



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL *Streptococcus thermophilus* İZOLATLARINDA  
HORIZONTAL KONJUGASYONUN İNCELENMESİ**

**ALTUĞ KARAMAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2012**

T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL *Streptococcus thermophilus* İZOLATLARINDA  
HORIZONTAL KONJUGASYONUN İNCELENMESİ**

**ALTUĞ KARAMAN**

**Bu tez,  
Zootekni Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS  
derecesi için hazırlanmıştır.**

**KAHRAMANMARAŞ 2012**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Altuğ Karaman tarafından hazırlanan “Doğal *Streptococcus thermophilus* İzolatlarında Horizontal Konjugasyonun İncelenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 13 /08 / 2012 tarihinde oy birliği ile Zootekni Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Sait Ekinci .....  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Zootekni Anabilim Dalı

Doç. Dr. İsmail Akyol .....  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyomühendislik Bilimleri Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Uğur Çömlekcioglu .....  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA .....  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Altuğ Karaman

Bu çalışma KSÜ Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No:

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

# DOĞAL *Streptococcus thermophilus* İZOLATLARINDA HORIZONTAL KONJUGASYONUN İNCELENMESİ

ALTUĞ KARAMAN

## ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan yoğurtlardan izole edilen ve K.S.Ü. Ziraat fakültesi Zootečni Bölümü BİGEM mikrobiyal kültür koleksiyonuna bulunan 106 adet *Streptococcus thermophilus*'un konjugasyon potansiyellerinin moleküler olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanılan izolatlardan 45 tanesinde konjugasyona teşvik edici gen olan *comX*'in varlığı PZR tekniği ile belirlenmiştir. Elde edilen 45 izolattan 6 tanesi konjugasyon ile referans *E. coli*'de bulunan pNZ276 plazmitini değişik frekanslarda kazanmışlardır. Dolayısı ile gıda açısından başlangıç kültürü olarak kullanılan *Streptococcus thermophilus* izolatlarının dışarıdan konjugasyonla gen kazanımları üzerinde *comX* geni rol oynamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptococcus thermophilus*, *comX*, *E. Coli*, pNZ276

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Zootečni Anabilim Dalı, Haziran /2012

Danışman: Prof. Dr. M. Sait Ekinci

Sayfa sayısı: 26

**ANALYSIS OF HORIZONTAL CONJUGATION IN NATURAL ISOLATES OF  
*Streptococcus thermophilus***

**ALTUĞ KARAMAN**

**ABSTRACT**

The Aim of this study was to determinate conjugation potentials of *S. thermophilus* strains which were isolated from yoghurt samples that have been collected from different regions of Turkey. 106 isolates were used which have been in KSU Agriculture Faculty Department of Animal Science, BIGEM laboratory culture collection. Out of the 106, in 45 isolates has been shown existence of *comX* gene which has stimulatory effect on conjugation by polymerase chain reaction. Out of 45 isolates 6 were selected as a transconjugant colony which is transfer *E. coli* pNZ276 plasmid. *comX* gene from this isolates has been analysed and gene exprexision and sequence data has proved that it is responsible for conjugation in *S. thermophilus* strains.

**Key Words:** *Streptococcus thermophilus*, *comX*, *E. Coli*, pNZ276

Kahramanmaraş Sütçü İmam University  
Institute for Graduate Studies in Science and Technology  
Department of Zootechni / August 2012

Supervisor: Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ

Page number: 26

## DOĞAL *Streptococcus thermophilus* İZOLATLARINDA HORIZONTAL KONJUGASYONUN İNCELENMESİ

### ÖZET

*Streptococcus thermophilus* süt endüstrisinde önemli yere sahip ve süt fermentasyonunda başlangıç kültürü olarak kullanılmaktadır. Gıda güvenliği açısından başlangıç olarak kullanılan kültürlerin dışarıdan gen transferine karşı korunaklı olması istenmektedir. Dolayısıyla ile bu çalışmada, doğal yoğurtlardan izole edilmiş 106 adet *Streptococcus thermophilus*'un izolatında PZR ile konjugasyon potansiyelleri *comX* geni üzerinden moleküler olarak belirlenmiştir. Toplam 45 izolatta *comX* geni varlığı tespit edilmiştir. Bu 45 izolatın tamamında transkonjugant kolonilerinin oluşup oluşmadığının teyidi yapılmıştır. Kolonilerde konjugasyon referans *E.coli*'de bulunan pNZ276 plazmiti kullanılarak yapılmıştır. Bu plazmit hem *E.coli* hemde *S.thermophilus*'larda replike olabilme özelliğine sahiptir. Konjugasyon *E. coli* ve *Streptococcus thermophilus* türlerinin aynı petride bütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Trans konjugasyon seçimi pNZ276 plazmitinin Eritromisin direnç özelliğine göre seçilmiştir. Ayrıca iki türü birbirinden ayırmada katalaz testi kullanılmıştır. 45 izolatın 6 tanesinde (7, 24, 30, 36, 37, 46) transkonjugasyon belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *comX* gen varlığı konjugasyon üzerinde rol almaktadır.

# ANALYSIS of HORIZONTAL CONJUGATION IN NATURAL ISOLATES of *Streptococcus thermophilus*

## SUMMARY

*S. thermophilus* has very important place in milk industry and used as starter culture for fermentation. In terms of the food safety the starter cultures must have protection system against foreign gene transfer. Therefore in this work, conjugation potentials of 106 species of *S. thermophilus* which were isolated from natural yoghurt samples were identified for the existence of *comX* gene, using PZR technique. Totally, existence of *comX* gene in 45 isolates were determined. Being transconjugant colony for all these isolates has been verified. Verifying of transconjugant colonies was determined by pNZ276 plasmid which present in *E. coli*. This plasmid naturally presents in *E. coli* and has able to replicate in *S. thermophilus*. Conjugation was performed in same petri dishes by growing up both *E. coli* and *S. thermophilus*. Transconjugants were selected by erythromycin resistance which is encoded by pNZ276 plasmid. Catalase test also used to distinguish these two species. 6 of 45 isolates were determined as transconjugant (7, 24, 30, 36, 37, 46). In addition, expression analysis of *comX* gene showed that its presence in bacteria is responsible for the high conjugation frequency between strains by comparing with control group.

## TEŞEKKÜR

“*Streptococcus Thermophilus* Türlerinde Konjugasyon” isimli tez alıőmamda bana her türlü yardımda bulunan ve fedakârlığını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ’ye, BİGEM laboratuvarı alıőanları Arő. Gör. Ferit Can YAZDIÇ’a ve Elif KÖKSALAN’a ayrıca ÜSKİM Mikrobiyoloji ve Mikrobial Genetik Laboratuar alıőanlarına (F. Gül ÖZÇELİK, Fadime TOPÇAL, Tolga GÜRKAN ve Ebru SEVEN) teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| ÖZ.....  | i   |
| ABSTRACT .....   | ii  |
| ÖZET .....   | iii |
| SUMMARY .....  | iv  |
| TEŞEKKÜR .....   | v   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | vi  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....  | lix |
| 1. GİRİŞ .....   | 1   |
| 1.1. Laktik Asit Bakterileri .....   | 1   |
| 1.2. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması.....   | 2   |
| 1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Kullanımı .....  | 3   |
| 1.4. Laktik Asit Bakterilerinde Konjugasyon Özellikleri .....  | 4   |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....  | 7   |
| 3. MATERYAL VE METOT.....  | 8   |
| 3.1. Materyal .....  | 9   |
| 3.1.1. Kimyasallar.....  | 9   |
| 3.1.2. Laktik Asit Bakterileri .....   | 9   |
| 3.2. Metot.....  | 9   |
| 3.2.1. Bakteriyel besiyerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları .....                             | 9   |
| 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....   | 10  |
| 3.2.3. DNA'nın Jel Elektroforezi.....  | 11  |
| 3.2.4. Bakterilerin stoklanması .....  | 12  |
| 3.2.5. İzole edilen bakterilerin taşıdığı plazmitlerin konjugasyon özelliklerinin belirlenmesi ..... | 12  |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....   | 14  |
| 4.1. PZR ile <i>S. thermophilus</i> izolatlarında comx gen varlığının belirlenmesi: .....            | 14  |
| 4.2. <i>comX</i> pozitif izolatların konjugasyon özellikleri: .....                                  | 16  |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....   | 21  |
| KAYNAKLAR.....   | 21  |
| ÖZGEÇMİŞ.....  | 26  |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 3.1. <i>comX</i> gen bölgesi .....   | 11 |
| Şekil 3.2. Kendiliğinden transfer olabilen plazmitlerin konjugasyonlarının belirlenmesi... | 13 |
| Şekil 4.1. <i>comX</i> primerleri ile elde edilen jel görüntüsü .....                      | 14 |
| Şekil 4.2. <i>comX</i> primerleri ile elde edilen jel görüntüsü .....                      | 15 |
| Şekil 4.3. <i>comX</i> primerleri ile elde edilen jel görüntüsü .....                      | 15 |
| Şekil 4.4. <i>comX</i> primerleri ile elde edilen jel görüntüsü .....                      | 16 |
| Şekil 4.5. Konjugasyon işlemi başarılı olan örneklerin görüntüsü.....                      | 17 |
| Şekil 4.8. <i>comX</i> gen sekansı .....   | 19 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 3.1. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 besi ortamının kimyasal içeriği.....                | 15 |
| Çizelge 3.2. <i>S. thermophilus</i> türlerinin <i>comX</i> geni için tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri..... | 16 |
| Çizelge 4.1.Konjugasyondan sonra elde edilen bakteri sayıları.....  | 24 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| mm    | : Milimetre                   |
| °C    | : Derece santigrad            |
| dk    | : Dakika                      |
| g     | : Gram                        |
| mg    | : Miligram                    |
| ml    | : Mililitre                   |
| sn    | : Saniye                      |
| %     | : Yüzde                       |
| µl    | : Mikrolitre                  |
| µm    | : Mikrometre                  |
| sp    | : Tür                         |
| bç    | : Baz çifti                   |
| dNTP  | : Deoksi nükleotid trifosfat  |
| TBE   | : Tris, Borik asit, EDTA      |
| Et-Br | : Etidyum Bromür              |
| PZR   | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| UV    | : Ultra viyole                |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) karbonhidrat fermentasyonu sonucu büyük oranda laktik asit oluşturan, gıda ve biyoteknolojik çalışmalarda model olarak kullanılan ve fermentasyon endüstrisinde büyük öneme sahip mikroorganizmalardır. Laktik asit ismini Latince süt anlamına gelen “lac” kelimesinden almıştır (Sudheer ve ark., 2006). Et, süt ürünleri, sebzeler, içecekler ve unlu mamüller gibi birçok fermente üründe bulunmuştur (Aukrust ve Blom, 1992; Jay, 2000). Fermente gıdalara ilaveten toprak, su, gübre ve atık sularda da LAB tespit edilmiştir (Beasley, 2004). Ayrıca insan ve hayvanların sindirim sistemlerinin mukozal yüzeylerinde doğal olarak bulunmaktadırlar (Axelsson, 2004). LAB'nin gıda ile etkileşimi, bilim adamlarının dikkatini çekmiş ve 1857'de Pasteur'ün laktik asit fermentasyonu ve ardından 1873'de Lister'in ekşimiş süttten ilk saf bakteri kültürünü (*Bacteriumlactis*) izole etmesiyle sonuçlanmıştır (Stiles ve Holzapfel, 1997; Matsuzaki, 2003). Orla-Jensen (1919) “gerçek laktik asit bakterileri”nin Gram pozitif, spor oluşturmayan, hareketsiz, çubuk ve koklar halinde, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek genellikle laktik asit oluşturan doğal bir grup olduklarını ifade etmiştir (Sharpe, 1979).

Metabolik bazı özelliklerinden dolayı LAB genellikle, fermente gıdaların mikrobiyal güvenliğine lezzet, doku, besin değeri açısından önemli ölçüde katkıda bulunur (Settanni ve Corsetti, 2008). Et, sebze, balık, süt, tahıl gibi çiğ gıdaların genelinde hem eş zamanlı hem de büyük ölçekli fermentasyonun korunması ve dönüşüm süreçleri için önemlidir (Gardner ve ark., 2001; Vogel ve ark., 2002). Laktik asitin etkisiyle gıda asitlenir ve bozulmaya neden olacak mikroorganizmaların büyümesi engellenir, yada öldürülebilir. Aynı şekilde silaj yapımında kullanılan yeşil otların, silolara doldurulup oksijenle teması kesildiğinde ortamda büyüyen laktik asit bakterileri ortamı asitlendirerek silajın bozulmasına neden olabilecek diğer organizmaların büyümesine engel olur.

Laktik asit bakterileri fermentasyon boyunca organik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve antimikrobiyal maddeler üretmektedirler (Lindgren ve Dobrogosz, 1990). Bu bileşiklerin gıdanın tadı ve tekstüründe istenilen özellik kazandırmasına ilaveten, istenmeyen patojenik mikroorganizmaların engellemesi ve ürün raf ömrünün uzatılmasında önemli etkiye sahiptir (Nettles ve Barefoot, 1993).

Laktik asit bakterileri bağırsak mikroflora dengesini olumlu yönde değiştirerek, zararlı bakterilerin gelişimini inhibe etmekte, sindirim sistemine olumlu yönde katkı sağlamakta, immün fonksiyonunu destekleyerek, enfeksiyon direncini arttırmaktadır (Melnikova ve ark., 1993).

Laktik asit bakterileri morfolojik ve fiziksel olarak, Gram pozitif (+) olup, katalaz enzim sistemini içermeyen, spor oluşturmayan, düşük G+C içeriği (% 33-55) bulunan anaerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. LAB, homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki gruba ayrılırlar ve karbonhidratları fermentasyona uğrattıklarında esas ürün olarak laktik asit üretirler. Homofermentatif bakteriler glikozu parçaladıktan sonra % 90 laktik asit, %10 CO<sub>2</sub> oluşturan bakterilerdir. Heterofermentatifler ikincil ürün olarak etil alkol, asetik asit, CO<sub>2</sub>, diasetil, asetonin gibi bileşikler oluştururlar (Prescott ve Dunn, 1987; Halkman, 1991).

LAB'nin önemi ve özellikleri; ortamda LAB'ın büyümesi, besin maddesinin karbonhidrat miktarını ve bakterinin laktik asit üretimine bağlı olarak ortamın pH düzeyini düşürmektedir. Ortam pH'sını hızlı bir şekilde düşürmesi LAB'ın istenilen önemli özelliklerinden biridir. LAB düşük pH'da (~ 4) canlılıklarını ve büyümelerini sürdürebilmekte ve patojen mikroorganizmalar üzerindeki baskılayıcı özelliği sayesinde gıdaların raf ömrünü uzatmakta ve patojen kontaminasyonunu engellemektedir.

## 1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

LAB' nin cins ve türlere göre değişmekle birlikte genel olarak kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk olmak üzere üç farklı morfolojik yapıda mezofilik mikroorganizmalardır (Holt ve ark., 1994). LAB'ın yapılan fizyolojik tanımlamalar sonucu, taksonomik olarak yaklaşık 20 cins içerdiği belirlenmiştir (Aarnikunnas, 2006). Bilinen başlıca LAB cinsleri; *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Melisococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır (Davidson ve ark., 1995; Axelsson 2004). Yaklaşık 80 adet tanımlanmış tür içeren *Lactobacillus* en geniş cinstir (Axelsson, 2004). *Bifidobacterium* ise, genellikle LAB ile aynı cins içerisinde incelenmesine ve bazı tipik özelliklerini de taşımasına rağmen filogenetik olarak diğer cinslerden ayrıdır (Ballongue, 2005).

Cins ve türler fenotipik ve taksonomik kriter olarak: morfolojik görünüm, fermentasyon son ürünü, karbonhidrat metabolizması, büyüme sıcaklığı aralığı, laktik asit formasyonu ve tuz toleransı kullanılmaktadır. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*

ve *Leuconostoc* cinsleri süt fermentasyonunda kullanılan suşları içermektedir. *Enterococcus* çok nadiren başlangıç kültürü olarak kullanılmaktadır.

LAB'nin pek çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlarda bulunurlar. Belirli bir çevreye adapte olmuş gibidirler ve hemen hemen her doğal habitatta bulunurlar. Bu alandaki bilgiler eksik olmasına rağmen şöyle bir genelleştirmeye gidilebilir. *Streptococcus* genusu türlerine; insan, hayvan ve kuşlarda rastlanabilir. *Lactobacillus* genusu türleri daha çok insan, hayvan ve bitkilerle beraber bunların bulunduğu doğal ortamlarda bulunabilir. *Pediococcus* genusu türleri ise ancak bitkilerde bulunurlar. *Leuconostoc* türleri de genellikle süt ürünlerinde ve sebzelerden izole edilebilir. Bazı LAB alt türleri insan sindirim sisteminde ve fermente gıdalarda bulunur (Klein ve ark., 1998).

### 1.3. Laktik Asit Bakterilerinin Gıdalarda Kullanımı

İnsanların tükettikleri gıdaların güvenilir olması, sağlıklı büyüme ve gelişmelerinde önemlidir. Gıdalara eklenen katkı maddeleri, gıdaların fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik özelliklerinin geliştirilmesi ve muhafaza sürelerinin uzatılması görevlerini üstlenmektedir. Ancak bu ilave edilen katkı maddelerinden bazılarının sağlıksız oluşu ve kullanım oranına bağlı olarak toksik veya kanserojenik etki gösterebilirler. Bu nedenle doğal ve güvenilir katkı maddelerinin elde edilmesi ve kullanımı önemli hale gelmiştir. Gıdaların güvenliği konusunda proses uygulamalarından kaçınılması ve mümkün olduğunca doğal katkı maddelerinin kullanılması tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Kurt ve Zorba, 2005).

LAB ile fermente edilen gıdalar ve yemler insan ve hayvan diyetinde önemli bir yere sahiptirler. Sağlık, beslenme, organoleptik özellik ve gıdaların korunmasında temel rol üstlenen LAB'n dünya gıda üretimindeki işlevsellik ve yararlılıkları, son yirmi yılda akademik araştırma grupları kadar, endüstrideki Ar-Ge çalışmalarında görev alan araştırmacılar tarafından da büyük bir ilgiyle takip edilmektedir (Siezen ve ark., 2002).

Gıdalarda bulunan yararlı mikroorganizmalar aracılığı ile sentezlenen çoğu madde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Özellikle organik asitlerin oldukça işlevsel olduğu bilinmektedir. Laktik asit ve asetik asit de koruyucu olarak kullanılan asitler arasında yer almaktadır. Bu asitlerin etkileri genelde ortamın pH değerini düşürmeye bağlı olsa da, asetik asidin ayrıca hücre duvarını aşarak hücreye girmesi ve plazmayı denatüre etmesi şeklinde de etki yaptığı saptanmıştır. Asetik asit daha çok sebze konserveleri, mayonez, sos, turşu, keçap ve etin olgunlaştırılmasında kullanılırken, laktik asit; turşular, salamuralar, sebze ve zeytin ürünlerinde en fazla kullanılmaktadır (Coşkun, 2006).

Koruyucu olarak kullanılan organik asitler ve ürettikleri antimikrobiyal peptitler nedeni ile laktik asit bakterileri ve diğer bakteriler arasındaki etkileşimler çeşitli gıdaların üretiminde özellikle de fermente gıdalarda ve silaj oluşumunda oldukça geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bunun dışında laktik asit bakterilerinin insanlar tarafından kullanılması güç olan ve toksik etkisi bulunabilen bileşenleri daha küçük molekülü, sindirilebilen ya da toksik etkisinin ortadan kalktığı moleküllere parçalayabilme özelliği de gıdalarda kullanılmaları için avantaj sağlamaktadır (Visser, 1986; Arıcı, 2005).

Laktik asit bakterileri farklı türden gıdaların besin değerinin artırılmasında ve raf ömrünün uzatılmasında kullanımının yanında, medikal alanda da intestinal enfeksiyonların ve bazı kanser tiplerinin kontrolünde de özellikle son yıllarda önem kazanan bir konu haline gelmiştir (Gilliland, 1990).

Laktik asit bakterileri sucuk, turşu, şarap, zeytin, boza, yoğurt gibi fermente gıdaların üretiminde çok eski zamanlardan beri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fermente ürünlerin kalitesinin belirlenmesinde de son derece önemlidir. Laktik asit bakterileri sebze, meyve ve süt ürünlerinde de bulunmaktadır. Bu bakteri grubunun bir kısmı insan vücudunun doğal florasını oluşturmaktadır (Deet ve Tamime, 1981).

#### **1.4. Laktik Asit Bakterilerinde Konjugasyon Özellikleri**

Konjugasyon alıcı hücrelerden verici hücelere DNA transferinin olduğu karmaşık fonksiyonları ile kontrol edilen bir olaydır. Bakteriler arasında genetik materyal transferi transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon ile olmaktadır. Konjugasyon ile kendiliğinden transfer olabilen plazmitler başlangıç kültürü lactococci suşlarına  $10^{-2}$  gibi yüksek frekansta transfer olabilmektedir (Coakley ve ark., 1997). Bakteriyosin (Mills ve ark., 2002), proteinaz (Kok, 1990), polisakkarit üretebilen (van Kranenbug ve ark., 2000), fajlara karşı dirençlilik (Coakley ve ark., 1997) ve lator katabolit özellikleri taşıyan konjugatif plazmitler süt endüstrisinde kullanılmaktadır.

Bazı yoğurt ve peynir türlerinde kullanılan *Streptococcus thermophilus* türlerinin fermantasyon özelliklerinin artırılmasından genetik çalışmalar yapılmakta ve bu alanda yeni suşların geliştirilmesinde önemli mesafeler katedilmektedir. Bu bakterinin konjugasyon özelliği kullanılarak süt endüstrisinde kullanılabilecek yeni ve önemli fermantasyon özelliklerine sahip *Streptococcus thermophilus* 'lar geliştirilmiştir. (Blomqvist ve ark, 2006 ).

Konjugasyon ile DNA transferi gıdaya uygunluğu açısından kabul edilebilir olduğundan daha iyi başlangıç kültürü oluşturabilmek için kullanılabilir. Konjugasyonun gerçekleşmesi için alıcı ve verici hücre yüzeylerinin etkileşmesi gerekmektedir. Gram negatif bakterilerde bu etkileşim seks pilusları ile gerçekleşmektedir. Konjugasyon transfer sistemi birçok gram pozitif türde görülse de gram pozitif bakterilerde hücre-hücre interaksiyonu mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Francia ve ark. 2004). Gram pozitif ve negatif bakterilerdeki farklılık konjugasyon transferini başlatan hücre-hücre etkileşimidir.

Konjugasyon, plazmitin transfer orjiniindeki spesifik bölgede fosfodiester bağının kesilmesi ile başlamaktadır (Grohmann ve ark. 2003). Konjugasyon ile plazmitin tek zincirinin transfer edildiği düşünülmektedir (Lanka ve Wilkins 1995). Konjugasyon sistemi üç temel işlemi içermektedir. i-konjugasyon pilusunun sentezlenmesi, ii-kompleks proteinler ile DNA'nın oriT bölgesinin işlenmesi ve iii-iki hücre arasında bağlantının kurulmasıdır. Konjugasyon esnasında, plazmitin transfer zinciri olarak isimlendirilen tek zinciri 5'→3' yönünde verici hücreden alıcı hücreye transfer olmaktadır. Transfer zinciri verici hücrede iken oriT bölgesi içindeki 'nic' bölgesinden kesilmektedir. Kesilen oriT parçası plazmit kodlamayı düzenleyen proteinler ile 5' ucuna DNA-protein yapısı oluşturmaktadır (Lanka ve Wilkins 1995). Başarılı bir konjugasyon hücre-hücre birleşmesi ile oluşmaktadır.

DNA'nın taşınması olan konjugasyon önemli bir genetik değişim olayıdır ve bunun ile antibiyotiğe direnç genleri rastgele yayılmakta ve faydalı bakteri suşları patojen forma dönüşebilmektedir. Bu şaşırtıcı durum patojen özellikli organizmaların sayısını arttırabilmektedir (Filutowicz ve ark. 2008). Bununla beraber potansiyel bazı bakteriyal plazmitler kendilerine ait konjugasyon özelliklerinden dolayı ajan olarak kodlayan plazmitler kullanılarak hastalıklar kontrol edilebilir. Plazmitin kendini bile elemine edebilecek özellikleri alıcı hücrede ekspres ederek patojen hücreler elemine edilebilir (Peng ve ark. 2006). Ayrıca türler arasında toksin üretebilen plazmitlerin konjugasyonu ile bakterilerin öldürülebileceği rapor edilmiştir (Rodriguez ve ark. 1995). Bütün bunların yanında faydalı konjugasyonların olabileceği ve endüstriyel öneme sahip suşların konjugasyon ile oluşabileceği gerçeği göz ardı edilmemelidir.

*Streptococcus* genusunda genetik transformasyon çok çalışılmamış ancak *Streptococcus pneumoniae*'in doğal olarak genetik transformasyon yapılabildiği ve bu transferin *comABCDE* regulonu tarafında kontrol edildiği gösterilmiştir (Claverys ve

Havarstein, 2002). *Streptococcus thermophilus*'ta doğal ve hızlı bir genetik modifikasyon (Blomqvist ve ark. 2006) tarafından gösterilmiştir. Klonlanan *comX* promotor aktivitesinin büyüme fazının başlangıç döneminde olduğunu dolayısı ile genetik modifikasyonun doğal şartlarda oluşabileceği fakat bunun büyüme fazında bağlı olduğu gerçektir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Herman ve Mckay (1985) , 23 adet *S.thermophilus* suşunda plazmit izolasyonu yapmışlar, bunlardan 5 tanesinin küçük kriptik, tek plazmit içerdiğini ve pHM1'den, pHM5'e kadar adlandırıldığını, bu 5 plazmitle ilgili olarak restriksiyon endonükleaz haritasını ve DNA-DNA hibridizasyonu incelemişler. Bunların her biri için 1.4- 2.2 mega dalton büyüklüğünde ve 4- 18 kopyaya sahip plazmite sahip olduklarını belirtmişlerdir. pHM11 ve pHM5 plazmitlerinin olduğu kadar, pHM2 ve pHM4 plazmitlerinin de iyi bir şekilde tanımlandığını, tek kesme bölgesi için *PvuII* ve *MboI* kesme enzimlerini pHM2 ve pHM3 plazmitleri için *H1A1* ve pHM1 plazmiti için *HindIII* kesme enzimini kullandıklarını belirtmişlerdir. Bu plazmitlerin, özellikle üzerinde çalışılan *S.thermophilus* suşlarının klonlama vektörlerinin gelişmesi açısından faydalı olacağını önermişlerdir.

Koçer ve ark., (2004) konjugal aktarım çalışmaları sonucu, *Lactococcus lactis subsp. Lactis* ELL23 suşunda 27.2 kb, *L. lactis subsp. cremoris* ELC5 suşunda 32.7 kb ve *L.lactis subsp. cremoris* ELC19 suşunda 31.1 kb büyüklükte plazmidlerin ekzopolisakkarit üretimi (Eps+) ve laktoz fermentasyonu (Lac+) özelliğinden sorumlu olduğunu belirlemişlerdir. Agregasyon morfolojisine sahip (Agg+) doğal tip verici suşlar ile, Agg+ alıcı suş *L. lactis subsp. lactis* LLT40 kullanılarak gerçekleştirilen eşleştirmelerden sonra; Lac+/Eps+ plazmidlerin konjugal aktarım sıklığı, verici hücre başına,  $1.0 \times 10^{-2}$  -  $2.8 \times 10^{-3}$ , konjugantlardaki stabilite oranları ise % 80-96 arasında  $1.5 \times 10^{-3}$  -  $4.5 \times 10^{-4}$ , stabilite oranları ise % 65-88 oranlarında gerçekleştirilmiştir.

Girard ve Moineau (2007), *S.thermophilus*'dan pSMQ-308 plazmitini izole etmişler buna ek olarak iki yeni  $\theta$  replikasyonuna sahip pSMQ- 312b ve pSMQ - 316 plazmitlerinin karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. pSMQ- 312b ve pSMQ-316'nın nükleotid sekansını belirleyerek 6.710 bç'de bant verdiğini gözlemlemişler ve iki farklı *S.thermophilus* suşundan izole edilen plazmitleri PFGE ile belirlemişler. Bu ikisini ve daha önceden izole ettikleri pSMQ-308 plazmidini (8.144 bç) karşılaştırmışlar. Plazmit stabilite testleri sonucu pSMQ- 312b/316 LM17 ortamında çok stabil bulunmuştur. Endüstriyel işlemlerde plazmitlerin varlığında sıcaklık ve zamana bağlı şartlar altında *S.thermophilus* suşlarının süt ürünlerinin yapımında kullanılmasında asidifikasyon profilinin modifiye edilmediğini belirtmişler. Bu  $\theta$  replikasyon plasmitlerinin, *S.thermophilus*'un endüstriyel suşlarının stabil klonlama vektörlerinin yapılandırılması için tek genetik materyal olduğu bildirilmiştir.

Türkiye'deki farklı köy ve kasabalardan toplanan yoğurt örneklerinden 34 adet suş *S.thermophilus* olarak teşhis edilmiştir. *S.thermophilus* suşunun antibiyotik dirençlilikleri ve plazmit içerikleri incelenmiştir. Birçok *S.thermophilus* suşunun gentamisin (%79) ve penisiline karşı (%64) dirençlilik gösterdiği belirlenirken, suşların %88 oranında tetrasikline, %94 oranında da kloramfenikole duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. *S.thermophilus*'un bazı suşlarında antibiyotik dirençlilik ve plazmit içeriği arasında bir etkileşimin olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra bazı suşlar ise; plazmit DNA içerikleri ile antibiyotik dirençlilikleri arasında korelasyon belirlenemediği bildirilmiştir (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Tanımlanan 115 *S. thermophilus* ve 35 *Lb.bulgaricus* izolatının plazmit DNA izolasyonları yapılmış, tüm izolatlar içerisinde *S.thermophilus*'ların 78, *Lb. bulgaricus*'ların ise 26 tanesinin değişen sayılarda plazmit taşıdığı belirlenmiştir. *S. thermophilus*'ların plazmit içeriğinin (1-4), *Lb.bulgaricus*'lardan (1-2) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda antibiyotik dirençliliği ortaya koymak üzere; kanamisin, kloramfenikol, eritromisin, ampisilin, rifampisin, tetrasiklin, vankomisin ve gentamisin antibiyotiklerinin dört farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. İzolatların en fazla dirençliliği kanamisin (% 53)'e gösterdiği, rifampisin (%17)'e karşı ise duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Antibiyotik direnç özelliklerinin, izolatların plazmit içeriği ile doğrusal bir ilişkisi tespit edilememiştir (Gezginç, 2010).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kimyasallar**

Tez çalışması Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmanın temel kimyasalları, Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Fermentas (USA), Promega (UK), Vivantis (Güney Kore)'den temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Laktik Asit Bakterileri**

Bu tez çalışmasında kullanılan 106 adet *Streptococcus thermophilus* bakteri suşları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

#### **3.2. Metot**

##### **3.2.1. Bakteriye besiyerinin hazırlanması ve inkübasyon koşulları**

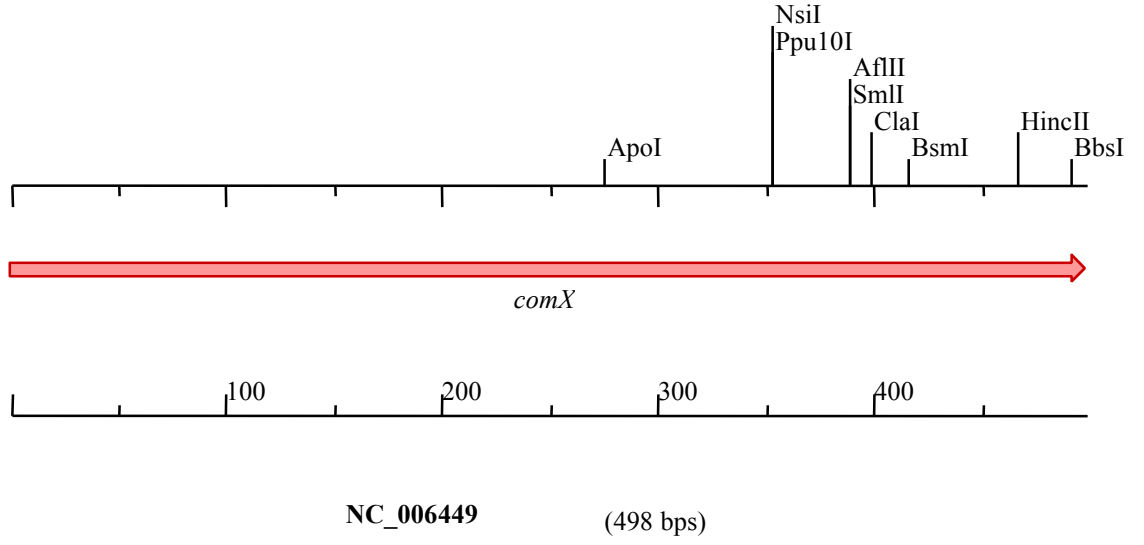
*Streptococcus thermophilus* suşları SM17 besiyerinde büyütülmüştür. 1000 ml saf su içerisinde 42,5 g M17 (Terzaghi ve Sandine, 1975) ve %1 (w/v) sükröz eklenerek sıvı besi ortamı hazırlanmıştır. Katı SM17 hazırlamak için besiyerine %1,5 agar ilave edilmiştir. *Streptococcus thermophilus* suşları 42 °C'de kültüre alınmıştır (Nüve EN110). Hazırlanan SM17 besiyeri 121 °C'de 10 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmada kullanılan M17 besi ortamının kimyasal içeriği Çizelge 1 'de verilmiştir. *E.coli* suşları Lauria Broth (LB) besi yerlerinde büyütülmüştür. 100 ml saf su içerisinde 5 g NaCl, 10 g Triptone ve 5 g Yeast extract (granüllü maya özütü) çözündürülerek pH 7,5 olarak hazırlanmıştır (Sambrook ve ark., 2001).

Çizelge 3.1. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 besi ortamının kimyasal içeriği

| <i>Kimyasallar</i>                | <i>Miktar (gr/l)</i> |
|-----------------------------------|----------------------|
| <b>Bacto tripton</b>              | 5                    |
| <b>Bacto soyton</b>               | 5                    |
| <b>Et özütü</b>                   | 5                    |
| <b>Maya özütü</b>                 | 2.50                 |
| <b>Askorbik asit</b>              | 0.50                 |
| <b>Magnezyum sülfat</b>           | 0.25                 |
| <b>Disodyum-β-gliserol fosfat</b> | 19                   |

### 3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR işlemi toplam 40 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için; 4 µl buffer (10X) [500 mM Tris-HCl (25°C’de pH 8,0), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT], 1 µl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1’er µl (20 pmol), 0,5 µl DNA polimeraz (5 u/µl) [25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT ve %50 (v/v) gliserol], 1 µl kalıp DNA (~400 ng/ml) ve 40 µl’ye tamamlamak üzere 31,5 µl dH<sub>2</sub>O ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu işleminde, 94 °C de 1 dak DNA’nın denatürasyonu, 55 °C de 30 sn primerlerin yapışması, 72°C de 1 dak uzama sıcaklığı olarak ayarlanmıştır ve PZR 35 döngü olarak yapılmıştır. Koloni PZR işleminden önce koloniler 95 °C de 5 dakika muamele edilip daha sonra PZR işleminde kalıp DNA olarak kullanılmıştır. PZR çalışmada kullanılan *comX* bölgesi ( şekil 3.2 ) NCBI’den tespit edilmiş ve gen bankasındaki dizilere göre primerler oluşturulmuştur (Çizelge 3.2 ).



**Şekil.3.1.** *comX* gen bölgesinin şematik gösterimi.

Çizelge 3.2. *S. thermophilus* türlerinin *comX* geni için tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri ve yapışma sıcaklıkları

| Primer       | Oligonükleotid Dizisi      | 5' → 3' | Uzunluğu | GC oranı | Tm (°C) |
|--------------|----------------------------|---------|----------|----------|---------|
| <b>ComXF</b> | ATGGAACAAGAAGTTTTGTTAAGGC  |         | 26 bç    | %34.62   | 64.95   |
| <b>ComXR</b> | TCAGTCTTCTTCATTACATGGATCAA |         | 26 bç    | %34.62   | 64.47   |

### 3.2.3. DNA'nın Jel Elektrofrez

Agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X Tris, Borik asit, EDTA (TBE) tampon çözeltisinde [1000 ml TBE (1X) tampon çözeltisi hazırlamak için; 5,5 g Borik asit, 10,8 g Trizma base ve EDTA (500 mM) çözeltisinden 4 ml eklenerek 1000 ml saf su ile karıştırılır] çözdürülmüştür. Analiz edilecek DNA örnekleri 1/5 (loading buffer/DNA) oranında yükleme solüsyonu [10 ml DNA loading buffer için; 0,025 mg bromophenol blue, %40 sükröz ve 2,5 ml EDTA (100 mM) (pH 8,0)] eklenerek yüklemeye hazırlanmıştır. Favorgen DNA marker 100 baz çiftlik ya da 1000 baz çiftlik DNA markörleri kullanılmıştır. Elektrofrez tankında, jel 120 volt ve 60 mA'da koşturulmuştur. Koşturulan

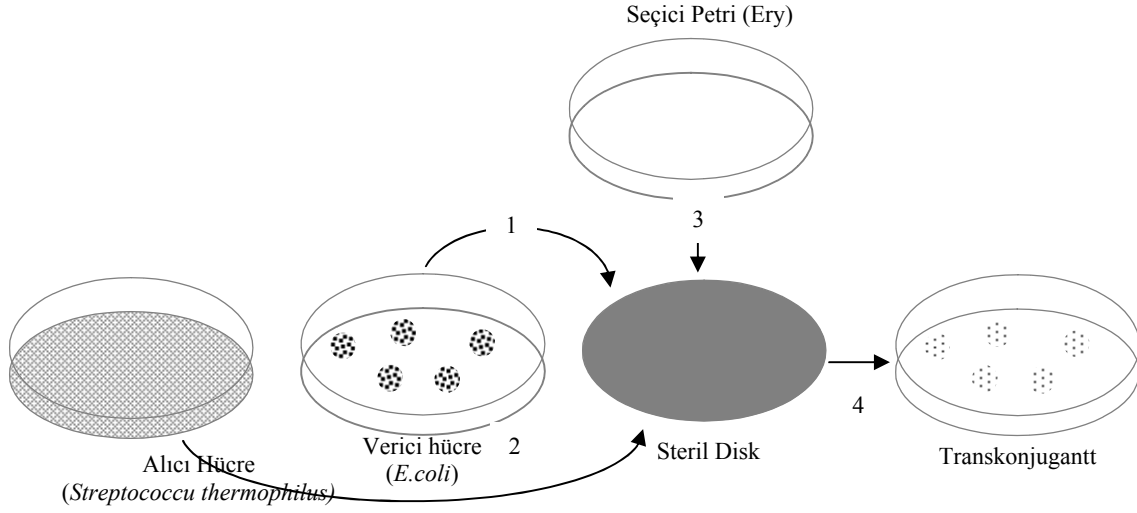
agaroz jel Et-Br (0,5 µg/ml) ile 15 dakika boyanmıştır. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

#### **3.2.4. Bakterilerin stoklanması**

Bakteriler kısa süreli stoklamalar için %30'lik gliserol içerisine alınarak -20 C'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama ise, besiyerinde 16 saat büyütülen bakterilerden 200 µl alınarak 12.000 rpm (14,515 g)'de 3 dakika çöktürülerek supernatant kısmının uzaklaştırılması ve peletlerin %40 gliserol içeren SM17 besi yerinde çözündürüp, şok soğutma ile -80°C'de gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.5. İzole edilen bakterilerin taşıdığı plazmitlerin konjugasyon özelliklerinin belirlenmesi**

Genetik tanımlaması yapılan bakterilerden izole edilen plazmitlerin herbirinin konjugasyon özellikleri *E.coli* ve *S.thermophilus* arasında belirlenmiştir. *comX* geni varlığı izole edilen bütün kolonilerde olup olmadığı PZR ile test edilmiş ve bu sonuca göre konjugasyon ve gen transferinde kullanılacak bakteriler bu genin varlığına göre seçilmiştir. Plazmitlerin konjugasyon özelliklerinin belirlenmesi sıvı besi yerinde ve agarlı besi yerlerinde belirlenmiştir. Sıvı besiyerinde transkonjugant suşu belirlemek için suşun ve plazmitin indikatör özellikleri kullanılmıştır. Suş özelliği PZR ile plazmit özelliği de antibiyotik dirençlilik veya metabolit özelliklerinden faydalanılabilmektedir. Konjugasyon işleminde plazmit alıcı ve verici hücreler birlikte besiyerinin %1 oranında inoküle edilip bakteriler çoğalmaya kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince plazmit değişimi olmuştur. Transkonjugant koloniler seçici petrilere seçilmiştir. Alıcı ve verici suşlar kontrol olarak seçici petrilere ekilmiştir. Seçici petriden alınan transkonjugant kolonilerin plazmit içerikleri ve alıcı hücre açısından teyitleri plazmit izolasyonu ve PZR ile yapılmıştır.



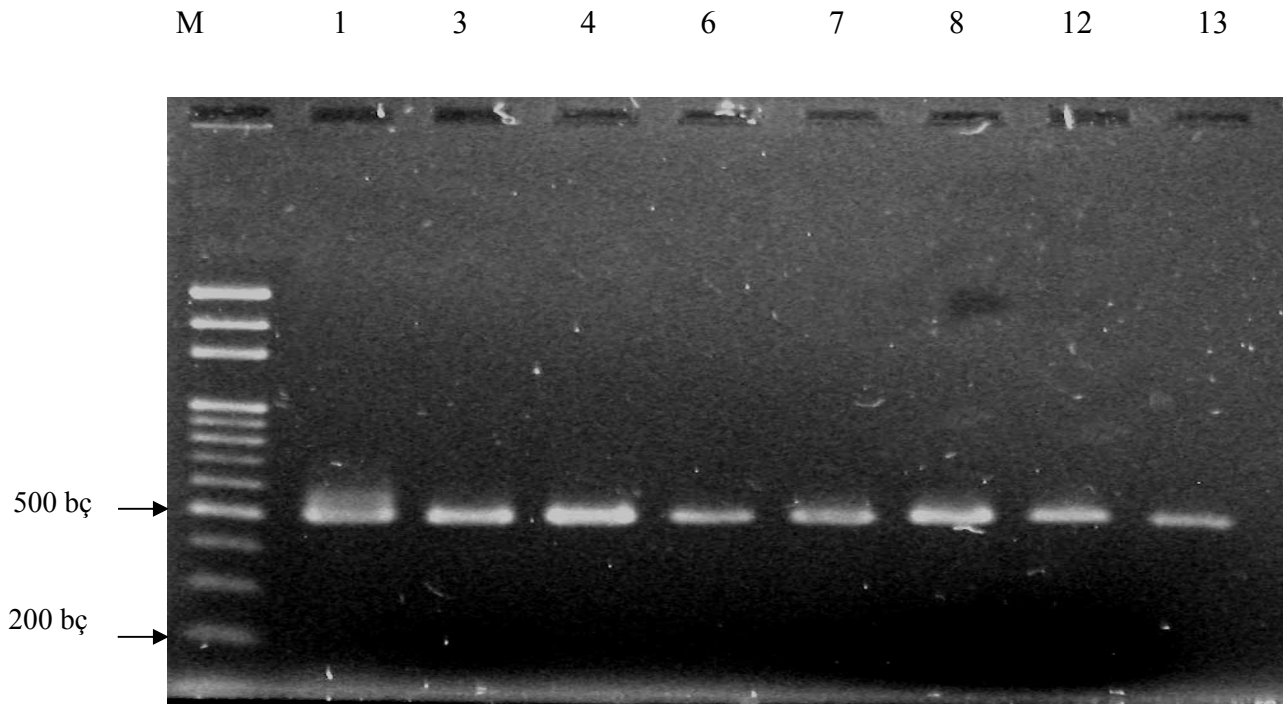
Şekil 3.2. Kendiliğinden transfer olabilen plazmitlerin konjugasyonlarının belirlenmesinin şematik gösterimi.

Petrilerde konjugasyon Şekil 3.2.'de gösterildiği gibi yapılmıştır. Alıcı hücreler kendi özelliğine göre seçici petrinin yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde çoğaltılmıştır. Verici hücreler kümeler halinde çoğaltılmıştır ve hücreler disk kullanılarak steril kadife parçasına bastırılarak transfer edilmiştir. Verici hücrelerin transferinden sonra alıcı hücreler aynı şekilde aynı kadife parçasına bastırılarak transfer edilmiştir. Transfer işleminden sonra transformant kolonileri seçecek olan petri alıcı ve verici hücrelerin transfer edildiği kadife üzerine baskılanarak hücrelerin transformant seçici besiyerine geçmesi sağlanmıştır. Petrilerin inkübasyonundan sonra transformant koloniler seçilmiş ve teyidi yapılmıştır.

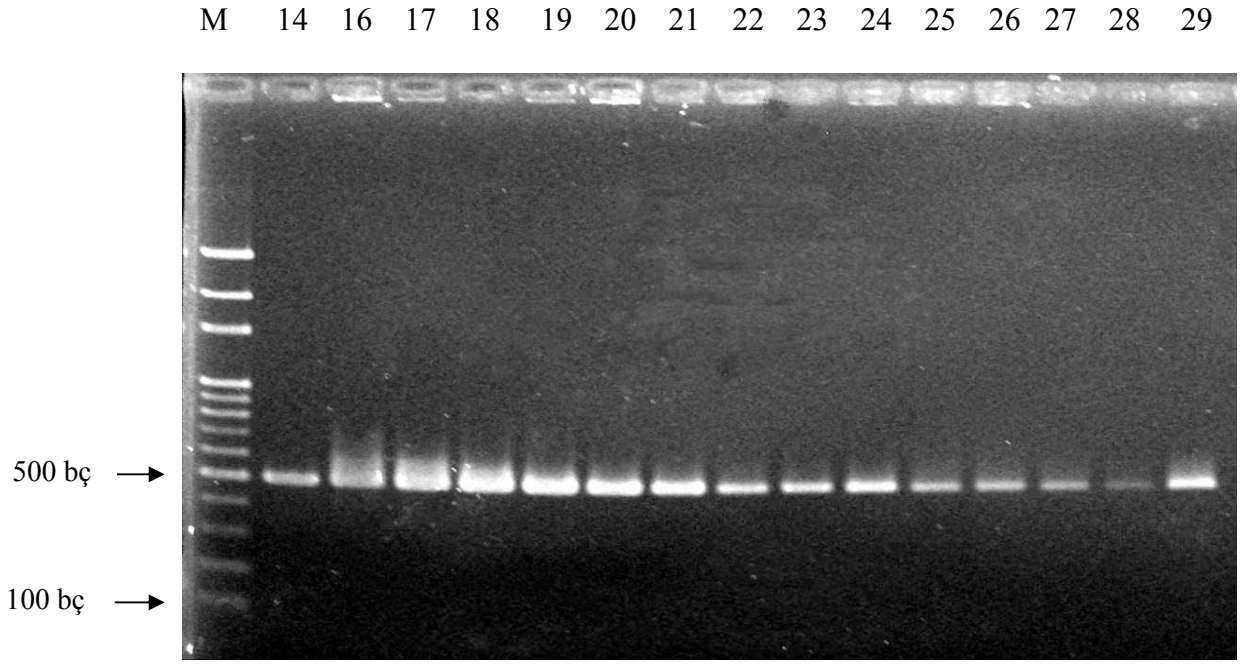
#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

##### 4.1. PZR ile *Streptococcus thermophilus* izolatlarında *comX* gen varlığının belirlenmesi:

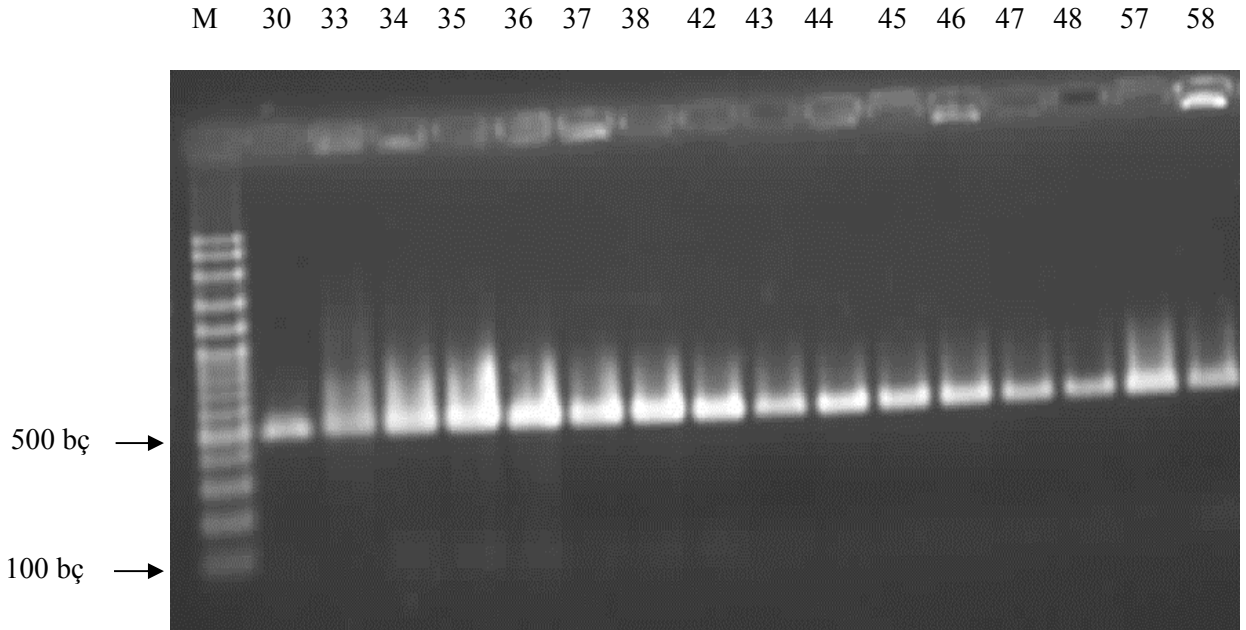
BİGEM koleksiyonundan temin edilen 106 adet *Streptococcus thermophilus* suşlarında konjugasyon varlığının tespit edilmesi için, konjugasyondan sorumlu genin amplifikasyonu, tasarlanan ComxF ve ComXR primerleri kullanılarak PZR ile belirlenmiştir. Bakteriler öncelikle -20 °C stoktan alınarak SM17 sıvı besiyerinde büyütülmüş, daha sonrada petrilere çizilerek tek koloni oluşması sağlanmış, koloni PZR için steril ortamda koloniler alınarak kullanılmıştır. PZR işlemini takiben PZR reaksiyonları jel elektroforezinde yürütülerek daha sonra fotoğraflanmış ve Şekil 4.1; 4.4’de gösterilmiştir.



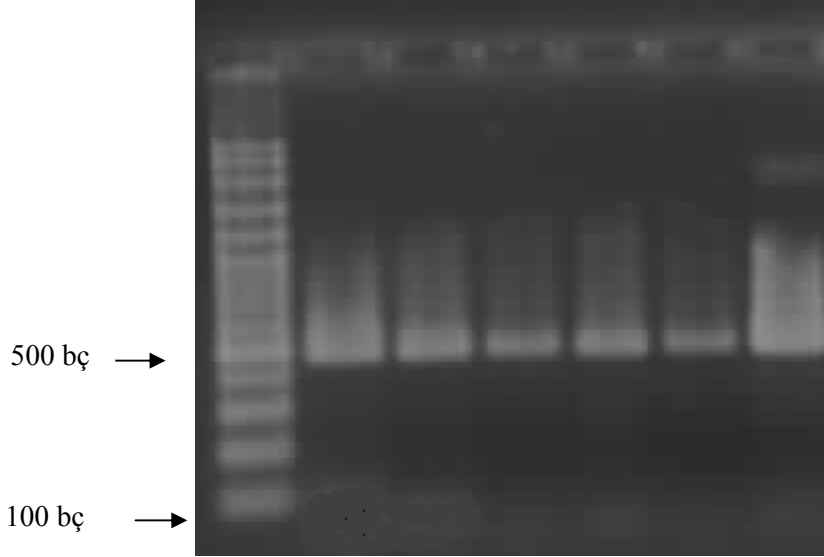
Şekil 4.1 ComX primerleri ile elde edilen jel görüntüsü



**Şekil 4.2.** ComX primerleri ile elde edilen PZR ürünlerine ait jel görüntüsü



**Şekil 4.3.** ComX primerleri ile elde edilen jel görüntüsü

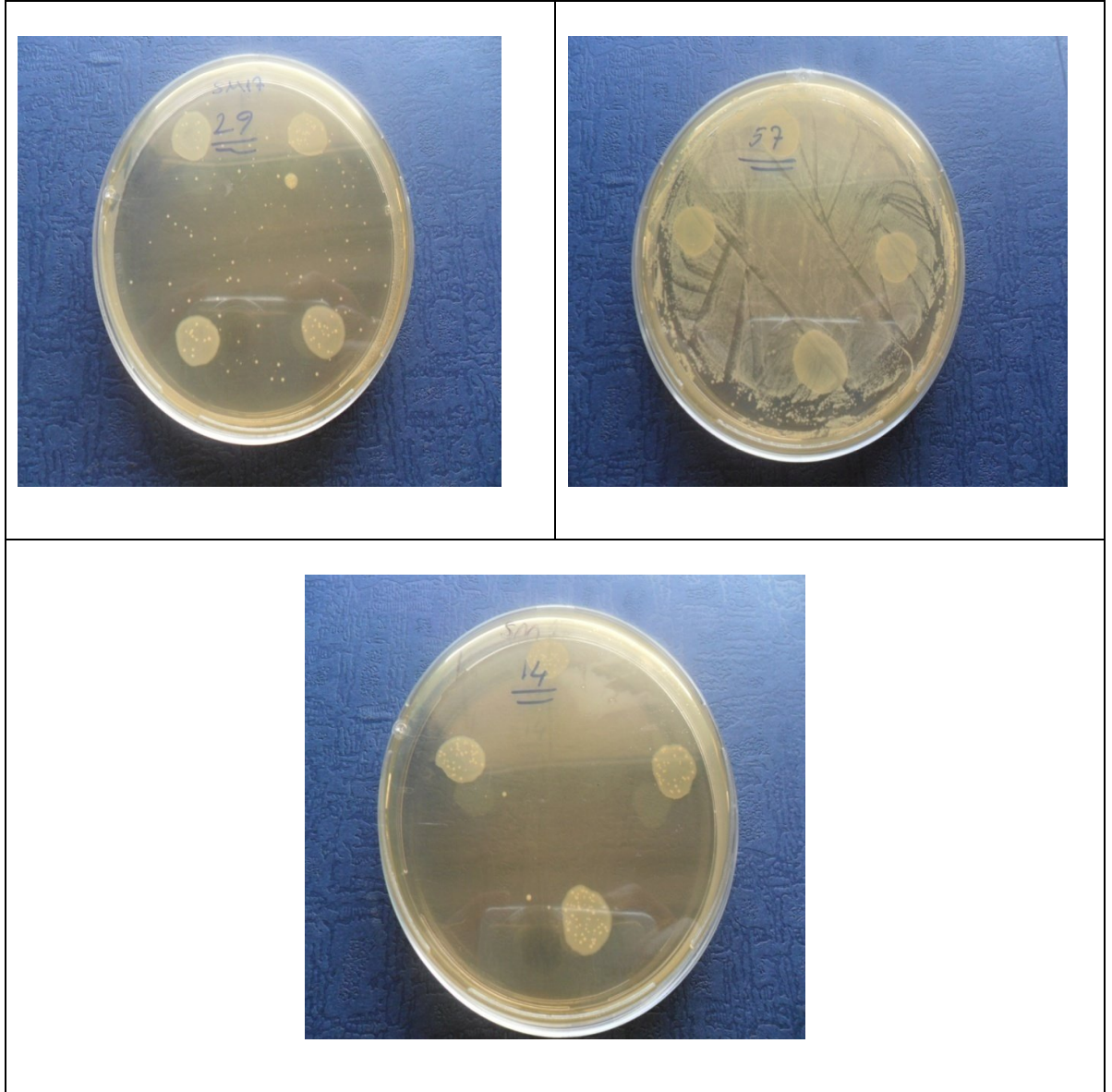


**Şekil 4.4.** ComX primerleri ile elde edilen jel görüntüsü

Şekil 4.1 4.2 4.3 4.4’de görüldüğü üzere, kullanılan 106 *Streptococcus thermophilus* suşlarından 46 tane izolatta yaklaşık uzunluğu 497 bç olan *comX* gen bölgesi çoğaltılmıştır. Jel görüntülerindeki *comX* gen bölgesine sahip bakteri örnekleri %30’luk gliserol stoğa alınarak -20 °C’de saklanmıştır.

#### **4.2. *comX* pozitif izolatların konjugasyon özellikleri:**

*comX* gen bölgesine sahip bakteriler konjugasyon özelliği bakımından konjugasyona daha yatkın olarak kabul edilmiştir. Pozitif sonuç alınan 46 izolat SM17 agarlı besiyerine yayma ekim ile ekilmiştir. Yayma işleminin ardından petrilere eşit uzaklıkta bulunan 4 farklı noktaya *E.coli* suşundan 10 microlitre damlatılarak kullanılmıştır. Damlatma işleminin ardından 37°C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen bakteriler steril kadife parçasına üzerine bastırılarak aktarılmıştır. Sonra eritromisin (5µg/ml) içeren besiyeri aynı kadife üzerine bastırılarak bakteriler alınmış ve tekrar 37 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petrilere seçilen *S.thermophilus*’lar 1ml bakteri 9ml dH<sub>2</sub>O şeklinde 3 kere seyreltilmiştir (10<sup>-3</sup>) ve 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriler büyüdüktan sonra üzerlerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak katalaz (-) olduğu görülen bakterilerin seçim yapılmıştır. Hem antibiyik dirençli hemde katalaz negatif *Streptococcus thermophilus* kolonilerinde konjugasyon işleminin gerçekleştiği kabul edilmiştir. Plazmid geçişi *E.coli*’de var olan pNZ276 plazmiti kullanılarak denenmiştir. pNZ276 Ery dirençli 4.2 kb büyüklüğünde *lacA* promoter bölgesine sahip bir plazmittir. Bu plazmid aynı zamanda *S.thermophilus*’ta replike olabilme yeteneğine sahiptir.



**Şekil 4.5..** Konjugasyon işlemi başarılı olan örnekler

Şekil 4.5. de görüldüğü üzere PZR sonuçlarına göre *comX* gen bölgesini içeren izolatlarda plazmit alım frekansları arasında farklılık görülmektedir. Lee ve ark (1999). yaptığı bir çalışmada *Streptococcus pneumoniae* ait *comX* gen bölgesinin birden fazla kopyası olduğunu belirtmişlerdir. Gen ifadesinde kopya sayısındaki farklıklar genin ifade edilme özelliğini artırmaktadır. Dolayısı ile PZR işlemi sonucuna göre kesin bir sonuca varılması yanılgıya sebep olabilir. *comX* gen amplifiye edilmiş izolatlarda bu genin kromozom üzerindeki kopya sayısı Eşzamanlı PZR tekniği ile detaylıca araştırılabilir.

İzole edilen bazı *Streptococcus thermophilus* suşlarının LAB'da temel özelliklerini gösterip göstermediğini ortaya koymak amacıyla katalaz testleri yapılmıştır (Çizelge 4.1). 106 bakteri örneği taranarak koljugasyon özelliğine sahip 45 suşun tamamı denenmiştir. 7, 24, 30, 36, 37 ve 46 nolu izolatlar konjugasyon özelliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Normal şartlarda Eritromisinli besiyerinde gelişemeyen *Streptococcus thermophilus* bakterileri pNZ276 plazmitini taşıyan *E.coli* bakterileri ile Eritromisin içeren besiyerine ekildiğinde gelişme göstermişlerdir (Şekil 4.5.). Bunun sonucunda *comX* bölgesine sahip bakteri suşlarının plazmit kazanımlarının yüksek frekansta oldukları belirlenmiştir.

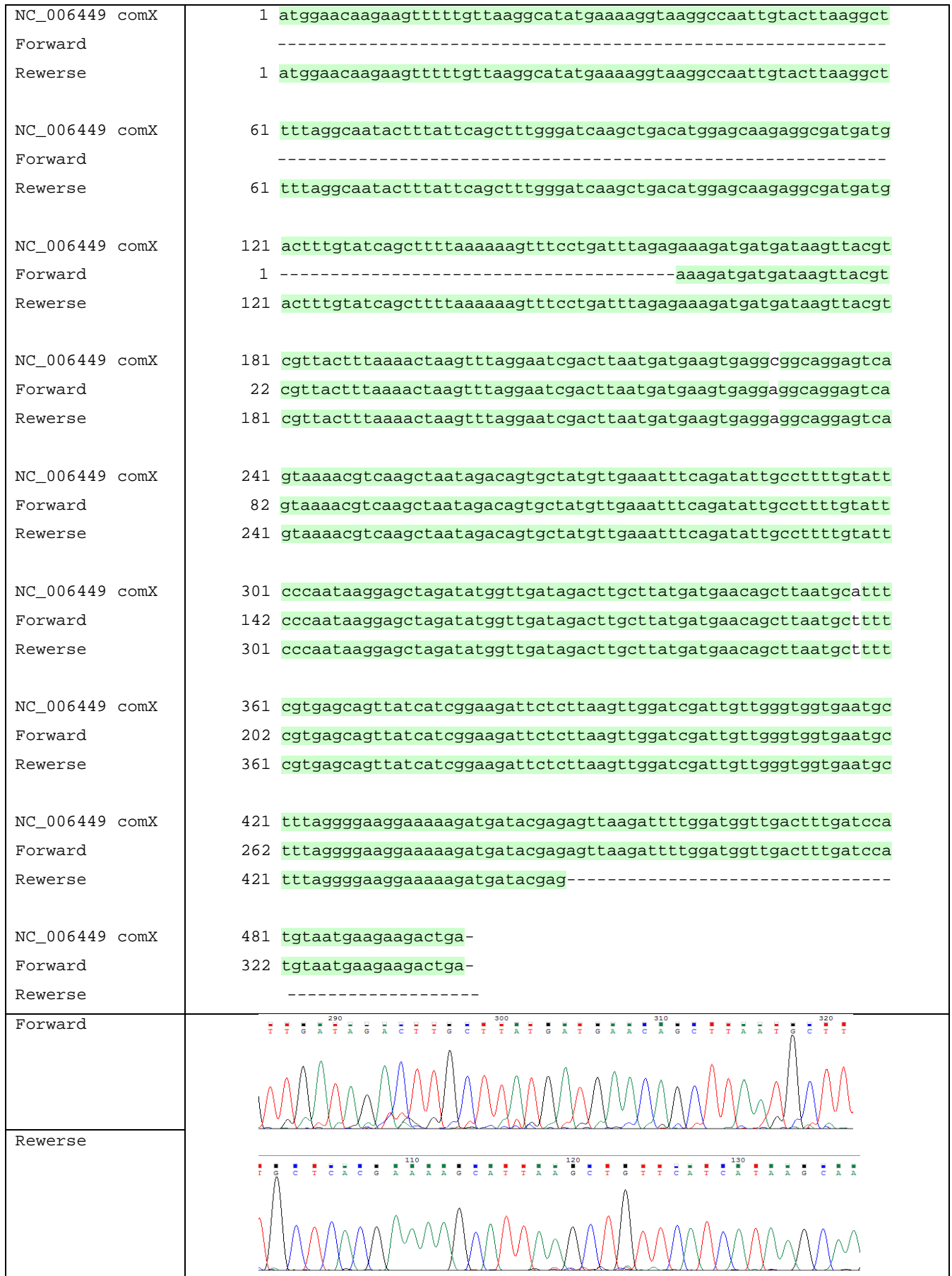
**Çizelge 4.1.** Konjugasyondan sonra elde edilen koloni sayıları

| İzolat No | Katalaz <sup>+</sup> | Katalaz <sup>-</sup> | Toplam |
|-----------|----------------------|----------------------|--------|
| BioSt7    | 87 (%74)             | 32 (%27)             | 117    |
| BioSt 24  | 76 (%77)             | 23 (%23)             | 99     |
| BioSt 30  | 95 (%58)             | 70 (%42)             | 165    |
| BioSt 36  | 85 (%74)             | 30 (%26)             | 115    |
| BioSt 37  | 54 (%90)             | 6 (%10)              | 60     |
| BioSt 46  | 44 (%79)             | 12 (%21)             | 56     |

Yukarıdaki 6 izolata yapılan konjugasyon işlemi sonucu oluşan koloniler için hidrojen peroksit ile katalaz testi yapılmıştır. Katalaz pozitif sayısı toplamdaki *E.coli* sayısını (Yüzdesini) katalaz negatif sayı ise *Streptococcus thermophilus* sayısını göstermektedir. *comX* gen bölgesine sahip 46 izolat içerisinde 30 nolu örnek konjugasyon özelliği bakımından diğerlerinde daha fazla öne çıkmaktadır (Çizelge 4.1). Ancak Çizelge 4.1. sonucuna bakılınca *comX* gen varlığı bakımından pozitif olan izolatlar arasında konjugasyon oranları açısından önemli farklar görülmektedir. Bu durum konjugasyon

frekansının sadece *comX* gen varlığı ile açıklanması sınırlıdır. Bu genin kromozom üzerindeki sayıları konjugasyon frekansı üzerinde etkili olabilir.

Ayrıca konjugasyon frekansları farklı olan bu altı farklı izolatın *comX* genleri sekanslanarak bu gen üzerinde nükleotid farklılıklarının tespit edilmesi amacıyla PZR ürünlerinden sekans yapılmıştır (Şekil 4.8.). Ancak sekans dizi analizi sonuçlarına göre herhangi bir dizi farklılığı tespit edilmemiştir. Kromozom üzerinde bu genin tekrar sayıları farklı frekansların oluşmasına sebep sayılabilir. Ayrıca *comX* geni konjugasyonda diğer genlerle beraber fonksiyon gösterebilir.



Şekil 4.8. *ComX* gen sekansı

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

*Streptococcus thermophilus* yoğurt sanyisinde kullanılan önemli bir starter kültürüdür. Bu bakteri starter olma özelliğini devam ettirmesi dışarıdan gen tranferine kapalı olmasına bağlıdır. Ayrıca bu bakterinin dışarıdan doğal olarak plazmid kazanımı gıda güvenliği açısından da önem taşımaktadır. Çünkü konjugasyonla bakteriler patojen ve antibiyotik direnç özellikleri kazanabilirler. Dolayısı ile konjugasyon frekansının düşük olduğu doğal izolatların starter olarak önerilmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada 106 adet doğal izolatu *comX* gen varlığı açısından taranmış ve bunların 45 tanesinde gen amplifiye edilmiştir. Konjugasyon denemesinde ise sadece 6 izolatta konjugasyon tespit edilmiştir. Gözlenen konjugasyon frekansları farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar ancak konu üzerinde daha detaylı çalışmalar ile açıklığa çıkarılabilir.

Öncelikle *comX* geni kromozom üzerinde kaç farklı yerde bulunmakta ve bu gen plazmit tarafından da kodlanmaktadır sorusuna cevap bulunmalıdır. Bunun için *comX* taşıyan izolatlardan plazmit DNA izole edilerek bu plazmitler üzerinden PZR yapılmalı ve plazmitlerin bu geni taşıyıp taşımadıkları ortaya konmalıdır. Ayrıca kromozom üzerindeki kopya sayıları eş zamanlı PZR yaklaşımı ile aydınlatılmalıdır.

Diğer taraftan genin konjugasyondaki rolü, eğer *comX* tek kopya sayılı ise moleküler delesyonla mutasyona uğratarak ve kontrol grubu ile olan konjugasyon frekans farkları ile açıklığa kavuşturulabilir. Sonuçta konjugasyon ve *comX* ilişkisinin güçlü bulunması halinde potansiyel starter kültürler bu gen kriter alınarak yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- Arıcı, M., 2005. “ Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Çoğalması Üzerine Patulinin Etkisi,” *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (1): 36-43s.
- Aslım, B. Beyatlı, Y., 2004. Antibioticresistance and plasmid DNA contest of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish youghurts. *Journal of Food Science and Technology* 41: 18-22s.
- Aukrust, T., Blom, H., 1992. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Res. Int.* 25:253–261s.
- Axelsson, L., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology (Salminen, S. von Wright, A. ve Ouwehand A. editörler). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3. baskı. Marcel Dekker, Inc., New York, s:1–66.
- Ballongue, J., 2005. Lactic Acid Bacteria: Bifidobacteria and Probiotic Action ( Salminen, S., von Wright, A. ve Ouwehand, A. Editörler ). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 3. baskı, Marcel Dekker, Inc., New York, s:67 123.
- Beasley, J., 2004. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Doktora tezi, Helsinki Üniversitesi, Finlandiya. 57s.
- Blomqvist, T., Steinmoen, H. and Havarstein, L.S., 2006. Natural Genetic Transformation: a Novel Tool for Efficient Genetic Engineering of the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 6751–6756s.
- Claverys, J.P. , and L.S. Havarstein., 2002. Extracellular-peptide control of competence for gentic transformation in streptococcus pneumoniae. *Front. Biosci.*7:d1798-1814s.
- Coakley, M., 1997. Application and Evaluation of the Phage Resistance- and Bacteriocin Encoding Plasmid pMRC01 for the Improvement of Dairy Starter Cultures. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 1434–1440.
- Çoşkun, F., 2006, “Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular,” *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2: 27-33s.
- Davidson, B. E., Llanos, R. M., Cancilla, M. R., Redman, N. C., Hillier, A. J., 1995. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5:763–84s.
- Deet, H.C. ve Tamime, A.Y., 1981, “Yoghurt: Nutritive and Therapeutic Aspects,” *Journal of Food Protection*, 44 (1): 78-86s.
- Filutowicz, M., Burgess, R., Gamelli, R.L., Heinemann, J.A., Kurenbach, B., Rakowski, S.A., Shankar, R., 2008. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid* 60 38- 44s.

- Francia, M.V., Fujimoto, S., Tille, P., Weaver, K.E. and Clewell, D.B., 2004. Replication of *Enterococcus faecalis* Pheromone-Responding Plasmid pAD1: Location of the Minimal Replicon and *oriV* Site and RepA Involvement in Initiation of Replication. *Journal Of bacteriology*, 5003–5016s.
- Gardner, N.J., Savard, T., Obermier, P., Caldwell, G., Champagne, C.P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. Journal of Food Microbiology* 64,261-275s.
- Gezginç, Y., 2010. Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit İçeriği ve Biyojenik Amin Üretimi Bakımından Gıda Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Doktora Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş. 245s.
- Gilliand, S.E., 1990. “*Health and Nutritional Benefits from Lactic acid bacteria*,” *FEMS Microbiology Reviews*, 87: 175-188s.
- Girard, S.L., Moineau, S., 2007. Analysis of theta-replicating plasmid of *streptococcus thermophilus*. *Plasmid*. 58:174-181s.
- Grohmann, E., Muth, G. and Espinosa, M., 2003. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 277–301s.
- Halkman, K., 1991, *Tarım Mikrobiyolojisi*, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No: 1214, 82s.,Ankara.
- Herman, R.E., McKay, L.L.,1985. Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:1103-1106s.
- Holt, J.G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Holt, J. G. Editör). 9. baskı, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, s:527-558.
- Jay, J. M., 2000. *Modern Food Microbiology: Fermentation and fermented dairy products*. 6. baskı, An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, ABD, s:113–130.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G., 1998. Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125s.
- Koçer E, Tekel Ç, Akçelik M., 2004. Conjugal transfer and stability of the plasmids determining exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* strains. *Turk J Vet Anim Sci*, 28: 481-487s.
- Kok, J., 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 15-42s.
- Kurt, Ş. Ve Zorba, Ö., 2005. “Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları,” *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16 (1): 77-83s.

- Lanka, E., and B. Wilkins., 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 141-169s.
- Lindgren, S. E., And W. J. Dobrogosz., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 149-164s.
- Matsuzaki, T., 2003. Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain shirota, in *Handbook of Fermented Functional Foods*, 145-177s, Ed. Farnworth, E. R., CRC Press, New York.
- Melnikova, V. M., Gracheva, N. M., and Belikov G. P., 1993. The chemoprophylaxis and chemotherapy of opportunistic infections. *Antibiotiki i Khimioterapiia*, 38:44–8s.
- Mills, S., 2002. Use of lacticin 481 to facilitate delivery of the bacteriophage resistance plasmid, pCBG104 to cheese starters. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 238–246s.
- Nettles, C. G., and S. F. Barefoot., 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56, 338-356s.
- Peng, Y., Rakowski, S.A. and Filutowicz, M., 2006. Small deletionvariants of the replication protein,  $\pi$ , and their potential for over-replication-based antimicrobial activity *FEMS Microbiol Lett* 261 245–252s.
- Prescott, C.S. and Dunn, G.C., 1987. *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, 882s.
- Rodriguez, M., Holcik, M. and Iyer, V.N., 1995. Lethality and Survival of *Klebsiella oxytoca* Evoked by Conjugative IncN Group Plasmids *Journal Of Bacteriology* 6352–6361s.
- Sambrook J., Fritsch F. Maniatis T., 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Settanni, L., and Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138s.
- Sharpe, M.E., 1979, “Identification of the Lactic acid bacteria.” In Love-Lock (Editor), *Identification Methods for Bacteriologists*. Society for Applied Bacteriology Technical Series 14. Academic Press, London, 243-259s.
- Siezen, R. J., Kok, L., Abee, T., Schaafsma, G., 2002. Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. *Proceeding of the Seventh Symposium on Lactic acid bacteria: Genetics, Metabolism and Applications Congress*: 1- 28s.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997, “Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy.” *International Journal Food Microbiol*, **36**: 1-29s.
- Sudheer, K. S., Syed, U. A., Ashok, P., 2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* 41:991–1000s.

- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M. and de Vos, W.M., 2000. Nucleotide Sequence Analysis of the Lactococcal EPS Plasmid pNZ4000. *Plasmid* **43**, 130–136s.
- Visser, R., Holzapfel, W.H., Bezuidenhout, J.J., Kotze, J.M., 1986. “Antagonism of Lactic Acid Bacteria against Phytopathogenic Bacteria,” *Applied and Environmental Microbiology*, 52 (3): 552-555s.
- Vogel, R.F., Ehmann, M.A., Ganzle, M.G., 2002. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 631-638s.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Altuğ KARAMAN  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 24.05.1987/KAHRAMANMARAŞ  
Telefon : 05548550292  
Faks :  
e-posta : altugkaraman@hotmail.com

### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi  | Mezuniyet tarihi |
|---------------|----------------|------------------|
| Yüksek lisans | KSÜ /Zootekni  | 2012             |
| Lisans        | KSÜ/ Biyoloji  | 2009             |
| Lise          | Atatürk Lisesi | 2005             |

### İş Deneyimi

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

- 1.
- 2.

### Hobiler

Satranç, Basketbol, Futbol, Yüzme, Seyahat