

Azərbaycan Respublikası Prezidenti yanında
Elmin İnkişafı fondunun icraçı direktoru
E.S.Babayevə 3-cü “Mobillik qrantı” müsabiqəsinin
qalibi olmuş (EIF- Mob-3-2013-6(12)) A.Ə.İsrayılovanın
qısamüddətli təcrübəkeçmə barəsində

H E S A B A T I

Mən, İsrayılova Aygün Əlimərdan qızı “Mobillik qrantı-3” müsabiqəsinin qalibi (EIF- Mob-3-2013-6(12)-14/07/03) 25.04. – 26.05.2014 tarixində Çexiya Respublikasının Praqa şəhərində Kimya Texnologiyalar İnstitutunda qısamüddətli təcrübəkeçmədə olmuşam. Bu müddət ərzində həmin institutda müxtəlif turş süd məhsullarından ayrılmış süd turşusu bakteriya ştamlarının antibakterial aktivliyi və antibiotik həssaslığı tədqiq olunmuşdur. Eyni zamanda, kimyəvi sintetik kompleks birləşmələrin bakteriyalara qarşı antibakterial aktivliyi də öyrənilmişdir. Beləliklə, əldə olunan nəticələrə əsasən qeyd etmək olar ki, kimyəvi ligand kompleks birləşmələrin bir çox sahələrdə tətbiq olunması əlverişlidir. Sadə və mürrəkkəb metodlarla (PCR) bakteriyaların plazmid və DNT-i ayrılmışdır. TLC (thin layer chromatography) və PCR (polymerase chain reaction) (2 spesifik praymer – BshA; BshB vasitəsilə) metodları ilə öd turşusu duzlarını kolleksion süd turşusu bakteriyasına (*L.acidophilus*) qarşı aktivliyi müəyyən olunmuşdur. Bakteriya hüceyrələrinin sayı klassik (plate count) və müasir qPCR metodları ilə hesablanmışdır. Beləliklə, sübut olundu ki, qPCR(quantative polymerase chain reaction) metodu klassik metodla müqayisədə daha səmərəli və əlverişlidir.

İlk olaraq aşağıdakı metod ilə asanlıqla süd turşusu bakteriyalarının DNT-si ayrılmışdır:

1. *L.acidophilus* CCDM141
2. *Str.thermophilus* CNAZ 1066
3. *L.bulgaricus* ATCC 11842
4. *L.casei* LL26
5. *L.acidophilus* LA5

Adları qeyd olunan bakteriya kulturalarından 1 ml eppendorf sınaq şüşələrinə əlavə olunur və 8000 rpm, 4⁰C, 10 dəq müddətində sentrifüqalasdırılır. Alınan pellet 1 ml steril su ilə yuyulduqdan sonra yenidən

sentrifuqalaşdırılır (8000 rpm, 4°C, 10 dəq). Daha sonra 180 µl lizis buferi (20 mM Tris – HCl, 2mM EDTA, 1.2 % triton X-100, pH 8.0, 40mg/ml) əlavə olunduqdan sonra 35°C-də 45 dəqiqə müddətində inkubasiya olunur. İnkubasiya bitdikdən sonra 25µl proteinase K (20mg/ml) və 200µl Buffer AL (Qiagen Kit) əlavə olunur 56 °C-də 30 dəqiqə müddətində inkubasiya olunur. Bu zaman artıq hüceyrə divarı dağıdılmış bakteriyanın DNT-dən əlavə ehtiyat zülalları parçalanmağa başlayır. Bakterial zülallardan azad olmuş DNT-ni çökdürmək üçün 200µl etanol (98%; -20°C). Eppendorf sınaq şüşələrində olan bütün tərkib kolleksion sınaq şüşələrinə (Dneasy minispin) əlavə edildikdən sonra 9000 rpm, 2dəq, 4°C də sentrifüqalaşdırılır. Kolleksion sınaq şüşəsi dəyişdirildikdən sonra növbə ilə 500µl Buffer AW1 və AW2 əlavə edildikdən sonra 14000 rpm, 4°C sentrifüqalaşdırıldıqdan sonra 50 µl Elution buffer (AE) əlavə edilir. Yenidən setrifüqalaşdırıldıqdan (9000 rpm, 2dəq, 4°C) sonra alınan məhsul kiçik kolleksion eppendorf sınaq şüşələrinə əlavə olunur.

Ayrılmış DNT- lərin amplifikasiyası üçün PZR reaksiyası qoyulmalıdır. Bunun üçün ilk olaraq master miks hazırlanır (cədvəl 1.1.) və hər bir bakteriya DNT-nə uyğun dizayn olunmuş praymerlərdən istifadə olunur:

- *Lactobacillus bulgaricus* - Primer Fwd: LDB 0224; Primer Re: LDB 0224
 - *Str. thermophilus* - Primer Fwd: TABASCO; Primer Re: TABASCO
 - BSH aktivlik üçün - Fwd: BshA, BshB; Primer Re: Bsh A, BshB
- Mater mikslər hazır olduqdan sonra PZR və qPZR reaksiyaları qoyulur.

Cədvəl 1.1.

PZR reaksiyası üçün MASTER MİKS

Miks	İstehsalçı	Miqdar (µl) bir DNT nümunəsi üçün
IQ SYBR Green Supermix	BioRad	10µl
Praymer BshA Fwd 1 (tabasco, LDB 0224)	Generi Biotech	1 µl
Praymer BshA Re1 (tabasco, LDB 0224)	Generi Biotech	1 µl
Steril H ₂ O	-	6 µl
DNT nümunəsi	Qiagen	2 µl
Cəmi		20 µl

Termosikldə PZR və qPZR reaksiyalarının proqramı hər bir ştamm üçün müəyyən olunan qayda ilə yığılır (Məsələn: qPZR (cədvəl 1.2.)

Cədvəl 1.2.

***L.bulgaricus* süd turşusu bakteriyasının termosiklda qPZR reaksiyasının planı**

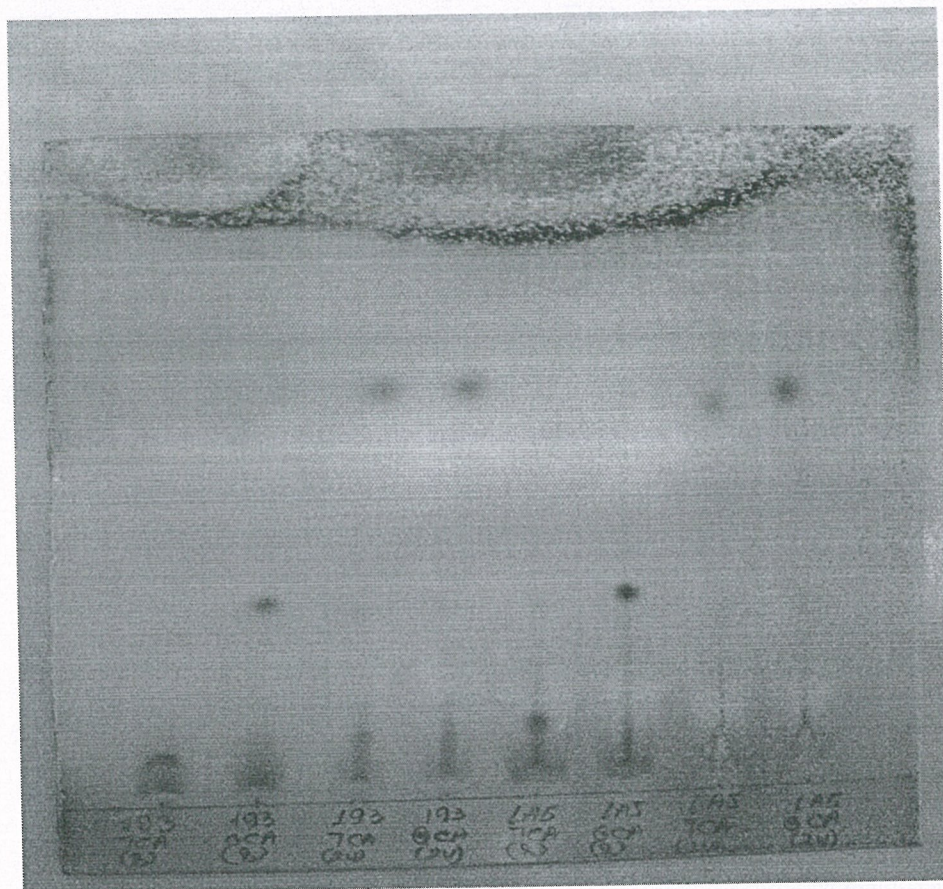
Proses	Sikllərin sayı	Temperatur (°C)	Zaman
İlkin denaturasiya	1	95	3 dəq.
Denaturasiya	39	95	30 san.
Annealing		62	30 san.
Elongasiya		72	30 san.
Reaksiyanın sona çatması		55-95	5 dəq.

Aparılan reaksiyalar nəticəsində məlum oldu ki, PZR və qPZR nəinki bakteriyaların identifikasiyası üçün həmçinin onların müəyyən xüsusiyyətlərini, eləcə də qidalı mühitdə sayını müəyyən etmək olar. Beləliklə, laboratoriya şəraitində PZR klassik metodlarla müqayisədə daha səmərəli olub, az bir zamanda çox az reaktiv istifadə etməklə yüksək nəticə əldə etməyə imkan verir.

Həmçinin, həmin institutda süd turşusu bakteriyasının (*L.acidophilus*) müxtəlif mühit turşuluqlarında (pH 3.5; 4; 4.5;5;6) inkişafını da tədqiq etmişəm. Təcrübə zamanı 3 süd turşusu bakteriya ştammlarından istifadə olundu: *L.acidophilus* 14 A; *L.acidophilus* LHR 14; *L.acidophilus* CH1.

Müxtəlif mühit turşuluqları olan qidalı mühitə (5 ml -MRS broth) bakteriya kulturası (2%) əkildi. Daha sonra hər bir nümunədən 3 təkrarda 200µl olmaqla mikropipet playtə (96 wells) əlavə edildi və biotek reader cihazına 50 saat müddətində inkubasiya üçün yerləşdirildi. Məlum oldu ki, bütün ştammlar pH 4.5, 5 və 6 olduqda daha yaxşı inkişaf edirlər. Bu metodla, öd turşusu duzlarının bakteriyalara qarşı aktivliyini müəyyən etmək üçün çox vaxt tələb olunur. Buna görə də, nazik qatlı xromatoqrafiya üsuluna daha çox üstünlük verilir. *L.acidophilus* bakteriya ştammları glikoxolik və tauroxolik turşuları olan qidalı mühitdə 8 və 24 saat inkubasiya olunduqdan sonra, hər bir kulturadan 3 µl miqdarında nazik qatlı xromatoqrafiya kağızına hopdurulur. Hopdurulmuş xromatoqrafiya kağızı mobile phase olan qaba yerləşdirilir. Reaksiya sona çatdıqdan sonra kağız 110 °C-də 3 dəqiqə müddətində qurudulur və 10 % (wt/v) fosfomolibdiq turşusu ilə yuyulur. Lövhə üzərində tünd rəngli nöqtələr əmələ gəlir

və buna uyğun olaraqda BSH aktivlik təyin olunur. Tədqiq olunan bütün şamlarda 24 saat inkubasiyadan sonra BSH aktivlik müşahidə olundu. Lakin, heç bir şamm eksponensial fazada (8 saatdan sonra) bu aktivliyi göstərmədi.



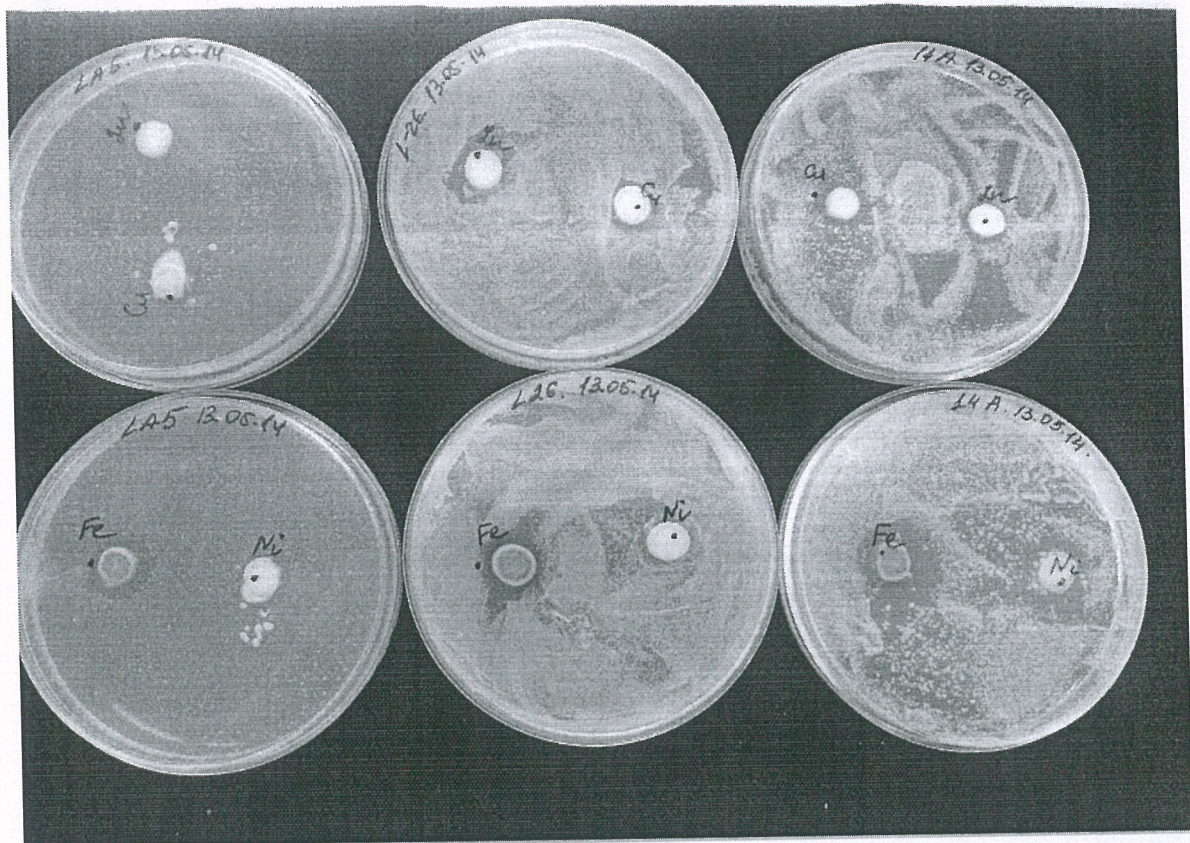
Şəkil 1. Nazik qatlı xromatoqrafiya ilə süd turşusu bakteriyalarının BSH aktivliyinin təyini üsulu. (tünd nöqtələr həmin şammlarda BSH aktivliyinin olmasını sübut edir)

Bu metod daha səmərəli və çox vaxt tələb etmədiyindən laboratoriya şəraitində tətbiq olunması məqsədə uyğun hesab olunur. Süd turşusu bakteriya şammlarının öd turşusu və onun duzlarına qarşı davamlılığını tədqiqi zamanı alınan nəticələr, tibb sahəsində insan orqanizminə uyğun probiotik preparatların hazırlanmasında istifadə olunur.

Eyni zamanda dissertasiya mövzumu əhatə edən kimyəvi sintetik ligand komplekslərin bakteriyalara qarşı aktivliyini müəyyən etmək üçün təcrübələr qoydum. Kimyəvi maddələrin aktivliyi tədqiq olunarkən, məlum oldu ki, ligand komplekslər heç bir toksiki təsirə malik olmayıb (cədvəl 3.1.) (şəkil 2.) müxtəlif sahələrdə tətbiq oluna bilər.

Ligand komplekslərin süd turşusu bakteriyalarına qarşı aktivliyi

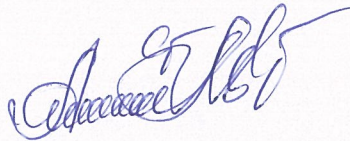
№	Süd turşusu bakteriya ştammlarının adı	Kimyəvi ligand kompleks birləşmələr (mm)			
		Fe (L)Cl ₂	Ni(L)Cl ₂	Cu(L)Cl ₂	Zn (L)Cl ₂
1	<i>Lactobacillus casei</i> 14A	5	-	4-5	4
2	<i>Lactobacillus casei</i> lafti L26	5	5	5	4
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 382	5	-	4	4
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	6	6	7	6
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CH1	5	4	4	4
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM109	5	-	5	5
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LHR14	6	5	5	4



Şəkil 2. Sintetik kimyəvi maddələrin bakteriyalara qarşı aktivliyi

Müasir dövrdə, yüksək və səmərəli bakteriosid, fungisid aktivliyi olan sintetik kimyəvi birləşmələrin (ferrosen, simantrenil, polifenol və onların törəmələri), bəzi bakteriyaların sintez etdiyi antimikrob xassəli maddələrin (bakteriosinə bənzər zülal təbiətli birləşmələr) göbələk, bakteriya və virusların törətdiyi xəstəliklərlə mübarizədə geniş tətbiq olunması məqsədə uyğun hesab olunur. Təbii və süni yolla alınmış kimyəvi birləşmələrin, bakteriosinə bənzər zülal təbiətli maddələri yüksək antimikrob aktivlik xüsusiyyətinə malik olması onların təbabətdə, suyun zərərsizləşdirilməsində, gigiyenik geyimlərin hazırlanmasında və qida sənayesində tətbiqinə imkan verir.

Lahiyə rəhbəri:



A.Ə.İsrayilova