

13048.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STREPTOCOCCUS LACTIS'DE FAJ DİRENÇLİLİĞİNİN
PLAZMİDLERLE OLAN İLİŞKİSİ VE FAJ DİRENÇLİLİK PLAZMİDLERİNİN
FAJA DUYARLI SUŞLARA AKTARIM OLANAKLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Mustafa AKÇELİK

DOKTORA TEZİ
GIDA BİLİMI VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Bu tez .8./.3/1991 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından .100 .

(. . Yüz. . . .) not ile takdir edilerek oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile
kabul edilmiştir.

M. Tunay
Prof.Dr. Nezihe TUNAY
Danışman

M. H. Pamir

Prof.Dr. M. Hilmi PAMIR

Prof.Dr. Gürdal ALAEDDINOĞLU

He

ÖZET

Doktora Tezi

STREPTOCOCCUS LACTIS'DE FAJ DİRENÇLİLİĞİNİN PLAZMİDLERLE OLAN İLİŞKİSİ ve FAJ DİRENÇLİLİK PLAZMİDLERİNİN FAJA DUYARLI SUŞLARA AKTARIM OLANAKLARI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Nezihe TUNAİL
1991, Sayfa: 163

Jüri: Prof.Dr. Nezihe TUNAİL
: Prof.Dr. M. Hilmi PAMİR
: Prof.Dr. Gürdal ALAEDDİNOĞLU

Bu çalışmada, starter kullanılmaksızın üretilen Türk beyaz peynirlerinin peyniraltı sularından izole edilmiş olan *Streptococcus lactis* suşlarında faj direnç mekanizmaları araştırılmıştır. Virulent laktik fajlar, Türk çiğ sütlerinden ve değişik ülkelerin endüstriyel fermentasyon süreçlerinde çeşitli ürün ve ortamlardan izole edilmiştir. 28 *Streptococcus lactis* suşu, direnç özelliklerinin belirlenmesi amacı ile 11 laktik faja karşı denenmiş ve bu suşların altısının tüm fajlara karşı tamamen dirençli olduğu saptanmıştır. Bu altı supta faj direnç sistemlerinin 32 Kb. ve

26.1 Kb. (Kilobaz) büyüklükte iki farklı plazmidin varlığına bağlı olduğu ve 32 Kb.lik plazmidin adsorbsiyonun engellenmesi, 26.1 Kb.lik plazmidin ise ısı duyarlı, faj direnç sistemlerini kodladığı belirlenmiştir. 32 Kb.lik plazmidin ayrıca proteolitik aktivite, laktоз fermentasyonu ve yüksek sıklıkta konjugasyon (verici hücre başına 1.2×10^{-2} - 4.8×10^{-4} konjugant) özelliklerini de kontrol ettiği örneklenmiştir. 26.1 Kb.lik plazmidin ise *Streptococcus lactis* suşlarında ısı duyarlı faj direnç dışında başka hiçbir özelliği kodlamadığı saptanmıştır. Her iki direnç plazmidi de protoplast transformasyonu yöntemiyle, plazmid içermeyen *Streptococcus lactis* suşlarına aktarılarak, plazmid DNA'nın $\mu\text{g.}$ mında 1.4×10^4 - 2×10^5 oranında transformant oluşumu sağlanmıştır. Ayrıca elektronmikroskopik incelemeler sonucu Türk faj izotllerinin morfolojik özellikleri belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER : *Streptococcus lactis*, plazmid, faj direnç, transformasyon, konjugasyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

RESEARCHES ON THE RELATIONSHIP BETWEEN PLASMIDS AND PHAGE
INSENSITIVITY IN *STREPTOCOCCUS LACTIS* AND TRANSFER
POSSIBILITIES OF THE PHAGE RESISTANCE PLASMIDS TO PHAGE
SENSITIVE STRAINS

Mustafa AKÇELİK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Science and Technology

Supervisor: Prof.Dr. Nezihe TUNAİL
1991, Page: 163

Jury: Prof.Dr. Nezihe TUNAİL
: Prof.Dr. M. Hilmi PAMİR
: Prof.Dr. Gürdal ALAEDDİNOĞLU

In this study, the phage resistance mechanisms of *Streptococcus lactis* strains, isolated from whey of Turkish white pickled cheese which produced using without industrial starter, were investigated. Virulent lactic phages were isolated from Turkish raw milk and various products and media of industrial fermentation processes of different countries. Twenty eight *Streptococcus lactis* strains were tested for resistance to eleven different lactic phages and six of these strains were found to be completely resistant

against all the phages. The phage resistance systems in the six strains were found to be determined by two different plasmids, having molecular sizes of 32 kilobase and 26.1 kilobase, and they were shown to encode interference of phage adsorption and heat sensitive phage resistance systems, respectively. Furthermore, the 32 kilobase plasmid was also demonstrated to be responsible for proteolytic activity, lactose fermentation and high frequency conjugation (1.2×10^{-2} - 4.8×10^{-4} conjugant per donor cell) functions. The 26.1 kilobase plasmid was found to carry none of the characters in the *Streptococcus lactis* strains except the heat sensitive phage resistance system. Both of the resistant plasmids could be transformed into plasmid free *Streptococcus lactis* strains by protoplast transformation method with the frequency rate of 1.4×10^4 - 2×10^5 transformant per μg of plasmid DNA. In addition, the morphological characters of the Turkish phage isolates were determined electronmicroscopically.

KEY WORDS: *Streptococcus lactis*, plasmid, phage resistance, transformation, conjugation

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm tez hocam Sayın Prof. Dr. Nezihe TUNAİL'e, yurt dışı görevlendirme işlemlerinde her türlü kolaylığı sağlayan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanlığı ve Ankara Üniversitesi Rektörlüğü'ne;

Engin bilgi ve deneyimlerinden ve Agricultural Food Research Council (AFRC-England) Food Research Institute laboratuarlarının tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan, Genetik ve Mikrobiyoloji bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Michael J. GASSON'a; Bakteriyofaj çalışmalarımda yararlı önerileri ve içten dostluklarından dolayı Sayın Prof. Dr. Brian E. JARWIS ve Sayın Dr. Audrey W. JARWIS'e (New Zealand Dairy Research Institute);

Başta sevgili çalışma arkadaşlarım, Dr. Helen M. TODD, Dr. Claire SHAERMAN, Harold M. UNDERWOOD, Phill ANDERSON, Dianne GIAYZER, Simon SWINDELL, Tracy J. EATON ve Margaret RODGER olmak üzere, işbirliği ve paylaşımı esirgemeyen tüm laktik grup elemanlarına;

Sonsuz anlayışı ve destekleriyle bana huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan sevgili eşim Dr. Nazan AKÇELİK'e;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI . . .	5
2.1. <i>Streptococcus lactis</i> 'in Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.	5
2.2. Laktik Streptokok Fajları, Süt Endüstrisinde Yarattığı Sorunlar ve Kontrolü.	6
2.3. Plazmidler.	11
2.4. <i>Streptococcus lactis</i> 'te Plazmid Kodlu Özellikler.	13
2.4.1. Karbonhidrat metabolizması.	14
2.4.2. Proteolitik aktivite.	16
2.4.3. Faj dirençlilik	18
2.4.3.1. Restriksiyon/modifikasyon (kısıtlayıcı/değiştirge) sistemleri.	18
2.4.3.2. Abortif infeksiyon.	20
2.4.3.3. Faj adsorbsiyonunun engellenmesi ve tanımlanmamış direnç sistemleri	23
2.4.4. Plazmidler tarafından kontrol edilen diğer özellikler.	26
2.5. <i>Streptococcus lactis</i> 'te Genetik Aktarım Sistemleri.	29
2.5.1. Transdüksiyon	29
2.5.2. Konjugasyon	31
2.5.3. Transformasyon.	37
2.5.4. Protoplast füzyonu.	41

2.6.	Faja Dirençli Suş Geliştirme Çalışmaları	43
3.	MATERIAL ve METOT	46
3.1.	Materyal.	46
3.1.1.	Mikroorganizmalar ve bakteriyofajlar.	46
3.1.2.	Kimyasal maddeler ve ayıraçlar	46
3.1.3.	Moleküler analiz araçları ve elektron mikroskopu	48
3.2.	Metot	50
3.2.1.	İzolatlardan Streptococcus lactis suşlarının tanısı	50
3.2.1.1.	Morfolojik tanı ve katalaz testi.	51
3.2.1.2.	Arjininden amonyak oluşumu.	52
3.2.1.3.	Elliker broth besiyerinde gelişme	53
3.2.1.4.	Sitrat fermentasyon testi	54
3.2.2.	Faj stoklarının hazırlanması ve bakteriyofaj biyodenemeleri	55
3.2.2.1.	Çift tabaka yöntemi	55
3.2.2.2.	Spot test	59
3.2.3.	Faj konsantratlarının hazırlanışı (polietilen glikol-dekstran sülfat yöntemi)	60
3.2.4.	Fajların saflaştırılması ve elektronmikroskopisi.	61
3.2.5.	Faj direnç mekanizmalarının saptanması.	63
3.2.6.	Profaj indüksiyonu.	63
3.2.6.1.	Ultraviyole ışık indüksiyonu.	64
3.2.6.2.	Mitomisin C indüksiyonu	64
3.2.7.	Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının ve direnç düzeylerinin saptanması	65

3.2.7.1.	Disk duyarlılık testleri	65
3.2.7.2.	Antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi.	66
3.2.8.	Doğal suşlardan plazmidlerin giderilmesi ve laktoz fermentasyon yeteneğini yitirmiş mutantların seçimi.	67
3.2.9.	Proteolitik aktivite özelliğinin saptanması. .	68
3.2.10.	Bakterilerin plazmid içeriklerinin tanımlanması	69
3.2.10.1.	Mini Ölçek plazmid izolasyonu.	69
3.2.10.2.	Büyük Ölçek plazmid izolasyonu	72
3.2.10.3.	Plazmidlerin saflaştırılması	75
3.2.10.4.	Elektroforez	78
3.2.10.5.	Plazmidlerin büyüklüklerinin saptanması. . . .	80
3.2.11.	Konjugasyon.	82
3.2.12.	Transformasyon	84
3.2.13.	Transformant ve konjugantlarda plazmid stabilitesinin saptanması.	86
4.	SONUÇLAR	88
5.	TARTIŞMA	125
KAYNAKLAR.		133

ŞEKİLLER

Şekil 1.	Cift tabaka yöntemi ile faj titrelerinin saptanması.	58
Şekil 2.	Sezyum klorür-ethidium bromit yoğunluk gradientinde ccc plazmid ve kromozomal DNA bantları.	77
Şekil 3.	Marker ccc DNA moleküllerinin agaroz jel plani ve moleküler büyüklükleri.	81

Şekil 4. P81-13 Fajının elektronmikroskopik görünüşü.	93
Şekil 5. P88-13 Fajının elektronmikroskopik görünüşü.	94
Şekil 6. P78-L Fajının elektronmikroskopik görünüşü	95
Şekil 7. P76-2 Fajının elektronmikroskopik görünüşü	96
Şekil 8. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında plazmid içerikleri ve büyüklükleri	103
Şekil 9. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında plazmid içerikleri ve büyüklükleri	104
Şekil 10. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında plazmid içerikleri ve büyüklükleri	105
Şekil 11. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında plazmid içerikleri ve büyüklükleri	106
Şekil 12. <i>Streptococcus lactis</i> P148 suşunun faja dirençli mutantlarında plazmid içerikleri.	110
Şekil 13. <i>Streptococcus lactis</i> P148 suşunun faja dirençli mutantlarında plazmid içerikleri.	111
Şekil 14. Adsorbsiyonun engellenmesi tipindeki faj direnç özelliğinden sorumlu plazmidin, plazmidleri giderilmiş suşlara konjugasyon ve transformasyon yolu ile aktarımından sonra konjugant ve transformantların plazmid içerikleri	117
Şekil 15. Isı duyarlı faj direnç sisteminden sorumlu plazmidin, plazmidleri giderilmiş suşlara transformasyonu sonucu seçilen transformantlarda plazmid içerikleri	120

TABLOLAR

Tablo 1. Araştırmada kullanılan laktik fajlar	49
Tablo 2. Laktik streptokok izolatlarından <i>streptococcus lactis</i> suşlarının tanısı	90

Tablo 3. Türk çiğ sütlerinden izole edilen fajların morfolojik özellikleri	91
Tablo 4. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında faj duyarlılıklarını ve temperent faj induksiyonu.	92
Tablo 5. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	100-101
Tablo 6. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarının disk duyarlılık testleri sonucu seçilen antibiyotiklere karşı deneysel direnç düzeyleri	102
Tablo 7. Fajadirençli <i>Streptococcus lactis</i> suşlarından elde olunan mutantlarda plazmid içeriğine bağlı faj direnç fenotipi değişimleri	112-113
Tablo 8. Konjugasyon ve transformasyon denemelerinde kullanılan <i>Streptococcus lactis</i> suşlarının fenotipik özellikleri ve plazmid içerikleri. .	114
Tablo 9. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında faj direnç gen kodu taşıyan plazmidlerin konjugasyon sikliği.	118
Tablo 10. <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında faj direnç özelliklerini kontrol eden plazmidlerin transformasyon sikliği	119
Tablo 11. Alici suşlar, transformant ve konjugantların genel faj duyarlılık özellikleri ve faj direnç özelliğini kodlayan plazmidlerin stabilité oranı.	121
Tablo 12. Fajadirençli <i>Streptococcus lactis</i> suşlarında proteolitik aktivite ile plazmidlerin ilişkisi	124

GİRİŞ

Starter kültürler; fermentasyon sürecinin başlatılması, arzu edilen ürünün yüksek ve sürekli standart kalitede eldesi amacıyla ile fermentasyon ortamlarına ilave edilen, özellikleri tanımlanmış mikroorganizma kültürleridir. Bu kültürler, fermentasyon süreçlerinde yapı ve aroma bileşiklerini oluşturmaları yanında, gıda bozulmaları ve gıda zehirlenmeleri etmeni olan bakterilerin gelişimlerinin engellenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Dünyada fermente gıda üretiminin sürekli artışı ve buna paralel olarak değişen üretim teknolojilerinden dolayı, starter kültür üretimi ve saklanması uygulanan klasik teknikler, modern gıda endüstrisinin sorunlarına yanıt verememektedir. Günümüzde, bir yandan starter kültürlerin canlılıklarını kaybetmeden uzun süre saklanmalarına çözümler aranırken, diğer yandan genetik analizleri yapılan mikroorganizmalarda biyokimyasal ve fizyolojik özellikler moleküller seviyelerde yeniden düzenlenerek, üretim ve saklama süreçlerine en uygun suşların geliştirilmesine çalışılmaktadır.

Süt endüstrisinde başlıcaları; Cheddar, Colby, Blue, Gorgonzola, Roquefort, Stilton, Camembert, Brick, Limburger, Feta, Gouda, Edam, Cottage ve Kaşkaval olmak üzere yaklaşık 500 peynir türü ile, tereyağı, yağlı süt, ekşi krema, Quark ve Viili gibi birçok fermente süt ürününün eldesinde, laktik streptokok suşlarından starter kültür olarak yararlanılmak-

tadır. Bu starterler, ürünün özelliğine göre sadece laktik streptokok suşlarından oluşabileceği gibi, diğer laktik asit bakterileri, özellikle de *Leuconostoc* ve laktobasiller ile belirli oranlarda kombine edilmiş karışık kültürler olarak da kullanılabilir. Ayrıca, Camembert, Roquefort benzeri peynirlerin olgunlaştırılmasında bazı küf türleri ikincil florayı oluşturmaktadır. Dünyada toplam fermente gıda üretiminin %21.5'i fermente süt ürünleridir. 1980 yılı rakamlarına göre, sadece "Avrupa Ekonomik Topluluğu"na üye ülkeler tarafından 3,5 milyon ton peynir üretilmiştir. Bu üretim için gerekli starter kültür miktarı 350 bin tondur. Bu miktar Devlet Planlama Teşkilatı'nın 1987 istatistiklerine göre, ülkemiz için 289 bin tondur ve işlem için yaklaşık 30 ton startere ihtiyaç vardır. Birçok gelişmiş ülke ve üretim birimi starter kültürlerini kendi üretmekle birlikte, ülkemiz örneğinde olduğu gibi, diğer bazı ülkeler endüstride kullandıkları starter kültürleri dışarıdan sağlamaktadır. Starter kültürlerin ithali ürün maliyetini etkilemeye ve döviz kaybına neden olmaktadır. Ayrıca, doğal koşullara ve geleneksel produktelere adapte olmuş suşların kullanılması, hem ürünün kendine has özelliklerinde değişimlere neden olmakta, hem de halen süt endüstrisinin başlıca sorunlarından biri olma özelliğini koruyan bakteriyofaj kontaminasyonlarından etkilenme riskini artırmaktadır. Zira bu ticari suşlar belli başlı faj tiplerine karşı denenmekte, ancak, doğal olarak değişik ekosistemlerde oluşabilecek modifiye fajlara duyarlılıklarını bilinmemektedir. Güçlü bir tarım potansiyeline sahip ülkemizde, geleneksel süt ürünlerimizin yüksek

kalitede ve verimde üretilmesi ve dünya pazarlarında kabulünün sağlanabilmesi için, kendi starter üretim birimlerimizi kurmak zorunludur.

Süt endüstrisinde fermentasyon süreçlerinin doğası gereği tam anlamı ile asepsinin sağlanamayışı, laktik starter kültürlerin %98 gibi yüksek bir oranda lizogeni özelliği içermesi ve geliştirilen faj inhibitör ortamların tüm litik olayları önleyememesi gibi başlıca etmenler, faj kontaminasyonları sonucu oluşan ürün kayıplarının engellenmesi amacı ile geliştirilen tüm fiziksel ve kimyasal yöntemleri, birçok durumda ekonomik açıdan yetersiz kılmaktadır. 1930'lu yıllarda beri süt fabrikalarında bakteriyofajların yarattığı sorunlar bildirilmekte ve değişik önlemler önerilmektedir. Bakteriyofajların fermentasyon ortamlarında starter kültürleri etkilemesi sonucu; yapı ve aroma bileşiklerinin oluşumu yavaşlamakta, ürün kalitesi düşmekte ve bir üretim devresinde yaklaşık %15-20 oranında ürün kaybı meydana gelmektedir.

Son yıllarda, laktik streptokoklarda sitrat metabolizması, proteolitik aktivite, laktoz fermentasyonu sonucu hızlı asit oluşumu ve faj direnç sistemleri gibi endüstriyel açıdan çok önemli özelliklerin genetik kodunun, bu suşların içерdiği plazmidler tarafından taşındığının belirlenmesi, starter suş geliştirme programlarına yeni bir yaklaşım ve ivme kazandırmıştır. Plazmidlerin konakçı hücreden kendiliğinden kaybının yüksek oluşu, bu özelliklerin sürekliliği için stabil hale getirilmelerini ya da oldukça

stabil halde bulundukları konakçının belirlenmesi zorunluğunu yaratmaktadır. Bununla beraber, bu moleküllerin kromozomal DNA ya oranla çok küçük olmaları ve genellikle bakteriler arasında doğal aktarımlarını sağlayabilme yetenekleri, yapısal analizlerini kolaylaştırmaktadır. Moleküller Biyoloji'de sağlanan gelişmelerin, genetik analizi yapılmış özelliklerin amaçlanan doğrultuda yeniden düzenlemesini olanaklı hale getirişi, starter kültürlerin belli başlı sorunlarının kalıcı çözümünde büyük bir potansiyel oluşturmuştur. Bu nedenlerle laktik streptokoklarda plazmid kodlu özelliklerin belirlenmesi ve analizi çalışmaları starter suş geliştirme programlarının odak noktası haline gelmiştir.

Bu araştırmada Türkiye'de ilk kez, starter olarak izole ve identifiye edilmiş yerli *Streptococcus lactis* suşlarında faj direnç sistemleri yanında laktوز kullanımı ve proteolitik aktivite gibi özelliklerin genetik analizi yapılmış ve laktik fajların morfolojileri tanımlanmıştır. Ülkemizde endüstriyel starter kültür kullanmayan klasik işletmelerde, peyniraltı suyundan izole edilmiş olan *Streptococcus lactis* suşlarının, yine bu işletmelerden sağlanan çiğ sütlerden izole edilmiş olan bakteriyofajlara karşı dirençlilikleri ile direnç sistemlerinin bağlı bulunduğu genetik taşıyıcılar ve bunların aktarım olanakları araştırılarak, genetik çalışmalara temel oluşturacak yön tem ve araçlar geliştirilmeye çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Streptococcus lactis*'in Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Streptococcus lactis; *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ve *Streptococcus cremoris* ile birlikte, laktik streptokoklar grubu içinde sınıflandırılmaktadır. N grup antijenlere sahip bu bakteriler; gram pozitif, spor oluşturmayan, mezofilik, mikroaerofilik ve fakultatif anaerob özellikte belirlenmiştir. Homofermentatif olup, sütte fermentasyonları sonucu başlıca ürün olarak L(+) laktik asit ve aroma maddeleri oluşturmaktadırlar. Diğer laktik asit bakterileri gibi, laktik streptokoklar da sitokromların önemli bileşenleri olan hemiporfirinlerini sentezleme yeteneğinden yoksun olduklarından, sitokroma bağlı oksidadif forforilasyon ve katalaz sistemlerine sahip değildir. Ancak, düşük oranda oksijen redüksiyonu flavoprotein peroksidaz enzimleri aracılığı ile yapılmaktadır. Bu grup bakteriler arasındaki temel biyokimyasal farklılıklar; *Streptococcus lactis* 'in arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşturması ile *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*'in sitratı metabolize etme özellikle olarak tanımlanmıştır. Laktik streptokoklar gelişmeleri için, doğal olarak sentezleyemedikleri birçok aminoasit ve vitamine gereksinim duyarlar. Bu aminoasit ve vitaminlerce desteklenmiş ortamlarda; 30°C'de, pH 6.0-6.3 arasında optimum gelişme gösterdikleri saptanmıştır (Mundt 1986).

Streptococcus lactis suşları 10°C 'nin altında, 45°C ve üstündeki ısilarda ve %6.5 NaCl içeren ortamlarda gelişme göstermemektedir. DNA'lerindeki %G+C oranı %36 olarak belirlenmiştir. Hücre morfolojileri ovoid olup, çapları 0.5-1.0 μm .arasındadır. Genellikle hemolitik özellikte değişdirler. Yalnız birkaç suş kanlı agarda geliştiğinde zayıf α hemoliz göstermektedir. Gelişme ortamlarında çift ya da kısa zincirler oluşturan *Streptococcus lactis* suşları, çoğunlukla hareketsiz olmakla birlikte, nadiren hareketli formlarına da rastlandığı bildirilmiştir. İzolasyon kaynakları; çiğ süt, süt ürünlerini, bitkiler, steril olmayan dondurulmuş veya kurutulmuş gıdalardır (Mundt 1986). Son yıllarda nukleik asit hibridizasyonları ve dizi analiz yöntemlerinden elde olunan verilere dayanılarak, *Streptococcus cremoris*'in de *Streptococcus lactis*'e ait bir alt tür olduğu belirtilmiş ve genus'un *Lactococcus* olarak değiştirilmesi önerilmiştir (Schleifer 1987).

2.2. Laktik Streptokok Fajları, Süt Endüstrisinde Yarattığı Sorunlar ve Kontrolü

Bugüne dek yapılan çalışmalarında, tüm laktik streptokok fajları Bradley'in morfolojik sistematiğine göre "Grup B" üyeleri olarak tanımlanmıştır. Genellikle; 55-65 x 40-48 nm. boyutlarında prolate bir baş ve 80-110 nm. uzunluğunda, kasılma yeteneğinde olmayan bir kuyruk içermektedirler. Prolate fajlara oranla, daha az sıklıkta

rastlanan izometrik baş yapılı fajlarda baş çapı 45-65 nm. kuyruk uzunluğu ise 100-300 nm. arasında belirlenmiştir. Gerek prolate ve gerekse izometrik baş yapılı fajların, yaka, taban plağı ve taban fibrilleri içeren tiplerine rastlandığı gibi, bu yapıları içermeyen tiplerinin de olduğu bildirilmiştir (Keogh ve Shimmin 1974, Terzaghi 1976, Jarwis 1981, Teuber ve Lembke 1983, Davies ve Gasson 1984, Klaenhammer 1984a, Teuber ve Loof 1987, Braun vd.1989).

Laktik fajların sadece çift zincir DNA içerdikleri ve DNA'da Guanin-Sitozin oranının %32.7-40 arasında olduğu saptanmış (Lawrence vd.1976), genom büyüklükleri ise, 18-60 kilobaz arasında bulunmuştur (Daly ve Fitzgerald 1987, Teuber ve Loof 1987, Braun vd.1989, Coveney vd.1989).

Streptococcus lactis suşlarında faj almaç bölgeleri, hücre membranı üzerinde bulunabilmekle birlikte (Oram 1971) bu bölgelerin genellikle hücre duvarında lökalize olduğu (Teuber ve Lembke 1983) ve fajların, hücre duvarına etkili faj lisinlerini ürettikleri belirlenmiştir (Mullan ve Crawford 1985, Shaerman vd.1989). Birçok araştırcı, laktik streptokok fajlarının morfolojileri, serolojileri ve DNA homolojilerinde saptanan benzerlikleri gözönünde bulundurarak değişik alt gruplar oluşturmuştur (Jarwis 1978, Heap ve Jarwis 1980, Sihna 1980, Jarwis 1984, Jarwis ve Meyer 1986, Jarwis ve Klaenhammer 1986, Braun vd.1989). Ancak, bu alt gruplar arasında konakçı özgüllüğe göre kesin bir ayırım yapılamamıştır.

Pearce (1978), 23 farklı *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* konakçı suşuna 643.ML3 fajının etkinliğini araştırmış ve bu fajın 23 farklı suşa da etkinlik gösterdiğini saptamıştır. Benzer olarak, Boussamaer vd.(1980) 4 farklı *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* suşuna karşı denedikleri 36 fajın %77'sinin çapraz konakçı özgüllüğüne sahip olduğunu belirlemiştir. Parada vd.(1984) ise çiğ sütten izole ettikleri morfolojik olarak tamamen benzer 3 fajın, *Streptococcus lactis* C2 suşunda lizizleri sonucu farklı plak büyüklükleri oluşturduklarını bildirmiştir. Laktik streptokoklar arasında fajların değişken ve geniş konak özgüllüğüne sahip olması, DNA homolojilerindeki büyük oranda uyuşma, bu fajların aynı kökenli olduğu ve evrimlerinde mutasyonların rol oynadığı fikrini güçlendirmektedir (Jarvis 1987, Mata ve Ritzenthaler 1988, Coveney vd.1989). Jarvis (1987) değişik yıllarda Yeni Zelanda ve Amerika Birleşik Devletleri'nde endüstriyel işletmelerden sağlanan peyniraltı suyundan izole edilen fajların morfolojileri ve DNA homolojilerini karşılaştırmış; her iki ülke izolatlarından 1975 yılında prolate baş yapılı tesbit ettiği 6 fajın, 1985 yılında izole edilerek izometrik baş yapısında bulunan 2 fajla, tamamen aynı restriksiyon fragmentleri ve yüksek oranda DNA homolojisi verdienen saptamıştır. Araştırcı morfolojisini değişen fajlarda konakçı özgüllüğünün de değişimleceği esasından hareketle, laktik streptokok fajlarının belirli birkaç faj türünden türediğini ileri sürmüştür. Braun vd.(1989) değişik *Streptococcus lactis* suşalarından

izole ederek restriksiyon analizleri, DNA homolojisi ve protein profillerindeki benzerliğe göre sınıflandırdıkları 7 farklı faj grubundan 36.4 kilobaz büyüklükte DNA içeren p335 fajının, *Streptococcus cremoris* 936-l suşunun temperent fajı ile büyük çapta homoloji verdiğini saptamışlardır.

Laktik streptokoklarda lizogeni çok yaygın bir özellikle (Zabriskie vd.1972, Lowrie 1974, Chopin vd.1976, Reyrolle vd.1982, Klaenhammer 1984a). Bu nedenle, süt fermentasyon süreçlerinin yeterince aseptik olmayan koşullarda gerçekleşmesinden kaynaklanan faj kontaminasyonları yanında, temperent fajların litik hale dönüşümleri de starter kültürleri etkilemeye ve ürün kayıplarına neden olmaktadır (Keogh 1973, Terzaghi ve Terzaghi 1978, Baldwin ve McKay 1987, Mansais vd.1988, Sechaud vd.1988). Süt endüstrisinde kullanılan mezofilik starter kültürler, laktik streptokok ve *Leuconostoc* türlerini içermektedir. Bu türler, fermentasyon ortamlarında asit üretimi yanında, süt proteinlerinin parçalanması, yağ asitlerinin hidrolizi ve sitrat metabolizması (*Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*) sonucu süt ürünlerini için önemli yapı ve aroma bileşiklerini de oluşturmaktadır (Lawrence vd.1976, Law 1984, Marshall ve Law 1984). Günümüzde, tek suşlu kültürler, çok suşlu kültürler ve karışık tür kültürler olmak üzere, başlıca 3 tip starter kullanılmaktadır (Daly 1983a). Bu starter kültürlerini oluşturan suşların seçimi ve kombinasyonu, üretilcek ürünün cinsine, onun tad ve aroma özelliklerine göre gerçekleştirilmektedir.

(Daly 1983b). Bakteriyofajların fermentasyon ortamlarına kontaminasyonu ile, birinci aşamada hızlı asit oluşumu engellemekte ve sonuçta sütün koagülasyonu yavaşlamakta, fermentasyon ortamında yapı ve aroma bileşiklerinin oluşumu engellenmektedir. Ayrıca belirli bir suşun lizizi ile, fermentasyon ortamında bulunan, fakat dominasyonu arzu edilmenen, ya da gıda bozulması etmeni bakteriler hakim flora hâline geçebilmektedir (Lawrence vd.1976, Marmelstain 1982, King vd.1983, Sanders 1988).

Süt endüstrisinde faj kontaminasyonlarının kontrolü amacıyla ile değişik korunma yöntemleri geliştirilmiştir. Buların başlıcaları; kapalı fermentasyon tanklarının kullanımı, hava filtrasyonu, ortam pastörizasyonu (Chopin 1980, Davies ve Gasson 1984), kütle starterlerin hazırlanması ve direk fermentasyon tanklarına inokülasyonu (Klaenhammer 1984a), sütün ultrafiltrasyonu (Mystry ve Kosikowski 1986, Zottola vd.1987), kalsiyum alginat yapılarında immobilize edilmiş kültürlerin kullanımı (Steenson vd.1987), starter kültürlerin rotasyonu, kimyasallarla desteklenmiş faj inhibitör ortamlar, çok suşlu starterlerin ve faja dirençli suşların kullanımı (Heap ve Lawrence 1976, Thunnell vd.1982, Sanders 1988), yöntemleridir. Ancak starter kültürlerde çok sık rastlanan temperent fajların litik çevrimi, stabil olmayan faj direnç özelliklerinin kaybı, faj modifikasyonları ile konakçı özgüllüğünün değişimi ve faj inhibitör ortamlarının tüm fajlara karşı etkili olamaması gibi başlıca nedenler, fajdan korunmak için önerilen tüm yöntemlerin faj kontaminasyonu sorununa köklü bir çözüm getirmesini engel-

lemektedir (Daly 1983b, Mabbitt vd.1987). Laktik streptokoklarda faj direnç sistemlerinin genellikle plazmid kodlu genler tarafından taşındığının saptanması ve bu suşların detaylı genetik analizleri sonucunda alternatif moleküller genetik yaklaşımlar doğmuş, lizogeni özelliğinin giderilmesi ve bu durumun sürekliliğinin sağlanması, bakterilere etkili ve stabil faj direnç sistemlerinin kazandırılması gibi çabalar yoğunlaşmıştır (Sandine 1987, Sanders 1988).

2.3. Plazmidler

Plazmidler, 1×10^6 - 250×10^6 Dalton moleküller ağırlıkta, kromozom dışı, stabil olmayan DNA elementleri olarak tanımlanmaktadır. Bu elementler, kromozomal DNA'dan bağımsız replikonlar olmakla beraber, bazı durumlarda kromozomal DNA ile birleşikleri ve beraber eşlendikleri de saptanmıştır. Bu durumdaki plazmidlere epizom adı verilmektedir (Forster 1983, Forster 1984). Plazmidler, prokaryot ve ökaryot hücrelerde gelişme ve çoğalma için zorunlu genleri taşımazlar. Açık sirküler (OC), lineer (L) veya kovalent bağlarla kapanmış süper sarmal dönüşler (CCC) içeren yapılarda bulunabilmektedirler. Bakteriyel plazmidlerin genel CCC yapı özellikleri, bu elementlerin yoğunluk gradienti ve agaroz jelde diğer DNA formlarından farklı davranışına neden olmakta ve saflaştırılmalarını kolaylaştırmaktadır (Wang 1980, Hintermann vd.1981, Holmes 1982, Grinsted ve Bennett 1984). Sınıflandırılmaları; ya aralarında birbirinin

replikasyonunu engelleme esasına göre uyuşmazlık grupları oluşturularak, ya da kopya sayısı ve replikasyonlarını düzenleyen genler dışında taşıdıkları karakteristik genlere göre yapılmaktadır (Hardy 1981, Forster 1984). Plazmidler, bulundukları hücrelere sağladığı özellikler gözönünde bulundurularak, başlıca beş grup altında incelenmektedir:

a- Direnç (R) Plazmidleri: Değişik antibiyotiklere karşı, konak hücrede direnç fenotipi oluştururlar. Genellikle bir antibiyotike karşı direnç gen kodu taşımakla birlikte, çoklu antibiyotik direnç genleri taşıyan plazmidler de saptanmıştır (Forster 1983, Willets 1985).

b- Fertilite (F) Plazmidleri: Konjugal transfer gen kodu taşıyan plazmidlerdir. Bu plazmidleri içeren bakteriler konjugal verici olarak tanımlanmaktadır.

c- Metabolik Plazmidler: Çeşitli maddelerin sentezi ve parçalanmasında rol oynayan enzimlerin gen kodunu içerirler. *Rhizobium* türlerinde azot tesbiti ile *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus* ve *Streptococcus*'lardaki laktоз kullanımdan sorumlu plazmidler gibi.

d- Bakteriyosin Plazmidleri: Diğer bakterilere toksik etki gösteren antibakteriyel maddelerin üretiminden sorumlu plazmidlerdir. *Escherichia coli* ColEl plazmidi gibi (Old ve Primose 1985).

e- Virulenslik Plazmidleri: Bulundukları konakçı hücrenin patojenite özelliğinin gen kodunu taşıyan plazmidlerdir. *Agrobacterium tumefaciens* 'te bulunan Ti plazmidleri gibi (Hardy 1981, Watson vd.1987).

Plazmidlerin, kromozomal DNA'ya oranla çok küçük DNA molekülleri oluşu, basit testlerle saptanabilir fenotipik özelliklerin gen kodunu taşımaları, doğal aktarım yeteneği içermeleri ve birçok bakteride endüstriyel önem taşıyan özellikleri kontrol etmeleri; bu moleküllerin, gen analizleri yanında tür içi ve türler arası aktarım ve ifade vektörleri olarak kullanımı ile amaca yönelik suşların geliştirilmesi gibi çok yönlü genetik araştırmaların temel araçları haline gelmesini sağlamıştır (Watson vd.1987, Brown 1989).

2.4. *Streptococcus lactis*'te Plazmid Kodlu Özellikler

Streptococcus lactis suşlarında; laktوز, sakkaroz, glukoz, mannoz gibi karbonhidratların metabolizması, proteolitik aktivite, nisin üretimi ve dirençliliği, antibiyotik dirençliliği, inorganik iyon dirençliliği, mukoz yapı oluşumu, bakteriyosin üretimi ve faj dirençliliği özelliklerinin, bu suşların içерdiği plazmidlerle ilişkide olduğu fenotipik ve genetik kanıtlarla gösterilmiştir. Bu özelliklerden bazılarının araştırmamızla doğrudan ilişkisi bulunmaması nedeniyle bunlara ait literatür bilgisi "Plazmidler Tarafından Kontrol Edilen Diğer Özellikler" başlığı altında topluca verilmiştir.

2.4.1. Karbonhidrat metabolizması

Laktik streptokoklar gelişme ortamlarında bulunan laktoz, sakkaroz, glukoz, mannoz gibi karbonhidratları ferment ederek laktik asit oluşturma yeteneğindedir. Süt fermentasyon ortamlarında laktik asit üretimi sonucu pH düşmekte, sütün koagülasyonu ve pıhtı oluşması için uygun koşullar yaratılmaktadır (Kandler 1983, Mabbitt vd.1987). Endüstride arzu edilen hızlı asit üretimi, süt şekeri laktoz üzerinden olmakta (Anderson ve McKay 1984a, Mabbitt vd.1987) ve fermentasyon süreçlerinde faj kontaminasyonunun başlıca indikatörlerinden biri, starter kültürlerin asit üretimle-rindeki düşüş olarak bildirilmektedir (Davies ve Gasson 1981, Gasson ve Davies 1984, Huggins ve Sandine 1984, Jarwis 1987).

McKay vd.(1972) *Streptococcus lactis* C2 suşunda laktozu kullanamayan (lac^-) mutantlarının kendiliğinden oluşumu yanında, akriflavin uygulaması ile yüksek oranda Lac^- varyantların meydana geldiğini ve bunların tekrar laktozu fermente edebilir (Lac^+) hale dönüşümlerinin olası olduğunu saptadıkları çalışmalarında, laktoz metabolizmasının plazmidlere bağlı bir özellik olabileceğine işaret etmişlerdir. Lac^+ özellikle *Streptococcus lactis* C2 doğal suşu ile, bu suşun Lac^- varyantlarının plazmid içerikleri karşılaştırıldığında, doğal suusta bulunan 30 Megadalton (MDal.) büyük-lükte bir plazmidin Lac^- varyantlardan elimine olduğu belirlenmiştir (McKay vd.1976, Klaenhammer vd.1978). Genetik analizler sonucu, tüm laktik streptokok suşlarında laktoz

kullanımının plazmidlere bağlı bir özellik olduğu ve laktoz metabolizmasında rol oynayan her üç enzim sistemine ilişkin (fosfoenolpiruvat'a bağlı fosfotransferaz sistemi, β -galaktozidaz, fosfo- β -galaktozid galaktohidrolaz) gen kodunun da plazmidler üzerinde bulunduğu saptanmıştır (McKay 1983). Laktoz kullanımından sorumlu genetik determinantlar, değişik *Streptococcus lactis* suşlarında farklı plazmidler üzerinde olabileceğinin gibi, aynı suş için genetik determinantların farklı büyüklüklerde olabilecekleri de gösterilmiştir (Gasson ve Davies 1980a, Gasson ve Davies 1984, Novel vd. 1988). *Streptococcus lactis* ML3 suşunda 33 MDal., C10 suşunda 43 MDal., ve ML3 suşunda 45 MDal. (Kuhl vd. 1979), *Streptococcus lactis* C2 suşunda yüksek oranda delesyon yapısı içeren 33 MDal. (Gasson 1982), *Streptococcus lactis* LMO232 suşunda ise 36 MDal. (Harlander ve McKay 1984) büyülükle plazmidlerin laktoz metabolizması genlerini taşıdığı belirlenmiştir. Süt fermentasyonlarında büyük önem taşıyan bu özelliğin kromozomal DNA'ya integrasyonu ile stabilizasyonu ya da yüksek sayıda kopya veren vektörler kullanılarak gen etkinliğinin artırılması üzerindeki çalışmalar sürdürülmektedir (McKay ve Baldwin 1978, Harlander vd. 1984, Gasson vd. 1987, Simon ve Chopin 1988, Chopin vd. 1989, DeVos ve Gasson 1989).

Streptococcus lactis suşlarının lac⁻ varyantlarında galaktoz üzerinde gelişimin çok yavaş olduğu, değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiş (McKay ve Baldwin 1974, Le Blanc vd. 1979) ve bu fenotipik değişimin, bu suşlardaki özel galaktoz fosfotransferaz sistemi gen kodunun, laktoz

plazmidi gen lokusunda bulunmasından ileri geldiği saptanmıştır (Maeda ve Gasson 1986, Shimazu-Kodota 1988, DeVos ve Gasson 1989). Lac⁻ varyantlarda tagatoz-6-fosfat yolunun giriş metaboliti galaktoz-6-fosfat engellendiği için, galaktoz Leloir yolu ile metabolize edilmektedir (Crow vd. 1983, Wolfe ve McKay 1983, DeVos ve Gasson 1989).

Le Blanc vd. (1980) sakkaroz kullanımının *Streptococcus lactis* suşlarında laktoz plazmidine bağlı bir özellik olabileceğini, ancak bu özelliğin bağımsız bir plazmid tarafından da kodlanabileceğini belirlemiştir.

Araştıracılar, *Streptococcus lactis* 354-07 suşunda laktoz ve sakkaroz metabolizmasının 32 MDal., *Streptococcus lactis* 11454 suşunda ise sadece sakkaroz metabolizmasının 28 MDal. büyülükte bir plazmide bağlı olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, *Streptococcus lactis* 354-07 suşunda glukoz ve mannoz kullanımı ile ksiloz üzerinde gelişme özelliklerinin 23 MDal.luk bir plazmid tarafından kodlandığını saptamıştır. Ayrıca, Dodd vd.(1990) genetik analizler sonucu *Streptococcus lactis* F15876 suşunda bulunan 30 Kb. büyülükteki plazmidin, sakkaroz metabolizması yanında nisin üretimi ve dirençliliği gen kodunu da taşıdığını belirlemiştirlerdir.

2.4.2. Proteolitik aktivite

Laktik streptokoklar, içerdikleri proteinaz sistemleri ile süt proteinlerini parçalayarak, gelişmeleri için

gerekli azotlu bileşikleri oluşturma yeteneğindedirler. Bu bakterilerin, proteinaz sistemlerini yitirmeleri halinde 21°C'de sütün koagülasyonu için 48 saatte fazla süreye ihtiyaç duydukları belirlenmiştir (Thomas vd.1974, Exterkate 1975). Proteoliz sonucu laktik streptokokların gelişme faktörleri yanında, kazein türevi peptidler ve bazı serbest aminoasitler gibi, ferment süt ürünleri için önemli yapı ve aroma bileşikleri de oluşturulmaktadır (Law ve Kolstard 1983, Casey ve Meyer 1985, Thomas ve Richard 1987).

N Grup streptokoklarda proteinaz sistemlerinin kendiliğinden kaybının çok yüksek olduğu ve transdüksiyon süreçleri sonucu proteinaz aktivitesini yitirmiş varyantları, bu özelliği yeniden kazandığı değişik araştıracılar tarafından bildirilmiştir (McKay ve Baldwin 1974, Molskness vd.1974, Pearce 1974). İlk kez McKay ve Baldwin (1975) *Streptococcus lactis* C2 suşunda 10 MDal. büyülüklükte bir plazmidin proteinaz aktivitesinden sorumlu olduğunu fiziksel bulgularla belirlemiştir. Coğu kez *Streptococcus lactis* suşlarında laktoz metabolizması (Lac^+) ve proteolitik aktivite (Prt^+) özellikleri aynı plazmid tarafından kodlanmaktadır (Klaenhammer vd.1978, Kuhl vd.1979, Gasson 1983 a, Kok ve Vanema 1988). *Streptococcus lactis* C2 suşunda 30 MDal. (Klaenhammer vd.1978), ML3 suşunda 33 MDal., C10 suşunda 40 MDal. ve M18 suşunda 45 MDal. (Kuhl vd.1979), 712 suşunda ise 37.5 MDal. (Gasson 1983a) büyülüklükte plazmidlerin Lac^+ Prt^+ fenotipten sorumlu olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Streptococcus lactis* suşlarında değişik proteinaz enzim sistemlerinin gen kodları kromozomal DNA üzerinde de

bulunabilmekte ve plazmid DNA ile kromozomal DNA'nın interaksiyonuna bağlı olarak regüle edilebilmektedir (Kok ve Vanema 1988, Tynkkynen ve Von Wright 1988).

2.4.3. Faj dirençlilik

Streptococcus lactis suşlarında plazmid kodlu faj dirençlilik mekanizmaları; restriksiyon/modifikasyon, abortif infeksiyon, faj adsorbsiyonunun engellenmesi özellikle ile tanımlanmış sistemler yanında, ısı duyarlı ve faj plak etkinliğinde düşme olmaksızın plak çapının indirgenmesi gibi henüz biyokimyasal süreçleri tanımlanmamış sistemleri içermektedir.

2.4.3.1. Restriksiyon/modifikasyon (kısıtlayıcı/değiştirge) sistemleri

Restriksiyon endonukleazlar, plazmid yada faj gibi yabancı DNA saldırısına karşı konakçı hücrenin doğal savunma mekanizmalarıdır. Bu enzimler, hücreye giren yabancı DNA molekülünü belirli serilerden tanıma ve kesme aktivitesi gösterirler (Watson vd.1987). Modifikatör enzimler ise belirli pozisyonlardaki adenin yada timin bazlarını metilleerek, yabancı DNA molekülünü restriksiyon endonukleaz aktivitesinden korurlar (Kruger ve Bickle 1983, Good 1988). Bu nedenle, laktik streptokoklarda restriksiyon/modifikasyon

sistemleri yalnız faj infeksiyonunu engelleyici rol oynamamakta, aynı zamanda fermentasyon ortamlarını infekte eden fajların konakçı özgüllüğünün genişlemesine de neden olabilmektedir (Klaenhammer 1987). Tüm plazmid tamamlama ve konjugal transfer çalışmaları, laktik streptokoklarda restriksiyon/modifikasyon özelliklerinin her ikisinin de aynı plazmidler tarafından kodlandığını göstermektedir (Gasson 1983b, Klaenhammer 1984a, Klaenhammer ve Sanozky 1986, Vedamuthu ve Neville 1986, Higgins vd. 1989)

Laktik starter olarak kullanılan değişik suşların, kendiliğinden oluşan adsorbsiyonun engellenmesi ve abortif infeksiyon sistemlerini içermeyen varyantlarında, restriksiyon/modifikasyon aktivitelerinin gözlendiği ve bu özelliğin stabil olmadığı bildirilmiştir (Pearce 1978, Limsowtin vd. 1978, Boussamaer vd. 1980). Laktik streptokoklarda belirlenen ilk plazmid kodlu faj dirençlilik mekanizması, restriksiyon/modifikasyon sistemleridir (Sanders ve Klaenhammer 1980, Sanders ve Klaenhammer 1981). Fitzgerald vd. (1982) *Streptococcus cremoris* F suşundan, ScrFI olarak adlandırılan bir tip II restriksiyon endonukleaz enzimini izole ederek, biyokimyasal özelliklerini tanımlamıştır. Chopin vd. (1984) *Streptococcus lactis* IL594 suşunda restriksiyon/modifikasyon aktivitesinin varlığını saptadıkları çalışmada; bu özelliğe ait gen kodunun aynı suşta bulunan biri konjugasyon yeteneğinde 28 Kilobaz (Kb.) diğeri ise konjugasyon yeteneğinde olmayan 31 Kb. büyüklüklerde iki farklı plazmid tarafından da taşıdığını bildirmiştir. Diğer *Streptococcus*

lactis suşlarından ME2'de 48 Kb. büyülüklükte konjugatif bir plazmidin laktoz metabolizması ve abortif infeksiyon özelliklerinin yanında restriksiyon/modifikasyon sisteminin gen kodunu da taşıdığı (Klaenhammer ve Sanozky 1985), KR5 suşunda ise konjugasyon yeteneğinde olmayan 42 Kb.lık bir diğer plazmidin abortif infeksiyon ve restriksiyon/modifikasyon sistemlerini birlikte kodladığı (Froseth vd.1988a) belirlenmiştir.

Streptococcus lactis suşlarında transfer yeteneğinde olmayan plazmidlerin konjugasyon süreçlerinde uygun plazmidlerle birleşerek aktarımına sıkılıkla rastlanmaktadır (Gasson vd.1989). Higgins vd.(1989) *Streptococcus lactis* N1 suşunun transkonjugantlarından izole ettikleri 96 Megadalton (MDal.) büyülüklükteki plazmidin restriksiyon endonukleaz haritasını çıkararak, bu plazmidin doğal suşa bulunan 40 MDal.luk restriksiyon/modifikasyon özelliğinden sorumlu plazmid ile 60 MDal.luk konjugal transfer yeteneğinde, laktoz metabolizması ve nisin dirençlilik gen kodunu taşıyan plazmidin birleşmesi sonucu olduğunu saptamıştır.

2.4.3.2. Abortif infeksiyon

Abortif infeksiyon, faj infeksiyon süreçlerinin engellenmesi olarak tanımlanmaktadır (Duckworth vd.1981). Bu faj direnç tipinde, faj DNA'sının hücreye girişi ve erken gen ifadesi normal olarak meydana gelmekte, ancak geç (ikincil) gen ifadesi engellenmektedir (Kruger ve Bickle

1983). Abortif infeksiyon sistemlerini içeren fenotiplerin morfolojik farklılık gösteren fajlara karşı aynı dirençliliği vermesi, bu tip direnç özelliğini pratikte çok önemli kılmaktadır (Sanders 1988).

Sanders ve Klaenhammer (1984) *Streptococcus lactis* suşlarının abortif infeksiyon özelliğinde faj dirençlilik sistemlerini içerdiğini, *Streptococcus lactis* ME2 suşunda faj aktivite testleri sonucu saptamıştır. Klaenhammer ve Sanozky (1985) bu özelliğin genetik taşıyıcıları üzerinde yaptıkları çalışmada; litik C2 fajına 30°C ve 40°C'de duyarlı olan *Streptococcus lactis* suşlarına, *Streptococcus lactis* ME2 suşundan 48 Kb. büyülüklükte pTR2030 plazmidinin aktarılması halinde, transkonjugantlarda 30°C'de faj dirençli fenotipin olduğu, bununla beraber 40°C'de faj duyarlılığında bir değişme olmadığı belirlenmiştir. Dao ve Ferretti (1985) *Escherichia coli* pSA3 evrensel vektör sistemlerini kullanarak pTR2030 plazmidi restriksiyon endonuklease fragmentlerinin faj duyarlı konakçı hücrelerde ifadesini (expression) sağlamış ve bu plazmidin 13.6 Kb. büyülüklükte BglII fragmentinin ısı duyarlı abortif infeksiyon özelliğinden sorumlu olduğunu tesbit etmişlerdir. pTR2030 plazmidinde abortif infeksiyon özelliğinin ısı duyarlı olmasına rağmen, *Streptococcus cremoris* M43 ve HP suşlarına aktarımı ile elde olunan transkonjugantlarda homolog fajlara karşı 40°C'de de dirençliliğin stabil olduğu saptanmıştır (Sing ve Klaenhammer 1986). Jarwis ve Klaenhammer (1987) *Streptococcus cremoris* R1 suşuna pTR2030 plazmidinin aktarımı ile faj dirençliliğin indüksiyonu yanında, bu susta

temperent halde bulunan $r_1 t$ fajının mitomisin C uygulaması ile litik hale dönüşümünün de engellendiğini belirlemiştir.

Daly ve Fitzgerald (1987) *Streptococcus lactis* MG1363 suşunda 46 Kb. büyülüklükte bir plazmidin abortif infeksiyon sistemlerinin gen kodunu taşıdığını ve bu plazmidin *Streptococcus lactis* 811 yada *Streptococcus cremoris* UC653 suşlarına aktarımı halinde faj 712'ye karşı tam dirençlilik olduğunu örneklemiştir. *Streptococcus lactis* KR5 suşundan 42 Kb.lik abortif infeksiyon faj dirençlilik gen kodunu taşıyan plazmidin, faja duyarlı suşlara ya da plazmidleri giderilmiş suşlara transformasyonu ile, prolate c2, st15 ve izometrik skl gibi değişik morfolojik yapı gösteren tüm fajlara karşı dirençli transformantlar elde edilmiştir (Froseth vd.1988a).

pTR2030 plazmidinin abortif infeksiyon yanında, restriksiyon/modifikasyon sistemi ve laktoz metabolizması gen kodunu da taşıması ve yüksek sıklıkta transfer yeteneğinde olması, faj dirençli suş geliştirme programlarında bu plazmidin kullanımına öncelik kazandırmaktadır (Jarvis ve Klaenhammer 1986, Sanders vd.1986, Gautier ve Chopin 1987). Günümüzde, laboratuar koşullarında oluşturulmuş stabil pTR2030 transkonjugantları yaygın bir şekilde süt endüstri-sinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Klaenhammer 1987, Hill vd.1989a).

2.4.3.3. Faj adsorbsiyonunun engellenmesi ve tanımlanmamış direnç sistemleri

Laktik streptokoklarda faj tipine özgül alماç bölgelerde oluşan bir değişim sonucu, fajların yüzeylerde tutunmasının engellenmesi; hem hücresel fonksiyonların ikincil bir etkisi sonucu meydana gelebilmekte ve hem de induksiyonu plazmid kodlu genler tarafından kontrol edilen bir özelilik olabilmektedir (King vd.1983, Sanders ve Klaenhammer 1983, 1984, Sijtsma vd.1988). Bu bakterilerde faj adsorbsiyonunun engellenmesi yaygın bir faj direnç sistemi olmakla birlikte, genetik determinantları üzerinde yeterli bilgi henüz sağlanamamıştır (King vd.1983, Sanders 1988).

İlk kez Sanders ve Klaenhammer (1983) tarafından *Streptococcus lactis* ME2 suşunda 48 Kb. büyülüklükte bir plazmidin faj adsorbsiyonunun engellenmesi özelliğinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Araştıracılar, 4 farklı faja karşı %40 oranında adsorbsiyon sıklığı ve 10^{-9} plak etkinliği veren doğal sustan, 48 Kb.lık plazmidin giderilmesi ile oluşturdukları restriksiyon/modifikasyon aktivitesine sahip varyantlarda adsorbsiyon sıklığının %99.7, plak etkinliğinin ise 10^{-7} 'ye yükseldiğini belirlemişlerdir. Dunny vd.(1988) *Streptococcus lactis* LM2301 suşunda faj adsorbsiyonunun engellenmesi direnç gen kodunu taşıyan 90 Kb. büyülüklükte bir plazmidin, bu suşun hücre duvarında bulunan antijen nitelikli proteinlerle ilişkisi üzerine yaptıkları çalışmada; söz konusu plazmidin varlığında, faj almaç bö-

gelerinde lokalize olan 16 ve 20 kilodalton (Kd.)luk iki özel proteinin üretildiğini ve 22 Kd.luk bir başka proteinin üretiminin engellendiğini saptamıştır. Bu araştırma dışında, halen plazmidlerle doğrudan ilişkisi belirlenememiş olan adsorbsiyonun engellenmesi şeklindeki faj direnç özelliklerinin; laktik streptokoklarda kromozomal DNA üzerinde meydana gelen çerçeve kayması (=frame-shift) mutasyonlar yolu ile oluşturulabildiği, bazı durumlarda plazmid DNA'sı ile kromozomal DNA'nın interaksiyonuna bağlı olarak da regüle edilebildiği ileri sürülmektedir (Klaenhammer 1987, Sanders 1988).

Streptococcus lactis suşlarında aktivite özellikleri henüz tanımlanmamış plazmid kodlu faj dirençlilik sistemleri; ısı duyarlı sistemler (Jarwis ve Klaenhammer 1986, Hill vd.1989b, McKay vd.1989) ile faj plak etkinliği indirgenmeden plak çapının küçülmesi (Klaenhammer ve Sanozky 1985, Steenson ve Klaenhammer 1985, Steele vd.1989) olarak bildirilmiştir. Bu direnç sistemlerinin gen kodu, adsorbsiyonun engellenmesi, restriksiyon/modifikasyon ya da abortif infeksiyon özelliklerinden sorumlu plazmidler üzerinde fakat değişik lokuslarda bulunmaktadır (Klaenhammer ve Sanozky 1985, Hill vd.1989b, Steele vd.1989). Isı duyarlı faj direnç sistemleri, 28°C ve 32°C'de aktif olmakla birlikte, 37°C ve yukarısı gibi maksimum gelişme sıcaklığına yakın ortamlarda özelliklerini sürdürmemektedir (Sanders ve Klaenhammer 1984, Jarwis ve Klaenhammer 1987). Hill vd. (1989b) *Streptococcus lactis* ME2 suşunda pTR2030 plazmidinin kendiliğinden delesyonu (fragment kaybı) sonucu,

13.6 Kb. büyüklükte Bgl II bölgesinden 11.5 Kb.luk fragmentin eksilmesi ile, oluşan varyantlarda restriksiyon/modifikasyon ve ısı duyarlı faj dirençlilik sistemlerinin kaybolduğunu gözlemişler ve delesyon fragmenti içerisinde bulunan 3 Kb.lik lokusun, yalnız ısı duyarlı sistemden sorumlu gen kodunu taşıdığını belirlemiştir.

Faj plak etkinliğinde indirgenme olmaksızın yalnız plak çap büyülüğünün indirgenmesi tipindeki direnç sistemleri, birçok araştırmacı tarafından *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* suşlarında örneklenmiştir (Snook ve McKay 1981, Snook vd.1981, DeVos vd.1984, Laible vd.1987, Jarwiss 1988, Murphy vd.1988). Steele vd.(1989) bu faj direnç sistemini içeren değişik laktik streptokok suşlarından elde edilen farklı büyülükleredeki plazmidlerin (*Streptococcus lactis* suşları; 1107 ve WM4'ten 88 MDal., *Streptococcus cremoris* suşları; UC653'ten 50 MDal., C3'ten 34 MDal. ve EB7'den 56 MDal.) tümünün 4.1 Kb.luk restriksiyon fragment bölgelerinde birbirleriyle tam homoloji verdiklerini saptamışlardır. Araştırmacılar, sadece bu fragmentin delesyonunu içeren plazmidlerin, bulundukları konakçında faj plak çapının indirgenmesi özelliğini kontrol edeceklerini bildirmiştir.

2.4.4. Plazmidler tarafından kontrol edilen diğer özellikler

Streptococcus lactis suşlarında ayrıca, inorganik iyon dirençlilik (Efstathiou ve McKay 1977), nisin üretimi ve dirençlilik (Gasson 1984, Gonzales ve Kunka 1985), bakteriyosin üretimi (Scherewitz vd.1983) ve antibiyotik direnç özelliği (Dobrzanski vd.1982) ile mukoz yapı oluşumunun da (Vedamuthu ve Neville 1986) plazmidler tarafından kodlanabilecegi saptanmıştır.

Birçok *Streptococcus lactis* suşu, gram pozitif bakterilere karşı etkili, peptid yapıda bir antibiyotik olan nisin üretimi ve/veya dirençlilik özelliklerine sahiptir (Fuchs vd.1975, Froseth vd.1988b, Klaenhammer 1988). Nisinin, gıda bozulmalarına neden olan bakterilerde spor oluşumu (Hurst 1981), *Clostridium botulinum*, *Lysteria monocytogenes* gibi gıda zehirlenmesi ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engelleme yeteneği (Taylor ve Somers 1985, Bonkerroum ve Sandine 1988) bu antibiyotiğin gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanımını teşvik etmektedir (Klaenhammer 1988). Değişik araştırmacılar, laktik streptokoklarda nisin üretimi ve direnç özelliğinin stabil olmadığını (Hurst 1966, Kozak 1974) ve suştan suşa değişebilen büyülüklüklerde plazmidlerin kontrolü altında bulunduğuunu saptamışlardır (Gasson 1984, Gonzales ve Kunka 1985). Ayrıca, Dodd vd.(1990) *Streptococcus lactis* F15876 suşunda nisin üretimi ve sakkaroz metabolizmasından sorumlu plazmid üzerinde nisin üretimi gen kodunun, kromosomal DNA üzerinde çok sayıda kopyası bulunan IS904 insertion

elementleri ile birleşik olduğunu saptamışlar ve bu sonuctan hareketle nisin genlerinin kromozomal DNA kökenli olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Scherewitz vd.(1983) *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*'te 88 MDal. büyüklükte konjugatif bir plazmidin bakteriyosin üretimi özelliğinden sorumlu olduğunu saptamış ve *Streptococcus lactis* suşlarına aktarımı gerçeklestirmiştir. Gram pozitif bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi gösteren laktotrepsinler gibi yakın geçmişte laktik streptokoklarda tanımlanmış bakteriyosinlerin ve bakteriyosin benzeri proteinlerin genetik determinantları üzerinde ise henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır (McKay ve Baldwin 1984, Scherewitz ve McKay 1987, Van Belkum vd.1989).

Efstathiou ve McKay (1977) *Streptococcus lactis* C2 suşundan 30 MDal. büyüklükte bir plazmidin giderilmesiyle oluşturdukları lac⁻ varyantlarda, lac⁺ doğal suşa oranla; arsenit, arsenat ve kromat iyonlarına karşı duyarlılığın ve bakır iyonlarına karşı dirençliliğin, yüksek düzeyde arttığını belirlemiştir. Aynı araştırmada lac⁺ transdüktantlarda 30 MDal.luk plazmidin, transdüksiyon süreçlerine uyum için küçüldüğü saptanmış ve büyük bir olasılıkla delesyon bölgesinin bakır duyarlılık gen lokusunda oluşmasından dolayı, arsenit, arsenat ve kromata karşı dirençliliğin plazmid aktarımı ile sağlanabilmesine rağmen, bakır iyonlarına duyarlılığın yeniden oluşturulmadığı bildirilmiştir.

N grup streptokoklarda, mastitis tedavisinde kullanılan penisilin gibi β- laktam antibiyotikler dışında yük-

sek düzeyde antibiyotik dirençlilik sık rastlanan bir özellik değildir (Reinbold ve Reddy 1974, Wulf ve Sandine 1983, Orberg ve Sandine 1985, Parada ve De Giachi 1986). Bugüne deðin bu bakterilerden sadece *Streptococcus lactis* 71 suþunda 4.5 Kb. büyülüklükte bir plazmidin kanamisine dirençlilikten sorumlu gen kodunu taşıðığı saptanmıştır (Dobrzanski vd.1982). Bunun dışında Sihna (1986) *Streptococcus lactis* C2 ve ML3 suþlarında yüksek düzeyde streptomisin duyarlılığının 5.5 MDal. büyülüklükte bir plazmidin varlığında teþvik edildiðini ve bu plazmidin doğal suþlardan giderilmesi hâlinde antibiyotik dozuna direncin 20-100 kat arttığını belirlemiþtir. Bu bulgular, kromozomal DNA üzerinde kodlanan antibiyotik dirençlilikten sorumlu genlerin ifade bulmasının plazmidler tarafından engellenmesinin de olası bir durum olduğuna işaret sayılmaktadır.

Ískandinav ülkelerinde üretilen fermentle süt ürünü Viili'de mukoz yapının oluþumu arzu edilen bir özelliklektir. Mukoz yapý, laktik streptokokların glukoprotein ya da polisakkarit yapıda bir kapsül materyali tarafından oluþturulmaktadır (Macura ve Downsley 1983, Vedamuthu ve Neville 1986, Neve vd.1988). Wright ve Tynkkynen (1987), genellikle *Streptococcus cæmoris* suþları için tanımlanan bu özelliðin, *Streptococcus lactis* MG1614 suþunda da plazmidler tarafından kodlandığını saptamıştır. Araştıracılar, bu suþun plazmidleri giderilmiş mutantlarına, doğal suþtan izole etlikleri 30 MDal.luk plazmidin transformasyonu ile yeniden mukoid fenotiplerin meydana geldiðini bildirmiþlerdir.

Streptococcus lactis subsp. *diacetylactis*'in, *Streptococcus lactis* suşlarından temel ayırcı özelliği olan sitrat metabolizması da, bu bakterinin bütün suşlarında belirlenen 5.5 MDal. büyüklükte bir plazmid tarafından kodlanmaktadır (Kempler ve McKay 1979, Gasson vd.1989).

2.5. *Streptococcus lactis*'te Genetik Aktarım Sistemleri

2.5.1. Transdüksiyon

Transdüksiyon, kromozomal ya da kromozom dışı genetik materyalin bakteriyofajlar tarafından, bir bakteriden diğerine aktarımına olanak sağlayan süreçlerle karakterize edilmektedir (Malke 1972). Laktik streptokoklarda transdüksiyon, lizogen suşlarda bulunan temperent fajların litik çevrimi sonucu, ya da doğrudan litik fajlar aracılığı ile meydana gelmektedir (Jarvis 1978, Davies ve Gasson 1981).

McKay ve Baldwin (1973) laktozu metabolize edebilen (Lac^+) *Streptococcus lactis* C2 suşunun içerdiği temperent fajları ultraviyole ışık uygulaması ile indukleyerek oluşturdukları lizatlardan, laktوز metabolizması yeteneğini yitirmiş (Lac^-) mutantlara bu özelliğin transdüksiyonunu gerçekleştirmiştir. Molskness vd.(1974) ise aynı suşa laktoz metabolizması ile birlikte proteolitik aktivite özelliğinin de (Prt^+) transdükte olduğunu, ancak Lac^+ transdüktantlarda proteolitik aktivitenin, doğal suşa oranla önemli

ölçüde indirgendiğini bildirmişlerdir. Proteolitik aktivitesi indirgenmiş Lac⁺ transdüktantların analizi sonucu, bunların doğal suşta bulunmayan iki farklı plazmid içerdikleri (McKay vd.1976) ve bu plazmidlerin laktوز plazmidi türrevleri olduğu (Klaenhammer vd.1978) belirlenmiştir.

Streptococcus lactis C2 suşunda temperent halde bulunan değişik baş büyülüğünde iki fajın da transdüksiyonda rol oynaması nedeniyle; 33 MDal. büyülükteki laktوز ve proteinaz özellikleri gen kodunu taşıyan plazmidin bu faj DNA'larına uyum için bazen 7.4 MDal. bazen de 6.2 MDal.luk fragmentleri delesyona uğramakta, böylece oluşan transdüktantlar değişik büyülüklerde plazmidleri içerebilmektedir (McKay vd. 1976, Klaenhammer vd.1978). Laktik streptokoklarda transdükte plazmidlerin yeni konakçida kromozoma integre olmaları halinde çoğu kez laktوز plazmidi üzerinde kodlu olan proteolitik aktivitenin indirgenmiş olduğu, bazı durumlarda da laktوز gen lokusunda meydana gelen delesyonlardan dolayı, plazmid aktarımı sağlanmasına rağmen gen ifadesinin yapılamadığı saptanmıştır (McKay ve Baldwin 1978, Davies ve Gasson 1981, Davies ve Gasson 1983). *Streptococcus lactis* 712 suşundan, temperent faj ØT712'nin plazmid içermeyen suşlara transdüksiyonu ile; Lac⁺, Prt⁺ ve Lac⁺, Prt⁻ fenotiplerin oluştuğu (Gasson 1982), her iki tip transdüktantın da aynı plazmidi içermesine rağmen gen ifadesinin değişiminin, 30 MDal. büyülükteki plazmidin proteinaz gen bölgesinde tanımlanan delesyon yapısından ileri geldiği (Gasson 1983a) belirlenmiştir.

Transdüksiyon süreçlerinde plazmidlerin yaygın olarak delesyona uğraması ve pCK1 gibi 5.5 Kb.lık küçük plazmid vektörlerinin faj baş yapısı içinde paketlenememesi nedenleriyle, bu yöntem laktik streptokoklarda gen aktarımı için kullanışlı değildir. Ancak gen bağlantı haritalarının yapımında transdüksiyon sistemlerinden büyük ölçüde yararlanılmaktadır (Gasson ve Anderson 1985, Fitzgerald ve Gasson 1988).

2.5.2. Konjugasyon

Bakteri hücrelerinin fiziksel teması ile genetik materalın verici hücreden alıcı hücreye tek yönlü aktarım aşamalarını içeren konjugasyon sistemleri, değişik bakteri grupları için tanımlanmıştır (Willets 1984, Willets ve Wilkins 1984). Konjugasyon, genel biyokimyasal ve genetik özellikleri bakımından tüm bakteri grupları arasında büyük ölçüde benzerlikler göstermekte, ancak gram negatif bakterilerde verici hücrelerin tanınmasına olanak sağlayan seks pilusları, gram pozitif bakterilerde bulunmamaktadır (Willets 1984). Bu genetik aktarım sistemi genellikle plazmid kodlu genler için geçerli bir özellik olmakla beraber, bakterilerde konjugatif transpozonların varlığı da belirlenmiştir (Le Blanc vd.1978, Clewell ve Gavron-Burke 1986, Fitzgerald vd.1987).

Streptococcus lactis suşlarında ilk kez laktoz metabolizması özelliğinin (Lac^+) konjugatif plazmidler tarafından-

dan aktarılabilir bir özellik olduğu saptanmıştır (Kuhl vd. 1979, Gasson ve Davies 1979, Gasson ve Davies 1980b, Gasson ve Davies 1980c). Gasson ve Davies (1979) tarafından, *Streptococcus lactis* C2 suşunda doğal konjugasyon sikliği, verici hücre başına 10^{-5} - 10^{-9} arasında bulunmaktadır. Laktik streptokoklarda konjugasyon sikliğinin, bu bakterilerin bazı suşlarında saptanan, gelişme ortamlarında agregat oluşturma özellikleri (Agg^+) ile yakından ilişkili olduğu, verici hücrelerin katı ve sıvı ortamlarda agregasyonu sağlandıktan sonra, alici-verici hücre karışımının membran filtreler üzerinde geliştirilmesi ile 10^{-1} - 10^{-3} gibi yüksek oranlarda transkonjugant oluşturabileceği belirlenmiştir (Gasson ve Davies 1980b). Agregasyon fenotipleri katı ortamlarda normal kolonilerden daha sert ve yoğun koloni morfolojisi göstermekte ve ortamdan aşısı gözü ile alındıklarında bütünlüklerini korumaktadır. Sıvı ortamlarda ise yapışkanlıklarından dolayı yumaklanmış yapı veren aggregatif koloniler, santrifüj işleminden sonra karıştırıcılarla tamamen çözülememektedirler (Gasson ve Davies 1980b, Walsh ve McKay 1981). *Streptococcus lactis* suşlarında diğer etkili konjugasyon yöntemleri olarak, yüksek yoğunluktaki alici-verici hücre karışımının süt gibi sıvı ortamlar veya katı agar ortamlarında beraber geliştirilmesi (McKay vd. 1980) yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

Streptococcus lactis ML3 suşundan, plazmidleri giderilmiş *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* mutantlarına, laktوز metabolizması ve proteolitik aktiviteden sorumlu 33 MDal. büyülüklükteki plazmidin (pSK08) aktarımı

sonucu; transkonjugantların %87.5'nin Lac⁺, Agg⁺, %12.5'nin de Lac⁺, Agg⁻ fenotipte olduğu saptanmıştır (Walsh ve McKay 1981). Lac⁺, Agg⁺ fenotipteki transkonjugantların doğal suusta bulunmayan 60 MDal., Lac⁺, Agg⁻ transkonjugantların ise 33 MDal.luk pSK08 plazmidini içерdiği belirlenmiştir (Walsh ve McKay 1982). 60 MDal. büyüklükteki plazmidin restriksiyon endonukleaz enzim analizleri ile pSK08 ve pSR01 plazmidinde hücre agregasyonu yanında yüksek sıklıkta konjugasyon (10^{-1}) özelliklerinin gen kodunu taşıyan 27 MDal. luk fragmentin birleşmesi sonucu oluştugu bildirilmiştir (Walsh ve McKay 1982, Anderson ve McKay 1983a). Anderson ve McKay (1984a) 60 MDal.luk plazmidi içeren transkonjugantların bazen Lac⁺ Agg⁻ fenotip vermesinde, iki plazmidin birleşmesi esnasında hücre agregasyonunu yöneten gen bölgesinde meydana gelen delesyonunun rol oynadığını, bu gen bölgesinin fiziksel analizi ile örneklemiştir.

Laktik streptokoklarda bulunan bazı konjugatif plazmidler, yüksek sıklıkta transfer genleri taşımaktadır (Snook ve McKay 1981, Gasson 1983a). *Streptococcus lactis* suslarında kendi aktarımlarını yönetme yeteneğinde olmayan kromozom dışı DNA moleküllerinin, bu plazmidlerle doğal koşullarda birleşerek konjugal hareketliliklerinin sağlanabildiği, birçok araştırıcı tarafından belirlenmiştir (Chopin vd.1984, Kondo ve McKay 1985, Sing ve Klaenhammer 1986, Higgins vd.1989, Priebe ve Lacks, 1989). Konjugasyon süreçleri sonrası genellikle stabil olmayan yapılar olarak ortaya çıkan birleşik plazmidler (=Co-integre) konakçı susların genel rekombinasyon sistemleri tarafından kontrol

edilememektedir (Anderson ve McKay 1983a, Anderson ve McKay 1984b). Hill vd. (1987) streptokokkal transpozon Tn919'un *Streptococcus lactis* pMG600'a aktarımından sonra, bu suşun verici olarak kullanılması halinde, laktoz plazmidi konjugasyon sikliğinin 100 - 1000 kez arttığını saptamışlardır. Araştıracılar Tn919'un laktoz plazmidi üzerinde yüksek sıkılıkta konjugasyon şeklindeki etkisini, plazmid-transpozon birleşik yapısı oluşturmadan gösterdiğini bildirmiştir. Polzin ve Shimazu-Kadota (1987) tarafından *Streptococcus lactis* ML3 suşunda konjugasyon süreçlerinde birleşik yapı oluşturan pSK08 ve pRS01 plazmidlerinin baz dizileri üzerinde yapılan çalışmada; bu plazmidlerin birleşme bölgelerinde birbirlerini tamamlayıcı DNA dizileri içeriği ve laktoz metabolizması gen kodunu taşıyan pSK08 üzerinde, birleşik plazmid yapısı oluşturan eşlenen 808 baz çifti büyülükte bir insert serinin (ISS1S) varlığı tanımlanmıştır. *Streptococcus lactis* pLP712 suşunda da laktoz plazmidi üzerinde 3 Kb. büyülükte ISS1S benzeri bir insert serinin yüksek sıkılıkta konjugal transfer gen kodunu taşıdığı belirlenmiş, ancak bu plazmidin konjugasyon süreçlerinde herhangi bir plazmidle birleşik yapı oluşturmamasından dolayı, seks faktörlerinin kromozomal DNA kökenli olabileceği ileri sürülmüştür (Fitzgerald ve Gasson 1988).

Higgins vd.(1989) *Streptococcus lactis* ME2 suşunda laktoz metabolizması ve nisin dirençlilik özelliklerinin gen kodunu taşıyan 71.7 Kb. büyülükte plazmidin (pTR1040) aktarımının, aynı suşun içeriği 28.4 Kb.lık restriksiyon/modifikasyon ve yüksek sıkılıkta transfer özelliklerinden

sorumlu plazmid ile birleşmesi sonucu sağlandığını belirlemişlerdir. Araştıracılar, birleşik plazmid yapısında rol oynayan 3.3 Kb.lık insert serinin pSK08 üzerinde özel bölgelerle oluşturduğu rekombinasyonlardan dolayı, bu plazmidin gen ifadesinin olumsuz yönde etkilendiğini ve transkonjugantlarda restriksiyon/modifikasyon aktivitelerinin değişim gösterdiğini bildirmiştir. Jarwis (1988)

Streptococcus lactis subsp. *diacetylactis* kökenli 106 Kb. büyülükte birleşik plazmidin aktarıldığı *Streptococcus lactis* TLM0230, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* T4942 ve *Streptococcus cremoris* T4854 suşlarının her üçünü de verici olarak kullanarak, bu suşlarda doğal koşullarda oluşturulamayan 1.6×10^{-2} - 1×10^{-5} oranlarıyla konjugasyon sikliği elde etmiştir. Aynı çalışmada DNA homolojisi ve restriksiyon analizi yöntemleri kullanılarak 106 Kb.lık plazmidin; laktoz metabolizması, ısı duyarlı faj dirençlilik ve yüksek sıklıkta transfer genlerini içeren pAJ2074 ile laktoz metabolizmasından ve ısı duyarlı faj dirençlilik sistemlerinden sorumlu pAJ3060 plazmidlerinin birleşmesi ile olduğu saptanmıştır. Bu birleşik plazmidin, peynir yapımında kullanılan endüstriyel laktik starter suşlara aktarımı halinde, peynir teknolojisinde kullanılan sıcaklık derecelerinde, konjugantların peyniraltı suyundan izole edilen değişik morfolojilerdeki tüm fajlara karşı dirençli hale geldiği belirlenmiştir (Jarwis vd.1989). Lelie vd. (1990) tarafından *Streptococcus lactis* suşlarında doğal olarak bulunmayan ve ayrıca konjugasyon yeteneğine sahip olmayan plazmidlerin invivo süreçlerde konjugal hareketli-

likleri üzerine yapılan çalışmada; *Streptococcus agalactiae* kökenli, tetrasiyklin dirençlilik gen kodu içeren pMV158 plazmidi *Streptococcus lactis* JLL403 suşuna transformasyon yöntemiyle aktarılmış, elde edilen transformantlar verici suş olarak kullanılmış ve bu plazmidi içermeyen suşlara konjugasyonu sağlanmıştır.

Laktik streptokoklarda tür içi ve türler arası gen aktarımlarında genel bir sistem olan konjugasyon, oldukça karmaşık aşamaları içermekte ve değişik suşlarda genetik determinantlarına bağlı özgüllük gösterebilmektedir (Tsai ve Sandine 1987, Lelie 1989, Hayes vd.1990a). Bugüne dek yüksek sıklıkta transfer vericilerinin genel özelliği olarak bildirilen agregasyon yeteneğinin bazı suşlarda bulunmasına rağmen, verici suş olarak kullanılmaları halinde, konjugasyon oranının çok yüksek olduğu saptanmıştır (M.Gasson 1990, sözlü görüşme). Plazmidlerin birleşik transferinde rol oynayan sistemlerin genetik orijini ve regulasyonu üzerinde ise çok az bilgi bulunmaktadır. Hayes vd.(1990a) *Streptococcus lactis* ILL404'te pMV158 plazmidinin konjugal hareketliliğinin hem transfer yeteneğinde plazmidlerle birleşik yapı oluşturarak, hem de kromozomal DNA tarafından sağlanabildiğini belirlemiştir. Araştırmacılar birleşik yapı oluşumunun, yapısal gen kodu pMV158 üzerinde bulunan plazmid rekombinasyon enzimleri aracılığıyla katalize edildiğini bildirmiştir.

Streptococcus lactis suşlarında konjugatif plazmidlerin, konjugal transfer yeteneğinde olmayan plazmidlerle

doğal koşullarda birleşerek aktarımlarını gerçekleştirmeleri yanında; değişik faj dirençlilik sistemleri, laktoz ve sakkaroz metabolizması, nisin üretimi ve dirençlilik gibi endüstriyel öneme sahip özelliklerini taşıyan plazmidlerin birleşmeksızın beraber transferi ve değişik faj dirençlilik sistemlerinin genetik taşıyıcısı durumundaki farklı plazmidlerin aynı suşa aktarımı ile arzu edilen güçlü fenotiplerin geliştirilmesinin mümkün oluşu (Jarvis 1988, Thompson 1988, Lelie 1989, Lelie vd.1990), bu bakterilerde konjugal transfer sistemini kullanışlı bir gen aktarım yöntemi haline getirmektedir.

2.5.3. Transformasyon

Serbest DNA moleküllerinin alıcı hücrelere aktarımına olanak sağlayan genetik değişim süreçlerine transformasyon adı verilmektedir (Dobrzanski 1972). Bakteri hücrelerine özel almaç bölgelerden tutunan serbest DNA molekülü, hücre membranı üzerinde bulunan diffüze olabilir transformasyon faktörleri ve otolisin'ler gibi membran geçirgenliğini artıran proteinler aracılığı ile hücreye dahil olmaktadır (Smith vd.1981, Sounders vd.1984). Bu aşamadan sonra, yabancı DNA molekülü ya kromozomal DNA ile rekombine olmakta, ya da hücrede bağımsız bir replikon olarak ifade bulunmaktadır (Sounders vd.1984). Transformasyon sistemleri, özellikle kriptik plazmidlerin hücresel işlevlerinin sap-

tanmasında önemli ölçüde kolaylıklar sağlamaktadır (Simon vd.1985).

Laktik streptokok suşları, DNA moleküllerinin alıcı hücrelere geri dönüşümsüz tutunmaları ve penetrasyonları için zorunlu transformasyon faktörlerini içermeyenlerinden, bu bakterilerde doğal transformasyon sistemleri engellenmiştir (Kondo ve McKay 1982, Harlander ve McKay 1984, Mercenier vd.1987, Mercenier ve Chassy 1988, Holo ve Nes 1989). Kondo ve McKay (1982) mutanolisin uygulaması ile oluşturdukları *Streptococcus lactis* ML3 suşunun protoplastlarına, polietilen glikol içeren ortamlarda 33 MDal. büyük-lükteki laktoz plazmidinin (Lac^+) transformasyonunu örneklemiş ve plazmid DNA moleküllerinin mikrogramında (μg) 8.5 sıklıkta lac^+ transformant meydana geldiğini saptamıştır. Laktik streptokoklarda yapay koşullarda transformasyonun gerçekleştirildiği bu ilk çalışmadan sonra, aynı araştırmacılar transformasyon koşullarının optimizasyonunda polietilen glikol miktarı ile regenerasyon ortamlarının etkili olduğunu, ML3 suşu için tampon ortamlarında %22.5 oranında polietilen glikol kullanılması ve protoplast regenerasyonun M17 glukoz üst agar ortamında teşviklenmesi sonucu 10-100 kat daha yüksek oranda transformant elde edilebileceğini bildirmiştir (Kondo ve McKay 1984).

Protoplast transformasyonu yöntemlerinde; protoplastları elde edilecek hücrelerin gelişme fazı, protoplastların oluşturulmasında kullanılan maddelerin miktarı, polietilen glikol'ün miktarı ve uygulama süresi, protoplast tamponlarının osmotik stabilité gücү, Ca^{++} gibi hücre

membranının geçirgenliğini artırıcı iyonlar ve etkili regenerasyon ortamları önemli rol oynamaktadırlar (Kondo ve McKay 1984, Simon vd.1985, Wright vd.1985, Simon vd.1986, Mercenier vd.1987, Badii vd.1989). Wright vd.(1985) *Streptococcus lactis* MG1299, MG1614 ve VS118 suşlarında, protoplast tamponlarına Ca^{++} iyonlarının ilavesi ile bu iyonları içermeyen ortamlara oranla 10 kez daha fazla transformant oluşturulabileceğini belirlemişlerdir. Simon vd.(1986) *Streptococcus lactis* IL1403 suşunun, erken logaritmik gelişme fazı kültürlerine, tampon ortamlarda 10 mg/ml. lizozim uygulamasıyla elde ettikleri protoplastların, toplam hacimlerinin %30'u oranında polietilen glikol ile 2 dk. teşviklenmesi halinde M17-glukoz regenerasyon ortamlarında, 5.5 Kb. büyüklükte pIL204 plazmidinin $\mu g.$ 'nında 5×10^6 gibi çok yüksek sıklıkta transformant elde etmeyi başarmışlardır. Erken logaritmik fazda bakteri kültürleri ozmotik basınçlara çok dirençlidirler ve değişik fizyolojik koşullara göre bu evre farklılık göstereceğinden her sus için kendi koşullarında belirlenmesi önem taşımaktadır. Sanders ve Nicholson (1987) *Streptococcus lactis* LM0230 suşunda plazmid transformasyonu ve faj DNA'sının transfeksiyonunun, ısı şoku uygulanan hipertonik ortamlarda daha yüksek bulduğunu, ancak bunun LM0230 suşuna has bir özellik olabileceğini bildirmiştir. DNA moleküllerinin transformasyonu ya da transfeksiyonunda etkili diğer faktörler; konakçı hücre restriksiyon/modifikasyon sistemleri ve plazmid uyuşmazlık gruplarıdır (Lelie 1987, Lelie 1989). Lelie vd. (1988) antibiyotik marker plazmidi olan pKGV110'un *Bacillus*

subtilis'ten değişik laktik streptokok suşlarına transformasyonunun sağlanmasına rağmen, *Streptococcus lactis* MG1210 ve *Streptococcus cremoris* Wg2 suşlarına aktarılamadığını saptamışlardır. pKGV110'un bu suşların içерdiği plazmidler ile homolojileri belirlenerek, her iki susta da birer değişik plazmidin pKGV110 ile yüksek oranda homolog olduğu gösterilmiştir.

Streptococcus lactis suşlarında yüksek transformant oranı elde etmek amacıyla elektroporasyon tekniklerinden de yararlanılmaktadır. Elektroporasyon yönteminde esas; serbest DNA molekülleri ve hücre karışımılarına, stabil ozmotik ortamlarda ve çok kısa sürelerde yüksek elektrik akımı uygulayarak, porozitenin artırılması suretiyle DNA moleküllerinin membran yapılardan geçişini kolaylaştırmaktır (Harlander 1987, Fiedler ve Wirth 1988). Harlander (1987) 19 Kb. büyüklikte pSA3 plazmidi ve *Streptococcus lactis* LM0230 suşu protoplastlarına, stabil ozmotik ortamlarda 3-6 salise (ms) süre ile 8000 volt elektrik akımı uygulayarak, plazmid DNA'nın mikrogramında hem monomer hem de dimer formları için 10^4 oranıyla transformant oluşumunu sağlamıştır. Powell vd. (1988) ise *Streptococcus lactis* LM0230 ve C6 suşlarına 7.4 Kb.lik pMU1328 plazmidinin 6250 voltta etkili transformasyonu yanında laktik streptokok fajları c2 ve c6A DNA'larının transfeksiyonunun da bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilebileceğini belirlemiştir, DNA moleküllerinin mikrogramı başına; 1×10^4 - 5×10^5 arası sıklıkta transformant meydana geldiğini bildirmiştir. McIyntre ve Harlander (1989) *Streptococcus lactis* LM0230 suşunda, büyük moleküller ağır-

liktaki plazmidler için uygun elektroporasyon koşullarının araştırıldığı çalışmalarında; elektroporasyon karışımılarının 10^{10} gibi yüksek hücre yoğunluğundaki kültürlerden hazırlanması ve 5 ms. süre ile 3000 volt elektrik akımı uygulanması halinde, 9.8-30 Kb. arası büyülüklüklerde plazmidlerin transformasyon sıklığının DNA'nın mikrogramında 10^3 oranına yükseltilebileceğini saptamışlardır.

2.5.4. Protoplast füzyonu

Streptococcus lactis suşlarında kullanışlı bir diğer genetik aktarım sistemi protoplast haline getirilmiş hücrelerin polietilen glikol içeren ortamlarda füzyona teşvik edilmeleridir (Gasson 1980, Okamoto vd. 1983, Okamoto vd. 1985). Protoplast füzyonu tekniklerinde; transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon sistemlerinden farklı olarak, aktarılan genetik materyal belirli kromozomal DNA fragmentleri ve plazmidlerle sınırlı değildir. Füzyonlarda hücrelerin toplam genom temasının meydana gelişisi; bu yöntem kullanılarak oluşturulabilen değişik rastgele rekombinantlar aracılığı ile, kromozomal DNA üzerinde çok sayıda gen sistemleri tarafından kontrol edilen özelliklerin tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır (Gasson ve Davies 1984).

Gasson (1980) *Streptococcus lactis* 712 suşundan türetilmiş mutantlarda oluşturduğu tür içi füzyonlar sonucu; gen kodu kromozomal DNA üzerinde bulunan maltoz kullanımı ve streptomisin dirençlilik yanında, eritromisin dirençli-

lik gen kodunu içeren vektör plazmid pAM β 1 ile laktoz plazmidi pLP712'nin aktarımlarının da meydana geldiğini saptamıştır. Laktik streptokok suşlarında protoplast füzyonu yönteminin tanımlandığı bu ilk çalışmada; plazmid aktarım sikliği 1.9×10^{-3} - 3×10^{-3} , kromozomal DNA rekombinasyon sikliği ise 3×10^{-5} - 7.1×10^{-5} oranlarında bulunmuştur.

Okamoto vd. (1983) *Streptococcus lactis* MJ708-1 ve MJ904 suşlarının, lizozim ve α -amilaz enzimleri uygulayarak oluşturdukları protoplastlarını, polietilen glikol 6000 varlığında füzyona teşvikleyerek, maltoz ve galaktoz kullanımı ile streptomisin dirençlilik özelliklerini bakımından birleşik fenotiplerin oluştuğunu göstermişlerdir. Protoplast füzyonu yöntemleriyle laktik streptokoklarda türlerarası gen aktarımının da sağlanabileceği bildirilmiştir. Cocconcelli vd. (1986) tarafından *Streptococcus lactis* suşlarından pAM β 1 plazmidi ve trehaloz fermentasyonu özelliklerinin *Lactobacillus reuteri* DSM20016 suşuna füzyonu başarılı olmuştir. Lelie vd. (1988) değişik *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* suşlarının *Bacillus subtilis* suşları ile füzyonu sonucu, *Bacillus subtilis* ara konakçı hücreden antibiyotik dirençlilik markerleri; pAM β 1, Δ pAM β 1 ve pGV21 plazmidlerinin türlerarası aktarımını örneklemiştir.

Son yıllarda laktik streptokoklar için elektroporasyon gibi güçlü transformasyon tekniklerinin bulunması, bu suşlarda protoplast füzyonu yönteminin plazmid aktarımında kullanımını önemli ölçüde geriletmıştır. Günümüzde, ancak diğer transformasyon yöntemlerinin etkili olmadığı koşullarda, alternatif bir genetik aktarım sistemi olarak

protoplast füzyonlarından yararlanılmaktadır (Gasson ve Davies 1984, Lelie 1989).

2.6. Faja Dirençli Suş Geliştirme Çalışmaları

Endüstriyel sus geliştirme programları, ticari fermentasyon süreçlerinde ürün miktarı ve kalitesinin artırılmasında çok önemli rol oynamaktadır (Hopwood 1977). Son yıllarda, DNA moleküllerinin yapısal analizinde kolaylıklar sağlayan araçların bulunması, ticari susların eldesinde uzun yıllardır kullanılan klasik genetik yöntemlerin yanı sıra, sadece belirli bir gen ya da DNA fragmentinin izolasyonu, vektörler aracılığı ile yeni bir konakçı hücreye aktarımı ve ifade edilmesi aşamalarını içeren "Genetik Mühendisliği" tekniklerinin uygulanmasına da olanak tanımlıstır (Queener ve Baltz 1979, Hopwood 1981, Shortle vd. 1981, Rowlands 1984a, Rowlands 1984b).

Laktik streptokoklarda gen analizleri için; ya, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus sangius* gibi ara konakçılarda , ya da doğrudan *Streptococcus lactis* suslarında oluşturulan gen klonlarından yararlanılmaktadır (DeVos 1987, Sandine 1987). Uygun vektör sistemleri kullanılarak, bu bakterilerde plazmidler tarafından kodlanan laktoz kullanımını, proteolitik aktivite gibi özellikler ile fosfo- β -D-galaktozidaz sistemi, ultraviyole ve faj direnç sistemlerinin homolog ve heterolog konakçılarda klonlanması sağlanmış, aynı zamanda yapısal özellikleri belirlenmiştir.

Bugüne deðin, laktik streptokoklarda 10 deðiþik promotor bölgenin, 7 ribozom bağlanma bölgesinin ve çok yönlü terminatörlerin baz dizileri saptanmıştır. Vektör sistemlerinin oluşturulmasında ve gen ifadesinin optimize edilmesinde anahtar rol oynayan bu bulgular, başarılı rekombinant DNA uygulamalarını beraberinde getirmiþtir (Kok vd.1984, Le Blanc ve Lee 1984, Van Der Vossen vd.1985, Herman vd. 1987, Simons ve DeVos 1987, Simon ve Chopin 1988).

Laktik starter olarak kullanılan suþlarda, faj dirençli fenotiplerin oluşturulmasında genel yaklaşım, birden fazla faj direnç genleri ile rekombine edilmiş vektörlerin aktarımı ve yeni konakta stabil hale getirilmeleri esasını içermektedir. Aktarımı sağlanan özelliklerin stabilizasyonu sorunu ise ya yüksek kopya sayılı vektörlerin kullanımı, ya da doğrudan kromozomal DNA'ya integrasyonu suretiyle aşıl-maya çalıþılmaktadır (Gautier ve Chopin 1987, Laible vd. 1987, Sandine 1987, Kok 1989). Gautier ve Chopin (1987) *Streptococcus lactis* suþlarında tanımlanan pIL103 plazmidi üzerindeki restriksiyon/modifikasyon özellikle, Laible vd. (1987) ise *Streptococcus lactis* KR2 suþunda abortif infeksiyon özellikleri faj direnç genlerini izole ederek bu genlerin pGB301 ve pGB305 gibi yüksek kopya sayılı *Escherichia coli* / *Streptococcus* evrensel vektörleriyle aktarılmalarını sağlamışlardır. Abortif infeksiyon ve ısı duyarlı faj direnç sistemlerinin gen kodunu taşıyan pTR2030 ve restriksiyon/modifikasyon sistemi gen kodunu taşıyan pTN20 plazmidlerinin, bu özellikler bakımından stabil oldukları belirlenen transkonjugantları endüstriyel fermentasyon

süreçlerinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Klaenhammer 1987, Chopin ve Chopin 1989, Higgins vd.1989, Hill vd.1989b). Ancak, genetik olarak düzenlenmiş rekombinant suşların ticari süreçlerde kullanımında, doğal çevre ve tüketici üzerinde yaratabileceği tüm risklerin belirlenmesi ve bu koşullarda hiçbir sorun yaratmayacak özellikle olmaları zorunlu kılınmıştır. Bu amaçla Avrupa Topluluğu "Biyolojik Aktivite Program"ları çerçevesinde, Fransa, İngiltere, Hollanda ve Federal Almanya'da, genetik olarak düzenlenmiş laktik asit bakterilerinin gıda üretiminde kullanımı ve güvenilirliğinin belirlenmesi üzerinde ortak projeler sürdürülmektedir. Laktik streptokokların yüzlerce yıldır insanlar tarafından güvenle tüketilen gıdalarda yüksek oranlarda bulunusu, patojen özellikle olmamaları ve çok çeşitli metabolik ürünler oluşturmaları, genetik mühendisliği teknikleri ile diseñlenmiş suşların biyoteknolojik süreçlerde kullanımı konusunda bu bakterilere öncelik tanınmasına olanağ sağılmıştır (Teuber 1990).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar ve bakteriyofajlar

Bu çalışmada, Öner (1986) tarafından, Türkiye'nin değişik bölgelerinde, endüstriyel starter kullanmayan klasik işletmelerin peyniraltı suyundan izole edilen 28 *Streptococcus lactis* suşu ve çiğ sütlerden Tunail ve Aşkın (1990) tarafından izole edilen 4 bakteriyofaj kullanılmıştır. Ayrıca, transformasyon ve konjugasyon denemelerinde kullanılan plazmidleri giderilmiş, antibiyotik marker'lar içeren bir alicı suş (*Streptococcus lactis* 1614) ile, değişik ülkelerde endüstriyel fermentasyon ortamlarından izole edilen litik fajlar, Agricultural Food Research Council (AFRC-ENGLAND) Norwich laboratuvarlarından elde olunmuştur (Table 1).

3.1.2. Kimyasal maddeler ve ayıraçlar

Agaroz (Sigma Chem. Co., USA)

Akriflavin (BDH Chem. Ltd., Poole-England)

Amonyum asetat (BDH Chem. Ltd., Poole-England)

Amonyum molibdat (Sigma Chem. Co., USA)

Antibiyotikler (Sigma Chem. Co., USA)

Bacto litmus (Difco Chem. Co., USA)

Brom krezol purpur (BDH Chem. Co., USA)

Dializ membrani (The Scientific Inst.Cent.Ltd., England)

Dietilpirokarbonat (Sigma Chem. Co., USA)

Dithiothereitol (Sigma Chem. Co., USA)

DNaz I (Sigma Chem. Co., USA)

Etanol (James Burrough Ltd., England)

Etilendiamin-tetra-asetik asit=EDTA (Sigma Chem. Co., USA)

Ethidium bromit (Sigma Chem. Co., USA)

Fenol (FSA Laboratory Suppl., England)

Ferrik sitrat (Sigma Chem. Co., USA)

Gliserol (BDH Chem. Ltd., Poole-England)

Hidrojen peroksit (May-Baker Ltd., England)

İzoamil alkol (May-Baker Ltd., England)

Kloroform (May-Baker Ltd., England)

Lizozim (Sigma Chem. Co., USA)

Macaloid powder (Sigma Chem. Co., USA)

Maleik asit-disodyum tuzu (Sigma Chem. Co., USA)

Membran Filtre-0.45 μm . (Scheicher-Schruell GmbH, Germany)

Mutanolisin (Sigma Chem. Co., USA)

Polietilen glikol 3350, 4000, 6000 (Sigma Chem. Co., USA)

Potasyum ferri-siyanat (Sigma Chem. Co., USA)

Potasyum fosfo-tungstat (Sigma Chem. Co., USA)

RNaz A (BRL Laboratories, USA)

Sığır serum albumini=BSA (Sigma Chem. Co., USA)

Sezyum klorür=CsCl (FSA Chem. Co., England)
Sodyum asetat (BDH Chem. Ltd., Poole-England)
Sodyum dodesil sülfat=SDS (BRL Laboratories, USA)
Sodyum gliserofosfat (Ruger Chem. Co., USA)
Sodyum tetra-borat (BDH Chem. Ltd., Poole-England)
Tris (hidroksimetil) aminometan=Tris (Sigma Chem. Co., USA)
Tris hidroklorit=Tris.Cl (Sigma Chem. Co., USA)
Yağsız süt tozu (Golloway Wes. Co., USA)

3.1.3. Moleküler analiz araçları ve elektron mikroskopu

Plazmid izolasyonu ve tanımlanmasında Kingshill (England) elektrik sağlama kaynağı ve horizontal ya da vertikal elektroforez sistemleri (Bathesda Research Laboratories, USA) kullanılmıştır. Bakteriyofaj Fotoğrafları Philips 300 (Germany) elektron mikroskopunda alınmıştır.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan laktik fajlar

Faj Kod No.	Baş Yapısı	Konakçı Etkinliği	Kökeni	Kültür Kolleksiyonu
P78-LØ	-	Litik	Türkiye	AÜZF-TARMİK
P81-13Ø	-	Litik	Türkiye	AÜZF-TARMİK
P88-13Ø	-	Litik	Türkiye	AÜZF-TARMİK
P76-2Ø	-	Litik	Türkiye	AÜZF-TARMİK
ML3Ø	Prolate	Litik	İngiltere	AFRC
2015Ø	Prolate	Litik	ABD	AFRC
2509Ø	Prolate	Litik	İngiltere	AFRC
712Ø	İzometrik	Litik	İngiltere	AFRC
924Ø	İzometrik	Litik	Y.Zelanda	AFRC
2550Ø	İzometrik	Litik	İrlanda	AFRC
2250Ø	İzometrik	Litik	İrlanda	AFRC

AÜZF : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
 Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü

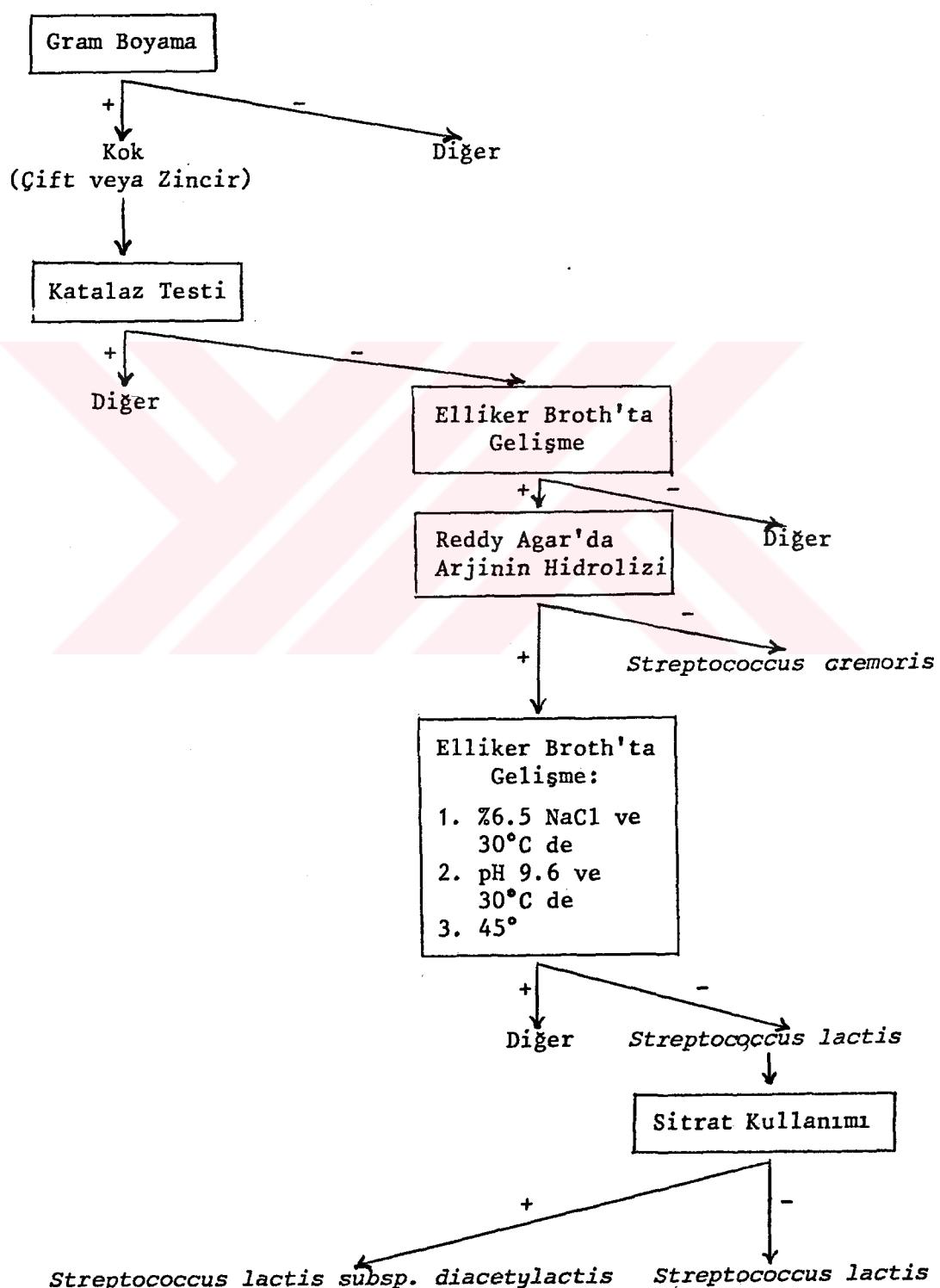
TARMİK : Tarımsal Mikrobiyoloji Ünitesi

AFRC : Agricultural Food Research Council (England)
 Norwich laboratuvarı

3.2. Metot

3.2.1. İzolatlardan *Streptococcus lactis* suşlarının tanısı

Streptococcus lactis suşlarının tanımlanmasında aşağıda verilen (Huggins, 1984) tanı şeması kullanılmıştır.



3.2.1.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi

Gram boyama yöntemiyle hazırlanan preparatlar 1300 x büyütmede, ışık mikroskopu (Seitz-Wetzlar No.669358) altında incelenmiş ve bakteri morfolojileri belirlenmiştir. Katalaz testi için, M17 agar ortamlarında geliştirilen kültür kolonileri aşır gözü ile lam üzerine alınmış, üzerine hidrojen peroksit çözeltisinden bir damla akıtılarak 100 x büyütmede gaz çıkışısı olup olmadığı gözlenmiştir.

M17 Broth ve Agar

Polipepton	5.0 g.
Fitonpepton	5.0 g.
Maya ekstraktı	2.5 g.
Beef (Dana eti) ekstraktı	5.0 g.
β -Disodyum glisero fosfat	19.0 g.
Glukoz ya da laktوز (%10)	50 ml.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.0 M)	1 ml.
Askorbik asit	0.5 g.
Agar	15 g.
Destile su	950 ml.
pH 7.15 (Sterilizasyondan önce)	

Ortam içerikleri 950 ml destile su içerisinde çözüllerken, agar ilavesinden önce pH 7.15'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 121°C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır. Ortam soğutulduktan sonra (45°C'de) ayrı sterilize edilen laktوز çözeltisi (50 ml) ilave edilmiştir (Terzaghi ve Sandine 1975).

3.2.1.2. Arjininden amonyak oluşumu

izolatların arjininden amonyak oluşturma özellikle-
rinin saptanması amacıyla Reddy agar (Reddy vd.1969) kullanılmıştır. İzolatlar Reddy agar ortamına (her petri plağı
için 1 ml) inoküle edildikten sonra, petri plakları 32°C'de
48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda kolonilerdeki
renk değişimlerine göre arjininden amonyak oluşumu belir-
lenmiştir. Beyaz koloniler arjininden amonyak oluşturarak
indikatör boyası brom cresol purple'den dolayı asit oluşumu
sonucu sarıya dönüşen ortam rengini nötürleştirmektedir.
Sarı koloniler ise sadece asit oluşturarak indikatör boyası
rengini (menekşe) sarıya çeviren ve arjininden amonyak
oluşturamayan bakterileri temsil etmektedir (Reddy vd.1969,
Reddy vd.1972a, Reddy vd.1972b).

Reddy Agar

Tripton	5.0 g.
Maya ekstraktı	5.0 g.
L-Arjinin hidroklorit	4.0 g.
K ₂ HPO ₄	1.0 g.
CaCO ₃	3.0 g.
Karboksi metil selüloz	6.0 g.
Rekonstitüt yağsız süt (%11)	50 ml
Brom krezol purpur (%0.1)	20 ml.
Agar	15 g.
Destile su	830 ml.
pH 6.8 ± 0.1 (Sterilizasyondan önce)	

Önce 430 ml destile su içeren bir erlenmayer içinde agar, 500 ml destile su içeren bir diğerinde ise karboksimetil selüloz, kaynar su banyosunda çözülmüş ve birbirine karıştırılmıştır. Bu ortama tripton, maya ekstraktı, arjinin, K_2HPO_4 , $CaCO_3$ ilave edilmiş ve erlenmayer alüminyum-foli ile kaplanarak 10 dk kaynar su banyosunda tutulmuştur. $121^{\circ}C$ 'de 15 dk sterilize edilen ortam, $55^{\circ}C$ 'ye kadar soğutulduktan sonra ayrı sterilize edilen rekonstitut yağsız süt ve brom kreゾol purpur ilave edilerek 15 ml lik porsiyonlar halinde petrilere dağıtılmıştır. Petri plakları, inoculasyondan önce $37^{\circ}C$ 'de 24 saat tutulmuştur.

3.2.1.3. Elliker broth besiyesinde gelişme

Bakteriler Elliker broth ortamında üretildikten sonra, %6.5 NaCl ilavesiyle ve pH 9.6'ya ayarlanarak yeniden hazırlanan iki ayrı Elliker broth besiyerine inoküle edilmiştir. Ayrıca orijinal Elliker broth içinde kültürlerin $45^{\circ}C$ 'de gelişme özellikleri de gözlenmiştir.

Elliker Broth (Difco Manual, 1984)

Tripton	20 g.
Maya ekstraktı	5.0 g.
Jelatin	2.5 g.
Dekstroz	5.0 g.
Laktoz	5.0 g.
Sakkaroz	5.0 g.
Sodyum klorür	4.0 g.

Sodyum asetat 1.5 g.
 Askorbik asit 0.5 g.
 Destile su 1000 ml.

pH 6.8 ± 0.2 (25°C'de)

Besiyeri 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan önce ortam pH'sının 9.6'ya ayarlanması 1N NaOH kullanılmıştır.

3.2.1.4. Sitrat fermentasyon testi

Kempler ve McKay'ın (1980) sitrat fermentasyon ortamlarında, bakteri kültürlerinin gelişmeleri sonucu mavi kolonilerin oluşumu, sitratın fermentte edildiğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Sitrat Fermentasyon Ortamı

Yağsız süt (%1) 10 ml.
 Pepton (süt protein hidrolizatı) 2.5 g.
 Dekstroz 5.0 g.
 Agar 15 g.
 Destile su 970 ml.
 pH 6.6 (Sterilizasyondan önce)
 115°C'de 12 dk. sterilize edilmiştir.

Çözelti A

Potasyum ferri siyanat 10 g.
 Destile su 100 ml.

Çözelti B

Ferrik sitrat	1 g.
Sodyum sitrat	1 g.
Destile su	40 ml.

Sterilize edilen ana besiyeri ortamına; 100°C su banyosunda 30 dk süreyle tutulan ve 55°C'ye kadar soğutulan A ve B çözeltilerinin her birinden litreye 10 ml olacak şekilde ilave edilerek karıştırılmış ve petrilere dökülmüştür. Bakteri kültürlerinin inokülasyonundan önce petriler 30°C'de 24 saat karanlıkta tutulmuştur. Bu süre sonunda sürme ekim yapılarak petri plakları 32°C'de 48 saat hidrojen-karbondioksit atmosferinde (Gaspak, BBL systems) inkübe edilmiştir.

3.2.2. Faj stoklarının hazırlanması ve bakteriyofaj biyodenemeleri

3.2.2.1. Çift tabaka yöntemi

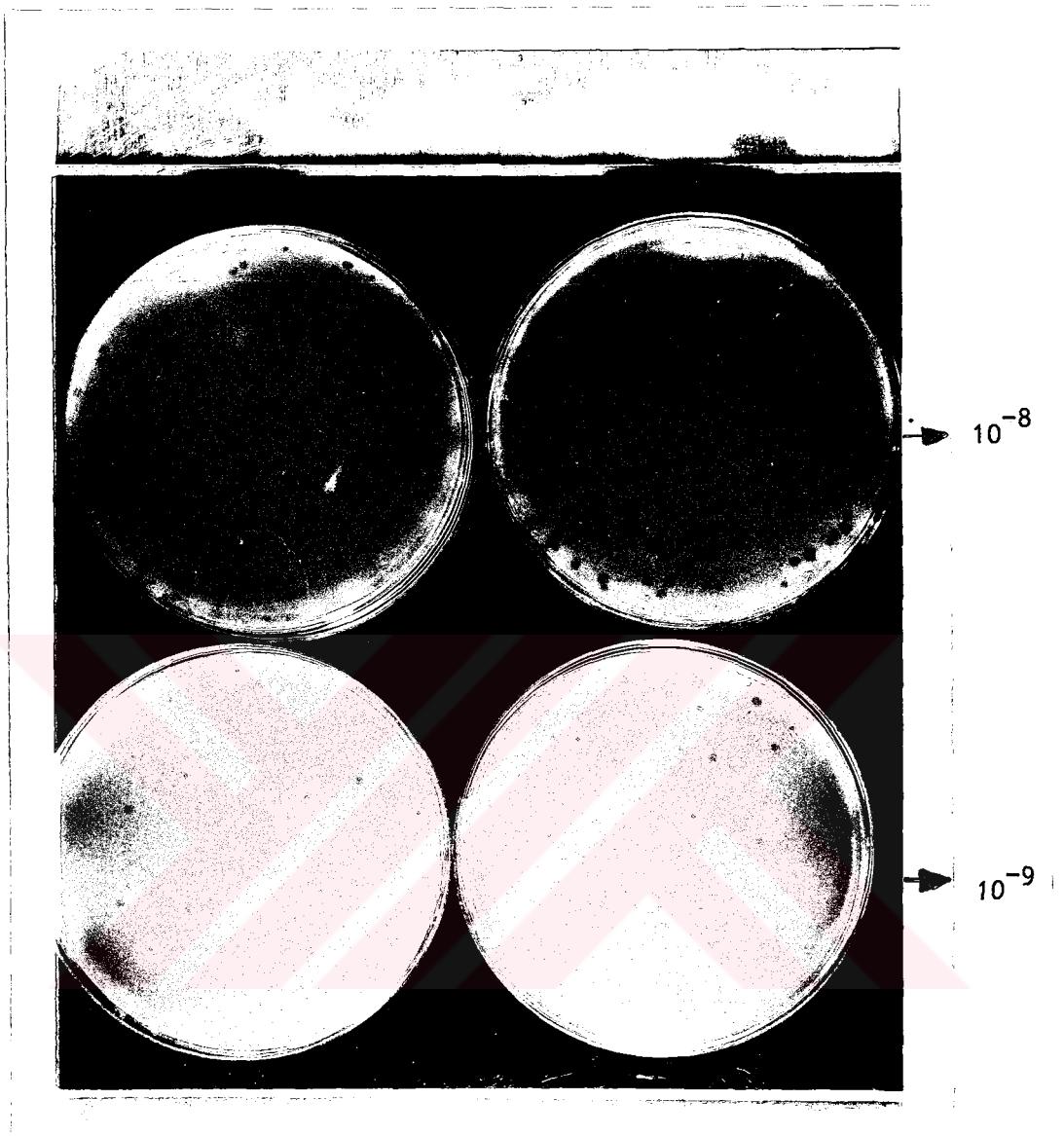
M17 Broth'ta 30°C'de 18 saat geliştirilen bakteri kültürlerinden 0.1 ml alınarak, M17 broth ile hazırlanan seri faj dilüsyonlarının 0.1 ml si ile karıştırılmış ve adsorbsiyonun sağlanması için ortama $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1M) çözeltisinden 0.05 ml. ilave edilmiştir. Adsorbsiyonun tamamlanması için tüpler 30°C'de 10 dk tutulmuştur. Bu süre sonunda herbir tüpe 2.5 ml , %0.45 agar oranı ile hazırlanan yumuşak agar aktarılarak karıştırılmış ve katı M17 agar plakla-

rı üzerine dökülmüştür. Yumuşak agar ortamının alt tabaka üzerinde homojen bir şekilde dağılması sağlanarak katılaşması beklenmiş ve petriler 30°C 'de 3-5 saat inkübe edilmiş- tir. Faj plak oluşumu gözlendikten sonra, iyi izole olmuş 2 ya da 3 faj plağı, pastör pipetleri ile ortamdan alınarak $2-5^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş ve 0.5 ml M17 broth içeren tüpler aktarılmıştır. Orijinal faj-konakçı sistemlerinde belirli plak büyüklüğünün ve plak morfolojisinin oluşup oluşmadığını gözlemek amacıyla, diğer petriler aynı inkübasyon koşullarında 18 saat daha tutulmuştur. Petrilerde değişik plak morfolojisinin oluşmadığından emin olununca, buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$) saklanan tek plak izolatları ile faj stoklarının hazırlanmasına devam edilmiştir. Tek plak izolatlarını içeren tüpler üzerine, M17 broth'ta 3.5 saat süre ile geliştirmiş konakçı hücre kültürlerinden 9.5 ml ve $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ (1M) çözeltisinden 0.1 ml ilave edilerek 30°C 'de inkübe edilmiştir. Bakteriyel liziz tamamlandıktan sonra (18-22 saat içerisinde) ortam steril konik santrifüp tüplerine (110x16 mm Sterilin, England) aktarılmış, 4500 devirde 10 dk. süre ile santrifüp edilmiştir (Koolpsin, Refrigerated centrifuge, England). Üst sıvı membran filtrelerden ($0.45 \mu\text{m}$) geçirilmek sureti ile bakteriler ortamdan ayrılmıştır. Filtratlardan hazırlanan seri dilüsyonlar yeniden konakçı hücrelere uygulanarak faj titreleri belirlenmiştir (Billing 1969, Kay 1972, Terzaghi ve Sandine 1975).

Bakterilerin faj duyarlılıklarının saptanmasında 10^8 plak oluşturma birimi/ml (Cfu/ml) ve yukarısında elde edi-

len faj titreleri kullanılmıştır. Faj stokları %15'lik glicerol ile muamele edilerek +4°C'de saklanmıştır.

Çift tabaka ortamlarının hazırlanışı: Faj denemeleinde, M17 alt tabaka agar ortamı, ayrı sterilize edilen $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1M) çözeltisinden 10 ml/l ilave edilerek petrileye aktarılmış (20-25 ml.) ve 22-25°C'de 18 saat tutulmuştur. Üst tabaka agar ortamı $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hariç, M17 alt tabaka içeriklerinin tümünün katılması ile hazırlanmıştır. 50 ml. lik porsiyonlar halinde hazırlanan yumuşak üst tabaka agarında, agar oranı %0.45 olarak kullanılmıştır. Yumuşak agar da alt tabaka ortamı gibi 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (Terzaghi ve Sandine 1975).



Şekil 1. Çift tabaka yöntemi ile faj titrelerinin saptanması

3.2.2.2. Spot test

Microtitre (sterilin-cooke Microtiter Systems, England) plaklarındaki kuyucuklara 0.2 ml laktوز indikatör broth ilavesinden sonra, herbir kuyucuğa 30°C 'de 10 dk bekletilen faj-bakteri karışımlarından (1/1 oranında) 20 μl aktarılmıştır. 30°C 'de 3-5 saat arası inkübe edilen kültürlerde, asit üretimi sonucu rengin sarıya dönüşümü ile denenen bakterilerin fajlara dirençli, renk değişiminin gözlenmemesi ile de fajlara duyarlı oldukları saptanmıştır (DeVos vd. 1984).

Laktوز İndikatör Broth ve Agar

Tripton	20 g.
Jelatin	2.5 g.
Dekstroz	2.5 g.
Glukoz (%1)	100 ml.
NaCl	4.0 ml.
Sodyum asetat	1.5 g.
Askorbik asit	0.5 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.0 M)	10 ml.
Brom krezol purpur (%0.004)	10 ml.
Agar	15 g.
Destile su	880 ml.
pH 6.8 (Sterilizasyondan önce)	
121 $^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk. sterilize edilmiştir.	

880 ml. destile su içerisinde ortam bileşenleri çözülmüş ve sterilizasyon sonrası, ayrı sterilize edilen lakt-

toz, brom krezol purpur ve $\text{CaCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ilave edilerek karıştırılmıştır (McKay vd.1972, McKay vd.1973). $\text{CaCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ortama yalnız faj denemelerinde ilave edilmektedir (Terzaghi ve Sandine 1975).

Brom krezol purpur'un hazırlanışı: 0.49 g brom krezol purpur 2.5 ml etanol (%70) içerisinde çözüldükten sonra hacim, destile su ile 100 ml ye tamamlanmış ve 115°C 'de 15 dk sterilize edilmiştir.

3.2.3. Faj konsantratlarının hazırlanışı (polietilen glikol-dekstran sülfat yöntemi)

%10 oranında konakçı bakteri kültürü (18 saatlik)
 1 l. M17 broth'a inoküle edilerek 30°C 'de 3 saat gelişmiş, 600 nm'de 0.8-0.9 optik yoğunluk (OD) değerine ulaşmıştır. Bu süre sonunda ortama; 10 ml $\text{CaCl} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 M) ve 10^8 - 10^9 plak oluşturma birimi/ml (pfu/ml) olan faj lizatlarından 10 ml aktarılmış ve bakteriyel lizizin oluşumu için 30°C 'de inkübasyona devam edilmiştir (~2.5 saat). Lizizi tamamlanan ortam, 4000 devirde 30 dk santrifüp edilmiştir. Faj içeren üst sıvıya; 65 g polietilen glikol 6000, 2 g dekstran sülfat (sodyum tuzu) ve 17.5 g NaCl ilave edilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bulunan ayırma hunisine aktarılmıştır. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat bekletildikten sonra, ayırma hunisinin dibinde biriken yoğun faz (1.de yaklaşık 13 ml) 50 ml.lik santrifüp tüplerine alınmış ve 3000 devirde 15 dk santrifüp edilmiştir. Santrifüp tüplerinde oluşan katı ara

faz, 10 ml borat tampon içerisinde çözülmüştür. Ortamda kalan dekstran sülfatın çöktürülmesi için, fajları içeren ortama 1 ml KCl (3.0 M) ilave edilerek +4°C'de 2 saat bekletilmiştir. Dekstran sülfat ve diğer kalıntılar, ortamın 3000 devirde 10 dk santrifüp edilmesi ile tamamen çökürülmüş ve üst sıvı 13.5 ml lik Beckman ultrasantrifüp tüplerine (Ultraclear type) aktarılarak 40.000 devirde (rpm, +4°C) 2 saat santrifüp edilmiştir (Beckman L8-M Ultracentrifuge, California-USA). Faj konsantratları 1.5 ml borat tamponunda çözülmüş ve 1500 ml borat tamponuna karşı +4°C'de 18 saat dializ edilmiştir. Dializ süresince 2 ya da 3 kez tampon değiştirilmiştir (Bachrach ve Friedman 1971). Bu süre sonunda dializ tüp içerikleri 0.45 µm membran filtrelerden geçirilerek steril tüplere alınmış ve %15 steril gliserol ilave edilerek -20°C'de saklanmıştır (Nyendo vd.1974).

Borat Tampon çözeltisi

Sodyum tetra-borat	11.4 g.
EDTA	1.11 g.
Destile su	1000 ml.
pH 9.0	

3.2.4. Fajların saflaştırılması ve elektronmikroskopisi

Fajların saflaştırılmasında sezyum klorür yoğunluk gradienti yöntemi kullanılmıştır (Bachrach ve Friedman 1971). Üç ayrı tüpe aktarılan 1'er ml steril saf su üzerine

1.tüpten itibaren, sırasıyla 0.45 g , 0.830 g ve 1.280 g sezyum klorür ilave edilerek çözülmüştür. Hacimleri 1.3 ml ye ayarlanan çözeltiler, 5 ml lik bir Beckman Ultrasantrifüj tübüne (Ultraclear type) artan yoğunluk sırasına göre aktarılmıştır. Her aşamada değişik yoğunluktaki sezyum klorür çözeltileri tüpün alt kısmına pipetlenmiştir. Hazırlanan yoğunluk gradienti tüplerine yaklaşık 1.1 ml faj konsantratı ilave edilerek +4°C'de ve 50.000 devirde (rpm, Beckman Ultracentrifuge, California-USA) 60 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Yoğunluk gradientinde oluşan faj bandı (ara fazda) alınarak 0.3 M amonyum asetat tampon çözeltisinin (pH 7.0) 0.5 ml si içinde süspansiyonu hazırlanmış ve aynı tampon çözeltide (500 ml.) 12 saat süreyle dializ edilmiştir.

Çalkalamalı inkübatörde +4°C'de 3 saat tutulan faj süspansiyonlarından 1 damla alınarak, 1 damla %2'lik potasyum fosfotungstat, %2'lik amonyum molibdat (pH 5.0) boyalı çözeltileri ile karıştırılmış ve karbonla kaplanmış elektron mikroskop gridlerine (3.05 mm, 400 mesh) emdirilmiştir (yaklaşık 10 dk). Oda sıcaklığında ve filtre kağıtları üzerinde kurutulan grid'ler, Philips 300 transmission elektron mikroskobunda incelenerek fajların fotoğrafları; 40.000, 60.000, 85.000 ve 120.000 büyütmelerde alınmıştır. Faj boyutlarının hesaplanmasında her eleman için bağımsız on ölçümdeki değerlerin ortalaması kullanılmıştır (Jarvis 1978).

3.2.5. Faj direnç mekanizmalarının saptanması

Streptococcus lactis suşlarında faj direnç sistemlerinin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla M17 broth ve M17 agar ortamlarına inoküle edilen faj-bakteri karışımıları 32°C ve 37°C 'de inkübe edilerek, suşlarda farklı gelişme sıcaklıkları için faja duyarlılık fenotipindeki değişimeler gözlenmiştir.

Faj adsorbsiyonunun araştırılmasında ise tek aşamalı geliştirme testi kullanılmıştır (Baumgartner vd.1986). Etkili faj süspansiyonlarından (10^8 pfu/ml) 0.6 ml alınarak, 0.6 ml faj dirençli bakteri kültürü ve 0.2 ml CaCl_2 (0.185 M) içeren eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 10 sn. karıştırıldıktan sonra 30°C 'de 12 dk tutularak faj adsorbsiyonunun tamamlanması sağlanmıştır. Bu süre bitiminde, test tüpleri 5000 devirde 10 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvıdan 1 ml alınarak faj duyarlı kontrol suşlara denmek suretiyle faj adsorbsiyonundan sonraki titre belirlenmiştir. Adsorbsiyon oranı; başlangıç faj titresi-Adsorbsiyon sonrası titre/Başlangıç faj titresi X 100, formülünden saptanmıştır.

3.2.6. Profaj indüksiyonu

Streptococcus lactis suşlarında profaj indüksiyonu amacıyla, ultraviyole ışık ve mitomisin C uygulaması yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.6.1. Ultraviyole ışık indüksiyonu

M17 broth besiyerinde 30°C 'de 10 saat süreyle geliştileren *Streptococcus lactis* kültürleri, 2500 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra, hücre peleti steril saf su ile yaklaşık 1/20 oranında seyreltilerek, optik yoğunluk 600 nm de 0.05 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu ortamdan 10 ml alınmış ve steril petri plaklarına aktarılmıştır (McKay ve Baldwin 1973). Petri kütükları, steril çalışma kabininde bulunan ultraviyole ışık kaynağı (Philips TUV, P/40 Bactericidal Lamp, 15W) altına yerleştirilerek, ultraviyole ışık kaynağı ile petri kutularının aralığı 29 cm olacak şekilde düzenlenmiştir (Georghiou vd.1981). Bakterilere 243.7 nm de 20-60 saniye arası ultraviyole ışık uygulandıktan sonra, fotoreaktivasyonun en aza indirilmesi amacıyla, 6 ml M17 broth ilave edilen kültürler 30°C 'de 20 dk süreyle karanlıkta tutulmuştur (Terzaghi ve Sandine 1981). Profaj indüksiyonunun meydana gelip gelmediği, 30°C 'de inkübe edilen kültürlerden 5 saat süreyle her 30 dk da bir örnek alınarak 600 nm de yapılan spektrofotometrik (Uvikon 860 Spectrophotometer, Kontron Instruments Co., Zurich) ölçümelerle belirlenmiştir.

3.2.6.2. Mitomisin C indüksiyonu

M17 broth'ta 30°C 'de 10 saat süreyle geliştileren kültürlerden, yeni 10 ml lik M17 broth ortamlarına 0.2 ml

lik inokülasyonlar yapılarak, 30°C'de 2 saat inkübe edilmişdir. Bu süre sonunda kültürler 2500 devirde 10 dk santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı atılarak hücre peleti 5 ml. MgSO₄ (0.1M) içerisinde çözülmüştür. Bu ortamdan, 5 ml M17 broth içeren tüplere: 0.4, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ve 7.0 µg/ml olacak şekilde mitomisin C ilave edilmiş, herbir tüpe 0.2 ml bakteri kültürü aktarılmıştır. 30°C'de inkübe edilen kültürlerden, 5 saat süreyle ve her 30 dk da bir örnek alınarak şahit besiyerine karşı 600 nm de optik yoğunluk ölçülmüştür (Meister ve Ledford 1979).

Her iki yöntemde de sonuçlar, profaj indüksiyonu uygulanan ortamların çift tabaka M17 agar ortamlarına denemesi suretiyle kontrol edilmiştir.

3.2.7. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının ve direnç düzeylerinin saptanması

3.2.7.1. Disk duyarlılık testleri

M17 agar ortamı, petri kutularına 12-15 ml. olacak şekilde dökülmüş ve katılaşması beklen dikten sonra, 30°C'de 1 gece tutulmuştur (Reinbold ve Reddy 1974). M17 broth besiyerinde 30°C'de 4.5 saat geliştirilen bakteri kültürlerinden (10^7 - 10^8 koloni oluşturan birim/ml =cfu/ml) her petri plaqına 0.1 ml aktarılarak drigalski spatülü ile agar yüzeyine homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır (Orberg

ve Sandine 1985). Antibiyotik diskleri, her bir petri plajında 5 adet olacak şekilde uygulanmış ve bu ortamlar 30°C 'de 20 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, antibiyotik diskleri çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapı ölçülerek, bakterilerin duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir (Reinbold ve Reddy 1974, Orberg ve Sandine 1985).

3.2.7.2. Antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi

Disk duyarlılık testleri sonucu, denenen antibiyotik konsantrasyonlarına dirençli bulunan bakterilerde, bu antibiyotiklere karşı direnç düzeylerinin saptanması amacı ile, kültürlerde aynı antibiyotiklerin değişik konsantrasyonları uygulanmıştır. Saf su ile hazırlanan ve membran filtrelerden geçirilmek suretiyle sterilize edilen antibiyotik stok çözeltilerinden alınan miktarlarla değişik konsantrasyonlar oluşturulmuş bunlar, 45°C 'ye kadar soğutulmuş M17 agar ortamlarına ilave edilmiştir. İyice karıştırılan ortamlar 12-15 ml olacak şekilde petrilere aktarılmıştır (Wulf ve Sandine 1983). 30°C 'de 1 gece M17 broth'ta geliştirilen her bir bakteri kültürü, steril fizyolojik tuz çözeltisi (%0.85 NaCl) içerisinde, yaklaşık 5×10^7 cfu/ml oranı sağlanacak şekilde seyreltilmiştir. Mikrotitre kuyucuklarına aktarılan bu kültürler, 21 çelik uç içeren steril inokülatörler aracılığı ile antibiyotikleri içeren agar or-

tamlarına aktarılmıştır. Petri plakları 30°C'de 20 saat inkübe edildikten sonra, kültür ekim planları üzerine yerleştilmiş ve koloni gelişimi araştırılmıştır (Parada ve De Giachi 1986).

Antibiyotik stok çözeltileri, -20°C'de saklanmıştır (Maniatis vd.1986).

3.2.8. Doğal suşlardan plazmidlerin giderilmesi ve laktوز fermentasyon yeteneğini yitirmiş mutantların seçimi

Streptococcus lactis suşlarında plazmid giderme ajanı olarak akriflavin kullanılmıştır. Öncelikle 2 µg/ml-30 µg/ml akriflavin içeren bir dizi steril M17-glukoz broth besiyeri hazırlanmıştır. Herbir tüpte akriflavin oranı 0.5 µg/ml artırılarak, son konsantrasyona ulaşılmıştır. Bu seri tüplere, 12 saat süreyle geliştirilmiş aktif *Streptococcus lactis* kültürlerinden 0.1 er ml aktarılarak, tüpler 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. 18 saat sonunda bakteriyel gelişimin saptandığı en yüksek akriflavin konsantrasyonunu içeren ortamdan, aynı oranda akriflavin içeren M17-glukoz broth'a 0.1 ml aktarılmış ve inkübasyona devam edilmiştir. İşlem beş kez tekrar edildikten sonra, bu ortamlardan hazırlanan seri dilüsyonlar, laktoz indikatör agar ortamlarına aktarılarak 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. 18 saat sonra, gelişimleri sonucu yeterli asit oluşturamadıklarından indikatör boyalı rengini sarıya çeviremeyen koloniler laktoz fermentasyon yeteneğini yitirmış

(Lac^-) mutantlar olarak seçilmiştir (McKay vd.1972, Gasson ve Davies 1980a, Wolfe ve McKay 1983). Ayrıca, akriflavin uygulanmış kültürlerden örneklenen kolonilerde plazmid içeriğleri saptanmış ve belirli plazmidlerin doğal suştan giderilmesi halinde oluşan fenotipik değişimler araştırılmıştır.

3.2.9. Proteolitik aktivite özelliğinin saptanması

Doğal suşlar yanında, plazmid giderme ajanları ile muamele edilmiş suşlar ve konjugantlar, Fast-Slow Differen-tiel (FSD) agar ortamına inoküle edilerek 30°C 'de 48 saat, anaerobik koşulda geliştirilmiştir (Gas-Pak, BBL systems). Bu süre sonunda gelişen kolonilerde çap ve morfolojik özellikler belirlenerek laktوز fermentasyon yeteneği (Lac^+) ile proteolitik aktivite (Prt^+) özelliklerindeki değişimler araştırılmıştır. Prt^+ ve Lac^+ koloniler; 2-3 mm çapında, beyaz konkav morfolojik yapı göstermiş ve koloni çevresinde kırmızı zon oluşturmuştur. Prt^- ve Lac^- koloniler ise; düz, yarı şeffaf olup, çapları 1 mm den küçük bulunmuş ve koloni çevresinde kırmızı zon saptanmamıştır. Lac^+ , Prt^- kolonilerin Lac^- , Prt^- kolonilerden başlıca farklılığı, koloni çevresinde kırmızı zonun oluşması şeklinde belirlenmiştir (Huggins ve Sandine 1984, Sanders vd. 1986).

Fast Slow Differentiel (FSD) Agar

Yağsız süt tozu	100 g.
Sodyum glisero fosfat	19 g.
Bakto litmus	1.0 g.
Brom krezol purpur (%0.004)	10 ml.
Agar	10 g.
Destile su	990 ml.

540 ml destile su içeren erlen içerisinde aktarılan agar, kaynar su banyosunda çözülmüş, sodyum glisero fosfat ve litmus ilave edilerek karıştırılmıştır. 450 ml destile su içeren bir başka erlen içerisinde yağsız süt tozu çözülderek, erlenler ayrı ayrı 121°C 'de 17 dk sterilize edilmiştir. 55°C 'ye kadar soğutulan ortamlar karıştırılarak, stok brom krezol purpur çözeltisinden 10 ml ilave edilmiş ve 20 şer ml hacimlerde petri kutularına aktarılmıştır. Ortamlar, kullanılmadan önce 30°C 'de 48 saat tutulmuştur.

3.2.10. Bakterilerin plazmid içeriklerinin tanımlanması

3.2.10.1. Mini ölçek plazmid izolasyonu

M17 broth'ta 30°C 'de 12 saat geliştirilen *Streptococcus lactis* kültüründen 20 mM DL-treonim içeren (Klanhammer vd.1978, Le Blanc vd.1979) 10 ml lik M17 broth besiyerlerine 1'er ml inoküle edilerek tüpler 30°C 'de 3.0-3.5 saat inkübasyona bırakılmıştır (Optik yoğunluk 600 nm'de 0.6-0.8'e ulaşınca dek). Bu süre sonunda

1.5 ml lik steril propilen tüplere aktarılan bakteri kültürleri 5000 devirde 5 dk süreyle (+4°C'de) santrifüj edilmiştir (Koolpsin, refrigerated centrifuge Burkard-England). Bu işlem her bakteri kültürü için 4 kez tekrarlanarak toplam hacim 6 ml ye yükseltilmiştir. Hücre peleti, lizozim içeren 250 µl protoplast tamponunda çözülerek tüpler 37°C'lik su banyosunda 4.5 dk tutulmuştur (Gasson 1980). Bu süre sonunda su banyosundaki tüp içeriklerine 10 µl dietilpirokarbonat (endonukleaz inhibitörü) ilave edilerek karıştırılmış ve 37°C'de 5 dk daha bekletilmiştir (Davies vd.1981). Buz banyosuna aktarılan tüplere 250 µl liziz çözeltisi ilave edilmiş ve elle çok yavaş bir şekilde karıştırılmıştır (Gasson ve Davies 1980b, Gasson 1983a). Buz banyosunda tutulan liziz ortamlarına 5M NaCl çözeltisinden 125'er µl aktarılarak karıştırılmış ve tüpler 1 saat süreyle bu ortamda bekletilmiştir. Kromozom komplekslerinin çöktürülmesi amacıyla tüpler +4°C'de 15000 devirde 30 dk santrifüj edilmişler ve sıvı kısımlar 15 ml lik yeni tüplere aktarılmıştır. Ortamda bulunan proteinlerin parçalanması için, tüplere 700 µl kloroform/izoamil alkol (24/1) ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dk süreyle karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi elle ve çok yavaş bir şekilde yapılmıştır. 10 dk sonunda tüpler 3 dk süreyle buz banyosunda tutulmuştur. +4°C'de 10.000 devirde santrifüj edilen ortamlardan üst faz (500 µl) steril plastik pastör pipetleri ile alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Bu işlemde, ara fazda bulunan protein kalıntılarının alınmamasına dikkat edilmiştir. Yeni tüplere aktarılan sıvı kısım üzerine,

50 μ l 3M sodyum asetat ve 1 ml absolu etanol ilave edile-rek, -20°C'de 1 gece bekletilmiştir. Konsantre plazmid DNA'sı, ortamın 10.000 devirde 20 dk santrifüjlenmesi ile çök-türülmüş ve etanol akıtılarak DNA peleti vakum altında ku-rutulmuştur. 20 μ l Tris-EDTA-1 tamponunda çözülen DNA ör-neklerine, RNaz A stok çözeltisinden 1 μ l ilave edilip 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Präparatlar elektroforez için kullanılıana dek -20°C'de tutulmuştur (Gasson 1983b, Klaenhammer 1984b).

Protoplast Tampon Çözeltisi

Magnezyum asetat 0.0215 g.

Amonyum asetat 0.858 g.

Sakkaroz 17.1 g.

Destile su 100 ml.

pH 7.0 (eğer pH 7.0'dan yüksekse asetik asit ile ayarlanır.)

20 mg. lizozim kullanımından kısa bir süre önce 5 ml protoplast tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş ve %10 ase-tik asit ile pH 8.0'e ayarlanmıştır.

Liziz Çözeltisi

Tris 1.21 g.

EDTA 1.86 g.

NaCl 4.67 g.

SDS 1.0 g.

Destile su 100 ml.

pH 8.0 (1 N HCl ile)

Tris-EDTA-1

Tris 0.121 g.

EDTA 0.037 g.

Destile su 100 ml.

RNaz A Çözeltisinin Hazırlanışı: 5 ml steril destile su içinde hazırlanan 0.05 M sodyum asetat çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 5'e ayarlanmış ve üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynar su içerisinde ortam 5 dk tutulduktan sonra -20°C'de saklanmıştır.

3.2.10.2. Büyuk ölçek plazmid izolasyonu

Plazmidlerin saflaştırılmasında büyük ölçek plazmid preperasyonlarından yararlanılmıştır. 30°C'de 1 gece geliştilen M17 broth kültürlerinden, 1.44 g DL-treonin içeren 600 ml. hacimde M17 broth'a %10 oranında inokülasyonlar yapılarak 30°C'de 3.0-3.5 saat tutulmuştur (Larsen ve McKay 1978, Gasson 1980). Bu süre sonunda kültürler, +4°C 7000 devirde 10 dk. santrifüj edilerek (Sorwall Instruments, RC5C, USA) hücre peleti 30 ml sakkaroz çözeltisi içerisinde çözülmüştür. 37°C'de 5 dk tutulan santrifüj tüplerine, 7.5 ml. lizozim çözeltisi ilave edilmiş ve yavaşça karıştırılarak 37°C'de inkübasyon 5 dk daha sürdürülmüştür.

3.75 ml. Tris-EDTA-2 uygulamasından sonra tüplere %20 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinden 2.25 ml aktarılmış, elle çok yavaş bir şekilde çevrilerek ortamın karışımı sağ-

lanmıştır. Bu aşamada ortamlarda viskozitenin artışı lizizin başladığını göstermektedir. Hücre lizisinin tamamlanması için santrifüj tüpleri 10 dk süreyle 37°C'de tutulmuştur. Liziz ortamları yüksek devirde vorteks karıştırıcılar da 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA parçalanmıştır. Ortama yeni hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 2.40 ml ilave edilmiş ve tüpler düz bir yüzey üzerinde 10 dk. aralıklarla çevrilerek, kromozomal DNA'nın denatürasyonu sağlanmıştır. NaOH uygulamasında ortam pH'sının 12.1-12.3 arasında olup olmadığı kontrol edilmiştir (Currier ve Nester 1976, Anderson ve McKay 1983b). Denatürasyon aşamasının biriminde, santrifüj tüplerine 3.90 ml, 2M Tris-Cl çözeltisi aktarılarak 3 dk. sürekli karıştırılmıştır. Ortam pH'sının 8.5-9.0 arasına düşüşü ile nötralizasyonun sağlandığı belirlenmiştir. Tüplere, +4°C'de tutulan 5M NaCl çözeltisinden 5 ml. ve %3 NaCl ile doyurulmuş fonol çözeltisinden 55.8 ml. ilave edilerek +4°C'de 7000 dv /dk ve 10 dk süre ile santrifüj işlemi uygulanmıştır. Tüplerde oluşan üst faz steril plastik pastör pipetleri ile yeni tüplere aktarılmış ve deproteinasyonun sağlanması için 55.8 ml kloroform/izoamil alkol (24/1 v/v) ilave edilmiştir. Tüpler +4°C'de 7000 devirde 10 dk süreyle santrifüj edilerek, plastik pastör pipetleri ile üst faz alınmış ve eşdeğer hacimde izopropanol ile muamele edilmiştir. Tüpler buz banyosunda 2 saat tutulduktan sonra 10.000 devirde, +4°C'de 20 dk santrifüj edilmiş, sıvı faz akıtlarak DNA çökeltisi vakum altında kurutulmuştur. DNA örnekleri 1 ml Tris-EDTA-1 içe risinde çözülmüştür (Anderson ve McKay 1983b). Yoğunluk

gradienti uygulamasından önce, örneklere RNaz A stok çözeltisinden 100 μ l ilave edilerek 37°C'de 15 dk inkübe edilmişdir (Gasson 1983b).

Sakkaroz Çözeltisi

Tris	0.655 gg.
EDTA	0.0372 g.
Sakkaroz	6.7 g.
Destile su	100 ml.
pH 8.0	

Lizozim Çözeltisi

Tris	0.3 g.
Lizozim	0.1 g.
Destile su	10 ml.
pH 8.0	

Tris-EDTA-2

Tris	0.60 g.
EDTA	9.31 g.
Destile su	100 ml.
pH 8.0	

Tris-Cl

Tris-Cl	31.52 g.
Destile su	100 ml.
pH 7.0	

SDS Çözeltisi

Tris 0.60 g.

EDTA 0.74 g.

SDS 20 g.

Destile su 100 ml.

pH 8.0

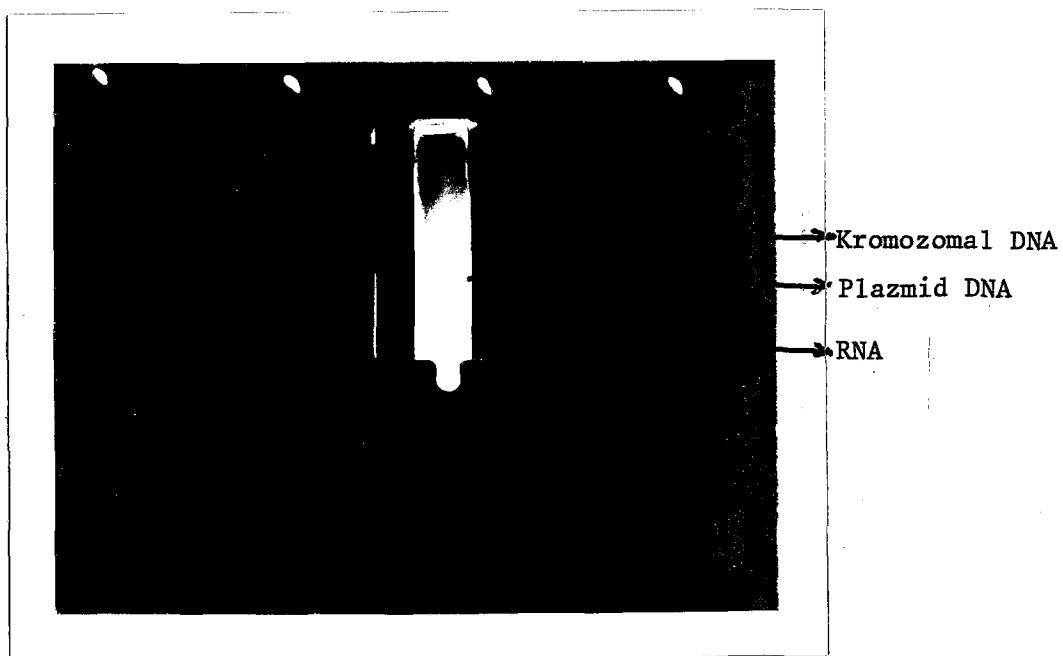
%3 NaCl ile Doyurulmuş Fenol Çözeltisinin Hazırlanışı:

100 g. fenol üzerine 20 ml destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45°C'deki su banyosunda çözülmüştür. Ortama 0.1 g hidroksiguinolin ilave edilmiş, karıştırılarak oda sıcaklığında tutulmuştur.

3.2.10.3. Plazmidlerin saflaştırılması

Bakterilerden izole edilen plazmidlerin saflaştırılmasında sezyum klorür -ethidium bromit yoğunluk gradienti yöntemi kullanılmıştır (Klaenhammer vd.1978). 4 farklı DNA örneği için; 52.64 g sezyum klorür, 46.52 ml Tris-EDTA-1 tampon içerisinde çözülmüş ve üzerine 1 ml. Na_2HPO_4 (0.2M) ilave edilerek karıştırılmıştır. 4 Beckman ultrasantrifüj tüpünün (Polyallomer, Quick seal 13.5 ml) herbirine 10 mg/ml lik stok ethidium bromit çözeltisinden 225 μl ., Tris-EDTA-1 tamponunda çözülen DNA örneklerinden 1 ml ve sezyum klorür çözeltisinden 10 ml aktarılmıştır. Tüplerin ağırlığı, sezyum klorür çözeltisi ile ± 0.01 g olacak şekilde dengelenmiş ve ağızları ısıtılmak suretiyle kapatılmıştır.

Alüminyum santrifüj kapakları ile 70-ITL rotor (1966 tip) Beckman santrifüjüne (18-M tip, USA) yerleştirilen tüpler $+10^{\circ}\text{C}$ 'de, 40.000 devirde 60-72 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra, tüpler 366 nm ultraviyole ışık altında incelenerek (Model UVL-56, Black-Ray lamp, Ultra-violet Product Inc.USA) CCC Plazmid DNA bantı steril şiringalar aracılığı ile ortamdan alınmıştır. 5 ml lik steril tüplere (D-5223, Sarstedt-West Germany) aktarılan örnekler, ethidium bromidin giderilmesi amacıyla, sezyum klorür ile doyurulmuş izoamil alkolde ekstrakte edilmiştir. Örneklerde pembe renk giderilinceye dek işleme devam edilmiştir. Bu işlemin bitiminden sonra dializ tüplerine aktarılan DNA örnekleri, 2 l. tris-EDTA-1 tamponuna karşı, $+2^{\circ}\text{C}$ 'de ve manyetik karıştırıcı üzerinde 24 saat dializ edilmiştir. Dializ süresince her 6 saatte bir Tris-EDTA-1 tamponu değiştirilmiştir. Dializ tüp içerikleri, 13 ml lik santrifüj tüplerine (D.5558, Sarstedt-West Germany) aktarılmış, 1/10 oranında sodyum asetat ve örnek hacminin 2 katı %99.8 etanol ilave edilerek -20°C 'de 12 saat tutulmuştur. Tüpler -4°C 'de 10.000 dv/dk (SM24 rotor) ve 15 dk. süre ile santrifüj edilerek (Sorwall Instrument, RC5C, USA) plazmid DNA Konsantreleri çöktürülmüştür. Üst sıvı akıtilarak DNA çökeltisi vakum altında kurutulmuş ve 100 μl Tris-EDTA-1 tamponunda çözülmüştür. Örnekler -20°C 'de saklanmıştır.



Sekil 2. Sezyum klörür-ethidium bromit yoğunluk gradientinde ccc plazmid ve kromozomal DNA bantları

Dializ tüplerinin hazırlanışı

Dializ membran şeritlerinden 20 cm. uzunlukta kesilen parçalar, kaynar %2 sodyum bikarbonat ve 1mM EDTA çözeltisi içinde (2 l.) 10 dk tutulmuştur. Bu süre sonunda steril destile su ile yıkanan membranlar, 2 l. EDTA (0.001M) içerisinde 10 dk daha kaynatılmıştır. Ortam soğutulduktan sonra dializ membranlar aynı çözelti ile birlikte +4°C'de saklanmıştır. Kullanılmadan önce membranların içi ve dışı destile su ile yıkamıştır. Şeritlerin alt kısmı düğümlenerek bağlanmış ve DNA preparatları pipetlendikten sonra üst kısmı da bağlanarak oluşturulan tüpler, dializ ortamlarına aktarılmıştır. Saklama ortamlarında dializ membranlarının daima çözelti içinde tutulması gereğinden (Maniatis vd. 1986) bu kurala dikkatle uyulmuştur.

3.2.10.4 Elektroforez

DNA örneklerinin elektroforezi agaroz (%0.7) jellerde yapılmıştır (Meyers vd.1976). Vertikal jel sistemleri için agaroz, 100 ml tris-asetat (Holmes ve Quigley 1981), horizontal jel sistemleri için ise 100 ml tris-borat (Rochelle vd.1985) elektroforez tamponları içerisinde kaynar su banyosunda çözülmüştür. 45°C 'ye kadar soğutulan ortam; vertikal jeller için 50 ml horizontal sistemler için 15 ml olacak şekilde elektroforez plaklarına akıtılmış, jel tarakları yerleştirilerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en az 2 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda tampon çözeltiler jelleri 0.5 cm kapatacak şekilde elektroforez tanklarına dökülmüş ve jellerin zedelenmemesine dikkat edilerek, taraklar ortamdan alınmıştır (Aaij ve Borst 1972, Maniatis vd.1986). %10 oranında marker boyalı maddesi brom krezol purpur (Maniatis vd. 1986) ile karıştırılan DNA örnekleri, mikropipetler aracılığıyla jel kuyucuklarına aktarılmıştır. Elektroforez, vertikal sistemler için 100 volt'ta 3.0-3.5 saat, horizontal sistemler için 100 voltta 1.0-1.5 saat süreyle yapılmıştır (Hintermann vd.1981). Marker boyanın jel sistemlerini terketmesinden sonra elektrik akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jeller, kullanılan elektroforez tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromit içeren çözeltisinde, 1 saat boyanmıştır. Elektroforez ve boyama işlemleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yapılmıştır (Thomas 1984, Stroop 1988). Boya içeren tampon çözeltiden alınan jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole ışıkta (Transilluminator, Model TM-20 UVP Inc, California,

USA) incelenmiş ve fotoğraflar polaroid film (Tip 667, Polaroid-Cambridge USA) kullanılarak alınmıştır. Fotoğraf-ların çekiminde pembe filtrelerden yararlanılmıştır (Ribelio vd.1989).

Tris-Asetat Tamponu

Tris	4.84 g.
Sodyum asetat	4.08 g.
EDTA	0.37 g.
Destile su	1000 ml.
pH 8.0	

Tris-Borat Tamponu

Tris	10.8 g.
EDTA	9.93 g.
Borik asit	5.5 g.
Destile su	1000 ml.
pH 8.0	

Brom Krezol Purpur (Marker Boya) Çözeltisi

Brom krezol purpur	0.25 g.
Tris	0.60 g.
Gliserol (%50'lik, steril destile su içinde)	100 ml.
pH 7.9	

3.2.10.5. Plazmidlerin büyüklüklerinin saptanması

Streptococcus lactis suşlarından izole edilen plazmidlerin büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker'larının elektroforetik harelilikleri ile, büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır (Macrina vd. 1978, Southern 1979, Schaffer ve Sederoff 1981). Marker ccc DNA Moleküllerinin agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak kurveleri çıkarılmış, istatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve kurvenin eğimi belirlenerek, bakterilerden izole edilen plazmidlerin büyüklükleri saptanmıştır (Campbell 1974, Elder ve Southern 1983, Elder vd. 1983). Hesaplamalarda, standart istatistik analiz programları kullanılmıştır (Hawlett-Packard Manual, 4ICVC, 1986).

$$\text{Kurvenin eğimi (I)} = \frac{E - (G.C)}{B - (G.A)}$$

$$\text{Korelasyon katsayısı (J)} = \frac{E - (G.C)}{\sqrt{[D - (H.C)] \cdot [B - (G.A)]}}$$

$$\text{Moleküler büyüklük (W)} = \text{Antilog}_{10}^{[I \cdot (\alpha - G) + H]}$$

X= Marker DNA molekülerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

y= Marker DNA Molekülerinin büyüklüğü (kilobaz)

$$A = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n$$

$$B = x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \dots + x_n^2$$

$$C = \log_{10} y_1 + \log_{10} y_2 + \log_{10} y_3 + \dots + \log_{10} y_n$$

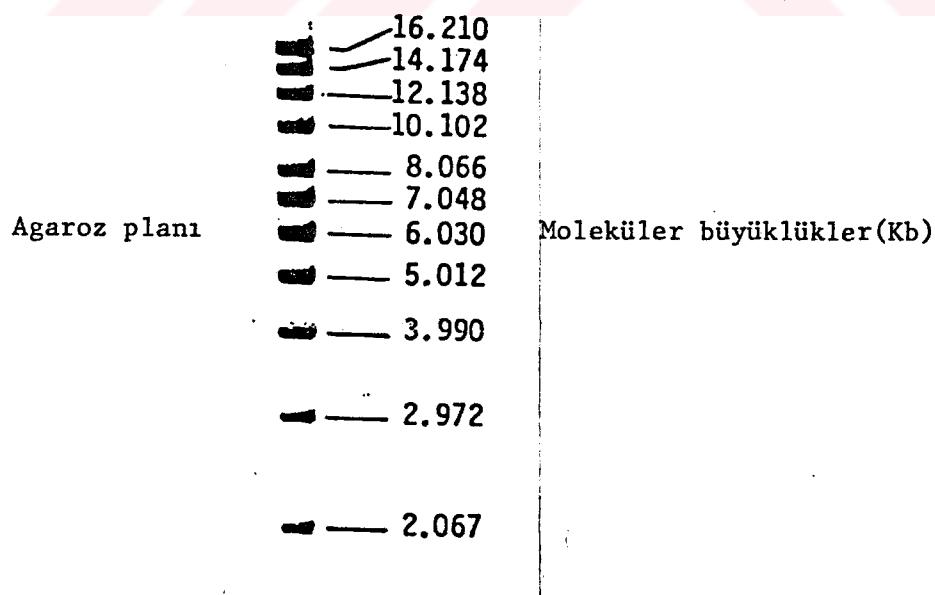
$$D = (\log_{10} y_1)^2 + (\log_{10} y_2)^2 + (\log_{10} y_3)^2 + \dots + (\log_{10} y_n)^2$$

$$E = x_1 \cdot (\log_{10} y_1) + x_2 \cdot (\log_{10} y_2) + x_3 \cdot (\log_{10} y_3) + \dots + x_n \cdot (\log_{10} y_n)$$

$$G = \text{Ortalama } x = \frac{A}{N}$$

$$H = \text{Ortalama } y = \frac{C}{N}$$

α = Moleküler büyülügü bilinmeyen plazmidin jel üzerinde
göçü (mm.)



Şekil 3. Marker ccc DNA moleküllerinin agaroz jel planı ve moleküler büyüklikleri.

Stok Tampon Çözeltisi

10 mM Tris-HCl (p 8.0)

1 mM Na₂EDTA

Saklama sıcaklığı: -20 C (ccc DNA product, No:5622SA,
Bathesda Research Laboratories, Life Technologies
Inc. USA)

3.2.11. Konjugasyon

M17 broth besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilen konjugal verici ve alıcı suş kültürlerinin, aynı besiyeri ile hazırlanan 10⁻¹ oranındaki dilüsyonları karıştırılmış (1.5 ml. verici suş kültürü +1.5 ml alıcı suş kültürü) ve steril membran fitrelerden (0.45 µm) geçirilerek, filtreler M17-glukoz agar ortamlarına aktarılmıştır. Petri kutuları 30°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, membran filtreler 1 ml steril fizyolojik su (%0.89 NaCl) içerisinde çözülmüştür. Alıcı suşların duyarlı olduğu fajlarla (10⁸-10⁹ pfu/ml) muamele edilen (1/1 oranında) bu ortamlardan hazırlanan seri dilüsyonlar, seçici antibiyotikleri içeren laktوز indikatör agar plakları üzerine inoküle edilmiştir (0.2 ml). Etkili faj adsorbsyonunun sağlanması için ortamlara 10 ml /l olacak şekilde, 1M CaCl₂·6H₂O çözeltisi ilave edilmiştir. Laktuz indikatör agar plaklarında 30°C'de 18 saat gelişim sonucu bakteri sayımları alınmış ve verici ya da alıcı hücre başına konjugant oranı saptanmıştır. Kontrol ortamlarda verici ya da alıcı hücre kültürlerinin

sadece birisi denenmiştir. Konjugasyon süreçlerinde transformasyondan korunmak için filtreler 2 ml 100 µg/ml lik DNaz I çözeltisi ile muamele edilmiş ve 37°C'de 15 dk tutulmuştur. Ayrıca steril fizyolojik su ortamlarına 100 µg/ml olacak şekilde DNaz I uygulanmıştır (McKay vd. 1980, Gasson ve Davies 1980b, Gasson ve Davies 1981).

DNaz I Stok Çözeltisinin Hazırlanışı: 100 mg. DNaz I; 20 mM tris-Cl (pH 7.6) 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 100 µg/ml sığır serum albumini ve %50 gliserol içeren çözeltinin 5 ml si ile karıştırılarak, üzerine 15 ml tris-Cl (50 mM, pH 7.6) ilave edilmiştir. 50 ml tris-Cl (50 mM, pH 7.6) ve 0.5 g macaloid içeren çözeltiden (karışım 100°C su banyosunda 5 dk tutulmuş ve buz banyosunda soğutularak kullanılmıştır) 7 ml aktarılarak tüp içerikleri +4°C'de 30 dk. süre ve sabit hız ile karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda, ortam 0°C'de 8000 devirde santrifüj edilerek, üst sıvı steril tüplere alınmıştır. Bu ortama tekrar macaloid çözeltisinden 7 ml ilave edilerek 15 dk 12000 devirde santrifüj edilmiştir. Yeni tüplere aktarılan üst sıvı, 1/l oranında gliserol (%50, buz banyosunda soğutulmuş) ile muamele edilmiş ve -20°C'de saklanmıştır. Bu stok çözeltide DNaz I oranı yaklaşık 3 mg/ml dir (Maniatis vd. 1986).

3.2.12. Transformasyon

Streptococcus lactis suşlarının M17-glukoz broth ortamında geliştirilen 16 saatlik kültürlerinden, 30 ml lik M17-glukoz ortamlarına, 0.3 ml inokülasyonlar yapılmış ve hücreler 30°C'de 2 saat geliştirilmiştir. Bu süre sonunda kültürler 6000 dv/dk süre ile santrifüj edilmiş ve hücre çökeltisi, +4°C steril destile su ile yıkanarak (10 ml) aynı santrifüj hızı ile çöktürülmüştür. 7.6 ml sakkaroz çözeltisi ilave edilerek karıştırılan ortama 25 µg/ml olacak şekilde mutanolisin aktarılmış ve protoplastların oluşumu için oda sıcaklığında 2 saat tutulmuştur (Gasson 1980, Kondo ve McKay 1984). 2 saat sonunda mikroskopik gözlemlerle protoplast formasyonu takip edilmiş ve ortam 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. 1 ml 2XSMM tampon içerisinde suspansiyon haline getirilen protoplast ortamından 0.5 ml alınarak, TE-1 tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş (40 µl) saf plazmid DNA örneği ile karıştırılmış ve üzerine 1.5 ml polietilen glikol ilave edilmişdir. Transformasyonun tamamlanması için ortam oda sıcaklığında 20 dakika tutulmuştur. Transforme hücreler 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve 0.5 ml SMMB tampon içerisinde çözülmüştür. Protoplastların regenerasyonu için ortalama 0.4 ml 2XSMM-M17-glukoz broth (1/1 oranında) ilave edilerek 30°C'de 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, transformasyon ortamlarından hazırlanan dilüsyonlar %5 oranında sakkaroz (0.5 M) ilave edilmiş M17-glukoz üst tabaka agar ile karıştırılarak önceden hazırlan-

mış alt tabaka M17-glukoz agar üzerine aktarılmıştır. Faj direnç özelliği yanında laktoz özelliğini de içeren plazmidin transformantları, brom krezol purpur ve marker antibiyotikler ilave edilen çift tabaka M17-glukoz agar ortamlarında 28°C'de 2-5 gün süre inkübasyondan sonra laktوزu kullanabilen koloniler (sarı) olarak seçilmiş ve uygun dilüsyonlardan sayımlar alınmıştır. Faj dirençlilik dışında herhangi bir fenotipik özellik içermeyen plazmidin transformasyon sikliği ise; uygun dilüsyonlardan yapılan sayımların, yine bu ortamların alici suşların duyarlı olduğu fajlarla muamele edilerek kontrol ortamlara karşı belirlenen % faj dirençli hücre sayımları ile oranlanması sonucu saptanmıştır. Transformant sikliği 40 µl DNAörneğinde 1 µg DNA bulunduğu esasından hareketle, 1 µg DNA için belirlenmiştir (Kondo ve McKay 1984). Ayrıca seçilen transformant ve konjugantlar tüm fajlara karşı denenerek, genel direnç özellikleri araştırılmıştır.

Sakkaroz Çözeltisi

Sakkaroz	17.11 g.
Tris.Cl	0.16 g.
Destile su	100 ml.
pH 7.0	

SMMB Tampon Çözeltisi

Sakkaroz	17.11 g.
Maleat	0.35 g.
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.20 g.
Sığır serum albumini	1.0 g.

Destile su 100 ml.

pH 6.5

2 X SMM Tampon Çözeltisi

Sakkaroz 34.23 g.

Maleat (Disodyum tuzu) 0.71 g.

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.40 g.

Destile su 100 ml.

pH 6.5

Polietilen Glikol Çözeltisi

Polietilen glikol (3350) 30 g.

2 X SMM tampon 50 ml.

Destile su 50 ml.

3.2.13. Transformant ve konjugantlarda plazmid

stabilitesinin saptanması

Plazmid içerikleri 3.2.10.5'de anlatıldığı şekilde belirlenen konjugant ve transformantlar M17-Glukoz ya da M17-Laktoz broth ortamlarına inoküle edilerek 32°C'de 8 saat inkübe edilmiş ve her 8 saatte yeni M17 broth ortamlarına inokülasyonlar (%1 oranında) yapılmak suretiyle, işlem 10 kez tekrarlanmıştır (70-75 generasyon)(Sanders 1988). Bu süre sonunda, M17 agar ortamlarında alınan kültürel sayımlar ve etkili faj çözeltileri ile 1/1 oranında muamele edi-

len aynı bakteri kültürlerinin laktوز indikatör ortamlarda alınan sayımları karşılaştırılarak, faj dirençli plazmidler için stabilité oranı belirlenmiştir.



4- SONUÇLAR

Laktik streptokok izolatlarından *Streptococcus lactis* suşlarının tanımlanmasında, Huggins (1984) tarafından oluşturulan tanı şeması kullanılmış; morfolojik, biyokimyasal ve kültürel testler sonucu, 28 izolatin *Streptococcus lactis* olduğu belirlenmiştir. Anahtar testler dışında, ayrıca doğal suşların proteolitik aktivite özelikleri araştırılmış ve tümünün proteolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 2).

Streptococcus lactis suşları kullanılarak Türk çiğ sütlerinden izole edilmiş olan laktik fajların (P78-LØ, P81-13Ø, P88-13Ø ve P76-2Ø) elektronmikroskopunda incelenmeleri sonucu morfolojileri belirlenmiş ve fotoğrafları alınmıştır. P81-13Ø, P78-LØ ve P88-13Ø izometrik baş yapısında bulunurken, P76-2Ø prolate baş yapısında belirlenmiştir. Diğer yandan, tüm fajlarda baş boyutlarının ve kuyruk uzunluğunun farklılık gösterdiği, ayrıca; P88-13Ø kuyruk fibrillerini ve yaka elemanlarını içerirken, P78-LØ ve P76-2Ø de kuyruk fibrillerini içerdiği, ancak yaka kısmına sahip olmadığı, P81-13Ø'de ise her iki elemanın da bulunmadığı saptanmıştır (Tablo 3, Şekil 4, 5, 6, ve 7). P78-LØ, P81-13Ø ve P88-13Ø, Davies ve Gasson (1984) tarafından "Grup B" üyesi laktik fajlar için tanımlanan özellikler ile tamamen uygunluk göstermiş, bununla beraber P76-2Ø, kuyruk uzunluğu ve baş boyutları bakımından, prolate fajlar için bildirilen oranlara göre oldukça küçük bulunmuştur.

Streptococcus lactis suşlarında faj duyarlılıklarının belirlenmesinde; Türkiye'den sağlanan fajlar yanında, deşik ülkelerde bulunan işletmelerin süt fermentasyon süreçlerinde farklı ortamlardan izole edilerek, morfolojik özellikleri tanımlanmış (Tablo 1) 7 farklı laktik faj kullanılmıştır. 11 litik faja karşı *Streptococcus lactis* suşlarında faj duyarlılıklarının araştırılması sonucu; 28 suşun, Türk çiğ sütlerinden izole edilmiş olan P78-LØ, P81-13Ø, P88-13Ø ve P76-2Ø için tamamen aynı faj duyarlılık verdiği, ancak bu suşların diğer 7 faja karşı duyarlılıklarında değişimeler olduğu saptanmıştır. Araştırmada kullanılan tüm *Streptococcus lactis* suşlarında en geniş konakçı özgüllüğüne sahip fajlar olarak; prolate baş yapısındaki ML3Ø ve izometrik baş yapısındaki 712Ø belirlenmiştir. ML3Ø suşlara karşı %78.57, 712Ø ise %64.28 oranında etkili bulunmuştur. Türk çiğ sütlerinden izole edilmiş olan fajların (P78-LØ, P81-13Ø, P88-13Ø ve P76-2Ø) dördünün de 28 suşa karşı etki oranı %39.28 olarak saptanmıştır. 11 laktik faj içerisinde, 28 suşa karşı en düşük etki oranı (%14.28) ise prolate baş yapısında tanımlanmış olan 2015Ø ve 2509Ø için belirlenmiştir. Faj duyarlılık testleri sonucu, faj morfolojisi ile konakçı özgüllüğü arasında bir ilişki belirlenmemiştir. Faj duyarlı suşların tümü, prolate ve izometrik baş yapısındaki morfolojik grup üyesi fajlarla liziz vermiştir. Aynı şekilde, faj dirençli suşlarda her iki tip faja karşı da direnç gözlenmiştir. 28 *Streptococcus lactis* suşunun tümünde, mitomisin C ve ultraviyole ışık uygulaması yöntemiyle kullanılarak, temperent faj içerikleri araştırılmıştır.

Tablo 2. Laktik streptokok izolatlarından *Streptococcus lactis* susclarının tanısı

	Bakteri Kod No.'ları	Bakteri Kod No.'ları																				
		P102	P103	P104	P105	P106	P107	P108	P109	P110	P111	P112	P113	P114	P115	P116	P117	P118	P119	P120	P121	P122
Morfolojik, Biyokimyasal ve Kültürel Özellikler		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bakteri Morfolojisı	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Gram Boyama	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz Testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteolitik Aktivite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arijininden Amonyak Oluşturma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat Kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30°C																					
Elliker	%6.5 NaCl																					
Broth'ta	30°C																					
Gelisme	pH 9.6																					
	30°C																					
	45°C																					

K: Kok.

Tablo 3. Türk çiğ sütlerinden izole edilen fajların morfolojik özelliklikleri

Morfolojik Özellikler	Faj Kod No.ları		
	P78-LØ	P81-13Ø	P88-13Ø
Baş Yapısı	İzometrik	İzometrik	İzometrik
Baş Boyutları (nm.)	50	58	45
Kuyruk Uzunluğu (nm.)	138	280	135
Kuyruk Fibrilleri	+	-	+
Yaka	-	-	-

nm: Nanometre

Tablo 4. *Streptococcus lactis* suşlarının faj duyarlılıkları ve temperatür faj indüksiyonu

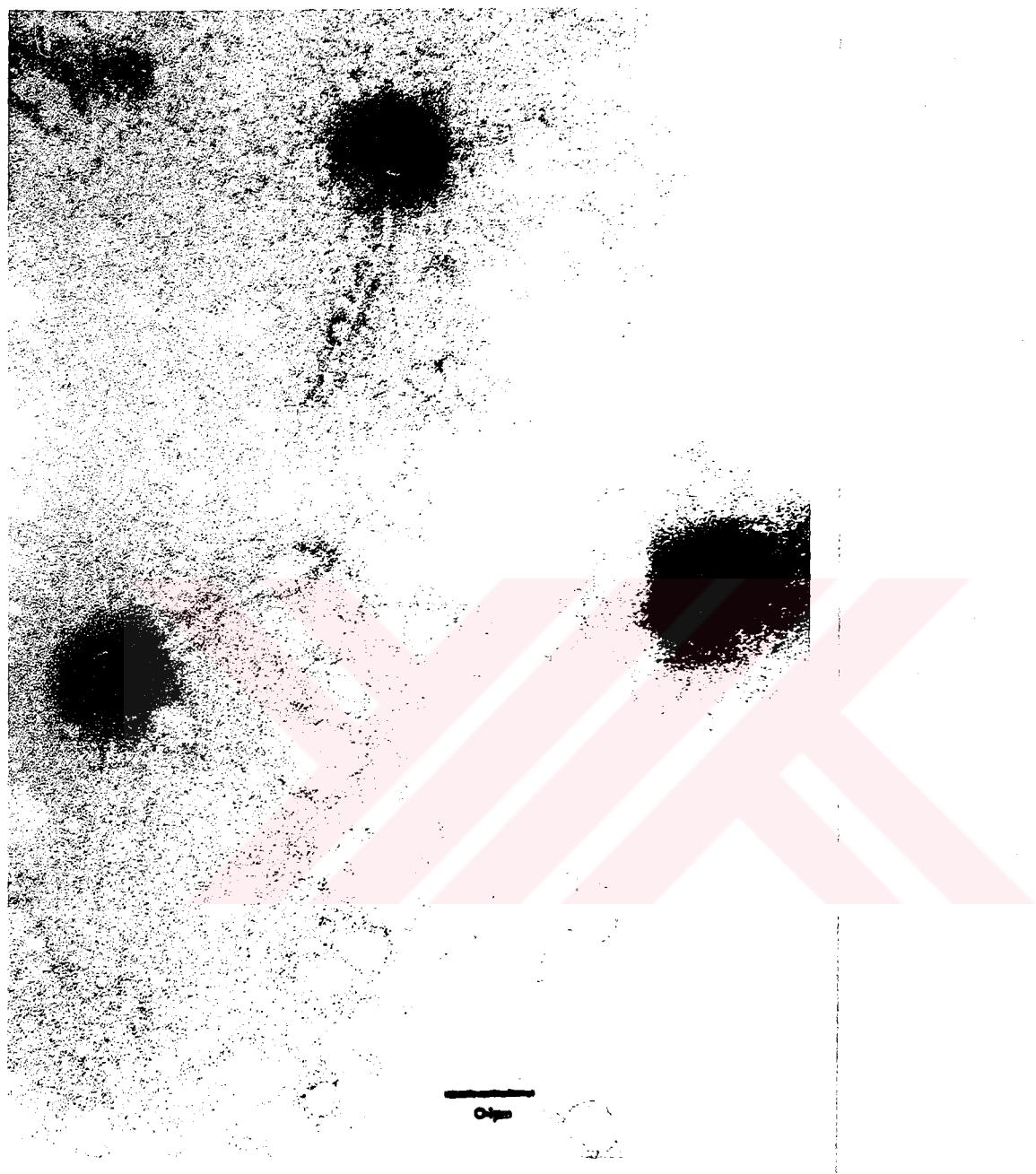
Faj duyarlılık testleri 32°C inkübasyon sıcaklığında yapılmıştır

+ : Direncili

- : Duyarlı

UV : Ultraviolet sunlamps

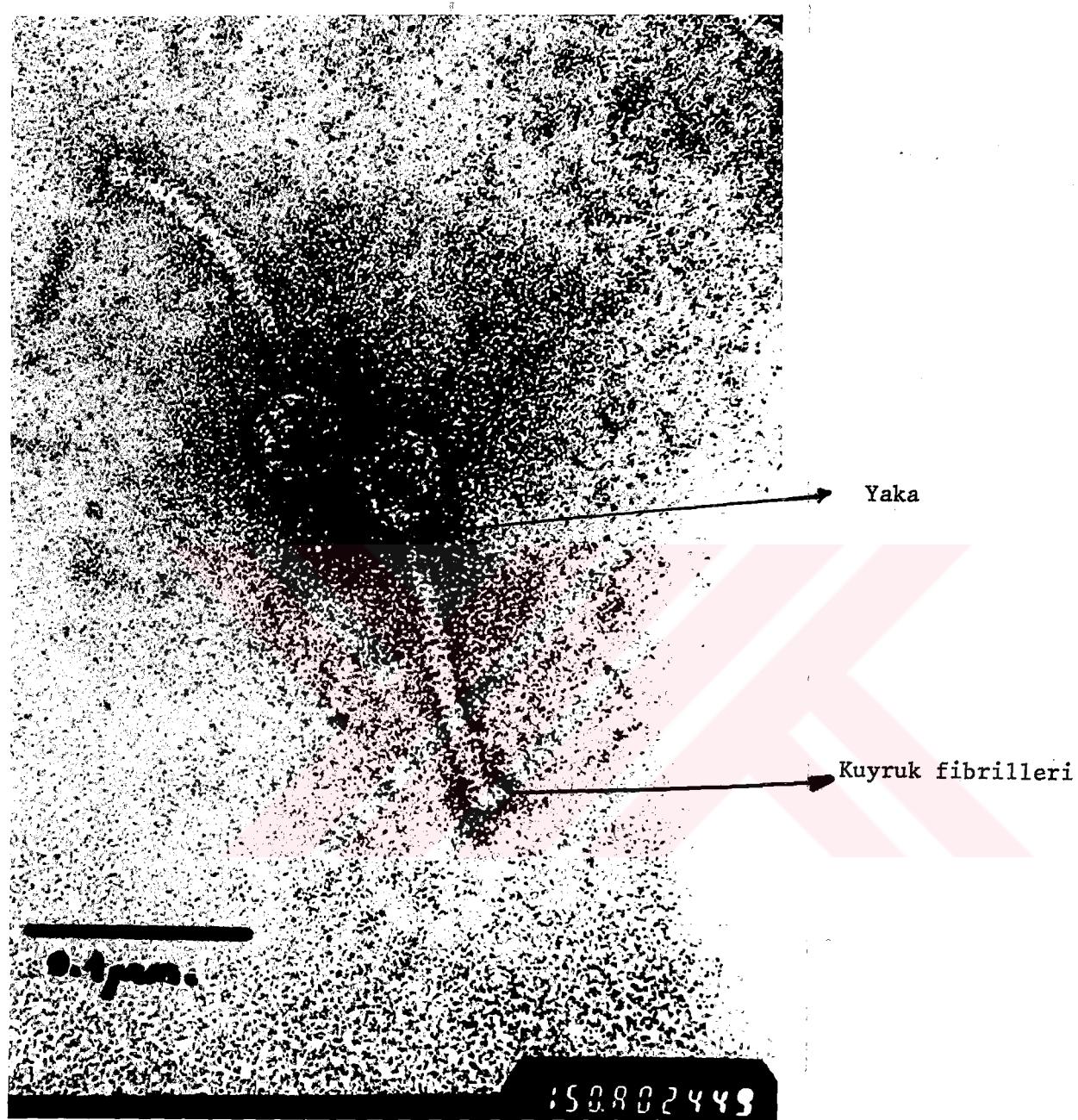
MC : Mitonis in Cuyugulamasi



Sekil 4. P81-13 Fajının elektronmikroskopik görünüşü

Mikroskop büyütmesi : 40000X

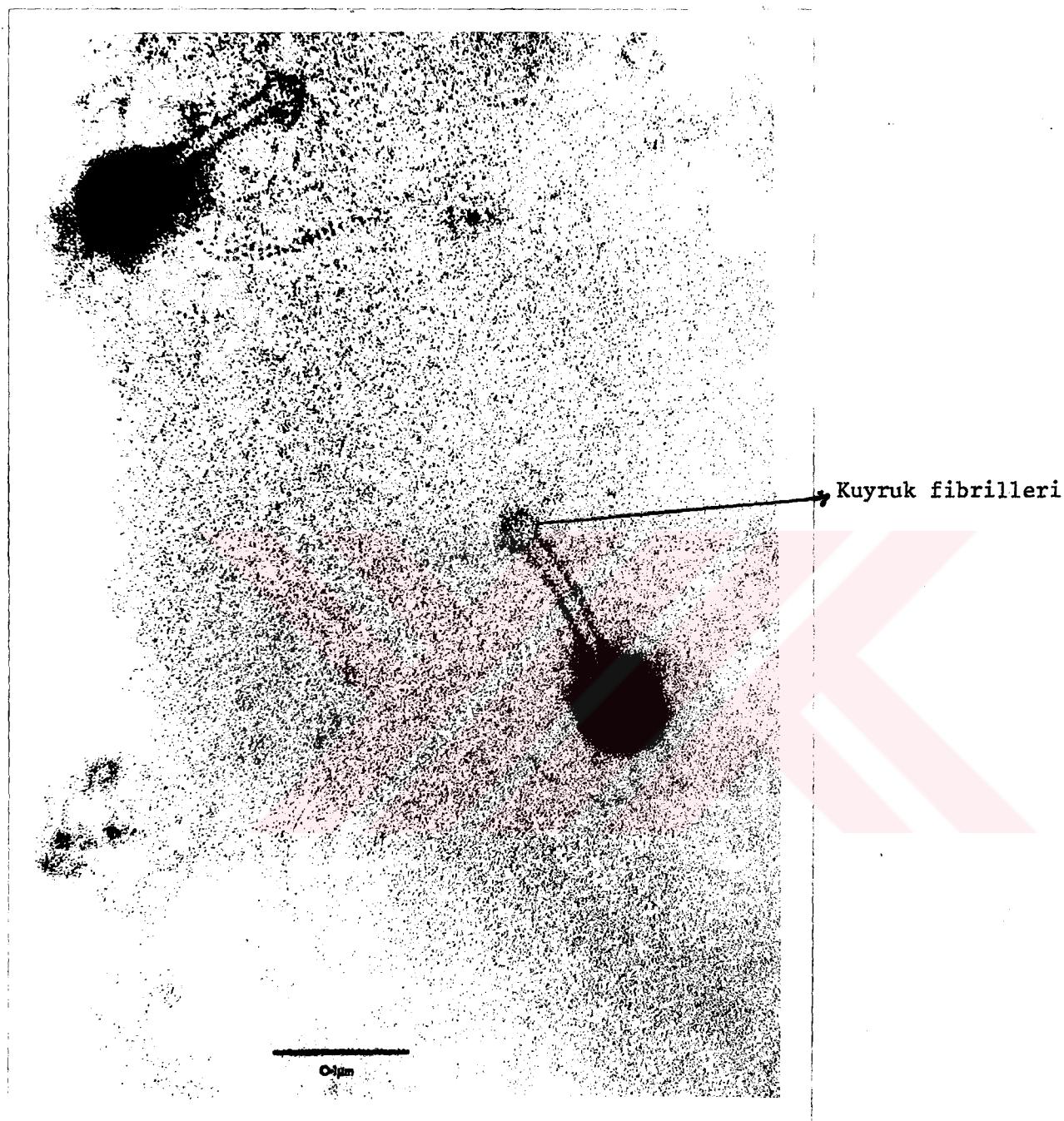
0.1 μm = 1.3 cm.



Şekil 5. P88-13 Fajının elektronmikroskopik görünüsü

Mikroskop büyütmesi : 85000X

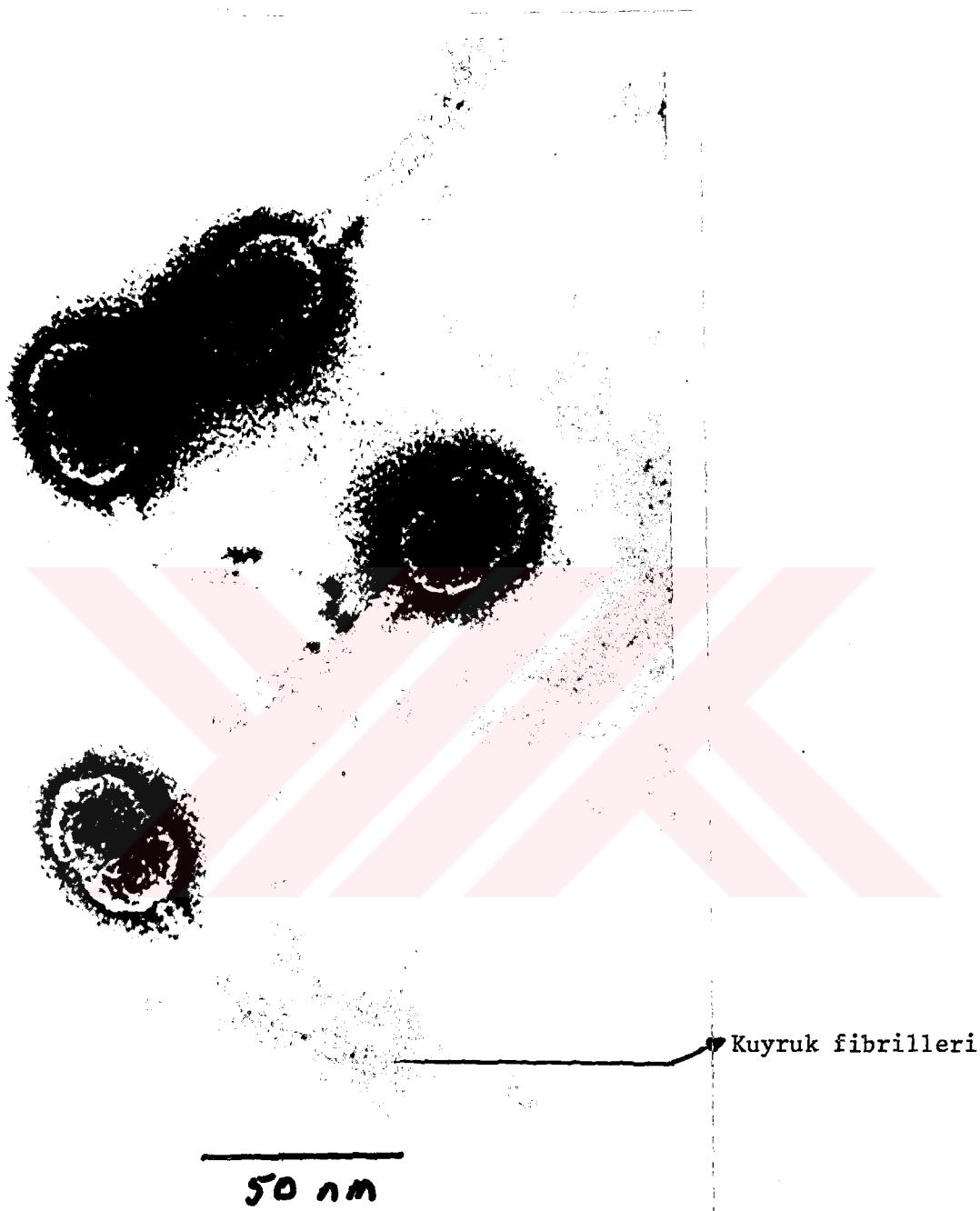
0.1 μm = 3.4 cm.



Sekil 6. P78-L Fajının elektronmikroskopik görünüsü

Mikroskop büyütmesi : 60000X

0.1 μm = 2.2 cm.



Sekil 7. P76-2 Fajının elektronmikroskopik görünüşü

Mikroskop büyütmesi : 120000X

50 nm = 2.9 cm.

Ancak, her iki uygulama sonucunda da, suşların hiçbirinde temperent faj indüksiyonu gerçekleşmemiştir (Tablo 4).

Konjugasyon ve transformasyon denemelerinde kullanılacak suşlarda, genetik aktarım sonrası, konjugantların ve transformantların seçiminde esas teşkil edecek antibiyotik dirençlilik marker'larının belirlenmesi amacı ile, *Streptococcus lactissuşlarının* 30 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını, toplam 50 antibiyotik konsantrasyonu için disk diffüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. 28 suş içerisinde; P78 linkomisin, P81 ve P90 kanamisin ve streptomisin, P61 rifampin, P141 ve A4 neomisin, P112 kolistin ve P102 nalidiksik asidin denenen tüm disk konsantrasyonlarına karşı dirençli bulunmuştur. 10 µg. streptomisin disk konsantrasyonuna dirençli bulunan A4, All, P13, P61, P65, P76, P88, P102, P130, P139, P140, P141 ve Z16 suşları, 25 µg. streptomisin disk konsantrasyonuna duyarlı bulunmuştur. Aynı şekilde 5 µg. neomisin disk konsantrasyonunda dirençli olarak belirlenen P61, P81 ve P90 suşları, 30 µg. neomisin disk konsantrasyonuna duyarlı, 5 µg. novobiosin disk konsantrasyonunda dirençli olarak belirlenen P81 ve P90 suşları 30 µg. novobiosin disk konsantrasyonuna karşı duyarlı, 2 µg. kolistin disk konsantrasyonunda dirençli olarak belirlenen P130, P140 ve Z16 suşları 10 µg. kolistin disk konsantrasyonuna karşı duyarlı ve 1 µg. mendelamin disk konsantrasyonuna dirençli olarak belirlenen A4, A10, All, P61, P64, P102 ve P130 suşları, 2.5 µg. mendelamin disk konsantrasyonlarına karşı duyarlı, bulunmuştur. Suş-

larda diğer antibiyotik disk konsantrasyonlarına karşı duyarlılık düzeyleri büyük ölçüde benzer olarak saptanmıştır (Tablo 5).

Yukarıda belirtilen 7 farklı antibiyotiğin disk konsantrasyonlarına dirençli bulunan 8 *Streptococcus lactis* suşunda, aynı antibiyotiklere karşı deneysel direnç düzeyleri kıyaslanmış ve en yüksek düzeyde direnç; P81 ve P90 suşlarında, streptomisin ve kanamisine karşı saptanmıştır. Streptomisin için her iki suşta da minimal inhibisyon konsantrasyonu 250 µg/ml. olarak belirlenirken, kanamisin için 80 µg/ml. olarak bulunmuştur. En düşük minimal inhibisyon konsantrasyonu, P78 suşunda linkomisin için 7 µg/ml. saptanmıştır (Tablo 6). Genetik aktarım süreçlerinde kullanılan suşların, antibiyotik duyarlılık fenotipinde mutasyon sonucu oluşabilecek değişimlere karşı, birden fazla antibiyotik marker içermesi tercih edildiğinden (Davies 1979), bu araştırmadaki konjugasyon ve transformasyon denemelerinde, faja dirençli verici suşların aksine; faja duyarlı ve iki farklı antibiyotiğin yüksek konsantrasyonlarına doğal olarak direnç gösteren P81 suşunun laktوز fermentasyon yeteneğini yitirmiş (Lac^-) mutantı (Tablo 8) alıcı suş olarak kullanılmıştır.

28 *Streptococcus lactis* suşunda plazmid içeriklerinin araştırılması sonucu; suşların 1.8 ile 41.0 Kb. arası büyülüklerde ve 1-10 adet arasında değişen sayıarda plazmid içerdikleri saptanmıştır (Şekil 8, 9, 10 ve 11). L3 ve Pl46 (Şekil 8 ve 9) suşlarının yanında, P75 ve P99 (Şekil

9 ve 10) ile P81 ve P90 (Şekil 11) suş çiftlerinde plazmid sayısı ve büyülüğu birbirinin aynı belirlenmiştir. Plazmid sayısı ve büyülüğu benzer olan suşların, 30 farklı antibiyotik ve 11 laktik faja karşı duyarlılık spektrumlarının da aynı olduğu gözlenmiştir (Tablo 4 ve 5). Aynı suşları 15 ayrı laktik faja karşı deneyen Tunail ve Aşkın'ın (1990) saptadıkları faj spektrumu buradaki bulgularla uyuşmaktadır. Bu sonuçlardan hareketle; L3 ve P146, P75 ve P99 ile P81 ve P90 suş çiftlerinin, kendi içinde aynı suş olduğuna karar verilmiştir. Suşlarda en yüksek oranda bulunan aynı moleküller büyülükteki plazmidler, 32.0 Kb ve 26.1 Kb.lik plazmidler olarak belirlenmiştir. 28 suşun 18'inin 32.0 Kb. büyülükte, 17'sinin ise 26.1 Kb. büyülükte plazmidleri içerdiği gözlenmiştir. Bunun dışında, 13 suşun 41 Kb., 11 suşun ise 16.5 Kb. büyülüklere deki plazmidleri içerdiği saptanmıştır.

Tablo 5. *Streptococcus lactis* suslarinin antibiyotik duyarlılliklari

Antibiyotikler ve Konsantrasyonları	Bakteri Kod No.ları
Bacitracin*	P13
Bacitracin*	P14
Bacitracin*	P15
Neomycin*	P16
Neomycin*	P17
Oleandomycin*	P18
Oleandomycin*	P19
Novobiocin*	P20
Novobiocin*	P21
Cloxacillin*	P22
Lincomycin*	P23
Erytromycin*	P24
Erytromycin*	P25
Streptomycin*	P26
Streptomycin*	P27
Ampicillin*	P28
Ampicillin*	P29
Oxacillin*	P30
Chlortetracycline*	P31
Chlortetracycline*	P32
Oxytetracycline*	P33
Oxytetracycline*	P34
Polymyxin B*	P35
Polymyxin B*	P36
Furadantin*	P37
Furadantin*	P38
Penicillin G*	P39
Penicillin G*	P40
Bacitracin*	P41
Bacitracin*	P42
Neomycin*	P43
Neomycin*	P44
Oleandomycin*	P45
Oleandomycin*	P46
Novobiocin*	P47
Novobiocin*	P48
Cloxacillin*	P49
Lincomycin*	P50
Erytromycin*	P51
Streptomycin*	P52
Streptomycin*	P53
Ampicillin*	P54
Oxacillin*	P55
Chlortetracycline*	P56
Chlortetracycline*	P57
Oxytetracycline*	P58
Oxytetracycline*	P59
Polymyxin B*	P60
Polymyxin B*	P61
Furadantin*	P62
Furadantin*	P63
Penicillin G*	P64
Penicillin G*	P65
Bacitracin*	P66
Bacitracin*	P67
Neomycin*	P68
Neomycin*	P69
Oleandomycin*	P70
Oleandomycin*	P71
Novobiocin*	P72
Novobiocin*	P73
Cloxacillin*	P74
Lincomycin*	P75
Erytromycin*	P76
Erytromycin*	P77
Streptomycin*	P78
Streptomycin*	P79
Ampicillin*	P80
Oxacillin*	P81
Chlortetracycline*	P82
Chlortetracycline*	P83
Oxytetracycline*	P84
Oxytetracycline*	P85
Polymyxin B*	P86
Polymyxin B*	P87
Furadantin*	P88
Furadantin*	P89
Penicillin G*	P90
Penicillin G*	P91
Bacitracin*	P92
Bacitracin*	P93
Neomycin*	P94
Neomycin*	P95
Oleandomycin*	P96
Oleandomycin*	P97
Novobiocin*	P98
Novobiocin*	P99
Cloxacillin*	P100
Lincomycin*	P101
Erytromycin*	P102
Erytromycin*	P103
Streptomycin*	P104
Streptomycin*	P105
Ampicillin*	P106
Ampicillin*	P107
Oxacillin*	P108
Chlortetracycline*	P109
Chlortetracycline*	P110
Oxytetracycline*	P111
Oxytetracycline*	P112
Polymyxin B*	P113
Polymyxin B*	P114
Furadantin*	P115
Furadantin*	P116
Penicillin G*	P117
Penicillin G*	P118
Bacitracin*	P119
Bacitracin*	P120
Neomycin*	P121
Neomycin*	P122
Oleandomycin*	P123

* : Mastitis tedavisinde kullanılan antibiyotikler.

Tablo 5. *Streptococcus lactis* susclarının antibiyotik duyarlılıklarını (devam)

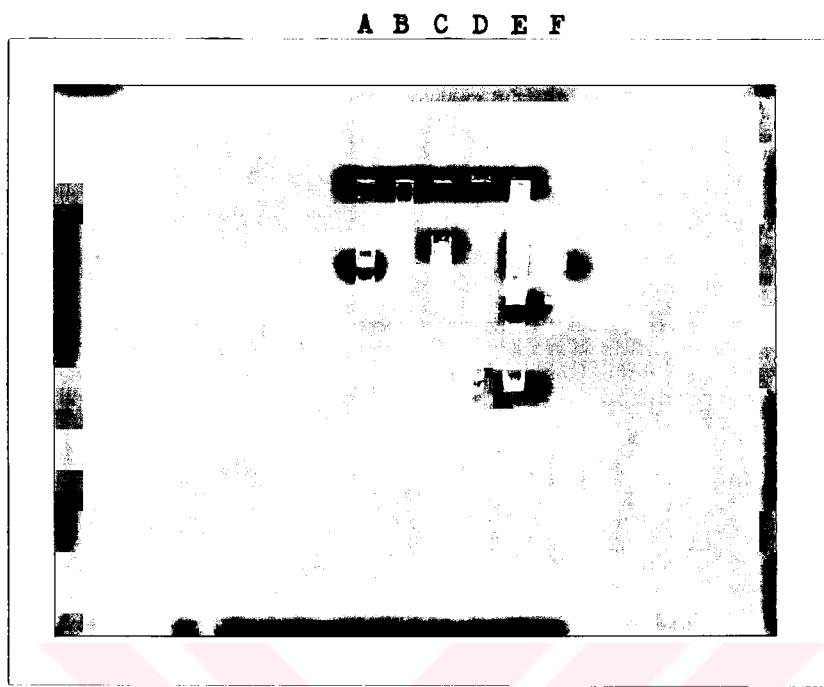
Antibiyotikler ve Konsantrasyonları	Bakteri Kod No.'ları
Nalidixic acid 30 µg.	A1-1
Phenetecillin 3 Ünite	P61
Vancomycin 5 µg.	P62
Vancomycin 30 µg.	P63
Cephalothin 30 µg.	P64
Colistin 2 µg.	P65
Colistin 10 µg.	P66
Triburon 250 µg.	P67
Doxycycline 5 µg.	P68
Doxycycline 30 µg.	P69
Kanamycin 5 µg.	P70
Kanamycin 30 µg.	P71
Chloramphenicol 5 µg.	P72
Chloramphenicol 30 µg.	P73
Methicillin 5 µg.	P74
Nafcillin 1 µg.	P75
Methacycline 5 µg.	P76
Methacycline 30 µg.	P77
Mendelamine 1 µg.	P78
Mendelamine 2,5 µg.	P79
Rifampin 5 µg.	P80
Demethylchloro tetracycline 5 µg.	P81
Demethylchloro tetracycline 30 µg.	P82
	P99
	P88
	P77
	P76
	P75
	P72
	P71
	P70
	P69
	P68
	P67
	P66
	P65
	P64
	P63
	P62
	P61
	P90
	P102
	P112
	P130
	P139
	P140
	P141
	P146
	P148
	Z16
	Z73
	Z73

D: Dirençli
 1: İnhibisyon zonu \leq 2 mm.
 2: İnhibisyon zonu $>$ 2 mm. $<$ 5 mm.
 3: İnhibisyon zonu \geq 5 mm.

Tablo 6. *Streptococcus lactis* suşlarının disk duyarlılık testleri sonucu seçilen antibiyotiklere karşı deneysel direnç düzeyleri

Bakteri Kod No.ları	Antibiyotikler ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (µg/ml)				
	Linkomisin	Streptomisin	Rifampin	Neomisin	Kolistin
P78	7	—	—	—	—
P81	—	250	—	—	—
P90	—	250	—	—	—
P61	—	—	16	—	—
P141	—	—	—	55	—
A4	—	—	—	60	—
P112	—	—	—	—	24
P102	—	—	—	—	—
					41

— : Antibiyotiklerin denenen disk konsantrasyonlarına karşı duyarlı (Tablo 5).



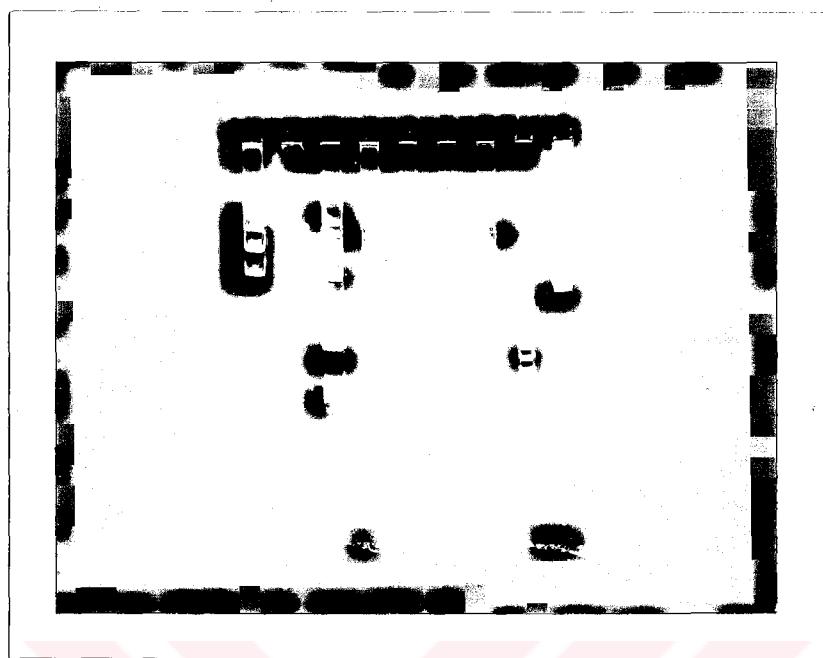
*Sekil 8. Streptococcus lactis suşlarında plazmid içerikleri ve
büyükükleri (Kb.)*

A <u>P102</u>	B <u>P64</u>	C <u>P140</u>	D <u>ccc</u>	E <u>P148</u>	F <u>L3</u>
41.0	41.0	37.5	15.14	32.0	32.0
37.5	32.0	32.0	13.82	26.1	26.9
26.1	26.1	19.8	12.62	16.5	26.1
22.8	16.5	16.5	10.52	12.6	16.5
8.0	8.7	8.7	8.01	6.1	12.6
	5.6	4.2	7.31	4.6	
	5.0	3.5	6.10		
	1.8		5.08		
			3.81		
			2.94		
			2.04		

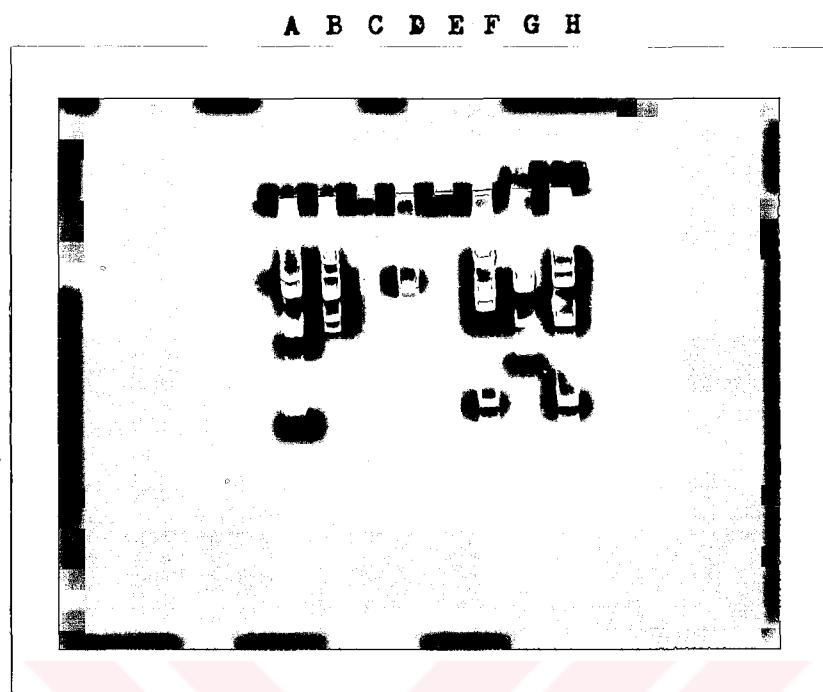
Kb : Kilobaz

ccc : Plazmid DNA marker

A B C D E F G H I

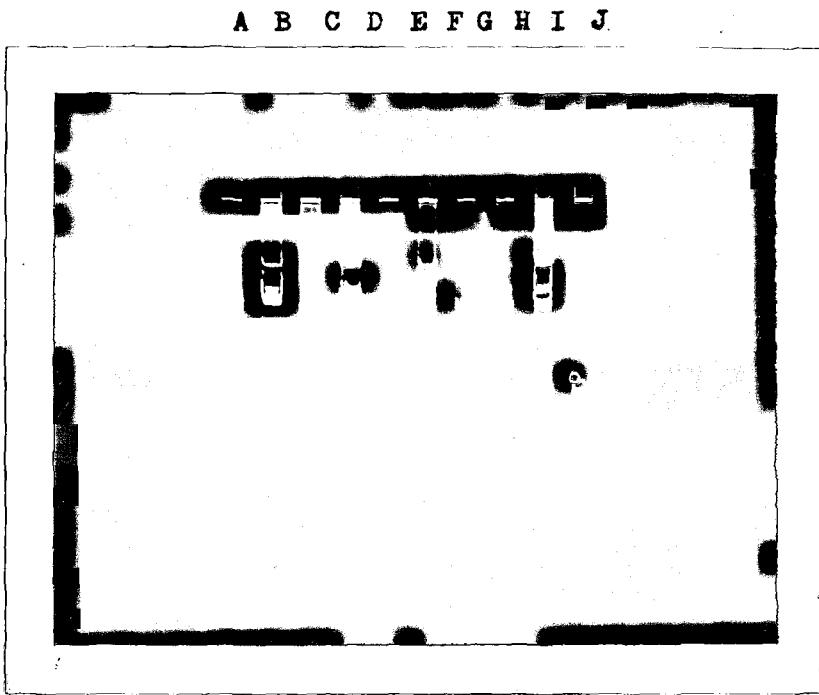


Sekil 9. Streptococcus lactis suslarında plazmid içerikleri ve
büyüklükleri (Kb.)



*Sekil 10. Streptococcus lactis suşlarında plazmid içerikleri ve
büyüklükleri (Kb.)*

A <u>Z73</u>	B <u>P13</u>	C <u>P99</u>	D <u>P78</u>	E <u>ccc</u>	F <u>P88</u>	G <u>P77</u>	H <u>Z73</u>
32.0	37.2	41.0	26.1	16.19	37.2	32.0	32.0
26.1	32.0	26.1	19.3	14.16	20.5	26.1	26.1
16.5	26.1	16.5	14.1	12.12	19.3	19.3	16.5
14.1	18.4		6.1	10.09	12.8	16.5	14.1
12.6	16.5			8.05	6.1	12.6	12.6
6.1	14.1			7.03	4.6	8.0	6.1
4.6	7.2			6.00		7.2	4.6
	2.8			5.00		6.0	
				3.98		4.6	
				2.96		2.2	
				2.05			



*Sekil 11. Streptococcus lactis suşlarında plazmid içerikleri ve
büyüklikleri (Kb.)*

A <u>P81</u>	B <u>Z16</u>	C <u>P76</u>	D <u>P130</u>	E <u>CCC</u>	F <u>P141</u>	G <u>P90</u>	H <u>A11</u>	I <u>P139</u>	J <u>A10</u>
30.1	41.0	41.0	41.0	16.20	41.0	30.1	41.0	41.0	41.0
	38.2	37.6	32.0	14.17	32.0		32.0	32.0	38.2
	32.0	32.0	30.1	12.13	30.1		30.1	30.1	32.0
	30.1	29.3	24.2	10.10	24.2		24.2	8.1	30.1
	24.2	23.1	8.1	8.06	8.1		8.1	5.3	24.2
	8.1	7.0	5.3	7.04	7.0		5.3	5.0	8.3
	5.3	4.2	5.0	6.03	5.3			1.9	5.0
	5.0	2.1	4.2	5.01	5.0				
			4.2	3.98	1.9				
					2.97				
					2.06				

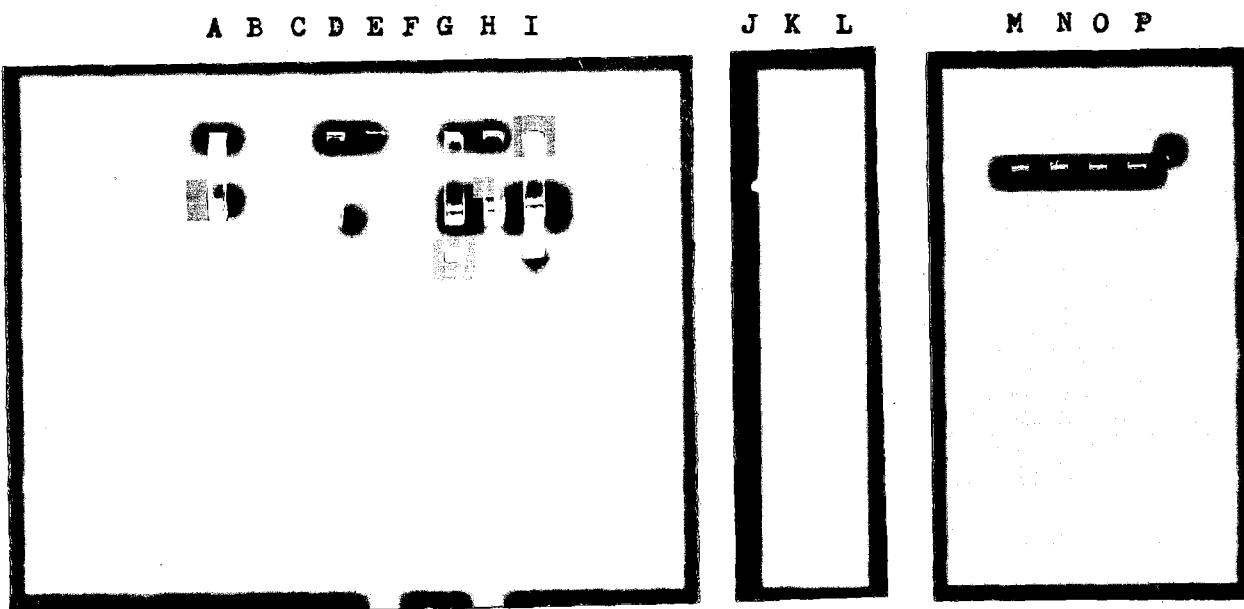
Denemedede kullanılan tüm fajlara karşı direnç gösteren suşlarda, bu özelliğin plazmidlerle olan ilişkisini araştırmak amacıyla ile, doğal suşların P81-13Ø'e dirençli, akriflavin uygulanmış mutantları, laktوز indikatör agar ortamlarında seçilmişdir. P81-13Ø'e dirençli mutantlar, laktوز indikatör agar üzerinde, laktوز fermentasyon yeteneğinde (Lac^+) ve laktوز fermentasyon yeteneğini yitirmiş (Lac^-) özellikle koloniler oluşturmuştur. Faj dirençli mutantlarda plazmid içerikleri incelendiğinde; tümünün doğal suşa ait diğer plazmidlerin varyasyonları yanında, daima 32.0 Kb. ve 26.1 Kb. büyülüklüklerde plazmidleri içерdiği saptanmıştır (Tablo 7). *Streptococcus lactis* Pl48 doğal suşu ve faj dirençli mutantlarının agaroz jeller üzerinde alınan, plazmid içeriklerine ait fotoğraflar ve plazmid büyülüklükleri Şekil 12 ve 13'te gösterilmektedir. Faj dirençli suşların bu özelliği devam ettiren mutantlarında, 26.1 Kb. ve 32.0 Kb. büyülükteki plazmidlerin beraber ya da yalnız birinin bulunması halinde, 32°C inkübasyon sıcaklığında faj direnç özelliğinin devam etmesi, ayrıca her iki plazmidin giderildiği mutantlarda -doğal suşlara ait tüm plazmidleri içereler bile- faja duyarlı hale dönüşümün görülmesi (Tablo 7), doğal suşlarda faj direnç fenotipinin bu iki plazmid tarafından kontrol edildiğini kanitlamaktadır. Yalnız 32.0 Kb. büyülükte plazmidi içeren mutantlarda faj direnç yanında Lac^+ özelliğin de devam ettiği, bütün doğal suşlar için belirlenmiştir (Tablo 7).

Streptococcus lactis suşlarında faj direnç fenotipinden sorumlu bulunan 32.0 Kb. ve 26.1 Kb. büyülükteki

plazmidlerde kodlanan faj direnç sistemlerinin etki mekanizması hakkında fikir sahibi olabilmek amacıyla, doğal suşların ve faja dirençli mutantlarının faj adsorbsiyon özellikleri incelenmiş ve değişik sıcaklıklarda tüm fajlara karşı duyarlılıklarındaki değişimler araştırılmıştır. Doğal suşlar, tüm fajlara karşı 32°C ve 37°C 'de direnç özelliğini gösterirken, 26.1 Kb. büyüklükte plazmidi içeren Lac^{-} mutantlarda 32°C 'de gözlenen tam direnç özelliğinin, 37°C 'de sürdürülemediği ve mutantların tüm fajlara karşı duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, faja dirençli doğal suşlarda hiçbir fajın adsorbsyonun oluşmamasına rağmen, 26.1 Kb.lik plazmidi içeren faja dirençli mutantlarda faj adsorbsyonunun %77-98 gibi çok yüksek oranlarda olduğu saptanmıştır. Diğer yandan, sadece 32.0 Kb. büyüklükte plazmidi içeren Lac^{+} mutantlarda tüm fajlara karşı direnç, doğal suşlarda olduğu gibi, 32°C ve 37°C 'de sürdürülmüş ve faj adsorbsyonunun tamamen engellenmiş olduğu belirlenmiştir (Tablo 7).

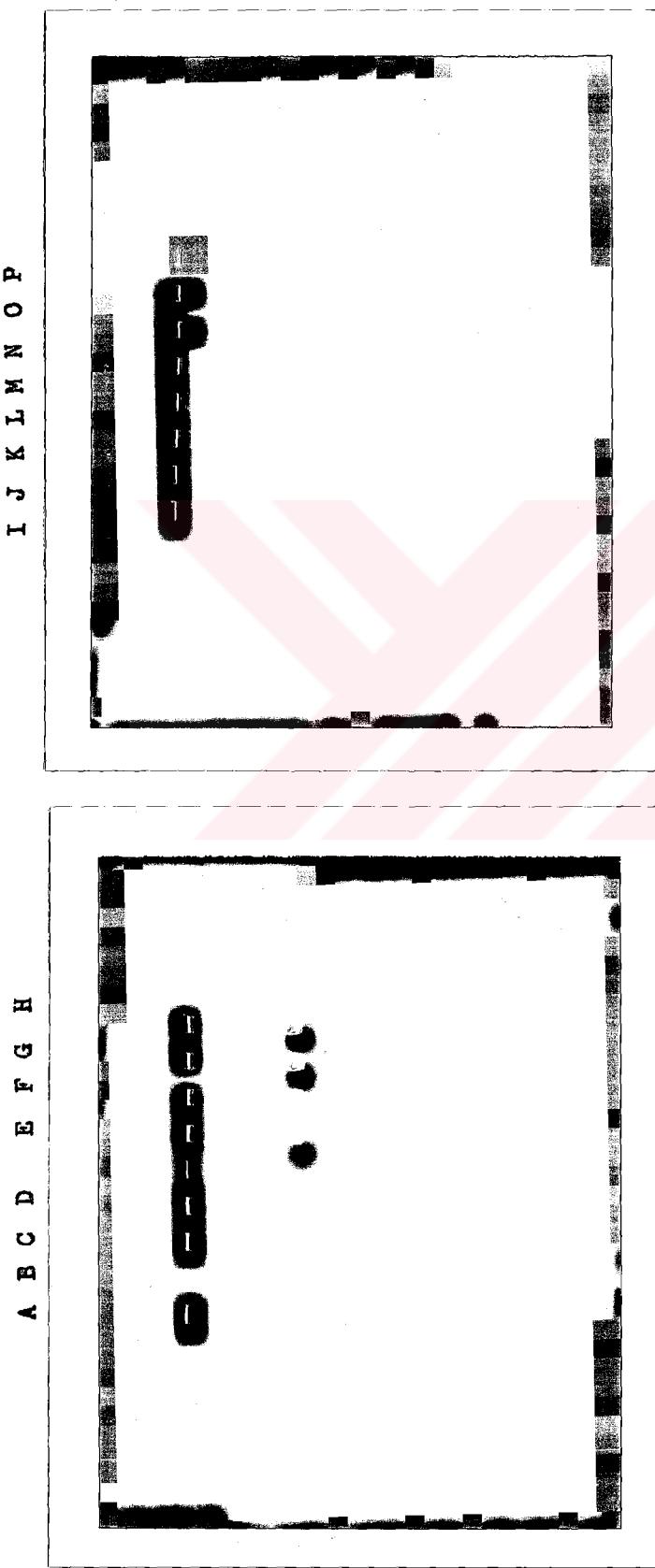
Tüm bu testler sonucu, faj direnç özelliğinden sorumlu plazmidler ve etki sistemleri yanında, transformasyon ve konjugasyon denemelerinde kullanılacak alıcı ve verici suşların daha önce belirlenmiş olan fenotipik ve genetik özelliklerinden yararlanılarak, transformant ve konjugant seçim ortamlarında kullanılacak marker'ları saptanmıştır. 26.1 Kb. büyüklükte plazmidin, 32.0 Kb.lik plazmid olmaksızın transferi halinde; genetik aktarım sağlanacak susta laktوز kullanım özelliği (Lac^{+}) seçici bir özellik olamayacağı için, konjugant ve transformant ortamlarında, doğal

suşun kolaylıkla belirlenebilen bir başka özelliği olan faj dirençlilikten yararlanılmıştır (Tablo 8). Bu amaçla, genetik aktarım süreçleri ve rejenerasyon tamamlandıktan sonra, bakteriler kontrol faj olan P81-13Ø ile 1/1 oranında muamele edilerek seçici ortamlara aktarılmıştır. Alıcı olarak kullanılan, plazmidleri giderilmiş her iki suşta da streptomisine dirençlilik ($200 \mu\text{g}/\text{ml}.$) yanında, P81-1 için kanamisine dirençlilik ($70 \mu\text{g}/\text{ml}.$), 1614 kontrol suşu için ise rifampine dirençlilik ($100 \mu\text{g}/\text{ml}.$), özellikleri ikinci bir antibiyotik marker olarak kullanılmıştır (Tablo 7).



Sekil 12. Streptococcus lactis P148 suşunun faja dirençli mutantlarında plazmid içeriğleri (Kb.)

- A, D, H : 32, 26.1, 16.5 ve 6.1
- B, C, F : 26.1
- E : Plazmid DNA marker
- G, I : 32, 26.1, 16.5, 6.1 ve 4.6
- K : 32, 26.1, 16.5, 12.6, 6.1 ve 4.6 (*Streptococcus lactis* P148 doğal suş)
- J, L : 32
- M : 32, 16.5, 12.6
- N : 26.1, 16.5
- O : 32, 26.1, 16.5, 12.6, 6.1
- P : 32, 26.1, 16.5, 4.6



Sekil 13. Streptococcus lactis P148 susunun faja direngli mutantlarında plazmid içerişleri (Kb.)

A, K, N :	32	G :	32, 26.1 ve 6.1
B :	26.1	I, O :	32, 16.5 ve 6.1
C :	32 ve 26.1	L, N :	32 ve 16.5
D, F, H, J :	32, 26.1 ve 16.5	M :	32 ve 6.1
E :	32, 26.1, 16.5 ve 6.1	P :	Plazmid DNA marker

Tablo 7. Faja dirençli *Streptococcus lactis* susşalarından elde olunan mutantlarda plazmid içeriğine bağlı faj direnç fenotipi değişimleri

Bakteri Kod No.1arı	Faj Kod No.1arı										Plazmid içeriği (Kb)	Laktoz Fermentasyonu
	ML3Ø	2015Ø	2509Ø	P76-2Ø	712Ø	924Ø	2250Ø	P78-LØ	P8843Ø	P81-13Ø		
P148	++0	++0	++0	++0	++0	++0	++0	++0	++0	++0	32, 26.1, 16.5 12.6, 6.1, 4.6	+
P148-G*	+ - 90	+ - 90	+ - 85	+ - 80	+ - 85	+ - 90	+ - 77	+ - 98	+ - 98	+ - 98	26.1	-
P148-1*	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	32	+
P148-D*	- - 90	- - 90	- - 85	- - 80	- - 85	- - 90	- - 80	- - 98	- - 98	- - 98	16.5, 12.6, 4.6	-
P61	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	41, 37.5, 32, 28.6, 26.1, 19.8, 8, 4.2	+
P61-G*	+ - 92	+ - 90	+ - 88	+ - 80	+ - 85	+ - 90	+ - 90	+ - 95	+ - 95	+ - 95	26.1	-
P61-L*	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	32	+
P61-D*	- - 90	- - 90	- - 90	- - 80	- - 85	- - 90	- - 90	- - 97	- - 95	- - 95	41, 19.8, 4.2	-
L3	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	+ + 0	32, 26.9, 26.1 16.5, 12.6	+
L3-G*	+ - 95	+ - 90	+ - 92	+ - 95	+ - 95	+ - 90	+ - 87	+ - 98	+ - 98	+ - 98	26.1	-

Tablo 7. Faj dirençli *Streptococcus lactis* suşlarından elde olunan mutantlarda plazmid içeriğine bağlı faj direnç fenotipi değişimleri (devam)

Bakteri Kod No.ları	Faj Kod No.ları										Plazmid içeriği (Kb)	Laktoz fermentasyonu
	ML3Ø	2015Ø	2509Ø	P76-2Ø	712Ø	924Ø	2250Ø	P78-LØ	P88-13Ø	P81-13Ø		
L3-L*	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	32	+
L3-D*	-- 92	-- 95	-- 90	-- 95	-- 95	-- 90	-- 90	-- 96	-- 98	-- 95	12.6	-
Z73	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	32, 26.1, 16.5 14.1, 12.6, 6.1, 4.6	+
Z73-G*	+ - 80	+ - 90	+ - 82	+ - 85	+ - 88	+ - 85	+ - 85	+ - 90	+ - 94	+ - 92	26.1	-
Z73-L*	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	32	+
Z73-D*	-- 85	-- 90	-- 80	-- 85	-- 90	-- 90	-- 85	-- 90	-- 95	-- 95	6.1	-
P77	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	32, 26.1, 19.3 16.5, 12.6, 8, 7.2, 6, 4.6, 2.2	+
P77-G*	+ - 75	+ - 90	+ - 84	+ - 80	+ - 90	+ - 85	+ - 90	+ - 90	+ - 90	+ - 88	26.1	-
P77-L*	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	++ 0	32	+
P77-D*	-- 80	-- 92	-- 90	-- 85	-- 80	-- 95	-- 85	-- 90	-- 90	-- 90	19.3, 8	-

*: Akriflavin uygulanarak seçilen mutantlar

Ad: Faj adsorbsiyonu

+: Dirençli

-: Duyarlı

Tablo 8. Konjugasyon ve transformasyon denemelerinde kullanılan *Streptococcus lactis* suslarının fenotipik özelliklerini ve plazmid içerikleri

Bakteri Kod No.	Fenotipik Özellikler	Plazmid içeriği (Kb)	Genetik Aktarımda Rolü	Uygulanan Mutajen ve Koşantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{ml.}$)
P148	Lac ⁺ , Str ^S , Rif ^S , Km ^S , Ø ^R	32, 26.1, 16.5, 12.6, 6.1, 4.6	Konjugal verici	— (Doğal sus)
1614*	Lac ⁻ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^S	—	Alici	Akriflavin 12.5
P81-1	Lac ⁻ , Str ^R , Km ^R , Ø ^S	—	Alici	Akriflavin 17.5
P148-G	Lac ⁻ , Str ^R , Km ^R , Ø ^R	26.1	Konjugal verici	Akriflavin 22
P61	Lac ⁺ , Str ^S , Km ^S , Rif ^S , Ø ^R	41, 37.5, 32, 28.6 26.1, 19.8, 8, 4.2	Konjugal verici	— (Doğal sus)
L3	Lac ⁺ , Str ^S , Km ^S , Rif ^S , Ø ^R	32, 26.9, 26.1, 16.5, 12.6	Konjugal verici	— (Doğal sus)
Z73	Lac ⁺ , Str ^S , Km ^S , Rif ^S , Ø ^R	32, 26.1, 16.5, 14.1, 12.6, 6.1, 4.6	Konjugal verici	— (Doğal sus)
P77	Lac ⁺ , Str ^S , Km ^S , Rif ^S , Ø ^R	32, 26.1, 19.3, 16.5, 12.6, 8, 7.2, 6, 4.6, 2.2	Konjugal verici	— (Doğal sus)

* : Agricultural Food Research Institute'den (İngiltere) sağlanan alici sus.

Lac⁺ : Laktozu fermente edebilir özellikte.

Lac⁻ : Laktoz fermentasyonu yeteneğini yitirmış.

Str^R : Streptomisine dirençli ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Rif^R : Rifampine dirençli ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Km^R : Kanamisine dirençli ($70 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Ø^R : Faja dirençli (Kontrol faj olarak P81-13Ø kullanılmıştır).

Str^S : Streptomisine duyarlı.

Rif^S : Rifampine duyarlı.

Km^S : Kanamisine duyarlı.

Laktoz fermentasyon yeteneğinde olan (Lac^+), streptomisine, rifampine ve kanamisine duyarlılık gösteren (Str^S , Rif^S , Km^S) ve faja dirençli (\emptyset^R) verici doğal suşlar ile, laktoz fermentasyon yeteneğini yitirmiş (Lac^-), streptomisin ve kanamisine dirençli (Str^R , Rif^R) ve faja duyarlı (\emptyset^S) P81-1 ve Lac^- , Str^R , Rif^R , \emptyset^S 1614 alıcı suşları arasında konjugal aktarım sonucu; P81-1 alıcı suşunun kullanılması halinde Lac^+ , Str^R , Km^R ve \emptyset^R , 1614 suşunun kullanılması halinde ise Lac^+ , Str^R , Rif^R ve \emptyset^R fenotipte konjugantlar oluşmuştur. Hiçbir konjugant seçim ortamında Lac^- , Str^R , Rif^R (ya da Km^R) ve \emptyset^R özellikle koloni belirlenememiştir. Konjugantların plazmid içerikleri araştırıldığında, yalnız 32.0 Kb. büyüklükte plazmidi içerdikleri saptanmıştır (Şekil 14). 32.0 Kb.lik plazmidin konjugasyon sikliği, değişik verici ve alıcı suşlar için; 1.2×10^{-2} ile 4.8×10^{-4} arasında bulunmuş ve tüm doğal verici suşlar için alıcı suş olarak P81-1 kullanılması halinde konjugasyon sikliğinin, 1614 alıcı suşuna oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. 26.1 Kb. büyüklükte, ısı duyarlı faja direnç fenotipinden sorumlu plazmidin konjugal hareketliliğe sahip olup olmadığından daha detaylı araştırılabilmesi için, *Streptococcus lactis* Pl48 suşunun sadece 26.1 Kb.lik plazmidi içeren mutantı (Pl48-G) verici suş olarak kullanılmak suretiyle P81-1 ve 1614 suşları ile konjugasyona teşvik edilmiş, ancak bu denemeler sonucunda da aktarımın sağlanamadığı belirlenmiştir (Tablo 9).

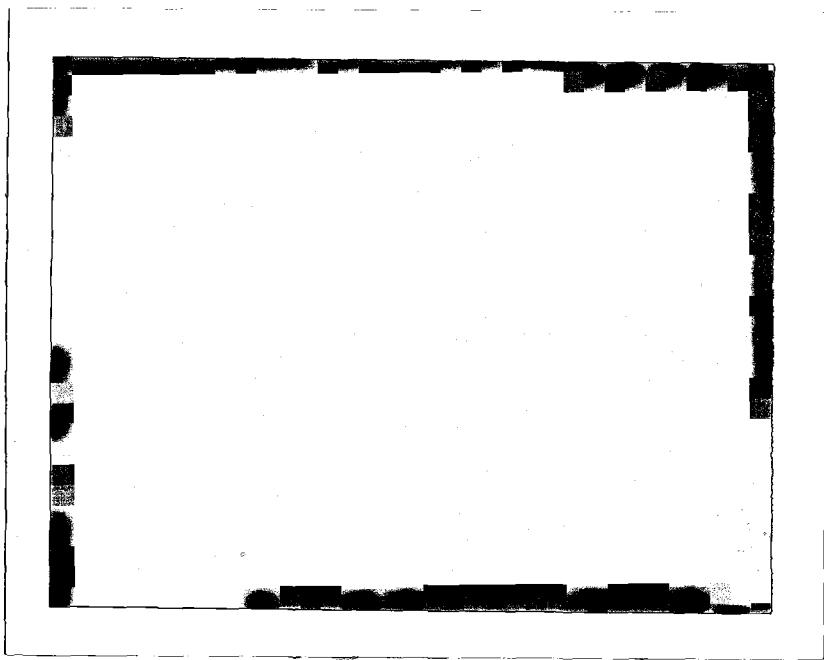
Konjugasyon sonuçlarını kontrol etmek amacıyla 32.0 Kb. ve 26.1 Kb. büyüklükte plazmidler ayrı ayrı saf-

laştırılarak bunların 1614 ve P81-1 alicı suşlarına transformasyonları araştırılmıştır. Her iki plazmidin de protoplast transformasyonu yöntemiyle aktarımı sağlanmış ve transformasyon sikliği birbirine yakın bulunmuştur.

P81-1 alicı suşunda 32.0 Kb.lık plazmidin transformasyon sikliği, μg DNA için 4.3×10^4 , 26.1 Kb.lık plazmidin transformasyon sikliği ise 2.7×10^4 olarak saptanmıştır. 1614 alicı suşunun kullanılması halinde, 26.1 Kb.lık plazmidin transformasyon sikliği P81-1 alicı suşu kullanıldığında elde edilen değerle yakın bulunmuştur (1.4×10^4) ancak, 32.0 Kb.lık plazmidin transformasyon sikliğinin, 1614 alicı suşunda 2×10^5 'e yükseldiği belirlenmiştir (Tablo 10). Antibiyotik marker'lar ve faj direnç özelliğine göre seçilen transformantlarda plazmid içerikleri, doğal suş ile karşılaştırılarak saptanmıştır (Şekil 14 ve 15). Transformasyon denemeleri sonuçları da, 32.0 Kb. büyülükte plazmidi içeren suşların daima Lac⁺, ve adsorbsyonun engellenmesi tipindeki faja direnç sistemini içerdiğini, 26.1 Kb.lık plazmidi içeren transformantların ise Lac⁻ ve ısı duyarlı faj direnç sistemine sahip olduğunu, doğrulamıştır.

Genetik aktarım sonucu transformant ve konjugantların seçim ortamlarında faja dirençli fenotiplerin tanımlamasında kullanılan P81-13Ø'in, denemedede kullanılan tüm fajlar için uygun bir seçim kriteri olup olmadığı, transformant ve konjugantların tüm fajlara karşı 32°C ve 37°C'de verdikleri duyarlılıklar incelenerek saptanmıştır. Konjugant ve transformantların P81-13Ø'e karşı verdiği duyarlı-

A B C D E F G H I



Sekil 14. Adsorbsiyonun engellenmesi tipindeki faj direnç özelliğinden sorumlu plazmidin, plazmidleri giderilmiş suşlara konjugasyon ve transformasyon yolu ile aktarımından sonra konjugant ve transformantların plazmid içerikleri

- A, B : 32 Kb. büyüklükte plazmidi içeren konjugantlar
- C : *Streptococcus lactis* P148 (Doğal suş)
- D, E, F, G, H, I : 32 Kb. büyüklükte plazmidi içeren transformantlar (Alici suş olarak plazmidleri giderilmiş *Streptococcus lactis* P81-1 su kullanılmıştır.)

Tablo 9. *Streptococcus lactis* susşalarında faj direnç gen kodu taşıyan plazmidlerin konjugasyon sıklığı

Verici Sus Kod No.	Alici Sus Kod No.	Konjugant Seçim Kriterleri	Konjugasyon sıklığı (Verici hücre bagına)	Konjugant Kod No.	Konjugantlarda Plazmid içeriği		
					32 Kb.	26 Kb.	32 Kb. ve 26 Kb. Diger
P148	1614	Lac ⁺ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^R	2.5 x 10 ⁻³	P148-1	+	-	-
P148	P81-1	Lac ⁺ , St ^R , Km ^R , Ø ^R	1.2 x 10 ⁻²	P148-2	+	-	-
P148-G	1614	Lac ⁻ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^R	-	-	-	-	-
P148-G	P81-1	Lac ⁻ , Str ^R , Km ^R , Ø ^R	-	-	-	-	-
P61	1614	Lac ⁺ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^R	3.3 x 10 ⁻⁴	P61-1	+	-	-
P61	P81-1	Lac ⁺ , Str ^R , Km ^R , Ø ^R	5 x 10 ⁻³	P61-2	+	-	-
L3	1614	Lac ⁺ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^R	1.2 x 10 ⁻⁴	L3-1	+	-	-
L3	P81-1	Lac ⁺ , Str ^R , Km ^R , Ø ^R	5.5 x 10 ⁻³	L3-2	+	-	-
Z73	1614	Lac ⁺ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^R	4.8 x 10 ⁻⁴	Z73-1	+	-	-
Z73	P81-1	Lac ⁺ , Str ^R , Km ^R , Ø ^R	2 x 10 ⁻³	Z73-2	+	-	-
P77	1614	Lac ⁺ , Str ^R , Rif ^R , Ø ^R	6 x 10 ⁻³	P77-1	+	-	-
P77	P81-1	Lac ⁺ , Str ^R , Km ^R , Ø ^R	1.8 x 10 ⁻³	P77-2	+	-	-

Ø^R: Faja direnç (Kontrol faj olarak P81-13 kullanılmıştır).

Lac⁺: Laktoz fermentasyon yeteneğine sahip.

Lac⁻: Laktoz fermentasyon yeteneğini yitirmış.

StrR: Streptomisine dirençlilik (200 µg/ml)

Rif^R: Rifampine dirençlilik (70 µg/ml).

Km: Kanamisine dirençlilik (70 µg/ml).

Kb : Kilobaz

P148-G: *Streptococcus lactis* P148 susşunun yalnız 26.1 Kb.lik plazmidi içeren mutantı.

Tablo 10. *Streptococcus lactis* suşlarında faj direnç özelliklerini kontrol eden plazmidlerin transformasyon sikliği

Alici Suş	Transforme Edilen Plazmid (Kb)	Transformant Kod No.	Transformant Seçim Kriterleri	Faja Dirençli Hücre (%)	Transformasyon Sıklığı (DNA nin μ g. 'da)
1614	32	1614-T1	Lac ⁺ ,Str ^R ,Rif ^R	83	2 \times 10 ⁵
	26.1	1614-T2	Lac ⁻ ,Str ^R ,Rif ^R , \emptyset ^R	77	\sim 1.4 \times 10 ⁴
P81-1	32	P81-T1	Lac ⁺ ,Str ^R ,Km ^R	80	4.3 \times 10 ⁴
	26.1	P81-T2	Lac ⁻ ,Str ^R ,Km ^R , \emptyset ^R	65	2.7 \times 10 ⁴

Lac⁺: Laktoz fermentasyon yeteneğine sahip.

Str^R: Streptomisine dirençlilik (200 μ g/ml).

Rif^R: Rifampine dirençlilik (100 μ g/ml).

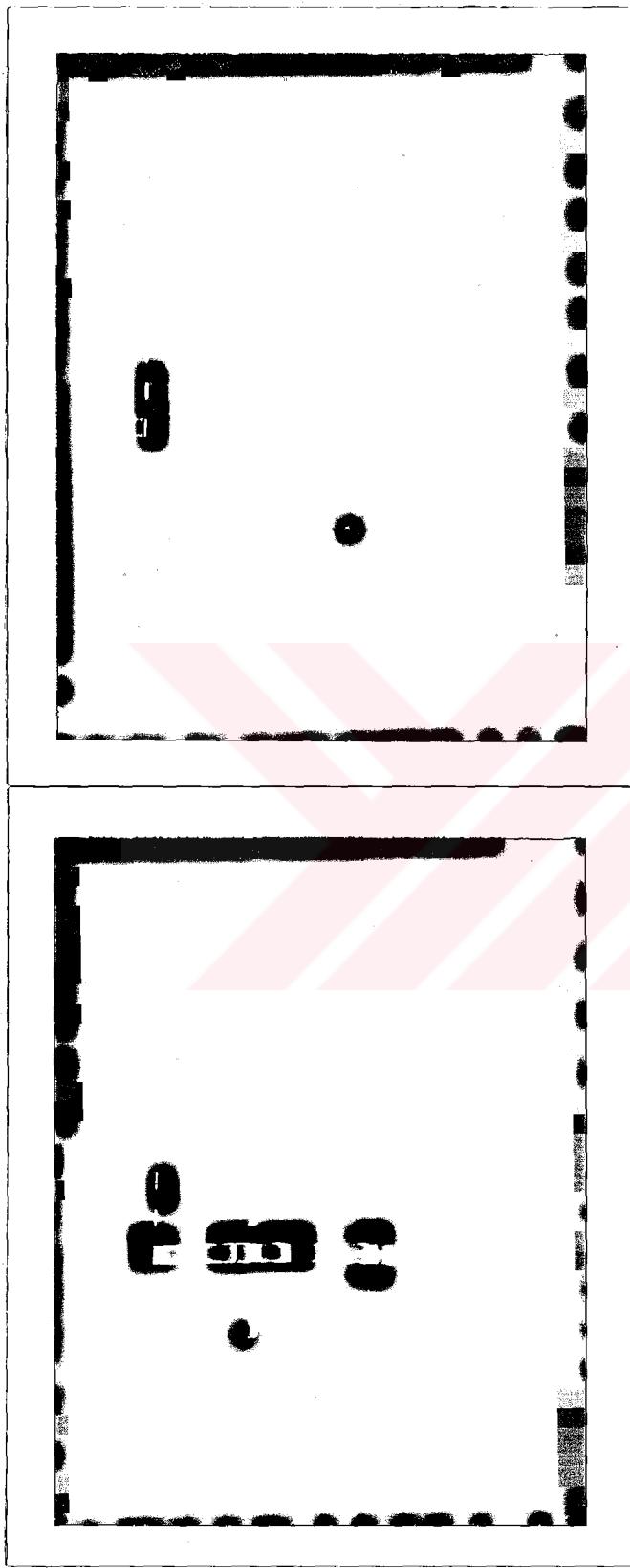
Km^R: Kanamisine dirençlilik (70 μ g/ml).

\emptyset ^R: Faja direnç (Kontrol faj olarak P81-13 kullanılmıştır).

Kb: Kilobaz

A B C D E F G H I

J K L M N O



Sekil 15. *Isı duyarlı faj direnc sisteminden sorumlu plazmidin, plazmidleri giderilmiş susqlara transformasyonu sonucu seçilen transformantlarda plazmid içerikleri.*

A, B, D, H, I, J, K, N, O : 26.1 Kb. büyülüklükte plazmid içeren transformantlar

C : *Streptococcus lactis* Z73 (Doğal sus)

E, L : Plazmid DNA marker

F : *Streptococcus lactis* 1614 (Alici sus)

G : *Streptococcus lactis* P81-1 (Alici sus)

M : *Streptococcus lactis* P148 (Doğal sus)

Tablo 11. Alıcı susşalar, transformant ve konjugantların genel faj duyarlılık özelliklerini ve faj direnç özelliğini kodlayan plazmidlerin stabilitelerini orantı.

Bakteri Kod No.ları	Faj Kod No.ları										Plazmid içerişleri (KB)	% Plazmid Stabilitesi (70 Generasyon)		
	ML3Ø					P2015Ø								
	MI3Ø	2015Ø	2509Ø	P76-2Ø	712Ø	924Ø	2250Ø	2550Ø	P78-LØ	P88-13Ø	P81-13Ø			
P148-2*	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
P61-2*	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
13-2*	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
Z73-2*	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
P77-2*	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
1614-T1**	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
1614-T2**	+ -	85	+	-	90	+	-	82	+	-	95	+	-	88
P81-T1**	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0	++	0
P81-T2**	+ -	90	+	-	95	+	-	95	+	-	95	+	-	95
1614	--	85	-	-	90	-	-	85	-	-	95	-	-	95
P81-1	--	90	-	-	95	-	-	96	-	-	90	-	-	95

**: Transformantlar Kb: Kilobaz

*: Konjugantlar
Ad: Adsorbsiyon
+: Dirençli
-: Duyarlı

lîk özelliklerinin, diğer tüm fajlar için tamamen aynı olduğu belirlenmiştir (Tablo 11). Bu bulgular P81-13Ø'ın, faj direnç fenotipi seçiminde denemedede kullanılan diğer fajları da temsil edebileceğini göstermektedir.

Konjugasyon ve transformasyon süreçlerinde aktarımı sağlanan faj direnç plazmidlerinin, yeni konakçılarında gösterdikleri stabilité oranları, tek kolonilerden geliştirilen kültürlerin ardışık pasajları yapılımak sureti ile araştırılmıştır. Lac⁺ özelliği de içeren faj dirençli transformant ve konjugantlar için M17-laktoz broth, Lac⁻ ancak faj dirençli transformantlar için ise M17-glukoz broth gelişme ortamı olarak kullanılmıştır. Bu ortamlarda ardışık pasajlarla yaklaşık 70 generasyon'u tamamlayan kültürlerden M17-agar ortamlarında seçilen kolonilerde, 32.0 Kb. büyüklükte plazmid için Lac⁺ özelliğin sürüp sürmediği fenotipik olarak araştırılmış, 26.1 Kb. büyüklükte plazmidi içeren transformantlar için ise doğrudan faj duyarlılık testleri yapılmıştır. Bu fenotipik özellikler yanında ayrıca, tüm örneklerde plazmid analizleri yapılmıştır. Bu testlere göre; 32.0 Kb.lik plazmidin, transformant ve konjugantlarının %70-77'sinde, 26.1 Kb.lik plazmidin ise transformantlarının %83-88'inde, stabilitelerini koruduğu belirlenmiştir (Tablo 11).

Doğal suşların tümünde saptanmış olan proteolitik aktivite özelliğinin (Tablo 2), bu suşlardan tüm plazmidlerin giderilmesi halinde kaybolduğu gözlenmiştir. Faj dirençlilik özelliklerinin aktarımı sağlanan transformant ve konjugantlarda proteolitik aktivite, fast-slow differentiel

(FSD) agar ortamlarında morfolojik ve kültürel özellikler gözönünde bulundurularak araştırılmıştır. 32.0 Kb. büyük-lükte plazmidi içeren tüm transformant ve konjugantlar, FSD agar ortamlarında proteolitik aktivite özelliği için tanımlanan yapıda koloniler oluşturmuştur. Ancak, 26.1 Kb. büyük-lükte plazmidi içeren transformantlar, alicı suşlarla tamamen aynı özellikte koloniler oluşturmuştur (Tablo 12). Bu sonuçlar, faj dirençli doğal suşlarda belirlenen 32.0 Kb. büyük-lükte plazmidin, adsorbsiyonun engellenmesi tipinde faj dirençlilik, laktوز fermentasyon yeteneği ve yüksek sıklıkta konjugasyon özellikleri ile birlikte proteolitik aktivite özelliğini de kodladığını göstermektedir.

Tablo 12. Faja dirençli *Streptococcus lactis* suşlarında proteolitik aktivite ile plazmidlerin ilişkisi

Bakteri Kod No.	FSD Agarda Ölçülen Koloni Çapı (mm)	Fenotip				Plazmid İçerigi (Kb.)	Uygulanan Mutajen ve Konsantrasyonu (μ g/ml)
		Lac ⁺	Prt ⁺	Lac ⁻	Prt ⁻		
P148	2.2	+ +				32, 26.1, 16.5 12.6, 6.1, 4.6	— (Doğal suş)
P61	2.5	+ +				41, 37.5, 32, 28.6, 26.1, 19.8, 8, 4.2	— (Doğal suş)
L3	2.3	+ +				32, 26.9, 26.1 16.5, 12.6	— (Doğal suş)
Z73	2.2	+ +				32, 26.1, 16.5 14.1, 12.6, 6.1, 4.6	— (Doğal suş)
P77	2.3	+ +				32, 26.1, 19.3 16.5, 12.6, 8 7.2, 6, 4.6, 2.2	— (Doğal suş)
P81-1	0.5			+ +		—	Akriflavin, 17.5
P148-1	2.5*	+ +				32	(Konjugant)
P81-T2	0.5			+ +		26.1	(Transformant)
P61-2	2.5**	+ +				32	(Konjugant)
L3-2	2.5**	+ +				32	(Konjugant)
Z73-2	2.5**	+ +				32	(Konjugant)
P77-2	2.5**	+ +				32	(Konjugant)

FSD Agar: Fast Slow Differential Agar.

Lac⁺: Laktoz fermentasyon yeteneğine sahip.

Lac⁻: Laktoz fermentasyon yeteneğini yitirmış.

Prt⁺: Proteolitik aktiviteye sahip.

Prt⁻: Proteolitik aktivite yeteneğini yitirmış.

* : Alıcı suş olarak plazmidleri giderilmiş *Streptococcus lactis* 1614 suşu kullanılmıştır.

** : Alıcı suş olarak plazmidleri giderilmiş *Streptococcus lactis* P81-1 suşu kullanılmıştır.

5- TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türkiye'den izole edilmiş olan *Streptococcus lactis* suşlarında faj direnç fenotipinden sorumlu bulunan 32.0 Kb. ve 26.1 Kb. büyüklükteki iki farklı plazmid ve bunlara bağlı direnç sistemlerinin aktivite özellikleri tanımlanarak, faja duyarlı suşlara aktarım olanakları araştırılmıştır. Doğal suşlarda beraber bulunan bu iki plazmidden, 32.0 Kb. büyüklükteki plazmidin adsorbsiyonun engellenmesi tipindeki faj direnç sistemini, 26.1 Kb. büyüklükteki plazmidin ise, ısı duyarlı faj direnç sistemini kontrol ettiği belirlenmiştir. Değişik araştıracılar, laktik streptokoklarda aynı suş için birden fazla plazmid tarafından kontrol edilen benzer ya da farklı aktivite özelliklerine sahip faj direnç sistemlerinin saptandığını bildirmiştir (Klaenhammer ve Sanozky 1985, Froseth 1988b, Gasson vd.1989). Laktik asit bakterilerinde gen kodu plazmidler tarafından taşınan faj direnç sistemleri; genellikle restriksiyon/modifikasyon, abortif infeksiyon, ısı duyarlı faj dirençlilik ve faj plak büyülüğünün indirgenmesi şeklindeki etki mekanizmalarını içermektedir (Chopin vd.1984, Dao ve Ferretti 1985, Jarwis 1988, Steele vd.1989). Laktik streptokoklarda belirli faj tipleri için adsorbsiyon doğal olarak engellenmektedir. Bu durum, faj almaç bölgelerinin yapışal özelliklerinden ve buna bağlı olarak suşların gösterdiği yüksek düzeyde konjak özgüllüğünden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, kromozomal DNA tarafından kontrol edilen ancak moleküler düzeyde henüz tamamlanmamış faj direnç sistemle-

rinin varlığı (Sanders ve Klaenhammer 1983, Daly ve Fitzgerald 1987, Sanders 1988) nedeniyle, faj dirençlilik fenotipinin belirli plazmidlerin konakçında bulunusuyla indüklendiği, fakat plazmidleri giderilmiş suşlarda da faja direnç özelliğinin sürdürülebildiği gözlenmiştir (Klaenhammer 1987, McKay 1989). Faj adsorbsiyonunun engellenmesi tipinde sistemlerin genetik özelliklerinin henüz tanımlanmamış olmasına karşın, farklı çalışmalarda *Streptococcus lactis* ve *Streptococcus cremoris* suşlarının içерdiği bazı plazmidlerin, bu suşlara etkili belirli faj tiplerinin adsorbsiyonunun indirgenmesinde rol oynadığı saptanmıştır (Sanders ve Klaenhammer 1983, Klaenhammer ve Sanozky 1985). Bununla birlikte, faj adsorbsiyonunun tamamen engellendiğine ilişkin bir bulgu bildirilmemiştir. Bugüne dek, sadece Dunny vd. (1988) *Streptococcus lactis* LM2301 suşunda 90 Kb. büyüklükte bir plazmidin, bu suşun bir litik fajına karşı (LP10GØ) adsorbsiyonun engellenmesi tipindeki faj dirençliliğin gen kodunu taşıdığını belirlemiştir. Bizim araştırmamızda da adsorbsiyonun engellenmesi şeklindeki faj direnç sisteminin, doğrudan plazmid tarafından kontrol edilen bir özellik olduğu saptanmış, ancak Dunny vd. (1988) tarafından bildirilen bulgulardan farklı olarak, 32.0 Kb. büyüklükteki plazmidin *Streptococcus lactis* suşlarına denenen değişik faj tiplerinin tümünde adsorbsiyonu tamamen engellediği belirlenmiştir. Bu sonuçlarla, ilk kez laktik streptokoklarda belirli bir plazmid tarafından kontrol edilen adsorbsiyonun engellenmesi tipindeki faj direnç özelliğinin, değişik faj tiplerine karşı genel

bir direnç sistemi oluşturabildiği ortaya konmuştur.

Laktik streptokoklarda, gen kodu plazmidler üzerinde bulunan ısı duyarlı faj direnç sistemlerine yaygın olarak rastlanmaktadır (Jarvis ve Klaenhammer 1986, Hill vd.1989b, McKay vd.1989). Sadece bu tür faja direnç sistemini içeren bakterilerde 32°C gelişme sıcaklığında direnç fenotipi görülmekte, 37°C ve yukarısı gelişme sıcaklıklarında bu özellik sürdürmemektedir. Peynir üretiminde 37°C ve yukarısı genellikle ulaşılan bir sıcaklık olduğu için, bu direnç sistemi starter suşlarda tercih edilen bir koruyucu özellik olmamaktadır. Ancak, ikinci bir direnç sistemi olarak bulundukları konakçılar ya da söz konusu özelliğe ait plazmidin, 37°C 'de de direnç özelliğini sürdürdürebildiği saptanan transkonjugantları, süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Higgins vd.1989, Hill vd.1989b). Araştırma bulguları; ısı duyarlı faj direnç özelliğinden sorumlu 26.1 Kb. büyülükteki plazmidi tek başına içeren mutantlar ve transformantların hiçbirinde 37°C gelişme sıcaklığında, faja direnç özelliğinin korunmadığını göstermiştir. Bu açıdan, 26.1 Kb.lik plazmidin tek başına bulunduğu suşlarda, faja dirençli starter bakterileri olarak güvenli kullanımları olanaklı görülmemektedir. Bununla beraber bu plazmid; 32.0 Kb. büyülükte plazmid ile birlikte bulunduğu suşlarda adsorbsiyonun engellenmesi sistemini aşabilecek litik fajlar için ikinci bir faj direnç sistemi oluşturacağından ve bu yolla infeksiyon olasılığı çok daha aza indirgeneceğinden, önem taşımaktadır. Plazmidlerin *siderjetik* etkisi olarak da adlandırılan bu özellikten, değişik faj

direnç özelliklerini kodlayan plazmidlerin aynı suşa aktarımı ve stabil hale getirilmeleri ya da bu plazmidlerden izole edilen faj direnç gen bögelerinin bir vektör üzerine alınarak birlikte transferi ile güçlü faj direnç sistemlerine sahip starter suşların oluşturulmasında yararlanılmaktadır (Gasson vd.1989).

Laktik streptokoklarda, laktоз fermentasyon yeteneği ve proteolitik aktivite özelliklerinin gen kodları genellikle konjugatif özelliğe de sahip aynı plazmidler üzerinde bulunmakta (Klaenhammer vd.1978, DeVos ve Simons 1988, McKay 1989, Hayes vd.1990b, Rhodes 1990) ve bu plazmidler bazen değişik faj direnç sistemlerini kontrol edebilmektedir (Hill vd.1989a, Chopin ve Chopin 1989). Araştırmamızda, adsorbsyonun engellenmesi tipindeki faj direnç sisteminden sorumlu bulunan 32.0 Kb.lık plazmidin, yukarıdaki literatür verileri ile benzer olarak, yüksek sıklıkta konjugasyon yeteneği yanında, *Streptococcus lactis* suşlarında proteolitik aktivite ile laktоз fermentasyonu özelliklerinin de genetik taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. 26.1 Kb.lık plazmid ise konjugatif özellikte olmadığı gibi, bulunduğu suşlarda kontrol ettiği bir başka fenotipik özellik de tanımlanamamıştır. Sonuç olarak, 32.0 Kb. büyüklükteki plazmidin faja tam dirençlilik yanında yüksek sıklıkta konjugal aktarım yeteneği göstermesi ve laktоз fermentasyonu ile proteolitik aktivite gibi endüstriyel açıdan çok önem taşıyan iki özelliğe ait gen kodlarını içermesi; endüstriyel starter suş geliştirme programları için elverişli, çok yönlü bir vektör olduğuna işaret etmektedir.

Transformasyon denemeleri sonucu, 32.0 Kb. ve 26.1 Kb. büyülüklükte plazmidlerin her ikisinin de değişik alıcı *Streptococcus lactis* suşlarına aktarımı sağlanmış ve transformasyon sikliği literatür verilerinde belirtilen yüksek sınırlar (Simon vd.1986, Sanders ve Nicholson 1987, Mercenier ve Chassy 1988) içerisinde bulunmuştur. Laktik streptokok suşlarında doğal transformasyon sistemleri ile genetik aktarım sağlanamadığından, saflaştırılan DNA moleküllerinin protoplast haline getirilmiş alıcı hücrelere, ozmotik yönden stabilliği sağlanmış ortamlarda aktarımı gerçekleştirilmektedir (Kondo ve McKay 1984, Badii vd.1989). Bu nedenle, 32.0 Kb. ve 26.1 Kb.lik faj direnç plazmidleri için araştırmamızda kullanılan transformasyon koşulları, denemelerimizdeki alıcı suşlar için geçerli olup; değişik alıcı suşların kullanılması halinde, bu suşların fizyolojik özelliklerine göre farklılık gösterebilecek stabil ozmotik ortamlar ve transformantların regenerasyonuna etkili faktörler yeniden belirlenmelidir.

Genetik aktarım çalışmalarında, antibiyotik marker içermeyen suşlara rekombinant DNA teknikleri kullanılarak doğal olarak sahip olmadıkları antibiyotik direnç özelliklerinin kazandırılması, çevre ve halk sağlığı açısından tehlike yaratmaktadır. (Davies 1979). Bu sakincadan kaçınmak için yapılan çalışmalarda, *Streptococcus lactis* suşlarının doğal antibiyotik duyarlılık özellikleri detaylı bir şekilde incelenmiş ve iki değişik antibiyotiğe yüksek düzeyde dirençlilik özelliğine sahip bulunan bir doğal susta, plaz-

mid giderme çalışmaları ile, genetik aktarım süreçlerinde kullanılacak özellikle bir alıcı suş geliştirilmiştir. Türkiye'den izole edilmiş olan 28 *streptococcus lactis* suşunda yapılan antibiyotik duyarlılık testleri; laktik streptokokların antibiyotik dirençlilik özelliğini yüksek düzeyde içermeye iliskin literatür verileri ile (Wulf ve Sandine 1983, Orberg ve Sandine 1985, Parada ve DeGiachi 1986) uygunluk göstermiştir. Bununla birlikte, denemelerde kullanılan suşların, mastitis tedavisinde uygulanan antibiyotikler yanında, doğal ortamlarında bulunmayan ya da çok düşük düzeylerde bulunabilen antibiyotiklerin de denenen disk konsantrasyonlarına karşı direnç göstermeleri; bu suşlardaki antibiyotik duyarlılık özelliklerinin doğal ortamlarında bulunan antibiyotiklerle sınırlı olmadığını işaret etmektedir.

Gerek 32.0 Kb. ve gerekse 26.1 Kb. büyüklüklerdeki plazmidlerin aktarımının sağlandığı suşlarda stabilité oranları, M17 broth ortamlarında yapılan ardışık 10 pasaj (~70 generasyon) sonucu, benzer çalışmalar için bildirilen literatür verilerine (Klaenhammer ve Sanozky 1985, Sanders vd. 1986) oranla çok yüksek bulunmuştur. Süt fermentasyon süreçlerinde starter kültürlerin hazırlanması, fermentasyon ortamlarına inokülasyonu ve ürün eldesi için gerekli süre; bakteri generasyonu cinsinden, 40-50 generasyon olarak kabul edilmektedir (Sanders 1988, Bron 1989) Çalışmamızda elde olunan yüksek stabilité oranlarının ticari olarak geçerliliği, bu suşların endüstriyel fermentasyon süreçlerinde denenmesi suretiyle tesbit edilebilecektir. Ayrıca, genetik

aktarımı sağlanan plazmidlerin yeni konakçıdan elimine olmadan ifade edilmesinin engellenmesi olarak belirlenen gen ifadesinin kararsızlığı, araştırmamızda elde olunan transformant ve konjugantların hiçbirinde gözlenmemiştir.

Bu çalışmada Türkiye kökenli suslar için de belirlendiği gibi, laktik streptokoklarda endüstriyel öneme sahip birçok özelliğin gen kodu plazmidler üzerinde taşınmaktadır. Çoğu kez susların, stabil olmayan bu karakterleri fermentasyon süreçlerinde yitirmeleri sonucu, önemli ölçüde ürün ve zaman kaybının meydana gelmesi, plazmid stabilité sorununu doğurmaktadır. Diğer yandan, faj kontaminasyonlarının fiziksel ve kimyasal yöntemlerle güvenilir bir şekilde engellenmemesi, starter kültürler için yeni faj korunma yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Özette, klasik korunma ve sus seçme yöntemlerinin gelişen endüstriyel düzeyde yetersiz kalması nedeni ile, laktik streptokoklarda endüstriyel öneme sahip özelliklerin genetik determinantlarının belirlenmesi ve analizi; starter susların tanımlanması, seçimi ve geliştirilmesinde hareket noktası haline gelmiştir. Bu konu üzerinde Türkiye'de yapılan ilk çalışmayı teşkil eden araştırmamızda, değişik faj tiplerine karşı tam direnç özelliği yanında laktozu metabolize edebilen ve proteolitik aktivite gösteren *Streptococcus lactis* suslarında, bu özelliklere bağlı genetik determinantların analizinin yapılması ve faj direnç sistemlerinin tanımlanması, ülkemizde starter sus geliştirme programlarında modern genetik tekniklerinin kullanılabilmesi için zemin ha-

zırلامıştır. Özellikle 32.0 Kb. büyüklükte saptanan plazmidin, doğal aktarımını da sağlayabilen güçlü bir faj direnç sistemine sahip olması, faj kontaminasyonlarından kaynaklanan süt endüstrisi sorunlarının çözümünde önemli bir potansiyel oluşturacaktır. Faja direnç gen kodunu taşıyan plazmidlerin, ileri genetik analizler yapılarak baz dizilerinin belirlenmesi; uygun vektör sistemleri geliştirerek, tür içi ve türler arası aktarımlarında arzu edilen gen etkinliği ve stabilitenin sağlanması açısından kolaylıklar yaratacaktır. Diğer yandan konakçı özgüllükleri ve morfolojileri belirlenen laktik fajların, özellikle DNA homolojisi yöntemleriyle kökenlerinin araştırılması ve çalışmamızda saptanan temperent faj sistemleri engellenmiş suşlarda plazmid ve kromozomal DNA analizleri ile bu özelliğin genetik doğasının belirlenmesi; laktik streptokoklarda rekombinant DNA tekniklerinin güvenli bir şekilde uygulanılabilirliğini beraberinde getirecektir.

Kendi starter endüstriyimizin kurulması ve geliştirilmesinde temel aşamaları teşkil edecek bu tür çalışmalar teşvik gördüğü ve üretim birimleri ile ilişki sağlandığı takdirde, bugün dünyada süt endüstrisinde kullanılan bilim ve teknolojinin en yeni tekniklerinin ülkemizde uygulanılabilirliği mümkün olacak ve Türkiye'ye henüz tam anlamıyla yerleşmemiş olan faj problemi temelden çözülebilecektir.

KAYNAKLAR

AAIJ, C., BORST, P. 1972. The Gel Electrophoresis of DNA. Biochem Biophysics. Acta. 269: 192-200.

ANDERSON, D.G., MCKAY, L.L. 1983a. Isolation of a Recombinant-Deficient Mutant of *Streptococcus lactis* ML3. Journal of Bacteriology. 155: 930-932.

ANDERSON, D.G., MCKAY, L.L. 1983b. A Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 46: 549-552.

ANDERSON, D.G., MCKAY, L.L. 1984a. Genetic and Physical Characterization of Recombinant Plasmid Associated With Cell Aggregation and High Frequency Conjugal Transfer in *Streptococcus lactis* ML3. Journal of Bacteriology. 138(3): 954-962.

ANDERSON, D.G., MCKAY, L.L. 1984b. In Vitro Cloning of Lac Genes in *Streptococcus lactis* ML3 Appl. Environ. Microbiol. 47(2): 245-249.

BACRACH, U., FRIEDMAN, A. 1971. Practical Procedures for the Purification of Bacterial Viruses. Applied Microbiology. 22(4): 706-715.

BADII, R., JONES, S., WARNER, P.S. 1989. Spheroplast and Electroporation Mediated Transformation of *Lactobacillus Plantarum*. Letters in Applied Microbiology. 9(2): 41-44.

BALDWIN, K.A., MCKAY, L.L. 1987. Spontaneous Release Temperate Phage by Relysogenized Lactose-Positive Transconjugants of *Streptococcus lactis* C2. J. Dairy Sci. 70: 2005-2012.

BAUMGARTNER, A., MURPHY, M., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1986. Conjugative Co-Transfer of Lactose and Bacteriophage Resistance Plasmids From *Streptococcus cremoris* UC653. FEMS Microbiology Letters. 35: 233-237.

BILLING, E. 1969. Isolation, Growth and Preservation of Bacteriophages. Methods in Microbiology. Vol.3B, Ed: J.R.Norris, D.W.Robbins. Acad. Press. Inc. New York, 369 s.

BONKERROUM, N., SANDINE, W.E. 1988. Inhibitory Action of Nisin Against Lysteria Monocytogenes. J.Dairy Sci. 71: 3237-3245.

BOUSSAMAER, J.P., SCHRAUWEN, P.P., SOURROILE, J.L., GUY, P. 1980. Multiple Modification/Restriction Systems in Lactic Streptococci and Their Significance in Defining a Phage Typing System. J.Dairy Sci. 47: 401-409.

BRAUN, V., HERTVIG, S., NEVE, H., GEIS, A., TEUBER, M. 1989. Taxonomic Differentiation of Bacteriophages of *Lactococcus lactis* by Electron Microscopy, DNA-DNA Hybridization and Protein Profiles. Journal of General Microbiolog. 135: 2551-2560.

BRON, S. 1989. Plasmid (In) Stability In Gram Positive Bacteria. Course of Genetic Systems In Lactic Acid Bacteria. Biotechnology Action Programme. The Netherland. 12-23 June 1989, Sayfa: 65-69.

BROWN, T.A. 1989. Gene Cloning. Van Nostrand Reinbold Ltd. England. 243 s.

CAMPBELL, R.C. 1974. Statistics for Biologists. Cambridge University Press. Second Edition. 385 s.

CASEY, M.G., MEYER, J. 1985. Presence of α -Propyl-Dipeptidyl-Peptidase in Lactic Acid Bacteria. J.Dairy Sci. 68: 3212-3215.

CHOPIN, M.C., CHOPIN, A., ROUX, C. 1976. Definition of Bacteriophage Groups According to Their Lytic Action on Mesophilic Lactic Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 32(6): 741-746.

CHOPIN, M.C. 1980. Resistance of M17 Mesophilic Lactic Streptococcus Bacteriophages to Pasteurization and Spray Drying J.Dairy Res. 47: 131-139.

CHOPIN, A., CHOPIN, M.C., BATT, G.M., LANGELLA, P. 1984. Two Plasmid Determined Restriction and Modification Systems in *Streptococcus lactis*. Plasmid. 11: 260-263.

CHOPIN, M.C., CHOPIN, A., ROUANLT, A., GALLERON, N. 1989. Insertion and Amplification of Foreign Genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chromosome. Appl. Environ. Microbiol 55(7): 1769-1774.

CHOPIN, A., CHOPIN, M.C. 1989. Bacteriophage Defense Mechanisms in Lactic Acid Bacteria. Course of Genetic Systems in Lactic Acid Bacteria. Biotechnology Action Programme. The Netherlands. 12-23 June 1989. Sayfa: 60-62.

CLEWELL, D.B., GAVRON-BURKE, C. 1986. Conjugative Transposons and Dissemination of Antibiotic Resistance in Streptococci. Annual Review Microbiology. Ed: N.L.Ornston, A.Baliows, P.Boumann. Annual Rev.Inc. 40: 635-639.

COCCONCELLI, P.S., MORELLI, L., VESCOVO, M., BOTTAZI, V. 1986. Intergenic Protoplast Fusion In Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Letters. 35: 211-214.

COVENY, J.A., FITZGERALD, G.F., DALY, C. 1989. Detailed Characterization on Comparison of Four Lactic Streptococcal Bacteriophages Based on Morphology, Restriction Mapping, DNA Homology and Structural Protein Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 53(7): 1439-1447.

CROW, V.L., DAVEY, G.P., PEARLE, L.E., THOMAS, T.D. 1983. Plasmid Linkage of D-Tagatose-6-Phosphate Pathway in *Streptococcus lactis*: Effect on Lactose and Galactose Metabolism. Journal of Bacteriology. 153(1): 76-83.

CURRIER, T.C., NESTER, E.W. 1976. Isolation of Covalently Closed Circular DNA of High Molecular Weight From Bacteria. Analytical Biochemistry. 76: 431-441.

DALY, C. 1983a. The use of Mesophilic Cultures in Dairy Industry. Antonie Van Leeuwenhoek. 49: 297-312.

DALY, C. 1983b. Starter Culture Development in Ireland. Ireland J.Food Sci. Technol. 7: 39-48.

DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1987. Mechanisms of Bacteriophage Insensitivity in Lactis Streptococci. Streptococcal Genetics. s.259-268. Ed: J.J.Ferretti, R.Curtis. ASM Washington D.C. 1987. 300 s.

DAO, M.L., FERRETTI, J.J. 1985. Streptococcus-Escherichia coli Shuttle Vector pSA3 and Its Use in the Cloning of Streptococcal Genes. Appl. Environ. Microbiol. 49: 115-119.

DAVIES, J. 1979. General Mechanisms of Antimicrobial Resistance. Reviews of Infectious Diseases. 1(1): 23-29.

DAVIES, F.L., UNDERWOOD, H.M., GASSON, M.J. 1981. The Value of Plasmid Profiles for Strain Identification in Lactic Streptococci and the Relationship Between Streptococcus lactis 712, M13, C2. Journal of Applied Bacteriology. 51: 325-337.

DAVIES, F.L., GASSON, M.J. 1981. Review of Progress of Dairy Science Genetics of Lactic Acid Bacteria. J.Dairy Res. 48: 363-376.

DAVIES, F.L., GASSON, M.J. 1983. Genetics of Dairy Cultures. Ireland J. Food Sci. Technol. 7: 49-60.

DAVIES, F.L., GASSON, M.J. 1984. Bacteriophages of Dairy Lactic Acid Bacteria. Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese And Fermented Milk. s.127-151. Ed: F.L.Davies, B.A.Law. Elsevier Appl. Sci. Publ. Ltd. New York, 1984, 259 s.

DeVOS, W.M., UNDERWOOD, H.M., DAVIES, F.L. 1984. Plasmid Encoded Bacteriophage Resistance In *Streptococcus cremoris* SK11. *FEMS Microbiology Letters.* 23: 175-178.

DeVOS, W.M. 1987. Gene Cloning and Expression In Lactic Streptococci. *FEMS Microbiology Reviews.* 46: 281-295.

DeVOS, W.M., SIMONS, G. 1988. Molecular Cloning of Lactose Genes in Dairy Lactic Streptococci: The Phospho- β Galactosidase and β -Galactosidase Genes and Their Expression Products. *Biochimie.* 70: 461-473.

DeVOS, W.M., GASSON, M.J. 1989. Structure and Expression of the *Lactococcus lactis* Gene For Phospho- β Galactosidase (LacG) in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*. *Journal of General Microbiology.* 135: 1833-1846.

DIFCO MANUAL. 1984. Difco Laboratories, Detroit-Michigan USA. 333 s.

DOBRZANSKI, W.T. 1972. Transformation Among Streptococci. Mechanisms and Implications. s: 81-98. *Streptococci and Streptococcal Diseases.* Ed: L.W. Wannamaker, J.M. Matsen. Academic Press Inc. New York 1972. 633 s.

DOBRZANSKI, W.T., BARROWSKI, J., KOZAK, W., SAJDEL, J. 1982. Lactostrepsins: Bacteriocins of Lactic Streptococci. s: 255-269. *Microbiology.* Ed: D: Schlessinger. ASM Washington DC. 1982. 1092 s.

DODD, H.M., HORN, N., GASSON, M.J. 1990. Analysis of the Genetic Determinant for Production of the Antibiotic Nisin. *Journal of General Microbiology.* 136(3): 555-566.

DUCKWORTH, D.H., GLENN, J., McCORQUODALE, D.I. 1981. Inhibition of Bacteriophage Replication by Extrachromosomal Genetic Elements. *Microbiological Reviews.* 45(1): 52-71.

DUNNY, G.M., KRUG, D.A., PAN, C.L., LEDFORD, R.A. 1988. Identification of Cell Wall Antigens Associated With a Large Conjugative Plasmid Encoding Phage Resistance and Lactose Fermentation Ability in Lactic Streptococci. *Biochimie.* 70: 443-450.

EFSTATHIOU, J.D., MCKAY, L.L. 1977. Inorganic Salts Resistance Associated With a Lactose-Fermenting Plasmid in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology.* 130(1): 257-265.

ELDER, J.K., AMOS, A., SOUTHERN, E.M., SHIPPEY, G.A. 1983. Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis (I). *Analytical Biochemistry.* 128: 223-226.

ELDER, J.K., SOUTHERN, E.M. 1983. Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis (II): Comparison of Methods for plating Mobility of Fragment Length. *Analytical Biochemistry.* 128: 227-231.

EXTERKATE, F. 1975. Introductory Study of the Proteolytic System of *Streptococcus cremoris* Strain HP. *Neth. Milk Dairy J.* 29: 303-318.

FIEDLER, S., WIRTH, R. 1988. Transformation of Bacteria With Plasmid DNA by Electroporation. *Analytical Biochemistry.* 170: 38-44.

FITZGERALD, G.F., DALY, C., BROWN, L.R., GINGERAS, T.R. 1982. ScrFI: A New Sequence Specific Endonuclease from *Streptococcus cremoris*. *Nucleic Acid Res.* 10: 8171-8178.

FITZGERALD, G.F., HILL, C., VOUGHAN, E., DALY, C. 1987. Tn919 in Lactic Streptococci. s:238-241. *Streptococcal Genetics.* Ed: J.J. Feretti, R. Curtiss. ASM Washington DC. 300 s.

FITZGERALD, G.F., GASSON, M.J. 1988. In Vivo Gene Transfer Systems and Transposons. *Biochimie.* 70: 489-502.

FORSTER, T.J. 1983. Plasmid Determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. *Microbiological Reviews* 47(3): 361-409.

FORSTER, T.J. 1984. Analysis of Plasmids With Transposons. s:197-223, Vol.17. *Methods in Microbiology*. Ed: P.M. Bennett, J. Grinsted. Academic Press, 1984. 321 s.

FROSETH, B.R., HARLANDER, S.K., MCKAY, L.L. 1988a. Plasmid Mediated Reduced Phage Sensitivity in *Streptococcus lactis* KR5. *J.Dairy Sci.* 71: 275-284.

FROSETH, B.R., HERMAN, R.E., MCKAY, L.L. 1988b. Cloning of Nisin Resistance Determinant and Replication Origin On 7.6 Kilobase EcoRI Fragment of pNP40 From *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(8): 2136-2139.

FUCHS, P.G., ZAJDEL, J., DOBRZANSKI, W.T. 1975. Possible Plasmid Nature of the Determinant for Production of the Antibiotic Nisin in Some Strain of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology*. 88: 189-192.

GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1979. Conjugal Transfer of Lactose Genes in Group N Streptococci. *Soc. Gen. Microbiol. Quart.* 6: 87-88.

GASSON, M.J. 1980. Production, Regeneration and Fusion of Protoplasts in Lactic Streptococci. *FEMS Microbiology Letters*. 9: 99-102.

GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1980a. Prophage Cured Derivatives of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 964-966.

GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1980b. High Frequency Conjugation Associated With Donor Cell Aggregation in *Streptococcus lactis* 712. *Journal of Bacteriology*. 143: 1260-1264.

GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1980c. Conjugal Transfer of Drug Resistance Plasmid pAM β in the Lactic Streptococci. FEMS Microbiology Letters. 7: 51-53.

GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1981. Physical Analysis and Conjugal Transfer of Transduced Lactose Plasmids in *Streptococcus lactis* 712. Journal of General Microbiology. 119: 173-178.

GASSON, M.J. 1982. Identification of the Lactose Plasmid in *Streptococcus lactis* 712. s:217-220. Microbiology. Ed: D. Schlessinger. ASM Washington DC. 1982. 1092 s.

GASSON, M.J. 1983a. Genetic Transfer Systems in Lactic Acid Bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 49: 275-282.

GASSON, M.J. 1983b. Plasmid Complements of *Streptococcus lactis* NcDO712 and Other Lactic Streptococci After Protoplast Induced Curing. Journal of Bacteriology. 154(1): 1-9.

GASSON, M.J. 1984. Transfer of Sucrose-Fermenting Ability, Nisin Resistance And Nisin Production in *Streptococcus lactis* 712. FEMS Microbiology Letters. 21: 7-10.

GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1984. The Genetics of Dairy Lactic Acid Bacteria. s:99-126. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Ed: F.L. Davies, B.A.Law. Elserier Appl. Sci. Publ. Ltd. London, 1984. 259 s.

GASSON, M.J., ANDERSON, P.H. 1985. High Copy Number Plasmid Vector for Use in Lactic Streptococci. FEMS Microbiology Letters. 30: 193-196.

GASSON, M.J., HILL, S.A., ANDERSON, P.H. 1987. Molecular Genetics of Metabolic Traits in Lactic Streptococci. s:242-245. Streptococcal Genetics. Ed. J.J. Ferretti, R.Curtiss. ASM Washington DC. 1987. 300 s.

GASSON, M.J., DODD, H.M., ANDERSON, P.H., UNDERWOOD, H.M. 1989. Genetic and Genetic Engineering of Lactic Acid Bacteria. 8th International Biotechnology Symp. The Netherland. June 1989. Sayfa: 1-9.

GAUTIER, M.J., CHOPIN, M.C. 1987. Plasmid Determined Systems for Restriction and Modification Activity and Abortive Infection in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(5): 923-927.

GEORGHIOU, D., PHUA, S.H., TERZAGHI, E. 1981. Curing Lysogenic Strain of *Streptococcus cremoris* and Characterization of the Temperate Bacteriophage. *Journal of General Microbiology*. 122: 295-303.

GONZOLES, C.F., KUNKA, B.S. 1985. Transfer of Sucrose-Fermenting Ability and Nisin Production Phenotype Among Lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(3): 627-633.

GOOD, M.L. 1988. Biotechnology and Material Science: Chemistry for the Future. American Chemistry Society Pub. 135 s.

GRINSTED, J., BENNETT, P.M. 1984. Isolation and Purification of Plasmid DNA. s: 123-131. Methods in Microbiology Vol.17. Ed. P.M. Bennett, J. Grinsted. Academic Press. London.

HARDY, K. 1981. Bacterial Plasmids. Van Nostrand Reinbold Co. England. 104 s.

HARLANDER, S.K., MCKAY, L.L. 1984. Transformation of *Streptococcus Sangius Challis* With *Streptococcus lactis* Plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2): 342-346.

HARLANDER, S.K., MCKAY, L.L., SCHACHTLE, C.F. 1984. Molecular Cloning of the Lactose-Metabolizing Genes from *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2): 347-351.

HARLENDER, S.K. 1987. Transformation of *Streptococcus lactis* by Electroporation. s: 229-233. Ed: J.J. Ferretti, R. Curtiss. ASM Washington DC. 1987. 300 s.

HAWLETT-PACKARD MANUAL (41CVC). 1986. Hawlett-Packard Ltd. England. 65 s.

HAYES, F., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1990a. Identification of the Minimal Replicon of *Streptococcus lactis* subsp. *Lactis* UC317 Plasmid pC1305. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1): 202-209.

HAYES, F., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1990b. High Frequency Site Specific Recombination Between Lactococcal and pAM β 1 Plasmid DNAs. *Journal of Bacteriology.* 172(6): 3485-3489.

HEAP, H.A., LAWRENCE, R.C. 1976. The Selection of Starter for Cheesemaking. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 11: 16-20.

HEAP, H.A., JARWIS, A.W. 1980. A Comparison of Prolate and Isometric Headed Lactic Streptococcal Bacteriophages. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 15: 75-81.

HERMAN, R.E., SCHROEDER, C.J., MCKAY, L.L. 1987. Characterization of Plasmid and Cloning of the β -Galactosidase Gene From *Streptococcus thermophilus*. s: 225-228. *Streptococcal Genetics.* Ed: J.J. Ferretti, R.Curtiss. ASM Washington DC. 1987. 300 s.

HIGGINS, D.L., SANOZKY, R.B., KLAENHAMMER, T.R. 1989. Restriction and Modification Activities From *Streptococcus lactis* ME2 Are Encoded by a Self-Transmissible Plasmid, pTN20, That Forms Cointegrates During Mobilization of the Lactose-Fermenting Ability. *Journal of Bacteriology.* 170(8): 3435-3442.

HILL, C., DALY, C., FITZGERALD, G.F. 1987. Development of High-Frequency Delivery System for Transposon Tn919 in Lactic Streptococci. Random Insertions in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 74-78.

HILL, C., PIERCE, K., KLAENHAMMER, T.R. 1989a. The Conjugative Plasmid pTR2030 Encodes Two Bacteriophage Defense Mechanisms in Lactococci, Restriction/Modification (R^+/M^+) and Abortive Infection (Hsp^+). *Appl. Environ. Microbiol.* 55(9): 2416-2419.

HILL, C., ROMERO, D.A., MCKENNEY, D.S., FITNER, K.R., KLAENHAMMER, T.R. 1989b. Localization, Cloning and Expression of Genetic Determinants for Bacteriophage Resistance (Hsp) from Conjugative Plasmid pTR2030. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(7): 1864-1889.

HINTERMANN, G., FISCHER, H.M., CRAMERI, R., HUTTER, R. 1981. Simple Procedure for Distinguishing CCC, OC and L Forms of Plasmid DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Plasmid*. 5: 371-373.

HOLMES, D.S., QUICLEY, M. 1981. A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids. *Analytical Biochemistry*. 114: 193-197.

HOLMES, D.S. 1982. Rapid Purification of Bacterial Plasmids and Coliphage M13RF Without CsCl Purification. *Analytical Biochemistry*. 127: 228-233.

HOLO, H., NES, I.F. 1989. High-Frequency Transformation by Electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown With Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(4): 825-831.

HOPWOOD, D.A. 1977. Genetic Recombination and Strain Improvement. *Industrial Microbiol. Rev.* 18: 9-21.

HOPWOOD, D.A. 1981. Genetic Programming of Industrial Microorganisms. *Scientific American.* 245(3): 90-105.

HUGGINS, A.R. 1984. Progress in Dairy Starter Technology. *Food Technology.* 38: 41-50.

HUGGINS, A.R., SANDINE, W.E. 1984. Differentiation of Fast and Slow Milk Coagulating Isolates in Strains of Lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.* 67(8): 1675-1679.

HURST, A. 1966. Biosynthesis of the Antibiotic Nisin by Whole *Streptococcus lactis* Organisms. *Journal of General Microbiology.* 44: 209-220.

HURST, A. 1981. Nisin. *Advanced in Applied Microbiology.* 27: 85-123.

JARWIS, A.W. 1978. Serological Studies of a Host Range Mutant of a Lactic Streptococcal Bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(6): 785-789.

JARWIS, A.W. 1981. The Use of Whey-Derived Phage Resistant Strains in New Zealand Cheese Plants. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 16: 102-109.

JARWIS, A.W. 1984. Differentiation of Lactic Streptococcal Phage Into Phage Species by DNA-DNA Homology. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(2): 343-349.

JARWIS, A.W., KLAENHAMMER, T.R. 1986 Bacteriophage Resistance Conferred on Lactic Streptococci by the Conjugative Plasmid pTR2030: Effect on Small-Isometric, Large-Isometric and Prolate Headed Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(6): 1272-1277.

JARWIS, A.W., MEYER, J. 1986. Electron Microscopic Heteroduplex Study and Restriction Nuclease Cleavage Analysis of the DNA Genomes of Three Lactic Streptococcal Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 91(3): 566-571.

JARWIS, A.W. 1987. Sources of Lactic Streptococcal Phages in Cheese Plants. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 22: 93-103.

JARWIS, A.W., KLAENHAMMER, T.R. 1987. The Phage Resistance Plasmid pTR2030 Inhibits Lytic Infection of r_1t Temperate Bacteriophage But Not Induction of r_1t Prophage in *Streptococcus cremoris* R1. Appl. Environ. Microbiol. 53(2): 385-389.

JARWIS, A.W. 1988. Conjugal Transfer in Lactic Streptococci of Plasmid-Encoded Insensitivity to Prolate-and small. Isometric-Headed Bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 54(3): 777-783.

JARWIS, A.W., HEAP, H.A., LIMSOWTIN, G.K.Y. 1989. Resistance Against Industrial Bacteriophages Conferred on Lactococci by Plasmid pAJ1106 and Related Plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 55(6): 1537-1543.

KANDLER, O. 1983. Carbonhydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 49: 209-224.

KAY, D. 1972. Method for Studying the Infectious Properties and Multiplication of Bacteriophage. s: 191-255. Methods in Microbiology. Ed: J.R. Norris, D.M. Ribbons. Academic Press Inc. New York, 1972. 479 s.

KEMPLER, G.M., MCKAY, L.L. 1979. Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: Evidence for Plasmid-Linked Citrate Utilisation. Appl. Environ. Microbiol. 37(2): 316-323.

KEMPLER, G.M., MCKAY, L.L. 1980. Improved Medium for Detection of Citrate-Fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol. 39(4): 926-927.

KEOOGH, B.P. 1973. Adsorption, Latent Period and Burst Size of Phages of Some Strains of Lactic Streptococci. J. Dairy Res. 40: 303-309.

KEOOGH, B.P., SHIMMIN, P.D. 1974. Morphology of the Bacteriophage of Lactic Streptococci. Applied Microbiology. 27(2): 411-415.

KING, W.R., COLLINS, E.B., BARRETT, E.L. 1983. Frequencies of Bacteriophage Resistant and Slow Acid-Producing Variants of *Streptococcus cremoris*. 45(5): 1481-1485.

KLAENHAMMER, T.R., MCKAY, L.L., BALDWIN, K.A. 1978. Improved Lysis of Group N Streptococci for Isolation and Rapid Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. Appl. Environ. Microbiol. 35(3): 592-600.

KLAENHAMMER, T.R. 1984a. Interactions of Bacteriophages with Lactic Streptococci. Adv. Appl. Microbiol. 30: 1-29.

KLAENHAMMER, T.R. 1984b. A General Method for Plasmid Isolation in Lactobacilli. Current Microbiol. 10: 23-28.

KLAENHAMMER, T.R., SANOZKY, R.B. 1985. Conjugal Transfer From *Streptococcus lactis* ME2 of Plasmid Encoding Phage Resistance, Nisin Resistance and Lactose Fermenting Ability: Evidence for High-Frequency Conjugative Plasmid Responsible for Abortive Infection of Virulent Bacteriophages. Journal of General Microbiology. 131: 1531-1541.

KLAENHAMMER, T.R., SANOZKY, R.B. 1986. pTN1060, A Conjugal Plasmid Which Confers Phage Restriction and Modification Activities to Lactic Streptococci. 2nd. International ASM Conference On Genetics of Streptococci. 1986, USA. Paper No.225: 1-26.

KLAENHAMMER, T.R. 1987. Plasmid Directed Mechanisms for Bacteriophage Defence in Lactic Streptococci. FEMS Microbiology Reviews. 46: 313-325.

- KLAENHAMMER, T.R. 1988. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie.* 70: 337-349.
- KOK, J., Von Der VOSSEN, W.M.M., VANEMA, G. 1984. Construction of Plasmid Cloning Vectors for Lactic Streptococci Which Also Replicate in *Bacillus Subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(4): 726-731.
- KOK, J., VANEMA, G. 1988. Genetics of Proteinases of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie.* 70: 475-488.
- KOK, J. 1989. Gene Cloning in Lactococci. Course of Genetic Systems in Lactic Acid Bacteria. The Netherlands, 12-23 June 1989. Sayfa: 11-14.
- KONDO, J.K., MCKAY, L.L. 1982. Transformation of *Streptococcus lactis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(5): 1213-1215.
- KONDO, J.K., MCKAY, L.L. 1984. Transformation of *Streptococcus lactis* Protoplasts: Optimization and Use Molecular Cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(2): 252-259.
- KONDO, J.K., MCKAY, L.L. 1985. Gene Transfer Systems and Molecular Cloning in Group N Streptococci. *J. Dairy Sci.* 88: 2143-2159.
- KOZAK, W., RAJCHERT-TRZPIL, M., DOBRZANSKI, W.T. 1974. The Effect of Proflavin, Ethidium Bromide and An Elevated Temperature on the Appearance of Nisin-Negative Clones in Nisin Producing Strains of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology.* 83: 295-302.
- KRUGER, D.H., BICKLE, T.A. 1983. Bacteriophage Survival. Multiple Mechanisms for Avoiding the Deoxyribonucleic Acid Restriction Systems of Their Hosts. *Microbiol. Reviews.* 47(3): 345-360.

KUHL, S.A., LARSEN, L.D., McKAY, L.L. 1979. Plasmid Profiles of Lactose-Negative and Proteinase Deficient Mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 and M18. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(6): 1193-1195.

LAIBLE, N.J., RULE, P.L., HARLANDER, S.K., McKAY, L.L. 1987. Identification and Cloning of Plasmid Deoxyribonucleic Acid Coding For Abortive Infection From *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* KR2. *J. Dairy Sci.* 70: 2211-2219.

LARSEN, L.D., McKAY, L.L. 1978. Isolation and Characterization of Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(6): 944-952.

LAW, B.A., KOLSTARD, J. 1983. Proteolytic Systems in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 49: 225-245.

LAW, B.A. 1984. Flavour Development in Cheeses. s: 187-208. Advances in the Microbiology And Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Ed: F.L. Davies, B.A. Law. Appl. Sci. Publ. Ltd. 1984. 259 s.

LAWRENCE, R.C., THOMAS, T.D., TERZAGHI, B.E. 1976. Reviews of the Progress of Dairy Science: Cheese Starters. *J. Dairy Res.* 43: 141-193.

LeBLANC, D.J., HAWLEY, R., LEE, L.N., StMARTIN, E.J. 1978. Conjugal Transfer of Plasmid DNA Among Oral Streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(7): 3484-3487.

LeBLANC, D.J., CROW, V.L., LEE, L.N., GARON, C.F. 1979. Influence of Lactose Plasmid On Metabolism of Glactose by *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology.* 137(2): 878-884.

LeBLANC, D.J., CROW, V.L., LEE, L.N. 1980. Plasmid Mediated Carbohydrate Catabolic Enzymes Among Strains of *Streptococcus lactis*. s: 31-41. *Plasmids and Transposons: Environmental Effects and Maintenance Mechanisms.* Acod Press Inch, New York, 1980. 452 s.

LeBLANC, D.J., LEE, L.N. 1984. Physical and Genetic Analysis of Streptococcal Plasmid pA β 1 and Cloning Its Replication Region. *Appl. Environ. Microbiol.* 157(2): 445-453.

LELIE, D. 1987. *Bacillus Subtilis* Generates a Major Specific Deletion in pAM β 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(10): 2458-2463.

LELIE, D. Van Der VOSSEN, W.M.M., VANEMA, G. 1988. Effect of Plasmid Incompatibility on DNA Transfer to *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 865-871.

LELIE, D. 1989. Mechanisms of DNA Transfer in Lactococci. Proefschrift, University of Groningen Pub. 146 s.

LELIE, D., VOSTEN, A.B., BRON, S., OSKAM, L., VANEMA, G. 1990. Conjugal Mobilization of *Streptococcus* Plasmid pMV158 Between Strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Bacteriology.* 71(1): 47-52.

LIMSOWTIN, G.K.Y., HEAP, H.A., LAWRENCE, R.C. 1978. Heterogeneity Among Strains of Lactic Streptococci. New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 13: 1-8.

LOWRIE, R.J. 1974. Lysogenic Strains of Group N Lactic Streptococci. *Applied Microbiology.* 27(1): 213-217.

MABBITT, A., DAVIES, F.L., LAW, B.A., MARSHALL, W.M. 1987. *Microbiology of Milk and Milk Products.* s: 135-166. Essays in Agricultural And Food Microbiology. Ed: J.R. Norris, G.L. Pettipher. John Wiley sons ltd. England, 325 s.

MACRINA, F.L., KOPECKO, D.J., JONES, K.R., AYERS, D.S., MCCOVEN, S.M. 1978. A Multiple Plasmid Containing *Escherichia coli* Strain: Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules. *Plasmid.* 1: 417-420.

MACURA, D., DOWSLEY, P.M. 1983. Scandinavian Ropy Milk Identification and Characterization of Endogenous Ropy Lactic Streptococci on Their Extracellular Excretion. *J. Dairy Sci.* 67: 735-744.

MAEDA, S., GASSON, M. 1986. Cloning, Expression and Location of the *Streptococcus lactis* Gene for Phospho- β -Galactosidase. *Journal of General Microbiology*. 132: 331-340.

MALKE, H. 1972. Transduction in Group A Streptococci. s: 119-133. *Streptococci and Streptococcal Diseases*. Ed: L.W. Wannamaker, J.M. Matsen. Academic Press, New York, 1972, 633 s.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. 1986. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), New York. 455 s.

MANSAIS, Y.L., MATA, M., RITZENTHALER, P. 1988. Molecular Taxonomy of *Lactobacillus* Phages. *Biochimie*. 70: 429-435.

MARMELSTAIN, N.H. 1982. Advanced Bulk Starter Medium Improves Fermentation Process. *Food Technology*. 8: 69-77.

MARSHALL, W.M., LAW, B.A. 1984. The Physiology and Growth of Dairy Lactic Acid Bacteria. s:67-98. Advanced in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Ed: F.L. Davies, B.A. Law. Elsevier Appl. Sci. Publ. 1984, London, 259 s.

MATA, M., RITZENTHALER, P. 1988. Present State of Lactic Acid Bacteria Phage Taxonomy. *Biochimie*. 70: 395-399.

McIYNTRE, D.A., HARLANDER, S.K. 1989. Genetic Transformation of Intact *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* by High Voltage Electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(3): 604-610.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A., ZOTTOLA, E.A. 1972. Loss of Lactose Metabolism in Lactic Streptococci. *Applied Microbiology*. 23(6): 1090-1096.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A. 1973. Induction of Prophage in *Streptococcus lactis* C2 by Ultraviolet Irradiation. *Applied Microbiology*. 25(4): 682-684.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A. 1974. Simultaneous Loss of Proteinase and Lactose Utilizing Enzyme Activities in *Streptococcus lactis* and Reversal of Loss by Transduction. *Applied Microbiology*. 28(3): 342-346.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A. 1975. Plasmid Distribution Evidence for a Proteinase Plasmid in *Streptococcus lactis* C2. *Applied Microbiology*. 29(4): 546-548.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A., EFTATHIOU, J.D. 1976. Transductional Evidence for Plasmid Linkage of Lactose Metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Environ. Microbiology*. 32(1): 45-52.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A. 1978. Stabilization of Lactose Metabolism in *Streptococcus lactis* C2. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(2): 360-367.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A., WALSH, P.M. 1980. Conjugal Transfer of Genetic Information in Group N Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(1): 81-84.

McKAY, L.L. 1983. Regulation of Lactose Metabolism in Dairy Streptococci. s: 153-182. *Developments in Food Microbiology (I)*. Ed: R. Davies. Appl. Sci. Publ. Ltd. 1983, London. 219 s.

McKAY, L.L., BALDWIN, K.A. 1984. Conjugative 40 Megadalton Plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is Associated Resistance to Nisin and Bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(1): 68-74.

McKAY, L.L. 1989. Functional Role of Plasmids in the Metabolism of Lactococci. Course of Genetic Systems in Lactic Acid Bacteria. Biotechnology Action Programme. The Netherlands, 12-23 June 1989. Sayfa: 1-6.

McKAY, L.L., BOHANON, M.J., POLZIN, K.M., RULE, P.L., BALDWIN, K.A. 1989. Localization of Separate Genetic Loci for Reduced Sensitivity Towards Small Isometric-Headed Bacteriophage skl and Prolate-Headed Bacteriophage C2 on pBK17 From *lactococcus lactis* subsp. *lactis* KR2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(10): 2702-2709.

MEISTER, K.A., LEDFORD, L.A. 1979. Optimum Cultural Conditions for Induction of Temperate Bacteriophages in Lactic Streptococci. *Journal of Food Protection.* 42(5): 396-400.

MERCENIER, A., ROBERT, C., ROMERO, D.A., SLOS, P., LEMONIE, Y. 1987. Transfection of *Streptococcus thermophilus* Spheroplasts. s: 234-237. *Streptococcal Genetics.* Ed: J.J. Ferretti, R. Curtiss. ASM Washington DC. 1987. 300 s.

MERCENIER, A., CHASSY, B.M. 1988. Strategies for Development of Bacterial Transformation Systems. *Biochimie.* 70: 503-517.

MEYERS, J.A., SANCHES, D., ELWELL, L.P., FALKOW, S. 1976. Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Bacteriology.* 127(3): 1529-1537.

MOLSKNESS, T.A., SANDINE, W.E., BROWN, L.R. 1974. Characterization of Lac⁺ Transductants of *Streptococcus lactis*. *Applied Microbiology.* 28(5): 753-758.

MULLAN, W.M.A., CRAWFORD, R.J.M. 1985. Lysin Production by ØC2(W), A Prolate Phage for *Streptococcus lactis* C2. *J. Dairy Res.* 52: 113-121.

MUNDT, O. 1986. Lactic Streptococci. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Ed: P.H.A., Sneath. Volume:2. Williams, Wilkins Co. 1986. 1599 s.

MURPHY, M.C., STEELE, J.L., DALY, C., McKAY, L.L. 1988. Concomitant Conjugal Transfer of Reduced Bacteriophage-Sensitivity Mechanisms With Lactose and Sucrose Fermenting Ability in Lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(8): 1951-1956.

MYSTRY, V.V., KOSIKOWSKI, K. 1986. Influence of Milk Ultrafiltration on Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria. *J. Dairy Sci.* 69: 2571-2582.

NEVE, H., GEIS, A., TEUBER, M. 1988. Plasmid Encoded Function of Ropy Lactic Streptococcal Strains From Scandinavian Fermented Milk. *Biochimie.* 70: 543-551.

NOVEL, M., HUANG, D.C., NOVEL, G. 1988. Transposition of the *Streptococcus lactis* ssp. *lactis* Z270 Lactose Plasmid to pVA797: Demonstration of an Insertion Sequence and Its Relationship to an Inverted Repeat Sequence Isolated by Self-Annealing. *Biochimie.* 70: 543-551.

NYENDO, J., SEIDLER, R.J., SANDINE, W.E., ELLIKER, P.E. 1974. Preparation and Storage of High Titer *Streptococcus* Bacteriophages. *Applied Microbiology.* 27(4): 72-74.

OKAMATO, T., FUJITA, Y., IRIE, R. 1983. Fusions of Protoplast of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.* 47: 2675-2676.

OKAMATO, T., FUJITA, Y., IRIE, R. 1985. Interspecific Protoplast Fusion Between *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1105-1108.

OLD, R.W., PRIMOSE, S.B. 1985. Principles of the Gene Manipulation (An Introduction to Genetic Engineering). Blackwell Scientific Publ. Oxford. 409 s.

ORAM, J.D. 1971. Isolation and Properties of a Phage Receptor Substance From the Plasma Membrane of *Streptococcus lactis* ML3. *Journal of General Virology.* 13: 59-71.

ORBERG, P.K., SANDINE, W.E. 1985. Survey of Antimicrobial Resistance in Lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(3): 538-542.

ÖNER, Z. 1986. Peynir ve Peyniraltı Suyunda Bulunan Laktik Streptokokların Özgül Fajlarının Aranması ve Konakçıları Belli Bazi Laktik Fajlara Karşı Özgüllüklerinin Saptanması. Doktora Çalışması. A.Ü.Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, Ankara. s.71.

PARADA, J.L., LaVIA, M., SOLARI, A.J. 1984. Isolation of *Streptococcus lactis* Bacteriophages and Their Interaction With the Host Cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(6): 1352-1354.

PARADA, J.L., DeGIACHI, M.P. 1986. Resistance of *Streptococcus lactis* Mutant to β -Lactam Antibiotics. *J. Dairy Sci.* 69: 2031-2037.

PEARCE, L.E. 1974. Activity Tests for Cheese Starter Cultures. *New Zealand J. Dairy Sci. Technol.* 4: 246-247.

PEARCE, L.E. 1978. The Effect of Host-Controlled Modification on the Replication Rate of a Lactic Streptococcal Bacteriophage. *New Zealand Dairy Sci. Technol.* 13: 166-171.

POLZIN, K.M., SHIMAZU-KADOTA, M. 1987. Identification of a New Insertion Element, Similar to Gram Negative IS26, On the Lactose Plasmid of *Streptococcus lactis*. *Journal Bacteriology.* 169(2): 5481-5484.

POWELL, I.B., ACHEN, M.G., HILLER, A.J., DAVIDSON, B.E. 1988. A Simple and Rapid Method for Genetic Transformation of Lactic Streptococci by Electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(3): 655-660.

PRIEBE, S.D., LACKS, S.A. 1989. Region of the Streptococcal Plasmid pMV158 Required for Conjugative Mobilization. *Journal of Bacteriology.* 171(9): 4778-4784.

QUEENER, S.W., BALTZ, R.H. 1979. Genetics of Industrial Microorganisms. s:6-45. Annual Reports on Fermentation Process. Ed. D. Perlmann, G. Tsao. Academic Press Inc. New York 1979. 220 s.

REDDY, M.S., VEDAMUTHU, E.R., WASHAM, C.J., REINBOLD, G.W. 1969. Differential Agar Medium for Separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Applied Microbiology. 18(5): 755-759.

REDDY, M.S., VEDAMUTHU, E.R., WASHAM, C.J., REINBOLD, G.W. 1972a. Associative Growth Studies Studies in Three-Strain Mixtures of Lactic Streptococci. Applied Microbiology. 24(6): 953-957.

REDDY, M.S., VEDAMUTHU, E.R., WASHAM, C.J., REINBOLD, G.W. 1972b. Agar Medium for Differential Enumeration of Lactic Streptococci. Applied Microbiology. 24(6): 947-952.

REINBOLD, G.W., REDDY, M.S. 1974. Sensitivity or Resistance Dairy Starter and Associated Microorganisms to Selected Antibiotics. J.Milk Food Technol. 37(10): 517-521.

REYROLLE, J., CHOPIN, M.C., LETELLIER, F., NOVEL, G. 1982. Lysogenic Strains of Lactic Acid Streptococci and Lytic Spectra of Their Temperate Bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 43(2): 349-356.

RHODES, L. 1990. Analysis of Plasmid Mediated Cell Aggregation Phenotype In *Lactococcus lactis* 712. PHD. Thesis. University of East Anglia. 107 s.

RIBELIO, E.A., LARCOM, L.L., MILLER, P.P. 1989. Quantitative Flourescene of DNA Intercalated Ethidium Bromide on Agarose Gels. Analytical Biochemistry. 181: 197-208.

ROCHELLE, P.A., FRY, J.C., DAY, M.J., BALE, M. 1985. An Accurate Method For Estimating Sizes of Small and Large Plasmids and DNA Fragments by Gel Electrophoresis. Journal of General Microbiology. 132: 53-59.

ROWLANDS, R.T. 1984a. Industrial Strain Improvement: Mutagenesis and Random Screening Procedures. *Enzyme Microbial Technol.* 6: 3-10.

ROWLANDS, R.T. 1984b. Industrial Strain Improvement: Rational Screens and Genetic Recombination Techniques. *Enzyme Microbial Technol.* 6: 290-300.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1980. Restriction and Modification in Group N Streptococci: Effect of Heat on Development of Lytic Bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(3): 500-506.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1981. Evidence for Plasmid Linkage of Restriction and Modification in *Streptococcus cremoris* KH. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(6): 944-950.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1983. Characterization of Phage Sensitive Mutants From a Phage-Insensitive Strain of *Streptococcus lactis*: Evidence for a Plasmid Determinant That Prevents Phage Adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(5): 1125-1133.

SANDERS, M.E., KLAENHAMMER, T.R. 1984. Phage Resistance in a Phage-Insensitive Strain of *Streptococcus lactis*: Temperature-Dependent Phage Development and Host Controlled Phage Replication. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5): 979-985.

SANDERS, M.E., LEONHARD, P.J., SING, W.D., KLAENHAMMER, T.R. 1986. Conjugal Strategy for Construction of Fast Acid Producing, Bacteriophage Resistant Lactic Streptococci for Use in Dairy Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(5): 1001-1007.

SANDERS, M.E., NICHOLSON, M.A. 1987. A Method For Genetic Transformation of Nonprotoplasted *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1730-1736.

SANDERS, M.E. 1988. Phage Resistance in Lactic Streptococci. *Biochimie.* 70: 411-421.

SANDINE, W.E. 1987. Looking Backward and Forward at the Practical Applications of Genetic Researches on Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Reviews. 46(3): 205-220.

SCHAFFER, H.E., SEDEROFF, R.R. 1981. Improvement Estimation of DNA Fragment Lengths From Agarose Gels. Analytical Biochemistry. 115: 113-122.

SCHEREWITZ, K.M., BALDWIN, K.A., MCKAY, L.L. 1983. Plasmid Linkage of a Bacteriocin-Like Substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* Strain WM4. Transferability to *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 45(5): 1506-1512.

SCHEREWITZ, K.M., MCKAY, L.L. 1987. Restriction Enzyme Analysis of Lactose and Bacteriocin Plasmids From *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* WM4 and Cloning of BclI Fragments Coding For Bacteriocin Production. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1171-1174.

SCHLEIFER, K.H. 1987. Recent Changes in Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Review. 46(3): 201-203.

SECHAUD, L., CLUZEL, P.J., ROSSEAU, M., BAUMGARTNER, A., ACCOLAS, J.P. 1988. Bacteriophages of Lactobacilli. Biochimie. 70: 401-410.

SHAERMAN, C., UNDERWOOD, H.M., JURY, K., GASSON, M. 1989. Cloning and DNA Sequence Analysis of a *Lactococcus* Bacteriophage Gene. Molecular General Genetic. 218: 214-221.

SHIMAZU-KADOTA, M. 1988. Cloning and Expression of the Phospho- β -Galactosidase Genes on the Lactose Plasmid and the Chromosome of *Lactobacillus casei* in *Escherichia coli*. Biochimie. 70: 523-529.

SHORTLE, D., Di MAIO, D., NATHANS, D. 1981. Directed Mutagenesis. Annual Review Genetics. 15: 265-294.

SIHNA, R.P. 1980. Alteration of Host Specificity to Lytic Bacteriophages in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(2): 326-332.

SIHNA, R.P. 1986. Development High-Level Streptomycin Resistance Affected by a Plasmid DNA in Lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(2): 255-261.

SIJTSMA, L., STENKENBURG, A., WOUTERS, J.T.M. 1988. Properties of the Cell Walls of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and SK112 and Their Relation to Bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(11): 2808-2811.

SIMON, D., ROUAULT, A., CHOPIN, M.C. 1985. Protoplast Transformation of Group N Streptococci With Cryptic Plasmids. *FEMS Microbiology Letters.* 26: 239-241.

SIMON, D., ROUAULT, A., CHOPIN, M.C. 1986. High-Efficiency Transformation of *Streptococcus lactis* Protoplasts by Plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(2): 394-395.

SIMON, D., CHOPIN, A. 1988. Construction of a Vector Plasmid Family And Use For Molecular Cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie.* 70: 559-566.

SIMONS, G., DeVOS, W.M. 1987. Gene Expression in Lactic Streptococci. s: 458-461. 4th Euro. Cong. Biotech. Ed: O.M. Neijssel, R.R. Van Der Meer, A.M. Lyben. Elsevier Sci. Publ. Ltd. Amsterdam 1987. 554 s.

SING, W.D., KLAENHAMMER, T.R. 1986. Conjugal Transfer of Bacteriophage Resistance Determinants on pTR2030 Into *Streptococcus cremoris* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(6): 1264-1271.

SMITH, O., BANNER, D.B., DEICH, R.A. 1981. Genetic Transformation. *Annual Rev. Biochem.* 50: 41-68.

SNOOK, R.J., MCKAY, L.L. 1981. Conjugal Transfer of Lactose-Fermenting Ability Among *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(5): 904-911.

SNOOK, R.J., MCKAY, L.L., AHLSTRAND, G.G. 1981. Transduction of Lactose Metabolism by *Streptococcus cremoris* C3 Temperate Phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 42(5): 897-903.

SOUNDERS, J.R., DOCHERTY, A., HUMPREYS, G.O. 1984. Transformation of Bacteria by Plasmid. *Methods in Microbiology.* 17: 61-91.

SOUTHERN, E.M. 1979. Measurement of DNA Lengths by Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry.* 100: 319-323.

STEELE, J.L., MURPHY, M.C., DALY, C., MCKAY, L.L. 1989. DNA-DNA Homology Among Lactose-and Sucrose Fermenting Transconjugants From *Lactococcus lactis* Strains Exhibiting Reduced Bacteriophage Sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(9): 2410-2413.

STEENSON, L.R., KLAENHAMMER, T.R. 1985. *Streptococcus cremoris* M12R Transconjugants Carrying the Conjugal Plasmid pTR2030 Are Insensitive to Attack by Lytic Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4): 851-858.

STEENSON, L.R., KLAENHAMMER, T.R., SWAISGOOD, H.E. 1987. Calcium Alginate-Immobilized Cultures of Lactic Streptocci Are Protected From Bacteriophages. *J. Dairy Sci.* 70: 1121-1127.

STROOP, W.G. 1988. Simultaneous Electroelution and Concentration of DNA Fragments From Agarose Gels. *Analytical Biochemistry.* 169: 194-196.

TAYLOR, S.L., SOMERS, E.B. 1985. Evaluation of the Antibotulinal Effectiveness of Nisin In Bacon. *Journal of Food Protection.* 48: 949-952.

TERZAGHI, B.E., SANDINE, W.E. 1975. Improved Medium For Lactic Streptococci And Their Bacteriophages. Applied Microbiology. 29(6): 807-813.

TERZAGHI, B.E. 1976. Morphologies and Host Sensitivities of Lactic Streptococcal Phages From Cheese Factories. New Zealand Dairy Sci. Technol. 11: 155-163.

TERZAGHI, E.A., TERZAGHI, B.E. 1978. Effect of Lactose Concentration on the Efficiency of Plating of Bacteriophages on *Streptococcus cremoris*. Appl. Environ. Microbiol. 35(3): 471-478.

TERZAGHI, B.E., SANDINE, W.E. 1981. Bacteriophage Production Following Exposure of Lactic Streptococci to Ultraviolet Radiation. Journal of General Microbiology. 122: 305-311.

TEUBER, M., LEMBKE, J. 1983. The Bacteriophage of Lactic Acid Bacteria With Emphasis On Genetic Aspects of Group N Lactic Streptococci. Antonie Van Leeuwenhoek. 49: 283-295.

TEUBER, M., LOOF, M. 1987. Genetic Characterization of Lactic Streptococcal Bacteriophages. s: 250-258.
Streptococcal Genetics. Ed: J.J. Ferretti, R. Curtiss. ASM, Washington DC, 1987. 300 s.

TEUBER, M. 1990. Strategies For Genetic Modification In Lactic Acid Bacteria. Food Biotechnology, 4(1): 537-546.

THOMAS, C.M. 1984. Analysis of Clones. Methods in Microbiology. 17: 163-192.

THOMAS, T.D., JARWIS, B.D.W., SKIPPER, N.A. 1974. Localisation of Proteinase(s) Near the Cell Surface of *Streptococcus lactis*. Journal of Bacteriology. 118: 329-333.

THOMAS, T.D., RICHARD, G.G. 1987. Proteolytic Enzymes of Dairy Starter Cultures. FEMS Microbiology Reviews. 46(3): 245-268.

THOMPSON, J. 1988. Lactic Acid Bacteria: Model Systems For In Vitro Studies of Sugar Transport And Metabolism in Gram-Positive Microorganisms. *Biochimie.* 70: 325-336.

THUNNEL, R.K., BODYFELT, F.W. SANDINE, W.E. 1982. Economic Comparisons of Cheddar Cheese Manufactured With Defined-Strain and Commercial Mixed Strain Cultures. *J. Dairy Sci.* 67: 1061-1068.

TSAI, H.J., SANDINE, W.E. 1987. Conjugal Transfer of Nisin Plasmid Genes From *Streptococcus lactis* to *leuconostoc dextranicum* 181. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2): 352-357.

TUNAİL, N., AŞKIN, O. 1990. Laktik Streptokok Fajlarının İzolasyonu, Konakçı Spektrumlarının Saptanması ve Lizogen Bakterilerin Faj İndüksiyon Yöntemi ile Belirlenmesi. TÜBİTAK-TOAG Tarımsal Mikrobiyoloji Araştırma Ünitesi. Proje No: TARMİK-9, 45 s.

TYNKKYNNEN, S., Von WRIGHT, A.W. 1988. Characterization of a Cloned Chromosomal Fragment Effecting the Proteinase Activity of *Streptococcus lactis* ssp. *lactis*. *Biochimie:* 531-534.

Van BELKUM, M., HAYEMA, B.J., GEIS, A., KOK, J., VANEMA, G. 1989. Cloning Two Bacteriocin Genes From a Lactococcal Bacteriocin Plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(5): 1187-1191.

Van Der VOSSEN, J.B.M., KOK, J., VANEMA, G. 1985. Construction of Cloning Promoter-Screening Shuttle Vectors for *Bacillus subtilis* and *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(2): 540-542.

VEDAMUTHU, E.R., NEVILLE, J.M. 1986. Involvement of a Plasmid In Production of Ropiness (Mucoidness) In Milk Cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(4): 677-682.

WALSH, P.M., MCKAY, L.L. 1981. Recombinant Plasmid Associated With Cell Aggregation And High-Frequency Conjugation of *Streptococcus lactis* ML3. *Journal of Bacteriology.* 146(3): 937-944.

WALSH, P.M., MCKAY, L.L. 1982. Restriction Endonuclease Analysis of Lactose Plasmid In *Streptococcus lactis* ML3 And Two Recombinant Lactose Plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(6): 1006-1010.

WANG, S. 1980. Superhelical DNA. *Trends In Biochemical Sciences.* 5: 219-221.

WATSON, J.D., HOPKINS, H.A., ROBERTS, J.W., STEITZ, A.J., WEINER, A.M. 1987. *Molecular Biology of the Gene.* Benjamin Cummings Publ. Co. USA, Fourth Edition. 1163 s.

WILLETS, N. 1984. Conjugation. *Methods In Microbiology.* 17: 34-58.

WILLETS, N., WILKINS, B. 1984. Processing of Plasmid DNA During Bacterial Conjugation. *Microbiol Reviews.* 48(1): 24-41.

WILLETS, N. 1985. *Plasmids.* s: 165-193. *Genetics of Bacteria.* Ed: J. Scaife, D. Leach, A. Galizzi. Academic Press Inc. New York 1985. 286 s.

WOLFE, T.W., MCKAY, L.L. 1983. Isolation And Partial Characterization of Lactose-Negative Mutants From *Streptococcus lactis* C2 Defective In the Phosphotransferase System. *J. Dairy Sci.* 67: 950-959.

WRIGHT, A.V., TOIMISTO, A.M., SIVELA, S. 1985. Effect of Ca^{+2} Ions on Plasmid Transformation of *Streptococcus lactis* Protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4): 1100-1102.

WRIGHT, A.W., TYNKKYNNEN, S. 1987. Construction of *Streptococcus lactis* subsp. *lactis* Strains With a Single Plasmid Associated With Mucoid Phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(6): 1385-1386.

WULF, J.J., SANDINE, W.E. 1983. Isolation And Characterization Fast Acid-Producing, Antibiotic Resistant Mutants of Lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.* 60: 1835-1842.

ZABRISKIE, J.B., READ, S.E., FISCHETTI, F.A. 1972. Lysogeny In Streptococci. s: 99-118. *Streptococci And Streptococcal Diseases*. Ed: L.W. Wannamaker, J.M. Matsen. Academic Press Inc. New York 1972. 633 s.

ZOTTOLA, E.A., COGAN, T.M., KELLY, J. 1987. Partition of Lactic Streptococcal Bacteriophage During Ultrafiltration, Concentration of Milk And Whey. *J. Dairy Sci.* 70: 2013-2021.