

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* VİRULENT FAJLARININ  
İZOLASYONU ve YOĞURT STARTER KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE LİTİK  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

DEĞER KALELİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

104505

ANKARA  
2001

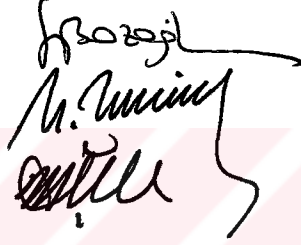
Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Nezihe TUNAİL danışmanlığında, Değer KALELİ tarafından hazırlanan bu çalışma 13/02/2001 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU

Üye : Prof. Dr. Nezihe TUNAİL

Üye : Doç. Dr. Mustafa AKÇELİK



**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Esmâ KILIÇ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* VİRULENT FAJLARININ İZOLASYONU ve YOĞURT STARTER KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE LİTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Değer KALELİ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nezihe TUNAİL

Bu çalışmada öncelikle *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ( *S. thermophilus* ) fajlarının, çiğ sütlerden izolasyonuna çalışılmıştır. Farklı kaynaklara ait süt örneklerinden daha önceden izole edilerek tanılanan 30 adet doğal (yerel) *S. thermophilus* suşunun konakçı, 19 adet çiğ süt örneğinin de faj izolasyon materyali olarak kullanıldığı denemelerde, Chr. Hansen Laboratuvarı ATL faj testi ile faj izole edilememiştir. Bunun üzerine yoğurt fabrikalarından sağlanan 9 adet liyofilize miks yoğurt kültüründen izolasyonları başarılı olan 9 ayrı *S. thermophilus* suşu; yoğurt, bulk, peyniraltı suyu ve ayrandan oluşan 34 adet faj izolasyon materyali için konakçı olarak kullanılmıştır. 709, 231 ve B3 suşları ile 23 adet *S. thermophilus* faj izolasyonunun gerçekleştirildiği denemelerde Modifiye M17 (thM17) Broth ve thM17 Agar besiyerlerinden ve çift tabaka agar yönteminden yararlanılmıştır.

Denenen fajlara karşı yerel *S. thermophilus* suşlarının hepsi dirençli bulunurken starter kökenli suşlardan 709, 231 ve B3' ün hemen hemen bütün fajlara karşı çok duyarlı, buna karşılık V1, V2, Y1, Y4, 632 ve CH-1 suşlarının ise yerel suşlar kadar dirençli oldukları saptanmıştır.

Fajların homolog konakçılarından dışında diğer iki suşu da heterolog konakçı olarak kullandıkları belirlenmiştir. Starter kökenli *S. thermophilus* suşları üç farklı litik spektrum sergilemişlerdir. Ayrıca, tüm *S. thermophilus* suşlarının, partneri olan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*' un fajları ile lize vermedikleri, dolayısıyla heterolog konakçı olarak davranmadıkları gösterilmiştir.

*S. thermophilus* temperent fajlarının izolasyonu amacıyla suşlarda profaj indüksiyonu için mitomisin C (MC) kullanılmış, referans lizogenik suş *S. thermophilus* CNRZ 1205 ile belirlenen etkili MC konsantrasyonları (0,05; 0,1; 0,2 µg/ml) tüm *S. thermophilus* suşlarına uygulanmıştır. Ne yerel suşlar ne de starter kökenli suşlar lizogenik karakterde bulunmamıştır. Starter üreten firma prospektüsünde, faj atağında rotasyona sokulmak üzere önerilen kültürün yerel fajlara göre yanlış bir öneri olduğu da bu çalışma ile gösterilmiştir.

2001, 78 sayfa

**ANAHTAR KELİMELER:** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, virulent faj, lizogeni

## ABSTRACT

Master Thesis

### VIRULENT PHAGES ISOLATION OF *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* AND DETERMINATION OF LYTIC ACTIVITY ON YOGHURT STARTER CULTURES

Deger KALELİ

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Nezihe TUNAİL

Phages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) from raw milk were isolated. 30 native *S. thermophilus* strains which were previously isolated from raw milk were used as host and 19 raw milk samples used as phage isolation material. However no isolates could be obtained by using Chr. Hansen Laboratory ATL phage test. After this result, 9 different *S. thermophilus* strains were isolated successfully from 9 lyophilized mixed yogurt cultures taken from different dairy factories. Then, those 9 strain were used as host for isolation of phages from 34 different materials including yogurt, bulk, whey, airan. In experiments, 23 *S. thermophilus* phages could be isolated by 3 of 9 strains; 709, 231 and B3. Modified M17 (th M17) Agar and th M17 Broth medias and double layer agar method were applied for growth and isolation.

It is noteworthy that while all native strains of *S. thermophilus* were found to be resistant for phages which were tested, starter originated strains 709, 231 and B3 were found to be very sensitive against almost all phages. Opposingly V1, V2, Y1, Y4, 632 and CH-1 strains were found to be resistant as native strains.

Other than their homolog hosts, phages were also detected using other two strains as heterolog host. Starter originated *S. thermophilus* strains exhibited three different lytic spectrum. Also it was shown that the phages of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* did not produce any lysis on any *S. thermophilus* strains meaning not to use as their heterolog hosts.

In order to isolation of temperate phages mitomicin C (MC) concentration (0,05; 0,1; 0,2 µg/ml) were determined by using reference lysogenic strain of *S. thermophilus* CNRZ 1205 and these concentrations applied for all of *S. thermophilus* strains. Neither native strains nor starter originated strains found in lysogenic character. By this study it was shown that the culture which was suggested in prospectus of starter producing company for the rotation, is a wrong suggestion when the native phages are regarded.

2001, 78 pages

**Key Words:** *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, virulent phage, lysogeny

## TEŞEKKÜR

Her konuda azimle beni destekleyen, ilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, birlikte zevkle çalıştığım sevgili Hocam Sayın Prof. Dr. Nezihe TUNAIL' e,

Sık sık bilgi ve tecrübelerine başvurduğum Sayın Prof. Dr. Kadir HALKMAN' a,

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* lizogen referans suşun yurt dışından getirilmesini sağlayarak çalışmalarına katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Kamuran AYHAN' a,

Her ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mustafa AKÇELİK' e

Anlayışı ve içten dostluğu ile acı ve tatlı günlerde her zaman yanımda olan, benim için hiçbir özveriden kaçınmayan değerli arkadaşım İlker Turan AKOĞLU' na,

Çalışmalarım süresince deneyimlerinden yararlandığım ve son iki senemi birlikte geçirdiğim dostlarım; Araş. Gör. Fügen DURLU ÖZKAYA' ya, Araş. Gör. Hilal Beyhan DOĞAN' a, Araş. Gör. İbrahim ÇAKIR' a, Araş. Gör. Hakan KULEAŞAN' a, özellikle elektron mikroskobu çalışmalarında bana yardımcı olan Esra ACAR' a ve yanımda olan herkese,

TÜBİTAK-TARP 2106 nolu “Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar” konulu proje kapsamında olan yüksek lisans tezimin çalışmaları süresince maddi yardımlarından dolayı TÜBİTAK' a,

Bana burs imkanı sağlayan TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu (BAYG)' na ve K.K.T.C. Milli Eğitim Bakanlığı' na

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca maddi manevi destekleriyle bugüne gelmemi sağlayan ve aldığım her kararda yanımda olan canım aileme sevgi ve saygılarımı sunmayı bir borç bilirim.

Değer KALELİ  
Ankara, Şubat 2001

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>5</b>
2. 1. Termofilik Starter Kültürleri ve İşlevleri .....	5
2. 2. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ' un Özellikleri .....	9
2. 3. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ve Fajları Arasındaki Konakçı İlişkileri .....	12
2. 3. 1. Litik yaşam çemberi .....	12
2. 3. 2. Lizogenik yaşam çemberi .....	14
2. 4. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> Fajları .....	16
2. 5. Faj Enfeksiyonunun Önlenmesi İçin Önlemler .....	22
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
3. 1. Materyal .....	25
3. 1. 1. Faj izolasyon materyali .....	25
3. 1. 2. Mikroorganizmalar .....	25
3. 1. 3. Bakteriyofajlar .....	25
3. 2. Yöntem .....	27
3. 2. 1. Liyofilize miks yoğurt kültürlerinden <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşlarının izolasyonu .....	27
3. 2. 2. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajlarının izolasyonu .....	27
3. 2. 2. 1. Örneklerin faj izolasyonuna hazırlanması .....	27
3. 2. 2. 2. Faj izolasyonunda kullanılan yöntemler .....	28
3. 2. 2. 3. Faj titresinin belirlenmesi .....	31
3. 2. 2. 4. Safılaştırma, zenginleştirme ve faj stoklarının hazırlanması .....	33
3. 2. 3. İzole edilen <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşlarının ve fajlarının korunması .....	33

3. 2. 4. Fajların liyofilize yoğurt kültürü kökenli homolog konakçılarının belirlenmesi .....	34
3. 2. 5. Fajların doğal (yerel) suslardan homolog konakçılarının belirlenmesi .....	34
3. 2. 6. Doğal (yerel) ve starter kökenli <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> susları ile <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> fajları arasındaki faj-konakçı spesifikliğinin test edilmesi .....	35
3. 2. 7. Faj indüksiyon (lizogeni) çalışmaları .....	35
3. 2. 7. 1. Uygun MC konsantrasyonunun belirlenmesi .....	35
3. 2. 7. 2. Doğal (yerel) ve starter kökenli <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suslarında profaj indüksiyonu .....	37
3. 2. 8. Örnek olarak seçilen bazı <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajlarının elektron mikroskopta gösterilmesi .....	37
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>38</b>
4. 1. Liyofilize Miks Yoğurt Kültürlerinden <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> Suslarının İzolasyonu .....	38
4. 2. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> Fajlarının İzolasyonu .....	40
4. 3. Fajların Starter Kökenli Homolog Konakçılarının Belirlenmesi .....	48
4. 4. Fajların Doğal (Yerel) Suslardan Homolog Konakçılarının Belirlenmesi .....	52
4. 5. Doğal (Yerel) ve Starter Kökenli <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> Suslarının <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Fajlarına Karşı Duyarlılıkları .....	56
4. 6. Profaj İndüksiyon (Lizogeni) Çalışmaları .....	60
4. 6. 1. Uygun mitomisin C konsantrasyonunun belirlenmesi .....	60
4. 6. 2. Doğal (yerel) ve starter kökenli <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suslarında profaj indüksiyonu .....	61
4. 7. Bazı <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> Fajlarının Elektron Mikroskopik Mikrografları .....	65
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>69</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>75</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 3. 1.	Chr. Hansen Laboratuvarı ATL Faj Testi .....	29
Şekil 3. 2.	Faj titresinin (pfu/ml) belirlenmesi .....	32
Şekil 3. 3.	Uygun MC konsantrasyonunun belirlenmesi .....	36
Şekil 4. 1.	V <sub>2</sub> miks yoğurt kültüründeki <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ve <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> kolonilerinin LAPT <sub>L10</sub> Agar üzerindeki görüntümü.....	39
Şekil 4. 2.	Miks yoğurt kültürü V <sub>2</sub> ' den izole edilen <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ve <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> kolonilerinin LAPT <sub>L10</sub> Agar üzerindeki görüntümü .....	39
Şekil 4. 3.	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajının konakçısına karşı oluşturduğu tek plaklar .....	45
Şekil 4. 4.	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajının çift tabaka agar yöntemine göre titresinin belirlenmesi.....	46
Şekil 4. 5.	MC konsantrasyonlarının lizogen suş <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> CNRZ 1205' in gelişimine etkisi .....	62
Şekil 4. 6.	231.x21 fajının elektron mikroskopik görüntüsü .....	66
Şekil 4. 7.	709.x4 fajının elektron mikroskopik görüntüsü .....	66



## ÇİZELGELER DİZİNİ

**Sayfa**

Çizelge 2.1. Finlandiya peynir işletmelerinden izole edilmiş olan <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajları ve homolog konakçıları .....	20
Çizelge 3.1. Yoğurt starter kültürlerinin karakteristikleri .....	26
Çizelge 4.1. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşlarının izole edildiği liyofilize miks yoğurt kültürleri (starter) ve ait oldukları firmalar .....	40
Çizelge 4.2. İzole edilmiş olan <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşları ve kaynakları .....	41
Çizelge 4.3. Faj izolasyonu amacıyla kullanılan izolasyon materyalleri ve kaynakları .....	42
Çizelge 4.4. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajlarının kodları, konakçıları, titreleri ve izolasyon kaynakları .....	47
Çizelge 4.5. 9 adet liyofilize miks yoğurt starter kökenli <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşunun, çeşitli örneklerden izole edilen 23 adet <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajına karşı verdiği titreler (pfu/ml). .....	49
Çizelge 4.6. 30 adet doğal (yerel) <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşunun, çeşitli örneklerden izole edilen 23 adet <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> fajına karşı duyarlılıkları .....	54
Çizelge 4.7. 30 adet doğal (yerel) <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşunun, çeşitli örneklerden izole edilen 30 adet <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> fajına karşı duyarlılıkları .....	57
Çizelge 4.8. 9 adet starter kökenli <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşunun, çeşitli örneklerden izole edilen 30 adet <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> fajına karşı duyarlılıkları .....	59
Çizelge 4.9. MC ile indüklenen lizogen <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> CNRZ 1205 kültürlerinde inkübasyon süresince izlenen optik yoğunluk (absorbans) değerleri .....	62
Çizelge 4.10. 3 farklı MC konsantrasyonu ile indüklenen doğal (yerel) <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> suşlarının lizogeni durumları .....	64

**Çizelge 4.11. 3 farklı MC konsantrasyonu ile indüklenen starter kökenli**

***S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının lizogeni durumları..... 65**



## 1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinde starter kültür veya yalnızca kültür olarak anılan mikroorganizmaların seçimine ve kullanımına en fazla gereksinme duyan dal, süt teknolojisidir. Çünkü süttten üretilen farklı lezzet ve yapıdaki ürünlerin her biri, farklı kültürleri talep eder. Seçilmiş kültürler süttün yoğurt, peynir, tereyağı vb. ürünlere dönüşümü için amaçlanan fermentasyonları gerçekleştirir ve teknolojik proses parametreleri ile birlikte ürünün kendine özgü kalitesini belirler. Kültürlerin kendilerinden beklenen işlevleri başarmaları, onların fizyolojik verimlilikleri ve üreme yetenekleri yüksek, aktif kültürler halinde proses süttüne katılmalarıyla olanaklıdır.

*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*), çubuk : kok oranı 1:1 veya 1:2 olacak şekilde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) ile karıştırılarak klasik yoğurt üretiminde starter kültür olarak kullanılır. Simbiyotik ilişkiye bağlı olarak gelişen kültürün oluşturduğu laktik asit ve *L. bulgaricus* tarafından sentezlenen asetaldehit yoğurdun oluşumunda ve özel aromasının gelişiminde en belirleyici unsurlardır. Koagülasyonun gerçekleşmesinde, konsistensin sağlanmasında, aroma oluşumunda ve ürünün dayanıklı hale gelmesinde asitik gelişimi (pH düşüşü) esastır.

Simbiyotik ilişkinin yanında, yoğurt kültüründe *L. bulgaricus*' un fizyolojik açıdan istenmeyen D (-) laktik asit, *S. thermophilus*' un ise metabolize olabilen L (+) laktik asit oluşturması, kültürde bakteri oranlarının korunmasına özen gösterilmesi için bir başka nedendir. Bu oran, proses süttüne % 3 aktif kültür katılması ve 43 °C' da kontrollü fermentasyon ile sağlanır. İnkübasyon sıcaklığının yükselmesi veya süresinin uzaması dengeyi laktobasillerden yana, tersi koşullar ise *S. thermophilus*' dan yana bozar ve ürün kalitesinin düşmesine neden olur.

*S. thermophilus*, yoğurt kültüründen başka peynir pıhtısına 44 °C' ın üzerinde ısı işlem uygulanan İsviçre ve İtalyan tipi peynirlerin üretiminde termofilik laktobasillerden bir veya birkaçı ile kombine edilerek peynir kültürü olarak da kullanılır. Yoğurt bakterilerine ek olarak kültüre veya *L. bulgaricus* yerine *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. *helveticus* (*L. helveticus*) ve/veya *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. lactis*) suşlarının katılmasının nedeni; peynirde yoğurt lezzetinden kaçınmak içindir. Son iki laktobasil asetaldehit üretmediğinden tercih edilir. Termofilik peynir kültürlerinde de simbiyotik ilişkiye bağlı olarak görülen çok hızlı asit üretimi ve laktobasillerin proteolitik aktiviteleri, ürün için önde gelen önemli kriterlerdir.

Kaliteli, arzulanan özelliklere sahip, standart ürün elde etmek için fizyolojik verimliliği yüksek kültürlerin seçimi, oranı ve proses parametrelerinin önemi açıktır. Ancak en az bunlar kadar önemli bir diğer kriter ise, kültürlerin bakteriyofajlara dirençleridir. Yoğurt ve peynir işletmelerinde kullanımlarından vazgeçilmesi asla mümkün olmayan kültürler, özellikle bulk (kütle) üretim aşamasında virulent fajlarla enfekte olmakta, kısa sürede lize olan bakteri popülasyonu fermentasyon sürecinde fonksiyonlarını yerine getirememektedir. Kullanılan kültürlerin dış kaynaklı olmasına karşılık işletmelerde bulunan yerel virulent fajların veya kökenini lizogen bakterilerden alan litik döngüye bağlanan temperent fajların, ki bunlar da artık virulent fajlardır, konakçıya rastlayıp süratle replike olmaları bulk kültürün hazırlanma aşamasında gerçekleşmektedir. O nedenle fajlar en yoğun olarak bulk kültür, yoğurt, pıhtılaşmış süt ve peynirde bulunurlar. Ayrıca peynir baskı bezlerinde, peyniraltı suyu (PAS) ve havada da faj titreleri belli bir düzeye kadar çıkabilir.

Faj enfeksiyonunun ilk göstergesi ve şiddeti, ortamdaki faj titresine, fajın latent periyot süresine ve patlama büyüklüğüne bağlı olarak kendini gösteren asitlik gelişiminin yavaşlamasıdır. Kültür içindeki partnerlerden birinin, örneğin *S. thermophilus*' un özgül fajının saldırısına uğraması, kültürde bakteri dengesinin bozulmasına dolayısıyla hızlı asit oluşumunun engellenmesine neden olur ve sonuçta kalitesiz ürünler ortaya çıkar. Şiddetli faj ataklarında veya her iki partnerin de fajlarla enfekte olması halinde ürün hiç oluşmayabilir.

Lizogen bakterilerin içinde profaj olarak varlığını sürdüren temperent fajların, işletmelerin faj sorunlarındaki payı, hala tartışmalı konular arasındadır. O nedenle fajlar kadar, starter bakterilerinin de lizogeni nedeniyle araştırılmaları gerekmektedir.

*S. thermophilus* fajlarına ilişkin bilgiler, laktokok fajları ile kıyaslandığında hayli sınırlıdır. Bunun nedenlerinden biri; laktokok fajlarının çok uzun yıllar öncesinden başlayarak çok daha sıklıkla sorun yaratmaları ve keşfedildikleri 1935 yılından beri araştırılmalarıdır. Termofilik fajlar ise daha az sıklıkla faj ataklarına neden olduklarından ve ancak 1952’ de *S. thermophilus* ve 1974’ de *L. bulgaricus* fajlarının keşfinden sonra araştırılmaya başlandığından bunlar üzerine daha az bilgi toplanmıştır. İkinci neden olarak, bunların izolasyonunda ve faj plaklarının gösterilmesindeki güçlükler sayılabilir. Bununla beraber son yıllarda gerek ABD’ de gerekse Orta Avrupa’ da *S. thermophilus* fajları işletmelerde daha sık sorun olmaya başlamıştır. ABD’ de termofilik starter kültürlerin kullanıldığı ürünlerde % 350-400 oranındaki artış, üretimde mekanizasyon ve rasyonelliğe gidilmesi sonucu büyük ölçekli ve modern işletmelerin doğuşu termofilik faj sorununun artışına neden olarak gösterilmektedir.

Ülkemizde *S. thermophilus* fajlarına ilişkin çalışmalar son birkaç yıldır A.Ü.Z.F. Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi’nde başlamıştır. Son 6 yıldır yoğurt fabrikalarımızda zaman zaman çok önemli boyutta yaşanan faj probleminin işletmelerin Gıda Mühendisleri tarafından çözülememesi, konunun detaylı olarak araştırılmasını gündeme getirmiştir. Her ne kadar kültür üreten firmalar, bakterilerin fajlara dirençlerini belirleyip faj ataklarında bir önlem olarak rotasyona girebilecek, faj akrabalığı olmayan suşları önerse de işletmelerin faj probleminden kaçışı mümkün olmamaktadır. Bu konuda en anlamlı yaklaşım; diğer tüm önlemlerin yanı sıra yoğurt üretiminde kullanılacak kültürlerin, işletmelerin yerleşik dominant ve büyük olasılıkla yerel fajlarına karşı periyodik olarak test edilmesi, faj-konakçı spektrumunun belirlenmesi ve rotasyonda kullanılacak kültüre, işletme koşullarına göre karar verilmesidir.

Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan bu çalışma, yoğurt işletmelerinde görülen bakteriyofaj problemine kısa ve uzun vadede çözüm üretmek amacıyla başlatılan, maddi olarak Tübitak ve DanoneSA-Birtat Şti. tarafından desteklenen TARP-2106 nolu “Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar” konulu projenin bir bölümüdür. Bu çalışmada; işletmelerde yoğurt kültürü olarak kullanılan 9 adet liyofilize miks kültürden *S. thermophilus* suşları izole edilmiş ve bu suşlar çeşitli süt ürünlerinden fajların izolasyonunda konakçı olarak kullanılmışlardır. Yüksek titrelili

fajlara karşı yerel ve starter kültür kökenli *S. thermophilus* suşlarının direnç durumları test edilmiş, fajların tür içi homolog ve heterolog konakçıları belirlenmiştir. *S. thermophilus* suşlarında lizogeni, mitomisin C (MC) indüksiyonu ile araştırılmıştır. Eldeki tüm *S. thermophilus* suşlarının *L. bulgaricus* fajlarına karşı heterolog konakçı olarak davranıp davranmadıkları da test edilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

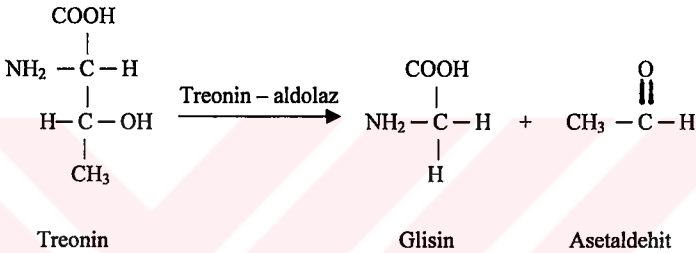
### 2.1. Termofilik Starter Kültürleri ve İşlevleri

Optimum gelişme sıcaklıkları 37 °C üzerinde olup yaklaşık 45 °C civarında gelişen termofilik laktik asit bakterileri (LAB) süt teknolojisinde önemli bir yere sahiptirler. Bunlar, kültüre bağlı olarak 42-45 °C' larda 2-3 saat içinde pH 4,0' e kadar asitlik geliştirirler. Bu özellikleriyle mezofil LAB' lerine göre asit oluşturma yönünden daha aktiftirler (Riemelt vd 1996). *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. delbrueckii* subsp. *helveticus* bakterilerinin kullanıldığı çeşitli termofilik starter kültürler, yoğurt dışında İtalyan ve İsviçre tipi peynir üretiminde de kullanılmaktadır (Sozzi vd 1976, Lawrence 1978, Reinbold vd 1982, Cluzel vd 1987a, Neve vd 1989, Brüssow vd 1994).

*L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*'tan hazırlanan starter kültürler yoğurt yapımında kullanılmaktadır. Bu iki bakteri arasında simbiyotik bir ilişki vardır. *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*' tan daha hızlı gelişerek laktozdan laktik asit oluşumu yanında ürenin üreaz tarafından parçalanmasıyla süte CO<sub>2</sub> ve genellikle formik asidin (40 µg/ml kadar) salınmasını sağlar. Böyle bir ortam *L. bulgaricus*' un gelişmesini ve metabolizmasını stimüle eder. Bundan sonra *L. bulgaricus* kazeinin bir kısmını hidrolize ederek ve peptidaz aktivitesi ile, her iki türün gelişimi için gerekli olan aminoasitleri kullanışlı (hazır) hale getirir. Proteince zengin habitatlarına rağmen *S. thermophilus* suşları sınırlı proteolitik yeteneğe sahiptirler. Bakterinin nitrojen kaynağı sütte doğal olarak bulunan veya sıcaklık uygulaması süresince ortama salınan serbest aminoasitlerdir. Ancak glutamik asit, histidin, sistin, metionin, valin veya lösin gibi belirli serbest aminoasitler sütte *S. thermophilus*' un gelişmesini sağlayacak düzeyde değildir. *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*' tan farklı olarak kazeini, özellikle β-kazeini, hücre duvarına bağlı proteinaz yardımıyla polipeptidlere hidrolize edebilmektedir. Ancak *L. bulgaricus*' un da peptidaz aktivitesi sınırlıdır. Bu aşamada *S. thermophilus* kısa zincirli peptidleri absorbe ederek serbest aminoasitlere hidrolize etmektedir. Bu serbest aminoasitler daha sonra bazı durumlarda *L. bulgaricus* tarafından da kullanılabilir.

Bu simbiyoz yaşamın sonucu olarak;

- (i) Her iki tür de, laktozu laktik aside kadar aktif olarak metabolize ederek fermentasyonun 3-4 saat içinde tamamlanmasını sağlar.
- (ii) Her iki tür tarafından ortama salınan metabolitler, diğer fermente süt ürünlerinden tamamen farklı olan yoğurt tadını oluştururlar. Yoğurta karakteristik aroma komponenti asetaldehittir. 40 mg/kg seviyelerine kadar bulunabilen asetaldehit yaygın olarak *L. bulgaricus* tarafından üretilmektedir. Asetaldehit üretimindeki temel yol, treoninin treonin-aldolaz tarafından glisine çevrilmesidir.



Asetaldehit oluşumu genellikle pH 5,0' de başlar. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*' un alkol-dehidrogenaz içermemeleri durumunda asetaldehit, türlerin sahip oldukları diğer metabolik yollara bağlı olarak belli bir düzeye kadar yükselir. Örneğin; prövatın dekarboksilasyonu da asetaldehit üretimi ile sonuçlanır. Asetaldehit *S. thermophilus* tarafından da oluşturulmakla beraber, metabolitin miktarı inkübasyon sıcaklığı ile doğrudan ilişkilidir. 30 °C' ın üzerindeki sıcaklıklarda treonin-aldolaz enzim aktivitesi önemli ölçüde düştüğünden asetaldehit oluşumu çok düşük düzeyde gerçekleşir. Diğer taraftan, *L. bulgaricus*' ta bulunan aynı enzim ise, sıcaklıktan etkilenmediğinden *L. bulgaricus*, ticari yoğurtlardaki asetaldehitin esas kaynağıdır. Serbest yağ asitleri, aminoasitler, aseton, diasetil ve keto/hidroksi asitler gibi starter orijinli diğer bileşiklerin de yoğurdun son andaki tadına katkıda bulunduğu bildirilmekle birlikte, bu metabolitlerin tat ve aroma açısından önemleri tam olarak anlaşılamamıştır.

- (iii) Her iki türün bazı suşları tarafından fark edilebilir oranda ekstraselüler polisakkarit (farklı glikan) maddeleri üretilmekte ve bu metabolitlerin varlığı, yoğurdun viskozitesini artırmaktadır. *L. bulgaricus*' un "sakız benzeri" bir materyal



sentezlemesine karşın *S. thermophilus* “yapışkan”, “glikan benzeri” bir polimer üretmektedir. Diğer taraftan *S. thermophilus*’ un bazı suşları polisakkaritleri hidrolize eden glikohidrolaz enzimine sahiptir ve kullanılan kültürlerdeki sonuçlara bağlı olarak bu tür bir aktivite vizkozitenin azalmasına neden olmaktadır (Riemelt vd 1996, Robinson 1999).

*L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* homofermentatif süt asidi bakterileri olmalarına karşın laktozun fermentasyonu sonucunda farklı konfigürasyonlarda laktik asit oluşturmaktadırlar. *S. thermophilus* L (+) laktik asit oluştururken, *L. bulgaricus* fizyolojik açıdan arzulanan D (-) laktik asit oluşturmaktadır (Robinson 1999). Geleneksel yoğurt için % 45-60 L (+) laktik asit, % 40-55’ de D (-) laktik asit değerleri gereklidir. Bunu sağlamak için klasik yoğurt kültüründe çubuk : kok oranı; 1:1 veya 1:2 olarak kullanılır. Kültürdeki bireylerin oranına veya metabolik aktivitelerine bağlı olarak yoğurdun lezzeti yumuşak, az asitli (% 0,8 laktik asit) veya kuvvetli, yüksek asitli (% 1,3 laktik asit) olur. Yoğurdun lezzeti kültüre bağlı olarak düzenlenebilir. Yüksek inokülasyon miktarı, uzun inkübasyon süresi ve yüksek inkübasyon sıcaklığı ile laktobasiller ortama hakim olurlar ve buna bağlı olarak da laktik asit miktarı artar. Düşük inokülasyon oranı, daha düşük sıcaklıkta kısa süreli inkübasyonda ise ortama streptokoklar hakim olacağından yumuşak asitli ürünler oluşur. Diğer süt ürünlerinde olduğu gibi yoğurtta da dayanıklılığın sağlanmasında laktik asit bakterilerinin oluşturduğu laktik asidin rolü büyüktür. Asit oluşumu (pH değerindeki düşüş) sütün koagülasyonunu olanaklı kılan enzimlerin aktivitesi için optimum koşulları yaratır. Ayrıca olgunlaşma, aroma oluşumu ve konsistensin sağlanmasında da pH düşüşü esastır (Riemelt vd 1996, Robinson 1999).

Sütün ısıtılması ve ürün eldesi için kültürle inokülasyonu yoğurt üretimi için en belirleyici adımdır. 80 °C’ da 20-30 dk, 90 °C’ da 10-15 dk, 95 °C’ da veya 134 °C’ da 4-6 sn sıcaklık uygulamaları patojen ve teknolojik açıdan zararlı mikroorganizmaların öldürülmesi için kullanılabilir. Ayrıca süt serumundaki k-kazein ile interaksiyona giren proteinlerin denatüre olması nedeniyle ürün konsistensi de pozitif etkilenir. Sütün ısıtılması ayrıca oksijenin çıkmasına da olanak sağladığından mikroaerofilik olan yoğurt kültürünün gelişimi de stimule olur (Riemelt vd 1996).

Fermentasyon tamamlandıktan sonra sütün asitliği % 1,2 - 1,4 laktik aside (pH 4,2 – 4,3 civarı) yükseldiği zaman, starter içindeki her bir türün popülasyonu  $2 \times 10^7$  hücre/ml' yi geçmektedir. Bu asitlik düzeyi birçok tüketici tarafından tercih edilmektedir. Fazla asidifikasyondan kaçınmak için ürün, 2 - 4 °C' a soğutulur. Eğer bu kontrol yapılmazsa, üründe aşırı oranda keskin, ekşi bir tat gelişmekte ve protein jeli çekmeye (toplanmaya) başlayabilmektedir. Böyle bir durum serumun farklı bir tabaka olarak yoğurt yüzeyinde ayrılmasına sebep olmaktadır.

Yoğurt yapılacak süte sıcaklık uygulaması ile birlikte son ürünlerdeki düşük pH, halk sağlığı açısından yoğurdu güvenilir kılmaktadır. Çünkü bilinen patojenlerin hiçbiri pH 4,3' ün altında hayatta kalamamakta ve gelişememektedir. *L. bulgaricus'* a ait bazı suşların “ bulgarikan” isimli bir antibiyotik salgıladığı saptanmıştır. *S. thermophilus* ise bakteriyel özellikte ve düşük moleküler ağırlığa sahip bir bileşik salgılayabilmektedir. Ancak, bu bakteriyosinlerin aktiviteleri sınırlı olup etkileri, gelişen asitliğin etkisinden çok daha düşüktür (Robinson 1999).

Termofilik peynir kültürleri ise, İsviçre ve İtalyan tipi peynirlerin üretimine hizmet etmektedirler. Bunlar hızlı asit geliştiren kültürler olup, karakteristikleri ve işlevleri yoğurt kültürüne eşdeğerdir. Ancak asetaldehit üreten *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yoğun yoğurt aromasına neden olduğundan bundan kaçınmak için *L. delbrueckii* subsp. *helveticus* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ya da *L. bulgaricus'* a katılır ya da sadece bu suşlar kullanılır (Riemelt vd 1996). Bazı peynirler laktik asit bakterilerine ilaveten diğer bakteri ve küflerin metabolik aktivitesi sonucu olgunlaştırılırlar. Bu mikroorganizmalar, üründe karakteristik özelliklerin oluşumuna katkıda bulunan sekonder flora olarak adlandırılırlar. Örneğin; İsviçre peynirlerinin üretiminde *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* ve *S. thermophilus* türlerinin yanında, üründe tat ve aromanın geliştirilmesi ve karakteristik gözenek oluşumunun sağlanabilmesi için *Propionibacterium shermanii* de ilave edilmektedir (Turantaş 1998).

Süt asidi bakterileri *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterococcus* cinsleri ile kıyaslandıklarında zayıf proteolitik aktivite göstermelerine rağmen, peynir olgunlaşmasında merkezi bir role sahiptirler. *Lactococcus lactis* türünün proteolitik

sistemi detaylı araştırılmış ve açıklığa kavuşmuştur. Bu sistem hücre duvarına bağlı proteinazdan ve ortalama 8 peptidazdan oluşmaktadır. In-vitro olarak proteinazın  $\beta$ -kazeine spesifik olduğu gösterilmiştir (Riemelt vd 1996). Örneğin; olgunlaştırılmış peynirlerin fermentasyon aşamasında kullanılan kültüre göre, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* kazeinin koagülasyonu için belirli düzeyde asit üretmekte ve bu mikroorganizmaya *Lactobacillus casei* gibi diğer LAB' leri de eşlik etmektedir. Fermentasyon ilerledikçe *L. casei* dominant hale geçmekte ve çevresel koşullara göre *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* gibi diğer LAB de florada yer almaktadır (Turantaş 1998) .

## 2.2. *S. salivarius* subsp. *thermophilus*' un Özellikleri

İlk kez 1919 yılında Beijerinck ve Orlo-Jensen tarafından laktik asit bakterileri (LAB) karakterize edilmiş ve taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama daha sonraki çalışmalara ışık tutmuştur (Riemelt vd 1996). Sherman' ın 1937 yılında, streptokokların fizyolojik özelliklerine göre yaptığı sınıflamada *S. thermophilus* viridans grup içinde yer almıştır (Ünlütürk vd 1998). Daha sonra *Streptococcus* cinsi "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" kitabında; piyogenik, oral, enterokok, laktik ve diğer streptokoklar olarak 5 gruba ayrılmış, *S. thermophilus* diğer streptokoklar grubuna dahil edilmiştir (Sneath vd 1986). Nükleik asit çalışmaları ve uzun zincirli yağ asitleri esas alınarak *S. thermophilus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Farrow ve Collins 1984).

*S. thermophilus* 0,7 – 0,9  $\mu$ m çapında, yuvarlak (kok) veya oval formlu çiftler veya 10-20 hücrelik uzun zincirler halinde bulunan Gram pozitif bakterilerdir. Minimum gelişme sıcaklığı 20 °C, maksimum gelişme sıcaklığı 52 °C, optimum gelişme sıcaklığı ise 40-45 °C arasındadır. 60 °C' da 30 dk ve 75 °C' da 15 dk ısıldığında canlılığını koruyabilmektedir. Bu mikroorganizma hakiki termofil karakterde olmayıp termodurik olarak nitelendirilmektedir. 45 °C' da inkübe edilen Litmus Milk besiyerinde hızlı bir gelişme göstermektedir (Sneath vd 1986, Riemelt vd 1996, Robinson 1999).

pH 4,5-4,0' e kadar asitlik geliştirebilmekte, % 2' ye kadar NaCl' ü tolere edebilmekte ve arjininden amonyak üretebilmektedir. Kanlı agar besiyerinde *S. thermophilus* suşları zayıf hemoliz göstermektedir.

% 40 safra tuzu veya % 0,04 potasyum tellurit içeren agarlı ortamda gelişmemesinin yanında, pH 9,6 olan ortamlarda veya % 0,1 metilen mavisi içeren sütte de gelişmemekte ve tetrazoliumu indirgeyememektedir.

*S. thermophilus*' un DNA' sındaki % G+C oranı % 40 olarak belirlenmiştir. Peptidoglikan yapısı *S. faecalis* ile tamamen aynı olup peptid ünitesi içinde sırasıyla L-alanin, D-glutamin, L-lisin, D-alanin bulunmaktadır. *S. thermophilus*, diğer birkaç *Streptococcus* türü ile birlikte spesifik antijeni bulunmayan streptokoklar arasında yer almaktadır (Sneath vd 1986).

*S. thermophilus* sütte bulunan laktozu hücre membranında bulunan galaktozit-permeaz enzimi yardımıyla, hücre içinde laktozu glikoz ile galaktoza hidrolize eden  $\beta$ -galaktozidaz enziminin bulunduğu bölgeye taşımaktadır. Glikoz, Embden Meyerhof Parnas (EMP) yolu ile prüvata kadar katabolize olmakta, prüvat laktat-dehidrogenaz enzimi ile laktik aside çevrilmektedir. Bazı suşlarda galaktoz, Leloir yolu ile glikoza dönüşüp aynı şekilde katabolize olurken, *S. thermophilus*' un birçok suşunda laktik asit ile birlikte galaktoz da hücreden ayrılmakta ve ortamda birirmektedir (Robinson 1999). *S. thermophilus* glikoz, früktoz ve mannozu katabolize edebilmesine karşın galaktoz, maltoz ve sakkarozun fermentasyonu suşa spesifiktir (Sneath vd 1986).

Süt sanayinde *S. thermophilus*, yoğurt yapımı için *L. bulgaricus* ile birlikte starter kültür olarak kullanılarak yoğurda temel özelliklerini kazandırmaktadır. Yine klasik yoğurda benzeyen asidofilus yoğurdu için *Lactobacillus acidophilus* ile, bifidus yoğurdu için ise *Bifidobacterium bifidum* veya *Bifidobacterium longum* ile birlikte kullanılmaktadır. Ayrıca *S. thermophilus* tek kültür olarak veya diğer LAB' leri ile birlikte kullanılarak çeşitli peynirlerin yapımında önem kazanmaktadır. Feta, Emmental, Permesan, Swiss, Mozzarella, Provolone peynirleri bunlardan bazılarıdır (Turantaş 1998).

Starter kültürlerin antimikrobiyel özelliği laktik asit, asetik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve bilinmeyen diğer bileşenlere bağlıdır. Örneğin; *Salmonella* inaktivasyonu için laktik asit en önemli metabolittir. pH değerini 4,5-4,0' e kadar düşürebilen *S. thermophilus*, *Salmonella* inaktivasyonunda etkilidir. *S. thermophilus*' un yoğurt üretiminde 45 °C' da 5 saatlik inkübasyon süresinde ürettiği asitlikle *Listeria monocytogenes*' i de inhibe ettiği belirtilmiştir. Bunlara ilaveten *S. thermophilus*, *S. lactis*, *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus* türleri sütte gelişimleri süresince *Bacillus cereus*' un gelişimini ve spor çimlenmesini azaltabilmektedirler (Ray 1992).

Mastitis hastalığının kontrolü için yaygın olarak kullanılan penisilin, streptomisin, neomisin ve ampisilin gibi antibiyotiklere karşı *S. thermophilus*' un duyarlı olduğu bulunmuştur. 0,04 International Unit (IU) düzeyindeki az bir penisilin kontaminasyonu bile hücre duvarı gelişimini inhibe etmektedir (Robinson 1999).

Starter kültürlerin kullanımı süresince yapılan rutin pasajlar sonucunda kültürün aktivitesi, asit üretim oranı veya salgılanan tat ve aroma bileşiklerinin seviyesi değişebilmekte, genellikle düşüş kaydedilmektedir. İnküasyonun ardışık transferlerine bağlı bu değişikliklerin neden kaynaklandığı tam olarak açıklanamamıştır. Proteolitik aktivite, antibiyotik dirençliliği veya glikoproteinlerin salgılanması gibi teknolojik önemi olan karakteristiklerin kodlandığı plazmidler *Lactococcus* spp. kültürasyonları için iyi belgelenmişse de ne *L. bulgaricus*' un ne de *S. thermophilus*' un metabolik öneme sahip herhangi bir plazmide sahip olduğu gösterilememiştir (Daly vd 1996, Robinson 1999). Herman ve Mc Kay (1985) ise inceledikleri 23 adet *S. thermophilus* suşundan 5 adedinin birer küçük plazmid içerdiğini bulmuşlar, restriksiyon endonükleaz ve DNA-DNA hibridizasyon analizleri ile bu 5 plazmidin çok yakın ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Laktokoklarda yaygın olan plazmid bazlı faj direnç sistemlerinin *S. thermophilus* suşlarında bulunmamasına karşın farklı faj direnç mekanizmalarının olduğu kabul edilmektedir. Benbadis ve arkadaşlarının 1991' de yaptıkları çalışmada restriksiyon / modifikasyon (R/M) sistemlerinin varlığı, çeşitli tip II restriksiyon endonükleazların saflaştırılması ve karakterizasyonu ile desteklenmektedir. 42 °C' da en yüksek aktiviteyi

gösteren bu enzimlerin, laktokokal restriksiyon endonükleazlar, ScrFI ve LlaI, gibi aynı temel tanıma sekanslarına sahip oldukları ve bu nedenle izoşizomer oldukları bildirilmiştir. Larbi ve arkadaşları ise 1992'de *S. thermophilus* NST3 ve NST5 suşlarında farklı faj savunma sistemleri bulmuşlardır. Bu sistemlerin R/M aktivitelere ve Abortif enfeksiyona bağlı olabileceğini ve 30 °C' da gelişme sırasında etkilerinin oldukça azaldığını bildirmişlerdir (Neve 1996). Sebastiani ve Jäger (1993) inceledikleri 6 adet *S. thermophilus* suşunda 5 adedinin GATC sekansındaki sitozini metilleyen R/M sistemine sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu sisteme göre GATC sekansındaki sitozin metilazlar tarafından 5-metil sitozine metillenerek modifiye edilmektedir.

Moineau vd (1995) 3-GATC-5 sekansını tanıyan ve kesen, laktokokal plazmidde kodlu *Lactococcus lactis* LlaII R/M sisteminin *S. thermophilus*' a aktarılmasını ve bu yolla fajlara duyarlı *S. thermophilus* suşlarına dirençlilik kazandırmayı amaçlamışlardır. 78 kb büyüklüğündeki laktokokal plazmid, pSRQ700, faja duyarlı *L. lactis* suşuna aktarıldığı zaman LlaII sistemi tarafından kuvvetli bir faj direnci sağlanmıştır. Ancak bu çalışmada, pSRQ700 laktokokal plazmidin *S. thermophilus* üzerinde replike olmadığı gösterilmiştir. Bunun üzerine LlaII genleri, hem *L. lactis* hem de *S. thermophilus*' da replike olabilen pNZ123 taşıyıcı vektör üzerine klonlanmıştır. Bu vektör *S. thermophilus* suşlarına aktarılarak doğal LlaII sistemi ifade edilmiş ve çeşitli yoğurt ve Mozzarella peynir altı sularından izole edilen fajlara karşı kuvvetli faj dirençliliği sağlanmıştır.

### **2.3. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ve Fajları Arasındaki Konakçı İlişkileri**

#### **2.3.1. Litik yaşam çemberi**

Litik yaşam çemberi; fajın konakçı bakteride, duyarlı yüzeye (hücre duvarına) kuyruk bölgesinden adsorbsiyonu ile başlamaktadır. Oldukça spesifik olan bu olay, konakçı hücre duvarında uygun faj reseptörlerinin varlığına bağlıdır. Konakçı hücreye adsorbsiyondan sonra fajın kapsid içindeki DNA' sını kuyruktan geçerek bakteriyel hücreye enfekte olur. Boş kapsid bir süre hücre yüzeyinde kalır ve daha sonra bağlandığı yerden ayrılır. DNA' nın bakteriyel hücreye enfekte olmasından

(penetrasyon) sonra normal bakteriyel metabolizma durur ve üçüncü aşama olan latent dönem başlar. Fajlara göre değişmekle birlikte, bu dönem başlıca iki evreden meydana gelmektedir. Birincisi, hiçbir olgun faja rastlanılmadığı ve latent periyodun ilk yarısını teşkil eden eklips evresi, ikincisi ise sentezlenen faj komponentlerinin birleştirilerek olgun faj partiküllerinin meydana getirildiği olgunlaşma evresidir. Birinci evrede, yeni faj DNA moleküllerinin sentezi (DNA replikasyonu) için gerekli enzimler ve yeni faj proteinleri (erken proteinler) sentezlenir. Olgunlaşma evresinde ise fajın baş, kuyruk, bazal taban plağı, fibril gibi diğer komponentlerinin (geç proteinler) sentezleri tamamlanır. Yeni sentezlenmiş faj DNA' ları kapsid içinde paketlenerek komponentler birleştirilir ve olgun enfektif faj partikülleri meydana getirilir. Dördüncü ve son aşama, konakçı bakteriyel hücrenin lizisidir. Litik döngü, konakçı hücre duvarının faj lisini ile lize olmasıyla tamamlanmaktadır. Yeni faj partikülleri ortama salınırlar ve sağlam bakteri hücrelerine yapışmak suretiyle litik yaşam çemberini tekrar ederler (Tunail ve Köşker 1989, Arendt vd 1993, Neve 1996, Arda 1997).

Fajın replikasyonu (kopyalarının çıkması) çevresel parametrelerden (ör; pH ve sıcaklık) ve konakçı hücrenin şartlarından (ör; kültürün gelişme aşaması) etkilenebilir. Genel olarak, faj replikasyonu için uygun olan optimum sıcaklık, konakçı suş ile aynıdır. Restriksiyon / Modifikasyon (R/M) sistemleri veya abortif enfeksiyon (Abi) mekanizmaları da ayrıca konakçı hücrede faj gelişmesinde etkilidir (Neve 1996). Faj çoğalması; konakçı hücrenin faj replikasyonu ve hücre lizisinde etkili olan maddeleri yeterli oranda içermesine ve elektrolit kapasitesine bağlıdır (Arendt vd 1993). *S. thermophilus* fajı replikasyon için  $Ca^{++}$  iyonlarına mutlak ihtiyaç göstermesinin yanında, ortamdaki  $Ca^{++}$  iyonlarının konsantrasyonu bakteriyel alanda oluşacak plak büyüklüğü ve plak sayısını da etkilemektedir (Reinbold ve Reddy 1973).

Enfeksiyona uğrayan her bir bakteriden salınan serbest faj sayısına patlama büyüklüğü denmektedir. *S. thermophilus* virulent fajı için patlama büyüklüğünün 34 partikül, latent periyodun ise 80 dk. olduğu belirtilmiştir (Cibilis 1970). Bruttin ve Brüssow (1996) genomda meydana gelen site-spesifik (bölgeye özel) spontan delesyonların (kopmaların) litik çoğalma üzerine etkisini tek adım (one-step) gelişme deneyleri ile değerlendirmiştir. *S. thermophilus* wt fajı için eklips periyodunu 30 dk, meydana çıkış periyodunu 20 dk, patlama büyüklüğünü ise yaklaşık 170 (140-200) partikül

bulmuşlardır. Sfi 21 *S. thermophilus* temperent fajının genomunda meydana gelen kopmalarla oluşan tüm varyant (mutant) fajlar litik olarak çoğalabilmiştir. Bu varyantlar wt litik faj ile kıyaslandıklarında; eklips periyotlarının değişmemesine karşın patlama büyüklüğünde düşüş görülmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada ise *S. thermophilus* Sfi 19 virulent fajının lisini ile *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BK5-T fajı ve *Streptococcus pneumoniae* Dp-1 fajı lisinlerinin benzer olduğu açıklanmıştır (Desiere vd 1998).

### 2.3.2. Lizogenik yaşam çemberi

Fajın adsorpsiyonu ile faj genomunun penetrasyonu, litik döngü ile benzer olmasına rağmen lizogenik döngüde faj çoğalması yerine, bakteriyel kromozoma entegrasyon söz konusudur. Bu birleşme, faj entegraz enzimleri tarafından katalize edilmekte ve spesifik ya da spesifik olmayan faj-konakçı DNA bölgelerinde meydana gelmektedir. Buna göre faj genomu hücreye enjeksiyondan sonra attP (faj genomu üzerinde, faj tutunma bölgesi) ve attB (bakteriyel konakçı DNA' sı üzerinde, bakteriyel tutunma bölgesi) olarak adlandırılan 2 bölge arasındaki rekombinasyon ile bakteriyel kromozoma entegre olmakta, sonuç olarak konakçıda liziz görülmemektedir. Bakteri genomuna entegre olmuş faj formu profaj olarak tanımlanmaktadır. Profaj, bakteriyel DNA ile aynı zamanda replike olarak lizogenik hücrelerin nesline neden olmaktadır. Bakteriyel hücre lizizine neden olmayan bu tür fajlara temperent fajlar denilmektedir (Arendt vd 1993, Neve 1996). Laktik asit bakterilerine ait lizogenik suşların izolasyonu ilk kez 1949' da Reiter tarafından gerçekleştirilmiştir (Davidson vd 1990).

Duyarlı *S. thermophilus* hücrelerinin (SFi 21, W3, SFi 1) SFi 21 fajı ile enfeksiyonundan sonra, enfeksiyonun ilk 6 saati boyunca gelişme gözlenmemiştir. Bundan sonra hücrelerin gelişmesi yeniden başlamıştır. Genel olarak lizogeni konakçı hücreye immünite kazandırarak çok yakın ilişkili fajlar tarafından hücrenin enfekte olmasını (süper enfeksiyon) engellemektedir. Lizogen bağışıklık olarak adlandırılan bu durum faj direnç mekanizmalarından biri olarak da kabul edilmektedir (Sanders 1988, Sebastiani ve Jäger 1993, Brüssow ve Bruttin 1995, Neve 1996).



Profajın konakçı kromozomundan ayrılması ve bunu takiben temperent fajın serbest kalması ya spontan olarak ya da yüksek sıcaklık uygulaması ile, UV ışığıyla indüksiyon veya mitomisin C (MC) gibi mutajenik ajanlarla muamele yoluyla görülmektedir. Örneğin, *S. thermophilus* suşunun gelişme sıcaklığı 40 °C' dan 45 °C' a çıktığı zaman bazı lizogenik suşlar lize olmaktadır (Neve 1996). Fayard vd (1993) 120 *S. thermophilus* suşu ile yapmış oldukları indüksiyon çalışmasında indüksiyonu 0,2 µg/ml MC konsantrasyonu ile sağlamışlardır. Konakçı hücreden serbest hale geçen temperent fajlar relizogenize olabildikleri gibi indikatör suşlar olarak tanımlanan duyarlı suşlar üzerinde virulent faj olarak da çoğalabilmektedirler (Neve 1996).

Fayard vd (1993) indüksiyon çalışmaları sırasında 120 *S. thermophilus* suşundan 12' sinin lizogen olduğunu saptamışlardır. Başlangıçta faj lizizi sadece sıvı içerisinde görülmüş, MC lizatları katı ortamda indikatör suşlar üzerinde denendiği zaman plak oluşturmamışlardır. Buna karşın, sıvı ortamda bir pasajdan sonra 5 temperent faj (0701, 01358, 01598, 01599 ve 01601) indikatör suşlar üzerinde liziz plakları oluşturma kabiliyeti göstermiştir.

Teuber ve Lembke (1983) de, genel olarak elektron mikroskopunda görülen laktik streptokoklara ait faj partikülleri için duyarlı indikatör bakteri bulmanın zorluğuna dikkat çekmişlerdir. Diğer taraftan Jarvis (1989), laktik streptokoklara ait temperent fajlara uygun indikatör suşların bulunmasında genel olarak elde edilen düşük başarı oranlarını, elektron mikroskobu ile incelenen fajların kusurlu olabilecekleri ve bu nedenle indikatör suşlarda replike olamadıkları şeklinde yorumlamıştır. Buna karşın indikatör suşların temperent fajlara karşı duyarlı olmama olasılığını da göz ardı etmemiştir.

Faj-konakçı spesifikliği çalışmaları sırasında da lizogenik suş tarafından barındırılan profajın MC ile indüksiyonundan hemen sonra, doğal temperent fajları replike edebilen çok az sayıda indikatör suş bulunmuştur. Daha detaylı çalışılan 7 temperent faj, indikatör sušta çoğaldıktan sonra 120 *S. thermophilus* suşuna denenmiş ve 44 suşa (% 37) etkili bulunmuştur (Fayard vd 1993). Temperent fajlar kendi indikatör konakçılarında çoğaldıkları zaman DNA restriksiyon profilleri farklı bulunmuş fakat

DNA büyüklüğünde önemli bir farklılık saptanmamıştır. Bu çalışmaların sonucunda doğal temperent fajın indüksiyon sonrası kendi indikatör suşu içerisindeki pasajının, faj özelliklerini ve davranışlarını etkilediği görülmektedir.

Temperent ve litik *S. thermophilus* fajları arasındaki benzerliğin veya farklılığın araştırıldığı tüm çalışma sonuçlarından, bunlar arasında yakın bir ilişkinin varlığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Davidson vd 1990, Fayard vd 1993, Brüssow ve Bruttin 1995). *S. thermophilus*' a ait temperent fajların da virulent fajlar gibi hegzagonal yapıda izometrik başa, esnek (kontraktıl olmayan) kuyruğa, bazal taban plağı ve değişen uzunlukta fibrile sahip oldukları gösterilmiştir (Fayard 1993, Sebastiani ve Jäger 1993, Brüssow vd 1994). Bu durumda tüm *S. thermophilus* fajları Bradley' in B grubuna veya Ackermann' ın *Siphoviridae* familyasına aittir.

*S. thermophilus* suşlarında lizogeni çok yaygın olmamakla birlikte (Brüssow vd 1994, Neve 1996) yapılan çalışmalar çok farklı sonuçlar vermiştir. Smaczny, hepsi çiğ süttten izole edilerek incelenen 24 suş arasından 6 adet indüklenebilen lizogenik suş bulmuştur (% 25) (Fayard vd 1993). Neve vd' nin 17 suştan 2 tanesinin lizogen olduğunu göstermelerine karşın (% 12) Carminati ve Giraffa 45 adet *S. thermophilus* suşu arasından sadece 1 adet MC ile indüklenebilen lizogenik suş elde edebilmişlerdir (% 2) (Fayard vd 1993). Fayard vd (1993) 120 *S. thermophilus* suşundan 12' sinin MC ile muameleden sonra lizogenik olduğunu bulmuştur (% 10). Brüssow vd (1994) 100 adet *S. thermophilus* starter suşundan 2 adedinin lizogen olduğunu belirtmişlerdir (%2). Brüssow ve Bruttin (1995) test edilen 196 *S. thermophilus* suşundan sadece 3 adedinin (% 1,53) lizogen olduğunu göstererek suş kolleksiyonlarında lizogeninin seyrek bir fenomen olduğunu savunmuşlardır. Bu farklılıkların, suşların çeşitliliğinden veya değişik araştırmacılar tarafından kullanılan metodlardan ileri geldiği düşünülmektedir (Fayard vd 1993).

#### **2.4. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Fajları**

Bakteriyofaj veya faj olarak adlandırılan bakterilere özgü virüsler, yaklaşık 80 yıl önce tanımlanmalarına karşılık (Prescott vd 1993), *S. thermophilus* fajı ilk kez 1952 yılında Pette ve Kay tarafından gösterilmiş (Rasic ve Kurmann 1978), *S. thermophilus* fajının

elektron mikrografları ve ölçüleri ise ilk kez Deane ve arkadaşları tarafından 1953' te yayınlanmıştır (Deane vd 1953). Kısa bir süre sonra 1955' de Kiuru ve Teybeck Finlandiya' da İsviçre tipi peynirlerin yapımında kullanılan starter kültürlerden *S. thermophilus* yanında *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *helveticus*' u lize eden fajları da izole etmişlerdir (Reinbold ve Reddy 1973, Sechaud vd 1988, Fayard vd 1993).

Değişik bakteri türlerine ait 3400 faj, elektron mikroskobu ile incelenmiş ve genel olarak Bradley ve Ackermann sınıflarına göre taksonomileri yapılmıştır. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajları ile yapılan morfolojik çalışmalar bir süre sınırlı kalmış ancak 1980' lerin ikinci yarısında hız kazanmıştır (Kivi vd 1987, Krusch vd 1987, Neve vd 1989, Benbadis vd 1990). Peynir veya yoğurt yapımı boyunca asidifikasyon zorlukları nedeni ile izole edilen ve bugüne kadar çalışılan tüm fajlar nispeten homojen bir grup oluşturmaktadır. Yapılan bu çalışmalar ışığında *S. thermophilus* için Ackermann' ın *Siphoviridae* familyasına veya Bradley' in B grubuna ait olan baskın bir morfotip bulunmuştur. Reinbold ve Reddy (1973) çeşitli peynir işletmelerinden alınan örneklerden *S. thermophilus* fajı izolasyonu sırasında faj plaklarının elde edilmesindeki zorluklar nedeniyle izolasyonun her zaman gerçekleşmediğini belirtmişlerdir. Ancak daha sonraki çalışmalarda böyle bir zorluktan bahsedilmemektedir (Krusch vd 1987, Benbadis vd 1990, Sebastiani ve Jäger 1993).

Krusch vd (1987) İsviçre' den (10 faj), Almanya' dan (28 faj) ve Fransa' dan (21 faj) olmak üzere, birçok yoğurt ve İsviçre tipi peynir örneklerinden elde edilen toplam 59 faj toplamışlar ve fajların morfolojilerini elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. İncelenen fajlarda izometrik baş (48-63 nm), kontraktil olmayan çeşitli uzunluklarda (213-265 nm) ve kalınlıklarda (10-12 nm) kuyruk yapısı ile küçük taban plağı görülmüştür. Yaka benzeri yapıları rastlanmazken, bazen tek bir uzun ve ince kuyruk fibrilli görülmüştür. Bu özellikleri ile fajların Bradley' in B grubunda yer aldıkları bildirilmiştir.

Neve vd (1989) tarafından elektron mikroskobu ile incelenen 12 *S. thermophilus* virulent fajın, 60-65 nm çapında izometrik bir baş, 222-290 nm uzunluklarında ve 10 nm çapında, kontraktil olmayan kuyruk ile karakterize oldukları ve aynı temel

morfolojiyi gösterdikleri bildirilmiştir. Kuyruk uçlarında, üzerinde eşit uzaklıklarda en az 3 nodül (yumru) bulunan uzun bir kuyruk fibriline sıkça rastlanmıştır. Kivi vd (1987) ise Finlandiya peynir işletmelerinden izole edilen 9 adet *S. thermophilus* fajı ile yaptıkları elektron mikroskopisi çalışmaları sonucunda bu 9 fajın hepsinin aynı morfolojik tipe sahip olduğunu, buna göre fajların Bradley' in B grubunda veya Ackermann sınıflamasına göre *Siphoviridae* familyasında yer aldıklarını belirtmişlerdir. Benbadis vd (1990) çalıştıkları 7 *S. thermophilus* virulent fajı temsilen 2 tanesinin ( $\phi$  57 ve  $\phi$  17) morfolojilerini incelemişler ve her ikisinin de ikosahedral baş ve kontraktıl olmayan kuyruk yapıları ile Bradley' in B grubuna girdiğini belirtmişlerdir. Ancak baş büyüklükleri (42 ve 49 nm) Krusch vd (1987) tarafından ölçülen baş büyüklüklerinden (50-70 nm) daha küçük bulunmuştur. Her iki fajda da kuyruğun başa tutunduğu noktada tapa benzeri bir yapı görülmüştür.  $\phi$  57 fajında ise kuyruk ucunda merkezi bir kuyruk fibrili gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada da farklı litik gruplara ait olan 24 *S. thermophilus* fajı elektron mikroskobu ile incelenmiş ve hepsi de Bradley' in B grubuna dahil edilmiştir (Brüssow vd 1994). Fayard vd (1993) ise 12 *S. thermophilus* temperent fajını mitomisin C indüksiyonunu takiben rutin konakçılarında çoğalttıktan sonra araştırmışlardır. Hegzagonal yapıda izometrik başa (45-65 nm çapında), esnek kontraktıl olmayan kuyruğa (220-245 nm boyunda), bazal taban plağı ile değişen uzunluklarda kuyruk fibriline sahip olan temperent fajların da virulent fajlar gibi Bradley' in B grubunda veya Ackermann' in *Siphoviridae* familyasında sınıflandırılabilceği bildirilmiştir. Neve (1996) de, tüm *S. thermophilus* virulent ve temperent fajların aynı morfolojik yapıyı gösterdiğini belirtmiştir. Sonuç olarak, mezofilik laktik streptokokların (laktokokların) çeşitli morfolojik farklılıklar ve değişik faj tipleri göstermelerinin aksine, termofilik streptokoklarda tek bir morfolojik tip bulunmuştur (Krusch vd 1987).

*S. thermophilus* fajlarının genetik materyal olarak çift zincirli DNA' ya sahip oldukları ve bu DNA' daki G+C oranının % 30-40 arasında değiştiği gösterilmiştir (Kivi vd 1987). *S. thermophilus* virulent fajlarının genom büyüklükleri üzerine yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda, genom büyüklüklerinin 30-44 kb arasında değiştiği ve genellikle 38 kb' ın altında olduğu bildirilmiştir (Kivi vd 1987, Neve 1989, Benbadis vd 1990,

Sebastiani ve Jäger 1993). Neve vd (1989) tarafından genom büyüklükleri 40 kb' ın üzerinde bulunan P6 ve P8 fajları istisna olarak kabul edilmiş ve farklı bir grupta sınıflandırılmıştır.

Neve vd (1989) 12 adet *S. thermophilus* virulent faj ile yaptıkları çalışmalarda fajların hepsinde homolog DNA bölgeleri bulmuşlar, ancak homoloji oranının ve fragmentlerinin farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Benbadis vd (1990) ise 7 adet *S. thermophilus* virulent fajını, hibridizasyon çalışmaları ve yapısal proteinlerin analizleri ile 2 gruba ayırmışlardır. Bu 2 grubun temsilcileri ile Neve vd (1989)' nin grup temsilcilerini hibridizasyon çalışmaları ile karşılaştırmışlar ve fajların değişen oranlarda ilişkili olduklarını göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucuna göre laktokokal fajlar için var olan durumdan farklı olarak (Mata ve Ritzenthaler 1988) karşılaştırılan tüm *S. thermophilus* fajlarının tek bir DNA homoloji grubuna ait olduğu ve muhtemelen temel bir atadan türedikleri gösterilmektedir. Brüssow vd (1994) yine benzer bir çalışmada tüm kolleksiyonlarındaki *S. thermophilus* fajlarının, *S. thermophilus* virulent fajı  $\phi$  S1 ile hibridize olduğunu bildirmiş, sonuç olarak da *S. thermophilus* fajlarının DNA homojisini paylaştıklarını ve genetik olarak ilişkili olduklarını göstererek Benbadis vd (1990)' ni doğrulamıştır. Birçok araştırmacı (Mata ve Ritzenthaler 1988, Neve vd 1989) DNA/DNA hibridizasyon ve temel protein analizleri ile elde edilen faj sınıflaması arasında temel bir korelasyon olduğunu vurgulamaktadır.

Krusch vd (1987) İsviçre, Fransa ve Almanya' daki yoğurt ve İsviçre tipi peynir örneklerinden elde edilen 90'dan fazla *S. thermophilus* fajı ve 70' ten fazla *S. thermophilus* suşunu kullanarak konakçı spesifiklerini incelemişlerdir. Genelde, farklı ülkelerden gelen fajlar, farklı konakçı alanı göstermişler ve birkaç faj/konakçı sistemi dışında diğer ülkelerden izole edilen konakçı bakteriler üzerinde replike olmamışlardır. Elektron mikroskobu ile yapılan morfoloji çalışmaları sonucunda elde edilen tekdüzelige karşın, ilginç bir ülke orijin-spesifik konakçı alanı gözlemlenmiştir. Fransa, İsviçre ve Almanya' dan elde edilen faj ve streptokokal materyalde gözlenen kesin faj-konakçı spesifikliği, bu coğrafik bölgelerin her birinin yoğurt ve peynir üretimi sırasında diğer bölgelerde kullanılanlardan daha farklı, spesifik termofilik streptokokların kullanımı ile açıklanmıştır. Krusch vd (1987)' ne göre bundan dolayı süt

ürünlerinin üretildiği işletmelerde faj havuzunun sadece ülkeye özel streptokokal suşlara karşı geliştirilebileceği ileri sürülmüştür.

Fajların konakçı spektrumları üzerine diğer bir çalışma da Kivi vd (1987) tarafından yapılmıştır. Finlandiya peynir işletmelerinden izole edilen 9 adet *S. thermophilus* fajı, 6 adet starter kökenli *S. thermophilus* suşuna karşı denenmiş, *S. thermophilus* fajlarının homolog ve heterolog konakçıları üzerine adsorbsiyonu ve plak oluşturma etkinliği incelenmiştir. Konakçı-faj kombinasyonlarına bağlı olarak farklı suşlar farklı fajlar için değişen etkenlikle konakçı olarak davranmışlardır. Fajlar ve homolog konakçıları Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Finlandiya peynir işletmelerinden izole edilmiş olan *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajları ve homolog konakçıları

Faj kodu	F <sub>Ku</sub> 101	F <sub>Y</sub> 101	F <sub>A</sub> 101	F <sub>K</sub> 10	F <sub>K</sub> 11	F <sub>Ko</sub> 74	F <sub>Lo</sub> 140/76	F <sub>Lo</sub> Ths	F <sub>E</sub> Ths
Konakçı kodu	101	101	101	10	11	74	140/76	Ths/41	Ths/41

F<sub>Ku</sub> 101, F<sub>Y</sub> 101, F<sub>A</sub> 101, F<sub>K</sub> 11, F<sub>Lo</sub> Ths ve F<sub>E</sub> Ths fajları kendi homolog konakçılarına etkili olmuşlardır.

F<sub>K</sub> 10 ve F<sub>Ko</sub> 74 fajları birbirleri ile benzer olup sadece kendi ve birbirlerinin konakçılarına değil 101 suşuna da etkili olmuşlardır.

F<sub>Lo</sub> 140/76 kendi homolog konakçısı yanında heterolog olan 101 suşuna ve daha az oranda 74 ve 10 suşlarına da etkili olmuştur.

Görüldüğü üzere starter suşlarının hepsi sadece homolog değil heterolog fajları da adsorbe etmişlerdir. Ths/41 suşunun ise konakçı-faj reaksiyonunda homolog fajla en çok sınırlı kalan suş olduğu görülmüştür.

Sebastiani ve Jäger (1993) de *S. thermophilus* fajlarını konakçı alanına göre 3 alt gruba ayırmıştır. Buna göre;

Grup 1' deki P<sub>106</sub> ve P<sub>1231</sub> fajları sadece 106 ve 1232 suşlarına etkili bulunmuştur.

Grup 2' deki P<sub>1304</sub> ve P<sub>1314</sub> fajları kendi konakçıları olan 1304 ve 1314 suşları yanında birbirlerinin konakçıları da enfekte edebilmektedirler.

Grup 3' teki P<sub>T19</sub> ve P<sub>T51</sub> fajları ise 106, 1232, 1304 ve 1314 suşlarına karşı hemen hemen hiç liziz göstermemektedirler. Bu grubun konakçıları olan 19 ve 51 suşları diğer fajlara karşı dirençlilik göstermektedir.

Fajların konakçı alanı ile restriksiyon enzim profilleri arasında, genel olarak iyi bir korelasyon bulunmuş ve yapılan sınıflama bu korelasyon ile desteklenmiştir. Özellikle P<sub>1304</sub> ve P<sub>1314</sub> fajları Hind III ile kesildikten sonra çok benzer restriksiyon fragment profilleri göstermişler ve diğer fajlardan açıkça ayrılmışlardır.

Neve vd (1989) tarafından 12 *S. thermophilus* virulent fajı konakçı spesifikliğine göre ayrılmıştır. Bu grupta farklı konakçı spesifikliği gösteren 8 faj bir grup içinde toplanırken, aynı konakçı spesifiklikleri gösteren 2 faj çifti de diğer 2 gruba oluşturmuştur. Buna göre, DNA homoloji testlerine göre farklı gruplar içinde yer alan P6 ve P8 ile a10/9 fajları konakçı spektrumuna göre aynı grup içinde yer almışlardır. Neve vd (1989) de genel olarak faj-konakçı ilişkileri ile restriksiyon enzim fragment profilleri arasında bir korelasyon bulmuşlardır. Buna karşılık benzer fakat aynı olmayan konakçı alanına sahip olan P<sub>53</sub> ve P<sub>55</sub> fajları benzer restriksiyon fragment profilleri göstermişlerdir. Bunun yanında, her iki fajın da farklı konakçı alanı göstermesine karşın 71/45 ve 124/44 fajları restriksiyon analizlerine göre ayıramamışlardır. Farklı olarak litik spektrumu aynı olmasına karşın 50/34 ve 124/44 fajlarının DNA' ları için farklı restriksiyon fragment profilleri bulunmuştur.

Benbadis vd (1990) DNA homoloji gruplaması ile konakçı alanı arasında tam bir korelasyon eksikliğinin bulunduğunu savunmaktadırlar.  $\phi$  57 ve  $\phi$  11 fajlarının DNA homoloji özelliklerine göre farklı alt gruplarda yer almalarına karşın her ikisi de *S. thermophilus* BSN 1 suşuna etkili olabilmektedir. Bunun yanında  $\phi$  15,  $\phi$  29 ve  $\phi$  57 fajları aynı DNA homoloji alt grubunda sınıflandırılmalarına karşın tamamen farklı bir konakçı spesifikliğine sahiptirler. Benbadis vd (1990) de daha önce Mata ve Ritzenthaler (1988) tarafından belirlendiği gibi, konakçı alanının faj sınıflaması için güvenilir bir kriter olmasına karşın endüstriyel bakteriyel suşların klasifikasyonu için geçerli olduğunu kabul etmektedirler.

Fajlarda konakçı özgülükleri; R/M sistemleri, faj mutasyonları, almaç bölge değişimleri ve faj proteinlerinin modifikasyonları gibi nedenlerle değişime uğrayabilmektedir (Akçelik 1996).

## 2.5. Faj Enfeksiyonunun Önlenmesi İçin Önlemler

Süt işletmelerinde fermentasyon bozukluklarına, dolayısıyla ürün kaybına sebep olan fajların kaynağını kesin olarak göstermek zordur. Lembke ve Teuber (1981) yaptıkları çalışmalarıyla faj kontaminasyonunda çiğ süt ve orijinal starter kültürlerin zayıf bir kaynak olduğunu, buna karşılık işletmede hazırlanan starter kültürde, peyniraltı suyunda salamurada ve süt ürünlerinde düzenli olarak yoğun faj kontaminasyonları belirlendiğinden, bu substratların esas kaynağı oluşturduğunu ileri sürmektedirler. Ayrıca peynir baskılama bezleri yanında salamura sularında  $10^3$  pfu/ml ve havada ise  $10^3$  pfu/m<sup>3</sup> ten fazla faja rastlanması, peynir ustalarının önlüklerinde faj titresinin oldukça yüksek oluşu ve yıkanmayan ellerde fajların  $7 \times 10^4$  pfu/ml olarak bulunması üretim esnasında substratla temasa geçildiğinde personel, ekipmanlar ve havanın primer faj enfeksiyon kaynakları olduğunu göstermektedir. Reinbold ve Reddy (1973)' de faj izolasyon materyali olarak yoğurt, İsviçre peyniri, yumuşak peynir ve Gorgonzola üretimi süresince alınan peyniraltı suyu örneklerini kullanmışlardır. Bunların yanında işletmedeki havadan ve ekipmandan da faj izole etmişlerdir. Neve (1996) ise çiğ süttten ara sıra faj izole etmişse de çiğ süttü önemli bir faj kaynağı olarak görmemektedir. Tunail vd (1998) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fajlarının izolasyonu için kullandıkları 95 çiğ süt örneğinden 24 çiğ süt izolatına karşı faj izolasyonunu başaramamışlardır. Oysa *S. thermophilus* fajları tembel fermentasyon gösteren bulk kültürden, oluşumu geciken yoğurtlardan ve yoğurt sularından kolaylıkla izole edilebilmiştir (Durlu Özkaya vd 1999).

Fayard vd (1993)' ne göre ise faj saldırılarına karşı gerektiği kadar önlem alınmayan süt ürünleri işletmelerinde, fajların görülmesi ve yayılmasında lizogenik suşlar hayati bir role sahiptir. Lizogenik starterlerin potansiyel kaynak olduğu görüşü Brüssow vd (1994) tarafından da desteklenmektedir. Ayrıca yoğurt starterinden izole edilen bazı *S. thermophilus* temperent fajlarının, yoğurt fermentasyonlarından izole edilen litik fajlarla



genetik açıdan yakın ilişkili olduğu ve bazı *S. thermophilus* virulent fajların, genomlarında spontan kopmalarla temperent fajlardan meydana gelmiş olabileceği belirtilmektedir (Bruttin ve Brüssow 1996). Bununla beraber laktik asit bakterilerinde (LAB) lizogeninin oldukça yaygın olmasına karşılık, *S. thermophilus* suslarında lizogeniye, laktokoklara ve laktobasilere oranla daha ender rastlanmaktadır (Sechaud vd 1988, Brüssow vd 1994, Neve 1996).

Faj enfeksiyonlarının doğurduğu tehlikeyi mümkün olduğu kadar seyrek ve dar sınırlarda tutmak için hijyen önlemlerini almak temel kuraldır. Bulk kültür tanklarının dizaynı, kullanılan alet ve ekipman için doğru bir yerleşim planı ve etkili sanitasyon uygulaması ile faj gelişimini büyük oranda inhibe etmek mümkündür (Lawrence 1978). Bu amaçla, starter üretim ünitesinin diğer proses alanlarından uzakta olması, ayrı bir bölüme alınması, 0,1 bar pozitif basınç altında tutulması ve ortam havasının faj tutan filtrelerle sterilize edilmesi gereklidir. Kültür tankları dezenfektanların kullanımına dayanlı materyalden uygun şekilde dizayn edilmeli ve starter hazırlama tankı maksimum kapasitede doldurularak üst kısımda boşluk bırakılmamalıdır. Üretimden önce tüm üretim ekipmanı (starter tankları, proses tankları, akım sistemi, proses tekneleri) esaslı bir şekilde temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir (Smaczny ve Krämer, 1984). Perasetik asit ve aktif klor fajlara karşı en etkili dezenfektanlardır (Lembke ve Teuber 1981). İşletmedeki personelin hijyenine de önem verilmelidir. Laktik asit bakterileri fajlarının pek çoğu pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olduğundan kültür hazırlamada kullanılacak süt, en az 90 °C' da 30 dak. ısıtılmalıdır (Riemelt vd 1996).

Tasarım ve sanitasyona ilişkin alınacak önlemlerin yanında, bulk starter hazırlarken faj inhibe eden ortamların (PIM) kullanımı da etkilidir. PIM, laktik asit bakterileri fajlarının çoğunda konakçı hücre yüzeyine adsorbsiyon için gerekli olan  $Ca^{++}$  iyonlarını bağlayan fosfat veya sitrat içermektedir (Lawrence 1978, Sandine 1979, Daly vd 1996, Neve 1996, Riemelt vd 1996). Bu besiyeri ABD' deki peynir fabrikalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Daly vd 1996). Ancak  $Ca^{++}$  iyonu eksikliğinde bazı laktik asit bakterilerinin gelişimi özellikle *Leuconostoc*' ların gelişimi yavaşladığından ortama amonyum ve sodyum fosfat tuzları gibi gelişmeyi teşvik edecek maddelerin konulması

önerilmektedir (Sandine 1979, Neve 1996). Diğer taraftan bazı laktik asit bakteri fajlarının adsorbsiyon için  $Ca^{++}$  iyonuna gereksinim duymadıkları da bilinmektedir (Sandine 1979). Sozzi vd (1976) yaptıkları çalışmalarında, Reinbold ve Reddy (1973)'nin bulgularının aksine bazı *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. lactis* ve *S. thermophilus* suşlarına ait fajların  $Ca^{++}$  iyonuna gereksinim duymadan üreyebildiklerini göstermişlerdir.

İşletmede kullanılacak starterin üretiminde, proses sütüne direkt aşlamayı olanaklı kılacak kültürlerin kullanılması da etkili olmaktadır. Bu durumda fajların seri inokülasyonlar sonucu çoğalması önlenemez, sayıları sınırlanacaktır (Lawrence 1978, Sanders 1988, Riemelt vd 1996). Starter kültürün seçimi ve kullanımı da faj kontrolünde en önemli unsurlardan biridir. Starter kültür olarak özellikleri tam olarak bilinen bakterilerden oluşan miks (karışık) kültürün seçimi uygundur (Lawrence 1978, Sanders 1988, Daly vd 1996). Ancak böyle bir kültürün kullanılması durumunda lizogen olmayan, faja dirençli ve faj duyarlılık profilleri farklı suşlar seçilmelidir ki suşlardan birinin faj atağı ile lizisi durumunda diğer, faj akrabalığı olmayan suş fermentasyonu yürütebilsin (Möller ve Teuber 1988).

Faj kontrolünde kullanılan en etkin yöntem rotasyon sistemidir. Bunun için işletmede faj düzeyi sürekli kontrol edilmeli, işletmeye yerleşen dominant fajlara karşı test edilen ve dirençli bulunan suşlar rotasyonla devreye sokulmalıdır (Sandine 1979, Sanders 1988, Daly vd 1996). Faj ataklarının yaşandığı dönemde, işletmedeki faj popülasyonunun belirlenmesi ve dominant yerel fajlara karşı çeşitli yoğurt starter kültürlerinin duyarlılığı test edildikten sonra rotasyona sokulması, rotasyon konusunda kültür üreten firmaların bildirimlerine fazlaca itibar edilmemesi önemli görülmektedir (Tunail vd 2000).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Faj izolasyon materyali

Süt ve ürünlerini işleyen çeşitli işletmelerden sağlanan 19 adet çiğ süt, 15 adet bulk (kütle) starter, 9 adet kaşar ve beyaz peynir pıhtı serumu (peyniraltı suyu = PAS), 7 adet yoğurt ve 3 adet ayran olmak üzere toplam 53 örnek, faj izolasyon materyali olarak kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada A.Ü.Z.F. Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Biriminde yürütülmekte olan TÜBİTAK/TARP-2106 nolu proje kapsamında Türkiye' nin değişik bölgelerine ait çiğ süt örneklerinden K.Ayhan ve F.Durlu Özkaya tarafından izole edilen ve tanımlanan 30 adet doğal (yerel) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) suşu (Tunail vd 1998) ile ticari liyofilize miks yoğurt kültürlerinden bu çalışma içinde izolasyonları yapılan 9 adet *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşu kullanılmıştır. Kullanılan yoğurt starter kültürlerinden bazılarının karakteristikleri Çizelge 3.1.' de verilmiştir. Lizogeni çalışmalarında kullanılan referans suş, *S. thermophilus* CNRZ 1205 (French Collection of Lactic Acid Bacteria) Dr. Patrick Tailliez (Fransa)' den sağlanmıştır.

##### 3.1.3. Bakteriyofajlar

30 adet yerel ve 9 adet starter kökenli *S. thermophilus* suşunun konakçı olarak vazife gördüğü denemelerde 23 adet faj izole edilmiş ve faj-bakteri çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Yoğurt starter kültürlerinin karakteristikleri (Wisby Starter Cultures and Media isimli katalogtan alınmıştır)

	<i>Str. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<b>Özellikleri</b>
<b>Y2</b>	•	•	* Hızlı asitlik
<b>Y4</b>	•	•	* Kuvvetli yoğurt tadı (yüksek asetaldehit oluşumu)
<b>Y1</b>	•	•	* Düşük viskozite
<b>709</b>	•	•	Kültürlerin teknolojik karakterleri aynı, faj akrabalığı farklı.
<b>231</b>	•	•	Faj atağında rotasyona sokulur.
<b>632</b>	•	•	* Orta hızda asitlik * Orta kuvvette yoğurt tadı (Yüksek asetaldehit oluşumu) * Düşük viskozite
<b>V1</b>	•	•	* Orta hızda asitlik * Orta kuvvette yoğurt tadı (Yüksek asetaldehit oluşumu)
<b>V2</b>	•	•	* Güçlü viskozite

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Liyofilize miks yoğurt kültürlerinden *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının izolasyonu

Liyofilize miks yoğurt kültürleri 10 ml steril Skim Milk (Ek-1) besiyeri içeren tüplerde 43 °C' da 18 saat aktifleştirilmiş ve üç ayrı besiyeri kullanılarak, *S. thermophilus* izolasyonu için en uygun besiyeri araştırılmıştır. Laktik streptokokların izolasyonları için önerilen, bileşimleri ve hazırlanışları Ek-1' de verilen LAPT<sub>LIO</sub> Agar (Amorosa vd 1988), Neutral Red Chalk Lactose (NRCL) Agar (Harrigan ve McCance 1966) ve M17 Agar (Terzaghi ve Sandine 1975) besiyerleri kıyaslandığında, içlerinde LAPT<sub>LIO</sub> Agar' ın *S. thermophilus*' un izolasyonuna daha uygun bulunması nedeniyle, izolasyon çalışmaları bu besiyeri ile sürdürülmüştür.

Aktifleştirilen kültürlerden LAPT<sub>LIO</sub> Agar' a sürme yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 43 °C' da 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler binoküler altında incelenerek koloni morfolojisine ve aynı koloniden hazırlanan basit boyama preparatlarının mikroskopta incelenmesi sonucu hücre morfolojisine göre seçilmişlerdir. Seçilen koloniler *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşları için geliştirilen Modifiye M17 Broth (thM17 Broth) besiyerine (Krusch vd 1987) (Ek-1) alınarak 43 °C' da 18 saat inkübe edilmişlerdir. Gelişen kültürlerin saflık kontrolleri yapıldıktan sonra suşlar korunmaya alınmıştır.

### 3.2.2. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajlarının izolasyonu

#### 3.2.2.1. Örneklerin faj izolasyonuna hazırlanması

Değişik kaynaklardan sağlanan örnekler içinde çiğ sütlere ayrı bir işlem uygulanmıştır. 100 ml süte % 10' luk laktik asitten 6 ml katılarak kazeinin çöktürülmesi sağlanmış, kaba filtre kağıdından süzülen filtrata çoğu durumlarda % 10 kloroform katılarak veya filtrat 0,45 µm porlu filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilerek bakteriden arı filtrat elde edilmiştir (Lembke vd 1980). Bulk, yoğurt, ayran ve PAS örnekleri ise hiçbir işlem

uygulanmadan, doğrudan kaba filtre kağıdından süzölmüşlerdir. Aynı şekilde kloroform uygulaması veya membran filtre yöntemiyle örnek filtratları elde edilmiştir.

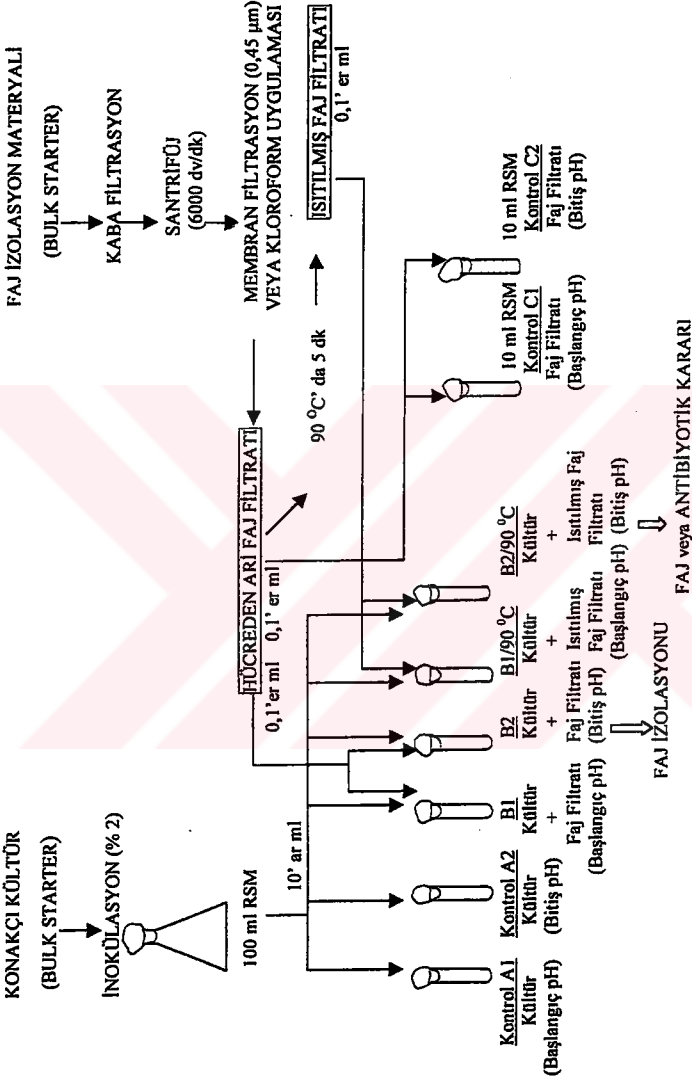
### 3.2.2.2. Faj izolasyonunda kullanılan yöntemler

#### Chr.Hansen Laboratuvarı ATL Faj Testi (Anonymous 1993)

Şekil 3.1.' de şematik olarak gösterilen bu test, faj sorunu yaşanan işletmelerde özellikle bulk kültürlerde, gerektiğinde ürünlere ve diğer faj izolasyon materyallerinde faj varlığının belirlenmesi ve izolasyonu için önerilen bir yöntemdir. Testin toplam süresi, Skim Milk (SM) veya süt tozundan % 10 kuru madde (KM) içerecek şekilde hazırlanan, Rekonstitüye Skim Milk (RSM) bulunan tüplerde 43 °C' da 4 saatlik bir inkübasyon süresi ile inkübasyon başlangıcında ve sonunda pH değerlerinin ölçüm süresini kapsar. Bu çalışmada ATL Faj Testi yalnızca değişik kaynaklı 19 çiğ süt örneğinden faj izole etmek amacıyla kullanılmıştır. İzolasyon materyali olarak 3.2.2.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanan çiğ süt filtratları (19 adet), konakçı kültür olarak ise yerel *S. thermophilus* suşları (30 adet) kullanılmış ve ayrı ayrı birbirleriyle karşılaştırılmışlardır.

Yönteme göre 100 ml RSM, 18 saat RSM' de aktiveştirilmiş yerel *S. thermophilus* kültürü ile % 2 oranında inoküle edilerek inokülümün homojen dağılımı sağlanmış ve hemen 10' ar ml olarak 6 steril tüpe pipetlenmiştir (Kontrol A<sub>1</sub>, Kontrol A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>/90 °C, B<sub>2</sub>/90 °C). Kontrol A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub> tüpleri, 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda RSM besiyerinde pH düşüşünün belirlenmesinde kullanılmıştır. Kontrol A<sub>1</sub> tüpünde inkübasyon başlangıç, A<sub>2</sub> tüpünde bitiş pH' sı ölçülmüştür. B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> tüplerine 0,1' er ml örnek (faj) filtratından, B<sub>1</sub>/90 °C ve B<sub>2</sub>/90 °C tüplerine de 0,1' er ml 90 °C' da 5 dk ısıtılan aynı örnek (faj) filtratından ilave edilmiştir. Ayrıca Kontrol C<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> tüplerine yalnızca steril 10' ar ml RSM ve 0,1' er ml örnek (faj) filtratı pipetlenmiştir. Bütün tüpler eş zamanlı inkübasyona bırakılmıştır. B<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>/90 °C ve C<sub>1</sub> tüplerinde inkübasyon başlangıç pH' sı, B<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>/90 °C ve C<sub>2</sub> tüplerinde bitiş pH' sı ölçülmüştür.

B<sub>2</sub> tüpüne katılan örnek (faj) filtratında faj mevcut ise asitlik gelişimi engelleneceği için A<sub>2</sub> tüpüne göre çok daha yüksek pH değeri saptanır. Bu iki tüp arasındaki pH farkı ( $\Delta$ pH) faj varlığı ve yoğunluğu hakkında fikir verir (Şekil 3.1.).



**Şekil 3.1. Chr. Hansen Laboratuvarı ATL Faj Testi, CHL AP 1017 (Anonymous 1993).**

RSM = % 10 Rekonstitüye Skim Milk

B<sub>2</sub> tüpü ile Kontrol A<sub>2</sub> tüpü arasındaki ApH değeri şu şekilde yorumlanır;

ΔpH = 0,1 FAJ OLASILIĞI

ΔpH = 0,1 - 0,5 ÖNEMLİ FAJ PROBLEMİ

ΔpH = >0,5 ÇOK CİDDİ FAJ PROBLEMİ

B<sub>2</sub>/90 °C tüpünde ise fajlar ısı ileme yıkıma uğradığından inkübasyon, Kontrol A<sub>2</sub> tüpündeki gibi pH düşüşü ile sonuçlanır. pH düşüşü g r lm zse faj dışında bir inhibitörün (antibiyotiğin) bulunma olasılığı artar. İçinde yalnızca RSM ve örnek (faj) filtratı bulunan Kontrol C<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> tüplerinde ise inkübasyon baŐlangıı ve bitiş pH' larının aynı olması gerekir. Eğer C<sub>2</sub> tüpünde pH değeri düŐerse bu durum örnek (faj) filtratının bakteriden arındırılmadığına iŐaret eder. Faj olasılığı bulunan B<sub>2</sub> tüplerinden çift tabaka agar plaklarına damlatılarak liziz kontrol edilir ve fajın tek plak izolasyonuna geçilir.

### Cift Tabaka Agar Yöntemi

Bu yöntem çiğ sütlerden faj izolasyonunda ATL Faj Testi ile birlikte faj plaklarının gösterilmesi amacıyla paralel olarak kullanılmış, ayrıca ticari liyofilize yoğurt kültürü kökenli 9 adet *S. thermophilus*' un konakçı olarak vazife gördüğü 34 adet örnekten (bulk, yoğurt, ayran, PAS) fajların izolasyonunda, iyi sonuç vermesi nedeni ile, tek yöntem olarak kullanılmıştır.

Terzaghi ve Sandine (1975) tarafından önerilen yöntem esas olmakla beraber , *S. thermophilus*' un geliŐtirilmesinde bileŐimi ve hazırlanıŐ Ek-1' de verilen Modifiye M17 (thM17) Broth, ift tabaka agar yönteminde ise Modifiye M17 Agar ve Modifiye M17 Yumuşak Agar kullanılmıştır (Krusch vd 1987, Neve vd 1989).

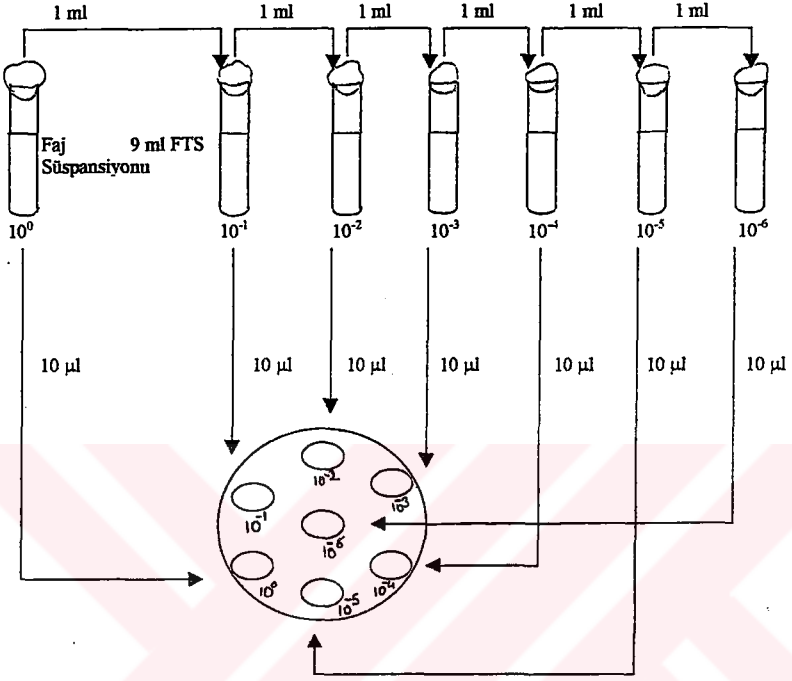
3.2.2.1' de anlatıldığı gibi hazırlanan örnek (faj) filtratlarından steril tüplere 1' er ml alınarak üzerlerine konakçı bakterilerden birinin Modifiye M17 Broth içinde geliŐtirilmiŐ 4 saatlik kültüründen 0,1' er ml ilave edilip karıştırılmış, adsorbsiyonun sağlanması için oda sıcaklığında 10 dk tutulmuŐtur. Bu süre sonunda bakteri-filtrat karışımı üzerine 10 ml steril Modifiye M17 Broth pipetlenmiştir. 43 °C' da 18 saat süren inkübasyonun ardından hücreler ve partiküller 10 dk süren bir satrifüj iŐlemi (5000 dv/dk) ile ayrılmışlardır. Süpernatantlar steril tüplere alınarak % 10 oranında kloroform ilave edilmiştir (Billing 1969). S pernatantlardaki faj varlığının belirlenmesinde; 4 saatlik konakçı bakteri kültüründen 0,1' er ml alınarak içinde 3' er ml Modifiye M17 Yumuşak Agar (% 0,6 agar) bulunan tüplere aktarılıp karıştırılmış ve petrilere daha önceden hazırlanmış olan alt tabaka (th M17 Agar)  zerine dökülerek homojen olarak



yayılmıştır. Katılaşılan agar üzerine, faj varlığı kontrol edilecek olan süpernatantlardan mikroenjektör yardımıyla 10 µl damlatılmış ve 43 °C' da 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda damlatılan alanlardaki berrak plak oluşumu (liziz) faj varlığı olarak tanımlanmıştır.

### 3.2.2.3. Faj titresinin belirlenmesi

Faj titresi çift tabaka agar yöntemiyle belirlenmiştir. İçinde 9' ar ml fizyolojik tuzlu su (FTS) bulunan tüplerden ilkinde aseptik koşulda 1 ml faj süspansiyonu aktarılmış ve  $10^{-11}$  lik dilüsyon hazırlanmıştır. Daha sonra ardışık aktarımlarla  $10^{-6}$  ya kadar seyreltilmiş dizisi elde edilmiştir. İçinde 3 ml th M17 Yumuşak Agar bulunan tüpe, konakçı suşun 4 saatlik kültüründen 0,1 ml ile önceden hazırlanmış olan steril % 10' luk SM' den 0,1 ml ilave edilerek köpürmeyecek şekilde hafifçe karıştırılmış ve petrilere daha önceden hazırlanan alt tabaka üzerine homojen olarak yayılmıştır. Katılaşması için bir süre beklendikten sonra faj süspansiyonu ve seyreltilerinden petri plaklarının çizilerek ayrılan bölümlerine 10' ar µl damlatılmıştır. 43 °C' da 18 saat süren inkübasyonun sonunda petri kutularında liziz incelenmiş ve liziz plaklarının sayılabileceği seyreltiden hareketle faj süspansiyonunun titresini, plak oluşturma birimi/ml (pfu/ml) olarak belirlenmiştir. Örneğin  $10^{-5}$  lik faj seyreltisinin damlatıldığı yerde 5 adet faj plağı oluşmuşsa, orijinal faj süspansiyonunda faj titresini  $5 \times 10^5 \times 100 = 5 \times 10^7$  pfu/ml olarak hesap edilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Faj titresinin (pfu/ml) belirlenmesi

#### 3.2.2.4. Saflaştırma, zenginleştirme ve faj stoklarının hazırlanması

Çift tabaka agar yöntemi ile belirlenen fajların saflaştırılması tek plak izolasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3.2.2.3' de anlatıldığı gibi, faj süspansiyonu seyreltilerek seyrelti dizisi hazırlanmış, bu seyreltilerin her birinden 0,1' er ml alınarak içlerinde 3' er ml thM17 Yumuşak Agar bulunan tüplere ayrı ayrı aktarıldıktan sonra, 4 saatlik konakçı kültürden ve önceden hazırlanmış steril % 10' luk SM' den 0,1' er ml ilave edilmiştir. Hafifçe karıştırıldıktan sonra alt tabaka olarak thM17 Agar içeren petri kutularına homojen yayılmasına özen gösterilerek dökülmüştür. Katılaşması için bir süre beklendikten sonra petri kutuları 43 °C' da 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda faj lize plakları açısından uygun olan petriden steril enjektör iğnesi yardımıyla tek bir lize plağı kesilerek steril bir tüpe alınmıştır. Üzerine 0,5 ml thM17 Broth besiyeri aktarılarak iyice karıştırıldıktan sonra 4 saatlik konakçı kültürden 0,1 ml ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Süre sonunda tüpe 10 ml thM17 Broth besiyeri aktarılmış ve 43 °C' da 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteriyel lizinin tamamlanmasının ardından ortamlar 10 dk süreyle santrifüj edilmiş (5000 dv/dk), süpernatantlar 0,45 µm porlu filtrelerden geçirilmiş veya % 10 oranında kloroform ilave edilmiştir. Titrenin yükseltilmesi için faj süspansiyonu birkaç kez yeniden konakçı bakterileri ile sıvı ortamda karşılaştırılmış ve membran filtreden geçirilmiştir. En son elde edilen filtrattan hazırlanan seri dilüsyonlar, yine çift tabaka agar yöntemiyle faj titrelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Titresi 10<sup>8</sup> pfu/ml ve üzerindeki faj süspansiyonları korunmaya alınmıştır.

#### 3.2.3. İzole edilen *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının ve fajlarının korunması

İzole edilen ve saflaştırılan *S. thermophilus* suşları Modifiye M17 Broth besiyerinde % 15-20 steril gliserol ilave edilerek -18 °C ve - 40 °C' larda ayrı ayrı korunmaya alınmışlardır (Krusch vd 1987, Kraus ve Geller 1998). Bakterilerin yitirilmesini önlemek ve transferin sayısını azaltmak amacıyla başka bir önlem olarak; 7 ml steril Litmus Milk (Oxoid) besiyerine, 18 saatlik aktif kültürden 0,5 ml ilave edilmiş, 43 °C' da 2-4 saatlik inkübasyondan sonra henüz pıhtı oluşumu başlamadan gelişen kültür ependorf kapçıklarına 1' er ml porsiyonlar halinde dağıtılarak -40 °C' da korunmaya alınmıştır (Friedrich 1979).

Fajlar Modifiye M17 Broth' lu ortamlarda yüksek titreye ( $10^8$  -  $10^9$  pfu/ml) getirildikten sonra 0,45 µm porlu filtrelerden geçirilmiş ve filtrlara % 15 oranında gliserol ilave edilerek - 18 °C ve - 40 °C' larda korunmaya alınmıştır (Lembke vd 1980, Kraus ve Geller 1998). Belli aralıklarla titre kontrolleri yapılarak düşük titre gösteren faj süspansiyonları tekrar zenginleştirilmiş ve yüksek titreye getirilmiştir.

### **3.2.4. Fajların liyofilize yoğurt kültürü kökenli homolog konakçılarının belirlenmesi**

Homolog konakçıların belirlenmesi amacıyla titreleri  $10^8$  pfu/ml ve üzerinde olan faj filtrları, liyofilize yoğurt kültürlerinden izole edilmiş 9 adet *S. thermophilus* suşu ile öncelikle doğrudan çift tabaka agar üzerinde karşılaştırılmıştır. Petri kutularına thM17 Yumuşak Agar içinde üst tabaka olarak yayılan her bir bakteri zeminine faj filtrları damlatılmak suretiyle homolog konakçılar belirlenmiştir. İkinci bir uygulama olarak; fajlarla konakçılar ayrı ayrı Modifiye M17 Broth besiyerinde karşılaştırılmış ve bu karşılaştırma ardışık olarak üç kez tekrarlanmıştır. 3. karşılaştırmadan sonra çift tabaka agar yöntemi ile homolog konakçılar tekrar saptanmıştır. Bu amaçla faj filtrlatından ve 4 saatlik konakçı kültüründen 0,1' er ml alınarak steril bir tüpte karıştırılmış ve faj-bakteri karışımı 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 10 ml Modifiye M17 Broth ilave edilerek 43 °C' da 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde faj-bakteri süspansiyonu 10 dk santrifüjlenerek (5000 dv/dk) süpernatanta 1 ml kloroform ilave edilmiştir. Bu süpernatant 2. ardışık karşılaştırmada faj filtrları olarak kullanılmıştır. 3. karşılaştırmadan sonra faj filtrlatının seyreltileri hazırlanmış ve çift tabaka agar yöntemi ile fajların homolog konakçıları belirlenmiştir.

### **3.2.5. Fajların doğal (yerel) suşlardan homolog konakçılarının belirlenmesi**

Titreleri  $10^8$  pfu/ml olacak şekilde zenginleştirilen faj filtrları, çeşitli örneklerden izole edilmiş olan 30 adet doğal (yerel) *S. thermophilus* suşu ile öncelikle çift tabaka agar üzerine doğrudan damlatma yapmak suretiyle karşılaştırılmış, faj liziz durumuna bakılmıştır. Daha sonra sonucu doğrulamak amacıyla, yerel suşlarla faj filtrları ayrı ayrı sıvı ortamlarda (Modifiye M17 Broth) ardışık olarak 3 kez karşılaştırılmış, 3. karşılaştırmadan sonra elde edilen faj filtrları çift tabaka agar plaklarına damlatılarak liziz durumu kontrol edilmiştir.

### **3.2.6. Doğal (yerel) ve starter kökenli *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşları ile *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fajları arasındaki faj-konakçı spesifikliğinin test edilmesi**

TÜBİTAK/TARP-2106 no' lu proje kapsamında M. Akçelik, H. B. Doğan ve Ç. Tükel tarafından izole edilen 25 adet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fajının (Tunail vd 1998), faj-konakçı ilişkisi çift tabaka agar yöntemine göre araştırılmıştır. Petri kutularında thM17 Yumuşak Agar içinde üst tabaka olarak yayılan her bir *S. thermophilus* bakteri zeminine mikropipetle faj filtratları damlatılmış ve liziz incelenmiştir.

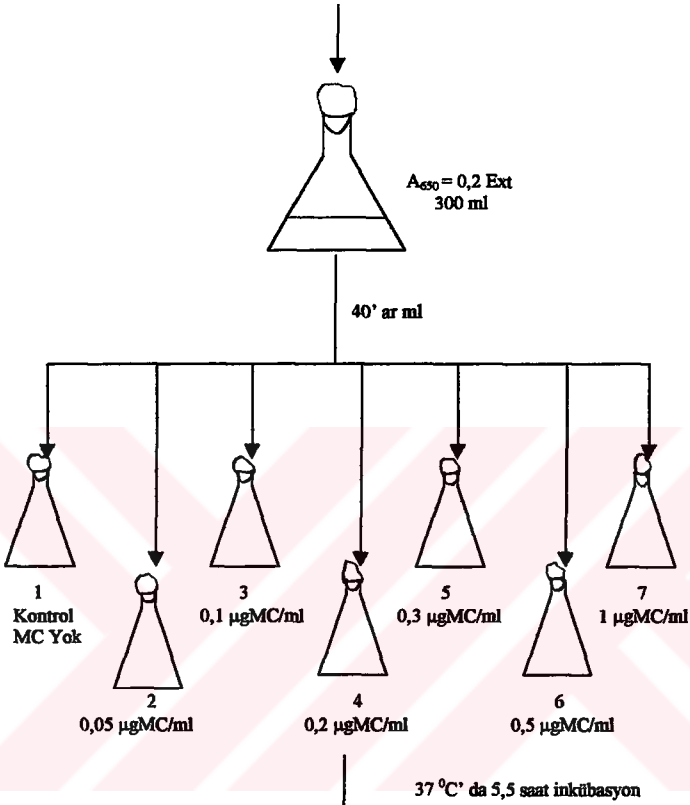
### **3.2.7. Faj indüksiyon (lizogeni) çalışmaları**

Elde mevcut olan tüm *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının lizogen karakterli olup olmadıkları, indüksiyon ajanı mitomisin C (MC) (Sigma, St Louis Mo63178, USA) uygulanarak kontrol edilmiştir. Denemelerde kullanılacak uygun MC konsantrasyonu kontrol (lizogen) suş *S. thermophilus* CNRZ 1205 ile saptanmıştır. Bu amaçla temel olarak Cluzel vd (1987a) ile Fayard vd (1993)' nin kullandıkları yöntemlerden yararlanılmıştır.

#### **3.2.7.1. Uygun MC konsantrasyonunun belirlenmesi**

Profaj indüksiyonu için uygun MC konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kontrol (lizogen) suşun 18 saatlik aktif kültürü, içinde 300 ml Modifiye M17 Broth bulunan erlene % 2 oranında aşılmıştır. 37 °C' da gelişmeye bırakılan kültürün optik yoğunluğu 650 nm' de (Spektronic 20, Bousch Lamb) 0,2 Eks. değerine ulaştığında (yaklaşık 3 saat), ki bu değer kültürün logaritmik gelişme evresine geçiş değeridir, kültür 40 ml' lik porsiyonlar halinde 7 küçük steril erlene dağıtılmış ve 6 erlenin her birine sırasıyla 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 ve 1,0 µg MC/ml ilave edilmiştir. MC ilave edilmeyen, sadece lizogen suşun kültürünü içeren erlen kontrol olarak kullanılmıştır. 37 °C' da inkübasyona bırakılan erlenlerden başlangıç anından itibaren 5,5 saatlik süre boyunca her 30 dakikada bir örnekler alınmış ve spektrofotometrede optik yoğunlukları ölçülmüştür. Erlenlerdeki kültürlerin liziz ile sonuçlanan gelişim grafiklerinden en etkili konsantrasyonlar belirlenmiştir. Şekil 3.3. uygun MC konsantrasyonunun belirlenmesini şematik olarak göstermektedir.

% 2 İnokülüm



30 dakika aralıklarla optik yoğunluk ölçümü

Zamana karşı optik yoğunluk değerlerinin grafiğe işlenmesi

Şekil 3.3. Uygun MC konsantrasyonunun belirlenmesi

### 3.2.7.2. Doğal (yerel) ve starter kökenli *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarında profaj indüksiyonu

Elde bulunan 30 adet doğal (yerel) *S. thermophilus* suşu ile 9 adet starter kökenli *S. thermophilus* suşunda profaj indüksiyon çalışmaları her bir suş için 0,05; 0,1 ve 0,2 µg/ml MC konsantrasyonları ile yürütülmüştür. Suşların her birine bu işlemler ayrı ayrı uygulanmıştır. Suşlardan herhangi birinde lizogeni belirlenmesi halinde MC indüksiyonundan sonra elde edilecek lizatların 0,45 µm porlu filtrelerden geçirilmesi ve filtratta bulunan temperent fajın indikatör bakterilerle (konakçılarla) çift tabaka agar yöntemine göre karşılaştırılmasının ardından zenginleştirilmesi öngörülmüştür (Cluzel vd 1987a).

### 3.2.8. Örnek olarak seçilen bazı *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajlarının elektron mikroskopta gösterilmesi

Faj konsantratlarının hazırlanmasında Kivi vd (1987) ile Bhimani ve Freitas (1991) tarafından önerilen yöntemlerdeki santrifüj devri ve süresi gibi parametreler modifiye edilerek kullanılmıştır.  $10^8$ - $10^9$  pfu/ml' lik faj lizatları öncelikle 0,45 µm porlu filtrelerden (Sartorius, Germany) geçirilmiş ve daha sonra 1 saat süreyle 50000 dv/dk' da santrifüjlenerek konsantre edilmiştir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra faj pelletleri 10µl 0,3 M amonyum asetat (Merc) içerisinde çözölmüştür.

Elektron mikroskop preparatları için konsantre faj süspansiyonları; 10 µl sodyum fosfotungstat (% 2, pH 5,0 ± 0,02) (Sigma Chem.Co., USA) ve 10 µl amonyum molibdat (% 2, pH 5,0 ± 0,02) (Sigma Chem.Co., USA) ile karıştırılarak elektron mikroskop gridleri (3,05 mm, 400 mesh Agar Scientific Ltd. U.K.) üzerine damlatılmış, 15 dk oda sıcaklığında bekletilen gridler kurulama kağıdı yardımıyla kurutulmuştur. Gridler Jeol-JEM S-100 transmission elektron mikroskobunda incelenerek farklı büyütmelerde fajların fotoğrafları alınmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Liyofilize Miks Yoğurt Kültürlerinden *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Suşlarının İzolasyonu

Yoğurt kültürlerinden *S. thermophilus* suşlarının izolasyonu amacıyla kullanılan Neutral Red Chalk Lactose (NRCL) Agar, M17 Agar ve LAPT<sub>LIO</sub> Agar besiyerlerinden LAPT<sub>LIO</sub> Agar en iyi sonucu vermiştir. Karbonhidrat kaynağı olarak laktoz içeren LAPT<sub>LIO</sub> Agar besiyerine Skim Milk içinde aktifleştirilen liyofilize yoğurt kültürlerinden sürme yöntemiyle ekim yapılmış ve 43 °C' da 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda *S. thermophilus* suşları yuvarlak veya mercimeğe benzeyen, düzgün ve kaygan görünümlü S (smooth) formlu koloniler oluştururken, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşları aynı süre sonunda çok küçük, pürüzlü ve dumanlı görünümde R (rough) formlu koloniler geliştirmişlerdir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Binoküler altında incelenen kolonilerden yuvarlak, hafif konveks S formlu olanların yarısından basit boyama yapılmış ve mikroskopta 100 X büyütme ile kolonilerin hücre morfolojileri incelenmiştir. Hücreleri kok formunda olan kolonilerin diğer yarısı agarlı ortamdaki öze ile alınarak Modifiye M17 Broth içinde ayrı ayrı geliştirilmiştir. Tek koloni saflaştırılması için aynı işlemler birkaç kez tekrarlanmış ve saf kültürler korunmak üzere stoğa alınmıştır.

*S. thermophilus* izolasyonunda kullanılan liyofilize miks yoğurt kültürleri ve üretici firmaları ile izole edilen suşların kodları Çizelge 4.1.' de gösterilmiştir. *S. thermophilus* suşlarının izolasyonu zorlukla başarılı olmuştur. Stoğa alınan saf kültürlerin geliştirilmelerinde de sıklıkla sorunlar yaşanmıştır. Ticari amaçla üretilen bu kültürlerden, alıcı ülkelerin işletme ve mandıralarında sürekli starter üretimini önlemek amacıyla üretici firmanın aldığı bir önlem nedeniyle bu durumun ortaya çıktığı düşünülmektedir. İzolasyonun bu denli zor gerçekleşmesi ve stok kültürlerin üretilmesindeki güçlükler, konakçı olarak kullanılan bu bakterilerle çalışmaların zaman zaman yavaşlamasına neden olmuştur. Üretici firmalar tarafından önlem olarak bakterilerin oksotrof mutantların kullanılmış olabileceği veya bazı genetik



manipülasyonlar sonucu bakterilerin 1-2 pasaj sonra üremelerinin engellendiği olasılıkları akla gelmektedir.



Şekil 4.1.  $V_1$  miks yoğurt kültüründeki *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kolonilerinin LAPT<sub>1.10</sub> Agar üzerinde görüntümü



Şekil 4.2. Miks yoğurt kültürü  $V_1$  izole edilen *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kolonilerinin LAPT<sub>1.10</sub> agar üzerindeki görünümü

Çizelge 4.1. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının izole edildiği liyofilize miks yoğurt kültürleri (starter) ve ait oldukları firmalar

İzole Suş	Miks Starter	Üretici Firma
<i>S. thermophilus</i> 231	231	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> 632	632	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> 709	709	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> V1	V1	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> V2	V2	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> Y1	Y1	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> Y4	Y4	Wiesby (Almanya)
<i>S. thermophilus</i> CH-1	CH-1	Chr.Hansen Lab. (Danimarka)
<i>S. thermophilus</i> B3	B3	Chr.Hansen Lab. (Danimarka)

İzolasyonu gerçekleştiren 9 adet *S. thermophilus* suşu yanında A.Ü.Z.F. Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Biriminde yürütülen "Yoğurt Fabrikalarında Faj Probleminin Çözümüne Yönelik Araştırmalar" kapsamında çiğ sütlerden izole edilmiş ve tanılanmış 30 adet yerel *S. thermophilus* suşu (Tunail vd 1998) da kullanılmıştır. Bu suşların izolasyon kaynakları ve suş kodları Çizelge 4.2.' de gösterilmiştir.

#### 4.2. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Fajlarının İzolasyonu

Öncelikle çiğ sütlerden izole edilmiş olan 30 adet yerel *S. thermophilus* suşunun (Çizelge 4.2.) özgül yerel fajlarını yakalamak amacıyla, faj izolasyon materyali olarak 19 adet çiğ süt örneği (Çizelge 4.3.) kullanılmış, her bir çiğ süt filtratı bakterilerle ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Ancak Chr.Hansen Laboratuvarı ATL faj testi ve ardından çift tabaka agar üzerine damlatılarak gerçekleştirilen denemelerde, çiğ sütlerden faj izolasyonu başarısız olmuştur. Sürekli faj atakları yaşayan bir yoğurt işletmesinde bulk starter ve yoğurtlardan *S. thermophilus* fajlarının kolaylıkla izole edilebildiğinin (Durlu Özkaya vd 1999) bilinmesine karşın böyle bir yol izlenmesinin nedeni çiğ süt kökenli yerel fajların koleksiyonunun oluşturulma çabasından kaynaklanmıştır.

Çizelge 4.2. İzole edilmiş olan *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşları ve çiğ süt kaynakları

İzolasyon Materyali No.	İzolasyon Materyali Kaynağı	<i>S. thermophilus</i> suşları
1	AOÇ (Avanos, Nevşehir)	St.1.2., St.1.4.
2	AOÇ (Varollar, Burdur)	
3	AOÇ	St.3.1., St.3.2.i, St.3.3.
4	AOÇ (Bozova, Antalya)	
5	AOÇ (Varollar, Burdur)	St.5.3.i
6	TİGEM (Polath, Ankara)	
7	AOÇ (Bozova, Antalya)	St.7.1., St.7.5., St.7.6. St.7.7.,St.7.8.
8	AOÇ (Avanos, Nevşehir)	
9	AOÇ (Altınova, Konya)	
10	AOÇ (Seydiköy, Burdur)	
11	AOÇ (Avanos, Nevşehir)	
12	AOÇ	St.12.2., St.12.4., St.12.5.
13	AOÇ (Seydiköy, Burdur)	St.13.5., St.13.6.
14	BİRTAT (Samsun)	St.14.3., St14.5.
15	BİRTAT (Bozova, Antalya)	St.15.4.
16	BİRTAT (Kastamonu)	
17	BİRTAT	
18	BİRTAT (Bozova, Antalya)	
19	BİRTAT	
20	BİRTAT	St.20.1., St.20.3.
21	BİRTAT	
22	BİRTAT	
23	BİRTAT	St.23.1., St.23.3., St.23.5.
24	BİRTAT	St.24.2., 24 b
25	BİRTAT	
26	BİRTAT	St.26.2., St.26.5.
27	SOKAK SÜTÜ (Kahramanmaraş)	MR27a
28	SOKAK SÜTÜ (Ankara)	
29	AÜZF	
30		TH3

TH3 *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşu daha önceki çalışmalarda izole edilmiştir.

AOÇ : Atatürk Orman Çiftliği Süt İşletmesi

AÜZF : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi

TİGEM, BİRTAT : Diğer Süt İşletmeleri

Çizelge 4.3. Faj izolasyonu amacıyla kullanılan izolasyon materyalleri ve kaynakları

İzolasyon Materyali No.	İzolasyon Materyali Kaynağı	İzolasyon Materyali Çeşidi
1	AÜZF	Çiğ süt
2	AÜZF	Çiğ süt
3	AVANOS (Nevşehir)	Çiğ süt
4	VAROLLAR (Burdur)	Çiğ süt
5	ALTINOVA (Konya)	Çiğ süt
6	VAROLLAR (Burdur)	Çiğ süt
7	TİGEM (Polath)	Çiğ süt
8	AVANOS (Nevşehir)	Çiğ süt
9	SEDİKÖY (Burdur)	Çiğ süt
10	BOZOVA (Antalya)	Çiğ süt
11	TİGEM (Konya)	Çiğ süt
12	AÜZF	Çiğ süt
13	AÜZF	Çiğ süt
14	AVANOS (Nevşehir)	Çiğ süt
15	VAROLLAR (Burdur)	Çiğ süt
16	BOZOVA (Antalya)	Çiğ süt
17	HAYMANA (Ankara)	Çiğ süt
18	HAYMANA (Ankara)	Çiğ süt
19	AÜZF	Çiğ süt
20	AOÇ	CH-1 Bulk
21	AOÇ	B3 Bulk
22	AÜZF	Bulk
23	AÜZF	Yoğurt
24	AOÇ	Yoğurt
25	BİRTAT	Kaşar PAS
26	GÜVEN	Beyaz peynir PAS
27	GÜVEN	Kaşar PAS
28	GÜVEN	Bulk
29	AÜZF	709 Bulk
30	HİTİT	709 Bulk

Çizelge 4.3. (devam)

İzolasyon Materyali No.	İzolasyon Materyali Kaynağı	İzolasyon Materyali Çeşidi
31	HİTİT	V1 Bulk
32	HİTİT	709+V1 Yoğurt
33	AÜZF	709 Yoğurt
34	ÖNCE	Beyaz peynir PAS
35	ÖNCE	Beyaz peynir PAS
36	ÖNCE	Kaşar PAS
37	GÜVEN	Beyaz peynir PAS
38	BİZİM	Kaşar PAS
39	BİZİM	Beyaz peynir PAS
40	TATAL	6.36 Bulk
41	TATAL	6.38 Bulk
42	AOÇ	231 Bulk
43	AOÇ	FYS-43 Bulk
44	AOÇ	FYS-43+231 Yoğurt
45	TATAL	Ayran
46	TATAL	Yoğurt
47	AOÇ	709 Bulk
48	AOÇ	709 Bulk
49	AOÇ	CH-1 Ayran
50	AÜZF	231 Bulk
51	AÜZF	231 Yoğurt
52	HİTİT	709 Bulk
53	HİTİT	709 Ayran

AÜZF : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi

AOÇ : Atatürk Orman Çiftliği Süt İşletmesi

HİTİT, TATAL, BİRTAT, BİZİM, ÖNCE, GÜVEN : Diğer Süt İşletmeleri

Bulk : Listede verilenlerden sadece 41. materyal ayrıntılı bulk olup, diğerlerinin hepsi yoğurt bulk kültürüdür.

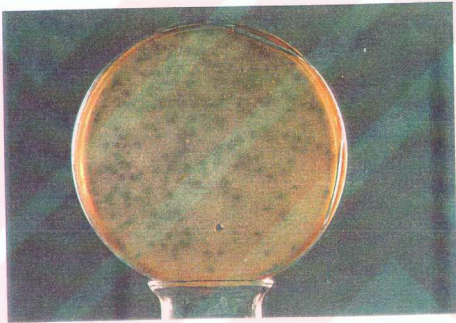
PAS : Peynir altı suyu.

Lembke ve Teuber (1981); süt işletmelerinde ortaya çıkan faj kontaminasyonlarında çiğ süt ve orijinal starter kültürlerin zayıf bir kaynak olduğunu, buna karşılık bulk kültür, PAS, salamura ve süt ürünlerinin esas kaynakları oluşturduğunu belirtmiş, Neve (1996) tarafından da çiğ süt, ara sıra faj izole edilse de, önemli bir faj kaynağı olarak görülmemiştir. Bununla birlikte laktokok fajları çiğ sütlerden, çiğ süt kökenli ve değişik kökenli konakçılar kullanılarak birçok kez kolaylıkla izole edilmiştir. Örneğin Lembke vd (1980), bu amaçla yöntem nermiler ve bu yönteme göre laktokok fajlarını çiğ sütlerden izole etmişlerdir. Tunail ve Akın (1991) Türkiye' nin değişik bölgelerinden alınan 68 çiğ süt örneğinin 33' nde (%49) laktokok faj izolasyonunu gerekletirmilerdir. Aynı Şekilde iğ sütlerden laktokok fajlarının izolasyonunu gerekletirenler arasında Durlu (1991), Aydar (1992) ile Şanlıbaba ve Akçelik (2000) bulunmaktadır.

Çiğ sütlerden *S. thermophilus* fajlarının izolasyonu baarlanmadığı gibi, e zamanlı yürütülen bir başka çalışmada 90 adet çiğ süt örneğinden *L. bulgaricus* fajlarının izolasyonu da gerekletirilememitir (Tunail vd 1998). Bu durum termofilik laktik asit bakteri fajlarının izolasyonunda çiğ sütlerin uygun materyal olmadığını göstermiştir. Çiğ sütlerde büyük olasılıkla termofilik faj titresi laktokok faj titresine oranla çok daha düşük düzeydedir veya bu sonuç yerel konakçı bakterilerin çiğ sütlerde sayısal azlığı yanında kuvvetli faj-direnç sistemleri ile ilgilidir. Diğer taraftan *S. salivarius* subsp. *thermophilus* zgl fajlarının Pette ve Kay tarafından 1952 yılında kefedilmesine karşın, bu fajların laktokok fajlarına oranla daha az araştırılmasına, daha geç bulunmalarının yanı sıra faj plaklarının elde edilmesindeki güçlükler gerçekçe gösterilmiştir (Reinbold ve Reddy 1973). Yapılan bu araştırma süresinde de termofilik fajlardan olan *S. thermophilus* fajlarının gerek izolasyonlarının gerekse titre artımlarının laktokoklara oranla daha zor gerçekleştiği söylenebilir.

Çiğ sütlerden faj izolasyonunda başarısız kalınması üzerine hem çiğ sütler hem de ATL faj testi terkedilerek, faj izolasyonu için çift tabaka agar yöntemi ile işletmelerin faj titreleri yüksek olan materyallerine ynelinmitir. Bu amaçla, liyofilize miğ yoğurt kültürlerinden izolasyonu baarılan *S. thermophilus* suları (izelge 4.1.) konakçı olarak kullanılmış ve 15 adet yoğurt bulk kültürü, 9 adet PAS, 7 adet yoğurt ve 3 adet ayrandan oluşan 34 adet faj izolasyon materyali ile (izelge 4.3.) ayrı ayrı

karşılaştırılmıştır. Sonuçta izole edilen 23 adet fajın 5 adedi konakçı olarak kullanılan *S. thermophilus* 709 suşu ile, 8 adedi *S. thermophilus* 231 suşu ile ve 10 adedi de *S. thermophilus* B3 suşu ile elde edilmiştir. İzole edilen 23 adet virü lent *S. thermophilus* faj izolatu nun ho mojen faj süspansiyonunun oluşturulması amacıyla, her bir fajın konakçısına karşı oluşturdu ğu tipik tek plaklar seçilmiş (şekil 4.3 ), aynı konakçı suşlara karşı ardışık transferler yapılarak zenginleştirilmiş ve titreleri  $10^8$  pfu/ml düzeyine çıkarılmıştır (şekil 4.4.) (Terzaghi ve Sandine 1975, Krusch vd 1987, Neve vd 1989).



şekil 4.3. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajının konakçısına karşı oluşturdu ğu tek plaklar

Çizelge 4.4. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajlarının kodları, konakçıları, titreleri ve izolasyon kaynakları

Faj Kodu	Konakçı Bakteri	Titre (pfü/ml)	Kaynak
709.x1 φ	<i>S.thermophilus</i> 709	3 x 10 <sup>8</sup>	CH-1 Ayran (AOÇ)
709.x2 φ	<i>S.thermophilus</i> 709	1 x 10 <sup>8</sup>	231 Bulk (AÜZF)
709.x3 φ	<i>S.thermophilus</i> 709	1 x 10 <sup>8</sup>	231 Yoğurt (AÜZF)
709.x4 φ	<i>S.thermophilus</i> 709	1 x 10 <sup>8</sup>	709 Bulk (HİTİT)
709.x5 φ	<i>S.thermophilus</i> 709	1 x 10 <sup>8</sup>	709 Ayran (HİTİT)
231.x6 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	4 x 10 <sup>8</sup>	CH-1 Ayran (AOÇ)
231.x7 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	1 x 10 <sup>8</sup>	231 Bulk (AÜZF)
231.x8 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	1 x 10 <sup>8</sup>	231 Yoğurt (AÜZF)
231.x9 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	1 x 10 <sup>8</sup>	709 Bulk (HİTİT)
231.x10 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	6 x 10 <sup>8</sup>	709 Ayran (HİTİT)
B3.x11 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	1 x 10 <sup>8</sup>	CH-1 Ayran (AOÇ)
B3.x12 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	2,5 x 10 <sup>8</sup>	231 Bulk (AÜZF)
B3.x13 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	1 x 10 <sup>8</sup>	231 Yoğurt (AÜZF)
B3.x14 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	1 x 10 <sup>9</sup>	709 Bulk (HİTİT)
B3.x15 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	4 x 10 <sup>8</sup>	709 Ayran (HİTİT)
B3.x16 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	1 x 10 <sup>8</sup>	CH-1 Bulk (AOÇ)
B3.x17 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	1 x 10 <sup>8</sup>	B3 Bulk (AOÇ)
B3.x18 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	2 x 10 <sup>8</sup>	Yoğurt (AÜZF)
B3.x19 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	2 x 10 <sup>8</sup>	Yoğurt (AOÇ)
B3.x20 φ	<i>S.thermophilus</i> B3	2 x 10 <sup>8</sup>	Yoğurt (AOÇ)
231.x21 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	1 x 10 <sup>8</sup>	Yoğurt (TATAL)
231.x22 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	6 x 10 <sup>8</sup>	Yoğurt (AOÇ)
231.x23 φ	<i>S.thermophilus</i> 231	4 x 10 <sup>8</sup>	Kaşar PAS (BİRTAT)

AÜZF : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt İşletmesi

AOÇ : Atatürk Orman Çiftliği Süt İşletmesi

HİTİT, TATAL, BİRTAT : Diğer Süt İşletmeleri

Bulk : Listede verilenlerin hepsi yoğurt bulk kültürüdür.

PAS : Peynir altı suyu



### 4.3. Fajların Starter Kökenli Homolog Konakçılarının Belirlenmesi

Bir türün spesifik fajlarının izolasyonunda her bir faj için öncelikle bir konakçı ortaya çıkarsa da , farklı suşlar da aynı faja konakçı olarak hizmet edebilirler. Bu durumda bir faj değişik *S. thermophilus* suşlarına değişik plak etkinliği (pfu/ml) gösterebilmektedir. Bu farklı etkinlik faj konakçı uyumuna bağlıdır (Kivi vd 1987).

Bu çalışmada elde edilen 23 fajın homolog ve heterolog konakçılarını belirlemek amacıyla öncelikle 9 adet liyofilize miks yoğurt kültüründen izole edilen *S. thermophilus* suşları (709, 231, B3, CH-1, 632, Y1, Y4, V1, V2) ile titreleri  $10^8$  pfu/ml düzeyinde bulunan 23 adet faj filtratı çift tabaka agar üzerinde damlatma yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Denen fajlara karşı 709, 231 ve B3 suşlarının duyarlı, diğer 6 suşun ise (CH-1, 632, Y1, Y4, V1, V2) hepsinin dirençli olduğu saptanmıştır. Bu ön bulgulardan sonra yapılan ikinci bir denemede; tüm suşlar 23 faj ile ayrı ayrı sıvı besiyerinde 3 kez ardışık transferle karşılaştırılmış ve faj titreleri (pfu/ml) çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir. Yukarıda dirençli oldukları ifade edilen suşların bulunduğu petrielerde, fajların plak etkinliği yine görülmemiştir. Aynı denemelerde 709, 231 ve B3 kodlu suşlar üzerinde fajlar farklı plak etkinliği (pfu/ml) göstermişlerdir (Çizelge 4.5.). 709 suşunun; izolasyonda konakçı olarak görev yaptığı ve izolasyonunu olanaklı kıldığı 709-x1, 709-x2, 709-x3, 709-x4 ve 709-x5 fajlarının yanısıra B3-x15 fajının da homolog konakçısı olduğu, diğer iki suşla izole edilen fajlara da, 231-x7, 231-x10, B3-x17, B3-x19 fajları hariç, heterolog konakçı görevi yaptığı anlaşılmıştır. 231 suşu ise izolasyonunda konakçı olarak görev yaptığı 231-x6, 231-x7, 231-x8, 231-x9, 231-x10, 231-x21, 231-x22, 231-x23 fajlarının yanısıra B3-x13 fajının da homolog konakçısı olduğunu göstermiş, diğer fajlara ise heterolog konakçı olarak davranmıştır. Bu iki suştan, ait olduğu firma nedeniyle ayrılan (Çizelge 4.1.) B3 suşu da benzer şekilde izolasyonunu olanaklı kıldığı fajların (B3-x11, B3-x12, B3-x13, B3-x14, B3-x15, B3-x16, B3-x17, B3-x18, B3-x19, B3-x20) ve aynı zamanda 231-x10 fajının homolog konakçısı, diğer bütün fajların heterolog konakçısı olarak davranış sergilemiştir. Ancak hiçbir konakçı kendi homolog fajlarına gösterdiği etkiden daha fazlasını heterolog fajlarına karşı göstermemiştir.

Çizelge 4.5. 9 adet liofilize mikts yoğurt starter kökenli *S. salivarius* subsp. *thermophilus* susunun, çeşitli örneklerden izole edilen 23 adet *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajna karşı verdiği titreler (pfu/ml)

Bakteri	Faj Kod No																						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23
709	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	-	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	-	10 <sup>6</sup>	-	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
231	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>
B3	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	4x10 <sup>8</sup>	4x10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	6x10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
CH-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
632	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Finlandiya peynir işletmelerinden izole ettikleri 9 adet *S. thermophilus* fajını, 6 adet starter kökenli *S. thermophilus* suşuna karşı deneyen Kivi vd (1987)' nin, fajların homolog ve heterolog konakçıları üzerine adsorbsiyon ve plak etkenliklerini inceledikleri çalışmalarında; farklı suşlar farklı fajlara değişik plak etkenlikleriyle karakterize konakçı olarak davranmışlardır. F<sub>Ku</sub>101, F<sub>Y</sub>101, F<sub>A</sub>101, F<sub>K</sub>11, F<sub>Lo</sub>Ths ve F<sub>E</sub>Ths fajlarının plak etkenlikleri yalnız kendi homolog konakçıları ile belirlenirken, F<sub>Ko</sub>10 ve F<sub>Ko</sub>74 fajları yalnız kendi homolog konakçılarına değil birbirlerinin konakçılarına ve ayrıca 101 kodlu suşa da kendi konakçılarına olduğu kadar etkenlik göstermişlerdir. Yine F<sub>Lo</sub> 140/76 fajı homolog konakçısına olduğu gibi 101 kodlu suşa da etken bulunmuştur. Sebastiani ve Jäger (1993) benzer bir çalışmada *S. thermophilus* faj izolatlarının *S.thermophilus* suşları üzerinde gösterdikleri plak etkenliklerini incelemişlerdir. Buna göre, P106 ve P1232 fajları sadece kendi homolog konakçılarına etkili olurken, P1304 ve P1314 fajları ise homolog konakçıları yanında birbirlerinin konakçılarını da enfekte etmişlerdir. PT19 ve PT51 fajları ise 106, 1232, 1304 ve 1314 suşları üzerinde neredeyse hiç liziz vermezken PT19 ve PT51 konakçı suşları da diğer fajlara karşı kuvvetli bir direnç göstermişlerdir.

Bu tez çalışmasında izole edilen fajların tamamının yalnızca 3 suş ile izole edilebildiği ve bu fajların morfolojik, strüktürel ve genom farklılıklarına ilişkin hiçbir verinin henüz elde bulunmadığı düşünülürse, bu fajların ayrı materyalden izole edilseler de identik olma olasılıkları yüksektir. Bununla beraber identik fajlar nedeniyle izole faj sayısının redükte olacağı varsayılsa bile 709, 231 ve B3 konakçıların faj akrabalığının yüksek olduğu kanısı değişmeyecektir. Çünkü Çizelge 4.4.' ten de görüleceği üzere yapımında 231 kültürü kullanılan bulktan faj izolasyonu 231 suşu ile başarılı olduğu gibi B3 ve 709 suşları ile de gerçekleşmiş veya aksi durumlar kaydedilmiştir. Homolog konakçıların belirlenmesine ilişkin deneme sonuçları, faj izolasyon bulgularıyla örtüşmektedir.

Fajların karakterizasyonu ve sınıflandırılması açısından faj-konakçı özgülüğünün bir kriter oluşturması söz konusu değildir (Mata ve Ritzenthaler 1988, Benbadis vd 1990). Bugün fajların sınıflandırılmasında genom karakterizasyonu, DNA homolojisi, yapısal protein profilleri ve restriksiyon enzim analizleri gibi daha temel kriterler dikkate alınmaktadır (Mata ve Ritzenthaler 1988, Neve vd 1989, Benbadis vd 1990).

Buna karşılık konakçı spektrumunun belirlenmesi pratik uygulamalarda büyük yarar sağlamaktadır. Lotutier ve Novel tarafından 2 farklı litik grupta yer alan mezofilik streptokok virulent fajlarının DNA hibridizasyonu ve konakçı spektrumu arasında korelasyon saptanamamasına (Mata ve Ritzenthaler 1988), benzer şekilde, konakçı spektrumuna göre aynı grupta yer alan *S. thermophilus* fajlarının DNA homolojisine göre farklı gruplara girmesine karşılık (Neve vd 1989, Benbadis 1990), konakçı spektrumları ile restriksiyon analiz sonuçları arasında genelde iyi bir korelasyon bulunduğu açıklanması (Neve vd 1989, Sebastiani ve Jäger 1993) bu çalışmada belirlenen faj gruplarının da ileride yapılacak restriksiyon analizleri çalışmalarında (Tunail vd 1998) kullanılmasını öngörmektedir.

Denemelerde belirlenen faj konakçı ilişkilerine göre; bakteriler tüm fajlara duyarlı, 231.x7, 231.x10, B3.x17, B3.x19 fajları haricindekilere duyarlı ve dirençli olmak üzere üç grup altında toplanırken, fajlar da 709 konakçı suşla gelişemeyen, ancak 231 ve B3 konakçılarıyla gelişebilenler (231.x7, 231.x10, B3.x17, B3.x19) ve her üç konakçı suşla da gelişebilenler (diğer tüm fajlar) olmak üzere konakçı özgüllüklerine göre iki grup oluşturmuşlardır (Çizelge 4.5.). Bu iki faj grubu arasında farklılıklar bulunup bulunmadığı restriksiyon analizleri yapılarak araştırılabilir (Neve vd 1989, Sebastiani ve Jäger 1993).

Pratiğe yarar açısından incelendiğinde; işletmelerde rotasyona sokulacak kültürler belli olmuştur. 709 kültürü ile bir faj atağı yaşandığında, rotasyona sokulacak kültür kesinlikle 231 ve B3 olmamalı, dirençli suşlardan biri seçilmelidir. Faj problemi atlatıldıktan sonra teknolojik karakterleri nedeniyle tekrar bu duyarlı 3 kültürden biri rotasyona girebilir.

*S. thermophilus* suşlarında lizogeninin diğer laktik asit bakterilerine (LAB) göre çok düşük olması (Fayard vd 1993, Brüssow vd 1994, Brüssow ve Bruttin 1995, Neve 1996) nedeniyle, bu çalışmada izole edilen fajların, kökenini çiğ sütte alan yerel fajlar olma olasılığı çok yüksektir. 709 ve 231 kültürlerinin (miks) bütün teknolojik özelliklerinin (hızlı asitlik, kuvvetli yoğurt tadı = yüksek asetaldehit oluşumu ve düşük vizkozite) aynı olduğu ancak faj akrabalığı bulunmadığı ve faj ataklarında birbirlerinin yerine rotasyona sokulabileceği belirtilmiştir (Çizelge 3.1.). Halbuki deneme bulguları her iki suşun faj

akrabalığı, 4 faj için farklı olsa da, pratikte kullanılmasına olanak tanımayacak kadar yakındır. Bu farklı sonucun büyük olasılıkla üretici firmanın elinde bulunan ve bu çalışmada izole edilen fajların köken (ülke) farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Krusch vd 1987). Ayrıca fajlarda konakçı özgüllükleri de her zaman kalıcı bir özellik olarak görülmemelidir. Konakçı özgüllükleri; restriksiyon / modifikasyon (R/M) sistemleri, faj mutasyonları, almaç bölge değişimleri ve faj proteinlerinin modifikasyonlarına bağlı olarak değişime uğrayabilmektedir (Akçelik 1996). Farklı bakteri türleri arasında yaygın olan bir sistem de GATC sekansındaki R/M sistemidir. Modifikasyon, DNA' nın üç farklı restriksiyon enzimi tarafından kesilmesi ile olanaklıdır. Bu üç enzimin (DpnI, Nde II ve Sau 3A) hepsi GATC sekansı hedef alan tanıyıp kesebilmektedir. Benbadis vd (1990) yoğurt starterlerinin streptokok suşlarında böyle bir R/M sisteminin varlığını ileri sürmüşlerdir. Sebastiani ve Jäger (1993) ise inceledikleri 6 adet *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşundan 5 adedinde, GATC sekansındaki sitozinleri metilleyen R/M sisteminin olduğunu göstermişlerdir.

Bu irdelemelerden anlaşılacağı üzere; gerek faj kökeni (ülke) farklılıklarına, gerek faj mutasyonları ve konakçıdaki modifikasyonlara bağlı olarak, fajların konakçı özgüllüklerinin veya diğer bir deyişle suşların faj akrabalıklarının değişmez kabul edilmesi olanaklı değildir. Bu nedendir ki uygulamada faj kontrolü için rotasyon sistemi kullanılırken; işletmedeki yerleşik faj düzeyi sürekli kontrol edilmeli, dominant yerel fajlara karşı dirençleri test edilen kültürlerden dirençli olanlar rotasyona sokulmalı, firmaların bildirimlerine fazlaca itibar edilmemelidir (Daly 1983, Daly vd 1996, Durlu Özkaya vd 1999, Tunail vd 2000).

#### 4.4. Fajların Doğal (Yerel) Suşlardan Homolog Konakçılarının Belirlenmesi

Titreleri  $10^8$  pfu/ml olacak şekilde zenginleştirilen 23 adet faj filtratı, çeşitli örneklerden izole edilmiş olan 30 adet doğal (yerel) *S. thermophilus* suşu ile öncelikle çift tabaka agar yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış, ancak inkübasyon sonrasında faj plak etkinliği saptanamamıştır. Sonuçların doğrulanması amacıyla 23 adet faj ayrı ayrı 30 adet yerel *S. thermophilus* suşuyla sıvı besiyerinde (Modifiye M17 Broth) ardışık olarak 3 kez karşılaştırılmış ve tekrar çift tabaka agar plaklarına faj filtratları damlatılarak liziz

kontrol edilmiştir. Denenen doğal suşlardan hepsinin, 23 adet *S. thermophilus* fajına karşı dirençli oldukları görülmüştür. Çizelge 4.6.' da sonuçlar toplu olarak gösterilmektedir.

Bu sonuçları Krusch vd (1987)' nin araştırma bulguları ile de açıklamak olanaklı değildir. Araştırmacılar çeşitli yoğurt ve İsviçre tipi peynir örneklerinden topladıkları 59 adet *S. thermophilus* fajını (10 adedi İsviçre, 28 adet Almanya ve 21 adet Fransa orijinli) 70' ten fazla *S. thermophilus* suşuna karşı denemeler ve konakçı spesifikliklerini incelemişlerdir. Genelde farklı ülkelerden köken alan fajların farklı konakçı alanı gösterdiklerini ve birkaç faj-konakçı ilişkisi hariç tutulursa bu fajların diğer ülkelerden izole edilen bakterileri konakçı olarak kullanmadıklarını, ilginç bir ülke orijin-spesifik konakçı ilişkisi saptadıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada izole edilen ve kullanılan fajların yerel olma olasılığı çok daha fazla olduğuna göre yerel suşların bu dirençli durumunu fajların ülke orijini ile açıklamak olanaksızdır. Krusch vd (1987)' nin aksine Öner (1986) çoğunluğunu PAS' lardan izole ettiği 132 adet laktokoku (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*); İngiltere, Avustralya ve ABD' nin araştırma enstitülerinden temin ettiği 7 adet laktokok fajı ile tiplendirmiş, yerel suşların bu fajlara karşı % 64-99 arasında dirençli olduklarını (konak vazifesi görmediğini), ancak yabancı orijinli bu fajlara % 1-36 arasında duyarlı suşların varlığını da saptamıştır. O nedenle yerel suşların *S. thermophilus* fajlarına gösterdikleri bu direncin detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu denli kuvvetli direnç sistemine sahip suşların, alternatif yoğurt starteri olarak incelenmeleri ve uygun olanların kullanılmaları gerekir. Bu suşların ticari kültür olarak sürekli kullanılmaları halinde direnç durumlarını koruyup koruyamayacakları konusunda şimdiden değerlendirme yapmak ise mümkün değildir.

Çizelge 4.6. 30 adet doğal (yere) *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşunun, çeşitli örneklerden izole edilen 23 adet *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajına karşı duyarlılıkları

Bakteri	Faj Kod No																						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23
709	709	709	709	709	709	231	231	231	231	231	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	231	231
TH3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR27a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.3.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.3.2.i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.3.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.5.3.i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.7.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.7.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.7.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.7.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.7.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.12.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.6. (devam)

Bakteri	Faj Kod No																						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23
Kod No	709	709	709	709	709	709	231	231	231	231	231	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	B3	231	231
St.12.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.13.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.13.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.14.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.14.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.15.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.20.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.20.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.23.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.23.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.23.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.24.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.26.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
St.26.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



#### 4.5. Doğal (Yerel) ve Starter Kökenli *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Suşlarının *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Fajlarına Karşı Duyarlılıkları

9 adet liyofilize miks yoğurt kültüründen izole edilen *S. thermophilus* suşu ile Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden alınan çiğ süt örneklerinden izole 30 adet yerel *S. thermophilus* suşu, 25 adet *L. bulgaricus* fajı ile karşılaştırılarak faj-heterolog konakçı spesifikliğı test edilmiştir. Çift tabaka agar yöntemine göre her bir bakteri; Modifiye M17 Yumuşak Agar içerisinde önceden hazırlanmış Modifiye M17 Agar bulunan alt tabaka petri plakları üzerine yayılmıştır. Üstteki bakteriyel zemine *L. bulgaricus* faj filtratları damlatılarak faj ile bakteri karşılaştırılmış ve liziz incelenmiştir. Tüm *S. thermophilus* suşları beklendiğı üzere *L. bulgaricus* fajları tarafından lize edilememiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7. ve 4.8.' de gösterilmiştir.

Bu sonuç beklenmekle birlikte denemenin yürütülmesi iki açıdan önemli görülmüştür. Birincisi, liyofilize miks yoğurt kültürlerinden izole edilen suşların tanımlarının kesinlikle doğru olduğunun kanıtlanmasıdır ki elde edilen sonuçlarla bu sağlanmıştır. Diğer taraftan bazı bakterilerde olduğu gibi *S. thermophilus* suşlarının farklı türlere ait fajların heterolog konakçısı olabileceğı düşüncesinin eliminasyonudur. Örneğın *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* ve *Streptococcus diacetylactis* fajlarından bir kısmının her üç bakteriye de özgül olduğu gösterilmiştir (Öner 1986). Gerçi bugün bu türlerin tek bir tür olduğu, sadece alt türlerin heterolog konakçı görevi yaptıkları bilinmektedir. Yine ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus fermentum*' a ait iki virulent fajdan birinin, kendi konakçılarının dışında denenen *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus buchneri* türlerinden *L. brevis*' e konakçı özgülüğü gösterdiği saptanmıştır (Foschino vd 1995). Ayrıca Cluzel vd (1987b), *L. bulgaricus* LT4 (0448) lizogen suşa ait olan 0448 temperent faj için, *Lactobacillus lactis* CNRZ 326 suşunun indikatör olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışma ile *S. thermophilus* suşlarının kendi fajları dışında, simbiyotik ilişkide olduğu *L. bulgaricus* fajları ile ilişkili olmadığı kesinlik kazanmıştır.







## 4.6. Profaj İndüksiyon (Lizogeni) Çalışmaları

### 4.6.1. Uygun mitomisin C konsantrasyonunun belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin profaj indüksiyon çalışmalarında mitomisin C (MC) en etkili indükleyici ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak uygulanan bakteriye ve bakterinin bulunduğu fizyolojik duruma bağlı olarak etkili (optimum) MC konsantrasyonu değişebilmektedir. Örneğin laktobasillerde indüksiyon için optimum doz 0,1 µg/ml MC olarak belirlenirken (Mata vd 1986, Cluzel vd 1987a) laktokoklar için en etkili MC konsantrasyonu Jarvis ve Klaenhammer (1987) tarafından 1µg/ml olarak verilmiştir. Lakshmiddevi vd (1988) ise çalışmalarında aynı cins için 2,5 µg/ml MC oranını kullanmışlardır. Aydar (1992) yine doğal laktokok suşlarında optimum indüksiyon sıklığı için 4 µg/ml MC dozunu saptamışlardır. *S. thermophilus* lizogen suşlarının indüksiyon için Fayard vd (1993) 0,2 µg/ml oranında MC ile iyi sonuç alırlarken, Brüssow ve Bruttin (1995) 0,15 µg/ml MC dozunu yeterli bulmuşlardır.

Cluzel vd (1987a) yaptıkları çalışmada, profaj indüksiyonunda MC konsantrasyonunun yanında hücrelerin fizyolojik durumunun da belirleyici bir faktör olduğunu, denemelerde kullanılan laktobasil suşlarının, eksponansiyel (logaritmik) evrenin başlangıcında, bir başka ifade ile kültürde optik yoğunluğun 650 nm' de 0,2 absorbans değerine ulaştığı anda MC uygulamasının etkili indüksiyonla sonuçlandığını belirtmişlerdir.

*S. thermophilus* suşlarına uygulanacak MC konsantrasyonuna ilişkin veriler bulunmakla birlikte, doz yetersizliği veya doz fazlalığından kaynaklanabilecek olumsuzlukları önlemek amacıyla bu çalışmada kontrol lizogen suş *S. thermophilus* CNRZ 1205 ile optimum MC konsantrasyonunun belirlenmesi yoluna gidilmiştir. 3.2.7.1' de anlatıldığı üzere logaritmik evrenin başlangıcındaki hücelere farklı MC konsantrasyonları (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 µg/ml) uygulanmış, MC katılmayan kültür kontrol olarak kullanılmıştır. Logaritmik evrenin başlangıcı, Durlu Özkaya vd (1999)' nin *S. thermophilus* kültürleri için gelişme eğrisine göre kabul edilmiştir. Bu bakterilerin aktif kültürleri 3 saat süren lag evresinden sonra, optik yoğunlukları 0,2 Ekstinksiyon

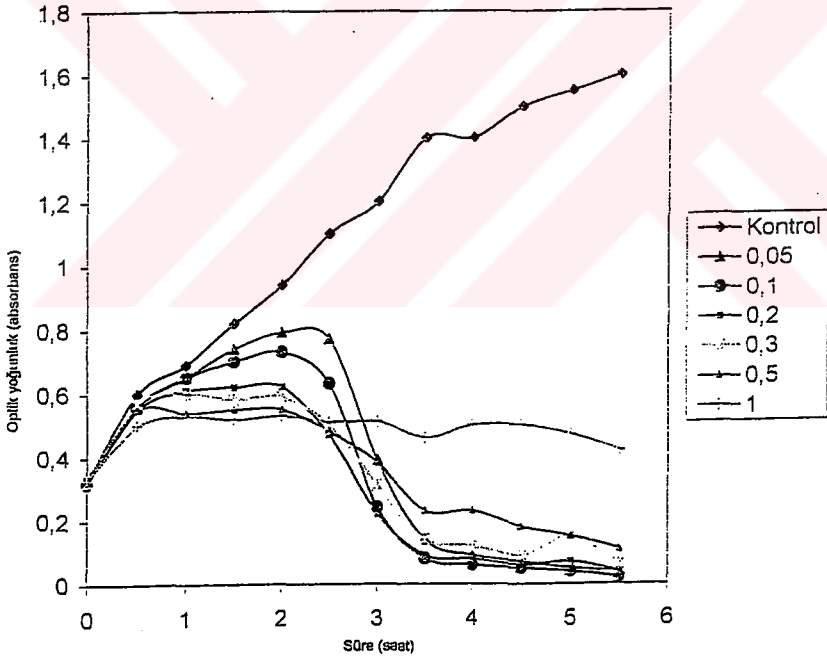
değerine ulaştığında logaritmik evreye geçmektedir. 37 °C' da indüksiyona bırakılan MC katılmış ve katılmamış kültürlerden 30 dk aralıklarla alınan örneklerde 650 nm' de (Spectronic 20, Bousch Lomb) spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Gelişmekte olan kültürlerde absorbens değerlerinin düşüşü lizizin göstergesi olarak kaydedilmiştir. *S. thermophilus* lizogenik kültürünün, değişik dozlarda uygulanan MC' den farklı etkilenecek lizize uğradığı görülmüştür (Çizelge 4.9., Şekil 4.5.). MC ilavesinden sonra 2 saat boyunca gelişme yavaş bir şekilde devam etmiş, bunu takip eden 3,5 saat içerisinde kültür tamamen lize olmuştur. İyi bir indüksiyonun klasik göstergesi, çan şeklinde bir eğri kabul edildiğinden (Cluzel vd 1987a, Fayard vd 1993), en iyi çan eğrileri veren 0,05 ve 0,1 µg/ml MC konsantrasyonları, optimum MC konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. Ancak *S. thermophilus* suşları için literatür verileri 0,15 ve 0,2 µg/ml MC dozları üzerinde yoğunlaştığından, suş farklılıklarına göre dozun değişebileceği de dikkate alınarak 30 adet doğal ve 9 adet starter kökenli *S. thermophilus* suşu ile yürütülen profaj indüksiyon çalışmalarında 0,05; 0,1; 0,2 µg/ml MC dozlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Bu dozların üzerinde, artan MC konsantrasyonları ile çan eğrisi giderek bozulmuştur. En yüksek doz olan 1,0 µg/ml MC ile kültürün gelişiminde genel bir inhibisyon görülmüşse de lizizi gösteren tipik eğri elde edilememiştir (Şekil 4.5.).

#### 4.6.2. Doğal (yerel) ve starter kökenli *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarında profaj indüksiyonu

30 adet doğal ve liyofilize yoğurt kültüründen köken alan 9 adet *S. thermophilus* suşuna Modifiye M17 Broth besiyerinde 4.6.1' de belirlenen optimum MC konsantrasyonları (0,05; 0,1; 0,2 µg/ml) uygulanmıştır.

Çizelge 4.9. MC ile indüklenen lizogen *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 1205 kültürlerinde inkübasyon süresince izlenen optik yoğunluk (absorbans) değerleri

MC Kons. (µg/ml)	Süre (saat)											
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
Kont.	0.33	0.60	0.69	0.82	0.94	1.10	1.20	1.40	1.40	1.50	1.55	1.60
0.05	0.33	0.56	0.65	0.74	0.79	0.77	0.39	0.14	0.09	0.07	0.05	0.04
0.1	0.32	0.56	0.65	0.70	0.73	0.63	0.24	0.08	0.06	0.05	0.04	0.02
0.2	0.32	0.55	0.61	0.62	0.62	0.47	0.22	0.09	0.08	0.06	0.07	0.04
0.3	0.32	0.57	0.60	0.58	0.59	0.50	0.31	0.14	0.12	1.09	0.15	0.06
0.5	0.32	0.55	0.54	0.55	0.55	0.48	0.38	0.23	0.23	0.18	0.15	0.11
1.0	0.33	0.50	0.53	0.52	0.53	0.51	0.51	0.46	0.50	0.50	0.47	0.42



Şekil 4.5. MC konsantrasyonlarının lizogen suş *S. salivarius* subsp. *thermophilus* CNRZ 1205' in gelişimine etkisi

Suşların herhangi birinin lizogen olarak belirlenmesi durumunda; lize olan kültürün 0.45 µm porlu membran filtreden (Sartorius, Germany) geçirilerek temperent faj filtratının elde edilmesi, çift tabaka agar yöntemi ile denenen indikatör bakteriler arasında konakçısının belirlenmesi, konakçısı ile geliştirilen fajın tek plak izolasyonu ve titresi artırılan temperent fajın korunmaya alınması planlanmıştır. Ancak yapılan denemeler sonucunda ne doğal, ne de starter kökenli *S. thermophilus* suşlarının lizogenik karakterli olmadıkları görülmüştür (Çizelge 4.10., Çizelge 4.11.).

Doğal *S. thermophilus* suşlarının, 23 adet *S. thermophilus* virulent fajına karşı gösterdikleri direnç ve lizogen karakter sergilememeleri, bu suşların henüz endüstriyel kullanıma girmedikleri, çiğ sütlerde faj titresinin düşüklüğü (Neve 1996) nedeniyle fajlarla fazlaca rastlaşmadıkları ve henüz duyarlılık geliştirmedikleri şeklinde yorumlanabilir. Ne var ki Smaczny'nin 1983 yılında hepsini çiğ süttten izole ettiği ve incelediği 24 *S. thermophilus* suşundan 6 adedini (%25) lizogen olarak belirlemesi (Fayard vd 1993), bu sonuçlara böyle bir yorum getirilmesini önlemektedir. Diğer taraftan, endüstride kullanılan starter kökenli 9 adet *S. thermophilus* suşundan hiçbirinde profaj indüksiyonunun başarısız olması, sınırlı sayıda *S. thermophilus* suşu kullanılmasına bağlanmıştır. Çünkü laktik asit bakterilerinde yaygın bir özellik olan lizogenin *S. thermophilus* suşlarında ender rastlanan bir fenomen olduğu sıkça belirtilmiştir (Sechaud vd 1988, Brüssow vd 1994, Neve 1996). 17 adet *S. thermophilus* suşu ile yürütülen indüksiyon çalışmalarında 2 suşun (%12) lizogenik karakterde olduğu Neve tarafından belirlenirken Carminati ve Giraffa , 45 adet *S. thermophilus* arasından sadece 1 adedinin (%2) MC ile indüklendiğini göstermiştir (Fayard vd 1993). Fayard vd (1993)' nin yürüttükleri kendi çalışmalarında 120 *S. thermophilus* suşunu denemeye almaları sonucu lizogenik suş sayısı 12 (%10) olarak belirlenmiştir. Buna karşılık Brüssow vd (1994) 100 adet *S. thermophilus* starter suşundan yalnızca 2 adedinin (%2), Brüssow ve Bruttin (1995) de 196 *S. thermophilus* suşundan sadece 3' ünün (%1.53) lizogen olduğunu saptamışlardır. Son araştırmacılar; suş koleksiyonlarında lizogeninin seyrek görüldüğünün altını çizmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasından yola çıkılarak bundan sonra yapılacak indüksiyon çalışmalarında; starter kökenli suşların sayıları artırıldığı, doğal suşların sayılarının artırılması yanında bu çalışmada kullanılan MC dozlarının üzerine çıktığı takdirde *S. thermophilus* suşlarında lizogeninin



yakalanabileceği varsayılabilir. Çünkü kontrol lizogenik suшта belirlenen optimum MC konsantrasyonlarının doğal suşlar için yetersiz kalmış olabileceği de bir olasılık olarak düşünölmeli ve dikkate alınmalıdır.

Çizelge 4.10. 3 farklı MC konsantrasyonu ile indöklenen doğal (yerel) *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının lizogeni durumları

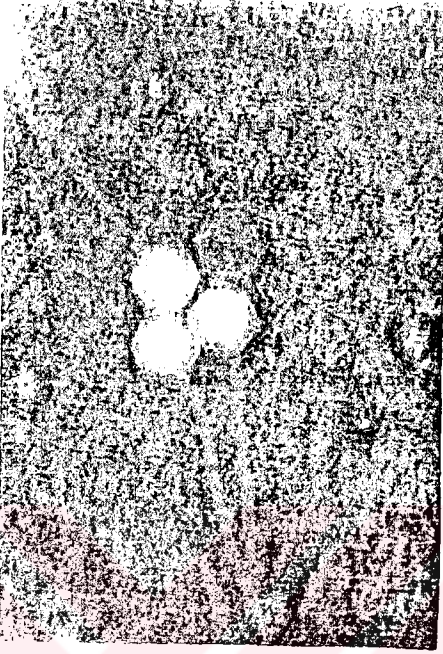
Bakteri Kod No	MC konsantrasyonları (µg MC/ml)		
	0.05	0.1	0.2
TH3	-	-	-
MR27a	-	-	-
24b	-	-	-
St.1.2	-	-	-
St.1.4	-	-	-
St.3.1	-	-	-
St.3.2.i	-	-	-
St.3.3	-	-	-
St.5.3.i	-	-	-
St.7.1	-	-	-
St.7.5	-	-	-
St.7.6	-	-	-
St.7.7	-	-	-
St.7.8	-	-	-
St.12.2	-	-	-
St.12.4	-	-	-
St.12.5	-	-	-
St.13.5	-	-	-
St.13.6	-	-	-
St.14.3	-	-	-
St.14.5	-	-	-
St.15.4	-	-	-
St.20.1	-	-	-
St.20.3	-	-	-
St.23.1	-	-	-
St.23.3	-	-	-
St.23.5	-	-	-
St.24.2	-	-	-
St.26.2	-	-	-
St.26.5	-	-	-

Çizelge 4.11. 3 farklı MC konsantrasyonu ile indüklenen starter kökenli *S. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının lizogeni durumları

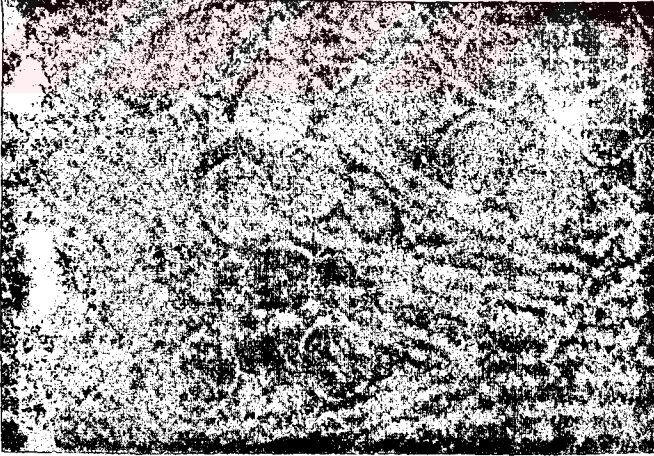
Bakteri Kod No	MC konsantrasyonları ( $\mu\text{g MC/ml}$ )		
	0.05	0.1	0.2
231	-	-	-
709	-	-	-
632	-	-	-
V1	-	-	-
V2	-	-	-
Y1	-	-	-
Y4	-	-	-
B3	-	-	-
CH-1	-	-	-

#### 4.7. Bazı *S. salivarius* subsp. *thermophilus* Fajlarının Elektron Mikroskopik Mikrografları

Örnek olarak seçilen 231.x21  $\Phi$  ve 709.x4  $\Phi$  *S. salivarius* subsp. *thermophilus* fajlarına 3.2.8' de anlatılan işlemler uygulanarak elektron mikroskop preparatları hazırlanmıştır. Preparatların Joel-JEM S-100 transmisyon elektron mikroskopunda incelenmeleri sonucunda izometrik, hegzagonal baş ve uzun kuyruk yapıları belirlenmiş, çeşitli büyütmelerde alınan fotoğraflar Şekil 4.6.-4.7.' de gösterilmiştir. Bu çalışma, fajların morfolojik özellikleri hakkında daha detaylı bilgi (baş çapı, kuyruk uzunluğu, kuyruk eni) edinmek üzere yapılacak olan bir sonraki elektron mikroskobu çalışması için bir ön çalışma, ön bilgi niteliğinde olmuştur.



Şekil 4.6. 231.x21 fajının elektron mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.7. 709.x4 fajının elektron mikroskopik görüntüsü

## 5. SONUÇ

1. Bu çalışmada starter kökenli 709, 231 ve B3 kodlu *S. thermophilus* suşları konakçı olarak kullanılarak çeşitli ürünlerden 23 adet *S. thermophilus* fajının izolasyonu başarılmıştır. Fajların bir kısmının identik olabilecekleri varsayılrsa bile *S. thermophilus* faj koleksiyonunun nüvesi sağlanmıştır. Elde edilen fajlar bir başka proje kapsamında süren elektron mikroskopik ve faj protein profilleri çalışmalarının materyalini oluşturmuştur.
2. Yoğurt fabrikalarında kullanılan kültürlerin elde bulunan fajlara göre konakçı spektrumları belirlenmiş; 709, 231 ve B3 suşlarının faj akrabalığının yüksek bulunması nedeniyle rotasyonda ardarda kullanılamayacağı, herhangi bir faj atağında dirençli suşların (V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, Y<sub>1</sub>, Y<sub>4</sub>, CH-1, 632) rotasyona sokulmasının uygun olacağı gösterilmiştir.
3. 709, 231 ve B3 suşları ile izolasyonu gerçekleştirilen fajların tür içi homolog ve heterolog konakçıları belirlenmiş, homolog konakçılardan herbirinin diğer iki suşa ait fajların büyük çoğunluğuna veya tamamına heterolog oldukları gösterilmiştir. *S. thermophilus* suşlarının hiçbiri partneri olan *L. bulgaricus*' un fajlarına heterolog konakçı olarak davranmamıştır.
4. Doğal (yerel) *S. thermophilus* suşlarının elde bulunan fajlara karşı dirençli oldukları gösterilmiştir. Bu sonuç hem suşlarda faj direnç mekanizmalarının araştırılması, hem de alternatif doğal (yerel) starter suş olarak endüstriyel öneme sahip özelliklerin belirlenmesi açısından önemli bulunmuştur.
5. Starter kökenli ve doğal *S. thermophilus* suşlarının lizogenik karakterli olmamaları her iki grubun da endüstride güvenle kullanılabilmesinin göstergesi olarak önem taşımaktadır.

6. *S. thermophilus* fajlarından örnek olarak seçilen 709.x4 Ø ve 231.x21 Ø'larının elektron mikroskopik mikrografları boyutları henüz saptanmamış olsa da bunların da diğer *S. thermophilus* fajları gibi Bradley' in B grubuna veya Ackermann' ın *Siphoviridae* grubunun üyesi olduğunu göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Akçelik, A. 1996. Laktokok fajları ve süt endüstrisindeki önemi. *Gıda Dergisi*, 21 (5); 311-315.
- Amorosa, M. J., Manca De Narda, M. C. and Oliver, G. 1988. Glucose, galactose, fructose, lactose and sucrose utilization by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial yoghurt. *Milchwissenschaft*, 43 (10); 626-631.
- Anonymous, 1993. ATL Phage Test, CHL AP 1017.
- Arda, M. 1997. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, 490 s., Ankara.
- Arendt, E.K., Van De Guchte, M. Coffey, A. G., Daly, C. and Fitzgerald, G.F. 1993. Molecular genetics of bacteriophages of lactic acid bacteria. *Lait*, 73; 191-198.
- Aydar, L.Y. 1992. Laktik streptokok fajlarının izolasyonu ve elektron mikroskobu ile incelenmeleri. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Benbadis, L., Faelen, M., Slos, P., Fazel, A. and Mercenier, A. 1990. Characterization and comparison of virulent bacteriophages of *Streptococcus thermophilus* isolated from yogurt. *Biochimie*, 72; 855-862.
- Bhimani, S. R. and Freitas, M. Y. 1991. Isolation and characterization of the bacteriophages of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 74; 1461-1471.
- Billing, E. 1969. Isolation of growth and preservation of bacteriophage. In "Methods in Microbiology. Eds. J. R. Norris, D. W. Robins pp. 315-329". Academic Press, 369., London.
- Brüssow, H., Frémont, M., Bruttin, A., Sidoti, J., Constabla, A. and Fryder, V. 1994. Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (12); 4537-4543.
- Brüssow, H. and Bruttin, A. 1995. Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. *Virology*, 212; 632-640.
- Bruttin, A. and Brüssow, H. 1996. Site-specific spontaneous deletions in three genome regions of a temperate *Streptococcus thermophilus* phage. *Virology*, 219; 96-104.
- Cibilis, E. 1970. Characterization of a bacteriophage of *Streptococcus thermophilus*. *Adteilung*, 125 (6); 541-554.

- Cluzel, P. J., Veaux, M., Rousseau, M. and Accolas, J. P. 1987a. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. J. Dairy Research, 54; 397-405.
- Cluzel, P. J., Serio, J. and Accolas, J. P. 1987b. Interactions of *Lactobacillus bulgaricus* temperate bacteriophage 0448 with host strains. Appl. Environ. Microbiol., 53 (8); 1850-1854.
- Daly, C. 1983. The use of mesophilic cultures in dairy industry. Antonie van Leeuwenhoek, 49; 297-312.
- Daly, C., Fitzgerald, G. F. and Davis, R. 1996. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. Antonie van Leeuwenhoek, 70; 99-110.
- Davidson, B. E., Powell, I. B. and Hiller, A. J. 1990. Temperate bacteriophages and lysogeny in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 87, 79-90.
- Deane, D. O., Nelson, F. E., Ryser, F. C. and Carr, P. H. 1953. *Streptococcus thermophilus* bacteriophage from Swiss cheese whey. J. Dairy Sci., 36 (1); 185-191.
- Desiere, F., Lucchini, S. and Brüssow, H. 1998. Evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophage genomes by modular exchanges followed by point mutations and small deletions and insertions. Virology, 241; 345-356.
- Durlu, F. 1991. Türkiye' de peynir yapımında kullanılan streptokok içeren ticari starterlerin yerli bakteriyofajlara karşı dirençliliklerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi (basılmamış). Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Durlu Özkaya, F., İç, N. ve Tunail, N. 1999. Termofilik fajlara dirençli yoğurt kültürleri ve rotasyon. Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, XI. KÜKEM-Biyoteknoloji Kongresi Özel Sayısı, 23 (2); 7-8.
- Farrow, J. A. E. and Collins, M. D. 1984. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. J. Gen. Microbiol., 130; 357-362.
- Fayard, B., Haefliger, M. and Accolas, J. P. 1993. Interactions of temperate bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* with lysogenic indicators affect phage DNA restriction patterns and host ranges. J. Dairy Research, 60; 385-399.
- Foschino, R., Perrone, F. and Galli, A. 1995. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. J. Appl. Bacteriol., 79; 677-683.

- Friedrich, A. 1979. Lysogenie bei kommerziell genutzten Milchsäurestreptokokken. Aus den Institut für Microbiologie der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, 362p., London.
- Herman, R. E. and McKay, L. L. 1985. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 50 (4); 1103-1106.
- Jarvis, A. W. and Klaenhammer, T. R. 1987. Bacteriophage resistance plasmid pTR2030 inhibits lytic infection of  $\tau_{1t}$  temperate bacteriophage but not induction of  $\tau_{1t}$  prophage in *Streptococcus cremoris* R1. Appl. Environ. Microbiol., 53 (2); 385-389.
- Jarvis, A. W. 1989. Bacteriophages of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci., 72; 3406-3428.
- Kivi, S., Peltomäki, T., Luomala, K. and Sarimo, S. S. 1987. Some properties of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. Fotra Microbiology, 32; 101-106.
- Kraus, J. and Geller, B. L. 1998. Membrane receptor for prolate phage is not required for infection of *Lactococcus lactis* by small or large isometric phages. J. Dairy Sci., 81; 2329-2335.
- Krusch, U., Neve, H., Luschei, B. and Teuber, M. 1987. Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 39 (3); 155-167.
- Lakshmidēvi, G., Davidson, B. E. and Hiller, A. J. 1988. Circular permutation of the genome of a temperate bacteriophage from *Streptococcus cremoris* BK5. Appl. Environ. Microbiol., 54 (4); 1039-1045.
- Lawrence, R. C. 1978. Action of bacteriophage on lactic acid bacteria: consequences and protection. New Zealand J. Dairy Sci. Techn., 13; 129-136.
- Lembke, J., Krusch, U., Lompe, A. and Teuber, M. 1980. Isolation and ultrastructure of bacteriophages of group N (lactic) streptococci. Zbl. Bact., I. Abt. Orig. C, 1; 79-91.
- Lembke, J. and Teuber, M. 1981. Inaktivierung von Bacteriophagen durch Desinfektionsmittel. Deutsche Molkereizeitung, 18; 2-6.
- Mata, M., Trautwetter, A., Luthaud, G. and Ritzenthaler, P. 1986. Thirteen virulent and temperate bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* belong to a single DNA homology group. Appl. Environ. Microbiol., 52 (4); 812-818.



- Mata, M. and Ritzenthaler, P. 1988. Present state of lactic acid bacteria phage taxonomy. *Biochimie*, 70; 395-399.
- Moineau, S., Walker, S. A., Holler, B. J., Vedamuthu, E. R. and Vandenberg, P. A. 1995. Expression of a *Lactococcus lactis* phage resistance mechanism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (7); 2461-2466.
- Möller, V. and Teuber, M. 1988. Selection and characterization of phage-resistant mesophilic lactococci from mixed-strain dairy starter cultures. *Milchwissenschaft*, 43 (8); 482-486.
- Neve, H., Krusch, U. and Teuber, M. 1989. Classification of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* isolated from yoghurt and Swiss-type cheese. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30; 624-629.
- Neve, H. 1996. Bacteriophage. In " Dairy Starter Cultures. Eds. T. M. Cogan, J. P. Accolas pp. 157-189 " VCH-Verlag, Weinheim.
- Öner, Z. 1986. Peynir ve peyniraltı suyunda bulunan laktik streptokokların özgül fajlarının aranması ve konakçıları belli bazı laktik fajlara karşı özgülüklerinin saptanması. A.Ü. Fen Bil. Ens. Doktora Tezi, Ankara.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. 1993. *Microbiology*. Wm. C. Brown Communication, Inc., 2<sup>nd</sup>. Edition, 912 p., USA.
- Rasic, J. and Kurmann, A. J. 1978. *Yoghurt*. Technical Dairy Publishing House, 466 p., DK-2720 Vanlose, Copenhagen, Denmark.
- Ray, B. 1992. Cells of lactic acid bacteria as food biopreservatives. In " Food Biopreservatives of Microbial Orijin. Eds. B. Ray, M. Daeschel pp. 81-101 ". CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Reinbold, G. W. and Reddy, M. S. 1973. Bacteriophage for *Streptococcus thermophilus*. *Dairy Industries*, 413-416.
- Reinbold, G. W., Reddy, M. S. and Hammond, E.G. 1982. Ultrastructures of bacteriophages active against *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Food Protection*, 45 (2); 119-124.
- Riemelt, I., Bartel, B. and Malcran, M. 1996. *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*. B. Behr' s Verlag GmbH., 382 p., Hamburg.
- Robinson, R. K. 1999. Fermented Milks/Yoghurt. In "Encyclopedia of Food Microbiology. Eds. R. K. Robinson, C. A. Batt, P. D. Patel pp. 784-791 ". Academic Press, London.

- Sanders, M. E. 1988. Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70; 411-421.
- Sandine, E. W. 1979. Lactic starter culture technology. Pfizer Cheese Monographs, 6; 24-41.
- Sebastiani, H. and Jäger, H. 1993. Bacteriophages of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*: characterization of hereditary relationships and determination of virus-host interaction. *Milchwissenschaft*, 48 (1); 25-29.
- Sechaud, L., Cluzel, P. J., Rousseau, M., Baumgartner, A. and Accolas, J. P. 1988. Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie*, 70; 401-410.
- Smaczny, T. and Krämer, J. 1984. Acidification disturbance in manufacture of yogurt, Bioghurt and Biogarde caused by bacteriocins and bacteriophages of *Streptococcus thermophilus*. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 105; 614-618.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (Eds) 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. William and Wilkins, Baltimore.
- Sozzi, T., Maret, R. and Poulin, J. M. 1976. Study of plating efficiency of bacteriophages of thermophilic lactic acid bacteria on different media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32 (1); 131-137.
- Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M. 2000. Çiğ süt ve peyniraltı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları. *Doğa (Turkish J. Biology)*, 24; 425-435.
- Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol.*, 29 (6); 807-813.
- Teuber, M. and Lembke, J. 1983. The bacteriophages of lactic acid bacteria with emphasis on genetic aspects of group N lactic streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49; 283-295.
- Tunail, N. ve Aşkın, O. 1991. Çiğ sütlerden laktik streptokok bakteriyofajlarının izolasyonu ve yerli laktik streptokok suşları ile ticari starterlerin faj dirençliliklerinin belirlenmesi. *Doğa Dergisi*, 15 (3); 785-791.
- Tunail, N., Ayhan, K., Akçelik, M., Durlu Özkaya, F., Doğan, H. B., Kaleli, D. ve Tükel, Ç. 1998. Yoğurt fabrikalarında faj probleminin çözümüne yönelik araştırmalar. Tübitak/TARP-2106 Nolu Proje (Devam ediyor).

- Tunail, N., Demirtaş, D. ve Durlu Özkaya, F. 2000. Yoğurt fabrikalarında görülen bakteritofaj problemi, nedenleri ve çözüm önerileri. Alınmıştır “ Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı. Eds M. Demirci pp. 113-125 ” Rebel Yayıncılık, 595s., Tekirdağ.
- Tunail, N. ve Köşker, Ö. 1989. Süt mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1116, 138 s., Ankara.
- Turantaş, F. 1998. Fermente gıdalar. Alınmıştır, “ Gıda Mikrobiyolojisi. Eds A. Ünlütürk, F. Turantaş pp. 455-481 ” Mengi Tan Basımevi, 605 s., İzmir.
- Ünlütürk, A., Karapınar, M. ve Turantaş, F. 1998. Gıdalarda önemli mikroorganizmalar. Alınmıştır, “ Gıda Mikrobiyolojisi. Eds A. Ünlütürk, F. Turantaş pp. 11-44 ” Mengi Tan Basımevi, 605 s., İzmir,

## EK-1 ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

### 1.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Sodyum klorür	8,5 g
Destile su	1000 ml

Sodyum klorür destile su içerisinde çözülmüş, tüplere 9' ar ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 121 °C' da 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

### 1.2. LAPT<sub>L10</sub> Agar (Amorosa vd 1988)

Pepton	15g
Tripton	10g
Maya ekstraktı	10g
Tween 80	1ml
Laktoz	10g
Agar	10g
Destile Su	1000ml

Yukarıdaki maddeler tartılarak destile suda çözülmüş, pH 6,6' ya ayarlanmış, 118 °C' da 20 dakika süreyle sterilize edilmiş ve petrilere dağıtılmıştır.

### 1.3. M17 Agar (Merc)

Ticari olarak bulunan besiyerinden, 1 litre destile suda 42,5 g dehidre M17 Broth (Merc) çözülmüş ve sıvı besiyeri olarak hazırlanan bu besiyerine 15 g agar katılarak 121 °C' da 15 dakika sterilize edilmiştir. pH 7,2 ± 0,2 olan besiyeri steril petrilere dağıtılmıştır.

#### 1.4. Modifiye M17 Broth (Krusch vd 1987)

---

Fiton pepton	5,0g
Poly pepton	5,0g
Maya ekstraktı	2,5g
Et ekstraktı	5,0g
Laktoz	5,0g
Askorbik asit	0,5g
Sodyum-β-gliserofosfat	9,5g
1M MgSo <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,0ml
1M CaCl <sub>2</sub>	1,2ml
Destile su	1000ml

---

M17 Broth (Terzaghi ve Sandine 1975), daha iyi bir bakteri gelişimi sağlamak için modifiye edilmiştir. Bu modifikasyonda sodyum-β-gliserofosfat miktarı 9,5 g' a indirilmiş, laktoz miktarı 8,0 g' a yükseltilmiş ve 1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisinden 1 litre için 1,2 ml ilave edilmiştir. Tüm bileşenler destile suda çözdürüldükten sonra tüplere dağıtılmış ve 121 °C' da 15 dakika sterilize edilmiştir (pH 7,2 ± 0,2).

#### 1.5. Modifiye M17 Agar (Krusch vd 1987)

M17 Broth besiyerine %1,5 agar ve %0,8 laktoz katılarak elde edilmiş ve 121 °C' da 15 dakika sterilize edildikten sonra steril petrilere dağıtılarak kullanılmıştır (pH 7,2 ± 0,2).

**1.6. Modifiye M17 Yumuşak Agar**  
(thM17 Yumuşak Agar) (Krusch vd 1987)

---

Fiton pepton	2,4g
Poly pepton	2,4g
Maya ekstraktı	2,0g
Kasamino asit	2,4g
Et ekstraktı	3,3g
Askorbik asit	0,4g
Sodyum- $\beta$ -gliserofosfat	12,7g
1 M MgSO <sub>4</sub>	1,3ml
Agar	6,0g
Elliker Broth (Difco)	16,0g
Destile su	1000ml

---

Tüm bileşenler katıldıktan sonra kaynatmak suretiyle agar eritilip tüplere 3' er ml olacak şekilde dağıtılmıştır. 121 °C' da 15 dakika sterilizasyondan sonra tüplere aseptik şartlarda 0,1 ml steril Skim Milk ilave edildikten sonra kullanılmıştır (pH 7,2  $\pm$  0,2).

**1.7. Neutral Red Chalk Lactose (NRCL) Agar (Harrigan ve McCance 1966)**

---

Laktoz	10g
Pepton	3g
Lab-Lemco et ekstraktı (Oxoid)	3g
Maya ekstraktı	3g
Agar	15g
Kalsiyum karbonat	15g
Neutral red (%1'lik)	5ml
Destile su	1000ml

---

Kalsiyum karbonat ve neutral red çözeltileri hariç diğerleri; destile suda çözülmüş, pH 6,8' e ayarlanmış ve 121 °C' da 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyeri katılaşmadan hemen önce (45-50 °C) yine 121 °C' da 15 dakika sterilize edilmiş olan kalsiyum karbonat çözeltisinden litreye 15g ve %1' lik neutral red çözeltisinden litreye 15 ml olacak şekilde aseptik koşullarda katılarak petrilere dağıtılmıştır.

#### 1.8. Skim Milk (Birtat/DanoneSa Ltd' den)

---

Skim Milk	100g
Destile Su	1000ml

---

Skim Milk destile su içerisinde iyice çözüldükten sonra 10' ar ml olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve 110 °C' da 15 dakika sterilize edilmiştir.

YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş.  
KARAGÖZ YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş.  
KARAGÖZ YATIRIM MENKUL DEĞERLER A.Ş.

## ÖZGEÇMİŞ

29.11.1977 tarihinde Lefkoşa' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Lefkoşa' da tamamladı. 1994 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü' nden 1998 yılında Gıda Mühendisi ünvanıyla mezun oldu. Aynı yılda Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı' nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**