

BAKTERİYEL BİYOLÜMİNESANS ve UYGULAMA ALANLARI

BACTERIAL BIOLUMINESCENCE and ITS APPLICATIONS

Serap COŞANSU, Kamuran AYHAN

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı, 06110, Ankara

ÖZET: Mikroorganizmaların aranması ve sayımında kullanılan klasik yöntemlerin karmaşık ve zaman alıcı olması nedeniyle, araştırmalar bunların yerine kullanılacak hızlı yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır. ATP-biyolüminesans teknikler pek çok üründe bakteriyel popülasyonun hızlı sayımına olanak sağlamakla birlikte spesifiktikten yoksundurlar. Diğer yandan, gıda kaynaklı patojenler ile ilgili endişeler nedeniyle spesifik hızlı arama sistemlerine ihtiyaç duyulmuş ve moleküler genetikteki gelişmelerin yardımıyla belirli türlere özgü arama sistemleri geliştirilmiştir. Son on yılda, luminus bakterilerin veya lux geni taşıyan rekombinant mikroorganizmaların kullandığı biyolüminesans yöntemler patojenlerin ve indikatör mikroorganizmaların aranması yanında pek çok analitik uygulamalarda da kullanılır hale getirilmiştir.

ABSTRACT: Because the traditional methods are complex and time-wasting, researches have been focused on rapid methods to be used instead of them. ATP-bioluminescence techniques can be used for rapid enumeration of bacterial population in many product, however, they are lack of specificity. On the other hand, rapid specific methods have been needed due to the worries about food-borne pathogens and specific detection methods have been developed by aiding of developments on molecular genetics. Last decade, bioluminescence methods using luminous bacteria or recombinant microorganisms carrying lux gene can be used many analytical applications besides detection of food-borne pathogens and indicator microorganisms.

GİRİŞ

Gıda mikrobiyolojisinde önem taşıyan bozulmaya neden olan mikroorganizmalarla, patojen ve indikatör mikroorganizmaların en kısa zamanda, basit ve ucuz yöntemlerle saptanması hem işletmede maliyetin düşürülmesi ve daha fazla üretim anlamına gelmekte hem de kalite kontrole harcanan zamanı ve emeği azaltmaktadır (TURANTAŞ 1996). Mikroorganizmaların aranmasında ve sayımında kullanılan geleneksel metotlar karmaşık olup beceri gerektirmekte ve çok zaman almaktadır (TANATAKA et al 1997). Bu amaçla klasik yöntemler yerine kullanılacak hızlı yöntemler araştırılırken, lipopolisakkarit, haematin ve ATP gibi bazı hücre bileşenlerinin saptanması yoluyla mikroorganizma sayısının tahmin edilmesine dayalı bu tür analizlerde bu maddelerin gıdalarda bulunması olasılığı problem yaratabilmektedir (TURANTAŞ 1996).

Tüm canlı hücrelere var olan ATP (Adenozin Tri Fosfat) hücrenin enerji transfer reaksiyonlarında önemli işleve sahip bir moleküldür. Gıdadaki ATP' nin ekstraksiyonla uzaklaştırılması sonrası örnekteki mikrobiyel ATP miktarı ile mikroorganizma sayısı arasında direkt bir ilişki kurulabilmektedir (TURANTAŞ 1996).

ATP-Biyolüminesans teknikler, pek çok üründe bakteriyel popülasyonun hızlı sayımına olanak sağlamakla birlikte, bu metotlar spesifiktikten yoksundur. Belirli bakteri türleri için spesifik hızlı arama sistemlerine olan ihtiyaç yakın zamanda gıda kaynaklı patojenlerle ilgili endişeler nedeniyle dikkat çekmektedir. Moleküler genetikteki ilerlemeler bakterilerin spesifik türleri için biyolüminesans arama sistemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (GRIFFITHS 1993, ULITZUR 1997).

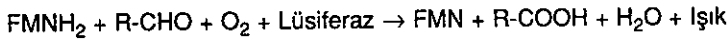
BAKTERİYEL BİYOLÜMİNESANS

Pek çok araştırıcı bakteriyel lüminesans ve uygulamalarına ilgi duymakta olup, bakteriyel lüminesans ile ilgili ilk çalışmalardan biri 17. yüzyılda Boyle tarafından gerçekleştirilmiştir. Boyle, daha sonra balık oldukları gösterilen parlayan canlıların ışık yayabilmesi için oksijene gereksinim olduğunu göstermiştir. Son yıllarda bakteriyel biyolüminesans analitik uygulamalarda da kullanılır hale gelmiş, luminus bakterilerin veya lux geni taşıyan rekombinant mikroorganizmaların kullandığı yöntemler geliştirilmiştir (ULITZUR 1997).

Biyolüminesans bakteriler özellikle denizde bulunmaktadır. *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* (*Altermonas*) ve *Photorhabdus* (*Xenorhabdus*) olmak üzere dört cinse ait 11 tür tanımlanmıştır. Bunlardan sadece *Photorhabdus* karasal olup diğerleri denizde bulunmaktadır. Lüsiferaz enzimi karmaşık fonksiyonlu bir oksidaz olup redükte Flavinmononükleotidi (FMNH₂) ve uzun zinciri aldehiti FMN, su, yağ asidi ve mavi-yeşil ışık (490 nm) verecek şekilde okside eder (HUDSON et al 1997, ULITZUR 1997).

Bakteriyel Biyolüminesansın Biyokimyasal ve Genetik Temelleri

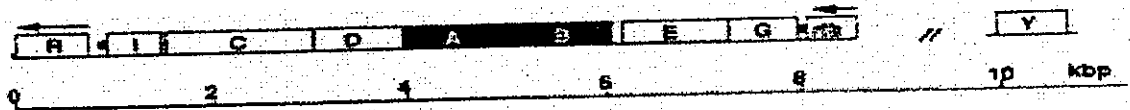
Işıma reaksiyonu, intraselüler lüsiferaz enziminin katalizi ile, FMNH₂ ve dedocanal gibi uzun zincirli alifatik aldehitin moleküler oksijen tarafından oksidasyonundan oluşmaktadır. Buna göre biyokimyasal açıdan bakteriyel biyolüminesans oksijen, enerji kaynağı, lüsiferaz enzimi ve uzun zincirli yağ aldehitine ihtiyaç duymaktadır (STEWART and WILLIAMS 1992, ULITZUR 1997, WILSON and HASTINGS 1998).



Bakteriyel lüsiferaz [alkanal monooxygenase (FMN-linked); alkanal, reduced FMN: oxygen oxidoreductase (1-hydroxylating, luminescing); EC 1.14.14.3] luxA ve luxB genleri tarafından kodlanan a (\approx 40 kDa) ve b (\approx 37 kDa) alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir enzimdir. *Vibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi*, *Vibrio harveyi* ve *Xenorhabdus luminescens* dahil pek çok türden bu genlere ait DNA sekans bilgileri elde edilmiş olup, bu tür bilgiler PCR ile genlerin klonlanmasında kolaylık sağlamaktadır (STEWART and WILLIAMS 1992).

V. harveyi ve *V. fischeri* de a ve b alt ünitelerinin ilk 4 aminoasidi aynı olduğundan luxA ve luxB genlerinin atasal bir genden tandem duplikasyon sonucu meydana geldiği ileri sürülmektedir. Lüsiferazın aktif formu bir $\alpha\beta$ dimeri olup aktif bölge özellikle α alt ünitesi ile ilgilidir. β alt ünitesinin spesifik rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte biyolüminesans aktivite için mutlaka gereklidir. Rekombinant bakteriyel sistemlerde gen ifadesinin iyileştirilmesinde önemli bir yere sahip olan luxAB füzyon proteinleri laboratuvar ortamında üretilebilmektedir. Bu şekilde *Bacillus subtilis*' in yüksek derecede biyolüminesans olan bir derivatı elde edilmiştir (STEWART and WILLIAMS 1992).

Biyolüminesans bakteriyel sistemler üzerindeki pek çok çalışma *Photobacterium* ve *Vibrio* ile gerçekleştirilmiştir. LuxA ve luxB genlerine ilave olarak, lux operonu yağ asidi redüktazın alt ünitelerini kodlayan luxC, luxD ve LuxE olmak üzere üç farklı yapısal gen daha içermektedir (Şekil 1)



Şekil 1. Lux operonu

Lux operonunda bu genlerin düzeni ile ilgili olarak herkes tarafından kabul edilen bir sıralama bulunmaktadır. Diğer lux genleri olan luxR ve luxI ise lux ifadesinin regülasyonuna dahil edilmiştir (BAKER et al 1992, STEWART and WILLIAMS 1992, WILSON and HASTINGS 1998).

Pek çok mikroorganizma lüsiferaz ve yağ asidi redüktaz için gerekli genetik düzenlemeden yoksun olmakla birlikte FMNH₂ içerirler. Buna göre *Escherichia coli* gibi ışık verme özelliği olmayan bir bakteri biyolüminesans hale gelebilir. Bunun için gerekli olan tek şey lüsiferaz ve yağ asidi redüktaz için gerekli genlerin transferidir. Uygulamada uzun zincirli aldehit dışarıdan ilave edilebilmektedir (STEWART and WILLIAMS 1992).

Analitik amaçlarla luminus bakterilerin kullanımı bazı avantajlara sahiptir. Lüminesans üniteye sahip bakteri belirli koşullar altında yüksek ve sabit ışık yayar. Tek bir bakteri hücrenin ışığı 5×10^4 quanta/s/hücre' ye kadar ulaşabilir ve bu düzeydeki ışık bir foton sayıcı yardımıyla belirlenebilir. Böylece mL' deki birkaç yüz bakterinin belirlenmesi için basit bir fotometre kullanılabilir. Duyarlılık ve zaman avantajlarına ek olarak, düşük-ışık ve foton sayıcı video kameralarının kullanım potansiyeli klasik yöntemlere göre bakteriyel biyölüminesans yöntemin üstünlük kazanmasını sağlamaktadır (ULITZUR 1997).

İn vivo lüminesansın düzeyi luminus bakterilerin metabolik aktivitesinin düzeyini ve bakteri hücrelerinin bütünlüğünü göstermektedir. Luminus bakteri reaktifleri -18°C ' de liyofilize halde aylarca saklanabilmekte ve liyofilize kültürler orijinal aktivitelerinin %95-98' ini göstermektedirler. Buna göre, analitik amaçlarla bu tip yöntemlerin kullanımı uygulamada diğer biyokimyasal testlerden farklı değildir (ULITZUR 1997).

Bakteriyel Biyölüminesansın Uygulama Alanları

1. Patojenlerin ve indikatör mikroorganizmaların aranması

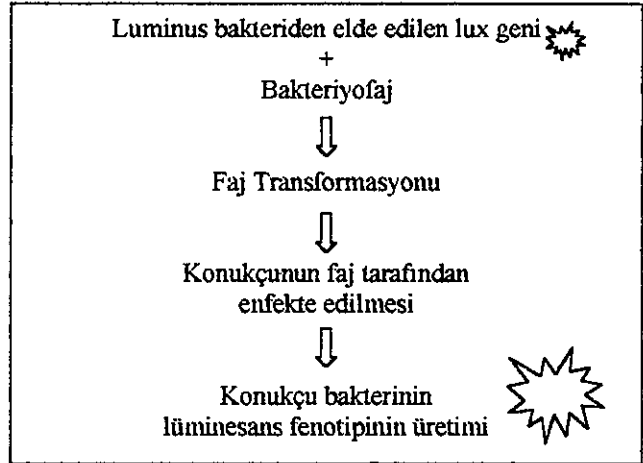
Bakteriyel biyölüminesansın sorumlu lux genleri konukçu spesifikliğı olan fajlara aktarılabilmektedir (Şekil 2). Bakteriyofaj hücre içi metabolizmadan yoksun olduğundan ışık üretmeyecektir. Bununla birlikte, konukçu bakterinin faj tarafından enfekte edilmesi, faj genleri ile birlikte lux genlerinin de ifade edilmesi ile sonuçlanır (STEWART and WILLIAMS 1992, GRIFFITHS 1993, ULITZUR 1997). Yayılan ışığın miktarı enfekte edilen bakterinin sayısı ile orantılı olup, yöntemin spesifikliğı fajın spesifikliğıne bağlıdır (GRIFFITHS 1993).

Salmonella typhimurium' a spesifik P22 bakteriyofajına lux genleri aktarılmış ve bu rekombinant fajla *S. typhimurium* kültürü enfekte edilmiştir. Bu yöntemle 60 dakika içinde 1×10^2 adet kadar düşük sayıdaki bakteri saptanabilmektedir. Diğer yandan bu yöntemle süt içindeki 10 adet *E. coli* hücrelerinin 1 saat içinde belirlenebileceğı bildirilmektedir (GRIFFITHS 1993).

ULITZUR and KUHN (1987), *V. fischeri* MJ1' den elde ettikleri lux geni taşıyan 9kb' lık DNA segmentini iharom 30 fajına aktarmışlardır. Böylece 10 adet kadar düşük *E. coli* hücreleri rekombinant faj L28 ile enfeksiyondan sonra 100 dakika içinde belirlenebilmektedir (STEWART and WILLIAMS 1992). Bu sonuç özellikle sütte basit olarak uygulanabilmesi ve oldukça duyarlı bir yöntem olması açısından önemli bulunmaktadır.

Enterik bakteriler, hatta *Pseudomonas* türlerine spesifik olan fajlara lux genlerinin aktarılması ile çok pahalı olmayan, süt ve süt ürünleri için on-line yani üretim hattında hijyen testi sağlayacak ve 1 saat veya daha kısa sürede sonuç verecek bir yöntem olarak sağlayacağı belirtilmektedir. Ayrıca mastitis etmeni organizmaların ve patojenlerin tanımlanması için biyölüminesans temele dayalı yöntem geliştirme çalışmalarının devam ettiği bildirilmektedir (GRIFFITHS 1993).

Rekombinant fajlar kullanılarak, indikatör mikroorganizmalar üretim hattında 1 saatten daha kısa bir sürede belirlenebilmektedir (STEWART and WILLIAMS 1992). KODIKARA et al (1991), lux-rekombinant bakteriyofajları kullanarak biyölüminesans metotla 1 saat içinde 10^4 adet/g veya cm^2 düzeyindeki enterik



Şekil 2. Bakteriyel biyölüminesans testi

bakterileri belirleyip sayımını yapmışlar, 10 adet/g veya cm² düzeyindeki bakteriyi ise 5 saat içinde belirlemişlerdir.

LOESNER et al (1997), lux geni aktardıkları *Listeria* cinsine spesifik A511 fajını kullanarak, *Listeria monocytogenes* scottA inoküle ettikleri gıdalarda standart yöntemle karşılaştırmalı olarak, söz konusu patojeni biyolüminesans yöntemle belirlemeye çalışmışlardır. *Listeria* sayısı çok düşük düzeyde olduğunda bile bu yöntemle 24 saatte belirlenebildiği bildirilmektedir. Araştırmacılar aynı zamanda test edilen gıdalarda EMS (En Muhtemel Sayı) tekniğini kullanarak patojenin sayısını belirlemişlerdir.

2. Starter kültür aktivitesinin izlenmesi

Fermente süt ürünlerinin üretimi sırasında, starter kültürün hızlı olarak çoğaldığından emin olunmalıdır. Antibiyotikler veya bakteriyofajlar laktik starter kültüre zarar verebilir ya da karışık starter kültürde suşların dengesini bozarak üründe tekstür ve flavor bozukluğuna yol açabilirler. Sütte antimikrobiyel aktiviteyi belirlemek için kullanılan renk indirgeme testleri sonuçların elde edilebilmesi için birkaç saatlik inkübasyon gerektirmektedir (STEWART 1990).

Yapılan bir çalışmada (AHMAD and STEWARD 1991), laktik asit bakterilerine (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*) lux genleri aktarılmış ve dışarıdan ilave edilen aldehit varlığında lüminesans hale gelmeleri sağlanmıştır. Antibiyotik ve bakteriyofaj gibi inhibitörlerin varlığında salınan ışık miktarı azalmaktadır. *Lactobacillus casei* nin biyolüminesans mutanı kullanılarak penisilin G' nin 0.03 mg/mL kadar düşük konsantrasyonları 30 dakika içinde belirlenmiştir. Teknik aynı zamanda 10⁵ /mL kadar düşük bakteriyofaj konsantrasyonlarının belirlenmesini sağlamaktadır (STEWART 1990, AHMAD and STEWARD 1991, GRIFFITHS 1993). Benzer şekilde, sütte antibiyotik aranması için lux geni taşıyan biyolüminesans *Streptococcus thermophilus* elde edilmiş olup, sütteki antibiyotik varlığının 1 saatten daha kısa bir süre içinde belirlenebileceği bildirilmektedir (JACOBS et al 1995).

3. Lux⁺ rekombinant fajlarla bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi

Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek amacıyla kullanılan klasik yöntemler zaman alıcıdır. Antibiyotik duyarlılığını belirlemek için ATP-Biyolüminesans yöntemin kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmakta birlikte (WHEAT et al 1988), bu amaçla lux⁺ rekombinant fajların kullanımı da söz konusudur.

Lux geni taşıyan bakteriyofajların kullanımı protein, RNA ve DNA sentezi inhibitörlerini belirlemek için hızlı bir yöntem sağlamaktadır. Söz konusu antibiyotiklere arzu edilen duyarlılığı gösteren bir bakteri suşu lux geni taşıyan bakteriyofaj tarafından enfekte edilir. Lüminesansın inhibisyon düzeyi test edilen antibiyotiğin aktivitesini gösterir. Yaklaşık 30 dakikalık inkübasyondan sonra aktif antibiyotik konsantrasyonu ile lüminesansın düzeyi arasında lineer bir ilişki bulunmuştur (ULITZUR 1997). Örneğin bir çalışmada *E. coli* nin antibiyotik duyarlılığı, ampisilin için 0.5 mg/mL, kloramfenikol için 0.2 mg/mL, polimiksin için 0.15 mg/mL ve sefalın için 0.05 mg/mL olarak belirlenmiştir (STEWART 1990).

Aynı prensipten yola çıkılarak, lux geni taşıyan bakteriyofaj kullanımıyla, *Mycobacterium tuberculosis* in antibiyotik duyarlılığını belirlemede yüksek potansiyel gösteren bir yöntem geliştirilmiştir. Bu testin, yavaş gelişen bu bakterinin antibiyotik duyarlılığını belirlemek için gerekli olan süreyi haftalardan saatlere indirmede yararlı olabileceği bildirilmektedir (ULITZUR 1997).

4. Gıdalarda bakteriyel metabolik aktivitenin belirlenmesi

İşlem görmüş ve düşük su aktivitesine (A_w) sahip gıdalarda canlı kalan bakterilerin metabolik aktiviteleri düşük olup, sürekli su fazının yokluğu standart analitik metotlarla metabolik aktivitenin izlenmesini sınırlamaktadır. Düşük su aktivitesine sahip ortamlarda, bakteriyel canlılık ile doğal veya klonlanmış luminus bakterilerin in vivo lüminesansı arasında korelasyon bulunmaktadır. Bu yaklaşımla popülasyonda zarar görmüş bakterilerin oranının tahmin edilebileceği ve metabolik aktivitenin belirlenebileceği ileri sürülmektedir (ULITZUR 1997).

5. Analitik amaçlarla luminus bakterilerin aldehit ve miristik asit-oksotrof mutantlarının kullanımı

Biyoluminesans reaksiyonu için gerekli aldehitlerin sentezi 3 farklı enzimden oluşan (redüktaz, transferaz ve sintitaz) yağ asidi redüktaz multienzim kompleksi tarafından katalize edilir. Daha önce de belirtildiği gibi, bu üç enzim sırasıyla luxC, luxD ve luxE genlerinde kodlanır ve bu genler tüm luminus bakterilerde lux operonunda bulunur. Yağ asidi redüktaz enzim kompleksi tarafından katalizlenen temel reaksiyon yağ asitlerinin aldehitlere indirgenmesidir. Bu işlem için ATP ve NADPH₂ gereklidir. Luminus bakterilerden, biyoluminesans için aldehitlere ihtiyaç duyan karanlık mutantlar izole edilmiştir. Bu mutantlardan bazıları, örneğin *Vibrio harveyi*'nin M42 suşu uzun zincirli yağ aldehitlerinin (C₈-C₁₆) varlığında yüksek lüminesans özelliği göstermektedir. Buna karşın *V. harveyi*'nin M17 gibi diğer mutantları miristik aside ve daha az olmak üzere C₁₂-C₁₆ yağ asitlerine cevap vermektedir. Bu mutantlar; lipaz, fosfolipaz, uzun zincirli doymamış yağ asitleri, lipopolisakkaritler (LPS), monoaminooksidaz, antilipojenik maddeler ve yağ oksidasyonunun belirlenmesi için hızlı ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır (ULITZUR 1997).

6. Lipaz, fosfolipaz ve esteraz için biyoluminesans yöntem

Serbest yağ asitlerinin kantitatif olarak belirlenmesi veya kompleks bir lipitten salınmaları ile ilgili kinetik bilgilerin elde edilmesi çok karmaşık ve fazlaca emek isteyen bir işlemdir. Bu amaç için geliştirilen biyoluminesans yöntemlerde *V. harveyi*'nin miristik asit ilave edildiğinde ışık yayan karanlık bir mutantı (M17) kullanılmaktadır. Lüminesans cevabın yani açığa çıkan ışığın miktarı ilave edilen miristik asit miktarı ile orantılıdır (ULITZUR 1997).

Lipaz testi için trimiristin kullanılmaktadır. Test M17 hücreleri ile lipaz ve substratın bir arada inkübe edilmesiyle veya hidroliz aşaması ve belirleme aşaması bağımsız olarak birbirini takip edecek şekilde gerçekleştirilebilir. Bu işlemler, 1-2 pmol miristik asit / dakika kadar düşük salınma karşılık gelen lipaz aktivitesinin hızlı olarak (5 dakika) belirlenmesine olanak sağlar. Test edilen uzun zincirli alifatik yağ asitleri içinde miristik asit en aktif olanıdır ve diğer yağ asitlerinden en az 20 kat daha aktiftir. Buna göre lipaz spesifikliğini belirlemek için α ve α' pozisyonunda stearik asit ve β pozisyonunda miristik asit içeren (veya tam tersi) karışık yağ asidi trigliseritlerinin kullanımı mümkündür. Lipaza ilave olarak diğer enzimler veya daha karmaşık lipitten serbest miristik asit salınmasını sağlayan hidrolitik aktivite bu yöntemle izlenebilir. FosfolipazA için biyoluminesans yöntemde substrat olarak L-dimiristol fosforilkolin kullanılmaktadır. FosfolipazC için test, oluşan diğliseridi hidrolize eden lipazı fazla miktarda içeren karışımın bulunduğu ikili sistemde gerçekleştirilir. M17 hücrelerinin lipolitik aktivitesinden kaçınmak için fosfolipaz ve lipaz aktivitesi olmayan M17LP₂ mutantı elde edilmiştir (ULITZUR 1997).

7. Uzun zincirli yağ asitlerinin belirlenmesi

Laurikasit gibi uzun zincirli yağ asitleri luminus bakterilerin in vivo biyoluminesansları için güçlü inhibitörlerdir. İnhibitör yağ asitleri, miristik asidi miristil aldehide çeviren redüktazın aktivitesini engellemektedir. Doymamış yağ asitlerinin konsantrasyonu ile lüminesansın inhibisyon derecesi arasında iyi bir korelasyon bulunmaktadır. mmol/L düzeylerindeki miristik asit varlığında 16:1, 18:1 ve 18:2 doymamış yağ asitleri *V. harveyi* M17 hücrelerinde lüminesansı engellemektedir. Buna karşın dışarıdan ilave edilen uzun zincirli aldehit doymamış yağ asitlerinin inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır (ULITZUR 1997).

8. Lipopolisakkaritlerin belirlenmesi

Tüm Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı lipopolisakkaritin (LPS) bir parçası olarak Lipit-A komponenti içermektedir. Lipit-A'nın komponentlerinden biri olan 3-hidroksi-miristik asit sadece LPS' de bulunur, bakteri hücrelerinin diğer bileşenlerinde bulunmaz. 3-OH-miristik asidin miristik aside kimyasal değişimi yukarıda tanımlanan *V. harveyi* M17 mutantının yardımı ile LPS'nin spesifik determinasyonuna olanak sağlar. Bu test ile 10⁴ adet bakteriye karşılık gelen 1 ng kadar düşük LPS miktarı belirlenebilmektedir. Bu test aynı zamanda bakterilerin R (Rough) ve S (Smooth) tiplerinin belirlenmesinde de kullanılabilir (ULITZUR 1997).

9. Antilipojenik bileşiklerin belirlenmesi

Cerulenin ve CM-55 gibi antilipojenik bileşenlerin belirlenmesi için geliştirilen yöntem, *V. harveyi*'nin miristikasit-oksotrof M17 mutantının *in vivo* lüminesansı üzerine cerulenin ve CM-55' in inhibitör etkisine dayanmaktadır. Bu yöntemle 0.1mg kadar düşük cerulenin miktarı 15 dakikada belirlenebilmektedir (ULITZUR 1997).

10. Akut ve kronik toksikantların belirlenmesi

In vivo biyölüminesansın prensibi fonksiyonel intraselüler biyokimyasal reaksiyonlara dayandığından, bu reaksiyonları engelleyen maddeler salınan ışık miktarında azalmaya yol açacaktır. Bu prensipten yola çıkılarak toksik maddelerin aranmasında kullanılan microtox sistemi geliştirilmiştir. Microtox sistemin önemli ve kullanışlı uygulamaları olmakla birlikte, test organizmasının habitatının deniz olması uygulanacağı endüstriyel alanları sınırlamaktadır. Bununla birlikte, bu açıdan spesifik antimikrobiyel maddelere duyarlı ve belirli endüstriyel proseslere uygun olan ancak biyölüminesans özelliğe sahip karasal mikroorganizmalar lux genlerinin aktarımı ile bu alanda kullanılabilir hale getirilmektedir. KORPELA and KARP (1988), biyölüminesans *E. coli*'nin kadmiyum aranmasında kullanılabileceği bir yöntem geliştirmiştir (BAR and ULITZUR 1994, STEWART and WILLIAMS 1992, ULITZUR 1997).

Microtox sistemde *V. fischeri* veya *P. leiognathii*'nin liyofilize kültürleri test mikroorganizması olarak kullanılmaktadır. Liyofilize kültür sulandırılarak, test edilecek suyun test tamponu ile hazırlanan seri dilüsyonlarına ilave edilir. *In vivo* lüminesansın düzeyi sıcaklık kontrollü fotometrik cihazda kısa bir inkübasyon periyodundan sonra belirlenmektedir (ULITZUR 1997).

11. Aldehit-oksotrof bir mutantla yağ oksidasyonunun belirlenmesi

Yağ içeren gıdalarda "oksidatif ransidite" olarak tanımlanan kötü flavorun oluşum nedeni doymamış yağ asitlerinin otooksidasyonudur. Oluşan hidroksiperoksitlerin parçalanması uzun zincirli aldehitlerin ortaya çıkmasına neden olur ve bu uzun zincirli aldehitler biyölüminesans test ile kantitatif olarak belirlenebilir. Geliştirilen yöntem, alkali pH' da etanol çözeltisi içinde, sıvı yağ veya hayvansal yağın Co⁺⁺ iyonları ile muamele edilmesinden oluşur ve böylece hidroksiperoksitlerin uzun zincirli aldehitlere dönüşmesi kolaylaşır. Bu testte *V. harveyi*'nin (M42) uzun zincirli (C₈-C₁₆) alifatik aldehitlerin varlığında ışık yayan aldehit-negatif karanlık mutantı kullanılır. Test, mısır, soya ve ayçiçek yağı ile denenmiş ve yaygın olarak kullanılan peroksit tayini ile mükemmel korelasyon göstermiştir (ULITZUR 1997).

12. Monoaminooksidaz (MAO) ve inhibitörlerinin belirlenmesi

Monoaminooksidaz enzimi, çeşitli aromatik (noradrenalin, dopamin, tiramin) ve uzun zincirli alifatik aminlerin (n-pentilamin, n-heptilamin ve n-desilamin) ilgili aldehitlere deaminasyonunu katalizler. MAO aktivitesini belirlemek için, *V. harveyi* M42' nin aldehit-negatif mutantı ile substrat olarak n-desilaminin kullanıldığı hızlı ve duyarlı bir yöntem geliştirilmiştir. Lüminesanstaki başlangıç artışı oranı ve son durağan durumdaki lüminesans düzeyi MAO konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu test spesifiklik, hızlilik ve MAO aktivitesini kesintisiz olarak izleme olanağı vermesi nedeniyle avantaja sahiptir ve farklı MAO inhibitörlerini belirlemek için de kullanılmaktadır (ULITZUR 1997).

13. Sularda asimile edilebilir organik bileşiklerin belirlenmesi

İçme sularında AOC (Assimilable Organic Compound) ve BDOC (Biyodegradable Organic Compound) belirlemede kullanılan standart yöntemler karmaşık olup 5-14 gün sürmektedir. AOC' nin hızlı olarak belirlenmesinde luminus bakterilerin biyosensör olarak kullanıldığı testler geliştirilmiştir (ULITZUR 1997).

14. Balıkların bozulmasının erken göstergesi olarak bakteriyel biyölüminesansın kullanımı

Balık derisinden elde edilen bakteriyel süspansiyonlardaki biyölüminesans düzeyinin 20°C' de depolama sırasında yükseldiği belirlenmiştir. Gerçek luminus bakterilerin gelişme ve lüminesans düzeyi ile toplam bakteri sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu bildirilmekte ve bakteriyel biyölüminesans düzeyinin deniz balıklarının mikrobiyolojik kalitesi hakkında fikir verebileceği ileri sürülmektedir (ULITZUR 1997).

KAYNAKLAR

- AHMAD K.A., STEWARD, G.S.A.B. 1991. The production of bioluminescent lactic acid bacteria suitable for the rapid assessment of starter culture activity in milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 70; 113-120.
- BAKER, J.M., GRIFFITHS, M.W., COLLINS-THOMPSON, D.L. 1992. Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. *J. Food Prot.*, 55 (1); 67-70.
- BAR, R., ULITZUR, S. 1994. Bacterial toxicity of cyclodextrins: luminous *Escherichia coli* as a model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41; 574-577.
- GRIFFITHS, M.W. 1993. Applications of Bioluminescence in the dairy industry. *J. Dairy Sci.*, 76; 3118-3125.
- HODSON, L.M., CHEN, J., Hill A.R., GRIFFITHS, M.W. 1997. Bioluminescence: A rapid indicator of *Escherichia coli* O157:H7 in selected yogurt and Cheese varieties. *J. Food Prot.* 60 (8); 891-897.
- JACOBS, M.F., TYNKKYNNEN, S., SIBAKOV, M. 1995. Highly bioluminescent *Streptococcus thermophilus* strain for the detection of dairy-relevant antibiotics in milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44; 405-412.
- KODIKARA, C.P., CREW, H.H., STEWART, G.S.B.A. 1991. Near on-line detection of enteric bacteria using lux recombinant bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.*, 83; 261-266.
- KORPELA M., KARP, M., 1988. Stable-light producing *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 10; 383-388. In Stewart, G.S.B.A. 1990. In vivo bioluminescence: new potentials for microbiology. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10; 1-8.
- LOESNER, M.J., RUDOLF, M., SCHERER, S. 1997. Evaluation of Reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (8); 2961-2965.
- STEWART, G.S.B.A. 1990. In vivo bioluminescence: new potentials for microbiology. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10; 1-8.
- STEWART, G.S.B.A., WILLIAMS P. 1992. Lux genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.*, 138; 1289-1300.
- TANATAKA, H., SHIINJI (Iwano), T., SAWADA, K., MONJI Y., SETO, S., YAJIMA, M., YAGI, O. 1997. Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria. *Water Res.*, 31(8); 1913-1918.
- TURANTAŞ, F. 1996. ATP biyoluminesans yöntemi ve gıda mikrobiyolojisindeki uygulamaları. *Gıda*, 21 (5); 331-335.
- ULIZUR, S. 1997. Review paper, established technologies and new approaches in applying luminous bacteria for analytical purposes. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 12; 179-192.
- ULIZUR, S., KUHN, J., 1987. Introduction of lux genes into bacteria a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility. In Stewart, G.S.B.A. 1990. In vivo bioluminescence: new potentials for microbiology. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10; 1-8.
- WHEAT P.F., HASTINGS, J.G.M., SPENCER, R.C. 1988. Rapid antibiotic susceptibility tests on *Enterobacteriaceae* by ATP bioluminescence. *J. Med. Microbiol.* 25; 95-99.
- WILSON, T.; HASTINGS, J.W. 1998. Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 14;. 197-230.