

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE TÜR İÇİ VE TÜRLER ARASI AYRIMDA
16S-23S rDNA ISR-RFLP TEKNİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bilge ÇETİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2012**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE TÜR İÇİ VE TÜRLER ARASI AYRIMDA 16S-23S rDNA ISR-RFLP TEKNİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bilge ÇETİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Laktik asit bakterilerinin (LAB) endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. 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. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir. Günümüzde, LAB tanımlama/tiplendirme çalışmaları ilgi odağı olan fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere (genotipik) doğru kaymıştır.

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyal Genetik laboratuvarımızdaki kültür koleksiyonunda mevcut bulunan Laktik Asit Bakterilerine ait 144 adet suşun tanımlanması daha önceki çalışmalarda fenotipik testlerin kullanımı ile yapılmıştır. Çalışmamızda, bu 144 adet suşun tür/tür içi ayrımında 16S-23S ISR (intergenic spacer region) RFLP tekniğinin taksonomik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda; 16S-23S ISR (intergenic spacer region) gen bölgesi evrensel primerlerin kullanımı ile amplifiye edilerek değişik restriksiyon endonükleazların kullanımı ile RFLP analizine tabi tutulmuştur. Bant paternlerine ait görüntüler daha ileriki analizlerde kullanılmak üzere GelCompar II, Version 4,1 (AppliedMath) bilgisayar yazılım programına aktarılmıştır. Bantların arasındaki benzerlik ise “Dice product moment correlation coefficient” ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile gruplandırma işlemi yapılmış ve neticede türler/suşlar arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiştir. Grupları birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı %90 olarak belirlenmiştir. Kullanmış olduğumuz restriksiyon enzimlerine bağlı olarak tür/suş seviyesinde birbirleri ile oldukça yakın ilişkide bulunan LAB suşlarının ayrımında bu tekniğin ayırım gücü kısmen başarılı bulunmuştur.

Mart 2012, 156 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri (LAB), 16S-23S rDNA, RFLP, moleküler taksonomi

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF 16S-23S r DNA INTERGENIC SPACER REGION (ISR)-RFLP FOR INTER AND INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF LACTIC ACID BACTERIA

Bilge ÇETİN

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

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

As far as industrial applications of Lactic acid bacteria (LAB) are concerned, the aim of the researches is choosing the LAB strain which can be used. Reliable methods for identification and characterization of bacterial strains belonging to LAB are great interest in food industry in the study of the performance of LAB starter cultures and cultures used as additives in functional food type products as well as in fields of applied microbiology. Therefore, application of reliable methods on specific and distinct discrimination of any strain is rather important. Nowadays, the main focus for the identification/typing of LAB has moved from phenotypic to genotypic methods as they yield more sensitive and accurate results.

In our lab culture collection (Ankara University, Faculty of Science, Microbial Genetic Laboratory), we have 144 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 16S-23S ISR (intergenic spacer region) RFLP techniques in discrimination of 144 strains belonging to LAB at the species and the intra-species level. In our study; by use of universal primer sets, 16S-23S rDNA spacer regions (ISR) were amplified and the resultant amplicons were used in ISR RFLP analysis by use of several restriction endonucleases. 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 Dice product-moment correlation coefficient (r) for 16S ARDRA. The UPGMA clustering algorithm was used to generate a dendrogram. A coefficient of correlation of 90 % was selected to distinguish the clusters for 16S-23S rDNA ISR and RFLP. Depending on the restriction enzymes used throughout the studies, the result of the study demonstrated the slightly discrimination of these techniques towards the differentiation of related LAB strains on species and strains levels.

March 2012, 156 pages

Key Words: Lactic Acid Bacteria (LAB), 16S-23S rDNA, RFLP, molecular taxonomy

TEŞEKKÜR

“Laktik Asit Bakterilerinde tür içi ve türler arası ayırmda 16S-23S rDNA ISR -RFLP tekniğinin değerdendirilmesi” konulu tez çalışmam **Ankara Üniversitesi-BAP** (Bilimsel Araştırma Projeleri)’nin 10B4240002 nolu Hızlı Destek Projeleri (HDP) tarafından desteklenmiştir. Tezimin başarılı bir şekilde sonuçlanabilmesi için gerekli desteği sağlayan BAP’a teşekkür ederiz.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her aşamada bana yol gösteren, bilgilerini paylaşan, bana inanarak ve güvenerek her zaman arkamda olan, benden desteğini hiç esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU’na (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı);

Yüksek lisans tezimin deney aşamalarında yanımda olan, benden bilgi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, Dr. Fadime KIRAN’a;

Ankara Üniversitesi Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı’ndaki tüm arkadaşlarıma göstermiş oldukları yakın ilgi ve anlayış için teşekkür ediyorum.

Bugüne kadar hayatımın her aşamasında gerek maddi gerekse manevi her anlamda benim her zaman arkamda olduğunu bildiğim, her türlü sıkıntıda beni hiç yalnız bırakmayan sevgili annem, babam ve kardeşime beni bugünlere kadar getirdikleri, desteklerini hiç esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ediyorum.

Ve son olarak;

Hayatımın bu en stresli ve aynı zamanda en keyifli döneminde göstermiş olduğum çalışma temposunun her adımında biraz daha güçlendiğim için ve göstermiş olduğum gayretin bu kadar güzel bir şekilde sonuçlandığı için kendime çok teşekkür ediyorum.

Bilge ÇETİN

Ankara, Mart 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Laktik Asit Bakterileri.....	7
2.1.1 <i>Enterococcus</i>	7
2.1.2 <i>Lactococcus</i>	7
2.1.3 <i>Pediococcus</i>	8
2.1.4 <i>Leuconostoc</i>	9
2.1.5 <i>Lactobacillus</i>	9
2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi	10
2.2.1 Starter kültür.....	11
2.2.2 Probiyotik	13
2.2.3 Bakteriyosin üretimi	15
2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Metotlar.....	18
2.3.1 RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)	27
2.3.1.1 Southern blotting temelli RFLP yöntemi.....	28
2.3.1.2 PZR temelli RFLP tekniği.....	30
2.4 ISR-PZR (Genler Arası Ayırıcı Bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1 Materyal	36
3.1.1 Bakteri kültürleri	36
3.1.2 Bakterilerin aktivasyonları ve gelişimleri için kullanılan besiyerleri	36
3.1.3 Tampon ve çözeltiler	36
3.1.4 Kromozomal (genomik) DNA izolasyon kiti.....	37
3.1.5 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler	37
3.2 Yöntem	41
3.2.1 Laktik asit bakterilerinin aktifleştirilmesi.....	41
3.2.2 Laktik asit bakterilerinden kromozomal DNA izolasyonu	41
3.2.3 Kromozomal DNA'nın saflık (kalite) ve miktar tayini.....	42
3.2.4 Agaroz jel elektroforezi	43
3.2.5 Kullanılan primerler	43
3.2.6 PZR amplifikasyonu	44
3.2.7 Kullanılan restriksiyon enzimleri (RE).....	44
3.2.8 Restriksiyon enzimleri ile kesim	45
3.2.9 Sonuçların değerlendirilmesi	46
4. BULGULAR	47
4.1 Kromozomal DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	47
4.2 Kromozomal DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi.....	51
4.3 16S rDNA-23S rDNA ISR	52
4.3.1 PZR uygulamaları.....	52

4.3.2 Restriksiyon enzimleri ile kesim	59
4.4 Dendogram İndekslerinin Oluşturulması	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	119
KAYNAKLAR	133
EKLER.....	147
EK 1 Bakteri gelişiminde kullanılan besiyerleri	148
EK 2 Tampon ve çözeltiler	149
EK 3 Kromozomal DNA izolasyonunda kullanılan Promega Wizard Genomic DNA Isolation Kit prospektüsü	151
EK 4 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler	152
EK 5 Kimyasallar	154
ÖZGEÇMİŞ	155

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
API CH	Analytical Profile Index Kit
ARDRA	Çoğaltılmış rDNA'nın Restriksiyon Analizi
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Baz çifti
C	Sitozin
CO ₂	Karbondioksit
°C	Santigrat Derece
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
ERIC	Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus
EtBr	Etidyum Bromür
G	Guanin
gr	Gram
ISR	Genler Arası Ayırıcı Bölge
ITS	İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge
LAB	Laktik Asit Bakterisi
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Broth
NaCl	Sodyumklorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NRL	Regional Research Laboratory Collection
nt	Nükleotid
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Dalgalı Alan Jel Elektroforezi

RAPD -PCR	Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA-PZR
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RE	Restriksiyon Enzimleri
Rep-PCR	Tekrarlanan Palindromlara Dayalı- PZR
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonkleikasit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TGE	Trypton Glukoz Yeast Ekstrakt
TGE	Trypton Glukoz Yeast Ekstrakt
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
UV	Ultra Viyole
V	Volt
l	Mikro litre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bakteriyosin zonunun oluşumu	16
Şekil 2.2 Southern blotting tekniği.....	29
Şekil 2.3 16S-23S ara bölgenin ve fonksiyonel bölgelerin şematik gösterimi	31
Şekil 4.1 Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinsden seçilmiş birer suşa ait kromozomal DNA görüntüsü	52
Şekil 4.2 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü	54
Şekil 4.3 <i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü	55
Şekil 4.4 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.5 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.6 <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü.....	58
Şekil 4.7 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 4.8 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DdeI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	61
Şekil 4.9 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	62
Şekil 4.10 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>Hinfi</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	63
Şekil 4.11 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>SspI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	64

Şekil 4.12 <i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	65
Şekil 4.13 <i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	66
Şekil 4.14 <i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DdeI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	67
Şekil 4.15 <i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 4.16 <i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>Hinfi</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 4.17 <i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	70
Şekil 4.18 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	71
Şekil 4.19 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DdeI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	72
Şekil 4.20 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>Hinfi</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	73
Şekil 4.21 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	74

Şekil 4.22 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>VspI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	75
Şekil 4.23 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DraI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	76
Şekil 4.24 <i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	77
Şekil 4.25 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	78
Şekil 4.26 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DdeI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	79
Şekil 4.27 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DraI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	80
Şekil 4.28 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	81
Şekil 4.29 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>HinfI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	82
Şekil 4.30 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	83
Şekil 4.31 <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>VspI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	84

Şekil 4.32 <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>AluI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	85
Şekil 4.33 <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>DdeI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	86
Şekil 4.34 <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>TaqI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	87
Şekil 4.35 <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin <i>HaeIII</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü	88
Şekil 4.36 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram.....	90
Şekil 4.37 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 49 adet <i>Lactococcus</i> suşuna ait dendogram	91
Şekil 4.38 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram	92
Şekil 4.39 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram	92
Şekil 4.40 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşuna ait dendogram.....	93
Şekil 4.41 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 144 suşa ait dendogram	94
Şekil 4.42 <i>AluI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram....	95
Şekil 4.43 <i>HaeIII</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram	96
Şekil 4.44 <i>HinfI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram	97
Şekil 4.45 <i>SspI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram	98

Şekil 4.46	<i>TaqI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram	99
Şekil 4.47	<i>DdeI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram ..	100
Şekil 4.48	<i>AluI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 49 adet <i>Lactococcus</i> suşuna ait dendogram	101
Şekil 4.49	<i>DdeI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 49 adet <i>Lactococcus</i> suşuna ait dendogram	102
Şekil 4.50	<i>HaeIII</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 49 adet <i>Lactococcus</i> suşuna ait dendogram....	103
Şekil 4.51	<i>HinfI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 49 adet <i>Lactococcus</i> suşuna ait dendogram	104
Şekil 4.52	<i>TaqI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 49 adet <i>Lactococcus</i> suşuna ait dendogram	105
Şekil 4.53	<i>AluI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram....	106
Şekil 4.54	<i>DdeI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram ..	107
Şekil 4.55	<i>DraI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram ..	108
Şekil 4.56	<i>HaeIII</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram....	109
Şekil 4.57	<i>HinfI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram....	110
Şekil 4.58	<i>VspI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram....	111
Şekil 4.59	<i>TaqI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram....	112
Şekil 4.60	<i>AluI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	112
Şekil 4.61	<i>DdeI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
	UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	113

Şekil 4.62 <i>DraI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	113
Şekil 4.63 <i>TaqI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	113
Şekil 4.64 <i>VspI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	114
Şekil 4.65 <i>HaeIII</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	114
Şekil 4.66 <i>HinfI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 3 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	114
Şekil 4.67 <i>AluI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Lactobacillus</i> suşuna ait dendogram ..	115
Şekil 4.68 <i>DdeI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Lactobacillus</i> suşuna ait dendogram ..	116
Şekil 4.69 <i>HaeIII</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Lactobacillus</i> suşuna ait dendogram ..	117
Şekil 4.70 <i>TaqI</i> enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin	
UPGMA'sından elde edilen 26 adet <i>Lactobacillus</i> suşuna ait dendogram ..	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Starter laktik asit bakterilerinin bazı karakteristik özellikleri.....	13
Çizelge 2.2 Probiyotiklerin başlıca özellikleri	15
Çizelge 2.3 Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları	28
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri.....	37
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri, kesim noktaları ve optimum çalıştıkları sıcaklık değerleri	45
Çizelge 3.3 Restriksiyon enzim kesim protokolü	45
Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları	47
Çizelge 5.1 Enzim kesimi sonuçları.....	131

1. GİRİŞ

Mikrobiyoloji bilim dalının doğuşu ile birlikte, tabiatta çok yaygın olarak bulunduğu bilinen laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar da başlamıştır. Laktik asit bakterilerini ilk olarak Orla-Jensen 1919 yılında morfolojisi, ekolojisi ve optimum üreme sıcaklıkları olmak üzere başlıca fizyolojik özelliklerine dayanarak sınıflandırmıştır.

Laktik asit bakterileri (LAB) karbonhidrat fermantasyonu sonucu laktik asit oluşturan bakterilerdir. Oldukça fazla türe sahip olan laktik asit bakterileri, gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz negatif, sitokroma sahip olmayan, mikroaerofilik veya anaerobik, aside dayanıklı, kuvvetli fermentatif olup şeker fermentasyonu sırasında başlıca son ürün olarak laktik asit üreten kok ya da çubuk şeklinde bakterilerdir (Holzapfel vd. 2007).

LAB endüstriyel alanda önemli olan başlıca bakterilerdir. Tabiatta yaygın olmaları, özellikle gıda üretiminde, sağlığı düzenlemede, makromoleküllerin, enzim ve metabolitlerin üretiminde kullanmaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar. LAB süt, bitki, etler, tahıllar, sebzeler ve mide-barsak sistemi olmak üzere çok geniş bir yayılım alanına sahiptirler (Pfeiler ve Klaenhammer 2007).

Fermente gıda ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterileri; Pek çok gıdaya doğal veya starter kültür olarak ilave edilerek, fermente ürünlerde tat, koku gibi organoleptik adı verilen özelliklerin kazandırılması, gıdaların olgunlaştırılması, üretimi, dayanıklılığının artırılmasında önemli rol oynarlar (Stiles ve Holzapfel 1997). Bakteriyosin gibi gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimini engelleyen antimikrobiyal madde üretim yetenekleri ile gıda endüstrisi için büyük öneme sahiptirler. Bazı üyeleri ağız, bağırsak ve vajinada da bulunmaktadır. Hayvanlarda ve insanlarda, özellikle gençlerde, sindirim sisteminde önemli bir rol oynamaktadırlar.

Yıllardan beri bakterilerin taksonomisi ve bilimsel adlandırılmasında sürekli değişimler olmasına rağmen son 10-20 yıldaki değişimler dikkat çekicidir (Stiles ve Holzapfel 1997).

Faydalı özelliklerinin yanında, gıdalarda bozulmalara sebep olan bazı laktik asit bakterilerinin olması bu bakteri grubuna olan ilgiyi daha da artırmış ve yapılan çalışmalar derinlik kazanmıştır (Rebecchi vd. 1998). LAB lerinin endüstriyel uygulamalarında, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun belirgin ve spesifik olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir (Dicks vd. 1990, Dykes ve von Holy 1994).

LAB'ler genel olarak fenotipik ve genotipik yöntemler olmak üzere iki temel yöntem ile incelenmektedir.

Fenotipik yöntemler, suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürününü karakterize eder ve cins-suş düzeyinde tanımlamaya olanak sağlamaktadır. Fakat LAB identifikasyonunda kullanılan fenotipik testlerin yorumlanması oldukça zordur. Fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler ile biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirmesi, bakteriyosin tiplendirmesi ve antibiyotiklere duyarlılık profilleri yer almaktadır. Bu teknikler zaman alıcı, moleküler yöntemler ile karşılaştırıldıklarında daha az ayırım gücüne sahip ve çoğunlukla değişken sonuçlar veren yöntemlerdir (Temmerman vd. 2004).

Yıllardır yapılan Laktik asit bakteri (LAB) tanımlama çalışmalarının çoğunluğunu fenotipik testler oluşturmaktadır. Ancak bu yöntemler; bir cins içindeki alt türleri ve suşları net bir şekilde ayırt etmede çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle genotipik özelliklere dayalı yeni yöntemler geliştirilmeli ve bakteriler net bir şekilde tanımlanmalıdır. LAB tanımlama/tiplendirme çalışmaları son zamanlarda fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere doğru kaymıştır (Babalola 2003).

Genotipik yöntemler, organizmanın genetik yapısının analizini temel alırlar. DNA temelli bu yöntemler, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins-suş seviyesine kadar identifikasyonunu sağlayabilmektedir. Nükleotit sekanslarının kullanımını içeren bu teknikler oldukça hızlı tekniklerdir. Besi ortamındaki

değişikliklerden etkilenmemeleri bakımından fenotipik identifikasyon yöntemlerine kıyasla oldukça önemli avantajlar sunmaktadır (Moschetti vd. 1998, Bush ve Nitschko 1999).

Moleküler teknikler, güçlü bir ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamalarının kolay olması, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Moschetti vd. 1998, Bush ve Nitschko 1999, Randazzo vd. 2009, Singh vd. 2009). Genotipik yöntemler arasında pilazmit tiplendirmesi, ribotiplendirme, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; restriction fragment length polymorphism), pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; polymerase chain reaction), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD; randomly amplified polymorphic DNA), çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP; amplified fragment length polymorphism), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), Arbitrarily Primed-PZR (AP-PZR), Repetitive extragenic palindrome (rep-PZR) ve 16S rDNA'ya dayalı dizi analizleri yer almaktadır (Randazzo vd. 2009).

Bu çalışmada, birçok farklı kaynaktan izole edilen ve birbirleri ile oldukça benzerlik gösteren laktik asit bakterilerine (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Pediococcus*) ait 144 adet suşun 16S-23S rDNA ISR bölgesi ve bu bölge üzerinde yapılacak olan RFLP çalışmalarının neticesinde elde edilen bant paternlerinin laktik asit bakterilerine ait tür ve suşların ayırımındaki taksonomik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Laktik asit bakterileri “güvenli bakteriler” olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar. Gıda kökenli patojen ve gıdayı bozucu mikroorganizmaları inhibe etmek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılan, gıdanın duyuşal özelliklerinde değışime sebep olmayan antagonistik kültürlere koruyucu kültürler denir. Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya başlangıç kültür olarak kullanılan bir çok laktik asit bakterisinde antagonistik etki; diğer mikroorganizmalarla besin açısından yarışarak ya da asetik, propiyonik ve laktik asit gibi organik asitler, hidrojen peroksit, antimikrobiyal enzimler, diasetil ve bakteriyosinler gibi bir veya daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşikler üretmelerinden kaynaklanmaktadır (Työppönen vd. 2003, Devlieghere vd. 2004).

Laktik asit, tabiatda çok yaygın olarak bulunan asitlerden birisidir ve asetik asit ile birlikte geniş şekilde gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Dünyada laktik asit; peynir, tereyağı, bira, ekmek hamuru, süttozu içeren gıdalar, sığır, koyun ve kanatlı karkaslarında koruyucu olarak kullanılmaktadır (Hutton vd. 1991, Boston vd. 1995).

Morfolojik açıdan değışken özellik gösteren LAB lar fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedirler. Tüm üyeler; Gram pozitif ve hareketsizdir. *Sporolactobacillus inulinus* türü hariç spor oluşturmazlar. Katalaz negatif, fakültatif anaerobik, aside dayanıklı, kuvvetli fermentatif, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Shape 1966). Büyüme ve gelişimleri için glikoz ve amonyum yanında bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyarlar (Holzapfel vd. 2007).

LAB’ın ortak özelliğı, glukozdan laktik asit fermentasyonu sonucu laktik asit oluşturmalarıdır. Laktik asit fermentasyonu ile besinlerde hem tat, koku gibi organoleptik özelliklerin oluşumu hem de fermentasyon sağlanmaktadır (Salminen ve Wright 1993, Tekinşen ve Atasever 1994). Bu bakteriler düşük guanin-sitozin (G+C) içeriklerine sahiplerdir ve genom büyüklükleri 1.8Mb (*Oenococcus oeni*) ve 3.3Mb (*Lactobacillus plantarum*) arasında değışmektedir (Pfeiler ve Klaenhammer 2007).

Günümüzde bakteri taksonomisindeki büyük değişiklikleri, önemli düzeyde bakteri DNA'sındaki nükleotit oranları (G+C) belirlemektedir. G+C içeriği kesin olmamasına rağmen, geniş dizilimli cinslerin alt dallarına ayrılmasında iyi bir göstergedir (Stackebrand ve Teuber 1988). Ayrıca izole edilen genlerinin elektroforetik özellikleri, DNA: DNA hibridizasyonu ve RNA'nın yapısı ve sıralanması gibi moleküler özellikler taksonomide kullanılan başlıca çok önemli tekniklerdir. Bunlar LAB'ın taksonomisinde çok önemli değişikliklerin yapılmasına neden olmuştur (Schleifer vd. 1985, Stiles ve Holzapfel 1997). Çünkü LAB'da önce yapılan sınıflandırmanın temeli fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerin (örn., farklı sıcaklık, pH değeri ve tuz konsantrasyonlarında gelişim ve karbonhidrat katabolizması) incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktaydı (Stiles ve Holzapfel 1997, Gobbetti vd. 2005).

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat metabolizmasına göre iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar glukozu yalnızca laktik asit veya bunun yanında diğer ürünlere fermente etme özelliklerine göre; homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri olarak isimlendirilirler.

Homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %95-100 oranında laktik asit üretirler. Bunun yanında az miktarda besi yerinin özelliğine göre formik asit, asetik asit ve etanol oluştururlar.

Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %50 laktik asit üretirken, bunun yanı sıra yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Drinan vd. 1976, Prescott ve Dunn 1987, Halkman 1991, Yetişmeyen 1995).

Homofermentatif yol:



Heterofermentatif yol:



Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan laktik asit bakterilerine, cins ve türe göre değişmek üzere süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların barsak sistemlerinde rastlanır (Tunail ve Köşker 1989, Tekinşen ve Atasever 1994).

Laktik asit bakterilerinin bir başka karakteristik özelliği de karmaşık büyüme ve gelişme sistemleridir. Grubun hiçbir üyesi, içinde yalnız glukoz ve amonyum bulunan bir mineral besi ortamında gelişmez. Pek çoğu vitaminlerden bir ya da birden fazlasına gerek duyarlar. Ayrıca amino asit istemleri de çok fazladır. Laktik asit bakterileri genellikle, vitamince zengin, maya ekstraktı, domates suyu, peynir altı suyu, süt serumu veya kan içeren karmaşık besi yerlerinde iyi gelişirler (Tunail ve Köşker 1989, Halkman 1991).

Laktik asit bakterileri, laktik asidin yanında hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler oluştururlar (Reiter ve Harnulv 1984, Daeschel 1989, Fitzsimmons ve Berry 1994). Laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu oluşan çeşitli antimikrobiyal maddeler, diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engeller (Attaie vd. 1987, Lindgren ve Dobrogosz 1990).

LAB lar fermente et ürünlerinde olgunlaşma süresini kısaltmak ve kontrol altına almak, dayanıklılık süresini uzatmak, ürüne renk, aroma ve lezzet kazandırmak amacıyla tek ya da kombine olarak kullanılan yararlı mikroorganizmalardır. Aynı zamanda bulundukları gıdalarda biyojen aminlerin oluşumu ve istenilmeyen mikroorganizmaların gelişimleri engellenerek, daha sağlıklı, kaliteli ve standart bir ürün elde edilmektedir (Salminen ve Wright 1993, Çon ve Gökalp 2000).

Genetik çalışmalar sonucu ortaya çıkan sınıflandırmada gıdalarda önem arz eden başlıca LAB cinsleri: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenecoccus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır (Stiles ve Holzapfel 1997, Axelsson 2004, Endo ve Okada 2005, Tangüler ve Erten 2006).

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Gıdalarla ilişkili olan laktik asit bakterileri arasından 5 cinsin özellikleri anlatılmıştır.

2.1.1 *Enterococcus*

Enterococcus cinsi bakteriler oval, uzun zincir şeklinde bir morfolojiye sahiplerdir ve genellikle hareketsizlerdir. Hayvan ve insan bağırsak sisteminde yer almasının yanında süt ürünleri ve diğer fermente gıdalarda yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileridir. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* süt ürünlerinde en sık rastlanan türleridir. Bu türler özellikle Akdeniz havzasında hem çiğ hem de pastörize sütlerden geleneksel olarak üretilen peynirlerde yoğun olarak bulunmaktadır (Suzzi vd. 2000, Andrighetto vd. 2001, Giraffa 2003).

Enterococcus türleri oksijen kullanımı bakımından fakültatif anaerob bakterilerdir. Farklı karbonhidrat formlarını metabolize ederek L (+) laktik aside çevirir ve gaz oluşturmazlar. Optimum gelişim sıcaklıkları 37°C'dir. 10-45°C 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 vd. 2003). Diğer türler kadar gıda endüstrisi açısından önem taşımamaktadır. Güney Avrupa'da bazı yöresel peynirlerde bulunmuştur. Tuza olan toleransları, hızlı asit üretimleri, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmaları starter kültür olarak kullanımları için idealdir. Özellikle probiyotik kültürlerde kullanımı bulunmaktadır (Franz vd. 2003).

2.1.2 *Lactococcus*

Lactococcus cinsi bakteriler kok şeklinde bir morfolojiye sahiptir. Küre ya da kısa zincir halinde bir araya gelen koklar morfolojik görüntüyü oluşturur. Zincir uzunluğu türlere göre değişir. Laktozdan L (+) laktik asit oluşturma yeteneğine sahiplerdir ve gaz oluşturmazlar. Süt ve bitki ürünlerinde bulunurlar. Optimum gelişme sıcaklığı 30°C'dir. 10°C'de gelişebilmelerine karşılık 45°C'de gelişemezler (Holt vd. 1994). *Lactococcus* cinsi bakteriler; Gram-pozitif, homofermentatif, mikroaerofilik bakterilerdir. Orla

Jensen tarafından 1919 yılında yapılan sınıflandırma neticesinde *Streptococcus* cinsine dahil edilmişlerdir. Daha patojenik streptokoklardan serolojik N antijen grubuna sahip olmaları ile ayrılmışlardır. Teuber tarafından 1995’de açıklanan taksonomik sınıflandırmada *Lactococcus* olarak isimlendirilmişler ve diğer gruplardan ayrılmışlardır (Teuber 1995).

Lactococcus grubu bakteriler *Lactococcus garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* ve *Lc. lactis* olmak üzere beş farklı tür içermektedir. Ancak, bu türler arasında yalnızca *Lc. lactis* süt teknolojisinde starter kültür olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu tür, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* olmak üzere iki alt tür ve *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* olmak üzere bir biovaryete içermektedir (Schleifer vd. 1985, Stiles ve Holzapfel 1997). *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, yüksek diasetil üretme yeteneği ile *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alt türlerinden ayırt edilmektedir (Samarzija vd. 2001). *Lc. lactis* spp. *lactis* ise arjininden amonyak üretebilmesiyle *Lc. lactis* subsp. *cremoris* alt türünden ayırt edilmektedir.

2.1.3 *Pediococcus*

Pediococcus cinsi bakteriler gram pozitif, hareketsiz, mikroaerofilik ve homofermentatif, katalaz negatif, mikroskop altında tetrat şeklinde bir morfolojiye sahiplerdir (Stiles ve Holzapfel 1997). Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi tarafından *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerecisiae* ve *Pediococcus dextrinicus* olmak üzere 7 türle temsil edilmektedir (Raccach 1987). Optimum gelişme sıcaklıkları 35°C’dir. 50°C’de gelişen türleri de (örn. *P. acidilactici*) bulunmaktadır. Pastörizasyon işlemi neticesinde varlıklarını sürdürebilmektedirler. Fermente gıdalar (örn.; turşu, şarap) ve sebzelerde sıklıkla bulunurlar (Salminen ve Wright 1993, Ünlütürk ve Turantaş 1999).

2.1.4 *Leuconostoc*

Hücreler yuvarlak veya çoğunlukla mercimek tanesi şeklinde olup ikili veya zincir şeklinde bulunurlar. Hareketsiz, spor oluşturmeyen gram pozitif bakterilerdir. Fermantasyon kapasiteleri mono-disakkaritler ile sınırlı olup heterofermantatif laktik asit bakteri grubunda yer alırlar. Fermantasyon sonucunda D-laktat ve etanol yanında gaz oluşumu gözlenir. Süt, peynir ve et gibi fermente ürünlerin oluşumunda ve organoleptik adı verilen tat, koku gibi özelliklerin kalitesinin belirlenmesinde önemli role sahiptirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasındadır (Holt vd. 1994, Dellaglio vd. 1995, Budde vd. 2003). Cins iki gruba ayrılır. I. gruptaki türler, genellikle 5.5-6.5, seyrek olarak 5.0 pH'da gelişirler. Süt, süt ürünleri ve bitkisel ürünleri fermente ederek mukus oluştururlar. II. Grup 4.8-4.2 pH'da gelişebilen *Leuconostoc oenos*'u içerir. Bu tür yüksek pH'da gelişmemektedir (Dellaglio vd. 1994, Kılıç 2008). *Leuconostoc* cinsi, her ne kadar Orla Jensen tarafından heterofermantatif kok olarak ayrı bir soyda kabul edilsede, morfolojisi bu soyu streptokoklara yakın kılmıştır (Stiles ve Holzapfel 1997).

2.1.5 *Lactobacillus*

Lactobacillus cinsi bakteriler düz ya da hafif kıvrık çubuk şekilli bir morfolojiye sahiptir. Hücreleri tek tek ya da zincir şeklinde bulunur. Gram-pozitif, katalaz negatif, anaerobik, mikroaerofilik ya da fakültatif anaerobiktirler. *Lactobacillus* cinsi biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik gösteren üyelere sahiptir. Beslenme istekleri de oldukça komplekstir. *Lactobacillus* cinsinin önemli bir üyesi olan *Lactobacillus bulgaricus*, Weiss ve arkadaşlarının (1984) önerisiyle *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ismiyle anılmaya başlanmıştır (Krieg ve Holt 1984, Wood ve Holzapfel 1995).

DNA'larında genellikle % 50 den daha az guanin+sitozin (G+C) içerirler. Glukozu karbon kaynağı olarak kullanan laktobasiller ya homofermantatif ya da heterofermantatifler. *Lactobacillus* cinsi tarafından çok sayıda bileşik (sitrat, malat, tartarat, nitrat, nitrit vb.) metabolize edilebilir ve enerji kaynağı ya da elektron akseptörü

olarak kullanılabilir (Hammes ve Vogel 1995). Doğada karbonhidrat içeren substratların zengin bir şekilde elde edilebileceği ortamlarda bulunurlar. Bundan dolayı da insan ya da hayvanların mukozal membranları (ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, bağırsak sistemi ve vajina), bitkilerin ya da bitkisel materyallerin üzeri, gübreler, lağım pisliği, fermente olan ya da bozulan gıdalar gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler (Hammes ve Vogel 1995).

Lactobacillus “*Thermobacterium*”, “*Streptobacterium*” ve “*Betabacterium*” olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir (Klein vd. 1998).

***Thermobacterium*:** Homofermentatif bakteri türlerini kapsamaktadır. Bu grubun optimum gelişme sıcaklığı 40°C civarındadır. Bakteriler uzun çubuklar halinde tek tek, nadiren zincir şeklinde bulunurlar. 15°C’nin altında gelişme göstermezler. *Thermobacterium* grubunda *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* bakterileri yer alır. Bunlardan *Lactobacilli delbrueckii* dışında hepsi saf kültür hazırlanmasında kullanılırlar.

***Streptobacterium*:** Fakültatif heterofermentatif bakteri türleri yer almaktadır. Bunlar heksozların hemen hemen tümünü laktik asite fermente etmelerinin yanı sıra, pentozlardan laktik asit ve asetik asit oluşturma özelliklerine sahiptirler ve 23-35°C arasında gelişirler.

***Betabacterium*:** Heterofermentatif bakteri türlerini kapsamaktadır. Bunlar heksozları %50 oranında laktik asit, etanol ve CO₂’e fermente ederler. 15-45°C arasında gelişimleri türlere göre değişiklik gösterir (Kılıç 2001).

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Laktik asit bakterileri, tabiatта yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisi açısından büyük bir öneme sahiptirler.

Gıdaların ve hafif alkollü içeceklerin üretiminde uzun yıllar kullanılmasının yanında, özellikle son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar haline gelmişlerdir. Çiğ materyalin laktik asit bakterileri ile fermente edilerek yeni gıdaların üretilmesi ve çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metotlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen fermente et ürünleri ve farklı sebzelerden üretilen turşular laktik asit fermantasyonu ile hazırlanmakta ve muhafaza edilmektedir (Andersson 1989, Mayra-Makinen ve Biret 1993).

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 ve gıda endüstrisinde sağlamış oldukları bu faydalı özellikler bu bakteri grubuna olan ilgiyi daha da artırmış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar derinlik kazanmıştır (Rebecchi vd. 1998). Bu nedenlerden dolayı laktik asit bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker ve de Bruijn 2000).

Bununla beraber laktik asit fermentasyonuna tabi tutulan bazı gıdaların üretilen organik asitlerden dolayı raf ömrünün uzadığı bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin organik asitler dışında diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren hidrojen peroksit, serbest yağ asitleri, amonyak, diasetil ve bakteriyosin gibi inhibitör maddeleri ürettiği saptanmıştır (Daeschel 1989, Vandenberg 1993).

2.2.1 Starter kültür

Fermantatif özelliklerinin iyi bilinmesi ve pek çok alanı ilgilendiren iddialı özellikleri ile laktik asit bakterileri fermente ürün eldesinde starter kültür olarak kullanılmakta ve gıda üretim aşamalarında önemli bir görevi üstlenmektedirler (Wouters vd. 2002).

Laktik asit bakterilerinin en önemli karakteristik özelliklerinden biri; süt şekeri olan laktozu kullanarak fermentasyon sonucunda laktik asit üretmeleridir. Bu reaksiyonu başlatan kültüre starter kültür denir (Lhys 2002).

Süt ürünlerinde yaklaşık 100 yıldan bu yana endüstriyel boyutta üretilmiş starter kültürler kullanılmaktadır. Fermente içecek ve gıdaların pek çoğu et, süt, sebze ve meyve gibi oldukça farklı çiğ tarımsal ürünlerden elde edilmektedir. Bugün başta laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, faj dirençliliği ve aroma oluşturma gücü gibi özelliklere göre seçilmiş starter kültürler gıda üretim endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Wouters vd. 2002).

Starter kültür kullanımı karbonhidrat fermentasyonunu ve proteolizisi geliştirmekte, çeşitli aroma bileşiklerinin üretimini sağlamakta ve patojen saldırılarına karşı ürünü korumaktadır (Dinsmore ve Klaenhammer 1995, Garvey vd. 1995).

Starter kültürleri iki başlık altında incelemek mümkündür: Mezofilik starter kültürler ve termofilik starter kültürler (Çizelge 2.1).

1) Mezofilik Starter Kültürler: Bu bakteriler 26°C’de gelişim gösterirler. Mezofilik starter kültürlerden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* laktik asit üretirken, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ve *Leuconostoc* spp. sitrik asit fermentasyonu oluşturmaktadır. Sonuçta, asetoin/diasetil ve CO₂ oluşumu gözlemlenmektedir (Cogan 1996).

2) Termofilik Starter Kültürler: Bu bakteriler 42°C’de gelişim gösterirler. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus* gibi termofilik starter kültürler, yüksek pişirme sıcaklıklarına maruz kalan peynir benzeri ürünlerin oluşumunda kullanılmaktadırlar (Cogan 1996).

Starter kültür olarak ürüne bağlı olmak kaydı ile genellikle mezofilik laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* ya da

termofillerden *Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kullanılmaktadır (Cogan ve Hill 1993).

Çizelge 2.1 Starter laktik asit bakterilerinin bazı karakteristik özellikleri (Early 1998)

Tür	Şekil	Metabolik ürün	Fonksiyon
Mezofilik			
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kok	Laktat	Asit
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Kok	Laktat	Asit
<i>Leucunostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Kok	Laktat, diasetil, CO ₂	Tat
<i>Leuconostoc lactis</i>	Kok	Laktat, diasetil, CO ₂	Asit
Termofilik			
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Kok	Laktat, asetaldehit	Tat
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Çubuk	Laktat, asetaldehit	Tat ve asit
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Çubuk	Laktat	Tat ve asit
<i>Lactobacillus lactis</i>	Çubuk	Laktat	Tat ve asit

2.2.2 Probiyotik

Probiyotiklerin olumlu etkilerine ait ilk bilimsel teoriler 1900’lü yılların başında ünlü mikrobiyolog Elie Metchnikoff tarafından ortaya çıkarılmıştır. Metchnikoff fermente süt ürünleri tüketimi yolu ile bağırsak mikroflorasının olumsuz etkilerinin

engellenebileceğini ve kişilerin yaşam sürelerinin artabileceğini belirtmiştir (Ross vd. 2002, Sullivan ve Nord 2002). “Probiyotik” Yunanca’da “yaşam için” anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir (Gomes ve Malcata 1999).

Probiyotiklerin en çok kabul gören tanımı, Roy Fuller tarafından 1989 yılında “tüketici sağlığına bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır” şeklinde yapılmıştır (Fuller 1989). Bu tanım 1998 yılında Salminen ve arkadaşları (1998) tarafından “insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal düzenleme” olarak değiştirilmiştir. Probiyotikler genellikle fermente süt ürünleri ya da diyet katkısı olarak alınabilen, intestinal sistemde biyolojik aktiviteleri ve canlılıklarını sürdürerek yasama kabiliyetleriyle tanımlanan, bir çoğu patojen olmayan mikroorganizmalardır ve *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. ve *Enterococcus* spp. gibi insan sindirim sisteminde doğal olarak bulunmaktadır (Gibson 2002, Guslandi 2003).

Probiyotik bakterilerin sağlık üzerinde olumlu etkileri; laktoz toleransını azaltma, patojenik virüsleri ve bakterileri inhibe etme, vitamin üretimi, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, tümör oluşumunu inhibe etme, diyare oluşumunu engelleme, kalsiyum absorpsiyonunu geliştirme, antikanserojenik aktivitede bulunma ve bağırsak mikrobiyal dengesinin düzenlenmesidir (Salminen vd. 1998).

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların sahip olması gereken çeşitli özellikleri vardır (Çizelge 2.2). Bu özelliklerden en önemlileri; düşük pH, safra tuzları ve pankreatik enzimlere olan dirençleridir. Bu özellikleri probiyotiklerin gastrointestinal sistem boyunca canlılıklarını korumalarını sağlamaktadır. İntestinal mukoza yüzeyindeki reseptörlere bağlanabilme, immün modülasyonu, patojenlerin reseptörlere tutunmasını önleme, çeşitli nedenlerle hasar görmüş mukozanın iyileştirilmesi ve kısa süreli kolonizasyonun uzatılması için oldukça önemlidir. Probiyotiklerin insan orijinli olması spesifik sağlık yararlarını gösterebilmeleri ve konakçı ile diğer muhtemel

ilişkileri için gerekli olabilir. Probiyotiklerin insan sağlığına herhangi bir zarar vermemesi yani kullanım güvenliğine sahip olması gerekmektedir (Famularo vd. 1997).

Çizelge 2.2 Probiyotiklerin başlıca özellikleri (Salminen vd. 1992, Gibson vd. 1997, Ouwehand vd. 2002)

Özellik	Yarar
• Pankreatik enzimler, asit ve safra tuzlarına direnç	• İntestinal sistemde canlılığı sürdürebilme
• İntestinal mukozaya tutunabilme	• İmmün sistemin modülasyonu • Patojenlerin tutunmasını önleme • Hasarlı mukozanın iyileştirilmesi • Kısa süreli kolonizasyonun uzatılması
• İnsan orijinli olma	• Konakçı ile spesifik interaksiyonlar
• Dokümanite edilmiş sağlık yararları	• Olası sağlık etkilerinin doğrulanması
• Güvenlik	• Tüketici için sağlık riskinin olmaması
• İyi teknolojik özellikler	• Stabilité • Endüstriyel düzeyde üretilebilme • Oksijene tolerans

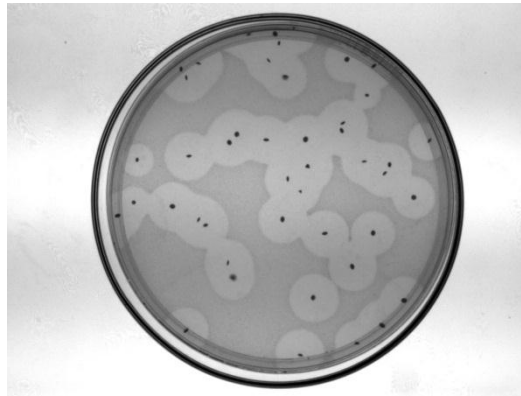
2.2.3 Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler, mikroorganizmalar tarafından, ribozomal olarak sentezlenerek salgılanan, protein yapısındaki antimikrobiyal bileşenlerdir (Lewus vd. 1991, Bromberg vd. 2004). Bakteriyosinler biyokimyasal özellikleri, moleküler ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik yapılanmaları ile oldukça farklılık gösterirler (Piard ve Desmazeaud 1992). Fakat genellikle kısa zincirli, küçük molekül ağırlığına sahiptirler ve etki spektrumları daha çok gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkilidir (Helander vd. 1997).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak oldukça faydalı özellikler taşıdığını açıkça gözler önüne sermiştir. Gıdalara koruyucu olarak bakteriyosin ilavesi ile;

- Gıdaların raf ömrü uzatılmakta,
- saklama koşulları altındaki sıcaklıklarda ekstra koruma sağlanmakta,
- gıda kökenli patojenlerin besin zinciri ile dağılımı azaltılmakta,
- gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmaların neden olduğu ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte,
- kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılmakta,
- koruma için daha az uygulama yapılması sebebi ile ürünün organoleptik özellikleri ve besinsel değeri daha iyi korunabilmektedir (Thomas ve Wimpenny 1996).

Laktik asit bakterilerinin pek çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. Antimikrobiyal etki *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen lactolin ya da *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin gibi antibiyotik ve antibiyotik benzeri maddeler üzerinden tanımlanmıştır. Üretilen bakteriyosinler aracılığıyla bakteriyosinin türüne bağlı olarak özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* gibi gıda kökenli patojen bakterileri inhibe edilebilmektedir (Lewus vd. 1991, Messi vd. 2001), (Şekil 2.1). Ayrıca bakteriyosinlerin *Salmonella enteridis* üzerinde de antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir (Park vd. 2005).



Şekil 2.1 Bakteriyosin zonunun oluşumu

LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanımlarının temel nedenleri arasında;

- Genel olarak güvenli bulunmaları,
- Ökaryotik hücrelere karşı aktif ya da toksik olmamaları,
- pH ve sıcaklığa karşı tolerans göstermeleri,
- Gıda kökenli patojen ve çürükçül mikroorganizmalara karşı geniş spektrumda antimikrobiyal etki sergilemeleri bulunmaktadır. (Gálvez vd. 2007).

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler için çeşitli sınıflandırmalar yapılabilmesine rağmen, Klaenhammer (1993) tarafından yapılan Nes ve arkadaşları (1996) tarafından modifiye edilen, sınıflandırma kabul edilmiştir. Bu sınıflandırma da molekül büyüklüğü, ısı stabilitesi, kimyasal yapı ve etki mekanizması dikkate alınmıştır.

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler arasında *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin en iyi karakterize edilmiş olandır. Nisin geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, gıda koruyucusu olarak uzun yıllar güvenle kullanılmış olması gibi olumlu özellikleri nedeni ile ticari ve ekonomik anlamda önem arz etmektedir. Nisaplin (Nisin A) 1962-1965 yılları arasında geliştirilen, nisin'in ilk ticari ekstraktıdır. Nisin'in insanlar tarafından tüketiminin güvenli olduğu 1962 yılında yapılan toksite testleri ile gösterilmiştir (Thomas ve Delves 2005). Günümüzde nisin dışında *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen lactocin gibi bakteriyosinler de iyi karakterize edilmiş ve antimikrobiyal özellikleri kesinlik kazanmıştır. Ayrıca son dönemlerde *Lactobacillus* tarafından üretilen, lactocin 27, lactacin B, helveticin J, plantacin B ve plantaricin A gibi bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerle ilgili pek çok araştırma bulunmaktadır (Schillinger ve Lücke 1989).

Topisirovic vd. (2006) peynirden izole edilen LAB ların gıda koruyucusu olarak kullanımlarını incelemişlerdir. Araştırmacılar izolatlardan bir kısmının bakteriyosin üretme potansiyeline sahip olduğunu ve bu izolatların *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella paratyphi* üzerinde antimikrobiyal aktivite sergilediğini

bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise laktisin 3147 bakteriyosinin kaşar peynirlerinde bulunan *L. monocytogenes* üzerine etkisi araştırılmış ve belirlenen *Listeria* miktarının 4°C’de 5 günde % 99.9 oranında azaldığı bildirilmiştir (Deegan vd. 2006).

Osmanağaoğlu’nun (2005) yapmış olduğu çalışmada, Pediocin DT10’un *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 hücreleri üzerine etki mekanizması incelenmiş ve hücreler ile muamelesinin ardından ilk etkinin sitoplazmik membranda olduğu elektron mikroskop altında plazma membranındaki porların varlığı ile belirlenmiştir. Daha sonra önemli hücre içi bileşenlerinin dışarı sızması sonucu hücre zarı geçirgenliği ve membran potansiyeli bozulmuş ve son olarak da makromolekül sentezinin durması ile hücre ölümü gerçekleşmiştir. Elektron mikroskobu ile gözlenen bu aşamalar sonucunda pediocin DT10’un duyarlı *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 hücreleri üzerinde litik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Metotlar

Laktik asit bakterilerinin endüstriyel önemi ve uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir metotların uygulanması oldukça önemlidir. Tanımlama, mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini tespit etmeye dayanan *fenotipik metotlar* ve mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrasözomal genetik elementlerinin analizine dayanan *genotipik metotlar* ile yapılmaktadır (Arbeit 1999).

Fenotipik metotlar, suşlar arasındaki ayrımın sağlanması için gen ekspresyonunun ürününü karakterize etmektedir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik paternlerinin tümü fenotipik özelliklere örnek teşkil etmektedir (Lyhs 2002). Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme,

arjinin degradasyonu gibi bazı basit fizyolojik testler cins tanımlamalarında kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermentasyonu gibi metabolik ve biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren fenotipik testler kullanılmakta ve tür bazında ayırım sağlamaktadır (Khaled vd. 1997, Falsen vd. 1999). Fenotipik metotlar kullanışlı olmasına rağmen, türler arası varyasyonlar ve tekrarlanabilirliğinin zayıf olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Pot vd. 1993).

LAB identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler, bakterilerin cins ve tür bazında ayırımı için önemli olsa da yorumlaması oldukça zor olan bu teknikler zaman alıcı ve moleküler metotlar ile karşılaştırıldıklarında daha az hassasiyete ve ayırım gücüne sahiptirler. SDS-PAGE sisteminde gözlemlenen toplam hücre protein profillerinin karşılaştırılması tür ve alt tür bazında identifikasyon için oldukça güvenilir bir yöntem olsa da bazı türler için, protein profilinden elde edilen ayırım gücü sınırlıdır. Bundan dolayı, protein profiline dayalı tiplendirme tekniğinin yeterli olmadığı ve doğruluğunu kanıtlamak için moleküler testlere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Temmerman vd. 2004).

Aynı zamanda, fenotipik testler ile gen ekspresyonunun ürünü karakterize edildiğinden bu özellikler büyüme koşullarındaki değişimler neticesinde sabit kalmayacaklardır. Bundan dolayı; LAB lerinin cins ve tür bazında tanımlanmalarında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı yöntemler genellikle yanlış identifikasyon sonuçlarının ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Günümüzde, LAB tanımlama/tiplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik metotlardan daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler metotlara doğru kaymıştır (Babalola 2003).

Genotipik metotlar, suşlar arasındaki ayırımın sağlanması için organizmanın genetik yapısının analizini temel alan metotlardır. Bu metotlar, DNA'yı yüzlerce fragmana ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu konu alan çalışmaları içerir. DNA'yı konu alan genetik analiz metotları, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins seviyesinden suş seviyesine kadar identifikasyonunu sağlayabilmektedir. Nükleotit sekanslarının kullanımını içeren bu teknikler oldukça hızlı teknikler olup besi ortamındaki

değişikliklerden etkilenmemeleri bakımından fenotipik identifikasyon metotlarına kıyasla oldukça önemli avantajlar sunmaktadır (Moschetti vd. 1998, Bush ve Nitschko 1999).

Bununla beraber, oldukça fazla zaman ve iş gücü harcanmasını gerekli kılan bu metot aynı zamanda da farklı restriksiyon enzimleri ve elektroforez koşulları gibi türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmaktadır ve genelde tür içi ayırım veya ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılmaktadır (Bush ve Nitschko 1999).

Moleküler teknikler, güçlü bir ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Moschetti vd. 1998, Bush ve Nitschko 1999, Randazzo vd. 2009, Singh vd. 2009). Genotipik yöntemler arasında pilazmit profili, ribotiplendirme, Pulsed-field Jel Elektroforezi (PFGE; pulsed field gel electrophoresis) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction) temelli teknikler: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; restriction fragment length polymorphism), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD; randomly amplified polymorphic DNA), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP; amplified fragment length polymorphism), Çoğaltılmış rDNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA; amplified ribosomal DNA restriction analysis), Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR), Tekrarlanan Palindromlara Dayalı PZR (rep-PCR; repetitive extragenic palindrome) ve 16S rDNA'ya dayalı dizi analizleri yer almaktadır (Randazzo vd. 2009). Güçlü bir ayırım gücüne sahip olmalarına rağmen belirtilen bu tekniklerin sonuçlarına ait veri bankalarının azlığı sonuçların karşılaştırılmasını ve yorumlanmasını kısıtlayabilmektedir (Martí'n-Platero vd. 2009).

Plazmid profil analizi, DNA'ya dayalı yapılan ilk tiplendirme metotlarından biridir. İzolatların taşıdıkları plazmid sayısı ve büyüklükleri belirlenerek suşlar birbirinden ayrılabilir (Arbeit 1999). Bu analiz, hızlı ve tekrarlanabilirlik özelliklerine sahiptir. Ayrıca plazmid analizinde pek çok suş çalışılabilmektedir (Kozarsky vd. 1986). Ancak plazmidlerin bakteriler tarafından kolaylıkla kaybedilmesi veya kazanılması ve

her izolatin plazmid taşıması gibi nedenlerle bazı izolatlar tiplendirilememektedir (Foster 2003).

Ribotiplendirme, kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizini rDNA prob kullanımı ile birleştirmekte, dolayısıyla çeşitli türler arasında ayırım sağlayabilmektedir. rDNA belirli türlerde bazı değişmeyen bölgeler içermektedir ve bu bölgeler için her bir türe özgü prob geliştirmek gerekmemektedir. rRNA yapılarındaki farklılıklara dayanarak bakterilerin tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını sağlayan bu yöntemin üstün yanı; bakterilerin cins hatta tür düzeyinde, yüksek tekrarlanabilirlik oranı ve kesin sonuçları ile tanımlanmasını sağlamasıdır (Miesfeld 1999, Olsen 2000).

PFGE (Pulsed-field jel elektroforezi), ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği olan, güvenilir bir metottur. Bu nedenle günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde “altın standart” olarak kabul edilmektedir (Weiss vd. 2010). PFGE ile DNA parmak izi tiplendirmeleri büyük restriksiyon fragmentlerinin karşılaştırılmasına imkan vermektedir. Böylelikle çeşitli LAB suş tiplendirmelerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, oldukça fazla zaman ve iş gücü harcanmasını gerekli kılan bu yöntem aynı zamanda türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmaktadır ve genelde türler arası ayırım veya ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılmaktadır (Randazzo vd. 2009).

RAPD (Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA), rastgele dizilimdeki tek ve kısa bir primer ile DNA üzerindeki çeşitli bölgeleri çoğaltarak laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonunun belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir (Sineo 1993, Brown 1995). RAPD-PZR tekniği tür, alttür ve suşlar arasındaki genetik farklılıkların ortaya konulabildiği bir yöntemdir ve çoğaltılan gen bölgeleri hakkında bir bilgiye sahip olunmasına gerek yoktur.

RAPD-PZR tekniği kullanılarak, laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmaların son yıllarda oldukça arttığı gözlenmektedir. Torriani vd. (1999) yapmış olduğu çalışma, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* arasındaki farklılığı moleküler düzeyde

ortaya koymayı amaçlamıştır. Bu çalışmada iki temel PZR yöntemi kullanılmıştır. Farklı kültür koleksiyonlarından sağlanan suşlar ile araştırmacılar tarafından çeşitli fermente ürünlerden izole edilen ve klasik fizyolojik yöntemlerle tanımlanan suşlar kullanılmıştır. Birinci PZR yönteminde spesifik primerler seçilerek çalışılmış ve bu iki bakterinin farklı büyüklüklerde ürünler oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra, hem alt tür düzeyinde klasik yöntemlerle ve moleküler düzeyde yapılan tanımlamayı doğrulamak hem de alttürler arası genetik farklılıkları ortaya koymak amacıyla RAPD-PZR yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar bir dendograma yansıtılarak incelendiğinde; RAPD-PZR yönteminin çok daha kısa sürede ve çok sayıda kültür için bu amaçları karşılayacak sonuçlar verdiği ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacıların bundan sonraki hedeflerinin fermente süt ürünleri teknolojisinde kullanılabilecek suşların seçimi için RAPD-PZR yönteminin kullanılmasını sağlamaya dönük çalışmalar olacağını bildirmişlerdir.

AFLP (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi), restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA fragmentlerinin adaptör DNA ile birleştirilmesinden sonra arka arkaya yapılan iki PZR reaksiyonu ve bu reaksiyonlarda seçici primer kullanılmasıyla yürütülür. RAPD ile RFLP teknikleri arasında kalan bir yöntemdir (Zabeau ve Vos 1993). 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 (Vos vd. 1995, Huys vd. 1996).

Coeuret vd. (2003) yapmış olduğu çalışmada, peynir ve günlük süt ürünlerinden izole ettikleri 80'den fazla *Lactobacillus* türünü tanımlamak ve karakterize etmeyi amaçlamış ve moleküler tekniklerden faydalanmışlardır. AFLP tekniğinde DNA fragmanlarını elde etmek için iki restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır. Böylece oluşan yapışkan uçlara uygun adaptörler bağlanarak PZR için şablon oluşturulmuş ve iki farklı primer kullanılarak primer sekansına uygun kesimler çoğaltılmıştır. Bu yolla selektif amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu çoğalma aşaması 30'dan 40'a kadar DNA fragmentini cins, tür, suş olarak sıralamıştır. RAPD-PZR ve AFLP kullanılarak *Lactobacillus acidophilus* suşlarının hızlı bir şekilde ayrımı en az 3 değişik primer

kullanılarak sağlanmıştır. Bu tekniklerin SDS-PAGE yöntemine göre çok daha hassas farklılıkları ortaya koyduğu belirtilmiştir.

ARDRA (oğaltılmış rDNA'nın restriksiyon analizi) tekniğinin temeli, 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Tre özgü spesifik primerlerin kullanımı ile 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır (Andrighetto vd. 1998). Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilir (Bouton vd. 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.

Koeleman ve arkadaşlarının (1998) yapmış olduğu çalışmada, 18 tanesi genomik tür, 13 tanesi ise klinik izolat olmak üzere toplam 31 adet *Acinetobacter* türüne ait suşun ARDRA, RAPD, AFLP parmak izi sonuçlarını karşılaştırmıştır. ARDRA tekniği çok düşük bir ayırım gücü sergilerken RAPD tekniği, *A. baumannii* izolatlar arasında büyük bir polimorfizm sergilemiştir. Floresanla işaretlenmiş primerler kullanılarak parmak izi analizi sağlayan AFLP ile 31 izolatın tanımlanması yapılmış, güçlü ve yüksek ayırım gözlenmiştir.

AP-PZR (Arbitrarily primed-PCR) tekniği, bilinen bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'da ki bir çok bölgenin çoğaltılmasına dayanır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerlerdir ve G+C bakımından zengindir. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağı için agaroz elektroforezinde amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Oluşan bantlar değerlendirmeye yetecek düzeydedir. 1990 yılında Welsh ve McClelland tarafından tanımlanan yöntem, 1500'n üzerinde araştırıcı tarafından kaynak

gösterilmiştir ve her tür mikroorganizmanın analizinde kullanılmaktadır (van Belkum 1994).

Rep-PZR (Tekrarlanan palindromlara dayalı PZR) tekniğinde, bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda **rep** olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde **ERIC** (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) olarak ifade edilen 124-127 baz çiftlik ve merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip diziler şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. Versalovic ve ark. (1994) bakteriyal parmakizi için bakteriyal genomların içinde bulunan bu tekrarlanan DNA elementlerinin PZR ile amplifikasyonundan elde edilen spesifik bantların incelenmesiyle yapılan bir tiplendirme, genom parmakizi tekniği tanımlamışlardır. Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PZR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden biridir (Van der Zee vd. 1999).

Carson vd. (2003) Rep-PZR'nin ribotiplendirmeden daha doğru, tekrarlanabilir ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. Tekniğin uygulanması kolaydır ve hem çok sayıda hem de az sayıda örneğe uygulanabilir. Daha fazla türe uygulanabilirlik göstermekte olan Rep-PZR, PFGE ile karşılaştırıldığında daha düşük bir ayırım gücüne (Olive ve Bean 1999) ancak plazmit profil analizleri veya genomik parmakizleri ile karşılaştırıldığında daha fazla ayırım gücüne sahiptir (Georghiou vd. 1995). 16S rDNA gen veya 16S-23S ara bölgesinin (Vila vd. 1996, Appuhamy vd. 1997) restriksiyon analizlerine kıyasla daha iyi bir ayırım gücüne sahiptir.

16S rDNA'ya dayalı dizi analizleri temelini, nükleik asit kimyası ve yapısal özelliklerinin tanımına ve ayırımına yönelik çalışmalar oluşturmaktadır. RNA'lar protein ve farklı enzimlerin sentezlenmesini gerçekleştiren reaktörler gibi görev yapan yapılardır. Bu moleküller hücre metabolizmasında gerekli olan enzimleri sentezleyerek genetik kodun açıklanmasını, anlaşılmasını sağlamaktadır (Jill 2004).

1980'li yıllarda bakteri tanımlamaya yönelik yeni yöntemler gelişmeye başlamıştır. Woese (1985), laboratuvar çalışmalarında bakterilerin yaşam formlarını belirleyebilen genetik kodlarındaki stabil parçaların karşılaştırılmasının yapılmasıyla, bakterilerin filogenetik ilişkilerinin belirlenebileceğini ifade etmiştir. Prokaryotların filogenetik incelemeleriyle ilgili gelişmeler, rRNA'nın ayırım tekniğindeki ilerlemelere neden olmuştur. Seçilen ilk molekül küçük parçanın ayırımını kolaylaştıran RNA 5S (120nt) olmuştur. Elde edilen sonuçlar ne cins, ne de tür seviyesindeki ayrımlara imkan vermeden yalnızca büyük evrim sırasını belirlemeye yardımcı olmuştur. rRNA 16S bölgesinden (1500nt uzunluğunda) elde edilen sonuç ise daha fazla yarar sağlamıştır (Böttger 1989, Kolbert ve Persing 1999).

16S rRNA dizi analizi, evrim sırasında molekülün farklı kısımları üzerinde fonksiyonel baskının farklı derecelerini yansıtan yüksek derecede korunmuş bölgeler ile, değişebilen bölgelerde de bu molekülün bulunduğunu ortaya koymuştur. Değişebilir bölgeler yakın akraba organizmaları karşılaştırmaya, korunmuş bölgeler ise uzak akrabaları gruplandırmaya yardım etmektedir. 16S RNA molekülleri, ortak bakteri orijinine doğru gidebilmek ve evrimin yönünü, önemini ve hızını belirlemek için kısa vadede karşılaştırmalardan yararlanmak amacıyla kullanılmaktadır (Böttger 1989).

Ayırım tekniklerinde 16S rRNA'nın yapısal özelliklerinden yararlanılmaktadır. RNA 16S'de saklı bölgelerden biri veya diğerine hibritleme yeteneğinde olan sentetik bir veya birçok oligonükleotidlerle moleküler tanımlama yöntemleri kullanılmaktadır (Thorne vd. 1998). Moleküler tanımlama yöntemlerinde 16S rRNA üzerinde daha çok bilgi edinmek için kullanılmış ve hızlı ayırım teknikleri geliştirilmiştir. Hedef DNA'yı çoğaltmak için enzim kullanılmakta ve teorik olarak bir kopya DNA tanımlanabilmektedir.

1983 yılında Kary B. Mullis'in *Thermus aquaticus*'dan izole edilen Taq DNA polimerazı, PZR tekniğinde başarı ile uygulaması, spesifik DNA dizilerinin *in vitro* şartlarda çoğaltılmasını mümkün kılmıştır. RNA 16S'teki oligonükleotidlerin dizilişlerindeki karşılaştırma, bir bakteri filogenetiği ve sistematik incelemeler için kullanılmaktadır. Hedef DNA/RNA dizilerinin amplifikasyonu ve tanımlanmasını,

modifiye PZR bazlı, daha duyarlı ve özgül yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar izlemiştir (Böttger 1989, Giovannoni vd. 1990, Ward vd. 1990, Muyzer vd. 1993, Ludwig ve Schleifer 1994, Amann vd. 1995, Head vd. 1998, Harmsen ve Karch 2004).

Janežič vd. (2011) yapmış olduğu çalışmada, PZR ribotiplendirme gaita örneklerinden *Clostridium difficile*'nin direk olarak belirlenmesini sağlamıştır. Doğrudan PZR ribotiplendirmesi 99 *C. difficile* pozitif dışkı örneklerinin 86'sında mümkündür ve 84 örnekte (% 84.8), dışkı örneği direk olarak belirlenen ribotip, aynı dışkı örneği izole edilen suşun ribotipi ile aynı olarak bulunmuştur.

Falsen vd. (1999) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, insan kaynaklı *Lactobacillus* türlerinin fenotipik ve genotipik olarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır. 11 adet bakteri suşu seçilmiş ve bunlara sırasıyla API test kitleri kullanılarak biyokimyasal testler, toplam hücre protein analizi, hücre duvarındaki murein miktarının analizi ve DNA baz kompozisyonu analizi ile PZR ile çoğaltılmış 16S rDNA genleri dizi analizi uygulanmıştır. Biyokimyasal testler ile protein profili analizleri 11 adet bakterinin cins düzeyinde *Lactobacillus* olduğunu göstermiştir. Uygulanan diğer moleküler biyolojik yöntemler ile bazı bakteriler *Lactobacillus* cinsi altında *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri* veya *Lactobacillus johnsonii* olarak tanımlanmış, bir bakterinin ise *Lactobacillus iners* sp. nov. olduğu ortaya konmuştur. Bu bakterilerin birbirlerine göre genetik uzaklıkları hesaplanmış ve buna göre *L. gasseri* ile *L. johnsonii*'nin birbirine çok yakın, *L. delbrueckii* ile *L. iners* sp. nov.'nın ise diğerlerine ve birbirlerine uzak oldukları belirlenmiştir.

Salzano vd. (1994) *Streptococcus thermophilus*'un genetik tiplendirmesinin ribosomal DNA restriksiyon analizi ile ortaya konulmasını amaçlayan çalışmada toplam 20 adet bakteri suşu üzerinde çalışmışlardır. Bakteri kromozomunda yer alan rRNA (5S, 16 S ve 23 S) operonlarının yüksek düzeyde korunmuş bölgeler olması, bunların tanımlama ve sınıflandırma çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. rDNA genlerinin restriksiyon analizleri ile birçok mikroorganizmanın tür, alt tür ve suş düzeyinde ayrılabilirdiğini, ancak rDNA genlerinin PZR ile çoğaltılarak analizinin

yapılmasının büyük ölçüde kolaylaştırıcı bir işlem olduğu bildirilmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada rDNA genleri PZR ile çoğaltılmış örnekler Hae III enzimi ile kesilmiş ve kullanılan 16 adet *S. thermophilus* suşu aynı tip olarak, 4 adet suş ise birbirinden farklı tek tip olarak karakterize edilmiştir. Bu 20 adet suş arasında çok farklı genetik tiplerin ortaya konulduğu ve bunun da *S. thermophilus*'un sınıflandırılması için önemli olduğu vurgulanmıştır.

Collins vd. (1991) yapmış olduğu çalışmada, *Lactobacillus* cinsine ait 55 adet türün küçük rRNA dizisi reverse transkriptaz enzimi kullanılarak gruplandırılmıştır. Karşılaştırılmalı analiz sonucunda; 3 farklı filogenetik grup oluşturulmuştur. 1. grup *L. delbrueckii* türlerinin yer aldığı 11 adet zorunlu homofermantatif tür içermektedir. 2. grup 32 adet *Lactobacillus* türü ve 5 adet *Pediococcus* türü içermektedir. 2. grupta 5 adet zorunlu homofermantatif tür dışındaki türler heterofermantatiftir. 3. grupta heterofermantatif *L. minor*, *L. kandleri*, *L. confusus*, *L. viridescens* ve *Leuconostoc paramesenteroides* gibi bakterilerin olduğu saptanmıştır. Sonuçta, sekans dizilimi *Lactobacillus* cinsinin filogenetik olarak önemli ölçüde heterojenik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir.

2.3.1 RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)

Restriksiyon enzimleri çift sarmal DNA molekülünü belirli bölgelerden keserek parçalara ayıran enzimlerdir. Bakteriler, bakteriyofajlara karşı savunma mekanizması olarak çeşitli restriksiyon enzimleri oluşturmaktadır. Bu enzimler DNA molekülünü özgün tanıma sıralarından kesebilen enzimlerdir. DNA'nın bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezinde bantların belirlenmesi ve böylece DNA parçalarının büyüklüğü ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilir. RFLP tekniği, DNA düzeyinde polimorfizm elde etmek amacıyla günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Griffiths vd. 1996).

Restriksiyon enzimleri DNA molekülünü 4-8 baz çiftlik DNA sıralarından tanıyarak bu bölgelerden kesim yapmaktadırlar. DNA'nın küçük parçalara ayrılması daha fazla bant oluşmasına neden olur ve bunun sonucunda yorumlanması zorlaşmaktadır. Bu yöntem

temel alınarak çok sayıda yeni tiplendirme metotları geliştirilmiştir (Derbentli 2002, Durmaz 2003). RE ile kesim sonucu yapışkan ya da küt uçlu parçacıklar elde edilmektedir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Restriksiyon enzimleri ile elde edilen yapışkan ve küt uçlu DNA parçacıkları

Kullanılan RE	Kesim noktası 5'→3'	
<i>HaeIII</i>	5'-G G [^] C C-3' 3'-C C [^] G G-5'	Küt uçlu
<i>HinI</i>	5'-G [^] A N T C-3' 3'-C T N A [^] G-5'	Yapışkan uçlu

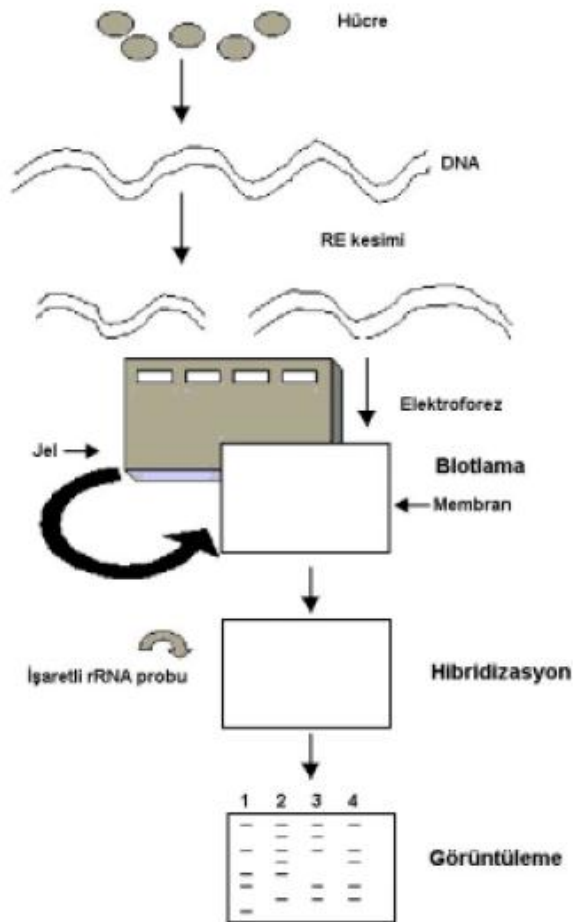
RFLP tekniği Southern blotting ve PZR temelli olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır:

2.3.1.1 Southern blotting temelli RFLP yöntemi

Southern blotting temelinde uygulanan RFLP tekniği, DNA düzeyindeki varyasyonların tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknikte belirli kesim enzimleri ile DNA molekülü muamele edildikten sonra elde edilen DNA parçacıklarının kesim modellerindeki farklılıklarından yararlanılarak DNA düzeyinde polimorfizmler tespit edilmektedir (Botstein vd. 1980). Oluşabilecek çeşitli mutasyonlar DNA molekülünü farklı şekillerde etkileyebilmekte ve sonuçta bireyler arasında farklı uzunluklara sahip DNA parçacıkları elde edilmektedir. Jel elektroforezi, hibridizasyon ve görüntüleme işleminden sonra DNA parçacıklarında meydana gelen uzunluk farklılıkları tespit edilebilmektedir (Southern 1975, Beckmann ve Soller 1983).

RFLP tekniğinde öncelikle kromozomal DNA izolasyonu gerçekleştirilmektedir. Fiziksel ve kimyasal işlemlerle DNA haricindeki moleküller ortamdaki uzaklaştırılır. Safılaştırılan DNA molekülü belirli restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir. Her bir restriksiyon enzimi DNA molekülünde belirli sıraları tanıyarak o noktalardan kesim

yapmaktadır ve sonuçta farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilmektedir. Elde edilen çok sayıdaki kesim parçacıkları genellikle agaroz jel elektroforezi ile ayrılmaktadır. Bu ayırmda agaroz jel bir süre akım altında bırakılır. Akım sonucunda büyük parçalar başlangıç yerinde, küçük parçalar ise jelin sonunda toplanır. Jel etidyum bromür ile boyandığında UV altında görüntü elde edilir. Jelde smear görüntü meydana gelebileceği için sadece boyama polimorfizmin tespit edilmesi için yeterli değildir. Bunun için agaroz jel üzerinde bulunan kesim parçacıkları daha stabil olan nitroselüloz ya da naylon membranlar üzerine aktarılmaktadır. Hibridizasyonu sağlamak için DNA'daki zincirlerden birinin tamamlayıcısı olan tek sarmallı DNA veya RNA probları kullanılır. Sonuçta sadece probla hibridize olan DNA parçaları görüntülenecektir. Southern (1975) adlı araştırmacının ortaya koyduğu DNA transfer yöntemi Southern blotting olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Southern blotting tekniği (Southern 1975)

2.3.1.2 PZR temelli RFLP tekniği

PZR-RFLP tekniği; hedef bir bölgede polimorfizm tespit etmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde standart PZR işlemi ile üzerinde durulan bölge, spesifik primerler ile çoğaltılmakta ve çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir. Kesim sonucu oluşan restriksiyon fragmentlerine göre kesim noktasının varlığı veya yokluğu türler arasındaki farklılıkları tespit etmektedir. Bu teknikte türler arasında tespit edilebilen polimorfizm, enzim tanıma bölgesinde meydana gelen bir nükleotidin eklenmesi, eksilmesi veya değişmesi şeklinde ortaya çıkan nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır.

Restriksiyon fragmentleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra restriksiyon bantları karşılaştırılır. Bu teknikte uzun oligonükleotid primerler kullanıldığı için oldukça güvenilir bir çoğaltım yapılmaktadır. Çoğaltılan gen bölgesi hakkında önceden bilgi sahibi olunmasının gerekliliği tekniğin bir dezavantajıdır (Botstein vd. 1980, Hall 1998, Vicente ve Fulton 2004).

Datta vd. (2009) yapmış olduğu çalışmada, *Fusarium* türleri, değişik bitkilerde hastalığa neden olan, patojenik olmayan ve farklı patojen türlerin rDNA RFLP analizi ile karşılaştırarak karakterize edilmiştir. Elegans, Laseola, Mortiella, Discolor, Gibbosum, Lateritium ve Sporotrichiella türlerini bulunduran 12 izolatın ITS (internal transkripsiyonu ayırıcı) bölgesine ait bölümü evrensel ITS primerleri (ITS-1 ve ITS-4) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilmiştir. 12 *Fusarium* izolatında elde edilen amplifiye ürünler 522-565 bp arasında değişmektedir. Amplifiye ürünler yedi farklı restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve RFLP patternleri analiz edilmiştir. rDNA bölgesi PZR-RFLP analizine tabi tutulmuş ve dendrogramlarda *Fusarium* izolatları üç ana gruba ayrılmıştır. rDNA RFLP tekniğine dayalı moleküler değişkenliğin değerlendirilmesi *Fusarium* türlerinin yakın evrimsel ilişkilerini ortaya koymuştur.

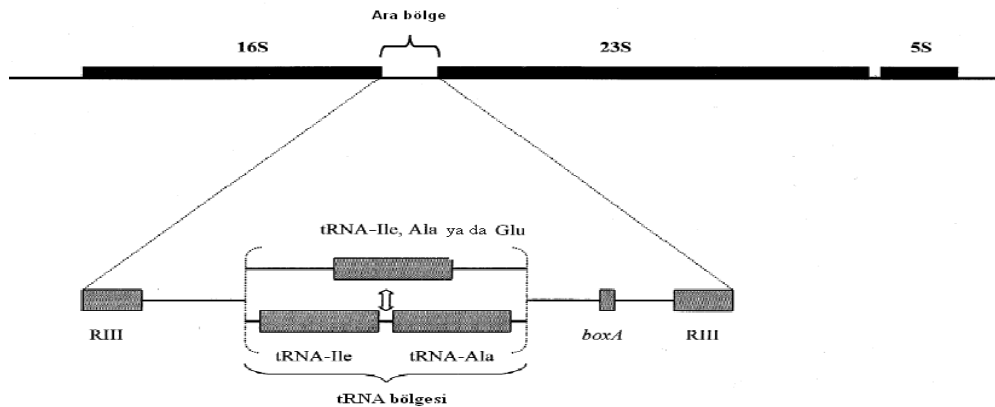
2.4 ISR-PZR (Genler Arası Ayırıcı Bölge Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi vardır.

Bunlar ara bölgelerle ayrılır ve dizide, hem cins hem tür seviyesinde uzunluk açısından yüksek çeşitlilik gösterirler. 16-23S rRNA arasındaki bölgenin çoğaltılması genellikle ISR-PZR olarak tanımlanır ve bu teknik 16S-23S rRNA'nın interjenik transkripsiyon bölgesi içindeki polimorfizmleri ortaya çıkararak bakteriyal türlerin karakterizasyonunda kullanılabilir. Bu yüzden filogenetik analizler için önemli bir araç olarak görev yapabilir (Toth vd. 2001). rRNA genleri arasındaki ara bölge hedef bölge olduğu için yöntem aynı zamanda *PZR-ribotiplendirme* olarak da adlandırılır. Çoğaltılan ve agaroz jelde ayrılan bölgeler karşılaştırılır. Çoğaltılmış bölgenin restriksiyon analizi veya dizisi, yöntemin ayırım gücünü yükseltir.

PZR ile amplifiye edilmiş 16S rDNA restriksiyon analizi tekniği filogenetik ilişki esaslı mikroorganizma karakterizasyonu ve ayırımında uygun bir yöntemdir. Bununla beraber, 16S rRNA geni ile bulunan çeşitlilik genellikle yetersiz bulunmakta ve birbirine yakın türleri kesin olarak tanımlamamaktadır. Bakterilerde ribozomal genler operon içerisinde yer almaktadır (Krawiec ve Riley 1990). *rrn* (5'-3') operonu olarak isimlendirilen ribozomal operon 16S, 23S ve 5S rRNA dizilerini içermektedir. Laktik asit bakterileri söz konusu olduğunda üç tip *rrn* operon organizasyonu tanımlanmıştır (Şekil 2.3).

- (i) tRNA^{Ile}/tRNA^{Ala} gen çifti
- (ii) tRNA^{Ala} gen
- (iii) tRNA gen bölgesi olmayan (Berthier ve Ehrlich 1998).



Şekil 2.3 16S-23S ara bölgenin ve fonksiyonel bölgelerin şematik gösterimi

Ara bölge olarak isimlendirilen intergenik ara bölge (ISR) gen bölgelerini ayırmakta ve fonksiyonel rolleri ile korunmuş diziler (tRNA genleri, antiterminasyon dizileri) içerebilmektedir. 16S-23S rDNA ISR leri organizmalar arasında sıklıkla “tRNA gen insersiyonlarından” dolayı hem uzunluk hem de dizi bakımından farklılık gösterdiğinden 16S rRNA yapısal geni ile kıyaslandığında daha fazla varyasyon sergilemekte ve bu varyasyon birbiri ile yakın ilişkili suşların ayırımında kullanılabilir (Gürtler ve Stanisich 1996). Bazı bakteri cinslerinde, ISR lerin direk amplifikasyonu tür seviyesinde ayırt edici bir tiplendirme sağlamaktadır (Kabadjova vd. 2002).

PZR ile amplifiye edilmiş 16S-23S rDNA ISR bölgesinin restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi bakteri popülasyonlarının ve izolatlarının karakterizasyonunda kullanılan hızlı ekonomik bir yöntem olarak gösterilmiştir (Tsai vd. 2010). Ayrıca rRNA dizisinin ya da rRNA yı kodlayan genin (rDNA) kullanımı özellikle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler ile yapılan sınıflandırmadaki önemli değişikliklere neden olmuştur (Hertel vd. 1993). Özellikle bu bölgeye özel geliştirilen problemlerle tanımlama ve tesbit yapılmaktadır (Ehrmann vd. 1992).

rRNAyı kodlayan gen tüm hücrelerde en fazla korunan (en az değişime uğrayan) genidir. Birbiriyle uzak ilişkili organizmaların rDNA dizisine ait kısımlar dikkat çekecek derecede benzerdirler. Yani, birbiriyle uzak ilişkili organizmalardan elde edilen diziler kesin olarak bağlantılıdır ve bu durum da farklılıkların belirlenmesini kolaylaştırır. Bu nedenle, rRNA'yı kodlayan genler (rDNA) taksonomi ve filogeniyi (evrimsel ilişki) belirlemek ve bakteriler arasındaki tür farklılıklarının oranını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. 16S-23S rDNA dizisinin karşılaştırılması mikroorganizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi gösterilebilir. Bu bölgeye özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sonuca gidilebilir.

Indra vd. (2010) yapmış olduğu çalışmada, *Clostridium difficile*'nin moleküler epidemiyoloji uygulaması üzerinde genellikle 16S–23S ISR bölgesi ile PZR ribotiplendirme çalışmaları yapılmıştır. 6 farklı PZR ribotipi 16S–23S ISR sekanslama ve klonlama ile analiz edilmiştir. 35 izolatın ribotip veya nükleotid dizisi yoluyla

farklılıkları gösterilmiştir. *C.difficile*'nin 16S–23S ISR sekansı, 9 bp ile ayrılmış 33 ve 53 bp bölgeler ve tRNA Ala gen bölgesi ile organize bir yapı göstermiştir. Çalışmanın sonucunda bu kompozisyonda 16S-23S ISR'de görülen uzunluk farklarının sorumlu olduğu hipotezini desteklemektedir ve bu uzunluk farklılıklarının nedeni, intra ve inter-kromozomal homolog rekombinasyon veya dizi kayma sonucu yanlış eşleşmelerini gösterdiği belirtilmiştir.

Ghodhbane-Gtari vd. (2010) yapmış olduğu çalışmada, 53 *Frankia* suşunun 16S-23S rRNA ITS bölge dizileri sıralanmış ve polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Ortak veritabanından seçilen 14 adet 16S-23S ITS dizi ile derlenmiştir. *Frankia* genomu 9 suştan beklenen uzunluk polimorfizmden yoksun 2 veya 3 ITS kopyası içerir. tRNA genine bu bölgede rastlanmamaktadır. *Frankia* suşları ITS bölgesinde çeşitli uzunluklar (369-452 nt) ve geniş sekans benzerliği (% 35-100) göstermiştir. *Frankia* suşlarının 16S-23S rRNA intergenic spacer bölge karşılaştırmalı dizi analizleri enfeksiyon grup veya kendi gruplarını belirlemek için yararlı değildir. Doğru tanımlama için 16S ve 23S rRNA gen parçalarının dahil edilmesi gereklidir.

Ramirez vd. (2011) yapmış olduğu çalışmada, suşlar arasındaki ilişkilerin analizi için *Mycoplasma synoviae* türünün suş seviyesinde moleküler karakterizasyonun epidemiyolojik araştırmalarda değerli olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada, 16S-23S rRNA genleri arasındaki ISR bölgesi sayesinde, suşlar hakkında yararlı bilgiler elde edilip edilemeyeceği incelenmiştir. Tüm diziler analize uyumlu hale getirilmiştir; DNA'nın benzerlik yüzdesi hesaplanmış ve dendrogramları yapılmıştır. ISR bölgelerinin uzunluğu 305 ve 309 baz çifti arasında değişmektedir. Filogenetik analizlere dayanarak, gruplar arasında en düşük benzerlik oranı % 95,8 iken, suşlar her grup içinde DNA benzerliği % 100 olduğunu dikkate alarak 10 gruba ayrılmıştır. ISR suş tiplendirmesinde iyi bir hedef olmasına rağmen, bu metod rutin kullanımda intersistronik heterojenite ile komplikasyonlar sebebiyle tercih edilmeyebilir. Ancak, ISR sekans bilgileri, ayırıcı gücünü artırmak için diğer mutasyon algılama teknikleri ile kombine edilebilir.

Tokajian vd. (2011) *Staphylococcus aureus* türünün moleküler karakterizasyonu hem klinikte hem de enfeksiyon kontrolünde önem taşıdığı için bu suşlar üzerinde çalışmışlardır. 130 *S. aureus* izolatının PZR ve çoklu ilaç direnci profilleri kullanarak virulans belirleyicileri incelenmiştir. 16S-23S DNA ara bölgenin PZR-RFLP analizi, 16S-23S ITS polimorfizm düzeyini araştırmak için yapılmıştır. Primerler ile kombine edilen 16S-23S ITS PZR-RFLP ile *S. aureus*'un moleküler parmak izi belirlenmiştir ve tiplendirme için kullanılabilir. Burada sunulan veriler, MRSA ve MSSA'nın Lübnan'da en önemli genetik popülasyonları tanımlayan bir başlangıç noktası olduğunu ve klinik epidemiyolojik çalışmalar için bir temel sağlayabileceğini göstermiştir.

Martínez-Blanch vd. (2011) yapmış olduğu çalışmada, *Bacillus cereus sensu stricto* suşunu çalışmışlardır. *Bacillus cereus sensu stricto*'nun birçok gıda kaynaklı salgına sebep olduğu rapor edilmiştir ve gıda endüstrisi için sorun oluşturduğu bilinmektedir. Şimdiye kadar kendi özel farklılaşmaları ile ilgili kesin hiçbir mikrobiyolojik veya biyokimyasal özellikleri tarif edilmemiştir. Burada, yeni izolatların belirlenmesini amaçlayan bir polifazik yaklaşım sunulmuştur. Toplamda 75 suşun, 59'u *Bacillus cereus* grubu (29 referans suş ve 30 gıda ve çevre izolatları) ve 16'sı diğer *Bacillus* türleridir. Bu kimyasal özellikleri (API 50CH ve API 20E) ve genetik profilleri içerir: 23S ve 16S rRNA genleri arasındaki ISR bölgesi ISR-PZR amplifikasyonu, 3 evrensel primer (M13, T3 ve T7) kullanılarak rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD PCR), hemolizin BL (HBL), sitotoksin K (cytK) ve cereulide (ces) kodlayan genlere yönelik spesifik primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu yapılmıştır. *B. cereus* grubu içinde 3 RAPD parmak izi birleştirerek grup analizi (RAPD-M13, RAPD-T3 ve RAPD-T7) suşların hemen hemen tamamını ayırmıştır. Sonuç olarak ISR-PZR profili, spesifik ve kültür-bağımsız teknik olarak API profiline göre avantajı ile *B.cereus* grubundaki izolatların hızlı belirlenmesi için önerilmektedir.

Tannock vd. (1999) yapmış olduğu çalışmada, gastrointestinal sistem, yeşillik ve yoğurt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* suşlarını tanımlama amacıyla 16S-23S rDNA genler arası bölgelerine (ISR) özgü primerler ile PZR uygulaması yapılmış ve sonuçta araştırmada uygulanan yöntemin bütün izolatlar için kullanılabileceği saptanmıştır.

Sasaoka vd. (2011) yapmış olduğu çalışmada, 16S ve 23S rRNA genleri arasındaki ISR (genler arası bölge), *Mycoplasma* türlerinin tanımlanması için genetik bir belirteç olarak kullanılmıştır. Burada intergenic ara bölgeler; *Mycoplasma haemofelis* ve *Candidatus Mycoplasma haemobos* olan iki hemotropik mikoplazma grubunun sınıflandırılması için de yararlıdır. Filogenetik analiz, hemoplazmalar ve *M. fastidiosum* arasında monofiletik bir ilişki olduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

16S-23S rDNA ISR (intergenic spacer region) bölgesinin RFLP (restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi) analizi neticesinde moleküler seviyede gerçekleştirilecek olan tiplendirme çalışmaları kapsamında kullanılan ve *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri ile temsil edilen Laktik Asit Bakteri (LAB) grubuna ait 144 adet suş Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3.1). Bakteri kültürleri % 50'lik gliserol solüsyonu içinde çözünmüş olarak -86°C'de saklı tutulmakta ve çalışma öncesi aktifleştirilmektedir (Biswas vd. 1991). Bu suşlar laboratuvarı daha önce gerçekleştirilen çalışmalar dâhilinde fenotipik yöntemler/API CH50 kit kullanımı ile tanımlanmışlardır.

3.1.2 Bakterilerin aktivasyonları ve gelişimleri için kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakteri gruplarından *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait olan türler TGE (Trypton-Glukoz-Yeast ekstraktı) besiyerinde 35°C'de, *Lactobacillus* cinsine ait olan türler ise MRS (deMan Rogosa Sharpe) besiyerinde 30°C'de geliştirilmiştir. LAB'ların gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin içerikleri EK 1'de verilmiştir.

3.1.3 Tampon ve Çözeltiler

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

3.1.4 Kromozomal DNA İzolasyon Kiti

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

3.1.5 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler

DNA analizlerinde kullanılan moleküler markörler EK 4'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri

	Bakteri	Kaynak
A	<i>Enterococcus</i>	
1	<i>Enterococcus avium</i> ATCC Pasteur (RSKK 500)	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2	<i>Enterococcus hirae</i> 115	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab
3	<i>Enterococcus casseliflavus</i> NRL 3502	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
4	<i>Enterococcus durans</i> RSKK 05034	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
5	<i>Enterococcus durans</i> 51	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
6	<i>Enterococcus durans</i> 56	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
7	<i>Enterococcus durans</i> 69	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
8	<i>Enterococcus durans</i> 75	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
9	<i>Enterococcus durans</i> 89	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
10	<i>Enterococcus durans</i> 116	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
11	<i>Enterococcus durans</i> 124	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
12	<i>Enterococcus faecalis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
13	<i>Enterococcus faecalis</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
14	<i>Enterococcus faecalis</i> E27	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
15	<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
16	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
17	<i>Enterococcus faecalis</i> 64	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
18	<i>Enterococcus faecalis</i> 74	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
19	<i>Enterococcus faecalis</i> 78	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
20	<i>Enterococcus faecalis</i> 79	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
21	<i>Enterococcus faecalis</i> 80	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
22	<i>Enterococcus faecalis</i> 81	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
23	<i>Enterococcus faecalis</i> 82	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
24	<i>Enterococcus faecalis</i> 139	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
25	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	GATA, Mikrobiyoloji Lab.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri (devamı)

26	<i>Enterococcus faecium</i> F1	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
27	<i>Enterococcus faecium</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
28	<i>Enterococcus faecium</i> 1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
29	<i>Enterococcus faecium</i> 2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
30	<i>Enterococcus faecium</i> 3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
31	<i>Enterococcus faecium</i> 5	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
32	<i>Enterococcus faecium</i> 6	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
33	<i>Enterococcus faecium</i> 7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
34	<i>Enterococcus faecium</i> 8	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
35	<i>Enterococcus faecium</i> 71	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
36	<i>Enterococcus faecium</i> 77	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
B.	<i>Lactococcus</i>	
1	<i>Lactococcus lactis</i> OZ1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Lactococcus lactis</i> OZ2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
3	<i>Lactococcus lactis</i> OZ3	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
4	<i>Lactococcus lactis</i> OZ4	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Lactococcus lactis</i> PK1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Lactococcus lactis</i> 30	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
7	<i>Lactococcus lactis</i> 32	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
8	<i>Lactococcus lactis</i> 33	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
9	<i>Lactococcus lactis</i> 57	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
10	<i>Lactococcus lactis</i> 86	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
11	<i>Lactococcus lactis</i> 88	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
12	<i>Lactococcus lactis</i> 93	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
13	<i>Lactococcus lactis</i> 94	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
14	<i>Lactococcus lactis</i> 100	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
15	<i>Lactococcus lactis</i> 102	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
16	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 7962	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
17	<i>Lactococcus lactis</i> W1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
18	<i>Lactococcus lactis</i> W2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
19	<i>Lactococcus lactis</i> W3	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 31	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 34	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 39	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 62	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 63	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
26	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 87	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
27	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 99	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
28	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 103	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri (devamı)

29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diac.</i> 50	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
30	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
31	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B634	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
32	<i>Lactococcus garvieae</i> 38	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
33	<i>Lactococcus garvieae</i> 43	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
34	<i>Lactococcus garvieae</i> 44	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
35	<i>Lactococcus garvieae</i> 46	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
36	<i>Lactococcus garvieae</i> 58	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
37	<i>Lactococcus garvieae</i> 59	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
38	<i>Lactococcus garvieae</i> 65	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
39	<i>Lactococcus garvieae</i> 66	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
40	<i>Lactococcus garvieae</i> 67	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
41	<i>Lactococcus garvieae</i> 83	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
42	<i>Lactococcus garvieae</i> 84	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
43	<i>Lactococcus garvieae</i> 85	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
44	<i>Lactococcus garvieae</i> 90	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
45	<i>Lactococcus garvieae</i> 91	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
46	<i>Lactococcus garvieae</i> 92	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
47	<i>Lactococcus garvieae</i> 95	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
48	<i>Lactococcus garvieae</i> 96	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
49	<i>Lactococcus garvieae</i> 97	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
C.	<i>Pediococcus</i>	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
4	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
8	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
11	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
13	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
14	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
15	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
16	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
17	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri (devamı)

18	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
19	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
21	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
22	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
23	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
24	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
25	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
26	<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
D.	<i>Leuconostoc</i>	
1	<i>Leuconostoc lysis</i> Lys	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
E.	<i>Lactobacillus</i>	
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2	<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRLL B1837	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
5	<i>Lactobacillus maltoramicus</i> NRLL 148532	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
6	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
7	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
8	<i>Lactobacillus rhamnus</i> TK2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
9	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL B21	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
11	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
12	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	ODTÜ Gıda Mühendisliği
13	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
15	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
16	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	H.Ü. Biyoloji Bölümü
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	ODTÜ Gıda Mühendisliği
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	ODTÜ Gıda Mühendisliği
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	ODTÜ Gıda Mühendisliği
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215L	ODTÜ Gıda Mühendisliği
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	ODTÜ Gıda Mühendisliği
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	ODTÜ Gıda Mühendisliği

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri (devamı)

26	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	ODTÜ Gıda Mühendisliği
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	A.Ü.F.F. BiyolojiBöl. Mikrobiyal Genetik Lab.

3.2 Yöntem

Bu çalışma ile 16S-23S ISR bölgesi ve bu bölge üzerinde yapılacak olan RFLP çalışmalarının neticesinde elde edilen bant paternlerinin Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait tür ve suşların ayrımındaki taksonomik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.2.1 Laktik asit bakterilerinin aktifleştirilmesi

-86°C’de muhafaza edilen bakteri stok kültürleri, gelişimleri için uygun olan steril besiyerlerine ardı ardına gerçekleştirilen pasajlama işlemi ardından DNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir. Çalışmış olduğumuz LAB’lara ait gruplardan *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait olan türler TGE besiyerinde (EK1) 35°C’de, *Lactobacillus* cinsine ait olan türler ise MRS besiyerinde (EK1) 30°C’de geliştirilmiştir.

3.2.2 Laktik asit bakterilerinden kromozomal DNA izolasyonu

Kromozomal DNA izolasyonu için, ticari olarak temin edilen PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti (Kit No: A1125) kullanılmıştır. Kit izolasyon basamakları EK 3’de verilmiştir. Uygun koşullarda geliştirilen aktif kültürden 2 mL alınarak 14500 devirde 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 480 µL 50 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) ile çözülen örneğin üzerine 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan lizozim (Sigma Chem. Co., USA) çözeltisinden 120 µL ilave edilerek 37°C’de 50 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda 14500 devirde 2 dakika santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. 600 µL

nükleiliziz çözeltisi eklenerek nazikçe karıştırılmış ve 80°C’de 5 dakika bekletilmiştir. Oda ısısına gelen örnek üzerine 3 µL RNaz çözeltisi eklenmiş ve 37°C’de 50 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda 200 µL protein çöktürme çözeltisi eklenmiş ve 20 saniye yüksek hızda karıştırılarak 5 dakika buzda beklenmiştir. Bu sürenin sonunda 14500 devirde 3 dakika santrifüj edilerek ayrılan üst sıvı mikropipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve 600 µL oda ısısında bulunan izopropanol (Merck, Darmstadt, Germany) ile muamele edilerek DNA’nın ipliksi yapıdaki zincirleri gözlemlenebilir bir kütle oluşturabilsin diye buz üzerinde 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 14500 devirde 3 dakika santrifüj edilmek suretiyle kromozomal DNA çöktürülerek sıvı faz uzaklaştırılmış ve çökelti steril bir ortamda kurutulmuştur. Kurutulan kromozomal DNA 600 µL % 70 lik etil alkol (Merck, Darmstadt, Germany) ile 2 kez yıkanmış ve 14500 devirde 3 dakika santrifüj neticesinde tekrar çökelti olarak elde edilmiştir. Steril bir ortamda kurutulan çökelti 40 µL DNA Rehidrasyon çözeltisinde (10mM Tris-1mM EDTA) çözölmüş ve önce 65°C’de 15 dakika ardından 1 gece +4°C’de inkübasyona bırakılarak çalışmalara hazır hale getirilmiştir.

Çalışmadan elde edilen kromozomal DNA, 16S-23S ISR-PZR ve RFLP çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.3 Kromozomal DNA’nın saflık (kalite) ve miktar tayini

Promega Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kit kullanımı ile izole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayinleri Nanodrop (Wilmington, USA) spektrofotometrede seyreltilmemiş ana stok DNA’ların kullanımı (2 µL) ile 3 paralel okuma yapıp bu değerlerin ortalaması alınarak gerçekleştirilmiştir. DNA numunelerinin okunması için kontrol olarak dehidrasyon tamponu kullanılmıştır. 260nm, 280nm, 260nm/280nm, 260/230nm değerleri ölçölmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenmiştir (Sambrook ve Russell 2001).

OD260/OD280 oranı DNA örneklerinin saflıklarının kontrolü için kullanılmıştır. 1.8 oranı saf örnekler için ideal iken, bu orandan daha yüksek değerlerde RNA, daha düşük değerlerde ise protein kontaminasyonunun söz konusu olduğu göz önünde tutulmuştur.

3.2.4 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 ve Russell 2001). Yatay jel elektroforezi için 1 gr agaroz, 100 mL 1X Tris-Borik asit-EDTA (TBE, Merck, Darmstadt, Germany) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C'ye kadar soğutulan jelle % 2 Etidyum bromit (Sigma Chem. Co., USA) çözeltisi (10 mg/mL) 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” (1X TBE) ilave edilmiştir. Ardından jelin hasar görmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdan uzaklaştırılmıştır.

-20°C'de saklanan 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” (EK 4) kullanılmıştır (3 µL markör + 2 µL yükleme boyası). Yüklem boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jel KODAK Gel Logic 200 jel dökümantasyon sisteminde (Eastman Kodak Co., USA) 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan çözeltilerin içerikleri EK 2'de belirtilmiştir.

3.2.5 Kullanılan primerler

LAB'larda her bir suşta 16S rDNA-23S rDNA ISR (Internal spacer region) bölgesinin evrensel primer çiftinin kullanımı ile PZR'da amplifikasyonu amacıyla **G1 5'**

GAAGTCGTAACAAGG 3' ve **L1 5' CAAGGCATCCACCGT 3'** primer çifti kullanılmıştır (Jensen vd. 1993).

3.2.6 PZR amplifikasyonu

200 µL'lik PZR tüpüne toplam hacim 50 µL olacak şekilde sırasıyla 14 µL ultra saf steril su, 6 µL 5X KCl tamponu (Promega, USA), 4 µL 2.5 mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP, Promega, USA) karışımı, 6 µL 10 µmol ileri ve 6 µL 10 µmol geri primer, 6 µL 50 ünite Taq DNA polimeraz enzimi (Promega, USA), 3 µL 25 mM MgCl₂ (Promega, USA) ve 6 µL kalıp DNA ilave edilmiştir. PZR işlemi “Gradient PZR thermocycler/Eppendorf” cihazında her biri kendi içinde 94°C’de 1 dakika denatürasyon, 58°C’de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C’de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 34 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72°C’de 10 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır. Elde edilen PZR ürünü % 1.5 agaroz (Sigma Chem. Co., USA) içeren jelde yürütülmüş ve 16S rDNA-23S rDNA ISR gen bölgesini içeren DNA fragmentleri gözlenmiştir.

3.2.7 Kullanılan restriksiyon enzimleri (RE)

Çalışmada *SspI*, *DdeI*, *DraI*, *HinfI*, *HaeIII*, *AluI*, *VspI*, *TaqI*, *HindIII*, *Bsp119I*, *NcoI*, *NheI*, *HindII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PaeI*, *PstI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri (Fermentas) beş farklı genusa ait birer örnek ile denenmiştir. Bunların arasından kesim noktasına sahip olan 8 tanesi (*SspI*, *DdeI*, *DraI*, *HinfI*, *HaeIII*, *AluI*, *VspI* ve *TaqI*) çalışmadaki 144 adet suşun 16S rDNA-23S rDNA ISR PZR-RFLP analizleri için kullanılmıştır. Kullanılan restriksiyon enzimleri, baz dizilişleri ve optimum çalıştıkları sıcaklık değeri çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri, kesim noktaları ve optimum çalıştıkları sıcaklık değerleri

	Kullanılan RE*	Kesim noktası 5'→3'	T _{opt.}	İnkübasyon süresi
1	<i>HaeIII</i>	5'-G G [^] C C-3' 3'-C C [^] G G-5'	37°C	3 saat
2	<i>AluI</i>	5'-A G [^] C T-3' 3'-T C [^] G A-5'	37°C	3 saat
3	<i>HinI</i>	5'-G [^] A N T C-3' 3'-C T N A [^] G-5'	37°C	3 saat
4	<i>VspI</i>	5'-A T [^] T A A T-3' 3'-T A A T [^] T A-5'	37°C	3 saat
5	<i>DraI</i>	5'-T T T [^] A A A-3' 3'-A A A [^] T T T-5'	37°C	3 saat
6	<i>DdeI</i>	5'-C [^] T N A G-3' 3'-G A N T [^] C-5'	37°C	3 saat
7	<i>TaqI</i>	5'-T [^] A C G A-3' 3'-A G C [^] T-5'	65°C	3 saat
8	<i>SspI</i>	5'-A A T [^] A T T-3' 3'-T T A [^] T A A-5'	37°C	3 saat

3.2.8 Restriksiyon enzimleri ile kesim

Restriksiyon enzimi ile kesim işleminin gerçekleştirebilmesi için çizelge 3.3'de belirtilen protokol takip edilmiştir. Enzim ile muamele edilen numuneler enzimin çalıştığı sıcaklıkta 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra restriksiyon endonükleazların aktivitesini sonlandırmak amacıyla PZR tüpü 70°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Kesime uğramış DNA fragmanları % 1.5 lik agaroz jelde daha önce anlatılan prosedürler takip edilerek gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.3 Restriksiyon enzim kesim protokolü

Reaksiyon Bileşimi	(µl)
Su	10
Restriksiyon Enzim Tamponu	2
Enzim	1
16S-23S rDNA ISR-PZR Ürünü	7
Toplam Hacim(µl)	20

3.2.9 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 oluşan bantlar KODAK Görüntüleme Sisteminde görüntülenip TIFF formatında depolandıktan sonra TIFF dosyaları bu software ile çalışabilecek dosya formatına dönüştürülmüştür (8 bit). Moleküler tiplendirme yaklaşımlarında Dice, Jaccard ve Pearson benzerlik katsayıları gibi elektroforetik bant temelli benzerlik katsayıları suş benzerliklerinin kantitatif değerlendirilmesini sağlayan dendrogramların oluşturulmasında kullanılır. Çalışmamızda ISR PZR ve ISR RFLP sonuçlarının değerlendirilmesinde Dice korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

Dice ve Jaccard korelasyon katsayıları bant paternlerinin kıyaslanmasında negatif bant eşleşmeleri göz ardı edildiğinden dolayı sadece var olan benzer bant profilleri üzerinden bir sonuca gitmektedir. Bundan dolayı olası tüm bant pozisyonları kullanılmadığı için benzer profillerden kaynaklanan yüksek benzerlik oranı içermektedir. Bu benzerlik katsayıları arasında gruplandırma ölçümlerinde fark yoktur. Bu nedenle restriksiyon enzim profil bantları arasındaki benzerlik “Dice product moment correlation coefficient (Dice korelasyon katsayısı)” değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile gruplama işlemi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Kromozomal 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 144 adet Laktik Asit Bakterisine ait kromozomal DNA PROMEGA Wizard Genomik DNA izolasyon Kit sistemi kullanılarak izole edilmiş ve NANODROP spektrofotometre kullanılarak DNA konsantrasyonu ng/μl olarak çizelge 4.1’de verilmiştir.

OD₂₆₀ nm, DNA molekülünün absorbe edildiği dalga boyudur. Bu değer numunedeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (OD₂₆₀ da 1= 50 ng/μl DNA). 280 nm’de okunan absorbans değeri OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır ve teorik olarak OD₂₆₀/OD₂₈₀ değerinin 1.75-2.0 arasında olması gerekmektedir. 1.75-2.0 arasında tespit edilen OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı UV skaladaki absorpsiyonun nükleik asitlerden kaynaklandığı anlamına gelmektedir. Bununla beraber, 1.75’den daha düşük OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı protein ve diğer UV absorbe edicilerin varlığını, 2.0’den daha büyük OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı ise numunenin kloroform veya fenol ile kontamine olmuş olabileceğini göstermektedir. Nükleik asit saflığının tespitinde kullanılan bir diğer ölçüm OD₂₆₀/OD₂₃₀ oranıdır ancak OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranına göre daha az hassas olan ve kullanılan bir değerdir.

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları

BAKTERİ ADI	KONT (ng/μl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD _{260/280}	OD _{260/230}
<i>Enterococcus</i>					
<i>Enterococcus avium</i> ATCC Pasteur (RSKK 500)	987,7	19,754	9,879	2	2,28
<i>Enterococcus hirae</i> 115	4511,8	90,235	44,346	2,03	2,31
<i>Enterococcus casseliflavus</i> NRL 3502	176,9	3,538	1,818	1,95	1,98
<i>Enterococcus durans</i> RSKK 05034	798,8	15,976	8,707	1,83	1,72
<i>Enterococcus durans</i> 51	599,1	11,981	6,014	1,99	2,28
<i>Enterococcus durans</i> 56	1308,9	26,179	12,826	2,04	2,25

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

<i>Enterococcus durans</i> 69	491,9	9,839	4,939	1,99	2,11
<i>Enterococcus durans</i> 75	3755,5	75,111	36,112	2,08	2,4
<i>Enterococcus durans</i> 89	5018,4	100,36	48,451	2,07	2,39
<i>Enterococcus durans</i> 116	671,3	13,426	6,74	1,99	2,36
<i>Enterococcus durans</i> 124	1841,7	36,834	18,179	2,03	2,33
<i>Enterococcus faecalis</i> OZ1	203,2	4,063	2,121	1,92	1,26
<i>Enterococcus faecalis</i> H	554,4	11,087	5,411	2,05	2,01
<i>Enterococcus faecalis</i> E27	264,9	5,298	2,688	1,97	1,86
<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	1523	30,461	15,065	2,02	2,31
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	3093,6	61,872	34,671	1,78	1,95
<i>Enterococcus faecalis</i> 64	457,1	9,142	4,567	2	2,13
<i>Enterococcus faecalis</i> 74	7036,9	140,73	71,6	1,97	2,31
<i>Enterococcus faecalis</i> 78	4710,4	94,207	45,416	2,07	2,37
<i>Enterococcus faecalis</i> 79	3282,3	65,647	31,963	2,05	2,39
<i>Enterococcus faecalis</i> 80	2049,2	40,983	19,687	2,08	2,43
<i>Enterococcus faecalis</i> 81	1555,7	31,113	15,439	2,02	2,3
<i>Enterococcus faecalis</i> 82	2387	47,739	23,281	2,05	2,36
<i>Enterococcus faecalis</i> 139	16732,9	334,65	178,245	1,88	2,1
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	2304,4	46,089	23,076	2	2,31
<i>Enterococcus faecium</i> F1	4539,5	90,789	43,86	2,07	2,41
<i>Enterococcus faecium</i> H	142,2	2,843	1,517	1,87	1,32
<i>Enterococcus faecium</i> 1	3380,6	67,613	32,837	2,06	2,44
<i>Enterococcus faecium</i> 2	4075,2	81,504	39,335	2,07	2,44
<i>Enterococcus faecium</i> 3	3115,5	62,311	30,92	2,02	2,31
<i>Enterococcus faecium</i> 5	3209,1	64,181	30,958	2,07	2,45
<i>Enterococcus faecium</i> 6	2657,3	53,146	25,638	2,07	2,41
<i>Enterococcus faecium</i> 7	638,3	12,766	6,416	1,99	2,22
<i>Enterococcus faecium</i> 8	3184,5	63,691	30,901	2,06	2,36
<i>Enterococcus faecium</i> 71	1396,7	27,933	13,793	2,03	2,32
<i>Enterococcus faecium</i> 77	414,91	18,283	14,045	2,01	2,02
Lactococcus					
<i>Lactococcus lactis</i> OZ1	582,9	11,658	5,823	2	2,25
<i>Lactococcus lactis</i> OZ2	607,8	12,157	6,103	1,99	2,25
<i>Lactococcus lactis</i> OZ3	870,6	17,412	9,222	1,89	2,32
<i>Lactococcus lactis</i> OZ4	2755,6	55,112	27,225	2,02	2,37
<i>Lactococcus lactis</i> PK1	269,4	5,388	2,702	1,99	2,54
<i>Lactococcus lactis</i> 30	2280,6	45,613	22,212	2,05	2,44
<i>Lactococcus lactis</i> 32	1600,9	32,019	15,605	2,05	2,42
<i>Lactococcus lactis</i> 33	1188,3	23,765	11,697	2,03	2,37
<i>Lactococcus lactis</i> 57	3024,4	60,488	29,977	2,02	2,34
<i>Lactococcus lactis</i> 86	2206,6	44,133	21,692	2,03	2,35
<i>Lactococcus lactis</i> 88	2767,8	55,355	27,019	2,05	2,4
<i>Lactococcus lactis</i> 93	3182,2	63,644	30,866	2,06	2,46
<i>Lactococcus lactis</i> 94	2858,1	57,162	27,977	2,04	2,44

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

<i>Lactococcus lactis</i> 100	4604,1	92,082	45,059	2,04	2,35
<i>Lactococcus lactis</i> 102	2175,5	43,51	21,3	2,04	2,35
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 7962	987,2	19,745	10,062	1,96	1,91
<i>Lactococcus lactis</i> W1	2687,2	53,743	26,334	2,04	2,4
<i>Lactococcus lactis</i> W2	2682,4	53,649	26,246	2,04	2,39
<i>Lactococcus lactis</i> W3	180,4	3,607	2	1,8	1,74
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 31	953,5	19,07	9,407	2,03	2,52
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 34	2554,4	51,088	25,136	2,03	2,15
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35	979,7	19,595	9,568	2,05	2,73
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 39	1754,7	35,095	17,067	2,06	2,46
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 62	238	4,76	2,441	1,95	2,22
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 63	3790,9	75,819	36,45	2,08	2,45
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 87	234,3	4,685	2,377	1,97	2,6
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 99	1241,4	24,829	12,151	2,04	2,72
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 103	3882,7	77,653	37,816	2,05	2,4
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	311,9	6,238	3,134	1,99	3,26
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B634	1834,6	36,692	17,67	2,08	2,41
<i>Lactococcus garvieae</i> 38	864	17,279	8,402	2,06	3,38
<i>Lactococcus garvieae</i> 43	1882,4	37,647	18,442	2,04	2,49
<i>Lactococcus garvieae</i> 44	5592,9	111,85	55,23	2,03	2,24
<i>Lactococcus garvieae</i> 46	2263,3	45,266	23,112	1,96	1,71
<i>Lactococcus garvieae</i> 58	2810,6	56,212	27,142	2,07	2,42
<i>Lactococcus garvieae</i> 59	1712,1	34,242	16,501	2,08	2,47
<i>Lactococcus garvieae</i> 65	690	13,799	6,843	2,02	2,35
<i>Lactococcus garvieae</i> 66	2423,5	48,469	23,584	2,06	2,47
<i>Lactococcus garvieae</i> 67	3171,2	63,423	31,167	2,03	2,41
<i>Lactococcus garvieae</i> 83	2959,3	59,185	29,047	2,04	2,37
<i>Lactococcus garvieae</i> 84	959	19,179	9,742	1,97	2,2
<i>Lactococcus garvieae</i> 85	1632,8	32,657	16,287	2,01	2,41
<i>Lactococcus garvieae</i> 90	3957,6	79,152	38,725	2,04	2,44
<i>Lactococcus garvieae</i> 91	2382,2	47,644	23,142	2,06	2,46
<i>Lactococcus garvieae</i> 92	2737,9	54,758	28,965	1,89	1,95
<i>Lactococcus garvieae</i> 95	4601,6	92,032	44,666	2,06	2,42
<i>Lactococcus garvieae</i> 96	2029,6	40,593	19,863	2,04	2,48
<i>Lactococcus garvieae</i> 97	769,69	15,592	12,536	2,00	2,14
<i>Pediococcus</i>					
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	4771,3	95,425	47,37	2,01	2,37
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	6130,9	122,61	61,735	1,99	2,33
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	1714	34,28	16,86	2,03	2,42
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	1081,9	21,639	11,248	1,92	2,02
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	17174,7	343,49	177,294	1,94	2,27
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	928,6	18,572	9,169	2,03	2,47
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	1349,6	26,993	13,68	1,97	2,37

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	2642,1	52,841	26,433	2	2,24
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	1553,7	31,074	15,583	1,99	2,35
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	666,3	13,327	6,751	1,97	2,58
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	514,5	10,29	5,23	1,97	2,46
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	968,5	19,371	9,82	1,97	2,46
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	209,3	4,186	2,141	1,95	2,37
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	998,2	19,964	10,112	1,97	2,53
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	704,4	14,089	7,259	1,94	2,52
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	875,9	17,518	9,121	1,92	2,33
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	1618,4	32,368	15,822	2,05	2,54
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	371,6	7,431	3,706	2,01	2,95
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	8407	168,14	82,077	2,05	2,46
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	631,1	12,621	6,6	1,91	2,43
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	1734	34,681	16,851	2,06	2,44
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	444,2	8,883	4,646	1,91	2,64
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	1560,9	31,218	15,387	2,03	2,52
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	392,8	7,856	4,067	1,93	2,73
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	411,4	8,227	4,279	1,92	2,52
<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	497,1	9,941	5,195	1,91	2,32
Leuconostoc					
<i>Leuconostoc lysis</i> Lys	2770,6	55,412	28,096	1,97	2,22
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B3469	2591,8	51,835	25,968	2	2,2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	460,3	9,207	4,637	1,99	2,39
Lactobacillus					
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	1058,8	21,175	10,603	2	2,48
<i>Lactobacillus buchnerii</i> NRLL B1837	2631,7	52,633	24,542	2,14	2,8
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	5625,2	112,50	55,043	2,04	2,36
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	4484	89,679	43,593	2,06	2,37
<i>Lactobacillus maltoramicus</i> NRLL 148532	9892,1	197,84	95,75	2,07	2,43
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	5314,4	106,28	51,601	2,06	2,25
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	4089	81,779	39,756	2,06	2,38
<i>Lactobacillus rhamnasus</i> TK2	2843,2	56,865	28,421	2	2,46
<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	4374,1	87,483	42,583	2,05	2,47
<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL B21	834,2	16,684	8,847	1,89	2,2
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	2181,4	43,628	21,361	2,04	2,32
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	812,8	16,256	8,117	2	2,62
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	3507	70,141	34,074	2,06	2,43
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	3606,8	72,135	34,541	2,09	2,51
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	3588,7	71,774	34,184	2,1	2,52
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	1935,5	38,71	19,35	2	2,25
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	6505,4	130,10	65,654	1,98	2,1
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	2173,2	43,465	22,134	1,96	2,18

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	968,1	19,362	9,568	2,02	2,36
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	1124,4	22,489	11,155	2,02	2,41
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	1720,6	34,412	17,378	1,98	2,52
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	1048,3	20,967	10,44	2,01	2,51
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	2024,7	40,494	19,959	2,03	2,47
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	187,3	3,746	1,874	2	3,05
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	5943,1	118,86	58,245	2,04	2,29
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	261,1	5,222	2,552	2,05	2,26
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	22110	442,20	275,746	1,6	1,84
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	1867,4	37,349	18,289	2,04	2,24
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	1816	36,32	18,451	1,97	2,46
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	591,82	11,836	6,114	1,94	1,80

4.2 Kromozomal DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

Promega Wizard DNA izolasyon kit kullanımı ile beş farklı cinsten seçilmiş birer suştan izole edilen ve elektroforezi % 1 agaroz içeren 0.02 µl/ml EtBr eklenmiş jellerde yapılan kromozomal DNA moleküllerine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılacak tüm suşlarda yaklaşık 1500 bp büyüklüğünde kromozomal DNA görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.1 Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinsden seçilmiş birer suşa ait kromozomal DNA görüntüsü

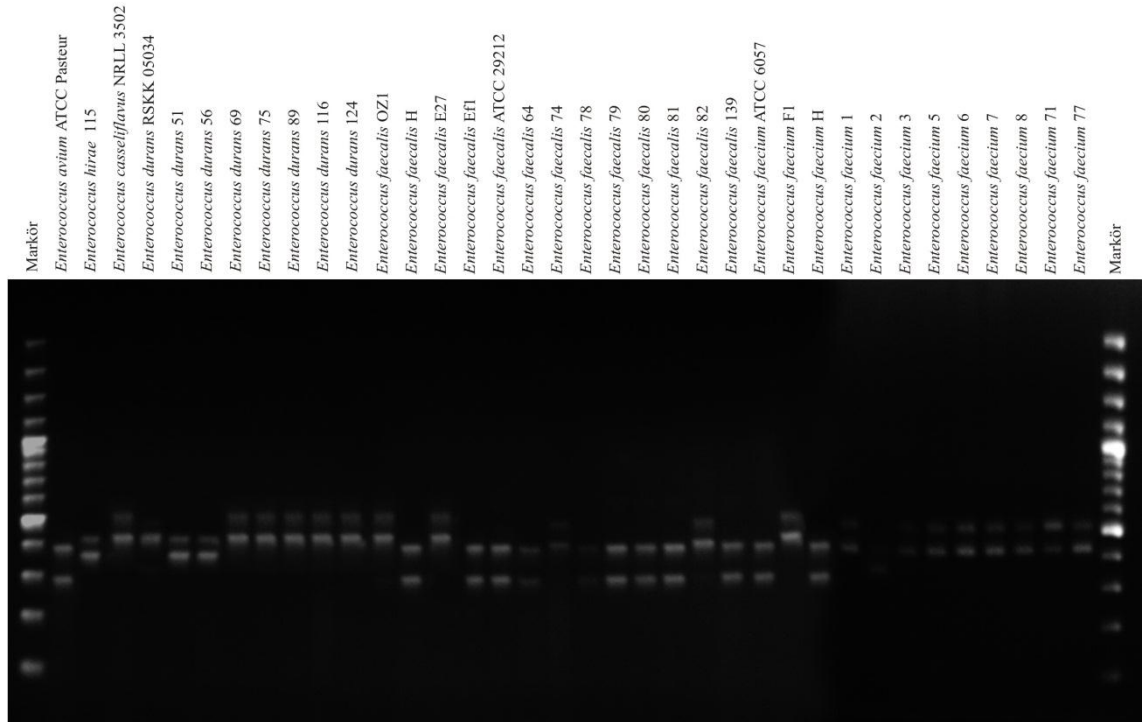
M: 100bp plus DNA ladder (bp), 1: *E. faecalis* OZ1, 2: *P. acidilactici cereviciae* ATCC 666,3: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*; 4: *Lc. lactis* OZ1, 5: *Lb. plantarum* DSM 20174

4.3 16S rDNA-23S rDNA ISR (Intergenic Spacer Region)

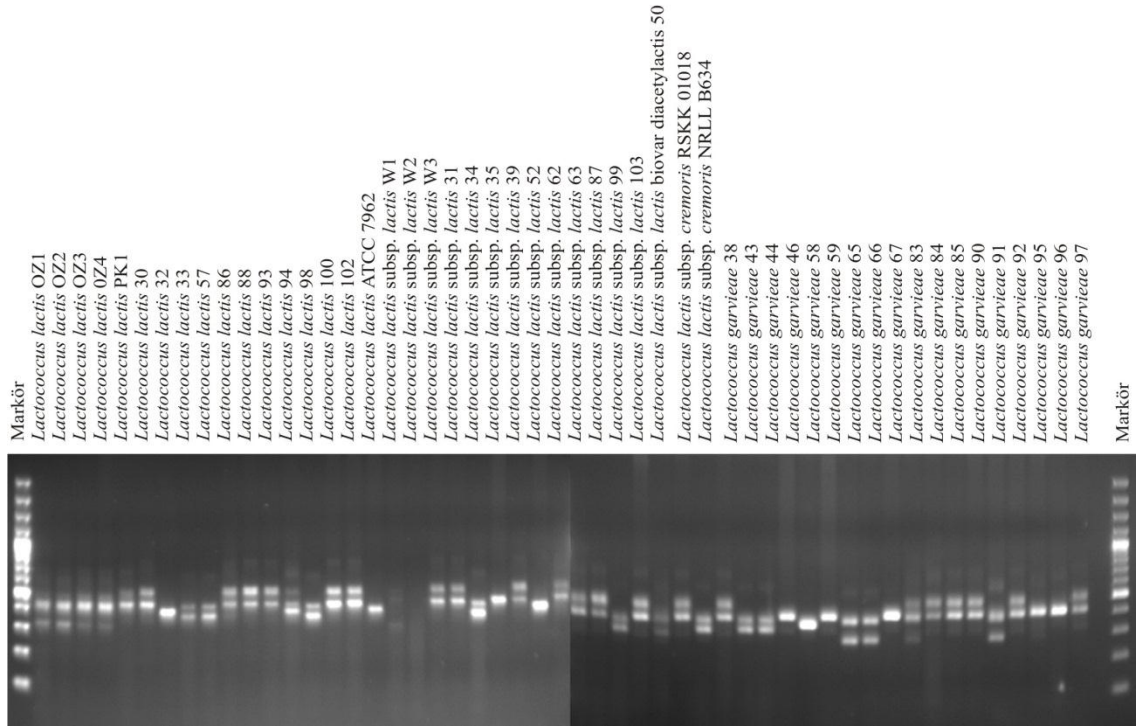
4.3.1 PZR uygulamaları

16S-23S rDNA ISR bölgeleri organizmalar arasında sıklıkla “tRNA gen insersiyonlarından” dolayı hem uzunluk hem de dizi bakımından farklılık gösterdiğinden 16S rRNA yapısal geni ile kıyaslandığında daha fazla varyasyon sergilemekte ve bu varyasyon birbiri ile yakın ilişkili suşların ayırımında

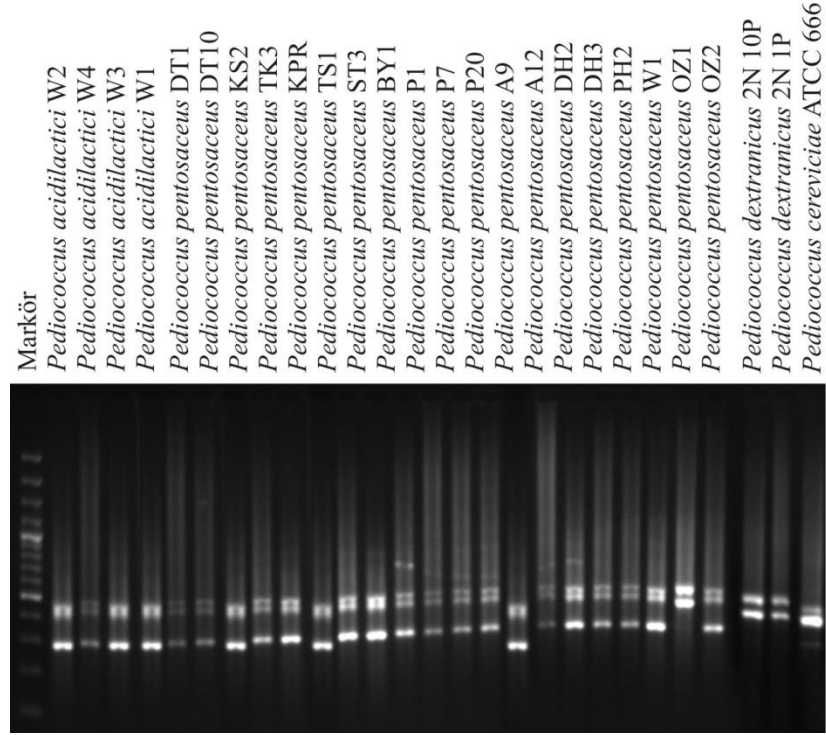
kullanılabilmekte ve bazı bakteri cinslerinde, ISR bölgelerinin direk amplifikasyonu tür seviyesinde ayırt edici bir tiplendirme sağlamaktadır. Bu bağlamda izole edilen kromozomal DNA'ların, **G1 5' GAAGTCGTAACAAGG 3'** ve **L1 5' CAAGGCATCCACCGT 3'** primer çiftinin kullanımı ile PZR işlemine tabi tutulan ürünleri 0.02 µl/ml EtBr içeren % 1.5'lık agaroz jellerde görüntülendiğinde farklı büyüklükte ve farklı sayıda DNA fragmentlerini içeren profiller elde edilmiştir (Şekil 4.2-4.6). Bu PZR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirilene kadar -20°C'de bekletilmiştir.



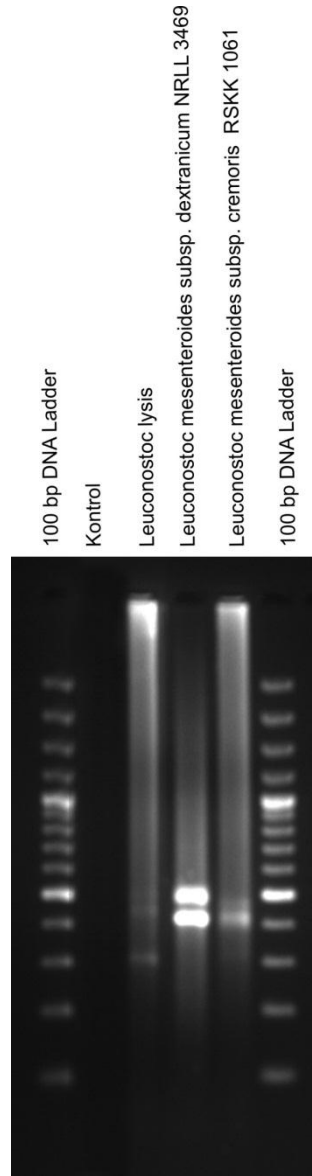
Şekil 4.2 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü



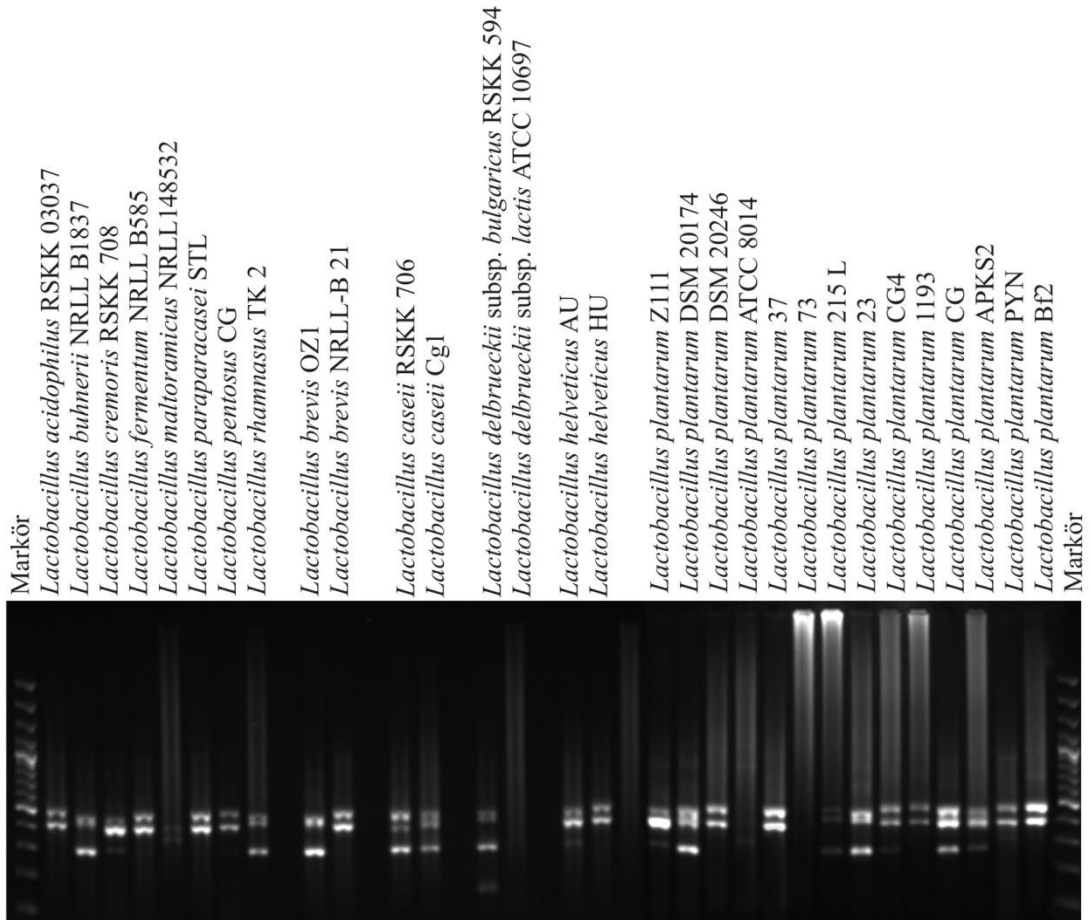
Şekil 4.3 *Lactococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.4 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü



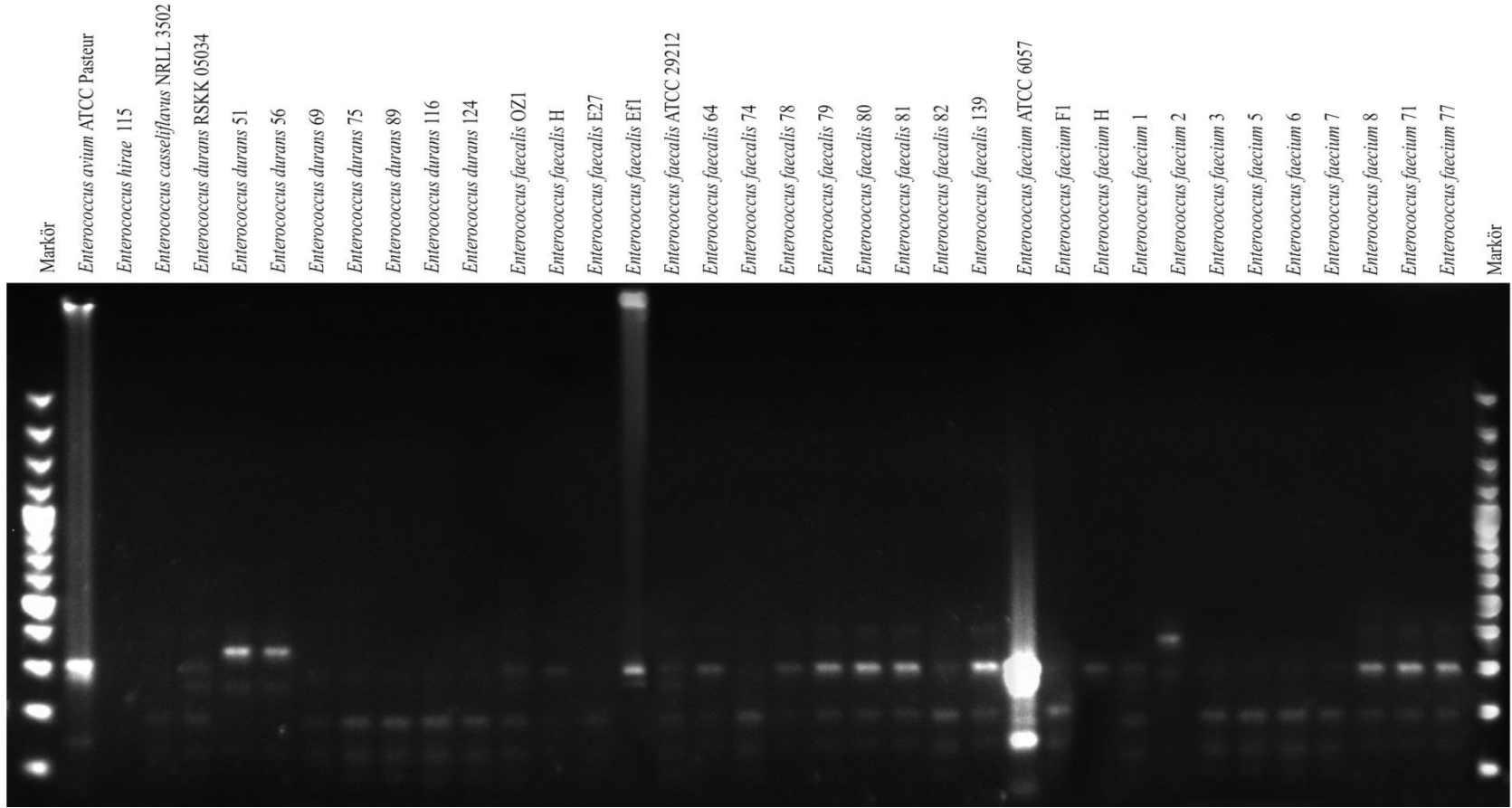
Şekil 4.5 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü



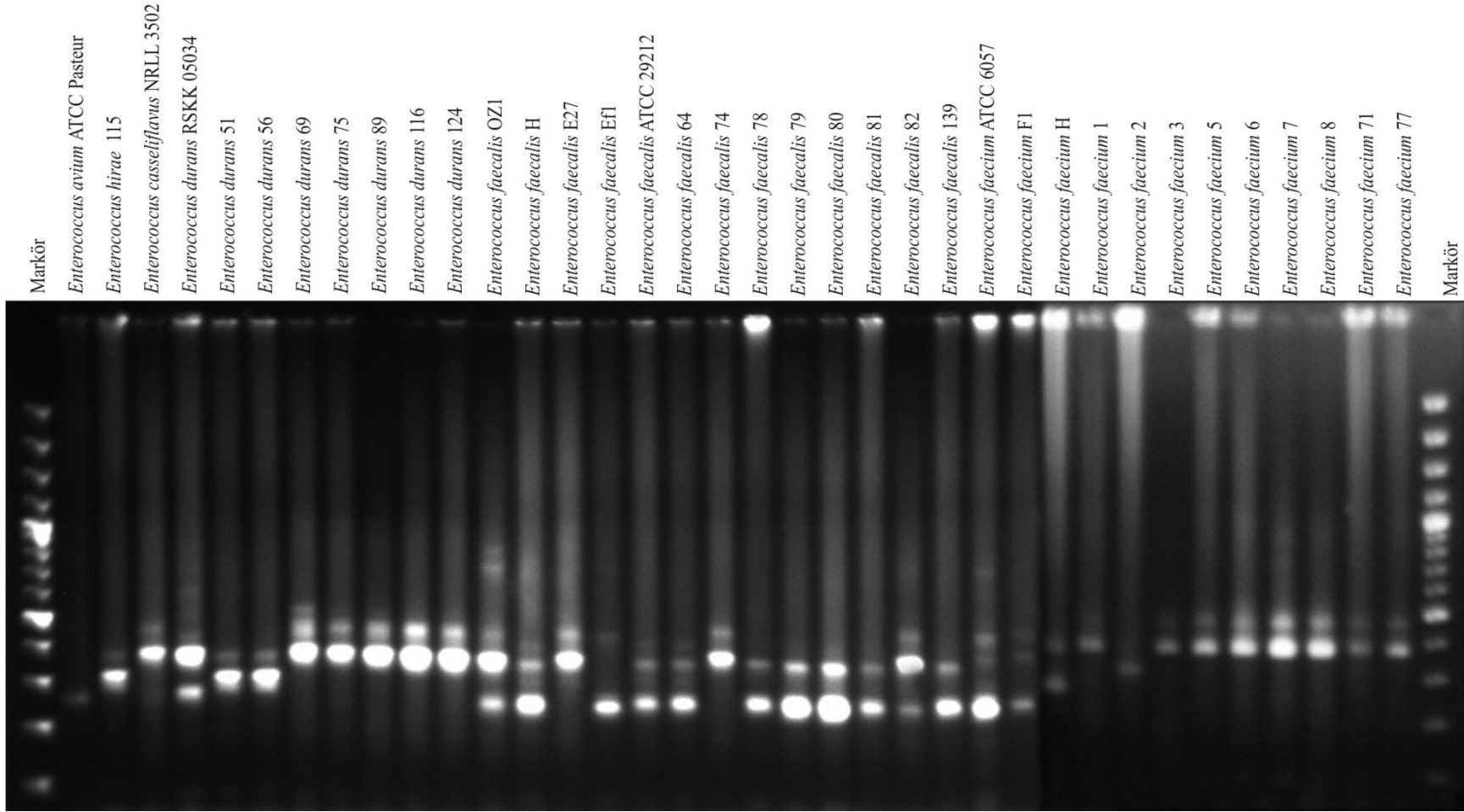
Şekil 4.6 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin % 1.5 agaroz jel görüntüsü

4.3.2 Restriksiyon enzimleri ile kesim

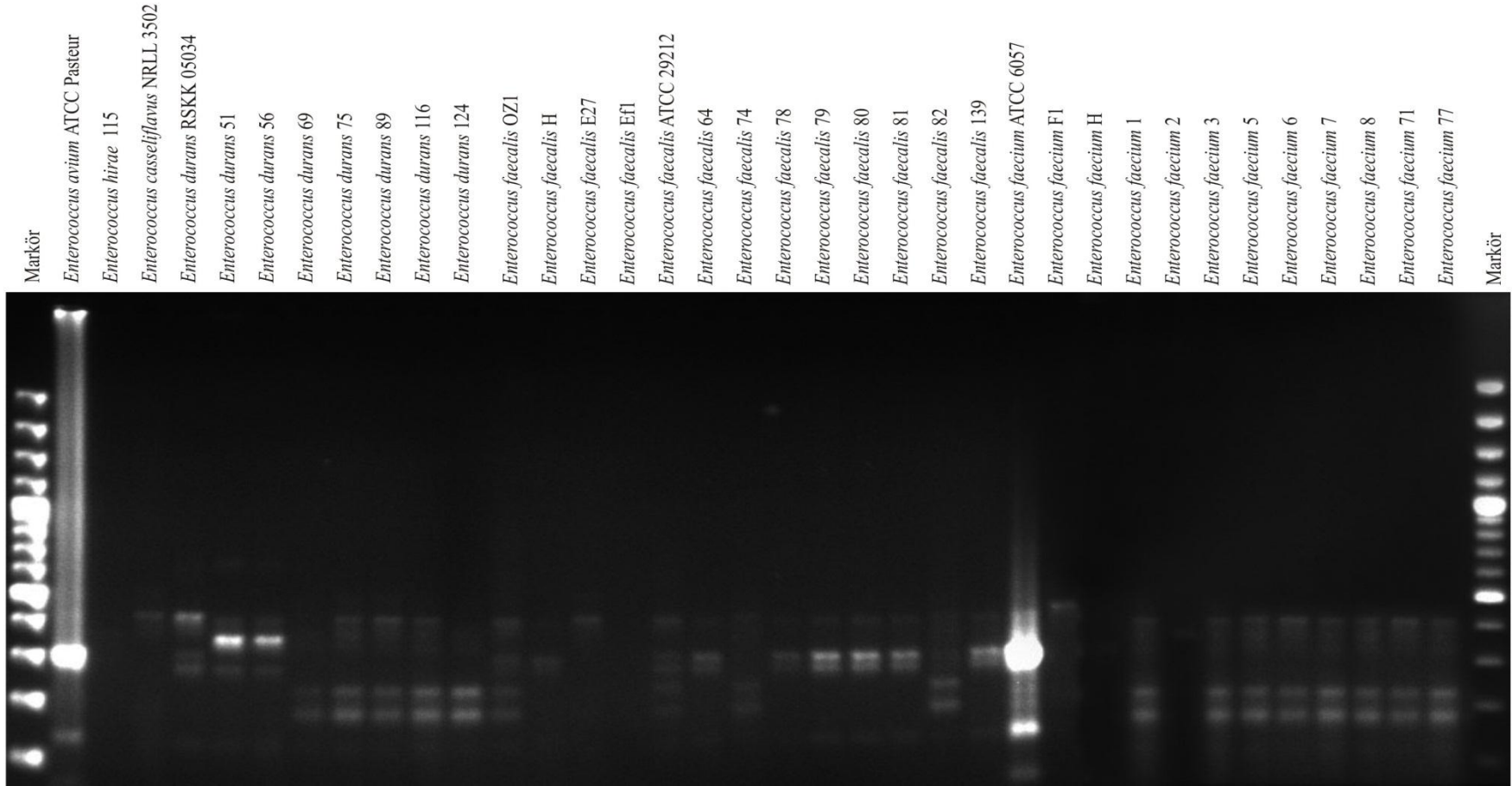
16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin kesim işlemi ön denemeler sonucu belirlenen en uygun restriksiyon enzimleri ile (*SspI*, *DdeI*, *DraI*, *HinfI*, *HaeIII*, *AluI*, *VspI* ve *TaqI*) toplam 20 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri 0.02 µl/ml EtBr içeren % 1.5'lik agaroz jellerde her bir primer için eşit süre zarfında yürütüldükten sonra KODAK jel görüntüleme cihazında jellerin görüntüsü alınmış ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.7-4.35).



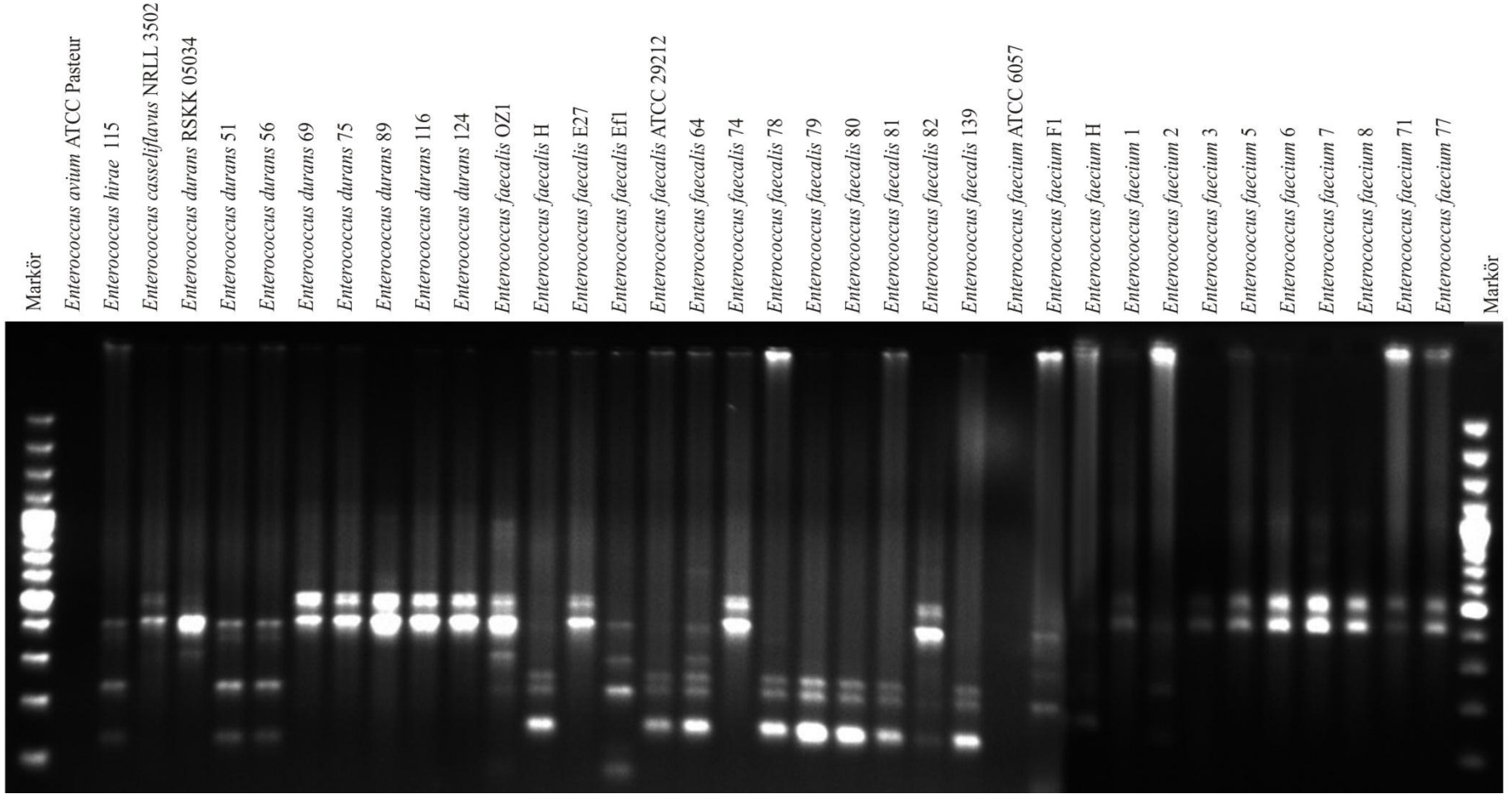
Şekil 4.7 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



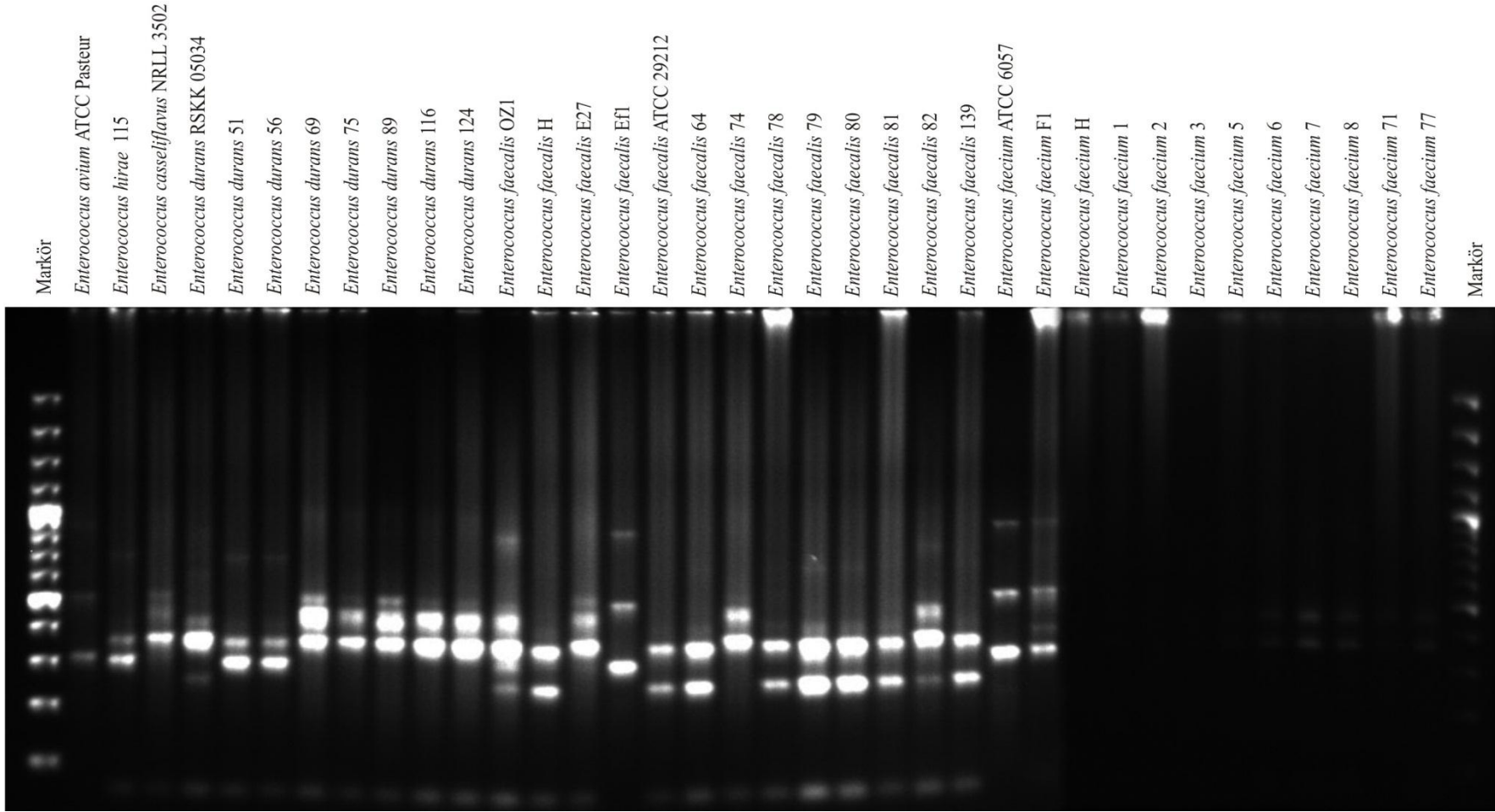
Şekil 4.8 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



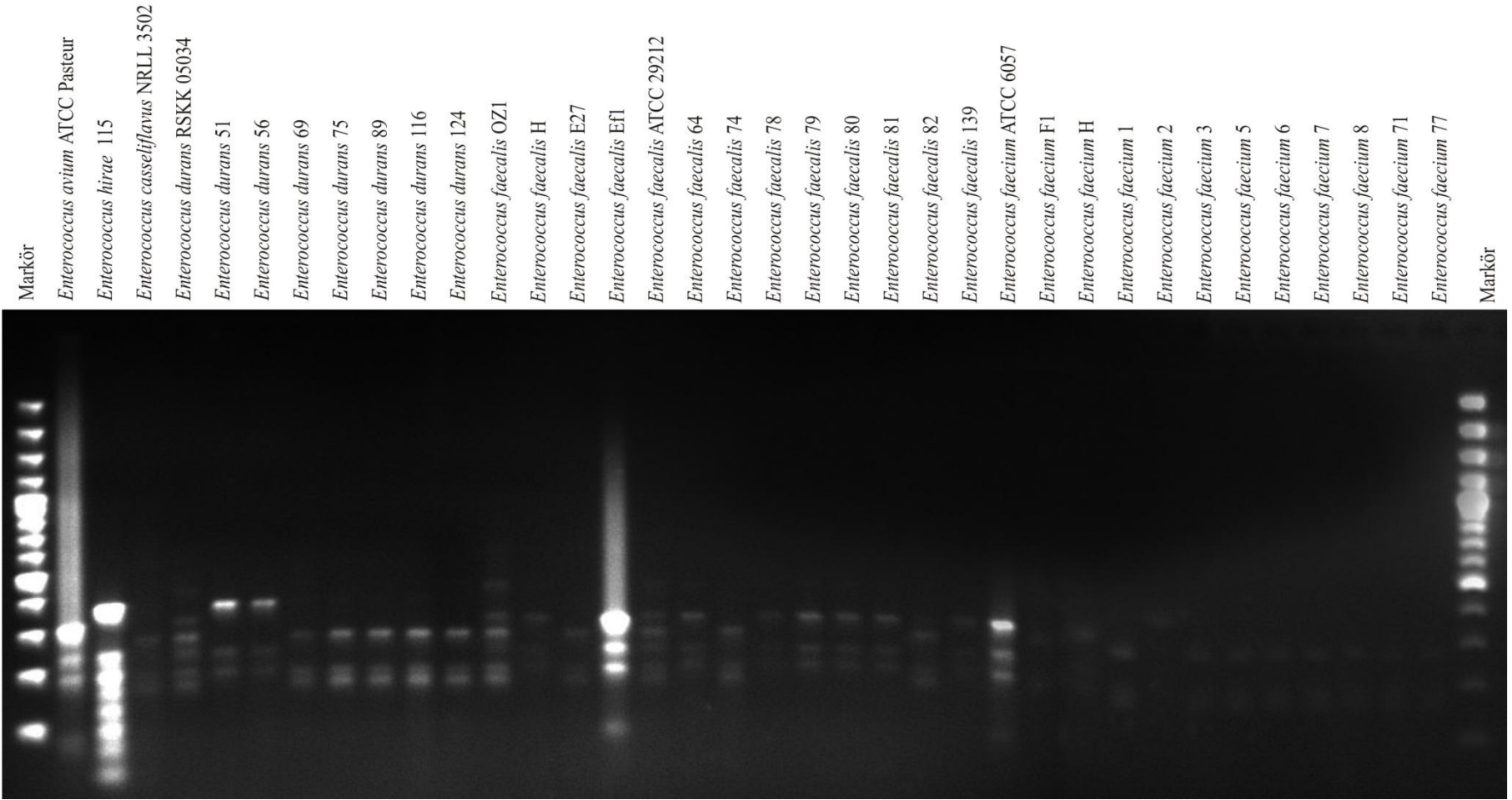
Şekil 4.9 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



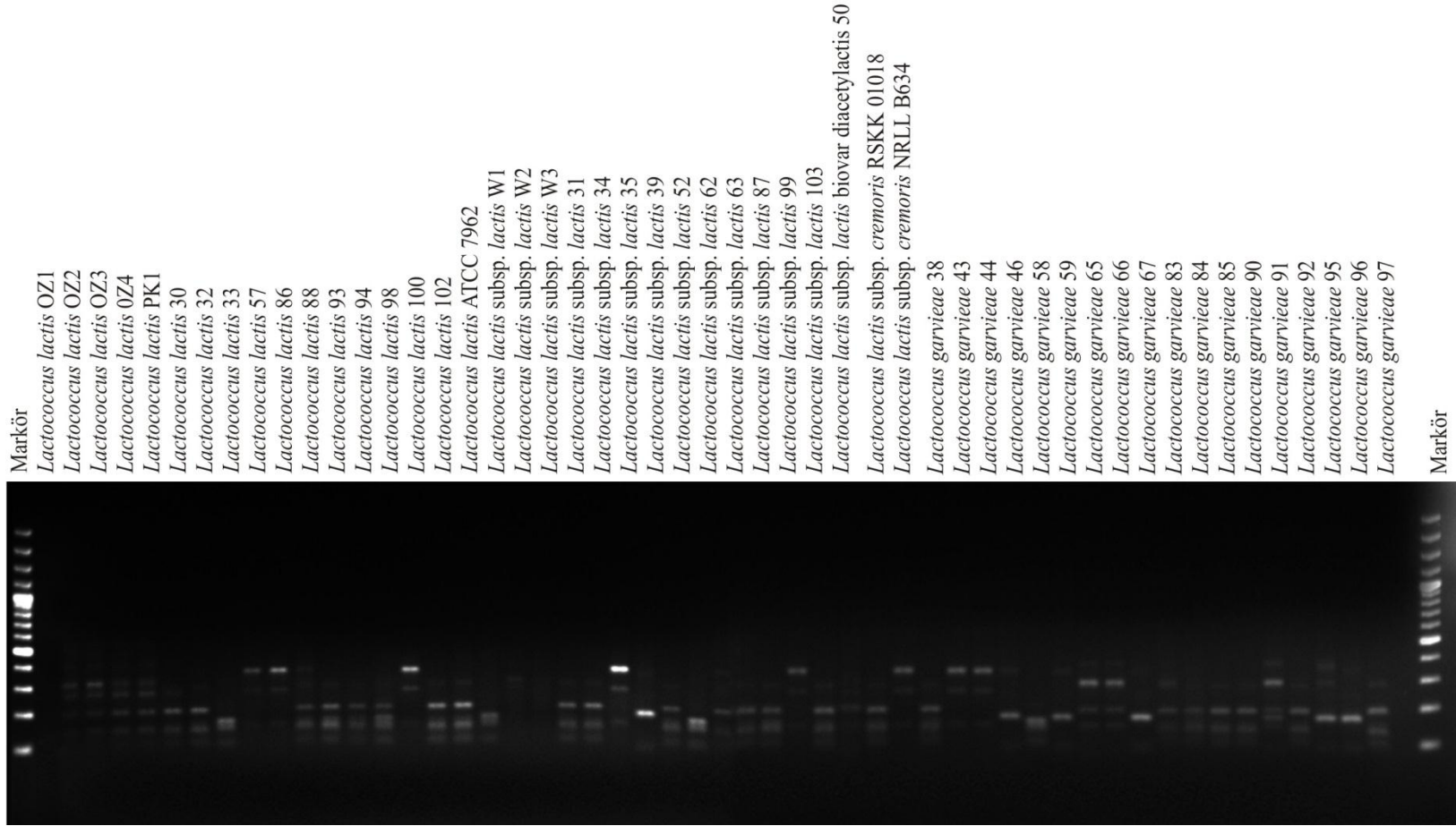
Şekil 4.10 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hinf*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



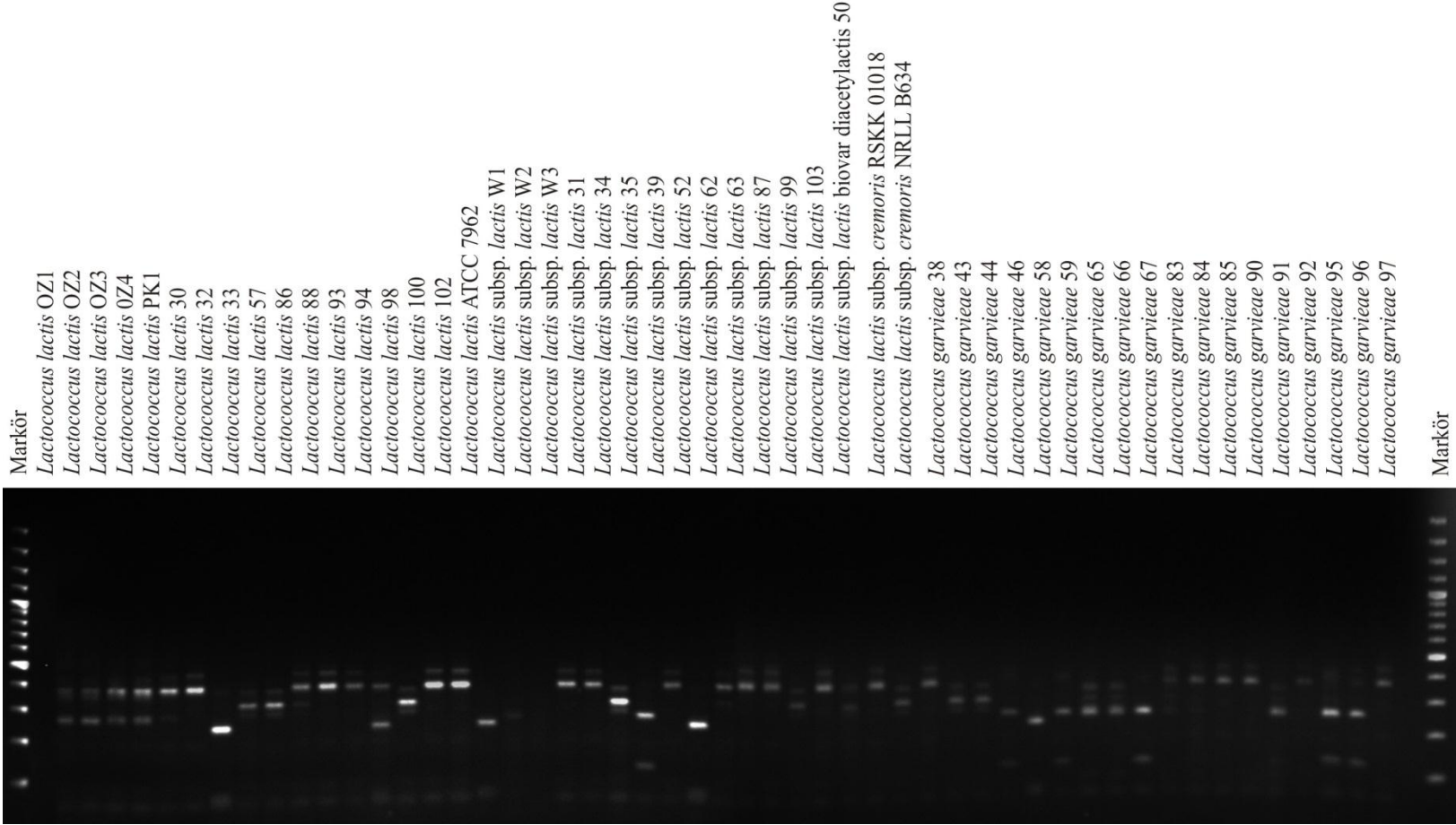
Şekil 4.11 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *SspI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



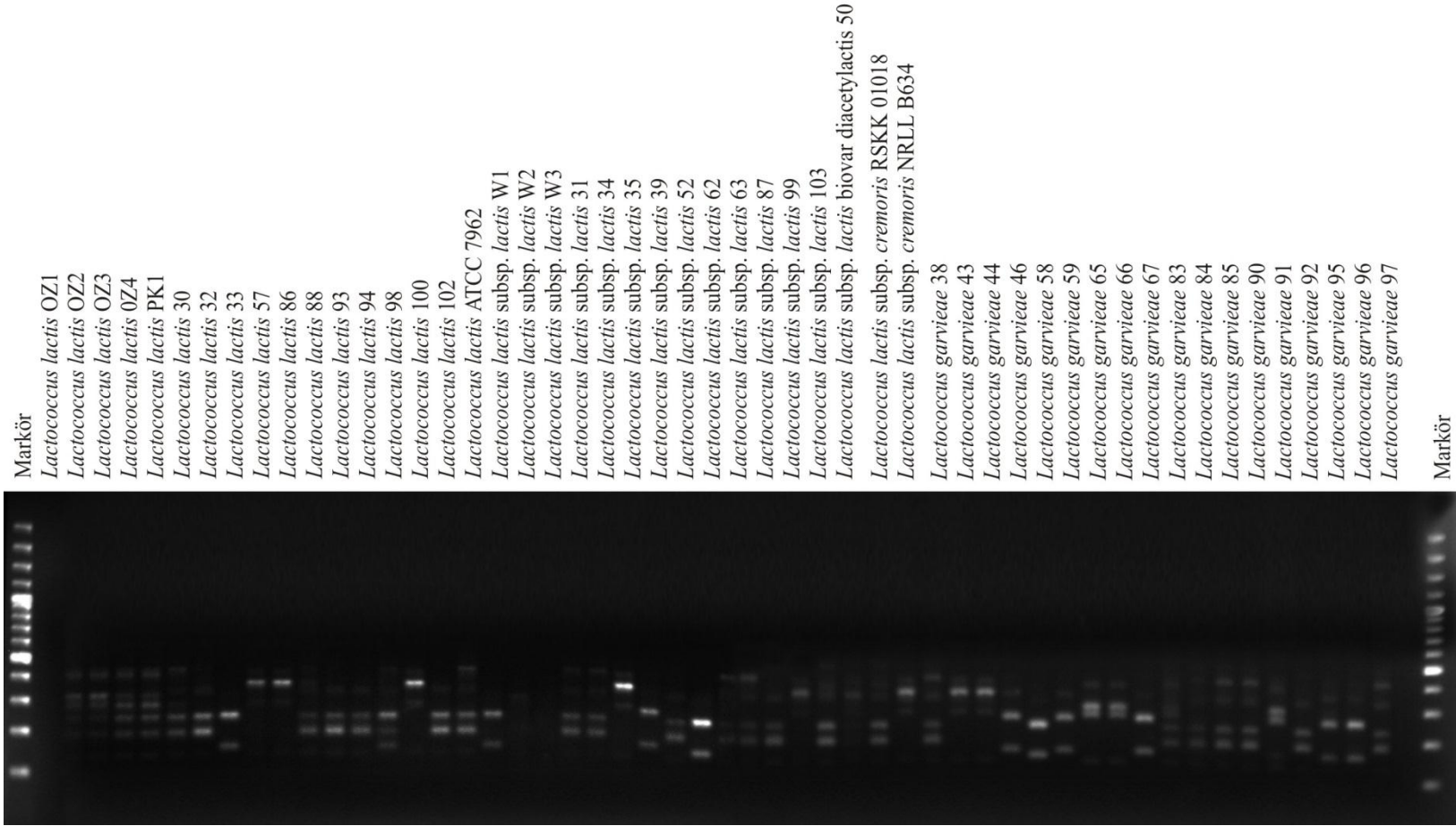
Şekil 4.12 *Enterococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



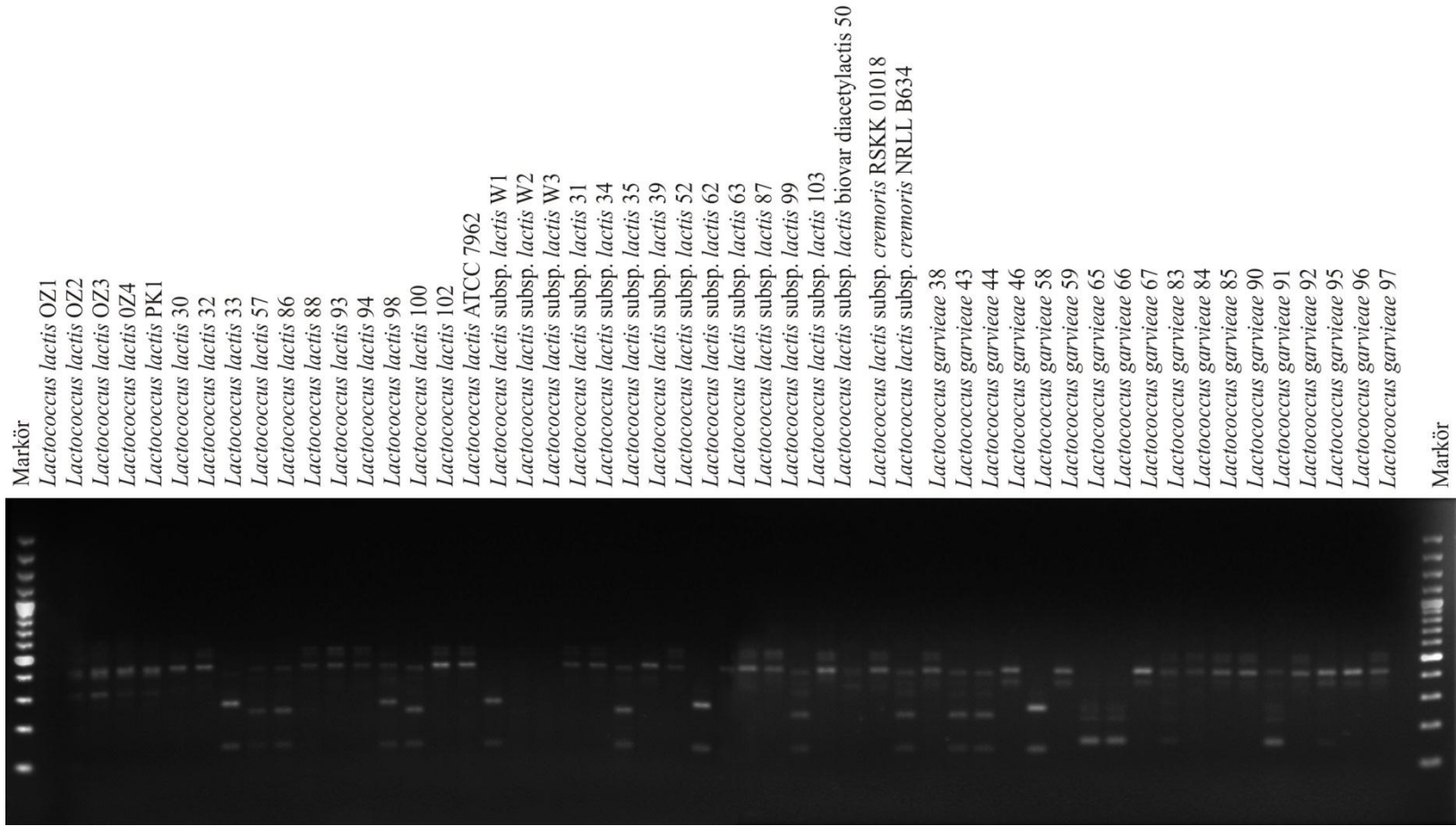
Şekil 4.13 *Lactococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



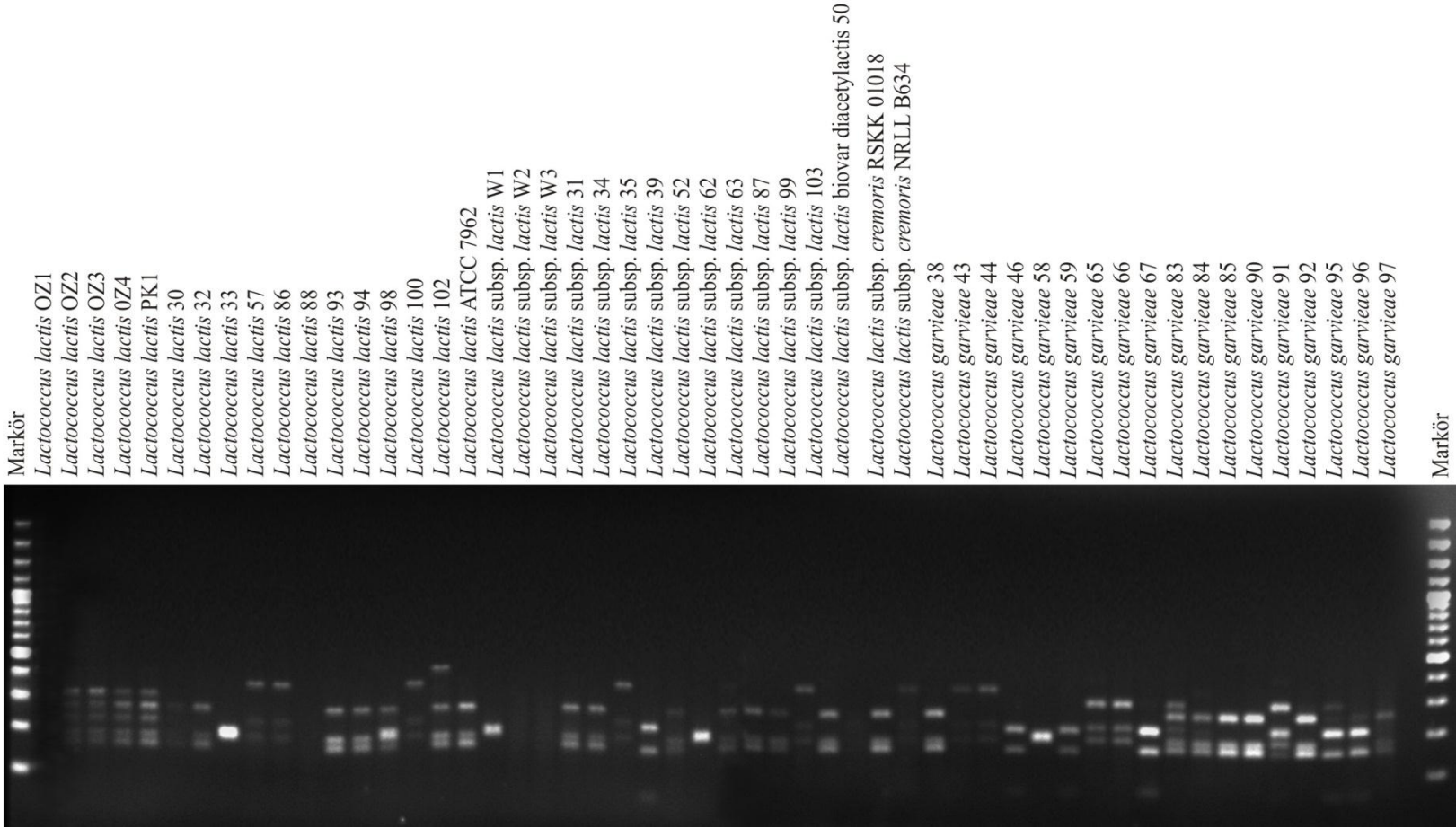
Şekil 4.14 *Lactococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



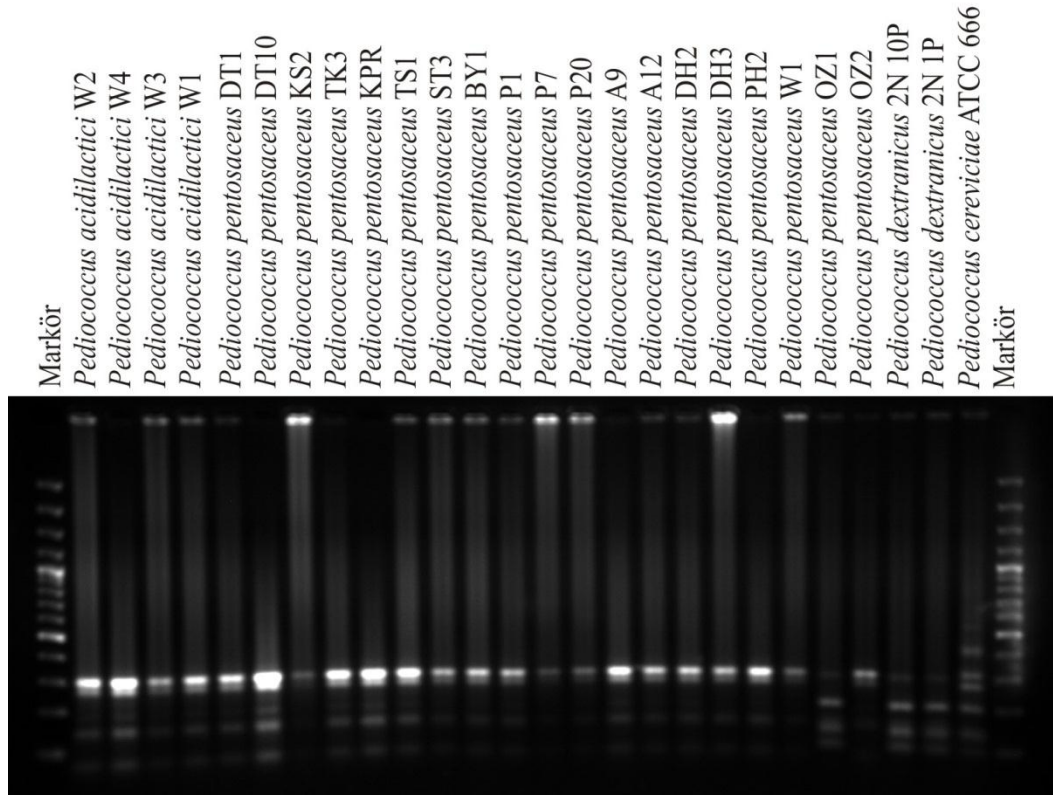
Şekil 4.15 *Lactococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



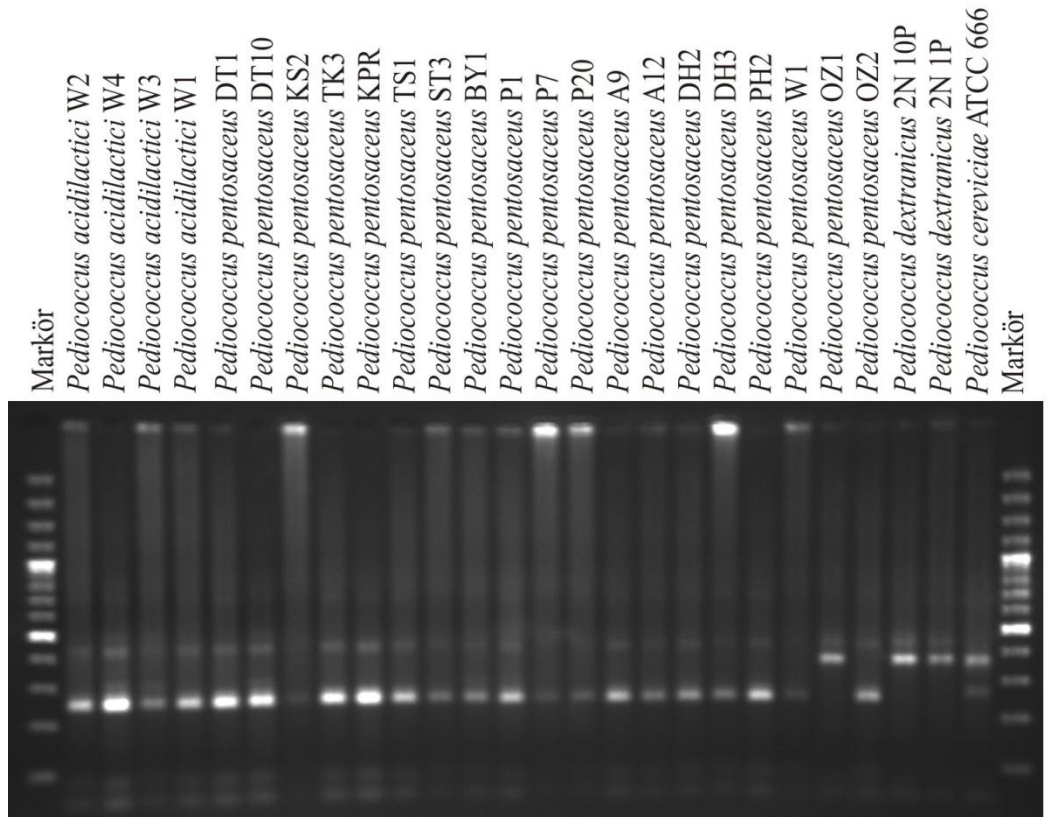
Şekil 4.16 *Lactococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hin*fl restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



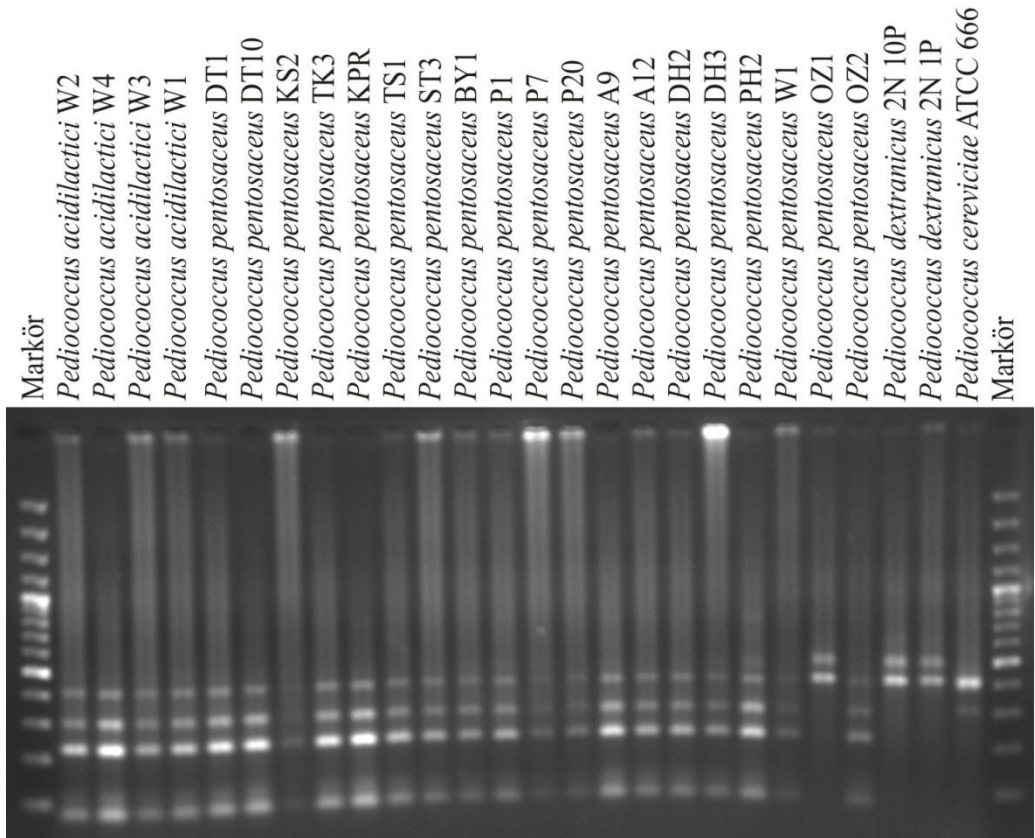
Şekil 4.17 *Lactococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



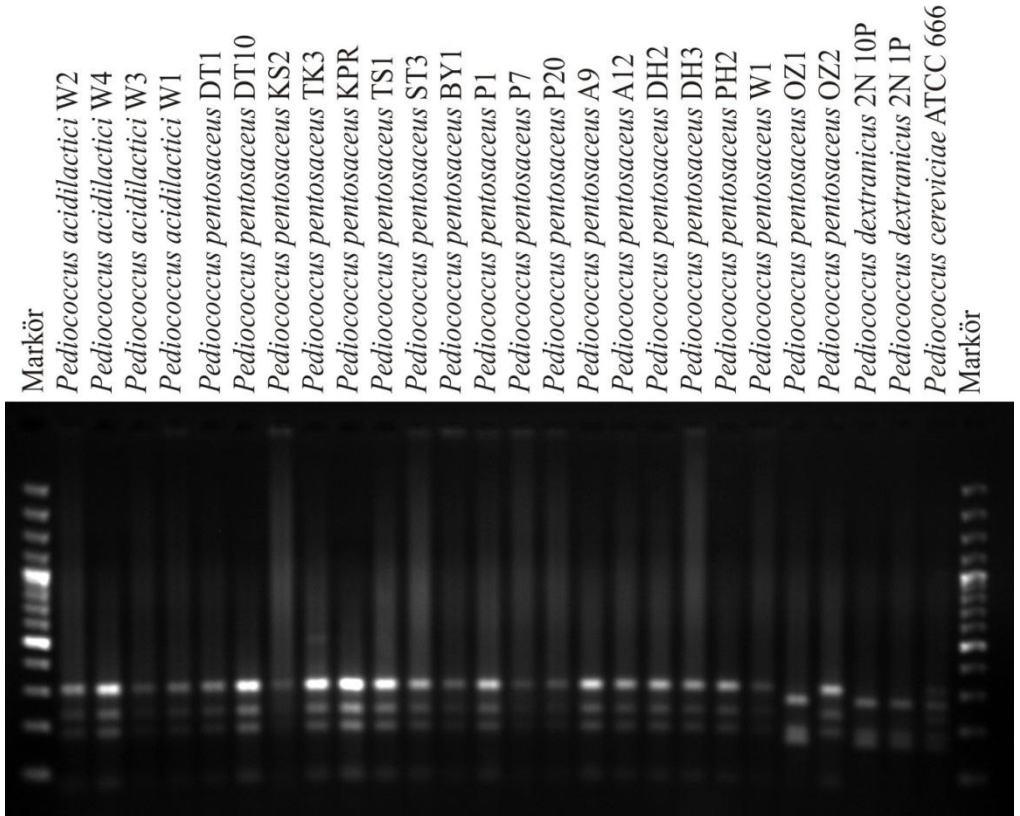
Şekil 4.18 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



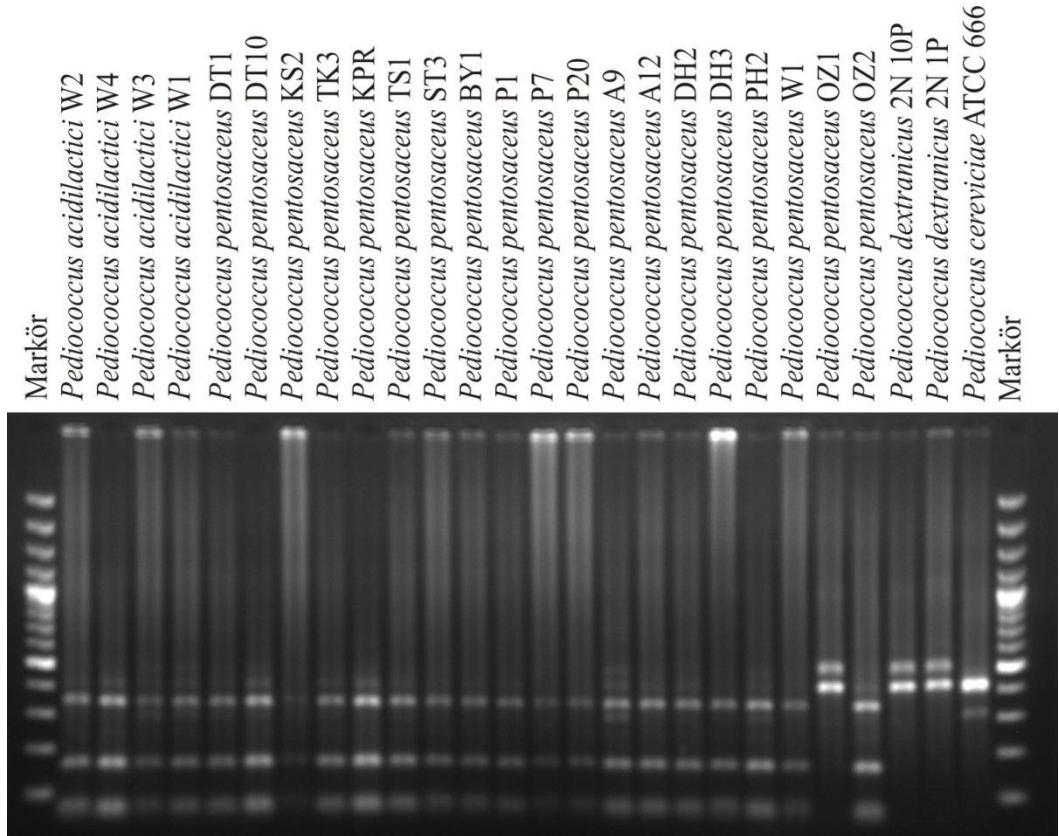
Şekil 4.19 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



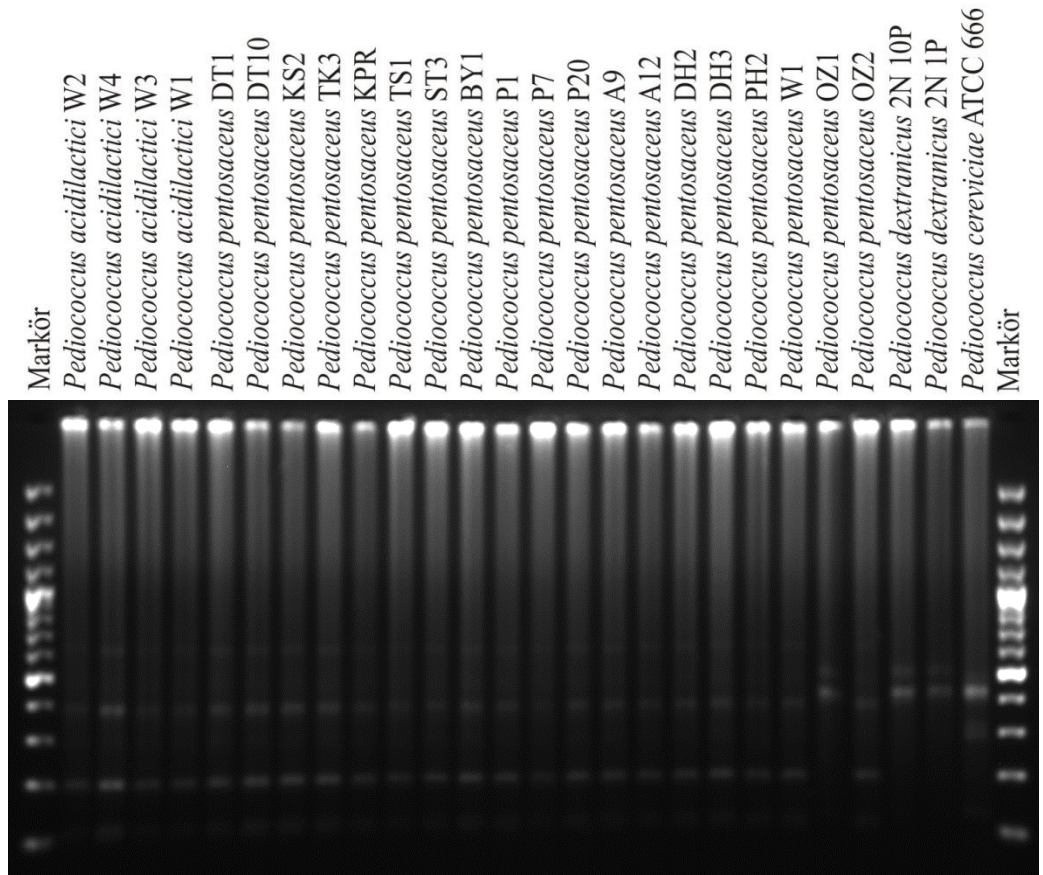
Şekil 4.20 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hinf*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



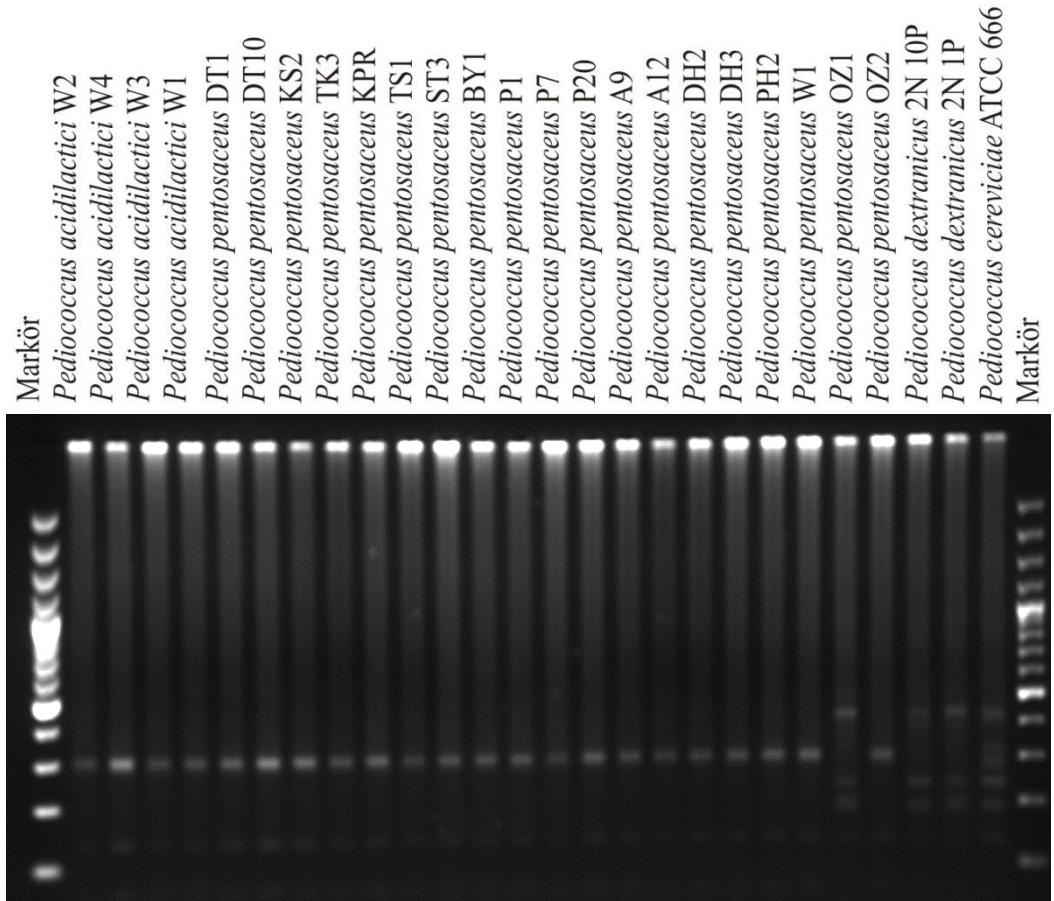
Şekil 4.21 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



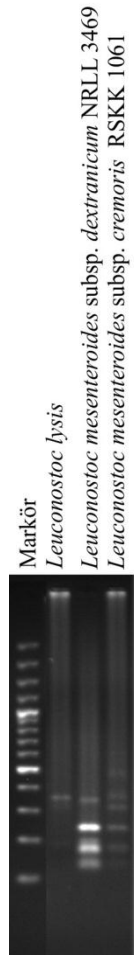
Şekil 4.22 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin VspI restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



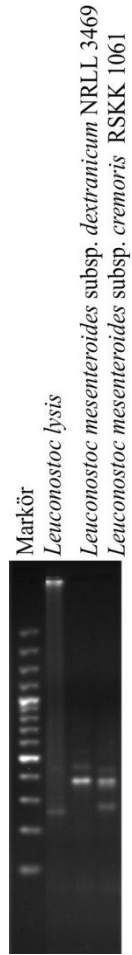
Şekil 4.23 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



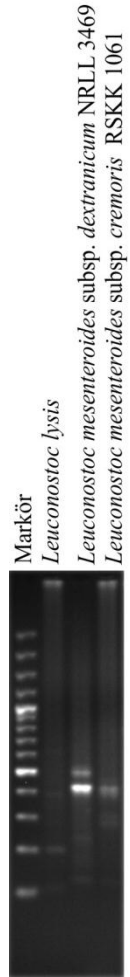
Şekil 4.24 *Pediococcus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



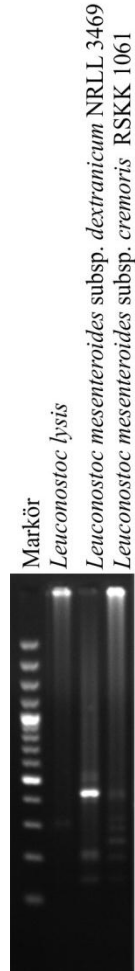
Şekil 4.25 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



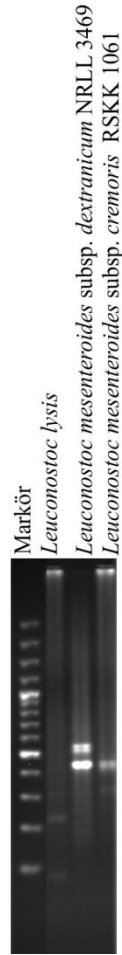
Şekil 4.26 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



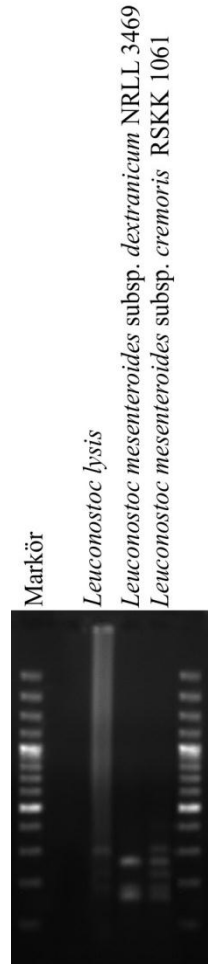
Şekil 4.27 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Dra*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



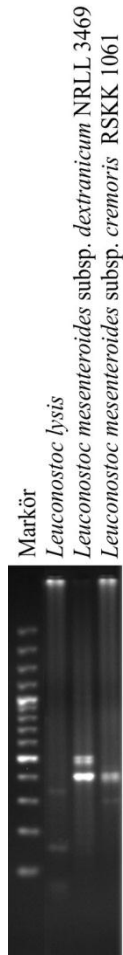
Şekil 4.28 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



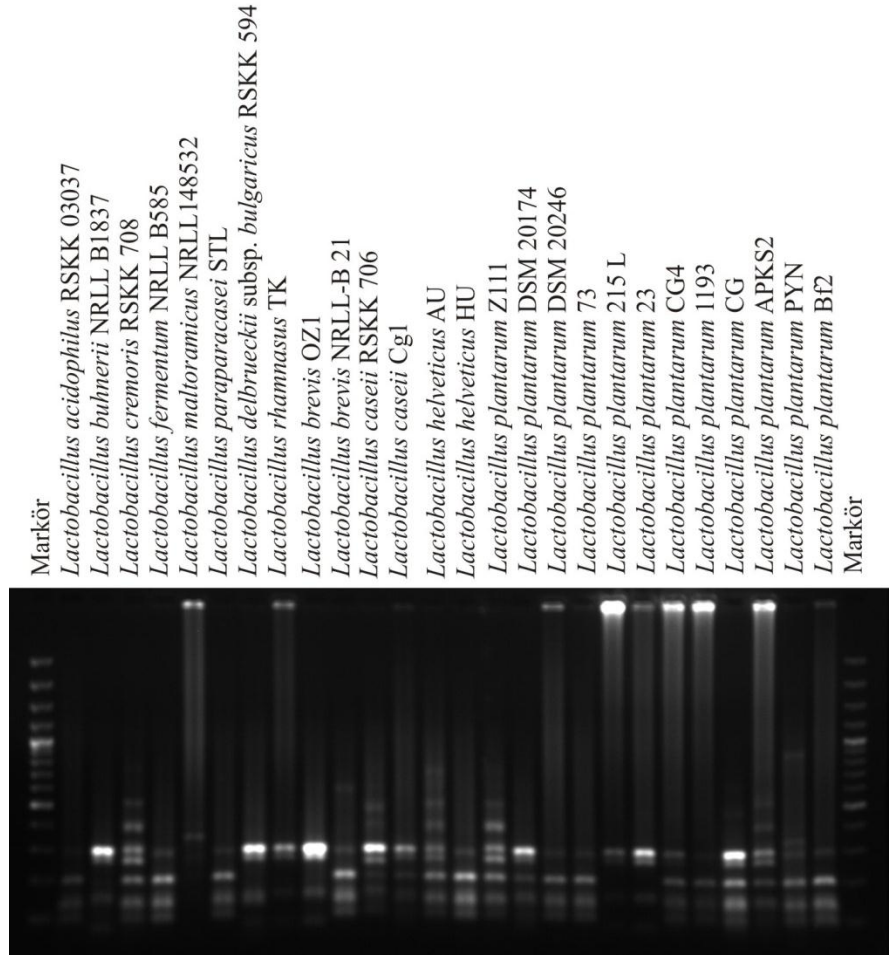
Şekil 4.29 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hinf*I restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



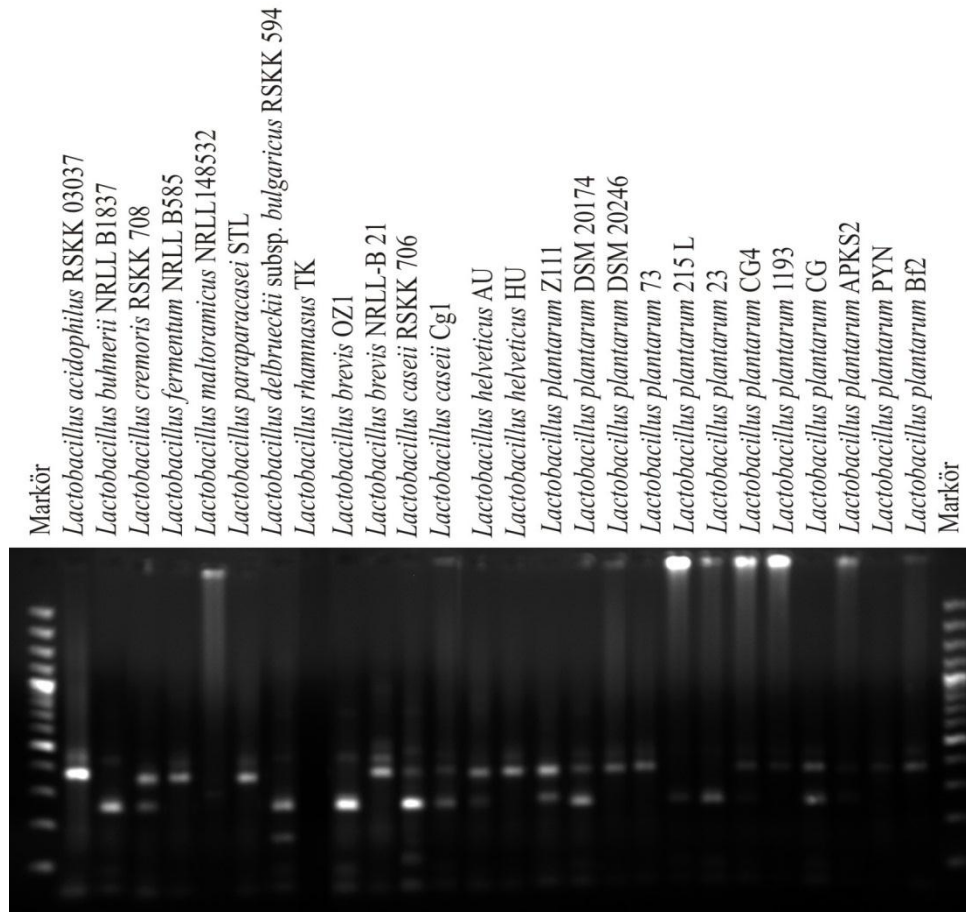
Şekil 4.30 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



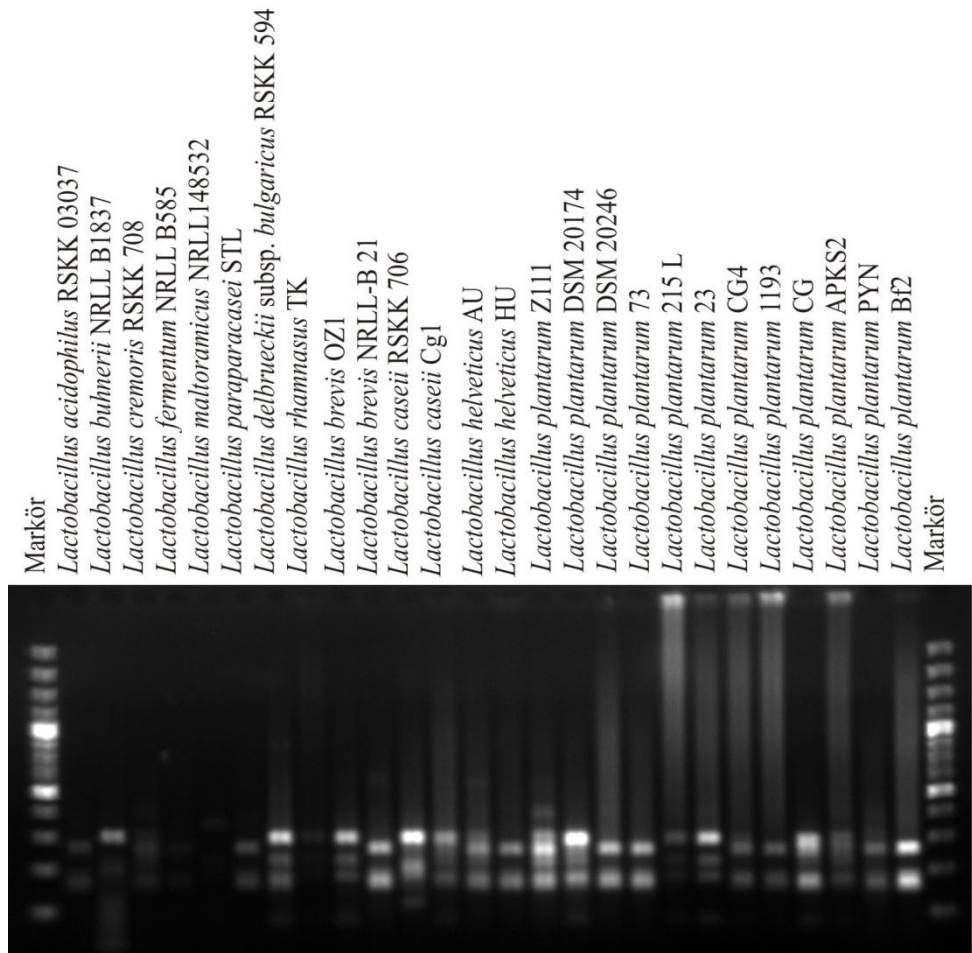
Şekil 4.31 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *VspI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



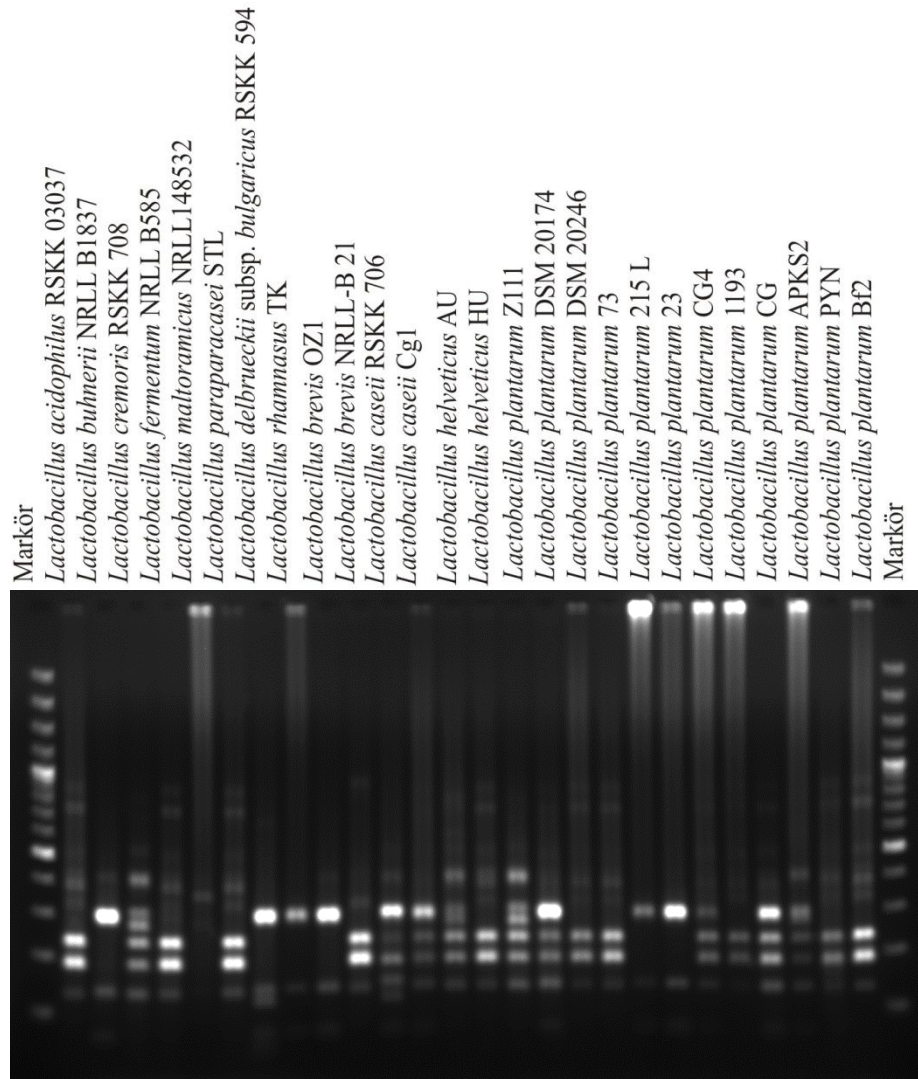
Şekil 4.32 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *AluI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.33 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *DdeI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



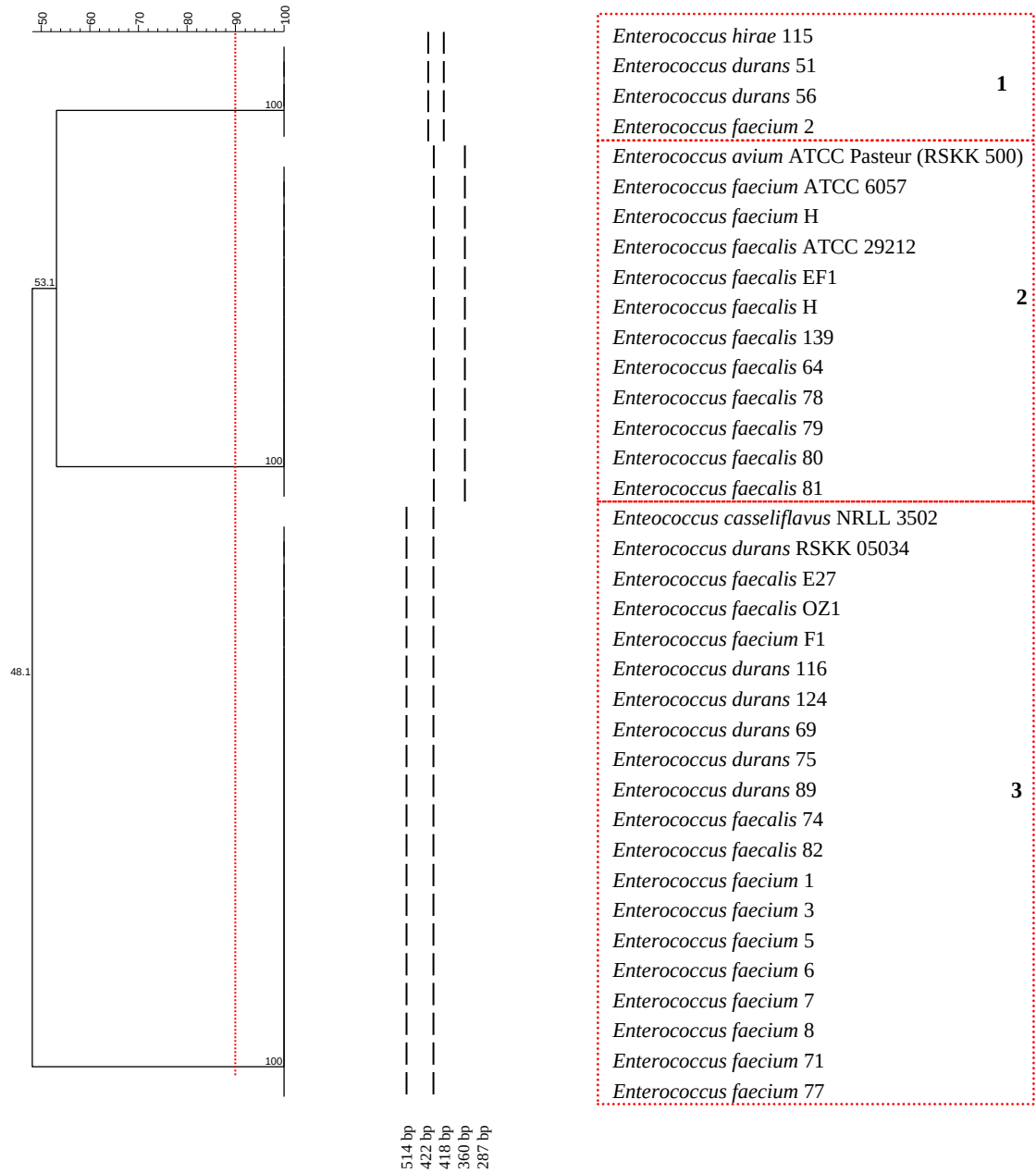
Şekil 4.34 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *TaqI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü



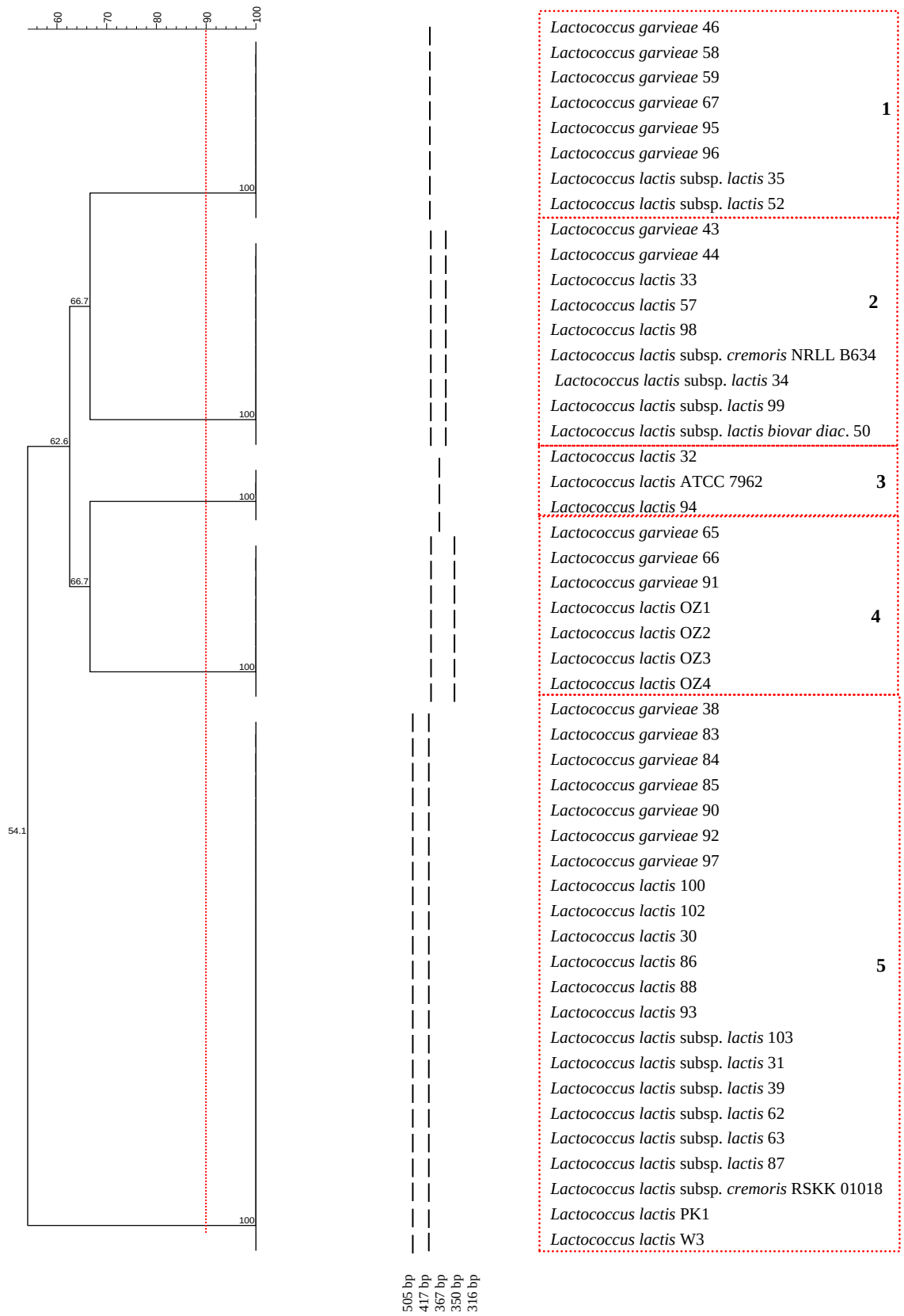
Şekil 4.35 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S-23S rDNA ISR PZR ürünlerinin *Hae*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucunda oluşan bantların % 1.5 agaroz jel görüntüsü

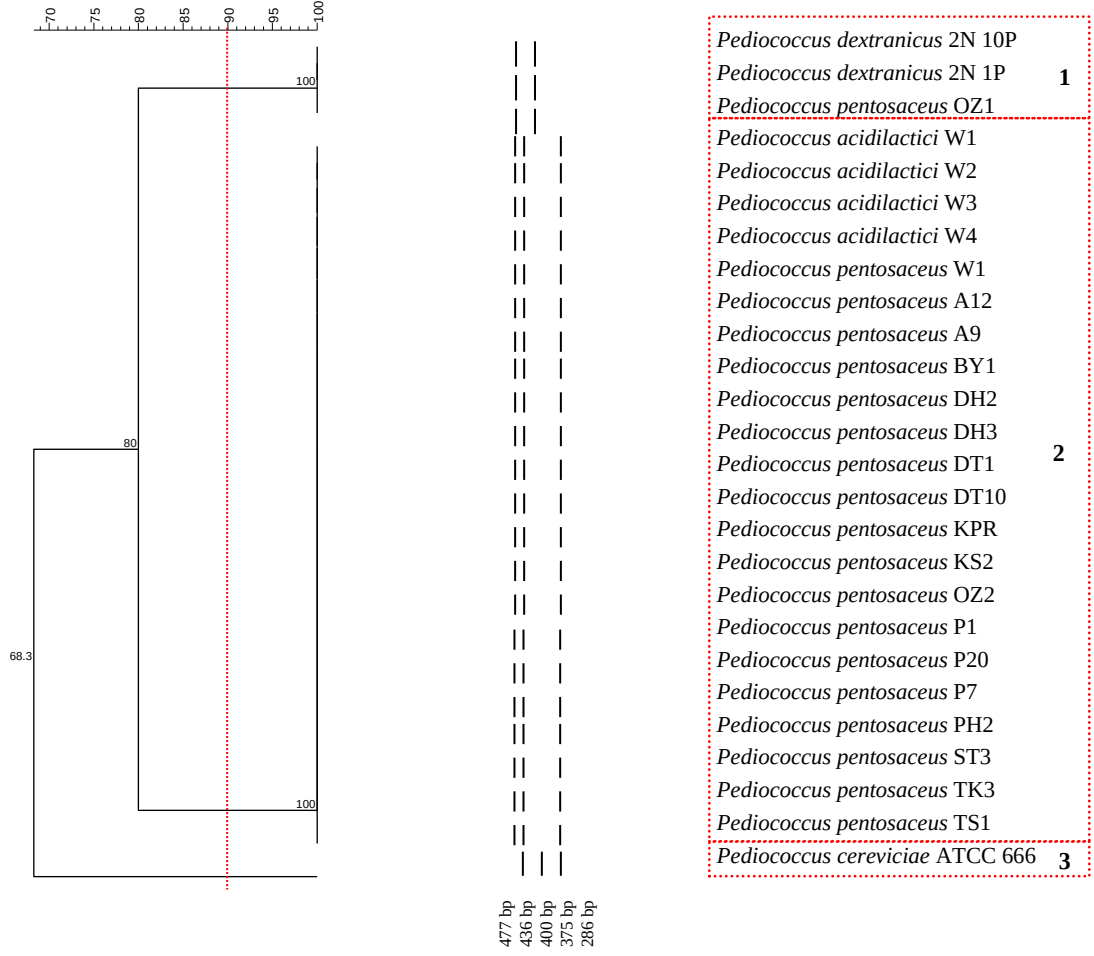
4.4 Dendogram İndekslerinin Oluşturulması

16S-23S rDNA ISR PZR ve RFLP uygulamaları neticesinde elde edilen bantlar arasındaki benzerlik ise “Dice product moment correlation coefficient” değeri (r) ile ifade edilip % değeriine dönüştürülmüştür. UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile gruplandırma işlemleri yapılarak neticede tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik ayrı ayrı dendogramlar olarak gösterilmiştir (Şekil 4.36-4.70).

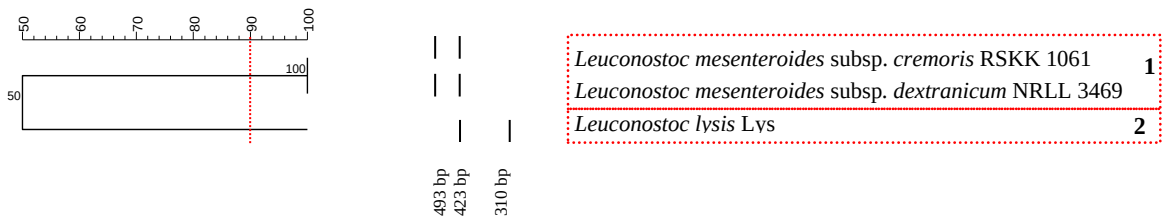


Şekil 4.36 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram

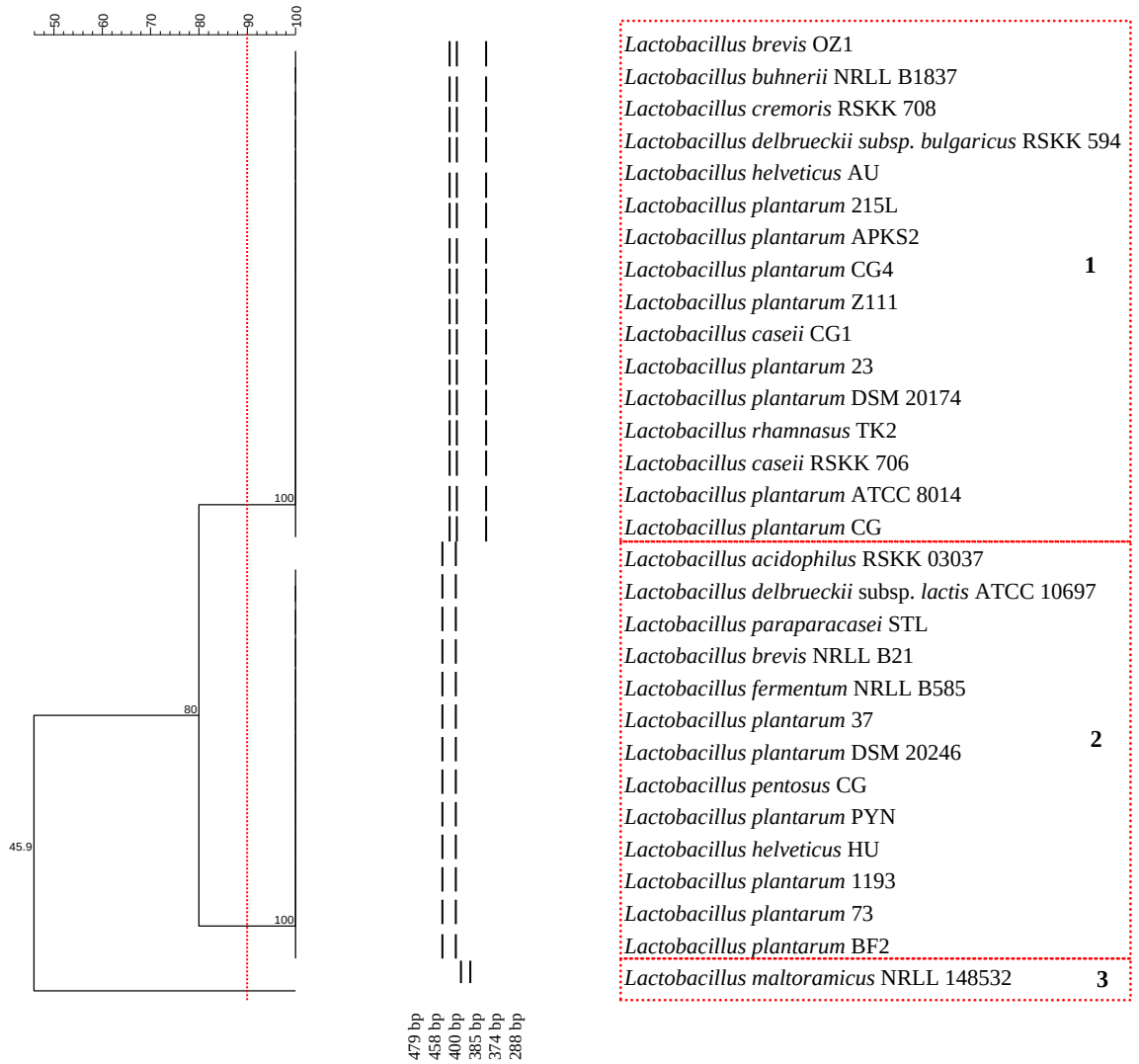




Şekil 4.38 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram

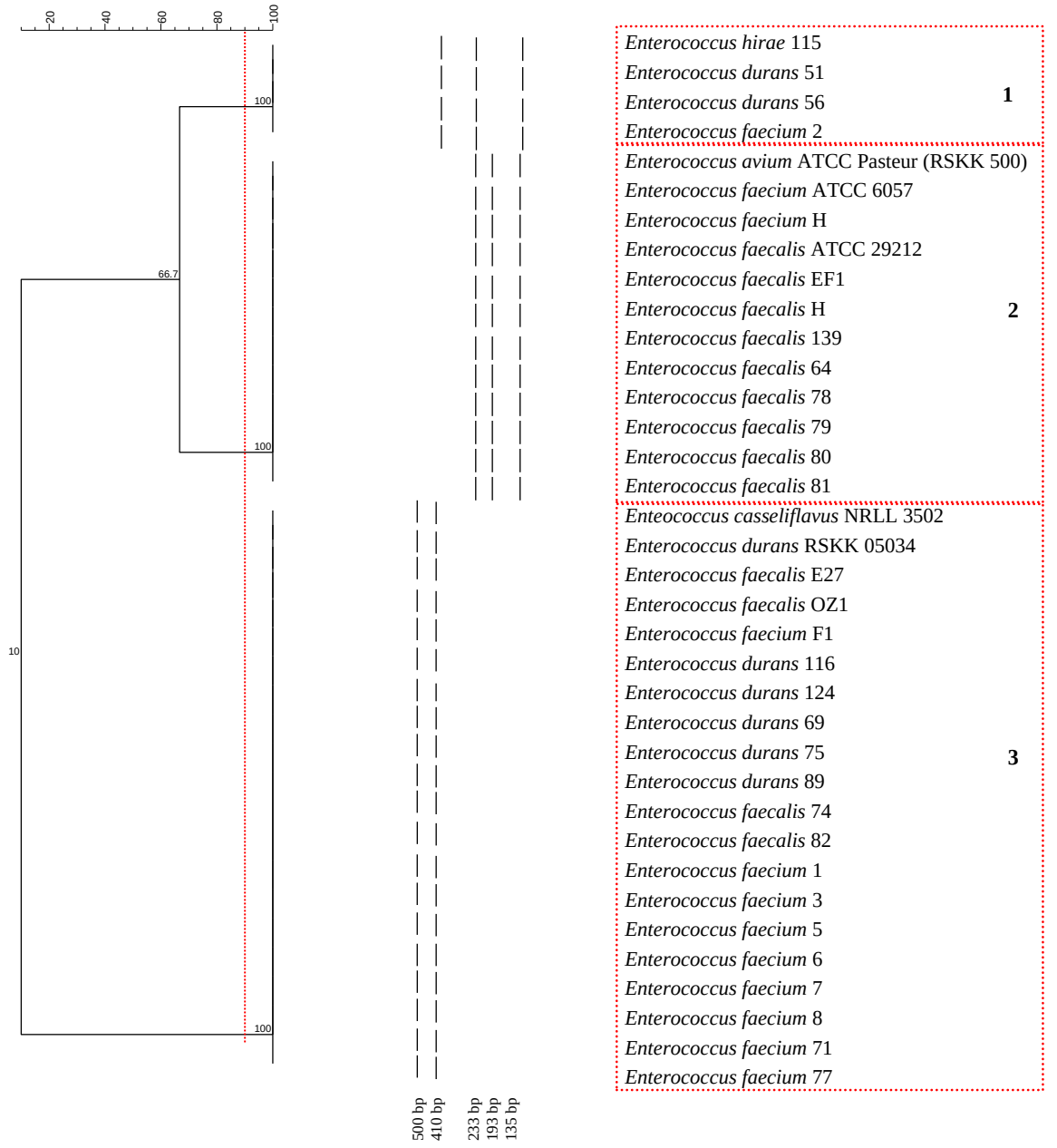


Şekil 4.39 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendrogram

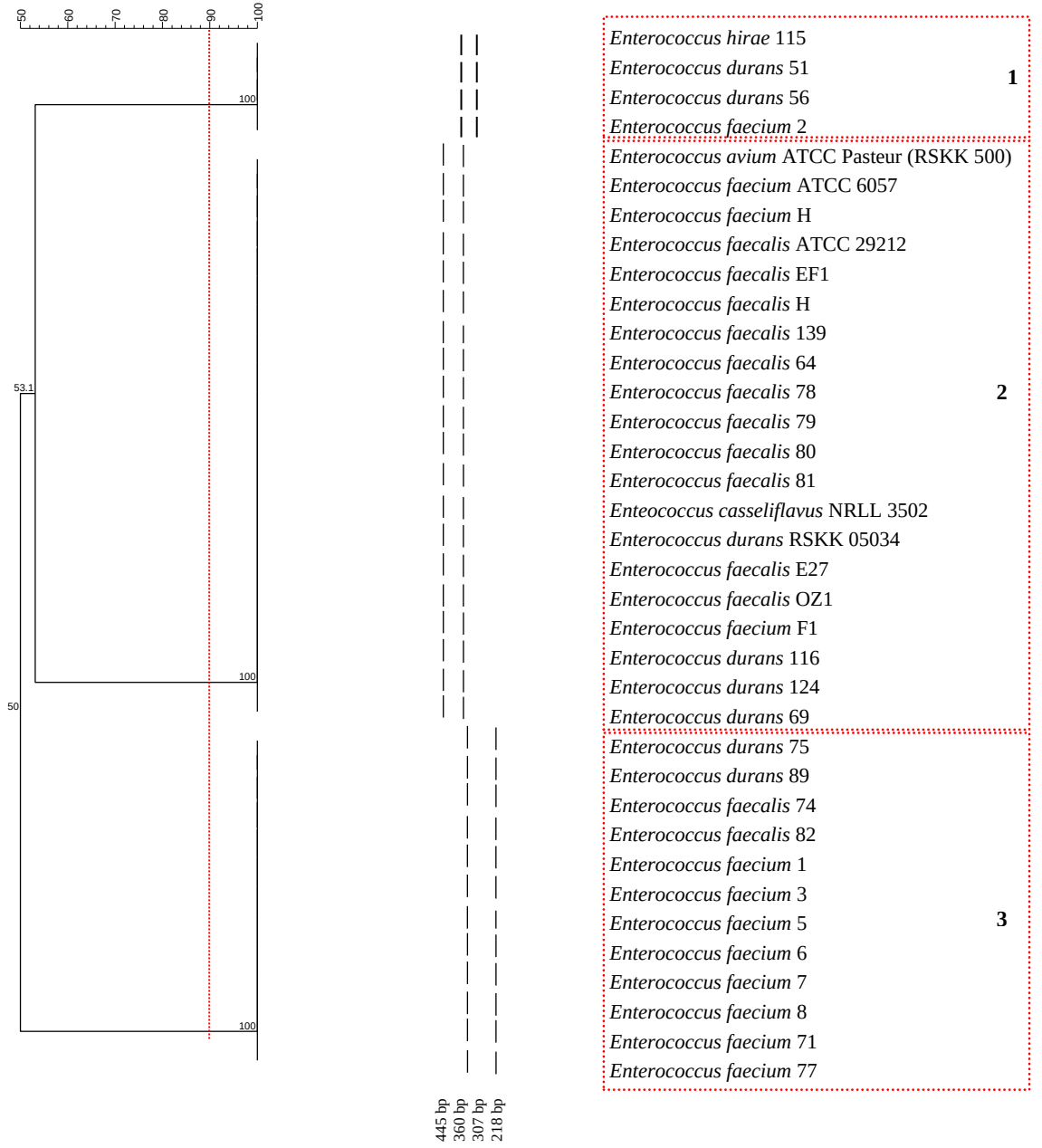


Şekil 4.40 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendrogram

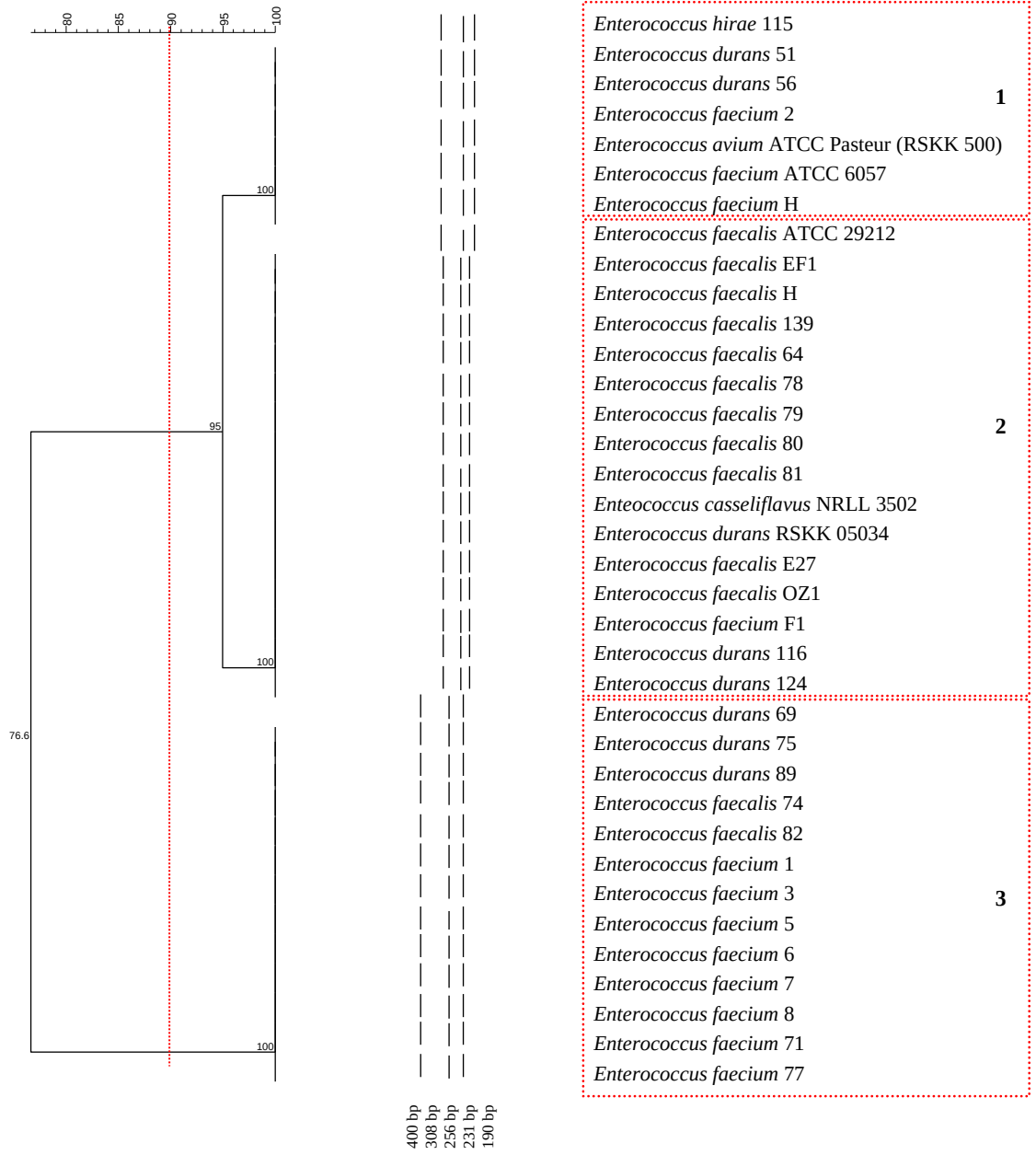
Şekil 4.41 16S-23S ISR PZR paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 144 adet suşaya ait dendogram



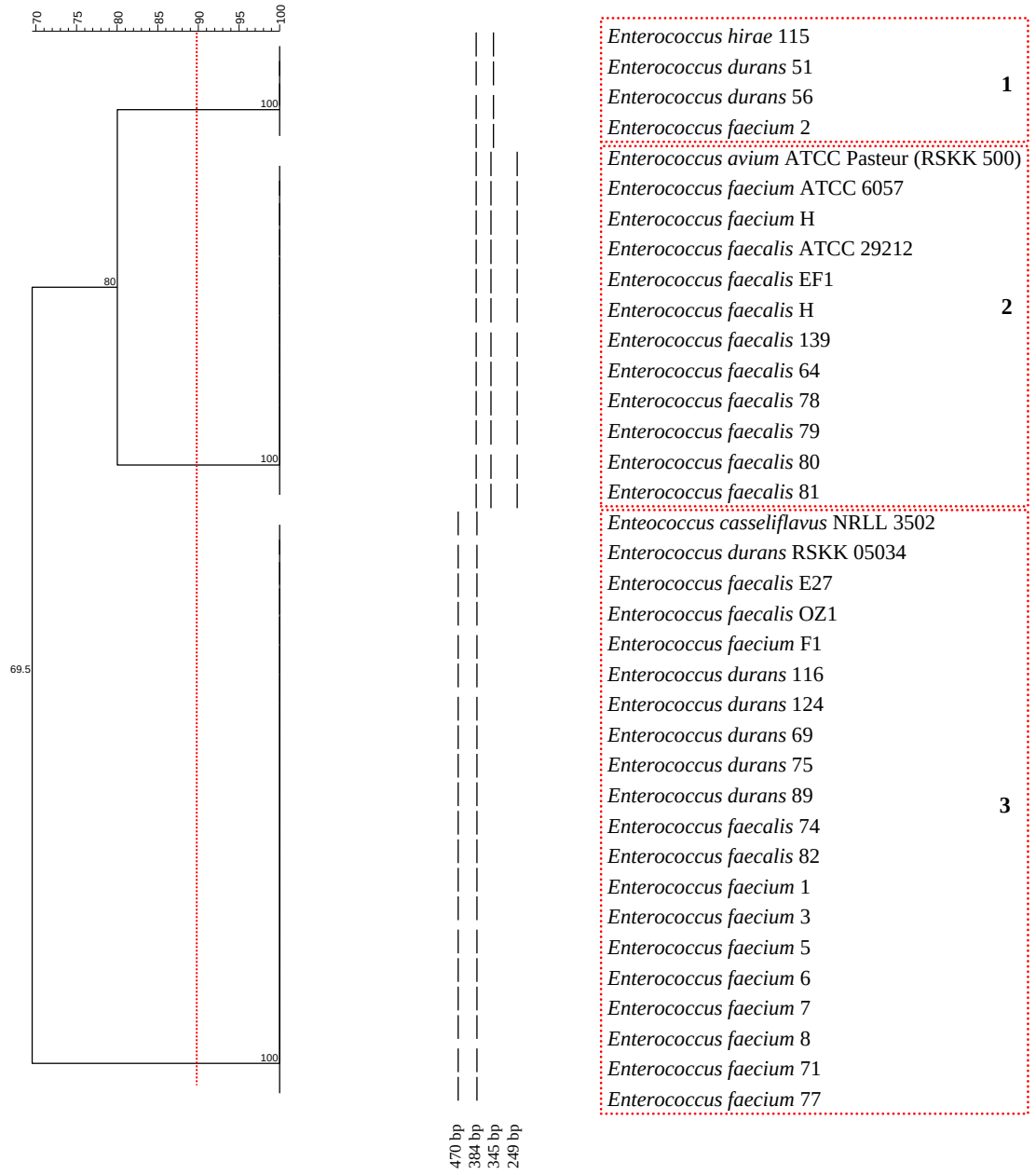
Şekil 4.44 *Hinf*I enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram



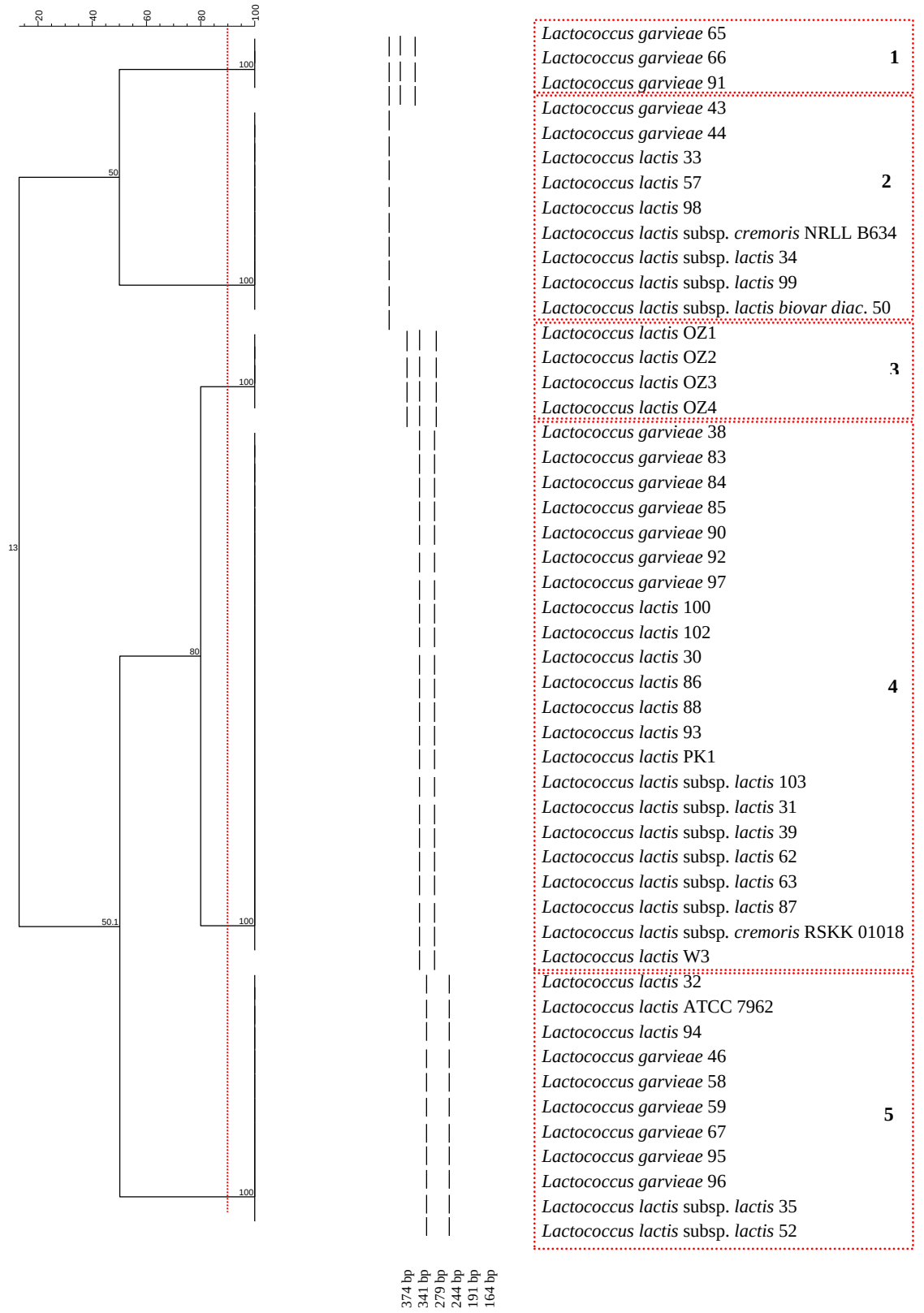
Şekil 4.45 *SspI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendogram



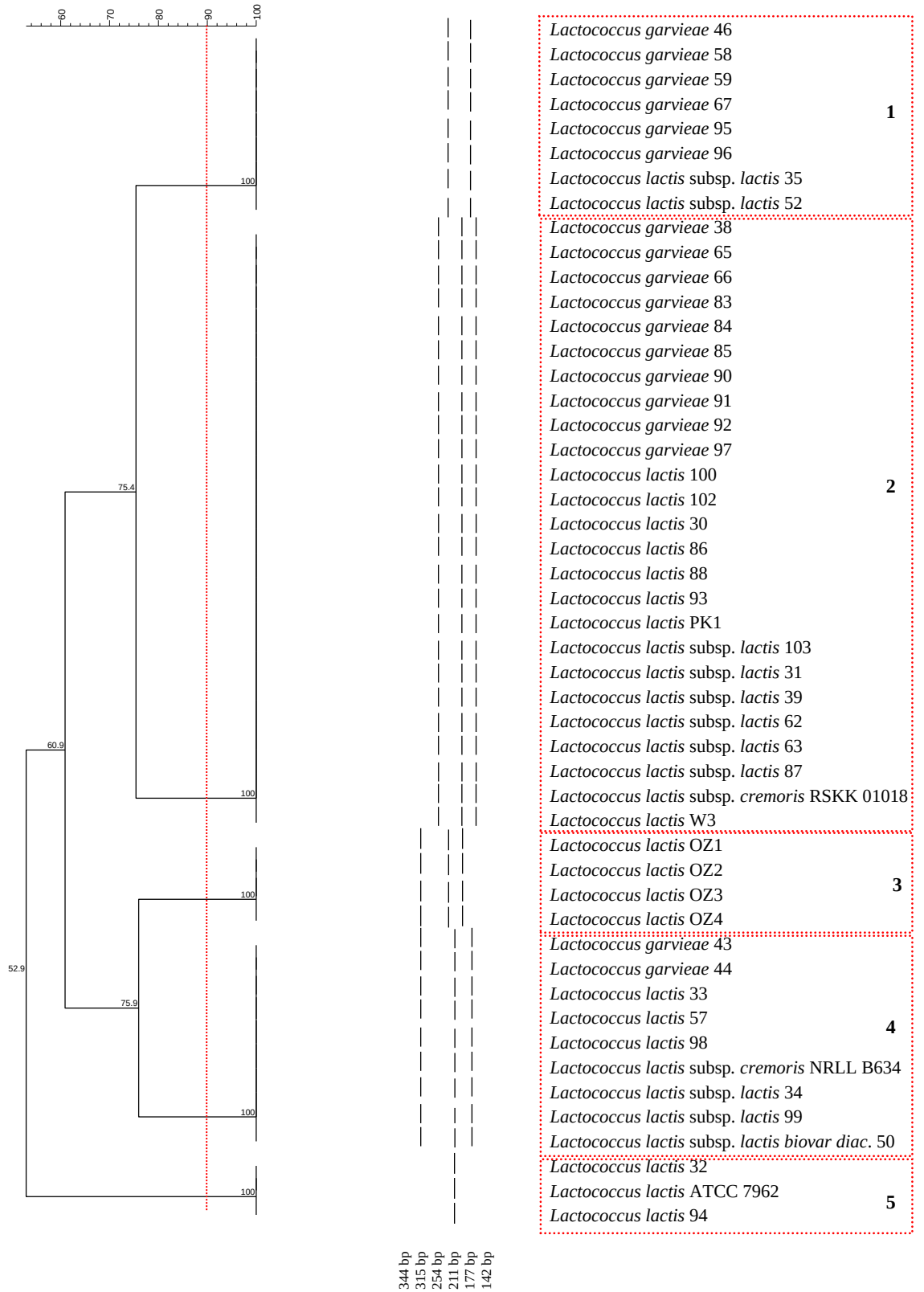
Şekil 4.46 *TaqI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram



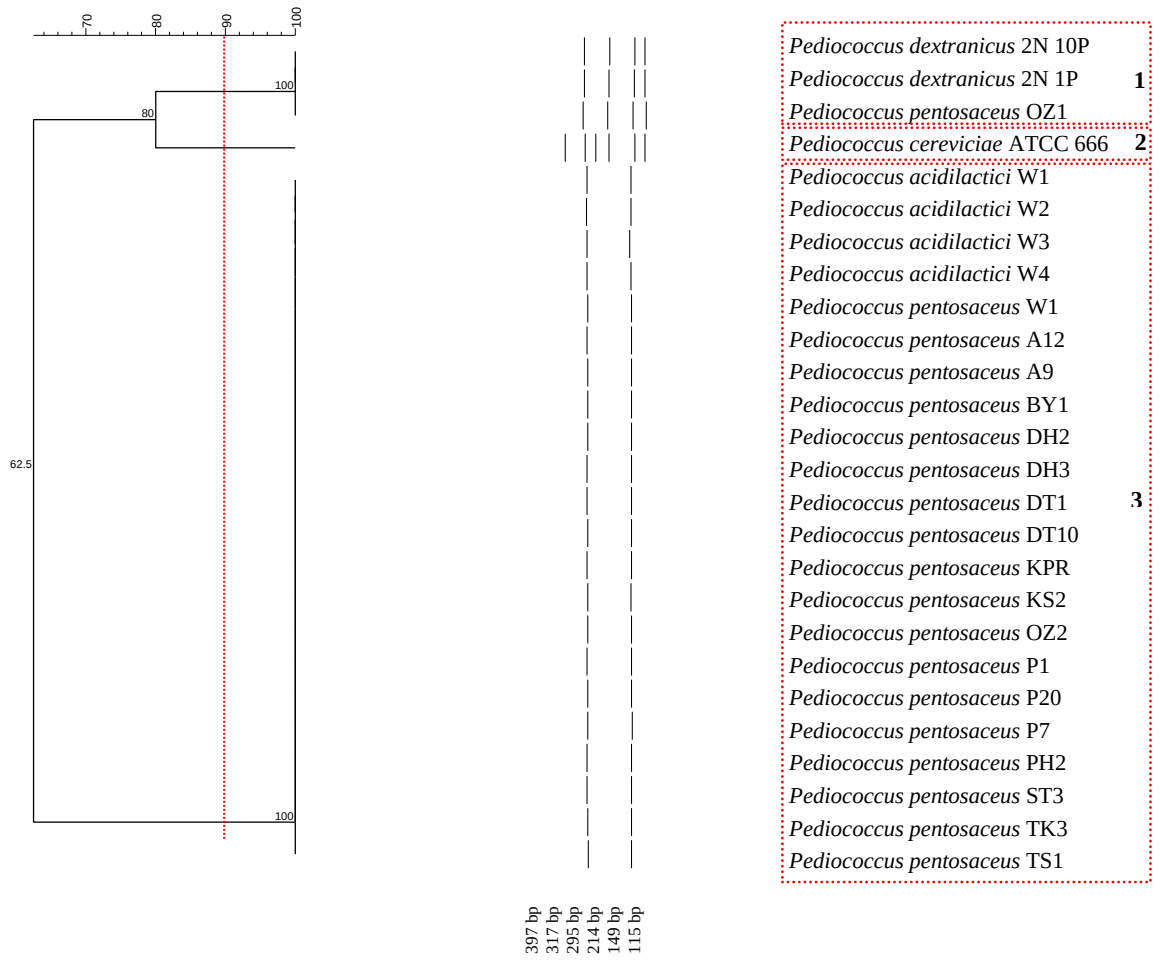
Şekil 4.47 *DdeI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram



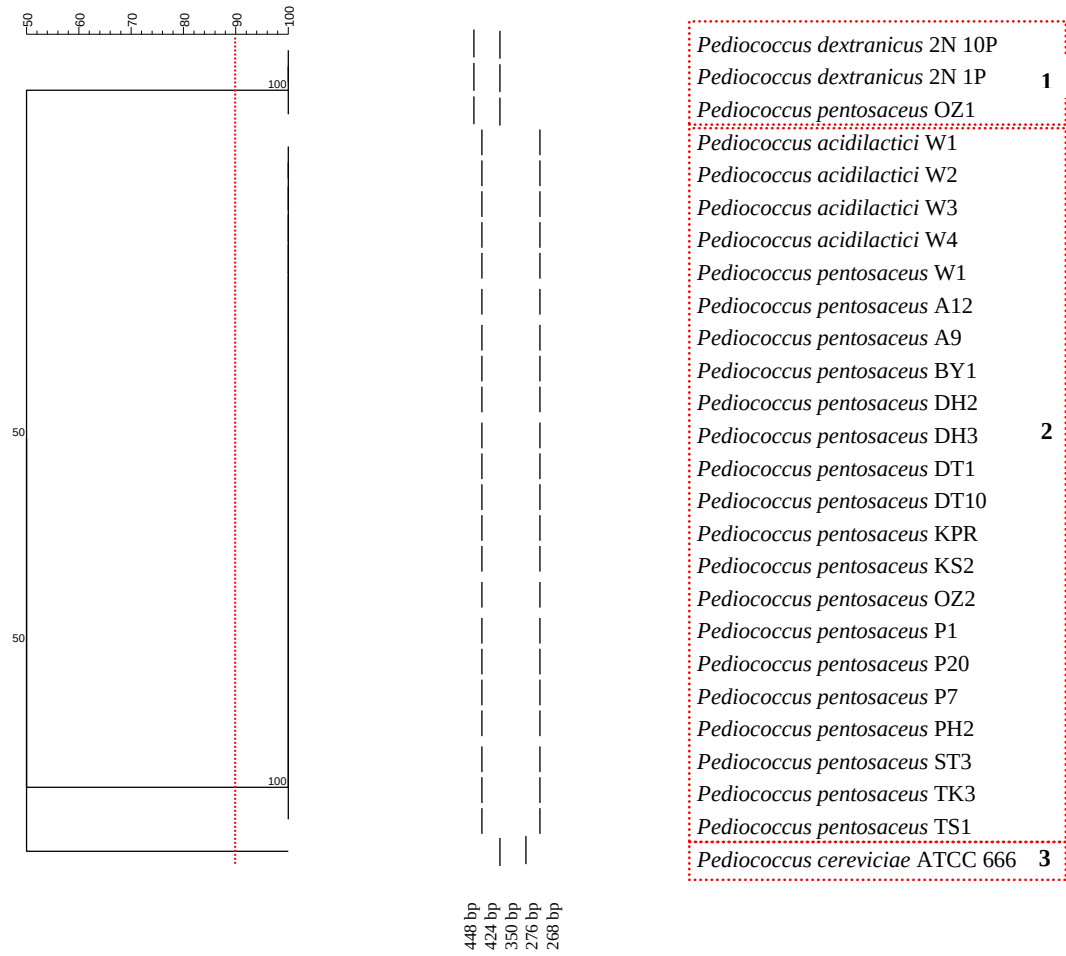
Şekil 4.50 *Hae*III enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 49 adet *Lactococcus* suşuna ait dendrogram



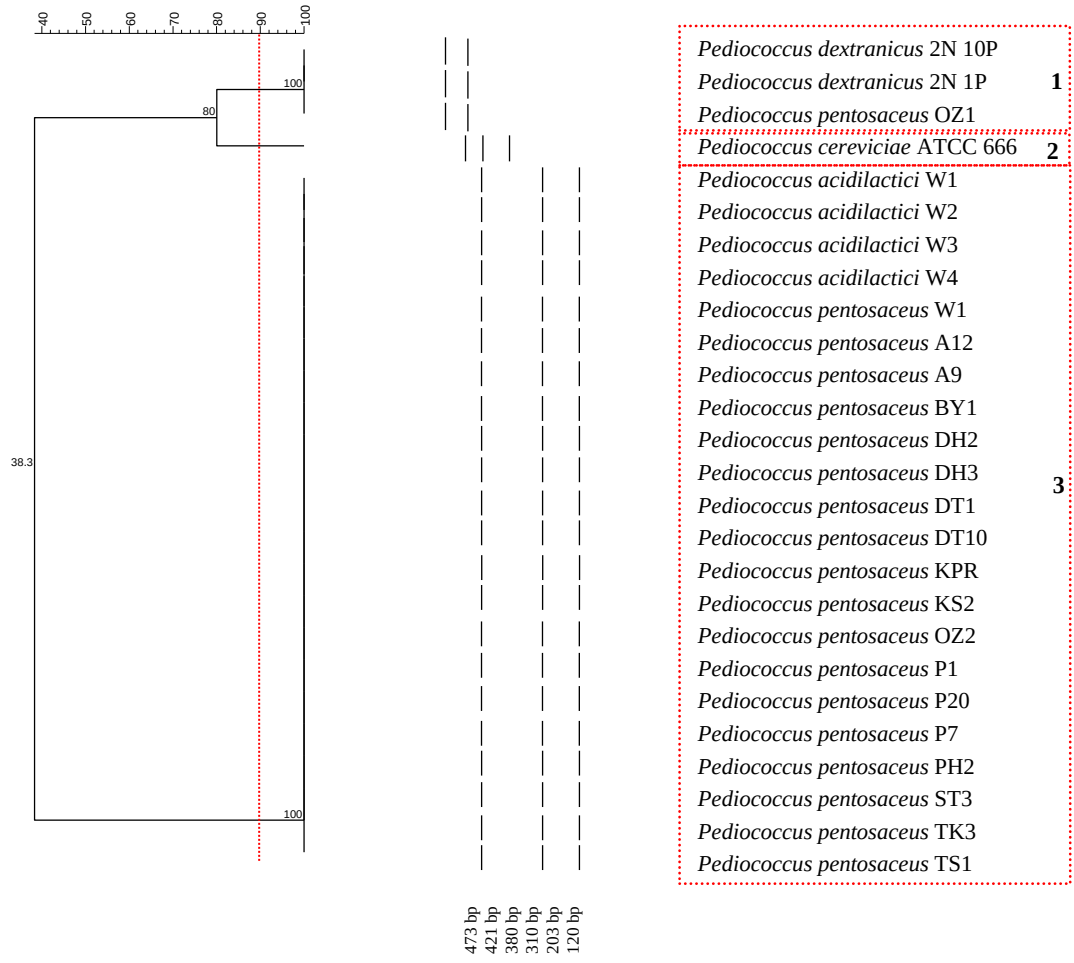
Şekil 4.52 *TaqI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 49 adet *Lactococcus* suşuna ait dendrogram



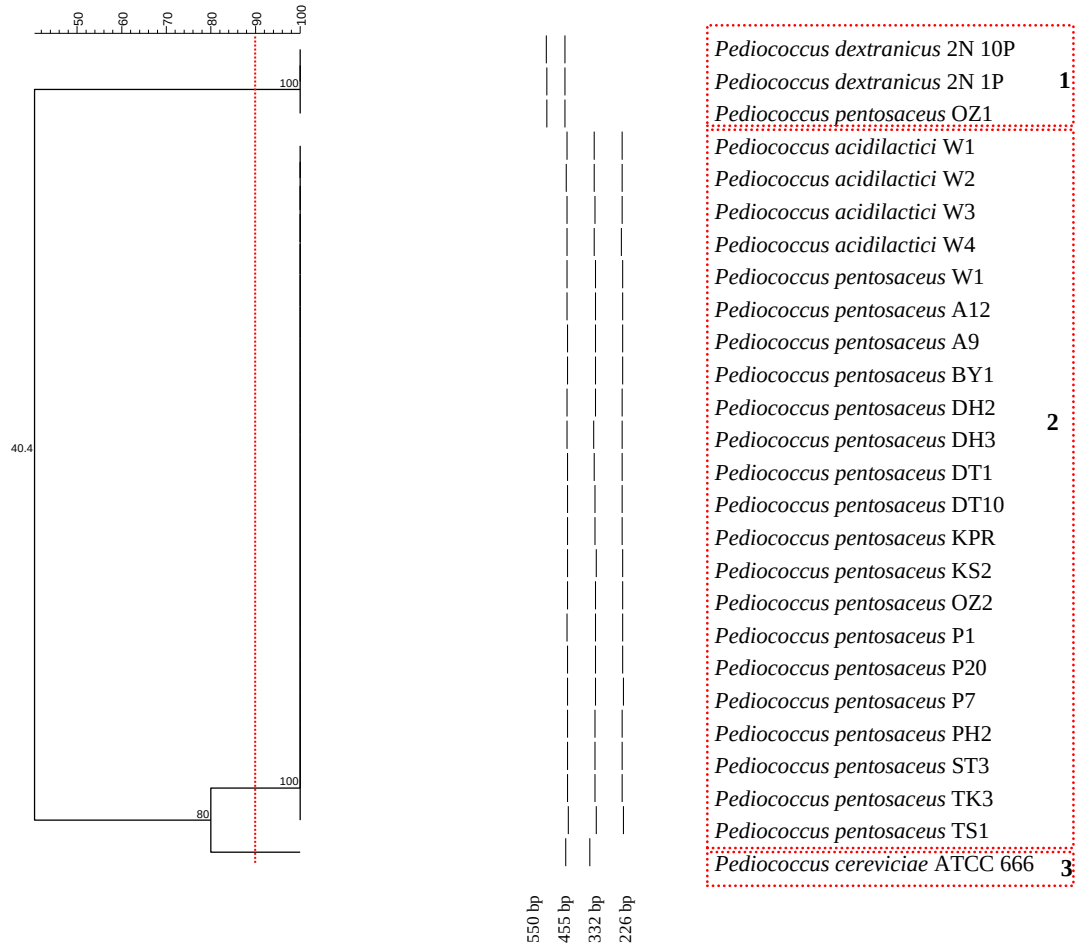
Şekil 4.53 *AluI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram



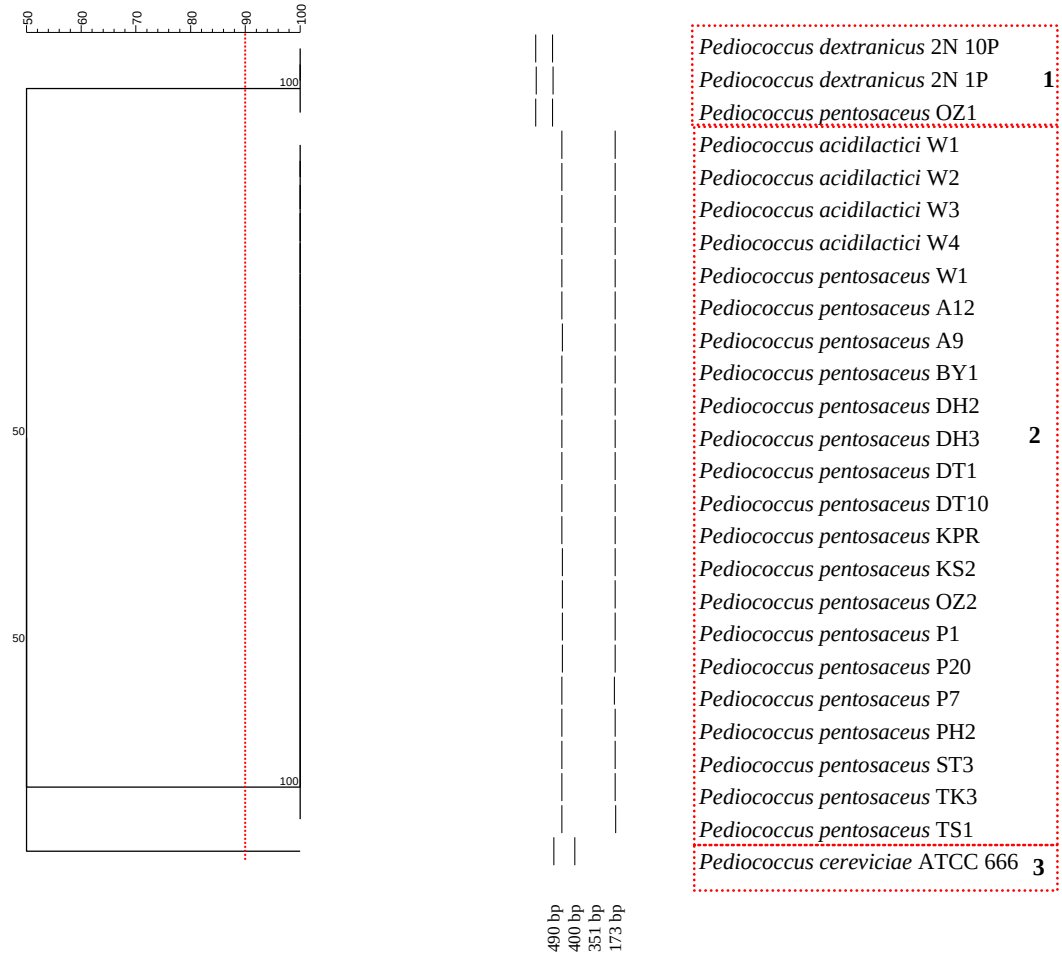
Şekil 4.54 *DdeI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram



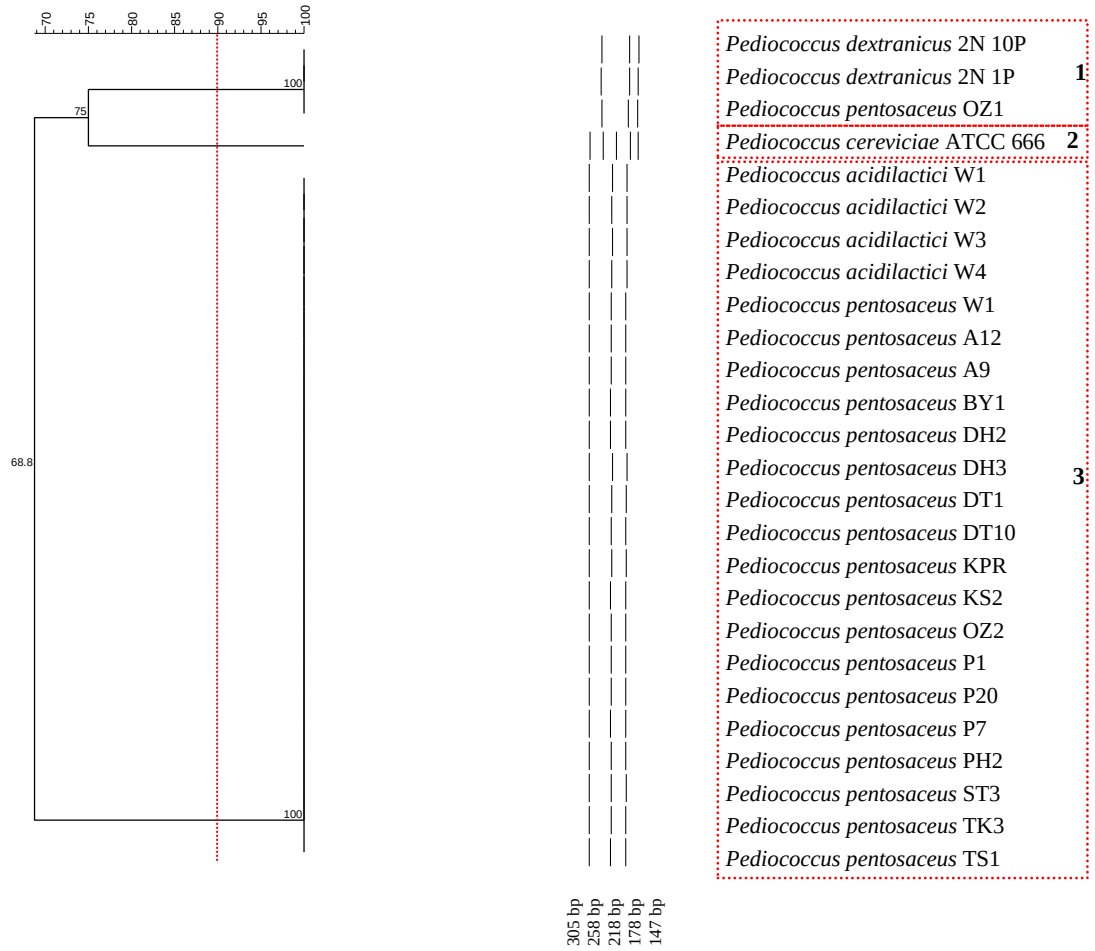
Şekil 4.55 *DraI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram



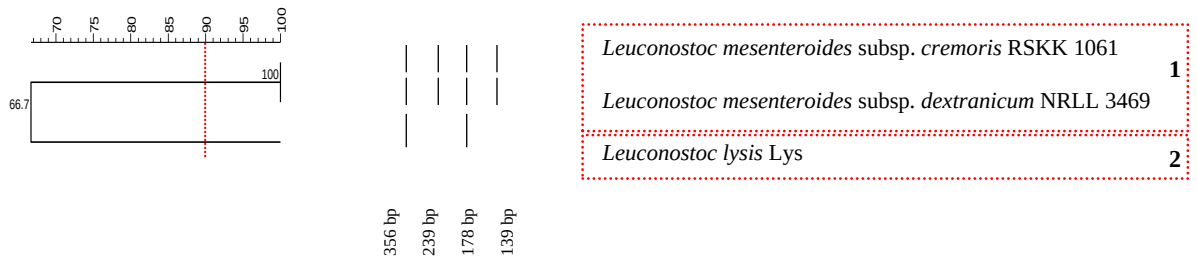
Şekil 4.57 *Hinf*I enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram



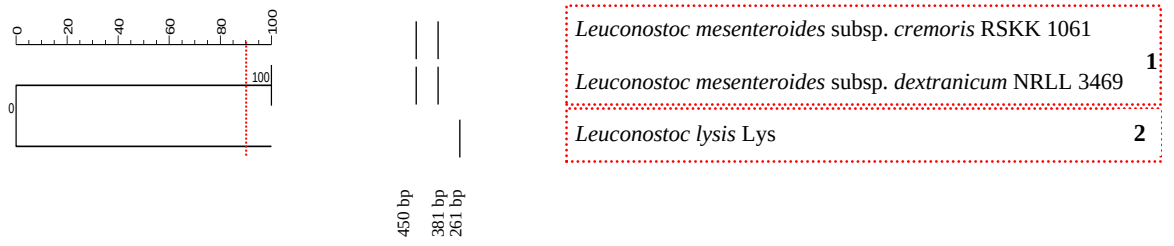
Şekil 4.58 *VspI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram



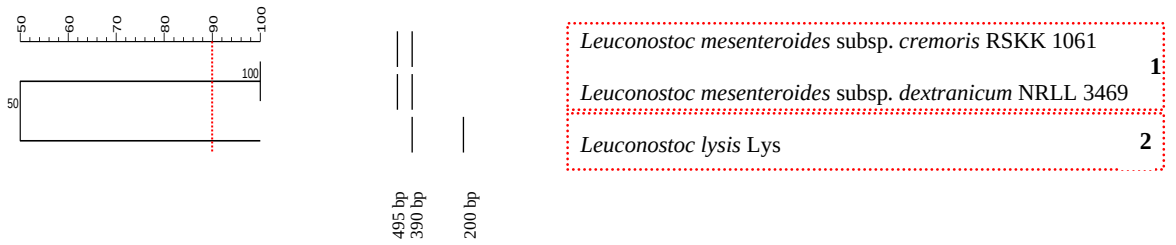
Şekil 4.59 *TaqI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram



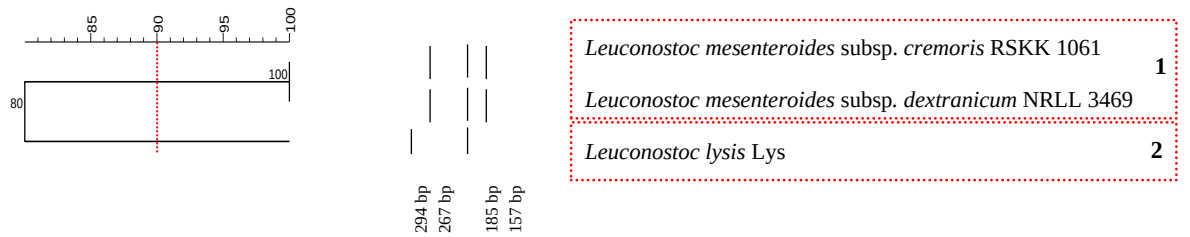
Şekil 4.60 *AluI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendrogram



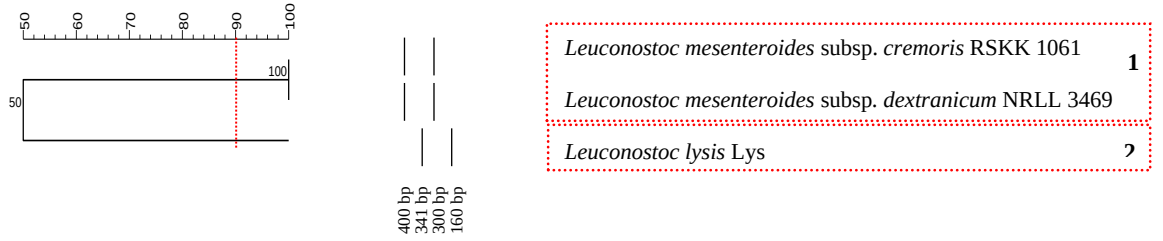
Şekil 4.61 *DdeI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendogram



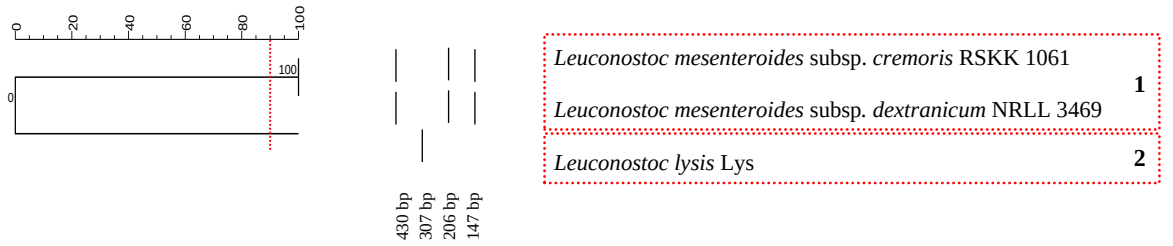
Şekil 4.62 *DraI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendogram



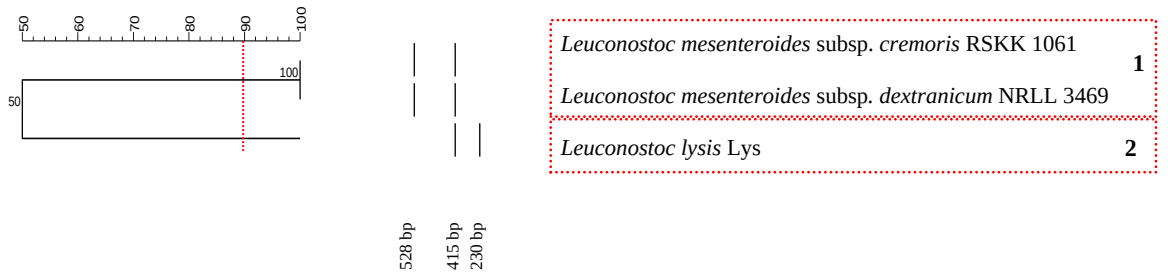
Şekil 4.63 *TaqI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendogram



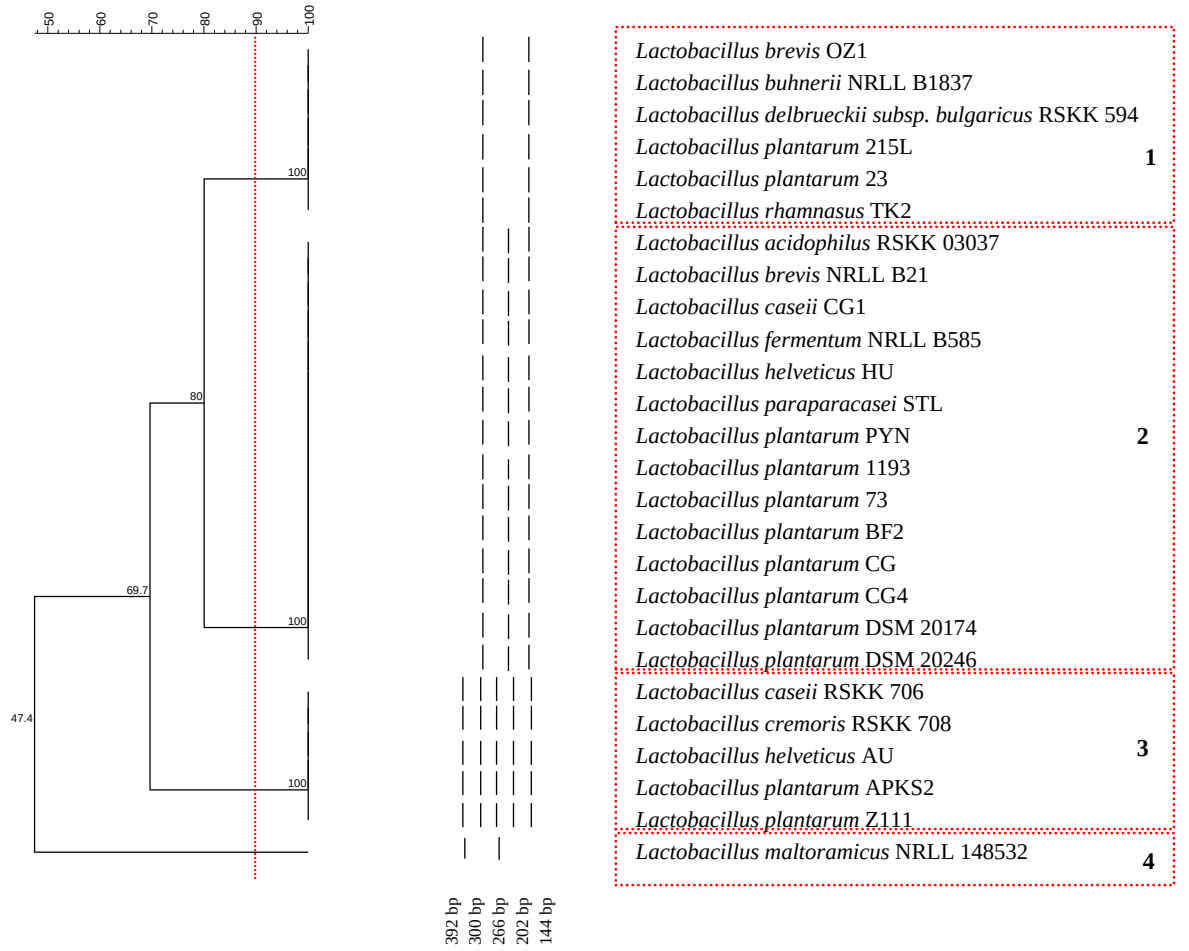
Şekil 4.64 *VspI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendrogram



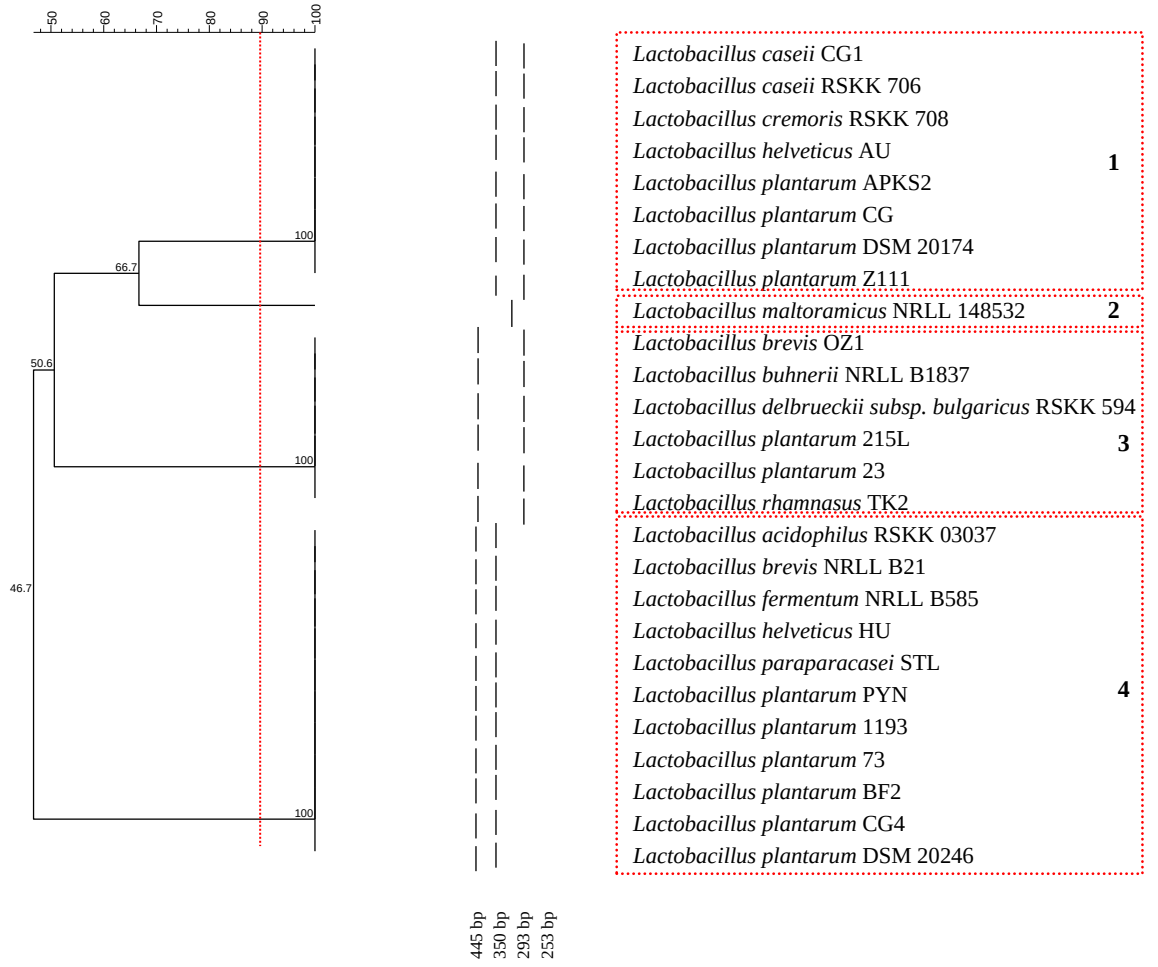
Şekil 4.65 *HaeIII* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendrogram



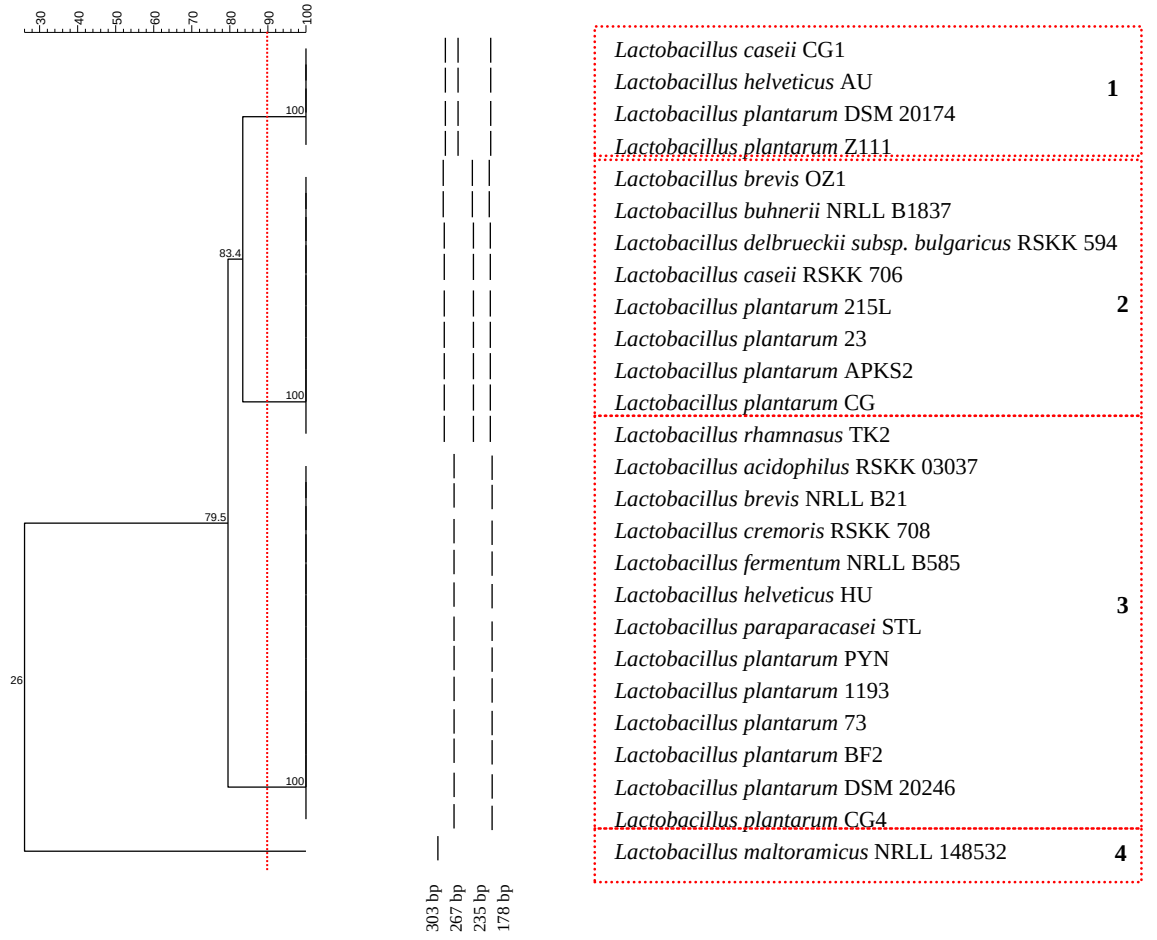
Şekil 4.66 *HinfI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 3 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendrogram



Şekil 4.67 *AluI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendrogram



Şekil 4.68 *DdeI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendrogram



Şekil 4.70 *TaqI* enzim kesimi ile oluşan 16S-23S ISR PZR-RFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 26 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendrogram

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Laktik asit bakterilerinin endüstriyel uygulamalarında, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir metotların uygulanması oldukça önemlidir. Son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan yöntemler olarak değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda, A.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür koleksiyonumuzda farklı fenotipik ve biyokimyasal testler ile cins düzeyinde API CHL50 tanımlama test kit kullanımı ile de tür/alttür düzeyinde tanımlanması önceden yapılmış olan gıda kökenli Laktik Asit Bakterilerinden 5 cins içeren 36 adet *Enterococcus*, 51 adet *Lactococcus*, 26 adet *Pediococcus*, 3 adet *Leuconostoc* ve 30 adet *Lactobacillus* olmak üzere toplam 144 adet suş kullanılmıştır. LAB suşları arasındaki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi için çalışmamızda laktik asit bakterilerine ait önce 144 adet suşun tür, özellikle suş düzeyinde ayrımına ve/veya tiplendirilmesine yönelik olan moleküler tekniklerden 16S-23S rDNA ISR PZR, *Lactococcus lactis* W2 ve *Lactococcus lactis* W3 suşlarından görüntü elde edilememesi nedeni ile 142 adet suş üzerinde RFLP yöntemi kullanılarak bu yöntem değerlendirilmiştir.

Çalışmada kullanılan LAB grubuna ait toplam 144 adet suştan PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile kromozomal DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromozomal DNA ISR-PZR çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

5 farklı cinse ait 144 adet suşun elde edilen kromozomal DNA 'ları, **G1 5' GAAGTCGTAACAAGG 3'** ve **L1 5' CAAGGCATCCACCGT 3'** primer çifti kullanılarak PZR teknolojisi ile çoğaltılmış ve 16S-23S rDNA ISR bölgesi elde edilmiştir.

Çalışmada *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *SspI*, *DraI*, *VspI* ve *TaqI*, restriksiyon enzimleri beş farklı genusa ait birer örnekle denenmiştir. Bunların arasından cins bazında kesim noktasına sahip olan enzimler kullanılmıştır. *Enterococcus* cinsi için *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*,

HinfI, *SspI* ve *TaqI* olmak üzere 7 enzim, *Lactococcus* cinsi için *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI* ve *TaqI* olmak üzere 5 enzim, *Pediococcus* cinsi için *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *DraI*, *VspI* ve *TaqI* olmak üzere 7 enzim, *Leuconostoc* cinsi için *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *DraI*, *VspI* ve *TaqI* olmak üzere 7 enzim ve *Lactobacillus* cinsi için *AluI*, *DdeI*, *HaeIII* ve *TaqI* olmak üzere 4 enzim kullanılmıştır. Toplam 142 suşun hepsinde ISR bölgeleri kesimi için ortak olarak *AluI*, *DdeI*, *HaeIII* ve *TaqI* restriksiyon enzimleri kullanılmıştır.

Restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin % 1.5 agaroz jel üzerinde ayrılan ve EtBr ile boyama neticesinde gözlemlenebilen farklı uzunluklara sahip bant patternleri GelComparII, Version 4.1 (Applied Math) bilgisayar yazılım programına aktarılmıştır.

16S rDNA-23S rDNA ISR PZR-RFLP bantları arasındaki benzerlik “**Dice product moment correlation coefficient**” değeri (r) ile ifade edilip % benzerlik değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile gruplandırma işlemi yapılarak neticede türler arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiş ve dendogram üzerinde grupları birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı % 90 olarak seçilmiş ve bu değere bağlı kalınarak gruplandırma yapılmıştır. Çalışmada kullanılan toplam 142 suş bu işlem sonrasında 11 grup altında toplanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* olmak üzere 5 farklı cinse ait 144 adet suşun amplifiye edilmiş 16S-23S rDNA ISR bölgelerinde oluşan bant paternleri ve 142 adet suşun *HinfI*, *AluI*, *HaeIII*, *VspI*, *TaqI*, *SspI*, *DraI* ve *DdeI* olmak üzere 8 farklı restriksiyon enzimi ile kesim neticesinde oluşan bant paternleri sonucu oluşturulan dendogramlar da korelasyon katsayısı %90 olarak belirlendiğinde ve tek tek incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar gözlemlenmektedir.

Enterococcus suşlarının 16S-23S ISR PZR paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %53.1, bu grupların 3. grup ile arasında %48.1 benzerlik

bulunmaktadır. 1. ve 3. gruplarda 418 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 422 ve 360 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta 418 ve 287 bp büyüklüğünde 2 bant ve 3. grupta 514 ve 418 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.36).

Lactococcus suşlarının 16S-23S ISR PZR paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 5 grupta toplanmıştır. 5 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %66.7, 3. ve 4. gruplar arasında %66.7, 1-2. ve 3-4. gruplar arasında %62.6 ve bu grupların 5. grup ile arasında %54.1 benzerlik bulunmaktadır. 1., 2. ve 5. gruplar arasında 505 bp, 4. ve 5. gruplar arasında 417 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 505 bp büyüklüğünde 1 bant, 2. grupta 505 ve 350 bp büyüklüğünde 2 bant, 3. grupta 367 bp büyüklüğünde 1 bant, 4. grupta 417 ve 316 bp büyüklüğünde 2 bant ve 5. grupta 505 ve 417 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.37).

Pediococcus suşlarının 16S-23S ISR PZR paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80 ve bu grupların 3. grup ile arasında %68.3 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 477 bp, 2. ve 3. gruplar arasında 286 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 477 ve 400 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta 477,436 ve 286 bp büyüklüğünde 3 bant ve 3. grupta 436, 375 ve 286 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.38).

Leuconostoc suşlarının 16S-23S ISR PZR paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 2 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 423 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 493 ve 423 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta 423 ve 310 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.39).

Lactobacillus suşlarının 16S-23S ISR PZR paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80 ve bu grupların 3. grup ile arasında %45.9 benzerlik bulunmaktadır. 1. grupta 458, 400 ve 288 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta 479 ve 400

bp büyüklüğünde 2 bant ve 3. grupta 385 ve 374 bp büyüklüğünde 2 bant bulunduran *Lactobacillus maltoramicus* NRLL 148532 suşu bulunmaktadır (Şekil 4.40).

Enterococcus, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* cinslerinin toplu ISR-PZR paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 11 grup altında toplanmıştır (Şekil 4.41).

Enterococcus suşlarının *AluI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 2. ve 3. gruplar arasında %66.7 ve bu grupların 1. grup ile arasında %45.3 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 286 bp, 2. ve 3. gruplar arasında 317 ve 187 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Enterococcus durans* suşlarının ağırlıklı olduğu, 347 ve 286 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta *Enterococcus faecalis* suşlarının ağırlıklı olduğu, 317, 286 ve 187 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta *Enterococcus faecium* suşlarının ağırlıklı olduğu, 317, 187 ve 127 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.42).

Enterococcus suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %64.6 ve bu grupların 3. grup ile arasında %56.2 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 360 ve 317 bp, 1. ve 3. gruplar arasında 386 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Enterococcus durans* suşlarının ağırlıklı olduğu, 386, 360 ve 317 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta *Enterococcus faecalis* suşlarının ağırlıklı olduğu, 360, 317 ve 173 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta *Enterococcus faecium* suşlarının ağırlıklı olduğu, 386, 281 ve 254 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.43).

Enterococcus suşlarının *Hinfi* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %66.7 ve bu grupların 3. grup ile arasında %10 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 233 ve 135 bp, 1. ve 3. gruplar arasında 410 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta

Enterococcus durans suşlarının ağırlıklı olduğu, 410, 233 ve 135 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta *Enterococcus faecalis* suşlarının ağırlıklı olduğu, 233, 193 ve 135 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta *Enterococcus faecium* suşlarının ağırlıklı olduğu, 500 ve 410 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.44).

Enterococcus suşlarının *SspI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %53.1 ve bu grupların 3. grup ile arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. 1., 2. ve 3. gruplar arasında 360 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Enterococcus durans* suşlarının ağırlıklı olduğu, 360 ve 307 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta *Enterococcus faecalis* suşlarının ağırlıklı olduğu, 445 ve 360 bp büyüklüğünde 2 bant, 3. grupta *Enterococcus faecium* suşlarının ağırlıklı olduğu, 360 ve 218 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.45).

Enterococcus suşlarının *TaqI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %95 ve bu grupların 3. grup ile arasında %76.6 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 308 bp ve 1. ve 2. gruplar arasında 231 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Enterococcus durans* suşlarının ağırlıklı olduğu, 308, 231 ve 190 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta *Enterococcus faecalis* suşlarının ağırlıklı olduğu, 308, 256 ve 231 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta *Enterococcus faecium* suşlarının ağırlıklı olduğu, 400, 308 ve 256 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.46).

Enterococcus suşlarının *DdeI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80 ve bu grupların 3. grup ile arasında %69.5 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 384 bp ve 1. ve 2. gruplar arasında 345 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Enterococcus durans* suşlarının ağırlıklı olduğu, 384 ve 345 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta *Enterococcus faecalis* suşlarının ağırlıklı olduğu, 384, 345 ve 249 bp büyüklüğünde 3

bant, 3. grupta *Enterococcus faecium* suşlarının ağırlıklı olduğu, 470 ve 384 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.47).

Lactococcus suşlarının *AluI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 5 grupta toplanmıştır. 5 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %82.4, bu grupların 3. grup ile arasında %62.9, 4. grup ile arasında %47.8 ve 5. grup ile arasında %8.7 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 162 ve 122 bp, 1. ve 3. gruplar arasında 162 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 220, 162 ve 122 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta, 293, 162 ve 122 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta, 333, 293, 220 ve 162 bp büyüklüğünde 4 bant, 4. grupta, 220 bp büyüklüğünde 1 bant, 5. grupta, 392 ve 333 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.48).

Lactococcus suşlarının *DdeI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 5 grupta toplanmıştır. 5 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %66.7, bu grupların 3. grup ile arasında %46.7, 4. ve 5. gruplar arasında %67.7 ve 1., 2., 3. grup ile 4., 5. gruplar ile arasında %29.2 benzerlik bulunmaktadır. 1., 2., 3. ve 4. gruplar arasında 313 bp, 4. ve 5. gruplar arasında 370 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 313 bp büyüklüğünde 1 bant, 2. grupta, 438 ve 313 bp büyüklüğünde 2 bant, 3. grupta, 313 ve 250 bp büyüklüğünde 2 bant, 4. grupta, 370 ve 313 bp büyüklüğünde 2 bant, 5. grupta, 438 ve 370 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.49).

Lactococcus suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 5 grupta toplanmıştır. 5 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50, 3. ve 4. gruplar arasında %80, 3 ve 4. grup ile 5. grup arasında %50.1 ve ilk 2 grup ile son 3 grup arasında %13 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 374 bp, 1. ve 3. gruplar arasında 341 bp, 1., 3. ve 4. gruplar arasında 279 bp, 3. ve 4. gruplar arasında 191 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 374, 341 ve 279 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta, 374 bp büyüklüğünde 1 bant, 3. grupta, 341, 279 ve 191 bp büyüklüğünde 3

bant, 4. grupta, 279 ve 191 bp büyüklüğünde 2 bant, 5. grupta, 244 ve 164 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.50).

Lactococcus suşlarının *Hinf*I enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 5 grupta toplanmıştır. 5 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50, 3. ve 4. gruplar arasında %80, 3 ve 4. grup ile 5. grup arasında %69.3 ve ilk 2 grup ile son 3 grup arasında %19 benzerlik bulunmaktadır. 1., 2. ve 5. gruplar arasında 442 bp, 3., 4. ve 5. gruplar arasında 157 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 442 ve 372 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, 512 ve 442 bp büyüklüğünde 2 bant, 3. grupta, 287 ve 157 bp büyüklüğünde 2 bant, 4. grupta, 287, 212 ve 157 bp büyüklüğünde 3 bant, 5. grupta, 442, 287 ve 157 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.51).

Lactococcus suşlarının *Taq*I enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 5 grupta toplanmıştır. 5 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %75.4, 3. ve 4. gruplar arasında %75.9, 1., 2. ve 3., 4. gruplar arasında %60.9 ve bu gruplar ile 5. grup arasında %52.9 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 3. gruplar arasında 254 ve 177 bp, 2., 4. ve 5. gruplar arasında 211 bp, 3. ve 4. gruplar arasında 344 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 254 ve 177 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, 315, 211 ve 142 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta, 344, 254 ve 177 bp büyüklüğünde 3 bant, 4. grupta, 344, 211 ve 142 bp büyüklüğünde 3 bant, 5. grupta, 211 bp büyüklüğünde 1 bant bulunmaktadır (Şekil 4.52).

Pediococcus suşlarının *Alu*I enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80, ve bu gruplar ile 3. grup arasında %62.5 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 317 ve 149 bp, 1. ve 2. gruplar arasında 214 ve 115 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 317, 214, 149 ve 115 bp büyüklüğünde 4 bant, 2. grupta, *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşunun bulunduğu 397, 317, 295, 214, 149 ve 115 bp büyüklüğünde 6 bant ve 3. grupta, 317 ve 149 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.53).

Pediococcus suşlarının *DdeI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50, ve bu gruplar ile 3. grup arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 3. gruplar arasında 350 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Pediococcus dextranicus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 448 ve 350 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 424 ve 268 bp büyüklüğünde 2 bant ve 3. grupta, 350 ve 276 bp büyüklüğünde 2 bant bulunduran *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşu bulunmaktadır (Şekil 4.54).

Pediococcus suşlarının *DraI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80, ve bu gruplar ile 3. grup arasında %38.3 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 421 bp, 2. ve 3. gruplar arasında 380 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Pediococcus dextranicus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 473 ve 421 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, 421, 380 ve 310 bp büyüklüğünde 3 bant bulunduran *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşu ve 3. grupta, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 380, 203 ve 120 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.55).

Pediococcus suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %75, ve bu gruplar ile 3. grup arasında %37.1 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 2. gruplar arasında 421 bp, 2. ve 3. gruplar arasında 380 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Pediococcus dextranicus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 473 ve 421 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, 421, 380 ve 310 bp büyüklüğünde 3 bant bulunduran *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşu ve 3. grupta, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 380, 203 ve 120 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.56).

Pediococcus suşlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi

arasında %100 benzerlik gösterirken, 2. ve 3. gruplar arasında %80, ve bu gruplar ile 1. grup arasında %40.4 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 455 bp, 2. ve 3. gruplar arasında 332 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Pediococcus dextranicus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 550 ve 455 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ağırlıklı olduğu 455, 332 ve 226 bp büyüklüğünde 3 bant, ve 3. grupta, 455 ve 332 bp büyüklüğünde 2 bant bulunduran *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşu bulunmaktadır (Şekil 4.57).

Pediococcus suşlarının *VspI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1., 2. ve 3. gruplar arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 400 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Pediococcus dextranicus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 490 ve 400 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ağırlıklı olduğu 400 ve 173 bp büyüklüğünde 2 bant, ve 3. grupta, 400 ve 351 bp büyüklüğünde 2 bant bulunduran *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşu bulunmaktadır (Şekil 4.58).

Pediococcus suşlarının *TaqI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 3 grupta toplanmıştır. 3 grupta kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %75 ve bu gruplar ile 3. grup arasında %68.8 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 178 bp, 1. ve 2. gruplar arasında 258 ve 147 bp, 2. ve 3. gruplar arasında 305 ve 218 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Pediococcus dextranicus* suşlarının ağırlıklı olduğu, 258, 178 ve 147 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta, 305, 258, 218, 178 ve 147 bp büyüklüğünde 5 bant bulunduran *Pediococcus cereviciae* ATCC 666 suşu ve 3. grupta, *Pediococcus pentosaceus* suşlarının ağırlıklı olduğu 305, 218 ve 178 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.59).

Leuconostoc suşlarının *AluI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %66.7 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 356 ve 178 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1.

grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 356, 239, 178 ve 139 bp büyüklüğünde 4 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu 356 ve 178 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.60).

Leuconostoc suşlarının *DdeI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında benzerlik bulunmamaktadır. 1. grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 450 ve 381 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu 261 bp büyüklüğünde tek bant bulunmaktadır (Şekil 4.61).

Leuconostoc suşlarının *DraI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 390 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 495 ve 390 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu, 390 ve 200 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.62).

Leuconostoc suşlarının *TaqI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 185 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 267, 185 ve 157 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu, 294 ve 185 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.63).

Leuconostoc suşlarının *VspI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. 1. grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 400 ve 300

bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu, 341 ve 160 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.64).

Leuconostoc suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında benzerlik bulunmamaktadır. 1. grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 430, 206 ve 147 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu, 307 bp büyüklüğünde 1 bant bulunmaktadır (Şekil 4.65).

Leuconostoc suşlarının *HinfI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 2 grupta toplanmıştır. 1. grup kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %50 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 415 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının bulunduğu, 528 ve 415 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta, *Leuconostoc lysis* Lys suşunun bulunduğu, 415 ve 230 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.66).

Lactobacillus suşlarının *AluI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 4 grupta toplanmıştır. Tüm gruplar kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %80, bu grupların 3. grup ile arasında %69.7, tüm grupların 4. grup ile arasında %47.4 benzerlik bulunmaktadır. Tüm gruplarda 300 ve 144 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 300 ve 444 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta 300, 202 ve 144 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta 392, 300, 266, 202 ve 144 bp büyüklüğünde 5 bant, 4. grupta 392 ve 266 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.67).

Lactobacillus suşlarının *DdeI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 4 grupta toplanmıştır. Tüm gruplar kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %66.7, bu grupların 3. grup ile arasında %50.6, tüm grupların 4. grup ile arasında %46.7 benzerlik bulunmaktadır. 1. ve 3. gruplarda 253 bp, 1. ve 4. gruplarda 350 bp, 3. ve 4. gruplarda

445 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 350 ve 253 bp büyüklüğünde 2 bant, 2. grupta 293 bp büyüklüğünde 1 bant, 3. grupta 445 ve 253 bp büyüklüğünde 2 bant, 4. grupta 445 ve 350 bp büyüklüğünde 2 bant bulunmaktadır (Şekil 4.68).

Lactobacillus suşlarının *HaeIII* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 4 grupta toplanmıştır. Tüm gruplar kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %85.7, bu grupların 3. grup ile arasında %74.1, tüm grupların 4. grup ile arasında %20.7 benzerlik bulunmaktadır. 1., 2. ve 3. gruplarda 230 ve 190 bp, 1., 2. ve 4. Gruplarda 290 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 396, 290, 230 ve 190 bp büyüklüğünde 4 bant, 2. grupta 290, 230 ve 190 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta 230 ve 190 bp büyüklüğünde 2 bant, 4. grupta 290 bp büyüklüğünde 1 bant bulunmaktadır (Şekil 4.69).

Lactobacillus suşlarının *TaqI* enzimi ile kesim sonucu 16S-23S ISR PZR-RFLP paternleri göz önünde bulundurulduğunda, suşlar 4 grupta toplanmıştır. Tüm gruplar kendi arasında %100 benzerlik gösterirken, 1. ve 2. gruplar arasında %83.4, bu grupların 3. grup ile arasında %79.5, tüm grupların 4. grup ile arasında %26 benzerlik bulunmaktadır. 1., 2. ve 4. gruplarda 303 bp, 1., 2. ve 3. gruplarda 178 bp, 1. ve 3. gruplarda 267 bp ortak bant olarak gözlemlenmiştir. 1. grupta 303, 267 ve 178 bp büyüklüğünde 3 bant, 2. grupta 303, 235 ve 178 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. grupta 267 ve 178 bp büyüklüğünde 2 bant, 4. grupta 303 bp büyüklüğünde 1 bant bulunmaktadır (Şekil 4.70).

16S-23S rDNA ISR-PZR yöntemi, özellikle elde edilen ürünün sayı ve uzunluk varyasyonuna sahip olmasından dolayı taksonomik çalışmalarda kullanışlı bulunan bir yöntemdir. Cins bazında ayırım gücü yüksek olan bu teknik, RFLP tekniğiyle birleştirildiğinde tür hatta suş bazında da başarılı sonuçlar verebilmektedir. Çalışmamızda 16S-23S rDNA ISR (Internal spacer region) bölgesinin PZR’de amplifikasyonu amacıyla G1 5’ GAAGTCGTAACAAGG 3’ ve L1 5’ CAAGGCATCCACCGT 3’ evrensel primer çiftleri kullanılmıştır. Bu primerlerin kullanımı neticesinde 286-514 bp aralığında değişen sayılarda bant profilleri elde edilmiştir.

Çalışmada populasyonun heterojenitesini belirleyebilmek ve tür veya suş bazında bir ayırım yakalayabilmek amacıyla 16S-23S rDNA ISR-PZR gen bölgesi çeşitli restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. *HindIII*, *Bsp119*, *HinfI*, *DraI*, *VspI*, *NcoI*, *HaeIII*, *TaqI*, *NheI*, *HindII*, *AluI*, *DdeI*, *EcoRI*, *MseI*, *EcoRV*, *SspI*, *PstI*, *KpnI* ve *PaeI* restriksiyon enzimleri çalışmada kullanılabilirlikleri açısından değerlendirilmiştir. Bunların arasından uygun kesim noktasına sahip olan 8 tanesi (*SspI*, *DdeI*, *DraI*, *HinfI*, *HaeIII*, *AluI*, *VspI* ve *TaqI*) çalışmadaki 142 adet suşun 16S-23S rDNA ISR PZR-RFLP analizleri için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; *AluI*, *HaeIII*, *DdeI* ve *TaqI* enzimin tüm cinslerden elde edilen 16S-23S rDNA ISR PZR ürünüde kesim noktasına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber; *HinfI* enzimi sadece kok morfolojiye sahip olan cinslerin DNA'sını kesmiş, fakat *Lactobacillus* cinsinin DNA'larını kesmemiştir. *SspI* enzimi sadece *Enterococcus* cinsinde kesim yapmış, *DraI* enzimi ise *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinde kesim yapabilmektedir. *VspI* enzimi sıklıkla kullanılan bir enzim olmamasına rağmen sadece *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinde kesim noktasına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 Enzim kesimi sonuçları

Enzimler	Kesime Uğrayan Cinsler
<i>AluI</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
<i>HaeIII</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
<i>DdeI</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
<i>TaqI</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
<i>HinfI</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i>
<i>SspI</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>DraI</i>	<i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>
<i>VspI</i>	<i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>

Tüm genom DNA'sı ve DNA-RNA hibridizasyonu ile GC içeriği baz alındığında Lactobacillales ailesi birbiri ile yakın ilişkili üç gruba ayrılmaktadır: *Leuconostoc* grubu (*Leuconostoc mesenteroides* ve *Oenococcus oeni*), *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* grubu (*L. plantarum*, *L. casei*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis*) ve *Lactobacillus delbrueckii* grubu (*L. delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri* ve *Lactobacillus johnsonii*). *Streptococci* (*Streptococcus thermophilus*) ve *lactococci* (*L. lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) ise bu gruplardan ayrı olarak farklı bir grupta yer almaktadır. Özellikle gerçekleştirilen yeni çalışmalar *Pediococcus* grubunun oldukça yakın ilişkili olduğu *Leuconostoc* grubu ile *Lactobacillus* grubunda yer aldığını göstermektedir (Siezen vd. 2004). Bu durum özellikle *VspI* enziminin sadece bu iki cinste kesim yapma nedenini açıklamaktadır.

Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde; ileri aşamalarda daha kesin ve ayırım gücü yüksek sonuçlar elde edebilmek amacıyla:

- 16S-23S rDNA ISR gen bölgesini hedef alan farklı primerler kullanılabilir.
- 16S-23S rDNA ISR-PZR ürünleri dizi analizine tabi tutulabilir ve elde edilen diziler neticesinde cins hatta tür seviyesinde ayırım gücünü sağlayabilecek primerler tasarlanabilir.
- RFLP çalışmasında farklı enzimler denenerek ayırım gücü yüksek profiller elde edilebilir.

Böylece tek bir aşama ile çeşitli ekolojik nişlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin tür hatta suş bazında tanımlanabilmesi için kullanışlı ve güçlü araçlar elde edilebilir. Kullanmış olduğumuz restriksiyon enzimlerine bağlı olarak cins seviyesinde birbirleri ile oldukça yakın ilişkide bulunan LAB suşlarının ayırımında bu tekniğin ayırım gücü başarılı bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59, 143-169.
- Andersson, R. 1989. Lactic acid bacteria in the production of food, SIK-Publication, food laboratory newsletter. *Food Processing*, 14-17.
- 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., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. and Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and Genetic Diversity of *Enterococci* Isolated from Italian Cheeses. *Journal of Dairy Research*, 68, 303-316.
- Appuhamy, S., Patron, R., Coote, J.G. and Gibb, H.A. 1997. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PZR methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 288-291.
- Arbeit, R.D. 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 116–137. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, USA.
- Attaie, R., Whalen, P.J., Shahani, K.M. and Amer, M.A. 1987. Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus yogurt. *J. Food Protec.*, 50(3), 224-228.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. (eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev., Marcel Dekker Inc., 1-66, New York.
- Babalola, O.O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 710-713.
- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 67, 35-43.
- Berthier, F. and Ehrlich, S.D. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PZR 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, 1265-1267.
- Boston, K., Uğur, M., Özgen, Ö. ve Aksu, H. 1995. Laktik asit solusyonlarına daldırmanın broiler karkaslarının mikrobiyolojik kalitesine etkisi. İstanbul Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 21, 443.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics, 32, 314-331.
- 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.
- Böttger, E.C. 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. FEMS Microbiology Letter, 53(1-2), 171-176.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R. and Oliveira, J. 2004. Isolation of bacteriosin-Producing Lactic Acid Bacteri from Meat Products and Its Spectrum of Inhibitory Activity. Braz J Microbiol, 35, 137-144.
- Brown, T.A. 1995. Gene cloning an introduction, Chapman & Hall, London, 334s.
- Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A.G. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. International Journal of Food Microbiology, 83, 171-184.
- Bush, U. and Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B, 722, 263-267.
- Bush, U. and Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B, 722, 263-278.
- 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 starter cultures in dairy starter cultures. Wiley-VCH Inc., 1-25.

- Cogan, T.M. and Hill, C. 1993. Cheese starters cultures. Fox, P.F. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Second ed. Chapman and Hall, 193-255, London.
- Collins, M.D., Rodriuges, U., Ash, C., Aquirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez, M.A., Phillips, B.A., Williams, A.M. and Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse tranacriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiology Letters, 77, 5-12.
- Çon, A.H. ve Gökalp, A.H. 2000. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 30, 180-190.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology, 164-167.
- Datta, S., Choudhary, R.G., Shamim, Md. and Dhar, V. 2011. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA among different *Fusarium* species. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(6), 558-566.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J., 16, 1058-1071.
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. and Janssens, D. 1994. Caracteristiques Generales des Bacteries Lactiques, 1, 25-116.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torani, S. 1995. "The genus *Leuconostoc*", in The lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. Blackie Academics and Professionals, 2, 235-279.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J. 2004. New Preservation Technologies: Possibilities and Limitations. Inter. Dairy J., 14, 273-285.
- 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.
- Dinsmore, P.K. and Klaenhammer, T.R. 1995. Bacteriophage resistance in *Lactococcus*. Molecular Biotechnology, 4, 297-314.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 2.phenoand genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology, 88, 165-188.
- Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria. Appl. Envir. Microbiol., 31(4), 481-486.

- Durmaz, R. 2003. Tüberkülozun Epidemiyolojik Araştırmalarında Laboratuvarın Yeri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, 443-456, Samsun.
- Dykes, G.A. and von Holy, A. 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. Letters in Applied Microbiology, 19, 63-66.
- Early, R. 1998. The Technology of Dairy Products. Blackie Academic & Professional, 446, England.
- Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1992. Species specific oligonucleotide probe for identification of *Streptococcus thermophilus*. Systematic Applied Microbiology, 16, 453-455.
- Endo, A. and Okada, S. 2005. Monitoring the Lactic Acid Bacterial Diversity during Schochu Fermentation by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. J. Biosci. Bioengin., 99, 216- 221.
- Falsen, E., Pascual, C., Sjöden, B., Ohlen, M. and Collins, M.D. 1999. Phenotyping and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources : description of *Lactobacillus iners* sp. nov. Int. Journal of Systematic Bacteriology, 49, 217-221.
- Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S. and De Simone, D. 1997. Stimulation of Immunity by Probiotics. Fuller, R.(eds), Probiotics 2: Applications and Practical Aspects, Chapman & Hall, London, 133-156, England.
- Fitzsimmons, N. and Berry, D.R. 1994. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system. Microbios., 80, 125-133.
- Foster, T. 2003. Web sitesi: http://webdb.dmhc.moph.go.th/ifc_nih/applications/files/staphylococcus2.pdf, Erişim Tarihi: 21.11.2011.
- 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.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and Animals. J. Appl. Bacteriol., 66, 365-378.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. and Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int. J. Food Microbiol., 120, 51-70.
- Garvey, P., Fitzgerald, G.F. and Hill, C. 1995. Cloning and DNA Sequence Analysis of two abortive infection phage resistance determinants from the lactococcal plasmid pNP40. Applied and Environmental Microbiology, 61(12), 4321-4328.
- Georghiou, P.R., Hamil, 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 Disease, 20, 84–94.
- Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Chair, M. Boudabous, A. and Gtari, M. 2010. 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Variability in the Genus *Frankia*. Microb Ecol, 60, 487-495.
- Gibson, G. 2002. Probiotics: a Growth Industry. Dairy Ind. Int. January, 18-20.
- Gibson, G.R., Saavedra, J. M., MacFarlane, S. and MacFarlane, G.T. 1997. Probiotics and Intestinal Infections. Fuller, R.(eds), Probiotics 2: Applications and Practical Aspects, Chapman &Hall, London, 212, England.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature (London) 345, 60-63.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of *Enterococci* in Dairy Products. International Journal of Food Microbiology, 88, 215– 222.
- Gobbetti, M., Angelis, M., Corsetti, A. and Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science & Technology, 16, 1-13.
- Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. 1999. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus Acidophilus: Biochemical, Technological and Therapeutic Properties Relevant For Use As Probiotics. Trends in Food Sci. & Technol., 10, 139-157.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. 1996. An introduction to genetic analysis. 6th Ed., W.H. Freeman and Company, p. 916, New York.
- Guslandi, M. 2003. Probiotics for Chronic Intestinal Disorders. Am. J. Gastroentol., 98(3), 520-521.
- Gürtler, V. and Stanisich, V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Society for General Microbiology, 142 (1), 3-16.
- Halkman, K. 1991. Tarım Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1214, 82, Ankara.
- Hall, H.G. 1998. PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honeybees. Biochemical Genetics, 36, 351-361.
- Hammes, W.P. and Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*, in the lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, Blackie Academics and Professionals, 2, 19-55.

- Harmsen, D. and Karch, H. 2004. How close is close enough? Not the tree of life but a living tree is of major importance for 16S rDNA based microbial species identification. *American Society of Microbiology News*, 70, 19-24.
- Head, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.W. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology, a decade of ribosomal analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiology Ecology*, 35, 1-21.
- Helander, I.M., Wriht, A. and Sandholm, T.M.M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends in Food Scie. & Technology*, 8, 146-150.
- Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B. and Kusters, K. 1993. Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. *Systematic Applied Microbiology*, 16, 463-467.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth Edition, Williams and Wilkins, London, U.K.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U. 2007. The American Society for Nutr., *J. Nutr.*, 137, 838-846.
- Hutton, M.T., Chehakk, P.A. and Hanlin, J.H. 1991. Inhibition of Botulinum toxin production by *Pedococcus acidilactici* in temperature abused refrigerated foods. *J. Food Safety*, 11, 255-267.
- 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.
- Indra, A., Blaschitz, M., Kernbichler, S., Reischl, U., Wewalka, G. and Allerberger, F. 2010. Mechanisms behind variation in the *Clostridium difficile* 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *J. Med. Microbiol.*, 59, 1317-1323.
- Janežič, S., Štrumbelj, I. and Rupnik, M. 2011. Use of modified PCR ribotyping for detection of *Clostridium difficile* ribotypes directly in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Maribor, Slovenia.
- Jensen, M.A., Webster, J.A. and Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 945-952.
- Jill, E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 840-862.

- 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.
- Khaled, D.K., Neilan, B.A., Henriksson, A. and Conway, P.L. 1997. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 153, 191-197.
- Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.
- Kılıç, S. 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542 (2 baskı). ISBN, 975-483-488-1. 450s. İzmir.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.*, 12, 39-86.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 103-125.
- Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.M.H. and Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. 1998. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2522-2529.
- Kolbert, C.P. and Persing, D.H. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Microbiology*, 2, 299-305.
- Kozarsky, P.E., Rimland, D., Terry, P.M. and Wachsmuth, K. 1986. Plasmid analysis of simultaneous nosocomial outbreaks of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection Control*, 7, 577-581.
- Krawiec, S. and Riley, M. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54, 502-539.
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, 1043-1234, Baltimore.
- Lewus, C.B., Kaiser, A. and Montville, T.J. 1991. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriosins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *App. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1683-1688.
- Lhys, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish pucts. Acedemic Dissertation, University of Helsinki, 77, Finland.

- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS- Microbiol. Review., 87, 149-164.
- Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiology Reviewers, 15, 155-173.
- Lyhs, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish pucts. Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.
- Martí'n-Platero, A.M., Maqyeda, M. Valdivia, E. and Purswani, J. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. Food Microbiology, 26, 294-304.
- Martínez-Blanch, J. F., Sánchez, G., Garay, E. and Aznar, R. 2010. Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. Antonie van Leeuwenhoek, 99(3), 697-709.
- Mayra-Makinen, A. and Bigret, M. 1993. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. (Ed.), Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker Inc., 617, New York.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Batini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. Int. J. Food Microbiol., 64, 193-198.
- Miesfeld, R.L. 1999. Applied molecular genetics. Chapter 6: The Polimerase Chain Reaction. Wiley-Liss Inc. Publication 293 p., New York.
- 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 polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. Journal of Applied Microbiology, 85, 25-36.
- 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 polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. Journal of Applied Microbiology, 85, 25-36.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradyan gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 695-700.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 70, 113-128.

- 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.
- Olsen, J.E. 2000. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International*, 33, 257-266.
- Osmanağaoğlu, Ö. 2005. Sensitivity of sublethally injured Gram-negative bacteria to pediocin P. J. *Food Safety*, 25, 266-275.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. and Isolauri, E. 2002. Probiotics: an Overview of Beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- Park, J.H., Seok, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Chung, M.J., Kim, S.D., Hong, U.P. and Park, J.H. 2005. Antimicrobial effect of lactic acid producing bacteria culture condensate mixture (LCCM) against *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 111-117.
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiol.*, 15, 546-553.
- Piard, J.C. and Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriosins and other antibacterial substances. *Lait*, 72, 113-142.
- 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 oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology*, 139, 513-517.
- Prescott, C.S. and Dunn, G.C. 1987. *Industrial Microbiology*. Published on Distributors, Delhi, 882, India.
- Raccach, M. 1987. *Pediococci and Biotechnology*. CRC Critical Review in Microbiology, 14, 291-309.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. 2000. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, <http://www.msu.edu.edu/user/debruijn/dna1-4htm>.
- Ramírez, A.S., Naylor, C.J., Yavari, C.A., Dare, C.M. and Bradbury, J.M. 2011. Analysis of the 16S to 23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma synoviae* field strains. *Avian Pathology*, 40(1), 79-86.
- Randazzo, C.L., Caggia, C. and Neviani, E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 1-9.

- 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.
- Reiter, B. and Harnulv, G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and partical applications. *J. Food Protect.*, 47(9), 724-732.
- Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C. 2002. Cheese Delivering Biocultures-probiotic Cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 71-78.
- Salminen, S. and Wright, von A. 1993. *Lactic Acid Bacteria*. 270 Madiso Avenue, New York 1001, USA.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. and Rowland, I. 1998. Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function. *British Journal of Nutrition*, 80, 147-171.
- Salminen, S., Deighton, M. and Gorbach, S. 1992. *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Salminen, S. and von Wright, A. (eds), *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker Inc., New York, 422, USA.
- Salzano, G., Moschetti, G., Villani, F., Pepe, O., Mauirello, G. and Coppola, S. 1994. Genotyping of *Streptococcus thermophilus* evidenced by restriction analysis of ribosomal DNA. *Research Microbiology*, 145, 651-658.
- Samarzija, D., Antunac, N. and Havranek, J.L. 2001. Taxonomy, Physiology and Growth of *Lactococcus lactis*: A Review. *Mljekarstvo*, 51, 35-48.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Watanabe, Y., Nagai, K. and Harasawa, R. 2011. Examination of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' and *Mycoplasma haemofelis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *App. Environ. Microbiol.*, 55(8), 1901-1906.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and Related *Streptococci* to the Genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 183-195.

- Shape, M.E., Fryer, T.F. and Smith, D.G. 1966. Identification of the Lactic Acid Bacteria. Gibbs, M.M. and Skinner, F.A. (eds), Identification Methods for Microbiologist Part A., Academic Pres, 245, New York.
- Siezen, R. J., van Enkevort, F. H., Kleerebezem, M. and Teusink, B., 2004. Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. Current Opinion in Biotechnology, 15, 105-115.
- Sineo, L., Martini, R., Borghi, G. and Failli, M. 1993. Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Boll Chim Farm., 132, 201-202.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R. and Heller, K.J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. Food Science and Technology, 42, 448-457.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98, 503-517.
- Stackebrand, E. and Teuber, M. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. Biochimie, 70, 317-324.
- 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.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol., 36, 1-29.
- Sullivan, A. and Nord, C.E. 2002. The place of Probiotics in Human Intestinal Infections. Int. J. Antimicrobial Agents, 20(5), 313-319.
- Suzzi, G., Lombardi, A., Lanorte, M.T., Caruso, M., Andrighetto, C. and Gardini, F. 2000. Phenotypic and Genotypic Diversity of Yeasts Isolated from Water- Buffalo Mozzarella Cheese. Journal of Applied Microbiology, 88, 117-123.
- Tangüler, H. and Erten, H. 2006. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü. Türkiye 9.Gıda Kongresi, Bolu.
- Tannock, G.W., Tilsala, T.A., Radtong, S., Ng, J., Munro, K. and Alatossava, T. 1999. Identification of Lactobacillus isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacerregion sequence comparisons. Applied and Environmental microbiology, 65,4264-4267.
- Tekinşen, O.C. ve Atasever, M. 1994. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür. Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını, 150, Konya.

- 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.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria. Blackie Academics and Professionals, 2, 173-235.
- Thomas, L.V. and Delves, B. 2005. Nisin. Davidson, P.M., Sofos, J.N. and Branen, A.L. (Eds.), *Antimicrobials in Food*, Taylor & Francis Group, 237-275, New York.
- Thomas, L.V. and Wimpenny, J.W.T. 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *App. Environ. Microbiol.*, 62, 2006-2012.
- Thorne, J.L., Kishino, H. and Painter, I.S. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology Evolution*, 15, 1647-1657.
- Tokajian, S., Haddad, D., Andraos, R., Hashwa, F. and Araj, G. 2011. Toxins and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from a Major Hospital in Lebanon. *International Scholarly Research Network Microbiology*, 2011, 9.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Firad, D., Golic, N., Strahinic, I. and Lozo, J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 112, 230-235.
- Torriani, S., Zapparol, G., Dellaglio, F. 1999. Use of PCR-Based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4351-4356.
- Toth, I.K., Avrova, A.O. and Hyman, L.J. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic transcribed spacer-PZR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4070-4076.
- Tsai, C., Lai, C., Yu, B. and Tsen, H. 2010. Use of PCR primers and probes based on the 23S rDNA and internal transcription spacer (ITS) gene sequence for the detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in feedsupplements. *Anaerobe*, 16, 270-277.
- Tunail, N. ve Köşker, Ö. 1989. Süt Mikrobiyolojisi. A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1116, 138, Ankara.
- Työppönen, S., Petaja, E. and Mattila-Sandholm, T. 2003. Bioprotectives And Probiotics For Dry Sausages. *Int. J. of Food Microbiol.*, 83, 233– 244.

- Ünlütürk, A. and Turantaş, F. 1999. Gıda Mikrobiyolojisi. 2.Baskı, Mengi Tan Basımevi, İzmir.
- van Belkum, A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR: a literature review. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 174-84.
- Van der Zee, A., Verbakel, H. and Von Zon, J. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence based PZR with various typing methods and isolation of novel epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 342-349.
- Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221-237.
- Vicente, M.C. and Fulton, T. 2004. Molecular marker learning modules-Vol 1. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. International Plant Genetic Resources Institute Publications. CD-Rom.
- Vila, J., Marcos, M.A. and Jimenez de Anta, M.T. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*- *A. baumannii* complex. *Journal of Medical Microbiology*, 44, 482-489.
- 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, D.M., Weller, R. and Bateson, M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345, 63-65.
- Weiss, A., Domig, K.J., Kneifel, W. and Mayer, H.K. 2010. Evaluation of PCR-based typing methods for the identification of probiotic *Enterococcus faecium* strains from animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 187-196.
- Woese, C.R., 1985. Study Evolutionary Relationship among Bacteria. Schleifer, K.H, Stackebrandt, E. *Evolutin of Procaryotes*, Academic Press, London.
- Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, 2, 398, London.
- 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.
- Yetişmeyen, A. 1995. Süt Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1420, 229, Ankara. Yöntemlerin Yeri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları*, 42, 7-13.

Zabeau, M. and Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprints. *European Patent Application. Publ. 0534858A1*.

EKLER

EK 1 BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

EK 2 TAMPON ve ÇÖZELTİLER

EK 3 KROMOZOMAL DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ

EK 4 DNA ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

EK 5 KİMYASALLAR

EK 1 BAKTERİ 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 (Trypton-glucose-yeast extract)

İçerik	%g
Trypton	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)

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

YÜKLEME BOYASI

İçerik

Bromofenol blue	0.25 g
Sakkaroz	40 g
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

Etidyum bromit	1.0 g
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 AGARUZ 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.

% 1.5'lık AGARUZ JEL (16S-23S ISR-PZR ÜRÜNLERİ İÇİN)

İçerik

% g

Agaroz

1.5

1 X TBE Tamponu

100 ml

Agaroz 1.5 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 etidum bromit solüsyonu eklenir.

EK 3 KROMOZOMAL DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

**Quick
PROTOCOL**

Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Pellet Cells

Centrifuge 1ml of overnight culture for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$. Discard the supernatant.

A. For Gram Positive Bacteria

1. Suspend cells in 480µl 50mM EDTA.
2. Add lytic enzyme(s) (120µl) [lysozyme and/or lysostaphin].
3. Incubate at 37°C for 30–60 minutes.
4. Centrifuge for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ and remove supernatant.
5. Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

B. For Gram Negative Bacteria

Go to Step 1, **Lyse Cells** (below).

Lyse Cells

1. Add 600µl Nuclei Lysis Solution. Pipet gently to mix.
2. Incubate for 5 minutes at 80°C, then cool to room temperature.
3. Add 3µl of RNase Solution. Mix, incubate at 37°C for 15–60 minutes, then cool to room temperature.

Protein Precipitation

4. Add 200µl of Protein Precipitation Solution. Vortex.
5. Incubate on ice for 5 minutes.
6. Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ for 3 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

7. Transfer the supernatant to a clean tube containing 600µl of room temperature isopropanol. Mix.
8. Centrifuge as in "Pellet Cells" above, and decant the supernatant.
9. Add 600µl of room temperature 70% ethanol. Mix.
10. Centrifuge for 2 minutes at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$.
11. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 10–15 minutes.
12. Rehydrate the DNA pellet in 100µl of Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

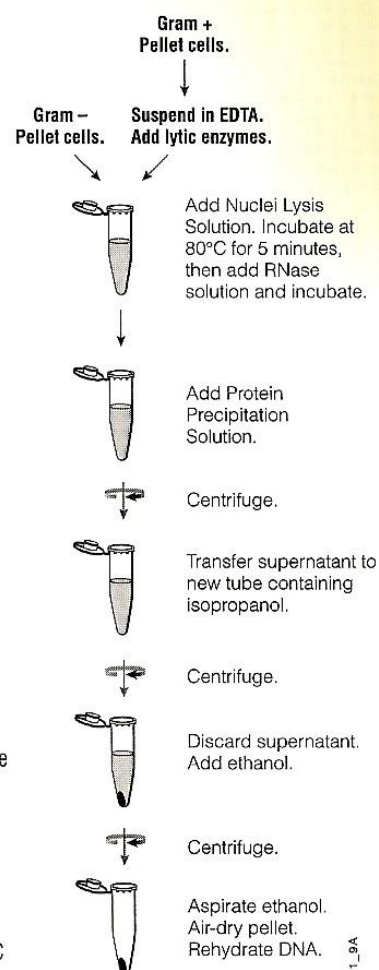
* Maximum speed on a microcentrifuge.

See additional protocol information in Technical Manual #TM050, available upon request from Promega or online at www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

©1999–2005 Promega Corporation. All Rights Reserved.



2825MA11_9A



Promega

Printed in USA. Revised 4/05
Part #9FB022

EK 4 DNA ANALİZİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

DNA Ladder, Supercoiled

11 Supercoiled fragments, 2–16 kb

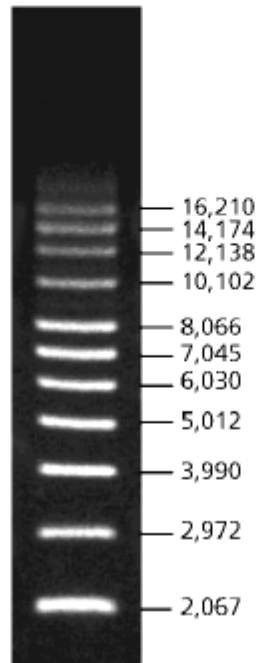
Product Number **D5292**

Storage Temperature -20°C

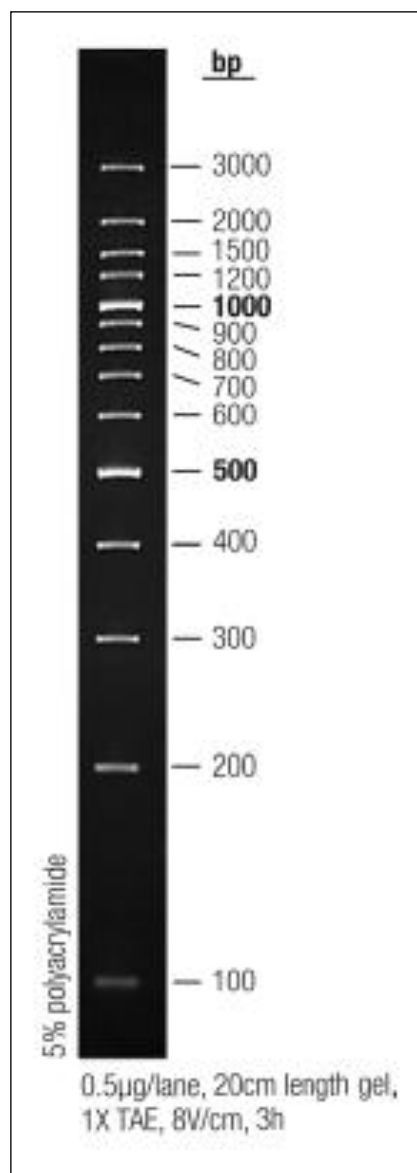
Product Description

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.

**Plasmid Sizes
base pairs (bp)**



GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)



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
Primerler	THERMO
Restriksiyon Enzimleri	FERMENTAS
Supercoiled DNA Ladder	SIGMA
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	PROMEGA
Tripton	OXOID
Tris	SIGMA
Tween 80	MERCK
100bp DNA Ladder	FERMENTAS

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bilge ÇETİN
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 26.11.1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çankaya Atatürk Anadolu Lisesi 2000-2004

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü 2005-2009

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı 2009-2012

YAYINLAR ve BİLDİRİLER

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Posterler

Osmanagaoglu O, Oral B, Cetin B and Kıran F (2011) Phylogenetic analysis of some Lactic Acid Bacteria as determined on the basis of their 16S-23S rDNA spacer region (ISR)-RFLP. **10th Symposium on Lactic Acid Bacteria**, Egmond aan Zee, Netherland, August 28-September 1.