

Lactococcus lactis Suşlarının Stres Koşullarına Dirençlilik Özellikleri*

Rahmi LALE¹

Mustafa AKÇELİK²

Geliş Tarihi : 29.12.2003

Özet: Bu çalışmada, *L. lactis* subsp. *lactis* LL52, *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşlarında dört farklı stres koşuluna karşı hücresel dirençlilik gelişimi araştırıldı. Stres koşulu olarak yüksek ve düşük sıcaklık, düşük asitlik ve ozmotik basıncın kullanıldığı denemelerde, LL52 diğer suşlardan daha duyarlı bulundu. Stres koşullarına dirençlilik ya induksiyona bağlı ya da sürekli bir karakter gösterdi. Stres dirençlilik induksiyonu, bakteri tipine ve stres faktörlerine bağlı olarak hücre üremesinin 40 ve 90 dakikaları arasında meydana geldi.

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus lactis*, stres, direnç

Resistance Characteristics of *Lactococcus lactis* Strains Under Stress Conditions

Abstract: In this study, cellular resistance responses against four stress factors were investigated for the strains *L. lactis* subsp. *lactis* LL52, *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62. Strain LL52 was found to be the most sensitive strain at the end of stress bioassays such as high and low temperatures, low pH and osmotic pressure. Stress resistance specificities of these strains were showed either inducible or constitutive characteristics. Stress resistance induction occurred between 40 - 90 minutes of cell growth according to the bacterial types and stress factors.

Key Words: *Lactococcus lactis*, stress, resistance

Giriş

Laktokokların (*Lactococcus*) starter kültür olarak kullanılan suşları; fermente süt ürünlerinin yapısal ve aromatik özelliklerinin gelişimi yanında, bu ürünlerin gıda kökenli hastalık ya da gıda bozulması etmeni bakterilerden korunmasında da aktif bir rol oynamaktadır (Schleifer ve ark. 1985, Kim ve ark. 1999). Starter kültürler, taşıma, saklama, kültür transferi ve endüstriyel fermentasyonların değişik aşamalarında stres koşullarına maruz kalmaktadır. Bunların başlıcaları; hammadde işleme süreçlerinde tipik stres koşulu olan yüksek sıcaklık, üretilen starter kültür preparatlarının saklanmasında karşılaşılan düşük sıcaklık ya da ozmotik basınç (sprey kurutucularda kurutma işlemine bağlı olarak ortaya çıkar) ve çoğu kez doğal ortamlarında güneş altında maruz kalınan ultraviyole ışınlar (yüksek sıcaklık ile birlikte), olarak sayılabilir (Le Bourgeois ve ark. 1995, Sanders ve ark. 1999). Doğal koşullarda kritik bir diğer stres faktörü de yetersiz besin arzıdır (Duwat ve ark. 1999). Üreme yeteneğindeki hücre sayısında önemli ölçüde düşmeye yol açan stres koşullarına dirençli starter kültür suşlarının seçimi ve kullanımı, fermente gıda üretiminde kalite ve maliyet ekonomisi açısından büyük önem taşımaktadır. Dirençli suşların seçiminde stres koşullarının tanımlanması en kritik aşamayı teşkil etmektedir.

Zira, doğal ekosistemlerin önemli ölçüde zarar gördüğü günümüz dünyasında, herhangi bir organizma için optimum koşullardan söz etmek, ancak deneysel ortamlarda mümkün olmaktadır (Fukuda ve ark. 2002, Kleerebezem ve ark. 2002, Weber ve Jung 2002). Özetle doğal koşullarda yaşamın sürekliliği, organizmaların karşı karşıya kaldıkları stres koşullarına adaptasyon yetenekleri ile doğrudan ilişkili hale gelmiştir (Jakob ve ark. 1999).

Bu çalışmada; yüksek ve düşük sıcaklık, düşük asitlik ve ozmotik basınç gibi dört değişik stres koşuluna karşı direnç yanıtı oluşturan *Lactococcus lactis* suşlarının tanımlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışma kapsamında kullanılan, *L. lactis* subsp. *lactis* LL52, *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Suşlar M17 broth ortamlarında (Terzaghi ve Sandine 1975) 30^o C'de 12 saat süreyle geliştirilmiş ve haftalık transferler yapılarak +4^o C'de muhafaza edilmiştir.

*Yüksek Lisans Tezinden hazırlanmıştır.

¹Department of Biochemistry, NTNU University, Trondheim-Norway

² Ankara Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü-Ankara

Bakterilere stres koşullarının uygulanması

M17 sıvı besiyerinde 30° C'de 18 saat süreyle geliştirilen kültürler steril santrifüj tüplerine aktarılmış ve 5500 devir/dk hızda 15 dk santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürülmüştür. Deneyden bir saat önce 42° C'ye ayarlı su banyosuna konulan GM17 sıvı besiyeri içerisinde bakteri çöktürmeleri çözülmüş ve hücre süspansiyonları 42° C'deki su banyosunda 10 - 150 dk süreyle inkübasyona bırakılarak yüksek sıcaklık uygulaması yapılmıştır. Örnekler her 10 dk'da bir alınarak analiz edilmiştir (Whitaker ve Batt 1991). Aynı koşullarda hazırlanan ve örneklenen *L. Lactis* suşlarında ; düşük sıcaklık stres koşulu için +8° C inkübasyon sıcaklığı, ozmotik basınç stres koşulu için % 2.5 tuz (NaCl) konsantrasyonu içeren gelişme ortamı ve düşük asitlik stres koşulu için de pH 5.5'e ayarlanan gelişme ortamı kullanılmıştır (Wouters ve ark. 1998; Wouters ve ark. 1999, Guillot ve ark. 2000, Kim ve ark. 2002).

Canlı koloni sayımı sonucu elde edilen tablo girdileri, faktöryel varyans analizi ile değerlendirilmiştir (Norman 1981).

Bulgular ve Tartışma

Stres uygulamalarından toplam etkilenme düzeylerinin bakteri türleri ile ilişkisinin bulunup bulunmadığı, çoklu karşılaştırma testi kullanılarak ölçülmüştür. Bu test sonucunda *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun stres koşullarından diğer iki bakteriye oranla daha yüksek düzeyde etkilendiği (-2,044), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 ile *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşları arasında ise anlamlı bir üreme farklılığının meydana gelmediği belirlenmiştir (Çizelge 1).

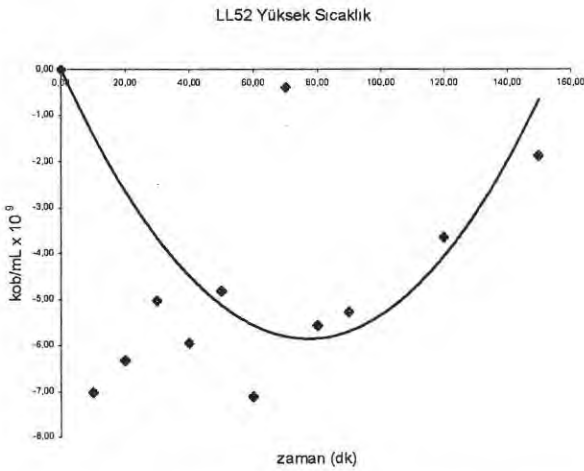
Bakterilerin stres koşulları altında, zamana karşı üreme grafikleri Şekil 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'de verilmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunda, yüksek sıcaklık uygulamasının 0 - 80 dk'ları arasında canlı hücre sayısında düşme belirlenmiştir. 80. dk'dan sonra, stres koşuluna geliştirilen hücresel yanıtı bağlı olarak, 150. dk'ya kadar sürekli artış meydana gelmiştir (Şekil 1). Yüksek sıcaklık stresi altında *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunda, *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun tam aksine, 80. dk'ya kadar üremede artış olmuş, 80 - 150 dk'ları arasında, hücresel stres yanıtının geliştirilememesi nedeni ile sürekli azalma tespit edilmiştir (Şekil 2). *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşunda da sıcaklık stresi karşısında hücresel yanıt geliştirilememiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşu ile benzer bir şekilde, bu suşta da stres uygulamasının 50. dk'sına kadar canlı hücre sayısı artmış, 50 - 150 dk'ları arasında azalmıştır (Şekil 3).

Düşük sıcaklık stresi karşısında, her üç bakteri de benzer sonuçlar meydana gelmiştir. Stres koşulu uygulamasında *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 ve *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşlarında 70. dk, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunda ise 80. dk'ya kadar canlı hücre sayısı azalmış, bu sürelerden sonra, stres yanıtına bağlı olarak, üremede artış başlamıştır (Şekil 4, 5 ve 6).

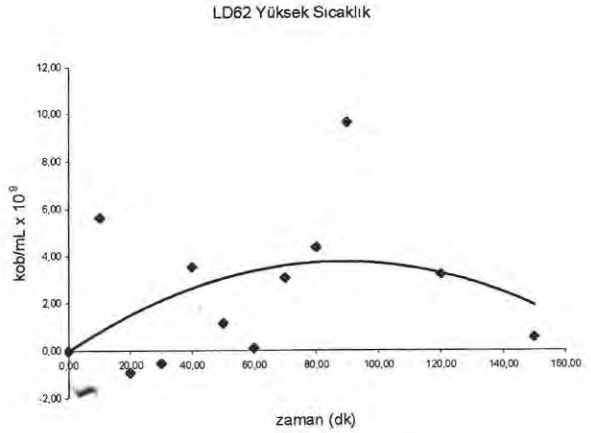
Çizelge 1. *L. lactis* suşlarının stres faktörlerinden toplam etkilenme düzeyleri

Bakteri	LLLL52	LDLD622	LCLC79
Ortalama	-2,044 ^{A*}	1,139 ^B	0,315 ^B

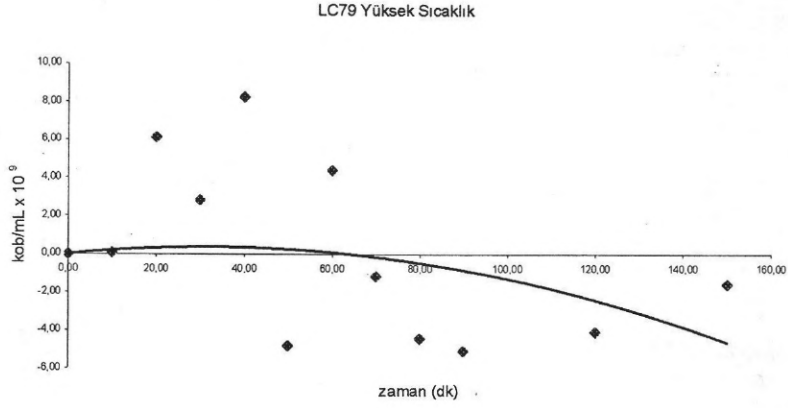
* Aynı üst simgeler farklanma olmadığını, farklı üst simgeler farklanma olduğunu gösterir.



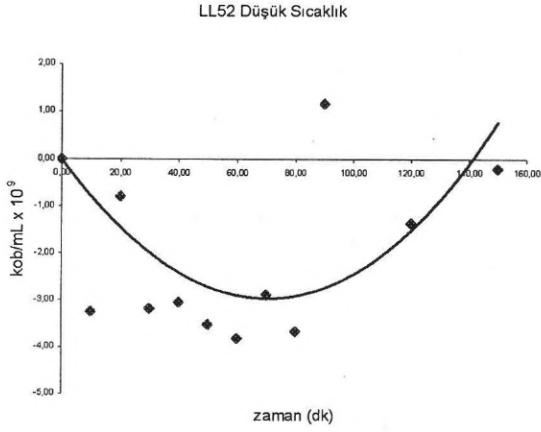
Şekil 1. *L. lactis* subsp. *lactis* suşunun yüksek sıcaklık stresi altındaki gelişim eğrisi



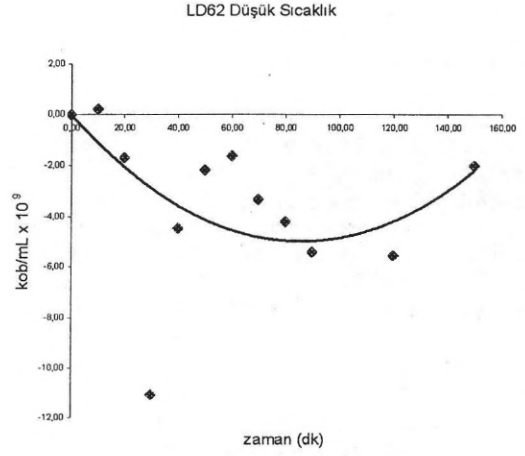
Şekil 2. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunun yüksek sıcaklık stresi altındaki gelişim eğrisi



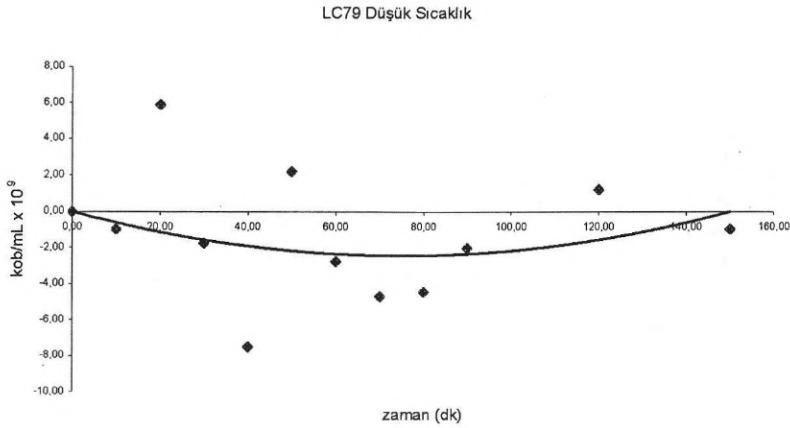
Şekil 3. *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşunun yüksek sıcaklık stresi altındaki gelişim eğrisi



Şekil 4. *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun düşük sıcaklık stresi altındaki gelişim



Şekil 5. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunun düşük sıcaklık stresi eğrisi altındaki gelişim eğrisi



Şekil 6. *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşunun düşük sıcaklık stresi altındaki gelişim eğrisi

Ozmotik stres koşullarında *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunda hücresel yanıt hazırlık süresi 0 - 40 dk arasında tanımlanmıştır. Bu zaman diliminde üremede azalma meydana gelirken, 40 - 150 dk arasında, stres koşullarına direnç özelliğinin kazanılması sonucu, artış belirlenmiştir (Şekil 7). *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşu ozmotik stres altında sürekli artan bir üreme karakteristiği göstermiştir (Şekil 8). Bu bulgu, söz konusu suşun ozmotik stres koşuluna uyum için sürekli üretilen yanıt mekanizmaları içerdiğine işaret etmektedir.

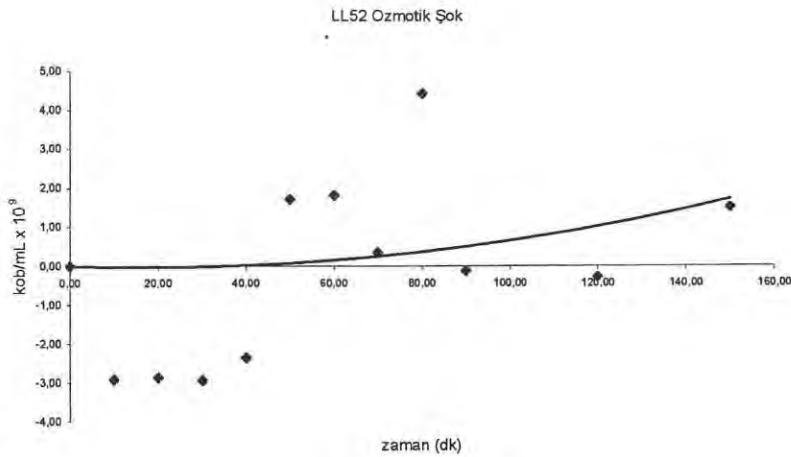
L. lactis subsp. *cremoris* LC79 suşu ise ozmotik şok koşullarına 60. dk'dan sonra stres yanıtı oluşturmuştur. Zira üremede artış bu süreden sonra başlamıştır (Şekil 9). Düşük asitlik stresi altında *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun üremesinde 90. dk'ya kadar azalma saptanırken, 90 - 150 dakikaları arasında sürekli bir artış gözlenmiştir (Şekil 10). Bu bulgu; *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun, söz konusu stres koşuluna karşı hücresel yanıt oluşturabilmek için 90 dk'lık bir hazırlık süresine ihtiyaç duyduğunu ispat etmektedir.

L. lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunda 80. dk'ya kadar artan canlı hücre sayısı, 80 - 150 dakikaları arasında azalmıştır (Şekil 11). *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşu ise, düşük asitlik koşullarında sürekli artan bir üreme karakteristiği göstermiştir (Şekil 12). Bu bulgu da, *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşunun düşük asitlik koşullarında geliştirdiği hücresel yanıt mekanizmalarının süreklilik arz ettiğini kanıtlamaktadır.

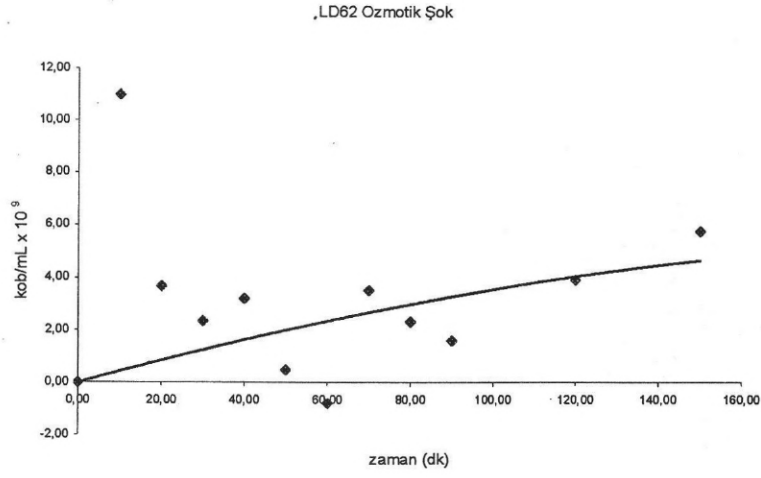
Literatür verilerinde genellikle *L. lactis* subsp. *lactis*'in stres koşullarına karşı *L. lactis* subsp. *cremoris*'ten daha dirençli olduğu belirtilmektedir (Duwat ve ark.1999, Sanders ve ark.1999, Pillidge ve ark. 2002, Frees ve ark. 2003). Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarında bu literatür

verilerinin aksine stres faktörlerinin toplam etkinliğine karşı en hassas suş *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 olarak belirlenmiştir. LL52 suşu, denenen tüm stres faktörlerine karşı stres direnç yanıtı oluşturma özelliği ile de LD62 ve LC79 suşlarından ayrılmıştır. Bu farklı karakteristikleri LL52 suşunu gerek bilimsel ve gerekse endüstriyel açıdan önemli hale getirmektedir. Diğer yandan ozmotik stres yanıtının *L. lactis*'te genellikle yüksek sıcaklık stresi ile benzer mekanizmalar içerdiğine dair literatür verileri de (Sanders ve ark. 1999, Vereecken ve Van Impe 2002, Frees ve ark. 2003) araştırmamızda kullanılan LD62 ve LC79 suşlardan elde edilen bulgular ile uyumlu değildir. Zira, LD62 ve LC79 suşlarında ozmotik strese karşı yanıt geliştirilmiş ancak yüksek sıcaklık stresine başlangıçta direnç göstermelerine rağmen, süreklilik arz eden bir yanıt oluşturulamamıştır. Bu suşlarda hücresel stres yanıt mekanizmalarının detaylı bir şekilde çalışılması, *L. lactis*'te biyokimyasal ve genetik farklılaşmanın esasına ilişkin ipuçları sunabilir.

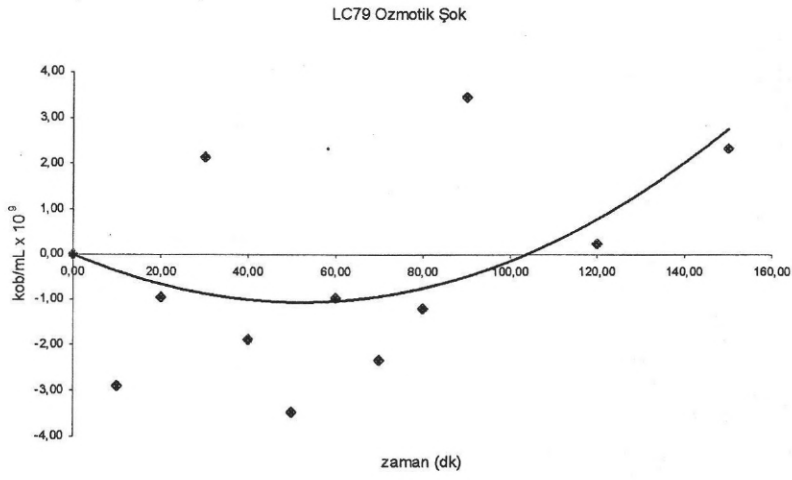
Stres koşullarına karşı Türkiye kökenli *L. lactis* suşlarında, genel bakteriyel yanıt sistemlerinde de olduğu gibi, ya belirli bir düzeyde direnç gösterildikten sonra yanıtı oluşturacak proteinlerin ileri düzeyde indüksiyonu gerçekleştirilememiş (yüksek sıcaklık stresine karşı LC79 ve LD62 suşlarının yanıtında olduğu gibi) ya da bakterinin sürekli dirençliliğini sağlayacak yanıt oluşturulmuştur. Starter kültür suşlarında tercih edilen stres direnç mekanizmaları, süreklilik arz eden yanıt sistemleridir. Zira, endüstriyel fermentasyonlarda belirli bir stres faktörü ya da stres faktörlerinin birkaçı bir arada bulunabilir ve uzun süreli etkinlik gösterebilirler. Diğer yandan, laktokokların alternatif kullanım alanı olan gastrointestinal sisteme aşı taşınımı, ancak bu organizmaların düşük asit stresine stabil bir şekilde direnç gösteren suşları ile mümkün olabilir (Sanders ve ark. 1999, Kim ve ark. 2001).



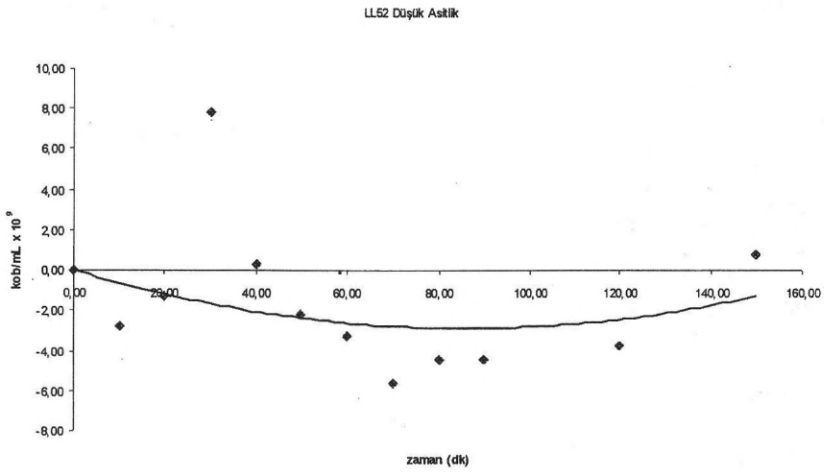
Şekil 7. *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun ozmotik stres altındaki gelişim eğrisi



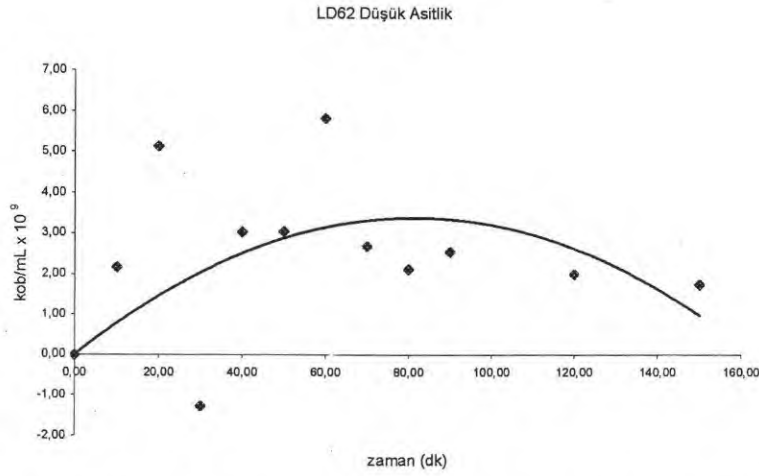
Şekil 8. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunun ozmotik stres altındaki gelişim eğrisi



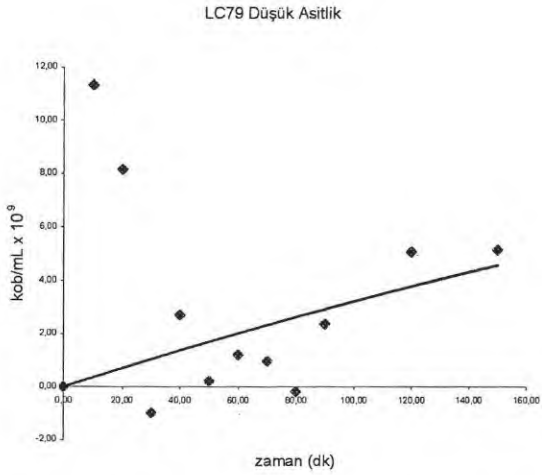
Şekil 9. *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşunun ozmotik stres altındaki gelişim eğrisi



Şekil 10. *L. lactis* subsp. *lactis* LL52 suşunun düşük asitlik stresi altındaki gelişim eğrisi



Şekil 11. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD62 suşunun düşük asitlik stresi altındaki gelişim eğrisi



Şekil 12. *L. lactis* subsp. *cremoris* LC79 suşunun düşük asitlik stresi altındaki gelişim eğrisi

LC79 ve LD62 suşlarında olduğu gibi, yüksek sıcaklık stresiyle belirli düzeyde ve sürede direnç gösterebildikten sonra, bu direncin kırılarak hücrelerin parçalanması da, özellikle peynir endüstrisi açısından kritik öneme sahip bir bulgudur. Peynirin olgunlaşması ve aromasının oluşumu, süt proteinlerinin aşamalı parçalanması ile elde edilmektedir. *L. lactis*, bu proteinlerin parçalanması için hücre içi ve hücre dışı proteinaz sistemlerini kullanmaktadır. Peynirin olgunlaşması üzerine yapılan çalışmalar, aroma ve tat oluşumunda rol alan ana enzim grubunun hücre içi peptidazlar olduğunu göstermiştir (Bie ve Sjostrom 1975, Ardo ve Pettersson 1988, Allison ve Klaenhammer, 1998, Pillidge ve ark. 2002). Peynir fermentasyonlarında olgunlaşmanın

hızlandırılması amacı ile kullanılan temel yöntem, fermentasyonun ileri aşamalarında ısı şoku uygulaması ile bakteriyel parçalanmanın sağlanmasıdır (Ardo ve Pettersson 1988, Wood ve ark. 2001). Bu açıdan bakıldığında LC79 ve LD62 suşlarındaki ısıl direncin belirli bir zaman sonunda kırılması, starter kültür suşlarında indüklenen lizis için model sistem olarak kullanılabilir nitelik taşımaktadır.

Sonuç

Türkiye kökenli *L. Lactis* suşlarının, endüstriyel üretim koşullarında en fazla rastlanılan stres faktörlerine karşı oluşturduğu direnç yanıt özellikleri, bu bakterilerin starter kültür suşları ve vektör sistemler olarak kullanımlarında referans oluşturacak niteliktedir. Özellikle denenen tüm stres faktörlerine direnç oluşturan LL52 suşu, endüstriyel potansiyeli açısından öne çıkmaktadır. Diğer yandan LC79 ve LD62 suşlarının sıcaklık stresiyle karşı sürekli bir direnç yanıtı geliştirememeleri, peynir üretiminde ekonomik yönden kritik bir önem taşıyan olgunlaştırma sürecinin kısaltılması uygulamasını mümkün kılacaktır. Bunlara ilave olarak, Türkiye kökenli bakterilerin, benzer stres koşulları altında, literatür verilerinde tanımlanan starter kültür suşlarına göre bazı farklı yanıt mekanizmalarına sahip olması, bu bakterilerin bilimsel araştırmalarda model sistemler olarak kullanımını beraberinde getirecektir.

Teşekkür

İstatistik analizler konusunda yaptığı katkılardan dolayı Sayın Doç. Dr. Ensar BAŞPINAR'a (Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Hayvansal Üretim Bölümü, Genetik ve İstatistik Birimi) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Allison, G. E. and T. R. Klaenhammer, 1998. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, 8, 207-226.
- Ardo, Y. and H. E. Pettersson, 1998. Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *J. Dairy Res.*, 55, 239-246.
- Bie, R. and G. Sjöström, 1975. Autolytic properties of some lactic acid bacteria used in cheese production. Part II. Experiments with fluid substrate and cheese. *Milchwissenschaft*, 30, 739-747.
- Duwat, P., S. D. Erlich and A. Grus, 1999. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Mol. Microbiol.*, 17, 1121-1131.
- Frees, D., F. K. Vogensen and H. Ingmer, 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* (In press).
- Fukuda, D., M. Watanabe, S. Sonezaki, S. Sugimoto, K. Sonomoto, and A. Ishizaki, 2002. Molecular characterization and regulatory analysis of *dnaK* operon of halophilic lactic acid bacterium *Tetragonococcus halophila*. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 88-394.
- Guillot, A., D. Obis and M. Y. Mistou, 2000. Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int. J. Food Microbiol.*, 55, 47-51.
- Jakob, U., W. Muse, M. Eser and J. C. A. Bardwell, 1999. Chaperone activity with redox switch. *Cell*, 96, 314-352.
- Kim, W. S., J. Ren and N. W. Dunn, 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their response to stresses. *FEMS Microbiol. Let.*, 171, 57-65.
- Kim, W. S., J. H. Park, J. Ren, P. Su and N. W. Dunn, 2001. Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4594-4602.
- Kim, W. S., J. H. Park, J. E. Tandianus, J. Ren, P. Su and N. W. Dunn, 2002. A distinct physiological state of *Lactococcus lactis* cell that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. *FEMS Microbiol. Let.*, 212, 203-208.
- Kleerebezem, M., I. C. Boels, M. N. Groot, I. Mireau, W. Sysbesma and J. Hugenholtz, 2002. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic engineering. *J. Biotech.*, 98, 99-213.
- Le Bourgeois, P., M. Lautier, L. Van Den Berghe, M. J. Gasson and P. Ritzenthaler, 1995. Physical and genetic map of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome. *J. Bacteriol.*, 177, 2840-2850.
- Norman, T. J. B. 1981. *Statistical methods in Biology*. Edward Arnold, Chapman and Hall, Inc., 269 p., New York.
- Pillidge, C. J., P. S. Rallabhandi, X. Tong, P. Gopal, P. C. Farley and P. A. Sullivan, 2002. Autolysis of *Lactococcus lactis*. *Int. Dairy J.*, 12, 133-140.
- Sanders, J. W., G. Venema, and J. Kok, 1999. Environmental stress response in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 483-501.
- Schleifer, K. H., J. Kraus, G. Drovak, R. Klipper-Balz, M. D. Collins and W. Fischer, 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6, 183-195.
- Terzaghi, B. E. and W. Sandine, 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29, 807-813.
- Vereecken, K. M. and J. F. Van Impe, 2002. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 73, 239-250.
- Weber, A. and K. Jung, 2002. Profiling early osmotic stress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA microarrays. *J. Bacteriol.*, 184, 5502-5507.
- Whitaker, R. D. and C. A. Batt, 1991. Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1408-1412.
- Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Kraemer, B. Poolman and L. T. Smith, 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Com. Biochem. Physiol. Part A*, 130, 437-460.
- Wouters, J. A., J. W. Sanders, J. Kok, W. M. De Vos, O. P. Kuipers and T. Abee, 1998. Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiol.*, 144, 2885-2893.
- Wouters, J. A., B. Jeynoy, F. M. Rombouts, W. M. De Vos, O. P. Kuipers and T. Abee, 1999. Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in cryoprotection. *Microbiology*, 145, 3185-3194.

İletişim Adresi:

Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü - Ankara

Fax: 312 3178711

E-mail: akcelik@science.ankara.edu.tr