ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE (LAB) AİT ÇEŞİTLİ SUŞLARIN RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İLE KARAKTERİZASYONU VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN İNCELENMESİ

Duygu AKKAYA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2009

Her Hakkı Saklıdır

Duygu AKKAYA tarafından hazırlanan **"Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait çeşitli suşların RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile karakterizasyonu ve genetik çeşitliliğin incelenmesi"** adlı tez çalışması 27/02/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD

Üye: Doç. Dr. Sertaç ÖNDE
ODTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Üye: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE (LAB) AİT ÇEŞİTLİ SUŞLARIN
RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İLE
KARAKTERİZASYONU VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN İNCELENMESİ

DUYGU AKKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Laktik asit bakterilerinin (LAB) gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaları, bakteriyosin üretim özelliklerinden dolayı gıdalarda raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu rolüne sahip olmaları, probiyotik ürünlerin içeriğinde bulunmaları ve bazı LAB'ların gıdalarda bozulmaya sebep olmaları bu bakteri grubunu hem endüstriyel açıdan hem de bilimsel arenada üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı oldukça önemli bir grup haline getirmiştir. LAB'ların endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, suş bazında güvenilir tiplendirme yöntemleri hem LAB starter kültürlerin performanslarının incelenmesinde hem de fonksiyonel gıda ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılacak olan kültürlerin incelenmesinde önem kazanmaktadır.

Laboratuvarımızdaki kültür koleksiyonunda mevcut bulunan Laktik Asit Bakterilerine ait 86 suşun tanımlanması daha önceki çalışmalarda fenotipik testlerin kullanımı ile yapılmıştır. Çalışmamızda LAB grubuna ait bu 86 adet suşun tür/tür içi ayrımında RAPD tekniğinin taksonomik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla mikroorganizmalardan genomik DNA izolasyonu için PROMEGA Wizard Genomic DNA izolasyon kiti kullanılmış ve elde edilen DNA çalışmanın daha sonraki aşamalarında kalıp DNA görevi görmüştür. RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) çalışmaları için genomik DNA üzerinde farklı bölgelere bağlanabilen 10 nükleotit uzunluğunda kısa oligonükleotit primerler kullanılmış ve neticede % 1.6' lık agaroz jel üzerinde farklı uzunluklara sahip PCR ürünlerinin oluşturduğu bant paternleri gözlemlenmiştir. Bu bant paternlerine ait görüntü daha ileriki analizlerde kullanılmak üzere GelCompar II, Version 4.1 (AppliedMath) bilgisayar yazılım programına aktarılmıştır. RAPD bantları arasındaki benzerlik *"Pearson product moment correlation coefficient"* değeri (*r*) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılmış ve neticede türler/suşlar arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiştir. Kümeleri birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı tarafımızdan % 66 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucu aynı tür/suşa ait ve birbirleri ile oldukça yakın ilişkide bulunan LAB suşlarının ayrımında RAPD tekniğinin ayrım ve kullanım gücünü vurgulamaktadır.

Şubat 2009, 125 sayfa

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterisi, RAPD, filogenetik ilişki

ABSTRACT

Master Thesis

CHARACTERIZATION OF SOME STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA BY RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) AND INVESTIGATION OF THEIR GENETIC DIVERSITY

Duygu AKKAYA

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Lactic acid bacteria are widely used as starter cultures in the food industry. Because of their bacteriocin production speciality, they make expire date of the food longer and thought to be potential biopreservativies. Besides, they are used in probiotic products and some of them causes food spoilage. All of these properties make this group of bacteria very important both industrially and scientificaly. As far as the industial applications of LAB are conserned, reliable strain typing methods will become increasingly important in the study of the performance of LAB starter cultures and cultures used as additives in functional food type products.

In our lab culture collection, we have 86 strains of LAB, the identification of which were previously carried out by phenotypic classification. It is the aim of this study to determine the taxonomic potential of RAPD in discrimination of 86 strains belonging to LAB at the species and the intra-species level. For this purpose, PROMEGA Wizard Genomic DNA isolation kit was used for isolation of genomic DNA which will be used as template in RAPD analysis. Short primers (about 10 bp) which anneal at different places on the genomic DNA were used and this generated PCR products of various lengths on % 1.6 agarose gel as band pattern. These band patterns were exported into the AppliedMath GelCompare II, Version 4.1 software for further analysis. Calculation of similarities in the profiles of bands was based on Pearson product-moment correlation coefficient (*r*). The UPGMA clustering algorithm was used to generate a dendogram. A coefficient of correlation of 66 % was selected to distinguish the clusters. The result of this study clearly demonstrated the discriminative power of RAPD towards the differentiation of highly related LAB strains that belong to the same species.

February 2009, 125 pages
Key words: Lactic acid bacteria, RAPD, phylogenetic relationship

TEŞEKKÜR

"Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait çeşitli suşların RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile karakterizasyonu ve genetik çeşitliliğin incelenmesi" konulu tez çalışmam TÜBİTAK-TBAG (Temel Bilimler Araştırma Grubu)'ın 108T280 nolu Hızlı Destek Projesi (HDP) tarafından desteklenmiştir. Tezimin başarılı bir şekilde sonuçlanabilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini hiç esirgemeyerek her aşamada yönlendiren; danışman konumunun yanı sıra bir arkadaş gibi her konuda sabırla ve ilgiyle yol gösteren, "hayatlarına dokunduğu insanlarda ne gibi mucizeler yarattığını" hiçbir zaman yeteri kadar anlatamayacağım, her zaman sevgi ve saygıyla hatırlayacağım çok değerli hocam Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU' na, öğrencileriyle kurduğu ailenin bir bireyi olma şansı verdiği için sonsuz teşekkür ederim.

Deney aşamasında tecrübeleriyle yanımda olan, yönlendiren, ilgisi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ali ERGÜL' e; tezimin savunmasında beni değerlendiren ve katkıda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK ve Doç. Dr. Sertaç ÖNDE' ye; kullanılan primerlerin temini için Doç. Dr. E. Erdoğan HAKKI' ya teşekkür ederim.

Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı'nda bulunduğum süre boyunca tezimin farklı aşamalarında bana destek olan, beraber çalışmaktan keyif aldığım ve hep gülümseyerek hatırlayacağım anılar bırakan arkadaşlarımdan tezimin yazım aşamasında ve sunumunda desteği için Fadime KIRAN, görüntüleme ve bilgisayar çalışmalarındaki desteği için Başak ORAL ve manevi desteği için Z. Betül ŞAHİN başta olmak üzere Burcu BİLER, Pelin DOĞAN, Elif YÜRÜMEZ ve Başar KARACA' ya tüm yardımları için teşekkür ederim.

Hayatımın en güzel zamanlarını beraber geçirdiğim, her koşulda yanımda oldukları için kendimi daima şanslı saydığım, bana her zaman mutluluk ve her konuda cesaret veren, Selen PEKER, Şafak CIVIL, Gül OLGUN, Vildan MUTLU başta olmak üzere, manevi desteklerinden güç bulduğum tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar her zaman aldığım kararların arkasında duran ve hangi konuda olursa olsun destekleyen, tüm sıkıntılarımda yanımda olacaklarını bilmenin güvenini her an hissettiren, yere daha bir emin basabilmemi sağlayan canım annem Pervin AKKAYA; yeryüzünde görüp görebileceğim tek melek sevgili babam Yusuf AKKAYA ve ailemizin en güzel rengi kardeşim Damla AKKAYA' ya; sevgilerini daima kalbimde hissettiğim, hayallerimi gerçeğe çevirmek ve mutlu edebilmek adına her türlü fedakarlığı yapabilecekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Duygu AKKAYA
Ankara, Şubat 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 3
2.1 Laktik Asit Bakterileri (LAB) 3
2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin sınıflandırılması 3
2.1.1.1 *Lactobacillus* 4
2.1.1.2 *Lactococcus* 5
2.1.1.3 *Leuconostoc* 6
2.1.1.4 *Enterococcus* 6
2.1.1.5 *Pediococcus* 6
2.1.1.6 Diğer Laktik Asit Bakterileri 7
2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi. 7
2.2.1 Starter kültür olarak kullanılmaları 8
2.2.2 Bakteriyosin üretimi 8
2.2.3 Probiyotik kültür olarak kullanılmaları 12
2.2.4 Ekzopolisakkarit üretimi 12
2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler 13
2.3.1 Fenotipik yöntemler 13
2.3.2 Genotipik yöntemler 16
2.3.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli olmayan yöntemler 18
2.3.2.1.1 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi) 18
2.3.2.1.2 Ribotiplendirme 20

2.3.2.1.3 Plazmit profil analizleri 21
2.3.2.1.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-
Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) 22
2.3.2.2 PCR temelli yöntemler 24
2.3.2.2.1 RFLP-PCR 24
2.3.2.2.2 AFLP-PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism-
Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi) 25
2.3.2.2.3 Rep-PCR (Repetetive Extragenic Palindrome PCR-
Tekrarlanan Palindromlara Dayalı PCR) 26
2.3.2.2.4 PCR Ribotiplendirme 28
2.3.2.2.4.1 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis-
Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi) 28
2.3.2.2.4.2 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer-İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge)/
ISR (Intergenic 16S-23S rRNA Spacer Region-Genler Arası 16S-23S rRNA Ayırıcı Bölge) PCR 29
2.3.2.2.5 RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR /
Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR) 30
2.3.2.3 DNA sekans analizi 39
2.4 LAB Taksonomisinde Polifazik Yaklaşımlar 40
2.5 Bilgisayar-Destekli Veri Analizleri 41
3. MATERYAL VE YÖNTEM 43
3.1 Materyal 43
3.1.1 Bakteri kültürleri 43
3.1.2 Besi ortamları 43
3.1.3 Tampon ve çözeltiler 43
3.1.4 DNA izolasyon kiti 43
3.1.5 Moleküler markörler 44
3.1.6 Kimyasallar 44
3.1.7 Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu 44
3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması 44

3.2 Yöntem 50
3.2.1 Laktik Asit Bakterilerinin aktifleştirilmesi 50
3.2.2 RAPD-PCR 50
3.2.2.1 Laktik Asit Bakterilerinden kromozomal (genomik) DNA izolasyonu 50
3.2.2.2 RAPD-PCR uygulamaları 52
3.2.2.3 Sonuçların değerlendirilmesi 55
4. BULGULAR 56
4.1 DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini 56
4.2 Kromozomal (Genomik) DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi 59
4.3 PCR Uygulamaları 65
4.4 Agaroz Jel Elektroforezi 65
4.5 Dendogram ve Benzerlik İndeksinin Oluşturulması 81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 94
KAYNAKLAR 98
EKLER 115
EK 1 Bakteri izolasyonunda ve gelişimlerinde kullanılan kültür ortamları 117
EK 2 Tampon ve çözeltiler 118
EK 3 Kromozomal (genomik) DNA izolasyonunda kullanılan Promega Wizard Genomic DNA Isolation Kit prospektüsü 120
EK 4 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler 122
EK 5 Kimyasallar 124
ÖZGEÇMİŞ 125

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
Ala	Alanin
API Kit	Analytical Profile Index Kit
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis (Çoğaltılmış rDNA geni Restriksiyon Analizi)
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz Çifti
°C	Santigrat Derece
C	Sitozin
CO_2	Karbondioksit
Dha	Dehidroalanin
Dhb	Dehidrobütirik
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
ERIC	Enterobacterial Repetetive Intergenic Consensus (Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus)
EtBr	Etidyum Bromit
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanin
gr	Gram
GRAS	Generally Regarded As Safe
HPLC	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi
ISR	Intergenic Spacer Region (Genler Arası Ayırıcı Bölge)

ITS	Internal Transcribed Spacer (İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge)
LAB	Laktik Asit Bakterileri
Mbp	Mega Base Pair (Mega baz çifti)
Mg	Magnezyum
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
MLST	Multiple Locus Sequence Typing (Çoklu Lokus Sekans Tiplendirmesi)
$MnSO_4$	Manganez Sülfat
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe Broth
MVSP	Multi Variate Statistical Package
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
NRLL	Regional Research Laboratory Collection
OH	Hidroksil
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Dalgalı Alan Jel Elektroforezi)
RAPD-PCR	Randomly Amlified Polymorphic DNA-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rDNA	Ribozomal RNA gen bölgesi
RE	Restriksiyon Enzimleri
Rep-PCR	Repetitive Extragenic Palindrome-PCR (Tekrarlanan Palindromlara Dayalı- PCR)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn	Saniye
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt
T_m	Melting Temperature
	(Erime Sıcaklığı)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
UV	Ultra Viyole
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µ	Mikro
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu 9
Şekil 2.2 Yürürlükteki genotipik ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik rezolüsyonu 16
Şekil 2.3 RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA- Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 33
Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan *Enterococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar 60
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan *Lactococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar 61
Şekil 4.3 Çalışmada kullanılan *Pediococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar 62
Şekil 4.4 Çalışmada kullanılan *Leuconostoc* suşlarına ait kromozomal DNA'lar 63
Şekil 4.5 Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar 64
Şekil 4.6 NAPS 5 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 66
Şekil 4.7 NAPS 6 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 67
Şekil 4.8 NAPS 23 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 68
Şekil 4.9 NAPS 34 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 69
Şekil 4.10 NAPS 38 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 70
Şekil 4.11 NAPS 432 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 71
Şekil 4.12 NAPS 499 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 72
Şekil 4.13 NAPS 564 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 73
Şekil 4.14 OPA 01 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 74

Şekil 4.15 OPA 07 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 75
Şekil 4.16 OPA 08 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 76
Şekil 4.17 OPA 12 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 77
Şekil 4.18 OPA 16 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 78
Şekil 4.19 OPY 10 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 79
Şekil 4.20 OPM 05 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü 80
Şekil 4.21 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 11 adet *Enterococcus* suşuna ait dendogram 82
Şekil 4.22 *Enterococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi 83
Şekil 4.23 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 10 adet *Lactococcus* suşuna ait dendogram 84
Şekil 4.24 *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi 85
Şekil 4.25 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendogram 86
Şekil 4.26 *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi 87
Şekil 4.27 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 8 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendogram 88
Şekil 4.28 *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi 89
Şekil 4.29 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 27 adet *Pediococcus* suşuna ait dendogram 90

Şekil 4.30 *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi 91
Şekil 4.31 15 farklı primerin kullanımı ile 86 adet LAB suşu için RAPD profillerinin UPGMA'sından oluşturulan dendogram 92
Şekil 4.32 Oluşturulan UPGMA dendogramlarından elde edilen benzerlik indeksi 93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Laktik Asit Bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri 10
Çizelge 2.2 İdeal bir tiplendirme düzeneğinde istenilen özellikler..... 15
Çizelge 2.3 Arbitrary primer parmakizi yöntemlerinde primer uzunluğu temel alınarak yapılan sınıflandırma..... 31
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri 45
Çizelge 3.2 RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, baz dizilişleri ve % G+C değerleri 53
Çizelge 3.3 PCR reaksiyon karışımları 54
Çizelge 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları 57

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB); Gram-pozitif, sporsuz, katalaz-negatif, fakültatif anaerob ve karbonhidratların fermentasyonu sonunda laktik asit üreten bakterilerdir (Axelsson 1998). Yüzlerce yıldır fermentasyon bozulabilir gıda ürünlerini korumak ve yeni besinlerin üretimi için kullanılmaktadır. Dünyada fermente besinlerin çeşitli tipleri tüketilmektedir. Fermente besinlerin ana tipleri laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu sonucu oluşturulmaktadır. Fermentasyon işleminden sonra karakteristik aroma ve tatlara sahip yeni besinler meydana gelir, ham materyallerin raf ömrü uzatılmış olur ve patojenik veya gıdalarda bozulmalara sebep olan organizmaların gelişmesi önlenir.

Laktik asit bakterileri çeşitli gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmakta ve probiyotik ürünlerin içeriğinde bulunmaktadırlar. Bununla beraber, üretmiş oldukları peptit yapısındaki "bakteriyosin" molekülü gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin gelişimini engellemekte ve böylece gıdanın raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu (biopreservative) görevi görmektedir. Bakteriyosin üretme özelliğinin genelde plazmit DNA tarafından kodlanan bir özellik olması ise üretimde bu özelliğin starter kültür olarak kullanılacak olan suşa aktarılmasına ve böylece daha kaliteli ürün eldesine olanak sağladığı için önemlidir. Bununla birlikte özellikle buzdolabı ısısında gelişebilen bazı laktik asit bakterileri de gıdalarda bozulmaya sebep olmaktadırlar. Tüm bu özellikler bu bakteri grubunu hem endüstriyel hem de bilimsel açıdan üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı oldukça önemli bir grup haline getirmiştir. LAB'ların endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir (Dics *et al*. 1990; Dykes *et al.* 1994).

LAB'ların tanımlanmasında kullanılan yöntemler fenotipik ve genotipik yöntemler olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir. Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen

ifadesinin ürününü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins-tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlayan geleneksel **fenotipik yöntemler** arasında; morfolojik, fizyolojik, metabolik/ biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücresel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, kuininler, poliaminler, hücre duvarı bileşikleri, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik tanısı (1D ya da 2D) yer almaktadır.

Günümüzde, LAB tanımlama/tiplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere doğru kaymıştır (Babalola 2003). Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan **genotipik yöntemler** DNA'yı yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon patternlerindeki polimorfizmini ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu içeren çalışmaların da dahil olduğu birçok yöntemi içermektedir.

Çalışmamızda, laktik asit bakterilerini temsilen 5 genusa (*Enterococcus, Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus,*) ait 86 suş arasındaki farklılıkların ortaya konulmasında, tür ve suş seviyesinde genetik farklılığın değerlendirilmesinde ve taksonomik tanımlanmalarında, rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerleri kullanarak ve genomdaki farklı bölgeleri çoğaltarak genetik polimorfizmi belirleyen bir PCR tekniği olan Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniğinin taksonomik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Orla-Jensen'a (1919) göre **"gerçek laktik asit bakterileri"** karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan, çubuk ya da kok şeklinde, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz negatif ve Gram-pozitif doğal bir gruptur. Birkaç ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsizdir. Laktik asit bakterilerine (LAB) ait en önemli gruplar *Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Weissella, Carnobacterium, Tetragenecoccus* ve *Bifidobacterium'*dur. Filogenetik olarak, Gram-pozitif bakteriler 2 temel başlık altında dallanma göstermektedir. *Bifidobacteria* grubu dışında, yukarıda bahsi geçen laktik asit bakterilerine ait tüm genuslar düşük G+C (guanin+sitozin) oranına sahip Gram-pozitif bakteri grubu içerisinde değerlendirilmekte (Ludwig *et al.* 1993) ve bu grup içerisinde yer alan bakterilerin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Davidson *et al.* 1996).

Bu organizmaların doğal ortamları; insanlar, hayvanlar ve bitkilerdir. Güvenli kullanımlarının uzun geçmişi (Holzapfel *et al.* 2001), GRAS (generally regarded as safe) olarak belirlenmiş olmaları ve ilginç metabolik karakteristikleri geniş alanda endüstriyel uygulamalara olanak tanımaktadır. Peynir, yoğurt, sosis, hamur mayası ve silaj gibi birçok fermente gıdanın tat, birleşim ve korunma kalitesine (Wood 1998) dair kullanımlarına göre uygun 7 LAB cinsi belirlenmiştir. Bu cinsler; *Lactobacillus* (süt, et, sebze, tahıl), *Lactococcus* (süt), *Leuconostoc* (süt, sebze), *Pediococcus* (sebze, et), *Oenococcus* (şarap), *Enterococcus* (süt), ve *Streptococcus*' tur (süt) (Klaenhammer *et al.* 2002).

2.1.1 Laktik Asit Bakterilerinin sınıflandırılması

Yeni cinslerin tanımlanması ve bilinen türlerin taksonomik düzeltmeleriyle birlikte LAB'lar; *Aerococcus, Alloicoccus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus,*

Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus ve Weissella cinsleri altında toplanmıştır (Axelsson 1998). Bununla beraber kullanışlı bir besin teknolojisi açısından bakıldığında başlıca LAB cinslerini; *Pediococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Carnobacterium, Streptococcus, Tetragenococcus, Bifidobacterium* ve *Weissella* olarak tanımlamak mümkündür (Stiles and Holzapfel 1997; Cogan 1996).

2.1.1.1 *Lactobacillus*

Mikroskop altında çubuk şeklinde gözlenirler. Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup % 5 CO_2'li ortamda gelişme gösterebilirler. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler (Hammes and Vogel 1995).

Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermentatif veya heterofermentatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit komposizyonunun % 33-55'ini G+C oluşturmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997).

Lactobacillus (*Lb*.) biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından çeşitlilik içeren üyelere sahip bir cinstir. Türlerine farklı ortamlarda sık sık rastlanmaktadır. Genellikle yoğun karbonhidrat bulunan ortamlarda yaşarlar. Karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan ürünler ortamın asiditesini artırır. Böylece bu tip ortamlarda gelişemeyen bakteriler için antimikrobiyal etki yaratır (Hammes and Vogel 1995). Bu bakterilerin birçok türü fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Stiles and Holzapfel 1997). *Lactobacillus* cinsi 3 gruba ayrılmıştır:

Thermobacterium: Homofermentatif *Lactobacillus* grubuna dahil olup; 15ºC' den düşük sıcaklıkta gelişim gösterememesine rağmen 45ºC' de gelişebilirler. Işık mikroskobu altında zincir şeklinde koklar olarak gözlenebilirler. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. helveticus, Lb. acidophilus* bu gruba dahil olup yüksek

sıcaklıkta peynir üretiminde starter olarak kullanılmaktadırlar. *Lb. acidophilus* probiyotik yoğurt ve diyet ürünlerin eldesinde kullanılmaktadır.

Streptobacterium: Homofermentatif grup olup 15ºC'den düşük sıcaklıkta gelişim gösterebilirler. Mandıra ürünlerinde bulunan *Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. buchneri* gibi türleri içerir. Bununla beraber sadece *Lb. casei* ve *Lb. plantarum* çeşitli peynir türlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılırlar.

Betabacterium**:** Heterofermentatif grup olup fermentasyon neticesinde laktik asit yanında asetat, etilalkol ve CO_2 üretirler. Süt ürünlerinde bulunan türler; *Lb.fermenti* ve *Lb. brevis* olup starter kültür olarak kullanılmamaktadırlar.

Bu sınıflandırma sistemi hem hücresel morfolojiler hem de gelişim sıcaklıkları dikkate alınarak yapılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar bu bakterileri fermentasyon özelliklerine göre zorunlu homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve zorunlu heterofermentatif olmak üzere 3 grup altında toplamıştır (Axelsson 1998; Hammes and Vogel 1995).

2.1.1.2 *Lactococcus*

Bu bakteriler kok şeklinde, küre ya da kısa zincir halinde bir arada bulunurlar. Zincir uzunluğu türlere göre değişir (Teuber 1995). Laktokoklar laktozu L(+) laktik aside dönüştürür. Gaz oluşumu gözlenmez. Optimum gelişme sıcaklıkları 30˚C'dir. Süt ve bitki örneklerinde bulunurlar.

Orla Jensen tarafından 1919 yılında yapılan sınıflandırmada *Streptococcus* cinsine dahil edilmişlerdir. Daha sonra serolojik N-antijen grubuna sahip olmalarıyla bu cinsten ayrılmış, Schleifer tarafından 1987'te yapılan taksonomik sınıflandırmada *Lactococcus* (*Lc.*) olarak isimlendirilmiş ve diğer gruplardan ayrılmışlardır (Schleifer 1987). *Lc. lactis* alttürleri özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli role sahiptir.

2.1.1.3 *Leuconostoc*

Heterofermentatif laktik asit bakterileri grubuna dahil edilmişlerdir. Fermentasyon sonucunda D-laktat ve etanol ile gaz oluşumu gözlenir. Süt, peynir ve et gibi fermente ürünlerin oluşumunda ve organoleptik adı verilen tat, koku gibi özelliklerin kalitesinin belirlenmesinde önemli role sahiptirler (Dellaglio *et al*. 1995). Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30˚C'dir (Holt *et al*. 1994). Starter kültür içeriğine dahil olup sitrattan diasetil oluşumuna neden olurlar. Bu da tat oluşumu için önemli bir kriterdir.

2.1.1.4 *Enterococcus*

Oksijen kullanımı bakımından fakültatif anaerob bakterilerdir. Farklı karbonhidratları metabolize ederek L (+) laktik aside çevirir, fakat gaz oluşturmazlar. Son pH aralıkları 4.2-4.6 arasındadır. Optimum gelişim sıcaklıkları 37ºC'dir. 10–45ºC sıcaklık aralığında, pH:9,6'da, % 6,5 NaCl'de ve % 40 tuzda gelişim gösterebilirler. Katalaz negatif özellik yansıtmalarına rağmen bazı türleri yalancı katalaz aktivitesi verebilir (Domig *et al.* 2003). Gıda endüstrisinde en az diğer türler kadar öneme sahiptir. Güney Avrupa'da bazı yöresel peynirlerde doğal florayı oluştururlar. Tuza olan toleransları, hızlı asit üretimleri, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmaları starter kültür olarak kullanımları için idealdir (Franz *et al.* 2003). *Enterococcus'*lar da *Lactococcus'*lar gibi *Streptococcus* grubu içinde sınıflandırılmışlardır. Daha sonra patojenik *Streptococci*'den serolojik D antijen grubuna sahip olmaları ile ayrılmışlardır (Holt *et al.* 1994).

2.1.1.5 *Pediococcus*

Laktik asit bakterileri arasında mikroskop altında tetrat morfoloji gösteren gruptur (Stiles and Holzapfel 1997). Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi tarafından 7 tür altında toplanmıştır. Bunlar; *Pediococcus damnosus, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus, Pediococcus halophilus, Pediococcus parvulus, Pediococcus cerecisiae* ve *Pediococcus dextrinicus'* tur (Raccach 1987). Optimum gelişme sıcaklıkları 35ºC'dir.

Pediococcus acidilactici gibi 50ºC'de gelişen türleri de bulunmaktadır. Homofermentatif gruba dahildirler. Katalaz negatiftirler. Pastörizasyon işlemi neticesinde varlıklarını sürdürebilirler. Alkolik içeceklerde bozulmalara sebep olurlar. Fermente gıdalar ve sebzelerde sıklıkla bulunurlar.

2.1.1.6 Diğer Laktik Asit Bakterileri

Streptoccoccus cinsine ait bakteriler homofermentatiftirler ve ışık mikroskobunda küre veya oval şekilde gözlenirler. Zincir veya çiftler halinde bulunurlar (Hardie and Whiley 1995). Optimum gelişme sıcaklıkları 37˚C'dir ve metabolik faaliyet sonucu gaz üretimi gözlenmez (Holt *et al.* 1994). Bilinen bazı türleri insan ve hayvanlarda parazit bazıları ise patojendir (Hardie and Whiley 1995; Stiles and Holzapfel 1997). *Tetragenococcus* cinsleri *Pediococcus* gibi tetrat morfolojidedir. *Oenococcus*; *Oenococcus oeni* isimli tek türe sahiptir ve genellikle şarapta bulunur. Şaraplarda malolaktik fermentasyonda önemlidir (Dellaglio *et al.* 1995). *Carnobacterium* et, kümes hayvanları ve balıklarla ilişkilidir (Klaenhammer 1993; Schillinger and Holzapfel 1995). Çubuk şekilli *Carnobacterium* heterofermentatiftir ve L(+) laktik asit üretirler. *Weissella* ise; bazı heterofermentatif *Lactobacillus* ve çeşitli *Leuconostoc* türlerini içeren yeni bir cinstir (Axelsson 1998).

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Laktik asit bakterileri gıda teknolojisi açısından büyük bir öneme sahiptir. Gıda endüstrisinde, laktik asit bakterilerinin gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler çeşitli fermente gıdaların tat, koku, tekstür özelliklerine etki etmektedir. Tüketiciler tarafından çok kullanılan fermente gıda maddelerinin doğal florasında baskın halde bulunmaları, ekzopolisakkarit üretmeleri, starter kültür olarak kullanılmaları, probiyotik ürünlere katılmaları, bazılarının bakteriyosin olarak adlandırılan özel bir protein üretmeleri ve böylece gıdalara raf ömürlerini uzatacak özellikler kazandırmaları, bununla beraber gıda endüstrisinde sağlamış oldukları bu faydalı özelliklere ek olarak, bazı LAB'ların gıdalarda bozulmalara sebep olması bu bakteri grubuna olan ilgiyi son yıllarda artırmış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar derinlik kazanmıştır (Rebecchi *et al*. 1998).

LAB'lar aynı zamanda sindirim enzimleri ve aşı antijenleri için oral araç olarak geliştirilmede güçlü adaylardır. LAB'ların doğal asit toleransı, gastrik yolda yaşayabilme kabiliyetleri ve insan tüketimi sırasındaki güvenilirlik kaydı, biyolojik moleküllerin hedef lokasyonlara ve dokulara etkili olarak ulaşmalarında kullanılan anahtar özellikleridir. Bu nedenlerden dolayı laktik asit bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker and de Bruijn 1997).

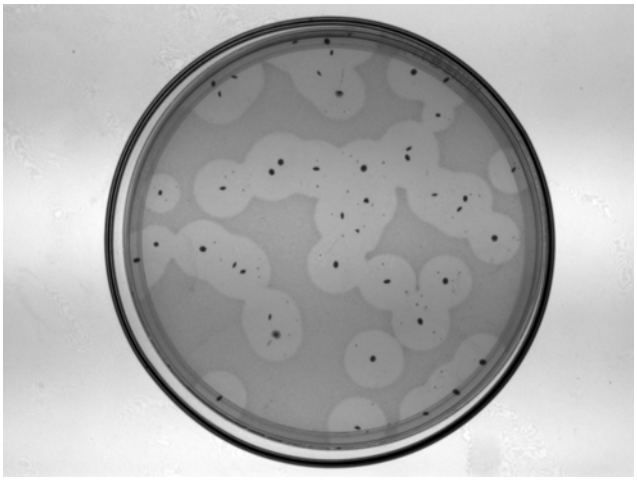
2.2.1 Starter kültür olarak kullanılmaları

Laktik asit bakterilerinin en önemli karakteristik özelliklerinden biri; süt şekeri olan laktozu kullanarak fermentasyon sonucunda laktik asit üretmeleridir. Bu reaksiyonu başlatan kültür ürüne öncelikli olarak verilir, buna da "starter kültür" denir. Fermentatif özellikleri ile laktik asit bakterileri pek çok fermente ürün eldesinde starter kültür olarak kullanılmakta ve gıda üretimi aşamalarında önemli bir görev üstlenmektedirler (Wouters *et al.* 2002). Peynir, krema, tereyağı, yoğurt gibi pek çok ürünün oluşumunda önemli görev üstlenirler ve fermentasyon sonucunda ürünlerin tat, koku ve yapısal özelliklerini oluştururlar. Süt ürünlerinde kullanılan starter kültürler mezofilik, termofilik ve artisanal olmak üzere 3 gruba ayrılır. Mezofilik starter kültürler 26˚C, termofilik kültürler ise 42˚C civarında gelişim gösterirler. Artisanal kültürler ise sütün inkübasyonuyla üretilirler.

2.2.2 Bakteriyosin üretimi

Gıda kaynaklı pek çok laktik asit bakterisi (*Enterococcus, Lactococccus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Streptococcus, Carnobacterium* ve *Propionibacterium*) gıda fermentasyonunda kullanılan antimikrobiyal özellikleri ile bilinmektedir. Bunlar, fermente gıdalarda güvenilirliği sağlayarak raf ömrünü uzatmaktadırlar. Bu bakterilere ait metabolitlerin binlerce yıldan beri farklı fermente gıdalarda sağlık için hiçbir tehlikesi olmadığı, LAB'a ait antimikrobiyal metabolitlerin düzenleyici ajanlar olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, fermente gıdaların ve bazı LAB'ların tüketici sağlığı açısından doğal, sağlıklı ve yararlı etkileri oldukları bilinmektedir. LAB'a ait bazı

metabolitler (laktik asit, diasetil, propiyonik asit ve asetik asit gibi) ve diğer bazı starter kültür bakterileri gıdalarda "gıda katkı maddesi" olarak kullanılmaktadırlar. Bununla beraber, gıda kökenli pek çok LAB gıda bozulmalarına ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan organizmalara karşı antibakteriyal etki gösteren ve "bakteriyosin" olarak isimlendirilen protein yapısında ekstraselüler bir madde sentezlemektedir (Klaenhammer 1988; de Vuyst and Vandamme 1994; Hoover and Steenson 1993) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu

Bakteriyosinler, üretici suşun bazı özel bağışıklık mekanizma(lar) ile ilişkili olarak hücre dışına salınan birincil veya gelişmiş bakteriyel ribozomal sentez ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bu bakteriyosinlerin çoğu küçük moleküler ağırlıklı proteinler olup bakterisidal etkilerini kendilerine yakın gruplara dahil bakteriler üzerinde göstermektedir. LAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinlere ait genel özellikler Çizelge 2.1' de yer almaktadır. LAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinler gıda bozulmalarına ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok gram pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte ve bu nedenle "biyokoruyucu-biopreservative" olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer 1988; Ray 1992).

Çizelge 2.1 Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri

- 34'den 57'ye kadar aminoasitten oluşan katyonik peptit içerirler.
- Gram pozitif bakterilere karşı duyarlı bakterisidal etki gösterirler.
- Membran fonksiyonları stabilizasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olurlar.
- Bakterisidal hareket genel olarak yüksek sıcaklık, geniş pH aralığına karşı dirençlidir.
- Bakterisidal hareket proteolitik enzimler tarafından kaybedilebilir.
- Bakterisidal spektrum azdan çoğa doğrudur.
- Bakteriyosine duyarlı gram pozitif bakteriler, kendi üretmiş olduğu bakteriyosine dirençlidir.
- Gram (+) suşa ait hücreler bir bakteriyosine duyarlı iken bir başkasına dirençli olabilirler.
- Üretici hücreler genetik olarak, kendi üretmiş oldukları bakteriyosinlere karşı bağışıklık kazanmıştır.
- Duyarlı bir suş bakteriyosin varlığında gelişirken geçici dirençlilik gösterebilir.
- Bakteriyosin molekülü, üretici hücreleri içeren gram pozitif bakterilerin hücre yüzeyinden absorbe edilmektedir.

Kaynak: Jack *et al* 1995

Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bazı gıda katkı maddeleri FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylı olmalarına rağmen yapılan son çalışmalarda tüketici sağlığında çeşitli problemlere neden oldukları belirlenmiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan koruyucular insanlarda astım, damar problemleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar WHO (World Health Organizastion) tarafından, katkı maddeleri sağlıklı olarak belirlenen gıdalara

yönelmişlerdir. Kimyasal gıda katkı maddelerine alternatif olarak bakteriyosinler gibi doğal koruyucular tercih edilmeye başlanmıştır. Bunların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır. Bunun nedeni ise; protein yapısında olan bu madde, sindirim sisteminde bulunan ve proteinleri hidrolize eden enzimler tarafından parçalanmaktadır. Dolayısı ile uygun olan bakteriyosin ya da bakteriyosin üreten LAB'ların gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. En iyi bilinen bakteriyosin *Lc. lactis* tarafından üretilen Nisin olup gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Pediocin de yine gıdalarda kullanılan biyolojik bir koruyucudur (Teuber 1995).

Gram-pozitif LAB'lar tarafından üretilen bakteriyosinler genelde sadece Gram-pozitif bakterileri inhibe ederler. Nisin ve pediocin AcH geniş inhibisyon aktivite spektrumuna sahip iken; sakacin ve leuconocin gibi diğerleri ise daha dar bir inhibisyon aktivite spekturumuna sahiplerdir. Gıdalarda bozulmaya ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan pek çok Gram-pozitif bakteriye karşı etki gösterirler (Ray 1992).

Farklı Gram-pozitif bakterilere ait bakterisidal proteinler, yapılarında mevcut olan modifiye aminoasitlere göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; doğada nadir bulunan aminoasitleri içeren "lantibiyotikler" ve lantibiyotik olmayanlardır. Lantibiotiklere örnek olarak nisin verilebilir. Yapısında, translasyon sonrasındaki modifikasyon ile meydana gelmiş olan lantiyonin (Ala- S-Ala), β-metillantionin (Abu-S-Ala) (sülfür grubu içeren aminoasit) ile dehidroalanin (Dha) ve dehidrobütirin (Dhb) gibi dehidre formdaki sıra dışı aminoasitler yer almaktadır. Lantiyonin içermeyen bakteriyosinler ise küçük, ısıya dayanıklı peptitler olup yapısında bu sıra dışı aminoasitleri bulundurmazlar. Bu gruba örnek olarak pediocin AcH/PA-1 lactococcin A, lactococcin B ve sakacin A verilebilir. Bununla beraber, molekülün yapısında lantiyoninlerin varlığı veya yokluğu ile bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrumları arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (Jack *et al.* 1995; Sahl *et al.* 1995).

2.2.3 Probiyotik kültür olarak kullanılmaları

Probiyotikler vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasında olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmışlardır (Kneifel *et al.* 1999). Probiyotiklerin besinsel kaynakları *Lactobacillus*, *Bifidobacteria, Streptococcus Enterococcus'*ların kullanıldığı fermente yoğurtlar, peynir, turşu, çiğ sucuk, ekmek, bira, şarap, kımız ve kefirdir.

Probiyotik kültürlerin önemli yararları arasında; patojen engelleme, çıkarma ve antagonizmi; bağışıklık uyarımı ve düzenleme; antikarsinojenik ve antimutajenik aktivite; laktoz duyarlılığının semptomlarını hafifletme; serum kolestrolünü azaltma; kan basıncını düşürme ve vajenitin önlenmesi yer almaktadır. Moleküler yöntemlerin gelişmesi probiyotik türlerin tanımlanması için yeni araçlar sağlamıştır. Koloni morfolojisi, fermentasyon modelleri, serotiplendirme ve bu yöntemlerin bazı kombinasyonları başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Durant *et al*. 1997).

2.2.4 Ekzopolisakkarit üretimi

Karbonhidrat metabolizması birçok bakteri türünde enerji ve biyokütle üretimine ilaveten ekzopolisakkarit üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır. Ekzopolisakkaritlerin; bakteriyi sıvı kaybına, makrofajlara, fagositoza, bakteriyofajlara, protozoa, antibiyotik ve toksik bileşiklere karşı koruduğu, ayrıca metal iyonlarının hücreye alınmasında görevli olduğu bilinmektedir. Ekzopolisakkaritlerin diğer önemli bir özelliği ise bakterinin yüzey tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması ve bulunduğu ortama tutunma ve biyofilm oluşturmada etkili olmasıdır. Bütün bu özellikler ekzopolisakkarit üreten bir bakteriye bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve baskın olarak büyüme özelliği kazandırmaktadır (Ding *et al.* 1995).

Faydalı biyoaktif özellikler içeren gıda içeriklerini bulmaya yönelik araştırmalar laktik asit bakterilerindeki ekzopolisakkaritlerin önemini desteklemektedir. Besinsel niteliklerinin

ötesinde sağlık ve duyusal yararlar sunan kullanışlı gıda ürünleri, gıda endüstrisinde gün geçtikçe daha önemli hale gelmektedir. Ekzopolisakkaritlerin duyusal yararları ispatlanmış ve laktik asit bakterilerindeki ekzopolisakkaritlere dayanan sağlık nitelikleri kanıtlanmıştır. Bununla beraber ekzopolisakkaritlerin moleküler yapıları ile gıdalardaki fiziksel değişimler ve biyoaktif reaksiyonları sağlayan mekanizmaların karmaşıklığında geniş bir varyasyon bulunmaktadır (Welman 2009).

2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Laktik asit bakterileri, çeşitli gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları, antimikrobiyal maddeleri üretmeleri ve probiyotik ürünlerin içeriklerinde yer almaları bakımından endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir. LAB'ların endüstriyel önemi ve uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların temel hareket noktası kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir.

LAB'ların tanımlanmasında kullanılan modern taksonomik yöntemler **fenotipik yöntemler** ve **genotipik yöntemler** olmak üzere 2 ana başlık altında toplanabilir. Fenotipik ya da genotipik olsun, tüm tiplendirme sistemleri yorum ve performans rahatlığı, ayrım gücü, üretilebilirlik ve tiplendirilebilirlik bakımından karakterize edilmektedir.

2.3.1 Fenotipik yöntemler

Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ifadesinin ürününü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins-tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlayan geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik/ biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücresel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, kuininler, poliaminler, hücre duvarı bileşikleri, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam

hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternleri (1D ya da 2D) yer almaktadır.

Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler **cins** tanımlamalarında kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermentasyonu gibi biyokimyasal testler fenotipik testler olarak kullanılmakta ve **tür** bazında ayırım sağlamaktadır. Kullanışlı olmasına rağmen türler arası varyasyonların belirlenmesinde ve tekrarlanabilirliğinde bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bununla birlikte; API-Kit sistemi gibi standardize edilmiş sonuçlardan oluşturulmuş veritabanlarından hazırlanmış ticari amaçlı sistemler yüksek sayıdaki suşların tanımlanmasında kullanılmakla beraber yeni özellik kazanmış türlerin veya alt türlerin tanımlanmasında bu veri tabanı yetersiz kalmaktadır.

Cins ve tür bazındaki tanımlama çalışmalarında kullanılan fermentasyon özellikleri ve API Kit prensibine dayalı biyokimyasal testlerin yanı sıra toplam hücre proteinlerinin (WCP-whole cell proteins) veya hücre duvarı proteinlerinin SDS-PAGE analizi neticesinde elde edilen protein bant profilleri mikrobiyal suşların tür seviyesinde ayrımında belirli başarı ölçütlerinde kullanılmaktadır (Vauterin *et al*. 1993). LAB lara ait suşların ayrımında ve genetik seviyede türler-suşlar arasında farklılıkların belirlenmesinde SDS-PAGE yöntemi sıklıkla kullanılmakla beraber bazı türler için protein profilinden elde edilen ayrım gücü limitlidir (Dicks and van Vuuren 1987; Pot *et al.* 1993; Dykes and von Holy 1994; Björkroth *et al*. 2002). Dolayısıyla, protein profiline dayalı tiplendirme tekniğinin yeterli olmadığı ve doğruluğunu kanıtlamak ve/veya desteklemek için DNA-temelli moleküler testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Temmerman *et al.* 2004).

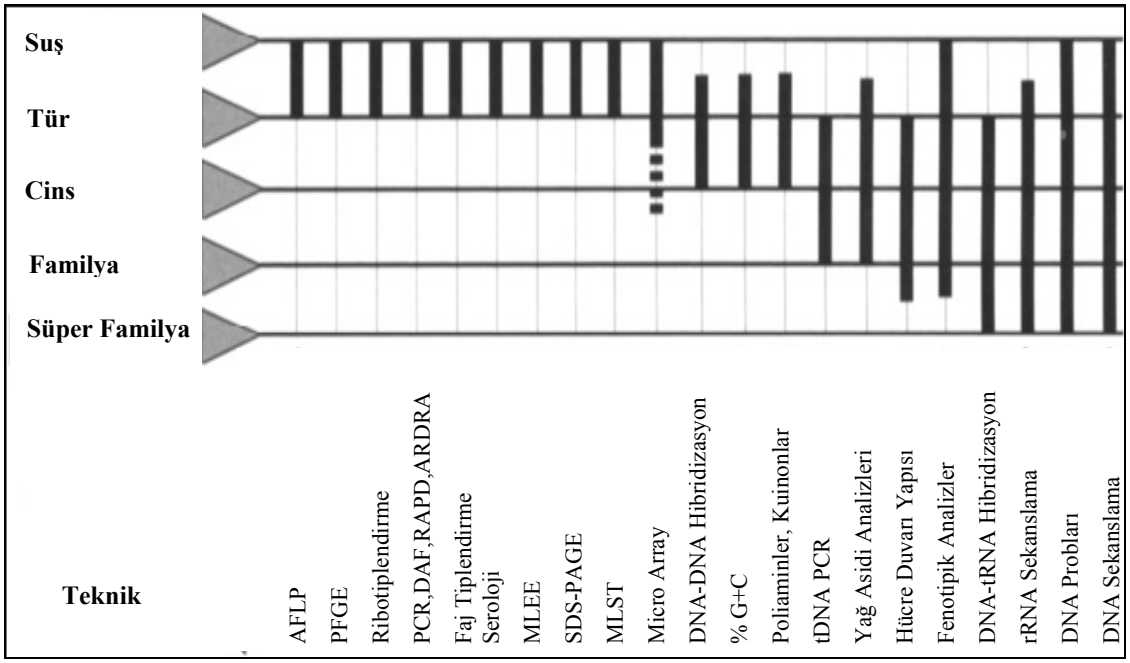
LAB tanımlanmasında kullanılan fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayrımı için hala önemli bir rol oynasa da laktik asit bakterilerinin çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı, cins ve tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayrım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe

uyandırıcıdır (Temmerman *et al.* 2004). Bununla beraber büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanımlama işlemlerinde zorluk yaratmaktadırlar. Bu kriterler kaba bir tanımlama amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir tanımlama amacına yönelik değillerdir. Bundan dolayıdır ki LAB'ların cins ve tür bazında tanımlanmalarında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı tanımlama sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış tanımlamalara sebep olabildiğinden mutlaka genotipik yöntemler ile desteklenmesi ve/veya tamamlanması gerekmektedir.

DNA temelli moleküler yöntemler filogenetik çalışmalarda mikroorganizmaların birbirleri ile bağlantısının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlardandır ve kullanılan yönteme bağlı olarak cins düzeyinden suş düzeyine kadar mikroorganizmaların farklı seviyelerde tanımlanmasında gelişmiş bir bakış açısı sunmaktadır. Bu tür stratejiler genelde genotipik özelliklere dayanmaktadır, ancak bazı belirli fenotipik özellikler de kullanılabilir. Bununla beraber, belirli bir stratejiyi kullanmadan önce ilişkili olmayan izolatları ayırmak için kullanılacak yöntemin farklı numunelerde aynı suşu tanımlayabilme yeteneğine sahip olması ve filogenetik olarak birbirine bağlı izolatlar arasında genetik ilişkiyi yansıtması oldukça önemlidir. Uygulamalı bakış açısından bakıldığında, ideal bir tiplendirme sistemi bir takım önemli özelliklere sahip olmalıdır (Çizelge 2.2) ve farklı yöntemler değişen seviyelerde ayrım gücüne sahiplerdir (Şekil 2.2).

Çizelge 2.2 İdeal bir tiplendirme düzeneğinde istenilen özellikler

- Geniş çeşitlilikteki izolatları tiplendirebilmeli
- Ayrım gücü yüksek olmalı
- Uzun zaman sonra ve farklı merkezlerde elde edilen sonuçlar 'tekrarlanabilirlik' bakımından güzel sonuç vermeli
- Laboratuar koleksiyonlarına ilaveten doğal izolatlara kolayca uygulanabilir olmalı
- Hızlı olmalı
- Bilgisayara bağlı analiz ve elektronik veri tabanı ile uyumlu olmalı
- Çok kompleks veya pahalı olmamalı



Şekil 2.2 Yürürlükteki genotipik ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik rezolusyonu (Dijkshoorn *et al.* 2000, 2001)

2.3.2 Genotipik yöntemler

Günümüzde, LAB tanımlama/tiplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere doğru kaymıştır (Babalola 2003). Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan **genotipik yöntemler** DNA'yı yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon patternlerindeki polimorfizmini ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu içeren çalışmaların da dahil olduğu birçok yöntemi içermektedir. Kültür koşullarından etkilenmemesi bakımından da fenotipik tanımlama yöntemlerine kıyasla daha avantajlıdır.

Bu yöntemlerin temel avantajları şunlardır: (Farber 1996)

- Kuvvetli bir ayrım gücüne sahiptirler. Çok yakın türlerin ayrımı bile gerçekleşebilir.
- Bakteriden DNA izolasyonu tanımlanmıştır ve kolay bir yöntem olduğu için materyal kolaylıkla elde edilebilir.
- DNA stabil bir molekül olduğu için kültür içeriğinden ve hazırlanan aşamalardan etkilenmemektedir. Böylece daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir.
- Sonuçlar istatiksel analizler ve diyagramlar ile desteklenebilir. Yeni izole edilen suşların da varlığı bu şekilde kanıtlanabilir

LAB suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan genotipik yöntemler arasında plazmit profili, Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (PFGE; pulsed-field gel electrophpresis), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; restriction fragment length polymorphism) gibi **PCR temelli olmayan yöntemler**; Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD; randomly amplified polymorphic DNA), Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP; amplified fragment length polymorphism), Tekrarlanan Palindromlara Dayalı PCR (Rep-PCR; repetetive extragenic palindrome-PCR), Çoğaltılmış Ribozomal DNA Geni Restriksiyon Analizleri (ARDRA; amplified ribosomal DNA restriction analysis), 16S-23S Genler Arası Ayırıcı Bölge (ISR; internal spacer region) PCR gibi **PCR temelli yöntemler** ve 16S rDNA'ya dayalı **dizi analizleri** yer almaktadır (Vandamme *et al.* 1996).

Kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins seviyesinden suş seviyesine kadar tanımlanmasını sağlayan DNA temelli teknikler hızlı ve güçlü bir ayrım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olması ve sonuçların genellikle kolay yorumlanabilmesinin yanı sıra besin ortamındaki değişikliklerden etkilenmemeleri bakımından fenotipik tanımlama yöntemlerine kıyasla oldukça önemli avantajlar sunmakta ve dolayısıyla son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Moschetti *et al.* 1998; Bush and Nitschko 1999). Bununla beraber, kromozomal DNA molekülünün insersiyon ve delesyonu, ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına

veya var olan kesim bölgelerinin elimine olmasına sebep olan rastgele mutasyonlardan etkilenmektedir.

2.3.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction- Polimeraz zincir reaksiyonu) temelli olmayan yöntemler

2.3.2.1.1 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi)

Kesime uğramış kromozomal DNA'nın PFGE'si sergilemiş olduğu yüksek ayrım gücü ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerinden dolayı moleküler tiplendirme yöntemleri arasında "altın standart" olarak ifade edilmektedir (Ehrmann and Vogel 2005). Moleküler tiplendirme yöntemlerinin en başarılısı olarak kabul edilen bu yöntemle sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısılı agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır.

PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Liziz işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kb'lık DNA fragmanlarının net olarak ayırt edilmesine sağlamaktadır.

Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle ilişkileri ortaya konulmaktadır. Bilgisayara dayalı

analizlerde incelenen mikroorganizmalara ait PFGE profillerinin saklanması ile veri bankası oluşturulabilir. Böylece çalışılan suşların profillerinin daha önce var olan verilerle karşılaştırılma olasılığı oluşmaktadır.

Son senelerde, PFGE ile DNA parmakizi tiplendirmeleri büyük restriksiyon fragmentlerinin karşılaştırılmasına imkan vererek çeşitli LAB suş tiplendirmelerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Moschetti *et al.* 2001). Bununla beraber, oldukça fazla zaman/iş gücü harcanmasını gerekli kılan bu yöntem aynı zamanda da türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmaktadır (farklı restriksiyon enzimleri ve elektroforez koşulları) ve dolayısıyla genelde tür içi ayrım veya ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılmaktadır (Bush and Nitschko 1999).

PFGE'de yüksek kalitede DNA'nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle soğuk tampondaki hücrelerin hızlıca işlenmesi, erimiş agaroza eklemeden önce bakterilerin buzda tutulması ve agaroz kalıpların soğukta tutulması gerekmektedir.

Restriksiyon enzimlerini seçerken göz önünde tutulması gereken birçok faktör vardır. Birincisi bakteriyel DNA'nın G+C içeriğidir. Düşük G+C içerikli DNA'lar, tanıma bölgesi G+C bakımından zengin olan restriksiyon enzimleri (RE) ile muamele edildiğinde yeteri kadar kesilememektedir. İkincisi ise tanıma bölgesi uzun olan enzimler kısa olanlara kıyasla daha az sayıda kesim parçaları oluştururlar.

Bu teknik taksonomik çalışmalarda ayrı türlerin benzer PFGE profili göstermesinin tür ilişkisini gösterdiği gibi, bakteriyel suşların ayrılmasında da kullanılır (Prakash *et al*. 2007).

Ender kesim yapan endonükleazların kullanılmasıyla kombine edilen PFGE kromozom bölgelerinin değerlendirilmesi yanında türlerin ayrımına da olanak tanır. Bu teknik yüksek ayrım gücü göstermektedir. PFGE restriksiyon biçimi zamana karşı stabildir, tekrarlanabilir ve yorum için standart kriterler mevcuttur. Bu nedenle bu yöntemin türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanışlı bir araç olduğu bildirilmiştir (Gordillo *et al.* 1993;

Donabedian *et al*. 1995; Tenover *et al*. 1995, 1997; Patterson and Kelly 1998). Birçok araştırmacı prosedürü hızlandırmak için ve zaman tüketen prosedürlerin üstünden gelebilmek için PFGE protokollerinin değişik modifikasyonlarını tanımlamışlardır (Matushek *et al.* 1996; Turabelidze *et al*. 2000).

2.3.2.1.2 Ribotiplendirme

PCR bağımsız bir diğer yöntem olan ribotiplendirme, 16S rRNA'yı kodlayan genlerin restriksiyon enzimleriyle parçalanmasıyla ortaya çıkan DNA fragmentlerinin analizlerine dayalı tanımlama yöntemidir. Bu prosedür, bakterilerde oldukça korunmuş rRNA' yı kodlayan genlerin DNA parmakizini esas alır.

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), spesifik bir DNA sekansının (prob) farklı hibridizasyonu üzerine kurulmuş bir moleküler markırdır. rRNA bazlı probların kullanıldığı RFLP yöntemi, ribotiplendirme olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ribozomal genlerin bakteriyel taksonomide oldukça uygun hedefler olduğu ve ribotiplendirmenin taksonomik çalışmalar için kullanışlı bir araç olduğu belirtilmiştir (Grimont and Grimont 1986).

Bakterilerde, ökaryotlarda ve arkelerde bulunan rRNA moleküllerinin birçoğunun moleküler evrimin gidişatında çok az değişmiş olduğu görülmektedir (Woese 1987), bu yüzden bu sekanslara spesifik problar bakterilerin geniş bir sınıflandırmasını, benzer rRNA sekanslarıyla belirleyebilmektedir. Diğer prob tipleri belirli türler veya tür içinde sınırlı kalmaktadır.

Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanır ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilir ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir probla hibridizasyona uğratılır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için probların bantlar olarak melezlendiği

yerde probdaki işaret gözlenir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla yakınlıkları gözlenerek bilinmeyen izolatların tanımlanması için kullanılabilir.

Ribotiplendirme aynı zamanda muhtemelen bu metodun en yaygın kullanım amacında olduğu gibi, izolatların filogenetik amaçlar için tiplendirilmesinde de kullanılabilir. Geçmiş yıllarda bu yöntem *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* türleri veya alttürlerinin taksonomik çalışmalarında da kullanılmıştır (Bjorkroth *et al*. 2000, 2002; Fernández *et al*. 2004; Kostinek *et al*. 2005; Schlegel *et al*. 2000; Suzuki *et al*. 2004).

Ribotiplendirme; araştırmacıların yanlış bir şekilde PCR-ribotiplendirme olarak tanımladığı, 16S-23S ara bölgesinin PCR bazlı fragment uzunluk polimorfizminden ayrılmalıdır (Kostman *et al*. 1992).

Metodun ayırım gücü kullanılan oligonükleotit probların ve restriksiyon enzimlerinin sayısına ve tipine bağlıdır. PFGE ile karşılaştırıldığında ribotiplendirme, alttür ve suş tanımlanması için yetersiz kalmakta ama türlerin ayrımında uygulanabilir bir yöntemdir (Hall *et al*. 1992; Gordillo *et al*. 1993; Woodford *et al.* 1993).

2.3.2.1.3 Plazmit profil analizleri

Plazmitler; ekstrakromozomal, replike olabilen, küçük, halkasal çift iplikli DNA molekülleridir. Çoğu plazmit 200 kb'dan düşük boyutta küçük halkasal olarak bulunsa da, doğrusal ve büyük plazmitlerin varlığı da bildirilmiştir.

Alkali lizis prosedürlerini kullanan geleneksel plazmit izolasyonu ve çok sayıda türetilmiş yöntemlerin kullanımı, plazmit izolasyonu ve analizlerini mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji labotatuvarlarında düzenli olarak kullanılan teknikler haline getirmiştir. Bu yüzden, plazmit profilleri bakteriyal tanımlama için yardımcı analizler olarak kullanılmaktadır.

Aynı türe ait olan suşların sahip oldukları plazmitlerin sayı ve büyüklüklerindeki varyasyonlar, plazmit profilleri, LAB'ların tiplendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Çünkü bu gruba ait suşların çoğu birçok plazmit içermektedir. Plazmit profilleri önceleri tür içi ayrımın tiplendirilmesinde uygun olarak görülmüştür. Bazı LAB'larda plazmitlerin yüksek oranda bulunmasına rağmen (örn: *Lb. plantarum*) bazılarının plazmit içerikleri açısından fakir olduğu görülmektedir. Plazmitlerin bulunmaması ve ekstrakromozomal DNA'nın kararsızlığına bağlı olarak, kromozomal DNA'yı kullanan yöntemler, plazmit profillerine göre daha üstün olmaktadır (Duffner and O'Connell, 1995). Suşların, yaşam süreçleri boyunca kazandıkları ve kaybettikleri plazmit yöntemin güvenilirliğini etkilemektedir (Duffner and O'Connell 1995). Plazmitler fermentasyon ve diğer teknolojik işlemler sırasında kaybolabileceği için plazmit profilleri türiçi tiplendirmede güvenilir bir yöntem olmaktan çıkmaktadır (Kondo and McKay 1985; Neve *et al.* 1987). Ayrıca, plazmit profil analizlerinin birçok durumda diğer genotipik yöntemlerden daha düşük ayrım gücü gösterdiği göz önünde bulundurulmalıdır (Maslow *et al.* 1993). Son zamanlarda plazmit içeriği uygulamasının PFGE veya immunoblotlama ile kıyaslanınca daha düşük ayırımcı olduğu bildirilmiştir (Hartstein *et al*. 1995). Buna ek olarak benzer moleküler ağırlıklı plazmitlerin varlığı bunların her zaman aynı plazmit olduğunu göstermez. Bu durumda restriksiyon endonüklez kesimleri kullanılabilir. Plazmit değişik bölgelerden belirli bir restriksiyon enzimi ile kesildiği zaman oluşan fragment bantlarının elektroforez sırasındaki hareketlerinin farklı olması beklenir.

2.3.2.1.4 RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

Aynı zamanda kromozomal DNA restriksiyon analizi veya DNA mikrorestriksiyon analizi olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde bakteriden alınan kromozomal DNA izole edilir ve restriksiyon enzimiyle muamele edildikten sonra oluşan fragmentlerin agaroz jelde ayrımı yapılır. Fragmentlerin büyüklüğü kullanılan restriksiyon enzimlerine bağlı olarak değişim gösterir. Etidyum bromür ile jel boyandıktan sonra fragmentlerin UV ışık altında gözlemi

yapılır. Bantlar ve bantlar arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak her izolatın ayrımı yapılmış olur (Grimont and Grimont 1991; Giovanetti and Ventura 1995).

Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalara "restriksiyon parçaları" denir. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilir. Değişik enzimlerle muamele sonucunda farklı uzunluklarda restriksiyon parçaları oluşur ve bu parçalar jel elektroforezi yoluyla birbirlerinden ayrılabilirler. Birbirinden farklı değişik miktar ve uzunlukta parçalar oluşur. DNA parçalarında görülen bu polimorfizmin nedeni nokta mutasyonu olabileceği gibi, inversiyon, delesyon, translokasyondan kaynaklanan büyük mutasyonlar da olabilir. Kısaca; RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA'daki kesim noktalarındaki değişmelerden faydalanılır. Kullanılan ana ve aşağıda aşamaları verilen yöntem southern blot hibridizasyonudur.

Genomik DNA'nın izolasyonu: DNA izolasyonunda birçok yöntem vardır. Araştırıcı yeteneklerine ve laboratuarın olanaklarına göre uygun olanını seçmelidir. Fiziksel ve kimyasal işlemlerle DNA haricindeki moleküller ortamdan uzaklaştırılır.

Spesifik restriksiyon enzimiyle kesim: Saf haldeki DNA eppendorf tüpüne konduktan sonra restriksiyon enzimi (RE) ilave edilerek gerekli zaman ve ısıda inkübasyona bırakılır. Bu esnada RE, DNA'yı belli noktalardan keser ve büyüklü küçüklü parçalar oluşturur.

Elektroforez: DNA solüsyonu agaroz jelde veya poliakrilamid jel elektroforezinde bir süre akım altında bırakılır. Akım jelin kalınlığına göre ayarlanır. Büyük parçalar, başlangıç yerinde, küçük parçalarsa jelin sonunda toplanır. Jel etidyum bromür ile boyanırsa bantlar UV altında görünür hale gelir.

Southern Blot bantlarının (DNA) membrana transferi: Elektrotransfer, alkali, kapillarite vb yöntemlerle parçalar naylon membrana alınırlar. Naylon membranlar sağlamlıkları, tekrar tekrar kullanılabilmeleri kuvvetli fiksasyon özellikleri nedeniyle

günümüzde tercih edilmektedirler. Transfer sonunda membran kurutulur. NaOH ile DNA'lar denatüre edilir ve membran ısıtılarak DNA' ların fiksasyonu sağlanır.

Hibridizasyon*:* Naylon membran önce ön solüsyonla yıkanıp kurutulur ve üzerine radyoaktif işaretli bir probun ilavesiyle melezleşme sağlanır. 24 saatin sonunda denatüre tek iplikçikli DNA'lar probla birleşir ve membran yıkanarak melezleşmemiş DNA'lar ve artıklar temizlenir. Otoradyografik yöntemlerle görüntülenir.

RFLP; hızlı, ucuz ve uygulanması nispeten kolay olan bir yöntemdir. Ancak birçok fragmentin oluşması ve bunların jelde yakın bir şekilde dizilmesiyle bu bant profillerini ayırmak güçleşir. Bu nedenle tutarlı sonuçların oluşması için birden fazla restriksiyon enziminin kullanımı gerekebilir (Mainville *et al*. 2005).

2.3.2.2 PCR temelli yöntemler

İşlenmeye yetecek yüksek miktar ve tür/tür içi seviyede yüksek ayrım gücü tercih edildiğinde PCR temelli genomik parmak izi tekniklerinin daha yüksek potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

2.3.2.2.1 RFLP-PCR

Hızlı bir yöntemdir. Genomdaki hedef bölgeler, spesifik primerlerin kullanımıyla çoğaltılır ve daha sonra restriksiyon enzimiyle kesilirler. Restriksiyon enzimi hedef bölgenin bilinen kompozisyonuna dayanarak seçilir. Son olarak elde edilen restriksiyon fragmentleri, agaroz jel elektroforeziyle ayrılırlar. Daha sonra restriksiyon bantları karşılaştırılır. Bu yöntemde hedef bölgenin önceden bilinmesi gerekir ve bu durum bir dezavantajdır. Bu nedenle evrensel primerler kullanılır (Kabadjova *et al.* 2002).

PCR türlerin varyasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğinin farklarını göstermek için spesifik genetik bölgelerin çoğaltılmasına ve çalışılmasına olanak tanımaktadır. Çalışılacak spesifik

lokus, gen spesifik primerler ile çoğaltılmayla RFLP analizlerine maruz bırakılmaktadır. DNA fragmentleri agaroz veya küçük poliakrilamid jelde ayrılırlar ve oluşan bantlar etidyum bromür boyamayla görüntülenirler. Çalışılacak bölgenin kısıtlı genomu yüzünden bu teknik diğer yöntemler kadar kuvvetli ayrım gücüne sahip değildir (Olive and Bean 1999).

2.3.2.2.2 AFLP-PCR

(Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

Moleküler teknikler, güçlü bir ayrım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir. AFLP; genetik markör teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir (Koeleman *et al.* 1997). Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiyi açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir (Janssen *et al* 1996). Genomik tiplendirme teknikleri, birbirine çok yakın akraba türlerin tespiti, türlerin tanımlanması ve ayrımı, starter kültür analizleri, gıdalarda bozulmalara ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan önemli mikroorganizmaların karakterizasyonlarında kullanılarak önem kazanmıştır.

AFLP temelde RFLP ve RAPD-PCR tekniklerinin bir arada kullanıldığı ve tanımlamada özellikle RFLP ve RAPD-PCR'da olduğu gibi tür-suş düzeyinde oldukça yüksek oranda başarıya ulaşan ve son yıllarda diğer genotipik yöntemlere alternatif olarak sunulan popüler bir tekniktir. Teknik, uygun koşullarda amplifiye edilecek olan kalıp DNA'yı yaratmak için DNA fragmanlarının uçlarına eklenmiş olan çift zincir DNA adaptörlerini tanıyan primerlerle seçici amplifikasyonu gerekli kıldığından elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özellik sergilemektedir (Huys *et al.* 1996; Vos *et al.* 1995).

AFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon endonükleazların her biri DNA üzerinde spesifik bir bölgeyi veya sekansı tanımakta ve kesim işlemi neticesinde DNA fragmanları meydana gelmektedir. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına pre-selektif amplifikasyon adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılır (Babalola 2003). Genelde her bir AFLP reaksiyonunda yaklaşık 30-80 restriksiyon fragmanı beraber amplifiye olduğundan ve denatüre koşullarda gerçekleşen jel elektroforez sisteminde tespit edilebildiklerinden teknik DNA polimorfizmin tespiti için oldukça güçlüdür. Tür ve alt tür seviyesinde ayrım sağlayan bu tekniğin kullanımı diğer DNA tiplendirme yöntemlerine kıyasla sergilemiş olduğu avantajlardan dolayı gün geçtikçe artmaktadır (Mueller and Wolfenbarger 1999).

Tekniğin çok geniş bir alanı taraması, az miktarda iş gücüne gereksinim duyması, kısa sürede neticelenmesi ve yorumlanabilmesinin oldukça kolay oluşu en temel avantajlarından olup bu yeni tekniğe olan ilgiyi arttırmaktadır. Bununla beraber, analiz için gerekli olan DNA miktarı çok az olmakla beraber ulaşılan bilgi oldukça fazladır. Analiz öncesi DNA sekansına ait bir bilgiye gerek yoktur ve diğer tekniklere kıyasla AFLP'nin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir (Huys *et al.* 1996; Vos *et al.* 1995; Blears *et al.* 1998).

2.3.2.2.3 Rep-PCR

(Repetitive Extragenic Palindrome PCR-Tekrarlanan Palindromlara dayalı PCR)

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda Rep olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. Versalovic ve arkadaşları 1994'de, bakteriyal parmakizi için bakteriyal genomların içinde bulunan bu tekrarlanan DNA elementlerinin PCR ile

amplifikasyonundan elde edilen spesifik bantların incelenmesiyle yapılan bir tiplendirme metodu tanımlamıştır (Versalovic *et al.* 1994).

Rep-PCR çoğu bakterinin genomunda birden birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmakizi tekniğidir (Lupski and Weinstock 1992). Bugüne kadar tekrarlanan DNA sekanslarının 3 türü tanımlanmıştır: (Prakash *et al.* 2007)

- Tekrarlanan ekstrajenik palindromik (REP); 35-40 baz çifti büyüklüğünde ve çeşitli halkaları yapısında bulunduran elementlerdir.
- Enterobakteriyal tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC); 124-127 baz çiftlik, ve merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır.
- BOX; 154 baz çiftlik box A, box B, ve box C şeklinde isimlendirilmiş korunmuş alt ünitelere sahip elementlerdir. Bakteriler arasında bütün bu alt üniteler arasında sadece box A-1 alt ünitesi oldukça korunmuştur.

Tiplendirme amacıyla primerler DNA'yı çoğaltmak için REP ve ERIC'de tekrarlanan bölgelerin dışından, BOX'da ise box A alt ünitesinden başlayacak şekilde tasarlanabilirler (Versalovic *et al*. 1994). Bu primerlerin kullanımıyla REP, ERIC ve BOX elementlerinin arasında yerleşmiş ayırıcı bölgeler çoğaltılabilir ve bunlara uyan yöntemlere REP-PCR, ERIC-PCR ve BOX-PCR genomik parmakizi denilmektedir.

Toplu halde bu metodlar Rep-PCR genomik parmak izi tekniği olarak anılmaktadır (Versalovic *et al*. 1994). Bu teknikle tekrarlanan elementler PCR ile değişik boyutlarda DNA fragmentleri üretmek için çoğaltılır (Farber 1996, Dombek *et al.* 2000). PCR ürünleri daha sonra boyutlarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılır ve spesifik DNA parmak izi bantları oluştururlar. Daha sonra bu bantlar tanımlayıcı bilgisayar programı kullanılarak analiz edilirler.

Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PCR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden biridir (Van der Zee *et al.* 1999). Carson ve ark. 2003'te Rep-PCR'ın ribotiplendirmeden daha doğru, tekrarlanabilir ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır (Carson *et al.* 2003). Tekniğin uygulanması kolaydır ve hem çok sayıda hem de az sayıda örneğe uygulanabilir. Yöntemin en önemli dezavantajı söz konusu serilerdeki yüksek değişimdir. Bu nedenle çoğu durumda tür ayrımında kullanılamaz.

Daha fazla türe uygulanabilirlik göstermekte olan Rep-PCR, PFGE ile karşılaştırıldığında daha düşük (Olive and Bean 1999) ancak plazmit profil analizleri veya genomik parmakizleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek ayrım gücüne sahiptir (Georghiou *et al.* 1995). 16S rRNA gen veya 16S-23S ara bölgesinin (Vila *et al.* 1996; Appuhamy *et al*. 1997) restriksiyon analizlerinden daha iyi bir ayrım gücüne sahiptir. Bununla beraber Rep-PCR'ı multilokus (çoklu bölge) enzim elektroforezi (Woods *et al*. 1992), biyokimyasal karakterizasyonlar (Clarridge *et al.* 1995) veya ribotiplendirme gibi diğer tiplendirme yöntemleriyle karşılaştıran çalışmalar Rep-PCR'ın bu yöntemlerden daha üstün olduğunu ortaya koymuştur. Son olarak farklı çalışmalar Rep-PCR'ın PFGE sonuçlarıyla iyi ilişkiye sahip olduğunu fakat genel olarak daha az ayrım gücüne sahip olduğunu göstermiştir (Barbier *et al.* 1996, Liu and Wu 1997).

2.3.2.2.4 PCR Ribotiplendirme

2.3.2.2.4.1 ARDRA

(Amplified rDNA Restriction Analysis-Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi)

Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PCR-RFLP temelli bir yöntem olan ARDRA'da türe özgü spesifik primerlerin kullanımı ile 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır (Andrighetto *et al.* 1998). Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilir (Bouton *et al*. 2002). Sonuçta oluşan

fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya gidilir. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır.

ARDRA'da 16S rDNA genleri evrensel primerler veya tür spesifik primerler kullanılarak çoğaltılırlar. Bu genin çoğaltılmasından sonra restriksiyon endonükleaz kesimi gerçekleştirilir. RE'nin seçimi, çoğaltılmış bölgenin nükleotit kompozisyonuna göre yapılır. Restriksiyon kesiminden sonra fragmentler agaroz jelde ayrılır ve her izolatın profili karşılaştırılır.

ARDRA tekniğinde bekteriyel kültür ve DNA izolasyonu gerekmektedir. DNA PCR amplifikasyonunda total olarak veya sadece rRNA geninin 16S bölgesini çoğaltmak için kullanılır. Bu amplifikasyonu PCR ürünlerinin bir restriksiyon parçalanması takip eder. ARDRA bantlarında restriksiyon enzimlerinin seçimi geniş sayıda türün net bir ayrımı için gereklidir. Restriksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ve bromür boyamasından sonra UV ışık altında görüntülenir. Bazı yakın türler arasında ayrım elde edebilmek için birden fazla restriksiyon profilinin karşılaştırılması önemlidir.

Bu tekniğin ilk tanımı Vaneechoutte ve arkadaşları tarafından *Comamonadaceae*'nin tanımlanmasında verilmiştir (Vaneechoutte *et al*. 1992). 16S-ARDRA süt ürünlerinden (Andrighetto *et al.* 1998, Giraffa *et al*. 1998), dışkı ve vajinal ürünlerden (Ventura *et al.* 2000) izole edilen laktobasillerin tanımlanması ve diğer bir şarap laktik asit bakterisi olan *O. oeni* nin ayrımı için uygulanmıştır (Sato *et al.* 2000).

2.3.2.2.4.2 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer-İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge)/ ISR (Intergenic 16S-23S rRNA Spacer Region-Genler Arası 16S-23S rRNA Ayırıcı Bölge) PCR

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi vardır. Bunlar ara bölgelerle ayrılır ve sekansta, hem cins hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik

gösterirler. 16-23S rRNA arasındaki bölgenin çoğaltılması genellikle ITS-PCR olarak tanımlanır. rRNA genleri arasındaki ara bölge hedef bölge olduğu için yöntem aynı zamanda PCR-ribotiplendirme olarak da adlandırılır. Agaroz jelde ayrılan çoğaltılan bölgeler karşılaştırılır. Çoğaltılmış bölgenin restriksiyon analizi veya sekansı, metodun ayrım gücünü yükseltir (Barry *et al.* 1991).

ITS-PCR'da bakteriyel taksonomi için kullanılabilir. ITS-PCR; 16S-23S rRNA'nın intergenik transkripsiyon bölgesi içindeki polimorfizmleri ortaya çıkarır ve bakteriyal türlerin karakterizasyonunda kullanılabilir. Bu yüzden filogenetik analizler için önemli bir araç olarak görev yapabilir (Toth *et al*. 2001).

PCR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir (Leblond-Bourget *et al.* 1996).

Bununla beraber çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması, dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi bazı güçlükler de mevcuttur (Ehrmann and Vogel 2005).

2.3.2.2.5 RAPD-PCR

(Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

Geleneksel PCR çalışmaları belirli bir türe veya hatta suşa özgü DNA sekanslarını amplifiye etmek için kullanılabilmekle beraber sistemin çalışabilirliği spesifik oligonükleotitlerin varlığına ihtiyaç duyduğu için üzerinde çalışılacak organizmanın DNA sekansının bilinmesi gerekmektedir. Bu da özellikle üzerinde çalıştığımız organizmanın DNA sekansı hakkında bilgi sahibi olmadığımız durumlarda dezavantaj olarak karşımıza çıkabilmektedir. RAPD analizleri bu gereksinimi ortadan kaldırmaktadır çünkü primer

tasarlamak için parmakizi analizi yapılacak olan genomun sekansını bilmeye gerek yoktur (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.* 1990). Williams ve arkadaşları, özgül nükleotit dizisini bilmeye gerek kalmadan PCR ile rastgele bir primer kullanarak polimorfizmin saptanabileceğini bulmuşlardır (Williams *et al.* 1990). Literatüre **RAPD-PCR** olarak geçen bu yöntemin analizleri sonucu elde edilen çoğaltılmış ürün polimorfizm göstermekte ve böylelikle genetik markörler olarak kullanılabilmektedir. Aynı yıl diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve **AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)** olarak isimlendirmiştir (Welsh and McClelland 1990). 1991 tarihinde ise bu metodla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitden daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmakizi profili elde edilen **DAF** (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir yöntem yayınlanmıştır (Caetano-Anolles *et al*. 1991).

Bu tekniği tanımlamak için kullanılan terminoloji bazı durumlarda karışıklık yaratmaktadır (Vaneechoutte 1996). RAPD parmakizlerinin yaratılmasını gerekli kılan yöntemleri tanımlamada çeşitli farklı isimler kullanılmaktadır. MAAP ('multiple arbitrary amplicon profiling') ifadesi önerilmekle beraber (Caetano-Anolles *et al.* 1991a,b; Caetano- Anolles *et al.* 1992a,b) her bir metodun kullanılan primerin uzunluğuna göre sınıflandırılabileceği de önerilmiştir (Çizelge 2.3). Bununla beraber, günümüzde önerilen bu terminolojinin hiçbiri resmi kabul görmemiştir ve son yıllardaki yayınlarda kullanılan primerin uzunluğuna bakılmaksızın genel yöntem AP-PCR veya RAPD tiplendirme olarak isimlendirilmeye devam etmektedir

Çizelge 2.3 Arbitrary primer parmakizi yöntemlerinde primer uzunluğu temel alınarak yapılan sınıflandırma (Caetano- Anolles *et al.* 1992a)

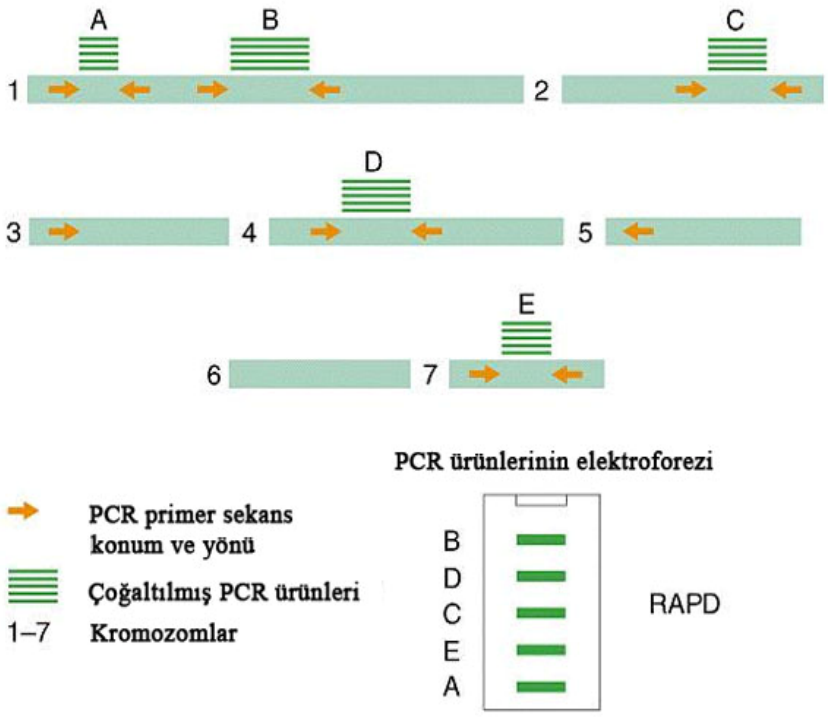
Yöntem	Primer uzunluğu
AP-PCR	*c*. 18-24 mer
RAPD	*c*. 10 mer
DAF[a]	*c*. 5-8 mer

[a] 'DNA amplifikasyon parmakizi'

RAPD parmak izi analizi LAB'ların tür içi ve türler arası ayrımında son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılan PCR-temelli bir tekniktir. Yöntem, yakın ilişkili türlerin filogenetik analizleri ve tür içinde ayrım potansiyeline sahiptir (Welsh and McClelland 1990; Williams *et al* 1990).

RAPD, bütün PCR temelli markörlerin en basitidir. RAPD markörleri, küçük (10 baz), %50'den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PCR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleşmektedir. Oligonükleotit primerleri polimeraz zincir reaksiyonunun anahtarıdır. Oluşan parçaların sayı ve büyüklüğü; primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA'da bu diziye komplamenter dizinin varlığına bağlı olarak araştırılan genoma özgü bir desen (patern) verir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA'lar çalışılır. Primer bağlanmasıyla, polimeraz enzimi 5′→3′ yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltır ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boyalarla boyanarak izlenebilir.

Welsh ve McClelland (1990) tarafından da gözlemlendiği gibi, metodun temelinde, rastgele seçilmiş tek bir primer önce düşük şiddette (stringency) gerçekleşen iki PCR döngüsünden sonra yüksek şiddette ardı ardına gerçekleşen pek çok döngünün ardından belirli bir genoma özgü olan farklı ve tekrarlanabilir amplifikasyon ürünlerinin oluşturulması yer almaktadır. Bu olayın gerekçesi ise muhtemelen oldukça düşük sıcaklıkta primerin kromozom üzerinde DNA polimerizasyonunu başlatmak için pek çok bölgeye bağlanması beklenmektedir ki bu bağlanmalar arasında çeşitli yanlış bağlanmalarda söz konusudur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olur. Düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler, kromozom üzerinde hem kendilerine özgün bölgelere, hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine olan uzaklıkları değişik olacağından agaroz elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklükleri de farklı olacaktır. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon (delesyon veya insersiyon) bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profili gösteren izolatlar filogenetik olarak ilişkili

şeklinde yorumlanabilir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tipleme yöntemleriyle çalışılmalıdır.

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. Tekniği etkileyen diğer temel değişkenler arasında; $MgCl_2$ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denaturasyonu, primer karışımları önem taşımaktadır (Williams *et al.* 1990; Welsh and McClelland 1990; Tingey and Del Tufa 1993; Kohel and Park 1994; Rafalski *et al.* 1994; Halldén *et al*. 1996; Khandka *et al*. 1997; Mathieu-Daudé *et al.* 1997; Halldén 1998; Aljanabi *et al.* 1999; Atienzar *et al.* 2000; Doulis *et al*. 2000; Sall *et al.* 2004). Bununla beraber PCR' da oluşan çelişkili sonuçlardan; yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir (Weeden *et al.* 1992; Hansen *et al.* 1998).

RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir (Halldén 1998). Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden önce yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Tingey and Del Tufa 1993; Halldén 1998).

Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntem diğer moleküler genetik yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. Kullanılan primer sayısı arttıkça ayrım gücü artar (Ehrmann and Vogel 2005). LAB'ların türler arası ayrımında, bazı türlerin (*Enterococci, Pediococci ve Lactobacilli*) tür içi ayrımında ve gıdalardan izole edilen suşların cins bazında ayrımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Cocconelli *et al.* 1995, 1997; Taillez *et al.* 1996).

Cocconelli ve arkadaşları (1995) laktik asit bakteri türlerini tiplendirme amacıyla RAPD-PCR fragmentleri üzerine kurulu bir protokol geliştirmişlerdir. Tek bir 10-mer primer kullanarak genomik DNA izolasyonuna gerek duymadan parmakizi incelemeleri elde etmişlerdir. Serbest DNA'nın değişik koşulları ve amplifikasyon sırasıyla tekrarlanabilir sonuçlar ve türler arası yüksek ayrım gücünü elde edebilmek için incelenmiştir. RAPD protokolü *Lb. acidophilus, Lc. helveticus, Lc. casei, Lc. reuteri, Lc. plantarum, E. jaecalas, E. faecium* and *Streptococcus thermophilus'a* ait türlerin tiplendirilmesinde başarıyla uygulanmıştır.

Drake ve arkadaşlarının (1996) *Lactobacillus helveticus*'un ayrımı üstüne yaptıkları bir çalışmada SDS-PAGE, 16S-23S ITS-PCR ve RAPD olmak üzere 3 moleküler yöntem, 16 suşun tiplendirilmesinde yeterlilikleri için denenmiştir. Suşlar ITS amplifikasyonu ve SDS-PAGE paternlerine göre gruplandırılmış ve 16 suşun tümünün ayrımı RAPD ile sağlanmıştır. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin *Lb. helveticus*' un suş seviyesinde ayrımının hızlı ve ucuz bir yol olduğunu, gelecekte yapılacak çalışmalarda bu yöntemlerle elde edilen paternlerin kullanışlı fenotipik karakteristiklerle ilişkisine odaklanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

1997 yılında Sudan'da hamurdan dominant florayı temsil eden 7 tür *Lactobacillus* izole edilmiş, kısmi 16S rRNA gen sekanslarının karşılaştırılması, bu türlerin filogenetik konumlarını aydınlatmıştır. 5 tür *Lactobacillus vaginalis* diğer 2 tür ise *Lb. helveticus* olarak belirlenmiştir. RAPD-PCR ve şeker fermentasyon patternleri bu sınıflandırmada esas alınmıştır (Hamad *et al.* 1997).

Cocconcelli ve arkadaşları (1997) moleküler tekniklerle, Parmigianno Reggiano peynir üretiminde peynir alt suyundan alınan kültürde termofilik mikrofloranın komünite gelişimini çalışmışlardır. RAPD analizleri, ilgili *Lactobacillus* türlerinin tanımlanmasını kolaylaştırmış ve peynir alt suyu fermentasyonunun iki döngüsü sırasında populasyon dinamiklerinin çalışılmasına izin vermiştir. Aynı analizler fermentasyon sürecini yönlendiren 4 biyotipin varlığını ortaya çıkarmıştır.

1998 yılında bilinen *Pediococcus* türleri üzerinde yapılan taksonomik bir çalışmanın sonucu, prosedür uygun bir şekilde takip edildiğinde RAPD'in genetik bir araç olarak, izolatların ayrımı için çok etkili olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar; RAPD'in hibridizasyon prosedürleriyle karşılaştırıldığında daha ucuz, hızlı ve daha az emek gerektirdiğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda değişik alanlardan izolatların veya populasyonların kısa zamanda fazla sayıda çalışılabilmesine olanak tanıdığı vurgulanmıştır (Nigatu *et al*. 1998).

Rastgele DNA çoğaltılması ile *Bifidobacterium'*un karakterizasyonu üzerine yapılan bir çalışma, uygun koşullarda 5 tek-primer reaksiyonu kullanımı ile süt işletmelerinden izole edilen Bifidobacterium türlerinin karakterizasyonu için RAPD metodunu doğrulamıştır. *Bifidobacteria* türleri arasındaki yakınlık RAPD profilleri üzerinden değerlendirilmiş, ayrıca RAPD tekniğinin uygulanmasının, endüstriyel türlerin spesifik gruplara yerleştirilebilmesi için, geleneksel sistematik çalışmalardan daha kullanışlı ve hızlı olabileceği belirtilmiştir. Sonuç olarak biyokimyasal tekniklerle beraber kullanılan RAPD'in, fermente sütlerin üretimi için yeni starter kültür suşları olarak kullanılabilecek *Bifidobacterium* türlerinin karakterizasyonu için hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu, endüstriyel süt ürünlerinden alınan izolatların hızlı tanımlanmasına olanak sağladığı vurgulanmıştır. Ek olarak RAPD'in *Bifidobacterium*'un bazı türlerinin taksonomik konumunun aydınlatılmasında yetersiz sonuçlar elde edildiğine dikkat çekilmiştir. *B. longum*/*infantis* and *B. animalis*/*lactis* türlerinin daha net ayrılabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği rapor edilmiştir (Vincenta *et al.* 1998).

Ward and Timmins'in (1999) heterofermentatif laktobasiller arasında yakın ilişkili taksonomik bir grup oluşturan *Lb. casei*, *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus'un* ayrımı üzerine yaptıkları bir çalışmada geleneksel fermentasyon profilleri kullanılarak ayrımları zor olan bu 3 türün 16S rRNA geninin V1 bölgesindeki farklılıklarına spesifik PCR primerleri geliştirmiş ve bu primerlerin kullanımıyla peynirden 63 *Lactobacillus* izolatı tanımlanmıştır. Bu şekilde tanımlanan 12 *Lb. rhamnosus* ve 51 *Lb. paracasei* RAPD primeri kullanarak da ayrımı yapılmıştır.

Pediocin AcH/PA-1'ı kodlayan geni hedefleyen, tek bir primerin kullanıldığı değiştirilmiş bir RAPD protokolü, tüm pediosin üreten türleri gruplandırma ve bunlardan başka 6 farklı patern tipini belirlemeye olanak tanımıştır. RAPD analizleri sonucu belirlenen genetik çeşitlilik aynı zamanda korunmuş çeşitli genlere yansımış, test edilen türler arasında geniş ve birleştirilmiş genetik ayrımı göstermiştir (Mora *et al*. 1998).

Ricotta forte peyniri doğal fermentasyonu sırasında *Lactobacillus*'lardaki değişikler üzerine 2000 yılında yapılan bir çalışmada RAPD analizleri, 16S rDNA sekanslama ve fizyolojik testler yapılmıştır. *Lactobacillus'*a ait 10 türün 33 farklı suşu karakterize edilmiş, *Lb. kefiri* ve *Lb. paracasei* suşlarının farklılığı RAPD analizleri ile ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada RAPD tekniği ile *Lactobacillus'*ların suş seviyesine kadar tanımlanmasının yapılmış olduğu ve özellikle daha önce *Lb. kefiri* suşu için spesifik bir RAPD protokolünün yayınlanmadığı belirtilmiştir (Baruzzi *et al*. 2000).

Torriani ve arkadaşları (2001) *Lb. plantarum, Lb. pentosus, Lb. paraplantarum* türleri arasındaki farklılıkların belirlenmesi için RAPD-PCR ve AFLP analizi ile ilgili yaptıkları çalışmada; genotipik yöntemlerin çalışılan türler içinde çok yüksek ayrım gücüne sahip olduklarını saptamışlardır. Ayrıca RAPD-PCR ve AFLP tekniklerinin her ikisinin de tür-suş bazında tanımlamaya imkan sağladıklarını ancak yüksek tekrarlanabiliğe sahip olmasından dolayı AFLP'nin daha avantajlı olduğunu vurgulamışlardır.

Coeuret ve arkadaşları 2003 yılında peynir ve günlük ürünlerden izole ettikleri 80'den fazla *Lactobacillus* türlerini ve alt türlerini tanımlamak ve karakterize etmek amacıyla RAPD-PCR ve AFLP kullanmış *ve* bu tekniklerin SDS-PAGE ile protein profilleri yöntemine göre çok daha hassas farklılıkları ortaya koyduğu sonucuna varmışlardır.

Buğday unu ve hamur mayasından izole edilen geniş bir laktik asit bakterisi populasyonunda RAPD ve hücre duvarı protein profili analizleri ayrım gücünü değerlendirmek için kullanılmış, şuşlar arasındaki farkılık/benzerlik ve bu suşların coğrafi kaynakları ve/veya işlenme parametrelerini ilişkilendirmek için birbirinden bağımsız bu 2

yöntem uygulanmıştır. Çalışmaya göre; (i) RAPD analizleri ile bazı suşların doğru türler dahilinde sınıflandırılamadıkları, (ii) iki yönteminde türiçi faklılıkları ortaya koyduğu, (iii) bazı durumlarda suşların ayrımı için RAPD analizlerinin hücre duvarı protein analiz sonuçlarına yardımcı olduğu belirtilmiştir. Birleştirilmiş RAPD ve hücre duvarı protein analizlerinin, geniş mikrobiyal populasyonların sınıflandırılması ve suşların ayrımının yapılabilmesi için kullanışlı bir araç olduğu belirtilmiştir (Corsetti *et al*. 2003).

2004 yılında Giraffa ve Rossetti'nin yayınladığı bir çalışmada RAPD-PCR, endüstriyel süt ürünlerindeki türlerin kompozisyonunu doğrulamak ve bu kültürlerin tür kompozisyonunda muhtemel değişimlerini tespit edebilmek için uygulanmıştır. Uygulamada, 2000 yılında izole edilen ve referans tür olarak kullanılan türlerin; 2001 ve 2002 yıllarında izole edilmiş türlerin her biri ile aynı dendogram grupları içinde çıkmadıkları gözlenmiştir. Bu çalışmada yeni süt ürünlerinde tanımlama ile değişimin kontrol edilmesi, yeni türlerin doğru ve güvenilir tanımlama yolları denenerek belirlenebilmesinin önemi vurgulanmıştır.

2004 yılında Sanchez ve arkadaşları 7 farklı mandıradan temin edilmiş 18 keçi peynirinden izole edilen laktobasillerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonunu çalışmış, fenotipik ve RAPD analizleri ile 136 izolat karakterize edilmiştir. Bu çalışmaya göre daha önce bu peynir çeşitlerinde belirlenememiş olan *Lb. curvatus, Lb. pentosus, Lb. cellobiosus* ve *Lb. rhamnosus* bulunmuş ve *Lb. paracasei* subsp. *paracasei, Lb. curvatus* ve *Lb. plantarum* için yüksek derecede genetik ayrım elde edilmiştir.

Dellaglio ve arkadaşları (2005) Hint günlük süt ürünlerinde yapmış oldukları çalışmalarında bu ürünlerden 4 adet suş izole etmişler ve bunları öncelikle *Lactobacillus delbrueckii* olarak tanımlamışlardır. Ancak alt tür düzeyinde tanımlamaya gidildiğinde moleküler kimliği ve fenotipik karakterleri bilinen alttürlere uyum sağlanamadığı için alt tür tanımlanamamıştır. Daha sonra AFLP, RAPD, 16S rRNA gibi genotipik yöntemler kullanılarak bu alt tür tanımlanabilmiş ve NCC 7255 olarak adlandırılmıştır.

Sardinia'daki bir çalışmada geleneksel ekmeklerden izole edilen (Carasau, Moddizzosu, Spianata, Zichi) laktik asit bakterilerinin ayrımı araştırmak için RAPD-PCR ve 16S rDNA sekans analizi kullanılmıştır. Hamur mayalarından alınan 25 örnekten izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlama ve tiplendirme çalışmaları yürütülmüş ve sonuçta RAPD ile *tek primerle* farklı türlerin ayrımına gidilemediğini, moleküler analizlerde türler için doğru ve etkin optimizasyonun oluşturulması gerektiğini vurgulamışlardır (Catzeddu *et al.* 2006).

Almagro patlıcan turşusu fermentasyonunda laktik asit bekterileri üzerine yapılan ekolojik bir çalışmada, doğal fermentasyonla ilgili laktik asit bakterileri ve moleküler tiplendirme ile genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla RAPD tekniği uygulanmıştır. Laktik asit bakteri izolatları, fenotipik analizler ve tür-spesifik PCR reaksiyonları ile tanımlama, RAPD analizleri ile tiplendirme yapılmıştır. Çalışmada RAPD ile daha önce yayınlanmamış olan *Leuconostoc, Lactococcus* cinsleri ve *Lc. acidophilus* ve *Lc. paracasei* türlerinin bu fermentasyonlarda varlıklarının tespit edildikleri belirtilmiştir (Sesena and Palop 2007).

2008 yılında Kuzey Brezilya'da farklı gıdalardan izole edilen toplam 55 *Enterococcus* türünün fenotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla fenotipik karakteristik analizleriyle beraber RAPD tekniği kullanılmıştır. RAPD analizleri sonucu mandıra ürünlerinden elde edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının yaklaşık % 40'ını içeren grupta en yüksek genetik farklılık bulunmuştur. Aynı şekilde et ve sebzelerden alınan örneklerde de büyük ölçüde farkllık ortaya çıkmıştır. Araştırmaya göre böylece enterokok türlerinin hem fenotipik hem genotipik çeşitlilik gösterme sebebinin bu gıdalardaki izolatların farklı kaynaklardan geldiği şeklinde ifade edilmiştir (Riboldi *et al*. 2008).

2.3.2.3 DNA sekans analizi

Bir DNA molekülünün nükleotid kompozisyonun belirlenmesidir. DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayrımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayrımı için DNA sekanslamanın kullanılmasının en iyi yol olarak görülmesine rağmen her izolatın tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri

bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rRNA sekansları bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş ve bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir (Klaenhammer 1993).

DNA sekanslaması için en popüler yöntem dideoksi veya "Sanger" metodu olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli gen sekanslarına ait DNA dizi analizi bir tiplendirme metodu olarak umut vericidir (DuBose *et al*. 1988; Dean *et al.* 1991). Birçok laboratuar için bu teknik şu an için uygulanabilir olmadığı için daha ucuz DNA sekans araçlarının uygulanabilirliği bu tekniği gelecekte daha ulaşılabilir hale getirebilir.

2.4 LAB Taksonomisinde Polifazik Yaklaşımlar

Polifazik taksonomi hem fenetik (fenotipik ve genotipik) hem filogenetik bilgiyi kullanır. Fenetik veri pratikte toplam "benzerlik konseptine" dayalı nümerik taksonomi ile işlenirken phylogenetic analiz "homoloji konseptine" (ortak bir orijine sahip olan) dayanmaktadır. Adansonian taksonomi olarakta isimlendirilen nümerik taksonomi 1970 li yıllarda Sneath ve Sokal (1973) tarafından ortaya konulmuştur ve nümerik taksonomide karakterlerin hepsi temelde eşit olarak muamele görürler. Çalışmada kullanılmak üzere seçilen numunelerin taksonomik seviyesi OTU'dur (Operational Taxonomic Unit - Operasyonel Taksonomik Ünite) ve çalışmaya bağlı olarak bu OTU tür, populasyon, birey vs. olabilir. Organizmaların karşılaştırılmalarında (pair-wise) benzerlik (similarity) (veya bazen dissimilarity) değerlerinin ölçümü iki OTU arasında yapılır. Jaccard, Dice ve Pearson gibi çeşitli formüller veya katsayılar bu amaç için geliştirilmiştir. Bu hesaplamalardan elde edilen benzerlik değerleri OTU ları tek bir (en yakın komşu, nearest neighbor) veya ortalama (unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA)-linkage clustering (bağlantı gruplandırma) yöntemleri ile hiyerarşik olarak kümelemek için kullanılmaktadır. Bu kümeleme daha sonra okuyucuya-dost bir dendogram şeklinde sunulur (Mohania *et al*. 2008).

2.5 Bilgisayar Destekli Veri Analizleri

İnsan gözü ve beyni jel üzerinde birbirine komşu olan iki kuyucuktaki elektroforetik paternlerdeki farklılıkları belirlemede ve teknik problemlerden dolayı jeldeki hasarları düzeltmede oldukça etkilidir. Bununla beraber, çoklu profillerin görsel karşılaştırılması ve gruplandırılması oldukça zordur, ve bu nedenle kompleks elekroforetik paternlerin analizleri bilgisayar programlarının kullanımına bağlıdır. Bu durum, otomatize fenotipik tanımlama sistemlerinin kullanımı ile oluşturulabilen çok sayıdaki fenotipik karakterin veri analizleri için de geçerlidir. En yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler- küme (cluster) yada patern analizleri – izolatların ikili gruplar (pairwise) halinde karşılaştırılmasından sonra benzerlikleri temel alınarak gruplandırılmalarını ve dendogram olarak adlandırılan ağaca benzer yapı ile anlatımını içerir.

Fazla sayıdaki karakterler bakımından toplam benzerlikleri temel alınarak organizmaların gruplanmasına ait fikir ilk olarak botanikçi Michel Adanson tarafından önerilmiştir (1727-1806). Bununla beraber, bu benzerliklerin hesaplanmasında yüksek hıza sahip bilgisayarların gelişimi ve mevcudiyeti neticesinde bu uygulama farklı disiplinlerde uygulanabilir duruma gelmiştir. Nümerikal (sayısal) taksonomi olarak isimlendirilen bu yaklaşım Sneath'in (1957 a,b) çalışmaları önderliğinde mikrobiyoloji alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş ve ilk olarak (+) veya (-) olarak skorlanan fenotipik karakterler için kullanılmıştır (Baumann *et al.* 1968). Nümerikal taksonomi gerçeğinin altında yatan prensipler başka çalışmalarda detaylı olarak açıklanmıştır (Sneath 1972; Sneath and Sokal 1973; Bock 1974; Aldenderfer and Blashfield 1984; Everitt 1998). Nümerikal taksonomide morfolojik ve fizyolojik özellikleri içine alan fenotipik karakterlerin ne şekilde skorlanacağına dair detaylı tanımlama Lockhart ve Liston'un (1970) çalışmasında bulunabilir. Mikroorganizmaların protein elektroforetik parmakizi analizlerine dayanan otomotize sınıflandırılması ilk olarak Kersters ve De Ley (1975) tarafından tanımlanmıştır. Benzer bir yaklaşımda Jackman (1985) tarafından izlenmiştir. 1980 lerden bu yana, mikrobiyal taksonomi ve filogenetikte elektroforetik parmakizlerinin analizlerinde bilgisayar destekli sistemlerin kullanımı giderek artmıştır. Başlangıçta Kersters ve De

Ley'in grubu tarafından geliştirilen bilgisayar programı yerini zaman içerisinde GelCompar ve BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) gibi oldukça gelişmiş ticari software paketlerine bırakmıştır. Parmakizi analizlerinde kullanılan diğer ticari software paketleri arasında Taxotron (Institut Pasteur, Paris, France), Dendron (Solltech, Oakdale, IA, USA) ve Bio Image Whole Band Analyser (Bio Image Inc., Ann Arbor, MI, USA) yer almaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

RAPD-PCR (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu) ile moleküler seviyede tiplendirme çalışmaları yapılacak olan ve *Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc* ve *Pediococcus* genusları ile temsil edilen Laktik Asit Bakteri (LAB) grubuna ait 86 adet suş Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3.1). Bu suşlar laboratuvarda daha önceden gerçekleştirilen çalışmalarda fenotipik yöntemler/API CH50 kit kullanımı ile tanımlanmışlardır.

3.1.2 Besi ortamları

Laktik Asit Bakterilerinin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin isimleri ve içerikleri **EK 1**'de verilmiştir.

3.1.3 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışı **EK 2**'de verilmiştir.

3.1.4 DNA izolasyon kiti

Çalışmada kromozomal (genomik) DNA izolasyonunda PROMEGA WIZARD GENOMİK DNA İZOLASYON KİTİ kullanılmıştır ve kitin kullanımına ait prospektüs **EK 3'**de verilmiştir.

3.1.5 Moleküler markörler

DNA analizlerinde kullanılan moleküler markörler **EK 4**'de verilmiştir.

3.1.6 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları **EK 5**'de verilmiştir.

3.1.7 Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 185°C'de 1 saat pastör fırını kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar için ise 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması

Çalışmada kullanılmış olan bakteri kültürleri Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu bakteri kültürleri % 50'lik gliserol solüsyonu içinde çözünmüş olarak -86°C'de saklı tutulmakta ve çalışma öncesi aktifleştirilmektedir (Biswas *et al*. 1991).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri

	Bakteri	**Kaynak**
A.	***Enterococcus***	
1.	*Enterococcus avium* ATCC Pasteur (RSKK 500)	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2.	*Enterococcus casseliflavus* NRLL 3502	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3.	*Enterococcus durans* RSKK 05034	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4.	*Enterococcus faecalis* OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	*Enterococcus faecalis* H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
6.	*Enterococcus faecalis* E27	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
7.	*Enterococcus faecalis* EF1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
8.	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
9.	*Enterococcus faecium* ATCC 6057	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
10.	*Enterococcus faecium* F1	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
11.	*Enterococcus faecium* H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
B.	***Lactococcus***	
1.	*Lactococcus lactis* OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
2.	*Lactococcus lactis* OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
3.	*Lactococcus lactis* OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
4.	*Lactococcus lactis* OZ4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

5.	*Lactococcus lactis* W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
6.	*Lactococcus lactis* W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
7.	*Lactococcus lactis* W3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
8.	*Lactococcus lactis* PK1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
9.	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* RSKK 01018	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
10.	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NRLL B634	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
C.	***Pediococcus***	
1.	*Pediococcus acidilactici* NRLL B4958	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
2.	*Pediococcus acidilactici* 2N 10P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
3.	*Pediococcus acidilactici* $E2^{++}$	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
4.	*Pediococcus acidilactici* RS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	*Pediococcus acidilactici* PBF	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
6.	*Pediococcus acidilactici* $F2^{+}$	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
7.	*Pediococcus acidilactici* E^{++}	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
8.	*Pediococcus acidilactici/cereviciae* ATCC 666	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
9.	*Pediococcus dextranicus* 2N 1P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
10.	*Pediococcus pentosaceus* DT1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
11.	*Pediococcus pentosaceus* DT10	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
12.	*Pediococcus pentosaceus* KS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

13.	*Pediococcus pentosaceus* TK3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
14.	*Pediococcus pentosaceus* KPR	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
15.	*Pediococcus pentosaceus* TS1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
16.	*Pediococcus pentosaceus* ST3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
17.	*Pediococcus pentosaceus* BY1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
18.	*Pediococcus pentosaceus* P1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
19.	*Pediococcus pentosaceus* P7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
20.	*Pediococcus pentosaceus* P20	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
21.	*Pediococcus pentosaceus* A9	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
22.	*Pediococcus pentosaceus* A12	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
23.	*Pediococcus pentosaceus* DH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
24.	*Pediococcus pentosaceus* DH3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
25.	*Pediococcus pentosaceus* PH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
26.	*Pediococcus pentosaceus* MCO31	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
27.	*Pediococcus pentosaceus* 345	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
D.	***Leuconostoc***	
1.	*Leuconostoc lysis*	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
2.	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* NRLL B3469	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3.	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 1061	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu

4.	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* OZ	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	*Leuconostoc* sp. OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
6.	*Leuconostoc* sp. OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
7.	*Leuconostoc* sp. OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
8.	*Leuconostoc* sp. OZ4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
E.	***Lactobacillus***	
1.	*Lactobacillus acidophilus* RSKK 03037	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2.	*Lactobacillus brevis* OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
3.	*Lactobacillus brevis* NRLL B21	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
4.	*Lactobacillus buhnerii* NRLL B1837	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
5.	*Lactobacillus caseii* RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
6.	*Lactobacillus caseii* CG1	ODTÜ Gıda Mühendisliği
7.	*Lactobacillus cremoris* RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
8.	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RSKK 594	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
9.	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 10697	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
10.	*Lactobacillus fermentum* NRLL B585	Ankara Üniveristesi Gıda Mühendisliği
11.	*Lactobacillus helveticus* AU	Ankara Üniveristesi Gıda Mühendisliği
12.	*Lactobacillus helveticus* HU	H.Ü. Biyoloji Bölümü
13.	*Lactobacillus maltoramicus* NRLL 148532	Ankara Üniveristesi Gıda Mühendisliği

14.	*Lactobacillus paraparacasei* STL	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
15.	*Lactobacillus pentosus* CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
16.	*Lactobacillus plantarum* Z111	ODTÜ Gıda Mühendisliği
17.	*Lactobacillus plantarum* DSM 20174	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
18.	*Lactobacillus plantarum* DSM 20246	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
19.	*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
20.	*Lactobacillus plantarum* 37	ODTÜ Gıda Mühendisliği
21.	*Lactobacillus plantarum* 73	ODTÜ Gıda Mühendisliği
22.	*Lactobacillus plantarum* 215L	ODTÜ Gıda Mühendisliği
23.	*Lactobacillus plantarum* 23	ODTÜ Gıda Mühendisliği
24.	*Lactobacillus plantarum* CG4	ODTÜ Gıda Mühendisliği
25.	*Lactobacillus plantarum* 1193	ODTÜ Gıda Mühendisliği
26.	*Lactobacillus plantarum* CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
27.	*Lactobacillus plantarum* APKS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
28.	*Lactobacillus plantarum* PYN	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
29.	*Lactobacillus plantarum* BF2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
30.	*Lactobacillus rhamnasus* TK2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

3.2 Yöntem

3.2.1 Laktik Asit Bakterilerinin aktifleştirilmesi

-86°C'de muhafaza edilen bakteri stok kültürleri gelişimleri için uygun olan steril sıvı besiyerlerine ardışık 3 pasaj yapılarak aktifleştirilmiştir. Katı besi yerine çizgi ekim neticesinde tek düşürülen koloniden DNA izolasyonu yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan bakteri gruplarından *Enterococcus, Lactococcus, Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait olan türler TGE besiyerinde (EK 1) 32°C'de, *Lactobacillus* cinsine ait olan türler ise MRS besiyerinde (EK 1) 30°C'de geliştirilmiştir.

3.2.2 RAPD-PCR

Araştırmada kullanılan RAPD tekniği üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar sırası ile; kromozomal (genomik) DNA izolasyonu, PCR uygulamaları ve sonuçların değerlendirilmesi (numerical analysis) başlıkları altında toplanabilir.

3.2.2.1 Laktik Asit Bakterilerinden kromozomal (genomik) DNA izolasyonu

Kromozomal DNA izolasyonu: Çalışmada kullanılan LAB grubuna ait toplam 86 suştan PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamalarında kit tarafından sağlanan prospektüs (EK 3) üzerinden birkaç değişikliğe gidilmiştir. Bu değişiklikler sırasıyla (i) elde edilen hücre miktarını arttırmak için toplam hücre hacminin 2 katına çıkarılması (ii) izopropanol ile DNA muamele edildikten sonra DNA'nın ipliksi yapıdaki zincirleri gözlemlenebilir bir kütle oluşturabilsin diye solüsyon buz üzerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ve bu zaman diliminde ependorf tüpün arada bir yavaş hareketlerle sallanması ve (iii) çalışma sonucunda elde edilen ve içerisinde DNA molekülünün bulunduğu pellet üzerine 40 µl kit tarafından temin edilen DNA Rehidrasyon solüsyonunun (Tris-EDTA) eklenmesi ve önce

65ºC'de 15 dk ardından 1 gece +4ºC'de inkübasyona bırakılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılacak şekilde 1:10 oranında dehidrasyon tamponu içerisinde seyreltilerek (5 µl DNA + 45 µl *dehidrasyon tamponu* veya) bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Bu arada ana stok DNA sı -80ºC de muhafaza edilmiştir.

Saflık (kalite) ve miktar tayini: Promega Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kit kullanımı ile izole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayinleri NANODROP spektrofotometrede seyreltilmemiş ana stok DNA'ların kullanımı (2µl) ile 3 paralel okuma yapılıp bu değerlerin ortalaması alınarak gerçekleştirilmiştir. DNA numunelerinin okunması için kontrol olarak dehidrasyon tamponu kullanılarak 260nm, 280nm, 260nm/280nm, 260/230nm değerleri ölçülmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenmiştir (Sambrook and Russell 2001).

Agaroz jel elektroforezi: Promega Wizard® Genomik DNA İzalasyon Kiti kullanımıyla izole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleri % 1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Sambrook and Russell 2001). Yatay jel elektroforezi için 3 gr agaroz, 300 ml 1XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulan jele % 2 Etidyum bromit (10mg/ml) çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş ve bir saat jelin polimerizasyonu için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde "tampon çözelti" (1XTBE) ilave edilmiştir. Ardından jelin hasar görmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdan uzaklaştırılmıştır. -20°C'de saklanan 1:10 seyreltilmiş DNA numuneleri bir süre oda sıcaklığında buz üzerinde bekletildikten sonra 3µl DNA numunesi üzerine 2 µl "yükleme boya çözeltisi" ilave edilerek mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 100 V'da 2.5-3 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak "supercoiled DNA ladder" kullanılmıştır (3µl markör + 2µl yükleme

boyası). Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jel KODAK JEL GÖRÜNTÜLEME (Gel Logic 200 Imaging System) cihazına yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2 RAPD-PCR uygulamaları

Kullanılan primerler: Çalışmada OPA, OPC, OPY, OPM, OPZ, OPY ve NAPS serilerinden rastgele seçilmiş toplam 27 adet RAPD oligonükleotitleri denenmiştir. Bunların arasından tutarlı sonuç veren (yüksek bant sayısı ve tekrarlanabilirlik) 15 tanesi (NAPS 5, NAPS6, NAPS23, NAPS34, NAPS38, NAPS432, NAPS499, NAPS564, OPA 01, OPA 07, OPA 08, OPA12, OPA16, OPM 05, OPY 10) çalışmadaki 86 adet suşun RAPD analizleri için kullanılmıştır. Denenen primerler, baz dizilişleri ve % G+C oranları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

PCR amplifikasyonu ve optimizasyonu: Laktik asit bakterilerine ait 5 genus'u temsilen seçilen 5 adet suş (*Enterococcus faecalis* OZ1*, Pediococcus acidilactici cereviciae* ATCC 666*, Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris, Lactococcus lactis* OZ1 *ve Lactobacillus plantarum* DSM 20174) üzerinden optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonda göz önünde bulundurulan temel parametreler arasında PCR reaksiyonlarında kullanılacak $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi ve toplam 27 oligonükleotit arasından çalışan oligonükleotitlerin primer olarak seçimi yer almaktadır. (i) PCR reaksiyonlarında kullanılacak $MgCl_2$ konsantrasyonunun belirlenmesi için 2 farklı protokol OPA 08 primerinin (5' GTG ACG TAG G 3') kullanıldığı çalışmada denenmiş (Çizelge 3.3) ve "Gradient PCR thermocyler/Eppendorf" cihazında, detayları aşağıda verilen amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu program; ön denatürasyon basamağının (94°C'de 5 dakika) ardından gerçekleşen ve her biri kendi içinde 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 35°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 35 döngüden oluşmaktadır. Son olarak 72°C de 8 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır.

Çizelge 3.2 RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, baz dizilişleri ve % G+C değerleri

	Kullanılan primerler* (Kod numarası)	**Baz dizisi 5'→3'**	**G+C (%)**
1	NAPS 5	CCT GGG TTC C	70%
2	NAPS 6	CCT GGG CCT A	70%
3	NAPS 23	CCC GCC TTC C	80%
4	NAPS 34	CCG GCC CCA A	80%
5	NAPS 38	CCG GGG AAA A	60%
6	NAPS 432	AGC GTC GAC T	60%
7	NAPS 499	GGC CGA TGA T	60%
8	NAPS 564	CGG CGT TAC G	70%
9	OPA 01	CAG GCC CTT C	70%
10	OPA 07	GAA ACG GGT G	60%
11	OPA 08	GTG ACG TAG G	60%
12	OPA 12	TCG GCG ATA G	60%
13	OPA 16	AGC CAG CGA A	60%
14	OPY 10	CAA ACG TGG G	60%
15	OPM 05	GGG AAC GTG T	60%
16	OPA 07	GAA ACG GGT G	60%
17	OPY 18	GTG GAG TCA G	60%
18	OPZ 10	CCG ACA AAC C	60%
19	OPZ 19	GTG CGA GCA A	60%
20	NAPS 30	CCG GCC TTA G	70%
21	NAPS 44	TTA CCC CGG C	70%
22	OPC 13	AAG CCT CGT C	60%
23	OPA 15	TTC CGA ACC C	60%
24	NAPS 495	CTT TCC TTC C	50%
25	NAPS 571	GCG CGG CAC T	80%
26	NAPS 660	AGA CGC CGA C	70%
27	NAPS 790	GGG TGT GGT T	60%

Çizelge 3.3 PCR reaksiyon karışımları

Reaksiyon Bileşimi	Protokol No. 1 (µl)	Protokol No. 2 (µl)
Su	5.5	4.5
DNA (1:10 seyreltilmiş)	3	3
5X KCl Colorless Buffer	5	5
$MgCl_2$ (25 Mm)	2.5	3.5
dNTP (2.5 Mm)	2	2
Primer OPA 08 (10 µmol)	4	4
Taq DNA polimeraz (50 ünite)	3	3
Toplam Hacim(µl)	25	25

(ii) OPA 08 primer kullanımı ile optimizasyonu yapılan yöntem (Protokol 2), toplam 27 oligonükleotit arasından daha tutarlı sonuç veren oligonükleotitlerin uygun primer olarak seçimi için kullanılmıştır. PCR döngüsü için daha önce belirtilen amplifikasyon koşulları kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi: 56 kuyucuklu jel plakalarında gerçekleştirilecek olan jel elektroforezi için 4.8 gr agaroz, 300 ml 1XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C'ye kadar indirilen jele % 4 Etidyum bromit (10mg/ml) solüsyonu eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş ve bir saat jelin donması için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde "tampon çözelti" (1XTBE) ilave edilmiştir. Jelin hasar görmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdan uzaklaştırılmıştır. 25 µl toplam hacme sahip PCR amplifikasyon ürününün tamamına 5 µl yükleme boyası eklenerek % 1.6 agaroz jel üzerinde koşturulmuştur. Elektroforez 100 V'da yaklaşık 3.5 saat yapılmıştır (Sambrook and Russell 2001). Çalışmada markör olarak yüklemeye hazır "GeneRuler^{TM} 100bp DNA Ladder Plus" (5 µl) kullanılmıştır. Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jel KODAK JEL GÖRÜNTÜLEME (Gel Logic 200 Imaging System) cihazına

yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3 Sonuçların değerlendirilmesi

Bu amaç için Gel Compar II, comparative analysis of electrophoresis patterns, version 4.1 (Applied Maths/Belgium) yazılım paket programı kullanılmıştır. Agaroz Jel üzerinde PCR amplifikasyon ürünlerinin oluşturdukları bantlar KODAK Görüntüleme Sisteminde görüntülenip TIFF formatında depolandıktan sonra TIFF dosyaları bu software ile çalışabilecek dosya formatına dönüştürülmüş (8 bit) ve elde edilen görüntü üzerindeki RAPD bantları arasındaki benzerlik "Pearson product moment correlation coefficient (Pearson korelasyon katsayısı)" değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılarak neticede türler arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiştir (Vauterin and Vauterin 1992).

4. BULGULAR

4.1 DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Çalışmanın ana noktasını ve materyalini oluşturan basamak kromozomal DNA molekülünün izolasyonudur. Başarılı bir izolasyonun ardından ana materyal olarak kullanılacak DNA molekülü diğer basamaklar için temel oluşturmaktadır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz 86 adet laktik asit bakterisine ait kromozomal DNA molekülü PROMEGA Wizard Kromozomal DNA Purifikasyon Kit sistemi kullanılarak izole edilmiş ve NANODROP spektrofotometre kullanılarak DNA konsantrasyonu ng/µl olarak Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları

BAKTERİ ADI	**KONSANTRASYON (ng/µl)**	**OD_{260}**	**OD_{280}**	**OD 260/280**	**OD 260/230**
Enterococus					
Enterococcus avium ATCC Pasteur (RSKK 500)	880,78	17,616	8,742	2,02	2,2
Enterococcus casseliflavus NRLL 3502	1043,67	20,873	10,664	1,96	2,01
Enterococcus durans RSKK 05034	354,43	7,089	3,57	1,99	1,96
Enterococcus faecalis OZ1	348,28	6,966	3,524	1,98	1,98
Enterococcus faecalis H	521,39	10,428	5,575	1,87	1,75
Enterococcus faecalis E27	812,24	16,245	8,143	1,99	2,07
Enterococcus faecalis EF1	484,88	9,698	4,944	1,96	2,08
Enterococcus faecalis ATCC 29212	1237,45	24,749	12,205	2,03	2,14
Enterococcus faecium ATCC 6057	876,41	17,528	8,567	2,05	2,26
Enterococcus faecium F1	717,65	14,353	7,028	2,04	2,11
Enterococcus faecium H	357,03	7,141	3,615	1,98	2,05
Lactococus					
Lactococcus lactis OZ1	1949,86	38,997	19,107	2,04	2,14
Lactococcus lactis OZ2	2949,9	58,998	28,609	2,06	2,27
Lactococcus lactis OZ3	1740,43	34,809	17,216	2,02	2,15
Lactococcus lactis OZ4	1819,22	36,384	17,844	2,04	2,17
Lactococcus lactis W1	985,46	19,709	9,678	2,04	2,21
Lactococcus lactis W2	2696,72	53,934	25,78	2,09	2,39
Lactococcus lactis W3	451,5	9,03	4,53	1,99	2,12
Lactococcus lactis PK1	999,59	19,992	9,657	2,07	2,17
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018	1107,95	22,159	10,968	2,02	2,08
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* NRLL B634	1445,71	28,914	14,254	2,03	2,23
Pediococus					
Pediococcus acidilactici NRLL B4958	1087,77	21,755	10,621	2,05	2,23
Pediococcus acidilactici 2N 10P	1479,07	29,581	14,542	2,03	2,08
Pediococcus acidilactici $E2^{++}$	952,43	19,049	9,53	2	2,14
Pediococcus acidilactici RS2	1279,62	25,592	12,806	2	2,14
Pediococcus acidilactici PBF	1414,13	28,283	14,045	2,01	2,22
Pediococcus acidilactici $F2^{+}$	547,77	10,955	5,48	2	2,08
Pediococcus acidilactici E^{++}	983,83	19,677	10,04	1,96	1,9
Pediococcus accidilactici /cereviciae ATCC 666	2253,88	45,078	21,964	2,05	2,28
Pediococcus dextranicus 2N 1P	2235,02	44,7	22,69	1,97	1,99
Pediococcus pentosaceus DT1	710,34	14,207	7,096	2	1,98
Pediococcus pentosaceus DT10	1741,23	34,825	17,179	2,03	2,29
Pediococcus pentosaceus KS2	610,72	12,214	6,02	2,03	2,05
Pediococcus pentosaceus TK3	280,86	5,617	2,908	1,93	1,81

Çizelge 4.1 (devam)

Pediococcus pentosaceus KPR	989,28	19,786	9,684	2,04	2,2
Pediococcus pentosaceus TS1	1092,53	21,851	10,883	2,01	2,17
Pediococcus pentosaceus ST3	383,05	7,661	4,151	1,85	1,74
Pediococcus pentosaceus BY1	1715,5	34,31	17,016	2,02	2,19
Pediococcus pentosaceus P1	1188,1	23,762	11,849	2,01	2,14
Pediococcus pentosaceus P7	416,81	8,336	4,13	2,02	1,97
Pediococcus pentosaceus P20	910,36	18,207	9,184	1,98	1,9
Pediococcus pentosaceus A9	816,14	16,323	8,053	2,03	2,1
Pediococcus pentosaceus A12	863,25	17,265	8,6185	2,005	2
Pediococcus pentosaceus DH2	331,92	6,638	3,379	1,96	1,92
Pediococcus pentosaceus DH3	2488,49	49,77	24,389	2,04	2,28
Pediococcus pentosaceus PH2	1096,31	21,926	10,895	2,01	2,13
Pediococcus pentosaceus MCO31	2209,87	44,197	21,994	2,01	2,03
Pediococcus pentosaceus 345	1417,9	28,358	13,684	2,07	2,27
Leuconostoc					
Leuconostoc lysis	1228,91	24,578	11,698	2,05	2,32
Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469	590,05	11,801	5,922	1,99	2,25
Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061	1309,61	26,192	13,435	1,95	1,69
Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ	1773,96	35,479	17,264	2,06	2,22
Leuconostoc sp. OZ1	1082,98	21,66	10,74	2,02	2,14
Leuconostoc sp. OZ2	2022,51	40,45	20.178	2	2,12
Leuconostoc sp. OZ3	2905,77	58.115	28.399	2,05	2,06
Leuconostoc sp. OZ4	2039,86	40,797	19,81	2,06	2,38
Lactobacillus					
Lactobacillus acidophilus RSKK 03037	1745,57	34,911	17,127	2,04	2,08
Lactobacillus brevis OZ1	532,67	10,653	5,553	1,92	2,21
Lactobacillus brevis NRLL B21	2551,93	51,039	25,054	2,04	2,33
Lactobacillus buhnerii NRLL B1837	839,17	16,783	8,541	1,96	1,78
Lactobacillus caseii RSKK 706	1834,66	36,693	18,119	2,03	2,21
Lactobacillus caseii CG1	1174,28	23,486	11,438	2,05	2,2
Lactobacillus cremoris RSKK 708	2256,28	45,126	22,956	1,97	1,95
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594	1582,3	31,646	16,432	1,93	1,69
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697	351,71	7,034	3,475	2,02	2,06
Lactobacillus fermentum NRLL B585	680,54	13,611	6,634	2,05	2,09
Lactobacillus helveticus AU	1904,32	38,086	19,316	1,97	1,73
Lactobacillus helveticus HU	1241,56	24,831	12,331	2,01	2
Lactobacillus maltoramicus NRLL 148532	552,13	11,043	5,641	1,96	1,64

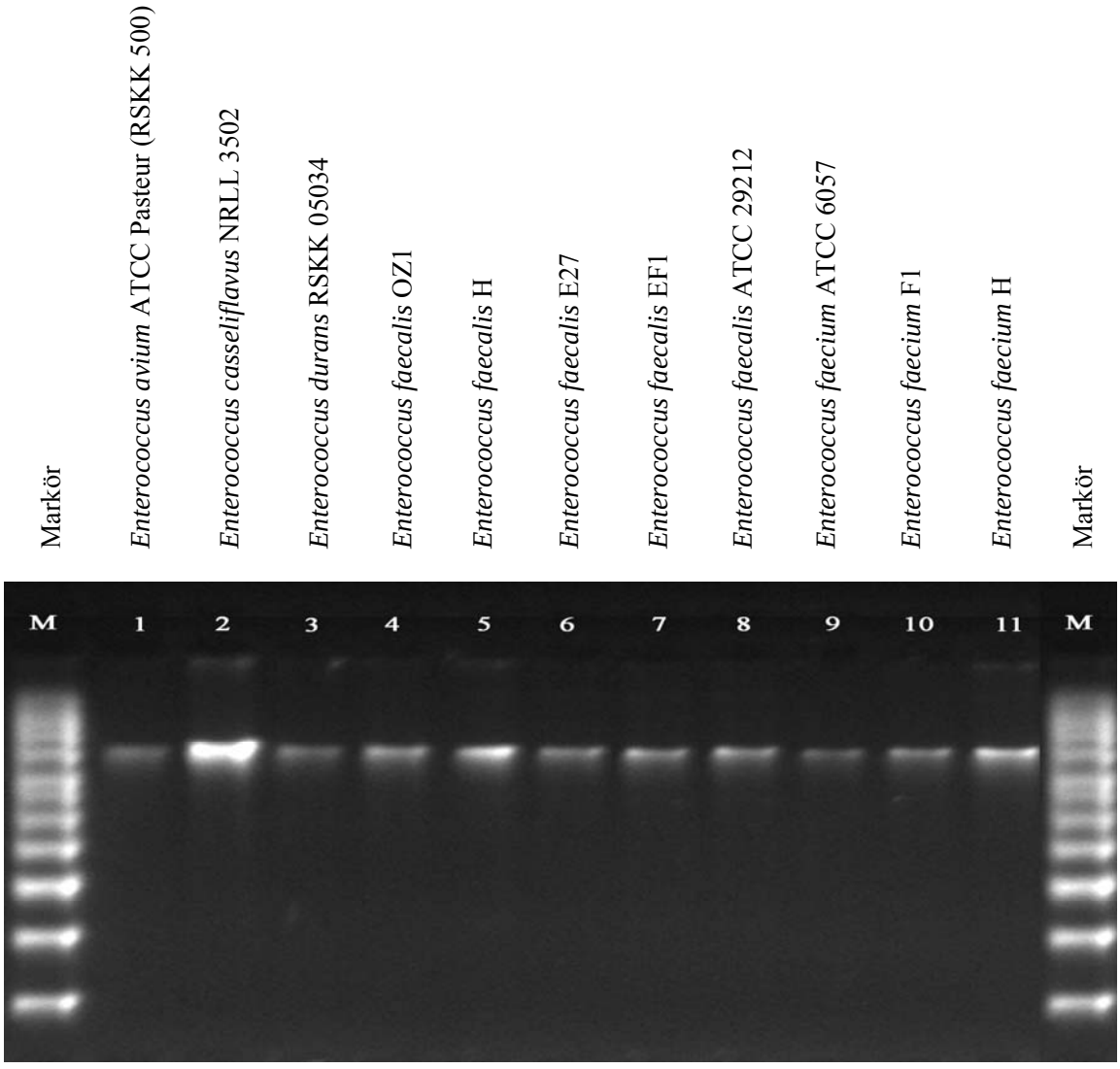
Çizelge 4.1 (devam)

Lactobacillus paraparacasei STL	1062,73	21,255	10,621	2	2,04
Lactobacillus pentosus CG	1371,65	27,433	13,846	1,98	2,05
Lactobacillus plantarum Z111	1370,13	27,403	13,68	2	2,07
Lactobacillus plantarum DSM 20174	1945,61	38,912	19,623	1,98	2
Lactobacillus plantarum DSM 20246	446,28	8,926	4,545	1,96	2,02
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	2824,04	56,481	28,266	2	2,14
Lactobacillus plantarum 37	1900,93	38,019	19,033	2	2,18
Lactobacillus plantarum 73	1208,3	24,166	12,002	2,01	1,83
Lactobacillus plantarum 215 L	1658,63	33,173	16,752	1,98	1,92
Lactobacillus plantarum 23	1449,19	28,984	15,711	1,84	1,61
Lactobacillus plantarum CG4	1589,57	31,791	16,084	1,98	1,91
Lactobacillus plantarum 1193	698,82	13,976	7,277	1,92	1,59
Lactobacillus plantarum CG	1144,195	22,8835	11,6805	1,95	1,75
Lactobacillus plantarum APKS2	1473,85	29,477	14,687	2,01	2,18
Lactobacillus plantarum PYN	1779,14	35,583	17,592	2,02	2,1
Lactobacillus plantarum BF2	591,82	11,836	6,114	1,94	1,8
Lactobacillus rhamnasus TK2	1622,08	32,442	16,497	1,97	1,77

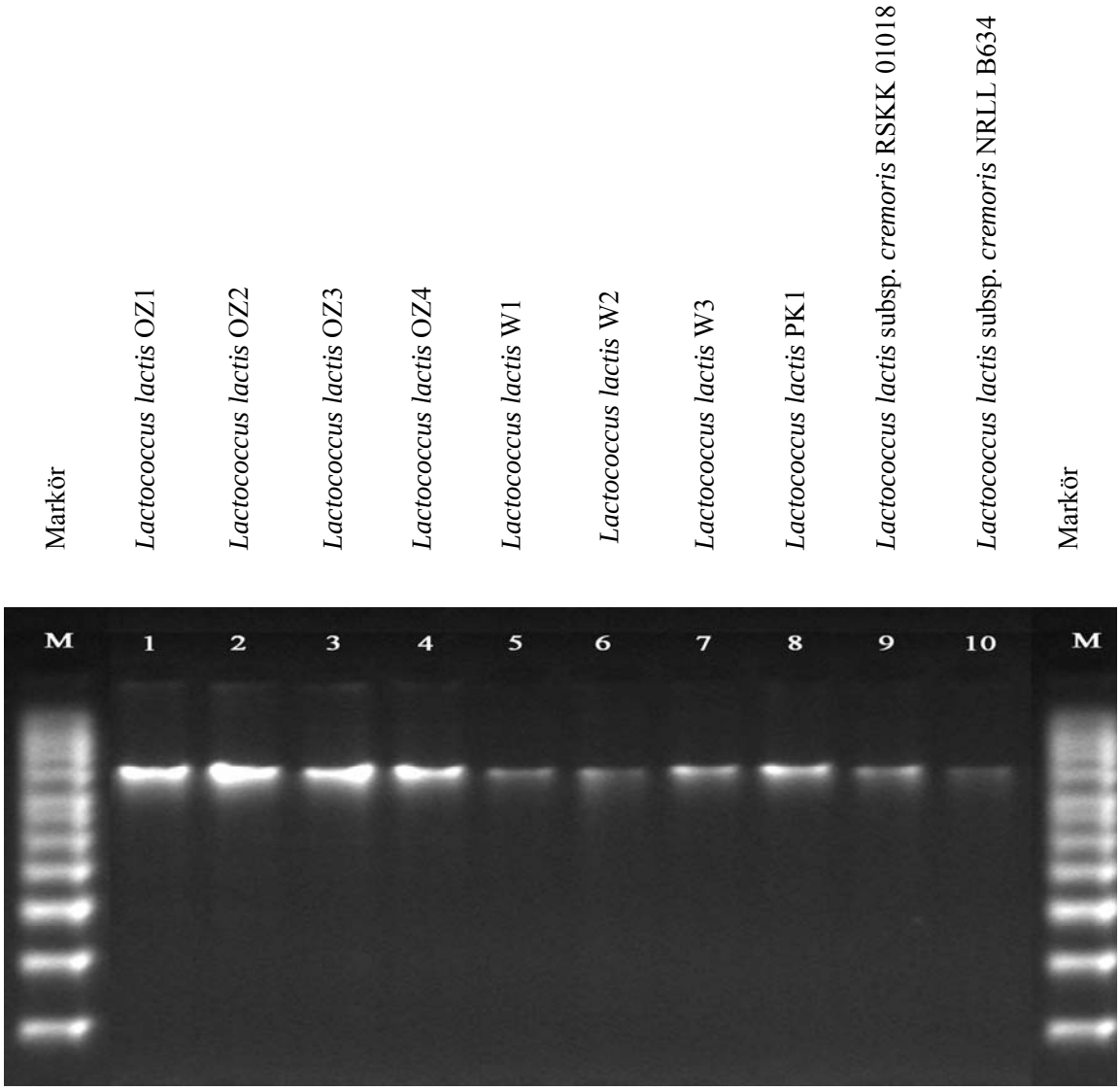
OD_{260} nm, DNA molekülünün absorbe edildiği dalga boyudur. Bu değer numunedeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (OD_{260} da 1= 50 µl/ml DNA). 280 nm'de okunan absorbans değeri OD_{260}/ OD_{280} oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır ve teorik olarak OD_{260}/ OD_{280} değerinin 1.75-2.0 arasında olması gerekmektedir. 1.75-2.0 arasında tespit edilen OD_{260}/ OD_{280} oranı UV skaladaki absorbsiyonun nükleik asitlerden kaynaklandığı anlamına gelmektedir. Bununla beraber, 1.75'den daha düşük OD_{260}/ OD_{280} oranı protein ve diğer UV absorbe edicilerin varlığını, 2.0'dan daha büyük OD_{260}/ OD_{280} oranı ise numunenin kloroform veya fenol ile kontamine olmuş olabileceğini göstermektedir. Nükleik asit saflığının tespitinde kullanılan bir diğer ölçüm OD_{260}/ OD_{230} oranıdır ancak OD_{260}/ OD_{280} oranına göre daha az hassas olan ve kullanılan bir değerdir.

4.2 Kromozomal (Genomik) DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

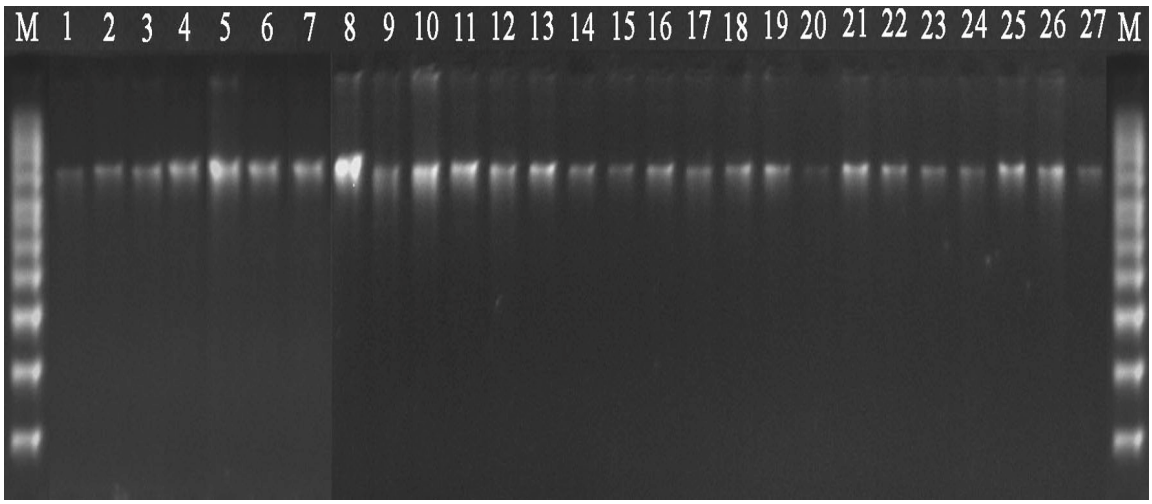
Promega Wizard DNA izolasyon kit kullanımı ile izole edilen ve elektroforezi % 1 agaroz içeren 0.02 µl/ml EtBr eklenmiş jellerde yapılan kromozomal DNA moleküllerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1-4.5'de verilmiştir.



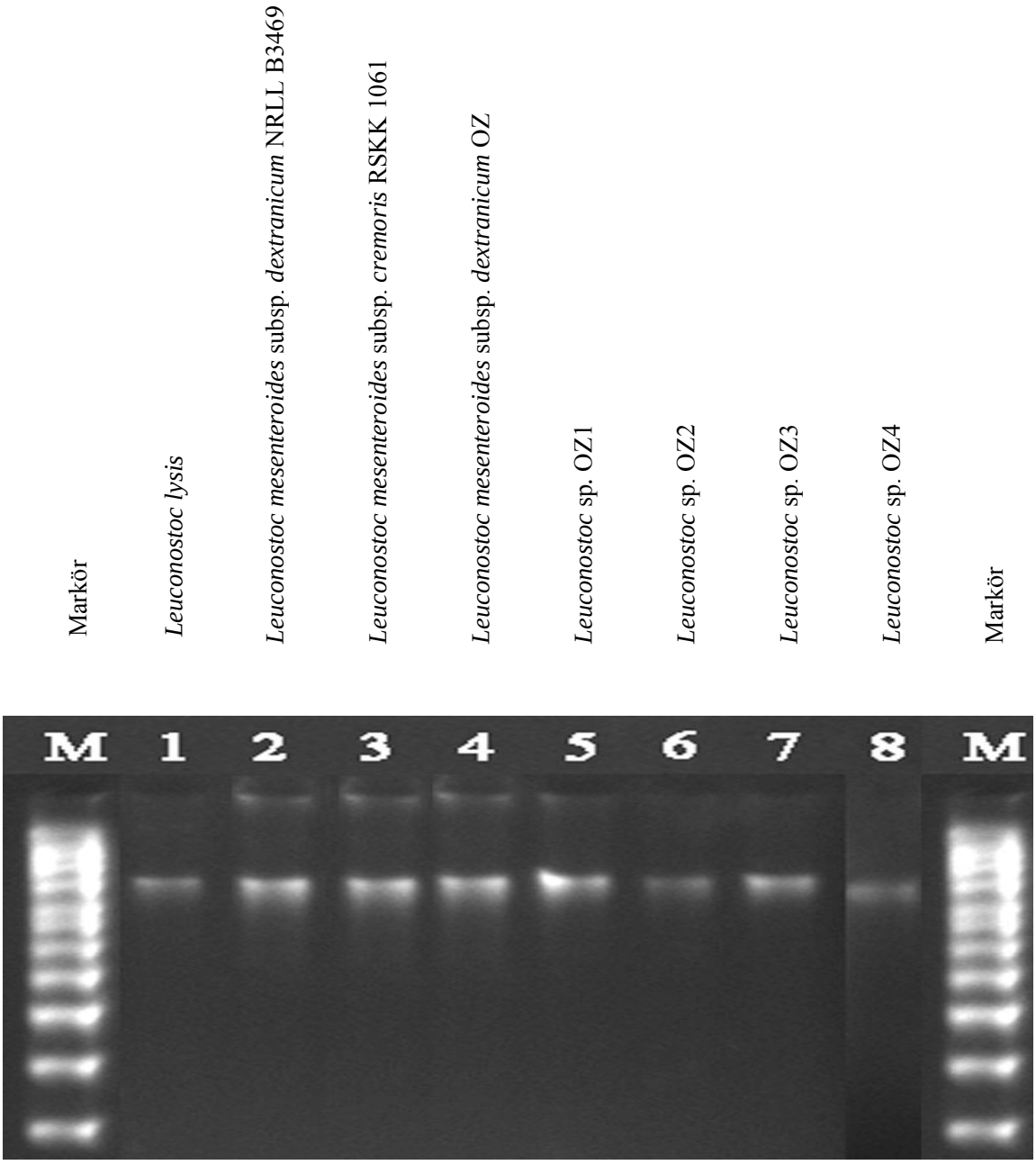
Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan *Enterococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar



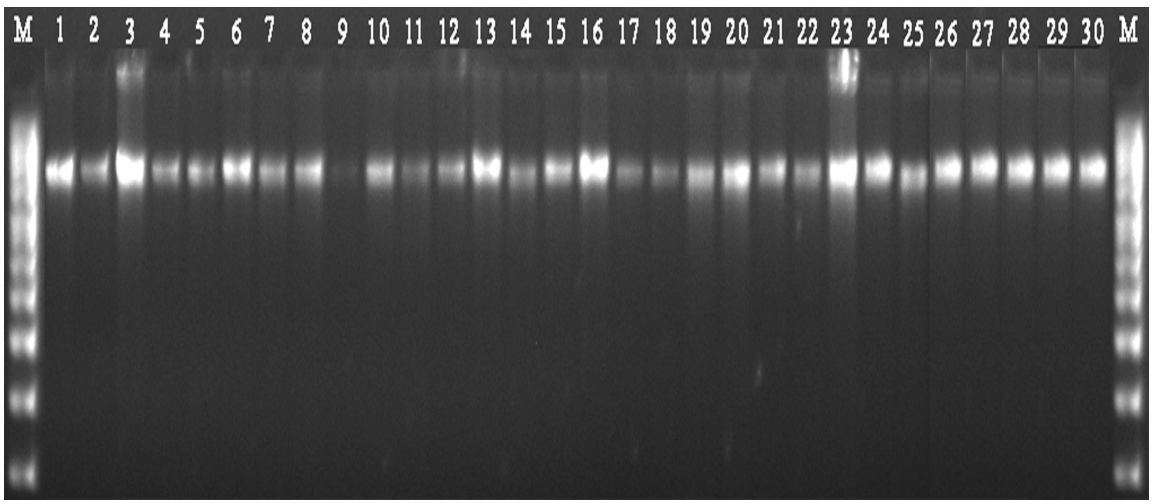
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan *Lactococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar



Şekil 4.3 Çalışmada kullanılan *Pediococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar



Şekil 4.4 Çalışmada kullanılan *Leuconostoc* suşlarına ait kromozomal DNA'lar



Şekil 4.5 Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar

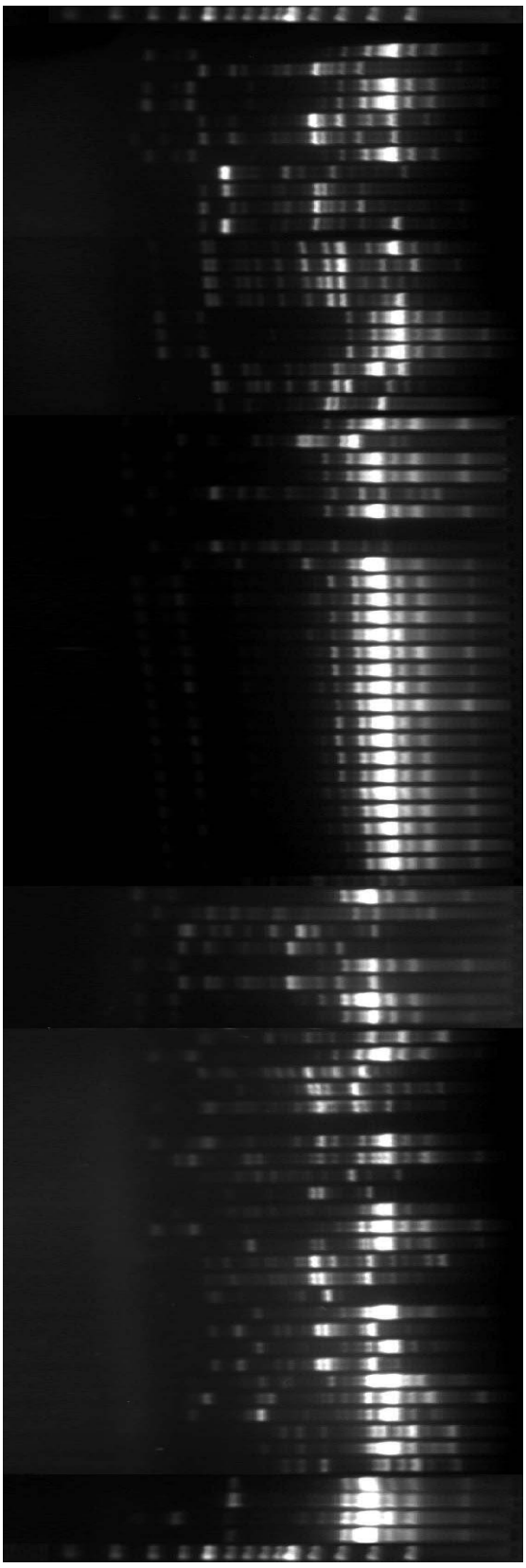
4.3 PCR Uygulamaları

İzole edilen genomik DNA'lar, 10-15 baz çiftinden oluşan sekansı rastgele seçilen primerler kullanılarak PCR işlemine tabii tutulmuştur. Her bir RAPD PCR reaksiyonu ön denemeler sonucu belirlenen en uygun amplifikasyon içeriklerine sahip toplam 25 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir.

RAPD PCR çalışmasında kullanılan protokol, ön denatürasyon basamağının (94°C de 5 dak) ardından gerçekleşen ve her biri kendi içinde 94°C de 30sn denatürasyon, 35°C de 1 dak primer bağlanması ve 72°C de 1 dak 45 sn uzama basamaklarından meydana gelen toplam 35 döngüden oluşmaktadır. Son olarak 72°C de 8 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır. Karışım 4°C ye getirildikten sonra elektroforez işlemi gerçekleştirilene kadar -20°C de bekletilmiştir.

4.4 Agaroz Jel Elektroforezi

RAPD-PCR DNA ürünleri daha sonra 0.02 µl/ml EtBr içeren % 1.6'lık agaroz jellerde her bir primer için eşit süre zarfında yürütüldükten sonra KODAK jel görüntüleme cihazında jellerin görüntüsü alınmış ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.6 - 4.20).

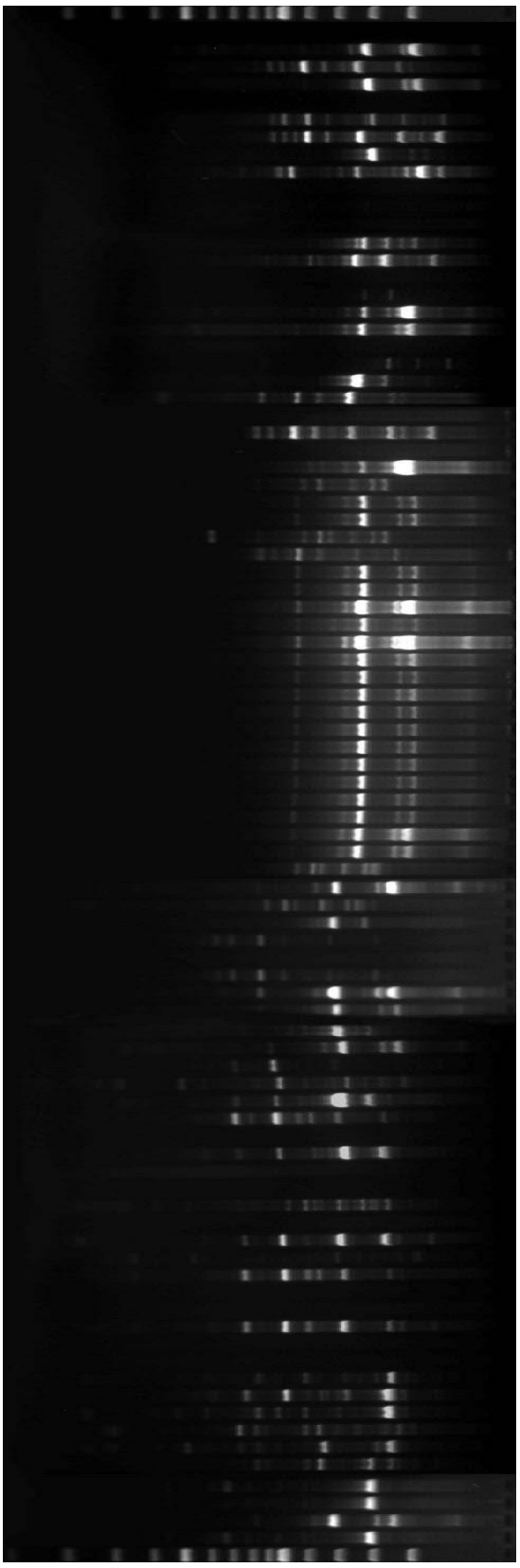


Supercoiled DNA ladder
Kontrol
E.avium RSKK 500
E. casseliflavus NRLL 3502
E.durans RSKK 05034
E.faecalis OZ1
E.faecalis H
E.faecalis E27
E.faecalis EF1
E.faecalis ATCC 29212
E.faecium ATCC 6057
E.faecium F1
E.faecium H
Lc. lactis OZ1
Lc. lactis OZ2
Lc. lactis OZ3
Lc. lactis OZ4
Lc. lactis W1
Lc. lactis W2
Lc. lactis W3
Lc. lactis PK1
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634
Ped. acidilactici NRLL B4958
Ped. acidilactici 2 N 10P
Ped. acidilactici E2++
Ped. acidilactici RS2
Ped. acidilactici AB6
Ped. acidilactici F2+
Ped. acidilactici E++
Ped. accidilactici cereviciae ATCC 666
Ped. dextranicus 2N 1P
Ped. pentosaceus DT1
Ped. pentosaceus DT10
Ped. pentosaceus KS2
Ped. pentosaceus TK3
Ped. pentosaceus KPR
Ped. pentosaceus TS1
Ped. pentosaceus ST3
Ped. pentosaceus BY1
Ped. pentosaceus P1
Ped. pentosaceus P7
Ped. pentosaceus P20
Ped. pentosaceus A9
Ped. pentosaceus A12
Ped. pentosaceus DH2
Ped. pentosaceus DH3
Ped. pentosaceus PH2
Ped. pentosaceus MCO31
Ped. pentosaceus 345
Leu. lysis
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ
Leu. sp. OZ1
Leu. sp. OZ2
Leu. sp. OZ3
Leu. sp. OZ4
Lb. acidophilus RSKK 03037
Lb. brevis OZ1
Lb. brevis NRLL-B 21
Lb. buhnerii NRLL B1837
Lb. caseii RSKK 706
Lb. caseii CG1
Lb. cremoris RSKK 708
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594
Lb. delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697
Lb. fermentum NRLL B585
Lb. helveticus AU
Lb. helveticus HU
Lb. maltoramicus NRLL148532
Lb. paraparacasei STL
Lb. pentosus CG
Lb. plantarum Z111
Lb. plantarum DSM 20174
Lb. plantarum DSM 20246
Lb. plantarum ATCC 8014
Lb. plantarum 37
Lb. plantarum 73
Lb. plantarum 215 L
Lb. plantarum 23
Lb. plantarum CG4
Lb. plantarum 1193
Lb. plantarum CG
Lb. plantarum APKS2
Lb. plantarum PYN
Lb. plantarum BF2
Lb. rhamnasus TK 2
Supercoiled DNA ladder

Şekil 4.6 NAPS 5 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

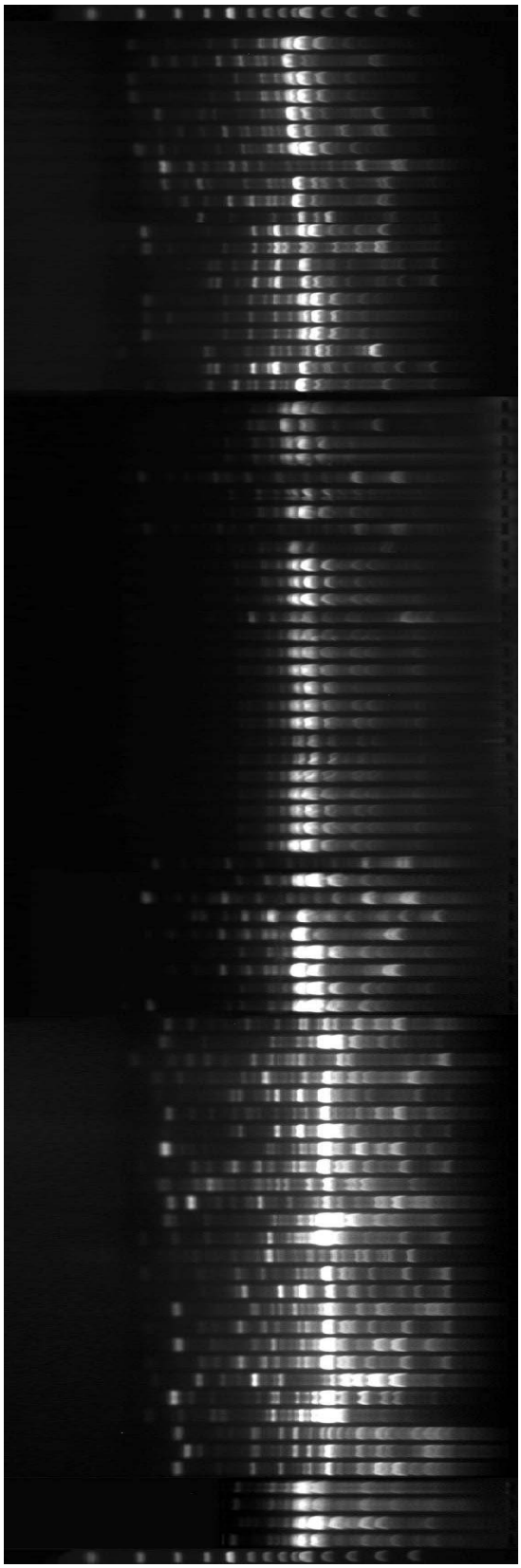
Şekil 4.7 NAPS 6 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.8 NAPS 23 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Supercoiled DNA ladder
Kontrol
E.avium RSKK 500
E. casseliflavus NRLL 3502
E.durans RSKK 05034
E.faecalis OZ1
E.faecalis H
E.faecalis E27
E.faecalis EF1
E.faecalis ATCC 29212
E.faecium ATCC 6057
E.faecium F1
E.faecium H
Lc. lactis OZ1
Lc. lactis OZ2
Lc. lactis OZ3
Lc. lactis OZ4
Lc. lactis W1
Lc. lactis W2
Lc. lactis W3
Lc. lactis PK1
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634
Ped. acidilactici NRLL B4958
Ped. acidilactici 2 N 10P
Ped. acidilactici E2++
Ped. acidilactici RS2
Ped. acidilactici AB6
Ped. acidilactici F2+
Ped. acidilactici E++
Ped. accidilactici cereviciae ATCC 666
Ped. dextranicus 2N 1P
Ped. pentosaceus DT1
Ped. pentosaceus DT10
Ped. pentosaceus KS2
Ped. pentosaceus TK3
Ped. pentosaceus KPR
Ped. pentosaceus TS1
Ped. pentosaceus ST3
Ped. pentosaceus BY1
Ped. pentosaceus P1
Ped. pentosaceus P7
Ped. pentosaceus P20
Ped. pentosaceus A9
Ped. pentosaceus A12
Ped. pentosaceus DH2
Ped. pentosaceus DH3
Ped. pentosaceus PH2
Ped. pentosaceus MCO31
Ped. pentosaceus 345
Leu. lysis
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ
Leu. sp. OZ1
Leu. sp. OZ2
Leu. sp. OZ3
Leu. sp. OZ4
Lb. acidophilus RSKK 03037
Lb. brevis OZ1
Lb. brevis NRLL-B 21
Lb. buhnerii NRLL B1837
Lb. caseii RSKK 706
Lb. caseii CG1
Lb. cremoris RSKK 708
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594
Lb. delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697
Lb. fermentum NRLL B585
Lb. helveticus AU
Lb. helveticus HU
Lb. maltoramicus NRLL148532
Lb. paraparacasei STL
Lb. pentosus CG
Lb. plantarum Z111
Lb. plantarum DSM 20174
Lb. plantarum DSM 20246
Lb. plantarum ATCC 8014
Lb. plantarum 37
Lb. plantarum 73
Lb. plantarum 215 L
Lb. plantarum 23
Lb. plantarum CG4
Lb. plantarum 1193
Lb. plantarum CG
Lb. plantarum APKS2
Lb. plantarum PYN
Lb. plantarum BF2
Lb. rhamnasus TK 2
Supercoiled DNA ladder

Şekil 4.9 NAPS 34 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Supercoiled DNA ladder
Kontrol
E.avium RSKK 500
E. casseliflavus NRLL 3502
E.durans RSKK 05034
E.faecalis OZ1
E.faecalis H
E.faecalis E27
E.faecalis EF1
E.faecalis ATCC 29212
E.faecium ATCC 6057
E.faecium F1
E.faecium H
Lc. lactis OZ1
Lc. lactis OZ2
Lc. lactis OZ3
Lc. lactis OZ4
Lc. lactis W1
Lc. lactis W2
Lc. lactis W3
Lc. lactis PK1
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634
Ped. acidilactici NRLL B4958
Ped. acidilactici 2 N 10P
Ped. acidilactici E2++
Ped. acidilactici RS2
Ped. acidilactici AB6
Ped. acidilactici F2+
Ped. acidilactici E++
Ped. accidilactici cereviciae ATCC 666
Ped. dextranicus 2N 1P
Ped. pentosaceus DT1
Ped. pentosaceus DT10
Ped. pentosaceus KS2
Ped. pentosaceus TK3
Ped. pentosaceus KPR
Ped. pentosaceus TS1
Ped. pentosaceus ST3
Ped. pentosaceus BY1
Ped. pentosaceus P1
Ped. pentosaceus P7
Ped. pentosaceus P20
Ped. pentosaceus A9
Ped. pentosaceus A12
Ped. pentosaceus DH2
Ped. pentosaceus DH3
Ped. pentosaceus PH2
Ped. pentosaceus MCO31
Ped. pentosaceus 345
Leu. lysis
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ
Leu. sp. OZ1
Leu. sp. OZ2
Leu. sp. OZ3
Leu. sp. OZ4
Lb. acidophilus RSKK 03037
Lb. brevis OZ1
Lb. brevis NRLL-B 21
Lb. buhnerii NRLL B1837
Lb. caseii RSKK 706
Lb. caseii CG1
Lb. cremoris RSKK 708
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594
Lb. delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697
Lb. fermentum NRLL B585
Lb. helveticus AU
Lb. helveticus HU
Lb. maltoramicus NRLL148532
Lb. paraparacasei STL
Lb. pentosus CG
Lb. plantarum Z111
Lb. plantarum DSM 20174
Lb. plantarum DSM 20246
Lb. plantarum ATCC 8014
Lb. plantarum 37
Lb. plantarum 73
Lb. plantarum 215 L
Lb. plantarum 23
Lb. plantarum CG4
Lb. plantarum 1193
Lb. plantarum CG
Lb. plantarum APKS2
Lb. plantarum PYN
Lb. plantarum BF2
Lb. rhamnasus TK 2
Supercoiled DNA ladder

Şekil 4.10 NAPS 38 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.11 NAPS 432 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

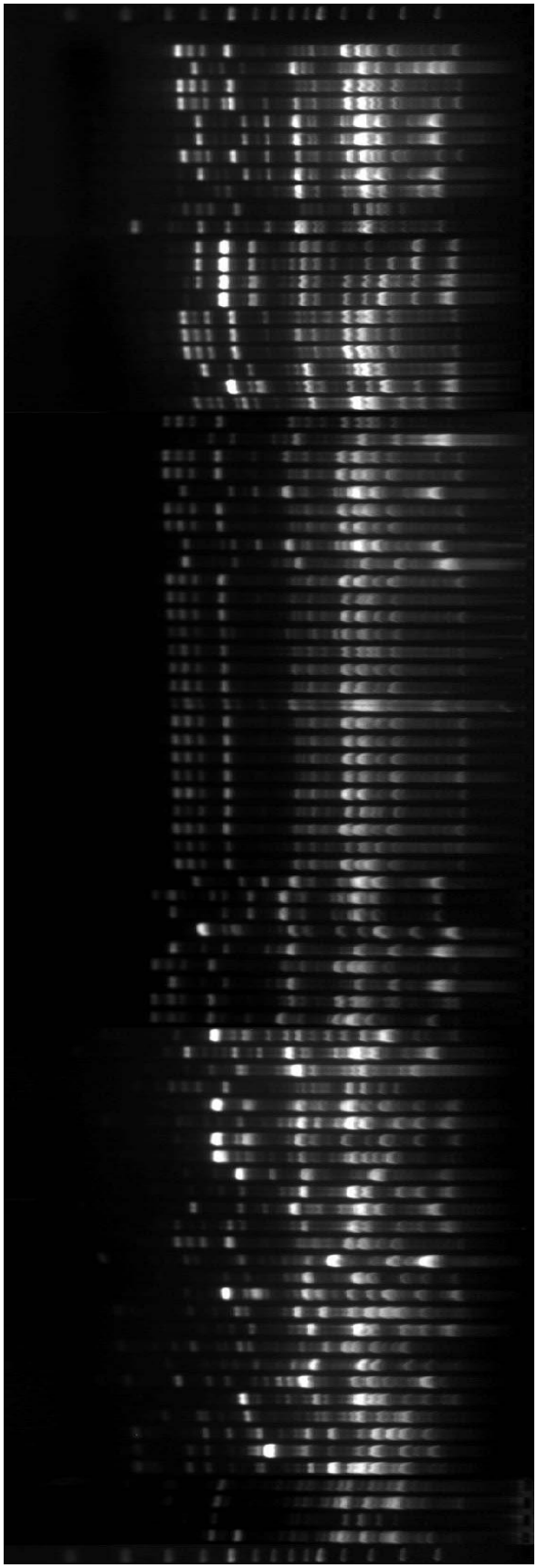
Şekil 4.12 NAPS 499 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.13 NAPS 564 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.14 OPA 01 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.15 OPA 07 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.16 OPA 08 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

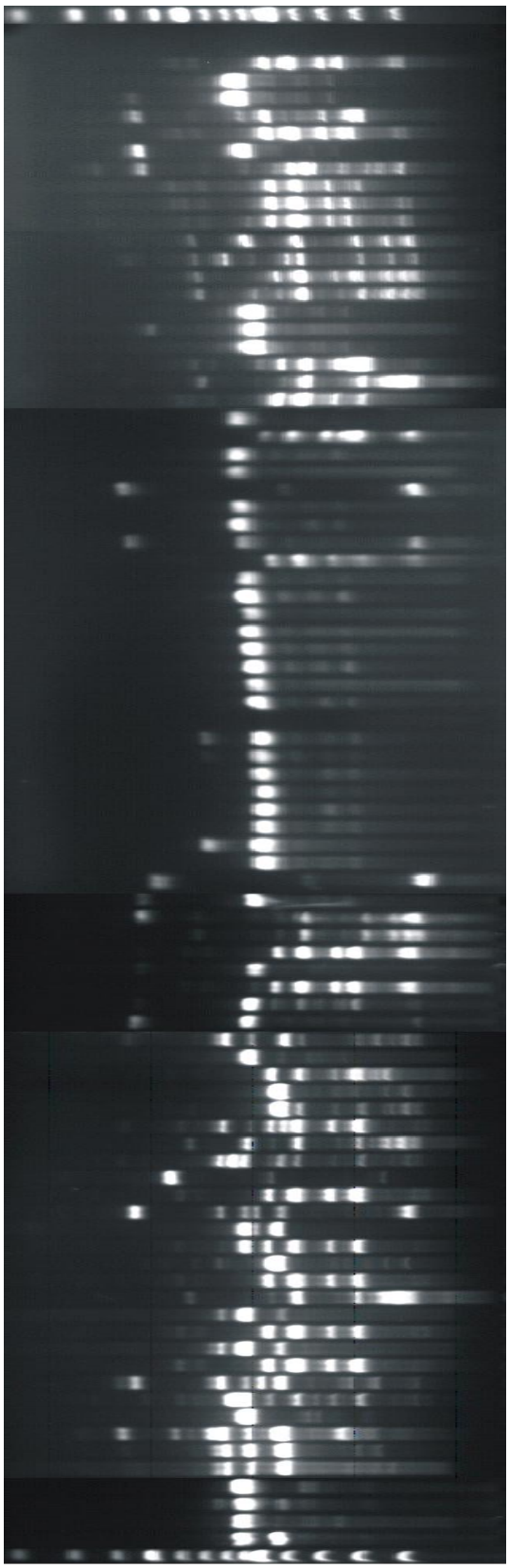


Supercoiled DNA ladder
Kontrol
E.avium RSKK 500
E. casseliflavus NRLL 3502
E.durans RSKK 05034
E.faecalis OZ1
E.faecalis H
E.faecalis E27
E.faecalis EF1
E.faecalis ATCC 29212
E.faecium ATCC 6057
E.faecium F1
E.faecium H
Lc. lactis OZ1
Lc. lactis OZ2
Lc. lactis OZ3
Lc. lactis OZ4
Lc. lactis W1
Lc. lactis W2
Lc. lactis W3
Lc. lactis PK1
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634
Ped. acidilactici NRLL B4958
Ped. acidilactici 2 N 10P
Ped. acidilactici E2++
Ped. acidilactici RS2
Ped. acidilactici AB6
Ped. acidilactici F2+
Ped. acidilactici E++
Ped. accidilactici cereviciae ATCC 666
Ped. dextranicus 2N 1P
Ped. pentosaceus DT1
Ped. pentosaceus DT10
Ped. pentosaceus KS2
Ped. pentosaceus TK3
Ped. pentosaceus KPR
Ped. pentosaceus TS1
Ped. pentosaceus ST3
Ped. pentosaceus BY1
Ped. pentosaceus P1
Ped. pentosaceus P7
Ped. pentosaceus P20
Ped. pentosaceus A9
Ped. pentosaceus A12
Ped. pentosaceus DH2
Ped. pentosaceus DH3
Ped. pentosaceus PH2
Ped. pentosaceus MCO31
Ped. pentosaceus 345
Leu. lysis
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ
Leu. sp. OZ1
Leu. sp. OZ2
Leu. sp. OZ3
Leu. sp. OZ4
Lb. acidophilus RSKK 03037
Lb. brevis OZ1
Lb. brevis NRLL-B 21
Lb. buhnerii NRLL B1837
Lb. caseii RSKK 706
Lb. caseii CG1
Lb. cremoris RSKK 708
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594
Lb. delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697
Lb. fermentum NRLL B585
Lb. helveticus AU
Lb. helveticus HU
Lb. maltoramicus NRLL148532
Lb. paraparacasei STL
Lb. pentosus CG
Lb. plantarum Z111
Lb. plantarum DSM 20174
Lb. plantarum DSM 20246
Lb. plantarum ATCC 8014
Lb. plantarum 37
Lb. plantarum 73
Lb. plantarum 215 L
Lb. plantarum 23
Lb. plantarum CG4
Lb. plantarum 1193
Lb. plantarum CG
Lb. plantarum APKS2
Lb. plantarum PYN
Lb. plantarum BF2
Lb. rhamnasus TK 2
Supercoiled DNA ladder

Şekil 4.17 OPA 12 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

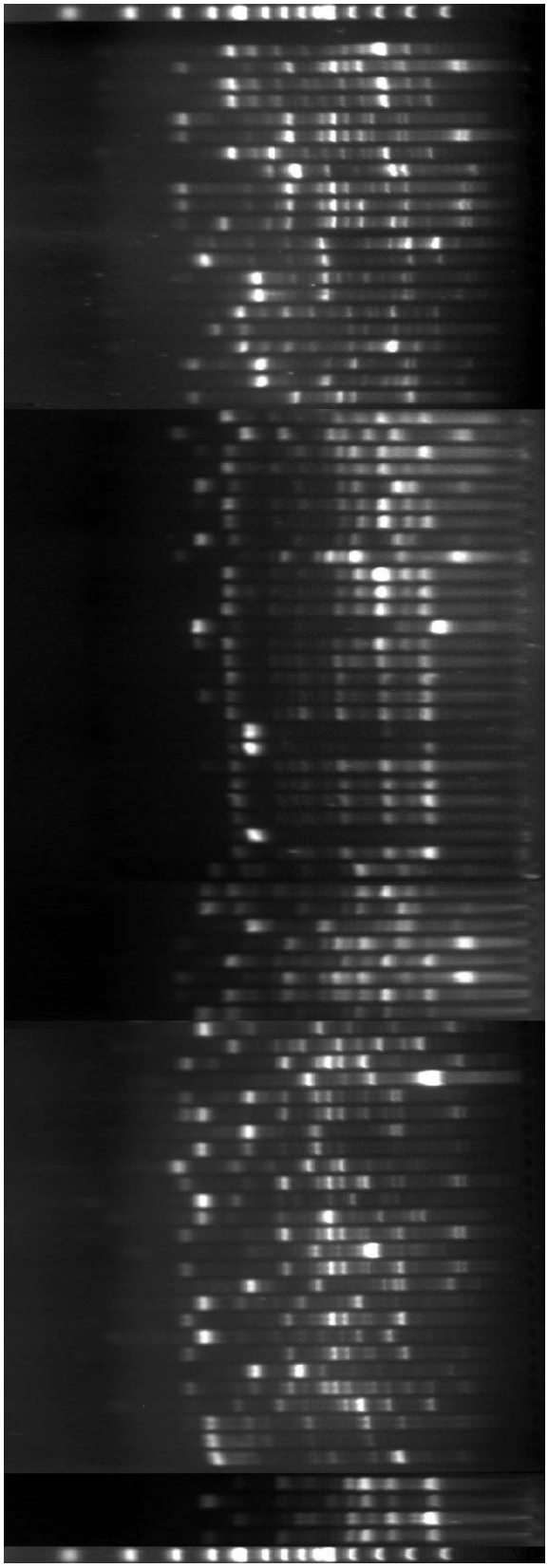
Şekil 4.18 OPA 16 primerleri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.19 OPY 10 primerleri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Supercoiled DNA ladder
Kontrol
E.avium RSKK 500
E. casseliflavus NRLL 3502
E.durans RSKK 05034
E.faecalis OZ1
E.faecalis H
E.faecalis E27
E.faecalis EF1
E.faecalis ATCC 29212
E.faecium ATCC 6057
E.faecium F1
E.faecium H
Lc. lactis OZ1
Lc. lactis OZ2
Lc. lactis OZ3
Lc. lactis OZ4
Lc. lactis W1
Lc. lactis W2
Lc. lactis W3
Lc. lactis PK1
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634
Ped. acidilactici NRLL B4958
Ped. acidilactici 2 N 10P
Ped. acidilactici E2++
Ped. acidilactici RS2
Ped. acidilactici AB6
Ped. acidilactici F2+
Ped. acidilactici E++
Ped. accidilactici cereviciae ATCC 666
Ped. dextranicus 2N 1P
Ped. pentosaceus DT1
Ped. pentosaceus DT10
Ped. pentosaceus KS2
Ped. pentosaceus TK3
Ped. pentosaceus KPR
Ped. pentosaceus TS1
Ped. pentosaceus ST3
Ped. pentosaceus BY1
Ped. pentosaceus P1
Ped. pentosaceus P7
Ped. pentosaceus P20
Ped. pentosaceus A9
Ped. pentosaceus A12
Ped. pentosaceus DH2
Ped. pentosaceus DH3
Ped. pentosaceus PH2
Ped. pentosaceus MCO31
Ped. pentosaceus 345
Leu. lysis
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ
Leu. sp. OZ1
Leu. sp. OZ2
Leu. sp. OZ3
Leu. sp. OZ4
Lb. acidophilus RSKK 03037
Lb. brevis OZ1
Lb. brevis NRLL-B 21
Lb. buhnerii NRLL B1837
Lb. caseii RSKK 706
Lb. caseii CG1
Lb. cremoris RSKK 708
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594
Lb. delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697
Lb. fermentum NRLL B585
Lb. helveticus AU
Lb. helveticus HU
Lb. maltoramicus NRLL148532
Lb. paraparacasei STL
Lb. pentosus CG
Lb. plantarum Z111
Lb. plantarum DSM 20174
Lb. plantarum DSM 20246
Lb. plantarum ATCC 8014
Lb. plantarum 37
Lb. plantarum 73
Lb. plantarum 215 L
Lb. plantarum 23
Lb. plantarum CG4
Lb. plantarum 1193
Lb. plantarum CG
Lb. plantarum APKS2
Lb. plantarum PYN
Lb. plantarum BF2
Lb. rhamnasus TK 2
Supercoiled DNA ladder

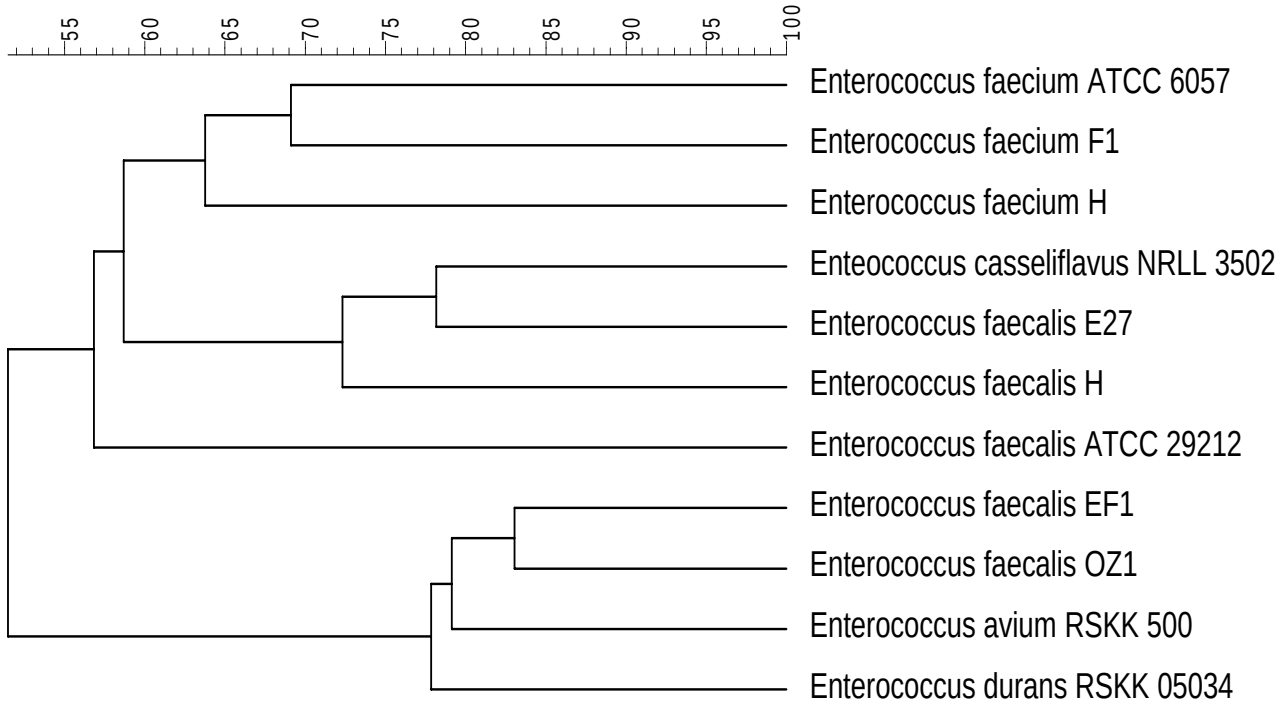
Şekil 4.20 OPM 05 primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Supercoiled DNA ladder
Kontrol
E.avium RSKK 500
E. casseliflavus NRLL 3502
E.durans RSKK 05034
E.faecalis OZ1
E.faecalis H
E.faecalis E27
E.faecalis EF1
E.faecalis ATCC 29212
E.faecium ATCC 6057
E.faecium F1
E.faecium H
Lc. lactis OZ1
Lc. lactis OZ2
Lc. lactis OZ3
Lc. lactis OZ4
Lc. lactis W1
Lc. lactis W2
Lc. lactis W3
Lc. lactis PK1
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK 01018
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634
Ped. acidilactici NRLL B4958
Ped. acidilactici 2 N 10P
Ped. acidilactici E2++
Ped. acidilactici RS2
Ped. acidilactici AB6
Ped. acidilactici F2+
Ped. acidilactici E++
Ped. accidilactici cereviciae ATCC 666
Ped. dextranicus 2N 1P
Ped. pentosaceus DT1
Ped. pentosaceus DT10
Ped. pentosaceus KS2
Ped. pentosaceus TK3
Ped. pentosaceus KPR
Ped. pentosaceus TS1
Ped. pentosaceus ST3
Ped. pentosaceus BY1
Ped. pentosaceus P1
Ped. pentosaceus P7
Ped. pentosaceus P20
Ped. pentosaceus A9
Ped. pentosaceus A12
Ped. pentosaceus DH2
Ped. pentosaceus DH3
Ped. pentosaceus PH2
Ped. pentosaceus MCO31
Ped. pentosaceus 345
Leu. lysis
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL B3469
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ
Leu. sp. OZ1
Leu. sp. OZ2
Leu. sp. OZ3
Leu. sp. OZ4
Lb. acidophilus RSKK 03037
Lb. brevis OZ1
Lb. brevis NRLL-B 21
Lb. buhnerii NRLL B1837
Lb. caseii RSKK 706
Lb. caseii CG1
Lb. cremoris RSKK 708
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* RSKK 594
Lb. delbrueckii subsp. *lactis* ATCC 10697
Lb. fermentum NRLL B585
Lb. helveticus AU
Lb. helveticus HU
Lb. maltoramicus NRLL148532
Lb. paraparacasei STL
Lb. pentosus CG
Lb. plantarum Z111
Lb. plantarum DSM 20174
Lb. plantarum DSM 20246
Lb. plantarum ATCC 8014
Lb. plantarum 37
Lb. plantarum 73
Lb. plantarum 215 L
Lb. plantarum 23
Lb. plantarum CG4
Lb. plantarum 1193
Lb. plantarum CG
Lb. plantarum APKS2
Lb. plantarum PYN
Lb. plantarum BF2
Lb. rhamnasus TK 2
Supercoiled DNA ladder

4.5 Dendogram ve Benzerlik İndeksinin Oluşturulması

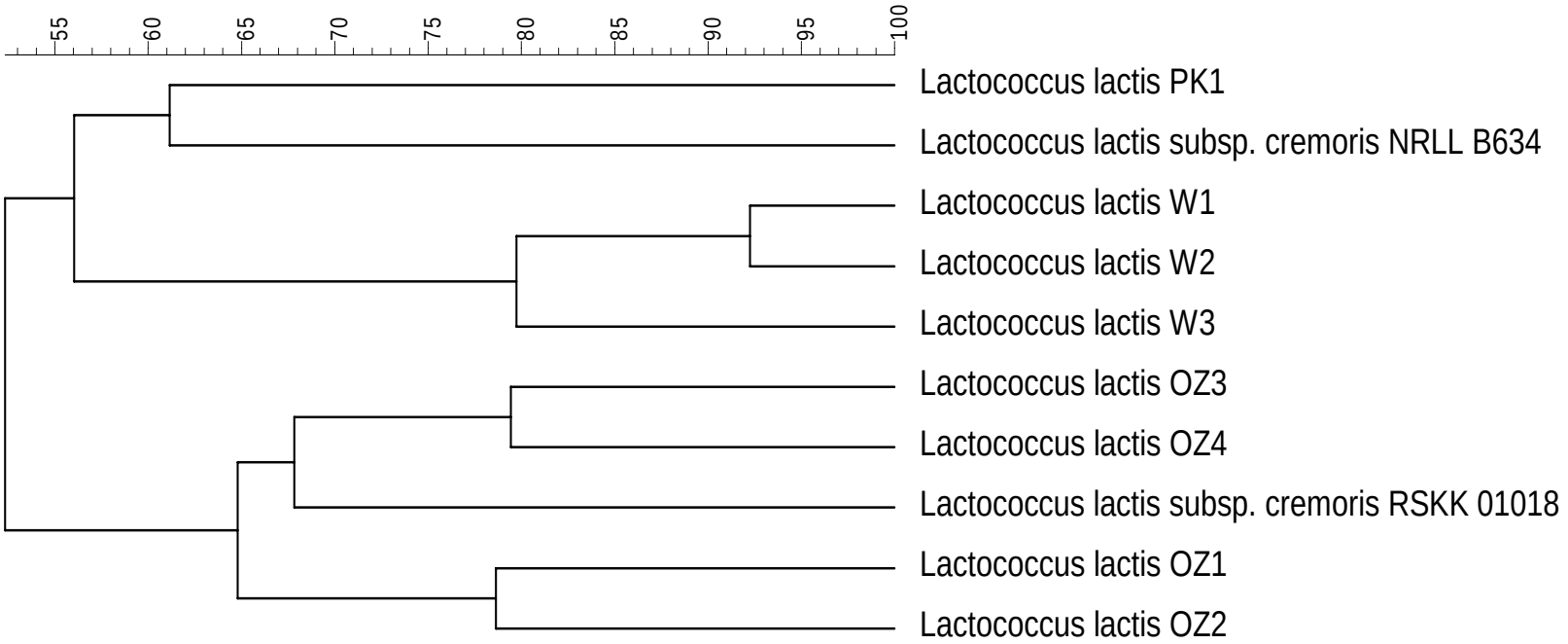
RAPD bantları arasındaki benzerlik "Pearson product moment correlation coefficient" değeri (*r*) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılarak neticede türler arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiştir (Şekil 4.21-4.31) (Vauterin and Vauterin 1992).



Şekil 4.21 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 11 adet *Enterococcus* suşuna ait dendogram

	Enterococcus faecium ATCC 6057	*Enterococcus faecium* F1	*Enterococcus faecium* H	*Enterococcus casseliflavus* NRLL 3502	*Enterococcus faecalis* E27	*Enterococcus faecalis* H	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212	*Enterococcus faecalis* EF1	*Enterococcus faecalis* OZ1	*Enterococcus avium* RSKK 500	*Enterococcus durans* RSKK 05034
E. faecium ATC C6057	100										
E. faecium F1	69.1	100									
E. faecium H	68.9	58.7	100								
E. casseliflavus NRLL 3502	60.0	57.8	55.5	100							
E. faecalis E27	62.3	61.5	56.1	78.2	100						
E. faecalis H	67.0	58.6	49.3	67.6	77.0	100					
E. faecalis ATCC 29212	64.0	49.3	54.4	51.5	57.1	64.6	100				
E. faecalis EF1	48.9	54.0	44.0	48.9	63.0	64.4	50.5	100			
E. faecium OZ1	50.1	56.5	47.3	52.2	65.6	64.1	50.2	83.0	100		
E. avium RSKK 500	46.6	48.2	40.4	49.4	59.5	63.4	49.7	79.4	78.9	100	
E. durans RSKK 05034	35.6	41.8	40.0	52.2	61.8	52.0	40.1	77.0	78.5	78.1	100

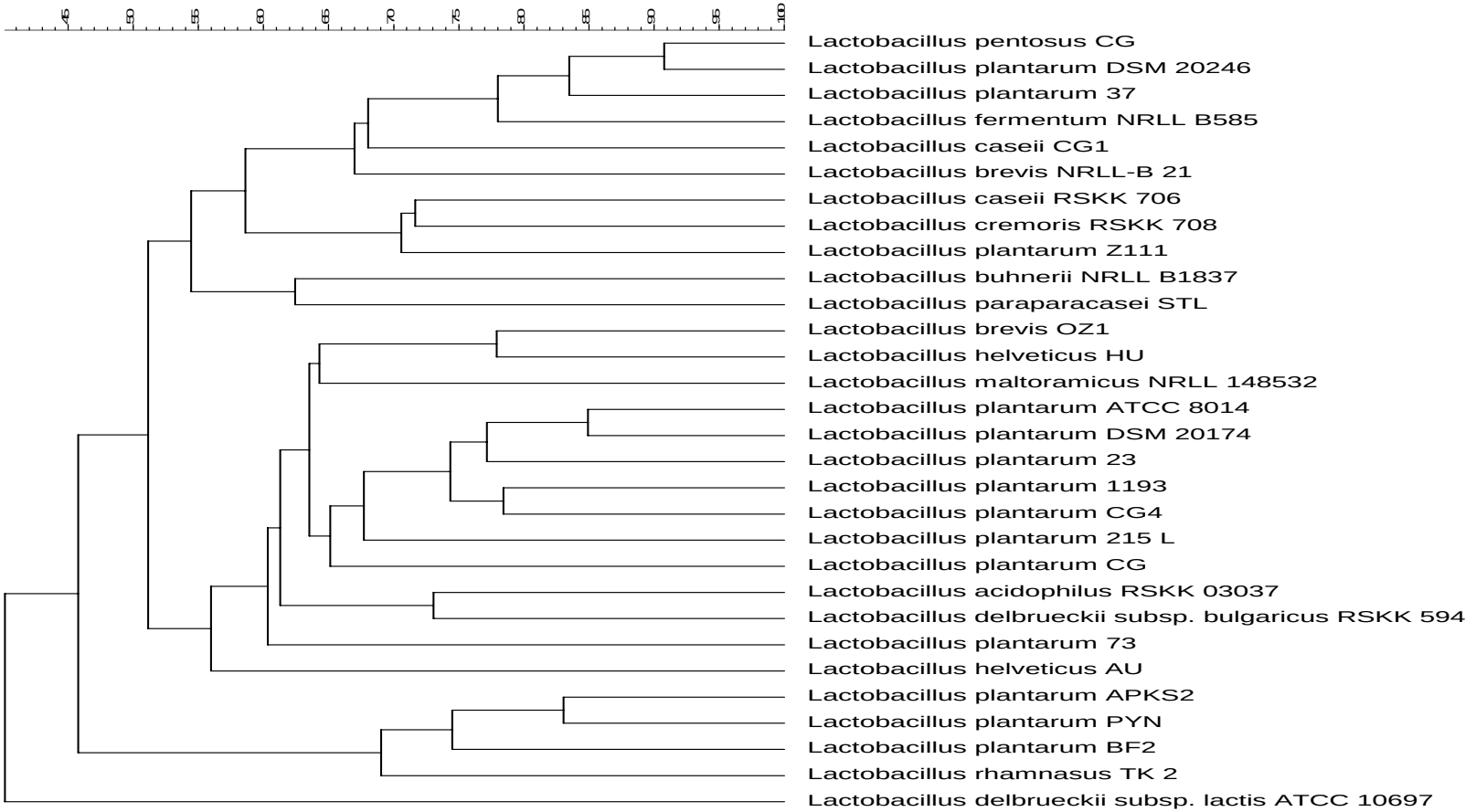
Şekil 4.22 *Enterococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.23 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 10 adet *Lactococcus* suşuna ait dendogram

	Lc. lactis PK1	*Lc. lactis* subsp. *cremoris* NRLL B634	*Lc. lactis* W1	*Lc. lactis* W2	*Lc. lactis* W3	*Lc. lactis* OZ3	*Lc. lactis* OZ4	*Lc. lactis* subsp. *cremoris* RSKK 01018	*Lc. lactis* OZ1	*Lc. lactis* OZ2
Lc. lactis PK1	100									
Lc. lactis subsp. *cremoris* NRLL B634	61.1	100								
Lc. lactis W1	54.1	54.2	100							
Lc. lactis W2	52.7	52.7	92.2	100						
Lc. lactis W3	63.7	58.8	78.6	80.9	100					
Lc. lactis OZ3	62.1	49.6	45.9	44.1	57.1	100				
Lc. lactis OZ4	55.3	47.3	62.1	61.8	56.0	79.4	100			
Lc. lactis subsp. *cremoris* RSKK01018	51.2	53.7	45.1	45.6	52.9	68.5	67.1	100		
Lc. lactis OZ1	52.0	47.4	56.7	56.6	60.9	69.0	63.6	59.9	100	
Lc. lactis OZ2	54.0	49.1	43.9	44.7	52.4	75.2	59.9	61.2	78.6	100

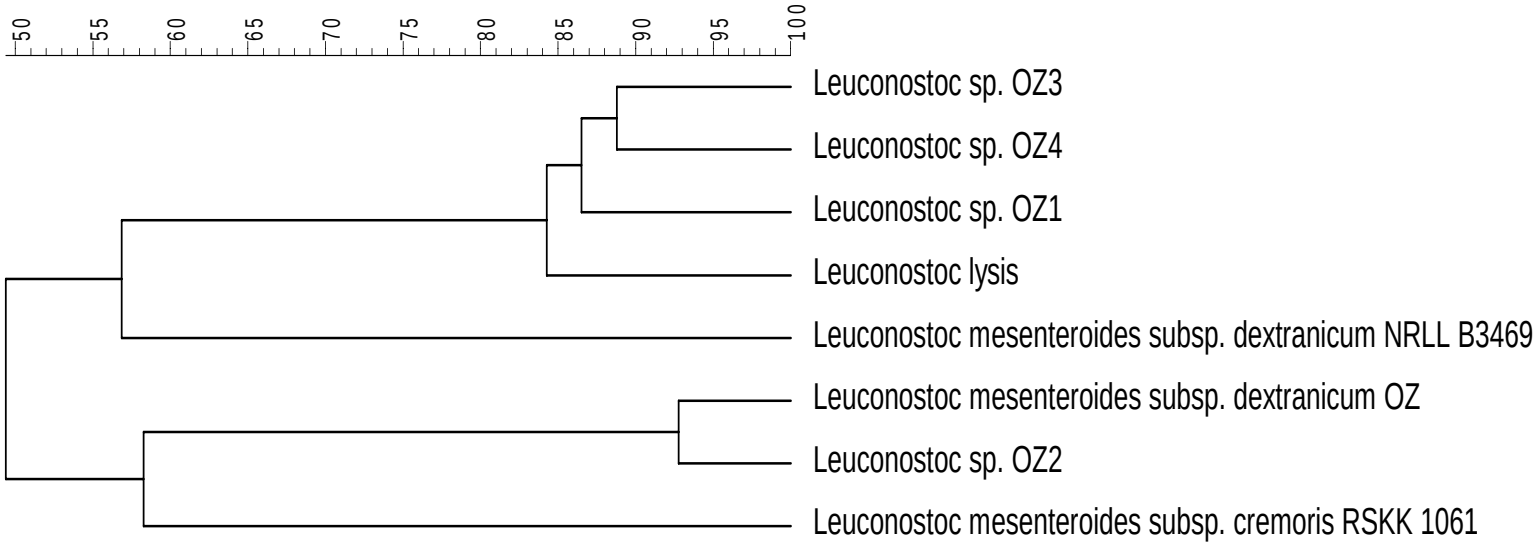
Şekil 4.24 *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.25 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendogramı

	Lactobacillus pentosus CG	*Lactobacillus plantarum* DSM 20246	*Lactobacillus plantarum* 37	*Lactobacillus fermentum* NRLL B585	*Lactobacillus brevis* NRLL-B 21	*Lactobacillus casei* CG1	*Lactobacillus mahoramiens* NRLL 1485 32	*Lactobacillus casei* RSKK 706	*Lactobacillus cremoris* RSKK 708	*Lactobacillus plantarum* Z111	*Lactobacillus hilmerii* NRLL B1837	*Lactobacillus paraparacasei* STL	*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014	*Lactobacillus plantarum* DSM 20174	*Lactobacillus plantarum* 23	*Lactobacillus plantarum* 1193	*Lactobacillus plantarum* CG4	*Lactobacillus plantarum* 215 L	*Lactobacillus brevis* OZ1	*Lactobacillus helveticus* HC	*Lactobacillus plantarum* CG	*Lactobacillus acidophilus* RSKK 03037	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RSKK 594	*Lactobacillus plantarum* 73	*Lactobacillus helveticus* AC	*Lactobacillus plantarum* APKS2	*Lactobacillus plantarum* PYN	*Lactobacillus plantarum* BF2	*Lactobacillus rhamnosus* TK 2	*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 10697
Lactobacillus pentosus CG	100																												
Lactobacillus plantarum DSM 20246	91.2	100																											
Lactobacillus plantarum 37	80.1	87.8	100																										
Lactobacillus fermentum NRLL B585	83.3	77.1	73.2	100																									
Lactobacillus brevis NRLL-B 21	72.3	67.8	65.5	68.4	100																								
Lactobacillus casei CG1	69.5	66.8	64.5	71.0	65.7	100																							
Lactobacillus mahoramiens NRLL 1485 32	70.8	69.4	64.8	65.9	62.9	60.9	100																						
Lactobacillus casei RSKK 706	66.6	63.6	58.7	68.3	62.4	60.2	57.0	100																					
Lactobacillus cremoris RSKK 708	52.6	51.8	48.7	47.6	52.0	48.6	55.7	73.1	100																				
Lactobacillus plantarum Z111	61.6	63.4	55.5	55.9	58.6	57.5	57.6	72.8	71.4	100																			
Lactobacillus hilmerii NRLL B1837	56.4	54.8	53.6	51.2	55.8	51.6	59.1	60.6	50.9	48.5	100																		
Lactobacillus paraparacasei STL	56.4	55.4	51.8	53.4	51.9	50.0	52.6	59.2	43.8	48.1	61.4	100																	
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	58.3	57.5	52.0	50.2	48.3	62.5	68.2	51.1	55.3	46.3	55.4	56.7	100																
Lactobacillus plantarum DSM 20174	53.7	53.8	52.2	49.5	48.1	57.0	67.1	50.5	50.5	42.9	54.1	59.8	85.0	100															
Lactobacillus plantarum 23	51.7	54.7	52.1	44.0	48.5	47.2	65.0	49.4	53.4	48.5	52.1	53.7	73.8	76.5	100														
Lactobacillus plantarum 1193	48.6	49.3	49.2	42.1	41.1	48.0	58.8	46.9	51.2	41.7	46.8	49.6	75.0	72.1	69.9	100													
Lactobacillus plantarum CG4	48.0	52.0	54.6	41.3	44.6	51.4	57.5	44.3	48.4	45.0	51.2	55.8	72.1	75.4	74.6	78.8	100												
Lactobacillus plantarum 215 L	54.4	58.7	61.4	47.2	49.4	46.9	60.8	44.1	49.0	44.2	49.1	51.1	63.5	65.1	73.5	60.5	68.5	100											
Lactobacillus brevis OZ1	51.2	52.2	53.2	46.7	48.0	44.9	63.3	50.1	54.1	40.1	60.6	53.4	63.5	67.6	66.2	57.9	60.0	62.4	100										
Lactobacillus helveticus HC	53.5	55.3	51.4	50.1	49.1	57.5	65.4	54.7	53.4	44.7	57.6	56.0	68.4	71.3	64.1	57.2	61.5	62.8	76.3	100									
Lactobacillus plantarum CG	47.7	49.7	50.0	42.3	39.8	51.4	55.3	44.4	45.9	42.0	50.3	45.7	67.2	60.2	58.5	67.6	69.4	57.1	56.3	55.3	100								
Lactobacillus acidophilus RSKK 03037	51.2	51.0	50.2	50.2	49.8	59.2	59.3	67.3	59.4	54.0	50.8	53.1	66.2	65.4	64.2	62.3	61.9	60.1	64.1	57.5	56.9	100							
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RSKK 594	47.7	47.6	45.8	46.3	43.6	56.7	58.7	59.4	65.0	51.0	54.7	48.3	69.7	68.8	57.0	59.1	61.0	62.1	60.4	65.2	57.4	74.3	100						
Lactobacillus plantarum 73	46.5	47.2	51.1	41.9	41.7	50.2	49.2	38.8	44.4	38.8	45.1	47.3	63.4	63.5	55.3	58.9	66.6	60.1	53.6	57.4	57.6	54.7	56.7	100					
Lactobacillus helveticus AC	42.5	43.3	43.8	38.2	40.4	57.4	53.9	42.9	51.8	39.7	42.5	40.5	66.3	61.8	50.4	54.5	55.4	44.8	51.0	56.6	52.0	59.6	58.4	52.4	100				
Lactobacillus plantarum APKS2	43.1	43.3	42.4	38.1	39.6	39.8	51.7	44.1	37.8	36.5	52.0	52.6	52.8	57.2	58.0	48.3	56.2	44.1	49.8	58.0	54.1	48.1	48.6	45.9	40.4	100			
Lactobacillus plantarum PYN	39.8	41.0	41.2	37.6	37.5	39.1	49.5	42.4	39.7	35.0	51.7	53.4	56.1	56.4	57.1	52.6	57.5	45.3	49.2	58.0	49.4	47.5	48.2	47.3	39.9	83.4	100		
Lactobacillus plantarum BF2	36.2	37.5	36.6	29.7	33.8	32.0	42.9	39.4	39.7	29.7	56.7	45.7	43.5	45.4	45.4	40.5	45.0	43.1	52.1	55.0	51.1	41.3	45.9	41.0	33.1	77.5	72.0	100	
Lactobacillus rhamnosus TK 2	40.4	40.1	39.8	31.2	37.9	33.4	45.8	37.2	37.9	32.3	45.3	44.3	46.0	46.2	51.6	42.8	48.2	44.1	43.5	46.8	42.4	37.2	35.7	40.8	31.7	70.3	76.3	65.2	100
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis ATCC 10697	52.5	52.7	47.2	47.4	49.1	45.2	44.8	46.1	41.7	44.3	42.9	43.2	40.2	41.8	38.9	38.9	37.0	39.5	39.0	37.6	35.2	38.8	35.7	31.4	34.1	23.9	27.5	21.3	26.9

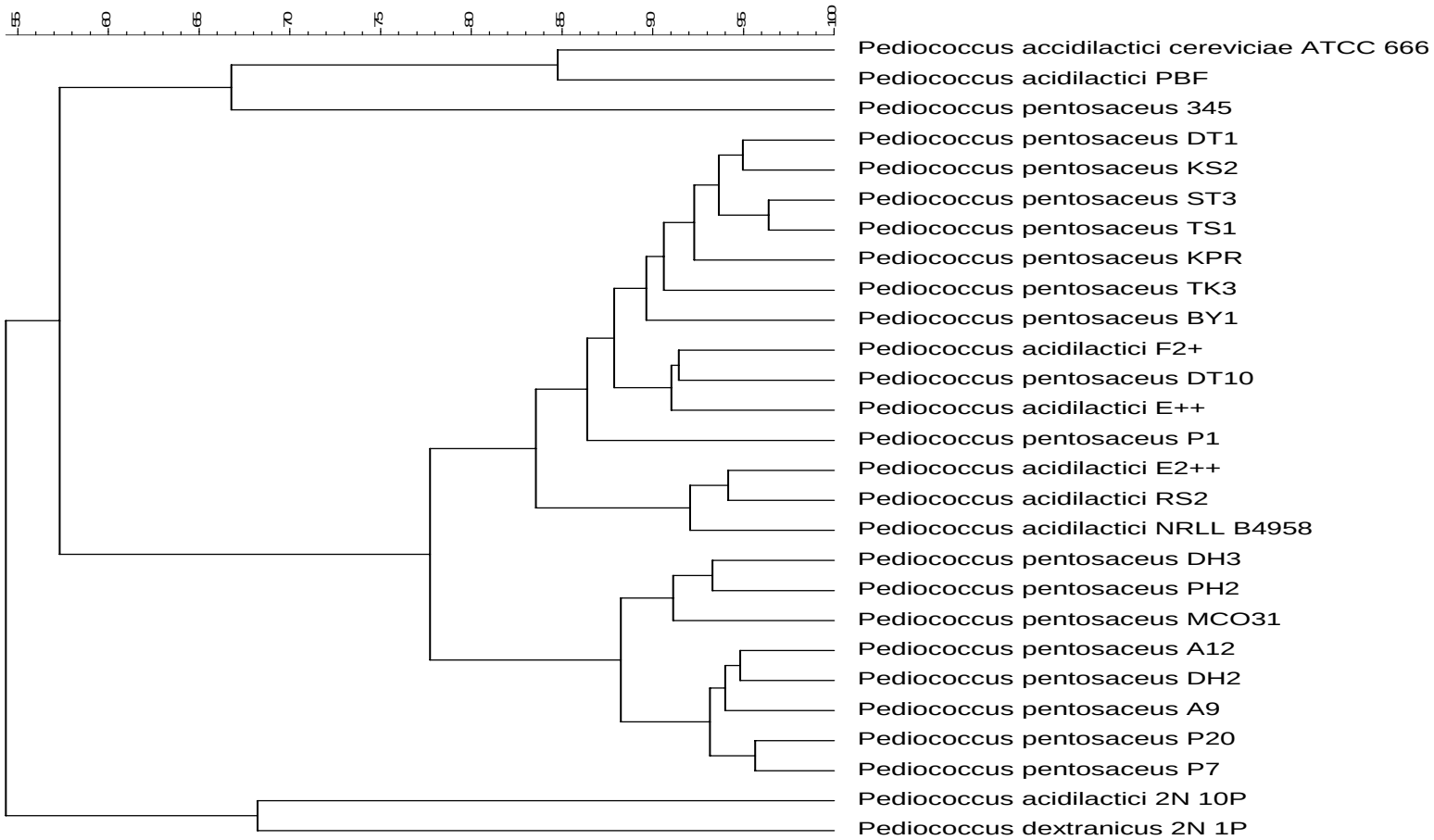
Şekil 4.26 *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.27 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 8 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendogramı

	Leuconostoc sp. OZ3	*Leuconostoc* sp. OZ4	*Leuconostoc* sp. OZ1	*Leuconostoc lysis*	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* NRLL B3469	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* OZ	*Leuconostoc* sp. OZ2	*Leu. mesenteroides subsp. cremoris* RSKK 1061
Leuconostoc sp. OZ3	100							
Leuconostoc sp. OZ4	88.8	100						
Leuconostoc sp. OZ1	87.9	85.1	100					
Leuconostoc lysis	83.8	84.7	84.2	100				
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* NRLL-B3469	52.6	59.3	55.3	60.2	100			
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum* OZ	49.2	40.5	45.5	41.5	54.2	100		
Leuconostoc sp. OZ2	60.4	52.7	56.2	52.4	55.9	92.7	100	
Leu. mesenteroides subsp. *cremoris* RSKK 1061	48.7	43.1	44.8	43.3	52.0	57.8	58.7	100

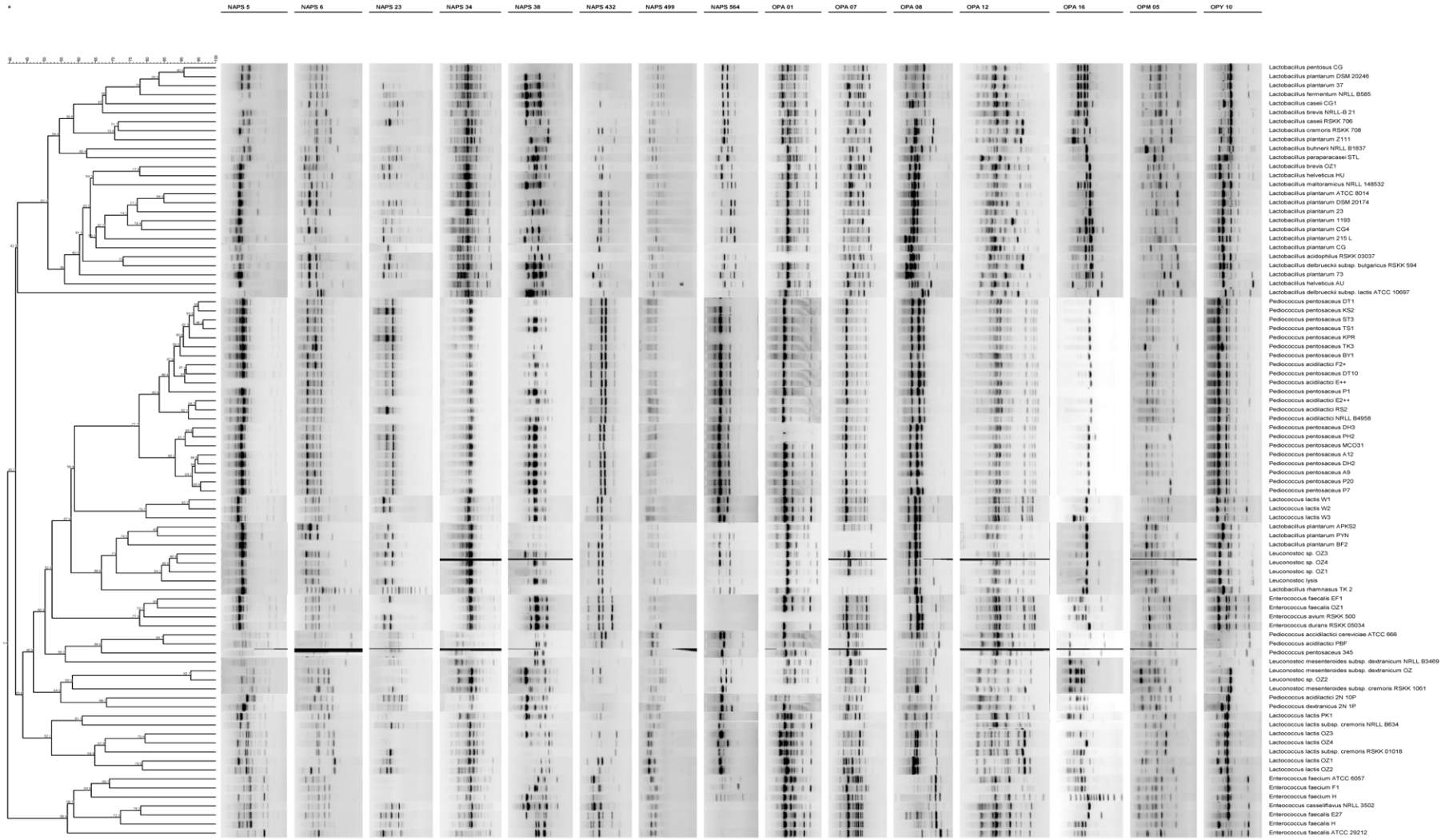
Şekil 4.28 *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.29 RAPD paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 27 adet *Pediococcus* suşuna ait dendogramı

	Pediococcus accidilactici cereviciae ATCC 666	*Pediococcus acidilactici* PBF	*Pediococcus pentosaceus* 345	*Pediococcus pentosaceus* ST3	*Pediococcus pentosaceus* TS1	*Pediococcus pentosaceus* BY1	*Pediococcus pentosaceus* KPR	*Pediococcus pentosaceus* DT1	*Pediococcus pentosaceus* KS2	*Pediococcus pentosaceus* DT10	*Pediococcus pentosaceus* P1	*Pediococcus pentosaceus* TK3	*Pediococcus acidilactici* E++	*Pediococcus acidilactici* F2+	*Pediococcus acidilactici* E2++	*Pediococcus acidilactici* RS2	*Pediococcus acidilactici* NRLL B4958	*Pediococcus pentosaceus* A12	*Pediococcus pentosaceus* DH2	*Pediococcus pentosaceus* A9	*Pediococcus pentosaceus* DH3	*Pediococcus pentosaceus* MCO31	*Pediococcus pentosaceus* P20	*Pediococcus pentosaceus* P7	*Pediococcus pentosaceus* PH2	*Pediococcus acidilactici* 2N 10P	*Pediococcus dextranicus* 2N 1P
Pediococcus accidilactici cereviciae ATCC 666	100																										
Pediococcus acidilactici PBF	85.4	100																									
Pediococcus pentosaceus 345	68.1	65.9	100																								
Pediococcus pentosaceus ST3	66.7	55.2	56.5	100																							
Pediococcus pentosaceus TS1	67.8	55.7	57.3	96.2	100																						
Pediococcus pentosaceus BY1	64.9	54.7	57.8	93.5	94.0	100																					
Pediococcus pentosaceus KPR	67.4	55.2	56.0	90.7	94.3	89.4	100																				
Pediococcus pentosaceus DT1	68.0	56.8	56.7	89.9	92.8	85.6	90.6	100																			
Pediococcus pentosaceus KS2	66.8	55.6	56.8	92.7	95.7	88.4	92.7	94.9	100																		
Pediococcus pentosaceus DT10	66.0	54.1	55.8	88.0	92.5	86.6	89.4	94.4	92.9	100																	
Pediococcus pentosaceus P1	64.9	57.0	57.8	92.0	90.4	90.0	84.5	85.5	86.2	85.4	100																
Pediococcus pentosaceus TK3	70.5	55.0	57.0	86.8	88.0	82.8	87.3	85.3	86.0	84.9	80.3	100															
Pediococcus acidilactici E++	67.2	55.0	55.7	85.3	88.0	82.2	84.0	91.5	88.8	91.1	83.2	80.9	100														
Pediococcus acidilactici F2+	68.4	54.1	54.3	84.6	88.2	82.0	87.3	90.3	88.3	91.6	81.6	84.6	91.6	100													
Pediococcus acidilactici E2++	69.4	57.8	56.1	81.3	84.0	78.4	80.1	86.4	86.2	85.8	80.0	78.9	89.8	88.6	100												
Pediococcus acidilactici RS2	68.1	55.6	56.6	80.7	83.1	78.1	81.7	85.0	85.6	84.5	80.7	79.0	87.7	88.7	93.9	100											
Pediococcus acidilactici NRLL B4958	66.6	55.2	57.1	80.9	85.5	80.0	82.9	86.5	86.8	89.0	81.3	79.8	87.5	86.9	93.4	91.2	100										
Pediococcus pentosaceus A12	55.7	49.1	52.3	87.8	83.9	87.7	78.3	76.8	78.4	75.3	87.2	73.6	73.1	70.5	69.7	70.4	72.5	100									
Pediococcus pentosaceus DH2	56.4	50.6	53.2	84.9	83.1	88.0	78.0	74.8	76.7	75.9	85.2	72.4	71.7	69.8	69.6	70.2	72.1	95.1	100								
Pediococcus pentosaceus A9	61.8	51.8	54.3	89.5	87.6	90.1	83.3	78.7	80.8	78.7	87.9	76.3	74.8	74.6	71.9	73.6	74.7	94.4	93.7	100							
Pediococcus pentosaceus DH3	55.4	49.1	54.4	83.5	83.0	85.9	78.1	75.0	77.3	74.9	83.2	73.2	71.6	70.1	69.6	70.3	72.9	92.0	93.4	90.5	100						
Pediococcus pentosaceus MCO31	54.1	49.4	53.4	81.8	80.6	83.2	77.1	73.4	77.4	73.1	79.9	70.4	69.6	66.5	67.8	67.9	70.4	89.7	91.8	86.3	91.1	100					
Pediococcus pentosaceus P20	56.8	47.6	51.5	83.7	82.9	85.4	77.0	75.0	76.7	75.3	84.1	73.7	70.6	69.7	66.5	67.3	70.3	88.9	87.5	88.8	85.0	82.4	100				
Pediococcus pentosaceus P7	58.7	50.1	52.2	88.1	87.1	88.4	81.6	79.1	81.0	80.0	87.3	77.8	75.4	75.3	71.2	72.0	74.2	88.1	87.0	88.7	84.7	80.7	95.8	100			
Pediococcus pentosaceus PH2	49.9	43.9	50.9	73.2	74.8	79.3	73.0	67.5	71.4	68.6	72.7	67.4	63.2	62.2	63.7	65.9	66.9	80.2	85.0	80.6	88.0	85.6	86.1	84.6	100		
Pediococcus acidilactici 2 N 10P	54.9	48.8	52.6	47.9	49.7	48.1	49.1	48.3	48.4	48.3	49.1	47.2	47.1	46.3	49.0	52.0	50.1	43.6	45.8	48.8	47.6	44.6	44.8	45.8	44.0	100	
Pediococcus dextranicus 2N 1P	62.6	57.9	60.5	61.4	63.3	60.2	60.9	63.8	64.0	62.3	63.4	61.3	58.4	60.0	62.6	63.2	63.6	56.1	56.8	58.5	57.2	57.4	55.3	56.6	53.9	68.4	100

Şekil 4.30 *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.31 15 farklı primerin kullanımı ile 86 adet LAB suşu için RAPD profillerinin UPGMA'sından oluşturulan dendogram

Şekil 4.32 Oluşturulan UPGMA dendogramlarından elde edilen benzerlik indeksi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doğal topluluklardaki bakteriyel farklılıklar oldukça zor anlaşılmakta ve genellikle tür düzeyinde tespit edilmektedir (Dykhuizen 1998). Suş düzeyinde bakteriyel farklılıklara ait bilgiler oldukça nadirdir. Son yılarda mikroorganizmalara ait genotiplendirme çalışmalarında güçlü teknikler ortaya konulmuş ve bu tekniklerin LAB'a ait suşlar üzerindeki uygulamaları halen devam etmektedir çünkü LAB'ların endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir ve özellikle son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan DNA temelli moleküler yöntemler var olan çalışmalara tamamlayıcı ve doğrulayıcı olmaları bakımından güvenilir, basit ve pahalı olmayan yöntemler olarak değerlendirilmektedir.

RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), LAB'lara ait suşlar arasında ayrımı sağlamada ya da LAB'ların biyoçeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Cocconelli *et al.* 1995, Rebecchi *et al*. 1998, Andrighetto *et al*. 2001a,b). RAPD tekniğinin suş tiplendirmesine olanak veren hızlı, hassas ve verimli bir teknik olduğu diğer araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalar neticesinde belirtilmiştir (Berthier and Ehrlich). Verilerin sayısal analizleri, suşların tanımlanmasına ve gruplanmasına izin vermektedir (Vauterin and Vauterin 1992). Bununla beraber, RAPD, birçok primerin kullanıldığı durumda genom morfolojisine göre gruplar içerisinde kalabalık suşların sınıflandırılmasında yaygın olarak bilinen ve kullanılan bir tekniktir (Williams *et al*. 1990).

A.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonumuzda farklı fenotipik ve biyokimyasal testler ile cins düzeyinde, API CHL50 tanımlama test kiti kullanımı ile de tür/alttür düzeyinde tanımlanması önceden yapılmış gıda kökenli 5 farklı cinse ait toplam 86 adet laktik asit bakterisi suşu bulunmaktadır. Çalışmamızda laktik asit bakterilerine ait 86 adet suşun tür, özellikle suş düzeyinde ayrımına ve/veya

tiplendirilmesine yönelik olan moleküler tekniklerden RAPD kullanılmış ve LAB suşları arasındaki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

- Çalışmada kullanılan LAB grubuna ait toplam 86 suştan PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen genomik DNA RAPD çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

- Çalışmada OPA, OPC, OPY, OPM, OPZ, OPY ve NAPS serilerinden rastgele seçilmiş her biri 10 nükleotit uzunluğunda toplam 27 adet RAPD oligonükleotitleri denenerek bunların arasından tutarlı sonuç veren (yüksek bant sayısı ve tekrarlanabilirlik) 15 tanesi (NAPS 5, NAPS6, NAPS23, NAPS34, NAPS38, NAPS432, NAPS499, NAPS564, OPA 01, OPA 07, OPA 08, OPA12, OPA16, OPM 05, OPY 10) çalışmadaki 86 adet suşun RAPD analizleri için kullanılmıştır. Seçilen primerlerin tümünün G+C içeriği % 60 dan daha fazladır.

- Amplifikasyon ürünlerinin % 1.6 agaroz jel üzerinde ayrılan ve EtBr ile boyama neticesinde gözlemlenebilen farklı uzunluklara sahip bant patternleri daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere GelComparII, Version 4.1 (Applied Math) bilgisayar yazılım programına aktarılmıştır.

- RAPD bantları arasındaki benzerlik "Pearson product moment correlation coefficient" değeri (*r*) ile ifade edilip % benzerlik değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılarak neticede türler arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiş ve dendogram üzerinde kümeleri birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı % 66 olarak rastgele seçilmiş ve RAPD bant paternleri toplam 28 kümede toplanmıştır.

Çalışılan *Lactobacillus* cinsine ait 30 suş toplam 12 kümeye ayrılmıştır. 26 suşun meydana getirdiği 11 kümedeki örnekler hem kendi aralarında hem kümeleri aralarında benzerlik oranlarına göre dendogramda bir araya gelmişlerdir. Böylece daha önce fenotipik yöntemlerle tanımlanan bu suşların doğru sınıflandırıldığı söylenebilmektedir. Bununla beraber, *Lactobacillus plantarum* APKS2, *Lactobacillus plantarum* PYN, *Lactobacillus plantarum* BF2 ve *Lactobacillus rhamnasus* TK2 suşlarının bazı Leuconostoc suşlarıyla benzerliğine göre aynı kümede yer almalarının, bu suşların tanımlanmasında yanlış fenotipik test sonuçları yüzünden olabileceği söylenebilmektedir.

Çalışılan *Pediococcus* cinsine ait 27 suş toplam 3 kümeye ayrılmıştır. 22 suştan meydana gelen ilk kümedeki örneklerin gösterdiği yüksek benzerlik oranlarına göre başarılı bir şekilde tanımlanmış oldukları söylenebilmektedir. Yüksek benzerlik yüzdelerine sahip *Pediococcus* suşlarından oluşan bu küme ile; *Pediococcus acidilactici/cereviciae* ATCC 666, *Pediococcus acidilactici* PBF, *Pediococcus pentosaceus* 345 suşlarını içeren ikinci küme % 50.3 ve *Pediococcus acidilactici* 2N 10P ile *Pediococcus dextranicus* 2N 1P suşlarını içeren üçüncü küme % 46.9 benzerlik oranı göstererek ayrılmıştır. *Pediococcus acidilactici* 2N 10P ve *Pediococcus dextranicus* 2N 1P suşlarının bazı *Leuconostoc* suşları ile % 54.9 benzerlik yüzdesine sahip olmaları sebebiyle; bu suşların yanlış tanımlanmış olabilecekleri söylenebilmektedir.

Enterococcus cinsine ait 11 suş toplam 5 kümeye ayrılmış ve *Enterococcus faecalis* F1, *Enterococcus faecalis* 0Z1, *Enterococcus avium* RSKK 500 ve *Enterococcus durans* RSKK 05034 suşlarını içeren grup hariç tüm kümeler, dendogramda benzerlik oranlarına göre bir arada sıralanmışlardır. Bu sonuçlara göre yakın kümeler içinde yer almış suşların fenotipik testler ile doğru tanımlanmış olduğu söylenebilmektedir. *Enterococcus faecalis* F1, *Enterococcus faecalis* 0Z1, *Enterococcus avium* RSKK 500 ve *Enterococcus durans* RSKK 05034 suşlarından meydana gelen kümenin, diğer *Enterococcus* örneklerine benzerlik yüzdelerine oranla, *Pediococcus* suşlarından meydana gelen kümeler ile daha yüksek benzerlik oranına sahip olması (% 52.3) nedeniyle yanlış tanımlanmış olabilecekleri söylenebilmektedir.

Çalışılan *Lactococcus* cinsine ait 10 suş toplam 5 kümeye ayrılmış ve *Lactococcus lactis* W1, *Lactococcus lactis* W2 ve *Lactococcus lactis* W3 suşlarını içeren grup hariç tüm kümeler dendogramda bir arada sıralanmışlardır. Bu suşların bulunduğu kümenin dendogramda *Pediococcus* suşlarından meydana gelen kümeler ile daha yüksek benzerlik oranına sahip olması (% 58.9) nedeniyle tanımlamalarında hata olabileceği söylenebilmektedir.

Leuconostoc cinsine ait 8 suş toplam 4 kümeye ayrılmıştır. % 92.7 benzerlik gösteren *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* OZ ve *Leuconostoc* sp. OZ2 suşlarından meydana gelen birinci küme, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 1061 suşunun oluşturduğu ikinci küme ile % 58.3 benzerlik göstermektedir. Bunun yanında *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* NRLL B3469 suşundan meydana gelen üçüncü küme, bir *Pediococcus* kümesiyle % 56.2 benzerlik göstermesiyle diğer *Leuconostoc* kümelerinden ayrılmış olmasıyla yanlış tanımlanmış olabileceği söylenebilmektedir. *Leuconostoc lysis, Leuconostoc* sp. OZ1, *Leuconostoc* sp. OZ3 ve *Leuconostoc* sp. OZ4 suşlarının ise bazı *Lactobacillus* suşları ile % 71 benzerlik göstererek aynı kümede yer almış olmaları sonucunda, bu suşların da tanımlanmasında hata olabileceği söylenebilmektedir.

- Çalışmanın sonucu birbirleri ile oldukça yakın ilişkide bulunan LAB suşlarının ayrımında RAPD tekniğinin ayrım ve kullanım gücünü vurgulamaktadır. Bununla beraber ucuz, hızlı ve az çaba gerektiren bir tekniktir.

- Yöntemin hızlılığı verilen fazla sayıdaki suş koleksiyonumuz için yöntemin oldukça cazip olduğunu göstermekte, aynı zamanda verilerin sayısal analiziyle suşların gruplandırılmasına izin vermektedir.

- Bununla beraber, RAPD ürünleri prop olarak daha ileriki çalışmalarda kullanılabilir ya da suş veya grupların spesifikliği için oligonükleotit propları ve primerleri sağlamak amacıyla sekanslanabilir.

KAYNAKLAR

Aldenderfer, M.S. and Blashfield, R.K. 1984. *Cluster analysis (Sage University Press series on quantitative applications in the social sciences, No. 44).* Sage University Press, Beverly Hills.

Aljanabi, S.M., Forget, L. and Dookun, A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polisaccaride and polyphenol-free sugarcane. Plant Molecular Biology Reporter, 17; 1-8.

Andrighetto, C., De Dea, P., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L. and Giraffa, G. 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. Research in Microbiology, 149; 631-643.

Andrighetto, C., Knijff, E., Lobardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. and Dellaglio, F. 2001a. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses, Journal of Dairy Research, 68: 303–316.

Andrighetto, C., Zampese, L. and Lombardi, A. 2001b. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). Letters in Applied Microbiology, 33; 26-30.

Appuhamy, S., Parton, R., Coote, J.G. and Gibb, H.A. 1997. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. Journal of Clinical Microbiology, 35; 288-291.

Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D. and Depledge, M. (2000). Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. BioTechniques, 28; 52-54.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects, 1-73.

Babalola, O.O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. African Journal of Biotechnology, 2(12); 710-713.

Barbier, N., Saulnier, P., Chachaty, E., Dumontier, S. and Andremont, A. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for

epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 34; 106-109.

Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. and Gannon, F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods and Applications, 151-56.

Baruzzi, F., Morea, M., Matarante, A. and Cocconelli, P.S. 2000. Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. Journal of Applied Microbiology, 89; 807-814.

Baumann, P., Doudoroff, M. and Stanier, R.Y. 1968. A study of the *MoraxeUa* group II. Oxidativenegative species (genus *Acinetobacter).* Journal of Bacteriology, 95; 1520-1541.

Berthier, F. and Ehrlich, S.D. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region, FEMS Microbiology Letters, 161; 97–106.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Applied and Environmental Microbiology, 57(4); 1265–1267.

Björkroth, K.J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W.H., Korkeala, H. J. and Vandamme, P. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. Applied and Environmental Microbiology, 66; 3764-3772.

Björkroth, K.J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W.H., Korkeala, H.J. and Vandamme, P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52; 141-148.

Blears, M.J., De Grandis, S.A., Lee, H. and Trevors, J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): Review of the procedure and its applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 21; 99-114.

Bock, H.H. 1974. *Automatische klassifikation.* Vandenhoeck & Ruprecht, Grttingen.

Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P. and Grappin, R. 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative Lactobacilli during Comte cheese ripening. International Journal of Food Microbiology, 76; 27-38.

Bush, U. and Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B, 722; 263-278.

Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991a. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnology, 9; 553-557.

Caetano-Annolles, G., Bassam, B. J. And Gresshoff, E M. 1991b. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. BioTechnology, 9; 553-557.

Caetano-Annolles, G., Bassam, B. J. And Gresshoff, E M. 1992a. DNA fingerprinting: MAAPing out a RAPD definition? BioTechnology, 10; 937.

Caetano-Annolles, G., Bassam, B. J. And Gresshoff, E M. 1992b. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. Molecular and General Genetics, 235; 157-165.

Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R. and Schnell, J.D. 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. Applied and Environmental Microbiology, 69;1836–1839.

Catzeddu, P., Mura, E., Parente, E., Sanna, M. and Farris, G.A. 2006. Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. Systematic and Applied Microbiology, 29; 138–144.

Clarridge, J.E., Raich, T.J., Pirwani, D., Simon, B., Tai, L., Rodriguez-Barradas, M.C., Regnery, R., Zollo, A., Jones, D.C. and Rambo, C. 1995. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. Journal of Clinical Microbiology, 33; 2107-2113.

Cocconelli, P.S., Porro, D., Galandini, S. and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and *Enterococci*. Letters in Applied Microbiology, 21; 376-379.

Cocconelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L., Cappa, F. and Bottazzi, V. 1997. Use of RAPD and 16 S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. Letters in Applied Microbiology, 24; 8-12.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. and Vernoux, J.P. 2003. Isolation, characterization and identification of Lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. INRA, EDP Sciences, 83; 269-306.

Cogan, T.M. 1996. History and taxonomy of strater cultures in dairy starter cultures. Wiley-VCH Inc., 1-25.

Corsetti, A., de Angelis, M, Dellaglio, F., Paparella, A., Fox, P.F. and Settanni, L. 2003. Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. Journal of Applied Microbiology, 94; 641-654.

Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M. and Hillier, A.J. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology, 70; 161-183.

Dean, D., Patton, M. and Stephens, R.S. 1991. Direct sequence evaluation of the major outer membrane protein gene variant regions of *Chlamydia trachomatis* subtypes D′, I′ and L2′. Infection and Immunity, 59; 1579-1582.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torrani, S. 1995. The genus *Leuconoctoc*. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol 2; 235-279.

Dellaglio, F., Giovanna, E.F., Castioni, A., Torriani, S. and Germond, J.E. 2005. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. nov., isolated from Indian dairy products. International Journal of Systematic Bacteriology, 55**;** 401-404.

de Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins p. 107-123. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (Eds.). Blackie Academic and Professional, England.

Dicks, L.M.T. and van Vuuren, H.J.J. 1987. Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. International Journal of Systematic Bacteriology, 37; 437-440.

Dicks, L.M.T., Van Vuuren, H.J.J. and Dellaglio, F. 1990. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions and DNA-DNA hybridizations. International Journal of Systematic Bacteriology, 40; 83-91.

Dijkshoorn, L., Ursing, B.M. and Ursing, J.B. 2000. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. Journal of Medical Microbiology, 49; 397-401.

Dijkshoorn, L., Towner, K. J. and Struelens, M. 2001. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier.

Ding, Y., Karie, O., Labbe, J., Palcic, M.M., Ernat, B. and Hindsgaul, O. 1995. Syntesis and biological activity of oligosaccharide libraries. Advances in Experimental Medicine and Biology, 376; 261-269.

Dombek, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T. and Sadowsky, M.J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. Applied and Environmental Microbiology, 66; 2572-2577.

Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp*. 2.Pheno- and genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology, 88; 165-188.

Donabedian, S., Chow, J.W., Shlaes, D.M., Green, M. and Zervos, M.J. 1995. DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of Enterococci to the species level. Journal of Clinical Microbiology, 33; 141-145.

Doulis, A.G., Harfouche, A.L. and Aravanopoulos, F.A. 2000. Rapid, high quality DNA isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and optimization of the RAPD marker technique. Plant Molecular Biology Reporter, 17; 1-14.

Drake, M.A., Small, C.L., Spence, K.D. and Swanson, B.G. 1996. Differentiation of *Lactobacillus helveticus* strains using molecular typing methods. Food Research International, Vol:29; 451-455.

DuBose, R.F., Dyhuiszen, D.E. and Hartl, D.L. 1988. Genetic Exchange among natural isolates of bacteria: Recombination within the phoA gene of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85; 7036-7040.

Duffner, F. and O'Connell, M. 1995. Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. Journal of Applied Bacteriology, 78; 20–27.

Durant, J.A., Young, C.R., Nisbet, D.J., Stanker, L.H. and Ricke, S.C. 1997. Detection and quantification of poultry probiotic bacteria in mixed culture using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. International Journal of Food Microbiology, 38; 181–189.

Dykes, G.A. and von Holy, A., 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. Letters in Applied Microbiology, 19; 63-66.

Dykes, G.A., Cloete, T.E. and Holy, A. 1994. Identification of *Leuconostoc* species associated with the spoilage of vacuum-packaged Vienna sausage by DNA-DNA hybridization. International Journal of Food Microbiology, 11; 271–274.

Dykhuizen, D.E. 1998. Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, V73; 25-33.

Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. Food Science and Technology, 20; 1-12.

Everitt, B. S. 1998. *Cluster analysis, 3rd edn.* Arnold, London.

Farber, J.M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. Journal of Food Protection, 59; 1091-1101.

Fernández, E., Blume, V., Garrido, P., Collins, M.D., Mateos, A., Domínguez, L. and Fernández- Garayzábal, J.F. 2004. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp.

nov., isolated from mastitis in small ruminants. International Journal of Evolutionary Microbiology, 54; 2291-2296.

Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. and Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology, 88; 105-122.

Georghiou, P.R., Hamill, R.J., Wright, C.E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D.A. and Lupski, J.R. 1995. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: Identification of hospital-associated strains by molecular techniques. Clinical Infectious Diseases, 20; 84–94.

Giovanetti, L. and Ventura, S. 1995. Application of total DNA restriction pattern analyses to identification and differentiation of bacterial strains. Methods in Molecular Biology,Vol 46: Diagnostics Bacteriology Protocols, pp. 165-179. Howard, J. and Whitcombe, D.M., Humana Press, Totowa, New Jersey.

Giraffa, G., Rossetti, L., Mucchetti, G., Addeo, F. and Neviani, E. 1998 Influence of the temperature gradient on the growth of thermophilic Lactobacilli used as natural starters in Grana cheese. Journal of Dairy Science, 81; 31–36.

Giraffa, G. and Rossetti, L. 2004. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters, 237; 133–138.

Gordillo, M.E., Singh, K.V. and Murray, B.E. 1993. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. Journal of Clinical Microbiology, 31; 1570–1574.

Grimont, F. and Grimont, P.A.D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Annales de l'Institut Pasteur de Microbiologie, 137(B); 165-175.

Grimont, F. and Grimont, P.A.D. 1991. DNA fingerprinting. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. pp. 249-280. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., John Wiley and Sons, Chichester.

Hall, L.M.C., Duke, B., Guiney, M. and Williams, R. 1992. Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis. Journal of Clinical Microbiology, 30; 915– 919.

Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.O., Hjerdin, A. and Sall, T. 1996. Competition as a of errors in RAPD analysis. Theoritical and Applied Genetics, 92; 1185-1192.

Halldén, C. 1998. Characterization and use of a multiplex PCR based system: Random amplified polymorphic DNA. Ph.D. Thesis, Department of Genetics, Lund University, Lund.

Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. 1997. Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. Journal of Applied Microbiology, 83; 764-770.

Hammes, W.P. and Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus.* The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol 2; 19-55.

Hansen, M., Halldén, C. and Sall T. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. Plant Molecular Biology Reporter, 16; 139-146.

Hardie, J.M. and Whiley, R.A. 1995. The genus *Streptococcus.* The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol 2; 55-125.

Hartstein, A.I., Phelps, C.L., Kwok, R.Y.Y. and Mulligan, M.E. 1995. In vivo stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphilococcus aureus* typing by restriction endonuclease analysis of a plasmid DNA compared with those of other molecular methods. Journal of Clinical Microbiology, 33; 2022-2026.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, 9. Edition, USA.

Holzapfel, W.H., Haberer, B.,Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition, 73(2); 365-373.

Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (Eds). 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc., San Diego, CA.

Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K. 1996. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. International Journal of. Systematic Bacteriology, 46(2); 572-580.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiology Reviews, 59; 171-200.

Jackman, P.J.H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In *Chemical methods in bacterial systematics,* Goodfellow, M. & Minnikin, D., eds, pp. 115-129. Academic Press, London.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 142; 1881-1893.

Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H. 2002. Differentiation of closely related carnobacterium food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. Applied and Environmental Microbiology. 68; 5358-5366.

Kersters, K. And De Ley, J. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns. Journal of General Microbiology, 87; 333-342.

Khandka, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejidat, A. and Goldhirsh, A.G. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. Electrophoresis, 18; 2852-2856.

Kleanhammer, Y.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 70; 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbology Reviews, 12; 39-86.

Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigon, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nuta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O´Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 82; 29-58.

Kneifel, W., Jaros, D. and Erhard, F. 1999. Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt related products fermented with commercially available starter cultures. International Journal of Food Microbiology, 18; 179-189.

Koeleman, J.G., Parlevliet, G.A., Dijkshoorn, L., Savelkoul, P.H. and Vandenbroucke-Grauls, C.M. 1997. Nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*

on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. Journal of Hospital Infection, 37; 113–123.

Kohel, R.,J. and Park,Y. 1994. Effect of concentration of $MgCl_2$ on random amplified DNA polymorphism. Biotechniques, 16(4); 652-656.

Kondo, J.K. and Mc Kay, L.L. 1985. Gene transfer systems and molecular cloning in group N *streptococci*: A review. Journal of Dairy Science, 37; 1193– 1195.

Kostinek, M., Pukall, R., Rooney, A.P., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H. and Franz, C.M.A.P. 2005. *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55; 2485-2489.

Kostman, J.R., Edlin, T.D., LiPuma, J.J. and Stull, T.L. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. Journal of Clinical Microbiology, 30; 2084-2087.

Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. and Decaris, B. 1996. 16s rRNA and 16s to 23s internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. International Journal of Systematic Bacteriology, 102-111.

Liu, P.Y.F. and Wu, W.L. 1997. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoacetics-Acinetobacter baumannii* complex. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 28;19–28.

Lockhart, W.R. and Liston, J. 1970. *Methods for numerical taxonomy.* American Society for Microbiology, Bethesda, MD.

Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbayer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U. and Scheleifer, K.H. 1993. Phylogenetic relationships of bacteria. Antonie Van Leuwenhoek, 64; 285-304.

Lupski, J.R. and Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. Journal of Bacteriology, 174;4525– 4529.

Mainville, I., Robert, N., Lee, B. and Farnworth, E.R. 2005. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. Systematic and Applied Microbiology, 29; 59-68.

Maslow, J.N., Mulligan, M.E. and Arbeit, R.D. 1993. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clinical Infectious Diseases,17; 153-164.

Mathieu-Daudé, F., Ralph, D. and McClelland, M. 1997. Arbitrarily primed PCR fingerprints: Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. (Eds.). Taylor, G.R., CRS Press, Boca Raton.

Matushek, M.G., Bonten, M.J.M. and Hayden, M.K., 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 34; 2598– 2600.

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj,A., Yadav,M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. Journal of Digestive Diseases, 9; 190–198.

Mora, D., Parini, C., Fortina, M.G. and Manachini, P.C. 1998. Discrimination among pediocin Ach/PA-1 producer strains by comparison of pedB and pedD amplified genes and by multiplex PCR assay. Systematic and Applied Microbiology, 21; 454-460.

Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Vilani, F., Deianna, P. and Coppola, S. 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorpism: Powerful methods to differantiate *Streptococcus thermophilus* strains. Journal of Applied Microbiology, 85; 25-36.

Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani F. and Coppola, S. 2001. Nisin producing organisms during tradditional Fior di latte cheese making monitored by multiplex-PCR and PFGE analysis. International Journal of Food Microbiology, 63; 109-116.

Mueller, U.G. and Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. TREE, 14; 389-394.

Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. 1987. Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starters. Systematic and Applied Microbiology, 9; 151-157.

Nigatu, A., Ahrne, S., Gashe, B.A. and Molin, G. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *P. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. Letters in Applied Microbiology, 26; 412-416.

Olive, D.M. and Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology, 37; 1661–1969.

Orla-Jensen, S. 1919. In S. Orla-Jensen (Ed.), The lactic acid bacteria. P:1-196. Copenhagen: A.F. Host and Son.

Patterson, J.E. and Kelly, C.C. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool for *Enterococci* and *Streptococci*. Methods in Cell Biology, 20; 233–239.

Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M. and Lal, R. 2007. Polyphasic approach of bacterial classifification: An overview of recent advances. Indianian Journal of Microbiology, 47; 98-108.

Pot, B., Hertel, C., Descheemaeker, P., Kersters, K. and Schleifer, K.H. 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus, L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA targeted oligonucleotid probe hybridization. Journal of General Microbiology, 139; 513-517.

Raccach, M. 1987. Pediococci and Biotechnology. CRC Critical Review in Microbiology, 14; 291-309.

Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis, p. 151-171. *In* G. Caetano-Anollés, and P. M. Gresshoff (ed.), DNA markers: protocols, applications and overviews. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y

Rafalskı, A., Tingey, S.V. and Williams, J.G.K. 1994. RAPD markers. Plant Molecular Biology Mannual, 114; 1-8.

Ray, B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. pp 177-206. In: Food biopreservatives of microbial origin. Bibek Ray and Mark Daeschel (Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcelli, P.S. 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation . Journal of Applied Microbiology, 84; 1043-1049.

Riboldi, G.P., De Mattos, E.P., Frazzon, A.P.G., d'Azevedo, P.A. and Frazzon, J. 2008. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. Journal of Basic Microbiology, 48; 31–37.

Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translation modifications. European Journal of Biochemistry, 230; 827-853.

Sall, T., Lind-Halldén, C. and Halldén, C. 2004. Primer mixtures in RAPD. Hereditas, 132(3); 203-208.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanchez, I., Sesena, S., Poveda, J., Cabezas, L. and Palop, L. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of Lactobacilli isolated from Spanish goat cheeses. International journal of Food Microbiology, 102; 355-362.

Sato, H., Yanagıda, F., Shinohara, T. and Yokotsuk, K. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. Journal of Bioscience and Bioengineering, 99(3); 335-337.

Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1995. The genus *Carnobacterium.* In:Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (Eds.). The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic Professional, Glasgow, pp. 307-326.

Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M.D., Régnault, B., Grimont, P.A.D. and Bouvet, A. 2000. *Streptococcus infantarius sp*. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 50; 1425-1434.

Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 46(3); 201-203.

Sesena, S and Palop, L. 2007. An ecological study of lactic acid bacteria from Almagro eggplant fermentation brines. Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072.

Sneath, P.H.A. 1957a. Some thoughts on bacterial classification. Journal of General Microbiology, 17; 184-200.

Sneath, P.H.A. 1957b. The application of computers to taxonomy. Journal of General Microbiology, 17; 201-226.

Sneath, P.H.A. 1972. Computer taxonomy. In *Methods in microbiology, vol. 7A,* Norris, J.R. & Ribbons, D.W., eds, pp. 27-98. Academic Press, London.

Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical taxonomy.* Freeman, San Francisco.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36; 1-29.

Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M. and Yamashita, H. 2004. *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. International Journal of Systematic Evol. Microbiology, 54; 115-117.

Taillez, P, Quenee, P. and Chopin, A. 1996. Estimation de la diversite parmi les souches de la collection CNRZ: Application dfe la RAPD a un groupe de *Lactobacilles*. Le Lait, 76; 147-158.

Temmermann, R., Huys, G. and Swings, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods. Trends in Food Science & Technology, 15; 348-359.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology, 33; 2233-2239.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D. and Goering, R.V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections. Infection Control and Hospital Epidemiology, 18; 426–439.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactoccocus.* The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol 2; 173-235.

Tingey, S.V. and Del Tufa, J.P. 1993. Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers. Plant Physiology, 101; 349-352.

Torriani, S., Giovanna E.F. and Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. Applied and Environmental Microbiology, 67; 3450-3454.

Toth, I.K., Avrova, A.O. and Hyman, L.J. 2001. Rapid identifification and differentiation of the soft rot Erwinias by 16S-23S Intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. Applied and Environmental Microbiology, 67; 4070–4076.

Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, A., Morris Jr., J.G. and Sulakvelidze, A. 2000. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant Enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 38; 4242– 4245.

Van der Zee, A., Verbakel, H. and Von Zon, J. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparision of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of novel epidemicity marker. Journal of Clinical Microbiology, 37; 342-349.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews, 60; 407–438.

Vaneechoutte, M., Rossau, R., de Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., de Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G. and Kersters, K. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiology Letters, 72(3); 227-33

Vaneechoutte, M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. Molecular Biotechnology, 6; 115-142.

Vauterin, L. and Vauterin, P. 1992. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. European Microbiology, 1; 37-41.

Ventura, M., Casas, I.A., Morelli, L. and Callegari, M.L. 2000. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus spp*. isolated from fecal and vaginal samples. Systematic and Applied Microbiology, 23(4); 504-509.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Methods in Molecular and Cellular Biology. 5; 25–40.

Vila, J., Marcos, M.A. and Jimenez de Anta, M.T. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA. Journal of Medical Microbilogy, 44; 482–489.

Vincenta, D., Royb, D., Mondoua, F. and Déry, C. 1998. Characterization of Bifidobacteria by random DNA amplification. International Journal of Food Microbiology, 43; 185–193.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23(21); 4407-4414.

Ward, L.J.H. and Timmins, M.J. 1999. Letters in Applied Microbiology, 29; 90–92. New Zealand Dairy Research Institute, Palmerston North, New Zealand.

Weeden N.F., Timmerman G.M., Hermmat, M., Hneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and Plant Breeding, Minneapolis, 12-17.

Welman, A.D. 2009. Exploitation of Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-45-5

Welsh, J. and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research, 18; 7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Reserch, 18; 6531-6535.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiology Reviews, 51; 221-271.

Wood, B.J.B. 1998. Microbiology of fermented foods. London: Blackie Academic & Porfessional.

Woodford, N., Morrison, D., Johnson, A.P., Briant, V., George, R.C. and Cookson, B. 1993. Application of resistant *Enterococci*. Journal of Clinical Microbiology, 31; 653–658.

Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1992. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 30; 2921–2929.

Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12; 91-109.

EKLER

EK1: BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

EK 2: TAMPON ve ÇÖZELTİLER

EK 3: KROMOZOMAL (GENOMİK) DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ

EK 4: DNA ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

EK 5: KİMYASALLAR

EK 1

BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

MRS BESİYERİ (52.2gr/l)

100 ml'de 5.2 gr hazır besiyeri içeriği çözülerek hazırlanmıştır. Katı besiyeri için % 1.5 agar ilave edilmiş ve sterilizasyon 121°C'de 15 dakika yapılmıştır.

TGE BESİYERİ (Tripton-glucose-yeast extract)

İçerik	**%g**
Tripton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstratı	1.0
Tween 80	0.1
$MgSO_4$	0.005
$MnSO_4$	0.005

Bu içerikler 100 ml distile su içerisinde çözülür, pH 6.8'e ayarlanır. Katı besiyeri hazırlamak için üzerine % 1.5 agar eklenir. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

EK 2

TAMPON VE ÇÖZELTİLER

TBE TAMPONU (Tris-Borik asit-EDTA)1X

İçerik (pH:8.3)	**% g**
Tris	10.8
Borik asit	5.5
EDTA (1M)	0.94
Distile su	1 lt
pH: 8.3	

YÜKLEME BOYASI

İçerik	**% g**
Bromofenol blue	0.25
Sakkaroz	40
Distile su	100 ml

Bu bileşenler 100 ml distile suda çözülerek 0.22µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik	**% g**
Etidyum bromit	1.0
Distile su	100 ml

Bu bileşenler 100 ml distile suda çözülerek 0.22µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve +4°C' de stok olarak koyu renk, ışık almayan bir şişede saklanır.

% 1' lik AGAROZ JEL

İçerik	**% g**
Agaroz	1.0
1 X TBE Tamponu	100 ml

Agaroz 1.0 gr tartılarak 100ml 1X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele 2 µl etidyum bromit solüsyonu eklenir.

% 1.6 'lık AGAROZ JEL (PCR ÜRÜNLERİ İÇİN)

İçerik	**% g**
Agaroz	1.6
1 X TBE Tamponu	100 ml

Agaroz 1.6 gr tartılarak 100ml 1X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele 4 µl etidtum bromit solüsyonu eklenir.

EK 3

KROMOZOMAL (GENOMİK) DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ

Promega

III.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- water bath, 80°C
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L7651) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. **For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.**
3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl (see note in the margin), and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.

   Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Nocardia otitidiscaviarum, Rhodococcus rhodochrous,* and *Brevibacterium albidium*) lyse efficiently using lysozyme alone.
5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × *g* and remove the supernatant.
6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.
12. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 3 minutes.

13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.

    Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.

14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.

15. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes.

16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.

17. Centrifuge at 13,000–16,000 × *g* for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.

18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10–15 minutes.

19. Add 100µl of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.

20. Store the DNA at 2–8°C.

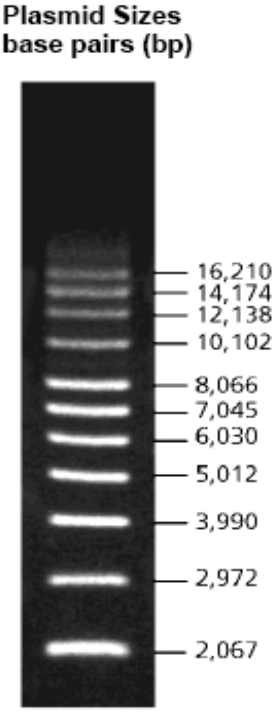
EK 4

DNA ANALİZİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

DNA Ladder, Supercoiled
11 Supercoiled fragments, 2–16 kb

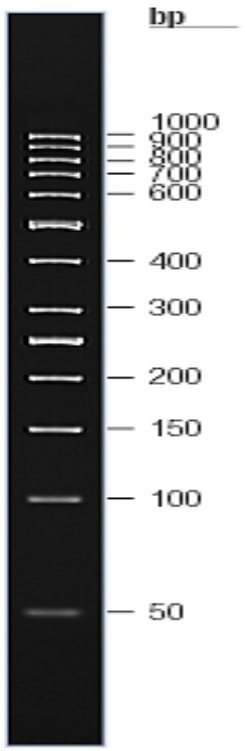
Product Number **D5292**
Storage Temperature –20 °C

Product Description
The Supercoiled DNA Ladder contains 11 supercoiled fragments (2,067–16,210 bp) and is suitable for use as an electrophoresis marker for supercoiled DNA.



GeneRuler ™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)

The ladder is composed of 14 chromotographypurified individual DNA fragments (in base pairs): 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. It contains two reference bands (1000 and 500bp) for easy orientation.



EK 5

KİMYASALLAR

Kimyasal Adı	Marka
Agaroz	SIGMA
Borik Asit	MERCK
Bromofenol Blue	MERCK
EDTA	MERCK
Etidyum Bromit	SIGMA
Glukoz	SIGMA
MRS Besiyeri	LAB M
Maya Ekstraktı	OXOID
$MgSO_4$	MERCK
$MnSO_4$	MERCK
Supercoiled DNA Ladder	SIGMA
Taq DNA Polimeraz	PROMEGA
Tripton	OXOID
Tris	SIGMA
Tween 80	MERCK
100bp DNA Ladder	FERMENTAS

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: DUYGU AKKAYA
Doğum Yeri: Antalya
Doğum Tarihi: 25. 10. 1981
Yabancı Dili: İngilizce
e-mail: duyguakkaya1@gmail.com

► EĞİTİM

Lise: Antalya Lisesi 1996-1999
Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü. 2000-2005
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji ABD, 2006-2009

► VERDİĞİ SEMİNERLER

Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu ve tiplendirilmesinde kullanılan modern moleküler teknikler. Aralık 2007.

► PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER

Laktik Asit Bakterilerinde tür içi ve türler arası ayrımda RAPD ve 16S-ARDRA tekniklerinin değerlendirilmesi

TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu, Hızlı Destek Projesi
Bursiyer, 2008-devam etmekte

PROJE NO: 108T280