



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU**

Oğuz AĞYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAHRAMANMARAŞ
Ocak-2010**

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU**

Oğuz AĞYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kod No :

Bu Tez 15/01/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

.....

Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

DANIŞMAN

.....

Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE

ÜYE

.....

Doç Dr. Yüksel BÖLEK

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Süleyman TOLUN
Enstitü Müdürü

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.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
İÇİNDEKİLER	I
ÖZET.....	III
ABSTRACT	IV
ÖNSÖZ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1.GİRİŞ	1
1.1. Probiyotikler	1
1.2. Laktik Asit Bakterileri	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal	16
3.1.1. Kimyasallar	16
3.1.2. Bakteri Suşları ve Plazmit.....	16
3.2. Metot	18
3.2.1. Bakteriyel Besi Yerlerinin Hazırlanması	18
3.2.2.LAB' nin Fermente Ürünlerden İzolasyonları	19
3.2.3. Seyreltme.....	20
3.2.4. LAB'nin Tanımlanmaları.....	21
3.2.4.1.Kimyasal Tanımlamalar.....	21
3.2.4.1.1.Gram Boyama	21
3.2.4.2.2. Katalaz Testi	22
3.2.4.2.Moleküler Tanımlama.....	22
3.2.4.2.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	22
3.2.4.2.2.Koloni PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon)	23
3.2.4.2.3.PZR Koşulları	23
3.2.4.2.4.DNA'nın Jel Elektroforezi.....	24
3.2.6.Bakteri Büyümesi (A_{600})	24
3.2.7.Plazmit DNA İzolasyonu.....	25
3.2.8.Elektroporasyon ile <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 'a Plazmit Transferi	26
3.2.9. Bakterilerin Stoklanması.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28

4.1. LAB'nin İzolasyonu.....	28
4.1.1.Seyreltme Ekimleri.....	28
4.2. Gram Boyama ile LAB'nin Kimyasal Tanımlanması	29
4.2.1.2. Katalaz Testi	31
4.2.2.Moleküler Tanımlama.....	32
4.2.2.1. Gen Çalışması ve Primer Bilgisi.....	32
4.2.2.2.Koloni PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon).....	33
4.3.Bakteri Büyüme Eğrisi.....	37
4.4 Elektroporasyon ile <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 'a Gen Transferi.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
6. KAYNAKLAR.....	43
7. ÖZGEÇMİŞ.....	51

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZET

PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU

Oğuz AĞYAR

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Yıl: 2010, Sayfa: 39

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ (Başkan)

: Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE

: Doç. Dr. Yüksel BÖLEK

Probiyotik mikroorganizmalar bağırsak sistemin doğal florasında yer alırlar. Canlılarda bağırsak bölgesindeki reseptörlere bağlanarak patojen mikroorganizmaların bağlanamamasına ve dışkı ile atılmalarına sebep olurlar ve böylelikle bağışıklık sistemini dolaylı olarak desteklemektedirler. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), çevre şartları ile birlikte, yem, süt, et, sebze ve birçok üründe doğal mikroflorada baskın halde bulunmaktadır. Fermantasyondan biyolojik işlemlere, zirai uygulamalardan gıdaya ve özellikle son zamanlarda tıp alanına kadar geniş bir sahada LAB önemli araştırmaların konusu haline gelmiş ve üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada silaj, ravanda, salamura zeytin ve et sucuğu gibi fermente gıdalar kaynak olarak kullanılarak, probiyotik özellikte olan LAB' n den *Lactobacillus* türüne ait *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus* ve *Lb. rhamnosus* suşlarını klasik biyokimyasal testlerin yanı sıra 16S rRNA gen bölgeleri hedef alınara yapılan polimera zincir reaksiyon (PZR) moleküler testleriyle tanımlanması ve izolasyonları yapılmıştır. Ayrıca izole edilen bakterilerin büyüme eğrileri çıkarılmış ve plazmit transferi özelliklerinin belirlenmesi için *L. lactis* kaynaklı pAK80 plazmiti elektroporasyonla aktarılmıştır. Bu çalışmada izole edilen mikroorganizmalar probiyotik özellikleri göz önünde bulundurularak gıda endüstrisi ve ziraat alanındaki araştırmalarda gerçekleştirilebilecek moleküler çalışmalarda kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri (LAB), *Lactobacillus*, probiyotik, PZR

UNIVERSITY OF KAHRAMANMARAS SÜTÇÜ İMAM
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES IN SCIENCE AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE

MSc THESIS

ABSTRACT

**IZOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA THAT CAN BE USED AS
PROBIOTIC**

Oğuz AĞYAR

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Year: 2010, Pages: 39

Jury: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

: Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE

: Doç. Dr. Yüksel BÖLEK

Probiotic microorganisms are located in intestinal system's natural flora. By being tied to receptors in creature's intestinal area, they cause pathogen microorganisms not to be tied and to be discarded with faeces, so immunity system is indirectly supported. LAB used as probiotic, with environmental conditions, dominantly exist in feed, milk, meat, vegetables and in lots of products. From fermentation to biological processes, from agricultural processes to foods and especially recently in medicine area, LAB have become a significant issue of researches and researches on LAB have been zoomed in. On this work silage, rava, pickled olive and sausage were decided to use as source and *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus* and *Lb. Rhamnosus* strains, which are LABs and have probiotic speciality, are characterized and isolated by using "polimer zincir reaksiyon" (PZR) molecular tests aiming 16S rRNA gene areas beside testing with classical bio-chemical methods. Also, growth curve of isolated bacteriums are formed and in order to determine characteristics of plasmid transfer, pAK80 plasmid of which source is *L.lactis* is transferred by using electroporation method. By figuring on probiotic characteristics of microorganisms isolated in this work can be considered in a position that they can be used in molecular works in food industry and agriculture.

Keywords: Lactic Acid Bacteria (LAB), *Lactobacillus*, probiotic, PZR

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda göstermiş oldukları her türlü yardım ve katkılarından dolayı başta danışmanım Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ, hocalarım Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE ve Yrd. Doç. Dr. İsmail AKYOL'a teşekkür eder, laboratuvar çalışmalarımda yardımları dokunan doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma da desteklerinden ötürü gönülden şükranlarımı sunarım.

Bugüne değin verdikleri karşılıksız emek ve sevgileri için aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak 2010, KAHRAMANMARAŞ**Oğuz AĞYAR**

ÇİZELGELER DİZİNİ

	SAYFA
Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	1
Çizelge 1.2. Karbonhidratları fermente etme yollarına göre gruplandırılması yapılan <i>Lactobacillus</i> türleri	8
Çizelge 3.1. Çalışmada izolasyonları ve tanımlanması hedeflenen bakterilerin türleri ve kullanılan plazmitin temel özellikleri.....	12
Çizelge 3.2. <i>Lactobacillus crispatus</i> suşları için kullanılan MRS besi ortamının kompozisyonu.....	14
Çizelge 3.3. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ve <i>Lactobacillus acidophilus</i> suşları için kullanılan M 17 besi ortamlarının kompozisyonları.....	15
Çizelge 3.4. <i>Lactobacillus</i> türleri için tasarlanan primerlerin hedef bölgeleri ve nükleotid dizileri.....	18
Çizelge 3.5. Türe özgü tasarlanmış spesifik primerlerin uygun sıcaklıkları ve PZR koşulları.....	19

SEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. <i>Lactobacillus</i> suşlarının 16S rRNA gen bölgesi sekanslarına göre oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	10
Şekil 3.1. pAK 80 plazmitinin şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.2. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 'ya kadar seyreltme hazırlanmış ve ekimleri yapılan 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} seyreltmelerinin katı besi yerlerine inokülasyonlarının şematığı	16
Şekil 4.1. a.Saf yonca silajı kaynağından 10^{-4} seyretme konsantrasyonundan MRS Agar'lı besi yerine ekim sonucunda oluşan tek kolonilerin gelişim gösterdiği petri. b. Kontaminasyon sonucu anormal koloni morfoloji oluşumu gözlenen petri.....	23
Şekil 4.2. İzole edilen <i>Lactobacillus</i> suşlarının Gram boyama ile mikroskop altında morfolojik görüntüleri (100X) ve görüntülerden kesit alınarak büyültmeler, a; <i>Lactobacillus acidophilus</i> , b; <i>Lactobacillus crispatus</i> , c; <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	24
Şekil 4.3. Katalaz testi pozitif reaksiyon vermiş olan koloni	25
Şekil 4.4. Primer tasarlanan dizi bölgelerinin şematik gösterimi	26
Şekil 4.5. Koloni PZR ile çoğaltılmış 9 adet potansiyel <i>Lactobacillus crispatus</i> ' un %1'lik agaroz jel görüntüsü	27
Şekil 4.6. Koloni PZR ile çoğaltılmış 8 adet potansiyel <i>Lactobacillus acidophilus</i> ' un %1' lik agaroz jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.7. Koloni PZR ile çoğaltılmış 8 adet potansiyel <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ' un %1'lik agaroz jel görüntüsü	29
Şekil 4.8. <i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> ve <i>L. rhamnosus</i> suşlarının büyüme eğrileri	30
Şekil 4.9. Elektroporasyon sonrası negatif ve pozitif kontrol petrileri. a; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> negatif kontrol, b; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pozitif kontrol, c; <i>Lactobacillus acidophilus</i> negatif kontrol, d; <i>Lactobacillus acidophilus</i> pozitif kontrol e; <i>Lactobacillus crispatus</i> negatif kontrol, f; <i>Lactobacillus crispatus</i> pozitif kontrol petri görüntüleri.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
ADP	: Adenin Di Fosfat
ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenin Tri fosfat
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
dev/dk	:Devir/dakika
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
dNTP	: Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	: Ethylendinitrilotetraasetat
Ery ^r	: Eritromisin dirençlilik geni
Et-Br	: Etidium Bromür
EtOH	: Etil alkol
G	: Guanin
g/l	: Gram/litre
gr	: Gram
GRAS	: Generally Regarded As Safe
kb	: Kilobaz
<i>Lb</i>	: <i>Lactobacillus</i>
lt	: Litre
M	: Molar
M	: Markör
Mbç	: Mega baz çifti
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
MRS	: De Man Rogosa and Sharpe
mM	: Milimolar
NCBI	: National Center for Biotechnology Institute
nm	: Nanometre
ng/ml	: Nanogram/mililitre
ng	: Nanogram
Nu	:Numara
OD	: Optik yoğunluk
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: Pikomol
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
S.	: <i>Streptococcus</i>
SDS	: Sodium Dodesil Sülfat
sp.	: Tür
subsp.	: Alt tür
T	: Timin
TBE	: Tris Borik asit EDTA

T_m	: Erime sıcaklığı
UV	: Ultra viyole
v	: Hacim
v/v	: Hacim/hacim
V	: Volt
w	: Ağırlık
w/v	: Ağırlık/hacim
g	: Gravity
µg	: Mikrogram
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
µl	: Mikrolitre
U.V.	: Ultra Viole
°C	: Santigrad derece
λ	: Lamda

1. GİRİŞ

1.1. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Yunanca'da *yaşam için* anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir (Gomes ve Malcata., 1999). Lilley ve Stilwell (1965) tarafından ilk kez, bazı mikroorganizmaların salgıladığı, başka mikroorganizmaların büyümesini uyaran maddeleri tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu antibiyotiğin zıddı bir anlamda olup, kavramın bu şekilde kullanımı etimolojik olarak uzak bir anlama dönüşmüştür. Fakat bu tanımda ısrar edilmeyip Sperti (1971) tarafından mikrobiyal büyümeyi uyaran doku ekstraktları olarak başka bir tanım getirilmiştir. Probiyotik kelimesi, bugün kullanıldığı anlamı ile ilk kez Parker (1974) tarafından kullanılmış ve bağırsaklarda mikrobiyal dengeye katkıda bulunan canlılar ve maddeler olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda Fuller ise, tüketici sağlığına bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkıları (Fuller, 1989) olarak farklı bir tanım getirmiştir. Günümüze kadar yapılan araştırma sonuçları ve beraberinde gelen kullanım alanlarıyla birlikte probiyotikler, kalitatif ya da kantitatif olarak bağırsak mikroflorasını etkileyerek ya da immün sistemin durumunu modifiye ederek yararlı etkiler oluşturma hedefiyle insan ve hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizma hazırlıkları olarak tanımlanmaktadır (Fuller, 2004).

Probiyotik bakteriler, gram (+), sporsuz, çubuk şeklindedir. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 1.1 'de verilmiştir

Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Yılsay ve Kurdal., 2000).

Lactobacillus türleri	<i>Lb. bulgaricus, Lb. cellebiosus</i>
	<i>Lb. delbrueckii, Lb. lactis</i>
	<i>Lb. acidophilus, Lb. reuteri</i>
	<i>Lb. brevis, Lb. casei</i>
	<i>Lb. curvatus, Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. plantarum, Lb. johnsonii</i>
	<i>Lb. rhamnosus, Lb. helveticus</i>
	<i>Lb. salivarius, Lb. gasseri</i>
Bifidobacterium türleri	<i>B. adolescentis, B. bifidum</i>
	<i>B. breve, B. infantis</i>
	<i>B. longum, B. thermophilum</i>
Bacillus türleri	<i>B. subtilis, B. pumilus, B. lentus</i>
	<i>B. licheniformis, B. coagulans</i>
Pediococcus türleri	<i>Pediococcus cerevisiae, Pediococcus acidilactici</i>
	<i>P. pentosaceus</i>
Streptococcus türleri	<i>S. cremoris, S. thermophilus</i>
	<i>S. intermedius, S. Lactics, S. diacetilactis</i>
Bacteriodes türleri	<i>B. capillus, B. suis</i>
	<i>B. ruminicola, B. amylophilus</i>
Propionibacterium türleri	<i>P. shermanii, P. freudenreichii</i>
Leuconostoc türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>S. cerevisiae, C. torulopsis</i>

Doğal olarak toprak, bitki ve genellikle fermente gıdalarda yayılış gösteren probiyotikler, omurgalı hayvanların gastrointestinal sisteminde yer alırlar.

Omurgalı hayvanların gastrointestinal ekosistemlerinde bakteriler için çeşitli habitatlar vardır. Bu habitatlar birbirinden farklıdır. Gastrointestinal sistemdeki bu habitatlarda yer alan mikrobiyal flora, doğal ve dışarıdan alınan mikroorganizmalar ile gastrointestinal epitelyum hücrelerinde yaşam alanı oluşturan biyotik bileşenler; beslenme orjinli ince bağırsakda parçalanmış abiyotik bileşenler; tükürük kökenli, mide, pankreas, karaciğer ve bağırsaklara ait salgı ya da boşaltım sıvıları ve ayrıca enzim, hormon, mukus, safra tuzları, üre, immunoglobulin peptidler gibi endojenik bileşenlerle konukçunun bağırsağındaki ekosistemi oluşturmaktadırlar.

Gastrointestinal bakteriler için besin kaynağı olan organik molekülleri; konakçının kendi salgıları ve hücrelerinden yayılan moleküller olduğu kadar hayvanın mevcut beslenme yolu ile aldığı moleküller de olabilir. Farklı habitatlar ve kompleks kimyasal çevreler, hayvanların gastrointestinal sisteminde belirlenebilen farklı metabolik ve morfolojik tipteki mikroorganizmaların çeşitliliğini yansıtmaktadır. Örnek olarak, insan dışkısında yaklaşık 400 çeşit bakteri tipi belirlenmiştir (Finegold ve ark., 1974). Bu 400 çeşit bakteri türü arasından 30 ile 40 türü mikrobiyal popülasyonun büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Sağlıklı gastrointestinal alanda yani normal doğal mikroflora alanında kolonize olmuş bakteri koleksiyonu, mikrobiologlar için zengin bir çalışma alanı olmaktadır. Ayrıca, metabolik olarak çeşitli karakterdeki gastrointestinal mikrofloralar biyoteknolojistler için bakterilerin genetiği üzerinde potansiyel bir çalışma kaynağıdır olmaktadır.

Gastrointestinal sistemindeki mikrobiyal etkileşim, bağırsak bakteri florasındaki devamlılığa katkıda bulunan önemli bir faktördür (Fuller,1992).Probiyotik bakteriler, bir mikrobiyal etkileşimler olan, epitelyal hücre yüzeylerinde olan reseptörlerce tanınmış bağlanabilmekte ve böylelikle immunolojik savunma mekanizmalarının çalışmasını sağlamaktadırlar (Saxelin ve ark., 2005). Bu bakteriler bağırsak duvarı yüzeyine yapışma ve orada gelişme özelliğine sahiptirler. Bağırsak epitel tabakalarını kaplayan mukus, sindirim sistemi mikroorganizmaları için bağırsaktaki ilk yüzeysel temas yeri olup, bakteriyel yapışma ve kolonizasyon için önemli bir yer olarak göz önüne alınır (Sillanpää,2001; Tuomola ve ark., 1999). Bakteri hücre yüzeyindeki bileşimler, bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine yapışmasına aracılık edebilmektedirler. Probiyotik bakterilerin intestinal epitel hücrelerle adezyonunu sağlayan çeşitli yüzey etkenleri vardır. Bu etkenler, pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobik, sterik kuvvetlerle ve lipoteikoik asit, lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkili etkenler olarak sayılabilir (Servin ve Coconnier., 2003). *Lactobacillus* suşlarının, insan ve hayvan bağırsak hücrelerine yapışmasının, bakteri yüzeyinde bulunan protein ve karbonhidratların farklı kombinasyonlarından oluşan mekanizmadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Probiyotik bakterilerin yapışma aktiviteleri için gerekli mekanizmalar türler arasında farklılık göstermiştir. Örneğin, *Lactobacillus gasseri* protein ve karbonhidratların yapışmada gerekli olduğu ve ayrıca divalent katyonların (Ca^{+2}) da yapışma metabolizmasında etkili olduğu bilinmektedir (Tuomola ve ark.,1999).

Probiyotik bakteriler insan ve hayvanların doğal savunma mekanizmasını güçlendirerek bağışıklık sistemini düzenleyici yeteneğe sahiptirler. Probiyotikler immunolojik etkilerini genellikle bağırsağa tutunarak gerçekleştirirler. Bağırsağa tutunma yetenekleri de hücre duvarında bulunan teikoik asit ve lektin benzeri maddeler ve bir takım etkenlerle sağlanmaktadır. Probiyotiklerin etkileyip düzenlediği bir takım mekanizmalar, mukus üretiminin indüksiyonu, makrofaj aktivasyonu, nötrofil salgılanması, uyarıcı sitokinlerin salgılanmasının inhibisyonu ve immunoglobulinlerin salgılanmasının uyarılması olarak sayılabilir (Senok ve ark., 2005).

Probiyotik bakteriler bağırsaklardaki immün sistem hücreleri ile devamlı etkileşim halindedir. Bu etkileşim immün sistemin gelişimi için önemlidir. Bağırsaklar, lenf dokuları ile ilişkilisinden dolayı canlı vücudundaki en büyük immün organ sayılırlar. Bu yüzden hayvan beslenmesinde yemden yararlanma ve sindirim kanalının fonksiyonu öncelikli olarak önem arz eden bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Genel olarak bakterilerin çeşitli organik bileşikler parçalayabilme yetenekleri, atıkların işlenmesi ve değerlendirilmesinde aldıkları roller hayvan beslenmesinde önemli özelliklerinden biridir.

Hayvan beslenmesinde, sindirim sisteminde patojenik mikroorganizmaların elimine edilmesi ve ishalin önlenmesi amaçlı hayvan yemlerine antibiyotikler uygulanmaktaydı. Fakat bağırsaklarda patojen bakterilerle birlikte yararlı mikroorganizmaların da çoğalmasını engelleyen antibiyotikler, hayvanların besinden istenilen ölçüde yararlanmasının önünü kesen bir etken olmuştur. Ayrıca patojen bakteriler, kullanılan antibiyotiklere karşı zamanla direnç kazanıp, antibiyotik etkiyi giderek tolere etmeye başlayabilirler. Bu durum gastrointestinal sistemde düzensizlikler meydana getirip ve bağırsak ekosistemi destabilize edebilir. Sindirim sistemindeki bu değişiklik yemden yararlanmanın önünü kesen direkt bir etkendir.

Antibiyotiklerin yerine, alternatif kullanılabilir yem katkı maddeleri üzerinde pek çok çalışma yürütülmekte olup organik asitler, probiyotikler ve çeşitli bitki ekstraktları gibi alternatif yem katkı maddeleri üzerinde araştırmalar ve tartışmalar sürmektedir. Bu yem katkı maddesi, bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Probiyotikler, birçok ülkede büyütme faktörü olarak sığır, koyun, keçi, domuz, kanatlı, at ve küçük ev hayvanlarının rasyon veya diyetlerinde 1970'li yıllardan beri kullanılmaktadır (Nemeskery, 1983; McCormick, 1984; Fuller, 1989; Vanbelle ve ark., 1990).

Probiyotikler, hayvanların sindirim kanalındaki mikrofloranın ekolojik dengesini düzene sokmak, mikroflora içerisindeki potansiyel patojen mikroorganizmaların zararlı hale gelmesini önlemek, özellikle hayvanların yemden yararlanmalarını arttırmak gibi amaçlarla içme suyu ya da yem içerisine, bir grup canlı bakteri, maya ve mantar kültürleri içeren biyolojik ürünler olarak katılmaktadırlar (Fuller, 1989; Hooper, 1989; Aytuğ, 1989). Probiyotikler yemlerin sindirimini arttırmaya ilaveten, sindirim sisteminin sağlıklı çalışmasına ve genel bağışıklık sistemini güçlendirerek hayvanın sağlığı üzerinde olumlu etkiler yaratmaktadırlar.

Canlı mikrobiyal hücreleri içeren, hayvan beslemede kullanılan ürünlerin üretilmesinin hayvan sağlığını geliştirdiğini söylemek doğru bir yaklaşım değildir. Bunun için bilimsel olarak geçerli probiyotik hazırlıkların üretimi yapılmalıdır. Bu zor bir iş olup, ideal probiyotik

kültür ve kullanılan bakterileri özellikleri aşağıdaki gibi olmalıdır (Nousiainen ve Setala, 1993; Tuncer, 2000; Dunne ve ark.,1999; Lee ve Salminen, 1995);

- i. Bakteri suşu, belli bir süre zarfında gastrointestinal alanda canlılığını sürdürebilmeli. Mukozal yüzeylere tutunabilme ve ilişki kurabilme özelliğine sahip olmalıdır. Bakterinin gelişme oranı ve besin kaynaklarından yararlanma verimi mikrobiyal kolonizasyonlarında önemli olduğu düşünülmektedir.
- ii. Bakteri suşu, gastrointestinal patojen mikroorganizmalara inhibitör madde üretmeli ya da hayvanın bağırsak enfeksiyonlarına direncini artırmak amacı ile konağın immun sistemini desteklemelidir.
- iii. Bakteri suşu, konakçı tarafından sindirilemeyen esansiyel maddeleri sindirmede katkıda bulunmalıdır.
- iv. Bakteri suşu, büyük ölçekteki endüstriyel şartlar altında kültür edilmeye ve saklanmaya elverişli olmalıdır.
- v. Bakteri suşu, hayvan sağlığını etkileyecek avirulant ve bu metabolik karakterden yoksun olmalıdır.
- vi. Tüm bu sayılanlar, bakteri suşunun sabit özellikleri olmalıdır.

Böyle bir prototip suşu arama ve keşfetmede büyük ve pahalı bir tarama programına ihtiyaç duyulabildiği gibi sonucun başarısız çıkma olasılığı da yüksektir. Probiyotikler arasında yer alan Laktik Asit Bakterileri (LAB), yukarıdaki listedeki kriterlere haiz bakteri suşları içeren, güvenilir bir bakteri grubu olarak bilinmektedir. Probiyotik olarak kullanılan ve sindirim sisteminin doğal bir mikroflorası olan LAB, bağışıklık sistemini uyarıcı etkilerinin yanı sıra bağırsakta hızla kolonize olabilme, mide ve safra asitlerine karşı dirençli olma (Stavrik ve Kornegay, 1995; Nousiainen ve Setala, 1993), düşük pH'larda asit üretme, patojen ve kontaminant organizmaların gelişimlerini ürettikleri organik asitler; laktik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriosinler gibi maddelerle inhibe edebilme gibi özelliklere sahiptirler (Zhu ve ark., 2000).

1.2. Laktik Asit Bakterileri

LAB, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif, bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında hareketsiz, sitokromdan yoksun, birkaç istisna tür dışında spor oluşturmayan, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten, morfolojik olarak, kok, düzgün çubuk ve düzensiz çubuk şeklindeki bakterilerdir. Tabiatta yaygın olarak bulunan LAB' nin doğal ortamları süt ve süt mamulleri, işlenmemiş, taze veya çürümüş bitkilerdir. LAB insan ve hayvanların sindirim sistemlerinin mukozal yüzeylerinde doğal olarak bulunurlar (Axelsson, 2004). Ayrıca toprak, su, gübre ve atık sularda da LAB tespit edilmiştir (Beasley, 2004). İlk olarak süttten izole edilmiş (Metchnikoff, 1908) olan LAB, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragonococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* gibi belli başlı cinsleri içerirler (Hofvendahl ve Hahn-Hagerdal,2000).

LAB' nin ilk kullanışlı sınıflandırılma yöntemi morfolojik, ekolojik ve fizyolojik özellikler üzerine kurulmuştur (Orla-Jensen, 1919). Zamanla bu belirleme işleminde kullanılan

fizyolojik ve morfolojik özelliklerine ilaveten, laktik asit üretimleri, karbonhidrat kullanımları, fermantasyon yolları, peptidoglikan tabakanın analizi gibi çeşitli düzenlemeler ve değişimler yapılmıştır. Test tekniklerinin ilerletilmesi LAB' nin tür bazında tanımlanabilirliklerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır.

Çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olan ve benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebilen LAB' nin tür düzeyinde tanımlamalarında kullanılan klasik kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından zayıf bulunarak (Kıran, 2006) LAB' ni tür düzeyinde tanımlamada aydınlatıcı bir test olarak hücre duvarı protein profillerinin tesbiti kullanılmıştır. Yağ asitlerinin kompozisyonu ve hücre duvar unsurlarından yararlanarak LAB' nin kemotaksonomik sınıflandırılmasının yapımında faydalanılmıştır (Axelsson, 2004). Hücre duvarı protein profillerine dayanan sınıflandırılmalar kullanılabilir, hızlı bir metot olmuştur. Fakat alt türlerin ayırımı sağlanamamıştır. Hücre duvarı protein profillerinin tespitine moleküler bir metot olarak 16S rRNA gen bölgelerinin analiz ve sonuçları eklenerek sınıflandırılmaya başlanılmıştır. LAB'nin tür ve suşlarının filogenetik pozisyonlarının moleküler düzeyde belirlenmesinde ribozomal RNA' dan yararlanılmaya başlanarak DNA' ya bağlı metotlarla daha spesifik sonuçlar alınmaya başlanılmıştır (Hofvendahl ve Hahn-Hagerdal,2000). Son yıllarda, fenotipik tanımlamaya alternatif olarak moleküler tanımlama çalışmaları sürdürülmektedir. 16S rDNA bölgelerinin total DNA üzerinden spesifik primerler yardımıyla bulunması işlemi, LAB' nin tanımlanmalarına farklı bir boyut getirmiştir.

Moleküler teknikler, güçlü bir ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Bush ve Nitschko, 1999). Moleküler tekniklerin bu gelişimi sonucu LAB suşları,16S rRNA gen bölgesindeki değişken bölgelerin analizlerinin belirlenmesi ile kesin olarak tanımlanabilmektedir.

LAB' nin ziraat sektöründe en önemli kullanım alanları, hayvan beslemesinde silajların olgunlaştırılmasında (Holzer ve ark., 2003) ve sütün değişik ürünlere işlenmesinde, fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında görülmektedir. Bu kullanım alanları genelde tarımsal üretim alanında, özelde ise hayvancılık ve gıda sektöründe önemli bir araştırma konusunu teşkil etmektedir.

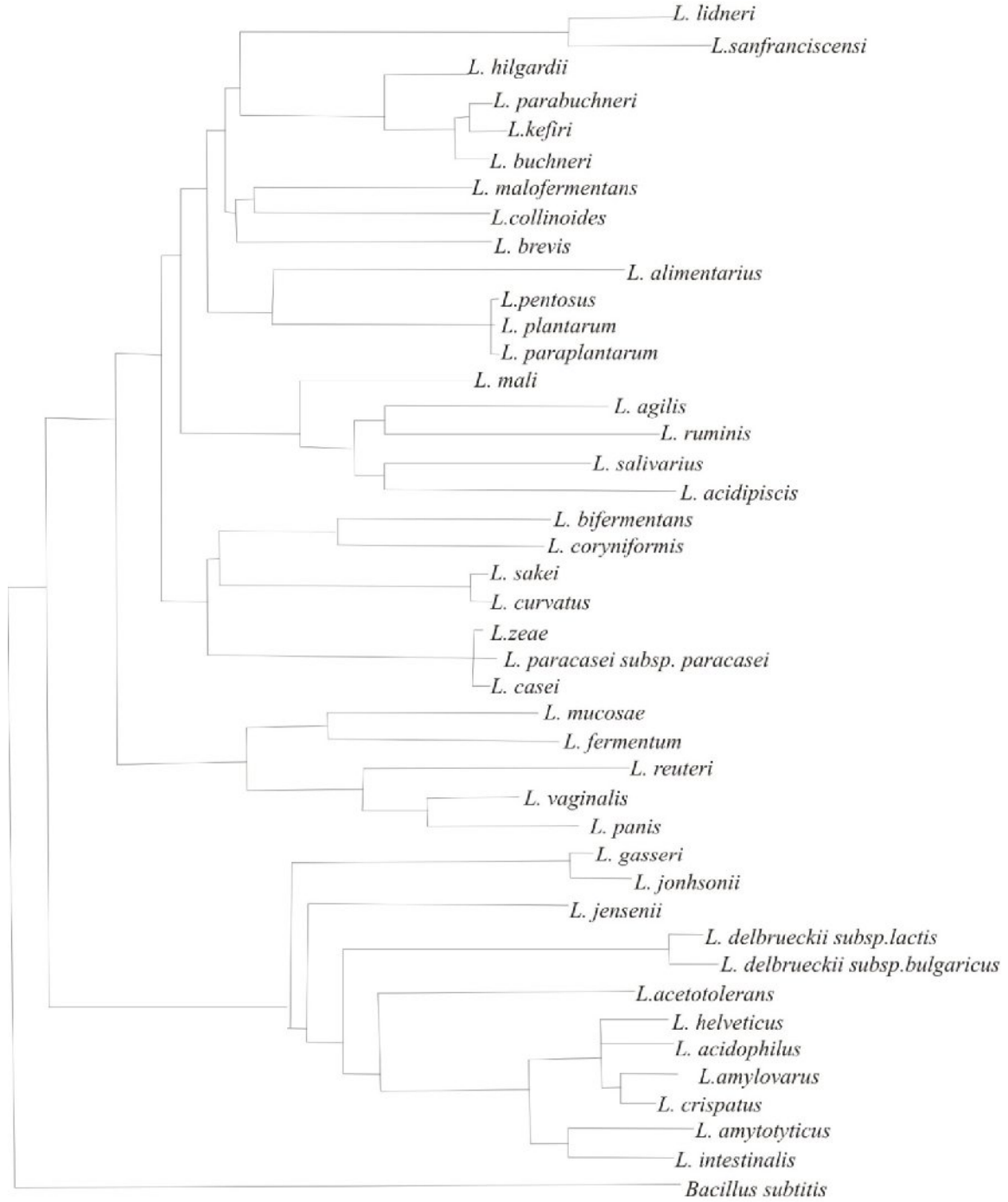
LAB tarafından üretilen organik asitler, karbondioksit, diasetil, biyosürfaktan maddeler, H₂O₂ ve protein yapısındaki bileşikler olan bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler gibi metabolitlerin birçoğu antimikrobiyel etkiye sahiptir (Mishra ve Lambert, 1996; Rolfe, 2000; Reid, 2000). LAB'nin asitlik geliştirmeleri yanında gıda maddelerinde aroma teşekkülü, gıda maddelerinin bileşiminde bulunan, insan ve hayvan organizması tarafından kullanılması mümkün olmayan ve toksik etkisi bulunan bileşenleri daha küçük molekülü, sindirilebilen veya toksik etkisi olmayan moleküllere parçalama özelliği göstermektedir (Arıcı, 2005).

Genellikle bağırsak sisteminde kolonize olan bu mikroorganizmalar gıdaların sindirimine yardımcı olmak, canlıyı patojen mikroorganizmalardan korumak ve canlının

savunma mekanizmasını desteklemek gibi işlevleri vardır. LAB ve onlardan fermente edilen gıdaların tüketilmesi ile tüketiciler üzerinde besleyici ve tedavi edici faydalarının yanı sıra antimutajenik ve antikanserojenik etkileri de bulunmaktadır. Ve özellikle kanserojenik maddeler üzerine baskı yaptıkları kanıtlanmıştır (Grill ve ark., 1995). Doğal ve sentetik mutajenlerin etkilerine karşı koruyan detoksifikasyon ve DNA tamir gibi mekanizmaların var olduğu açıktır. Bunla birlikte probiyotik olarak kullanılan LAB, kimyasal karsinojenlere karşı hassasiyeti azalttığı bilinmekte olup, bu metabolizmalar; alınan karsinojenleri detoksifiye ederek, barsağın içeriğini değiştirerek böylece karsinojenik bileşiklere neden olacak bakterilerin sayısı ve metabolik aktivitesini azaltırlar, bütirat gibi metabolik ürünleri üretirler, tümör hücrelerinin gelişmesini inhibe edecek bileşikler üretirler ve kanser hücrelerinin çoğalmasına karşı immun sistemi uyarır (Parvez ve ark., 2006).

LAB güvenilir bir şekilde insan ve hayvan probiyotikleri olarak kullanılmaktadırlar. Bu bakterilerin asitli ortama dayanmaları, safra tuzlarını hidroliz edebilmeleri, antimikrobiyal madde üretebilmeleri ve bağırsak yolunda yaşayıp, gelişebilme özelliklerinden dolayı bu bakterilerin probiyotik olarak kullanılmaları vurgulanmıştır (Kuar ve ark., 2002).

LAB arasında insan ve hayvan tüketiminde güvenilir (GRAS) mikroorganizmalar içerisinde sayılan en büyük bakteri grubu *Lactobacillus' tur*. Çoğunlukla endüstriyel önemi olan bu grupta yaklaşık 140 tür mevcuttur (Limsowtin ve ark., 2003). Çiğ süt, fermente süt ürünleri, et ürünleri, meyve, sebze gibi gıda ürünlerinin doğal florasının başlangıç parçası olan *Lactobacillus*, bu ürünleri fermente etmek için de kullanılan en önemli starter olarak veya ürün kalitesini yükseltmek ve sağlığa faydası için eklenmektedir. *Lactobacillus* türleri, omurgalı hayvanların gastrointestinal sisteminde, ince bağırsağa tutunarak lokalize olurlar. *Lactobacillus* türleri gram (+), çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz (-) özellik göstermektedir. *Lactobacillus* grubuna ait türlerden seçilen suşların 16S rDNA gen bölgesi sekanslarına göre birbirlerine genetik olarak yakınlık ve uzaklık ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç şekil 1.1'de verilmektedir.



Şekil 1.1. *Lactobacillus* suşlarının 16S rRNA gen bölgesi sekanslarına göre oluşturulmuş filogenetik ağacı (Lee ve Salminen, 2009).

Laktobasillus türleri karbonhidratları fermente etme yollarına göre homofermantatif, fakültatif heterofermantatif ve zorunlu heterofermantatif olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadırlar (Curry ve Crow., 2003). Bu şekilde Tannock tarafından derlenmiş ve gruplandırılması yapılmış *Laktobasillus* türleri Çizelge 1.2' de gösterilmektedir.

Çizelge 1.2. Karbonhidratları fermente etme yollarına göre gruplandırılması yapılan *Lactobacillus* türleri (Tannock, 1999).

Homofermantatif	Fakültatif Heterofermantatif	Zorunlu heterofermantatif
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. hamsteri</i>	<i>L. collinoides</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>L. bif fermentans</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	<i>L. coryniformis subsp. coryniformis</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>	<i>L. coryniformis subsp. torquens</i>	<i>L. malefermentans</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. oris</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. graminis</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. parabuchneri</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. parakefir</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. kefirano faciens</i>	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. kefirgranum</i>	<i>L. paracasei subsp. tolerans</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. aviarius subsp. araffinosus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. vaccinos tercus</i>
<i>L. ruminis</i>	<i>L. rhamn osus</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. mali</i>	<i>L. sake</i>	<i>L. fructosus</i>
<i>L. salivarius subsp. salicinus</i>		
<i>L. salivarius subsp. salivarius</i>		
<i>L. sharpae</i>		

Bu grupta yer alan bakterilerin ve ekonomik açıdan önemli olan türlerinin benzer fenotik ve fizyolojik özellikleri vardır. Muhtemelen aynı ekolojik niş için birlikte evrimleşmişlerdir. Bundan dolayı ayrımlarını yapmak zordur.

Genel olarak bakteriler, hızlı büyüme ve kolaylıkla manipüle edilebilmelerinden dolayı moleküler biyoloji, genetik ve biyokimyada birer araç olarak kullanılmaktadırlar. Bakteri DNA'sında mutasyon yapıp bunun fenotipini inceleyerek genlerin, enzimlerin ve metabolik yollarının işlevleri belirlenebilmektedir. Edinilen bilgiler ışığında biyoteknoloji kullanılarak gerek diğer canlılara metabolizmaları uygulayabilme, gerekse hayvan ve insanda beslenme ve sağlık amaçlı daha verimli şekilde kullanılması sağlanmaktadır. Örneğin, gastrointestinal alana kolonize olduğu bilinen bir bakteri suşunun genetik modifikasyonla; istenmeyen özelliği

taşıyan gen inaktive ederek inhibe edilebilir; rekombinant DNA teknolojisi ile istenilen probiyotik özelliğe sahip bir gen aktive edilebilir, gen teknolojisi ve gen transferi gibi metodlarla türlere kendi potansiyelleri dışında bazı genetik özellikler kazandırılabilir. Bu noktada LAB, güvenilir mikroorganizma olduğundan ve endüstriyel kullanım alanlarının geniş olmasından dolayı genetik işlemler yapılmaya dair cazibesini korumaktadır.

LAB'nin suşları, türleri hatta cinsleri arasında *in vivo* gen transferlerinin bilinen doğal mekanizmaları; fizyolojik transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon olarak sayılmaktadır. Bu mekanizmaların önemi, farklı türler arasında çok çeşitlilik göstermesidir. LAB'nin doğal yaşam alanlarında yatay gen transferlerine katkıda bulunan bu mekanizmalardan, LAB suşlarına genetik modifikasyonda da yararlanılmaktadır. Fakat *in vitro* olarak gen transfer mekanizmalarının rekombinant DNA teknikleri için güvenilirliği ve daha da önemlisi LAB'ne adaptasyonu esastır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Walter ve arkadaşlarının 2000 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, farelerin midelerinden elde edilen *Lactobacillus* suşlarının 16S rRNA gen bölgelerinde bulunan V2 ve V3 bölgelerini tanıyan spesifik primerler yardımı ile moleküler olarak belirlenmiştir. Ayrıca insan ve domuz gastrointestinal bölgelerinden izole edilen *Lactobacillus* suşlarını, 16S ve 23S rRNA ara bölgesi ve 16S rRNA gen bölgelerinden türe özgü tasarlanmış primerler yardımı ile moleküler olarak tür düzeyinde tespit etmişlerdir.

Brandt ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* suşlarındaki Le-Nu fajı genomunu kullanarak kesin spesifik tanımlanmasını ve *Lactobacillus rhamnosus* suşlarındaki faj bağlantıları incelemiştir. Birkaç primer çifti Le-Nu fajının dairesel replikasyon gen bölgesi sekansından türetilip, beklenen primer boyutlarda PZR ürününe ulaşmış. Tanımlama ve belirleme için 3 probiyotik *Lactobacillus rhamnosus* suşundan türetilen primerler 11 *Lactobacillus rhamnosus* suşu ve 40 başka bakteri türünde karşılaştırmalı test edilmiştir.

Baele ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, 38 *Lactobacillus* cinsine ait 82 suşa, tDNA bölgesi hedef alınıp, uygun primerler kullanılarak tür düzeyinde evrimsel yakınlıklarının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu moleküler metotla, 21 suş tür düzeyinde kesin belirlenirken, diğer suşların ise iki (örneğin, *L. fermentum* ve *L. cellobiosus*) ve üçlü (örneğin, *L. acidophilus*, *L. gallinarum* ve *L. helveticus*) şekilde gruplandırılmasına gidilmiştir.

Weinberg ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, silaj inokülasyonunda kullanılan laktik asit bakterilerinin (LAB) probiyotik etkileri üzerine çalışmışlar. Probiyotik etkileri üzerine çalışmalarında ilk olarak bu bakterilerin rumen sıvısında yaşayıp yaşamadıklarını belirlemek olmuştur. 10 ticari inokulant kullanılmış Amerika ve İsrail'deki uzmanlar eşliğinde, saf rumen sıvısı ve rumen sıvısı kontrol amaçlı 10^6 - 10^8 mikroorganizma/ml glikozlu ve glikozsuz 5 g/l inokule edilmiş. Rumen sıvısı 39°C'de inkubasyona bırakılmış ve 6, 12, 24, 48, 72 ve 96 saatlerde pH ve LAB sayımı yapılmış. Glikoz ilave edilmiş rumen sıvısının pH' sının azalmış olduğu belirtilmiştir. Glikoz eklendiğinde ise LAB' nin sayımının çoğaldığını göstermişlerdir.

Kao ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, Taiwan' da probiyotik ürünler içine eklenen *Lactobacillus* suşları olan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus delbrueckii* PZR ve melting curve analizi ile tanımlanması incelenmiştir. PZR işlemini, bu 5 *Lactobacillus* suşunu ayırmak için, türe özgü primerler 16S rRNA gen bölgelerinin sekanslarının değişkenliklerinden yararlanılarak 16S RNA geni hedef olarak yapılmıştır. *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* PZR ile basit bir şekilde tanımlamaları yapılmış, fakat *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus rhamnosus* suşları için farklı bir yaklaşım deneyip, hibrit problara melting curve analizi kullanarak tanımlamaya çalışılmıştır. Bu yaklaşımla da *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus rhamnosus* suşları tanımlanmış fakat *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus paracasei*

tanımlanamamışlardır. Çünkü her ikisi de aynı 16S rRNA gen bölgesi sekansına sahip oldukları bulunmuştur. Yakın ilişkili *Lactobacillus* suşlarını ayırt etmede PZR yaklaşımı ile hızlı, doğru ve basit bir metot olduğunu gösterilmiştir.

Gu ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, Çin' in Guangxi bölgesindeki Hotan, Xinjiang ve Bama' da yaşayan insanlar dışkı örneklerinden elde edilen LAB' nin probiyotik özellikleri araştırılmış. Toplam 567 LAB suşu üzerinde çalışmışlar. Önce incelemedeki sayıyı azaltmak için yüksek probiyotik özelliklerine ve pH 3.5'te büyüme kabiliyetlerine bakılmış. Böylelikle 36 LAB suşu üzerinde çalışmaya yönelmişler. 16S rRNA gen bölgeleri üzerinde RAPD yöntemi ile sekans analizi yapıp izolasyonlarına çalışılmış. 36 suştan, 3 tane *Lactobacillus acidophilus* suşu, 10 tane *Lactobacillus rhamnosus* suşu, 3 tane *Lactobacillus casein* suşu, 3 tane *Lactobacillus brevis* suşu, 2 tane *Enterococcus faecium* suşu, 2 tane *Enterococcus faecalis* suşu, 4 tane *Bifidobacterium infantis* suşu, 3 tane *Bifidobacterium breve* suşu, 3 tane *Bifidobacterium bifidum* suşu, iki tane *Bifidobacterium adolescentis* suşu ve bir tane *Bifidobacterium longum* suşu Probiyotik kullanım için uygun suşlar olarak tanımlanmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarında yapılmış bu tez çalışmasının kullanılan kimyasalları aksi belirtilmediği sürece Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) grubundan; moleküler biyoloji sarf malzemeleri Fermentas (USA), Promega (UK) ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir.

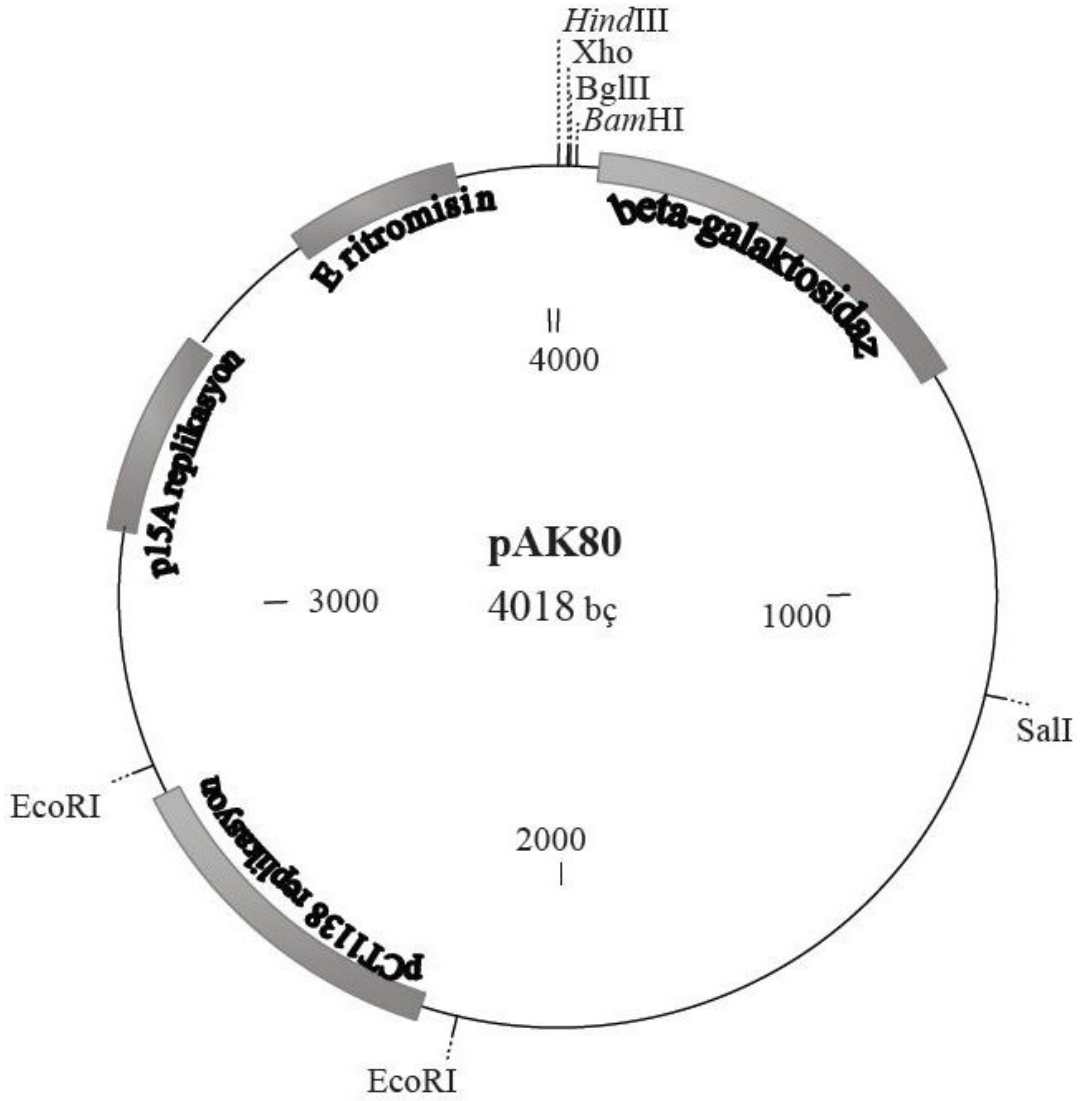
3.1.2. Bakteri Suşları ve Plazmit

Çalışma kapsamında Gen Bankası'ndaki üç farklı *Lactobacillus* türün genlerinden (Çizelge 3.1.) faydalanılarak izolatlar tanımlanmış ve gen transferi için pAK 80 plazmiti kullanılmıştır. pAK 80 plazmitinin temel özellikleri (Çizelge 3.1.) ve şematik gösterimi (Şekil 2.1.) verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada izolasyonları ve tanımlanması hedeflenen bakterilerin türleri ve kullanılan plazmitin temel özellikleri.

Bakteri Türleri	Uygulama Alanı	NCBI Erişim No
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Probiyotik	NC_006814
<i>Lactobacillus crispatus</i> DSM20016	Probiyotik	NZ ACKR01000046
<i>Lactobacillus rhamosus</i>	Probiyotik	FJ899640

Plazmit	Antibiyotik Dirençlilik	Genetik İçerik	Kaynak
pAK80	Eritromisin	Promotorsuz <i>lac Z</i> , RepA ⁺	Israelsen ve ark.,(1995)



Şekil 3.1. pAK 80 plazmidinin şematik gösterimi.

pAK80 plazmidi, *lacZ* gen bölgesi, replikasyon bölgesi ve eritromisine dirençlilik geni içerir. Plazmit kendi üzerinde replikasyon bölgesi içermesi nedeniyle hücre içinde kromozoma veya başka bir plazmite ihtiyacı olmadan çoğalabilmektedir.

3.2. Metot

3.2.1. Bakteriyel Besi Yerlerinin Hazırlanması

Lactobacillus crispatus suşları MRS (De Man Rogosa and Sharpe) Agar besi yerlerinde büyütülmüştür. 100 ml’de 5.2 gr hazır MRS besiyeri içeriği çözülürerek hazırlanmıştır. Katı besiyeri için % 1.5 agar ilave edilmiş ve sterilizasyon 121 °C’ de 15 dakika yapılmıştır (De Man ve ark., 1960; Halkman ve Akçelik., 2005). Bu besi yerinin kompozisyonu Çizelge 3.2.’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Lactobacillus crispatus* suşları için kullanılan MRS besi ortamının kompozisyonu.

MRS Broth (Merck)	Kimyasallar	Miktar (gr/l)
	Pepton	10,0
	Lab-Lemco Et Özütü	10,0
	D (-) Glucose	20,0
	Maya Özütü	5,0
	Tween	80 1 ml
	K ₂ HPO ₄	2,0
	Sodyum asetat	5,0
	Triammonium sitrat	2,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
	Distile Su (dH ₂ O)	1000 ml

Lactobacillus rhamnosus ve *Lactobacillus acidophilus* suşları GM17 besi yerinde büyütülmüştür. 42,5g M17 ve % 0,5 (g/w) glikoz 1000 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür (Terzaghi ve Sandine., 1975). Hazırlanan karışım 15 dakika 110 °C’de sterilize edilmiştir. Agar, katı besi yerlerine % 1,5 olarak eklenmiştir. Bu besi yerinin kompozisyonu Çizelge 3.3.’ te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus acidophilus* suşları için kullanılan M 17 besi ortamlarının kompozisyonları.

M17 (Merck)	Kimyasallar	Miktar (gr/l)
	Polipepton	5,0
	Fiton pepton	5,0
	Maya Özütü	2,5
	Et Özütü	2,5
	Askorbik Asit	0,5
	MgSO ₄ (0,1M).7H ₂ O	1 ml
	Disodyum-β-gliseroil-fosfat	19,0
	Laktoz	5,0
	Distile Su (dH ₂ O)	1000 ml

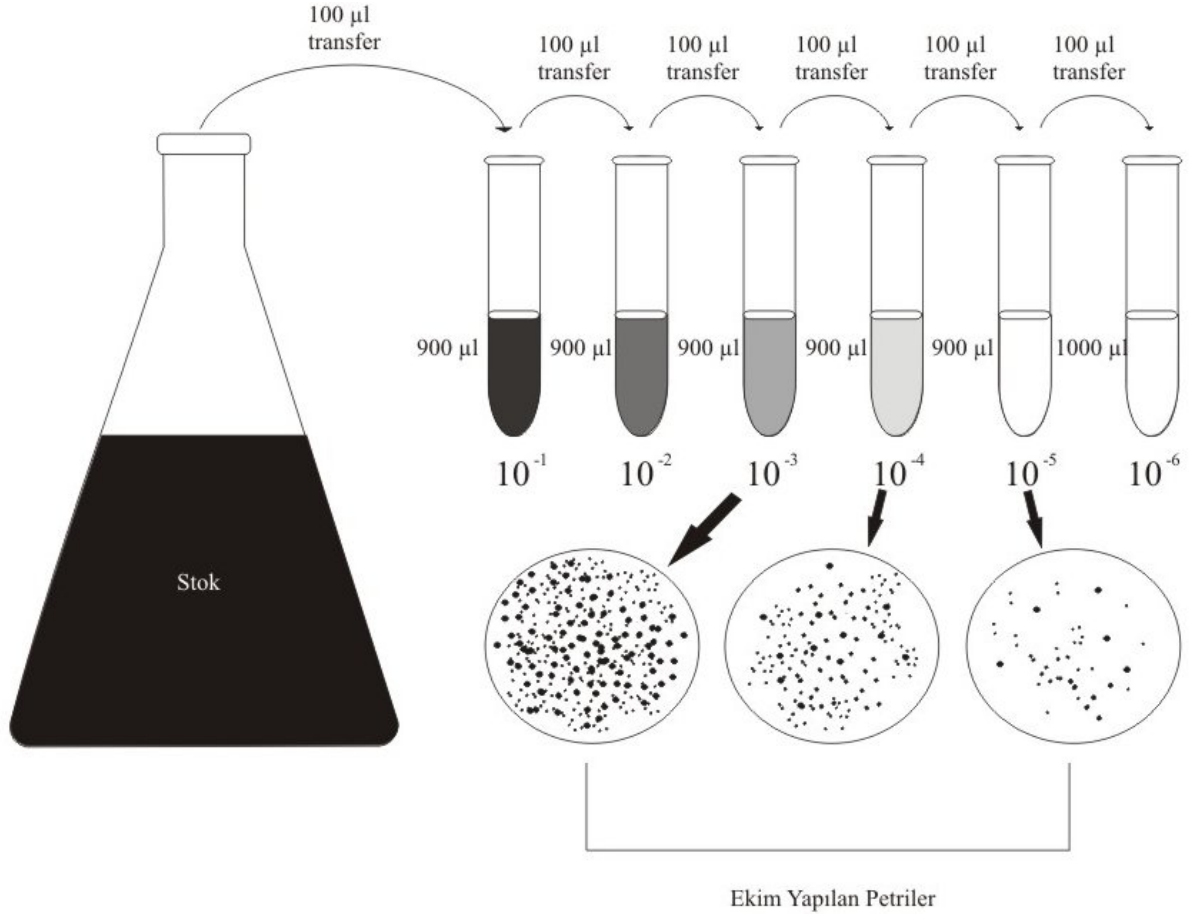
Laktik asit bakterileri (LAB), GM17 ve MRS besi ortamında geliştirilmişlerdir. GM17 ve MRS besi ortamları otoklav (Nüve; OT4060) ile 110 °C'de 15 dk. sterilize edilmiştir. *Lactobacillus crispatus* suşları için MRS besi ortamında ve 37 °C'de, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus acidophilus* suşları için GM17 besi ortamında ise 30 °C'de inkübe (Nüve; EN110) edilmiştir (De Man ve ark., 1960; Halkman ve Akçelik., 2005).

3.2.3. LAB' nin Fermente Ürünlerden İzolasyonları

K.S.Ü Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü tarafından hazırlanmış saf yonca silajı, % 6 ' lık *Honey locus* ve saf yonca karışımı silajı, % 3 ' lık *Honey locus* ve saf yonca karışımı silajı, %1.5 ' lık *Honey locus* ve saf yonca karışımı silajı, saf yonca silajı ve mısır silajı örneklerinden 5 gr alınarak, ev yapımı sucuk örneğinden 20 gr alınarak, ev yapımı ravanda örneğinden 500 µl alınarak, ev yapımı salamura zeytin örneklerinden 1 adet alınarak toplam 8 örneğin her biri için 50 ml'lik hem sıvı GM17' ye hem de sıvı MRS besi yerine ilave edilmek suretiyle 24 saat aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon koşulları GM 17 besi yeri için 30 °C ve MRS besiyeri için ise 37 °C' dir (De Man ve ark., 1960). Mikrobiyal aktiviteleri gözlemlenen ekim yapılan sıvı besi yerlerinden pipet yardımı ile 100'er µl alınarak MRS agar ve GM17 agar petrilere inoküle edilmişlerdir. İnoküle edilen petrilere GM 17 agar besi yeri için 30 °C ve MRS agar besi yeri için 37 °C' de aerobik koşullarda inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon ardından tek koloniler oluştuğu gözlenmiş ve öze yardımı ile oluşan tek kolonilerden alınarak 10'ar µl steril distile su içinde çözündürülüp koloni PZR işlemi için hazırlıkları yapılmıştır.

3.2.4. Seyreltme

50 ml'lik sıvı GM17 ve sıvı MRS besi yerlerine fermente ürünlerden; silaj örneklerinden 5 gr., sucuktan 20 gr., salamura zeytinden 1 adet, ravandadan 500 µl miktarlarda alınarak inoküle edilmiştir. GM 17 için 30 °C ve MRS için 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon koşulların altında 24 saat geçirildikten sonra mikrobiyal aktivitenin olduğu gözlenmiştir. Bu stok kültürlerden 100 µl alınarak 900 µl steril distile su ilave edilip mikroorganizmaların homojen dağılımı sağlanarak 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 'ya kadar seyreltmeler yapılmıştır. Yapılan seyreltme işlemi ve katı besi yerlerine inokülasyonları şematik olarak Şekil. 3.2.' de gösterilmiştir. MRS agar ve GM17 agar petrilere inoküle edilerek 30 °C ve 37 °C inkübasyona bırakılmıştır.



3.2.5. LAB'nin Tanımlanmaları**3.2.5.1. Kimyasal Tanımlamalar****3.2.5.1.1. Gram Boyama**

İzole edilen LAB'lar Gram (1884) tekniği ile boyanmış, günümüzde kullanılan boyalar kullanılarak modifiye edilmiştir. Petrilerdeki kolonilerden; preparatlara hazırlanmış, kurutulmuş ve tespit edilmiştir. Kristal violet solusyonu ile 2-3 dakika boyanmış, boya dökülmüş ve preparat üzerine lugol solusyonu konarak 1-2 dakika beklenmiştir. Lugol solusyonu önce saf alkol ile sonra saf su ile yıkanmış ve safranin ile de 5-10 saniye boyanıp, su ile yıkanarak boya giderilmiştir (Harrigan ve McCance,1976). Kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra sedir yağı konarak 100X büyütmele immersiyon objektifi ile muayene edilmiştir. Bu yöntemle morfolojileri ve renkleri gözlemlenmiştir. Mor olarak görülen mikroorganizmalar Gram pozitif olarak tanımlanmıştır.

3.2.5.2.2. Katalaz Testi

Katı besi yerinde büyüyen mikroorganizma kolonilerinden platin öze veya cam baget yardımı ile yeterli miktarda alınarak steril bir lamın üzerine konularak % 30 luk hidrojen peroksit (H_2O_2)' ten bir damla damlatılmıştır. Hidrojen peroksit (H_2O_2)' e reaksiyon göstererek kabarcıkların görülmesi katalaz enziminin kimyasal olarak varlığına işaret etmektedir (Hammes ve Vogel, 1995). Aynı işlemleri 5 ml' lik sıvı besi yerinde çoğaltılmış kültür üzerine % 3 lük hidrojen peroksit (H_2O_2)' den damlatıldıktan kabarcık oluşup oluşturmadıkları gözlemlenmiştir.

3.2.5.2. Moleküler Tanımlama**3.2.5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Koloniler, rRNA'yı kodlayan DNA bölgesi üzerinden tasarlanmış primerler ile yapılan PZR ile çoğaltılmıştır.

PZR işlemi toplam 40 µl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için; 4µl 10X buffer, 1µl 1 mM dNTP, ileri ve geri primerlerden 1'er µl (20 pmol), 0,5µl Taq DNA polimeraz (5 ünite/µl), 1 µl kalıp DNA (400 ng/ml) ve 40 µl'ye tamamlamak üzere 31,5 µl dH₂O ile karıştırılarak yapılmıştır.

Primerlerin tasarlanması, yapışma sıcaklıklarının hesaplanması ve dizi uygunlukları internet programı (<http://www.sigma.genosys.com/calc/DNACalc.asp>) ile yapılmış ve ticari firmalardan sipariş edilmiştir (İontek, İstanbul). Çalışmada kullanılan primerlerin detayları Çizelge 3.4.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. *Lactobacillus* türleri için tasarlanan primerlerin hedef bölgeleri ve nükleotid dizileri.

Türler	NCBI Erişim Nu.	Primerler	Hedef Bölgeler	Dizilim (5'→3')
<i>Lb. acidophilus</i>	NC_006814	Acid F AcidR	16S rRNA geni	AGCTGAACCAACAGATTCAC ACTACCAGGGTATCTAATCC
<i>Lb. crispatus</i>	NZ_CKR01000046	CrispF CripR	16S rRNA geni	GTAATGACGTTAGGAAAGCG ACTACCAGGGTATCTAATCC
<i>Lb. rhamnosus</i>	FJ899640	RhamF RhamR	16S rRNA-23S rRNA genleri arası	CAGACTGAAAGTCTGACGG GCGATGCGAATTTCTATTATT

3.2.5.2.2. Koloni PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon)

Lactobacillus türlerini tanımlama amacıyla koloni PZR yapılmıştır. Seçici petrielerde 24 saat inkübe edilmiş olan koloniler öze yardımıyla seçilerek 10µl dH₂O içerisine çözülmüştür. 3.2.5.2.1.' de açıklandığı şekilde PZR işlemi yapılmıştır. Kalıp DNA yerine 1µl koloni kullanılmıştır. PZR ile pozitif sonuç veren kolonileri, stoklanmak için sonraki çalışmalarda kullanılması amacıyla sıvı besi yerine alınmıştır.

3.2.5.2.3. PZR Koşulları

PZR amplifikasyonu 95 °C'de 4 dk. ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 35 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dk. denatürasyon, türe özgü tasarlanmış spesifik primerler için uygun yapışma sıcaklıklarında 1 dk. uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. Türe özgü tasarlanmış spesifik primerlerin uygun sıcaklıkları ve PZR koşulları Çizelge 3.5.' de gösterilmiştir. Primerlerin yapışma sıcaklığı, erime sıcaklığının yaklaşık 5 °C altındadır.

Çizelge 3.5. Türe özgü tasarlanmış spesifik primerlerin uygun sıcaklıkları ve PZR koşulları.

Zaman	Döngü	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
2dk	1	95 °C	94 °C	94 °C
1dk	35	94 °C	94 °C	94 °C
1dk		60 °C	62 °C	58 °C
1 dk		72 °C	72 °C	72 °C
7dk	1	72 °C	72 °C	72 °C
∞		4 °C	4 °C	4 °C

3.2.5.2.4. DNA'nın Jel Elektroforezi

Agaroz jel hazırlanarak üzere; %1 oranında agaroz, 1 X TBE çözeltisinde [1000 ml TBE (1X) 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. DNA 100 baz çiftlik ya da 1000 baz çiftlik DNA markerları (FAVORGEN) kullanılmıştır. Elektroforez tankında (ATTO Corporation), jel 100 volt ve 500 mA' da koşturulmuştur. Koşturulan agaroz jel Et-Br solusyonunda (0,5 µg/ml) ile 20 dakika boyanmıştır. DNA örnekleri U.V. ışığı altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.6. Bakteri Büyümesi (A₆₀₀)

Saflaştırılmış olan *Lb. crispatus* suşları 5 ml' lik sıvı MRS besi yerine, *Lb. acidophilus* ve *Lb. rhamnosus* suşlarının ise 5 ml' lik sıvı GM 17 besi yerine, katı besi yerlerindeki kolinilerinden öze yardımı ile alınarak kolonileri yeterli büyüklüğe getirmek üzere ekimleri yapılmış inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon şartları MRS besi yeri için 37 °C, GM 17 için 30 °C'dir. Bu şartlarda 4 saatlik inkübasyonun ardından 5 ml' lik besi yerlerin 200 µl alınarak 50 ml' lik sıvı MRS ve GM 17 besi yerlerine ekimleri yapıp aynı inkübasyon şartlarına bırakılmıştır. Spektrofotometride 96 saatlik bakteri büyüme ölçümleri 600 λ dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ölçümleri ilk 10 saati birer saat arayla yapıp sonraki ölçümleri 20., 24., 48. ve 96. saatlerde gerçekleştirilerek logaritmik büyüme eğrisi çıkarılacak verilere ulaşılmıştır.

3.2.7. Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu, FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini Kiti (Favorgen) kullanarak firmanın verdiği protokol ile izole edilmiştir. Bir gece önce ekilen ve gelişmiş olan bakteri kültüründen 1,5 ml tüplere alınarak 3500 dev/dk' da (1234 g) 10 dakika santrifüj edilerek bakteri hücrelerinin çöktürülmesi sağlanmıştır. Çöken pelet kısım üzerine 200 µl hazır FAPDI solüsyonu eklenerek, pelet solüsyon içerisinde çözdürülmüş ve 200 µl FAPDII solüsyonu eklenerek 10 defa karıştırılmıştır. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra karışıma 300 µl FAPDIII solüsyonundan eklenip yine yavaşça 10 defa karıştırılmıştır. Tüpler 14000 dev/dk' da (18620 g) 3 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı filtreli tüplere alınmıştır. Filtreli tüpler 14000 dev/dk' da (18620 g) santrifüj edildikten sonra filtreden süzülen kısım dökülüp filtre tekrar tüplere yerleştirilmiştir. Filtreli tüplere 400 µl Yıkama I solüsyonundan eklenerek 8000 dev/dk' da (6451 g) 30 saniye santrifüj edildikten sonra filtreden süzülen kısım dökülüp filtre tekrar tüplere yerleştirilmiştir. Filtreli tüpler son olarak 600 µl Yıkama II solüsyonundan eklenerek 8000 dev/dk' da (6451 g) 30 saniye santrifüj edildikten sonra son yıkama işlemi de gerçekleştirilmiştir. Filtre yerleştirildikten sonra yıkama solüsyonunun tamamen temizlenmesi için 14000 dev/dk' da (18620 g) 3 dakika daha santrifüj edilmiştir. Filtreler yeni tüplere alınarak 50 µl elüsyon buffer ya da distile su eklenip oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 14000 dev/dk' da (18620 g) 3 dakika santrifüj edilip elde edilen DNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.8. Elektroporasyon ile *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*'a Plazmit Transferi

L. lactis kaynaklı pAK80 plazmiti *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus*'e elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır (Kim ve ark.,2005). Plazmit transferi için hücrelerin 100 ml'lik GM17 ve MRS' e 1'er ml'lik *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* eklenerek 30 °C ve 37 °C'lerde inkübe edilmiş, $A_{600}=0,5$ 'de (yaklaşık 2,5–3 saat) 3500 dev/dk' da (1234 g) 10 dakika santrifüj edilip, hasat edilmiştir. Hasat edilen ve süpernatantı uzaklaştırılan peletlere 10 ml buzda soğutulmuş 0,5M sükröz, %10 gliserol eklenmiş ve hücreler bu solüsyonla çözdürülmüştür. Bu yıkama aşaması bir sefer daha tekrarlanmıştır. Hücreler 1 ml 0,5M sükröz, %10 gliserol içeren solüsyonda çözdürülmüş ve 40 µl olarak örnek sayısı kadar eppendorflara bölünmüştür.

Eppendorflara 40 µl hücre ve 5 µl ligasyon eklenerek oluşturulan toplam 45 µl örnek buz üzerinde soğutulmuş ve 0,2 cm elektroporasyon kuvetine aktarılmıştır. Hücreler Bio-Rad Pulser™ kullanılarak 200 Ohm., 25 µF ve 2,5 kV ayarlanmış şartlarda elektroporasyona maruz bırakılmıştır. Bu transformasyonu takiben hücreler, 1000 µl 2M sükröz, 100 µl 1M MgCl₂ ve 50 µl 100 mM CaCl₂ eklenmiş GM17 ve MRS besi yerleri içerisinde 2 saat 30 °C ve 37 °C'lerde inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol amaçlı hücreler seçici antibiyotik olarak eritromisin eklenen 100 ml' lik GM17 ve MRS katı besi yerine ekimleri yapılarak 30°C ve 37 °C'lerde 16 saat (bir gece) inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmanın negatif kontrolü için seçici

antibiyotik eritromisin eklenmiş petrilere transformasyon gerçekleştirilmemiş hücrelerin ekimleri yapılarak aynı şartlar altında inkübe edilmişlerdir.

3.2.9. Bakterilerin Stoklanması

Bakteriler, kısa süreli kullanımlar için, %15'lik gliserol içerisinde alınarak -20°C 'de saklanmıştır.

Uzun süreli saklama koşulları ise, besiyerinde 16 saat büyütülen bakterilerden 200 μl alınarak 12000 dev/dk' da (14515 g)'de 3 dakika çöktürülerek peletlerin %30 gliserol içerisinde çözdürüp, -80°C 'de saklanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Probiyotik özellikte olan üç farklı *Lactobacillus* suşunun fermente ürünlerden izolasyon amaçlı ekimleri yapılarak elde edilen tek koloni örnekleri çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir. Koloniler katalaz testine tabii tutulup, ardından biyokimyasal ve morfolojik tanıları için gram boyama işlemi yapılmıştır. Katalaz negatif (-) reaksiyon veren, çubuk ve kok şekilli Gram pozitif (+) özellikte olan koloniler muhtemel Laktik Asit Bakleterileri (LAB) olarak seçilmiştir. Bunun sonucunda probiyotik özellikte olan *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* türlerine özgü tasarlanan primerler kullanılarak 16S rRNA gen bölgelerinde belirlenen bölümler PZR ile çoğaltıp agoroz jelde görüntülenmiştir. Böylelikle probiyotik özellikte olan LAB'nin tanımlanması ve izolasyonları yapılmıştır.

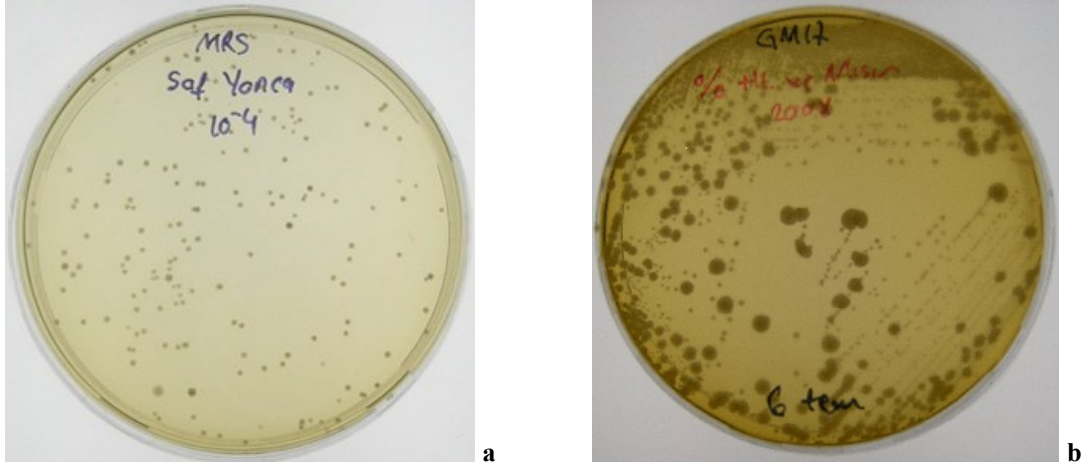
Tanımlanması ve izolasyonları yapılan probiyotik özellikte olan *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* türlerinin büyüme eğrileri çıkartılmıştır. Ayrıca bu bakterilerin gen transfer kapasitelerini ortaya koymak için *Lactococcus lactis* kaynaklı pAK80 plazmit transferi gerçekleştirilmiştir.

4.1. LAB'nin İzolasyonu

Fermente ürünler olan, silaj, sucuk, salamura, zeytin ve ravanda' dan toplan 48 koloniden 3 farklı koloni izole edilmiştir. İzole edilen kolonilerden biri *Lactobacillus acidophilus* olarak yonca ve % 4.5 *Honey locus* karışımı silajdan, diğeri *Lactobacillus crispatus* olarak sucuktan, bir diğeri ise *Lactobacillus rhamnosus* olarak ravandadan izolasyonları yapılmıştır.

4.1.1. Seyreltme Ekimleri

Seyreltme işlemi sonucunda mikroorganizma yoğunlukları göz önüne alınarak 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} seyreltmeleri GM 17 Agar ve MRS Agar' lı petrilere ekimleri yapılmıştır. GM 17 Agar için 30 °C ve MRS Agar için 37 °C' de (De Man ve ark., 1960), 24 saat inkübasyon ardından tek kolonilerin gelişimlerine ulaşılmıştır (Şekil 4.1.).

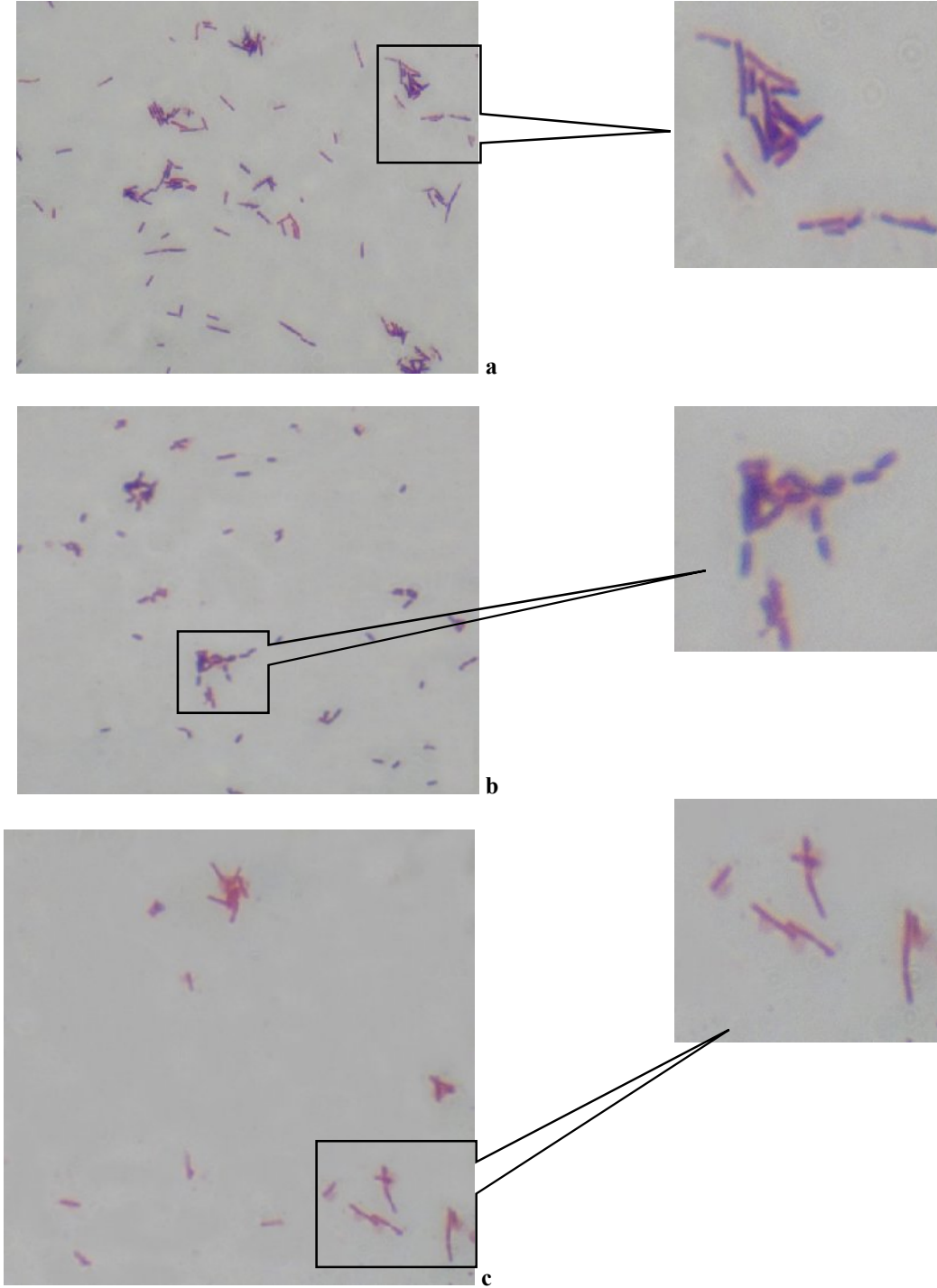


Şekil 4.1. a. Saf yonca silajı kaynağından 10^{-4} seyretme konsantrasyonundan MRS Agar'lı besi yerine ekim sonucunda oluşan tek kolonilerin gelişim gösterdiği petri. **b.** Kontaminasyon sonucu anormal koloni morfoloji oluşumu gözlenen petri.

Seyretmeler, tek koloni izole etmek için besi yerindeki koloni yoğunluğunu kontrol etmek amacıyla yapılmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990). Ekimler sonucu oluşan kolonilerin olası kontaminasyon durumunda koloni morfolojilerinde gözlemlenen anormallik izolasyon aşamasında seçim için bir kriter oluşturmuştur (Şekil 4.1.b.). Saf yonca silaj kaynağından 10^{-4} seyretme konsantrasyonundan seçilerek MRS Agar'lı besi yerlerine ekimi yapılan ve tek koloni gelişimleri gözlenen, Şekil 4.1.a.'daki petri fotoğrafında da görüldüğü gibi kimyasal ve moleküler çalışmaları yapmak için kolonileri gözlemek, seçmek kolay olmuştur.

4.2. Gram Boyama ile LAB' nin Kimyasal Tanımlanması

İzole edilen LAB' nin morfolojik ve biyokimyasal olarak da belirlenmesi amacı ile Gram boyama yapılmıştır (Harrigan ve McCance, 1976). Gram boyama ile hücre duvarı ve morfolojik yapıları mikroskop altında (100X) açığa çıkarılan *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* suşları Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. İzole edilen *Lactobacillus* suşlarının Gram boyama ile mikroskop altında morfolojik görüntüleri (100X) ve görüntülerden kesit alınarak büyültmeler, **a;** *Lactobacillus acidophilus*, **b;** *Lactobacillus crispatus*, **c;** *Lactobacillus rhamnosus*.

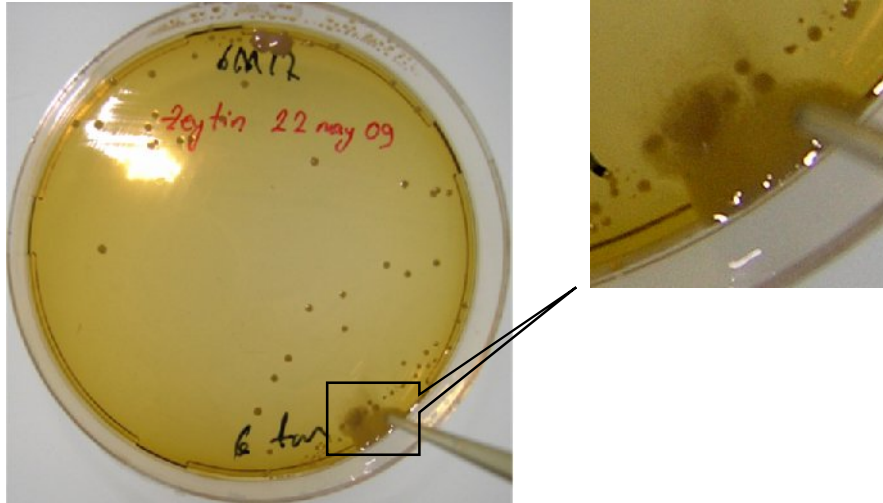
Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus crispatus* ve *Lactobacillus rhamnosus* Gram boyama sonrası mikroskop altında (100X) mor renkli boyandıkları ve şekillerinin çubuk şeklinde oldukları gözlemlendi. Sıralı ve birleşik koloni oluşturmalarının yanı sıra tek oldukları da gözlenmektedir. LAB, Gram (+) özelliktedirler (Line ve ark.,2007). Şekil 4.2.'

deki mikroskop görüntüsündeki kolonilerin mor renkli olmaları çalışacağımız suşların Gram (+) olduklarını belirtir. Böylelikle kimyasal bir tanımlama çalışmasıyla morfolojik ve biyokimyasal olarak da LAB' ne ait olabilecekleri ortaya konulmaktadır.

4.2.1.2. Katalaz Testi

MRS Agar ve MG17 Agar besi yerlerinde çoğaltılan mikroorganizma kolonilerinin kimyasal olarak tanımlanmak için katalaz testi yapılmıştır (Harrigan ve McCance,1976). Seçilen kolonilerin üzerlerine % 30 luk H₂O₂ (hidrojen peroksit)' ten bir damla damlatılmıştır. Kabarcıklar oluşturması gözlenen koloniler pozitif reaksiyon verdikleri için çalışmadan çıkarılmıştır. Pozitif reaksiyon vermeyen koloniler ise tanımlama için seçilerek sonraki çalışma aşamalarına devam edilmiştir (Schillinger ve Lücke,1987; Hammes ve Vogel, 1995; Teuber,1995). LAB sitokromdan yoksun oldukları için katalaz testine negatif reaksiyon verirler (Hofvendahl ve Hahn-Hägerdal, 2000). Diğer bir neden de LAB, katalaz enzimleri olmaksızın aerob koşullarda gelişebilen nadir bakterilerdendir (Halkman, 1991). Bu çalışmada olduğu gibi Oliveria ve ark. (2008)'nin yaptıkları çalışmada da LAB'nin katalaz testine negatif reaksiyon verdiği doğrulanmıştır. Araştırmacılar LAB'nin vakumlanmış etteki antimikrobiyal etkisini görmek amacıyla beş farklı *Lactobacillus* suşunu sığır etinden izole etmişler ve tüm suşların katalaz testine negatif reaksiyon verdikleri bildirmişlerdir. Ayrıca Özdemir ve Sırıkent (1996)'da pastırmalardan izole ettikleri 94 adet *Lactobacillus* suşlarının tümünün biyokimyasal olarak katalaz (-) olduklarını göstermişlerdir.

Katalaz enzimini saptamak amacıyla H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile muamelede pozitif reaksiyon vermiş olan koloninin petri fotoğrafı Şekil 4.3.' de gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Katalaz testi pozitif reaksiyon vermiş olan koloni.

Kimyasal tanımlamalar moleküler tanımlama işlemlerine hazırlık aşamasındaki önemli çalışmalardır. Kabarcık gözlenmeyen, negatif reaksiyon veren kolonilerin moleküler uygulamalarla tanımlamalarına aşamasına geçilmiştir.

4.2.2. Moleküler Tanımlama

4.2.2.1. Gen Çalışması ve Primer Bilgisi

Primer tasarlanması, 16S rRNA gen dizisi tamamlanan suşların GenBank'taki dizi bilgilerinden yararlanılarak yapılmıştır. 16S rRNA gen dizisi ribozomun alt ünitelerinde birini sentezlemektedir. 16S rRNA gen dizisi dışında bakterilerde diğer ribozom alt üniteleri 5S rRNA ve 23S rRNA gen dizileridir. Bu dizilerdeki mutasyon türleri arasındaki evrimsel bağları göstermektedir (Collins ve ark., 1991). LAB sınıflandırılmasında kullanılan kesin metodlar 16S rRNA geni dizi analizine dayanmaktadır (Woese, 1987). Genel olarak bütün ribozomlardaki işlev aynıdır ve bu kritik rolleri nedeniyle evrimsel olarak zaman içinde çok az değişiklik oluşmuştur. 16S rRNA geni farklı taksonomik gruplarda farklı değişim geçirmiş olabileceği gibi gen boyunca dejenere olan kısımlarında ayırt edilebilmesi mümkün olmuştur (Olsen ve ark., 1992).

16S rRNA gen bölgesi içinde primerin tasarlandığı bölgeler Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Tasarlanan primerlerin nükleotid dizileri materyal metot (3.2.5.2.1.) kısmında Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

```

1  AGCGAGCTGA ACCAACAGAT TCAC TTCGGT GATGACGTTG GGAACGCGAG CGGCGGA---
721 ---AAAGCAT GGGTAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCATGCCG TAAACGATGA

```

Lactobacillus acidophilus NC_006814

```

61  GAGCGGAACT AACAGATTTA CTTCGGTAAT GACGTTAGGA AAGCGAGCGG CGGATGG---
781 ---GCATGGG TAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CATGCCGTAA ACGATGAGTG

```

Lactobacillus crispatus NZ_ACKR01000046

```

181 TAGGAGAACC TGCGGCTGGA TCACCTCCTT TCTAAGGAAA CAGACTGAAA GTCTGACGG-
361 --ACAGCGTA TTTGCATGAG TTTCTAATAA TAGAAATTCG CATCGCATAA CCGCTGACGC

```

Lactobacillus rhamnosus FJ899640

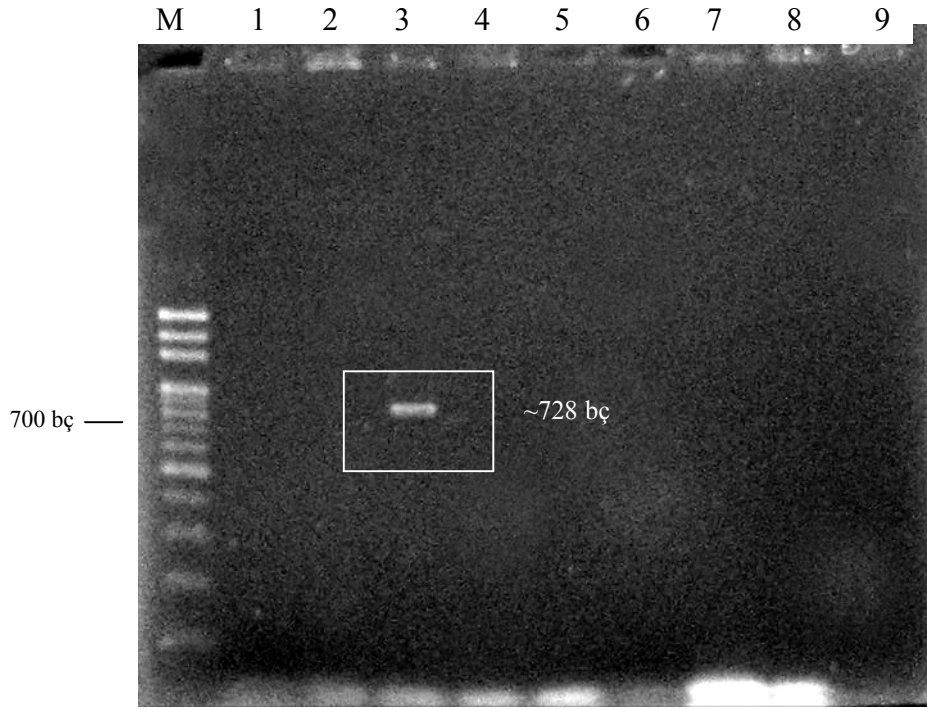
Şekil 4.4. Primer tasarlanan dizi bölgelerinin şematik gösterimi.

Tasarlanan primerlerin 16S rRNA gen bölgesi içinde koloni PZR sonucu çoğaltacağı bölgelerin uzunlukları; *Lactobacillus crispatus* suşu için 728 bç., *Lactobacillus acidophilus* suşu için 759 bç. ve *Lactobacillus rhamnosus* suşu için 186 bç. olarak hesaplanmıştır. Yapılacak koloni PZR sonuçları ile primerlerin vereceği PZR ürünlerinin baz boyları muhtemelen bu uzunluklarda olması beklenmektedir.

4.2.2.2. Koloni PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyon)

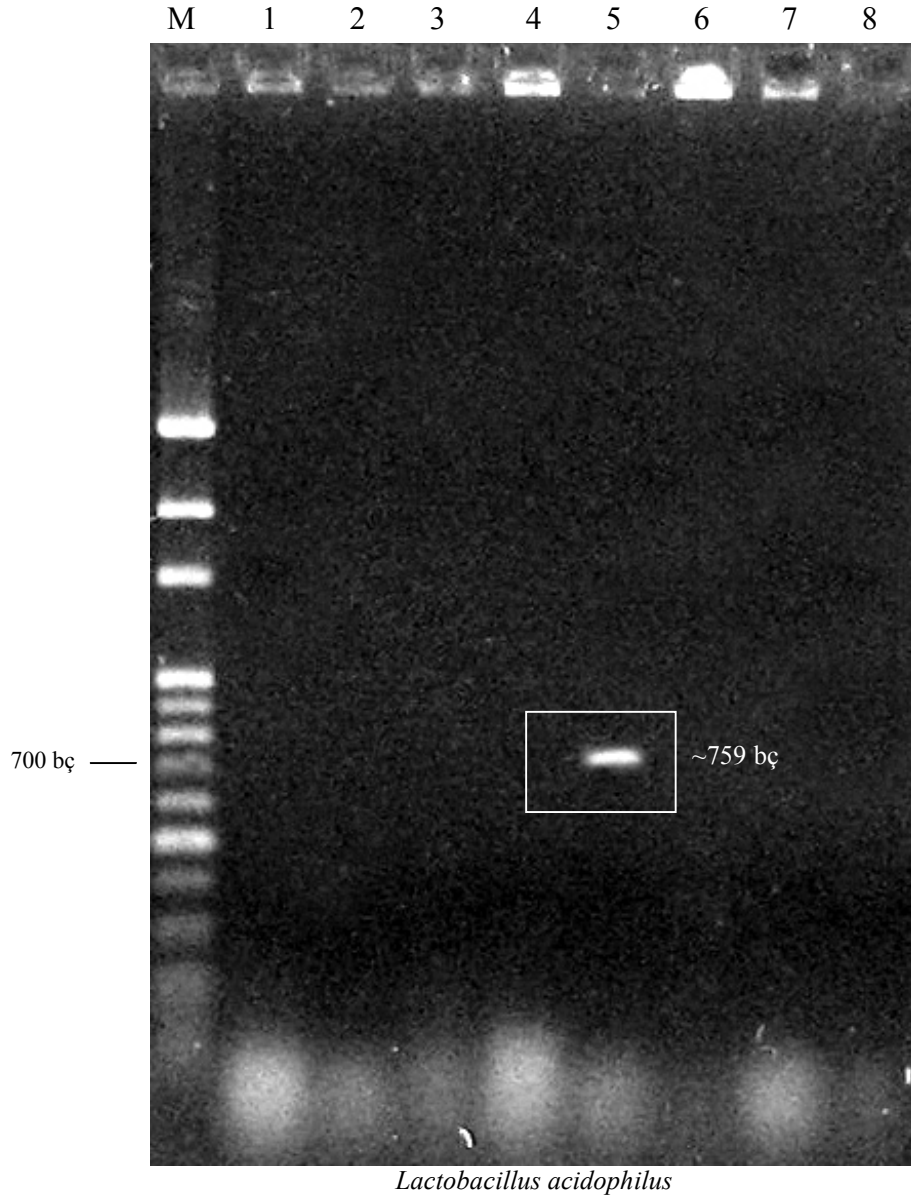
Koloni PZR işlemiyle 16S rRNA gen bölgesinden çoğaltılan hedef bölgeler *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* türlerine özgü tasarlanan primerler doğrultusunda yaklaşık uzunluklarda bulunmuşlardır. PZR

ampilifikasyonuna tabi tutulmuş olan bu bölgelere ait jellerin görüntüleri Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.' de verilmiştir.



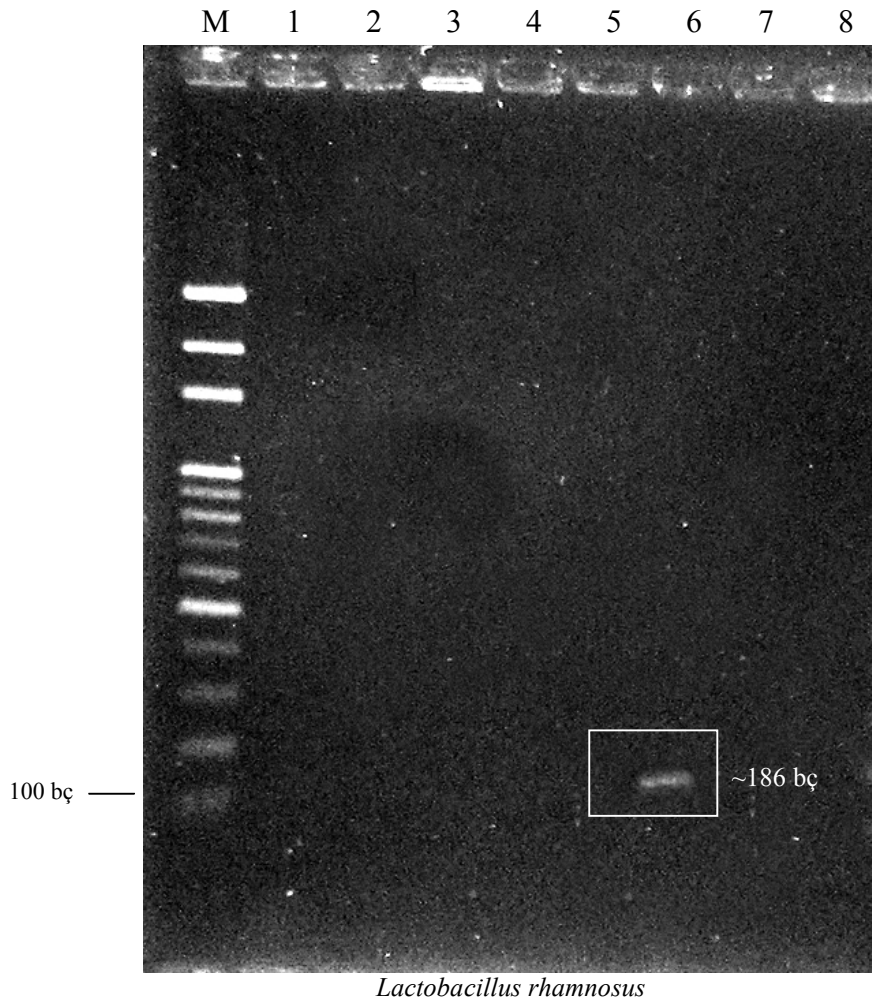
Şekil 4.5. Koloni PZR ile çoğaltılmış 9 adet potansiyel *Lactobacillus crispatus*' un %1'lik agaroz jel görüntüsü. M; 100 bç markör (DNA markör-Favorgen).

% 6' lık *Honey locus* ve saf yonca karışımı silaj' dan ekimler yapılarak elde edilen tek kolonilere, koloni PZR uygulanmıştır. Şekil 8.' deki koloni PZR jel görüntüsüne göre seçilen kolonilerden 3 numaralı koloni *Lactobacillus crispatus* suşu olarak belirlenmiş ve istenilen uzunlukta, yaklaşık olarak 728 bç.' de bant vermiştir. Ulaşılan bu koloni ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 3.2.9.' da anlatıldığı gibi -20°C'de stoğa alınmıştır.



Şekil 4.6. Koloni PZR ile çoğaltılmış 8 adet potansiyel *Lactobacillus acidophilus*' un %1' lik agaroz jel görüntüsü. M; 100 bç Markör (DNA markör-Favorgen).

Salamura zeytin' den ekimler yapılarak elde edilen tek kolonilere, koloni PZR uygulanmıştır. Şekil 9.' daki koloni PZR jel görüntüsüne göre seçilen kolonilerden 5 numaralı koloni *Lactobacillus acidophilus* suşu olarak belirlenmiş ve istenilen uzunlukta, yaklaşık olarak 759 bç,' de bant vermiş ve bu koloni ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 3.2.9.' da anlatıldığı gibi -20°C'de stoğa alınmıştır.

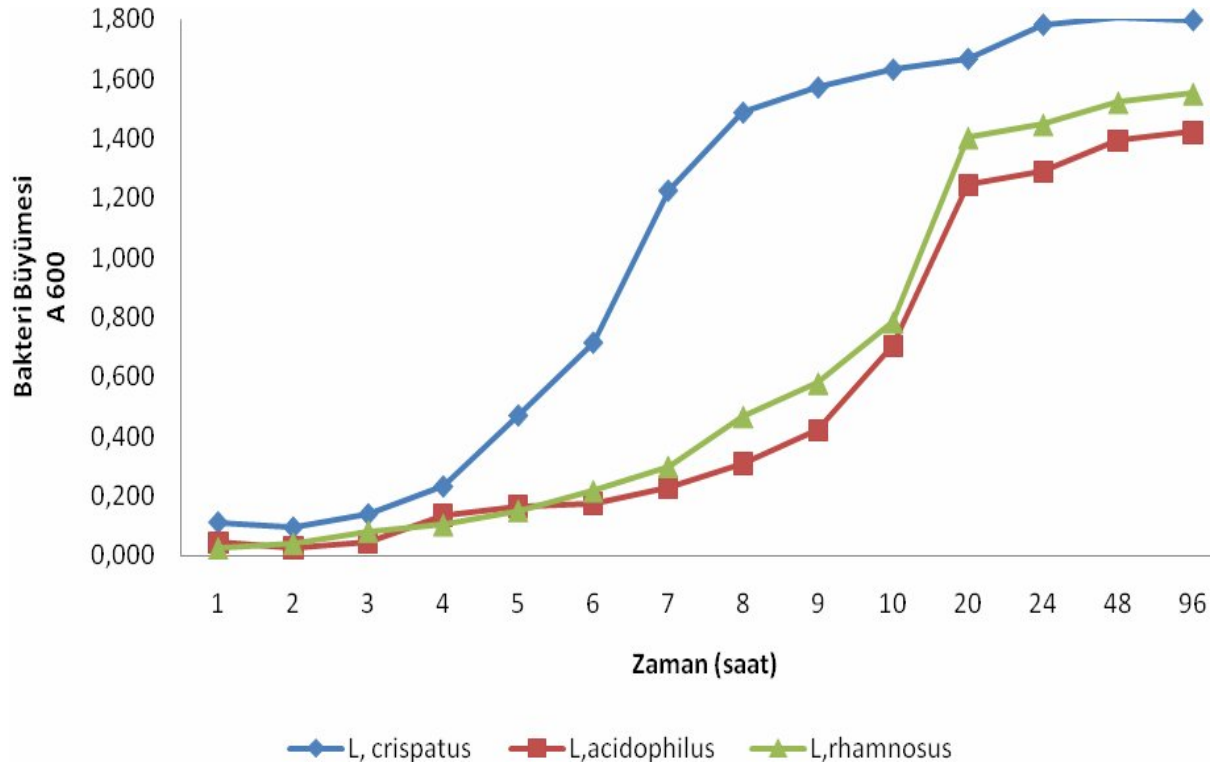


Şekil 4.7. Koloni PZR ile çoğaltılmış 8 adet potansiyel *Lactobacillus rhamnosus*' un %1'lik agaroz jel görüntüsü. M; 100 bç Markör (DNA markör-Favorgen).

Ravanda' dan ekimler yapılarak elde edilen tek kolonilere, koloni PZR uygulanmıştır. Şekil 10.'daki koloni PZR jel görüntüsüne göre seçilen kolonilerden 6 numaralı koloni *Lactobacillus rhamnosus* suşu olarak belirlenmiş ve istenilen uzunlukta, yaklaşık olarak 186 bç,' de bant vermiş ve bu koloni ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere 3.2.9.' da anlatıldığı gibi -20°C'de stoğa alınmıştır.

4.3. Bakteri Büyüme Eğrisi

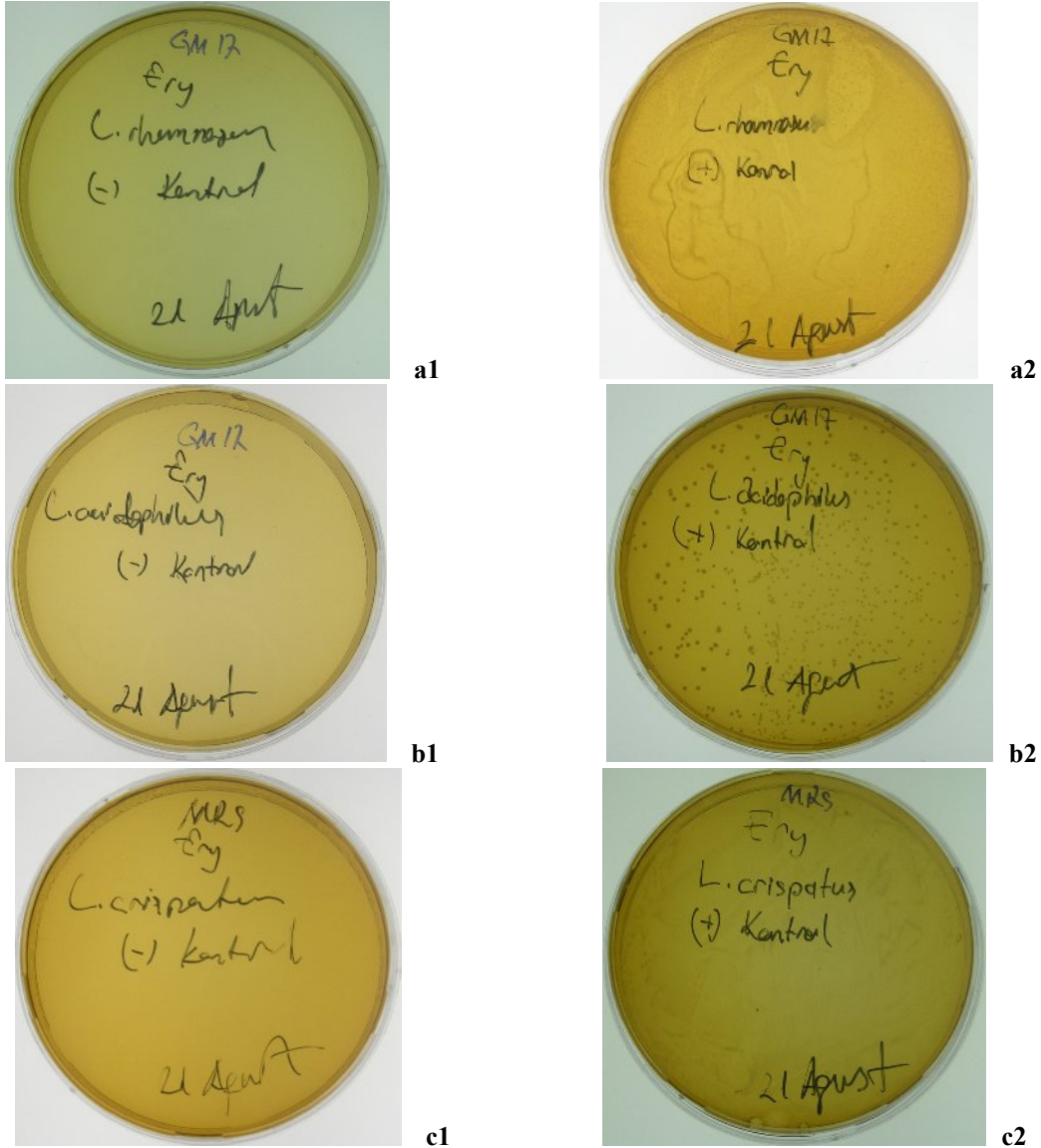
L. acidophilus, *L. crispatus* ve *L. rhamnosus* bakteri kültürleri %1 seyreltilerek 96 saatlik inkübasyon süresince büyüme grafiği için örnek alınarak spektrofotometrede ölçülmüştür (A_{600}). Farklı tür bakteriyel büyüme eğrileri Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *L. acidophilus*, *L. crispatus* ve *L. rhamnosus* suşlarının büyüme eğrileri.

4.4 Elektroporasyon ile *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*'a Plazmit Transferi

Lactococcus lactis kaynaklı pAK80 plazmiti, izole edilen *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus crispatus* bakterilerine elektroporasyon yöntemi ile aktarılması denenmiştir. Plazmit (pAK80) transferi yapılan suşların ve Plazmit transferi gerçekleştirilmeyen suşların eritromisin antibiyotikli petri görüntüleri Şekil 4.9.' de verilmektedir.



Şekil 4.9. Elektroporasyon sonrası pAK80 (-) ve pAK80(+) petrilere. **a1;** *Lactobacillus rhamnosus* pAK80 (-), **a2;** *Lactobacillus rhamnosus* pAK80(+), **b1;** *Lactobacillus acidophilus* pAK80 (-), **b2;** *Lactobacillus acidophilus* pAK80(+) **c1;** *Lactobacillus crispatus* pAK80 (-), **c2;** *Lactobacillus crispatus* pAK80(+) petri görüntüleri.

Elektroporasyonla pAK80 plazmit transferi denenmiş ve plazmitin eritromisin antibiyotiğine direnci göz önüne alınarak katı besi yerine eritromisin antibiyotiği ilave edilerek sonuçlara bakılmıştır. Elektroporasyona tabi tutulup pAK80 plazmiti transfer edilen bakterilerin ekimi yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda besi yerlerinde çok sayıda koloniler olduğu gözlenmiştir. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus crispatus* suşlarının eritromisin antibiyotiğine göstermiş oldukları direnç, pAK80 plazmitinin transferinin gerçekleştiğini ıspat etmektedir. Eritromisin ilave edilmiş besi yerine ise elektroporasyona tabii tutulmamış suşların ekimleri yapılmıştır. Eritromisinli petrilere de ise koloni oluşumu gözlenmemiştir. Böylelikle elektroporasyon yolu ile pAK80 plazmitinin *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus crispatus*

suşlarına transferinin ıspatı yapılan ekimle de gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar suşların gen transfer yeteneklerinin varlığının değerlendirilmesine projeksiyon sunmaktadır.

Bu gen transferi işleminde plazmit kullanılması da bir diğer önemli husustur. Plazmitler, önemli teknolojik özellikleri ve ekolojik avantajları belirleyen, kromozomdan bağımsız bölünebilme özelliği olan, 1-150 kb. uzunluğunda küçük dairesel DNA molekülüdür. Görece değişkenlik göstermelerine rağmen bir suşun plazmit profili, o suşun ayırımında önemli bir karakteristik özelliiktir (Davies ve Gasson, 1981). Plazmitler, bakteri hücresi yaşam döngüsü için gerekli bir genetik materyal olmamasına rağmen LAB söz konusu olduğunda, süt endüstrisinde önemli özelliklerde gen taşımaları dolayısıyla dikkate değerdir. Örneğin, Gasson ve Davies (1984), peynir yapımı sırasında sütün pıhtılaştırması için kullanılan buzağı, oğlak gibi süt emen yavruların şirdenlerinden elde ettikleri kimozen enziminin genini plazmite kodlayarak bakteri içine aktarılabilmiş ve bu yolla elde edilen kimozen enzimini peynir yapımında başarı ile kullanılabilmişlerdir.

Bu organellere, farklı şekerleri ve organik asitleri fermente etme yeteneği veya o ortamdaki proteinleri parçalama yeteneği ve kapasitesi gibi yararlı metabolik fonksiyonlar da kodlanabilir. Hatta ekzopolisakkarit üretimi, antibakteriyel maddelerin sentezi, faj enfeksiyonlarına, antibiyotiklere, bakteriosinlere ve ağır metal tuzlarına dayanıklılık gibi çevreye karşı koruma fonksiyonlarından da kodlamalar yapılarak transferleri gerçekleştirilebilir.

pAK80 plazmiti *Lactococcus* cinsinde yer alan *Lactococcus lactis* suşu kaynaklı olmasına rağmen çalışmada izolasyon ve tanımlaması yapılan bakteriler *Lactobacillus* cinsinin üyeleri olup transferi gerçekleştirmiş ve aktivite göstermişlerdir. İzolatlarımızın farklı kökenli plazmitleri kabul ettiklerini de değerlendirmekteyiz. Dolayısıyla bu çalışmada izole edilen bakterilere başka LAB plazmitleri aktarılabilmekte, endüstriyel ve bilimsel amaçlı moleküler genetik çalışmalarda kullanılabileceklerini düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvan beslenmesinde, yemden yararlanma verimini artırmak için sindirim sisteminin düzenlenmesi öncelikli konulardan biridir. Bu hususta atılan ilk adımlar antibiyotik kullanımlarıyla başlamıştır. Fakat bu uygulamalar, sindirim sistemindeki patojen bakterilerle birlikte yararlı bakterilerin de üremesini ve sindirim kanallarına tutunmalarını engellemektedir. Böylelikle sindirim sisteminde yemden istenilen ölçüde yararlanılamamaktadır. Alternatif arayışlar enzimlere ve katkı maddelerine yönelmeye başlamıştır. Enzimlerin sindirim kanallarında ki farklı asititeye ve metabolik reaksiyonlara karşı dirençlerinin az olmasından dolayı zaafı vardı. Genel olarak probiyotik mikroorganizmaların, diğer katkı maddelerindeki metabolik zaafı bulunmadığından dolayı, özellikle hayvan beslenmesinde yemden yararlanma konularındaki araştırma ve tartışmaların ilgisini üzerine toplamıştır. Besin ve suya katılarak hayvanlara verilen probiyotik mikroorganizmalar sindirim sistemindeki asititeye gösterdikleri tolerans ve sindirim kanallarına tutunma mekanizmalarının varlığından dolayı tercih edilmeye başlanmıştır.

Doğal olarak omurgalıların sindirim sisteminde de yayılış gösteren bakterilerden olan laktik asit bakterileri (LAB), endüstriyel açıdan önemi sıklıkla vurgu yapılan bir konudur. LAB' nin yaygın ve güvenilir bir grup olması kullanımını destekleyen önemli bir husustur. Çeşitli kaynaklardan izolasyonu ve tanımlaması yapılan bu grubun; hangi in vivo ve in vitro şartlarda yaşadıklarını ve hangi metabolik yollarla etki ettiklerini bilmek onları daha doğru kullanmakta projeksiyon olacağını düşünerek çalışmamıza konu ettiğimiz alan; probiyotik olarak kullanılacak LAB' nin moleküler olarak tanımlanmaları ve izolasyonlarıdır. Üzerinde çalışmayı hedeflediğimiz *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* suşlarını, bir çok biyokimyasal uygulamalar ve 16S rRNA gen bölgelerinden gen çalışmaları yaparak tasarlanan özgün primerler kullanarak moleküler çalışmalarla izole ettik.

Sindirim kanallarına tutunma ve uzun süreli orada kalma özelliklerini araştırmak için çalışmada ona yer verdik. Üç tekrarlı, 96 saatlik, OD₆₀₀' de yaptığımız büyüme ölçümlerinde, büyümelerini ve canlılıklarını koruduklarını gözlemledik. Özellikle ince bağırsağa tutunarak uzun süreli orada kalabileceklerini ve böylelikle sindirim kanalını düzene sokmadaki aktivitelerinin daha etkili olacağını tahmin etmekteyiz.

İzole ettiğimiz suşlara, plazmit transferi yaparak, gen transferi kapasitelerine de bakmış bulunmaktayız. Ulaştığımız sonuçlara göre, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* pAC 80 plazmiti transferi gerçekleşmiştir. Bu suşların gen transferi yetenekleri biyomühendislik ve biyoteknolojik çalışmalar için dikkate alınacak bir özellik olacağını vurgulamak isteriz.

Tüm bunlar sonucunda, izolasyon ve tanımlanması yapılan bakterilerin moleküler genetik alanında kullanımlarında önemli bir referans olacağı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

- ALTERMANN, E., RUSSELL, W. M., AZCARATE-PERIL, M. A., BARRANGOU, R., BUCK, B., McAULIFFE, O., SOUTHER, N., DOBSON, A., DUONG, T., CALLANAN, M. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102:3906–3912.
- AMBROSINI, V. M., GONZALES, S. HOLGADO, A.P.R. VE OLIVER, G. 1998. Study of the morphology of the cell walls of some strain of lactic acid bacteria and related species. J Food Prot. 61(5): 557-562
- ARICI, M. 2005. The effect of patulin on growth of some lactic acid bacteria. Journal of Tekirdag Agricultural Faculty. 2:1
- AYTUĞ, C.N. 1989. Probiyotikler ve Yoğurt. Animalia, 22: 13-15.
- AXELSSON, L. T. 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., and Ouwehand A. (Eds.), Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York. 1-72
- AXELSSON, L.T. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S. von Wright, A. and Ouwehand A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- BEASLEY, J. 2004. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota. Doktora tezi, Helsinki Üni., Finlandiya.
- BAELE M., VANEECHOUTTE M., VERHELST R., VANCANNEYT M., DEVRIESE LUC A., HAESBROUCK F. 2002. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. J Microbiol Methods 50:263-271
- BRANDT, K., T. ALATOSSAVA. 2002. Specific identification of certain probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains with PCR primers based on phage related sequences. Int. J. Food Microbiol. 84:189–196.
- BUSH U., NITSCHKO H. 1999. Methods for the differentiation of microorganisms. J Chromatogr B. Biomed Sci. Appl.; 722: 263-78.
- CURRY, B., CROW, V. 2003. *Lactobacillus* spp. Encyclopedia of Dairy Sciences (Eds: H. ROGINSKI, J.W. FUQUAY, P.F. FOX) Volume 3, Academic Press, 2095p.
- COLLINS, M. D., RODRIGUES, U. M., AGUIRRE, M., FARROW, J. A. E., MARTINEZ-MURCIA, A., PHILIPS, B. A., WILLIAMS, A. M., WALLBANKS, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol Lett 77,5±12.
- COPELAND A., LUCAS S., LAPIDUS A., BARRY K., DETTER J.C., GLAVINA DEL RIO T., HAMMON N., ISRANI S., DALIN E., TICE H., PITLUCK S., GOLTSMAN E., SCHMUTZ J., LARIMER F., LAND M., HAUSER L., KYRPIDES N., KIM E., WALTER J., HENG N.C.K., TANNOCK G.W., RICHARDSON P. 2007. Complete sequence of chromosome of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- ÇAKIR, İ. 2003. Laktobasillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. Türkiye
- ÇON, A. H., GÖKALP, H. Y. 2000. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 30: 180-190. Türkiye
- DAWSON, K.A., NEWMAN, K.E., BOILING, J.A. 1990. Effects of Microbial Supplement Containing Yeast and Lactobacilli on Rough-fed Microbial Activities. J. Anim. Sci., 68: 3392.

- DE MAN, J.D., ROGOSA, M., A. SHARPE, M.E. 1960. A Medium For The Cultivation Of Lactobacilli. – J. Appl. Bact., 23; 130-135.
- DAVIES, F. L., M. J. GASSON. 1981. Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. J. Dairy Res.48:363-376.
- DUNNE, C., MURPHY, L., FLYNN, S., O'MAHONY, L., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., MORRISSEY, D., THORNTON, G., FITZGERALD, G., DALY, C., KIELY, B., QUIGLEY, E. M. M., O'SULLIVAN, G. C., SHANAHAN, F., COLLINS, J. K. 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie van Leeuwenhoek, 76; 279-292.
- ERKMEN, O. 2000. Probiyotik Bakterilerin Önemi, Gıda Bilimi ve Tek., 5(1), 26-32.
- FINEGOLD, S.M., ATTEBERY, H.R.; SUTTER, V.L. 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. Am. J. Clin. Nutr. 27, 1456–1469.
- FULLER, R. 1989. A review. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66, 365-378
- FULLER, R. 1990. Probiotics For Far Animals.Probiotics in The Nutrition of Animals. Probiotics in The Nutrition of Animals, 19-21 November 1990, Brno, s.17-25.
- FULLER, R. 1992. Probiotics The Scientific Basis. Published by Chapman&Hall 2-6 Boundary Row, London, UK. S. 29
- FULLER, R. 1999. Probiotics for farm animals. pp. 15-22. Probiotics A Critical Review. Editor G. W. Tannock, Horizon Scientific Press, 164 p., Wymondham, UK.
- FULLER, R., 2004. Reasons for the apparent variation in the probiotic response. Biologist 51(4): 232
- GASSON, M. J., DAVIES, F. L. 1984. The genetic of dairy lactic-acid bacteria. In: Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milks, Ed. F.L. Davies, B.A. Law, Elsevier Applied Science Publishers, London, 99-126
- GRILL, J.P., MANGINOT-DTIRR, C., SCHNEIDER, F., BALLONGUE, J. 1995. Bifidobacteria and Probiotic Effects: Action of Bifidobacterium Species On Conjugated Bile Salts. Current Microbiology Vol. 31, pp. 23-27
- GU,R. X., YANG, Z.Q., LI, Z.H., CHEN, S.L., LUO, Z.L. 2008. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. Anaerobe.14(6):313-7.
- GÜRGÜN, V., HALKMAN, K. 1990. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayını, Ankara, 146 s.
- GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. 1999. Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science & Technol. 10: 139-157.
- HALKMAN, K., 1991, Tarım Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1214, 82s., Ankara.
- HALKMAN A.K., AKÇELİK M. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, 1. baskı, Bařak Mtb.,Ankara
- HAMMES W.P., VOGEL R.F. 1995. The genus Lactobacillus. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), Chapman & Hall, London, pp 19 – 54
- HARRIGAN, W.F., McCANCE M.E., 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Pres, London, 425p.
- HOFVENDAHL, K. HAHN-HAGERDAL, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme Microbio. Technol..26:87-107
- HOLZER, M., E. MAYRHUBER, H. DANNERR, R. BRAUN. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. Trends Biotechnol. 21, 282-287.

- HOOPER, P. 1989. The Role of Probiotics (Intestinal Inoculants) in Production Animals. World Association of Veterinary Food Hygienists Xth (Jubilee) International Symposium in Stockholm, 2-7 July, s.27-30.
- ISRAELSEN H., MADSEN S.M., VRANG A., HANSEN E.B., JOHANSEN E. 1995. Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector, pAK80 Applied and Environmental Microbiology 61 : 2540 - 2547.
- JONNISON, E. 1985. Lactobacilli as Probiotics to Pigs and Calves. A Microbiological Approach, Papport 148, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, s.1-65.
- KAO YT., LIU YS., SHYU YT. 2006. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. Food Res.; 40: 71–9.
- KIRAN, F. 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Plazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üni., Türkiye
- KIM, Y. H., HAN., K. S., OH, S., YOU, S., KIM, S. H. 2005. Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. J. Appl. Microbiol. 99:167–174.
- KLEEREBEZEM, M., BOEKHORST, J., VAN KRANENBURG, R., MOLENAAR, D. ve ark. 2003 Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 1990-1995.
- KUAR, I. P., CHOPRA, K., SAINI, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical application. Eur. J. Pharmaceutical Sci. 15: 1-9
- LEE, Y. K., SALMINEN, S. 1995. The coming of age of probiotics. Trends Food Sci. Technol., 6; 241-245.
- LEE, Y. K., SALMINEN, S. 2009. Handbook of Probiotics and Prebiotics, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- LILLEY, D.M., STILLWELL, R.H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147: 747-748.
- LIMSOWTIN, G.K.Y., BROOME, M.C., POWELL, I.B. 2003. Lactic Acid Bacteria, Taxonomy. Encyclopedia of Dairy Sciences (Eds: H. ROGINSKI, J.W. FUQUAY, P.F. FOX) Volume 3, Academic Press, 2095 s.
- LINE, J. E., E. A. SVETOCH, B. V. ERUSLANOV, V. V. PERELYGIN, E. V. MITSEVICH, I. P. MITSEVICH, V. P. LEVCHUK, O. E. SVETOCH, B. S. SEAL, G. R. SIRAGUSA, N. J. STERN. 2007. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 52:1094-1100
- MAKAROVA, K., SLESAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., MIRKIN, B., KOONIN, E., PAVLOV, A., PAVLOVA, N., KARAMYCHEV, V., POLOUCHINE, N., SHAKHOVA, V., GRIGORIEV, I., LOU, Y., ROHKSAR, D., LUCAS, S., HUANG, K., GOODSTEIN, D.M., HAWKINS, T., PLENGVIDHYA, V., WELKER, D., HUGHES, J., GOH, Y., BENSON, A., BALDWIN, K., LEE, J.H., DIAZ MUNIZ, I., DOSTI, B., SMEIANOV, V., WECHTER, W.P., BARABOTE, R., LORCA, G., ALTERMANN, E., BARRANGOU, R., GANESAN, B., XIE, Y., RAWSTHORNE, H., TAMIR, D., PARKER, C., BREIDT, F., BROADBENT, J., HUTKINS, R., O'SULLIVAN, D., STEELE, J., UNLU, G., SAIER, M., KLAENHAMMER, T., RICHARDSON, P., KOZYAVKIN, S., WEIMER, B., MILLS, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103:15611–15616.
- MAKAROVA, K. S. ve KOONIN, E. V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology. 189:1199–1208.

- McCORMICK, M.E. 1984. Probiotics in Ruminant Nutrition and Health. Proceedings 1984 Georgia Nutrition Conference For The Feed Industry, Atlanta, s.62-69.
- METCHNIKOFF, E. 1908. Prolongation of life: Optimistic studies. William Heinemann, London. p:161-183.
- MISHRA, C., LAMBERT, J. 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. Asia Pacific J. Clin. Nutr., 5; 20-24.
- NEMESKERY, T. 1983. Probiotics For Young Animals. Feed International, 2: 46-48.
- NOUSIAINEN, J., SETALA, J. 1993. Lactic Acid Bacteria As Animal Probiotics (S. SALMINEN and A. VON WRIGHT Eds.). Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, New York, US, s.315-356.
- OLIVERA, B. P., AFONSO, de L., GLORIA, M. A. 2008. Screening of lactic acid bacteria from packaged beef for antimicrobial activity.39:368-374.
- OLSEN, G. J., R. OVERBECK, N. LARSEN, T. L. MARSH, M. J. McCAUGHEY, M. A. MACIUKENAS, W. M. KUAN, T. J. MACKE, Y. XING, C. R. WOESE. 1992. The ribosomal database project. Nucleic Acids Res. 20(Suppl.):2199-2200.
- ORLA-JENSEN S. 1919. The lactic acid bacteria. Copenhagen: A.F. Host and Son. In S. Orla-Jensen (Ed.) 1-196
- ÖZÇELİK, S. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi, S.D.Ü. Ziraat Fak. 6, (Ders kitabı), Atabey-İSPARTA.
- ÖZDEMİR, H., SIRIKEN, B. 1996. Pastırmadan İzole Edilen Laktobasillerin Bazı Biyokimyasalve Fizyolojik Özellikleri. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 43 (3), 307-310.
- ÖZÜSAĞLAM, M. A. 2007. Yem Değerini Artırıcı Enzim Genlerinin Probiyotik Etkili Laktik Asit Bakterilerinde Klonlanarak Üretimi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi. Türkiye
- PARKER, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the story. Animal Nutrition and Health ;29:1250 4-8.
- PARVEZ, S., MALİK., K.A., AH KANG, S., KIM, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, J Appl Microbiol;100(6):1171-85.
- PRIDMORE, R.D., B. BERGER, F. DESIERE, D. VILANOVA, C.BARRETTO, A.-C. PITTET, M.-C. ZWAHLEN, M. ROUVET, E.ALTERMANN, R. BARRANGOU, B. MOLLET, A. MERCENIER, T.KLAENHAMMER, F. ARIGONI, M.A. SCHELL. 2004 The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 2512-2517.
- REID, G. 2000. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. Int. Dairy J., 10; 415-419.
- ROLFE, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J. Nutr.,(Supplement), 130; 396-402.
- SAXELIN, M., TYNKKYNNEN, S., MATTILA-SANDHOLM, T., VOS, W.M. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Current Opinion in Biotechnology; 16:204-211.
- SCHILLINGER, U.,LÜCKE, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and products. Food Microbiology, 4. 199 – 208.
- SENOK, A., C., ISMAEEL, A., Y., BOTTA, G., A. 2005, Probiotics: facts and myths, Clinical Microbiology and Infection, 11:958-966.
- SERVIN A., COCONNIER M. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best practice & Research Clinical Gastroenterology, 17(5); 741-754.
- SPERTI,G.S. 1971. Probiotics. West Point, Connecticut: Avi Publishing Col

- SISSIONS, J.W. 1989. Potential of Probiotic Organisms to Prevent Diarrhoea and Promote Digestion in Farm Animals-a Review. J. Sci. Food Agric., 49: 1.
- SILLANPÄÄ, J., 2001. Tissue – adherence in lactic acid bacteria identification and characterization of the collagen- binding S-layer protein of *Lactobacillus crispatus*. Academic Disseration in General Microbiology. 1-57.
- SÖNMEZ, N., ÇAKMAKÇI, M. L., KARAHAN, A., G.ÇAKIR, İ. 1999. Probiyotik kullanımı ve ülke şartlarında geliştirilmesi. SDÜ Basımevi, Isparta,134 s.
- STAVRIC, S. ve KORNEGAY, E.T. 1995. Microbial probiotics for pigs and poultry. Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding, s.205-231.
- TANNOCK, G. W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. Probiotics A Critical Review. Editor G. W. Tannock, Horizon Scientific Press, 164 p., Wymondham, UK.
- TERZAGHI, B. E. ve SANDINE, W. E. 1975. Improved medium for lactic, streptococci and their bacteriophages. Applied Microbiology. 29:807–813.
- TEUBER, M. 1995. The genus Lactococcus. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. Wood BJB and Holzapfel WH (Eds), pp 179 – 234, Chapman & Hall, London.
- TOKLU, G.Ş. 1999. Fermente süt ürünleri ve probiyotikler. Gıda Bilimi ve Tekn.,4.2. 4-6.
- TUNCER, İ. 2000. Kanatlı rasyonlarında Probiyotik Kullanımı. Çiftlik Dergisi, Mayıs, 2000, 195:39-42.
- TUOMOLA, E.M., OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S.J. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogensto human intestinal mucus, FEMS Immunology and Medical Microbiology. 26:137-142.
- TUOMOLA, M.E., SALMINEN, J. S., OUWEHAND, A.C. 1999. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mukus to investigate adhesion of probiotics . Letters in Applied Microbiology. 28:159-163
- TÜKSEKDAĞ, Z. N. 2005. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmid ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Gazi Üni., Türkiye
- VANBELLE, N., TELLER, E., FOCANT, M. 1990. Probiotics in Animal Nutrition:A review. Arch. Anim. Nutr., 40: 543-567.
- WALTER, J., TANNOCK, G.W., TILSALA-TIMISJARVI, A., RODTONG, S., LOACH, D.M., MUNRO, K., ve ALATOSSAVA, T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl. Environ. Microbiol. 66: 297-303.
- WEINBERG ZG, MUCK RE, WEIMER PJ, CHEN Y, GAMBURG M. 2003. Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. In: Mulchandani A, Pandey A, Larroche C, editors. Appl biochem biotechnol, vol. 118. Humana Press;. p. 1–11.
- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271
- WOESE, C. R., Olsen, G. J., Ibba, M. ve Soll, D. 2000. Comparisons of complete genome sequences allow the most objective and comprehensive descriptions possible of a lineage's evolution. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:202-236
- WU, J. F. 1987. The Microbiologist's Function In Developing Action-Specific Microorganisms (T.P. LYONS Ed.). Biotechnology In The Feed Industry, Alltech Technical Publication, Kentucky, s.181-197.
- YILSAY, T.Ö., KURDAL, E. 2000. Probiyotik Süt Ürünlerinin Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkisi, VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (ed.m. Demirci), Tekirdağ, 279-286.
- ZHU, W. M., LIU, M., WU, D. Q. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. jurn. Appl. Microbiol. 88: 887-886

7.ÖZGEÇMİŞ

1978 yılı Kahramanmaraş doğumlu Oğuz AĞYAR, ilk, orta ve lise eğitimini aynı şehirde gördü. Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2006 yılında mezun oldu. Bir süre Kahramanmaraş' ta özel bir eğitim kurumunda idari görev aldı. Lisansüstü eğitimi için çalıştığı kurumdan ayrıldı. Lisansüstü eğitimine 2007 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü' ne bağlı Zootekni Anabilim dalında Biyometri ve Genetik Bölümünde yüksek lisan programına kabul edilerek başladı.