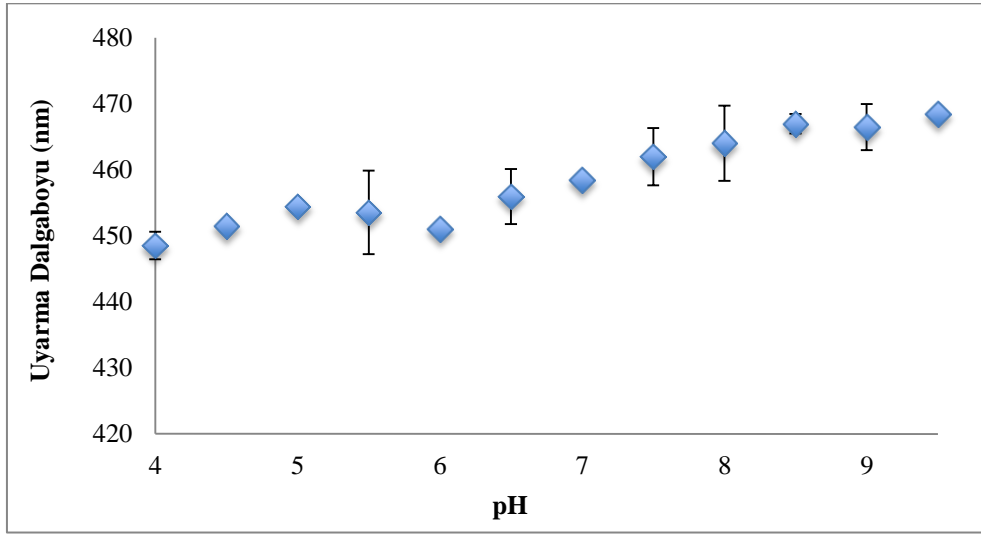


Şekil 4.1. 18 saatlik kültürün pH'sı değiştirilerek, elde edilen uyarma spektrumu

Şekil 4.1'den görüldüğü üzere pH değeri arttıkça uyarma spektrumundaki ikinci pik sağa kaymaktadır.

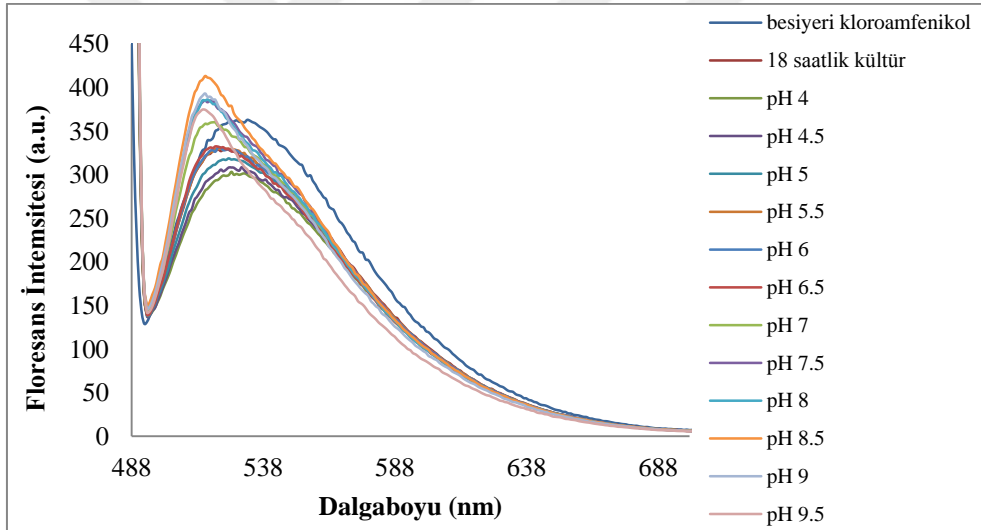


Şekil 4.2. Farklı pH'larda elde edilen uyarma intensitesi



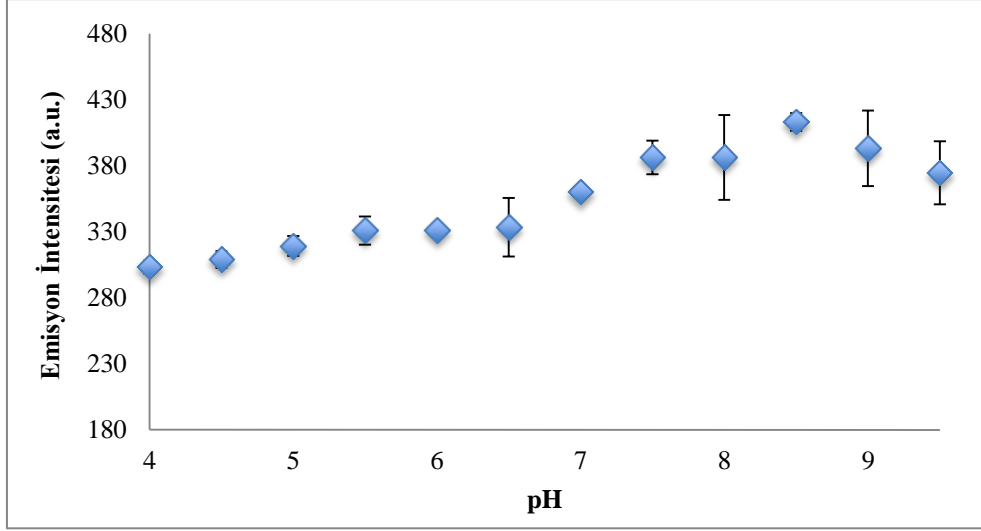
Şekil 4.3. Farklı pH'larda elde edilen GFP'li kültürün uyarma dalgaboyları

Emisyon Spektrumu



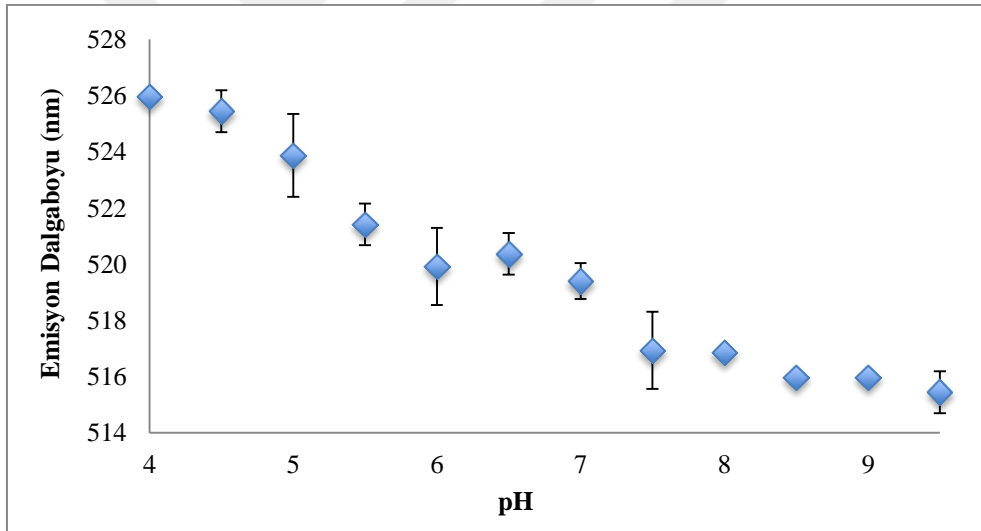
Şekil 4.4. 18 saatlik kültürün pH'sı değiştirilerek, elde edilen emisyon spektrumu

Şekil 4.4'ten görüldüğü üzere pH değeri arttıkça emisyon spektrumundaki pik sola kaymaktadır.



Şekil 4.5. Farklı pH'larda elde edilen emisyon intensitesi

Şekil 4.5'de verilen grafikte intensite değerleri her bir spektrumun maksimum olduğu noktada alınmıştır.



Şekil 4.6. Farklı pH'larda elde edilen GFP'li kültürün emisyon dalgaboyu

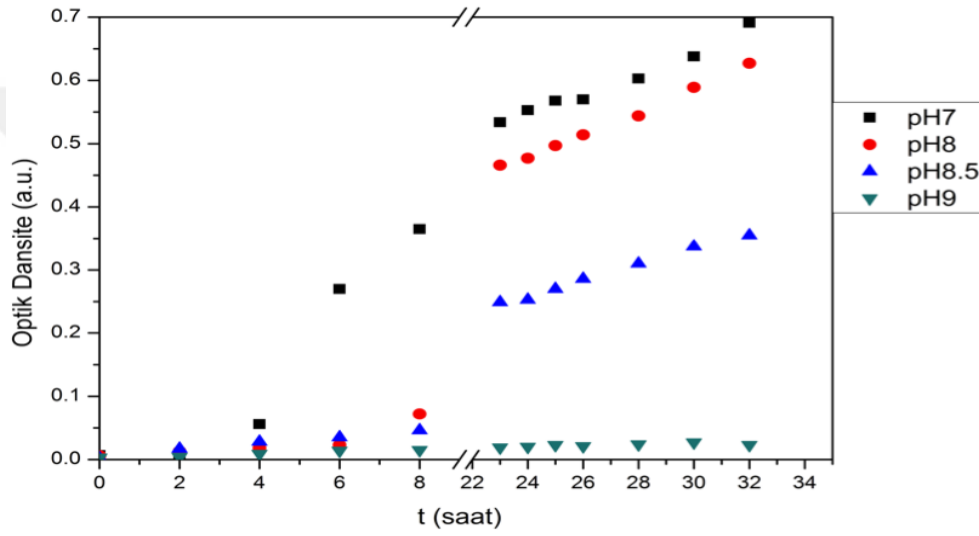
Yukarıdaki grafiklerden de görüldüğü üzere, pH değişimi ile hem floresans intensitesi değişmekte, hem de uyarma ve emisyon dalgaboylarında kaymalar olmaktadır. pH'a bağlı spektral kaymaların olası sebebi kromofor imidazolündeki enol formunun stabilizasyonunu sağlayan kromofordaki tirozin aminoasitinin iyonizasyonu ve/veya arjininin deprotonasyonudur [163].

E. coli kültüründe zamanı bağlı üreme gerçekleşirken, GFP de *E. coli*'de ekspres edilirken, aynı zamanda pH da düşmektedir. pH düşüşü floresans emisyonunu iki şekilde etkilemektedir: Birincisi GFP'nin net yükü pH değişimine bağlı konformasyonel değişim

göstermekte ve intensitesinde azalma olmaktadır. İkincisi pH değişimine bağlı olarak emisyon dalga boyunda kayma meydana gelmektedir. pH azaldıkça emisyon dalgaboyu artmakta, uyarma dalgaboyu ise azalmaktadır. Kültür pH'sı 8.5 iken en yüksek emisyon intensitesi elde edilmektedir. Bu yüzden bundan sonraki çalışmalar için 480 nm uyarma, 513 nm emisyon dalgaboylarında kültür pH'sı 8.5'e ayarlanarak ölçümler alınmıştır.

4.1.2 Besiyeri pH'sının Etkisi

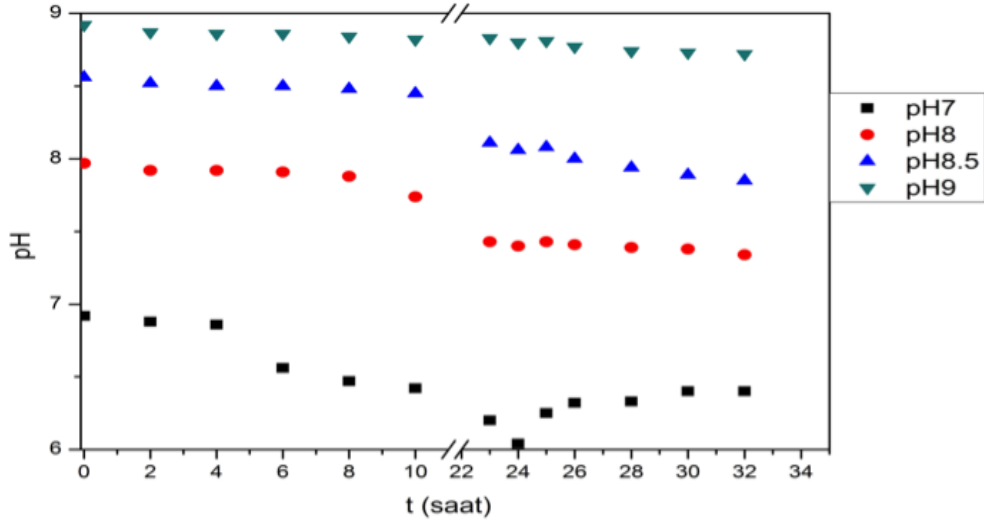
Çalışma kapsamında LB Broth-Lennox (Conda, Pronadisa) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri hazırlandığında pH yaklaşık 7.0 civarındadır. Besiyeri pH'sı farklı pH'lara ayarlanarak *E. coli* hücrelerinin gelişimi izlenmiştir.



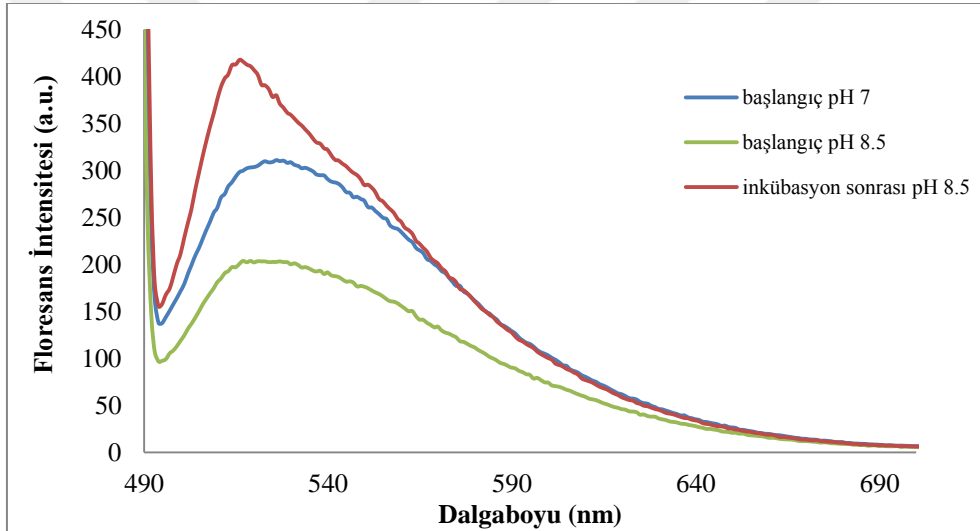
Şekil 4.7. Farklı pH'larda hazırlanan besiyerlerine ekim yapılan GFP'li *E. coli* kültürünün inkübasyon süresi boyunca 545 nm'deki optik dansitesinde meydana gelen değişim

Şekil 4.7'den de görüldüğü üzere, yüksek pH'larda *E. coli* gelişimi olumsuz etkilenmekte, gelişim eğrisinin eğimi düşmektedir. 24 saatin sonundaki absorbans değerlerine bakıldığında, pH 7'deki kültürün optik dansite (O.D.) değeri 0.553 iken, pH 8.5'deki kültürün O.D. değeri 0.253'dür. Bu durumda, pH 8.5'ta geliştirilen kültürün O.D. değeri pH 7'dekinin yaklaşık yarısıdır.

Kültürün pH değeri, bakteri üremesine bağlı olarak zamanla azalma gösterecektir. Aşağıdaki grafik, inkübasyon boyunca her bir kültürdeki pH değişimlerini göstermektedir.



Şekil 4.8. Farklı pH'larda hazırlanan besiyerlerine ekim yapılan GFP'li *E. coli* kültürünün inkübasyon süresi boyunca pH'sında meydana gelen değişim

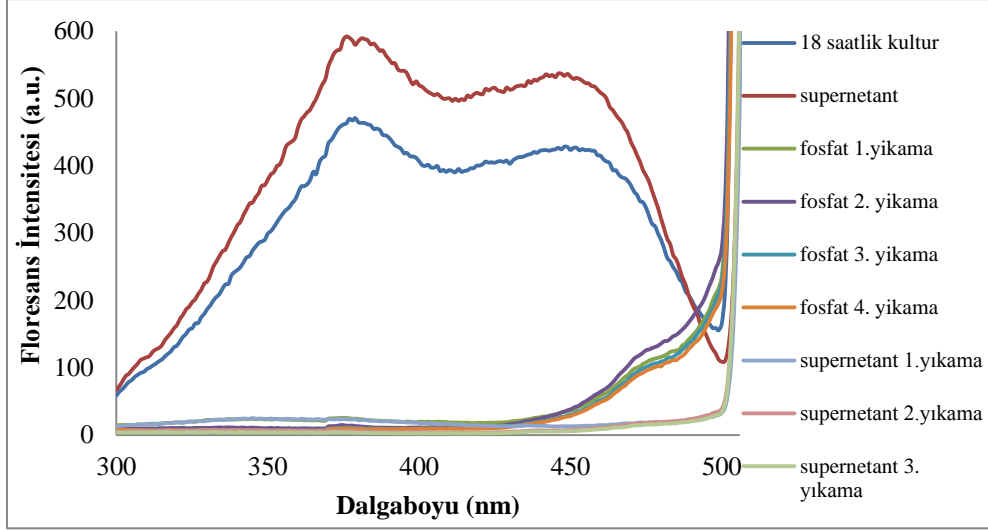


Şekil 4.9. Başlangıç pH'sı 7 ve 8.5 olan ve inkübasyon sonrası pH'sı 8.5'a çıkarılan örneklerin emisyon spektrumları

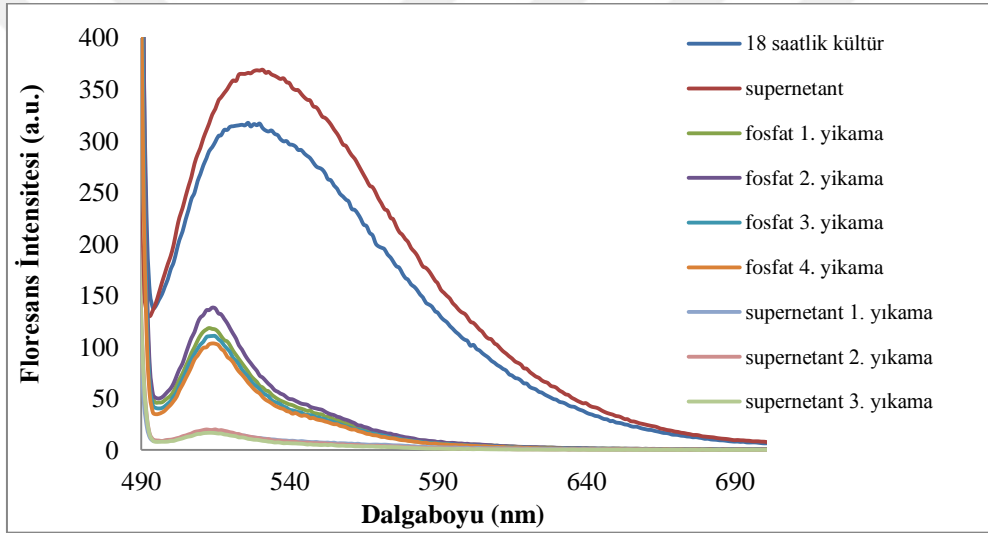
Sonuç olarak, pH optimizasyonu için yapılan çalışmalar sonucunda, GFP'li *E. coli*'nin pH 7 olan besiyeri koşullarında geliştirilmesi pH'sının sonradan 8.5'a ayarlanması daha doğru bir yaklaşım olup emisyon intensitesini artırmaktadır.

4.1.3 Yıkamanın Etkisi

18 saatlik GFP'li kültür elde edildikten sonra, pH 8.5 fosfat tampon ile dört yıkama aşaması uygulanmış ve her aşamada, hem supernetenant yıkama sıvısından hem de kültürden floresans ölçümleri alınmıştır.



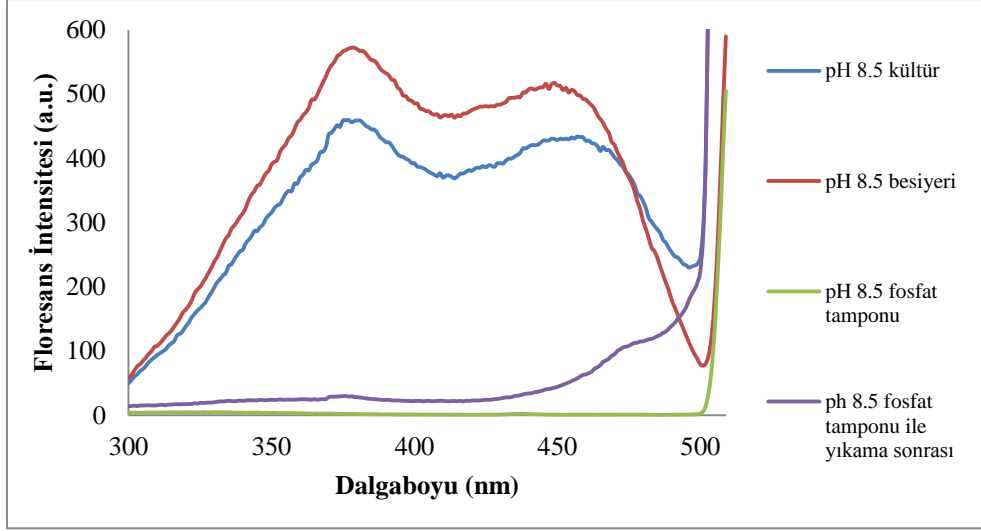
Şekil 4.10. pH 8.5 fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen uyarma spektrumları



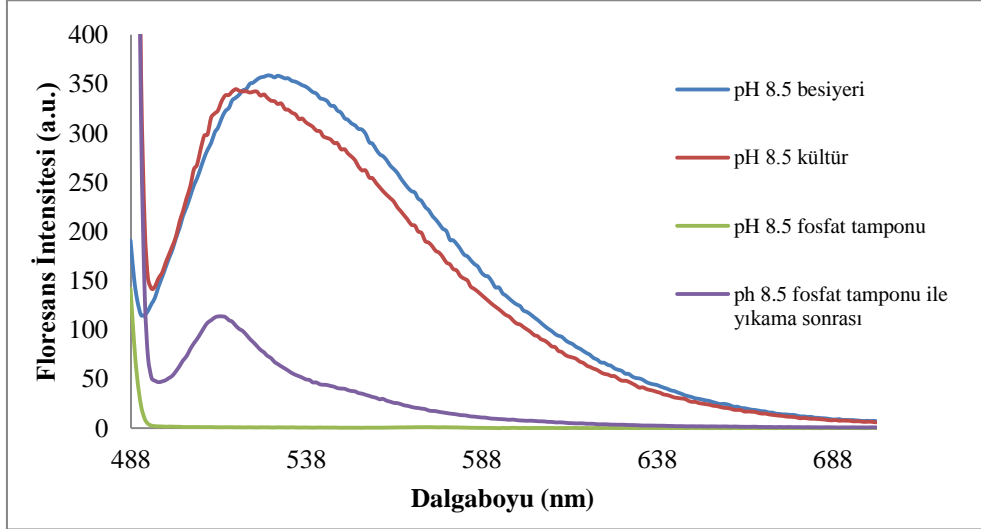
Şekil 4.11. pH 8.5 fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen emisyon spektrumları

Şekil 4.11'e göre, ilk supernetantın emisyon intensitesi 18 saatlik kültürün emisyon intensitesinden fazla görülmektedir. İlk supernetant kültürün santrifüjle çöktürülmesi sonrası ortamda bulunan besiyeridir. Supernetant intensitesinin kültür intensitesinden yüksek olması, besiyerinde floresans emisyonu veren maddelerin olduğunu ve bu emisyonun ortamda GFP'li *E. coli* ürettiğinde bir miktar sönmüldüğünü düşündürmektedir. Fosfat tamponu ile dört kez yıkamanın intensite üzerinde önemli bir etkisi olmayıp, bu çalışma kapsamında bir kez yıkamak yeterli görülmektedir.

Supernetant intensitesinin kültür intensitesinden fazla olmasının nedeninin besiyerinden kaynakladığı düşünüldüğünden, pH 8.5'deki besiyeri, pH 8.5'deki kültür, pH 8.5 fosfat tamponu ve kültürün pH 8.5'lik fosfat tamponu ile yıkama sonrası uyarma ve emisyon spektrumları alınmıştır. Elde edilen grafikler aşağıda görülmektedir.



Şekil 4.12. pH 8.5 besiyeri, kültür, fosfat tamponu ve pH 8.5'lik fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen uyarma spektrumları



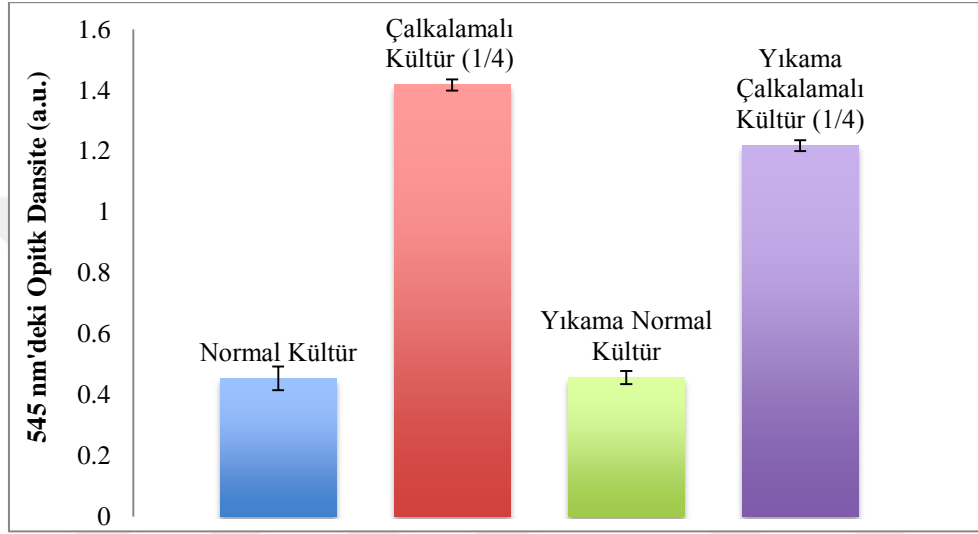
Şekil 4.13. pH 8.5 besiyeri, kültür, fosfat tamponu ve pH 8.5'lik fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen emisyon spektrumları

Bu grafiklerden görüldüğü üzere besiyerinde bulunan bileşenlerin de floresans intensitesi bulunmaktadır. Besiyeri içerisinde yaklaşık GFP ile yakın yerlerde floresans emisyonu veren başka bir madde daha bulunmaktadır. Bu emisyon veren maddenin de iki farklı belirgin uyarma dalgaboyu bulunmaktadır. Besiyerinde bulunan bileşenlerin floresans intensitesi, yıkama sonrası elde edilen GFP kaynaklı floresans intensiteden oldukça yüksek olup, takip edilen GFP floresansını baskılamaktadır. Bu yüzden besiyerindeki floresans girişiminden kurtulmak için fosfat tamponu ile yıkamanın zorunlu olduğu gözlenmektedir. Sonuç olarak bundan sonraki çalışmalarda, kültür elde edildikten sonra bir kez pH 8.5 fosfat tamponunda yıkama yapılmakta ve optik dansite ve floresans ölçümleri yıkama

sonrası alınmaktadır. Besiyerindeki kültüre pH 8.5 fosfat tamponu ile yıkama yapıldığında, hem besiyerinden gelen girişimlerden kurtulmuş olunmakta hem de ölçümlerden önce pH 8.5'a ayarlanmış olmaktadır.

4.1.4 Çalkalamalı Kültür Eldesinin Etkisi

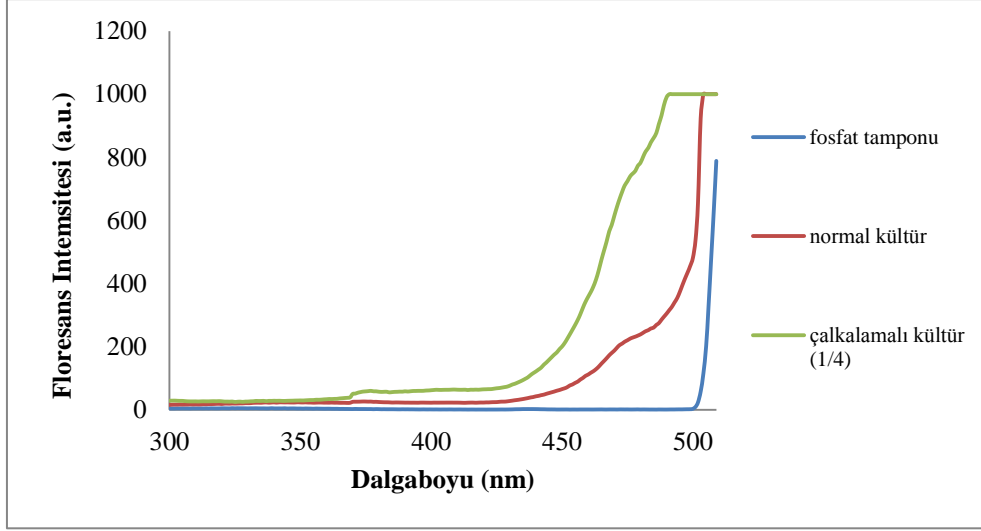
Bundan önceki çalışmalarda, kültürlerin inkübasyonları etüvde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ise, kültürler çalkalamalı su banyosunda geliştirilerek, çalkalamanın etkisine bakılmıştır.



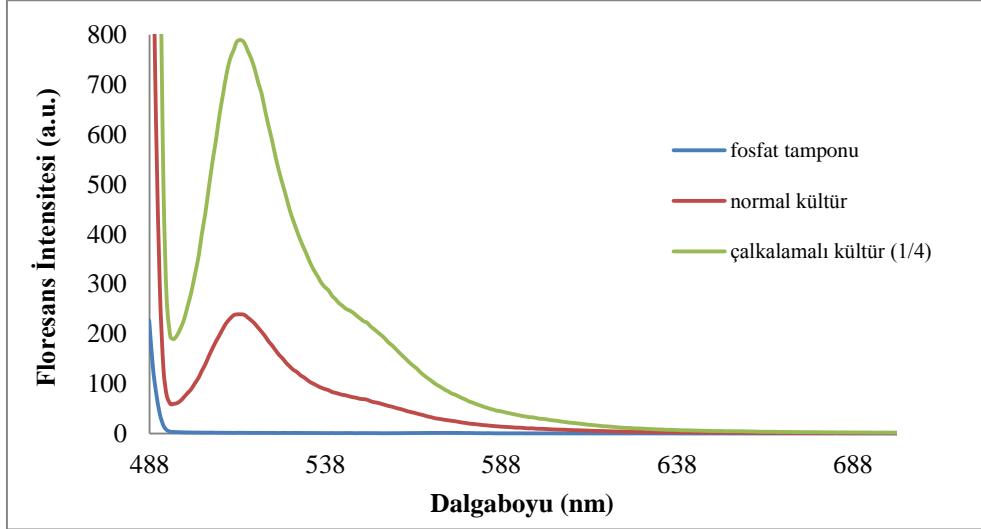
Şekil 4.14. Normal ve çalkalamalı kültürlerin ($\frac{1}{4}$ oranında seyreltilmiş) besiyerinde ve fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen optik dansiteleri

Şekil 4.14'den de görüleceği gibi, çalkalamalı kültürde *E. coli* çalkalamasız kültüre göre yaklaşık 12.5 kat fazla üremiştir. Elde edilen bu sonuç literatür ile uyumlu olup, çalkalamalı kültür ile daha yoğun kültürler üretilebilmektedir [180]. Bunun olası sebeplerinden biri hücrelerin çalkalamalı kültürde besin öğelerine daha rahat ulaşmaları, ikincisi ise çalkalamanın etkisi ile ortamın oksijenlenmesidir. Kullanılabilir oksijen miktarının artması hücre gelişimine etki etmektedir

E. coli fakültatif anaerop bir mikroorganizma olup, fakültatif anaerop mikroorganizmalar hem oksijenli hem oksijensiz ortamda üreyebilmekte fakat, oksijenli ortamda daha iyi gelişmektedirler. Elde edilen sonuçlar bu bilgiyi doğrular niteliktedir. *E. coli*'nin sayısının artması ile dolaylı olarak ekspres edilen GFP miktarı artacaktır. Bu durum düşük dedeksiyon limitlerine inilmesini kolaylaştıracaktır. Aşağıdaki grafikte, normal kültür ve çalkalamalı kültür ($\frac{1}{4}$ oranında seyreltilmiş)'den elde edilen floresans uyarma ve emisyon spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.15. Normal ve çalkalamalı kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen floresans spektrofotometresindeki uyarma spektrumu



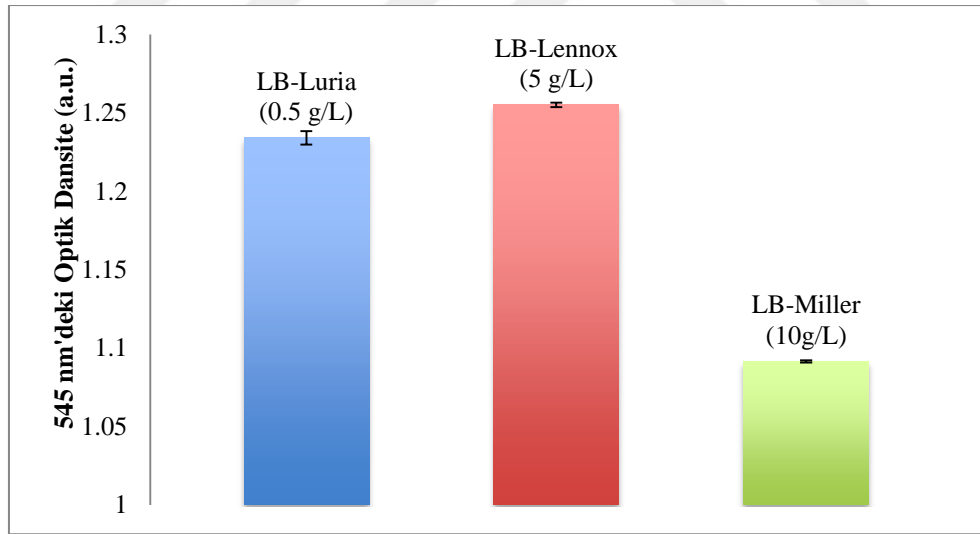
Şekil 4.16. Normal ve çalkalamalı kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) fosfat tamponu ile yıkama sonrası elde edilen floresans spektrofotometresindeki uyarma spektrumu

Yukarıdaki grafikten de görüleceği gibi çalkalamalı kültürün ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometresinde alınan 513 nm'deki floresans intensitesi yaklaşık 790, normal olarak elde edilen kültürün intensitesi 239'dur. Bu durumda çalkalamalı kültürün ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) intensitesi, normal kültürün intensitesinin yaklaşık 3.3 katıdır. Toplamda 13.2 kat floresans intensitesinde artış sağlanmıştır. Bu sonuç, Uv-vis spektrofotometrede alınan absorbans sonuçları (12.5 kat optik dansitede artış) ile karşılaştırıldığında tutarlı görülmektedir. Fakat, hücre yoğunluğu arttıkça oksijen gereksinimi çalkalamalı kültürdeki aerasyon hızını aşmakta ve bu oksijen limitasyonu, besiyerindeki kullanılabilir oksijen, karbon ve enerji kaynaklarına göre hücrenin metabolik kapasitesini düzenleyen kompleks

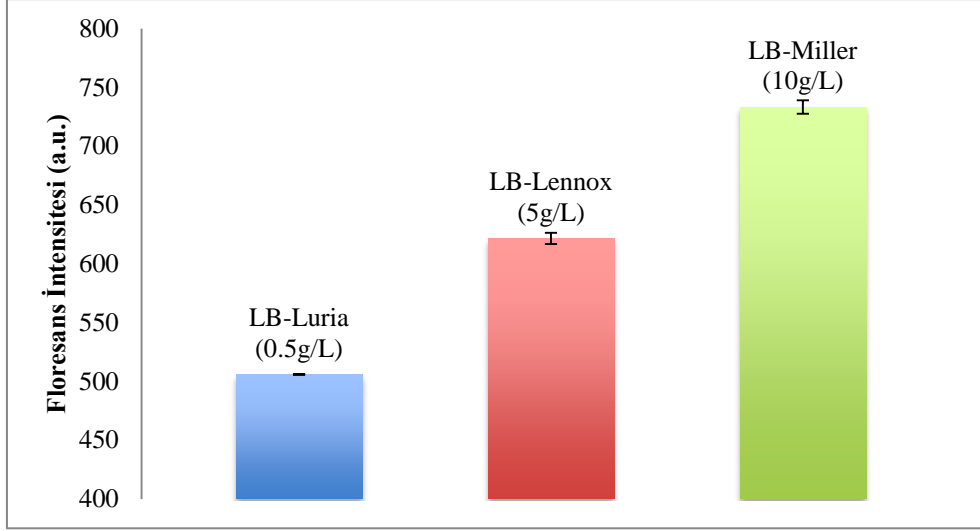
regülatör mekanizmaları tetiklemektedir. Oksijen limitasyonu bu mekanizmaları tetiklemeye başlamadan önce aerasyon hızı (oksijenlenme) arttıkça kültür yoğunluğu artmaktadır. Aerasyon hızı ile hücre yoğunluğu doğru orantılı olsa da, yüksek protein ekspresyonu için ılımlı aerasyonun gerekli olduğu bildirilmiştir [180]. Şekil 4.16'da görüldüğü üzere çalkalamalı kültür ile, birim hücre başına üretilen GFP miktarı artmıştır. Yapılan çalışmalarda çalkalamalı kültür oluşturulduğunda kısa sürede yoğun hücreler oluşturulmakta ve protein ekspresyon verimi artmaktadır [180]. Ayrıca, GFP'deki kromofor oluşumu için de, moleküler oksijen gereksinimi bulunmaktadır [167]. Sonuç olarak GFP intensitesindeki artış hem *E. coli* nin artışı, hem GFP proteininin daha fazla ekspres edilmesi hem de GFP molekülündeki daha fazla kromofor oluşumu ile açıklanabilmektedir. Çalkalamalı kültürdeki intensite artışı nedeni ile bundan sonraki çalışmalarda, çalkalamalı kültür ile devam edilmiştir.

4.1.5 Besiyerindeki Tuz Konsantrasyonu

Besiyerindeki farklı tuz konsantrasyonunun GFP üretimine etkisini araştırmak için farklı tuz konsantrasyonlarındaki LB besiyeri kullanılmıştır. LB-Luria 0.5 g/L tuz içerirken LB-Lennox 5 g/L tuz içermekte, LB-Miller ise 10 g/L tuz içermektedir.

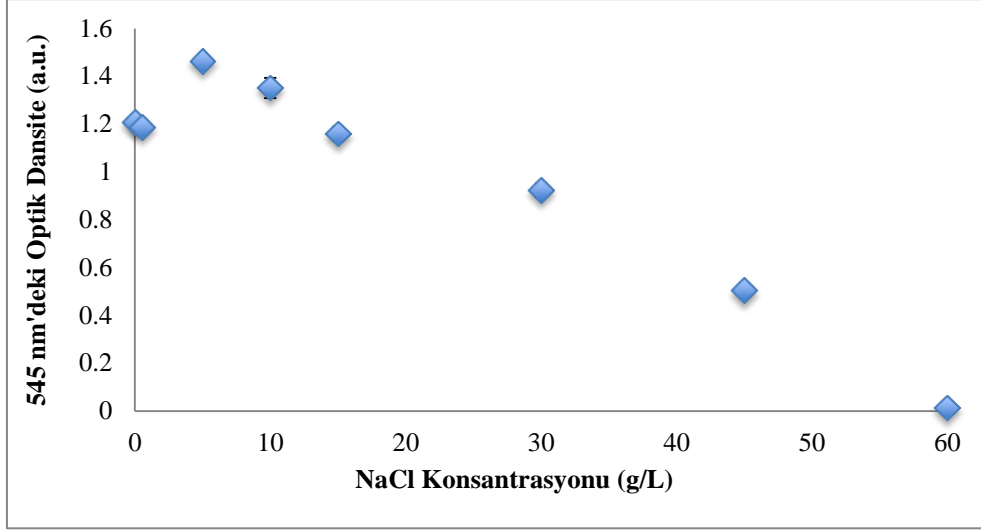


Şekil 4.17. LB-Luria, LB-Lennox ve LB-Miller besiyerlerinde elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) 545 nm'deki optik dansiteleri



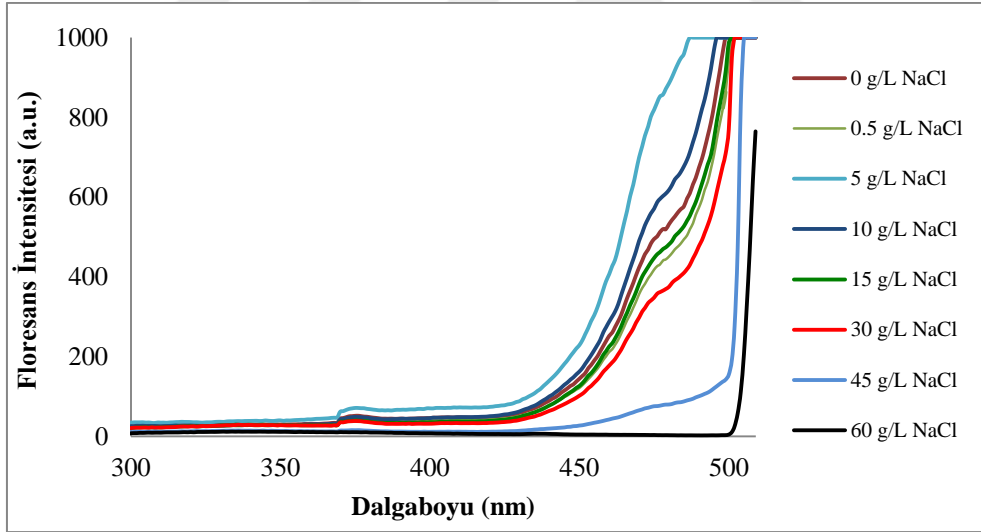
Şekil 4.18. LB-Luria, LB-Lennox ve LB-Miller besiyerlerinde elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) emisyon intensiteleri

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 incelendiğinde, Luria (0.5 g/L tuz) ve Lennox (5 g/L tuz) besiyerlerinde bakteri sayısı yaklaşık aynı düzeyde iken, Lennox (5 g/L tuz) besiyerinde floresans intensitesi Luria (0.5 g/L tuz) besiyerine göre daha fazladır. Miller (10 g/L tuz) besiyerinde ise, bakteri üremesi daha yavaş iken, floresans intensitesi en yüksektir. Bu durumun iki sebebi olabilir. İlki, yüksek tuz konsantrasyonu GFP ekspresyonunu artırmış olabilir. Diğer bir sebep ise, besiyeri bileşiminde bulunan pepton kaynağı olabilir. Farklı markaların besiyerlerinde farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu farklılık genel olarak peptondan kaynaklanmaktadır. Tripton, yani kazein peptonu farklı yollarla (pankreatik sindirim enzimleri, asit vb.) elde edilebilmektedir. Elde edilen pepton yöntemine göre farklı uzunluklardaki peptidlerden meydana gelen kompleks bir yapıda bulunmaktadır. Peptonun kalitesi, başlangıç proteinin kaynağına ve kalitesine, peptonun elde edilme yöntemine göre değişmektedir [181]. Bu yüzden tuzun etkisini incelemek için hazır ticari besiyerleri yerine bileşenleri ayrı ayrı eklenerek farklı tuz konsantrasyonlarında besiyerleri hazırlanmıştır. Bu amaçla, 10 g/L maya ekstraktı, 5 g/L tripton bileşenleri her besiyerine sabit konsantrasyonlarda eklenmiş, tuz konsantrasyonu ise değiştirilmiştir. 0 g/L, 0.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 30 g/L, 45 g/L, 60 g/L NaCl içeren besiyerleri hazırlanmıştır.

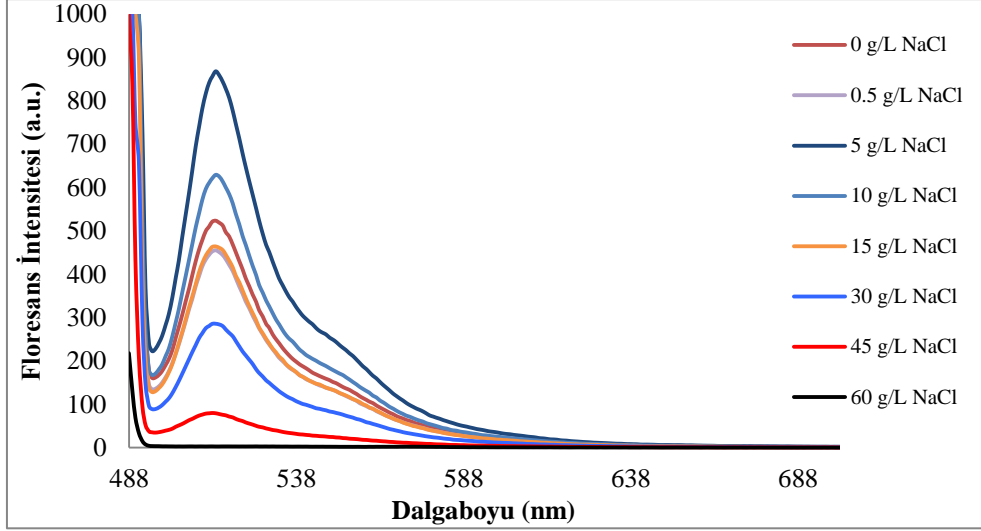


Şekil 4.19. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin (¼ seyreltilmiş) 545 nm'deki optik dansiteleri

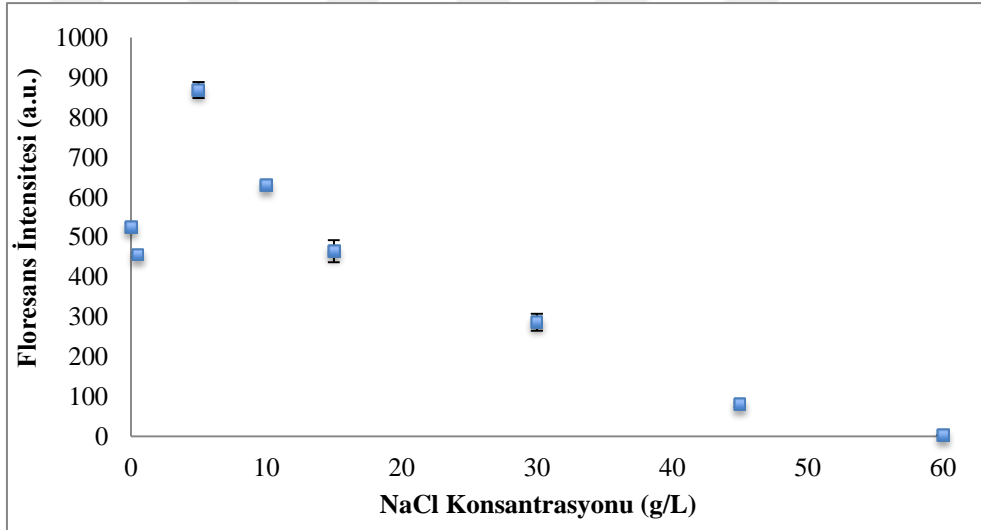
Şekil 4.19'dan da görüldüğü gibi, tuz konsantrasyonu 5 g/L olan besiyerinde kültür yoğunluğu en yüksek değerde olup, bu değerden sonra tuz konsantrasyonu arttıkça bakteri yoğunluğu azalmaktadır.



Şekil 4.20. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin (¼ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki uyarma spektrumu



Şekil 4.21. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin (¼ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki emisyon spektrumu



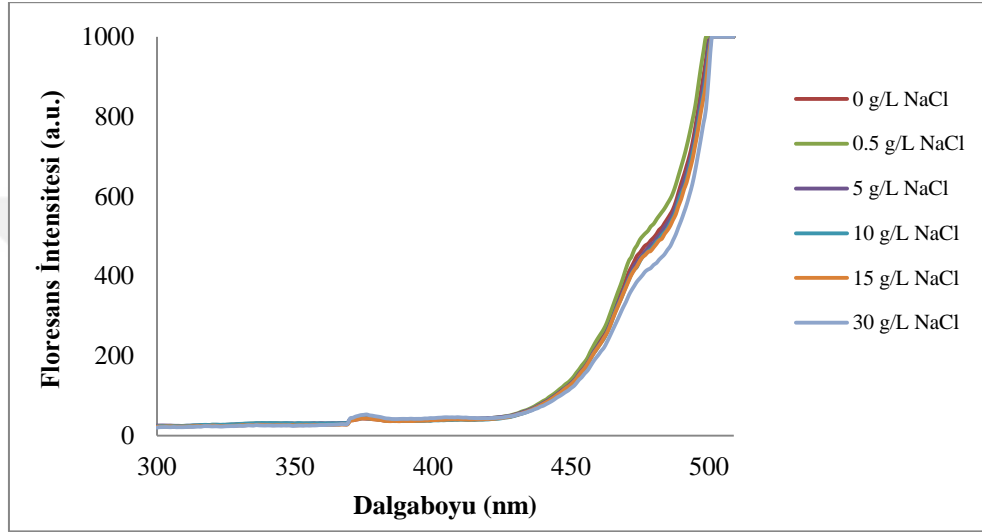
Şekil 4.22. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30, 45, 60 g/L) besiyerlerinde gelişen kültürlerin (¼ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki emisyon intensiteleri

Şekil 4.22'den görüldüğü üzere, 5 g/L tuz konsantrasyonuna sahip besiyerindeki floresans intensitesi diğer tuz konsantrasyonlarına göre yüksektir. Bu tuz konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlarda ise floresans intensitesinde optik dansite ile orantılı olarak azalma görülmektedir. Şekil 4.19'daki optik dansite değerleri incelendiğinde 5 g/L tuz konsantrasyonuna sahip kültürdeki absorbans 0 g/L tuz konsantrasyonunun yaklaşık 1.2 katı olduğu görülmektedir. Şekil 4.22'deki floresans intensitesi karşılaştırıldığında ise, 5 g/L tuz konsantrasyonuna sahip kültürdeki floresans intensitesi 0 g/L tuz konsantrasyonunun intensitesinin yaklaşık 1.6 katıdır. Bu durumda, floresans

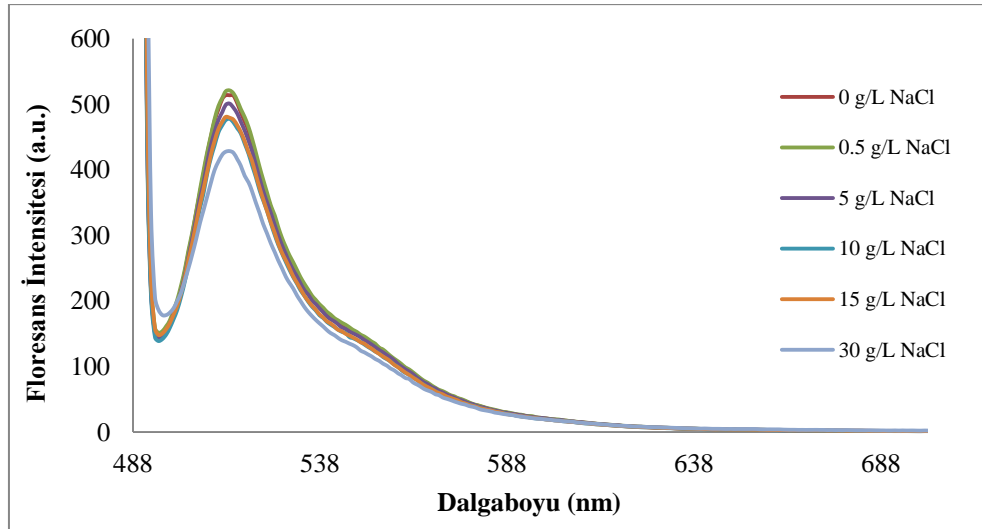
intensitesindeki artış sadece *E. coli* artışına bağlı olmayıp, NaCl'ün GFP ekspresyonunu da kısmi olarak artırdığı söylenebilir.

4.1.6 Yıkama Tamponu Tuz Konsantrasyonu

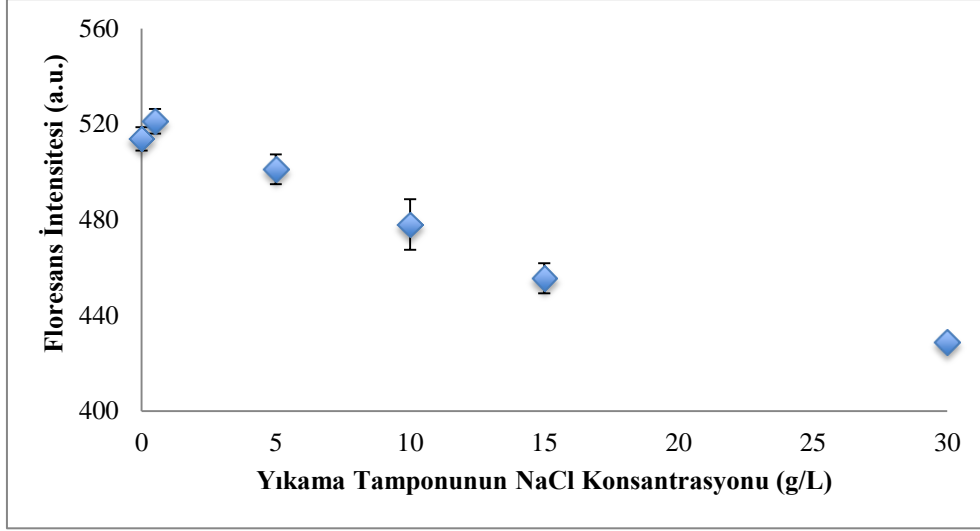
Yıkama tamponunda farklı tuz konsantrasyonlarının denenmesinin amacı, GFP'nin konformasyonel değişikliği ile floresans intensitesindeki farklılığın incelenmek istenmesidir. Bu amaçla, 0, 0.5, 5, 10, 15 ve 30 g/L NaCl içeren pH 8.5 fosfat tamponları hazırlanarak, yıkamalar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.23. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30 g/L) yıkama tamponunda yıkama sonrası elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki uyarma spektrumları



Şekil 4.24. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30 g/L) yıkama tamponunda yıkama sonrası elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) floresans spektrofotometredeki emisyon spektrumları

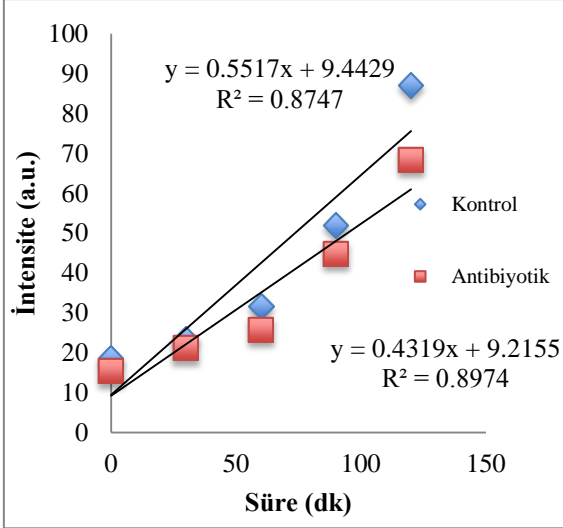


Şekil 4.25. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0, 0.5, 5, 10, 15, 30 g/L) yıkama tamponunda yıkama sonrası elde edilen kültürlerin ($\frac{1}{4}$ seyreltilmiş) 513 nm'deki emisyon intensiteleri

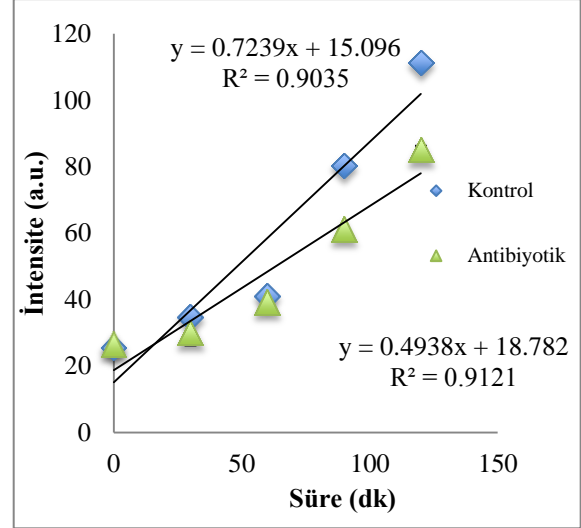
Şekil 4.25'deki grafikten de görüldüğü gibi yıkama tamponundaki 0.5 g/L NaCl konsantrasyonunun intensitesi en yüksektir. Fakat 0 g/L NaCl ortamın da emisyon intensitesi de oldukça yakın olup, standart sapmaları birbirleriyle çakışmaktadır. 0.5 g/L NaCl kullanımının intensitede belirgin bir artış meydana getirmedüğinden, çalışmada yıkama tamponu olarak NaCl içermeyen tampon tercih edilmiştir. Tuzun proteinin konformasyonuna ilişkin etkisi ise 30 g/L NaCl konsantrasyonunda açıkça görülmektedir. Bu durumda artan NaCl konsantrasyonu proteinin konformasyonunu olumsuz etkileyerek emisyonu azaltmaktadır. Tuz iyonları oldukça mobil olup, amino asit yan gruplarına göre kompakt yüklü birimlerdir. Bu yüzden proteinin yüklü grupları için amino asit yan grupları ile yarışmaktadırlar. Protein yüzeyindeki amino asit yan grupları arasındaki elektrostatik interaksyonlar, yüksek konsantrasyonlardaki tuz konsantrasyonları tarafından engellenmekte bu da protein stabilitesine etki etmektedir [182]. Yüksek tuz konsantrasyonlarında GFP'nin intensitesindeki azalmanın sebebi, tuz iyonlarının proteindeki elektrostatik etkileşimleri engellemesi olabilmektedir.

4.1.7 Analize Alınacak Kültür Konsantrasyonu

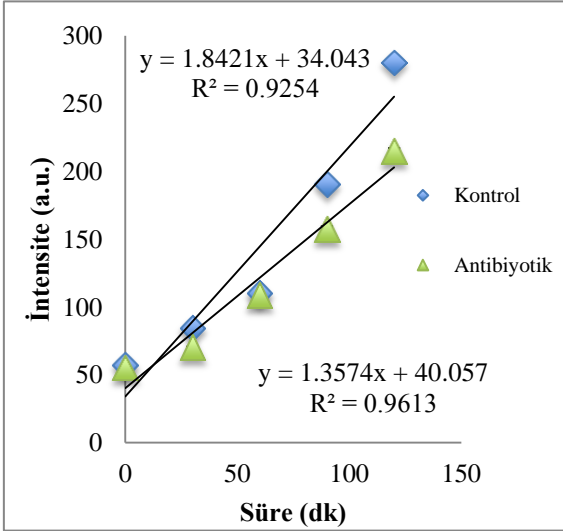
18 saatlik GFP'li *E. coli* kültüründen antibiyotik analizi için alınması gereken kültür oranını belirlemek için, farklı kültür oranları ile çalışılmıştır. Kontrol için fosfat tamponu, antibiyotik denemesi için 200 ppb tetrasiklin çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma kapsamında % 0.25, % 0.5, % 1.25, % 2.5 ve % 5 oranlarında 18 saatlik GFP'li kültür analize alınmıştır.



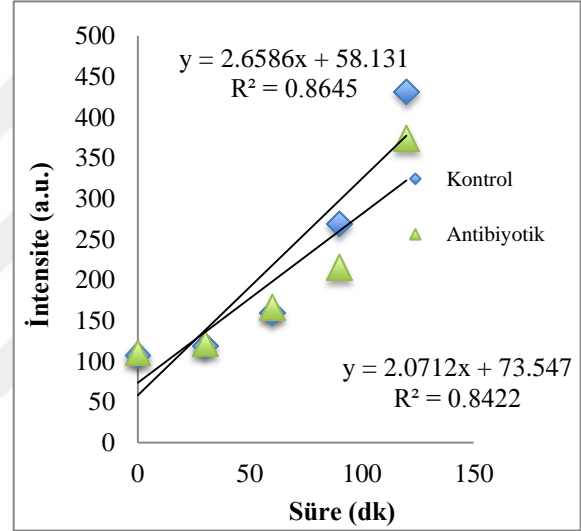
% 0.25 kültür oranındaki analiz



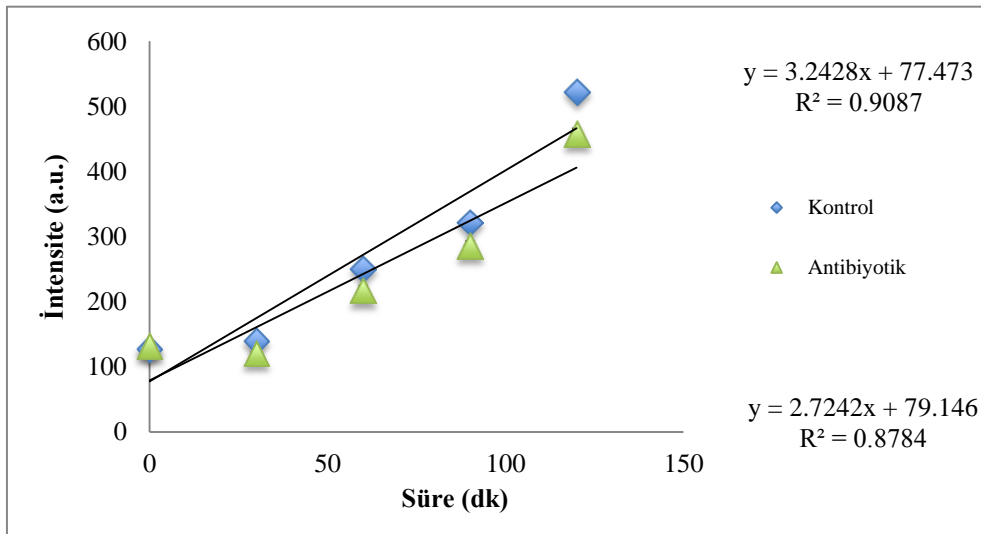
% 0.5 kültür oranındaki analiz



% 1.25 kültür oranındaki analiz



% 2.5 kültür oranındaki analiz



% 5.0 kültür oranındaki analiz

Şekil 4.26. Farklı kültür oranlarındaki (% 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0) kinetik analizler

Çizelge 4.1. Farklı kültür oranlarında kontrol eğiminin antibiyotik eğimine oranı

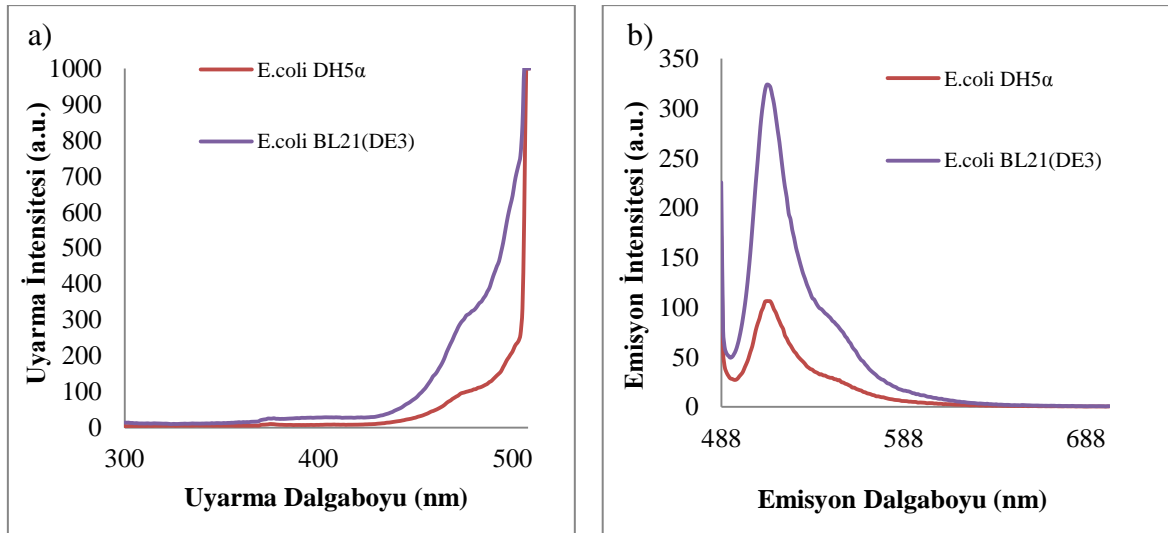
Kültür Oranı (%)	Eğimleri Oranı
0.25	1.287
0.5	1.466
1.25	1.357
2.5	1.284
5.0	1.190

Analizde önemli olan antibiyotikli örneğin eğiminin kontrol eğiminden olabildiğince farklı olmasıdır. Eğimleri oranı ne kadar yüksekse yöntemin hassasiyeti o kadar düşüktür. Bu nedenle, analize alınacak kültür oranı olarak % 0.5 seçilmiştir.

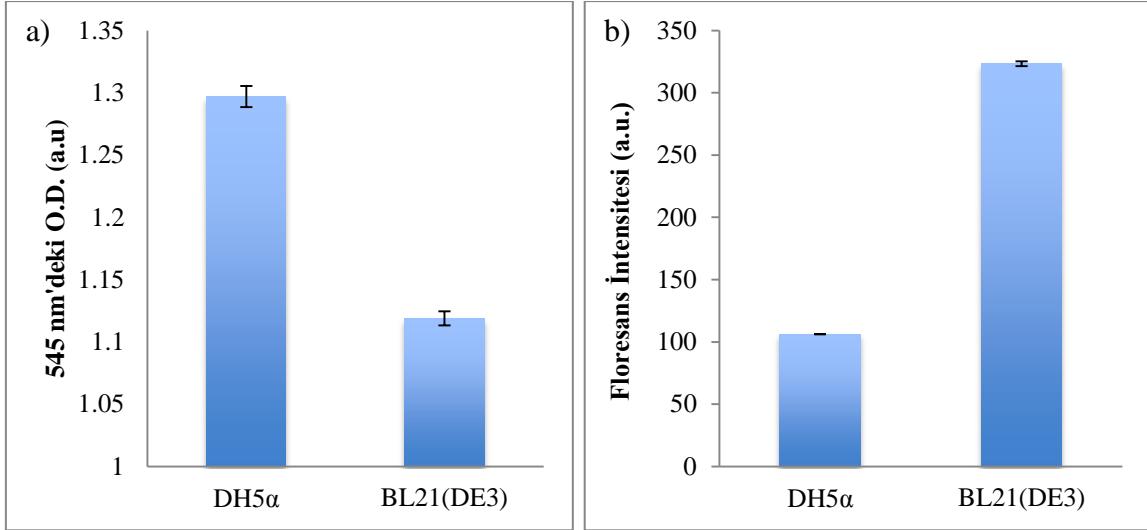
4.1.8 *E. coli* BL21(DE3) ile *E. coli* DH5 α Hücrelerinin Karşılaştırılması

E. coli DH5 α 'da bulunan GFP ve kloroamfenikol direnç geni taşıyan plazmid saflaştırılarak, kalsiyum kompetant hale getirilen *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarılmıştır. Her iki hücre daha önce belirlenen optimum koşullarda geliştirilerek, UV-vis spektrofotometrede optik dansite, floresans spektrofotometresinde ise uyarma ve emisyon spektrumları alınmıştır.

Bu çalışmada, uyarma 480 nm emisyon 513 nm, uyarma ve emisyon slit aralıkları 5 nm'dir.



Şekil 4.27. *E. coli* DH5 α ve *E. coli* BL21 hücrelerinin a) uyarma spektrumu, b) emisyon spektrumu



Şekil 4.28. *E. coli* DH5α ve *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin a) optik dansite değerleri b) emisyon intensiteleri

E. coli DH5α genellikle plazmid miktarını artırmak saflaştırmak için kullanılırken, *E. coli* BL21(DE3) protein ekspresyonu için kullanılmaktadır. *E. coli* DH5α hücrelerinde *endA* bölgesi bulunmamaktadır. *endA* endonükleaz I üretiminden sorumlu olan bölgedir. Endonükleazlar çift iplikçikli DNA'ya degrade etmektedir. *E. coli* DH5α hücrelerinde plazmid parçalayabilen endonükleazlar olmadığından *E. coli* DH5α daha stabil plazmid üretmektedir. *E. coli* BL21 ise genellikle rekombinant protein üretimi için kullanılmaktadır [183]. *E. coli* BL21 hücresi fazla miktarda üretilen rekombinant proteinin yarattığı strese daha az duyarlıdır.

Şekil 4.28a'daki optik dansite değerleri incelendiğinde, *E. coli* BL21(DE3) hücresinin, *E. coli* DH5α'ya göre kısmi olarak daha az geliştiği görülmektedir. Elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri 1.2'ye ayarlanıp, floresans spektrofotometredeki emisyon değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.28b'de görüldüğü üzere *E. coli* BL21'de birim hücre başına üretilen GFP miktarı daha fazladır. Elde edilen sonuçlar, literatürdeki bilgiyi doğrular nitelikte olup, plazmid *E. coli* BL21(DE3) hücresine aktarıldığında, üretilen GFP miktarı *E. coli* DH5α hücresinin 3 katıdır. Bu yüzden bundan sonraki çalışmalarda *E. coli* BL21(DE3) hücresi kullanılmıştır.

4.1.9 Pasaj Sayısının ve Kültür İnokülasyon Oranının Hücre Yoğunluğuna Etkisi

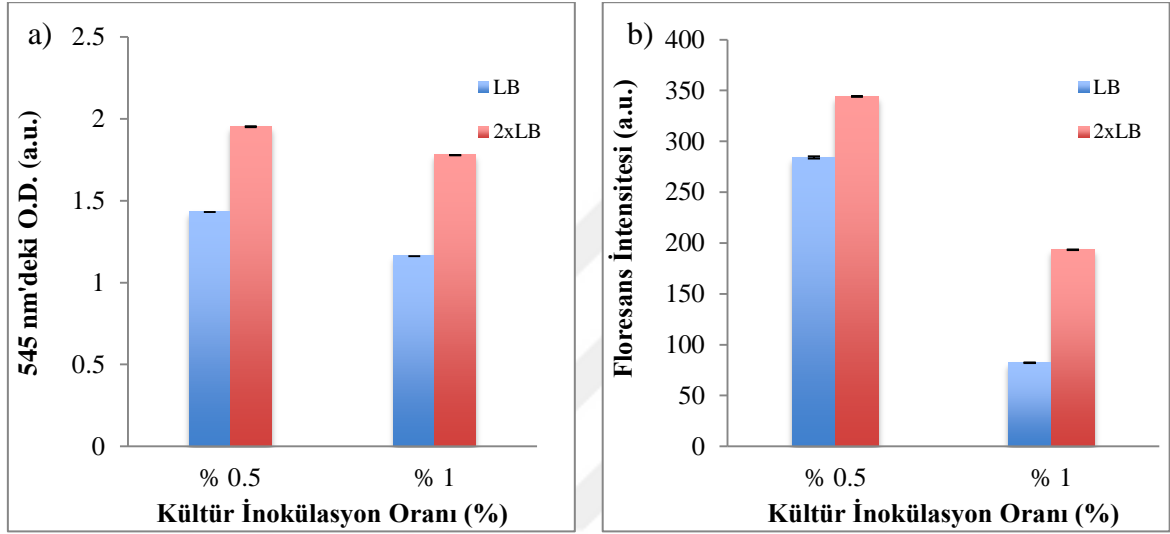
Gliserol stoğundan ve 2. pasajdaki kültürden farklı inokülasyon oranlarında ekimler yapılarak pasaj sayısının ve inokülasyon oranının hücre yoğunluğuna etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda 18 saatlik kültürler, fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar ¼ fosfat tamponunda

seyreltilmiştir. Kültürlerin 545 nm'deki O.D. değeri ~1.2 değerine ayarlanarak birim hücre başına üretilen GFP miktarları karşılaştırılmıştır.

Floresans ölçümleri scan modunda; uyarma 480 nm, emisyon aralığı 488-700nm, uyarma ve emisyon slit aralığı 5nm'de gerçekleştirilmiştir.

Stok

Stok *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin LB ve 2xLB besiyerlerinde farklı inokülasyon oranlarındaki (% 0.5, % 1) kültürü elde edilmiştir.



Şekil 4.29. Stok kültürden elde edilen a) O.D. değerleri b) emisyon intensiteleri

Şekil 4.29a'daki optik dansite değerleri incelendiğinde, 18 saatlik kültür elde ederken, farklı inokülasyon oranlarının (% 0.5, % 1) hem LB hem de 2xLB besiyerlerinde hücre yoğunluğuna etkisinin çok olmadığı gözlenmiştir. Büyük farklılık besiyerinden kaynaklanmakta olup, 2xLB besiyerinde daha yoğun bakteri üremesi gerçekleşmiştir.

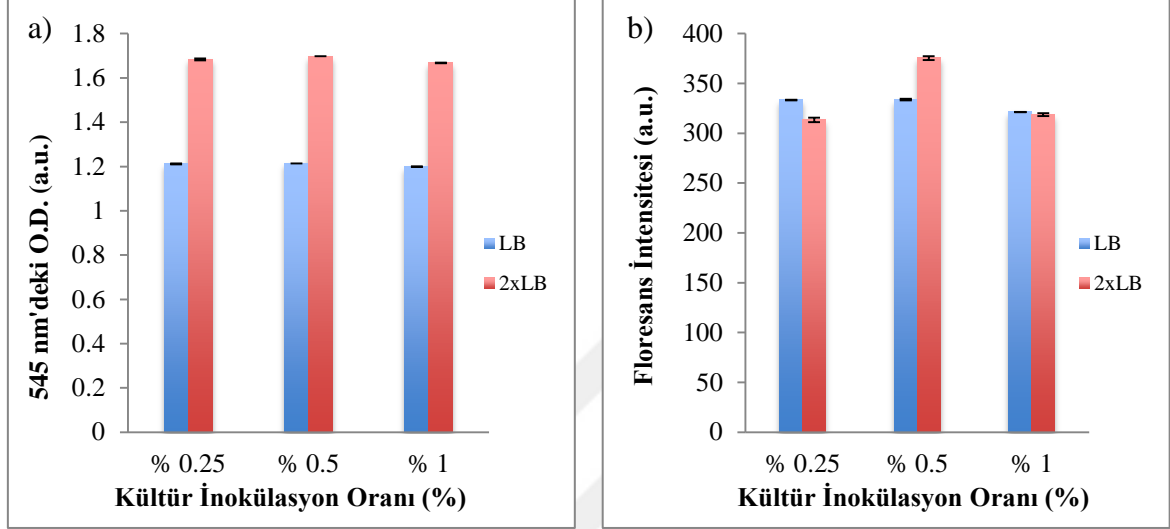
Şekil 4.29b'de görüldüğü üzere, stoktan LB besiyerinde birim hücre başına üretilen GFP miktarı % 1 kültür inokülasyon oranında 2xLB besiyerine göre yaklaşık olarak yarısı kadardır. Kültür inokülasyon oranı % 0.5 olduğunda 2xLB besiyerinde birim hücre başına üretilen GFP miktarı daha fazladır.

2. Pasaj

2.pasajtaki *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin, LB ve 2xLB besiyerlerinde farklı inokülasyon oranlarında (% 0.25, % 0.5, % 1) 18 saatlik kültürü elde edilmiştir.

18 saatlik kültürler, fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar $\frac{1}{4}$ fosfat tamponunda seyreltilmiştir. Kültürlerin 545 nm'deki O.D. değeri ~ 1.2 değerine ayarlanarak birim hücre başına üretilen GFP miktarları karşılaştırılmıştır.

Floresans ölçümleri scan modunda; uyarma 480 nm, emisyon aralığı 488-700 nm, uyarma ve emisyon slit aralığı 5nm'de gerçekleştirilmiştir.

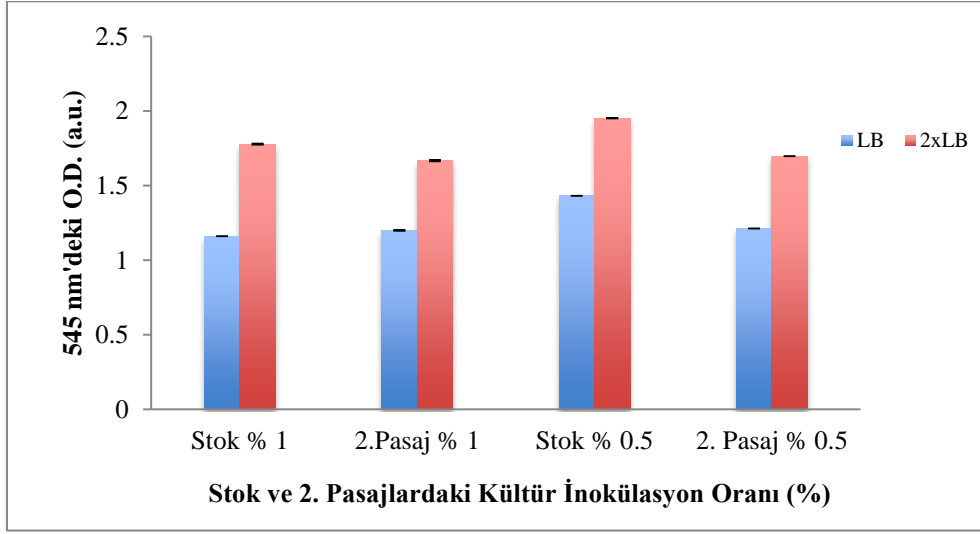


Şekil 4.30. İkinci pasajdaki kültürlerin farklı inokülasyon oranlarındaki LB ve 2xLB besiyerinde elde edilen a) O.D. değerleri b) emisyon intensiteleri

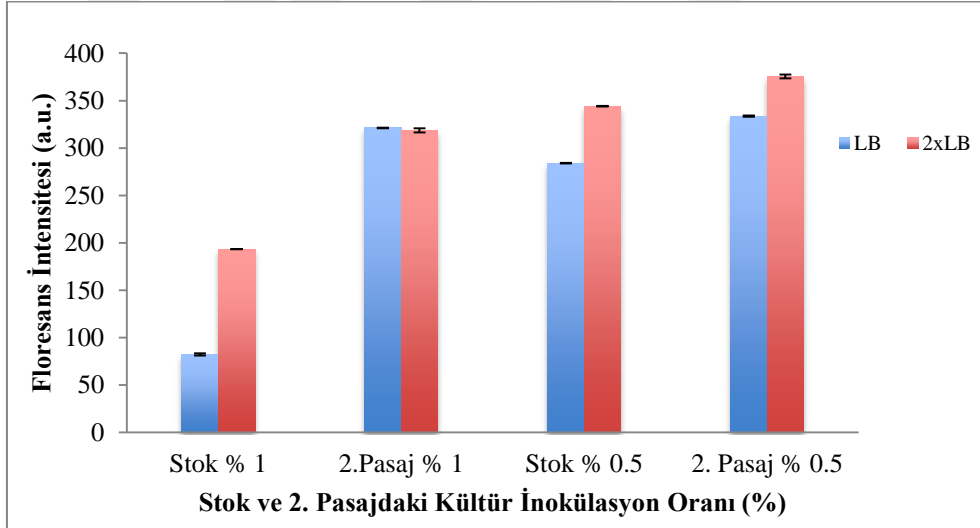
Şekil 4.30a'daki optik dansite değerleri incelendiğinde, 18 saatlik kültür eldesinde, hem LB hem de 2xLB besiyerlerinde farklı inokülasyon oranlarının (% 0.25, % 0.5, % 1) hücre yoğunluğuna bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Farklılık besiyerinden kaynaklanmakta olup, 2xLB besiyerinde daha yoğun bakteri üremesi gerçekleşmiştir.

Şekil 4.30b'deki floresans intensiteleri incelendiğinde, LB ve 2xLB besiyerinde birim hücre başına üretilen GFP miktarı % 1 kültür inokülasyon oranında yaklaşık olarak aynı iken, kültür inokülasyon oranı % 0.5 olduğunda 2xLB besiyerinde birim hücre başına üretilen GFP miktarı daha fazladır.

Stoktan ve 2. Pasajdan elde edilen kültür farkları



Şekil 4.31. Stok ve 2. pasajdaki kültürlerden LB ve 2xLB besiyerlerinde elde edilen O.D. değerleri



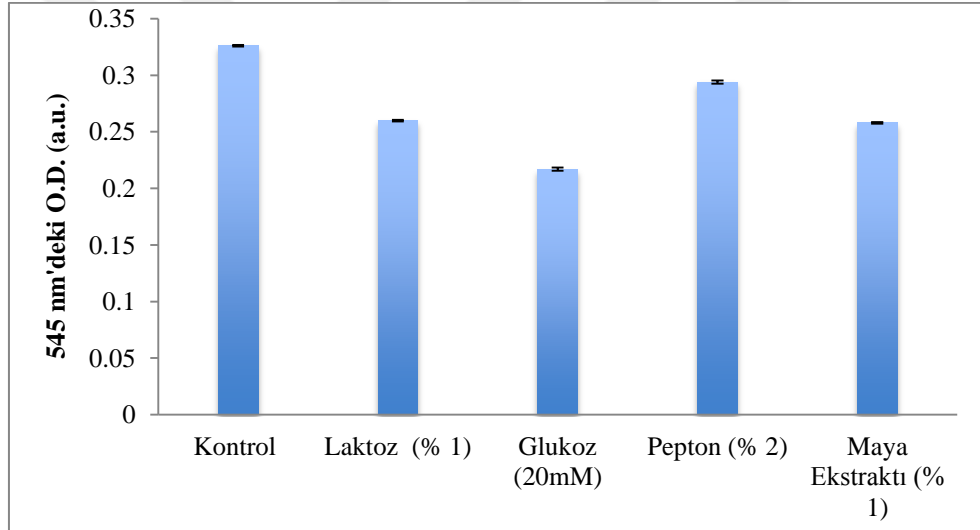
Şekil 4.32. Stok ve 2. pasajlardaki kültürden LB ve 2xLB besiyerlerinde elde edilen emisyon intensiteleri

Şekil 4.31'deki optik dansite değerleri incelendiğinde, kültür inokülasyon oranı ve pasaj sayısından ziyade kullanılan besiyerinin kültür yoğunluğu üzerine etkisinin olduğu görülmektedir. Şekil 4.32'deki floresans intensiteleri incelendiğinde ise, birim hücre başına üretilen GFP miktarı en fazla 2xLB besiyerinde 2. pasajdan % 0.5 inokülasyon oranında elde edilmektedir. Fakat 2. pasaj analiz süresini oldukça uzatan bir işlemdir. Stoktaki kültürden 2xLB besiyerine % 0.5 oranında kültür aktarımının yapıldığı durumdaki birim hücre başına elde edilen floresans intensitesi, 2. pasajdaki, 2xLB besiyerinde % 0.5 kültür oranına göre çok düşük olmayıp, yeterli görülmektedir. Bu yüzden, bu çalışma sonucunda

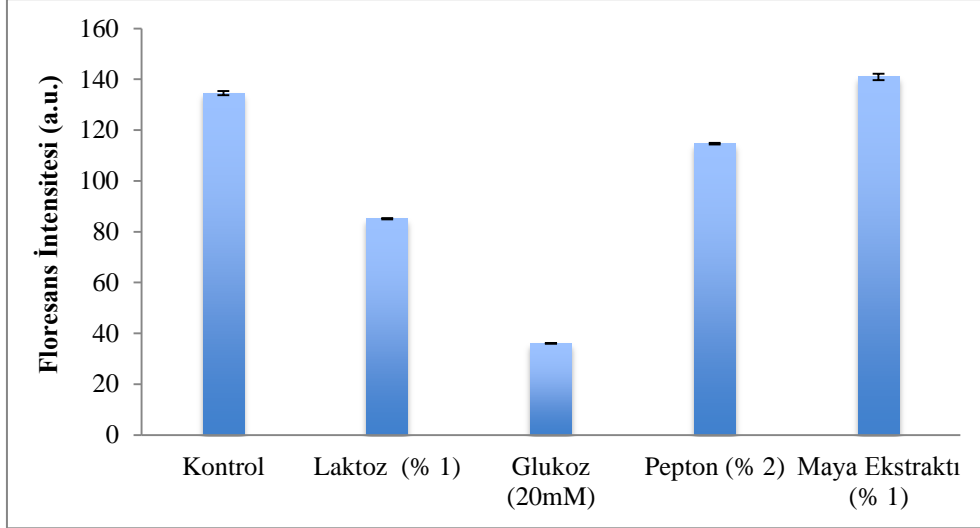
stoktaki kültürden % 0.5 kültür inokülasyon oranındaki aktarım seçilmiştir. Birim hücre başına elde edilen GFP'deki görünür artış 2xLB besiyerinden kaynaklanmış olup, bu çalışma sonrasında farklı besiyeri bileşenleri denenmiştir.

4.1.10 Besiyeri Bileşen Optimizasyonu

LB Broth besiyerine, laktoz (son konsantrasyon % 1 olacak şekilde), glukoz (20 mM), pepton (son konsantrasyon % 2 olacak şekilde), maya ekstraktı (son konsantrasyon % 1) eklenmiştir. Bu deney uygulanırken, 50 mL'lik falkon tüplerinde çalışıldığından, daha önce elde edilen (erlenlerde) O.D. değerlerinden daha düşük O.D. değerleri elde edilmiştir. Yine elde edilen kültürler, fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra, ¼ oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Birim hücre başına GFP miktarını tespit etmek için O.D değerleri ~ 0.22 değerine ayarlanmış ve bu şekilde floresans spektrofotometresinde ölçümler alınmıştır.



Şekil 4.33. LB besiyerine, laktoz glukoz, pepton ve maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin optik dansiteleri



Şekil 4.34. LB besiyerine, laktoz glukoz, pepton ve maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri

Şekil 4.33'deki optik dansite değerleri incelendiğinde, laktoz, glukoz, pepton ve maya ekstraktı eklenen besiyerlerinde elde edilen kültürlerde üremeler kontrol LB besiyerine göre daha az olmaktadır. Özellikle glukoz eklenen besiyerinde, bakteri üremesi kontrole göre belirgin bir şekilde düşmüştür. Besiyerine glukoz eklendiğinde, hücreler karbon kaynağı olarak ilk önce glukozu kullanmaktadır. Fakat aerobik koşullarda glukoz varlığında üreme sonucunda bakteriler asidik yan ürünler oluşturmaktadır. Bu asidik yan ürünler besiyerindeki tamponlama kapasitesini aşmış pH'yı 6.0'nın altına düşürdüğünde ise hücreler durağan faza girmekte ve üreme durmaktadır [180]. Glukoz eklendiğinde optik dansitedeki azalmanın nedeni bu mekanizma ile açıklanabilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan plazmid konstitutif promotörli olup oto-indüksiyon ile kendiliğinden GFP sentezlemektedir. Oto-indüksiyon çalkalamalı kültürde, T7 ekspresyon suşlarının stabilite, büyüme ve indüksiyonuna etki eden faktörlerin araştırılması sırasında, kompleks besiyerlerinde kendiliğinden ve istemeden oluşan ve ekspresyon indüksiyonunun farkedilmesi ile keşfedilmiştir [180]. Laktozun, protein ekspresyonunu indükleyebilme kapasitesinin ve bu indüksiyonun farklı bileşikler ile bakterilerin üremesi sırasında önlenemesinin farkedilmesi ile, bakteri üremesinin takip edilerek, uygun zamanlarda indükleyici eklenmesine gerek kalmadan, otomatik olarak protein ekspresyonu sağlayan besiyeri geliştirilmesi imkanı doğmuş ve bu durum oto-indüksiyon olarak adlandırılmıştır [180]. Oto-indüksiyon isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) indüksiyonuna göre daha uygundur, çünkü ekspresyon suşu sadece oto-indüksiyon besiyerine inoküle edilmekte ve kültür üremesi takibi ve uygun zamanda indükleyici eklenmesine gerek

kalmadan ekspresyon sağlanmaktadır. Ayrıca, kültür yoğunluğu ve birim kültür hacmi başına ekspres edilen proteinin konsantrasyonu, IPTG indüksiyonu ile elde edilenden oldukça fazladır [180]. Oto-indüksiyonun membran proteinleri de dahil çok farklı proteinlerin üretiminde kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Yüksek yoğunluklu kültürlerle oto-indüksiyon sonucu, IPTG indüksiyonuna göre, birim kültür hacmine göre daha fazla protein üretilmektedir. Oto-indüksiyon küçük ölçekli laboratuvarlarda tek bir protein analizinden, büyük projelerde birden fazla farklı proteinlerin üretimine ve hatta ticari ölçekte protein üretimi için uygun, verimli ve ekonomiktir. Protein ekspresyonu için ideal olan, ekspresyon suşlarının oto-indükleyici besiyerinde hedef proteini ekspres etmeden yüksek yoğunluklarda üretilmesi ve bunun sonucu olarak ortamda laktozun indüksiyonunu engelleyen inhibitör maddelerin azalması ile hedef proteinin yüksek miktarlarda üretilmesidir.

Oto indüksiyonda besiyeri bileşimi oldukça önemli olup, bazı maddeler indüksiyonu sağlarken bazı maddeler indüksiyonu inhibe etmektedir. İndüksiyonun en temel sebebi, besiyerindeki az miktardaki laktozdur. Laktozun neden olduğu indüksiyon glukoz tarafından bilinen mekanizmalarla engellenmektedir. Ortamda glukoz olduğu zaman, laktozun hücre içine alımı ve hücreler tarafından kullanımı engellenmektedir [184-186]. Yapılan çalışmalarda, besiyerine % 1 oranında glukoz eklenmesi sonucu indüksiyon kuvvetli bir şekilde baskılanırken, % 0.1 oranında glukoz eklenmesinin etkisinin az olduğu gözlenmektedir [180, 187]. % 0.05 oranındaki glukozun besiyerine ilavesi ile kısa bir lag fazı ile başlangıç üremesi hızlanmaktadır. Bu orandaki glukoz, özellikle konak hücreye çok toksik hedef proteinlerin ekspres edilmesinde başarı ile kullanılmaktadır. Glukoz başlangıç aşamasındaki indüksiyonu inhibe ederek, hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşmasını ve yeterli plazmidin oluşturulmasını sağlamaktadır. Bu şekilde toksik özellikteki proteinlerde başarı ile ekspresyon sağlanmaktadır [180].

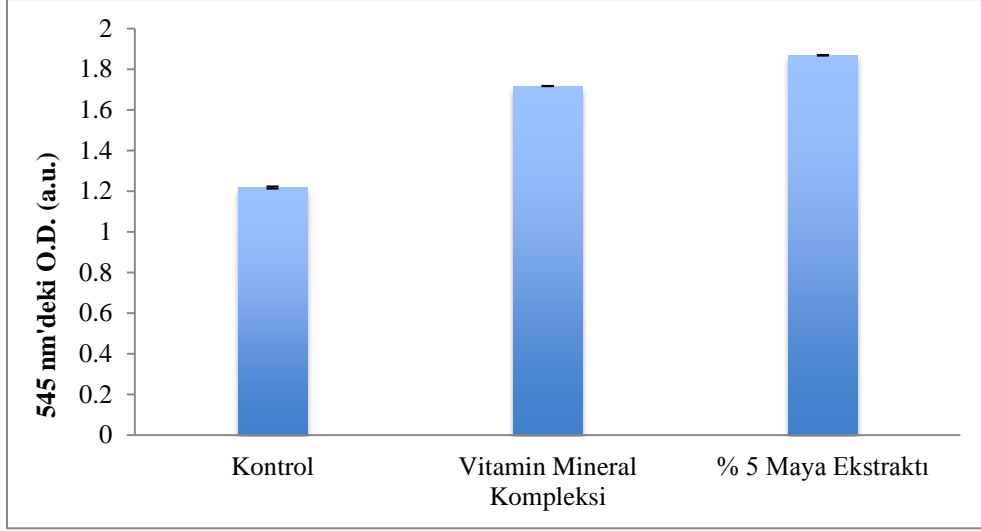
Şekil 4.33 ve 4.34'deki % 1 laktoz eklendiğindeki optik dansite ve emisyon intensiteleri incelendiğinde, hem üremenin yavaşladığı, hem de birim hücre başına üretilen GFP miktarının azaldığı gözlenmektedir. Düşük oranlardaki laktoz oto-indüksiyonda protein ekspresyonunu artırmaktadır. Fakat burada kullanılan konsantrasyon % 1 olup, protein ekspresyonunu artırmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, besiyerine % 0.005 ile % 1 arasında farklı oranlarda laktoz eklenmiş ve bunun hem hücre yoğunluğu hem de protein ekspresyonu miktarına etkisi incelenmiştir. Laktoz oranı % 0.005 iken en yüksek hücre yoğunluğu ve protein miktarına ulaşırken, laktoz oranı arttıkça hem hücre yoğunluğu hem

de protein miktarı azalmıştır [180]. Bunun sebebinin yüksek indüksiyonun, ekspres edilen protein toksik özellikte olmasa bile, plazmid taşıyan hücreleri öldürmesi olarak açıklanmıştır.

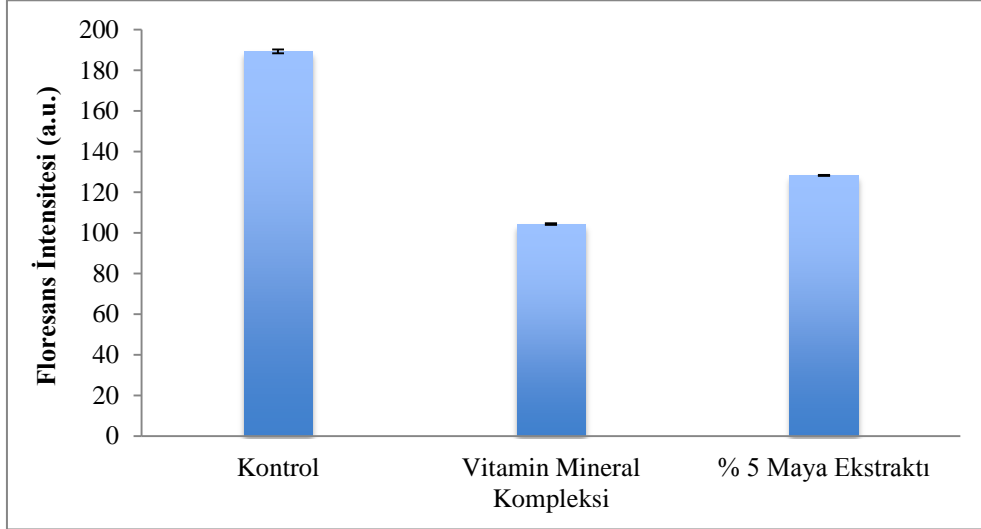
Şekil 4.33 ve 4.34'deki grafiklerden görüldüğü üzere pepton eklendiği durumda da hem hücre yoğunluğu, hem de birim hücre başına üretilen GFP miktarı azalmaktadır. Bunun sebebi glukozun olmadığı durumlarda, amino asitlerin de laktoz indüksiyonunu önleyebilmesidir [180].

Şekil 4.33 ve 4.34'de görüldüğü üzere besiyerindeki maya ekstraktı konsantrasyonu % 1 olduğu durumda, hücre yoğunluğu bir miktar azalırken, birim hücre başına ekspres edilen GFP miktarı artmaktadır. Yapılan çalışmalarda, LB besiyerindeki maya ekstraktının oto-indüksiyonu artırdığı gözlenmiştir. Bunun olası sebebinin maya ekstraktında bulunan az miktardaki laktozun olduğu düşünülmektedir [188].

% 1 konsantrasyondaki maya ekstraktı eklenmiş örneğin kontrole göre az da olsa daha yüksek GFP ekspres etmesi üzerine besiyerindeki maya ekstraktının son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunun dışında, piyasadan alınan 4 farklı markanın vitamin mineral kompleksi (Solgar, Elevit, Decavit, Sunday) denenmiştir. Bu denemede falkon tüplerinde üreme yavaşladığı için tekrar erlenler içerisinde üretim yapılmıştır. 18 saatlik kültürler, fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar $\frac{1}{4}$ fosfat tamponunda seyreltilmiştir. Kültürlerin 545 nm'deki O.D. değeri ~1.2 değerine ayarlanarak birim hücre başına üretilen GFP miktarları karşılaştırılmıştır. Floresans ölçümleri scan modunda; uyarma 480 nm, emisyon aralığı 488-700 nm, uyarma ve emisyon slit aralığı 5 nm parametrelerinde yapılmıştır.



Şekil 4.35. LB besiyerine, vitamin mineral kompleksi ve % 5 maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin optik dansiteleri

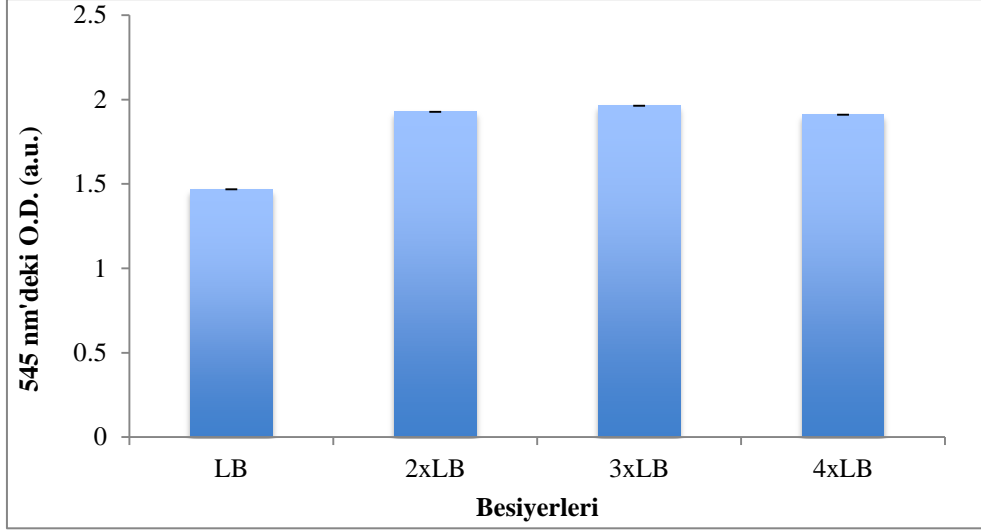


Şekil 4.36. LB besiyerine, vitamin mineral kompleksi ve % 5 maya ekstraktı eklenmiş besiyerlerinde elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri

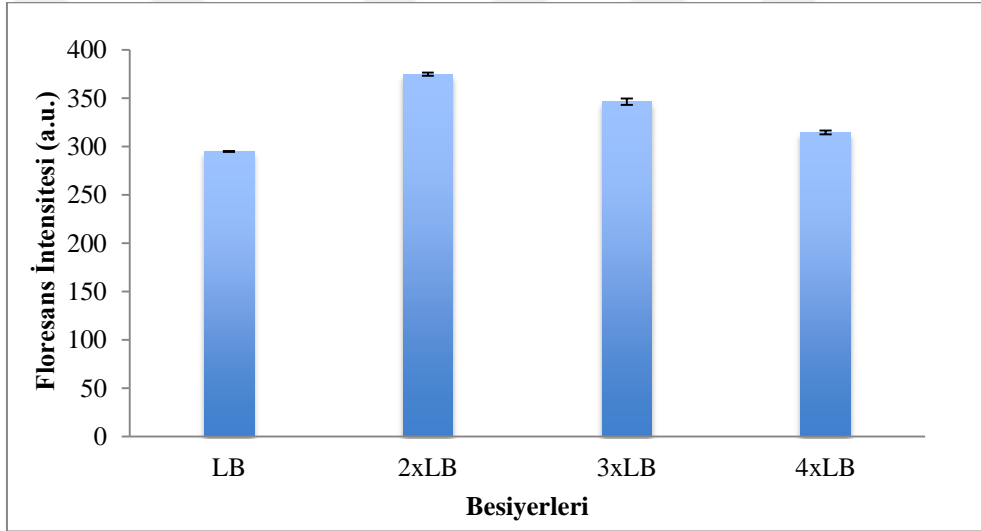
Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da görüldüğü üzere, vitamin mineral kompleksi ve maya ekstraktı hücrelerin üreme hızını artırmasına rağmen, birim hücre başına üretilen GFP miktarı azalmıştır.

LB, 2xLB, 3xLB, 4xLB Besiyerleri

Bu çalışmada kültür elde edilirkenki inokülasyon oranı olarak daha önceki çalışmalarda optimum olarak seçilen % 0.5 kullanılmıştır. 18 saatlik kültürler, fosfat tamponu ile yıkayıp tekrar $\frac{1}{4}$ fosfat tamponunda seyreltilmiştir. Kültürlerin 545 nm'deki O.D. değeri ~1.2 değerine ayarlanarak birim hücre başına ekspres edilen GFP miktarları karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.37. LB, 2xLB, 3xLB ve 4xLB besiyerlerinde elde edilen kültürlerin optik dansiteleri



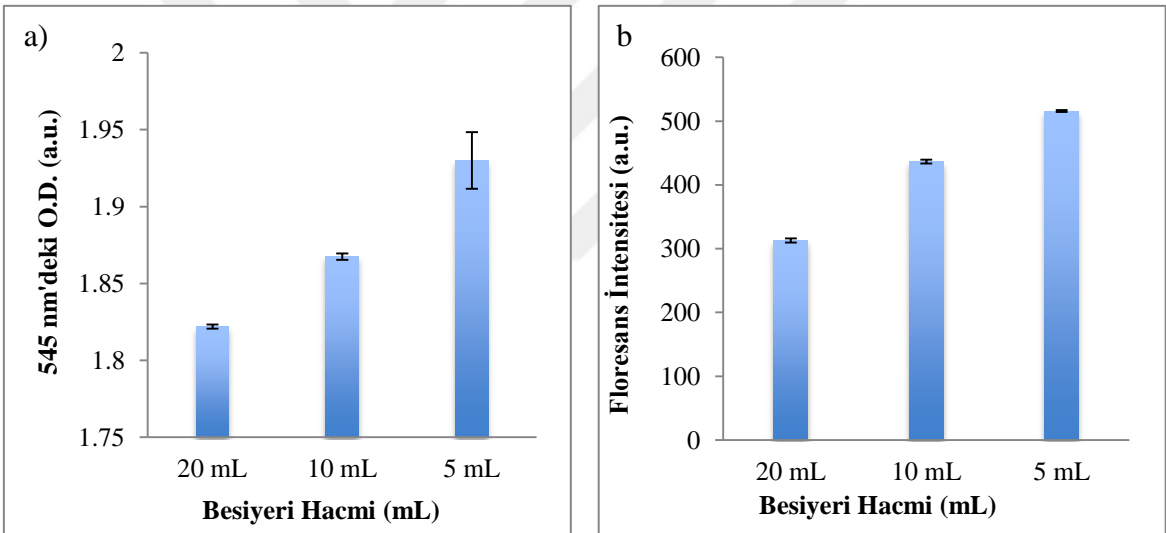
Şekil 4.38. LB, 2xLB, 3xLB ve 4xLB besiyerlerinde elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri

Şekil 4.38'deki optik dansite değerleri incelendiğinde 2xLB, 3xLB ve 4xLB besiyerlerindeki O.D. değerlerinin LB besiyerindekinden fazla olduğu, fakat kendi aralarında belirgin bir farkın olmadığı gözlenmektedir. Şekil 4.38'deki emisyon intensiteleri incelendiğinde ise birim hücre başına elde edilen GFP miktarının 2xLB besiyerinde çok az fazla olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre 2xLB besiyerinin kullanılmasının daha uygun olduğu görülmüştür. Bu yüzden bundan sonraki çalışmalarda 2xLB besiyeri kullanılmıştır.

4.1.11 Analiz İçin Besiyeri Miktarı (Oksijen Etkisi)

Elde edilen yaşam eğrisi sonucunda, daha önce ulaşılamayan floresans emisyon intensite değerleri elde edilmiştir. Bu durumun olası sebebi olarak, erlende bulunan kültürden saat başı örnek alınması dolayısı ile erlendeki hacim azalması ve bunun sonucunda örneğe daha fazla oksijen girişinin olduğu düşünülmüştür. Bu durumu kanıtlamak için, 250 mL erlenlere, 5 mL, 10 mL ve 20 mL hacimlerinde besiyeri alınarak her bir kültürün optik dansite, ve floresans emisyon intensite değerleri ölçülmüştür.

Elde edilen kültürler, fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra, $\frac{1}{4}$ oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Birim hücre başına GFP miktarını tespit etmek için O.D değerleri ~ 1.2 değerine ayarlanarak birim hücre başına ekspres GFP miktarları karşılaştırılmıştır. Floresans ölçümleri scan modunda; uyarma 480 nm, emisyon aralığı 488 - 700 nm, uyarma ve emisyon slit aralığı 5 nm'de alınmıştır.



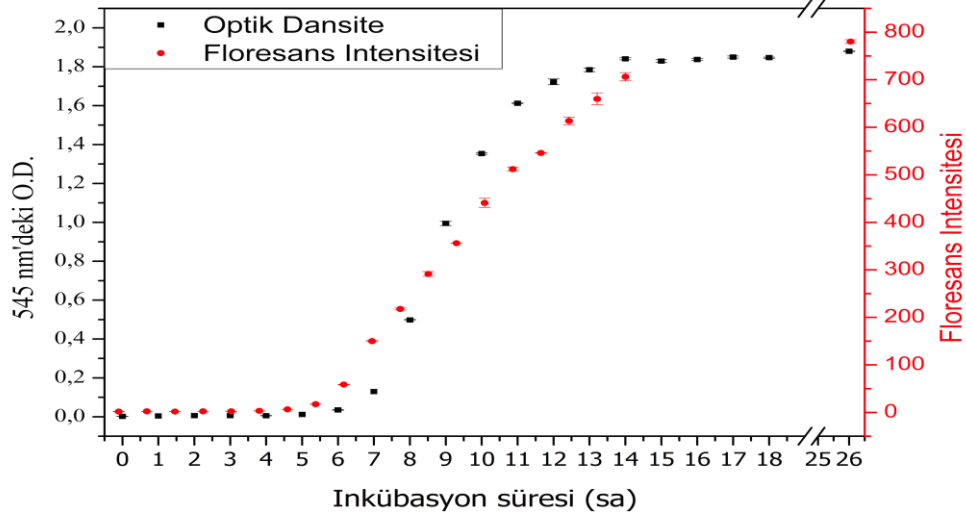
Şekil 4.39. Erlenlerdeki farklı besiyeri hacimlerinde (5, 10 ve 20 mL) elde edilen kültürlerin a) optik dansiteleri, b) emisyon intensiteleri

Şekil 4.39a'daki grafikte görüldüğü üzere, 5 mL LB besiyerinde özellikle O.D. değeri, diğerlerine oranla oldukça yüksektir. Bu, birim zamanda daha fazla hücrenin ürediğini göstermektedir. Şekil 4.39b'deki grafikte ise 5 mL besiyeri hacminde floresans intensitesinin daha fazla olduğu birim hücre başına daha fazla GFP ekspres edildiği görülmektedir. Bu sebeplerden dolayı, 5 mL hacimin kullanılması düşünülmüştür. Erendeki kültür hacmi azaldıkça, aerasyon hızı artmakta, besiyerine daha fazla oksijen girişi olmaktadır.

Yapılan bir çalışmada yeterli aerasyonun sağlanabilmesi için, 18 x 150 mm kültür tüpleri için 1.5 mL, 125 mL'lik erlen için 5-10 mL kültür hacminin olması gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, aerasyonun kültür yoğunluğu ve protein üretimine etkisi için hem kültür tüplerinde hem de erlenlerde farklı kültür hacmi ile çalışılmış ve kültür hacmi azaldıkça, hücre yoğunluğunun arttığı protein üretiminin azaldığı, kültür hacmi arttıkça ise, hücre yoğunluğunun azaldığı protein üretiminin arttığı görülmüştür. Bunun nedeninin, aerasyon hızı arttıkça protein indüksiyonu için daha fazla laktoza ihtiyaç duyulması olduğu bildirmiştir [180].

4.2 Üreme Eğrisi

E. coli BL21(DE3) hücresinin 2xLB besiyerinde 37°C'lik çalkalamalı su banyosunda üreme eğrisi çıkarılmıştır.



Şekil 4.40. *E. coli* BL21(DE3)' in zamana karşı elde edilen üreme eğrisi

Şekil 4.40'da *E. coli* BL21(DE3) hücresinin zamana karşı alınan optik dansite ve floresans intensiteleri görülmektedir. Floresans intensitesi değerleri incelendiğinde, inkübasyon sonlarına doğru intensitenin 700 civarında olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni olarak, besiyeri hacmi azaldıkça, hem hücre yoğunluğu hem de birim hücre başına üretilen GFP miktarındaki artış gösterilmiştir.

Belirli saatlerde alınan örneklerden ise, kloroamfenikol içeren LB agar besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile paralelli ekimler yapılmıştır. Buna göre sonuçlar aşağıdaki tabloda bulunmaktadır.

Çizelge 4.2. *E. coli* BL21(DE3) kültürünün inkübasyon sürecindeki farklı zamanlarda elde edilen canlı hücre sayımları

İnkübasyon süresi (sa)	Canlı hücre sayısı (KOB/mL)
0	$3.3 \pm 0.9 \times 10^6$
8	$5.3 \pm 1.2 \times 10^8$
10	$3.1 \pm 0.2 \times 10^9$
12	$4.3 \pm 0.6 \times 10^9$

Çalışmada, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin jenerasyon süresi de aşağıdaki formül ile hesaplanmış olup, 47.2 dk olarak bulunmuştur.

$$G = 120 / ((3.3 \times (\log 3.1 \times 10^9 / 5.3 \times 10^8)))$$

$$G = 120 / (3.3 \times 0.77)$$

$$G \approx 47.2 \text{ dk}$$

Yapılan bir çalışmada *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin log faz üreme aşamasında 37°C'de jenerasyon süresi minimal besiyerinde 60 ila 70 dk arasında, ZY besiyeri veya 18 amino asit içeren besiyerinde 30 – 35 dk arasında olduğu bulunmuştur [180].

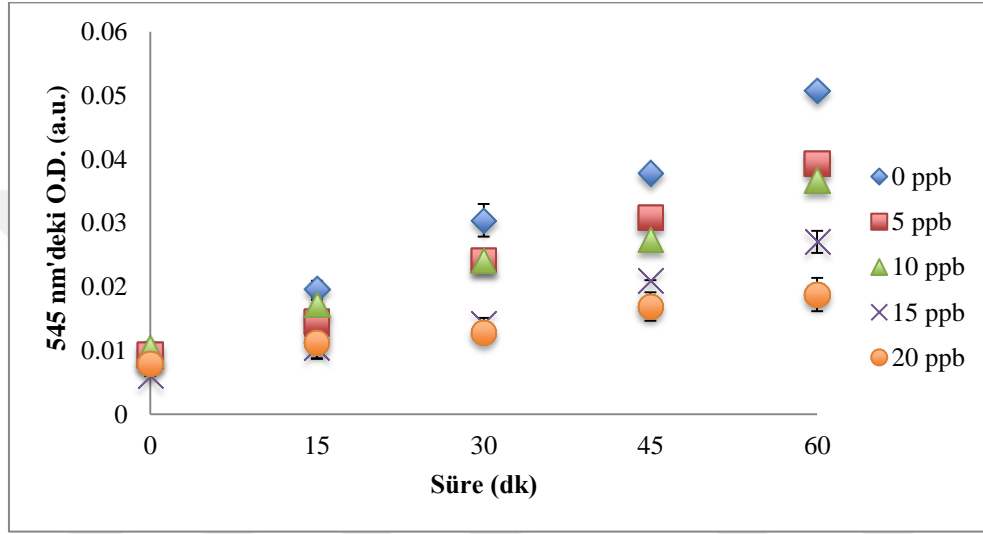
4.3 Antibiyotiklerin Analizi, Kalibrasyon Eğrileri, Tespit Değerleri

Yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde, seçilen optimum parametrelerde, antibiyotikler için geliştirilen yöntem standart antibiyotik çözeltileri için denenmiştir. Seçilen optimum analiz yöntemi; plazmid aktarımı yapılan *E. coli* BL21(DE3) gliserol stoğundan, 250 mL'lik erlende 5 mL 2xLB besiyerine % 0.5 inokülasyon oranında ekim yapılarak 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 18 saatlik kültürü elde edilmektedir. Bu kültürden analiz için % 0.5 oranında kültür yine yukarıdaki optimum parametrelerdeki besiyerine eklenmekte antibiyotik analizi için kinetik ölçüm yapılmaktadır. Analiz 60 dk süresince her 15 dk da bir örnek alınarak, pH 8.5 fosfat tamponunda 1 kez yıkanmakta ve UV-vis spektrofotometrede optik dansite, floresans spektrofotometrede emisyon intensiteleri ölçülmektedir. Her bir antibiyotik konsantrasyonu 2 paralelli çalışılmıştır. Zamana karşı emisyon intensiteleri grafiğe geçirilerek her bir antibiyotik konsantrasyonu için eğim değerleri elde edilmiştir. Bu eğim değerleri, antibiyotik konsantrasyonuna karşı grafiğe konularak kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri vasıtasıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen LOD değerleri, Türk Gıda Kodeksi 'Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri' yönetmeliğindeki MKL değerleri (EK 2) ve Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından önerilen MKL değerleri (EK 3) ile karşılaştırılmıştır [43, 189]. Türk Gıda Kodeksi'nde

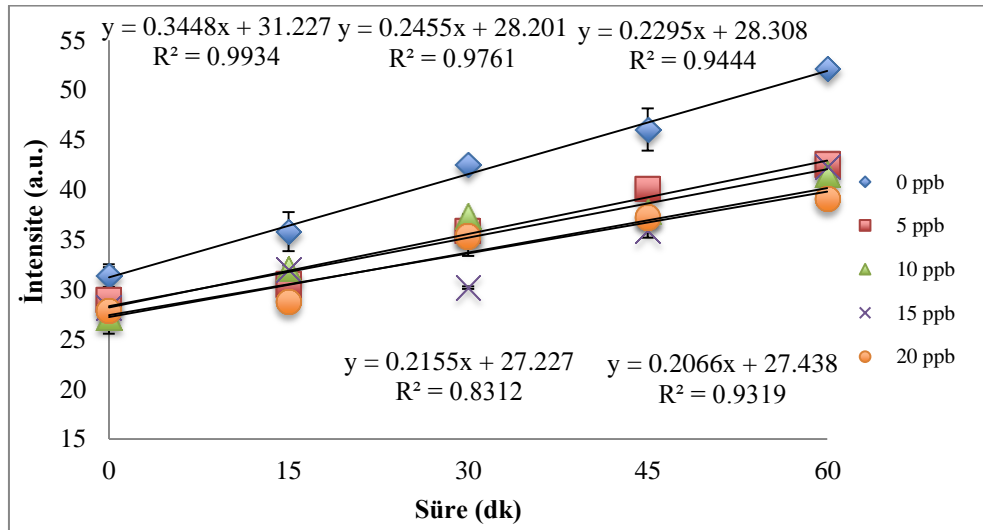
İlgili yönetmelikteki MKL değerleri, Avrupa Birliği tarafından belirtilen değerlerle aynıdır [190].

4.3.1 Ampisilin Analizi

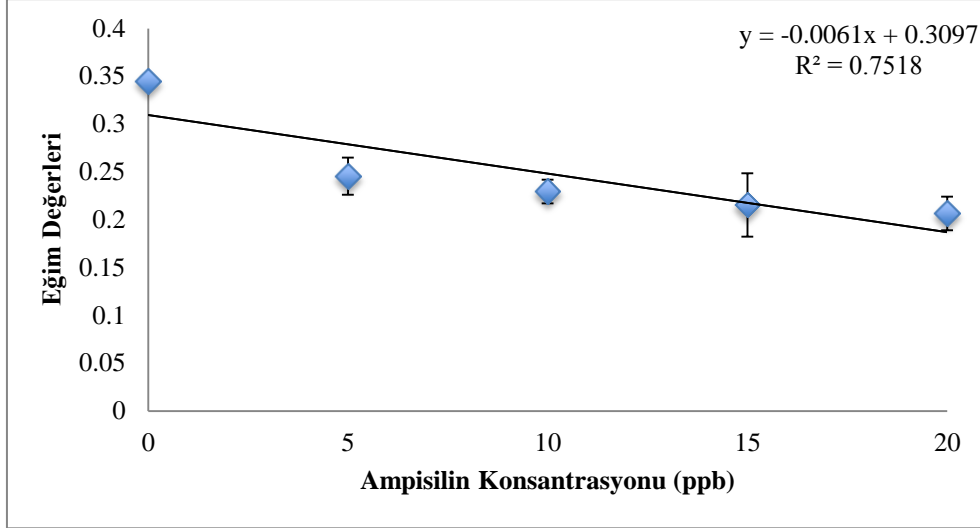
Ampisilin β -laktam grubu antibiyotikler içerisinde yer alan yarı-sentetik bir antibiyotiktir. Ampisilin analizi için, 0, 5, 10, 15 ve 20 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 μ L eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk'da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.41. Farklı ampisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20 ppb) elde edilen kültürün optik dansite değerleri



Şekil 4.42. Farklı ampisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20 ppb) elde edilen kültürün emisyon intensiteleri

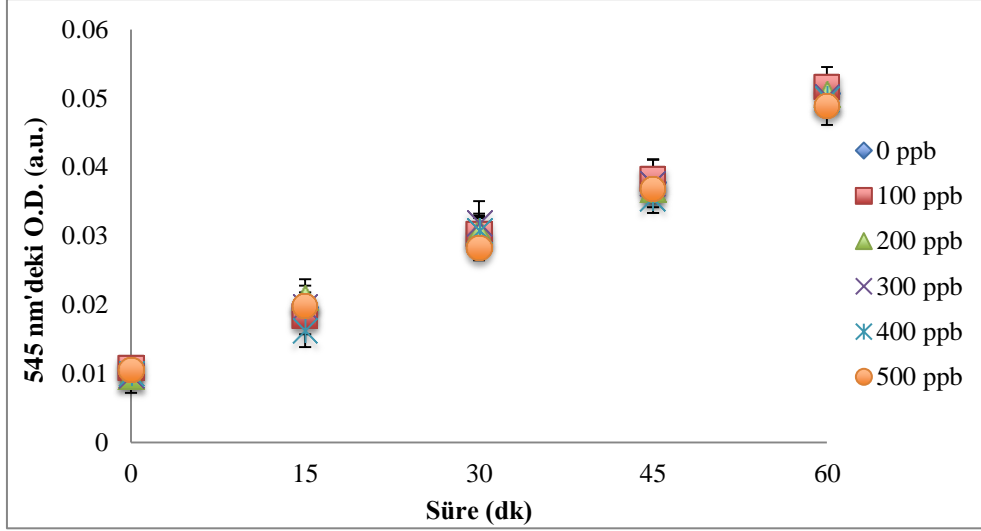


Şekil 4.43. Ampisilin konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 15, 20 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

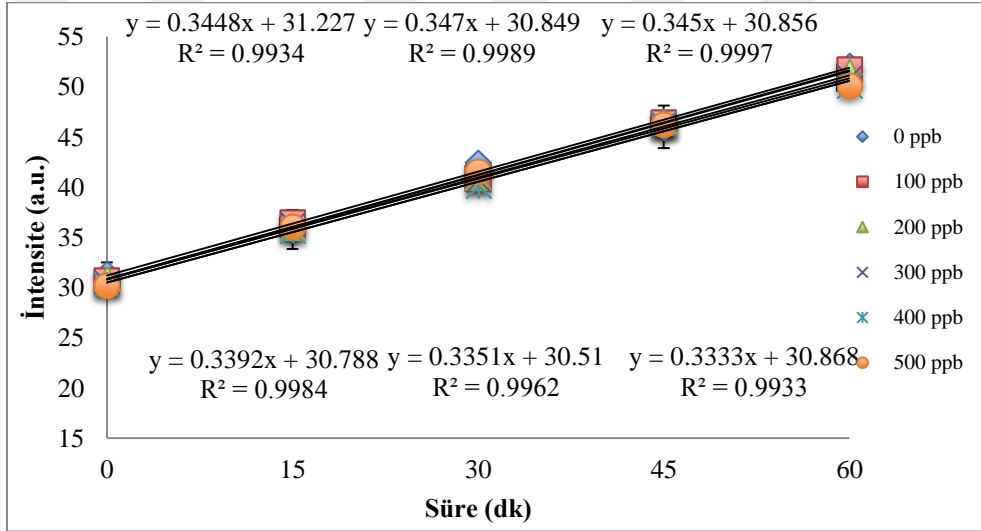
Şekil 4.43’de elde edilen kalibrasyon eğrisinden, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 3.33 ppb ve 10.08 ppb olarak bulunmuştur. Ampisilin için, ‘Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri’ yönetmeliğinin ‘Bölüm 1 İzinli Maddeler’ (EK 2’de bu tez kapsamında incelenen antibiyotikler için değerler verilmektedir) kısmına göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 4 ppb’dir. Kodeks Alimentarius’ta ampisilin ifadesi geçmemekte, bunun yerine amoksisilin (p-hidroksiampisilin) için MKL değeri 4 ppb olarak verilmektedir (EK 3). Ampisilin için elde edilen LOD değeri izin verilen MKL düzeylerinden daha düşük olduğundan, bu yöntemin ampisilin kalıntı düzeyi analizi için kullanılabilirliği söylenebilir.

4.3.2 Basitrasin A Analizi

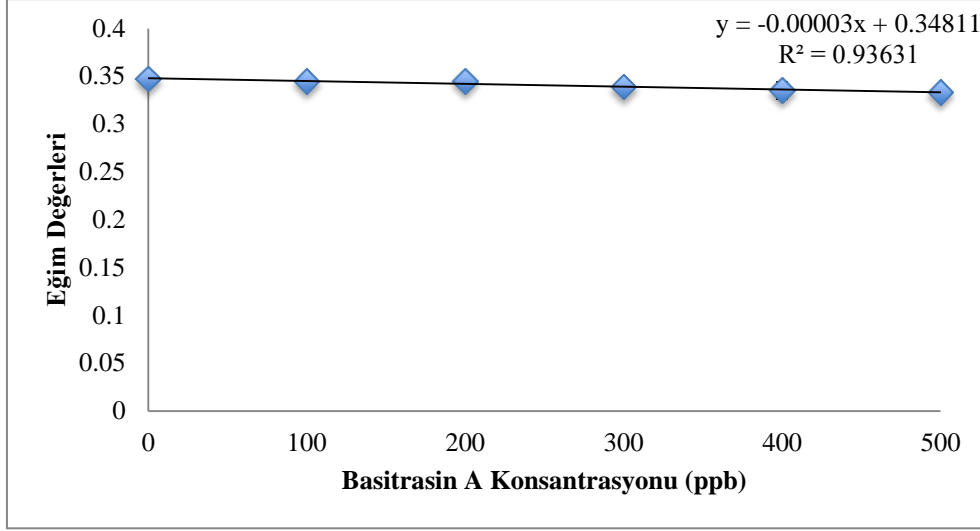
Basitrasin A polipeptid yapıda bir antibiyotik olup, peptidoglikan taşıyıcı C₅₅-izoprenil pirofosfat (IPP) defosforilasyonunu inhibe ederek hücre duvarı sentezinde girişim yapmaktadır [191]. Basitrasin A analizi için, 0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.44. Farklı basitrasin A konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürün optik dansite değerleri



Şekil 4.45. Farklı basitrasin A konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürün emisyon intensiteleri



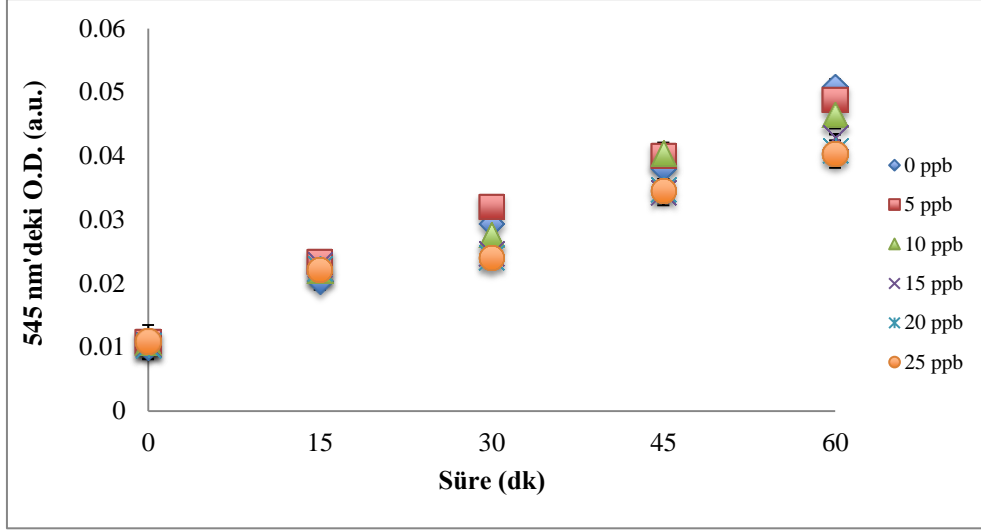
Şekil 4.46. Basitrasin A konsantrasyonlarına (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

Şekil 4.45’de elde edilen kalibrasyon eğrileri incelendiğinde, zamana karşı alınan intensite değerleri grafiğinde artan basitrasin A konsantrasyonuna karşı eğimde belirgin bir azalma gözlenmemektedir. Şekil 4.46’de elde edilen konsantrasyona karşı eğim değerleri kalibrasyon eğrisinden, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 544.47 ppb ve 1649.92 ppb bulunmuştur. Basitrasin A için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 100 ppb’dir. Bu yüzden, bu yöntemin basitrasin A’nın sütte kalıntı düzeyi analizi için kullanılamayacağı öngörülmektedir. Kodeks Alimentarius’ta ise Basitrasin A ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır.

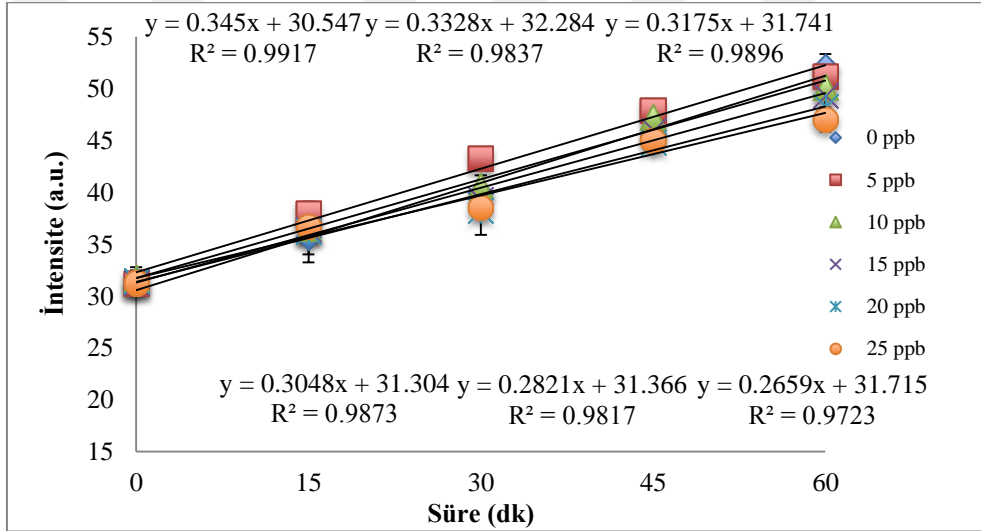
4.3.3 Benzilpenisilin (Penisilin G) Analizi

Benzilpenisilin β -laktam grubu bir antibiyotiktir. Penisilinlerin genel yapısında β -laktam halkasına bağlı thiazolidin halkası bulunmaktadır. Penisilinlerin merkezi biyolojik aktiviteden sorumlu iken, farklı penisilin türlerinde değişik yan zincirler bulunmaktadır. Benzilpenisilin hem insanlarda hem de hayvanlarda yaygın kullanılan antibiyotik türlerinden biridir. Özellikle laktasyon dönemindeki ineklerde mastitis tedavisinde kullanılmaktadır [192]. Penisilinler, bakteri hücre duvarı sentezinin ihibisyonu veya otolitik enzimlerin aktivasyonu ile etki göstermektedir.

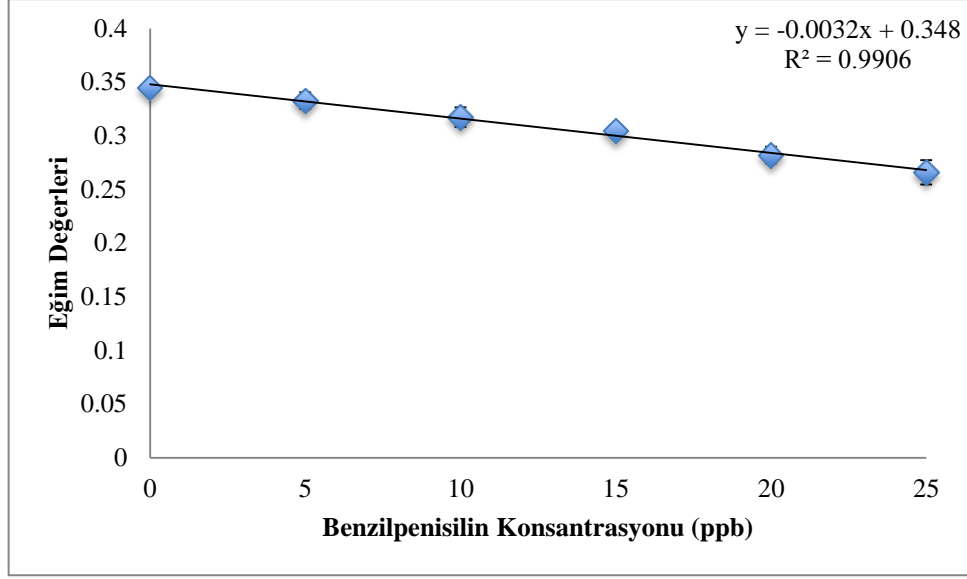
Benzilpenisilin analizi için, 0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 μ L eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.47. Farklı benzilpenisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri



Şekil 4.48. Farklı benzilpenisilin konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürün emisyon intensiteleri

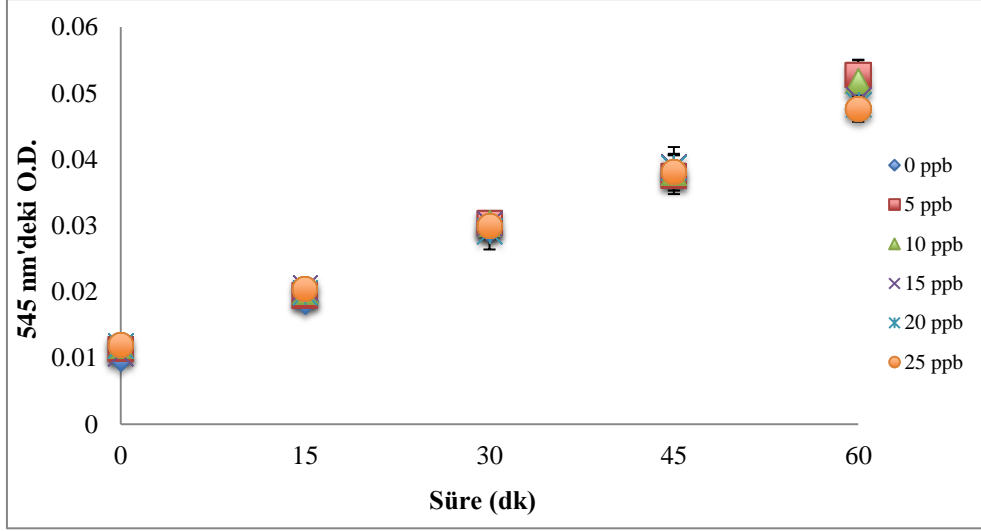


Şekil 4.49. Benzilpenisilin konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

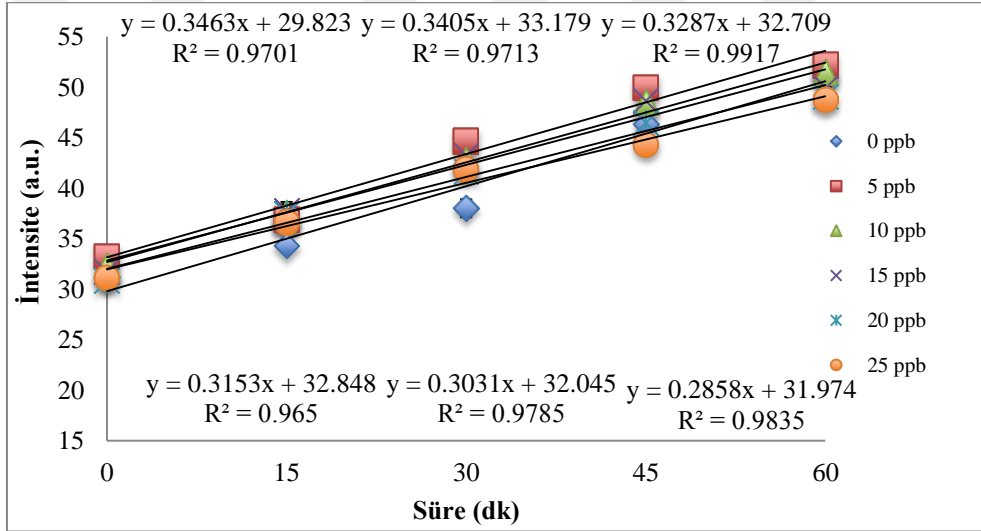
Şekil 4.49’da elde edilen konsantrasyona karşı eğim değerleri grafiğinin kalibrasyon eğrisinden, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 0.29 ppb ve 0.88 ppb bulunmuştur. Benzilpenisilin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 4 ppb’dir. Bu yüzden, bu yöntemin benzilpenisilinin sütte kalıntı analizi için başarılı bir şekilde kullanılabilceği görülmektedir.

4.3.4 Furazolidon Analizi

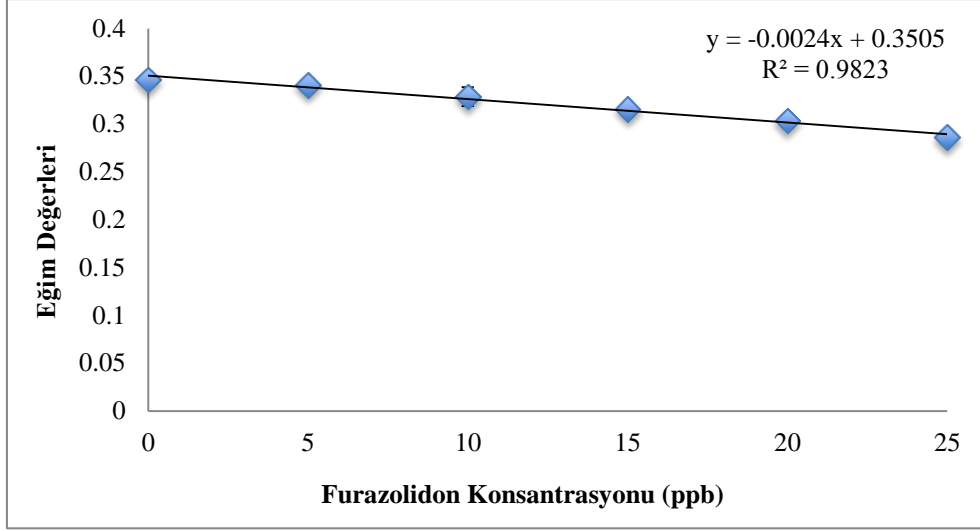
Furazolidon, nitrofuran grubu antibiyotik olup, hayvansal gıdalarda bulunmaması gerekmektedir. Furazolidon analizi için, 0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.50. Farklı furazolidon konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürün optik dansite değerleri



Şekil 4.51. Farklı furazolidon konsantrasyonlarında (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri

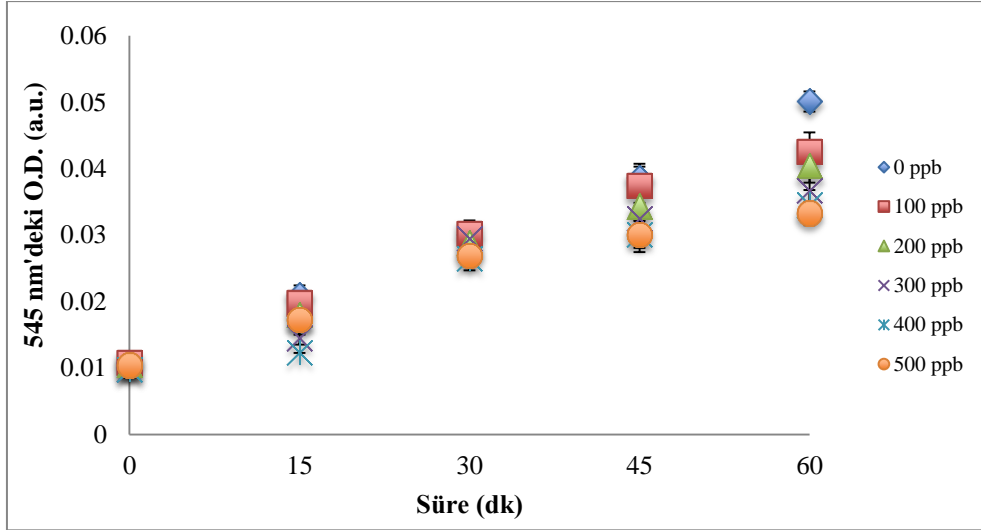


Şekil 4.52. Furazolidon konsantrasyonlarına (0, 5, 10, 15, 20, 25 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

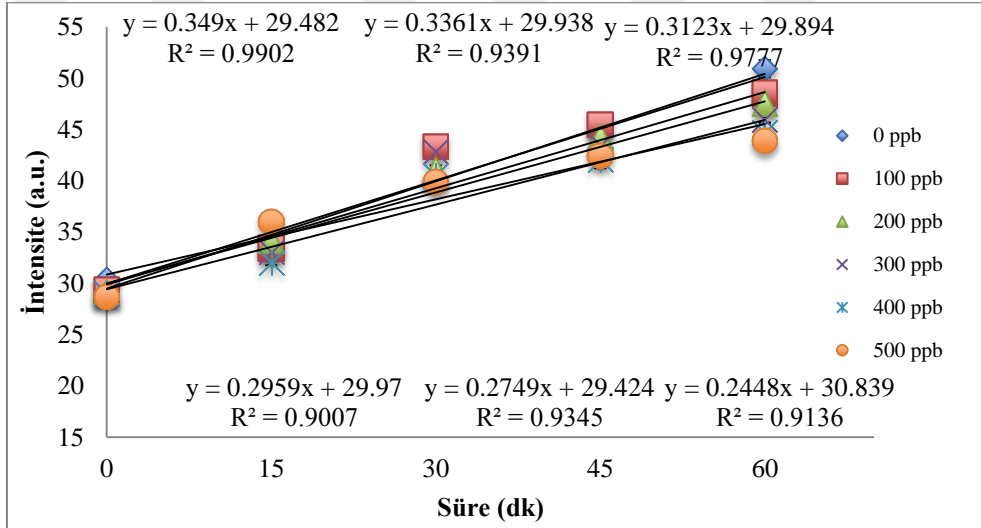
Şekil 4.52’de konsantrasyona karşı eğim değerlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinden, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 5.64 ppb ve 17.09 ppb bulunmuştur. Furazolidon, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre yasaklı maddeler kısmında yer almakta olup hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunmaması gerekmektedir. Bu yüzden, bu yöntem furazolidon analizi için amaca bağlı olarak kullanılabilir fakat kalıntı düzeyi tespiti için daha hassas analiz yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

4.3.5 Gentamisin Analizi

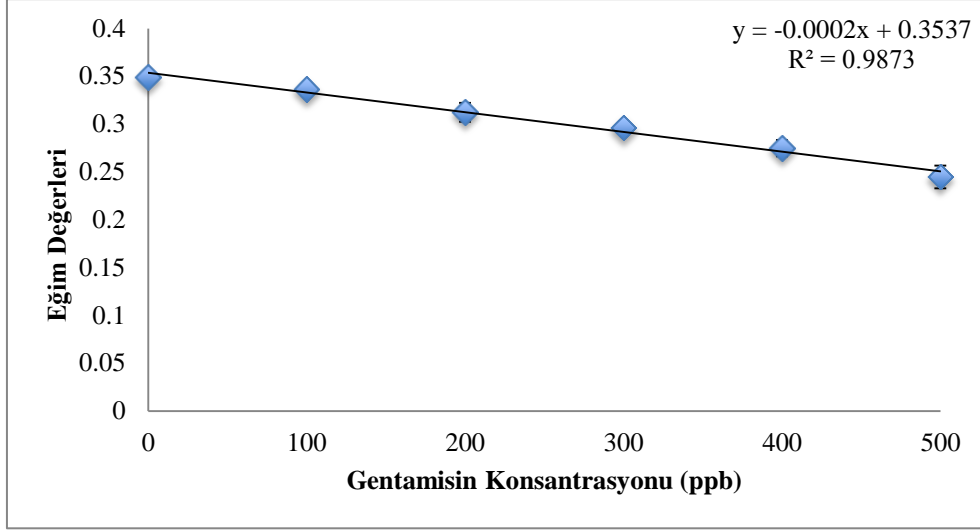
Gentamisin, aminosiklitol grubu içeren aminoglikozit sınıfı bir antibiyotiktir [193]. Gentamisin analizi için, 0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.53. Farklı gentamisin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri



Şekil 4.54. Farklı gentamisin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri

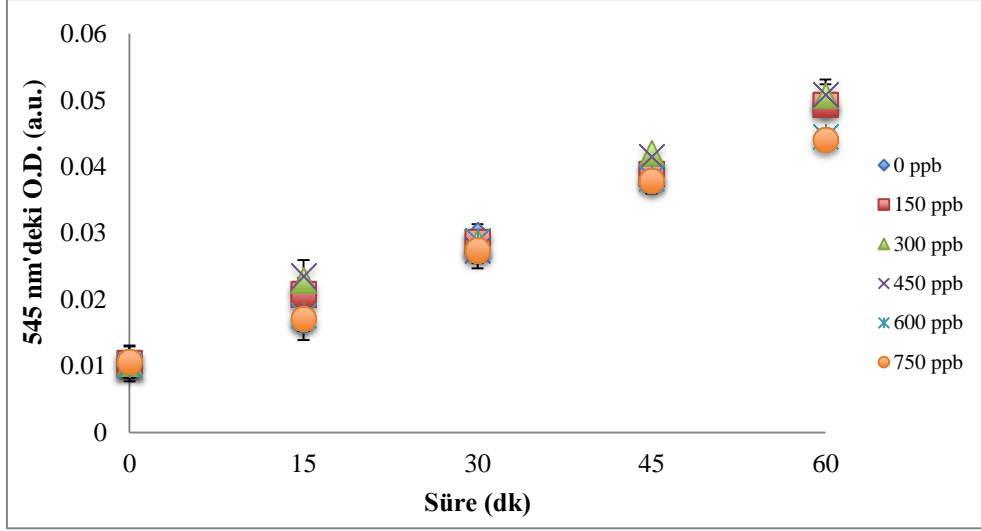


Şekil 4.55. Gentamisin konsantrasyonlarına (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

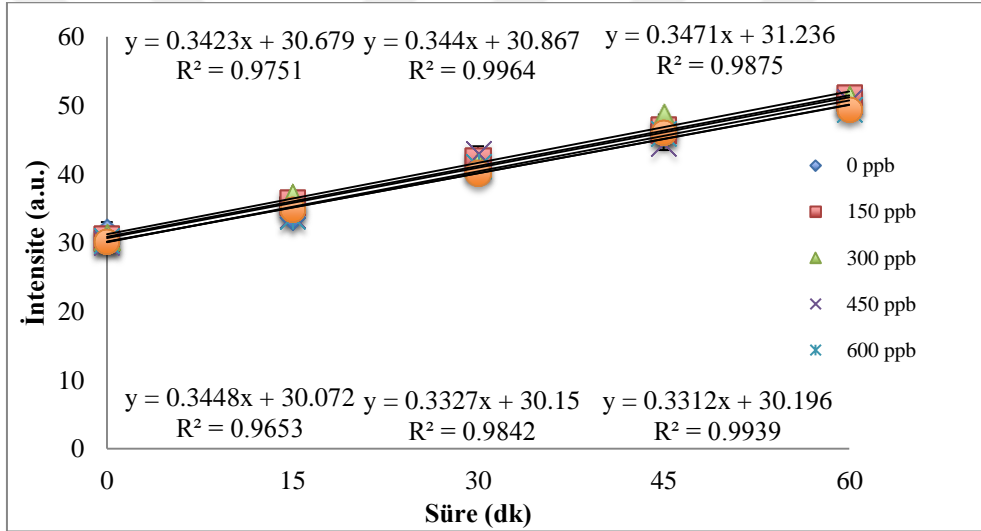
Şekil 4.55’de konsantrasyona karşı eğim değerleri grafiğinden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 28.00 ppb ve 84.85 ppb bulunmuştur. Gentamisin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 100 ppb iken, Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre MKL değeri 200 ppb’dir. Bu yüzden, bu yöntemin sütte gentamisin kalıntı düzeyi analizi için başarılı bir şekilde kullanılabileceği görülmektedir.

4.3.6 Linkomisin Analizi

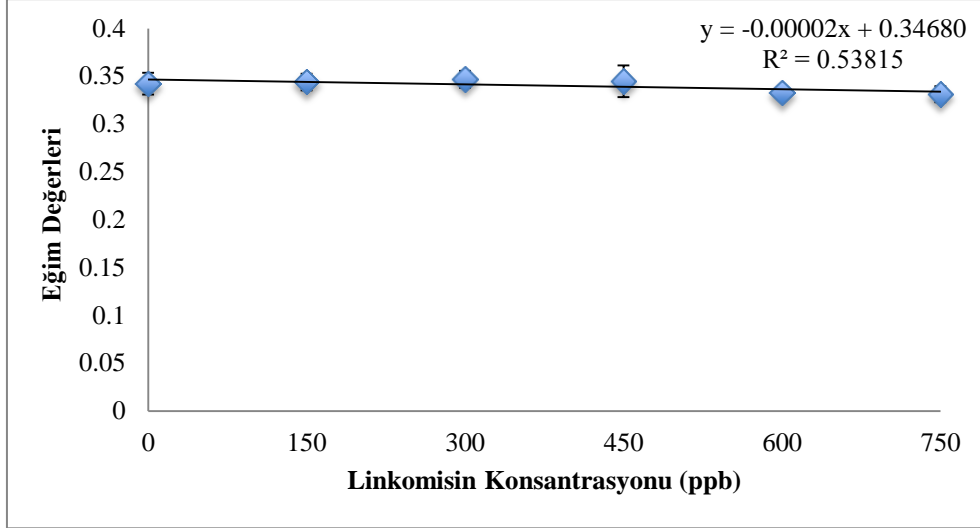
Linkomisin linkozamid grubu bir antibiyotiktir. Linkomisin analizi için, 0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.56. Farklı linkomisin konsantrasyonlarında (0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.57. Farklı linkomisin konsantrasyonlarında (0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri



Şekil 4.58. Linkomisin konsantrasyonlarına (0, 150, 300, 450, 600, 750 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

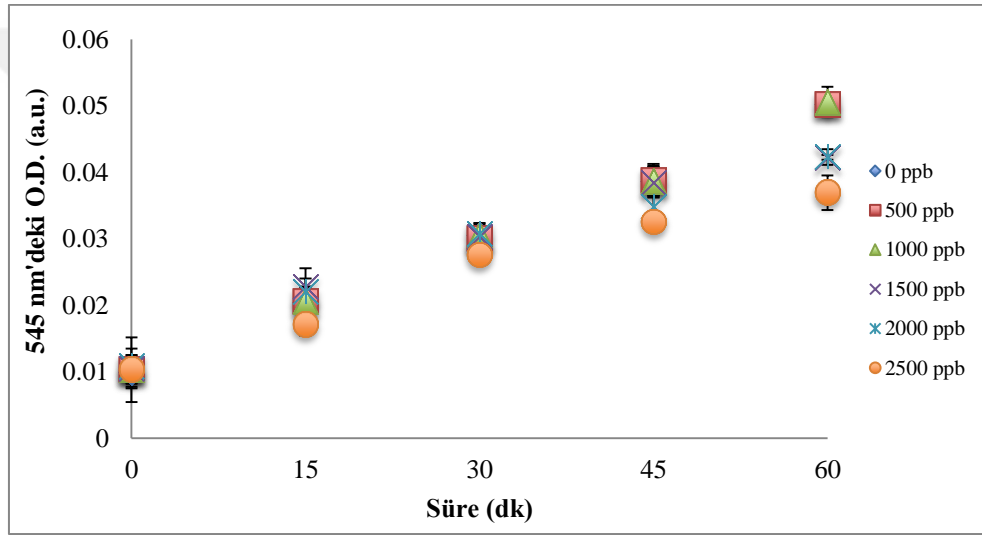
Şekil 4.57’de elde edilen zamana karşı intensite grafiğindeki kalibrasyon eğrileri incelendiğinde, artan linkomisin konsantrasyonuna karşı eğimde belirgin bir azalma gözlenmemektedir. Şekil 4.58’de konsantrasyona karşı eğim değerleri grafiğinde elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 1872.60 ppb ve 5674.53 ppb bulunmuştur. Linkomisin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 150 ppb’dir. Bu yüzden, bu yöntemin linkomisin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanılamayacağı görülmektedir. *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılan plazmidde kloroamfenikol direnç geni bulunmaktadır. Linkomisin linkozamid grubu bir antibiyotiktir. Etki mekanizması ribozoma bağlanıp protein sentezini inhibe etmesi şeklindedir. Kloroamfenikol, linkozamid ve makrolid grubu antibiyotikler ribozomda farklı yerlere bağlanarak etki göstermektedir fakat, birinin ribozoma bağlanması diğer antibiyotiklerin ribozoma bağlanmasını engellemektedir. Bu yüzden kullanımda bu antibiyotiklerin birlikte kullanılmaması gerektiği bildirilmektedir. Test hücrelerinde kloroamfenikol direnç geni bulunmaktadır. Bu direnç ribozomda farklılık yaratarak kloroamfenikolün bağlanmasını engellenmesi şeklinde ise, diğer antibiyotiklerin de buraya bağlanması engellenmiş olabilmektedir.

4.3.7 Neomisin Analizi

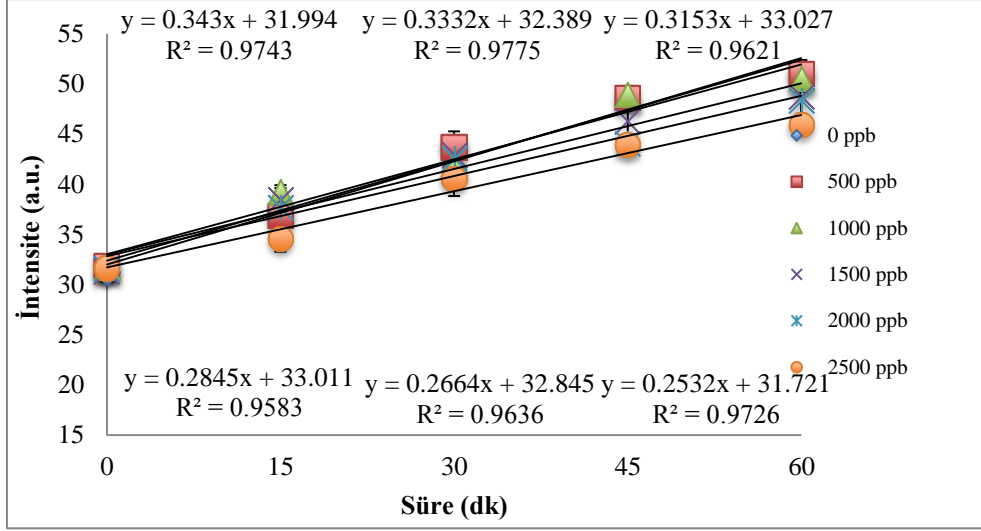
Neomisin, aminoglikozit grubu bir antibiyotiktir [194]. Aminoglikozit grubu antibiyotikler (neomisin, streptomisin, gentamisin vb.), bakteri hücreleri içerisine oksijen bağımlı aktif transport veya pasif difüzyon ile girmektedir. 30S bakteriyel ribozomlara tersinmez

bağlanmaktadır. Aminoglikozitler, mRNA, formil-metiyonin, tRNA kompleksinin oluşmasını engelleyerek, mRNA şablonu üzerinde genetik materyalin yanlış okunmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, tRNA translasyonu yanlış olmakta ve fonksiyonel olmayan protein üretilmektedir. Aminoglikozitler mikroorganizmalara başka mekanizmalarla da etki etmektedir. Örneğin, hücresel elektron transport sistemine girişim, RNA parçalanmasının indüklenmesi, translasyonun inhibisyonu, DNA metabolizmasına etki ve hücre membranının hasarı şeklindedir [194].

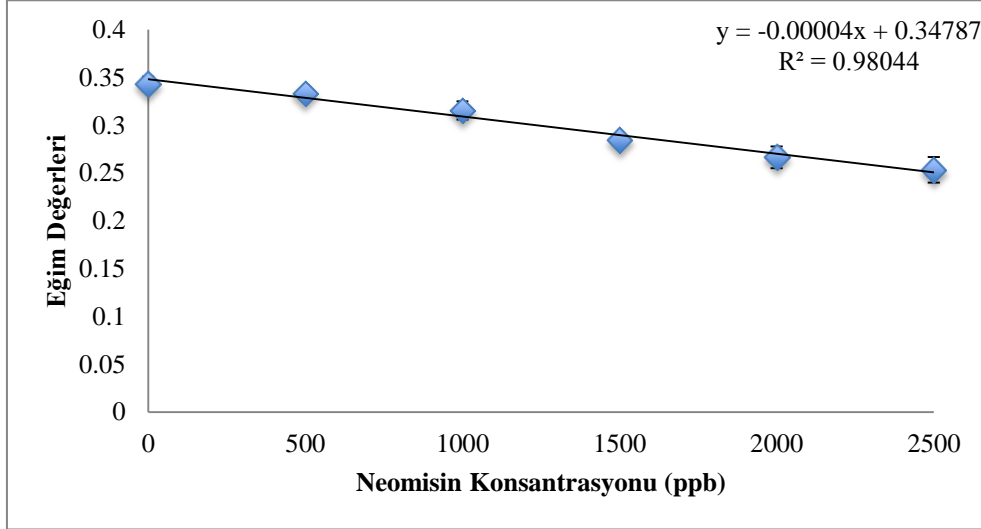
Neomisin analizi için, 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk'da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.59. Farklı neomisin konsantrasyonlarında (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.60. Farklı neomisin konsantrasyonlarında (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri



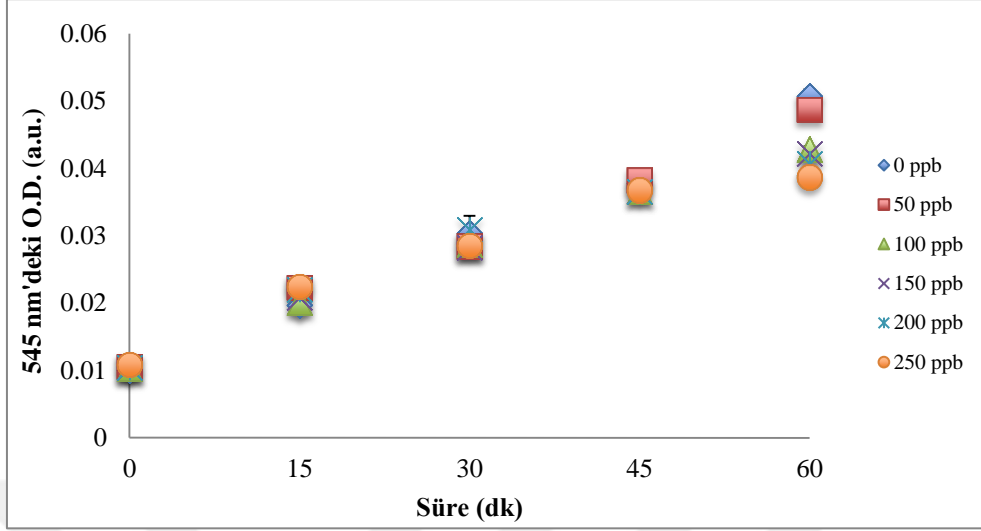
Şekil 4.61. Neomisin konsantrasyonlarına (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

Şekil 4.61'de konsantrasyona karşı eğim grafinden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 618.36 ppb ve 1873.83 ppb bulunmuştur. Neomisin için, Türk Gıda Kodeksi'ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius'a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 1500 ppb'dir. Bu yöntemin neomisin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanılabileceği görülmektedir.

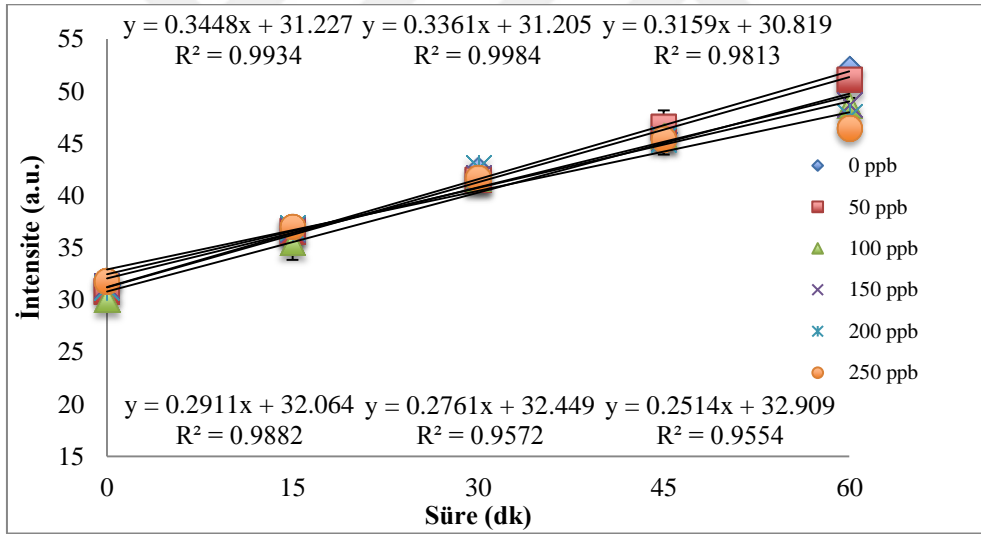
4.3.8 Sefazolin Analizi

Sefazolin, sefalosprin türü bir antibiyotik olup β -laktam grubu içerisinde yer almaktadır. Sefazolin analizi için, 0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb konsantrasyonlarında standart

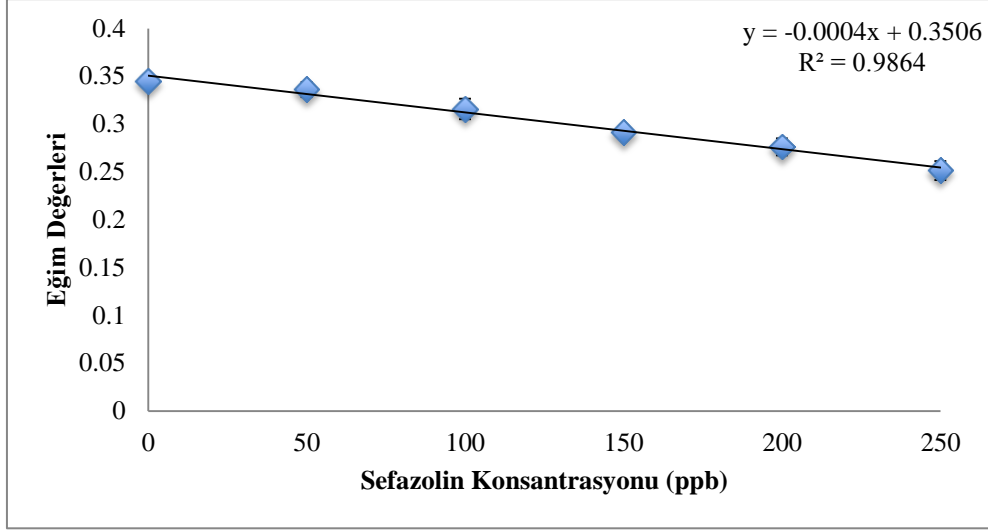
antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk'da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.62. Farklı sefazolin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.63. Farklı sefazolin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri

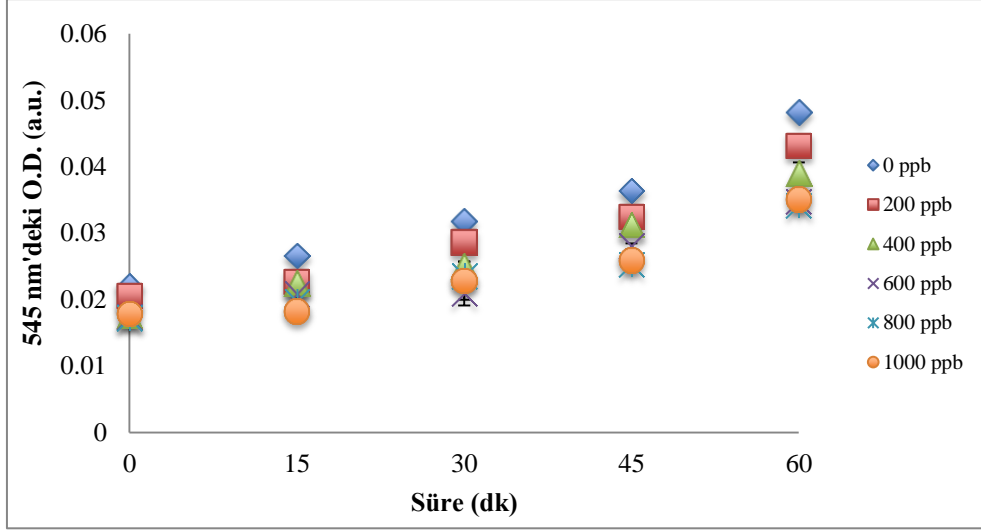


Şekil 4.64. Sefazolin konsantrasyonlarına (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

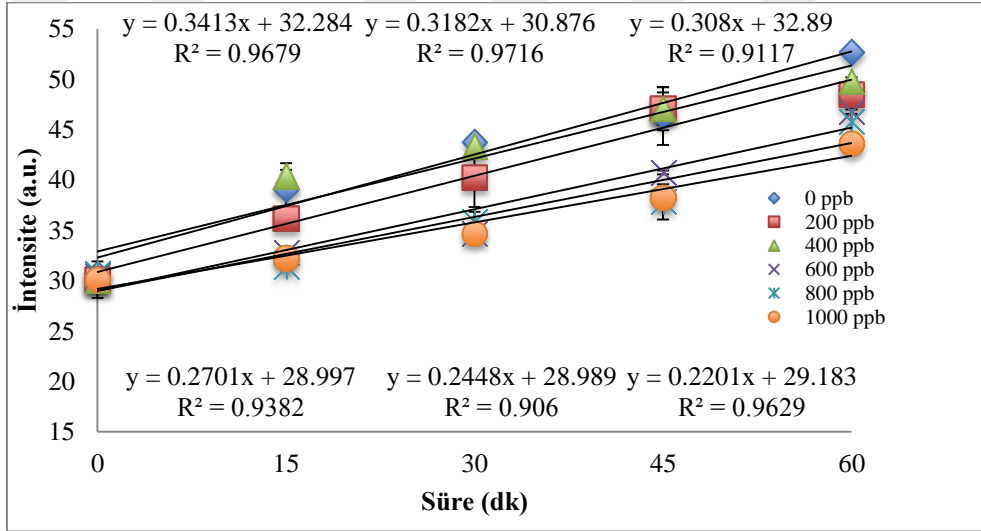
Şekil 4.64’de konsantrasyona karşı eğim değerleri grafiğinden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 50.75 ppb ve 153.80 ppb bulunmuştur. Sefazolin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 50 ppb’dir. Bu yöntemin sefazolin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanılabileceği görülmektedir. Kodeks Alimentarius’ta sefazolinler için her hangi bir limit bulunmamaktadır.

4.3.9 Spektinomisin Analizi

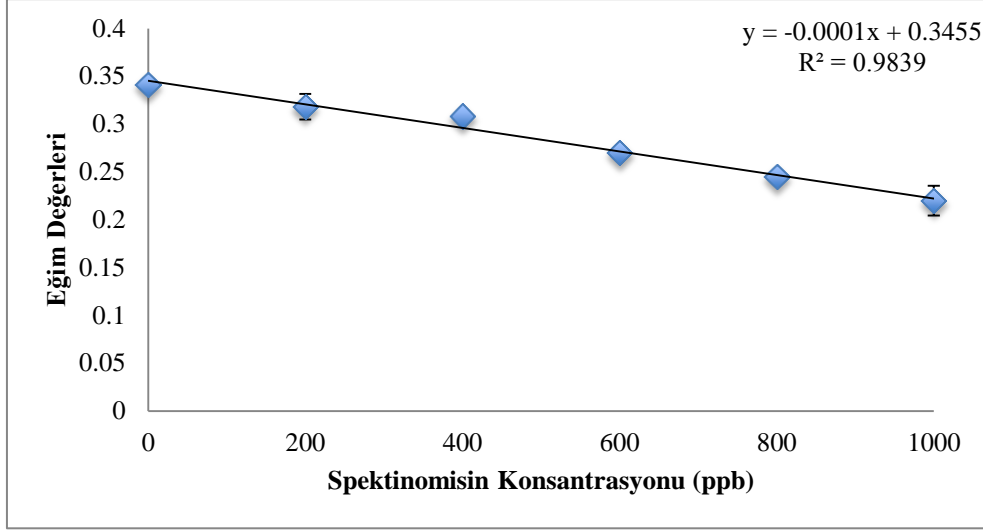
Spektinomisin, aminosiklitol türü bir antibiyotiktir. Etki mekanizması, 30S ribozomal altbirimdeki protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir [195]. Spektinomisin analizi için, 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.65. Farklı sefazolin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200, 250 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.66. Farklı spektinomisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800 ppb) elde edilen kültürlerin emisyon intensiteleri

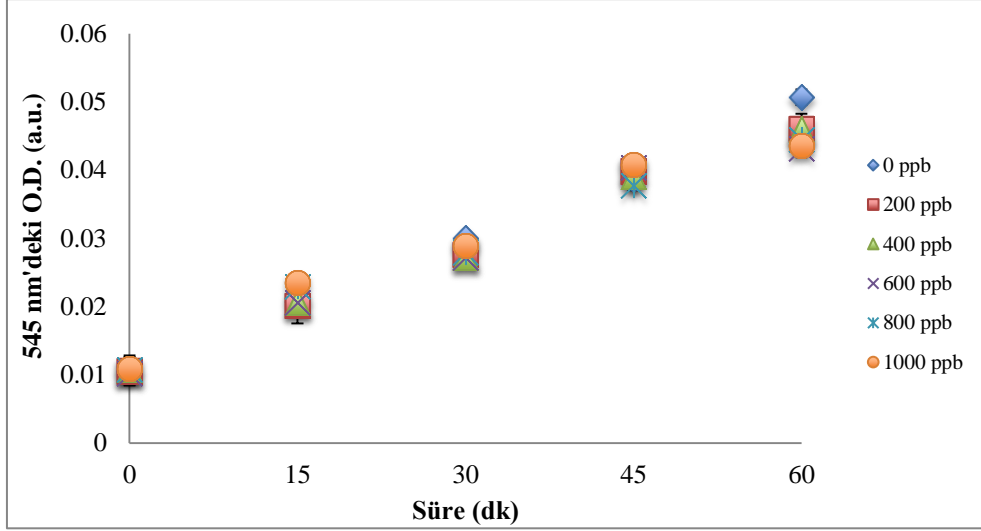


Şekil 4.67. Spektinomisin konsantrasyonlarına (0, 200, 400, 600, 800 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

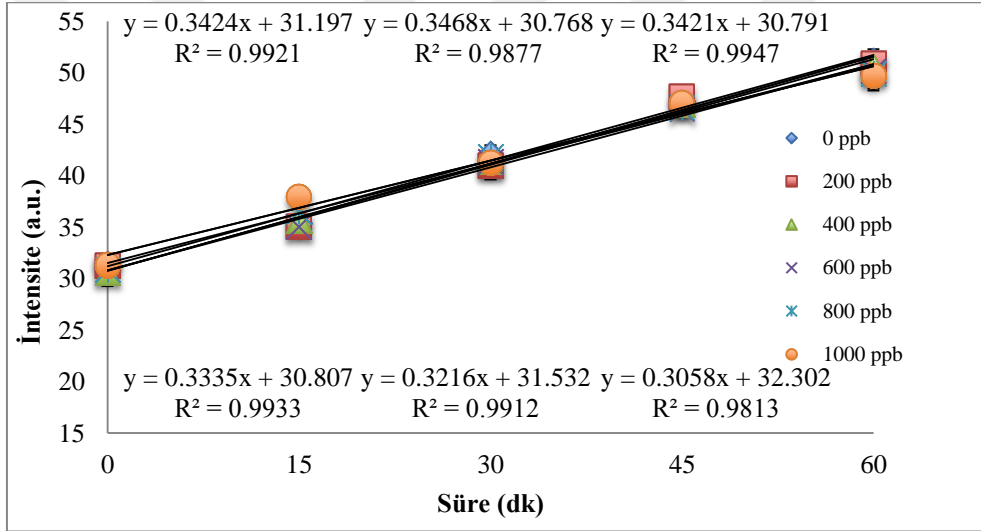
Şekil 4.67’de konsantrasyona karşı eğim değerleri grafiğinden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 203.01 ppb ve 615.18 ppb bulunmuştur. Spektinomisin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 200 ppb’dir. Bu yöntemin spektinomisin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanılabilmesi görülmektedir.

4.3.10 Spiramisin Analizi

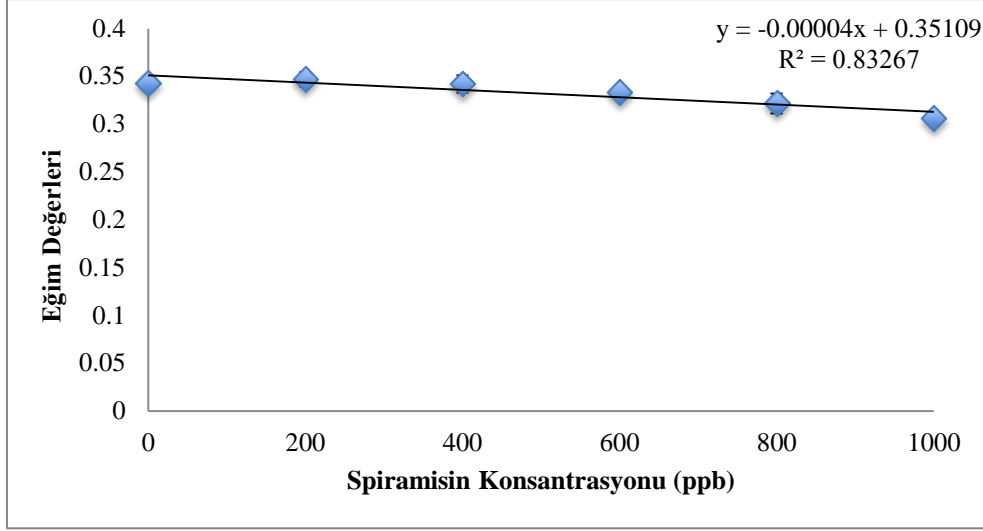
Spiramisin, makrolid grubu bir antibiyotiktir. Bakteriyostatik etki göstermektedir. Diğer makrolid grubu antibiyotikleri gibi, 50S ribozoma yarışmalı bağlanmakta ve protein sentezini inhibe etmektedir [196]. Spiramisin analizi için, 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.68. Farklı spiramisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen kültürlerin optik dansite değerleri



Şekil 4.69. Farklı spiramisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri

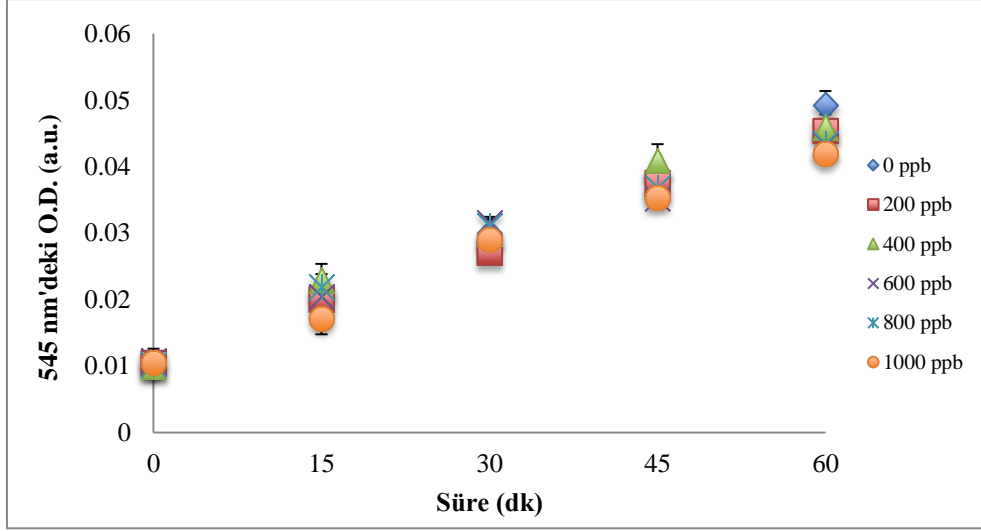


Şekil 4.70. Spiramisin konsantrasyonlarına (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

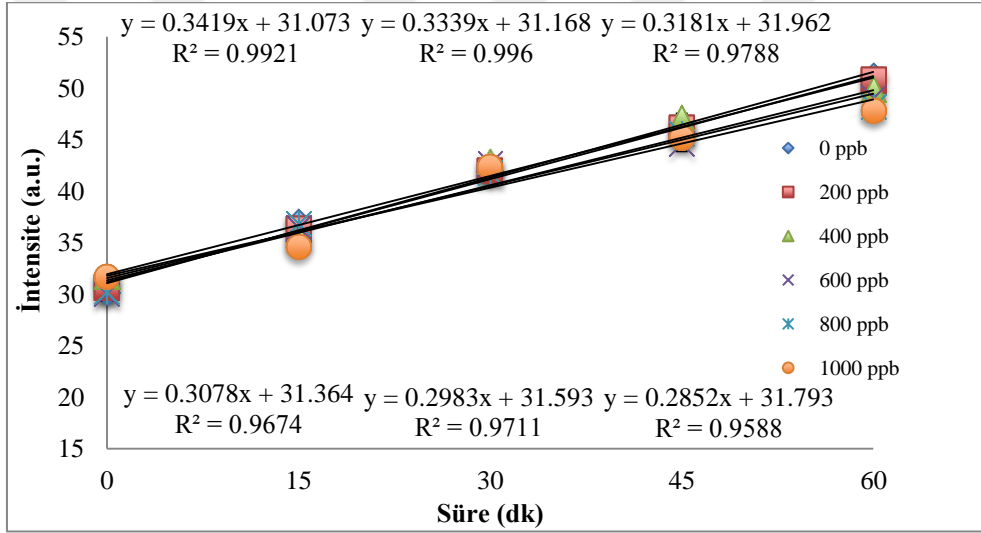
Şekil 4.69’da zamana karşı emisyon intensite değerleri grafiğinde elde edilen kalibrasyon eğrileri incelendiğinde, artan spiramisin konsantrasyonuna karşı eğimde belirgin bir azalma gözlenmemektedir. Eğimdeki azalış 800 ve 1000 ppb de gözlenmektedir. Şekil 4.70’de konsantrasyona karşı eğim değerlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 595.03 ppb ve 1803.12 ppb bulunmuştur. Spiramisin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 200 ppb’dir. Bu yüzden, bu yöntemin spiramisin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanılmayacağı görülmektedir. Spiramisin de makrolid grubu bir antibiyotiktir. Spiramisinin etki mekanizması kloroamfenikol ile benzerlik göstermekte ve peptidiltransferaz enzimi üzerine etki etmektedir. Test bakterisinin bu etki mekanizmasına direnci, spiramisin antibiyotiğinin de etki etmesini engellemiş olabilir.

4.3.11 Streptomisin Analizi

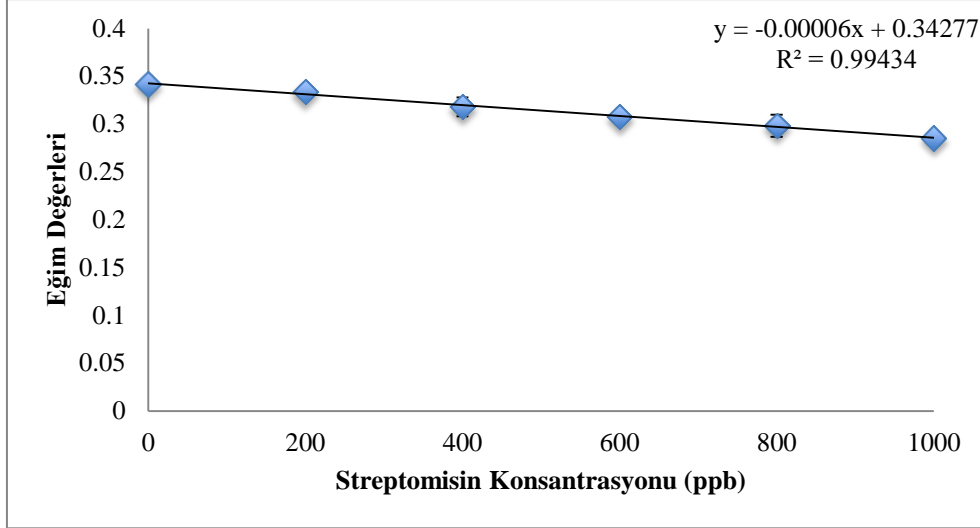
Streptomisin aminoglikozit grubu bir antibiyotiktir [197]. Streptomisin analizi için, 0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.71. Farklı streptomisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.72. Farklı streptomisin konsantrasyonlarında (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri

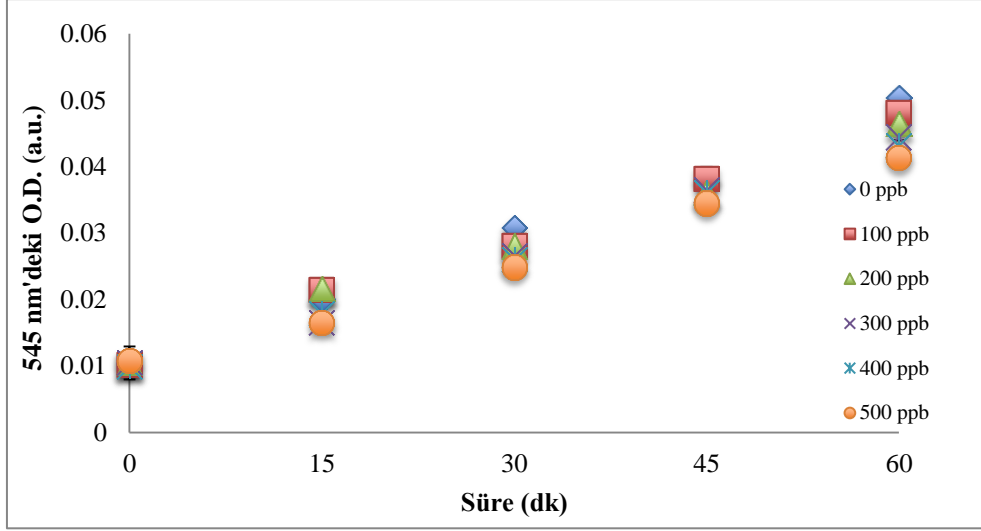


Şekil 4.73. Streptomisin konsantrasyonlarına (0, 200, 400, 600, 800, 1000 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

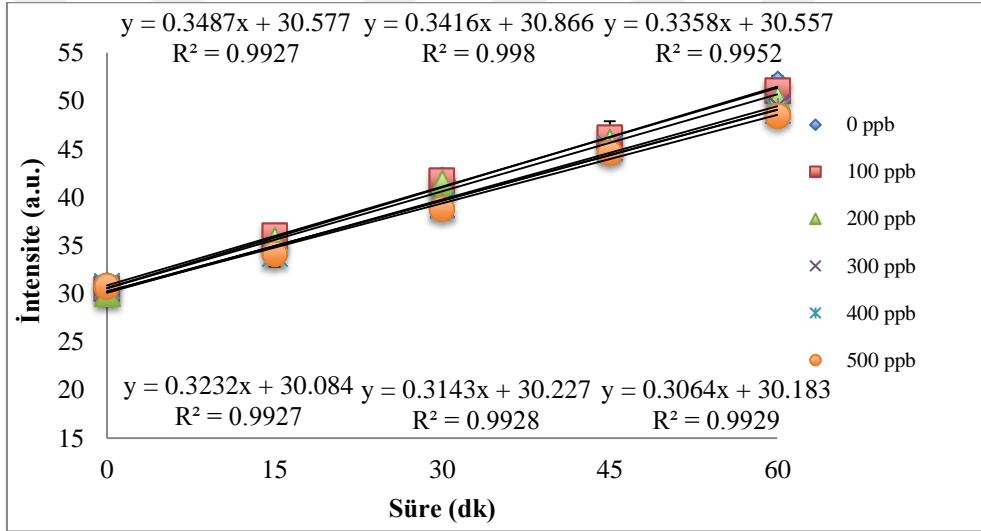
Şekil 4.73’de konsantrasyona karşı eğim değerleri grafiğinde elde edilen kalibrasyon eğrisi ile, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 210.01 ppb ve 636.40 ppb bulunmuştur. Streptomisin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 200 ppb’dir. Bu yöntemin LOD değeri 210.01 ppb olup 200 ppb değerinden biraz fazla olsa da streptomisin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanılabilceği söylenebilir.

4.3.12 Sulfadiazin Analizi

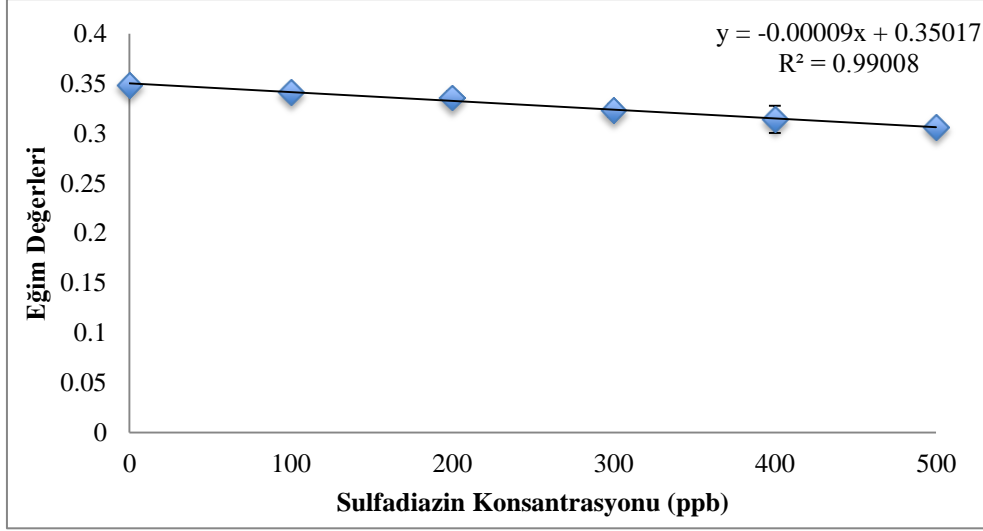
Sulfadiazin sulfonamid grubu bir antibiyotiktir. Sulfonamidler bakteriyostatik özellik göstermektedirler. p-aminobenzoik asitin folik asite katılmasını engelleyerek etki göstermektedirler. Sulfonamidler hayvanlarda terapötik amaçla kullanılmasına rağmen, beslenme verimini artırmak veya canlı ağırlığını artırmak için de kullanılabilir [198]. Sulfadiazin analizi için, 0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.74. Farklı sulfadiazin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.75. Farklı sulfadiazin konsantrasyonlarında (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri

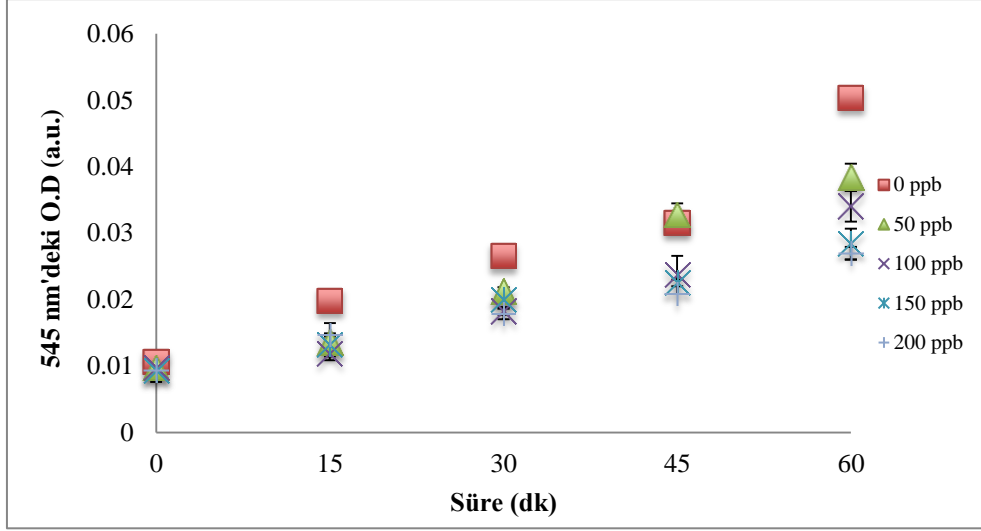


Şekil 4.76. Sulfadiazin konsantrasyonlarına (0, 100, 200, 300, 400, 500 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

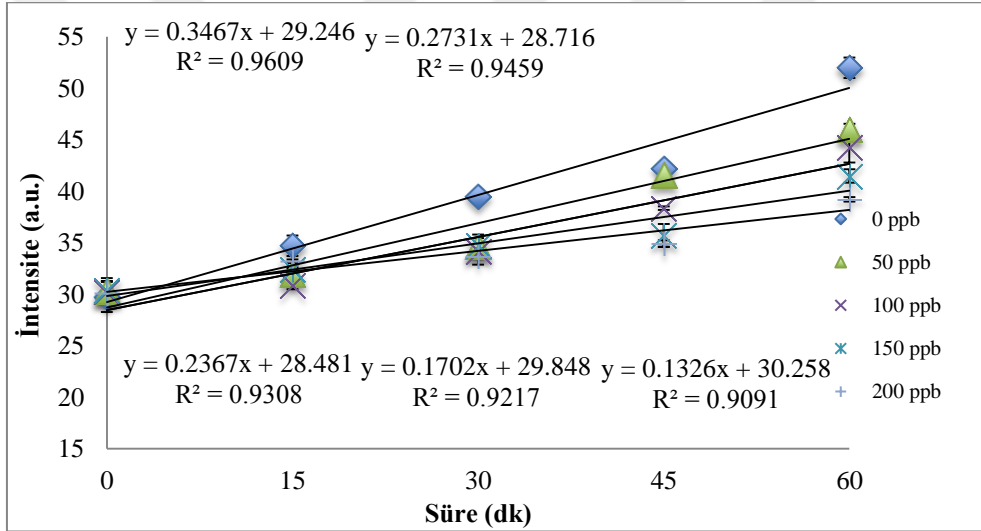
Şekil 4.76’da elde edilen kalibrasyon eğrisinden, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 124.45 ppb ve 377.12 ppb bulunmuştur. Sulfadiazin sulfonamid grubu bir antibiyotik olup, sulfonamidler için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 100 ppb’dir. Kodeks Alimentarius’ta (EK 3) sulfadimidin için MKL belirlenmiş olup 25 ppb’dir. Sulfadimidin de sulfonamide grubu bir antibiyotik olup yapısı sulfadiazine benzemektedir. Bu yöntemin LOD değeri 124.45 ppb olup MKL değerlerinden fazladır. Geliştirilen yöntemin sulfadiazin kalıntı düzeyinin tespiti için kullanımı uygun görünmemektedir.

4.3.13 Tetrasiklin Analizi

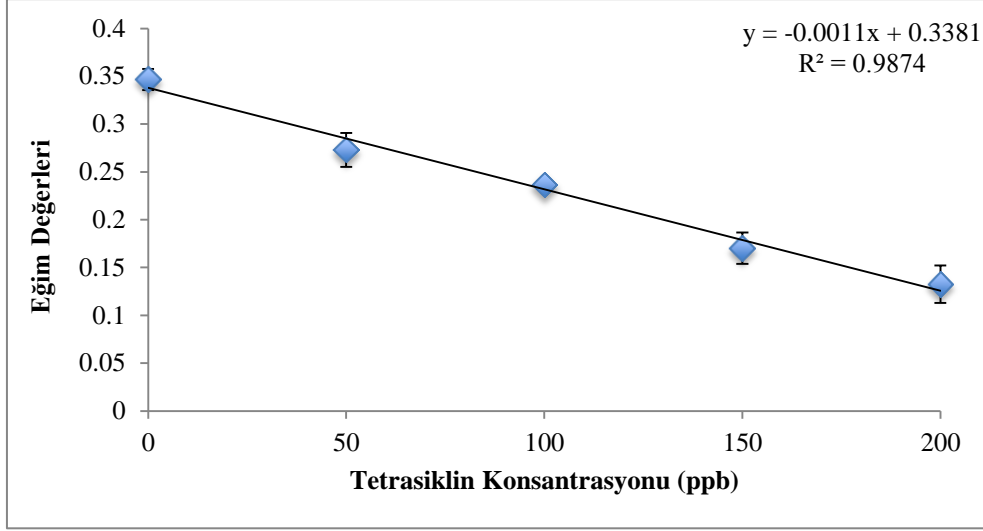
Tetrasiklinlerin etki mekanizması protein sentezini önlemek için, 30S ribozomdaki A bölgesine aminoaçil-t RNA’nın bağlanmasının inhibisyonu şeklindedir. Her ribozom başına bir tetrasiklin molekülü ile translasyon inhibe olmaktadır. Ribozomda, tetrasiklin magnezyum kompleksi oluşmakta ve ribozom daha az esnek hale dönüşerek aminoaçil-t RNA’nın bağlanmasını engellemektedir [199]. Tetrasiklin analizi için, 0, 50, 100, 150, 200 ppb konsantrasyonlarında standart antibiyotik çözeltileri hazırlanmış ve besiyerine 100 µL eklenmiştir. 60 dk boyunca her 15 dk’da bir örnek alınarak optik dansite ve emisyon intensiteleri ölçülmüştür.



Şekil 4.77. Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200 ppb) elde edilen optik dansite değerleri



Şekil 4.78. Farklı tetrasiklin konsantrasyonlarında (0, 50, 100, 150, 200 ppb) elde edilen emisyon intensiteleri



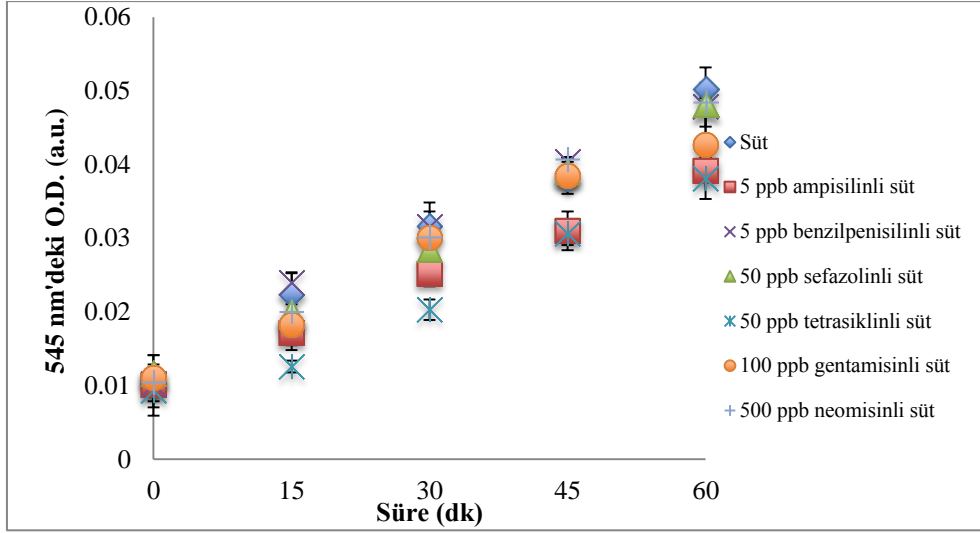
Şekil 4.79. Tetrasiklin konsantrasyonlarına (0, 50, 100, 150, 200 ppb) karşı elde edilen eğim değerleri

Şekil 4.79’da elde edilen kalibrasyon eğrisinden, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmış olup sırası ile 33.17 ppb ve 100.51 ppb bulunmuştur. Tetrasiklin için, Türk Gıda Kodeksi’ne (EK 2) ve Kodeks Alimentarius’a (EK 3) göre sütte bulunmasına izin verilen MKL değeri 100 ppb’dir. Bu yöntemin LOD değeri 33.17 ppb olup tetrasiklin kalıntı düzeyinin tespiti için başarı ile kullanılabileceği söylenebilir.

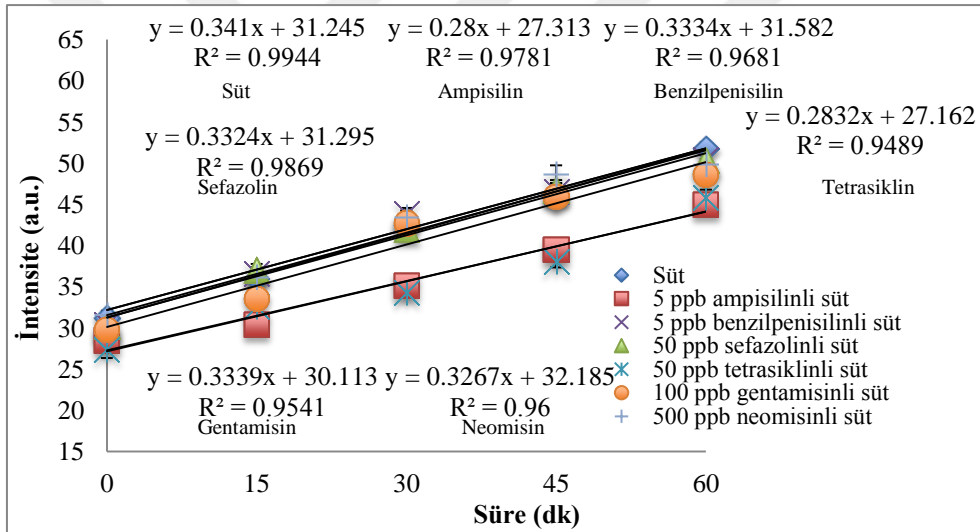
4.4 Gerçek Örnek Denemeleri

Gerçek örnek denemeleri kapsamında, antibiyotik içermeyen, yağsız UHT süt örneği kullanılmıştır. Bu süt örneğine, sonradan farklı standart antibiyotik çözeltileri eklenmiştir. Son konsantrasyonu 5 ppb olacak şekilde ampicilin ve benzilpenisilin, 50 ppb olacak şekilde sefazolin ve tetrasiklin, 100 ppb olacak şekilde gentamisin ve 500 ppb olacak şekilde neomisin eklenmiştir. Elde edilen bu süt örnekleri hem geliştirilen yöntem ile hem de ticari antibiyotik Charm® test kiti ile denenmiştir.

Her bir antibiyotik için tayin edilen ve eklenen konsantrasyon değerleri vasıtası ile geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, her antibiyotik için bağıl standart sapma (RSD) hesaplanmıştır.



Şekil 4.80. Antibiyotik içermeyen süt ve 5 ppb ampisilin, 5 ppb benzilpenisilin, 50 ppb sefazolin, 50 ppb tetrasiklin, 100 ppb gentamisin, 500 ppb neomisin içeren sütlerin optik dansite değerleri



Şekil 4.81. Antibiyotik içermeyen süt ve 5 ppb ampisilin, 5 ppb benzilpenisilin, 50 ppb sefazolin, 50 ppb tetrasiklin, 100 ppb gentamisin, 500 ppb neomisin içeren sütlerin emisyon intensiteleri

Çizelge 4.3. Süt örneğinde geri kazanım ve RSD değerleri

Eklenen Antibiyotik	Eklenen Antibiyotik Konsantrasyonu (ppb)	Yöntem ile Tayin Edilen Konsantrasyon	Geri Kazanım Değerleri ^a (%)	RSD ^b (%)
Ampisilin	5	4.87 ± 0.23	97.38	4.76
Benzilpenisilin	5	4.56 ± 0.51	91.25	11.18
Sefazolin	50	45.50 ± 5.30	91.00	11.66
Tetrasiklin	50	49.91 ± 1.41	99.82	2.83
Gentamisin	100	99.00 ± 2.83	99.00	2.86
Neomisin	500	529.25 ± 56.57	105.85	10.69

^a Geri Kazanım Değerleri (%) = 100 x Tayin Edilen Konsantrasyon / Eklenen Konsantrasyon

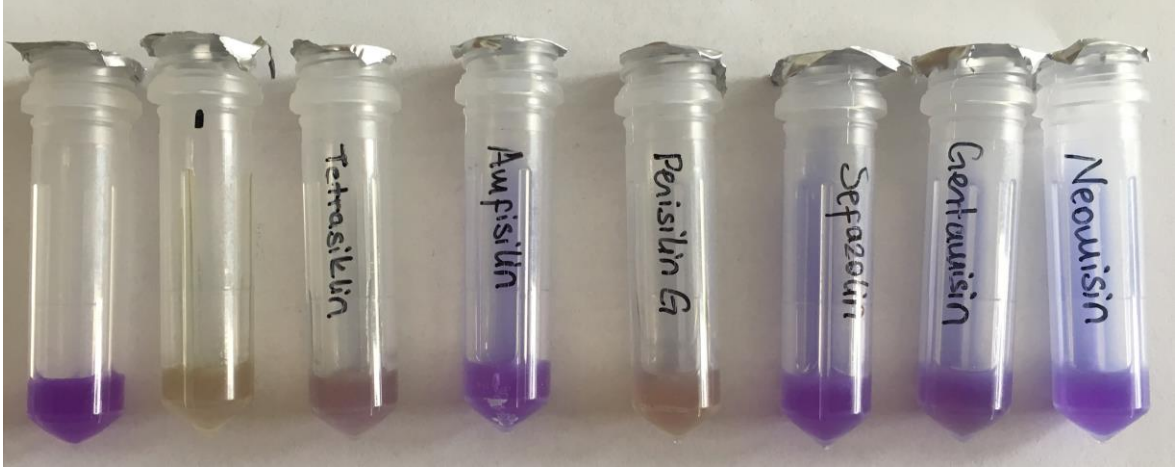
^b RSD (Bağıl Standart Sapma, %) = standart sapma / ortalama x 100

Süt örneğine eklenen antibiyotiklerin geliştirilen yöntem ile tayini sonrası elde edilen geri kazanım ve RSD değerleri Çizelge 4.3'te görülmektedir. Metodun geri kazanım değerleri % 91.00 - 105.85 arasında olup güvenilir bir şekilde süt örneklerinde kullanılabilceği görülmektedir. RSD ise % 2.83 - 11.66 arasında olup, kabul edilebilir düzeydedir.

4.4.1 Charm CowSide II® ile Kalıntı Antibiyotik Tayini

Test tüpündeki besiyerinin ilk rengi mordur. Süt tüpe eklenip 64°C'de inkübasyona başlandığında, sporlar vejetatif hale gelip gelişmekte ve asit oluşturmaktadır. Asit oluşumu sonucu renk mordan sarı renge dönmektedir. Sütte antibiyotik bulunuyorsa, mikrobiyal gelişme gerilemekte veya inhibe olmakta dolayısı ile asit oluşmamaktadır. Asit oluşmadığından, antibiyotik içeren süt örneklerinde test tüpündeki renk mor kalmaktadır.

Sarı veya sarı-yeşil renk sonucu negatif kabul edilirken, mavi-mor renk antibiyotik açısından pozitif kabul edilmektedir.



Şekil 4.82. (Soldan sağa sırası ile) Besiyeri, antibiyotik içermeyen süt, 50 ppb tetrasiklin içeren süt, 5 ppb ampisilin içeren süt, 5 ppb benzilpenisilin (penisilin G) içeren süt, 50 ppb sefazolin içeren süt, 100 ppb gentamisin içeren süt ve 500 ppb neomisin içeren sütlerin Charm® testi sonucu



Besiyeri

Charm® testinde kullanılan besiyeridir. Besiyerinin ilk rengi mordur.



Süt Örneği

Antibiyotik içermeyen süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Tüpteki mor renk sarı/yeşile dönmüş olup, sonuç negatif olup antibiyotik bulunmamaktadır.



50 ppb tetrasiklin içeren süt

50 ppb tetrasiklin içeren süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Renk ilk renk mora göre açılmış fakat tamamen sarı veya sarı/yeşil olmadığından şüpheli örnektir. Charm® testinde tetrasiklin için ölçüm hassasiyeti 50-100 ppb verildiğinden, 50 ppb tetrasiklin için bu sonucun çıkması olağandır.



5 ppb ampisilin
içeren süt

5 ppb ampisilin içeren süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Renk mavi/mor olduğundan sonuç pozitifdir. Antibiyotik bulunmaktadır. Charm® testinde ampisilin için ölçüm hassasiyeti 3-4 ppb verilmektedir. 5 ppb ampisilin bu test ile tayin edilebilmiştir.



5 ppb
benzilpenisilin
içeren süt

5 ppb benzilpenisilin (penisilin G) içeren süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Renk ilk renk mora göre açılmış fakat tamamen sarı veya sarı/yeşil olmadığından şüpheli örnek, temkinli davranılmalıdır.. Charm® testinde benzilpenisilin için ölçüm hassasiyeti 2-3 ppb verilmektedir. Fakat 5 ppb benzilpenisilin, bu test ile tam olarak tayin edilememiş şüpheli örnek olarak nitelendirilmiştir.



50 ppb sefazolin
içeren süt

50 ppb sefazolin içeren süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Renk mavi/mor olduğundan sonuç pozitifdir. Antibiyotik bulunmaktadır. Charm® testinde sefazolin için ölçüm hassasiyeti 6-10 ppb verilmekte olup, 50 ppb sefazolin bu test ile tayin edilebilmiştir.



100 ppb
gentamisin
içeren süt

100 ppb gentamisin içeren süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Renk mavi/mor olduğundan sonuç pozitifdir. Antibiyotik bulunmaktadır. Charm® testinde gentamisin için ölçüm hassasiyeti 75-150 ppb verilmekte olup, 100 ppb gentamisin bu test ile tayin edilebilmiştir.



500 ppb
neomisin içeren
süt

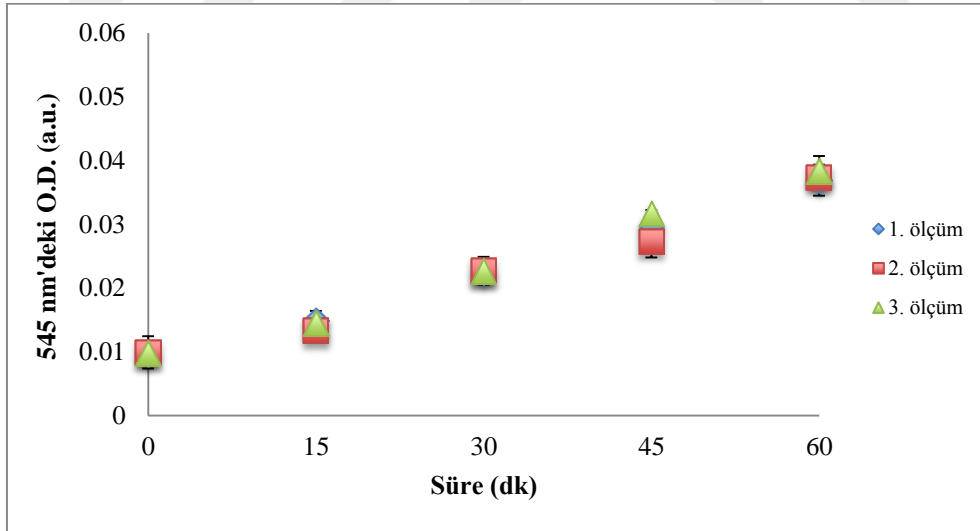
500 ppb neomisin içeren süt örneği eklendiğinde, inkübasyon sonrası elde edilen görüntü. Renk mavi/mor olduğundan sonuç pozitifdir. Antibiyotik bulunmaktadır. Charm® testinde neomisin için ölçüm hassasiyeti 100-150 ppb verilmekte olup, 500 ppb neomisin bu test ile tayin edilebilmiştir.

4.5 Validasyon Çalışmaları

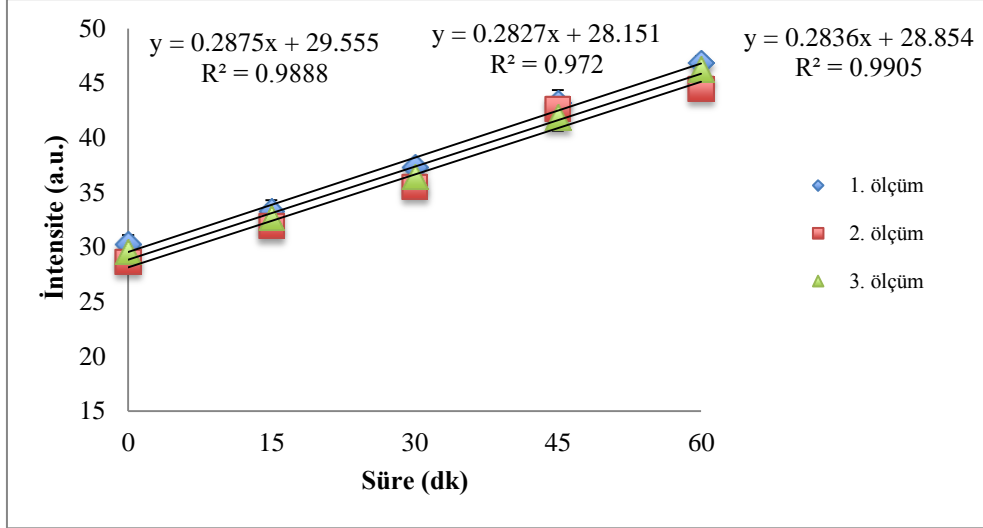
Validasyon çalışmaları kapsamında, kesinlik için standart antibiyotik çözeltisinde (50 ppb tetrasiklin) gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik denemeleri yapılmıştır. Kesinlik için RSD, doğruluk için ise bias değerleri kullanılmaktadır. Kesinlik birbirinden bağımsız elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı, doğruluk ise tayin edilen değerlerin gerçek değere olan yakınlığıdır.

4.5.1 Gün İçi Tekrarlanabilirlik

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için standart 50 ppb tetrasiklin konsantrasyonunda, aynı gün içinde 3 kez ölçüm alınmıştır.



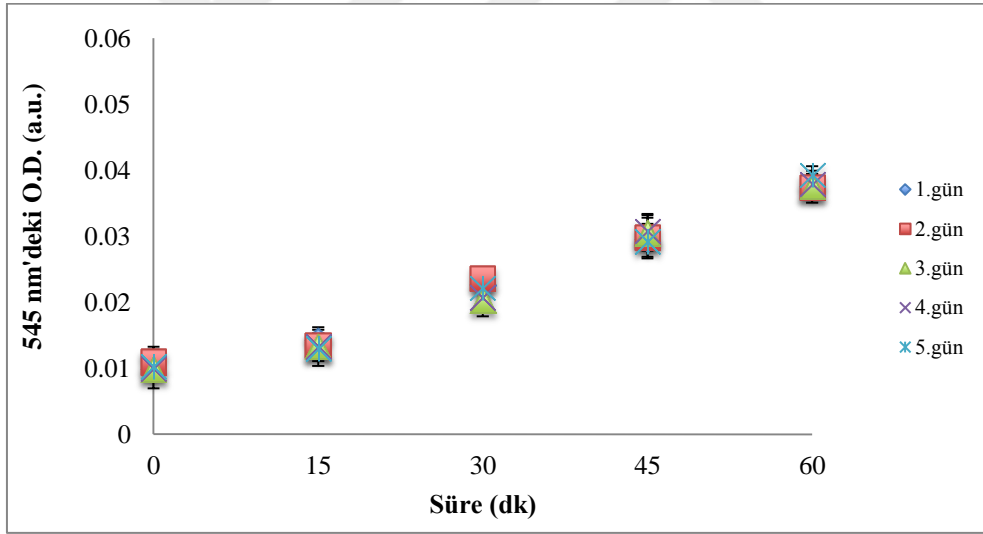
Şekil 4.83. Gün içi ölçüm optik dansite değerleri



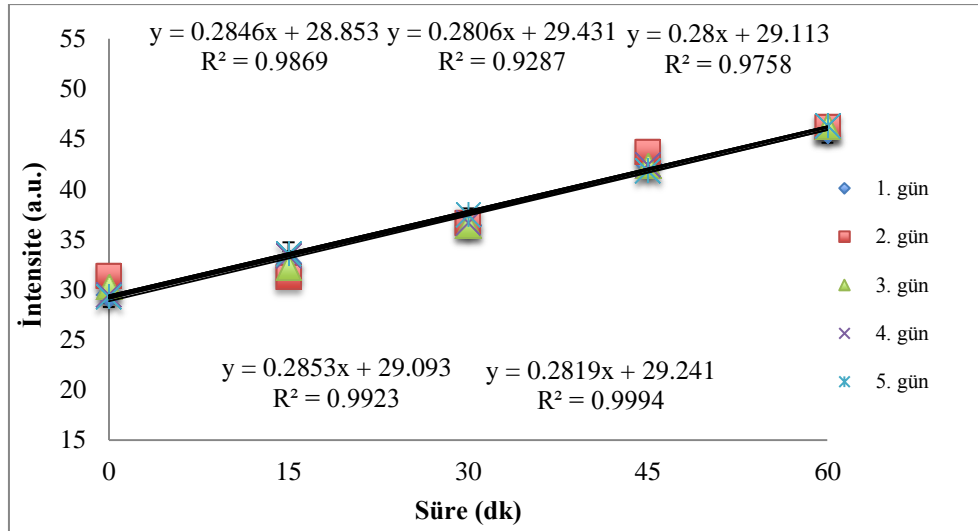
Şekil 4.84. Gün içi ölçüm emisyon değerleri

4.5.2 Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için standart 50 ppb tetrasiklin konsantrasyonunda, 5 farklı günde ölçümler alınmıştır.



Şekil 4.85. Günler arası (5 gün) optik dansite değerleri



Şekil 4.86. Günler arası (5 gün) emisyon intensiteleri

Çizelge 4.4. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik dataları

	Eklenen Antibiyotik Konsantrasyonu (ppb)	Yöntem ile Tayin Edilen Konsantrasyonu (ppb)	RSD ^a (%)	Bias ^b (%)	RSD Toplam ^c (%)
Gün içi					
					5.92
1. ölçüm	50	46.00 ± 2.31	5.03	-8.00	
2. ölçüm	50	50.32 ± 3.79	7.54	0.64	
3. ölçüm	50	49.55 ± 0.64	1.30	-0.91	
Günler arası					
					3.20
1. gün	50	47.36 ± 1.29	2.71	-5.27	
2. gün	50	50.32 ± 0.84	1.66	0.64	
3. gün	50	51.23 ± 1.09	2.13	2.45	
4. gün	50	49.36 ± 1.16	2.34	-1.27	
5. gün	50	50.27 ± 0.77	1.53	0.55	

^a% RSD (Bağıl Standart Sapma) = standart sapma / ortalama x 100 (Her bir ölçüm veya gün için)

^b% Bias = (Tayin Edilen Konsantrasyon – Eklenen Konsantrasyon) / Eklenen Konsantrasyon x 100

^c Gün içi veya günler arası ölçümlerin % RSD değerleri

Geliştirilen yöntem, tekrarlanabilirlik yönünden incelenmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik için RSD değeri % 5.92, günler arası tekrarlanabilirlik için RSD değeri % 3.20 bulunmuştur. Bias değeri 0'a ne kadar yakınsa yöntem o kadar doğru tayin edebilmektedir. Elde edilen bias değerleri % -8.00 ile 2.45 arasındadır.

5. SONUÇ

Antibiyotikler, hayvanları genelde tedavi etme veya hastalıklardan korunma amacı ile bazen de büyüme ve beslenme verimliliklerini artırma amacı ile verilmektedir. Laktasyon dönemindeki hayvanlara verilen antibiyotikler farklı düzeylerde hayvanın sütüne de geçmektedir. Süte geçen bu antibiyotiklerin insan sağlığına etki etmeyecek düzeylere indirilmesi gerekmektedir.

Son zamanlarda hayvansal kaynaklı gıdalardaki kalıntı antibiyotiğe ve bunun tespitini sağlayan yöntemlere artan bir ilgi vardır. Gıdalardaki kalıntı antibiyotik düzeyinin belirlenmesi, etik açıdan tüketicilerin istenmeyen terapötik dozlara maruz kalmalarının önlenmesi, teknolojik açıdan starter kültürlerin inhibisyonu ile fermentasyon proseslerin bozulmasının önlenmesi, ekolojik açıdan ise çevrenin antibiyotiklerle kontaminasyonun önlenmesi bakımından önemlidir. Artık bütün dünya için çok önemli boyutlara ulaşmış olan bakterilerdeki antibiyotik direnci, kalıntı antibiyotik düzeyinin düzenli olarak tayini ile kontrol altına alınabilir. Antimikrobiyal ajanların kontrolü için sistem iki aşamaya ayrılabilir. Bunlardan ilki, inhibitör ajanların hızlı bir şekilde genel tespiti, ikinci aşama ise identifikasyon ve kantitatif, spesifik analizdir. İlk genel tespit aşaması için hızlı, ucuz, kolay uygulanabilir ve çoğu antimikrobiyalin dedeksiyonuna izin veren bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Bu kapsamda, kalıntı antibiyotik tayini için GFP ekspres edebilen *E. coli* hücreleri ile biyosensör geliştirilmiştir.

Tez kapsamında, konstitütif promoterli plazmid içeren *E. coli* hücresi kullanılmıştır. Konstitütif promoter olduğundan GFP'nin ekspres edilmesi için herhangi bir indükleyici ajana gereksinim duyulmamaktadır. GFP kendiliğinden bazal bir şekilde üretilmektedir. Optimizasyon çalışmaları ile üretilen GFP miktarının artırılması amaçlanmıştır. GFP miktarı artışı dolaylı olarak hücre yoğunluğunun artırılması ile veya direkt birim hücre başına ekspres edilen GFP miktarının artırılması ile sağlanabilmektedir. Optimizasyon çalışmalarında bu yüzden hem optik dansite hem de floresans intensiteleri izlenmiştir. Optimizasyonda ilk olarak, farklı kültür ve besiyeri pH'ları denenmiştir. Deneme sonucunda başlangıç pH'sı 7.0 olan besiyeri ile çalışılması gerektiği, kültür üretildikten sonra ise pH'sının 8.5 ayarlanması gerektiği bulunmuştur. Özellikle kültür pH'sına bağlı olarak GFP'nin uyarma ve emisyon bandlarında kaymalar gözlenmektedir. pH'ya bağlı spektral kaymaların olası sebebinin kromofor imidazolündeki enol formunun stabilizasyonunu sağlayan kromofordaki tirozin aminoasitinin iyonizasyonu ve/veya arjininin deprotonasyonu olduğu bildirilmiştir [163]. Yıkamanın etkisi incelendiğinde,

besiyerinden gelen girişim yapan maddelerin olduğu gözlenmiştir. Yıkama için pH 8.5'teki fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bir kez yıkama yeterli görülmektedir. Kültür elde ederken, çalkalamanın etkisi de incelenmiştir. Çalkalamalı kültür eldesinin hem birim zamandaki hücre miktarını, hem de birim hücre başına ekspres edilen GFP miktarını artırdığı gözlenmiştir. Bu durumun olası sebebi, aerasyon ile besiyerine daha fazla oksijenin girmesidir. Yapılan çalışmalarda da aerasyon hızı arttıkça kültür yoğunluğunun arttığı gözlenmektedir [180]. Fakat fazla düzeydeki aerasyon protein ekspresyon verimini olumsuz etkilemektedir. Yapılan çalışmada, protein ekspresyon veriminde bir azalış meydana gelmemiş olup, çalkalama düzeyinin yeterli olduğu görülmektedir. Besiyerindeki tuz konsantrasyonunun optimizasyonu için, farklı tuz konsantrasyonlarda LB besiyeri hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, % 0.5 oranındaki NaCl'ün üreme hızını artırmaktadır. Bu yüzden besiyeri olarak LB (Lennox) besiyeri kullanılmıştır. Yıkama tamponundaki tuz konsantrasyonunun etkisi minimal düzeyde olduğundan, belirgin bir fark yaratmadığından, yıkama tamponunda tuz kullanılmamıştır. Yıkama tamponundaki tuz konsantrasyonunun etkisi GFP'nin konformasyonu üzerinedir. Artan tuz konsantrasyonunda GFP'nin katlanması engellenmekte ve kromofor oluşumu azalmaktadır. Analize alınacak kültür miktarı optimizasyonu sonucu % 0.5 oranında 18 saatlik kültürün analize alınması gerektiği bulunmuştur. Buradaki amaç, antibiyotiğin etkisinin rahat gözlenebileceği bir kültür oranının kullanılmasıdır. Optimizasyon çalışmaları kapsamında, ayrıca daha önceden kullanılan *E. coli* DH5 α hücreleri ile sonradan plazmid aktarımı yapılan *E. coli* BL21(DE3) hücreleri hem birim zamandaki hücre yoğunluğu, hem de birim hücre başına ekspres edilen GFP miktarı bakımından karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin hem daha yoğun kültür oluşturduğu, hem de daha fazla GFP ekspresyonu sağladığı bulunmuştur. *E. coli* BL21 hücreleri daha çok protein ekspresyonu için *E. coli* DH5 α hücreleri ise daha çok plazmid aktarımının yapılması veya plazmid saflaştırılmasında kullanıldığından, elde edilen sonuçlar tutarlı görülmektedir. Pasaj sayısının ve kültür inokülasyon oranının optimizasyonunda, stok gliserol kültüründen ve % 0.5 kültür inokülasyon oranında çalışılmasının yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Besiyeri optimizasyonunda, 2xLB besiyeri kullanımının daha uygun olduğu sonucu çıkmıştır. Erlende farklı besiyeri hacimleri ile çalışıldığında, hücre yoğunluğunun ve GFP ekspresyonunun etkilendiği gözlenmiş bunun üzerine en yüksek GFP ekspresyonunun ve bakteri yoğunluğunun elde edildiği 5 mL besiyeri hacmi seçilmiştir. Elde edilen bu sonuç erlenlerde farklı hacimdeki kültürlerle yapılan ve besiyeri hacminin hücre yoğunluğuna ve

protein ekspresyonuna etkisinin incelendiği çalışma ile tutarlı görülmektedir [180]. Seçilen optimum koşullarda *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinin üreme eğrisi çıkarılmış ve jenerasyon süresi belirlenmiştir. Hücrenin jenerasyon süresi 47.2 dk olarak bulunmuştur.

Kalıntı antibiyotik tayini için geliştirilen bu yöntemin optimizasyon çalışmaları sonrasında, standart antibiyotik çözeltilerinin analizleri yapılmış ve her bir antibiyotik için, antibiyotik konsantrasyonuna karşı eğim değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri vasıtasıyla yöntemin belirlenen her antibiyotik için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Her bir antibiyotik için yöntemle belirlenen LOD ve LOQ değerleri, ve hem Kodeks Alimentarius tarafından önerilen hem de Türkiye ve Avrupa'da izin verilen MKL değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 5.1. Antibiyotiklerin geliştirilen yöntem ile elde edilen LOD, LOQ değerleri ve izin verilen MKL değerleri

Antibiyotikler	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	MKL ^a / MKL ^b (ppb)
Ampisilin	3.33	10.08	4 / 4 ^c
Basitrasin A	544.47	1649.92	100 / -
Benzilpenisilin	0.29	0.88	4 / 4
Furazolidon	5.64	17.09	MKL yok / MKL yok
Gentamisin	28.00	84.85	100 / 200
Linkomisin	1872.60	5674.53	150 / 150
Neomisin	618.36	1873.83	1500 / 1500
Sefazolin	50.75	153.80	50 / -
Spektinomisin	203.01	615.18	200 / 200
Spiramisin	593.03	1803.12	200 / 200
Streptomisin	210.01	636.40	200 / 200
Sulfadiazin	124.45	377.12	100 / 25 ^d
Tetrasiklin	33.17	100.51	100 / 100

MKL: Maksimum Kalıntı Limiti

^a Türkiye ve Avrupa'da izin verilen MKL (EK 2)

^b Kodeks Alimentarius tarafından önerilen MKL (EK 3)

^c Kodeks Alimentarius'ta amoksisilin (p-hidroksiampisilin) için verilen MKL

^d Kodeks Alimentarius'ta sulfadimidin için verilen MKL

Antibiyotik direncin daha fazla yayılmasını ve antibiyotiğin neden olduğu sağlık ve teknolojik sorunları engellemek için adına çoğu ülkeler, hayvanlara uygulanan veteriner ilaçlarının, hayvansal gıdalardaki kalıntı miktarı için yasal limitler belirlemiştir. Kullanılan veteriner ilaçları arasında en büyük grubu, antimikrobiyal ajanlar oluşturmaktadır [96]. 1985 yılından buyana Kodeks Alimentarius ve FAO/WHO programları gıdalardaki kalıntılarla ilgili standartları revize ederek geliştirmektedirler [96]. Bu standartlar, gıda katkı maddeleri için ortak uzman komitesi (JECFA) tarafından yapılan

araştırmalar sonucunda belirlenen kabul edilebilir günlük alım (ADI) değerleri ve nerilen MKL değerleri neticesinde oluşturulmaktadır. Avrupa birliğinde ise veteriner tıbbi ürünler komitesi (CVMP), hayvansal gıdalarda bulunabilecek farmakolojik aktif veteriner ilaçlarının MKL değerlerini belirlemektedir. Bu nedenle, bu kurumlar tarafından nerilen MKL değerlerinde farklılıklar gözlenebilmektedir. Türkiye’de Türk Gıda Kodeksi’nde belirlenen MKL değerleri, Avrupa Birliği’ne uyum süreci için Avrupa Birliğinin tanımladığı MKL değerleri ile aynıdır.

Çizelge 5.1’de görüldüğü üzere, ampisilin için yöntemle belirlenen LOD değeri 3.33 ppb’dir. Türk Gıda Kodeksi’nin belirlediği MKL değeri 4 ppb’dir. Kodeks Alimentarius’ta ampisilin için bir değer bulunmamakta olup, amoksisilin için MKL 4 ppb’dir. Amoksisilin p-hidroksiampisilin, olduğundan ampisilin MKL değeri için bu değer kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem ile ampisilin için bulunan LOD, MKL seviyelerinden aşağıda olduğundan, kalıntı ampisilin tayini için yöntemin başarılı olduğu söylenebilir.

Basitrasin A için yöntemle belirlenen LOD değeri 544.47 ppb’dir. Türk Gıda Kodeksi’nin belirlediği MKL değeri 100 ppb’dir. Kodeks Alimentarius’ta basitrasin A için bir değer bulunmamaktadır. Basitrasin 1987 yılında başlayan, hayvansal kaynaklı gıdalarda kalıntı veteriner ilaçları risk değerlendirmesi programı sonrasında yeniden değerlendirilmemiştir. Fakat basitrasin kullanımı durumunda, gıdada dedekte edilebilir düzeyde kalıntı bulunmasına izin verilmemelidir. Komite tarafından önerilen analiz metodlarının kullanımı durumunda, süt için 0-1.2 IU/mL (1 mg basitrasin = 42 IU) değerini geçmemesi gerektiği bildirilmiştir [200]. Geliştirilen yöntem ile basitrasin A için bulunan LOD, verilen MKL seviyesinden oldukça fazla olduğundan, kalıntı basitrasin A tayini için yöntemin başarısız olduğu görülmektedir. Bunun sebebi basitrasin A tayini için yöntem süresinin yetersiz olması olabilir. Basitrasin A için yöntemin tekrar optimize edilmesi ile basitrasin A tayini yapılabilir. Analize alınacak kültür miktarının ve analiz süresinin optimizasyonu ile basitrasin A için daha düşük seviyelerde LOD değerleri elde edilebilir.

Benzilpenisilin için yöntemle belirlenen LOD değeri 0.29 ppb’dir. Türk Gıda Kodeksi’nin ve Kodeks Alimentarius’un belirlediği MKL değeri 4 ppb’dir. Geliştirilen yöntem ile benzilpenisilin için bulunan LOD, MKL seviyelerinden aşağıda olduğundan, kalıntı benzilpenisilin tayini için yöntemin başarılı olduğu söylenebilir.

Furazolidon için yöntemle belirlenen LOD değeri 5.64 ppb’dir. Türk Gıda Kodeksi ve Kodeks Alimentarius tarafından furazolidon yasaklı maddeler kısmına alınmıştır. Furazolidonun hayvanlarda kullanımı yasak olup, hayvansal gıdalarda kalıntı olarak hiç

bulunmaması gerekmektedir. ADI değeri olmadığından, MKL değeri de yoktur [200]. Geliştirilen yöntemin furazolidon tayini için kullanımı başarılı değildir. Daha hassas ölçüm sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Gentamisin için yöntemle belirlenen LOD değeri 28.00 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin gentamisin için belirlediği MKL değeri 100 ppb iken, Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 200 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile gentamisin için bulunan LOD, MKL seviyelerinden aşağıda olduğundan, kalıntı gentamisin tayini için yöntemin başarılı olduğu söylenebilir.

Linkomisin için yöntemle belirlenen LOD değeri 1872.60 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin ve Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 150 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile linkomisin için bulunan LOD, verilen MKL seviyesinden oldukça fazla olduğundan, kalıntı linkomisin tayini için yöntemin başarısız olduğu görülmektedir. Linkomisin için analize alınacak kültür miktarı optimizasyonu ve analiz süresinin artırılması ile yöntemin hassasiyeti artırılabilir.

Neomisin için yöntemle belirlenen LOD değeri 618.36 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin ve Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 1500 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile neomisin için bulunan LOD, MKL seviyelerinden aşağıda olduğundan, kalıntı neomisin tayini için yöntemin başarılı olduğu söylenebilir.

Sefazolin, için yöntemle belirlenen LOD değeri 50.75 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin belirlediği MKL değeri 50 ppb'dir. Kodeks Alimentarius'ta sefazolin için bir değer bulunmamaktadır. Geliştirilen yöntem ile elde edilen LOD, MKL değerinden çok az fazla olup, bu yöntemin sefazolin tayini için kullanılabilmesi söylenebilir.

Spektinomisin için yöntemle belirlenen LOD değeri 203.01 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin ve Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 200 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile spektinomisin için bulunan LOD, MKL seviyesinden çok az fazla olduğundan bu yöntemin spektinomisin tayini için kullanılabilmesi söylenebilir.

Spiramisin için yöntemle belirlenen LOD değeri 593.03 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin ve Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 200 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile spektinomisin için bulunan LOD, MKL seviyesinden fazla olduğundan bu yöntem spiramisin tayini için kullanılamaz. Linkomisin ve basitrasin A için önerilen yöntemlerle hassasiyet artırılabilir.

Streptomisin için yöntemle belirlenen LOD değeri 210.01 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin ve Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 200 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile streptomisin için bulunan LOD, MKL seviyesinden % 5 fazla olduğundan bu yöntemin streptomisin tayini için kullanılabilmesi söylenebilir.

Sulfadiazin için yöntemle belirlenen LOD değeri 124.45 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nde sulfonamid grubu antibiyotikler için belirlenen MKL değeri 100 ppb'dir. Kodeks Alimentarius'ta ise sulfadimidin için belirlenen MKL değeri bulunmakta olup, 25 ppb'dir. Sulfadimidin de sulfonamid grubunda bir antibiyotiktir ve yapısı sulfadiazine benzemektedir. Geliştirilen yöntem ile sulfadiazin için bulunan LOD, MKL seviyesinden fazla olduğundan bu yöntemin sulfadiazin tayini için kullanılmayacağı söylenebilir. Yöntem hassasiyetinin geliştirilmesi gereklidir. Analiz süresinin artırılması bu sorunu çözebilir.

Tetrasiklin için yöntemle belirlenen LOD değeri 33.17 ppb'dir. Türk Gıda Kodeksi'nin ve Kodeks Alimentarius'un belirlediği MKL değeri 100 ppb'dir. Geliştirilen yöntem ile tetrasiklin için bulunan LOD, MKL seviyelerinden aşağıda olduğundan, kalıntı tetrasiklin tayini için yöntemin başarılı olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak geliştiren yöntem ile ampisilin, benzilpenisilin, gentamisin, neomisin ve tetrasiklin başarılı bir şekilde 60 dakika içerisinde tayin edilebilmektedir. Spektinomisin ve streptomisin tayini için yöntemin kullanımı MKL değerine göre % 5 veya daha az farklılık gösterdiğinden kabul edilebilir düzeydedir. Sulfadiazin için geliştirilen yöntem ile elde edilen LOD değeri 124.45 ppb bulunmuştur. Türkiye ve Avrupa'da sulfonamidler için izin verilen MKL değeri ise 100 ppb iken Kodeks Alimentarius'ta sulfadimidin için verilen MKL 25 ppb'dir. Bu yüzden sulfadiazin tayini için yöntemin kullanılabilirliği tartışmalıdır. Daha az hassasiyette bir sulfadiazin tayini gerektiğinde geliştirilen yöntem kullanılabilir. Furazolidon yasaklı maddeler sınıfında yer almak olup, hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunmaması gerekmektedir. Geliştirilen yöntemde furazolidon için LOD değeri 5.64 ppb olup yüksek hassasiyette bir tayin gerekmediği koşullarda kullanılabilir. Geliştirilen yöntem basitrasin A, linkomisin ve spiramisin tayini için çok uygun değildir. Bu antibiyotikler için elde edilen LOD değerleri, MKL değerlerinden oldukça fazladır. Yöntem hassasiyetinin artırılması gerekmektedir. Bu analiz süresinin artırılması veya analize alınacak kültür miktarı optimizasyonu ile sağlanabilir.

Gerçek örnek denemeleri kapsamında, yağsız süt örneği kullanılmıştır. Süt örneğine, farklı antibiyotikler eklenerek, geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Son konsantrasyonu 5 ppb

olacak şekilde ampisilin ve benzilpenisilin, 50 ppb olacak şekilde sefazolin ve tetrasiklin, 100 ppb olacak şekilde gentamisin ve 500 ppb olacak şekilde neomisin süt örneklerine eklenmiştir. Elde edilen antibiyotikli sütler hem geliştirilen yöntemle hem de Charm® CowSide II ticari test kiti ile analiz edilmiştir. Yöntemle elde edilen geri kazanım değerleri % 91.00 ile % 105.85 arasındadır. Yöntemin geri kazanım değerleri ‘Analitik Metodlar için Performans Kriterleri, Diğer Gereksinimler ve Prosedürler’ Avrupa Komitesi 2002/657/CE direktiflerine göre kabul edilebilir sınırlar (% 80 – 110) arasındadır [201]. Geri kazanım denemelerinde elde edilen RSD değerleri % 2.83 - 11.66 arasında bulunmuştur. Charm® CowSide II test kiti, tetrasiklin ve benzilpenisilin dışındaki antibiyotikler için mavi mor rengini korumuş iken, tetrasiklin ve benzilpenisilinde renkte az bir miktar açılma gözlenmiştir. Bu durum şüpheli pozitif olup, dikkat edilmesi gerekmektedir. Test kitinin tetrasiklin için hassasiyeti 50 – 100 ppb verildiğinden, 50 ppb tetrasiklin içeren süt örneğinde bu sonucun çıkması normaldir. Test kitinde antibiyotik eklenmemiş süt örneği de denenmiş olup, renk sarı/yeşile döndüğünden süt örneğinde antibiyotiğin olmadığı söylenebilir.

Validasyon çalışmaları kapsamında, kesinlik ve doğruluk dataları incelenmiştir. Bu kapsamda gün içi (üç ölçüm) ve günler arası (beş gün) standart antibiyotik konsantrasyonunda ölçümler alınmıştır. Kesinlik ölçütü olarak değerlendirilen RSD değerleri % 1.30 – 7.54 arasında, doğruluk için incelenen bias değerleri % -8.00 ile 2.45 arasındadır. Yöntemin, gün içi tekrarlanabilirlik için RSD değeri % 5.92, günler arası tekrarlanabilirlik için RSD değeri % 3.20 bulunmuştur.

Sonuç olarak, geliştirilen yöntem ile bir saat içerisinde kalıntı ampisilin, benzilpenisilin, gentamisin, neomisin, tetrasiklin, spektinomisin ve streptomisin tayin edilebilmektedir. Diğer antibiyotikler için hassasiyetin artırılması, geliştirilen yöntemin diğer antibiyotiklerin analizi için tekrar optimize edilmesi gerekmektedir. Bu tez kapsamında test bakterisi olarak *E. coli* ile çalışılmış olup, diğer antibiyotiklerin tespiti için ilgili antibiyotiklere duyarlılıkları daha fazla olan başka bir test bakterisi bu kapsamda kullanılabilir.

Geliştirilen yöntemin, sahada kullanılması için portatif bir sistem haline getirilme potansiyeli yüksektir. Bu şekilde süt hayvancılığı çiftliklerinde ve süt temin eden gıda endüstrilerinde kullanım alanı bulacaktır. Dolayısı ile ucuz, kolay uygulanabilir, yerinde ve uzman personele gerek kalmadan tayin mümkün olabilecektir. Süt hayvancılığı çiftliklerinde, antibiyotik tedavisi görmekte olan hayvanın sütündeki kalıntı antibiyotik

düzeyi düzenli olarak incelenerek, sütün tüketime veya işlenmeye uygun olup olmadığının karar verilmesinde kullanılabilir. Geliştirilen yöntem ile kalıntı antibiyotik tayini sadece sütte değil, küçük modifikasyonlar ve uyarlamalar ile diğer gıda ürünlerinde de kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Waksman, S. A., What is an antibiotic or an antibiotic substance?, *Mycologia*, 39, 565-569, **1947**.
- [2] Waksman, S. A.; Woodruff, H. B., Selective antibiotic action of various substances of microbial origin, *Journal of Bacteriology*, 44, 373-384, **1942**.
- [3] Gangle, B. J., Sources and occurrence of antibiotic resistance in the environment. In University of Maryland: College Park, Md., 2005.
- [4] Pietsch, F. *Evolution of Antibiotic Resistance*. Uppsala University, Uppsala, Sweden, **2015**.
- [5] Strebhardt, K.; Ullrich, A., Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress, *Nat Rev Cancer*, 8, 473-480, **2008**.
- [6] Mitsuhashi, S., Drug resistance in bacteria history, genetics and biochemistry, *J. Int. Med. Res.*, 21, 1-14, **1993**.
- [7] Garrod, L. P.; O'Grady, F., *Antibiotic and Chemotherapy*, 3rd ed., Livingstone, Edinburgh, **1971**.
- [8] Fleming, A., On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *British journal of experimental pathology*, 10, 226-236, **1929**.
- [9] Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. G., Penicillin as a chemotherapeutic agent *The Lancet*, 236, 226-228, **1940**.
- [10] Moyer, A. J.; Coghill, R. D., Penicillin: VIII. Production of penicillin in surface cultures, *Journal of Bacteriology*, 51, 57-78, **1946**.
- [11] Raper, K. B.; Fennell, D. I., The production of penicillin X in submerged culture, *Journal of Bacteriology*, 51, 761-777, **1946**.
- [12] Greenwood, D., *Antimicrobial Chemotherapy*, 4th ed., Oxford University Press, Oxford ; New York, **2000**.
- [13] Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S. A.; Hanssen, A. D.; Patel, R.; Osmon, D. R., The classic: Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437, **2005**.
- [14] Hotchkiss, R. D.; Dubos, R. J., The isolation of bactericidal substances from cultures of *Bacillus brevis*, *Journal of Biological Chemistry*, 141, 155-162, **1941**.
- [15] Wright, G. D., The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity, *Nat Rev Micro*, 5, 175-186, **2007**.

- [16] Lipsitch, M.; Singer, R. S.; Levin, B. R., Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door?, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 5752-5754, **2002**.
- [17] Bush, K., Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes, *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 31, 43-56, **2012**.
- [18] Arthur, M.; Courvalin, P., Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 1563-1571, **1993**.
- [19] Georgopapadakou, N. H.; Liu, F. Y., Penicillin-binding proteins in bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18, 148-157, **1980**.
- [20] Massova, I.; Mobashery, S., Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1-17, **1998**.
- [21] Waxman, D. J.; Yocum, R. R.; Strominger, J. L., Penicillins and cephalosporins are active site-directed acylating agents: Evidence in support of the substrate analogue hypothesis, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289, 257, **1980**.
- [22] Lunde, C. S.; Hartouni, S. R.; Janc, J. W.; Mammen, M.; Humphrey, P. P.; Benton, B. M., Telavancin disrupts the functional integrity of the bacterial membrane through targeted interaction with the cell wall precursor lipid II, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 3375-3383, **2009**.
- [23] Kahan, F. M.; Kahan, J. S.; Cassidy, P. J.; Kropp, H., The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin), *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235, 364-386, **1974**.
- [24] Brown, E. D.; Vivas, E. I.; Walsh, C. T.; Kolter, R., MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 177, 4194-4197, **1995**.
- [25] Du, W.; Brown, J. R.; Sylvester, D. R.; Huang, J.; Chalker, A. F.; So, C. Y.; Holmes, D. J.; Payne, D. J.; Wallis, N. G., Two active forms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase in Gram-positive bacteria, *Journal of Bacteriology*, 182, 4146-4152, **2000**.
- [26] Allen, N. E.; Hobbs, J. N.; Alborn, W. E., Inhibition of peptidoglycan biosynthesis in gram-positive bacteria by LY146032, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, 1093-1099, **1987**.
- [27] Alborn, W. E.; Allen, N. E.; Preston, D. A., Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 2282-2287, **1991**.
- [28] Muthaiyan, A.; Silverman, J. A.; Jayaswal, R. K.; Wilkinson, B. J., Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 980-990, **2008**.

- [29] Bryan, L. E., *Antimicrobial Drug Resistance*, Academic Press, Orlando, **1984**.
- [30] Roberts, M., Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution, *FEMS Microbiology Reviews*, 19, 1-24, **1996**.
- [31] Gaynor, M.; Mankin, A., S., Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3, 949-960, **2003**.
- [32] Johnston, N., J.; Mukhtar, T., A.; Wright, G., D., Streptogramin antibiotics: Mode of action and resistance, *Current Drug Targets*, 3, 335-344, **2002**.
- [33] Ruiz, J., Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1109-1117, **2003**.
- [34] Duemling, W. W., Clinical experiences with penicillin in the navy, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 48, 201-220, **1946**.
- [35] Livermore, D. M., The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy, *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 3, 218-224, **2002**.
- [36] Abraham, E. P., Cephalosporins 1945–1986, *Drugs*, 34, 1-14, **1987**.
- [37] Rolinson, G. N.; Geddes, A. M., The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA), *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 3-8, **2007**.
- [38] Shryock, T. R.; Richwine, A., The interface between veterinary and human antibiotic use, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213, 92-105, **2010**.
- [39] Brunning, A., An Overview of Antibiotics, <https://longitudeprize.org/blog-post/overview-antibiotics> (Ocak, **2017**).
- [40] FAO, Lincomycin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-16-lincomycin.pdf (Haziran, **2017**).
- [41] Anonim, Bacitracin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00626> (Haziran **2017**).
- [42] Vass, M.; Hruska, K.; Franek, M., Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis, *Veterinarni Medicina*, 53, 469-500, **2008**.
- [43] Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği, Gıda Tarım Hayvancılık Bakanlığı, **2017**.
- [44] Acar, J.; Goldstein, F., Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones, *Clinical Infectious Diseases*, 24, S67-S73, **1997**.
- [45] Richard, S. G., Introduction to vancomycin, *Reviews of Infectious Diseases*, 3, S200-S204, **1981**.

- [46] Elting, L. S.; Rubenstein, E. B.; Kurtin, D.; Rolston, K. V. I.; Fangtang, J.; Martin, C. G.; Raad, I. I.; Whimbey, E. E.; Manzullo, E.; Bodey, G. P., Mississippi mud in the 1990s, *Cancer*, 83, 2597-2607, **1998**.
- [47] Wegener, H. C.; Aarestrup, F. M.; Jensen, L. B.; Hammerum, A. M.; Bager, F., Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 5, 329-335, **1999**.
- [48] FDA, FDA Approved Drug Products, <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/> (Şubat, **2017**).
- [49] Bush, K., Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 558-564, **2010**.
- [50] Normark, B. H.; Normark, S., Evolution and spread of antibiotic resistance, *Journal of Internal Medicine*, 252, 91-106, **2002**.
- [51] Chambers, H. F., Penicillin-binding protein-mediated resistance in Pneumococci and Staphylococci, *The Journal of Infectious Diseases*, 179, S353-S359, **1999**.
- [52] Ryffel, C.; Kayser, F. H.; Berger-Bächi, B., Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 25-31, **1992**.
- [53] Kirby, W. M. M., Bacteriostatic and lytic actions of penicillin on sensitive and resistant Staphylococci, *Journal of Clinical Investigation*, 24, 165-169, **1945**.
- [54] Norris, S. R.; Stratton, C. W.; Kernodle, D. S., Production of A and C variants of staphylococcal beta-lactamase by methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 1649-1650, **1994**.
- [55] Davies, T. A.; He, W.; Bush, K.; Flamm, R. K., Affinity of ceftobiprole for penicillin-binding protein 2b in *Streptococcus pneumoniae* strains with various susceptibilities to penicillin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 4510-4512, **2010**.
- [56] Diederer, B.; van Duijn, I.; van Belkum, A.; Willemsse, P.; van Keulen, P.; Kluytmans, J., Performance of CHROMagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1925-1927, **2005**.
- [57] Livermore, D. M., Has the era of untreatable infections arrived?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, i29-i36, **2009**.
- [58] Grayson, M. L.; Eliopoulos, G. M.; Wennersten, C. B.; Ruoff, K. L.; De Girolami, P. C.; Ferraro, M. J.; Moellering, R. C., Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 2180-2184, **1991**.
- [59] Ligozzi, M.; Pittaluga, F.; Fontana, R., Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 354-357, **1996**.

- [60] Abbassi, M. S.; Achour, W.; Touati, A.; Ben Hassen, A., *Enterococcus faecium* isolated from bone marrow transplant patients in Tunisia: High prevalence of antimicrobial resistance and low pathogenic power, *Pathologie Biologie*, 57, 268-271, **2009**.
- [61] Zscheck, K. K.; Murray, B. E., Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 1736-1740, **1991**.
- [62] Bradford, P. A.; Urban, C.; Mariano, N.; Projan, S. J.; Rahal, J. J.; Bush, K., Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 563-569, **1997**.
- [63] Drawz, S. M.; Bonomo, R. A., Three decades of β -lactamase inhibitors, *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 160-201, **2010**.
- [64] Bush, K.; Fisher, J. F., Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 65, 455-478, **2011**.
- [65] Jacoby, G. A.; Bush, K., β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM,SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes, <http://www.lahey.org/Studies> (Şubat, **2017**).
- [66] Ambler, R. P., The structure of beta-lactamases, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289, 321, **1980**.
- [67] Huovinen, P.; Huovinen, S.; Jacoby, G. A., Sequence of PSE-2 beta-lactamase, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 134-136, **1988**.
- [68] Jaurin, B.; Grundström, T., ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 4897-4901, **1981**.
- [69] Then, R. L., Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole, *Reviews of Infectious Diseases*, 4, 261-269, **1982**.
- [70] Hendlin, D.; Stapley, E. O.; Jackson, M.; Wallick, H.; Miller, A. K.; Wolf, F. J.; Miller, T. W.; Chaiet, L.; Kahan, F. M.; Foltz, E. L.; Woodruff, H. B.; Mata, J. M.; Hernandez, S.; Mochales, S., Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomyces, *Science*, 166, 122, **1969**.
- [71] Nair, S. K.; van der Donk, W. A., Structure and mechanism of enzymes involved in biosynthesis and breakdown of the phosphonates fosfomycin, dehydrophos, and phosphinothricin, *Archives of biochemistry and biophysics*, 505, 13-21, **2011**.
- [72] Wu, H. C.; Venkateswaran, P. S., Fosfomycin-resistant mutant of *Escherichia coli*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235, 587-592, **1974**.

- [73] Horii, T.; Kimura, T.; Sato, K.; Shibayama, K.; Ohta, M., Emergence of fosfomycin-resistant isolates of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O26, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 789-793, **1999**.
- [74] O'Hara, K., Two different types of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *FEMS Microbiology Letters*, 114, 9-16, **1993**.
- [75] Arca, P.; Reguera, G.; Hardisson, C., Plasmid-encoded fosfomycin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 393-399, **1997**.
- [76] Suárez, J. E.; Mendoza, M. C., Plasmid-encoded fosfomycin resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 791-795, **1991**.
- [77] Bernat, B. A.; Armstrong, R. N., Elementary steps in the acquisition of Mn²⁺ by the fosfomycin resistance protein (FosA), *Biochemistry*, 40, 12712-12718, **2001**.
- [78] Llana, J.; Villar, C. J.; Salas, J. A.; Suarez, J. E.; Mendoza, M. C.; Hardisson, C., Plasmid-mediated fosfomycin resistance is due to enzymatic modification of the antibiotic, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28, 163-164, **1985**.
- [79] Fillgrove, K. L.; Pakhomova, S.; Schaab, M. R.; Newcomer, M. E.; Armstrong, R. N., Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomycin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*, *Biochemistry*, 46, 8110-8120, **2007**.
- [80] Kobayashi, S.; Kuzuyama, T.; Seto, H., Characterization of the fomA and fomB gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomycin resistance on *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 647-650, **2000**.
- [81] Courvalin, P., Vancomycin resistance in Gram-positive cocci, *Clinical Infectious Diseases*, 42, S25-S34, **2006**.
- [82] Draghi, D. C.; Benton, B. M.; Krause, K. M.; Thornsberry, C.; Pillar, C.; Sahm, D. F., Comparative surveillance study of telavancin activity against recently collected Gram-positive clinical isolates from across the United States, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2383-2388, **2008**.
- [83] Nannini, E.; Murray, B. E.; Arias, C. A., Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 516-521, **2010**.
- [84] Périchon, B.; Courvalin, P., VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 4580-4587, **2009**.
- [85] Rossolini, G. M.; Mantengoli, E.; Montagnani, F.; Pollini, S., Epidemiology and clinical relevance of microbial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 582-588, **2010**.
- [86] Friedman, L.; Alder, J. D.; Silverman, J. A., Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomycin in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2137-2145, **2006**.

- [87] Jones, T.; Yeaman, M. R.; Sakoulas, G.; Yang, S.-J.; Proctor, R. A.; Sahl, H.-G.; Schrenzel, J.; Xiong, Y. Q.; Bayer, A. S., Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 269-278, **2008**.
- [88] McEwen, S. A.; Fedorka-Cray, P. J., Antimicrobial use and resistance in animals, *Clinical Infectious Diseases*, 34, S93-S106, **2002**.
- [89] Kreuzig, F.; Sherma, J.; Fried, B., Antibiotics. *Handbook of TLC*, (eds: Sherma, J.; Fried, B., Marcel Decker: New York, 445, **1996**.
- [90] Anonim, Effects of Antibiotics in Animal Feed, <http://www1.udel.edu/chem/C465/senior/fall97/feed/present.html> (Ağustos, **2016**).
- [91] Landers, T. F.; Cohen, B.; Wittum, T. E.; Larson, E. L., A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential, *Public Health Reports*, 127, 4-22, **2012**.
- [92] Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, Á.; Puchades, R., Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1038-1049, **2010**.
- [93] Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, **2006**.
- [94] Gaudin, V., Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review, *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 363-377, **2017**.
- [95] FDA, *Human health risks with the subtherapeutic use of penicillin or tetracyclines in animal feed.* , Washington, **1989**.
- [96] Navrátilová, P., Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk—a review, *Czech J Food Sci*, 26, 393-401, **2008**.
- [97] Petrović, J. M.; Katić, V. R.; Bugarski, D. D., Comparative examination of the analysis of β -lactam antibiotic residues in milk by enzyme, receptor–enzyme, and inhibition procedures, *Food Analytical Methods*, 1, 119-125, **2008**.
- [98] Sierra, D.; Sanchez, A.; Contreras, A.; Luengo, C.; Corrales, J. C.; Morales, C. T.; de la Fe, C.; Guirao, I.; Gonzalo, C., Detection limits of four antimicrobial residue screening tests for beta-lactams in goat's milk, *J Dairy Sci*, 92, 3585-91, **2009**.
- [99] Sierra, D.; Contreras, A.; Sánchez, A.; Luengo, C.; Corrales, J. C.; Morales, C. T.; de la Fe, C.; Guirao, I.; Gonzalo, C., Short communication: Detection limits of non- β -lactam antibiotics in goat's milk by microbiological residues screening tests, *Journal of Dairy Science*, 92, 4200-4206, **2009**.
- [100] Kilinc, B.; Meyer, C.; Hilge, V., Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*), *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 625-628, **2007**.

- [101] Kožárová, I.; Janošová, J.; Máté, D.; Tkáčiková, S., Evaluation of three different microbial inhibition tests for the detection of sulphamethazine residues in the edible tissues of rabbit, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26, 978-987, **2009**.
- [102] Dey, B. P.; Thaker, N. H.; Bright, S. A.; Thaler, A. M., Fast antimicrobial screen test (FAST): Improved screen test for detecting antimicrobial residues in meat tissue, *Journal of AOAC International*, 88, 447-454, **2005**.
- [103] Aila, O.; Shitandi, A.; Mahungu, S. M.; Sharma, H. K., Determination of the depletion of furazolidone residues in chicken tissues using a *Bacillus stearothermophilus* test, *Food Control*, 20, 543-547, **2009**.
- [104] Virolainen, N. E.; Pikkemaat, M. G.; Elferink, J. W. A.; Karp, M. T., Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11065-11070, **2008**.
- [105] Myllyniemi, A. L.; Sipila, H.; Nuotio, L.; Niemi, A.; Honkanen-Buzalski, T., An indirect conductimetric screening method for the detection of antibiotic residues in bovine kidneys, *Analyst*, 127, 1247-1251, **2002**.
- [106] Font, H.; Adrian, J.; Galve, R.; Estévez, M. C.; Castellari, M.; Gratacós-Cubarsí, M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P., Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 736-743, **2008**.
- [107] Lamar, J.; Petz, M., Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices, *Analytica Chimica Acta*, 586, 296-303, **2007**.
- [108] Zhao, C.; Liu, W.; Ling, H.; Lu, S.; Zhang, Y.; Lui, J.; Xi, R., Preparation of anti-gatifloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of gatifloxacin residue in milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6879-6884, **2007**.
- [109] Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, Á.; Puchades, R.; Miralles, J.; Moreno, A., Fast screening immunoassay of sulfonamides in commercial fish samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 911-921, **2010**.
- [110] Lu, S.; Zhang, Y.; Liu, J.; Zhao, C.; Liu, W.; Xi, R., Preparation of anti-pefloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pefloxacin residue in chicken liver, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6995-7000, **2006**.
- [111] Tittlemier, S. A.; Gélinas, J.-M.; Dufresne, G.; Haria, M.; Querry, J.; Cleroux, C.; Ménard, C.; Delahaut, P.; Singh, G.; Fischer-Durand, N.; Godefroy, S. B., Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fluoroquinolone residues in shrimp, *Food Analytical Methods*, 1, 28-35, **2008**.
- [112] Cooper, K. M.; Samsonova, J. V.; Plumpton, L.; Elliott, C. T.; Kennedy, D. G., Enzyme immunoassay for semicarbazide-The nitrofurantoin metabolite and food contaminant, *Analytica Chimica Acta*, 592, 64-71, **2007**.

- [113] Wesongah, J. O.; Murilla, G. A.; Guantai, A. N.; Elliot, C.; Fodey, T.; Cannavan, A., A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of chloramphenicol, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30, 68-73, **2007**.
- [114] Gaudin, V.; Cadieu, N.; Maris, P., Inter-laboratory studies for the evaluation of ELISA kits for the detection of chloramphenicol residues in milk and muscle, *Food and Agricultural Immunology*, 15, 143-157, **2003**.
- [115] Cooper, K. M.; Elliott, C. T.; Kennedy, D. G., Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissue-bound metabolite of the nitrofurans furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay, *Food Additives and Contaminants*, 21, 841-848, **2004**.
- [116] Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R.; Miralles, J.; Moreno, A.; Pastor-Navarro, N.; Espinós, F., Immunochemical determination of oxytetracycline in fish: Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays, *Analytica Chimica Acta*, 662, 177-185, **2010**.
- [117] Pyun, C. W.; Abd El-Aty, A. M.; Hashim, M. M. M.; Shim, J. H.; Lee, S. K.; Choi, K. D.; Park, K. H.; Shin, H. C.; Lee, C., Monitoring of streptomycin and dihydrostreptomycin residual levels in porcine meat press juice and muscle via solid-phase fluorescence immunoassay and confirmatory analysis by liquid chromatography after post-column derivatization, *Biomedical Chromatography*, 22, 254-259, **2008**.
- [118] Raz, S. R.; Bremer, M. G. E. G.; Haasnoot, W.; Norde, W., Label-free and multiplex detection of antibiotic residues in milk using imaging surface plasmon resonance-based immunosensor, *Analytical Chemistry*, 81, 7743-7749, **2009**.
- [119] Gaudin, V.; Maris, P., Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk, *Food and Agricultural Immunology*, 13, 77-86, **2001**.
- [120] Huet, A. C.; Charlier, C.; Singh, G.; Godefroy, S. B.; Leivo, J.; Vehniäinen, M.; Nielen, M. W. F.; Weigel, S.; Delahaut, P., Development of an optical surface plasmon resonance biosensor assay for (fluoro)quinolones in egg, fish, and poultry meat, *Analytica Chimica Acta*, 623, 195-203, **2008**.
- [121] Dumont, V.; Huet, A. C.; Traynor, I.; Elliott, C.; Delahaut, P., A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps, *Analytica Chimica Acta*, 567, 179-183, **2006**.
- [122] Ferrini, A. M.; Mannoni, V.; Carpico, G.; Pellegrini, G. E., Detection and identification of β -lactam residues in milk using a hybrid biosensor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 784-788, **2008**.
- [123] Cacciatore, G.; Petz, M.; Rachid, S.; Hakenbeck, R.; Bergwerff, A. A., Development of an optical biosensor assay for detection of β -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*, *Analytica Chimica Acta*, 520, 105-115, **2004**.
- [124] Link, N.; Weber, W.; Fussenegger, M., A novel generic dipstick-based technology for rapid and precise detection of tetracycline, streptogramin and macrolide antibiotics in food samples, *Journal of Biotechnology*, 128, 668-680, **2007**.

- [125] Alfredsson, G.; Branzell, C.; Granelli, K.; Lundström, Å., Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS, *Analytica Chimica Acta*, 529, 47-51, **2005**.
- [126] Anonim, Delvotest Product Information, <https://www.easterncrowninc.com/pdf/delvo.pdf> (Haziran, **2017**).
- [127] Anonim, BR-Test® AS Brilliant, http://www.nugi-zentrum.de/fileadmin/website_uni_ulm/nugi/Experimente/%C3%96kologie/Antibiotika-Nachweis/BrilliantSpez..pdf (Haziran, **2017**).
- [128] Anonim, Inhibition Tests - Charm Sciences, <https://www.charm.com/products/antibiotics/inhibition-tests?types%5B0%5D=1> (Haziran, **2017**).
- [129] Anonim, ECLIPSE 50 - Detection of Antibiotic Residues in Milk, <http://www.zeulab.com/products.html/veterinarian-residues/140-eclipse-50.html> (Haziran, **2017**).
- [130] Anonim, CMT-Copan Milk Test, https://www.globalcube.net/clients/beldico/content/medias/products/6_imp/labo/diagnostics/diary/copan_copan_milk_test.pdf (Haziran, **2017**).
- [131] Anonim, Premi®Test, <http://www.r-biopharm.com/tr/ueruenler/gda-yem-analizleri/kalintilar/antibiyotikler/premitest/item/premitest-4x25> (Haziran, **2017**).
- [132] Anonim, Charm II Beta Lactams, <https://www.charm.com/charm-ii/230-charm-ii-beta-lactams - documents> (Haziran, **2017**).
- [133] Anonim, Charm II Antibiotic Kits, <https://www.charm.com/products/antibiotics/charm-ii?types%5B0%5D=1> (Haziran, **2017**).
- [134] Anonim, Penzyme®, <http://foodsafety.neogen.com/en/penzyme> (Haziran, **2017**).
- [135] Davenport, D.; Nicol, J. A. C., Luminescence in hydromedusae, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 144, 399, **1955**.
- [136] Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223-239, **1962**.
- [137] Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene*, 111, 229-233, **1992**.
- [138] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, 263, 802, **1994**.
- [139] Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J. M.; Adams, J. A.; Ikura, M.; Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature*, 388, 882-887, **1997**.

- [140] Persechini, A.; Lynch, J. A.; Romoser, V. A., Novel fluorescent indicator proteins for monitoring free intracellular Ca²⁺, *Cell Calcium*, 22, 209-216, **1997**.
- [141] Romoser, V. A.; Hinkle, P. M.; Persechini, A., Detection in living cells of Ca²⁺-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence: A new class of fluorescent indicators, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 13270-13274, **1997**.
- [142] Siegel, M. S.; Isacoff, E. Y., A genetically encoded optical probe of membrane voltage, *Neuron*, 19, 735-741, **1997**.
- [143] Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A., Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiological Reviews*, 90, 1103, **2010**.
- [144] Kremers, G.-J.; Gilbert, S. G.; Cranfill, P. J.; Davidson, M. W.; Piston, D. W., Fluorescent proteins at a glance, *Journal of Cell Science*, 124, 157, **2010**.
- [145] Waldo, G. S.; Standish, B. M.; Berendzen, J.; Terwilliger, T. C., Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein, *Nat Biotech*, 17, 691-695, **1999**.
- [146] Chun, W.; Waldo, G. S.; Johnson, G. V. W., Split GFP complementation assay: a novel approach to quantitatively measure aggregation of tau in situ: effects of GSK3 β activation and caspase 3 cleavage, *Journal of Neurochemistry*, 103, 2529-2539, **2007**.
- [147] Chun, W.; Waldo, G. S.; Johnson, G. V. W., Split GFP complementation assay for quantitative measurement of tau aggregation in situ. *Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia: Methods and Protocols*, (eds: Roberson, E. D., Humana Press: Totowa, NJ, 109-123, **2011**.
- [148] Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science*, 313, 1642, **2006**.
- [149] Rothbauer, U.; Zolghadr, K.; Tillib, S.; Nowak, D.; Schermelleh, L.; Gahl, A.; Backmann, N.; Conrath, K.; Muyldermans, S.; Cardoso, M. C.; Leonhardt, H., Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies, *Nat Meth*, 3, 887-889, **2006**.
- [150] Bizzarri, R.; Serresi, M.; Luin, S.; Beltram, F., Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1107, **2008**.
- [151] Choi, W.-G.; Swanson, S. J.; Gilroy, S., High-resolution imaging of Ca²⁺, redox status, ROS and pH using GFP biosensors, *The Plant Journal*, 70, 118-128, **2012**.
- [152] Gjetting, S. K.; Ytting, C. K.; Schulz, A.; Fuglsang, A. T., Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor, *Journal of Experimental Botany*, 63, 3207-3218, **2012**.
- [153] Huang, Y.-m.; Bystroff, C., Complementation and reconstitution of fluorescence from circularly permuted and truncated green fluorescent protein, *Biochemistry*, 48, 929-940, **2009**.

- [154] Kneen, M.; Farinas, J.; Li, Y.; Verkman, A. S., Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator, *Biophysical Journal*, 74, 1591-1599, **1998**.
- [155] Arosio, D.; Ricci, F.; Marchetti, L.; Gualdani, R.; Albertazzi, L.; Beltram, F., Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor, *Nature methods*, 7, 516, **2010**.
- [156] Awaji, T.; Hirasawa, A.; Shirakawa, H.; Tsujimoto, G.; Miyazaki, S., Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 457-462, **2001**.
- [157] Bizzarri, R.; Arcangeli, C.; Arosio, D.; Ricci, F.; Faraci, P.; Cardarelli, F.; Beltram, F., Development of a novel gfp-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies, *Biophysical Journal*, 90, 3300-3314, **2006**.
- [158] Elsliger, M.-A.; Wachter, R. M.; Hanson, G. T.; Kallio, K.; Remington, S. J., Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH, *Biochemistry*, 38, 5296-5301, **1999**.
- [159] Hanson, G. T.; McAnaney, T. B.; Park, E. S.; Rendell, M. E. P.; Yarbrough, D. K.; Chu, S.; Xi, L.; Boxer, S. G.; Montrose, M. H.; Remington, S. J., Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application, *Biochemistry*, 41, 15477-15488, **2002**.
- [160] Miesenbock, G.; De Angelis, D. A.; Rothman, J. E., Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins, *Nature*, 394, 192-195, **1998**.
- [161] Zhou, X.; Herbst-Robinson, K. J.; Zhang, J., Visualizing dynamic activities of signaling enzymes using genetically encodable FRET-based biosensors: From designs to applications, *Methods in enzymology*, 504, 317-340, **2012**.
- [162] Eiamphungporn, W.; Prachayasittikul, S.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V., Development of bacterial cell-based system for intracellular antioxidant activity screening assay using green fluorescence protein (GFP) reporter, *African Journal of Biotechnology*, 11, 6934-6945, **2012**.
- [163] Chalfie, M.; Kain, S., *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols*, 2nd ed., Wiley, New York ; Chichester, **2006**.
- [164] Johnson, F. H.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Gershman, L. C.; Reynolds, G. T.; Waters, J. R., Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 60, 85-103, **1962**.
- [165] Yang, F.; Moss, L. G.; Phillips, G. N., The molecular structure of green fluorescent protein, *Nat Biotech*, 14, 1246-1251, **1996**.
- [166] Anonim, Molecular Models: Exploring the Structure of Fluorescent Proteins, <https://pdb101.rcsb.org/learn/resource/green-fluorescent-protein-gfp-activity-page> (Haziran, **2017**).

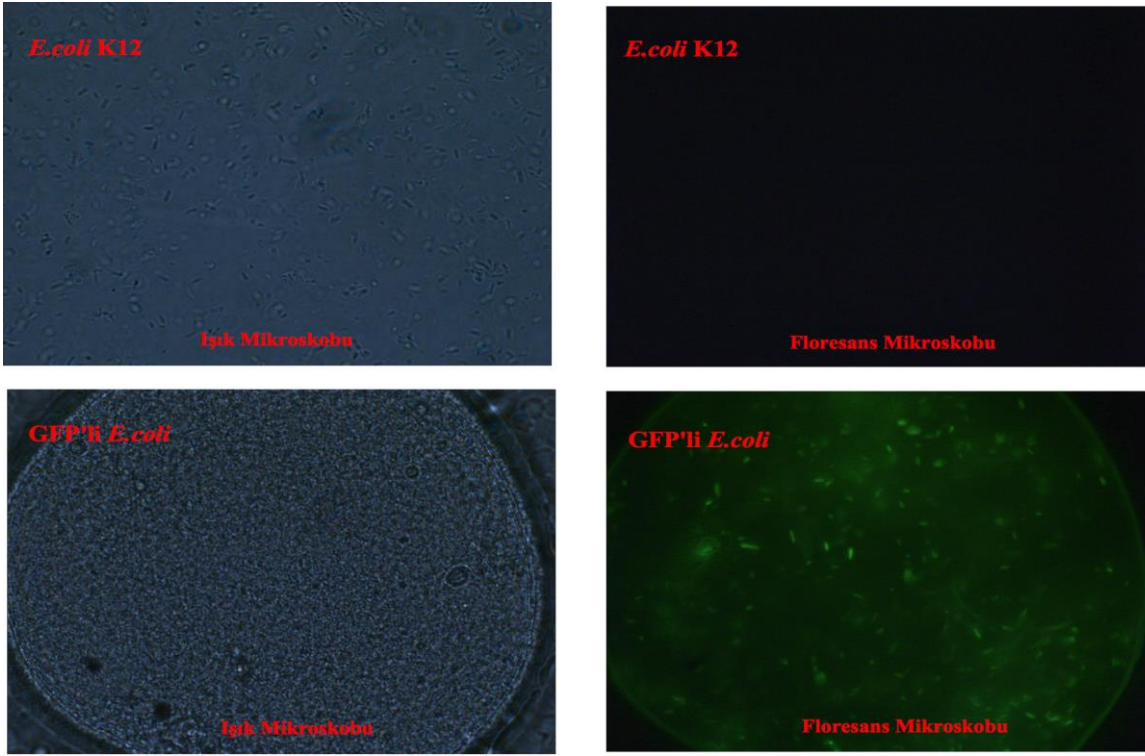
- [167] Heim, R.; Prasher, D. C.; Tsien, R. Y., Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 12501-12504, **1994**.
- [168] Nageswara Rao, B. D.; Kemple, M. D.; Prendergast, F. G., Proton nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopic studies of segmental mobility in aequorin and a green fluorescent protein from *Aequorea forskalea*, *Biophysical Journal*, 32, 630-632, **1980**.
- [169] Morin, J. G.; Hastings, J. W., Energy transfer in a bioluminescent system, *Journal of Cellular Physiology*, 77, 313-318, **1971**.
- [170] Heim, R.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y., Improved green fluorescence, *Nature*, 373, 663-664, **1995**.
- [171] Cramer, A.; Whitehorn, E. A.; Tate, E.; Stemmer, W. P. C., Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, *Nat Biotech*, 14, 315-319, **1996**.
- [172] Ormö, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J., Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, 273, 1392-1395, **1996**.
- [173] Heim, R.; Tsien, R. Y., Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Current Biology*, 6, 178-182, **1996**.
- [174] Siemering, K. R.; Golbik, R.; Sever, R.; Haseloff, J., Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein, *Current Biology*, 6, 1653-1663, **1996**.
- [175] Cormack, B. P.; Valdivia, R. H.; Falkow, S., FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, 173, 33-38, **1996**.
- [176] Kimata, Y.; Iwaki, M.; Lim, C. R.; Kohno, K., A novel mutation which enhances the fluorescence of green fluorescent protein at high temperatures, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 232, 69-73, **1997**.
- [177] Nagai, T.; Sawano, A.; Park, E. S.; Miyawaki, A., Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 3197-3202, **2001**.
- [178] Zacharias, D. A.; Violin, J. D.; Newton, A. C.; Tsien, R. Y., Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells, *Science*, 296, 913, **2002**.
- [179] Long, G. L.; Winefordner, J. D., Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition, *Analytical Chemistry*, 55, 712A-724A, **1983**.
- [180] Studier, F. W., Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures, *Protein expression and purification*, 41, 207-234, **2005**.

- [181] Jerums, M.; Yang, X., Optimization of cell culture media, *BioProcess Int*, 3, 38-44, **2005**.
- [182] Ishii, M.; Kunimura, J. S.; Jeng, H. T.; Vessoni Penna, T. C.; Cholewa, O., Evaluation of the pH- and thermal stability of the recombinant green fluorescent protein (GFP) in the presence of sodium chloride. *Applied Biochemistry and Biotechnology: The Twenty-Eighth Symposium Proceedings of the Twenty-Eight Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held April 30–May 3, 2006, in Nashville, Tennessee*, (eds: Mielenz, J. R.; Klasson, K. T.; Adney, W. S.; McMillan, J. D., Humana Press: Totowa, NJ, 555-571, **2007**.
- [183] Phue, J.-N.; Lee, S. J.; Trinh, L.; Shiloach, J., Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 α), *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 831-836, **2008**.
- [184] Inada, T.; Kimata, K.; Aiba, H., Mechanism responsible for glucose–lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model, *Genes to Cells*, 1, 293-301, **1996**.
- [185] Kimata, K.; Takahashi, H.; Inada, T.; Postma, P.; Aiba, H., cAMP receptor protein–cAMP plays a crucial role in glucose–lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 12914-12919, **1997**.
- [186] Meadow, N. D.; Fox, D. K.; Roseman, S., The bacterial phosphoenol-pyruvate: glyucose phosphotransferase system, *Annual review of biochemistry*, 59, 497-542, **1990**.
- [187] Grossman, T. H.; Kawasaki, E. S.; Punreddy, S. R.; Osburne, M. S., Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, *Gene*, 209, 95-103, **1998**.
- [188] Sarabipour, S.; King, C.; Hristova, K., Uninduced high-yield bacterial expression of fluorescent proteins, *Analytical Biochemistry*, 449, 155-157, **2014**.
- [189] Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) For Residues Of Veterinary Drugs In Foods, Codex Alimentarius International Food Standards, **2015**.
- [190] Commission Regulation (EU) of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Official Journal of the European Union, **2010**.
- [191] Harel, Y. M.; Bailone, A.; Bibi, E., Resistance to Bacitracin as Modulated by an *Escherichia coli* Homologue of the Bacitracin ABC Transporter BcrC Subunit from *Bacillus licheniformis*, *Journal of Bacteriology*, 181, 6176-6178, **1999**.
- [192] FAO, Benzylpenicillin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-3-benzylpenicillin.pdf (Haziran, **2017**).
- [193] FAO, Gentamicin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-7-gentamicin.pdf (Haziran, **2017**).

- [194] FAO, Neomycin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-7-nomycin.pdf (Haziran, **2017**).
- [195] FAO, Spectinomycin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-6-spectinomycin.pdf (Haziran, **2017**).
- [196] FAO, Spiramycin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-4-spiramycin.pdf (Haziran, **2017**).
- [197] FAO, Dihydrostreptomycin Streptomycin, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-7-dihydrostreptomycin_streptomycin.pdf (Haziran, **2017**).
- [198] FAO, General Considerations for Sulfadimidine and Sulfathiazole, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-2-general_consideration_for_sulfamidine_and_sulfathiazole.pdf (Haziran, **2017**).
- [199] FAO, Tetracycline, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-8-tetracycline.pdf (Haziran, **2017**).
- [200] FAO, Online Edition: "Residues of some veterinary drugs in foods and animals", <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-vetdrugs/details/en/c/72/> (Haziran, **2017**).
- [201] Performance Criteria, Other Requirements and Procedures for Analytical Methods, Official Journal of the European Communities, **2002**.

EKLER

EK 1



Şekil Ek.1 *E. coli* K12 ve GFP'li *E. coli* kültürlerine ait ışık mikroskobu ve floresans mikroskobu görüntüleri

EK 2**HAYVANSAL GIDALARDA BULUNABİLECEK FARMAKOLOJİK AKTİF MADDELERİN
SINIFLANDIRILMASI VE MAKSİMUM KALINTI LİMİTLERİ****BÖLÜM-1****İZİNLİ MADDELER**

Farmakolojik Aktif Madde	Belirleyici Kalıntı	Hayvan Türü	Maksimum Kalıntı Limiti- MKL	Hedef Doku	Diğer Koşullar	Terapötik Sınıfı
Ampisilin	Ampisilin	Gıda elde edilen tüm türler	50 µg/kg	Kas	Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları içindir. Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz. Yağ için verilen MKL, kanatlı hayvan ve domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir. Yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmaz.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			50 µg/kg	Yağ		
			50 µg/kg	Karaciğer		
			50 µg/kg	Böbrek		
			4 µg/kg	Süt		
Basitrasin	Basitrasin A, Basitrasin B ve Basitrasin C'nin toplamı	Sığır	100 µg/kg	Süt	-----	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
		Tavşan	150 µg/kg	Kas		
			150 µg/kg	Yağ		
			150 µg/kg	Karaciğer		
	150 µg/kg		Böbrek			
-----	Sığır	Süt dışındaki hedef dokularda MKL gerekmemektedir.	-----	Sadece laktasyondaki ineklerde meme içi kullanım içindir.		
Benzilpenisilin	Benzilpenisilin	Gıda elde edilen tüm türler	50 µg/kg	Kas	Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları içindir. Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz. Yağ için verilen MKL, kanatlı hayvan ve domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir. Yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmaz.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			50 µg/kg	Yağ		
			50 µg/kg	Karaciğer		
			50 µg/kg	Böbrek		
			4 µg/kg	Süt		

Gentamisin	Gentamisin C1, Gentamisin C1a, Gentamisin C2 ve Gentamisin C2a toplamı	Gıda elde edilen tüm memeli hayvan türleri, Balık	50 mg/kg	Kas	Böbrek için verilen MKL, böbrek ve derinin doğal oranları içindir Yağ için verilen MKL, domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			50 mg/kg	Yağ		
			200 mg/kg	Karaciğer		
			750 mg/kg	Böbrek		
			100 mg/kg	Süt		
Linkomisin	Linkomisin	Gıda elde edilen tüm türler	50 µg/kg	Yağ	Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları içindir. Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz. Yağ için verilen MKL, kanatlı hayvan ve domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			100 µg/kg	Kas		
			500 µg/kg	Karaciğer		
			1500 µg/kg	Böbrek		
			150 µg/kg	Süt		
			50 µg/kg	Yumurta		
Neomisin (Framisetin dahil)	Neomisin B	Gıda elde edilen tüm türler	500 µg/kg	Kas	Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları içindir. Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz. Yağ için verilen MKL, kanatlı hayvan ve domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			500 µg/kg	Yağ		
			5500 µg/kg	Karaciğer		
			9000 µg/kg	Böbrek		
			1500 µg/kg	Süt		
			500 µg/kg	Yumurta		
Sefazolin	Sefazolin	Sığır, koyun, keçi	50 µg/kg	Süt	-----	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
	-----	Sığır, koyun, keçi	Süt dışındaki hedef dokular için MKL gerekmemektedir.	-----	Meme dokusu gıda olarak insan tüketiminde kullanılmıyorsa, meme için kullanım içindir.	
Spektinomisin	Spektinomisin	Koyun	300 µg/kg	Kas	Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			500 µg/kg	Yağ		

			2000 µg/kg	Karaciğer	içindir. Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz. Yağ için verilen MKL, kanatlı hayvan ve domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir. Yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmaz.	
			5000 µg/kg	Böbrek		
			200 µg/kg	Süt		
		Gıda elde edilen diğer türler	300 µg/kg	Kas		
			500 µg/kg	Yağ		
			1000 µg/kg	Karaciğer		
			5000 µg/kg	Böbrek		
			200 µg/kg	Süt		
Spiramisin	Spiramisin ve Neospiramisin toplamı	Sığır	200 µg/kg	Kas	-----	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			300 µg/kg	Yağ		
			300 µg/kg	Karaciğer		
			300 µg/kg	Böbrek		
			200 µg/kg	Süt		
	Tavuk	200 µg/kg	Kas	Yumurtası insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmaz.		
		300 µg/kg	Deri ve Yağ			
		400 µg/kg	Karaciğer			
	Spiramisin 1	Domuz	250 µg/kg	Kas	-----	
			2000 µg/kg	Karaciğer		
1000 µg/kg			Böbrek			
Streptomisin	Streptomisin	Tüm geniş getiren hayvanlar, domuz, tavşan	500 µg/kg	Kas	Yağ için verilen MKL, domuzlarda yağ ve derinin doğal oranları içindir.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			500 µg/kg	Yağ		
			500 µg/kg	Karaciğer		
			1000 µg/kg	Böbrek		
		Tüm geniş getiren hayvanlar	200 µg/kg	Süt		
Sülfonamidler (Sülfonamid grubuna ait tüm maddeler)	Ana madde	Gıda elde edilen tüm türler	100 µg/kg	Kas	Sülfonamid grubunda bulunan tüm maddelerin toplam kalıntı miktarı 100 µg/kg'ı geçemez. Kas için verilen MKL, balıklarda	Antienfeksiyöz maddeler/ Kemoterapötikler
			100 µg/kg	Yağ		
			100 µg/kg	Karaciğer		
			100 µg/kg	Böbrek		

		Sığır, koyun, keçi	100 µg/kg	Süt	kas ve derinin doğal oranları içindir. Yağ, karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz. Yumurta insan tüketimine sunulan hayvanlarda kullanılmaz.	
Tetrasiklin	Ana madde ve 4-epimerleri toplamı	Gıda elde edilen tüm türler	100 µg/kg	Kas	Kas için verilen MKL, balıklarda kas ve derinin doğal oranları içindir. Karaciğer ve böbrek için verilen MKL balıkta uygulanmaz.	Antienfeksiyöz maddeler/ Antibiyotikler
			300 µg/kg	Karaciğer		
			600 µg/kg	Böbrek		
			100 µg/kg	Süt		
			200 µg/kg	Yumurta		

BÖLÜM-2

YASAKLI MADDELER

Farmakolojik Aktif Madde	Maksimum Kalıntı Limiti
Kloramfenikol	MKL oluşturulamaz.
Nitrofuraneler (furazolidone dahil)	MKL oluşturulamaz.

EK 3

**CODEX ALIMENTARIUS
MAXIMUM RESIDUE LIMITS (MRLs) AND RISK MANAGEMENT
RECOMMENDATIONS (RMRs) FOR RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN
FOODS**

MAXIMUM RESIDUE LIMITS (MRLs) FOR RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS

BENZYLPENICILLIN/PROCAINE BENZYLPENICILLIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 36 (1990); 50 (1998)				
Acceptable Daily Intake: 30 µg-penicillin/person/day (50 th JECFA, 1998). Residues of benzylpenicillin and procaine benzylpenicillin should be kept below this level.				
Residue Definition: Benzylpenicillin.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	50	23 rd (1999)	
Cattle	Liver	50	23 rd (1999)	
Cattle	Kidney	50	23 rd (1999)	
Cattle	Milk (µg/l)	4	23 rd (1999)	
Chicken	Muscle	50	23 rd (1999)	Applies to procaine benzylpenicillin only.
Chicken	Liver	50	23 rd (1999)	Applies to procaine benzylpenicillin only.
Chicken	Kidney	50	23 rd (1999)	Applies to procaine benzylpenicillin only.
Pig	Muscle	50	23 rd (1999)	
Pig	Liver	50	23 rd (1999)	
Pig	Kidney	50	23 rd (1999)	
LINCOMYCIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 54 (2000); 58 (2002); 62 (2004)				
Acceptable Daily Intake: 0-30 µg/kg body weight (54 th JECFA, 2000).				
Residue Definition: Lincomycin.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Milk	150	26 th (2003)	
Chicken	Muscle	200	26 th (2003)	
Chicken	Liver	500	26 th (2003)	
Chicken	Kidney	500	26 th (2003)	
Chicken	Fat	100	26 th (2003)	Additional MRL for skin with adhering fat of 300 µg/kg.
Pig	Muscle	200	26 th (2003)	
Pig	Liver	500	26 th (2003)	
Pig	Kidney	1500	26 th (2003)	
Pig	Fat	100	26 th (2003)	Additional MRL for skin with adhering fat of 300 µg/kg.

CHLORTETRACYCLINE/OXYTETRACYCLINE/TETRACYCLINE (antimicrobial agent)**JECFA Evaluation:** 45 (1995); 47 (1996); 50 (1998); 58 (2002)**Acceptable Daily Intake:** 0-30 µg/kg body weight (50th JECFA, 1998). Group ADI for chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline.**Residue Definition:** Parent drugs, singly or in combination.

Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	200	26 th (2003)	
Cattle	Liver	600	26 th (2003)	
Cattle	Kidney	1200	26 th (2003)	
Cattle	Milk (µg/l)	100	26 th (2003)	
Fish	Muscle	200	26 th (2003)	Applies only to oxytetracycline.
Giant prawn (<i>Paeneus monodon</i>)	Muscle	200	26 th (2003)	Applies only to oxytetracycline.
Pig	Muscle	200	26 th (2003)	
Pig	Liver	600	26 th (2003)	
Pig	Kidney	1200	26 th (2003)	
Poultry	Muscle	200	26 th (2003)	
Poultry	Liver	600	26 th (2003)	
Poultry	Kidney	1200	26 th (2003)	
Poultry	Eggs	400	26 th (2003)	
Sheep	Muscle	200	26 th (2003)	
Sheep	Liver	600	26 th (2003)	
Sheep	Kidney	1200	26 th (2003)	
Sheep	Milk (µg/l)	100	26 th (2003)	

DIHYDROSTREPTOMYCIN/STREPTOMYCIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 43 (1994); 48 (1997); 52 (1999); 58 (2002)				
Acceptable Daily Intake: 0-50 µg/kg body weight (48 th JECFA, 1997). Group ADI for combined residues of dihydrostreptomycin and streptomycin.				
Residue Definition: Sum of dihydrostreptomycin and streptomycin.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	600	24 th (2001)	
Cattle	Liver	600	24 th (2001)	
Cattle	Kidney	1000	24 th (2001)	
Cattle	Fat	600	24 th (2001)	
Cattle	Milk	200	26 th (2003)	
Chicken	Muscle	600	24 th (2001)	
Chicken	Liver	600	24 th (2001)	
Chicken	Kidney	1000	24 th (2001)	
Chicken	Fat	600	24 th (2001)	
Pig	Muscle	600	24 th (2001)	
Pig	Liver	600	24 th (2001)	
Pig	Kidney	1000	24 th (2001)	
Pig	Fat	600	24 th (2001)	
Sheep	Muscle	600	24 th (2001)	
Sheep	Liver	600	24 th (2001)	
Sheep	Kidney	1000	24 th (2001)	
Sheep	Fat	600	24 th (2001)	
Sheep	Milk	200	26 th (2003)	

GENTAMICIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 43 (1994); 48 (1997); 50 (1998)				
Acceptable Daily Intake: 0-20 µg/kg body weight (50 th JECFA, 1998).				
Residue Definition: Gentamicin.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	100	24 th (2001)	
Cattle	Liver	2000	24 th (2001)	
Cattle	Kidney	5000	24 th (2001)	
Cattle	Fat	100	24 th (2001)	
Cattle	Milk (µg/l)	200	24 th (2001)	
Pig	Muscle	100	24 th (2001)	
Pig	Liver	2000	24 th (2001)	
Pig	Kidney	5000	24 th (2001)	
Pig	Fat	100	24 th (2001)	

NEOMYCIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 43 (1994); 47 (1996); 52 (1999); 58 (2002); 60 (2003)				
Acceptable Daily Intake: 0-60 µg/kg body weight (47 th JECFA, 1996).				
Residue Definition: Neomycin.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	500	23 rd (1999)	
Cattle	Liver	500	28 th (2005)	
Cattle	Kidney	10000	28 th (2005)	
Cattle	Fat	500	23 rd (1999)	
Cattle	Milk	1500	28 th (2005)	
Chicken	Muscle	500	23 rd (1999)	
Chicken	Liver	500	23 rd (1999)	
Chicken	Kidney	10000	23 rd (1999)	
Chicken	Fat	500	23 rd (1999)	
Chicken	Eggs	500	23 rd (1999)	
Duck	Muscle	500	23 rd (1999)	
Duck	Liver	500	23 rd (1999)	
Duck	Kidney	10000	23 rd (1999)	
Duck	Fat	500	23 rd (1999)	
Goat	Muscle	500	23 rd (1999)	
Goat	Liver	500	23 rd (1999)	
Goat	Kidney	10000	23 rd (1999)	
Goat	Fat	500	23 rd (1999)	
Pig	Muscle	500	23 rd (1999)	
Pig	Liver	500	23 rd (1999)	
Pig	Kidney	10000	23 rd (1999)	
Pig	Fat	500	23 rd (1999)	
Sheep	Muscle	500	23 rd (1999)	
Sheep	Liver	500	23 rd (1999)	
Sheep	Kidney	10000	23 rd (1999)	
Sheep	Fat	500	23 rd (1999)	
Turkey	Muscle	500	23 rd (1999)	
Turkey	Liver	500	23 rd (1999)	
Turkey	Kidney	10000	23 rd (1999)	
Turkey	Fat	500	23 rd (1999)	

SPECTINOMYCIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 42 (1994); 50 (1998)				
Acceptable Daily Intake: 0-40 µg/kg body weight (42 nd JECFA, 1994).				
Residue Definition: Spectinomycin.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	500	23 rd (1999)	
Cattle	Liver	2000	23 rd (1999)	
Cattle	Kidney	5000	23 rd (1999)	
Cattle	Fat	2000	23 rd (1999)	
Cattle	Milk (µg/l)	200	23 rd (1999)	
Chicken	Muscle	500	23 rd (1999)	
Chicken	Liver	2000	23 rd (1999)	
Chicken	Kidney	5000	23 rd (1999)	
Chicken	Fat	2000	23 rd (1999)	
Chicken	Eggs	2000	23 rd (1999)	
Pig	Muscle	500	23 rd (1999)	
Pig	Liver	2000	23 rd (1999)	
Pig	Kidney	5000	23 rd (1999)	
Pig	Fat	2000	23 rd (1999)	
Sheep	Muscle	500	23 rd (1999)	
Sheep	Liver	2000	23 rd (1999)	
Sheep	Kidney	5000	23 rd (1999)	
Sheep	Fat	2000	23 rd (1999)	

SPIRAMYCIN (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 38 (1991); 43 (1994); 47 (1996); 48 (1997)				
Acceptable Daily Intake: 0-50 µg/kg body weight (43 rd JECFA, 1994).				
Residue Definition: Cattle and chickens, sum of spiramycin and neospiramycin; Pigs, spiramycin equivalents (antimicrobially active residues).				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Muscle	200	22 nd (1997)	
Cattle	Liver	600	22 nd (1997)	
Cattle	Kidney	300	22 nd (1997)	
Cattle	Fat	300	22 nd (1997)	
Cattle	Milk (µg/l)	200	22 nd (1997)	
Chicken	Muscle	200	22 nd (1997)	
Chicken	Liver	600	22 nd (1997)	
Chicken	Kidney	800	22 nd (1997)	
Chicken	Fat	300	22 nd (1997)	
Pig	Muscle	200	22 nd (1997)	
Pig	Liver	600	22 nd (1997)	
Pig	Kidney	300	22 nd (1997)	
Pig	Fat	300	22 nd (1997)	
SULFADIMIDINE (antimicrobial agent)				
JECFA Evaluation: 34 (1989); 38 (1991); 42 (1994)				
Acceptable Daily Intake: 0-50 µg/kg body weight (42 nd JECFA, 1994).				
Residue Definition: Sulfadimidine.				
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	CAC	Notes
Cattle	Milk (µg/l)	25	21 st (1995)	
Not specified	Muscle	100	21 st (1995)	
Not specified	Liver	100	21 st (1995)	
Not specified	Kidney	100	21 st (1995)	
Not specified	Fat	100	21 st (1995)	

RISK MANAGEMENT RECOMMENDATIONS (RMRS) FOR RESIDUES OF VETERINARY DRUGS

CHLORAMPHENICOL (antimicrobial agent)

JECFA evaluation: 12th (1968), 32nd (1987), 42nd (1994) and 62nd (2004) JECFA CAC37 (2014)

Recommended risk management measures

In view of the JECFA conclusions on the available scientific information, there is no safe level of residues of chloramphenicol or its metabolites in food that represents an acceptable

risk to consumers. For this reason, competent authorities should prevent residues of chloramphenicol in food. This can be accomplished by not using chloramphenicol in food producing animals.

FURAZOLIDONE (antimicrobial agent)

JECFA evaluation: 40th (1992) JECFA

CAC37 (2014)

Recommended risk management measures

In view of the JECFA conclusions on the available scientific information, there is no safe level of residues of furazolidone or its metabolites in food that represents an acceptable risk to consumers. For this reason, competent authorities should prevent residues of furazolidone in food. This can be accomplished by not using furazolidone in food producing animals.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Nazife Nur KARAÇAĞLAR

Doğum Yeri : Kayseri, Türkiye

Medeni Hali : Evli

E-posta : nuryazgan@gmail.com, nuryazgan@hacettepe.edu.tr

Adresi :Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 06800, Beytepe,
Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Kayseri Fen Lisesi (2001-2004)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2004-2008)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2008-2011)

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2011-2017)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce - 86.25 (2016-YDS Sonbahar)

İş Deneyimi

Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
Bölümü (2008-devam)

Deneyim Alanları

Gıda Mühendisliği, Süt Teknolojisi, Biyosensörler, Nanopartiküller

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: Antibiyotik Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler, ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 117 sayfalık kısmına ilişkin, 19/06/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

19.06.2017
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Nazife Nur KARAÇAĞLAR
Öğrenci No: N10248702
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Doktora
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç.Dr. Ali TOPCU

