

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

Əlyazması hüququnda

BACİLLUS CİNSLİ BAKTERİYALARDA ZÜLAL MƏNŞƏLİ ANTİBİOTİKLƏRİN SİNTEZİNİN BİOTEXNOLOJİ ƏSASLARI

İxtisas: 2422.01- Biotexnologiya
(o cümlədən, bionanotexnologiyalar)

Elm sahəsi: Biologiya

İddiaçı: **Səfadə Ədalət qızı Tağıyeva**

fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi almaq üçün təqdim olunan
dissertasiyanın

AVTOREFERATI

Bakı – 2024

Dissertasiya işi AR ETN-nin Mikrobiologiya İnstitutunun Bioloji aktiv maddələr laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbər:

biologiya elmləri doktoru, professor
Fəridə Xosrov qızı Qəhrəmanova

Rəsmi opponəntlər:



AMEA-nın müxbir üzvü
İbrahim Vahab oğlu Əzizov

AMEA-nın müxbir üzvü
İlham Əyyub oğlu Şahmuradov

biologiya elmləri doktoru
Lidiya Qriqoryevna Stoyanova

Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının AR ETN-nin Mikrobiologiya İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən BFD 1.07/1 Dissertasiya Şurası.

Dissertasiya şurasının
sədri:

biologiya elmləri doktoru, professor
AMEA-nın müxbir üzvü
Pənah Zülfiqar oğlu Muradov

Dissertasiya şurasının
elmi katibi:

biologiya üzrə fəlsəfə doktoru, dosent
Günəl Əli qızı Qasıмова

Elmi seminarın
sədri:

biologiya elmlər doktoru, dosent
Vəfa Xəlil qızı Qasıмова

GİRİŞ

Mövzunun aktuallığı və işlənmə dərəcəsi. İnsan həyatında müxtəlif antibakterial maddələr mühüm rol oynayır. Antibakterial, antifunqal və antiviral antibiotiklər hər gün minlərlə xəstə insanları və digər canlıları, bitkiləri, heyvanları xilas edir. Bakteriyaların və virusların inkişafının qarşısını alan antibiotiklərin sayı ildən-ilə artır; onlar daha səmərəli və daha geniş təsir spektrinə malik olurlar. Əgər ilk kimyəvi antibiotiklər, əsasən, mikroskopik göbələklərdən əldə olunurdusa, sonra onların daha ucuz və səmərəli kimyəvi sintezi başlamışdır. Lakin *“antibiotiklərin nəzarətsiz, bəzən əsassız və geniş istifadəsi onların təsirinə rezistent bakteriyaların yaranmasına gətirib çıxarmışdır. Hal-hazırda antibiotiklərə davamlı ştammlar hospital infeksiyaların əsas səbəbidir.”*^{1,2,3} İnsan orqanizminə kənar kimyəvi maddələr olaraq antibiotiklər qanda və daxili orqanlarda fəsadlar yaratmaq xüsusiyyətinə malikdir. Onlar bəzi insanlarda allergik reaksiyalar əmələ gətirir, digərlərində isə immun sistemini zəiflədir. Kimyəvi antibiotiklər geniş spektrə malik olduğu üçün nəinki patogen mikrobları, eyni zamanda selikli qişaların normal mikroflorasını məhv edir və disbakteriozlara, mikozlara gətirib çıxarırlar. Beləliklə, yeni növ dərman vasitələrinin axtarılması vacib bir məsələ kimi ortaya çıxmışdır. Təbii bioloji mənşəli antibakterial maddələr, yəni, bakteriosinlər alimlərin xüsusi diqqət mərkəzinə çevrilmişdir. Antibiotiklərdən fərqli olaraq bu zülmətli maddələr antibiotiklərə xas olan mənfi cəhətlərlə xarakterizə olunurlar. Bu sahədə aparılan tədqiqatlara cəlb edilən mikroorqanizmlərin sayının az olması, produsentlərin bioloji məhsuldarlığının məhdudlaşdırılması, eləcə də, bakteriosinlərin sintezi ilə bağlı bir

¹ Djordjevic, Z.M. Previous antibiotic exposure and antimicrobial resistance patterns of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with nosocomial infections / Z. M. Djordjevic, M. M. Folic, S.M. Jankovic // Balkan Medical Journal, - Kragujevac: - 2017. 34(6), - p.527- 533.

² Boev, C., Kiss, E. Hospital-acquired infections: current trends and prevention // - Pittsburg: Critical Care Nursing Clinics of North America, Pittsburg. – 2017. 29(1), - p. 51- 65.

³ Овчинников, Р.С. Этиопатогенез современных инфекций // - Москва: Vetfarma, - 2015. ч. 2, №3, - с. 40- 42.

sıra məsələlərin axıra kimi aydınlaşdırılmaması bu sahədə tədqiqatların aparılmasını zəruri edir.

Bakteriosinlərin xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi, produsent bakteriyaları becərmək üçün bakterioloji mühitlərin seçilməsi, optimal şəraitin müəyyənləşdirilməsi və sintez üsullarının sənaye şəraitinə uyğunlaşdırılması dissertasiya işinin aktuallığını təşkil edir.

Məqsəd və vəzifələr. Təqdim olunan elmi işin məqsədi *Bacillus* cinsli bakteriyalardan (o cümlədən, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14579 və təbii *Bacillus* ştammlarından) səmərəli, əlverişli və istehsalda tətbiq oluna biləcək üsullarla antibakterial maddələri sintez etməkdir.

Qarşıya qoyulan məqsədə çatmaq üçün aşağıdakı vəzifələrin yerinə yetirilməsi məqsədəuyğun hesab edilmişdir:

1. Seçilmiş *Bacillus* cinsli ştammların (*Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kolleksiya ştammlarının və təbii *Bacillus* ştamminin) produsent keyfiyyətlərini və antibakterial xüsusiyyətlərini tədqiq etmək.

2. *Bacillus* cinsli bakteriyalardan (*Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kolleksiya ştammlarından və Kür çayın suyundan ayrılmış təbii *Bacillus* ştammindən) zülal mənşəli antibakterial maddələri seçilmiş biotexnoloji üsullarla sintez etmək.

3. *Bacillus* cinsli bakteriyalardan sintez edilmiş bakteriosinlərin kimyəvi təmizliyini, konsentrasiyasını, molekül kütləsini ölçmək və antibakterial xassələrini müəyyənləşdirmək.

4. *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kolleksiya ştammlarının və Kür çayından ayrılmış təbii *Bacillus* ştamminin genetik materialında subtilin, subtilizin və polimiksin bakteriosinlərinin genetik əsaslarının olmasını müəyyən etmək.

Tədqiqat metodları. Alınan nəticələrin dürüstlüyü müasir standartlara cavab verən biotexnoloji, bakterioloji (manual və avtomatik) və genetik metodların tətbiqi, həyata keçirilən bütün təcrübələrin təkrarlığı ilə təsdiqini tapdı. Eksperimentlər üçün istifadə edilən bakterial ştammların və reagentlərin təmizlik

dərəcəsi, cihazların kalibrləməsi ilə dəstəklənən dəqiqliyi, mühitlərin və testlərin keyfiyyətinə nəzarəti də alınan nəticələrin dürüst olmasını şərtləndirir.

Dissertasiyanın müdafiəyə təqdim olunan müddəaları.

- *Bacillus* cinsli bakteriyaların (*Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kolleksiya ştammlarının, və Kür çayından ayrılmış təbii *Bacillus* ştamminin) prodüsent əlamətləri mövcud olduğuna görə bu bakteriyaların zülal mənşəli bakteriosinlərin sintezi üçün əlverişli prodüsent olmasına imkan verir;

- *Bacillus* cinsli bakteriyalardan bakteriosinlərin alınması mürəkkəb, ciddi sərmayə və xüsusi şərait tələb etməsi daha sadə və sərfəli sintez şərtlərinin müəyyən edilməsini şərtləndirir.

- *Bacillus* cinsli bakteriyaların bakteriostatik effekti onların ifraz etdiyi bakteriosinlərlə bağlıdır.

- *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kolleksiya ştammlarının və Kür çayından ayrılmış təbii *Bacillus* ştammların ifraz etdiyi bakteriosinlər bu onların genomunda müvafiq genlərin olması ilə əlaqəlidir.

Tədqiqatın elmi yeniliyi. Laboratoriyada dörd il ərzində aparılan tədqiqatlar zamanı elm və laborator metodikalar modifikasiya olunmuşdur, onların optimal variantları müəyyənləşdirilmişdir. O cümlədən, *Bacillus* cinsli bakteriyalardan (həm kolleksiya ştammlarından, həm də ki Kür çayının suyundan ayrılmış ştammdan) antibakterial maddələri əldə etmək üçün əlverişli və sadə üsullar seçilmişdir: 72 saatlıq bakterial kulturların suspenziyaları 18 saat qan qarışdırıcı cihazında çalxalanıb, sonra sentrifüqada fırladılmışdır. Yığılmış supernatantdan protein tərkibli bakteriosinlər asetonla çöktürülmüşdür.

Bacillus bakterial suspenziyalarını diri bakteriyalardan təmizləmək üçün orijinal və optimal üsul seçilmişdir. Bunun üçün sentrifüqada çökdürmə, yüksək temperaturda sterilizasiya və bakterial filtdən keçirmə biotexnoloji üsullar müqayisə edilib, sentrifüqada çökdürmə metoduna üstünlük verilmişdir. *Bacillus* bakteriyaları tərəfindən bakteriosinlərin məhz uzun müddətli kultivasiyadan sonra daha aktiv ifraz edilməsi aşkar olunmuşdur.

Bu nəticə ümumi xarakter daşıyır və digər bakteriyalardan müxtəlif zülal mənşəli maddələri əldə etmək üçün istifadə oluna bilər.

İlk dəfə *Bacillus* bakteriyalarda “qocalma” prosesi işıq mikroskopu altında müşahidə olunmuşdur və təsvir edilmişdir. *Bacillus* cinsli bakteriyaların bir və üç günlük bakterial hüceyrələrinin morfoloji xüsusiyyətlərində, düzülüşündə (“*arrangement*”) və spor əmələ gətirməsində fərqləndirici əlamətlər aşkar olunmuşdur.

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14579 və Kür çayından ayrılmış *Bacillus* ştammları əsasında bakteriosinlər ekstraksiya edilmişdir, onların konsentrasiyası və molekül kütləsi ölçülmüş, antibakterial xassələrin spektri müəyyən edilmişdir. Sintez edilmiş yeni bakteriosinlərin antibakterial xassələri yoxlanılıb, təsdiqlənmişdir. Yeni bakteriosinlərin və onlara uyğun bakterial kulturların antibakterial xüsusiyyətləri müqayisə edilmişdir. Onların eyni bakteriyalara qarşı inhibisiya göstərməsi təsdiqlənmişdir.

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14579 və Kür çayından ayrılmış *Bacillus* bakteriyaların genetik testləri keçirilmişdir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ştamminin DNT-sində subtilin bakteriosinin genetik əsasları, yəni, *spaS* geni, *Bacillus cereus* ATCC 14579 DNT-sində subtilizin geni *sboA*, Kür çayından ayrılmış *Bacillus polymyxa* ştamminin DNT-sində isə *pmxE* geni aşkar olunmuşdur.

Tədqiqatın nəzəri və praktiki əhəmiyyəti. Elmi işin çərçivəsində keçirilən tədqiqatlar həm nəzəri, həm də praktiki cəhətdən vacibdir. Dissertasiyada göstərilən üsullar nəinki *Bacillus* cinsli bakteriyaların, həmçinin də digər bakteriyaların antaqonizmini müəyyən etmək üçün uyğundur. Bu üsullar tez bir zamanda çoxsaylı produsentlərin aşkar edilməsinə və sintezinə təkan verə bilər. Digər tərəfdən isə, az sərmayə tələb edən şəraitdə bakteriosinlərin sintezi üçün imkan yarada bilər. Laboratoriya şəraitində keçirilən yeni bakteriosinlərin sintezi asanlıqla istehsalda tətbiq oluna bilər. Təklif edilən üsul əhalinin təhlükəsiz və selektiv təbii antibiotiklərlə təmin edilməsinə yardım edə bilər. Bakteriosinlər həm insanların, həm də heyvanların, bitkilərin

müalicəsinə kömək edəcək. Bakteriosin sintezi üsullarının optimallaşdırılması və sənaye proseslərinə uyğunlaşdırılması məqamları yeni tədqiqatlara təkan verəcək.

Nəşr və dissertasiyanın aprobasiyası və tətbiqi. Dissertasiyanın mövzusunə aid 17 əsər dərc edilmiş və onların nəticələri “The 5th International Symposium and School for Young Scientists on Physics” Beynəlxalq simpoziumda (Rusiya F., Moskva, 2020), Azərbaycan Baytarlıq Elmi-Tədqiqat İnstitutunun Beynəlxalq Elmi-praktik Konfransında (Azərbaycan R., Bakı, 2019), Xəzər Universitetində keçirilmiş “Dünya vahid sağlamlıq gününə həsr edilmiş 3-cü simpoziumda” (Azərbaycan R., Bakı, 2019), “21 əsrdə elmin inkişafı” mövzusunda LXIII Beynəlxalq elmi konfransda iki dəfə (Ukrayna R., Xarkov, 2020), AGRO Beynəlxalq Kənd Təsərrüfatı Konfransında (Azərbaycan R., Bakı, 2022), “VI Beynəlxalq Avropa Konfransında” (Rumıniya R., Buxarest, 2022) məruzə edilmişdir.

Dissertasiyanın yerinə yetirildiyi təşkilat. Dissertasiya işi Azərbaycan Respublikası Elm və Təhsil Nazirliyinin Mikrobiologiya İnstitutunun Bioloji aktiv maddələr laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir. Dissertasiyaya aid bəzi eksperimentlər Azərbaycan Respublikası Dövlət Baytarlıq Nəzarəti Xidmətinin Baytarlıq Laboratoriyasında aparılıbdır.

Dissertasiyanın strukturu və həcmi. Dissertasiya işi girişdən, 6 fəsildən (ədəbiyyat xülasəsi - I, material və metodlar - II, eksperimental hissə - III-VI), tədqiqat nəticələrinin yekun təhlilindən, nəticələrdən, dissertasiyada istifadə edilən ədəbiyyat və ixtisarların siyahısından və əlavələrdən ibarət olmaqla 245052 işarədən ibarətdir.

FƏSİL I

BACİLLUS CİNSLİ BAKTERİYALAR VƏ ONLARIN BAKTERİOSİNLƏRİ

Dissertasiyanın 1.1-ci bölməsində Bacillus cinsli bakteriyaların *“tez və rahat çoxalması, məhsuldarlığı, təhlükəsizliyi, ətraf mühitin mənfi amillərinə davamlı olmağı kimi*

alamətləri potensial bakteriosin əlamətlərini”⁴ müəyyən edilməsi məqsədi ilə göstərilir. 1.2-ci bölməsində bakteriosin sintezi üçün seçilmiş *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 “*şammların tinktorial və kultural xassələri, koloniya morfolojiyası, ətraf mühitdə yayılması, təhlükəsizliyi və digər əlamətləri təsdiqlənmiş identifikasiya üsulları*”^{5,6} təhlil edilir. 1.3-cü hissədə *Bacillus* cinsli bakteriyaların mövcud bakteriosinlərinin kimyəvi quruluşu, sintezi, genetik əsasları və onları əhatə edən elektron Databazalar (“*BACTIBASE*”⁷, “*NucleBact*”⁸ və BAGEL) haqqında məlumat elmi işin planlaşdırılması məqsədi ilə analiz edilib.

FƏSİL II TƏDQIQATIN MATERIAL VƏ METODLARI

2.1. Bakteriosinlərinlərin sintezi üçün istifadə olunmuş bakterial şammlar

Zülal mənşəli antibakterial maddələri əldə etmək üçün prodüsent şəklində çoxsaylı bioloji aktiv maddələrin mənbəyi *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC6633 bakteriyaların şammları seçilmişdir və Azərbaycan təbiətindən, xüsusilə də, Kür çayının suyundan *Bacillus polymyxa* əldə olunmuşdur. Bakterial şammların təcrübələrə hazırlıq mərhələsində onların canlı və tədqiqata yararlı, yəni, təmiz,

⁴ Еременко, Е.И. «*Bacillus cereus*» - проблемы идентификации и таксономии // - Ставрополь: Медицинский вестник Северного Кавказа, - 2008. № 3, с. 57-59.

⁵ Чубенко, Г.И. Методы идентификации бактерий / Г.И.Чубенко. - Благовещенск: Амурская Государственная Медицинская Академия Министерства Здравоохранения России, - 2018. - 44 с.

⁶ El-mishad, M.A. Manual of practical microbiology / M.A. El-mishad. - Cairo: Cairo University, - 2015. - 149 p.16.

⁷ Hammami, R. [et al.] BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization: [Electronic resource]/BMC Microbiology.- California,-2010.

⁸ Correia, A. NucleBact - Nuclease Bacteriocin Database: [Electronic resource] / PubMLST. – London, 2018.

kontaminasiya olunmamış kulturlar olduğu öyrənilmişdir. Kolleksiya ştammlarının və Kür çayından ayrılmış yeni izolyatın hazırlığı mərhələsində morfoloji, kultural və tinkorial “*identifikasiyası Hindistanın (Kerala) ABIS data baza sisteminin tövsiyələrinə*”⁹ əsasən aparılmışdır.

2.2. Bakteriosinlərinlərin sintezi üçün istifadə edilən metodlar

Tədqiqat nəticələrinin dürüslüyü müasir standartlara uyğun olan bakterioloji, biotexnoloji (fiziki, kimyəvi) və genetik metodlarla alınmış çoxsaylı təcrübələrin nəticələri ilə təsdiqlənmişdir. *Bacillus* cinsli bakteriyaların və onlardan sintez olunmuş bakteriosinlərin digər bakteriyalara qarşı antaqonizmi müxtəlif bakterioloji üsullarla yoxlanılmışdır, “*antagonizmi öyrənmək üçün bəzi məlum üsullar modifikasiya edilmişdir*”^{10,11} və istifadə olunmuşdur. Tədqiqatın məqsədi bakteriosinlərin sənaye miqyasında istehsal olunması üçün uyğun metodikanın hazırlanması olduğuna görə təcrübələrdə də mümkün qədər sadə və əlverişli və eyni zamanda səmərəli üsullardan istifadə olunmuşdur. Bakterial kulturları steril fizioloji məhlulda həll etmək, onları qan qarışdırıcı cihazında çalxalamaq, sentrifuqada fırlatmaq və supernatantdan asetonla aktiv maddəni ayırmaq kimi biotexnoloji metodları sınaqaraq onların ən optimal variantlar axtarılmışdır. Tədqiqat çərçivəsində yeni bakteriosin sintezi məqsədi ilə suspenziyaları diri bakteriyalardan təmizləmək üçün sentrifuqada çökdürmə və supernatantın əldə edilməsi, bakterioloji filtrlərdən keçirmə və qızdırma kimi biotexnoloji fiziki üsullar müqayisə

⁹ Paenibacillus (Bacillus) polymyxa: [Electronic resource] / Advanced Online Identification Software Encyclopedia, Activity-Based Information System (ABIS). - Kerala, 2022.

¹⁰ Иркитова А.Н., Яценко, Е. С. Оптимизация метода определения антагонистической активности пробиотических бактерий // Алтай: Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания, - 2017. № 5, - с. 114-116.

¹¹ Tagg, J.R. Assay system for bacteriocins /J.R.Tagg. - Cambridge: Applied Microbiology, - 1971. 21(5), - p. 943.

olunub və, nəticədə, sentrifüqada çökdürməyə üstünlük verilib. Steril edilmiş məhlullarda proteinlərin miqdarını, konsentrasiyanı müəyyən etmək üçün onların *COBAS e400* avtomatik biokimyəvi analizatorda “*total protein*” testi aparılıb, zülal konsentrasiyası spektrofotometriya ilə ölçülmüşdür.

Məhlul şəklində əldə edilmiş yeni protein mənşəli antibakterial maddələr soyuq aseton ilə çökdürülmüşdür. Yığılmış proteinlərin hansı zülal olduğunu müəyyənləşdirmək üçün poliakrilamid gel (*PAAG*) elektroforezi köməyi ilə hər üç zülal mənşəli maddənin molekul kütləsi ölçülüb hesablanmışdır. Zülallar və molekul kütləsi 1 kDa, 2kDa, 4 kDa olan kalibratorlar (standartlar) elektro-mağnit sahədə bir istiqamətdə “mənfi”-dən “müsbətə” hərəkət edərkən, onların keçdiyi məsafə birbaşa molekul ölçüsündən (kütləsindən) və elektrik yükündən aslıdır. Kütlə və məsafə arasındakı korrelyasiya qrafikini istifadə edərək, sintez olunmuş proteinlərin molekul kütləsi ölçüldü və digər proteinlərin molekul kütləsi ilə müqayisə olundu. Nəticədə *B.cereus* ATCC 14579 *B.subtilis* və təbii *B. polymyxa* zülallının molekul kütləsinin müvafiq olaraq subtilin, subtilizin və polimiksin zülalların molekul kütləsinə bərabər olması aşkar olundu. Bu zülalların, həqiqətən də, subtilin, subtilizin və polimiksin olmağını bir daha təsdiqləmək üçün müvafiq bakterial ştammların genetik materialında, yəni, ekstraksiya edilmiş və optimallaşdırılmış genom DNT-sində antibakterial maddələrin sintezinə cavabdeh olan genlər RT-PZR polimeraza zəncirvari reaksiya adlanan molekul-genetik metodu ilə müəyyən edilmişdir. *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC6633 bakteriyaların və Kür çayının suyundan izolə edilmiş *Bacillus polymyxa* mikroorqanizminin genetik materialında, yəni, DNT-sində antibakterial maddələrin sintezinə cavabdeh olan genlərin olması RT-PZR molekulyar-genetik metodu ilə müəyyən edilmişdir.

Bütün bu üsullardan istifadə edərək, elmi iş çərçivəsində *Bacillus* cinsli bakteriyalardan zülal mənşəli antibakterial maddələr sintez edilib və onların subtilin, subtilizin və polimiksin bakteriosinlərin olması müəyyən edilmişdir.

FƏSİL III
BACİLLUS CEREUS ATCC 14579, BACİLLUS
SUBTİLİS ATCC 6633 VƏ KÜR ÇAYININ
SUYUNDAN AYRILMIŞ TƏBİİ BACİLLUS
POLYMYXA ŞTAMMLARINDA ANTİBAKTERİAL
MADDƏLƏRİN SİNTEZİ

3.1. Bakterial ştammların əsas təcrübələrə hazırlanması

Bakterial kolleksiya ştammlarını canlandırmaq və kontaminasiyanı istesna etmək məqsədi ilə onlar Qoyun Qanı aqarına və *Mac-Concey* aqarına əkilmişdir. Onların kultural xassələri və koloniya morfoloqiyası qeyd olunduqdan sonra, mikroskopiya üsulu ilə bakteriyaların morfoloji və tinktorial əlamətləri araşdırılmışdır. Növbəti mərhələdə katalaza, oksidaza, kooqulaza, *CAMP* (*ChristieAtkins-Munch-Peterson*), indol testləri keçirilib, *TSİ* (üç dəmir şəkər) aqarında karbohidrat fermentasiyası və *H₂S* ifrazı, *Motility* aqarında və qalın damcı preparatında hərəkətlik testi və bir sıra digər testlər Hindistanın ABIS databaza sisteminin tövsiyələrinə uyğun olaraq keçirilmişdir.

3.2. Bacillus cereus ATCC 14579 və Bacillus subtilis ATCC 6633 bakteriyaların produsent xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi və təhlili

Bacillus cereus ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ştammlarının optimal çoxalma temperaturu 35; 35.5; 36; 36.5... 39.5; 40°C Ətli Peptonlu və Qoyun Qanı aqarlarında kultivasiya yolu ilə müəyyən edilmişdir. Variasiya sırası adlanan statistik üsulun köməyi ilə *Bacillus cereus* ATCC 14579 ştamminin optimal kultivasiya temperaturu 36.5°C, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ştamminin isə optimal kultivasiya temperaturu 37.5°C müəyyən edilmişdir. Təsdiq edilmişdir ki, bu bakterial ştammlar ucuz və əlçatan mühitlərdə adi inkubasiya şəraitində sürətlə çoxalmaq qabiliyyətinə malikdir və ona görə də potensial produsent kimi qiymətləndirilə bilər.

3.3. *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakteriyaların antibakterial xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi

Bacillus cinsli bakteriyaların digər bakteriyalara qarşı antibakterial xüsusiyyətlərini öyrənmək üçün onlar aşağıda göstərilən Qram mənfi və Qram müsbət bakteriyalarla birlikdə yan-yanə əkilmişdir:

Qram müsbət bakteriyalar:

Staphylococcus aureus ATCC 29213,
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228,
Streptococcus pyogenes ATCC 19615,
Streptococcus agalactiae ATCC 13813,
Enterococcus faecalis ATCC 29212.

Qram mənfi bakteriyalar:

Escherichia coli ATCC 15922
Pseudomonas aerogenosa ATCC 27853
Salmonella typhimurium ATCC 14028
Proteus mirabilis ATCC 25933
Shigella flexneri ATCC 12022

Bunun üçün Qoyun Qanı Aqarında və Ətli Peptonlu Aqarda Petri kasasının alt tərəfini qələmlə 2 yarım-dairəyə bölüb bir tərəfinə *Bacillus* bakteriyası (*B.cereus* ya-da *B.subtilis*), digər tərəfinə isə digər, məsələn, “qeyri-*Bacillus*” bakteriya ştrixlənmişdir. Əkmə nəticələri təhlil edilmişdir və *Bacillus* növlü bakteriyaların digər bakteriyalarla antaqonizmi aşkar edilmişdir.

Alternativ olaraq *Tagg* və *McGiven* antaqonizmin yoxlanması metodu modifikasiya edilib tətbiq edilmişdir: *Bacillus subtilis* və *Bacillus cereus* suspenziyası aqara damcılanan yerin ətrafında öncədən bütün Petri kasasına mikroorqanizmin bitməməsi və inhibisiya zolağı müşahidə edilmişdir.

Bacillus cereus ATCC 14579 bakteriyasının *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*,

Escherichia coli müəyyən ştammlarına qarşı, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 də *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus fecalis* müəyyən ştammlarına qarşı antibakterial təsiri aşkar edilmişdir.

3.4. Kür çayın suyundan ayrılmış təbii *Bacillus polymyxa* (*Paenibacillus polymyxa*) ştamminin antibakterial xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi

Bacillus cinsli bakteriyaları izolə etmək üçün Neftçala rayonunun Bankə qəsəbəsi ərazisində (coğrafiya koordinatları 39°24'50" şm.e. 49°14'56" ş.u.) Kür qırağında biri-birindən 100 metr məsafə ilə üç su nümunəsi toplanılmışdır. Onların hərəsi bir nöqtədən, lakin 20 santimetr, 1 metr və 2 metr dərinlikdən steril şüşə qablara yığılan nümunələrin qarışığı kimi hazırlanmışdır və maqnit qarışdırıcısı vasitəsilə qarışdırılmışdır. Sonra nümunələrin (nümunə №1, nümunə №2 və nümunə №3) 1:100 steril distillə suyu ilə durulaşdırılıb, steril Paster pipetlə 0.5 ml miqdarında Beyin Ürək İnfuziyası aqarı (*Brain Heart Infusion Aqar, BHIA*), Müllər-Hinton aqarı (MHA) və *Mac-Conkey* aqarına əkilməsi keçirilmişdir. *Mac-Conkey* aqarı *Bacillus* cinsinə aid olmayan Qram mənfi bakteriyaları istesna etmək üçün seçilmişdir. 24 saat 37°C inkubasiyadan sonra Petri qablarında bitmiş koloniyalar aşkar olunmuşdur. İri tək-tük və çoxsaylı xırda koloniyalardan saf kulturlar hazırlanmışdır. *Bacillus* bakteriyalara oxşar boz, iri, yapışqan, biotəbəqə şəklində koloniyalardan yaxmalar düzəldilmiş və Qram boyama edilmişdir. Mikroskopiya zamanı qısa Qram mənfi və uzun Qram müsbət çöpvari bakteriyalar müşahidə olunmuşdur. Növbəti mərhələdə ştrixləmə üsulu ilə əkmə və inkubasiya nəticəsində Kür suyunun ikinci və üçüncü nümunələrindən *Bacillus* cinsli bakteriyaların saf kulturları əldə olunmuşdur. Birinci nümunədə yalnız bağırsağ çöpü və *Klebsiella* aşkar edilmişdir. Üç nümunənin ikisində isə (ikinci və üçüncü) biri-birinə identik *Bacillus* bakteriyaları aşkar olunmuşdur. Kür çayından ayrılmış *Bacillus* mikroorqanizmləri aqarlar (MHA, BHIA) üzərində biotəbəqə yaratmışdır. Bu ağ-bozumtul qat aqarın üstünü tam olaraq

örmüşdür. Belə xüsusiyyət, əsasən, *B.subtilis* və *B. polymyxa* ştammlarında müşahidə olunur. Ona görə əlavə differensial test kimi, duzlu mühitdə bitmə qabiliyyəti yoxlanılmışdır. Bunun üçün NaCl duzu əlavə olunmuş aqarda bitmə testi istifadə olunmuşdur. Odur ki, *B.subtilis* 4% və 6% NaCl konsentrasiyalı aqarda bitir, *B. polymyxa* bakteriyasının isə, əksinə, 2% -dən yüksək konsentrasiyada, yəni, duzlu mühitdə bitmə qabiliyyəti yoxdur. Kür suyundan izolə olunmuş ştamminin 2%-dən yüksək konsentrasiyalı duzlu aqarlarda bitməməsi onun *B. polymyxa* olmasını təsdiqləmişdir.

Bacillus polymyxa Kür ştamminin bəzi Qram müsbət və Qram mənfi bakteriyalarına təsiri *B.cereus* və *B. subtilis* kolleksiya ştammlarının antaqonizminə analogi olaraq öyrənilmişdir. Təcrübələr nəticəsində Kür ştamminin *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginos*-a qarşı mənfi təsiri aşkar edilmişdir.

Bakteriosinlərin ifrazını aktivləşdirən ekstremal, qida məhsulları məhdud olan şəraitə salmaq üçün *Bacillus* cinsli bakteriyalar 3 gün ərzində Qoyun Qanı Aqarında kultivasiya edilib və sonra mikroskopiya olunub. 24 saat 37°C inkubasiyadan sonra “gənc” və 72 saat 37°C “qoca” kulturlardan hazırlanan yaxmalar Qram və Metilen göy üsulları ilə boyanıb. Mikroskopiya nəticələri müqayisə olunub. Qida məhsullarının məhdudlaşması fonunda hər iki bakteriyanın morfoloji əlamətlər dəyişməlidir: formasında, düzülüşündə, spor əmələ gətirməsində dəyişikliklər müşahidə olunmuşdur. *Bacillus* hüceyrələrinin “qocalması” fenomeni aşkar olunmuşdur. Uzun müddətli inkubasiya zamanı həm adaptasiya, həm də destruksiya prosesləri bakteriyalar tərəfindən özünü qorumaq üçün müəyyən maddələrin ifraz edilməsi ilə nəticələnir. Ona görə proteinlərin sintezi üçün üç günlük kulturlar istifadə olunmuşdur. Bioloji aktiv maddələri ayırmaq üçün *Bacillus* cinsli bakteriyaların hərəsi 10 ml-lik Falkon tipli sınaq borusunda 5 ml fizioloji məhlula yığılmışdır. Bakterial suspenziyaları McFarland standartı üzrə optik sıxlığı 3.0 göstəriciyə qədər tənzimlənmişdir və adi qan qarışdırıcı cihazında otaq temperaturunda 22°C yelləndirmək üçün yerləşdirilmişdir. Bioloji aktiv maddələri bakterial hüceyrələrin

üzərindən yuyub aparmaq məqsədi ilə nümunələr qan qarışdırıcı cihazında dəqiqədə 36 hərəkət sürəti ilə 18 saat ərzində çalxalanmışdır. Sonra, bioloji aktiv maddələri məhluldan ekstraksiya etməkdən əvvəl, bakterial suspenziyaların diri bakteriyalardan təmizlənməsi üçün üç biotexnoloji metod yoxlanılmışdır: pasterizasiya rejimində isitmə, sentrifuçada çökdürmə və bakterial filtdən keçirmə. Nəticədə sentrifuçada 2300 RPM sürətdə bir saat ərzində otaq temperaturunda fırlatma ilə bakteriyaların çökdürülməsi üsulu ən səmərəli olduğuna görə seçilmişdir. Məhlulların mikroblardan tam təmizlənməsi, yəni, steril olması, Qoyun Qanı Aqarına əkmə edərəkən heç bir koloniyanın bitməməsi ilə təsdiqlənmişdir. Hazır məhlullarda protein konsentrasiyası *Cobas e-411* biokimyəvi analizatorda müəyyən edilmişdir. Protein mənsəli bioloji aktiv maddələr aseton ilə məhlullardan çökdürülüb, -20°C (-4°F) temperaturda dondurucuya saxlamaq üçün yerləşdirilmişdir.

FƏSİL IV

BACİLLUS CEREUS ATCC 14579, BACİLLUS SUBTİLİS ATCC 6633 VƏ TƏBİİ BACİLLUS POLYMYXA BAKTERİYALARINDAN SİNTEZ EDİLMİŞ BAKTERİOSİNLƏRİN KİMYƏVİ TƏMİZLİYİNİN, KONSENTRASIYASININ VƏ MOLEKUL KÜTLƏSİNİN TƏDQIQI

4.1. Bacillus ştammlarından əldə olunmuş proteinlərin çökdürülməsi

Bioloji aktiv maddələrin aktivliyi birbaşa onların kimyəvi təmizliyi ilə bağlıdır. Ona görə *Bacillus* ştammlarından alınan təmiz zülalları əldə etmək üçün ən effektiv biotexnoloji üsul, yəni, çökdürmə seçilmişdir. Məhlullara -5°C (23°F) temperaturda aseton əlavə olunmuşdur. Sınaq boruları -5°C (23°F) dondurucuya yerləşdirilmişdir və hər 5 dəqiqədən yoxlanılmışdır. 10 dəqiqədən sonra *B.cereus* ATCC 14579 məhlulda çökmə prosesi başlayıb, 16 dəqiqə ərzində tam bitmişdir. 8 dəqiqədən sonra isə *B.subtilis* 6633

məhlulda çökmə prosesi başlayıb, 13 dəqiqə ərzində tam bitmişdir.

4.2. Sintez olunmuş zülal məhsulların təmizliyinin Eppendorf Biospectrometer cihazında spektrofotometriya üsulu ilə müəyyən edilməsi

Qidalı mühitlərinin əsas tərkib hissəsi olan aqar-aqarın tərkibində aqaroza, aqaropektin, D- və L-qalaktozalar və pentoza mövcuddur. Sintez olunmuş zülal məhsulların bu karbohidratlardan təmizliyi *Eppendorf Biospectrometer* cihazında spektrofotometriya üsulu ilə müəyyən edilmişdir. *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* 6633 şammlardan təcrid olunmuş zülalların saflığını təyin etmək üçün 260/280 nisbəti istifadə olunub. *Bacillus cereus* ATCC 14579 proteinin təmizliyi 0.56, *Bacillus subtilis* 6633 proteinin təmizliyi 0.58 müəyyən edilmişdir. Belə təcrübələr üçün optimal 260/280 (karbohidrat/protein) nisbəti 0,6 sayıldığına görə proteinlərin təmizliyi 0.56 və 0.58 məqsədə uyğun kimi qiymətləndirilmişdir.

4.3. Bacillus cereus ATCC 14579 və Bacillus subtilis 6633 şammlarından alınan zülalların konsentrasiyasının NanoPhotometr cihazında spektrofotometriyası.

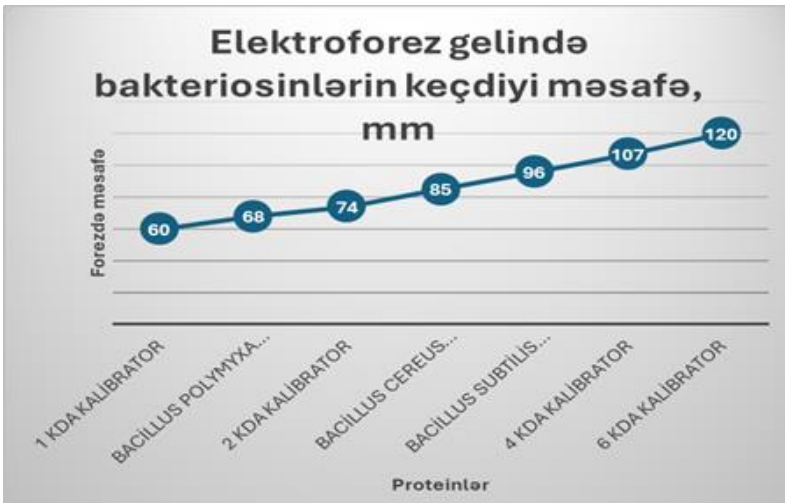
Bacillus cereus ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 şammlarından təcrid olunmuş zülalların konsentrasiyası *NanoPhotometr* cihazında spektrofotometriya üsulu ilə təyin olunmuşdur. Bu təcrübədə proteinlər 280 nm uzunluğu olan dalğada ölçülmüşdür. *Bacillus cereus* ATCC 14579 alınan bakteriosin zülalının konsentrasiyası 1359 nq/mkl, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 alınan bakteriosin zülalının konsentrasiyası 1417 nq/mkl-dir.

4.4. Bacillus cereus ATCC 14579 və Bacillus subtilis ATCC 6633 şammları əsasında sintez edilmiş bakteriosinlərin molekul kütləsinin ölçülməsi

Bacillus polymyxa şammından alınmış protein konsentrasiyası 1547 nq/mkl bərabər olmuşdur (*Bacillus cereus* ATCC 14579 -1357

nq/mkl və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - 1417 nq/mkl), yəni, təbii ştam özünü kolleksiya ştamlarından bir qədər aktiv prodüsent kimi göstərmişdir. Sintez edilmiş zülal mənşəli bakteriosinlərin molekulyar kütləsi vertical elektroforezde ölçülmüşdür. Məlum olan zülalların (kalibratorların) molekulyar çəkisi və gəldə hərəkət etdiyi məsafə ilə qrafik hazırlanıb, naməlum olan zülalların molekulyar çəkisi qrafikdə müəyyən edilmişdir. Molekulyar kütləsi və elektrik sahədə zülalların keçdiyi məsafə arasındakı loqarifmik korrelyasiya qrafikdə (Qrafik 4.1) və cədvəldə (Cədvəl 4.1) öz əksini tapmışdır. Hesablamaları aparmaq üçün 1, 2, 4 və 6 kDa molekulyar kütləsi olan protein standartları tətbiq olunmuşdur. Qrafikə əsaslanaraq, *Bacillus cereus* ştamından əldə olunan zülalın (BC) molekulyar kütləsi 3.6 kDa, *Bacillus subtilis*-dən (BS) 26 kDa, *Bacillus polymyxa*-dan 1,6 kDa təşkil etmişdir.

Məlumdur ki, subtilinin molekulyar kütləsi, təxminən, 3.6 kDa, subtilizinin molekulyar kütləsi 26-27 kDa, polimiksinin molekulyar kütləsi isə 1.4-1.6 kDa bərabərdir və sintez edilmiş zülalların subtilin, subtilizin və polimiksin olması ehtimal edilmişdir. Yuxarıdakı təcrübələr göstərmişdir ki, Azərbaycan təbiətindən, xüsusilə də, təbii *Bacillus polymyxa* məhsuldar və səmərəli prodüsentdir.



Qrafik 4.1. Yeni bakteriosinlərin molekulyar kütləsinin müəyyən edilməsi

Elektroforez gelində proteinlərin keçdiyi məsafə

Bakteriosinlər və kalibratorlar	Elektroforez bakteriosinlərin məsafə, mm	gelində keçdiyi
1 kDa kalibrator	60	
2 kDa kalibrator	74	
<i>Bacillus cereus</i> bakteriosini	85	
<i>Bacillus subtilis</i> bakteriosini (1:10 durulaşdırılıb)	96	
<i>Bacillus polymyxa</i> bakteriosini	68	
4 kDa kalibrator	107	
6 kDa kalibrator	120	

4.5 Kür suyundan ayrılmış təbii *Bacillus polymyxa* ştammindən əldə edilmiş bakteriosinin konsentrasiyasının və təmizliyinin spektrofotometrə ölçülməsi

Kür suyundan ayrılmış təbii *Bacillus polymyxa* ştammindən əldə edilmiş bakteriosinin konsentrasiyasının və təmizliyinin spektrofotometrə ölçülməsi kolleksiya ştammlarının bakteriosinlərində keçirilmiş təcrübələrə analogi olaraq aparılmışdır. Kür suyundan ayrılmış təbii *B. polymyxa* ştammindən əldə olunmuş bakteriosinin konsentrasiyası 1547 nq/ml, kimyəvi təmizliyi 0.59 müəyyən edilmişdir. Yuxarıda göstərilən təcrübələr göstərmişdir ki, Azərbaycan təbiətindən, Kür çayının suyundan izolə olunmuş *B. polymyxa* bakteriyası məhsuldar və səmərəli produsentdir. Adətən, *Bacillus* cinsli bakteriyalar torpaqdan izolə olunur, lakin Kür suyu bulanıq, lilli və faktiki olaraq torpaqla qarışıq bir substratdır, və onun dibindəki mikroorqanizmlər Kürün suyunda da aşkar olunur. Bununla əlaqədar olaraq Kür suyundan *Bacillus* cinsli bakteriyaları, xüsusilə də, *B. polymyxa* izolə etmək asan və rahatdır. Onun çoxsaylı antibakterial maddələri ifraz etmə qabiliyyəti və onun göstəricisi olan bakteriosinin konsentrasiyası kolleksiya ştammlarının eyni konsentrasiyasına, demək olar ki, bərabərdir. Beləliklə, təcrübələr

zamanı aşkar olundu ki, *B. polymyxa*-nın tədqiq edilmiş produsent xassələri kolleksiya ştammlarının produsent xassələri ilə eynidir.

FƏSİL V
BACİLLUS CEREUS ATCC 14579, BACİLLUS SUBTİLİS
ATCC 6633 VƏ KÜR SUYUNDAN AYRILMIŞ BACİLLUS
POLYMYXA ŞTAMMLARNDAN SİNTEZ EDİLMİŞ
BAKTERİOSİNLƏRİN ANTİBAKTERİAL
XÜSUSİYYƏTLƏRİNİN TƏDQIQI

Tədqiqat çərçivəsində *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 bakterial ştammlardan zülal mənşəli maddələr əldə olunmuşdur. Onların antibakterial xüsusiyyətlərini araşdırmaq üçün təcrübələr iki istiqamətdə aparılmışdır:

1. Əkmədən sonra qidalı mühitlərin üstünə yeni bakteriosin damcı şəklində əlavə olunmuşdur və bu mühitlərdə Qram müsbət və Qram mənfi bakteriyaların bitməsi müşahidə olunmuşdur.

2. Tagg²⁴ və McGiven üsulu ilə Petri qablarında aqar guman edilən bakteriosinin məhlulu ilə isladılmışdır. Məhlul aqara çəkildəndən sonra, aqarın üzərinə və, mənfi kontrol üçün, təmiz aqara, beş Qram mənfi və beş Qram müsbət bakteriya əkilmişdir. Qrafikdən aydın görünür ki, yeni bakteriosinlər *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pyogenes*, *E. fecalis* və *E. coli* bakteriyaların inkişafını əhəmiyyətli dərəcədə ləngidir. Bu bakteriostatik effekt növbəti diaqramda və cədvəldə öz əksini tapmışdır. (Şəkil 5.1) (Cədvəl 5.1)

Adətən, antibakterial maddənin bakteriostatik effektini müəyyən etmək üçün iki göstərici Minimal İnhibirləyici Konsentrasiya göstəriciləri MIC₉₀ və ya MIC₅₀ təyin edilir. Bu təcrübələrdə bakteriosinlərin konsentrasiyaları məlumdur. İnhibirləndirilmiş koloniyaların sayı təmiz aqarda və bakteriosin əlavə edilmiş aqarda koloniyaların sayının fərginə bərabərdir. 50% koloniyaların inhibirləndirilməsi hesablama yolu ilə təyin edilmişdir.



Şəkil 5.1. Bakteriosinlərin bəzi bakteriyaların bitməsinə bakteriostatik təsiri

Bakteriosinlərin Minimal İnhibirleyici Konsentrasiyası MİK50 mütnasib cəbr üsulu ilə hesablanmışdır. Məsələn, təmiz aqarda 99 ədəd *St. aureus* koloniyası bitmişdir. 99 ədəd koloniyaların 50% 45.5 koloniyaya bərabərdir. 1357 nq/mkl konsentrasida *Bacillus cereus*-dan əldə olunmuş bakteriosin 32 koloniya bitmişdir, 67 koloniya isə bitməmişdir. Proporsiyanı qururuq:

1357 nq/mkl konsentrasiya - 67, yəni 99 çıx 32 koloniyayı inhibirleyir
 X nq/mkl MİK50 - 45.5 koloniyayı, yəni 99 koloniyanın 50% inhibirleyir.

$$X = 1357 \times 45.5 / 67 = 921.5 \text{ nq/mkl}$$

Yəni, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ştamına görə *Bacillus cereus* ATCC 14579 - dan əldə olunmuş bakteriosinin MİK50 göstəricisi 921.5 nq/mkl bərabərdir. Analoji olaraq digər hər üç bakteriosinin MİK50 göstəricisi hesablanmışdır (Cədvəl 5.2).

Cədvəl 5.1

Qram müsbət və Qram mənfi bakteriyaların yeni bakteriosinlərin bakteriostatik effekti

№	Bakteriyaların adı	Təmiz aqarda bitmiş koloniyaların sayı	Bakteriosin əlavə olunmuş aqarda bitmiş koloniyaların sayı		
			B.cereus ATCC 14579 nq/mkl zülalı	B. subtilis ATCC 6633 1417 nq/mkl zülalı	B.polym yxa 1547 nq/mkl zülalı
1	St.aureus ATCC 29213	99	32	38	91
2	St.epidermidis ATCC 12228	145	48	45	99
3	Str.pyogenes ATCC 19615	107	43	39	103
4	Str.agalactiae ATCC 13813	112	110	115	107
5	E.fecalis ATCC 29212	156	159	49	126
6	E.coli ATCC 15922	185	85	79	26
7	Ps.aerugenosa ATCC 27853	87	89	126	15
8	S.typhimurium ATCC 14028	103	107	109	34
9	P.mirabilis ATCC 25933	187	197	169	56
10	Sh.flexneri ATCC 12022	158	147	169	38

Yeni bakteriosinərin MIC₅₀

№	Bakteriyaların adı	Təmiz aqarda bitmiş koloniyaların sayı	MIC ₅₀		
			B.cereus ATCC 14579 1357 nq/mkl zülalı	B. subtilis ATCC 6633 1417 nq/mkl zülalı	B.polym yxa 1547 nq/mkl zülalı
1	St.aureus ATCC 29213	99	901	1033	yox
2	St.epidermidis ATCC 12228	145	1014	1027	2438
3	Str.pyogenes ATCC 19615	107	1134	1115	yox
4	Str.agalactiae ATCC 13813	112	yox	yox	yox
5	E.fecalis ATCC 29212	156	yox	1032	4022
6	E.coli ATCC 15922	185	1255	1236	900
7	Ps.aerugenosa ATCC 27853	87	yox	yox	934
8	S.typhimurium ATCC 14028	103	yox	yox	804
9	P.mirabilis ATCC 25933	187	yox	yox	1104
10	Sh.flexneri ATCC 12022	158	yox	yox	1018

FƏSİL VI
BACILLUS CEREUS ATCC 14579, BACILLUS SUBTILIS
ATCC 6633 VƏ TƏBİİ BACİLLUS POLYMYXA
ŞTAMMLARININ GENETİK MÜAYİNƏSİ

6.1. Yeni zülal mənşəli antibakterial maddələrin identifikasiyası.

Bacillus cereus ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 və təbii *Bacillus poymyxa* ştammlarının genetik müayinəsi çərçivəsində subtilin, subtilizin və polimiksin təbii antibiotiklərin genetik əsasları araşdırılmışdır. Məhz bu biosinlərin seçilməsi onların sintez edilmiş biosinlərlə eyni molekul kütləsinə malik olması ilə bağlıdır. Növbəti təcrübələrdə PZR metodundan istifadə edilmişdir.

6.2. Bacillus izolyatlarının DNT ekstraksiyası, optimallaşdırılması və DNT-nin ölçülməsi.

Bacillus cereus ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 izolyatlarından DNT ekstraksiyası edilib, ölçülüb və tərkibində subtilin və subtilizin zülallarının genetik əsasları, yəni, *sboA* and *spaS* genlərin mövcud olması PZR üsulu ilə yoxlanılmışdır. Nümunələrin konsentrasiyası 130 və 118 nq/ml olduğundan, hər ikisi həll olunub konsentrasiyası optimallaşdırıldı və təkrar ölçüldü. Spektrofotometrlə təkrar ölçülmə zamanı *Bacillus cereus* ATCC 14579 kulturunun DNT-si 36 nq/ml və təmizliyi A260/A280 1.7 bərabər olmuşdur. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nümunəsində isə DNT-nin miqdarı 41 nq/ml (optimal konsentrasiya 20-60 nq/ml) və təmizliyi A260/A280 1.8 (optimal təmizlik < 2) göstərmişdir.

6.3. Bacillus cereus ATCC 14579, Bacillus subtilis ATCC 6633 və Kür çayından ayrılmış Bacillus polomyxa DNT-si nümunələrində PZR analizi ilə bakteriosin genlərinin təyini.

Bakteriyaların DNT-si ekstraksiya olunandan sonra PZR reagentləri hazırlanmışdır. Subtilin və subtilizin sintezinə cavabdeh

olan sboA and spaS genləri üçün xüsusi praymerlər istifadə edilmişdir.

Bacillus subtilis bakteriyalarına məxsus olan Subtilizin geni təyin etmək üçün irəli və geri praymerlər:

İrəli praymer:

sboA-f (5'-CATCCTCGATCACAGACTTCACATG-3')

Geri praymer:

sboA-r (5'-CGCGCAAGTAGTCGATTTCTAACAC-3')

Bacillus subtilis bakteriyalarına məxsus olan Subtilin geni təyin etmək üçün praymerlər:

İrəli praymer:

spaS-f (5'-TGTCATGGTTACAGCGGTATCGGTC-3')

Geri praymer:

spaS-r (5'-AGTGCAAGGAGTCAGAGCAAGGTGA-3')

Reaksiyanı aparmaq üçün İnvitrogen reagentləri seçilmişdir. Polimeraza zəncirvari reaksiyası Biorad CFX-96 PZR cihazında qoyulmuşdur. Tədqiqat zamanı sboA və spaS genlərinin təyini eyni reaksiyada keçirilmişdir.

Biorad cihazının termosiklərinə amplifikasiyanın proqramı daxil edilmişdir.

1. Termosiklərin qızması 15 dəqiqə 95°C.
2. Denaturasiya 5 saniyə 95°C.
3. Annilinq 20 saniyə 60 °C.
4. Elonqasiya 15 saniyə 72 °C.
5. 3-cü addımdan başlayaraq 5 dövr təkrar.
6. Denaturasiya 5 saniyə 95°C.
7. Annilinq 20 saniyə 60 °C.
8. DNT kopyaların sayılması – Reading.
9. Elonqasiya 15 saniyə 72 °C.
10. 7-ci addımdan başlayaraq 40 dövr.

Bacillus subtilis ATCC 6633 və *Bacillus cereus* ATCC 14579 ştammlarının DNT-sini Real-Time Polimeraza Zəncirvari Reaksiyasının məqsədi tərkibində bu bakteriosin genlərinin olmasını

müəyyən etmək idi. Genetik müayinənin nəticələri göstərdi ki, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ştammində subtilin bakteriosinin genetik əsasları, yəni, *spaS* geni mövcuddur (22.23 dövr), *Bacillus cereus* ATCC 14579 DNT-sində isə subtilizin geni *sboA* aşkar olunmuşdur (13.99 dövr). PZR testinin düzgün getməsi müsbət nəzarətin *spaS* üzrə 12.89 dövrdə, *sboA* üzrə isə 14.88 dövrdə müsbət nəticə göstərməsi ilə təsdiqlənmişdir.

Bacillus polymyxa bakteriyasının ən geniş istifadə olunan biosini polimiksindir. Kür çayıdan ayrılmış *Bacillus polymyxa* bakteriyasının DNT-sində bakteriosinin sintezinə cavabdeh gen klasteri 5 gəndən ibarətdir: *pmxA*, *pmxB*, *pmxC*, *pmxD* və *pmxE*. Bunlardan *pmx C* və *pmxD* genləri həmçinin bu zülalın nəqlində iştirak edir, 3 gen isə, yəni, *pmxA*, *pmxB* və *pmxE* polimiksin sintezini kodlaşdırır. Xüsusilə də, *pmxE* geni bu prosesdə ən mühüm rol oynayır. Bununla əlaqədar olaraq *Bacillus polymyxa*-nın genom DNT-sində bu genin təyin edilməsi məqsədi ilə müvafiq PZR keçirilmişdir.

Polimiksinin genini təyin etmək üçün istifadə edilmiş praymerlər:

İrəli praymer:

PmxEckF

5'-

GCATTCAATAACAAAGATTATGCCGTTTGGCAGCATTCCCG
AAGCTTACGGGCAGATGCTCCAGCCGCAGAATCATGTTTGA
CAGCTTATCATCG-3'

Geri paymer:

PmxEckR

5'-

GCAGCACGTCCATGGAAAGGCCGTCGGAACCAATATGATG
AATATCCAGCGGAGCAGAAATTTCTCTTTCCACGCCGAAA
CAAGCGCTC-3'

Birinci PZR reaksiyasına analogi olaraq bu praymerləri istifadə edərək Biorad CFX-97 cihazında Real-Time PZR reaksiyası qoyulmuşdur və *Bacillus polymyxa*-nın DNT-sində polimiksinin *pmxE* geni aşkar edilmişdir. Genetik müayinənin nəticələri göstərdi ki,

Bacillus polymyxa ştamında polimiksin bakteriosinin genetik əsasları, yəni, *pmxE* geni mövcuddur (“threshold” ilə kəsişmə” 25,82 dövr).

Yuxarıda göstərilən genetik təcrübələr və molekul kütlənin ölçülməsi göstərdi ki, *Bacillus cereus* ATCC 14579 ştamından subtilin, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ştamından subtilizin, təbii *Bacillus polymyxa* ştamından polimiksin protein mənşəli antibakterial maddələr sintez edilmişdir. “Biorad” CFX-96 cihazında bakteriosin sintezinə cavabdeh genlərin təyini məqsədilə aparılan polimeraza zəncirvari reaksiyaların cihazın hesabatları (orijinal protokolları) və kəmiyyət nəticələri təhlil edilmişdir.

TƏDQIQATIN YEKUN TƏHLİLİ

Antibiotiklərin törətdiyi mikrob rezistentliyinə, bir sıra çatışmazlıqlarına görə yeni keyfiyyətli dərman vasitələrinin axtarılmasına ehtiyac yaranmışdır. Bu baxımdan da təbii bioloji mənşəli antibakterial maddələr, yəni, bakteriosinlər alimlərin xüsusi diqqət mərkəzinə çevrilmişdir. Əlavə olaraq bakteriosinlərin müxtəlif sahələrdə tətbiqi elmin bu istiqamətində tədqiqatlarını daha perspektivli edir. Tibb, baytarlıq, kənd təsərrüfatı, qida sənayesi, əkinçilik, bağbançılıq və digər sahələr üçün yeni bakteriosin istehsal edən ştamların aşkar edilməsi çox vacib bir məsələdir. Bakteriosinlərin xüsusiyyətlərinin öyrənilməsi, produsent bakteriyaları üçün bakterioloji mühitlərin seçilməsi, optimal şəraitin müəyyənləşdirilməsi və sintez üsullarının sənaye şəraitinə uyğunlaşdırılması müasir biotexnologiya üçün olduqca vacibdir. Ümumiyyətlə, elm aləmində yeni bakteriosinləri əldə etmək üçün müxtəlif üsullar yoxlanılmışdır və müvəffəqiyyətlə həyata keçirilmişdir. Laboratoriyada dörd il ərzində aparılan tədqiqatlar zamanı laborator praktika və elmi-tədqiqat işləri üçün faydalı metodikaların yeni variantları təklif edilmişdir. Məsələn, bu vaxta qədər *Bacillus* cinsli bakteriyaların əsasında yüzdən çox müxtəlif antibakterial maddə hazırlanıb istifadəyə verilmişdir. Lakin bu maddələrin əksəriyyəti yalnız nəzəri olaraq mövcuddur. Praktiki olaraq onların sintezi mürəkkəbdir və tətbiq etmək üçün ciddi maliyyə və xüsusi şərait tələb edir. Bütün bunları nəzərə alaraq tədqiqat zamanı

daha uyğun, daha səmərəli və rahat üsulları seçib tapmaq vəzifəsi yerinə yetirilmişdir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14579 və təbii *Bacillus polymyxa* mikrobların elmi ədəbiyyatda bu vaxta qədər qeyd olunmayan əlavə antibakterial xassələri aşkar olunmuşdur. Bu elmi işdə təsvir olunmuş təcrübələr sənaye miqyasında müxtəlif bakteriosinlərin kütləvi şəkildə istehsalı üçün tətbiq edilə bilər. Təsvir olunmuş eksperimentlər nəinki basillərdən, hətta digər bakteriyaların suspenziyalarından bioloji aktiv maddələri ekstraksiya etmək üçün kömək edə bilər.

Elmi işin çərçivəsində keçirilmiş ətraflı nəzəri araşdırmalar və laborator təcrübələr zamanı tədqiqat qarşısında qoyulan tapşırıqlara uyğun olaraq biotexnologiya elminin biliklərini artıran və gələcəkdə tətbiq oluna bilən əsas nəticələr əldə olunmuşdur.

NƏTİCƏLƏR

1. Seçilmiş *Bacillus* cinsli şammların produsent xassələri və antibakterial xüsusiyyətləri tədqiq olunmuşdur. Aşkar olunmuşdur ki, *Bacillus cereus* ATCC 14579 bakteriyası *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* və *Escherichia coli* bakteriyalarına qarşı bakteriostatik təsir göstərir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mikroorqanizmi *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* bakteriyalarına bakteriostatik təsir göstərir. Kür çayından ayrılmış təbii *Bacillus polymyxa* ştammi *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* və *Staphylococcus epidermidis* qarşı bakteriostatik təsir göstərir [1,2, 4, 6, 10].

2. *Bacillus* cinsli bakteriyalardan (*Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kolleksiya şammlardan və Kür çayından ayrılmış təbii *Bacillus polymyxa* ştammindən) zülal mənşəli antibakterial maddələr (subtilin, subtilizin və polimiksin) sintez edilmişdir [7, 9, 11, 14].

3. Seçilmiş *Bacillus* cinsli şammlarından sintez edilmiş bakteriosinlərin kimyəvi təmizliyi, konsentrasiyası, molekül kütləsi ölçülüb, antibakterial xassələri müəyyən edilmişdir [14, 17].

4. *Bacillus cereus* ATCC 14579 və *Bacillus subtilis* ATCC 6633

kolleksiya şammların və Kür çayından ayrılmış təbii *Bacillus polymyxa* şammının genetik materialında subtilin, subtilizin və polimiksin bakteriosinlərinin genetik əsasları təsdiqlənmişdir: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 şammında subtilin spaS geni, *Bacillus cereus* ATCC 14579 DNT-sində isə subtilizin sboA geni, *Bacillus polymyxa* DNT-sində pmxE geni aşkar olunmuşdur[3].

5. Tədqiqatın vəzifələrindən əlavə olaraq *Bacillus subtilis* ATCC 6633 və *Bacillus cereus* ATCC 14579 bakteriyaların üç gün ərzində “qocalma” prosesi aşkar olunmuşdur, bununla bağlı onların morfolojiyasında və yerləşməsində dəyişikliklər təsvir edilmişdir[11].

DİSSERTASIYANIN MÖVZUSUNA AİD DƏRC EDİLƏN ƏSƏRLƏRİN SİYAHISI

1. Tağhiyeva, S.A. Obtaining of new antibacterial substances from bacteria *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* // - Bakı: Transactions of scientific-research institute of medical prophylaxis named after V.Y. Akhundov of Ministry of public health of Azerbaijan Republic, – 2019. Volume XXII, - p.192-197.
2. Tağhiyeva, S.A. Müasir təbabətdə bioloji mənşəli antibakterial maddələrin əhəmiyyəti // - Bakı: Azərbaycan Respublikası Səhiyyə Nazirliyinin V.İ.Axundov adına Elmi-tədqiqat tibb profilaktika institutunun elmi əsərləri, - 2019. Cild 12, - s.185-191.
3. Тагиева, С.А. Оптимизация процесса экстракции ДНК из различного биологического материала // - Баку: Известия Азербайджанского Государственного педагогического университета, - 2019. №3, - с. 160-169.
4. Тагиева, С.А. Новый Серия Математика и естественные подход к получению бактериоцинов на основе бактерий рода *Bacillus* // Известия педагогического университета, Серия Математика и естественные науки, - 2019. №4, - с.162-168.
5. Тагиева, С.А. Роль бактерий *Bacillus cereus* в развитии

- заболеваний у сельскохозяйственных животных // Материалы международной научно-практической конференции «Применение инноваций в области развития ветеринарной науки», - Баку: - 25 октября, 2019. - с.152-155.
6. Taghiyeva, S.A. Determination of antibacterial properties of the *Bacillus cereus* ATCC 14579 strain for application in synthesis of bacteriocins by new methods // - Baku: Khazar Journal of Science and Technology (KJSAT), - 2020. Volume 3 № 2, - p. 14-20.
 7. Taghiyeva, S.A. Trials for syntheses of bacteriocins from the bacteria genus *Bacillus* / S. A. Tagiyeva, Gahramanova F.K. // Baku: Khazar Journal of Science and Technology (KJSAT), Baku: - 2019. Volume 4
 8. Tağıyeva, S.A. Azərbaycanın aqrar sektorunda bitki bakteriozları ilə mübarizədə yeni bakteriosinlərin istifadəsinin əhəmiyyəti // Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Naxçıvan bölməsi Elmi əsərlər. Təbiət və texniki elmlər seriyası, - 2019. C. 15, №4, - s.192-198.
 9. Taghiyeva, S.A. Obtaining of bacteriocins from bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain // - Tbilisi-New-York: Georgian medical news, - 2020. №5 (302), - p. 178-182.
 10. Taghiyeva, S.A. Advantages and disadvantages of “pulling” of the laboratory samples // LXIII International Conference "Development of Science in the XXI Century", - Kharkov: - August 14, 2020, - p.5-8
 11. Тагиева, С.А. Изменение морфологических свойств бактерий рода *Bacillus* в ходе инкубации // LXIII Международная конференция «Развитие науки в XXI веке», - Харьков: - 14 августа, 2020, - с. 9-13
 12. Тагиева, С.Т. Преимущества применения бактериоцинных препаратов по сравнению с химическими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных (Обзор) / С.А, Тагиева, Ф.Х. Гахраманова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация, Воронеж. - 2020. №4, - с. 122-127
 13. Таğıyeva, S.Ə. Təsərrüfat balıqlarında infeksiyon xəstəliklərin

- Bacillus cinsli bakteriyalar tərkibli probiotiklərlə müalicəsi və profilaktikasi // AGRO International Conference on Agriculture. Bakı-Ege: June 04-06, - 2022, s. 422-425.
14. Taghiyeva, S.A. Trials for synthesis of bacteriocins from the bacteria genus Bacillus in Azerbaijan // VI-International European conference on interdisciplinary scientific research. Bucharest: - August 26-27, - 2022, - p. 148-149.
 15. Taghiyeva, S., Gahramanova F. Biotechnological bases for synthesis of protein-linked antibiotics from the Bacillus bacteria // The 5th International Symposium and International School for young scientists on “Physics, Engineering and Technologies for BioMedicine” – Moscow: - November 21-25, - 2020, - p.152-154.
 16. Тагиева, С. А. Опыт использования бактериоционных препаратов в рыбоводстве Азербайджана: [Электронный ресурс] / Sfera FM. – Санкт-Петербург, 2023.
 17. Taghiyeva S.T. Kür çayı suyundan təcrüd olunmuş Bacillus polymuxa bakteriayası əsasında bakteriosin sintezi // Azərbaycan Dövlət Pedaqoji Universitetin Xəbərləri, Riyaziyyat və təbiət elmləri seriyası, -Bakı: - 2023. C. 71, № 2, - s. 133-140.

Dissertasiyanın müdafiəsi _____2025-ci il tarixində saat_____ARETN-nın Mikrobiologiya İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən BFD 1.07/1 Dissertasiya şurasının iclasında keçiriləcəkdir.

Ünvan: Az1004, Bakı ş., A.Abbaszadə 115.

Dissertasiya ilə ARETN-nın Mikrobiologiya İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq mümkündür.

Dissertasiya və avtoreferatın elektron versiyaları AR ETN-nin Mikrobiologiya İnstitutunun rəsmi internet saytında (<https://azmbi.az/index.php/az/>).yerləşdirilmişdir.

Avtoreferat "_____"202_ il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa imzalanıb: 12.12.2024

Kağızın formatı: A5

Həcm: 37351

Tiraj: 100