

## LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS SUŞLARINDA YÜKSEK SIKLIKTA KONJUGAL TRANSFER SİSTEMLERİNİN ANALİZİ\*

### ANALYSIS OF HIGH FREQUENCY CONJUGAL TRANSFER SYSTEMS IN STRAINS OF LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS

Çağla TÜKEL, Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

**ÖZET:** Bu çalışmada, *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında laktoz fermentasyonu özelliğini kodlayan altı farklı plazmidin yüksek sıklıkta konjugal aktarım yeteneği araştırıldı. Bu plazmidlerin konjugal transfer sıklıkları; iki seks faktörünün interaksyonuna bağlı olarak (Clu ve Agg), Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup>, Agg<sup>+</sup> x Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup>, Agg<sup>-</sup> ya da Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>-</sup> x Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>-</sup> konjugasyon eşleri için  $1.5 \times 10^{-5}$  -  $1.0 \times 10^{-7}$  ve Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>-</sup> x Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup> konjugasyon eşleri için  $7.1 \times 10^{-2}$  -  $2.7 \times 10^{-3}$  oranlarında değişim gösterdi. Laktoz plazmidlerinin stabiliteeleri ise; doğal suşlarda %82-96, MG1390 alıcı suşu için tanımlanan konjugantlarda %77-98 ve MCL8060 alıcı suşu için tanımlanan konjugantlarda ise %44-67 arasında saptandı.

**ABSTRACT:** In this study, high frequency conjugal transfer ability of six different lactose plasmids encoding lactose fermentation in *L. lactis* subsp. *lactis* strains was searched. Depending on the interactions between the two sex factors (Clu and Agg), the conjugal transfer frequencies of these plasmids have ranged in the rates of  $1.5 \times 10^{-5}$  -  $1.0 \times 10^{-7}$  for Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup>, Agg<sup>+</sup> x Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup>, Agg<sup>-</sup> or Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>-</sup> x Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>-</sup> conjugation pairs and  $7.1 \times 10^{-2}$  -  $2.7 \times 10^{-3}$  for Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>-</sup> x Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup> conjugation pairs. And the stability of the lactose plasmids were 82-96% in wild type strains, 77-98% in the conjugants of recipient strain MG1390, 44-67% in the conjugants of recipient strain MCL8060.

### GİRİŞ

Değişik fermente gıdaların üretiminde starter kültürler olarak kullanılan laktokok suşlarında plazmid kodlu laktoz genlerinin konjugasyon sistemleri ile aktarımı, ilk kez GASSON ve DAVIES (1980) tarafından tanımlanmıştır. Bu öncü araştırmalardan sonra, farklı suşlar ile yürütülen çalışmalarda; laktoz plazmidlerinin doğal süreçlerde aktarımında konjugasyonun genel bir sistem olduğu, ancak düşük sıklıkta meydana geldiği saptanmıştır (McKAY ve ark. 1980; SNOOK ve McKAY, 1981; SHEREWITZ ve ark. 1983). Moleküler genetikte sağlanan gelişmeler, bakterilerin arzu edilen yönde yeniden düzenlenmesini olanaklı kılmaktadır. Bu genetik düzenlemelerin, yalnız etkin aktarım sistemleri içeren suşlarda gerçekleştirilebilmesi; laktokoklarda yüksek sıklıkta konjugal aktarım sistemlerinin saptanması ve analizini, starter suş geliştirme çalışmalarının hareket noktası haline getirilmiştir (KOK, 1996).

Konjugasyon, verici (donor) ve alıcı (recipient) bakteri hücrelerinin fiziksel teması sonucu, genetik materyalin verici hücreden alıcı hücreye doğru tek yönlü aktarımı ile karakterize edilmektedir. *Lactococcus* cinsi üyelerinde, hücre teması ve konjugal köprülerin oluşumunda rol oynayan cinsel piluslar bulunmadığı için, konjugasyonun başlatılabilmesinde hücrelerin yüzeysel teması esastır (GASSON ve DAVIES, 1980; SHAERMAN ve ark. 1996). *L. lactis* suşlarında belirlenen atipik agregatif (Clu<sup>+</sup>) fenotiplerin yüksek sıklıkta konjugal aktarım yeteneği ile ilişkili olduğu, değişik araştırmacılar tarafından saptanmıştır (GODON ve ark. 1994; GASSON ve ark. 1995; SHAERMAN ve ark. 1996). Agregatif fenotipler, suşların sıvı besin ortamlarında gelişimi sonucu oluşturdukları sünme yapıları ve bu yapıların mekanik karıştırıcılarda yüksek hız uygulaması sonucu çözülmemesi ile tanımlanmaktadır (McKAY ve ark. 1980; SNOOK ve McKAY, 1981). Diğer yandan agregatif olmayan (Clu<sup>-</sup>) bazı tipik *L. lactis* suşlarının verici olarak kullanılması halinde de yüksek konjugal transfer oranının sağlanabildiği belirlenmiştir. (KRANENBURG ve DE VOS, 1998; AKÇELİK, 1999). Suştan suşa farklılık gösterebilen ve oldukça karmaşık süreçlere sahip bu aktarım sistemlerinin genetik determinantları ve biyokimyasal doğasının analizi üzerinde araştırmalar, yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

\* Bu çalışma Çağla Tükel'in, Yüksek Lisans Tezinin bir bölümüdür.

Bu araştırmada, 10 adet verici suşa karşı iki farklı alıcı suşun kullanıldığı konjugal eşleştirme çalışmaları ile, Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında yüksek sıklıkta konjugal transfer sistemlerinin tanınlanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Araştırmada kullanılan konjugal verici ve alıcı suşlar TKEL (1999) tarafından izole edilmiş ve tanınlanmıştır. Kontrol alıcı suş *L. lactis* subsp. *lactis* MG1390 MICHAEL J. GASSON'dan (AFRC, Norwich/UK) sağlanmıştır. Bakteriler M17 dik agar besiyerinde +4°C'de ve litmuslu süt ortamında -20°C'de saklanmıştır.

### Yöntem

#### Antibiyotik Dirençlilik zelliğine Sahip Konjugal Alıcı Suş Geliştirme alışmaları

Streptomisin ve kanamisin (Sigma Chem. Co., USA) stok zlteleri (10 mg/mL) saf su ile hazırlanmış ve membran filtrelerden (0.45 m, Sartorius, Germany) geçirilerek sterilize edilmiştir. Akriflavin (Sigma Chem. Co., USA) muamele edilerek (40 g/mL) seçilen, plazmidleri giderilmiş alıcı suş *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MCL8060 (TÜKEL, 1999) ve verici suşlara karşı bu antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonları, antibiyotiklerin seri dilüsyonları ile hazırlanan Elliker broth (DIFCO MANUAL, 1984) ortamlarında saptanmıştır. Plazmid içermeyen *L. lactis* subsp. *lactis* MCL8060 suşu, antibiyotiklerin alt inhibisyon konsantrasyonlarında beş pasaj geliştirildikten sonra, arttırılan antibiyotik konsantrasyonlarına denenmiştir. Her iki antibiyotik için söz konusu suşta tekrarlanan alt inhibisyon konsantrasyonunda dirençliliğe teşvik sonucu, maksimum direnç konsantrasyonuna ulaşılmıştır (PARADA ve DE GIACHI, 1986).

### Konjugasyon

Konjugal aktarımda, alıcı ve verici suş karışımlarının membran filtreler (0.45 m, Sartorius, Germany) zerinde eşleştirilme yönteminden yararlanılmıştır (GASSON ve DAVIES, 1981). Konjugantlar, alıcı suşların dirençli olduğu antibiyotikleri içeren laktoz indikatör agar (McKAY ve ark. 1972) ortamında seçilmiştir. Konjugasyon sürecinde transformasyondan korunmak için filtreler 2 mL DNaz I (100 g/mL, Sigma Chem. Co., USA) zltisi ile muamele edilmiş ve 37°C'de 15 dk. tutulmuştur. Ayrıca membran filtrelerin üzüldüğü steril fizyolojik su ortamlarına, 100 g/mL olacak şekilde DNaz I uygulanmıştır (GASSON ve DAVIES, 1981). Konjugasyon sıklığı; 1 mL için saptanan konjugant sayısının, 1mL'de bulunan verici suş sayısına oranlanması sonucu belirlenmiştir.

### Laktoz Plazmidi Stabilite Testi

Suşlarda ve konjugantlarda laktoz plazmidi stabilitesi; herbirinin %10 reconstitute skim milk (Oxoid Ltd., UK) ortamında 10 pasaj (~70 generasyon) geliştirilmesinden sonra seçilen kolonilerin, laktoz indikatör agarda test edilmesi ile saptanmıştır (COAKLEY ve ark. 1997). Bu ortamlarda 30°C'de 18 saat inkübasyon sonucu indikatör boya rengini sariya eviren koloniler laktoz fermentasyon yeteneğini sürdüren (Lac<sup>+</sup>) koloniler olarak tanımlanmıştır. Lac<sup>+</sup> kolonilerin popülasyondaki oranı, yüzde stabilite cinsinden ifade edilmiştir.

### Plazmid İzolasyonu ve Tanımlanması

*L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında plazmid izolasyonunda ANDERSON ve McKAY (1983) tarafından nren alkali denaturasyon yöntemi kullanılmıştır. Agaroz jellerde plazmid büyüklüklerinin belirlenmesinde ise ticari plazmid marker moleküllerin (ccc DNA, Bathesda Reseach Laboratories, Product No: 5622SA, USA) elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklükleri arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır. (ELDER ve ark. 1983).

## SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Konjugasyon denemelerinde verici suşlar olarak 6 farklı büyüklükte laktoz plazmidine sahip 10 *L. lactis* subsp. *lactis* suşu kullanılmıştır. Bu suşlarda öncelikle sıvı gelişme ortamlarında agregat oluşturan (Clu<sup>+</sup>) ve oluşturmayan (Clu<sup>-</sup>) fenotiplerin doğal antibiyotik direnç özellikleri belirlenerek, verici suş karakterleri tanımlanmıştır. Alıcı suşlar olarak ise, antibiyotik dirençlilik özelliklerine sahip ve plazmid içermeyen *L. lactis* subsp. *lactis* MCL8060 ile MG1390 suşları kullanılmıştır. Clu<sup>-</sup> fenotipteki MCL8060 suşu, plazmid giderme ve antibiyotik dirençlilik teşviki testleri sonucu, bu çalışmada geliştirilmiştir. Streptomisin ve kanamisin alt inhibisyon konsantrasyonlarında teşvik edilen bu suшта, söz konusu antibiyotikler için sırasıyla 450 µg/mL ve 120 µg/mL dirençlilik düzeylerine ulaşılmıştır. Kromozomal DNA kökenli konjugal faktör geni (Agg<sup>+</sup>) içeren, Clu<sup>-</sup>, plazmid-siz ve spektinomisine dirençli (100 µg/mL) MG1390 suşu ise kontrol alıcı suş olarak kullanılmıştır (Çizelge 1).

Verici suşlar ile her iki alıcı suş arasında yürütülen konjugasyon denemelerinde, tüm laktoz plazmidlerinin konjugal aktarım yeteneği içerdiği saptanmıştır. Konjugantlar, alıcı suş için tanımlanan antibiyotikleri içeren laktoz indikatör agar ortamlarında gelişme ve Lac<sup>+</sup> özellikte olma kriterlerine göre seçilmiştir (Çizelge 2). Sadece *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında değil, tüm *Lactococcus* cinsi üyelerinde laktoz plazmidlerinin konjugal transfer yeteneği içermeleri ve buldukları konakçılarda yüksek düzeyde stabilite göstermeleri yaygın bir durumdur (SINHA, 1980; LANGELLA ve ark. 1996). Ancak bu suşlarda konjugal transfer yeteneğinde olmayan değişik laktoz plazmidleri de tanımlanmıştır (VENEMA, 1993; KOK, 1996). Konjugatif özellikte olmayan laktoz plazmidine sahip suşlarda laktoz plazmidinin kaybının yüksek oluşu, bu suşların süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanımını engelleyen temel özelliklerden biridir (KOK, 1996). Araştırmada tanımlanan farklı moleküler büyüklüklerdeki tüm laktoz plazmidlerinin (Çizelge 1) konjugal aktarım yeteneğine sahip olmaları (Çizelge 2) bu açıdan önem taşımaktadır.

MCL8060 (Clu<sup>-</sup>) suşunun alıcı olarak kullanıldığı konjugasyon denemelerinde laktoz plazmidini transfer sıklığı,  $1.5 \times 10^{-5}$ - $1.0 \times 10^{-7}$  gibi düşük oranlarda saptanmıştır. Bu denemelerde, verici suşların Clu<sup>+</sup> ya da Clu<sup>-</sup> özellikleri, laktoz plazmidlerinin transfer oranları üzerinde bir farklılığa neden olmamıştır. Diğer yandan MG1390 alıcı suşu ile Clu<sup>+</sup> verici suşların (MCL4, MCL6, MCL7 ve MCL15) eşleştirilmeleri sonucu  $7.1 \times 10^{-2}$ - $2.7 \times 10^{-3}$ , aynı alıcı suş ile Clu<sup>-</sup> verici suşların (MCL5, MCL10, MCL33, MCL34, MCL35 ve MCL48) eşleştirilmesi sonucu ise  $2.4 \times 10^{-5}$  -  $5.2 \times 10^{-6}$  arasında konjugal aktarım oranları belirlenmiştir. Clu<sup>+</sup> fenotipte konjugantlar, sadece Clu<sup>+</sup> verici suşlar ile alıcı suş MG 1390 arasında gerçekleştirilen konjugal aktarımlarda meydana gelmiş (Çizelge 2) ve konjugasyon sıklıkları, laktokoklar, için tanımlanan optimum sınırlar ile uyum göstermiştir (GASSON ve DAVIES, 1980; McKAY ve ark. 1980; STEENSON ve KLAENHAMMER, 1987). Aktarım denemeleri sonucu elde olunan konjugantların tümünde, yalnız verici suşlara ait laktoz plazmidini belirlenmiştir (Şekil 1). Konjugal aktarımda verici suşların içerdiği diğer metabolik ya da kriptik plazmidlerin laktoz plazmidini ile birleşerek aktarılabildiği, farklı laktokok suşları için tanımlanmıştır. Aktarım sonrasında bu birleşik plazmidler konjugantlardan; ya büyümüş laktoz plazmidini ya da ayrılma sonucu iki farklı plazmid olarak izole edilmektedir (LEENHOUTS ve ark. 1991; BROADBEND ve ark. 1995; SHAERMAN ve ark. 1996). Bu araştırmada oluşturulan konjugantların hiçbirinde böyle bir durum saptanmamıştır.

Laktokoklarda yüksek sıklıkta konjugal transfer sistemlerinin mekanizması, *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının model sistemler olarak kullanılması suretiyle, tanımlanmaya çalışılmaktadır. Bu araştırmalardan elde olunan veriler, yüksek sıklıkta konjugal aktarım yeteneğinin en az iki farklı sistem tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (BRINGEL ve ark. 1992; GASSON ve ark. 1992; WANG ve ark. 1994; BROADBEND ve ark. 1995; LANGELLA ve ark. 1996; SHAERMAN ve ark. 1996; KRANENBURG ve DE VOS 1998) Bu sistemlerden en yaygın olanı, *L. lactis* subsp. *lactis* ML3 ve 712 ve ilişkili suşlarında bütün elemanları örneklenen iki seks faktörlü sistemdir. Burada biri kromozomal DNA (Agg<sup>+</sup>), diğeri ise plazmid DNA entegrasyonuna bağlı olarak (Clu<sup>+</sup>) ifade edilen, seks faktör genleri ürünlerinin interaksyonu sonucu yüksek sıklıkta transfer meydana gelmektedir. Söz konusu interaksyon yalnız verici hücre karakteristiği değildir. Eğer alıcı suş Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup> özellikte ise Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup> verici suşların kullanılması halinde laktoz plazmidini transferi,  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  gibi yüksek oran-

larda meydana gelebilmektedir. Clu<sup>+</sup>/Agg<sup>+</sup> verici suşların kullanılması halinde ise, alıcı suşlar Clu<sup>-</sup>/Agg<sup>-</sup> olsa dahi yüksek sıklıkta transfer olmaktadır (VAN DER LELIE ve ark. 1991; BRINGEL ve ark. 1992; GASSON ve ark. 1992; GODON ve ark. 1994; GASSON ve ark. 1995; SHAERMAN ve ark. 1996).

İkinci sistem ise; yalnız verici suş laktöz plazmidi tarafından determine edilmektedir. Bu sistemin, iki seks faktörlü sistemden temel farklılığı, Clu<sup>-</sup>/Agg<sup>-</sup> verici ve alıcı suşlarda yüksek konjugal transfer oranlarının sağlanmasıdır (WANG ve ark. 1994; BROADBEND ve ark. 1995; LANGELLA ve ark. 1996; KRANENBURG ve DE VOS, 1998; AKÇELİK, 1999). Henüz hakkında çok az şey bilinen sistemin, genetik ve biyokimyasal doğasını esas alan yalnız bir araştırma bulunmaktadır. KRANENBURG ve DE VOS (1998) *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO B40 suşunun yüksek konjugal transfer yeteneğine sahip pNZ 4000 plazmidinin üzerinde bu özelliği tek başına yönlendiren gen bölgesini ve protein ürününü tanımlamıştır. Söz konusu proteinin konjugasyon süreçlerinde başka bir faktörle interaksyonu meydana gelmemektedir.

Yukarıda özetlenen literatür verileri ve deneysel bulgular ışığında; bu çalışmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında yüksek sıklıkta konjugal aktarım sistemlerinin, plazmid entegrasyonundan bağımsız, ancak iki seks faktörüyle ilişkili olduğu ortaya çıkmaktadır. Zira, yalnız Clu<sup>-</sup>/Agg<sup>+</sup> genotipik özellikleri tanımlanmış kontrol alıcı suş MG1390 ile yalnız Clu<sup>+</sup> fenotipik özelliği belirlenmiş olan verici suşlar arasındaki konjugal aktarım denemelerinde, ayrı suşlarda bulunan Clu<sup>+</sup> ve Agg<sup>+</sup> faktörlerin interaksyonu sonucu yüksek sıklıkta transfer ve tüm konjugantlarda Clu<sup>+</sup> fenotip oluşmuştur. Bu durum Clu<sup>+</sup> verici suşların tümünün Agg<sup>-</sup> ve Clu<sup>+</sup> verici suşlar ile eşleşmelerinde de düşük transfer sıklığı içeren MCL8060 suşunun ise Clu<sup>-</sup>/Agg<sup>-</sup> genotipte olduğunu ispatlamaktadır. Çünkü aksi halde (Tüm Clu<sup>+</sup> verici suşların Agg<sup>+</sup> ya da MCL 8060 alıcı suşunun Clu<sup>-</sup>/Agg<sup>+</sup> olması durumlarında), Clu<sup>+</sup> verici suşlar ile MCL8060 alıcı suşunun kullanıldığı konjugasyon denemelerinde de yüksek transfer oranları ve Clu<sup>+</sup> fenotipte konjugantların oluşması gerekmekeydi. Diğer yandan, Agg<sup>-</sup> ve aynı laktöz plazmidine sahip verici suşlarda Clu<sup>+</sup> ve Clu<sup>-</sup> fenotiplerin tanımlanması; sözkonusu suşlarda bu özelliğin, konjugantların aksine, Agg<sup>+</sup> interaksyonuna ihtiyaç duymadığına işaret etmektedir.

Konjugal aktarım sistemleri, laktokoklarda rekombinasyona olanak sağlayan temel mekanizmadır. Bu özelliği ile hem genetik analiz ve hem de starter suş geliştirme çalışmalarının vazgeçilmez bir unsurudur. (VENEMA, 1993; KRANENBURG ve DE VOS, 1998). Bu çalışmada *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında tanımlanan laktöz plazmidi konjugal aktarım sistemi, özellikle geleneksel fermente süt ürünlerimize yönelik starter kültür geliştirme çalışmalarının temel stratejisini oluşturması açısından önem taşımaktadır. Bundan sonraki aşamada, elde olunan verilerin; moleküler düzeyde plazmid ve kromozomal DNA analizleri ve söz konusu gen ürünlerinin biyokimyasal doğasının belirlenmesi ile karakterizasyonu amaçlanmaktadır.

Konjugal aktarımın sağlandığı suşlarda, laktöz plazmidlerinin gösterdiği stabilite; tek kolonilerden üretilen kültürlerin, reconstitute skim milk (%10) ortamlarında ardışık 10 pasaj (~70 generasyon) geliştirilmesinden sonra saptanmıştır. MCL8060 alıcı suşunun kullanıldığı konjugal transfer testleri sonucu seçilen konjugantlarda laktöz plazmidlerinin stabiliteyi, %44-67 arasında değişme göstermiştir. Diğer yandan, aynı laktöz plazmidlerinin doğal konakçılarındaki stabiliteyi (konjugal verici suşlar); bu konjugantlar için belirlenen stabilite düzeylerinin, %24-44 arasında değişen oranlarda üzerinde meydana gelmiştir (Çizelge 3). MCL 8060 konakçısında, bütün laktöz plazmidleri için tanımlanan kararsızlık, benzer araştırmalar için bildirilen literatür verilerine göre (WARD ve ark. 1993; KRANENBURG ve DE VOS 1998) oldukça yüksektir. Bu durum, muhtemelen laktöz plazmidlerinin MCL8060 suşundaki düşük kopya sayısı regülasyonuna bağlıdır. Ancak bu öngörünün kesinlik kazanabilmesi için, laktöz plazmidlerinin söz konusu konjugantlardaki replikasyon karakteristiklerinin tanımlanması gerekmektedir.

Aynı verici suşlar ile MG1390 alıcı suşu arasında gerçekleştirilen konjugal aktarımlar sonucu seçilen konjugantlarda laktöz plazmidlerinin stabiliteyi, %77-98 arasında değişen oranlarda bulunmuştur. Laktöz plazmidlerinin verici suşlarda belirlenen stabiliteyi ile (%82-96) bu konjugantlardaki stabiliteyi, önemli ölçüde benzerlik göstermiştir. Aynı büyüklüklerdeki plazmidlerin konjugantlar ve doğal suşlardaki stabilite oranları arasında en fazla ± %5 farklılık meydana gelmiştir. Diğer yandan her iki alıcı suş için de oluşturulan konjugantlarda, laktöz plazmidi büyüklüğüne bağlı belirgin bir stabilite değişimi saptanamamıştır (Çizelge 3).

**Çizelge 1. Laktoz Fermentasyonu Yeteneğinin Konjugal Aktarımında Kullanılan Verici ve Alıcı Suşların, Agregat Oluşturma Yetenekleri ve Diğer Fenotipik Özellikleri**

Bakteri Kod No.	Konjugal Davranış	Fenotipik Özellikler	Laktoz Plazmid (kb)
MCL5	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>-</sup>	33.0
MCL7	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>+</sup>	33.0
MCL4	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>+</sup>	38.5
MCL34	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>-</sup>	38.5
MCL6	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>+</sup>	29.1
MCL35	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>-</sup>	29.1
MCL10	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>-</sup>	26.3
MCL33	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>-</sup>	36.4
MCL15	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>+</sup>	35.0
MCL48	Verici Suş	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>S</sup> , Km <sup>S</sup> , Clu <sup>-</sup>	35.0
MCL8060	Alıcı Suş	Lac <sup>-</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup> , Clu <sup>-</sup>	-
MG1390*	Alıcı Suş	Lac <sup>-</sup> , Spc <sup>f</sup> , Clu <sup>-</sup>	-

**Kb** : Kilobaz

**Lac<sup>+</sup>** : Laktozu metabolize etme yeteneği

**Lac<sup>-</sup>** : Laktozu metabolize etme yeteneğini kaybetmiş

**Clu<sup>+</sup>** : Sıvı gelişme ortamlarında agregasyon oluşturma yeteneği

**Str<sup>f</sup>** : Streptomisin dirençlilik (450 µg/mL)

**Km<sup>f</sup>** : Kanamisin dirençlilik (120 µg/mL)

**Spc<sup>f</sup>** : Spektinomisin dirençlilik (100 µg/mL)

\* : *L. lactis* subsp. *lactis* (AFRC, Norwich/UK), kromozomal DNA tarafından kodlanan konjugal faktör geni içeriyor (Agg<sup>+</sup>)

Araştırma bulguları; konjugasyon denemelerinde kullanılan alıcı suşların, aktarılan laktoz plazmidlerinin stabilitesi üzerinde etkin bir rol oynadığına işaret etmektedir. Özellikle starter suş geliştirme çalışmalarında kullanılacak alıcı suşların seçiminde, plazmid stabilite kapasitelerinin belirlenmesi zorunludur. Araştırma kapsamında tanımlanmayan, ancak yine starter suş geliştirme süreçlerinde önemli bir diğer nokta ise, laboratuvar koşullarında saptanan plazmid stabilite oranlarının endüstriyel ölçekte üretimler için test edilmesi gerekliliğidir.

**Çizelge 2. *L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Fermentasyonu Özelliğini Determine Eden Plazmidlerin Konjugal Aktarımı**

Verici Suş Kod No.	Alıcı Suş Kod No.	Konjugant Seçim Kriterleri	Seçilen Konjugant No.	Konjugant Sıklığı (Verici hücre başına)	Clu <sup>+</sup> Konjugant Oranı
MCL5	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL5-60	5.6x10 <sup>-6</sup>	-
MCL7	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL7-60	2.9x10 <sup>-5</sup>	-
MCL4	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL4-60	6.8x10 <sup>-5</sup>	-
MCL34	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL34-60	1.1x10 <sup>-6</sup>	-
MCL6	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL6-60	7.4x10 <sup>-6</sup>	-
MCL35	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL35-60	5.9x10 <sup>-6</sup>	-
MCL10	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL10-60	1.0x10 <sup>-7</sup>	-
MCL33	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL33-60	4.2x10 <sup>-6</sup>	-
MCL15	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL15-60	1.5x10 <sup>-5</sup>	-
MCL48	MCL8060	Lac <sup>+</sup> , Str <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	MCL48-60	6.6x10 <sup>-5</sup>	-

**Lac<sup>+</sup>** : Laktozu metabolize etme yeteneği

**Clu<sup>+</sup>** : Sıvı gelişme ortamlarında agregasyon oluşturma yeteneği

**Str<sup>f</sup>** : Streptomisin dirençlilik (450 µg/mL)

**Km<sup>f</sup>** : Kanamisin dirençlilik (120 µg/mL)

**Çizelge 2. *L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Fermentasyonu Özelliğini Determine eden Plazmidlerin Konjugal Aktarımı (devam)**

Verici Suş Kod No.	Alıcı Suş Kod No.	Konjugant Seçim Kriterleri	Seçilen Konjugant No.	Konjugant Sıklığı (Verici hücre başına)	Clu <sup>+</sup> Konjugant Oranı
MCL5	MG1390*	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL5-90	2.4x10 <sup>-5</sup>	-
MCL7	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL7-90	7.1x10 <sup>-2</sup>	100
MCL4	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL4-90	1.8x10 <sup>-3</sup>	100
MCL34	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL34-90	5.2x10 <sup>-6</sup>	-
MCL6	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL6-90	1.0x10 <sup>-3</sup>	100
MCL35	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL35-90	4.8x10 <sup>-6</sup>	-
MCL10	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL10-90	3.5x10 <sup>-6</sup>	-
MCL33	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL33-90	6.8x10 <sup>-5</sup>	-
MCL15	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL15-90	2.7x10 <sup>-3</sup>	100
MCL48	MG1390	Lac <sup>+</sup> , Spc <sup>r</sup>	MCL48-90	4.9x10 <sup>-6</sup>	-

Lac<sup>+</sup> : Laktozu metabolize etme yeteneği

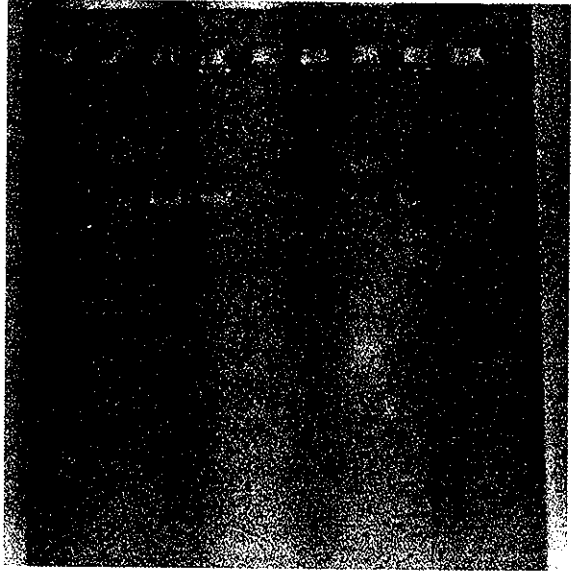
Clu<sup>+</sup> : Sıvı gelişme ortamlarında agregasyon oluşturma yeteneği

Spc<sup>+</sup> : Spektinomisin dirençlilik (100µg/mL)

\* : *L. lactis* subsp. *lactis* (AFRC, Norwich/UK), kromozomal DNA tarafından kodlanan konjugal faktör geni içeriyor (Agg\*)

**Çizelge 3. Doğal Tip *L. lactis* subsp. *lactis* Suşları ve Konjugantlarda Laktoz Plazmidi Stabilitesi**

Konjugant No.	Laktoz Plazmidi(kb)	Laktoz Plazmidi Stabilitesi (%)	
		Konjugant	Kontrol (Konjugal Verici Suş)*
MCL5-60	33.0	52	95
MCL7-60	33.0	55	90
MCL4-60	38.5	46	88
MCL34-60	38.5	48	92
MCL6-60	29.1	65	96
MCL35-60	29.1	60	94
MCL10-60	26.3	67	91
MCL33-60	36.4	44	82
MCL15-60	35.0	52	82
MCL48-60	35.0	56	90
MGL5-90	33.0	95	95
MGL7-90	33.0	93	90
MGL4-90	38.5	90	88
MGL34-90	38.5	94	92
MGL6-90	29.1	98	96
MGL35-90	29.1	98	94
MGL10-90	26.3	87	91
MGL33-90	36.4	77	82
MGL15-90	35.0	87	82
MGL48-90	35.0	89	90



**Şekil 1. MCL10 x MCL8060 suşları arasında gerçekleştirilen konjugal transfer denemelerinde kullanılan alıcı ve verici suşlar ile oluşan konjugantların plazmid içerikleri**

MCL10-60 A-B-C-E-G-H (konjugant) (kb) 26.3	MCL8060 D (Alıcı suş) (kb) -	MCL10 F (verici suş) (kb) 31.0 26.3
--	--	--

\*Çizelge 1 ve 2

### Teşekkür

Bu çalışma "Türkiye'de İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Fermentasyon Yeteneğinin Genetik Determinantlarının, Konjugal Aktarımının ve Stabilitesinin Tanımlanması" adlı Yüksek Lisans Tezinin bir bölümüdür. Yönlendirici katkılarından dolayı Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI (Süleyman Demirel Üniv.) ve Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e (Ankara Üniv. Fen. Fak.) teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- AKÇELİK, M. 1999. The Conjugal Plasmid pLL10236 Encodes Lactose Fermentation Ability, Restriction Modification Activity and Bacteriocin Production and Immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. Food Microbiology (Basımda)
- ANDERSON, D.G., MCKAY, L.L. 1983. A Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 46; 549-552.
- BRINGEL, F., ALSTINE, G.L., SCOTT, J.R. 1992. Transfer of Tn916 Between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains is Nontranspositional: Evidence for a Chromosomal Fertility Function in Strain MG 1363. J. Bacteriol. 18; 5840-5847.
- BROADBEND, J.R., SANDINE, W.E., KONDO, J.K. 1995. Characteristics of Tn5307 Exchange and Intragenic Transfer of Genes Associated with Nisin Production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1/2; 139-146.
- COAKLEY, M., FITZGERALD, G.F., ROSS, P. 1997. Application and Evaluation of the Phage Resistance and Bacteriocin Encoding Plasmid pMC01 for the Improvement of Dairy Starter Cultures. Appl. Environ. Microbiol. 63; 1434-1440.
- DIFCO MANUAL. 1984. Difco Laboratories, Detroit-Michigan, USA, 333s.
- ELDER, J.K., AMOS, A., SOUTHERN, E.M., SHIPPEY, G.A. 1983. Measurement of DNA Length by Gel Electrophoresis (I). Analytical Biochemistry, 128; 223-226.
- GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1980. High Frequency Conjugation Associated with Donor Cell Aggregation in *Streptococcus lactis* 712. J. Bacteriol. 143; 1260-1264.
- GASSON, M.J., DAVIES, F.L. 1981. Physical Analysis and Conjugal Transfer of Transduced Lactose Plasmids in *Streptococcus lactis* 712. Journal of General Microbiology, 119; 173-178.
- GASSON, M.J., SWINDELL, S., MAEDA, S., DODD, H.M. 1992. Molecular Rearrangement of Lactose Plasmid DNA Associated with High frequency Transfer and Cell Aggregation in *Lactococcus lactis* 712. Mol. Microbiol. 6;3213-3223.
- GASSON, M.J., GODON, J.J., PILLIDGE, C.J., EATON, T.J., JURY, K., SHAERMAN, C.A. 1995. Characterization and Exploitation of Conjugation in *Lactococcus lactis*. International Dairy Journal, 5; 757-762.
- GODON, J.J., JURY, K.L., SHAERMAN, C.A., GASSON, M.J. 1994. The *Lactococcus lactis* Sex-Factor Aggregation Gene Clu A. Mol. Microbiol. 12; 655-663.
- KOK, J. 1996. Inducible Gene Expression and Environmentally Regulated Genes in Lactic Acid Bacteria. Antonie van Leeuwen. 70; 129-145.
- KRANENBURG, V., DE VOS, W.M. 1998. Characterization of Multiple Regions Involved in Replication and Mobilization of Plasmid pNZ4000 Coding for Exopolysaccharide Production in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 18; 5285-5290.
- LANGELLA, P., ZAGOREC, M., ERLICH, S.D., MOREL, F. 1996. Intragenic and Intergenic Conjugal Transfer of Plasmids pAMbeta1, pIL205. FEMS Microbiol. Lett. 139; 51-56.
- LEENHOUTS, K.J., KOK, J., VENEMA, G. 1991. Lactococcal Plasmid pWV01 as an Integration Vector for Lactococci. Appl. Environ. Microbiol. 57(9); 2562-2567.
- MCKAY, L.L., BALDWIN, K.A., ZOTTOLA, E.A. 1972. Loss of Lactose Metabolism in Lactic Streptococci. Appl. Microbiol. 23(6); 1090-1096.
- MCKAY, L.L., BALDWIN, K.A., WALSH, P.M. 1980. Conjugal Transfer of Genetic Information in Group N Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 40; 81-84.
- PARADA, J.L., DEGIACHI, M.P. 1986. Resistance of *Streptococcus lactis* Mutant to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. J. Dairy Sci. 69; 2031-2037.
- SHAERMAN, C., GODON, J.J., GASSON, M. 1996. Splicing of a Group II Intron in a Functional Transfer Gene of *Lactococcus lactis*. Molecular Microbiology, 1; 45-53.
- SHEREWITZ, K.M., BALDWIN, K.A., MCKAY, L.L. 1983. Plasmid Linkage of a Bacteriocin-like Substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strains WM4: Transferability to *Streptococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 45; 1506-1512.
- SINHA, R.P. 1980. Effect of Growth Media and Extended Incubation on the Appearance of Lactose-Nonfermenting Variant in Lactococci. J. Food Protect. 7; 583-587.
- SNOOK, R.J., MCKAY, L.L. 1981. Conjugal Transfer of Lactose Fermenting Ability Among *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 42; 904-911.
- STEENSON, L.R., KLAENHAMMER, T.R. 1987. Conjugation Between Lactococci and Group D Streptococci by Using Cells Entrapped in Calcium Alginate Gel Beads. Appl. Environ. Microbiol. 53; 898-900.
- TÜKEL, Ç. 1999. Türkiye'de İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Fermentasyon Yeteneğinin Genetik Determinantlarının, Konjugal Aktarımının ve Stabilitesinin Tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 69s.
- VAN DER LELIE, D., CHAVARRI, F., VENEMA, G. and GASSON, M.J. 1991. Identification of a New Genetic Determinant for Cell Aggregation Associated with Lactose Plasmid Transfer in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 57; 201-208.
- VENEMA, G. 1993. Molecular Biology and Genetic Modification of Lactococci. J. Dairy Sci. 76; 2133-2144.
- WANG, H., BROADBEND, J.R. and KONDO, J.K. 1994. Analysis of the Physical and Functional Characteristics of Cell Clumping in Lactose-Positive Transconjugants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. J. Dairy Sci. 77; 375-384.
- WARD, A., HILLIER, A., DAVIDSON, B., POWELL, I.B. 1993. Stability Analysis of the *Lactococcus lactis* DRC1 Lactose Plasmid Using Pulse-Field Gel Electrophoresis. Plasmid, 29; 70-73.