

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE (LAB) AİT BAZI TÜRLERİN AFLP
(ÇOĞALTILAN PARÇA BOY FARKLILAŞMASI) YÖNTEMİ İLE
PARMAK İZİ ANALİZLERİ**

Tüliz YILDIRIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU danışmanlığında, Tüliz YILDIRIM tarafından hazırlanan “**Laktik Asit Bakterilerine (LAB) ait bazı türlerin AFLP (çoğaltılmış parça boy farklılaşması) yöntemi ile parmak izi analizleri**” adlı tez çalışması 10.Ağustos.2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Candan GÜRAKAN
Ortadoğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği ABD.

Üye: Doç. Dr. Reyhan ÇOLAK
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji ABD.

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

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT BAZI TÜRLERİN AFLP (ÇOĞALTILAN PARÇA BOY FARKLILAŞMASI) YÖNTEMİ İLE PARMAK İZİ ANALİZLERİ

TÜLİZ YILDIRIM

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

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

Çalışmamızda, LAB grubuna ait 86 adet suşun tür/tür içi ayrımında AFLP tekniğinin taksonomik potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla mikroorganizmalar için INVITROGEN AFLP analiz sistem kiti kullanılmış, elde edilen amplifikasyon ürünleri denatüre poliakrilamid jelde koşturulmuştur. Jellerdeki bantların var/yok şeklinde değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar uygun bilgisayar programları ile analiz edilmiştir. Jaccard benzerlik indeksine göre UPGMA dendogramı oluşturulmuş ve incelenen suşların genetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Dendogramdaki kümelenmeler, bazı istisnalar dışında büyük ölçüde fenotipik tanımlamaları doğrulamıştır.

2007, 115 sayfa

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterisi, AFLP, filogenetik ilişki

ABSTRACT

Master.Thesis

**ANALYSIS OF SOME SPECIES BELONGING TO LACTIC ACID BACTERIA (LAB)
BY AMPLIFIED FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISMS (AFLP)
FINGERPRINTING**

Tüliz YILDIRIM

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Lactic acid bacteria are widely used as starter cultures in the food industry. Because of their plasmid-coded bacteriocin production speciality, they make expire date of the food longer and thought to be potential biopreservatives. This group of bacteria become very important both industrially and scientifically in terms of their usage in probiotic products and some of them causes food spoilage. In terms of the industrial applications of LAB, reliable strain typing methods will become increasingly important in the study of the performance of LAB starter cultures and cultures used as additives in functional food type products.

It is the aim of this study to determine the taxonomic potential of AFLP in discrimination of 86 strains belonging to LAB at the species and the intra-species level. For this purpose, INVITROGEN AFLP Analysis System for Microorganism kit was used. Products from the selective amplification, were separated on denaturing polyacrilamide gel. The results of band patterns were scored (0/1) and analyzed with computer programmes of Jaccard similarity index for UPGMA dendogram to demonstrated phylogentic relationship.

The result of this study clearly demonstrated the superior discriminative power of AFLP towards the differentiation of highly related LAB strains that belong to the same species, highlighting this novel fingerprinting method in epidemiological and evolutionary studies.

2007, 115 pages

Key words: Lactic acid bacteria, AFLP, phylogenetic relationship

TEŞEKKÜR

“LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT BAZI TÜRLERİN AFLP (ÇOĞALTILAN PARÇA BOY FARKLILAŞMASI) YÖNTEMİ İLE PARMAK İZİ ANALİZLERİ” konulu tez çalışmam **TUBİTAK** Temel Bilimler Araştırma Grubu (TBAG) nun 106T742 no’lu projesi ile desteklenmiştir. Tezimin başarılı bir şekilde gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubuna teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime başladığım 2004 Eylül ayından bugüne kadar bana inanarak ve güvenerek her zaman arkamda olan, benden desteğini hiç esirgemeyen, bilimsel yönünün dışında sosyal yaşamda da beraber birçok paylaşıma sahip olduğumuz saygıdeğer danışman hocam Doç.Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU’na sonsuz teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans tezimin deney aşamalarında yanımda olan, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Doç.Dr. Ali ERGÜL’e teşekkür ederim. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı’na ve tezimin deney aşamalarında bana göstermiş oldukları yakın ilgi ve anlayış için Bitki Biyoteknolojisi grubu çalışanlarına teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimi okuma ve değerlendirme aşamalarındaki katkılarından dolayı Doç.Dr. Candan Gürakan ve Doç. Dr. Reyhan Çolak’a teşekkür ederim.

Tezimi hazırladığım süre boyunca benden ilgisini ve yardımını hiç esirgemeyen çalışmaktan ve beraber vakit geçirmekten keyif aldığım çok sevgili arkadaşım Arş.Gör. Fadime KIRAN ve ailesine, son 3 yıl içerisinde tanışmış olmamıza rağmen bu kısa zamanda pekçok şeyi paylaştığımız İlknur ALTUNTAŞ’a teşekkür ederim.

Bugüne kadar hayatımın her aşamasında gerek maddi gerekse manevi her anlamda benim her zaman arkamda olduğunu bildiğim, eğitim ve öğretimin önemini bana öğreten, hayatı, yaşam tecrübeleri ile gurur duyduğum ve her zaman örnek aldığım çok

değerli babam Dr.Hasan YILDIRIM'a, her türlü sıkıntıda beni hiç yalnız bırakmayan ve bana hep destek olan her zaman gurur duyduğum çok sevgili annem Nesrin YILDIRIM'a beni bugünlere kadar getirdikleri, desteklerini hiç esirgemedikleri ve bana her zaman güvendikleri için sonsuz teşekkür ediyorum. Bana bugüne kadar hep iyi bir örnek olduğu ve benden her ne kadar uzakta olsada her zaman varlığını yanımda hissettirdiği için ablam Esin Ülkü Beyazıt'a, hayatımın bu en yoğun geçen son üç yılında bana destek olduğu için kardeşim İnci YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Gerek yüksek lisans tezimin hazırlanma aşamalarında gerekse hayatımın ileriki aşamalarında her zaman yanımda olacağına inandığım, beni bu yoğun çalışma döneminde anlayışla karşılayan, benden ilgisini, sabrını, saygı ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen nişanlım Dt. Atılım GÖÇER'e ve onu bu kadar mükemmel bir birey olarak yetiştirdikleri ve manevi desteklerini üzerimden hiç eksik etmedikleri için Göçer Ailesine teşekkür ediyorum.

Ve son olarak;

Hayatımın bu en yoğun ve en keyifli döneminde göstermiş olduğum çalışma temposu için, kendime inandığım ve güvendiğim için ve göstermiş olduğum gayretin bu kadar güzel bir şekilde sonuçlandığı için kendime; Tüliz YILDIRIM'a çok teşekkür ediyorum....

Tüliz YILDIRIM

Ankara, Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
I. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1 MATERYAL	29
3.1.1 Bakteri kültürleri	29
3.1.2 Besiyerleri	29
3.1.3 DNA izolasyonu ve AFLP kiti	29
3.1.4 Tampon ve solüsyonlar	29
3.1.5 Moleküler markörler	29
3.1.6 Kimyasallar	29
3.1.7 Kullanılan solüsyon ve malzemelerin sterilizasyonu	30
3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması	30
3.2 YÖNTEM.....	35
3.2.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi.....	35
3.2.2 AFLP reaksiyonu	36

3.2.2.1	DNA izolasyonu	36
3.2.2.2	DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi, adaptör eklenmesi preamplifikasyon ve selektif amplifikasyon	37
3.2.2.3	Denatüre poliakrilamid jel elektroforezi	42
4.	BULGULAR	44
4.1	DNA miktar tayini	44
4.2	Kromozomal DNA molekülünün agaroz jelde gözlenmesi.....	47
4.3	DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi	52
4.4	Pre-amplifiye DNA molekülünün agaroz jelde gözlenmesi.....	52
4.5	Selektif amplifikasyon.....	58
4.6	Poliakrilamid jel elektroforezi	58
4.7	Dendogram ve benzerlik indeksinin oluşturulması	68
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	81
	KAYNAKLAR	89
	EKLER	
	EK1. Bakteri gelişimlerinde kullanılan besiyerleri.....	98
	EK2. DNA izolasyonu ve AFLP çalışmalarında kullanılan kitler	100
	EK3. Tampon ve solüsyonlar	102
	EK4. Moleküler markörler	108
	EK5. Kimyasallar	111
	ÖZGEÇMİŞ	114

SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis (çoğaltılmış rDNA'nın restriksiyon analizi)
ATCC	American Type Culture Collection
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR
bp	Baz çifti
C	Sitozin
°C	Santigrat derece
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
dk	Dakika
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanin
gr	Gram
LAB	Laktik asit bakterisi
Lt	Litre
M	Molarite
ml	Mililitre
MRS	de Man Rogosa and Sharpe Broth
MVSP	Multi-Variate Statistical Package
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE	Pulsed Field Jel Elektroforezi
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)

Rep-PCR	Repetitive extragenic palindrome
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonükleikasit
Rnase	Ribonükleaz enzimi
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
sn	Saniye
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamite Jel Elektroforezi
TGE	Tripton Glukoz Yeast Ekstrat
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages
V	Volt
WHO	World Health Organization
μ	Mikro
μl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu	12
Şekil 2.2	<i>Lactococcus lactis</i> tarafından üretilen ve bir lanthionine (Ala-S-Ala) olan nisin bakteriyosini ile üç nonlanthionine bakteriyosininin (<i>Pediococcus acidilactici</i> tarafından üretilen pediocin PA-1/AcH, <i>Leuconostoc gelidum</i> tarafından üretilen leucocin A ve <i>Lactobacillus sake</i> tarafından üretilen sakacin A. Nonlanthionine bakteriyosinlerin tamamı yapılarında muhtemelen disulfide (-S-S-) bağlarına sahipler	14
Şekil 2.3	AFLP tekniğinin çalışma prensibi.....	24
Şekil 3.1	Olası pek çok primer kombinasyonundan sadece birinin kullanımı ile gerçekleşen AFLP prosedürü	38
Şekil 4.1	Çalışmada kullanılan <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait kromozomal DNA'lar	47
Şekil 4.2	Çalışmada kullanılan <i>Lactococcus</i> suşlarına ait kromozomal DNA'lar	48
Şekil 4.3	Çalışmada kullanılan <i>Enterococcus</i> suşlarına ait kromozomal DNA'lar	49
Şekil 4.4	Çalışmada kullanılan <i>Pediococcus</i> suşlarına ait kromozomal DNA'lar	50
Şekil 4.5	Çalışmada kullanılan <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait kromozomal DNA'lar	51
Şekil 4.6	<i>Lactobacillus</i> suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri.....	53

Şekil 4.7	<i>Lactococcus</i> suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri.	54
Şekil 4.8	<i>Enterococcus</i> suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri.....	55
Şekil 4.9	<i>Pediococcus</i> suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri.	56
Şekil 4.10	<i>Leuconostoc</i> suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri.	57
Şekil 4.11	Primer 1 (E-A/M-T) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	60
Şekil 4.12	Primer 2 (E-A/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	61
Şekil 4.13	Primer 3 (E-T/M-T) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	62
Şekil 4.14	Primer 4 (E-T/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	63
Şekil 4.15	Primer 5 (E-T/M-A) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	64
Şekil 4.16	Primer 6 (E-G/M-T) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	65
Şekil 4.17	Primer 7 (E-G/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	66

Şekil 4.18 Primer 8 (E-C/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü.....	67
Şekil 4.19 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşuna ait dendogram.....	69
Şekil 4.20 <i>Lactobacillus</i> suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	70
Şekil 4.21 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 10 adet <i>Lc. lactis</i> suşuna ait dendogram.....	71
Şekil 4.22 <i>Lc. lactis</i> suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	72
Şekil 4.23 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 11 adet <i>Enterococcus</i> suşuna ait dendogram.....	73
Şekil 4.24 <i>Enterococcus</i> suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	74
Şekil 4.25 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 27 adet <i>Pediococcus</i> suşuna ait dendogram.....	75
Şekil 4.26 <i>Pediococcus</i> suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	76

Şekil 4.27 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 8 adet <i>Leuconostoc</i> suşuna ait dendogram.....	77
Şekil 4.28 <i>Leuconostoc</i> suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	78
Şekil 4.29 Değişik primer kombinasyonlarının kullanımı neticesinde 86 adet LAB suşuna ait AFLP paternlerinin UPGMA'sından oluşturulan dendogram. ...	79
Şekil 4.30 Oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Bazı starter kültürlerin taksanomisi.....	10
Çizelge 2.2	LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri.....	13
Çizelge 2.3	Ticari olarak satılan bazı probiyotik ürünler.....	16
Çizelge 2.4	AFLP tekniğın avantaj ve dezavantajları.....	25
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri.....	31
Çizelge 4.1	Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları.....	44
Çizelge 4.2	Laktik asit bakterilerinin denatüre poliakrilamit jelde yükleme sıraları.....	59

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), homofermentatif ya da heterofermentatif metabolizma süresince laktik asit üretebilme kabiliyetine sahip olan bir bakteri grubunu temsil etmektedir (Drinan *et al.* 1976).

Gıda endüstrisinde, laktik asit bakterilerinin gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler çeşitli fermente gıdaların tat, koku, teksür özelliklerine etki etmektedir. Tüketiciler tarafından çok kullanılan fermente gıda maddelerinin doğal florasında baskın halde bulunmaları, ekzopolisakkarit üretmeleri, starter kültür olarak kullanılmaları, probiyotik ürünlere katılmaları, bazılarının bakteriyosin olarak adlandırılan özel bir protein üretmeleri ve böylece gıdalara raf ömürlerini uzatacak özellikler kazandırmaları, bununla beraber gıda endüstrisinde sağlamış oldukları bu faydalı özelliklere ek olarak, bazı laktik asit bakterilerinin gıdalarda bozulmalara sebep olması bu bakteri grubuna olan ilgiyi son yıllarda artırmış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar derinlik kazanmıştır (Rebecchi *et al.* 1998). Bu nedenlerden dolayı laktik asit bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker and de Bruijn, 2000).

Laktik asit bakterilerinin endüstriyel uygulamalarında yararlı ve patojen olmayan altı anahtar cins kullanılmaktadır: *Lactococcus* (süt), *Lactobacillus* (süt, et, sebzeler, tahıl), *Leuconostoc* (sebzeler, süt), *Pediococcus* (sebzeler ve et), *Oenococcus* (şarap) ve *Streptococcus thermophilus* (süt). Laktik asit bakterilerinin diğer üyeleri özellikle *Lactobacilli* insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde önemli bir alanı işgal eder ve sağlıklı kalmak ve iyi hissetmek adına birkaç probiyotik yararı olduğu düşünülmektedir. Bu yararlar arasında normal mikrofloraya olumlu etkiler, patojenlerin yok edilmesi ve mukozal bağışıklığın stimülasyonu/modifikasyonu yer almaktadır.

Son zamanlarda laktik asit bakterileri; biopolimerler (*Leuconostoc sp.*), bulk enzimler (*Lactobacillus brevis*), etanol ve laktik asit (*Lactobacillus casei*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. brevis*) içeren endüstriyel, kimyasal ve biyolojik ürünlerin üretilmesinde kullanılmaya başlamıştır.

Laktik asit bakterileri aynı zamanda sindirim enzimleri ve aşı antijenleri için oral araç olarak geliştirilmede güçlü adaylardır. Laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, gastrik yolda yaşayabilme kabiliyetleri ve insan tüketimi sırasındaki güvenilirlik kaydı, biyolojik moleküllerin hedef lokasyonlara ve dokulara etkili olarak ulaşmalarında kullanılan anahtar özellikleridir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel ve bilimsel açıdan gittikçe daha fazla önem kazanan bir konu haline gelmiştir (Rademaker and DeBrujin 2000).

LAB lerinin endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilir olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir metotların uygulanması oldukça önemlidir.

LAB'leri genel olarak fenotipik metotlar ve genotipik metotlar olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir. Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürünü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins-tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlayan geleneksel *fenotipik metotlar* arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik/ biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücre yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininer, poliaminler, hücre duvarı bileşikler, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternleri (1D ya da 2D) yer almaktadır. LAB identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayrımı için halen önemli bir rol oynasa da yorumlaması oldukça zor olan bu teknikler aynı zamanda zaman alıcı ve moleküler metotlar ile karşılaştırıldıklarında ise daha az ayrım gücüne sahiplerdir (Temmerman *et al.* 2004). Bununla beraber, fenotipik testler ile gen ekspresyonunun ürünü karakterize edildiğinden bu özelliklerin hepsi spontan mutasyon ve büyüme koşullarındaki değişimler neticesinde değişim göstermeye meyillidirler. Bundan dolayıdır ki LAB lerinin cins ve tür bazında tanımlanmalarında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış identifikasyonlara ve hayal kırıklığı yaratan identifikasyon sonuçlarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

Günümüzde, LAB tanımlama/typendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik metotlardan daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler metotlara doğru kaymıştır (Babalola 2003). Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan **genotipik metotlar** ise DNA'yı yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon paternlerindeki polimorfizmini ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu içeren çalışmalardır. DNA temelli teknikler, 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 *et al.* 1998; Bush and Nitschko, 1999). Bununla beraber, kromozomal DNA molekülünün insersiyon ve delesyonu, ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına veya var olan kesim bölgelerinin elimine olmasına sebep olan rastgele mutasyonlardan etkilenmekle beraber genotipik metotlar doğal varyasyona daha az maruz kalmaktadırlar.

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 *et al.* 1998, Bush and Nitschko 1999). Genotipik metotlar arasında pilazmit profili, ribotiplendirme, pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR; polymerase chain reaction) temelli teknikler: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; restriction fragment length polymorphism), Rastgele 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-PCR (AP-PCR), Repetitive extragenic palindrome (rep-PCR) ve 16S rDNA'ya dayalı sekans analizleri yer almaktadır (Vandamme *et al.* 1996).

Çalışmamızda, Laktik Asit Bakterilerine ait suşlar arasındaki farklılıkların ortaya konulmasında ve identifikasyonlarında AFLP tekniğinin taksonomik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla laktik asit bakteri grubuna ait (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*) yaklaşık 86 adet suş AFLP (Amplifiye Fragment Length Polimorfizm) yöntemi ile tanımlanmaya ve bu bakteriler arasındaki taksonomik ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

2.1 Laktik Asit Bakterileri

2.1.1 *Lactobacillus*

Mikroskop altında çubuk (basil) şeklinde gözlenirler. Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup %5 CO₂'li ortamda gelişme gösterebilirler. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler (Hammes and Vogel 1995). Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermantatif ve heterofermantatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun % 33–55' ini G+C oluşturmaktadır (Stiles and Holzappel 1997).

Lactobacillus cinsi bakteriler ise 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 (Krieg and Holt 1984). *Lactobacillus* biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik içeren üyelerine sahip bir cinstir. Beslenme istekleri de oldukça komplekstir. *Lactobacillus* cinsinin önemli bir türü olan *Lactobacillus bulgaricus*, Weiss ve ark. nın

önerisiyle *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ismiyle anılmaya başlanmıştır (Weiss *et al.* 1984).

Lactobacillus türlerine farklı ortamlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Genellikle zengin karbonhidrat bulunan ortamlarda yaşarlar. Karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan ürünler ortamın asiditesini artırır. Böylece bu tip ortamlarda gelişemeyen bakteriler için antimikrobiyal etki yaratır (Hammes and Vogel 1995).

Lactobacilli kendi içinde 3 gruba ayrılır (Orla-Jensen 1919):

Thermobacterium: Homofermantatif *Lactobacillus* grubuna dahil olup; 15°C' den düşük sıcaklıkta gelişim gösterememesine rağmen 45°C'de gelişebilirler. Işık mikroskobu altında zincir şeklinde koklar olarak gözlenebilirler. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* bu gruba dahil olup yüksek sıcaklıkta peynir üretiminde starter olarak kullanılmaktadırlar. *Lb. acidophilus* probiyotik yoğurt ve diyetlik ürün eldesinde kullanılmaktadır.

Streptobacterium: Homofermantatif grup olup 15°C'den düşük sıcaklıkta gelişim gösterebilirler. *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. buchneri* gibi.

Betabacterium: Heterofermantatif grup olup fermentasyon neticesinde laktik asit yanında asetat, etilalkol ve CO₂ üretirler. Süt ürünlerinde bulunan türler; *Lb. fermenti* ve *Lb. brevis* olup starter kültür olarak kullanılmamaktadırlar.

Bu sınıflandırma sistemi hem hücresel morfolojiler hem de gelişim sıcaklıkları dikkate alınarak yapılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar bu bakterileri fermentasyon özelliklerine göre 3 gruba yerleştirmiştir (Hammes and Vogel 1995).

1. Zorunlu homofermantatif: Gıda fermentasyonu
2. Fakültatif heterofermantatif: Gıda fermentasyonu
3. Zorunlu heterofermantatif: Gıda bozulması

2.1.2 *Lactococcus*

Laktik asit bakteri grubuna dahil kok şeklindeki bakterilerdir. Küre ya da kısa zincir halinde bir araya gelen koklar morfolojik görüntüyü oluşturur. Zincir uzunluğu türlere göre değişir. *Lactococci* laktozu L (+) laktik aside çevirir. Gaz oluşumu gözlenmez. Optimum gelişme ısıları 30°C 'dir. Süt ve bitki ürünlerinde bulunurlar. 10°C' de gelişebilmelerine karşılık 45°C 'de gelişemezler (Holt *et al.* 1994). Orla Jensen tarafından 1919 yılında yapılan sınıflandırma neticesinde mezofilik laktik streptococci olarak *Streptococcus* cinsine dahil edilmişlerdir. Daha sonra patojenik streptococci'den 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* cinsine ait 5 tür bilinmektedir. *Lc lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium*. *Lc. lactis*' in 2 alttürü bulunmaktadır. *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* supsp. *cremoris*. *Lc. lactis* alttürleri özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli role sahiptir.

2.1.3 *Leuconostoc*

Fermantasyon kapasiteleri mono-disakkaritler ile sınırlı olup heterofermantatif laktik asit bakteri grubuna dahillerdir. 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 'dır (Budde *et al.* 2003, Dellaglio *et al.* 1995, Holt *et al.* 1994). Starter kültür kompozisyonuna dahil olup sitrattan diasetil oluşumuna neden olurlar. Bu da tat oluşumu için önemli bir kriterdir. Fermente ürün oluşumunda baskın olan türleri: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ve *Leuconostoc lactis*. Fakültatif anaeroblardır. Buzdolabı sıcaklığında da üreyebilme özellikleri vardır. Bu türleri vakum ile paketlenerek buzdolabında saklanan et ürünlerinde bozulmalara sebep olmaktadır. Bozulma heterofermantatif türlerin fermentasyon işlemi sonunda oluşturduğu yan ürünlerin varlığı ile gerçekleşmektedir.

2.1.4 *Enterococcus*

Oksijen kullanımı bakımından fakültatif anaerob bakterilerdir. Farklı karbonhidrat formlarını metabolize ederek L (+) laktik aside çevirir, fakat gaz oluşturmazlar. Son pH aralıkları 4.2–4.6 arasındadır. 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 *et al.* 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 *et al.* 2003). *Enterococcus*' lar da Lactococlar gibi *Streptococcus* grubu içinde sınıflandırılmışlardır. Daha sonra patojenik streptococci'den serolojik D antijen grubuna sahip olmaları ile ayrılmışlardır (Holt *et al.* 1994).

2.1.5 *Pediococcus*

Laktik asit bakterileri arasında mikroskop altında tetrat morfoloji gösteren gruptur (Stiles and Holzapfel 1997). Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi tarafından 7 türle temsil edilmektedir. *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus halophilus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerecisiae* ve *Pediococcus dextrinicus* (Raccach 1987). Optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C'dir. *Pediococcus acidilactici* gibi 50°C'de gelişen türleri de bulunmaktadır. Homofermantatif gruba dâhildirler. Katalaz negatiftirler. Pastörizasyon işlemi neticesinde varlıklarını sürdürebilirler. Alkolik içeceklerde bozulmalara sebep olurlar. Fermente gıdalar ve sebzelerde sıklıkla bulunurlar.

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Laktik asit bakterileri gıda teknolojisi açısından büyük bir öneme sahiptir. Gıda endüstrisinde, laktik asit bakterilerinin gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler çeşitli fermente gıdaların tat, koku, tekstür özelliklerine etki etmektedir. Tüketiciler tarafından çok kullanılan fermente gıda maddelerinin doğal

florasında baskın halde bulunmaları, ekzopolisakkarit üretmeleri, starter kültür olarak kullanılmaları, probiyotik ürünlere katılmaları, bazılarının bakteriyosin olarak adlandırılan özel bir protein üretmeleri ve böylece gıdalara raf ömürlerini uzatacak özellikler kazandırmaları, bununla beraber gıda endüstrisinde sağlamış oldukları bu faydalı özelliklere ek olarak, bazı LAB'lerin gıdalarda bozulmalara sebep olması bu bakteri grubuna olan ilgiyi son yıllarda artırmış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar derinlik kazanmıştır (Rebecchi *et al.* 1998). Bu nedenlerden dolayı laktik asit bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker and de Bruijn 2000). LAB'ler aynı zamanda sindirim enzimleri ve aşı antijenleri için oral araç olarak geliştirilmede güçlü adaylardır. LAB'lerin doğal asit toleransı, gastrik yolda yaşayabilme kabiliyetleri ve insan tüketimi sırasındaki güvenilirlik kaydı, biyolojik moleküllerin hedef lokasyonlara ve dokulara etkili olarak ulaşmalarında kullanılan anahtar özellikleridir.

2.2.1 Starter kültür

Günümüzde fermente içecekler ve gıdalar; süt, et, sebze, meyve gibi geniş varyeteye sahip pek çok çiğ zirai üründen elde edilmektedir. Laktik asit bakterilerinin en önemli karakteristik özelliklerinden biri; süt şekeri olan laktozu kullanarak fermentasyon sonucunda laktik asit üretmeleridir. Bu reaksiyonu başlatan kültür ürüne öncelikli olarak verilir ki buna starter kültür denir. Peynir, krema, tereyağı, yoğurt gibi birçok ürün oluşumunda önemli görev üstlenirler. Hem organoleptik özellikler dediğimiz tat, koku gibi özelliklerin oluşumunu hem de fermentasyonu sağlarlar. Fermantatif özelliklerinin iyi bilinmesi ve pek çok alanı ilgilendiren iddialı özellikleri ile laktik asit bakterileri pek çok fermente ürün eldesinde starter kültür olarak kullanılmakta ve gıda üretim aşamalarında önemli bir görevi üstlenmektedirler (Wouters *et al.* 2002). Tarihte gıda fermentasyonu; çiğ materyalde, doğal floranın aktivitesi ile meydana gelen doğal bir süreç olarak belirtilmiştir. Daha sonra; kaliteyi arttırmak ve gıdaların her birinde farklı organoleptik dediğimiz tat, koku, görüntü gibi özellikleri yaratabilmek için değişik yöntemler uygulanmaya başlanmıştır. Uygun saklama koşulları, teknik manipülasyonlar ve ilave hızlandırılmış süreçler ile bu doğal fermentasyon şekilleri geliştirmiştir

Çizelge 2,1 Bazı starter kültürlerin taksanomisi

Eski ismi	Yeni ismi	Fonksiyonu	Ürün
Mezofilik starter kültür			
<i>S. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Asit üretimi	Krema, Süt
<i>S. cremoris</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Asit üretimi	Krema, Süt
<i>S. diacetylactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Asit üretimi	Peynir
<i>Leu. cremoris</i>	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Tat	Krema, Süt, Tereyağ
Termofilik starter kültür			
<i>S. thermophilus</i>	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Tat	Yoğurt, süt, Peynir
<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Tat ve asit	Yoğurt
<i>Lb. lactis</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>	Tat ve asit	Yoğurt, süt
<i>Lb. helveticus</i>	Değişim yok	Tat ve asit	Yoğurt, süt

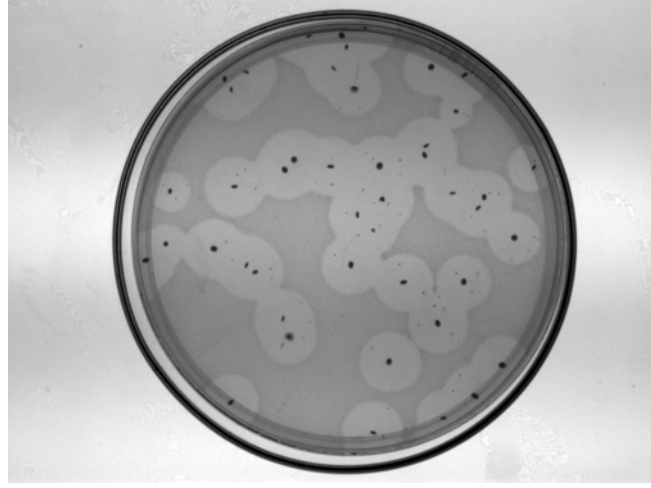
Mezofilik starter kültürler 26°C civarında gelişebilirler. Termofilik kültürler ise 42°C civarında gelişim gösteren bakterilerdir (Çizelge 2.1). Mezofilik starter kültürlerden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* laktik asit üretirken *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *Leuconostoc* sp. sitrik asit fermentasyonu gerçekleştirmektedir. Sonuçta aseton/diasetil ve CO₂ oluşmaktadır. Diasetil özellikle süt ürünlerinde tat oluşumu için önemlidir. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus helveticus* gibi termofilik starter kültürler yüksek pişirme sıcaklıklarına maruz kalan peynir gibi ürünlerin oluşumunda kullanılmaktadırlar (Cogan 1996).

2.2.2 Bakteriyosin üretimi

Gıda kaynaklı pek çok laktik asit bakterisi (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium* ve *Propionibacterium*) gıda fermentasyonunda kullanılan antimikrobiyal özellikleri ile bilinmektedir. Bunlar, fermente gıdalarda güvenilirliği sağlayarak raf ömrünü uzatmaktadırlar. Bu bakterilere ait metabolitlerin binlerce yıldan beri farklı fermente gıdalarda sağlık için hiçbir tehlikesi olmadığı, LAB'a ait antimikrobiyal metabolitlerin düzenleyici ajanlar olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, fermente gıdaların ve bazı LAB'ların tüketici sağlığı açısından doğal, sağlıklı ve yararlı etkileri oldukları bilinmektedir. LAB'a ait bazı metabolitler ve diğer starter kültür bakterileri gıdalarda gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Örneğin, laktik asit, diasetil, propiyonik asit ve asetik asit. Bununla beraber, gıda kökenli pek çok LAB gıda bozulmalarına ve gıda kökenli enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal etki gösteren ve "bakteriyosin" olarak isimlendirilen protein yapısında ekstraselüler maddeler sentezlemektedir (Klaenhammer 1988, Vuyst and Vandamme 1994, Hoover and Steenson 1993) (Şekil 2.1). Bakteriyosinler, üretici suşun bazı özel bağışıklık mekanizma(lar) ile ilişkili olarak hücre dışına salınan birincil veya gelişmiş bakteriyel ribozomal sentez ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bu bakteriyosinlerin çoğu küçük moleküler ağırlıklı proteinler olup bakterisidal etkilerini kendilerine yakın gruplara dahil bakteriler üzerinde göstermektedir (Çizelge 2.2). LAB'leri tarafından üretilen bakteriyosinler gıda bozulmalarına ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok gram pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte ve "biyokoruyucu" olarak isimlendirilmektedir (Klaenhammer 1988, Ray 1992)

Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. FDA tarafından onaylı olmalarına rağmen yapılan son çalışmalarda tüketici sağlığında çeşitli problemlere neden oldukları belirlenmiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan koruyucular insanlarda astım, damar problemleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle WHO tarafından belirlenen gıdalara yönelmişlerdir. Kimyasal gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular tercih edilmeye başlanmıştır. Bunların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır. Bunun nedeni ise; protein yapısında olan bu madde, sindirim sisteminde

bulunan ve proteinleri hidrolize eden enzimler tarafından parçalanmaktadır. Dolayısı ile uygun olan bakteriyosin ya da bakteriyosin üreten LAB'nin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. En iyi bilinen bakteriyosin Nisin olup; *Lc. lactis* tarafından üretilmektedir ve gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Pediocin de yine gıdalarda kullanılan biyolojik bir koruyucudur (Teuber 1995).



Şekil 2.1 Katı besi yeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu

LAB'e ait bakteriyosinler normalde sadece gram pozitif bakterileri inhibe ederler ve onların yaşam aralığı birbirinden oldukça farklıdır. Nisin ve pediocin AcH geniş inhibisyon spektrumunda etkin iken; sakacin ve leuconocin gibi diğerleri ise diğerlerine nazaran daha dar inhibisyon spektrumunda etkilidir. Gıdalarda bozulmaya ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan pek çok Gram-pozitif bakteriye karşı etki gösterirler (Ray 1992). Bu bakterilerin bazıları doğada anaerobik, fakültatif anaerobik ve psikrotroftiktir.

Farklı Gram-pozitif bakterilere ait bakterisidal proteinler, yapılarında mevcut olan modifiye amino asitlere göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; farklı aminoasitlerle tasarlanan “lantibiotikler” ve “nonlantibiotikler” (nonlanthionine bakteriyosinler) (Şekil 2.2). Lantibiotiklere örnek olarak nisin verilebilir. Yapısında translasyon sonrasındaki modifikasyon ile meydana gelmiş olan lanthionine (Ala- S-Ala), β -methyllanthionine (Abu-S-Ala) (Sülfür grubu içeren aminoasit) ile dehidroalanin (Dha) ve dehydrobutyric

acid (Dhb) gibi dehidra formdaki sıra dışı amino asitler yer almaktadır. Nonlanthionine bakteriyosinler ise küçük, ısıya dayanıklı bakteriyosinler olup yapısında bu sıra dışı amino asitleri bulundurmaz. Bu gruba örnek olarak pediocin AcH/PA-1 lactococcin A, lactococcin B ve sakacin A verilebilir. Bununla beraber, molekülün yapısında lanthioninlerin varlığı veya yokluğu ile bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrumları arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (Jack *et al.* 1995, Sahl *et al.* 1995).

Çizelge 2.2 LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri

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

Protein saflaştırılması ve gen teknolojisi ile nisin oluşumunun bazı moleküler detayları açığa kavuşmuştur (Vuyst and Vandamme 1994). Bakteriyosinin yapısal genlerinin yönlendirilmiş mutasyon (site-directed) için uygun olması sebebiyle antimikrobiyal aktivite veya geliştirilerek dayanıklılık kazandırılmış yeni peptit familyalarının yapımı mümkün görünmektedir (Miller *et al.* 1998).

Nisin A (34 amino acids)

Ile-Dhb-Ala-Ile-Dha-Leu-Ala-Abu-Pro-Gly-Ala-Lys-Abu-Gly-Ala-Leu-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Lys-Abu-Ala-Abu-Ala-His-Ala-Ser-Ile-His-Val-Dha-Lys

Pediocin AcH or PA-1 (44 amino acids)

Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Thr-Cys-Gly-Lys-His-Ser-Cys-Ser-Val-Asp-Trp-Gly-Lys-Ala-Thr-Thr-Cys-Ile-Ile-Asn-Asn-Gly-Ala-Met-Ala-Trp-Ala-Thr-Gly-Gly-His-Gln-Gly-Asn-His-Lys-Cys

Leucocin A (37 amino acids)

Lys-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-His-Cys-Thr-Lys-Ser-Gly-Cys-Ser-Val-Asn-Trp-Gly-Glu-Ala-Phe-Ser-Ala-Gly-Val-His-Arg-Leu-Ala-Asn-Gly-Gly-Asn-Gly-Phe-Trp

Sakacin A (41 amino acids)

Ala-Arg-Ser-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Tyr-Cys-Asn-Asn-Lys-Lys-Cys-Trp-Val-Asn-Arg-Gly-Glu-Ala-Thr-Gln-Ser-Ile-Ile-Gly-Gly-Met-Ile-Ser-Gly-Trp-Ala-Ser-Gly-Leu-Ala-Gly-Met

Şekil 2.2 *Lactococcus lactis* tarafından üretilen ve bir lanthionine (Ala-S-Ala) olan nisin bakteriyosini ile üç nonlanthionine bakteriyosini (*Pediococcus acidilactici* tarafından üretilen pediocin PA-1/AcH, *Leuconostoc gelidum* tarafından üretilen leucocin A ve *Lactobacillus sake* tarafından üretilen sakacin A). Nonlanthionine bakteriyosinlerin tamamı yapılarında muhtemelen disulfide (-S-S-) bağlarına sahipler.

Kaynak: Ray 1996

2.2.3 Probiyotik

Probiyotik kelimesi; Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk defa 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Tarihten günümüze kadar birçok anlamda açıklanan bu terim son olarak 1999’da Kneifel tarafından; vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmışlardır (Kneifel *et al.* 1999).

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında Nobel ödül sahibi; Rus Bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* sp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente ürünler üzerinde yapılan çalışmaların başlangıcı çok eskilere dayanmakla birlikte, probiyotikler konusunda yapılan çalışmalar ancak son 10–15 yılda hız kazanmıştır .

Laktik asit bakterileri, bağırsak florasına olumlu etkileri ile bağışıklık sistemini kuvvetlendirerek, vücudun doğal savunmasını güçlendirir. Yararlı bakteriler olarak bilinen bu organizmalar, bağırsak sisteminde yaşayarak beslenmeye olumlu etkide bulunur ve vücudu hastalıklara karşı korur. Ancak bunu yapabilmeleri için bu bakterilerin mideden geçerken canlı kalabilmeleri ve böylece bağırsaklarda gelişme olanağı bulabilmeleri gerekmektedir. Şu ana kadar bilinen laktik asit bakteri kültürleri, örneğin klasik yoğurdun içinde bulunanlar, mide asidi ve safra kesesi tuzları tarafından kolaylıkla zarar görür ve bu yüzden de etkilerini yitirir. *Lactobacillus bulgaricus* olarak bilinen klasik yoğurt mayasının laktik asit bakterilerininin 10 000 tanesinden yalnızca 1’i bağırsaklara ulaşabilmekte ve çok az canlı kalabilmektedir.

Probiyotik içerikli ürünler Japonya, Uzakdoğu ülkeleri ve Avrupa Birliğine üye olan ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde ise son yıllarda bu ürünlere olan ilgi giderek artmıştır. İnsan tüketimi için hazırlanmış çok fazla

sayıda ticari probiyotik preparatı bulunmaktadır. Sadece birkaç tanesinin fonksiyonel gıda bileşeni olarak yararlı etkisi kanıtlanmıştır. *Lactobacillus casei shirota* suşu ticari olarak satışa sunulanların en eskisi olup, 1930 yılında Japonya’da izole edilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Ticari olarak satılan bazı probiyotik ürünler

Ürün adı	Mikroorganizma	Kategori	Ülke
VITAGEN	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Fermente içecek	Malezya
LEVENIN	<i>Enterococcus faecalis</i>	Süt tozu	Japonya
BİO-GRADE	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Fermente süt	Avustralya
LC1	<i>Lactobacillus casei</i>	Yoğurt	Türkiye
VENTRUX	<i>Streptococcus faecium</i>	Kapsül	İsveç
LACTINEX	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Toz	USA

Üçüncü milenyumun başında özellikle gelişmiş ülkelerde alerjik hastalıklar, astım, barsak hastalıkları, diabet gibi hastalıkların önemli düzeyde yükseldiği görülmektedir. Bu hastalıkların barsak bariyer işlevinin bozulması ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Probiyotikler ise, endojen mikrofloranın özelliklerini geliştirerek konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır. Bu nedenle probiyotik bakteri kültürlerinin karakteristik özelliklerinin tanımlanmasına ve etkinlik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların süregelmesinin önemi üzerinde durulmaktadır. Özellikle gen teknolojisinin yeni kültürlerin gelişiminde önemli rol oynayabileceği, probiyotik bakterilerin işlevselliği ve etkinlik mekanizmalarının daha iyi belirlenebileceği ve açıklığa kavuşturulabileceği belirtilmektedir.

2.2.4 Ekzopolisakkarit üretimi

Karbonhidrat metabolizması birçok bakteri türünde enerji ve biyokütle üretimine ilaveten ekzopolisakkarit üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır.

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

2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Metotlar

LAB lerinin 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.

LAB'lerinin tanımlanmasında kullanılan modern taksonomik metotlar 2 ana başlık altında toplanabilir; **fenotipik metotlar** ve **genotipik metotlar**.

Fenotipik metotlar suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürününü karakterize etmektedir (gözlemlenebilir karakterler). Morfolojik, fizyolojik, metabolik/ biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hüresel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininler, poliaminler, hücre duvarı bileşikleri, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternlerinin (1D ya da 2D) tümü fenotipik özelliklere örnek teşkil etmektedir.

Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler cins tanımlamalarında kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermantasyonu gibi biyokimyasal testler fenotipik testler olarak kullanılmakta ve tür bazında ayırım sağlamaktadır (Khaled *et al.* 1997, Falsen *et al.* 1999). Kullanışlı olmasına rağmen bazı dezavantajları da bulunmaktadır, *türler arası varyasyonlar ve tekrarlanabilirliğinin zayıf olması gibi*. Bununla birlikte; standardize edilmiş sonuçlardan oluşturulmuş veri

tabanlarından hazırlanmış ticari amaçlı sistemler (örneğin API CH 50) yüksek sayıdaki suşların tanımlanmasında kullanılmakla beraber *yeni özellik kazanmış türlerin veya alt türlerin tanımlanmasında bu veri tabanı yetersiz kalmaktadır*. Şimdiye kadar tanımlamada kullanılan fermentasyon özellikleri ve API Kıt prensibine dayalı biyokimyasal testler tür ve cins bazında ayrımı sağlarken; tanımlamada kullanılan fenotipik testler arasında en güvenilir yöntemin protein profil analizi olduğu belirtilmiştir. Laktik asit bakterilerinde en iyi bilindik türlere ait protein patern databankası oluşturularak bu problemin de üstesinden gelinmeye çalışılmıştır (Pot *et al.* 1993). SDS-PAGE sisteminde elde edilen toplam hücre protein profillerinin kıyaslanması tür ve alt tür bazında identifikasyon için oldukça güvenilir bir yöntem olmakla beraber bazı türler için, protein profilinden elde edilen ayırım gücü limitlidir. Dolayısıyla, protein profiline dayalı tiplendirme tekniğinin *yeterli olmadığı ve doğruluğunu kanıtlamak için moleküler testlere ihtiyaç duyulduğu* belirtilmiştir (Temmerman *et al.* 2004).

LAB identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayrımı için halen önemli bir rol oynasa da yorumlaması oldukça zor olan bu teknikler aynı zamanda zaman alıcı ve moleküler metotlar ile karşılaştırıldıklarında ise daha az ayırım gücüne sahiplerdir (Temmerman *et al.* 2004). Bununla beraber, fenotipik testler ile gen ekspresyonunun ürünü karakterize edildiğinden bu özelliklerin hepsi spontan mutasyon ve büyüme koşullarındaki değişimler neticesinde değişim göstermeye meyillidirler. Laktik Asit Bakterilerinin çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı LAB lerin tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe uyandırıcıdır. Bununla beraber büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanımlama işlemlerinde zorluk yaratmaktadırlar. Bu kriterler kaba bir tanımlama amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir identifikasyon amacına yönelik değildir. Bundan dolayıdır ki LAB lerinin cins ve tür bazında tanımlanmalarında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış identifikasyonlara ve hayal kırıklığı yaratan 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, organizmanın genetik yapısının analizini temel alan metotlar olup DNA'yı yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon paternlerindeki polimorfizmini ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu içeren çalışmalardır. DNA temelli teknikler, 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 *et al.* 1998; Bush and Nitschko 1999). Bununla beraber, kromozomal DNA molekülünün insersiyon ve delesyonu, ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına veya var olan kesim bölgelerinin elimine olmasına sebep olan rastgele mutasyonlardan etkilenmekle beraber genotipik metotlar doğal varyasyona daha az maruz kalmaktadırlar. *Fenotipik ya da genotipik olsun, tüm tiplendirme sistemleri yorum ve performans rahatlığı, ayırım gücü, üretilebilirlik ve tiplendirilebilirlik bakımından karakterize edilmektedir.*

Suşların tiplendirilmesinde kullanılan genotipik metotlar arasında ribotyping, pilazmit DNA veya genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizleri (RFLP, PFGE), prop kullanılan teknolojiler, sekansa bağlı teknikler (PFGE ile indirek genetik sekans ölçümü ve MLST gibi çoklu lokus sekans tiplendirme) ve PCR temelli teknikler (RAPD, AFLP, ARDRA, AP-PCR, rep-PCR gibi) yer almaktadır (Vandamme *et al.* 1996).

Kesime uğramış kromozomal DNA'nın **PFGE** (Pulsed field gel electrophoresis)'si sergilemiş olduğu yüksek ayırım gücü ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerinden dolayı moleküler tiplendirme metotları arasında "altın standart" olarak ifade edilmektedir (Ehrmann and Vogel 2005). Dolayısıyla, son zamanlarda, PFGE ile DNA parmakizi tiplendirmeleri büyük restriksiyon fragmentlerinin karşılaştırılmasına imkan vererek çeşitli LAB suş tiplendirmelerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Moschetti *et al.* 2001). Bununla beraber, oldukça fazla zaman/iş gücü harcanmasını gerekli kılan bu

metot aynı zamanda da türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmaktadır (farklı restriksiyon enzimleri ve elektroforez koşulları) ve dolayısıyla genelde tür içi (intra-species) ayırım veya ilişkilerin ortaya konulmasında kullanılmaktadır (Bush and Nitschko 1999).

PCR bağımsız bir diğer yöntem olan **ribotiplendirme**, kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizini rDNA prop kullanımı ile birleştirmekte, dolayısıyla çeşitli türler arasında ayırım sağlayabilmektedir. Metodun ayırım gücü kullanılan oligonükleotit propların ve restriksiyon enzimlerinin sayısına ve tipine bağlıdır (Farber 1996).

Aynı türe ait olan suşların sahip oldukları pilazmitlerin sayı ve büyüklüklerindeki varyasyonlar, **pilazmit profilleri**, LAB'lerin tiplendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir çünkü bu gruba ait suşların çoğu birçok pilazmit içermektedir. Bununla beraber, yaşam süreçleri boyunca bu suşların kazandıkları ve kaybettikleri pilazmitler yöntemin güvenilirliğini etkilemektedir (Duffner and O'Connell 1995).

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

PCR teknolojisi ile **16S rDNA genlerinin direk sekansı** bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla beraber bazı güçlükler de mevcuttur, örneğin, çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi (Ehrmann and Vogel 2005).

RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) parmak izi analizi LAB'lerin identifikasyonunda uzun zamandır kullanılan PCR-temelli bir tekniktir. Genetik parmakizi için polimorfizmin hızlı bir şekilde belirlenmesi anlamına gelir. Hızlıca çoğaltılan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezinde gözlenir. Diğer moleküler genetik yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. Kullanılan primer sayısı arttıkça

ayırım gücü artar (Ehrmann and Vogel 2005). LAB'lerinin türler arası ayırımında, bazı türlerin (enterococci, pediococci ve lactobacilli) tür içi ayırımında ve gıdalardan izole edilen suşların cins bazında ayırımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Cocconelli *et al.* 1995, Cocconelli *et al.* 1997, Taillez *et al.* 1996). Bununla beraber, yüksek ayırım gücüne sahip primerler ile LAB türlerinden oluşan geniş bir grup içerisindeki geniş uygulanabilirliği henüz tanımlanmamıştır. Bununla beraber, RAPD primerleri belirli bir genetik lokusa spesifik olmadığından, elde edilen bant paternleri zayıftır ve deneyler arası sonuçların tekrarlanabilirliği açısından teknik yetersizdir. Standardize edilmediği sürece bir tanımlama veri tabanının oluşturulması için RAPD uygun bir yöntem değildir (Ehrmann and Vogel, 2005).

Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan **ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)** tekniğinde türe özgü spesifik primerlerin kullanımı ile 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır (Andrighetto *et al.* 1998). Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilir (Bouton *et al.* 2002). Sonuçta oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya gidilir. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır.

DNA molekülünün restriksiyon enzimlerinden bir veya birkaçı ile kesimi neticesinde agaroz jel elektroforezinde gözlemlenen DNA bantlarının yeri ve sayısının kıyaslanması ile elde edilen çeşitliliğe **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** denmektedir. RFLP yöntemi kolaylıkla uygulanabilen duyarlı bir yöntemdir. Ancak enzim seçimi önemlidir. RFLP analizi bakteriyal kromozom ve ekstra kromozomal DNA'nın restriksiyon profillerini belirlemede kullanılır (Sato *et al.* 2000).

Bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine rastgele seçilen bir ya da daha fazla primer kullanımı ile DNA molekülü üzerindeki birçok bölgenin çoğaltılması **AP-PCR (Arbitrarily Primed-PCR)** işlemi ile gerçekleşmektedir. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G+C bakımından zengindir. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerleri, sayısı ve birbirlerine olan uzaklıkları

değişik olacağından agaroz elektroforezinde çoğaltılan parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. 1990 yılında Welsh ve Mc. Cleland tarafından tanımlanan bu yöntem 1500'den fazla araştırmacı tarafından kaynak gösterilmiş olup her türlü mikroorganizmanın analizinde kullanılmaktadır (Welsh and Mc. Cleland 1990). Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir. Yöntemin en önemli dezavantajı ise henüz standardizasyonunun sağlanamamış olmasıdır.

Rep-PCR (Repetitive extragenic palindrome) bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda rep (Repetitive extragenic palindrome) olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) olarak ifade edilen sekansları şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PCR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden biridir (Van der Zee *et al.* 1999). Bununla birlikte PFGE ile karşılaştırıldığında daha düşük bir ayırım gücüne sahip olduğu gözlenmiştir (Olive and Bean 1999).

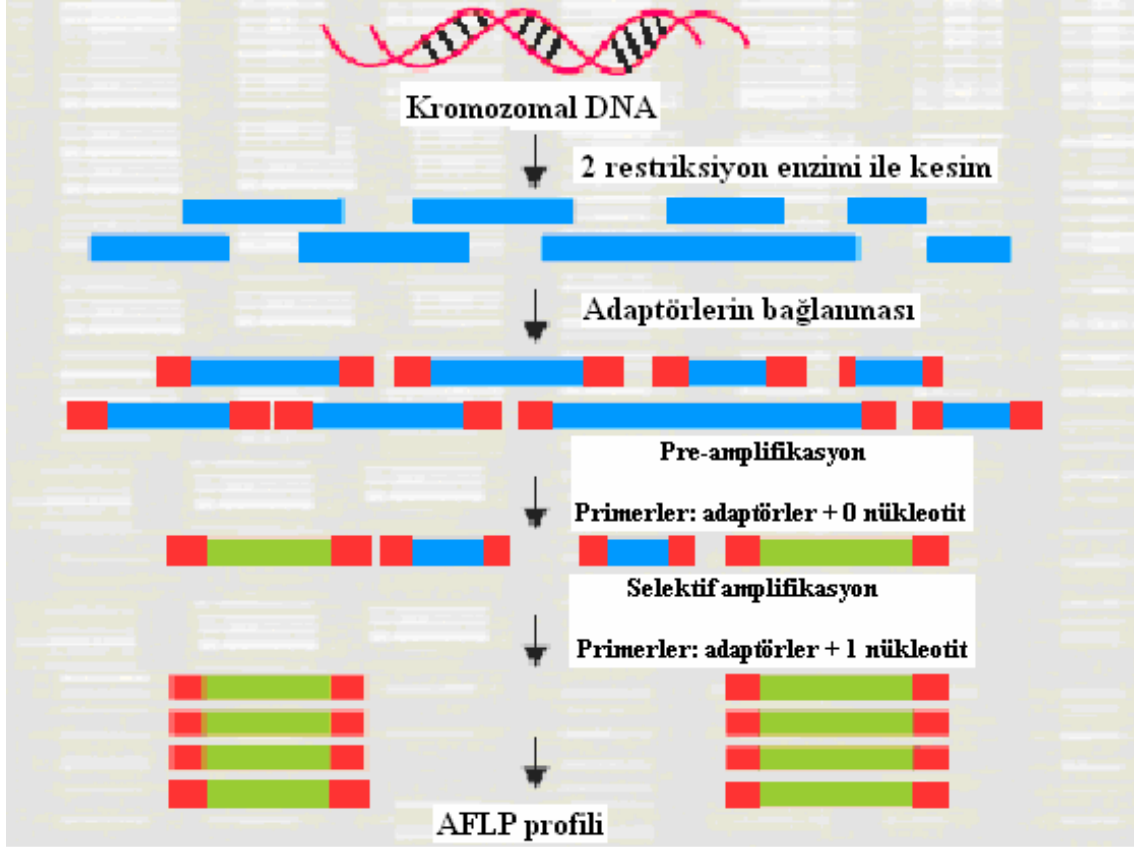
2.3.1 AFLP Tekniği ile Moleküler Karakterizasyon

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. AFLP; genetik markör teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir. Genomik tiplendirme teknikleri, birbirine çok yakın akraba türlerin tespiti, türlerin tanımlanması ve ayırımı, starter kültür analizleri, gıdalarda bozulmalara

ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan önemli mikroorganizmaların karakterizasyonlarında kullanılarak önem kazanmıştır.

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

AFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon endonükleazların her biri DNA üzerinde spesifik bir bölgeyi veya sekansı tanımakta ve kesim işlemi neticesinde DNA fragmanları meydana gelmektedir. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına pre-selektif amplifikasyon adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere artırılır (Şekil 2.3). Genelde her bir AFLP reaksiyonunda yaklaşık 30-80 restriksiyon fragmanı beraber amplifiye olduğundan ve denatüre koşullarda gerçekleşen jel elektroforez sisteminde tespit edilebildiklerinden teknik DNA polimorfizmin tespiti için oldukça güçlüdür. Tür ve alt tür seviyesinde ayırım sağlayan bu tekniğin kullanımı diğer DNA tiplendirme metotlarına kıyasla sergilemiş olduğu avantajlardan dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Tekniğin çok geniş bir alanı taraması, az miktarda işgücüne gereksinim duyması, kısa sürede neticelenmesi ve yorumlanabilmesinin oldukça kolay oluşu en temel avantajlarından olup bu yeni tekniğe olan ilgiyi arttırmaktadır. Bununla beraber, analiz için gerekli olan DNA miktarı çok az olmakla beraber ulaşılan bilgi oldukça fazladır. Analiz öncesi DNA sekansına ait bir bilgiye gerek yoktur ve diğer tekniklere kıyasla AFLP'nin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir (Çizelge 2.4).



Şekil 2.3 AFLP tekniğinin çalışma prensipi

Janssen ve ark.ları (1996) bakteriyel genomda AFLP analizinin öncüleridir. Bu çalışmalarında, bakteriyel taksonominin belirlenmesinde yeni bir araç olan AFLP ile 9 değişik tür bakterinin 147 suşu ile çalışmış ve bilgisayarla bu suşlara ait data analizlerini yapmıştır. Farklı türleri ayırmada kullanılan değişik restriksiyon enzimlerinin ve selektif primerlerin AFLP analizinin ayırma gücündeki başarısını araştırmıştır. Bu suşlar ile yapılan uygulama AFLP analizinin evrimsel çalışmalardaki potansiyelini ortaya koymuştur. Daha sonra yapılan çalışmalar için Janssen P.'nin bu çalışması temel teşkil etmiştir.

Çizelge 2.4 AFLP tekniğın avantaj ve dezavantajları

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
AFLP ile tüm genoma ait polimorfizm kısa sürede taranabilir	AFLP bilgisayar teknolojisi ve otomatik analizlere ihtiyaç duyan bir tekniktir
Çok fazla bant tanımlandığı için her markör parmakızı hakkında oldukça fazla bilgi vermektedir	Data analizlerinde ve laboratuvar çalışmalarında dikkat isteyen bir çalışmadır
Oldukça güvenilir bir tekniktir.	Genetik haritalamada sentromer ve telomerlerde kümelenme oluşturabilir
Önceden herhangi bir sekans bilgisine ya da prob ile ilgili soy bilgisine gereksinim duymaz	
Hızlı bir şekilde genetik harita yapımına uygundur	

Lin ve ark.ları (1996) AFLP yöntemini kullanarak *E.coli* ve *Agrobacterium tumefaciens* bakterilerine ait farklı suşları analiz etmişlerdir. Çalışmanın sonunda *Agrobacterium tumefaciens* suşlarının analizi için kullandıkları bu moleküler tanımlama yönteminin, Ti plazmidine dayalı fenotipik tanımlama yönteminden daha iyi bir tanımlama sonucu verdiğini tespit etmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada ise, Anthrax hastalığına neden olan *Bacillus anthracis*'in moleküler tanımlanmasını araştırmak amacıyla AFLP tekniği kullanılmıştır. DNA markörleri ile 78 *Bacillus anthracis* izolatu ve 6 tane farklı *Bacillus* türüne ait izolatlar analiz edilmiştir. Bunun sonucunda *B.cereus-B.thuringensis* ve *Bacillus anthracis* arasında çok uzak bir takson ilişkisi gözlenmiştir (Keim *et al.* 1997).

Arias ve ark.ları (1997) farklı coğrafik bölgelerden ve kaynaklardan izole edilen toplam 80 adet *Vibrio vulnificus* izolatu (bunlardan 44 tanesi Bio tip I ve 36 tanesi Bio tip II olmak üzere) intraspesifik genomik akrabalıklarını incelemek için AFLP parmak izi ve ribotiplendirme tekniklerini kullanmışlardır. Bio tip I suşları içerisinde 16 adet farklı

linik ve çevresel kaynaklı ribotip bulmuşlardır. Bu iki farklı biyotip arasında suşların % 96'sının aynı ribopaternleri gösterdiği sonucuna varmışlardır. Patojenik izolatlar arasında en iyi sonuç veren teknik *HindIII- TaqI* ile kesim neticesinde selektif PCR işlemine dayanan AFLP tekniği olmuştur.

Koeleman ve ark.ları (1998) 18 tanesi genomik, 13 tanesi ise klinik izolat olmak üzere toplam 31 adet *Acinetobacter* türüne ait suşların ARDRA, RAPD, AFLP parmak izi sonuçlarını karşılaştırmıştır. ARDRA yöntemi 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.

Savelkoul ve ark.ları (1999) yeni bir teknik olan AFLP ile ilgili yaptıkları araştırmada; geniş bir uygulama alanına sahip olan AFLP analizinin genotipik metotlar arasında, yüksek oranda tekrarlanabilir olmasının yanında yüksek ayırma gücüne sahip olduğunu, taksonomi, epidemiyoloji ve diagnostikte çok geniş uygulama alanı bulunduğu sonucuna ulaşmışlardır. AFLP'nin benzer kaynaklardan izole edilen numunelerde tür, alttür, suş bazında daha iyi ayırım yaptığını ve PFGE gibi, yüksek seviyede intraspesifik ayırma özelliği klinik ve çevresel kaynaklı izolatlarda etkili olduğunu bulmuşlardır. AFLP tekniğinin tek bir suşun bile görüntülenmesinde kullanılabilecek en ayırt edici araçlardan biri olduğunu ve bu nedenle iyi bir genetik işaretleyici olduğunu belirtmişlerdir.

Huys ve ark. (2000) AFLP tekniğinin kullanımı ile 17 adet *Mycobacterium bovis*, 15 adet *M. tuberculosis* ve 12 adet *M. ulcerans* arasındaki tür içi ve türler arası evrimsel ayrımı analiz etmişlerdir. *M. ulcerans* suşlarının ayırımında AFLP çok iyi sonuçlar vermiştir. Evrimsel grupların oluşturulmasında Pearson korelasyon katsayısı yerine banda bağlı Dice korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Fenotipik olarak tanımlanan *Mycobacterium bovis* ve *M. tuberculosis* kesin olarak iki AFLP markör bandı ile tanımlanmıştır. *M. ulcerans* izolatlarının ise tek AFLP markör bandının varlığına bağlı olarak Afrika ve Avustralya orjinleri ile aynı klona sahip olabilecekleri vurgulanmıştır.

Kunene ve ark.ları (2000) laktik asit bakterilerinin karakterizasyonları üzerine yapmış oldukları çalışmalarında 180 adet laktik asit bakterisi (58 tane *Lb plantarum*, 47 adet *Leu. mesenterioides*, 25 adet *Lb. sake-Lb. curvanis*, 17 adet *Ped. pentosaceus*, 13 adet *Ped. acidilactisi*, 7 adet *Lc lactis* suşu) kullanmışlardır. AFLP analizi ile bu LAB'lerine ait suşlar arasında güçlü bir ayırım sağlanmıştır. PCR protokollerine göre yapılan AFLP prosedürü sonucunda bu teknik ile suşlarda tek nokta mutasyonunun bile belirlenebileceğini ortaya koymuşlardır.

Torriani ve ark.ları (2001), RAPD PCR ve AFLP analizleri ile *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* türleri arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için yapmış oldukları çalışmada; genotipik metotların çalışılan türler içinde çok yüksek ayırım gücüne sahip olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca RAPD PCR ve AFLP tekniklerinin her ikisinin de tür-suş bazında tanımlamaya imkan verdiğini ancak tekrarlanabilir olmasından dolayı AFLP'nin daha avantajlı olduğunu vurgulamışlardır.

Ventura ve Zink (2002) *Lactobacillus johnsonii* suşlarına ait moleküler tiplendirme analizlerini ve spesifik tanımlanmasını PCR'a bağlı metotlar ile gerçekleştirmişlerdir. Kromozomal DNA'nın *EcoRI* ve *MseI* enzimleri ile kesimi neticesinde 200-1000bp arasında yaklaşık 200 farklı bant elde edilmiştir. Sonuçlar UPGMA analizleri ile değerlendirilmiş ve A1'den A7'ye kadar isimlendirilen 7 farklı küme elde etmişlerdir.

Coeuret ve ark.ları (2003) peynir ve günlük süt ürünlerinden izole ettikleri 80'den fazla *Lactobacillus* türünü tanımlamak ve karakterize etmek amacıyla moleküler tekniklerden faydalanmışlardır. AFLP tekniğinde DNA fragmanlarını elde etmek için iki restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır. Böylece oluşan yapışkan uçlara uygun adaptörler bağlanarak PCR 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 grup, suş, tür olarak sıralamıştır. RAPD PCR 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.

Jureen ve ark.ları (2004) yapmış oldukları çalışmada amfisiline dirençli, hastane kaynaklı *Enterococcus faecium* suşları için PFGE ve AFLP tekniğini kullanarak bu iki tekniği Simpson indeksi ile değerlendirmiş ve karşılaştırmıştır.

Dellaglio ve ark.ları (2005) Hint günlük süt ürünlerinde yapmış oldukları çalışmalarında bu ürünlerden 4 adet suş izole etmişler ve bunları öncelikle *Lactobacillus delbrueckii* diye tanımlamışlardır. Ancak alttür tanımlamaya gidildiğinde moleküler kimliği ve fenotipik karakterleri bilinen alt türlere uyum sağlanamadığı için AFLP, RAPD, 16S rRNA gibi genotipik metotlar kullanarak alttür tanımlamasını yapmış ve izole ettikleri bu suşu NCC 7255 olarak adlandırmışlardır.

Laursen ve ark.larının (2005) deniz ürünleri ve etten izole etmiş oldukları ve *Carnobacterium divergens* ve *Carnobacterium maltaromaticum* türlerinin fenotipik/genotipik karakterizasyonlarını belirlemeye yönelik yapmış oldukları çalışmalarında AFLP tekniğini kullanmışlardır. AFLP ile *C. divergens* için iki farklı kümelenme, *C. maltaromaticum* için bir tane daha önceden tespit edilmemiş kümelenmenin olduğu tespit edilmiştir. Bu kümelenmelerin bulunduğu izolatlar oldukça geniş etki spektrumuna sahip olduğu ve bakteriyosin ürettikleri için bu izolatların biyolojik koruyucu olabileceği belirlenmiştir.

Sow ve ark.ları (2005) toprak ve kurutulmuş tavuk posasından iki tanesi sıcaklığa toleranslı olmak üzere toplam 20 adet laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. Bunlar gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob, hareketsiz ve spor oluşturmeyen çubuk şeklinde olarak tanımlanmıştır. Örnekler birden yirmiye kadar numaralandırılmış, ancak *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanan 4. ve 20. örnekler AFLP analizi neticesinde *Lactobacillus plantarum* grubuna dahil edilememiştir. 16 S rDNA çalışmalarında ise bu iki örneğin *L.pentosus* ile benzerlik gösterdiği gözlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 MATERYAL

3.1.1 Bakteri kültürleri

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği ile genotip analizleri yapılacak olan ve Laktik Asit Bakteri (LAB) grubuna ait olan (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*) ve fenotipik yöntemler/ API CH50 kit kullanımı ile identifikasyonları yapılmış farklı türler Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Çizelge 3. 1).

3.1.2 Besiyerleri

LAB'lerin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin içerikleri **EK 1**'de verilmiştir.

3.1.3 DNA izolasyon ve AFLP kiti

Çalışmada kullanılan kitler **EK 2**'de verilmiştir.

3.1.4 Tampon ve solüsyonlar

Çalışmada kullanılan tampon ve solüsyonların hazırlanışı **EK 3**'de verilmiştir.

3.1.5 Moleküler markörler

Çalışma süresince kullanılan DNA markörleri **EK 4**'de verilmiştir.

3.1.6 Kimyasallar

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

3.1.7 Kullanılan solüsyon ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmamızda kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 185°C'de 1 saat pastör fırını kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamları ve solüsyonlar için ise 121°C'de 15 dakika otoklav kullanılarak sterilizasyon sağlanmıştır.

3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz bakteri kültürleri Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Bu bakteri kültürleri %50'lik gliserol solüsyonu içinde çözünmüş olarak -20°C'de saklı tutulmaktadır.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri

	Bakteri	Kaynak
A.	<i>Enterococcus</i>	
1.	<i>Enterococcus avium</i> ATCC Pasteur	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2.	<i>Enterococcus casseliflavus</i> NRLL 3502	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3.	<i>Enterococcus durans</i> RSKK 05034	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4.	<i>Enterococcus faecalis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	<i>Enterococcus faecalis</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
6.	<i>Enterococcus faecalis</i> E27	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
7.	<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
8.	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
9.	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
10.	<i>Enterococcus faecium</i> F1	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
11.	<i>Enterococcus faecium</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
B.	<i>Lactococcus</i>	
1.	<i>Lactococcus lactis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
2.	<i>Lactococcus lactis</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
3.	<i>Lactococcus lactis</i> OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
4.	<i>Lactococcus lactis</i> OZ4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	<i>Lactococcus lactis</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
6.	<i>Lactococcus lactis</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
7.	<i>Lactococcus lactis</i> W3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

8	<i>Lactococcus lactis</i> PK1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
9.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
10.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B634	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
C. <i>Pediococcus</i>		
1.	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
2.	<i>Pediococcus acidilactici</i> 2 N 10P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
3.	<i>Pediococcus acidilactici</i> E2++	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
4.	<i>Pediococcus acidilactici</i> RS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	<i>Pediococcus acidilactici</i> AB6	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
6.	<i>Pediococcus acidilactici</i> F2+	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
7.	<i>Pediococcus acidilactici</i> E++	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
8.	<i>Pediococcus accidilactici cereviciae</i> ATCC 666	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
9.	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
10.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
11.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
12.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
13.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
14.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
15.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
16.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

17.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
18.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
19.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
20.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
21.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
22.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
23.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
24.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
25.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
26.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> MCO31	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
27.	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 345	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
D. <i>Leuconostoc</i>		
1.	<i>Leuconostoc lysis</i>	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
2.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B3469	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu RSKK 1061
4.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
5.	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
6.	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
7.	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

8.	<i>Leuconostoc sp.</i> OZA	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
E. <i>Lactobacillus</i>		
1.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2.	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
3.	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
4.	<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRLL B1837	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
5.	<i>Lactobacillus caseii</i> RSKK 706	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
6.	<i>Lactobacillus caseii</i> CG1	ODTÜ Gıda Mühendisliği
7.	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
8.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
9.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
10.	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
11.	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
12.	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
13.	<i>Lactobacillus maltoramicus</i> NRLL148532	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
14.	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
15.	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
16.	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	ODTÜ Gıda Mühendisliği
17.	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
18.	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu

19.	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
20.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	ODTÜ Gıda Mühendisliği
21.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	ODTÜ Gıda Mühendisliği
22.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	ODTÜ Gıda Mühendisliği
23.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	ODTÜ Gıda Mühendisliği
24.	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	ODTÜ Gıda Mühendisliği
25.	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	ODTÜ Gıda Mühendisliği
26.	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
27.	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
28.	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
29.	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu
30.	<i>Lactobacillus rhamnasus</i> TK 2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonu

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi

-86°C’de muhafaza edilen bakteri stok kültürlerinden gelişimleri için uygun olan steril besiyerlerine ardı ardına 2 kere aktifleştirme işlemi yapıldıktan sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürlerin saflığı daha sonra katı besiyerine çizgi ekim yapılmak suretiyle kontrol edilmiş ve kültürler DNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir. Çalışmış olduğumuz bakteri gruplarından *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leucononostoc* cinslerine ait olan türler TGE besiyerinde (**EK1**) 32°C’de, *Lactobacillus* cinsine ait olan türler ise MRS besiyerinde (**EK1**) 30°C’de geliştirilmiştir.

3.2.2. AFLP Reaksiyonu

AFLP teknolojisi klasik hibridizasyon- ve PCR-tabanlı parmak izi çalışmalarını temel almaktadır. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına *pre-selektif amplifikasyon* adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılır (*selektif amplifikasyon*) ve amplifiye edilen fragmanlar parmakizi yaratmak için denatüre koşullarda gerçekleşen poliakrilamit jel elektroforezde analiz edilir.

Üç temel basamakta gerçekleşecek olan AFLP reaksiyonları Vos ve ark.larının (1995) metodunu temel alan hazır AFLP analiz kit (INVITROGEN, AFLP analysis system for microorganisms) kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. **1.** Laktik asit bakterilerinden kit kullanımı ile kromozomal DNA izolasyonu; **2.** Kit kullanımı buz üzerinde DNA'ların restriksiyon endonükleazlar ile kesimi ve adaptörlerin eklenmesi (Restriksiyon ve Ligasyon), preamplifikasyon ve selektif amplifikasyon; **3.** Numunelerin denatüre poliakrilamit jel elektroforez sisteminde yürütülerek sonuçların skorlanması ve dendogramın çıkarılması.

3.2.2.1 DNA izolasyonu

Kromozomal DNA izolasyonu: LAB grubuna ait olan ve çalışmamızda kullanmış olduğumuz toplam 86 adet suştan PROMEGA Wizard Kromozomal DNA Purifikasyon Kit kullanımı ile kromozomal DNA izole edilmiştir. İzolasyon için üretici firmanın öngörmüş olduğu protokol takip edilmiş ve bu protokol üzerinden optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. DNA numuneleri izole edildikten sonra 25µl ultra saf su (ultra saf PCR suyu) içerisinde çözünerek bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

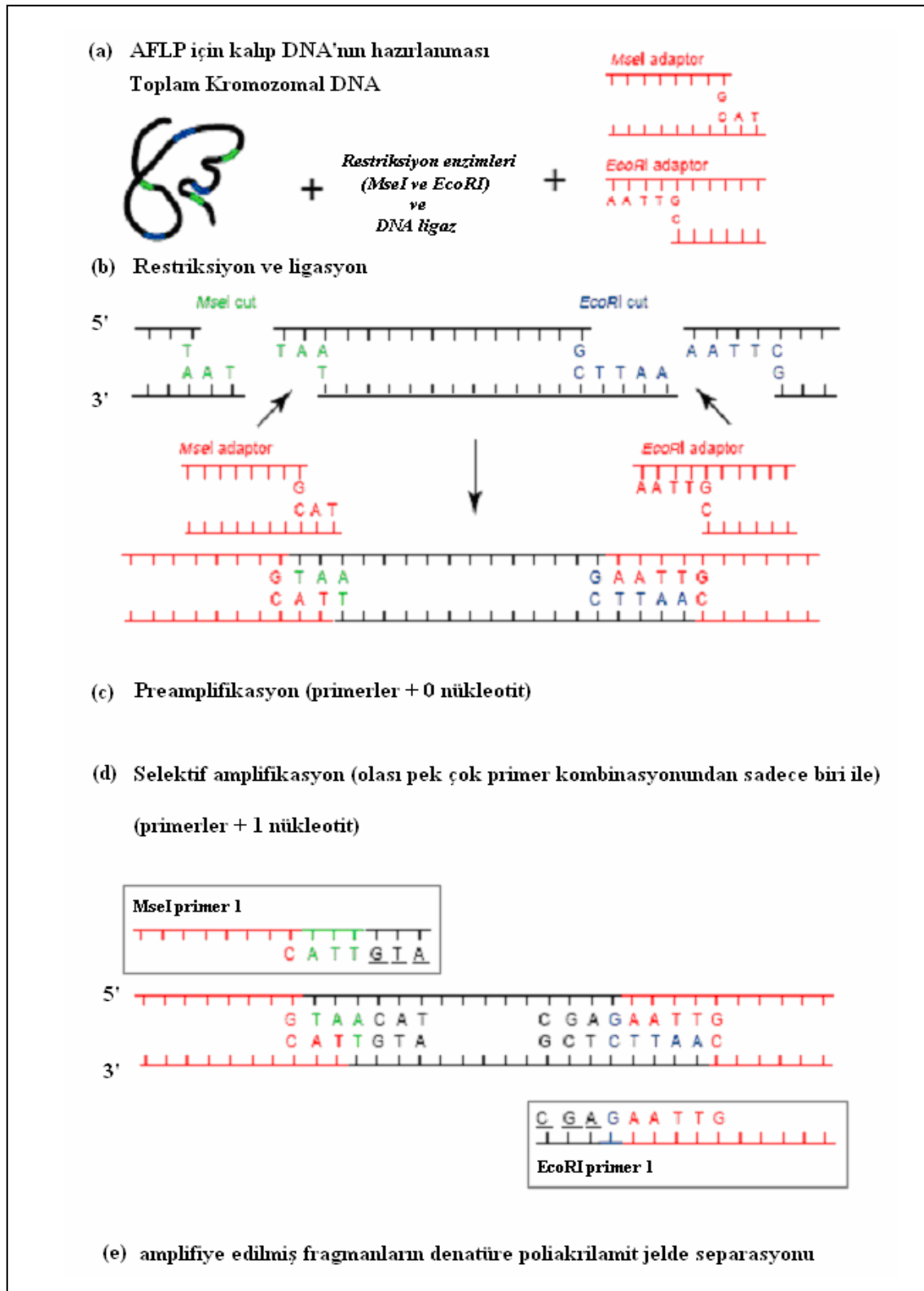
Safılık ve miktar tayini: PROMEGA Wizard Kromozomal DNA Purifikasyon Kit sistemi kullanılarak izole edilen DNA numunelerinin kalite ve miktar tayinleri

NANODROP spektrofotometrenin kullanımı ile yapılmıştır. DNA numunelerinin okunması için kör olarak ultra saf su kullanılarak 260nm, 280nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm değerleri ölçülmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonu ng/μl olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik okumalar 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Agaroz jel elektroforez: PROMEGA Wizard DNA izolasyon kit kullanımı ile izole edilen DNA numuneleri saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleri %1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Sambrook and Russell 2001). Yatay jel elektroforezi için agaroz, kullanılan sistemin büyüklüğüne göre 100-150ml tris-borik-EDTA elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. 45°C' ye kadar soğutulan jelle 5μl miktarda Etidyum bromit solüsyonundan eklenmiş ve homojen karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş, bir saat jelin donması için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde tampon çözelti ilave edilmiştir. Jelin hasar görmemesine dikkat edilerek tarak ortamdandan uzaklaştırılmıştır. -20C de saklanan DNA numuneleri bir süre oda sıcaklığında buz üzerinde tutulduktan sonra 7μl DNA numunesi üzerine 3μl yükleme boya çözeltisi ilave edilerek mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 80V'da 2.5-3 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak λDNA ladder kullanılmış. Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jeli, KODAK jel görüntüleme cihazına yerleştirilerek 365nm dalga boyunda UV ışığı altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2 DNA'nın Restriksiyon endonükleazlar ile kesimi, adaptörlerin eklenmesi, preamplifikasyon ve selektif amplifikasyon:

Her bakteri örneğine ait DNA numunesi mikrolitrede 250 ng olacak şekilde seyreltilerek AFLP çalışmaları için kullanıma hazır hale getirilmiştir ($M_1V_1=M_2V_2$). Şekil 3.1 de verilen genel işlemin detayları aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.1 Olası pek çok primer kombinasyonundan sadece birinin kullanımı ile gerçekleşen AFLP prosedürü

DNA'nın Restriksiyon endonükleazlar ile kesimi: AFLP reaksiyonunda kalıp yaratmak için izole edilen kromozomal DNA aynı anda 2 restriksiyon enziminin kullanımı ile kesilir (6 bp'lik tanıma bölgesine sahip *EcoRI* ve 4 bp'lik tanıma bölgesine sahip *MseI*). Kesim amacı ile bu iki enzimin bir arada kullanılması, başarılı bir şekilde amplifiye edilecek olan ve denatüre edici poliakrilamid jelde başarılı bir seperasyon için yeterli miktarda (<1 kb) küçük DNA fragmanları oluşturacaktır. Restriksiyon enzimi ile kesim işleminin gerçekleştirebilmesi için enzim ile muamele edilen numuneler 37°C'de inkubasyona bırakılmıştır.

<u>Test tüpüne konulan bileşenler</u>	<u>kontrol</u>	<u>numune</u>
5x reaksiyon tamponu	5µl	5µl
<i>E.coli</i> kontrol DNA	2.5µl	---
Kromozomal DNA (250 ng)	---	≤ 18µl
<i>EcoRI/MseI</i>	2µl	2µl
dH ₂ O	15.5µl	25µl'ye tamamla
toplam hacim	25µl	25µl

Yaklaşık 2 saat süren inkubasyondan sonra restriksiyon endonükleazların aktivitesini sonlandırmak amacıyla her iki PCR tüpü (kontrol ve numune) 70°C'de 15 dakika bekletilmiştir.

Adaptörlerin eklenmesi: Restriksiyon endonükleaz enzimleri ısı ile inaktif edildikten sonra, elde edilen kromozomal DNA fragmanlarına amplifikasyon için kalıp DNA yaratmak amacıyla *EcoRI* ve *MseI* adaptörleri eklenir. Bu amaçla, tüp içerisinde bulunan ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş kromozomal DNA karışımına 24µl adaptör ligasyon solusyonu ve 1µl T4 DNA ligaz eklenerek preamplifikasyon işleminde kullanılacak olan toplam 50 µl'lik son hacim elde edilir. Kısa bir santrifuj basamağından sonra ligasyon karışımı 20°C de 2 saat inkübasyona bırakılarak adaptörlerin kalıp DNA'ya bağlanması sağlanır.

Amplifikasyon reaksiyonları: PCR, ardı ardına yürütülen 2 reaksiyonda gerçekleşecektir; preamplifikasyon ve selektif amplifikasyon. Primer dizaynı ve

amplifikasyon stratejilerinden dolayı oluşan bu *EcoRI-MseI* fragmanları öncelikli olarak (*EcoRI-EcoRI* veya *MseI-MseI* fragmanlarına kıyasla) amplifiye edilir.

Preamplifikasyon olarak isimlendirilen ilk amplifikasyon reaksiyonunda kromozomal DNA'lar selektif nükleotit içermeyen AFLP primerleri ile amplifiye edilir (E-O ve M-O primerleri). Preamplifikasyon reaksiyonu için ligasyon karışımı 1:10 oranında seyreltilir (10µl reaksiyon karışımı yeni bir mikrosantrifuj tüpe transfer edilerek üzerine 90µl tampon eklenerek karıştırılır) ve seyrelttiğimiz DNA örneğinden 5µl alınarak üzerine E-0 ve M-0 primerleri eklenir. Aşağıda içeriği verilen reaksiyon tüpünde son hacim ultra saf su kullanımı ile 51µl'ye tamamlanır.

Seyreltilmiş kalıp DNA	5µl
Primer E-0 (<i>EcoRI</i> primeri)	2.7µl
Primer M-0 (<i>MseI</i> primeri)	12µl
Mg içeren 10 x PCR tamponu	5µl
Taq DNA polimeraz	1µl
dH ₂ O	25.3µl
toplam hacim	51µl

Kısa bir santrifuj basamağını takiben PCR reaksiyonu preamplifikasyon işlemi için 94°C de 30 saniye, 56°C de 60 saniye ve 72°C de 60 saniye olacak şekilde 20 döngüde gerçekleştirildi ve son ürün %1.5 agaroz içeren jelde gözlemlendi.

Preamplifikasyon basamağı opsiyonel bir basamak olmakla beraber selektif amplifikasyon ile birlikte gerçekleştirilmesi oldukça temiz ve tekrarlanabilir parmak izlerinin oluşumuna sebep olmaktadır.

Selektif amplifikasyon işleminde preamplifikasyon reaksiyonu neticesinde elde edilen PCR ürünü 1:20 oranında seyreltilerek (3µl reaksiyon karışımı yeni bir mikrosantrifuj tüpüne transfer edilerek üzerine 57µl TE tamponu eklenmiştir) 2 AFLP primer (0, 1 veya 2 selektif nükleotit içeren) kullanımı ile gerçekleşecek olan ***selektif amplifikasyon*** işleminde kalıp olarak kullanılır. Seçici amplifikasyon işleminde her bir primer çifti için her biri 10 reaksiyonluk Karışım1 ve Karışım2 hazırlanır.

<u>Karışım 1</u>		<u>Karışım 2</u>	
İşaretli <i>Eco</i> RI primer	5µl	dH ₂ O	79µl
<i>Mse</i> I primer (dNTP içeren)	45µl	Mg içeren 10 x PCR tamp.	20µl
Toplam hacim	50µl	Taq DNA polimeraz	1µl
		Toplam hacim	100µl

Uzatmalı (tek baz içeren) *Eco*RI ve *Mse*I primerlerini içeren olası 16 farklı kombinasyondan selektif amplifikasyonu sağlayan ve aşağıda içerikleri verilen 8 değişik kombinasyon oluşturularak her bir numune için toplam 8 değişik karışım I solusyonu hazırlanmıştır. Karışım II solusyonu ise standart olup içeriğinde ultra saf su, Mg içeren 10X PCR tamponu ve *Taq* DNA polimeraz (5 unit/µl) bulunmaktadır.

Kullanılan selektif primer kombinasyonları	
Primer 1: E-A/M-T	Primer 5: E-T/M-A
Primer 2: E-A/M-G	Primer 6: E-G/M-T
Primer 3: E-T/M-T	Primer 7: E-G/M-G
Primer 4: E-T/M-G	Primer 8: E-C/M-G

Her bir AFLP amplifikasyonu bu iki karışımın tek bir mikrosantrifuj tüpünde birleşmesi ile gerçekleşmektedir.

Kalıp DNA (1:20 seyreltilmiş)	5µl
Karışım 1	5µl
Karışım 2	10µl
toplam hacim	20µl

Kısa bir santrifuj basamağını takiben PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. 94°C de 30 saniye, 65°C de 30 saniye ve 72°C de 60 saniyede gerçekleşen 1 PCR döngüsünü takiben annealing sıcaklık touch-down PCR ile her bir döngüde 0.7°C azaltılarak toplam 13 döngü neticesinde 56°C'ye çekilir ve PCR, 94°C de 30 saniye, 56°C de 30 saniye ve 72°C de 60 saniye olacak şekilde 23 siklus döndürülür.

3.2.2.3 Denatüre Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Selektif amplifikasyon neticesinde elde edilen PCR ürünleri üre içeren %6 lık poliakrilamit (sekans) jelde denatüre edici koşullarda separasyona tabi tutulur (Maniatis *et al.* 1986, Sambrook and Russell 2001). Elde edilen bant paternleri (parmak izleri) gümüş nitrat ile boyama işlemini takiben skorlanarak polimorfizm için analiz edilir.

Cam plakaların hazırlanması: Denatüre poliakrilamit jel elektroforez sisteminde düz ve U şeklinde olmak üzere iki adet cam plaka kullanılmıştır. Düz ve U cam %70'lik etanol solüsyonu ile ikişer defa iyice temizlenmiş ve jelin yapışması istenen *düz cam plakaya* 300µl Bind Silane solüsyonu %70'lik alkollü havlu peçete ile iyice dağıtılarak sürülür. *U cam plakaya* ise 800 µl Sigma Cote solüsyonu yine aynı şekilde sürülür. İkinci bir defa sadece %70'lik etanol iyice dağıtılır ve cam plakalar üzerinden alkol uzaklaşınca kadar beklenir. Spacerlar (ayırıcılar) yerleştirildikten sonra cam plakalar pensler yardımıyla klipslenir.

Jelin cam plakalara dökülmesi: İki cam arasına jel dökülmeden önce, oda sıcaklığına gelmiş jele 45µl TEMED ile 600 µl APS aynı zamanda eklenir ve homojen bir şekilde dağılması için karıştırılır. Zaman kaybetmeden iki cam arasına dikkatli bir şekilde dökülür ve düz bir hat sağlayabilmek için tarak ters bir şekilde yerleştirilir ve jelin donması için yaklaşık 45 dakika beklenir.

PCR denatürasyonu: Poliakrilamit jele yükleme yapılmadan hemen önce 2µl sekans boyası ve 8µl selektif PCR ürünü DNA mikrosantrifüj tüpleri içerine alınarak 94°C'de 5 dakika süre ile denature edilmiştir. Bu arada hazırlanmış olduğumuz DNA markörlerinden 3µl alınarak üzerine 7 µl sekans boyası eklenerek aynı koşullarda denatüre edilir ve denatüre poliakrilamit jele mikropipet yardımıyla yüklenerek sistemin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla kullanılır.

Elektroforez aşaması: Hazırlanmış olduğumuz denatüre poliakrilamit jel donduktan sonra cam plakalar üzerindeki jel kalıntılarını temizlemek amacıyla camlar musluk altında yıkanır. Dikey elektroforez sistemine camlar yerleştirilir. Yeni hazırlanmış 1,5 lt

1X TBE tamponu elektroforez sisteminin üst havuzuna, 1,5 lt TBE tamponu ise alt havuzuna eklenir. Enjektör yardımıyla tarağın gireceği ve numunelerin yükleneceği yerdeki jelin temizliği yapılır. Tarağın yerleşeceği yere jel boyunca eşit miktarda sekans boyası yüklenir ve tarak düz bir şekilde yerleştirilir. Elektroforez aleti güç kaynağına bağlanarak 60 watta yaklaşık yarım saat çalıştırılarak sekans boyasının jelde ilerlemesi sağlanır. Bu süre sonunda güç kaynağı kapatılır ve kuyucuklara numunelerden 7µl yüklenir. İlk iki ve son iki kuyucuğa sırasıyla sekans boyası ve markör yüklenerek sistem 1600-1630 voltta yaklaşık 2,5-3 saat süresince yürütülür.

Elektroforezden çıkarılması: Elektroforezden çıkan camlar soğuk su ile soğutulur. Bisturi ucu ile iki cam birbirinden ayrılır ve anında boyama işlemine geçilir.

Boyama işlemi: Birbirinden ayrılan cam vakit kaybetmeden fikse edici solüsyon içeren kaba konulmuştur. Böylece yaklaşık 38 rpm'de 20 dakika süreyle shaker'da sallanarak asetik asit içeren fikse edici solüsyonun düz cam plaka ile homojen şekilde temas etmesi sağlanır. Daha sonra 2'şer dakika süreyle 3 defa distile saf su ile yine 38 rpm'de sallanır. En az 45 dakika aynı rpm değerinde gümüş nitrat solüsyonunda bekletilir. Sadece 3 saniye bidistile saf sudan geçirilerek developping solüsyonuna bırakılır. Developping solüsyonu içerisine kullanmadan hemen önce 600 µl sodyum thiosülfat ve 4500 µl formaldehit eklenir. Ancak burada rpm 58-60 olmalıdır. Yani çok hızlı bir şekilde, -20 °C'de yaklaşık 2-2,5 saat bekletilen developping solüsyonunda sallanır ve bantlar görünmeye başlayana kadar devam eder. Bantlar çok belirgin olunca fiksasyon solüsyonunun yaklaşık 1 lt kadarı bu solüsyon içine dökülür ve reaksiyonun bitmesi sağlanır. Sonra saf suda bekletilerek kurumaya alınır.

Jellerin taranması: Cam plakalar tarayıcı ile taranarak bilgisayar ortamına jel görüntüleri aktarılır. Sonuçlar var-yok şeklinde skorlanarak elde edilen ham veriler Jaccard (1908) benzerlik indeksine (Unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA cluster analizi) göre değerlendirilir ve Multi-Variate Statistical Package (MVSP) programı kullanılarak bilgisayarda dendogram elde edilir.

4. BULGULAR

4.1 DNA Miktar Tayini

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

Çizelge 4.1 Laktik asit bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları

BAKTERİ ADI	KONSANTRASYON (ng/µl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260/280	OD 260/230
<i>Lactobacillus</i>					
<i>Lb. acidophilus</i> RSKK 03037	938.47	18.76	9.254	2.02	2.03
<i>Lb. brevis</i> NRLL B21	711.07	14.22	6.82	2.08	2.02
<i>Lb. brevis</i> OZ 1	864.71	17.30	8.57	2.03	1.90
<i>Lb. buhnerii</i> NRLL B1837	446.22	8.664	4.33	2.00	2.00
<i>Lb. caseii</i> RSKK 706	700.00	14.00	7.11	1.97	1.82
<i>Lb. caseii</i> CG 1	510.75	10.21	5.06	2.02	2.03
<i>Lb. cremoris</i> RSKK 708	408.00	8.160	3.98	2.05	2.18
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	903.00	18.05	8.78	2.05	1.90
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	1261.81	25.23	12.90	1.96	1.70
<i>Lb. fermentum</i> NRLL B585	556.07	11.12	5.31	2.09	2.02
<i>Lb. helveticus</i> AU	1938.0	38.77	19.30	2.01	1.90
<i>Lb. helveticus</i> HU	408.00	8.170	4.057	2.00	1.89
<i>Lb. maltoramicus</i> NRLL 14852	1285.0	25.71	12.13	2.10	2.10
<i>Lb. paraparacasei</i> STL	3018.0	60.36	28.53	2.10	2.03
<i>Lb. pentosus</i> CG	200.0	3.99	1.97	2.02	2.09
<i>Lb. plantarum</i> Z111	1607	32.14	18.10	1.80	1.70
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	2000	40.00	19.66	2.03	1.80
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20246	574.0	11.48	5.66	2.02	1.94
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	990.4	19.80	9.39	2.10	2.00
<i>Lb. plantarum</i> 37	571.8	11.43	5.86	1.95	1.95
<i>Lb. plantarum</i> 73	1050	21.01	10.12	2.06	1.85
<i>Lb. plantarum</i> 215L	647.4	12.95	6.86	1.90	1.65
<i>Lb. plantarum</i> 23	977.7	19.55	9.37	2.06	2.00
<i>Lb. plantarum</i> CG4	3038	60.76	30.13	2.02	1.88
<i>Lb. plantarum</i> 1193	284.00	5.67	2.77	2.03	2.02

BAKTERİ ADI	KONSANTRASYON (ng/µl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260/280	OD 260/230
<i>Lb. plantarum</i> CG	1365	27.30	13.40	2.03	1.95
<i>Lb. plantarum</i> AP2	1123	22.46	11.26	2.00	1.80
<i>Lb. plantarum</i> PYN	825.26	16.50	7.94	2.05	1.88
<i>Lb. plantarum</i> BF2	880.0	12.96	6.70	1.94	1.75
<i>Lb. rhamnosus</i> TK2	1610	32.20	16.40	1.96	1.90
Lactococcus					
<i>Lc. lactis</i> OZ 1	425.50	8.552	4.27	2.00	2.10
<i>Lc. lactis</i> OZ 2	554.90	11.083	5.35	2.07	2.30
<i>Lc. lactis</i> OZ 3	540.00	10.47	5.134	2.04	2.27
<i>Lc. lactis</i> OZ 4	494.00	9.872	4.92	2.01	2.11
<i>Lc. lactis</i> W1	423.64	8.472	4.12	2.05	2.15
<i>Lc. lactis</i> W2	692.00	13.83	6.705	2.06	1.90
<i>Lc. lactis</i> W3	720.00	14.50	7.30	1.99	1.67
<i>Lc. lactis</i> PK 1	510.00	10.15	5.18	1.95	2.10
<i>Lc. lactis subsp.cremoris</i> RSKK 01018	382.00	7.67	3.77	2.03	2.40
<i>Lc. lactis subsp.cremoris</i> NRLL B634	647.00	12.95	6.155	2.10	2.05
Enterococcus					
<i>E. avium</i> ATCC Pasteur	1020.43	20.409	9.75	2.095	2.075
<i>E. casseliflavus</i> NRLL-3502	2944.3	58.885	27.95	2.10	2.19
<i>E. durans</i> RSKK 05034	713.73	14.274	6.62	2.155	2.21
<i>E. faecalis</i> E 27	788.7	15.77	7.450	2.13	2.22
<i>E. faecalis</i> H	945.5	18.91	8.85	2.13	2.25
<i>E. faecalis</i> OZ-1	675.40	13.508	6.53	2.06	2.00
<i>E. faecalis</i> EF 1	1632.00	32.64	15.52	2.10	2.13
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1552.45	31.049	14.648	2.12	2.27
<i>E. faecium</i> ATCC 6057	957.65	18.153	8.87	2.15	2.19
<i>E. faecium</i> F 1	1704.7	34.093	16.070	2.12	2.24
<i>E. faecium</i> H	1178.98	23.763	11.68	2.03	2.21
Pediococcus					
<i>P. acidilactici</i> NRLL B4958	586.2	11.72	5.71	2.05	2.10
<i>P. acidilactici</i> 2N 10P	1074	21.47	10.12	2.10	2.10
<i>P. acidilactici</i> E2++	421.2	8.42	4.78	1.78	1.55
<i>P. acidilactici</i> RS2	2259	45.18	21.12	2.10	2.12
<i>P. acidilactici</i> AB6	280.05	5.61	2.72	1.98	2.0
<i>P. acidilactici</i> F2+	313.00	6.25	3.14	1.99	1.94
<i>P. acidilactici</i> E++	1012	20.24	11.79	1.77	1.50
<i>P. acidilactici cereviciae</i> ATCC 666	812.0	16.24	8.05	1.98	2.00
<i>P. dextranicus</i> 2N IP	950.7	19.01	9.95	1.92	1.74
<i>P. pentosaceus</i> DT1	1224	24.50	12.63	1.94	2.08
<i>P. pentosaceus</i> DT10	1046	20.92	10.29	2.04	2.02
<i>P. pentosaceus</i> KS2	344.0	6.87	3.40	2.02	2.07
<i>P. pentosaceus</i> TK3	844.7	16.90	8.40	2.02	2.00
<i>P. pentosaceus</i> KPR	955.6	19.11	9.30	2.05	2.03
<i>P. pentosaceus</i> TS1	865.0	17.30	8.60	2.01	2.05
<i>P. pentosaceus</i> ST3	521.0	10.42	5.05	2.05	2.03
<i>P. pentosaceus</i> BY1	495.3	9.906	4.89	2.02	1.98
<i>P. pentosaceus</i> P1	332.3	6.65	3.25	2.05	1.90
<i>P. pentosaceus</i> P7	257.0	5.13	2.62	1.96	1.97
<i>P. pentosaceus</i> P20	312.0	6.23	3.20	1.99	2.07
<i>P. pentosaceus</i> A9	324.5	6.50	3.15	2.04	2.02
<i>P. pentosaceus</i> A12	450.5	9.01	4.60	1.97	2.03

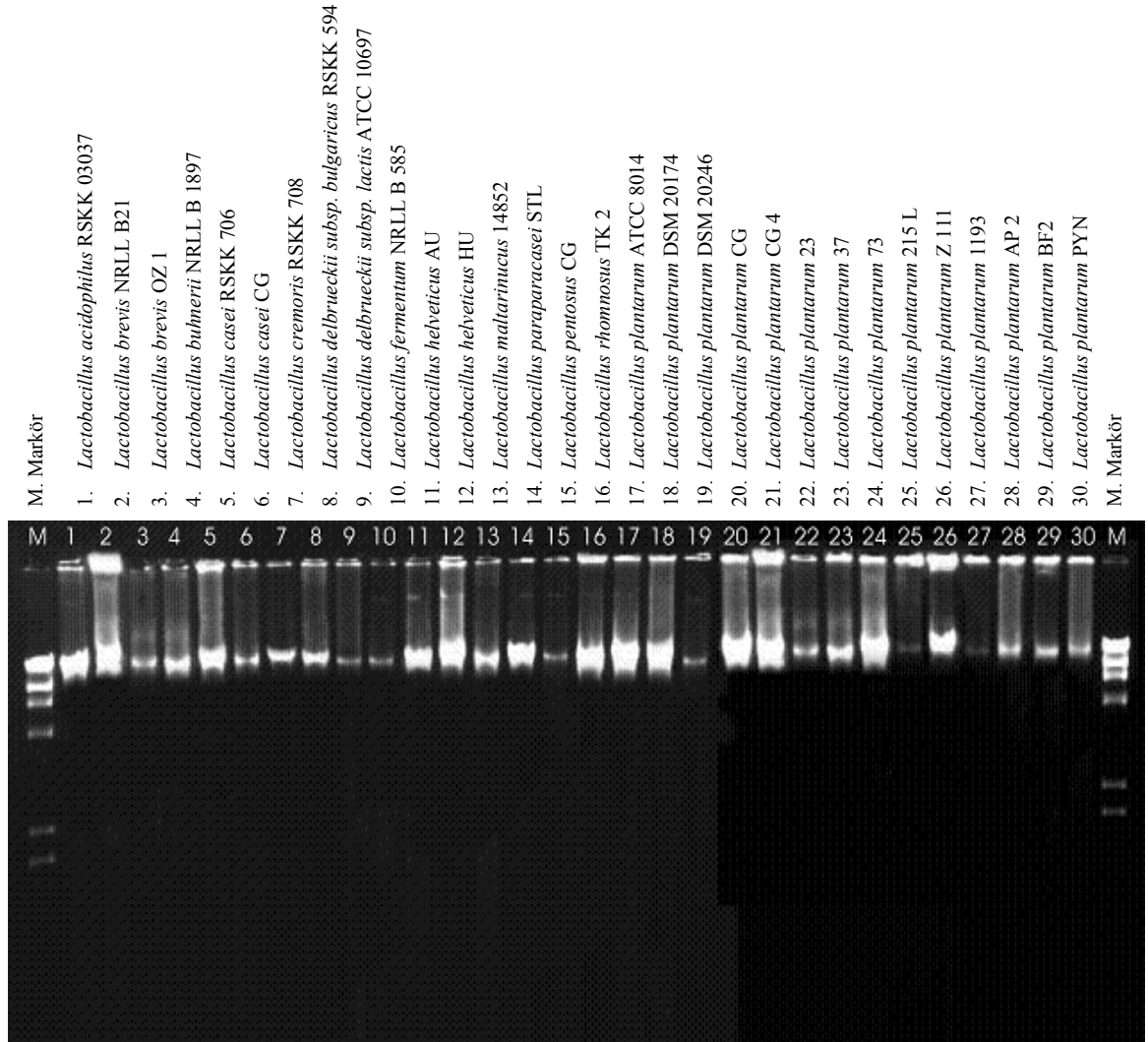
BAKTERİ ADI	KONSANTRASYON (ng/ul)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260/280	OD 260/230
<i>P. pentosaceus</i> DH2	530.0	10.58	5.64	1.88	1.60
<i>P. pentosaceus</i> DH3	1235	24.70	11.62	2.10	1.98
<i>P. pentosaceus</i> PH2	1605	32.08	16.83	1.90	1.78
<i>P. pentosaceus</i> MCO31	1034	20.67	10.15	2.03	2.01
<i>P. pentosaceus</i> 345	650.0	13.01	6.70	1.94	1.90
<i>Leuconostoc</i>					
<i>Leu. lysis</i>	290.00	5.81	2.73	2.13	2.17
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	426.00	8.519	4.11	2.07	2.21
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B 3469	974.50	19.49	9.54	2.04	2.01
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ	490.00	9.839	4.79	2.05	2.01
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ 1	283.00	5.659	2.71	2.08	2.10
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ 2	804.00	16.08	7.59	2.10	2.10
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ 3	1780.0	35.60	18.82	1.89	1.81
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ 4	830.00	16.60	7.96	2.06	2.03

OD₂₆₀ nm, DNA molekülünün absorbe edildiği dalga boyudur. Bu değer numunedeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (OD₂₆₀ da 1= 50µg/ml 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 edicilerinin varlığını, 2.0'dan 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.

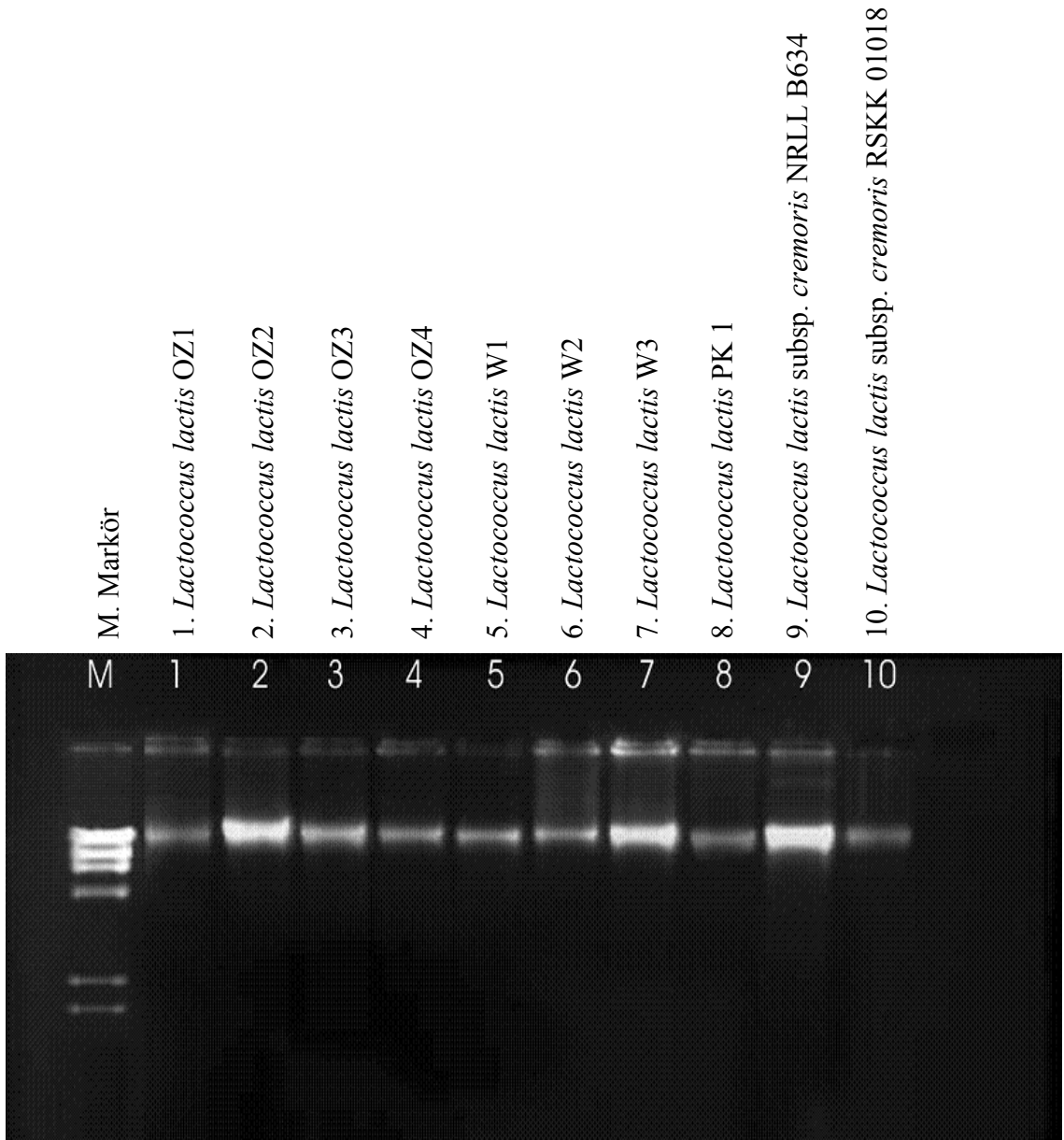
Çalışmaya başladığımız toplam 94 adet laktik asit bakterisinden 8 tanesinde (*Lb. acidophilus* CG1, *Lb. fermentum* PK2, *Lb. paraparacasai* ABZ, *Lb. plantarum* OZ1, *Lb. plantarum* 80, *Lb. plantarum* MLR, *Lb. plantarum* NCDO 955, *Lb. rhamnosus* NRRL B442) OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı verilen skalanın oldukça dışarısında kaldığı için bu suşlar çalışmaya katılmadı ve toplam 86 adet suş üzerinden çalışma gerçekleştirildi.

4.2 Kromozomal DNA molekülünün agaroz jelde gözlenmesi

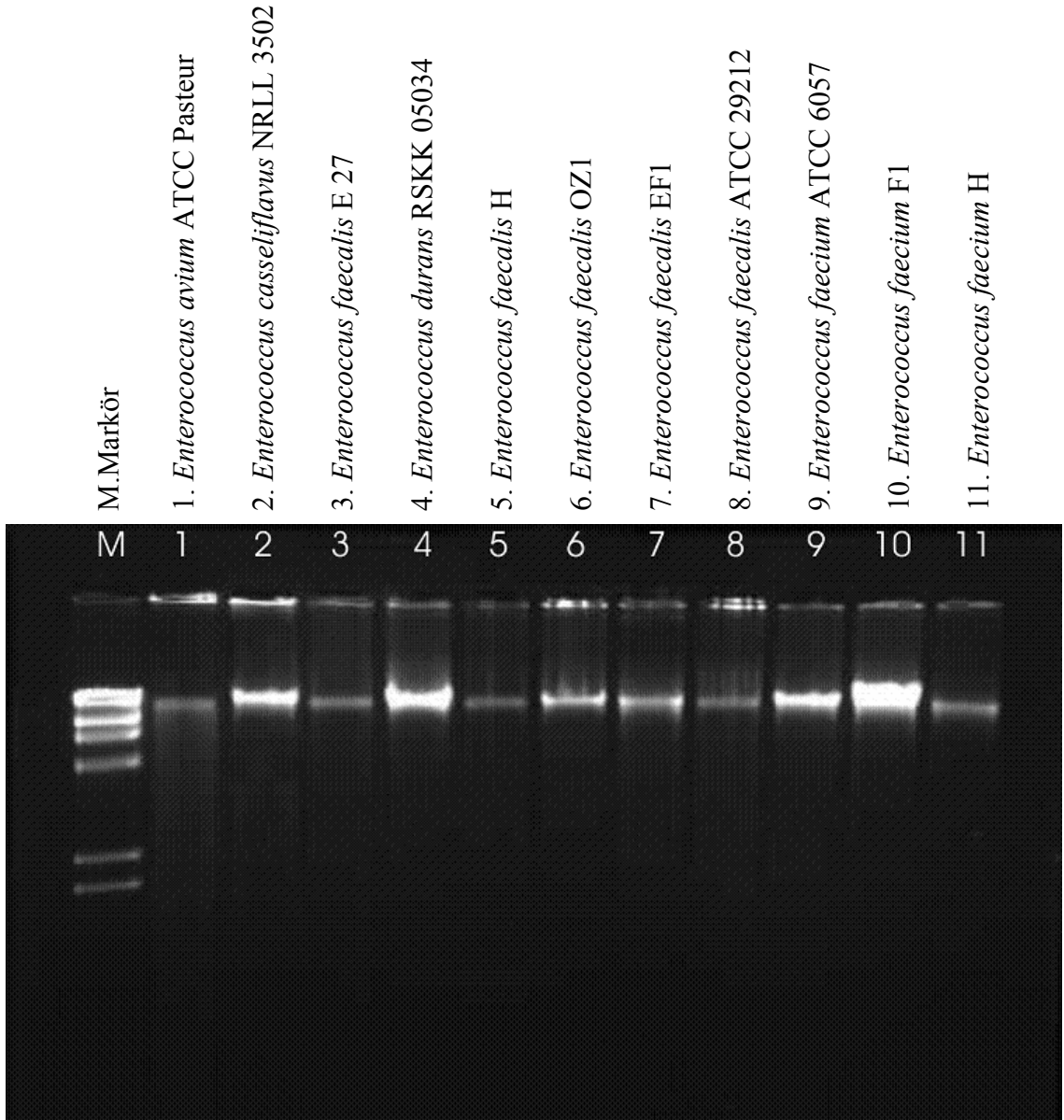
AFLP tekniğinin başarısı, başarı ile tamamlanmış restriksiyon kesimlerine bağlıdır. Dolayısıyla, yüksek kalitede, bir bütün olarak ve nükleaz ile inhibitör kontaminasyonundan arınmış genomik DNA'nın izolasyonu için azami dikkat gösterilmelidir. PROMEGA Wizard DNA izolasyon kit kullanımı ile izole edilen kromozomal DNA numunelerinin elektroforezi %1 agaroz içeren jellerde yapılarak fotoğraf çekimleri KODAK jel görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir. İzole edilen kromozomal DNA moleküllerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1-4.5 de verilmiştir.



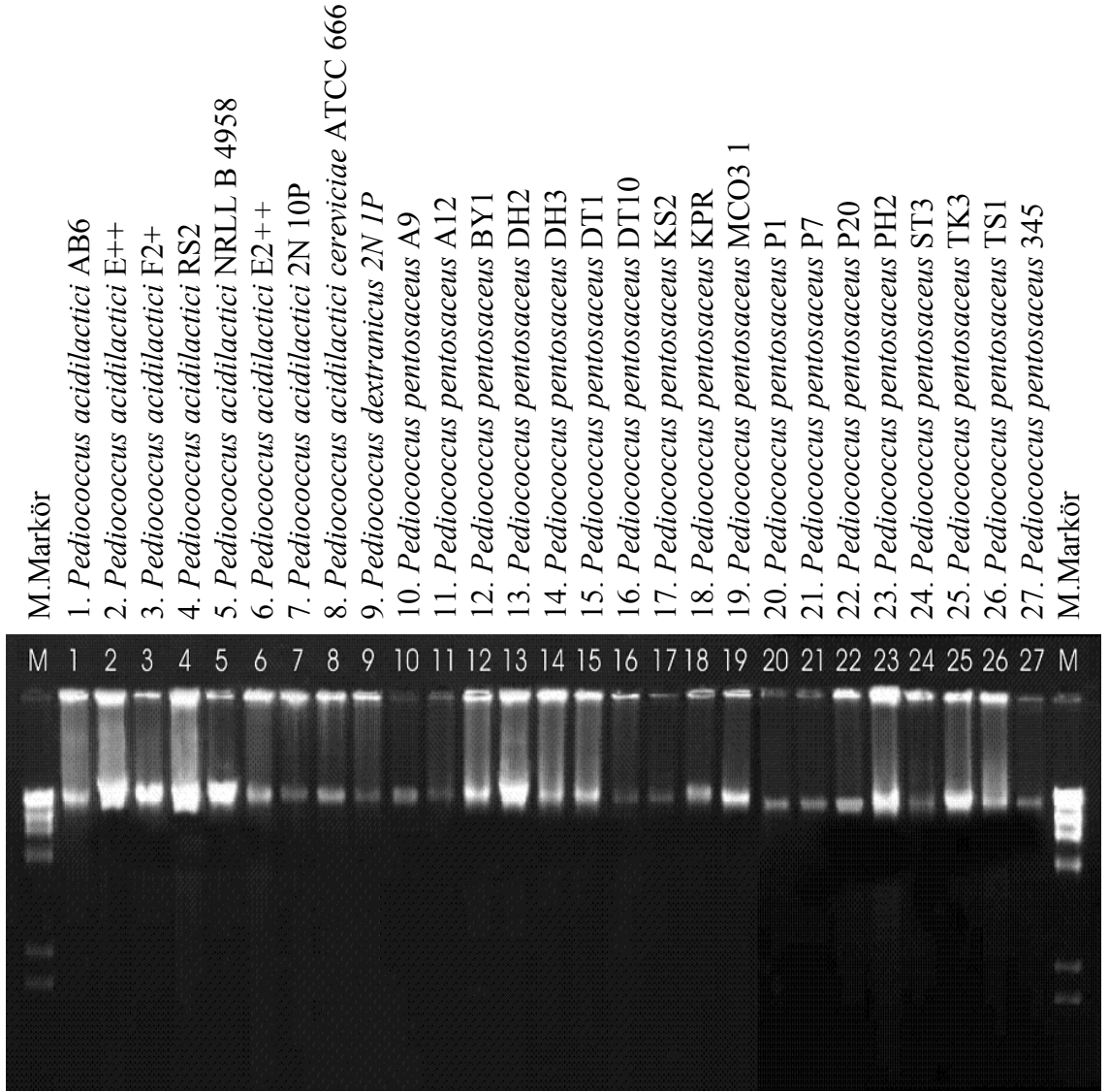
Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar



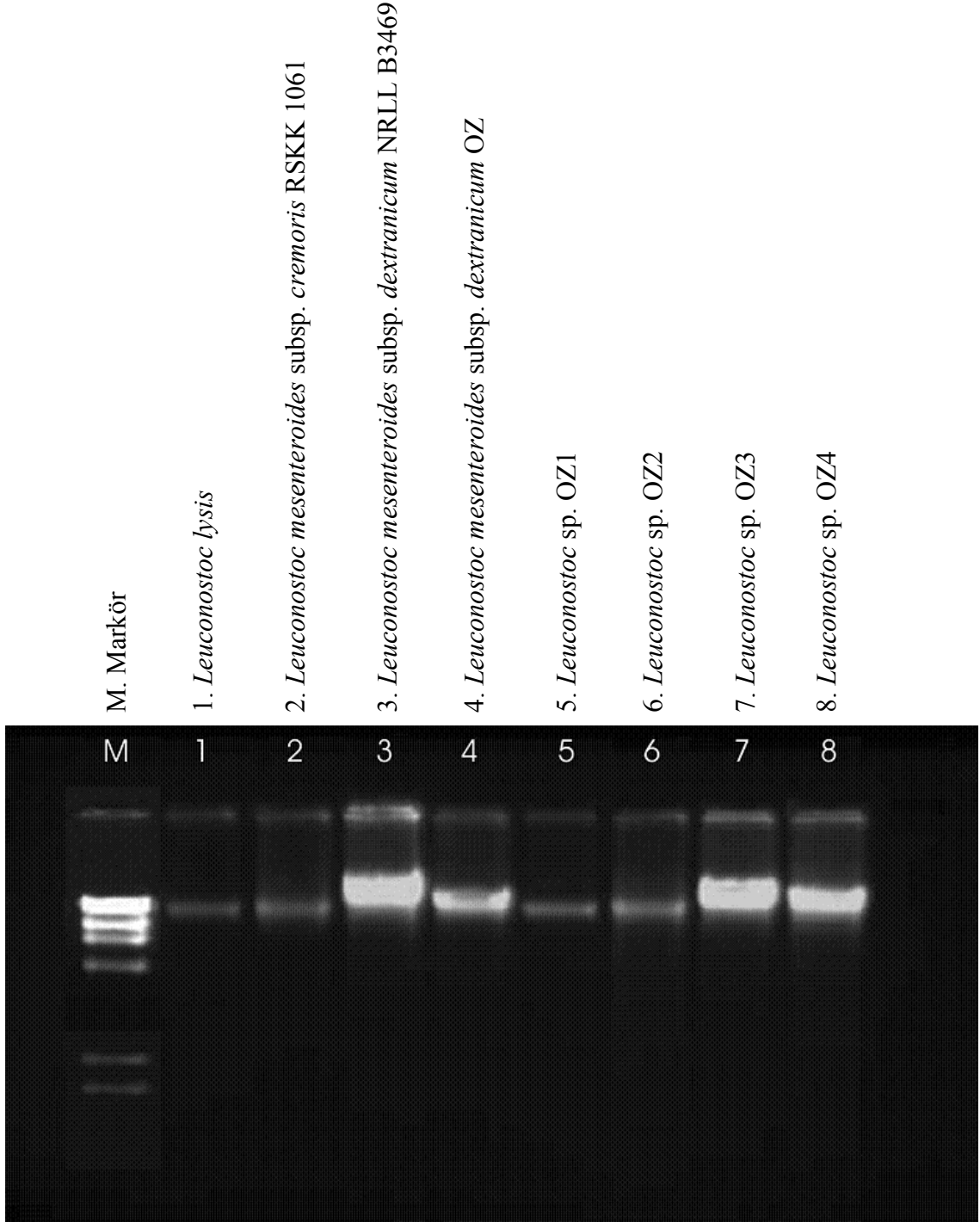
Şekil 4.2 Çalışmada kullanılan *Lactococcus* suşlarına ait kromozomal DNA'lar



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



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



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

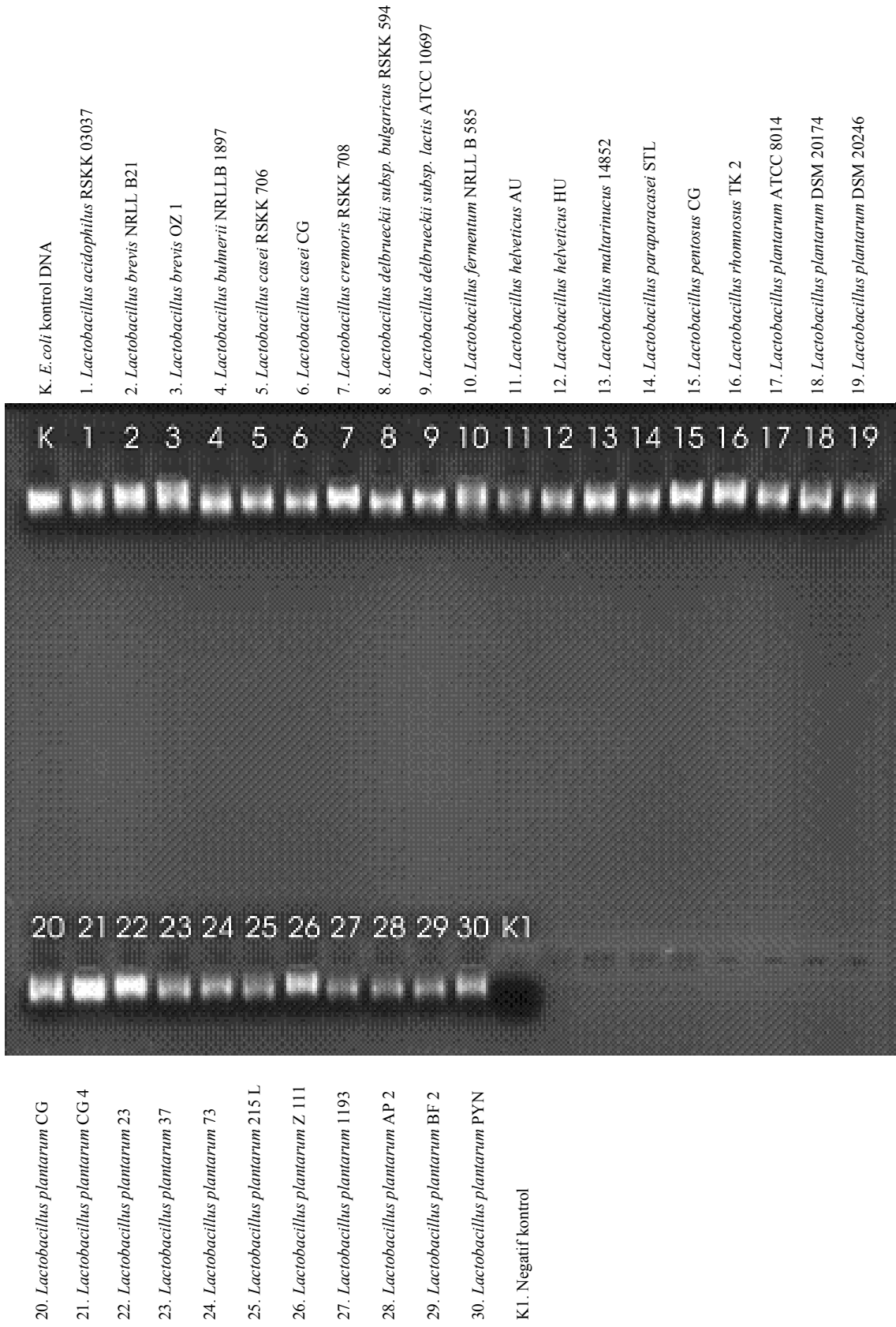
4.3 DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi:

AFLP reaksiyonunda kalıp yaratmak için izole edilen kromozomal DNA aynı anda 2 restriksiyon enziminin kullanımı ile kesilerek (6 bp'lik tanıma bölgesine sahip *EcoRI* ve 4bp'lik tanıma bölgesine sahip *MseI*) elde edilen kromozomal DNA fragmanlarına amplifikasyon için kalıp DNA yaratmak amacıyla *EcoRI* ve *MseI* adaptörleri eklenmiştir. Kesim amacı ile bu iki enzimin bir arada kullanılması başarılı bir şekilde amplifiye edilecek olan ve denatüre edici poliakrilamid jelde başarılı bir separasyon için yeterli miktarda (<1 kb) küçük DNA fragmanları oluşturmaktadır.

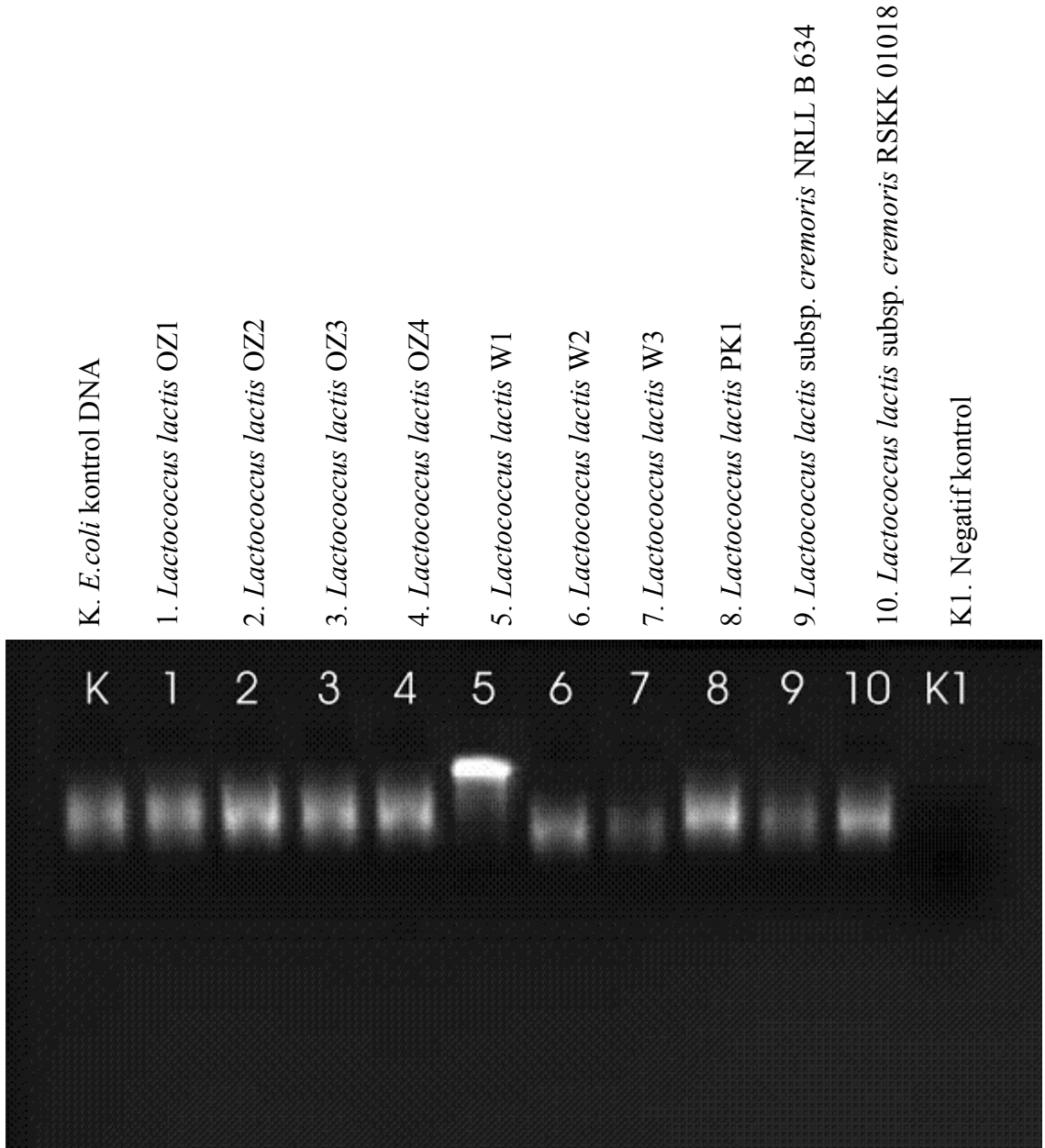
4.4 Pre-Amplifiye DNA molekülünün agaroz jelde gözlenmesi

Klasik hibridizasyon- ve PCR-tabanlı parmakizi çalışmalarını temel alan AFLP teknolojisinde farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına *pre-selektif amplifikasyon* adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır.

Restriksiyon endonükleazlar ile kesim neticesinde uygun adaptörlerin bağlanmasından dolayı oluşan bu *EcoRI-MseI* fragmanları öncelikli olarak (*EcoRI-EcoRI* veya *MseI-MseI* fragmanlarına kıyasla) *preamplifikasyon* olarak isimlendirilen ilk reaksiyonda, seçici nükleotit içermeyen AFLP primerleri ile (E+O ve M+O primerleri) amplifiye edilmiş ve %1.5 'luk agaroz jelde yürütülerek elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.6- 4.10 de verilmiştir.

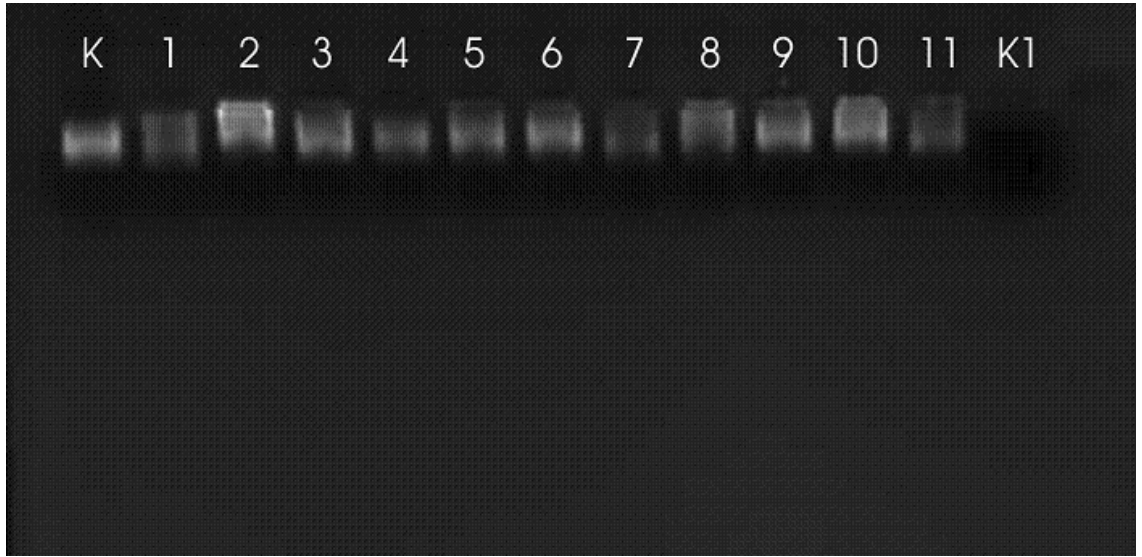


Şekil 4.6 *Lactobacillus* suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri

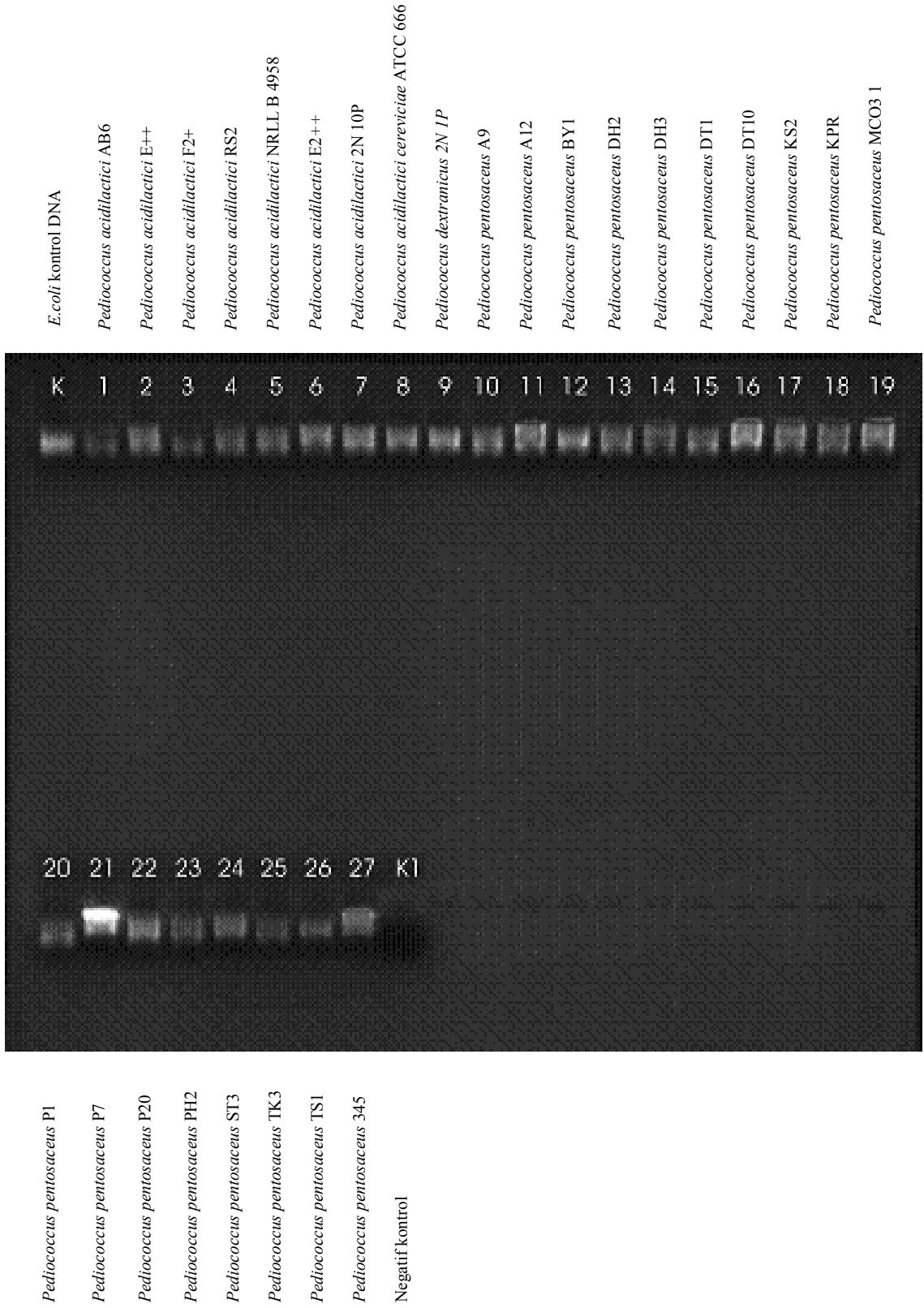


Şekil 4.7 *Lactococcus* suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri

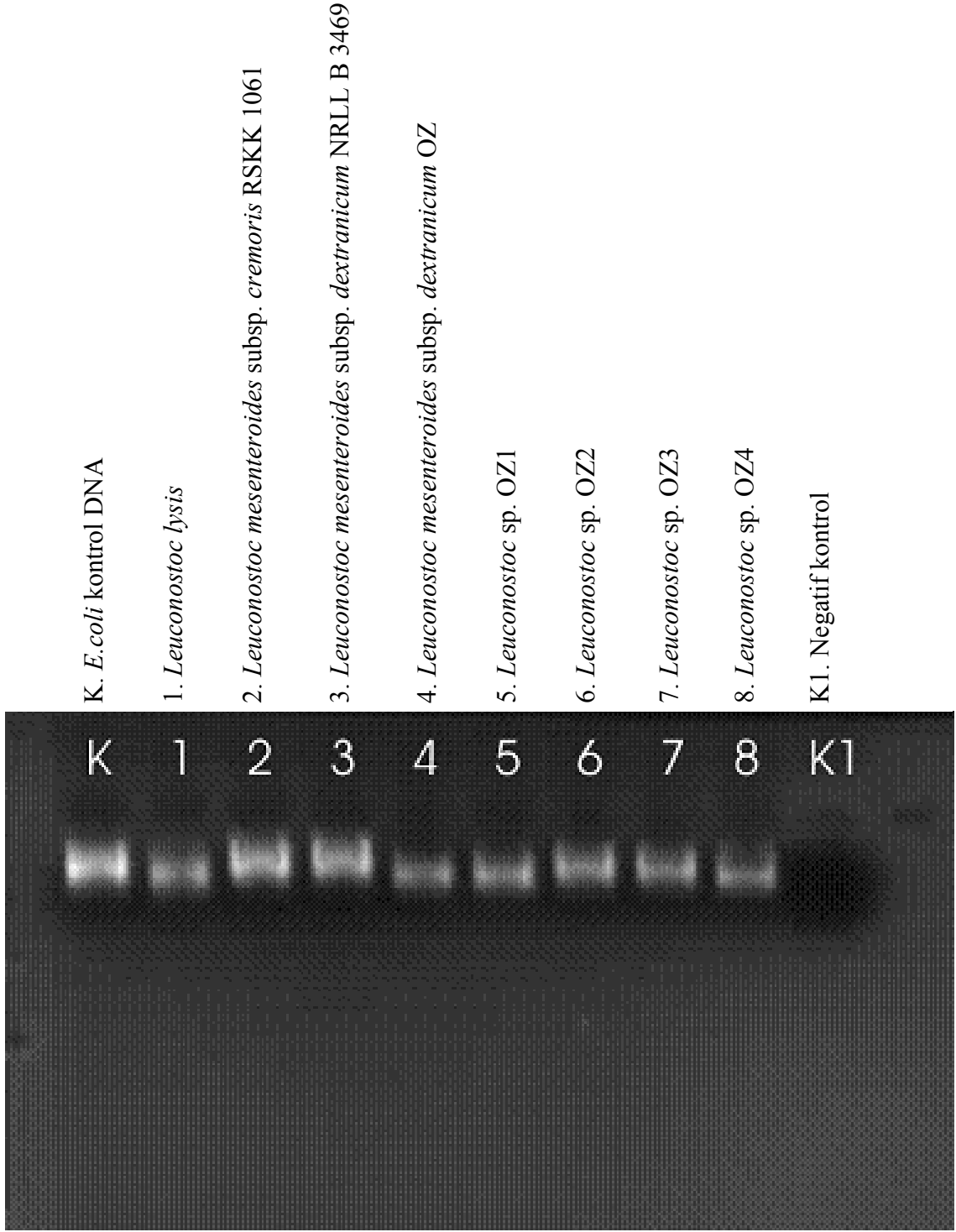
E. coli kontrol DNA
Enterococcus avium ATCC Pasteur
Enterococcus casseliflavus NRLL 3502
Enterococcus faecalis E 27
Enterococcus durans RSKK 05034
Enterococcus faecalis H
Enterococcus faecalis OZ1
Enterococcus faecalis EF1
Enterococcus faecalis ATCC 29212
Enterococcus faecium ATCC 6057
Enterococcus faecium F1
Enterococcus faecium H
Negatif kontrol



Şekil 4.8 *Enterococcus* suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri



Şekil 4.9 *Pediococcus* suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri



Şekil 4.10 *Leuconostoc* suşlarından pre-amplifiye edilmiş DNA görüntüleri

4.5 Selektif amplifikasyon

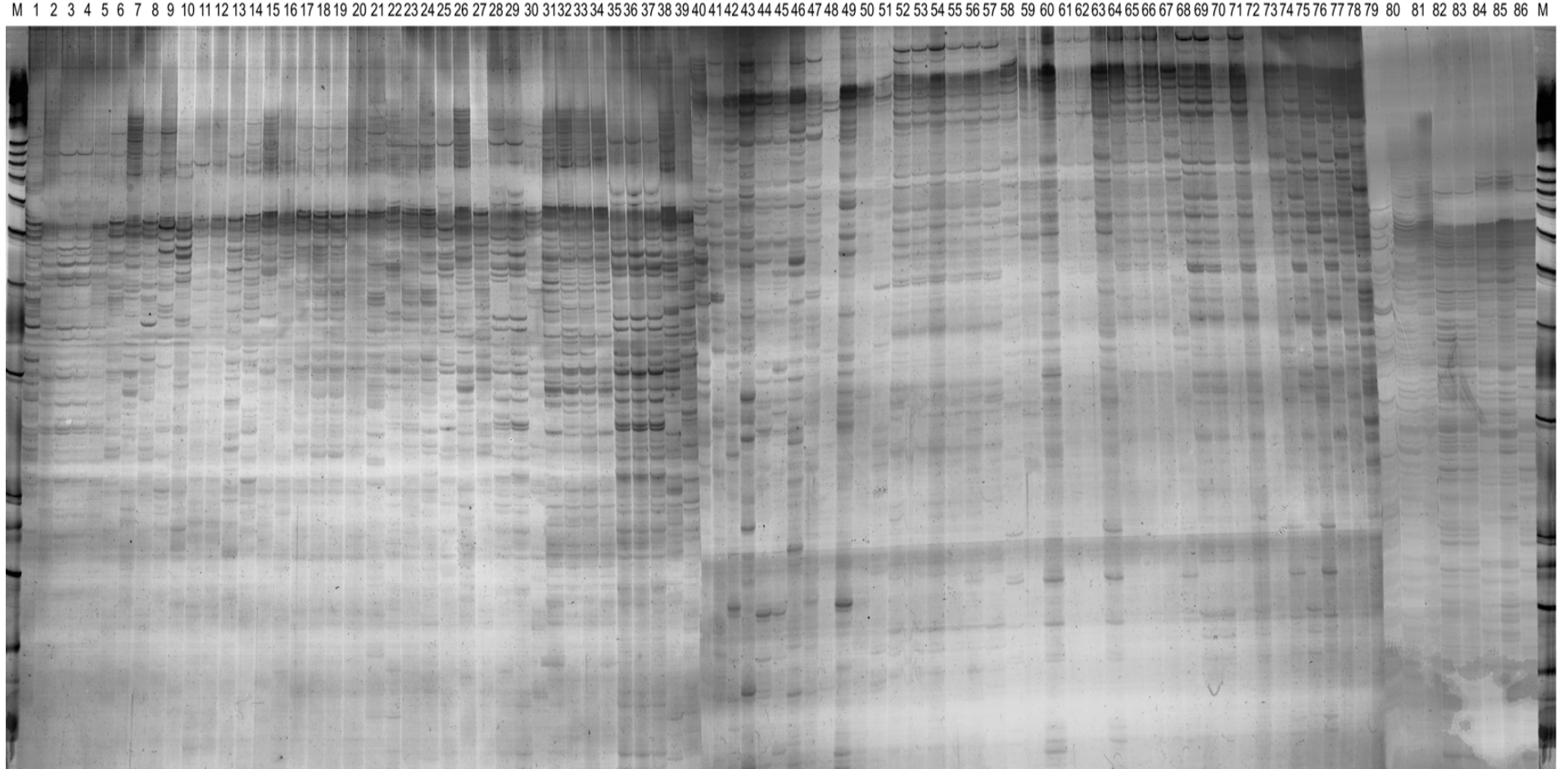
İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına yapılan *pre-amplifikasyon* işlemi neticesinde elde edilen PCR ürünü, daha sonra tek uzatmalı primerlerin (E+1 ve M+1) kullanımı ile gerçekleştirilen *selektif amplifikasyon* işleminde kalıp görevi görür ve böylece istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılmış olur.

4.6 Poliakrilamit jel elektroforezi

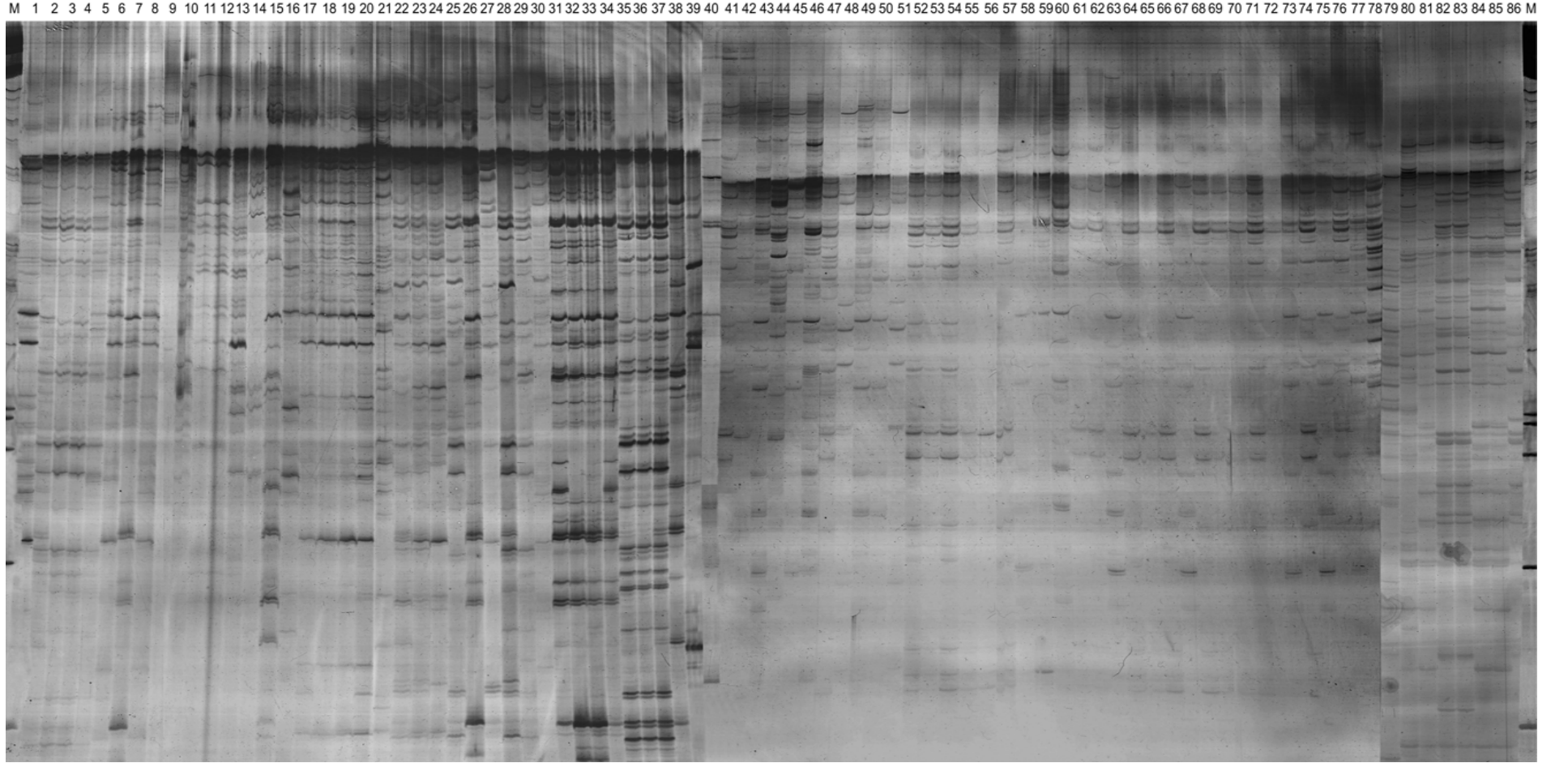
İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına *pre-selektif amplifikasyon* adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılır (*selektif amplifikasyon*) ve amplifiye edilen fragmanlar parmakizi yaratmak için denatüre koşullarda gerçekleşen poliakrilamit jel elektroforezde analiz edilmişlerdir. Bütün poliakrilamit jellerde izlenen yükleme sırası Çizelge 4.2 de verilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri (Şekil 4.11-4.18) tarayıcıda taranarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Çizelge 4.2 Laktik asit bakterilerinin denatüre poliakrilamit jelde yükleme sıraları

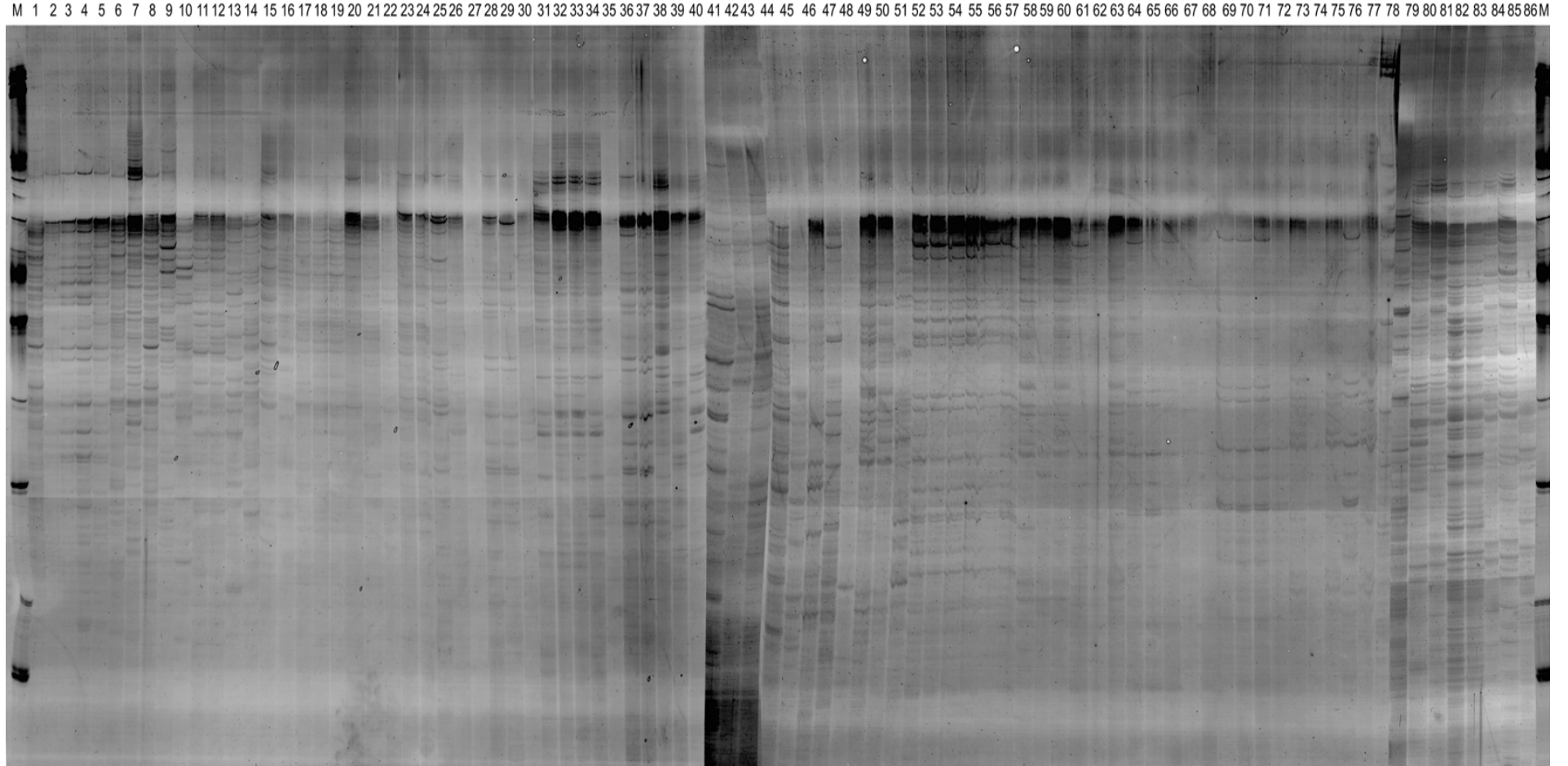
M. Markör	44. <i>E. durans</i> RSKK 05034
1. <i>Lb. acidophilus</i> RSKK 03037	45. <i>E. faecalis</i> H
2. <i>Lb. brevis</i> NRLL B21	46. <i>E. faecalis</i> OZ1
3. <i>Lb. brevis</i> OZ 1	47. <i>E. faecalis</i> EF 1
4. <i>Lb. buhnerii</i> NRLLB 1897	48. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212
5. <i>Lb. caseii</i> RSKK 706	49. <i>E. faecium</i> ATCC 6057
6. <i>Lb. caseii</i> CG1	50. <i>E. faecium</i> F 1
7. <i>Lb. cremoris</i> RSKK 708	51. <i>E. faecium</i> H
8. <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> RSKK 594	52. <i>Ped. acidilactici</i> AB6
9. <i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i> ATCC 10697	53. <i>Ped. acidilactici</i> E++
10. <i>Lb. fermentum</i> NRLL B 585	54. <i>Ped. acidilactici</i> F2+
11. <i>Lb. helveticus</i> AU	55. <i>Ped. acidilactici</i> RS2
12. <i>Lb. helveticus</i> HU	56. <i>Ped. acidilactici</i> NRLL B 4958
13. <i>Lb. maltarinucus</i> 14852	57. <i>Ped. acidilactici</i> E2++
14. <i>Lb. paraparacasei</i> STL	58. <i>Ped. acidilactici</i> 2N 10P
15. <i>Lb. pentosus</i> CG	59. <i>Ped. acidilactici cereviciae</i> ATCC 666
16. <i>Lb. rhomnosus</i> TK 2	60. <i>Ped. dextranicus</i> 2N 1P
17. <i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	61. <i>Ped. pentosaceus</i> A9
18. <i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	62. <i>Ped. pentosaceus</i> A12
19. <i>Lb. plantarum</i> DSM 20246	63. <i>Ped. pentosaceus</i> BY1
20. <i>Lb. plantarum</i> CG	64. <i>Ped. pentosaceus</i> DH2
21. <i>Lb. plantarum</i> CG 4	65. <i>Ped. pentosaceus</i> DH3
22. <i>Lb. plantarum</i> 23	66. <i>Ped. pentosaceus</i> DT1
23. <i>Lb. plantarum</i> 37	67. <i>Ped. pentosaceus</i> DT10
24. <i>Lb. plantarum</i> 73	68. <i>Ped. pentosaceus</i> KS2
25. <i>Lb. plantarum</i> 215 L	69. <i>Ped. pentosaceus</i> KPR
26. <i>Lb. plantarum</i> Z 111	70. <i>Ped. pentosaceus</i> MCO3 1
27. <i>Lb. plantarum</i> 1193	71. <i>Ped. pentosaceus</i> P1
28. <i>Lb. plantarum</i> AP 2	72. <i>Ped. pentosaceus</i> P7
29. <i>Lb. plantarum</i> BF 2	73. <i>Ped. pentosaceus</i> P20
30. <i>Lb. plantarum</i> PYN	74. <i>Ped. pentosaceus</i> PH2
31. <i>Lc. lactis</i> OZ1	75. <i>Ped. pentosaceus</i> ST3
32. <i>Lc. lactis</i> OZ2	76. <i>Ped. pentosaceus</i> TK3
33. <i>Lc. lactis</i> OZ3	77. <i>Ped. pentosaceus</i> TS1
34. <i>Lc. lactis</i> OZ4	78. <i>Ped. pentosaceus</i> 345
35. <i>Lc. lactis</i> W1	79. <i>Leu. lysis</i>
36. <i>Lc. lactis</i> W2	80. <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061
37. <i>Lc. lactis</i> W3	81. <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B3469
38. <i>Lc. lactis</i> PK 1	82. <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ
39. <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B 634	83. <i>Leuconostoc</i> sp. OZ1
40. <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	84. <i>Leuconostoc</i> sp. OZ2
41. <i>E. avium</i> ATCC Pasteur	85. <i>Leuconostoc</i> sp. OZ3
42. <i>E. casseliflavus</i> NRLL 3502	86. <i>Leuconostoc</i> sp. OZ4
43. <i>E. faecalis</i> E27	M.Markör



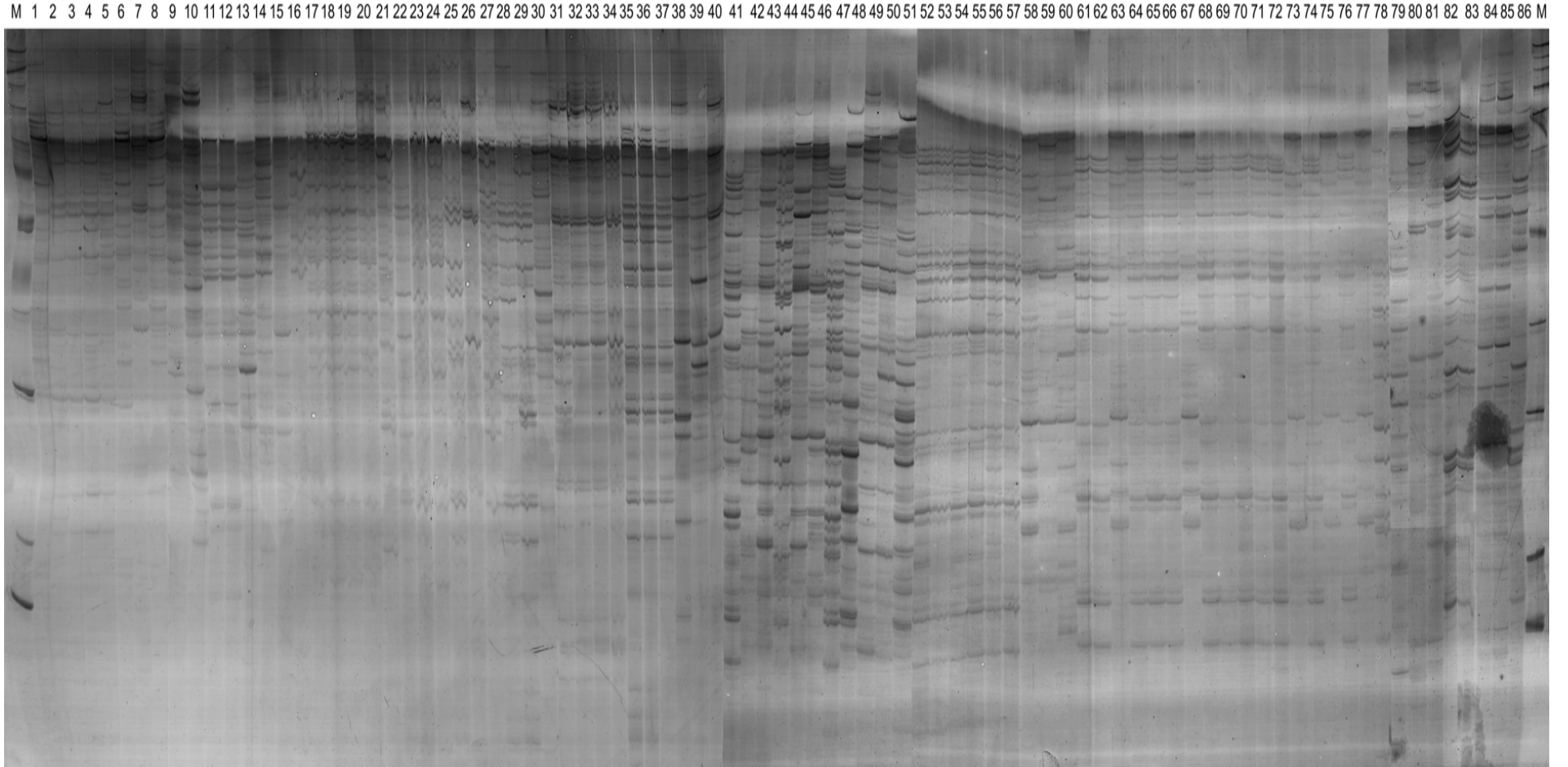
Şekil 4.11 Primer 1 (E-A/M-T) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.12 Primer 2 (E-A/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü

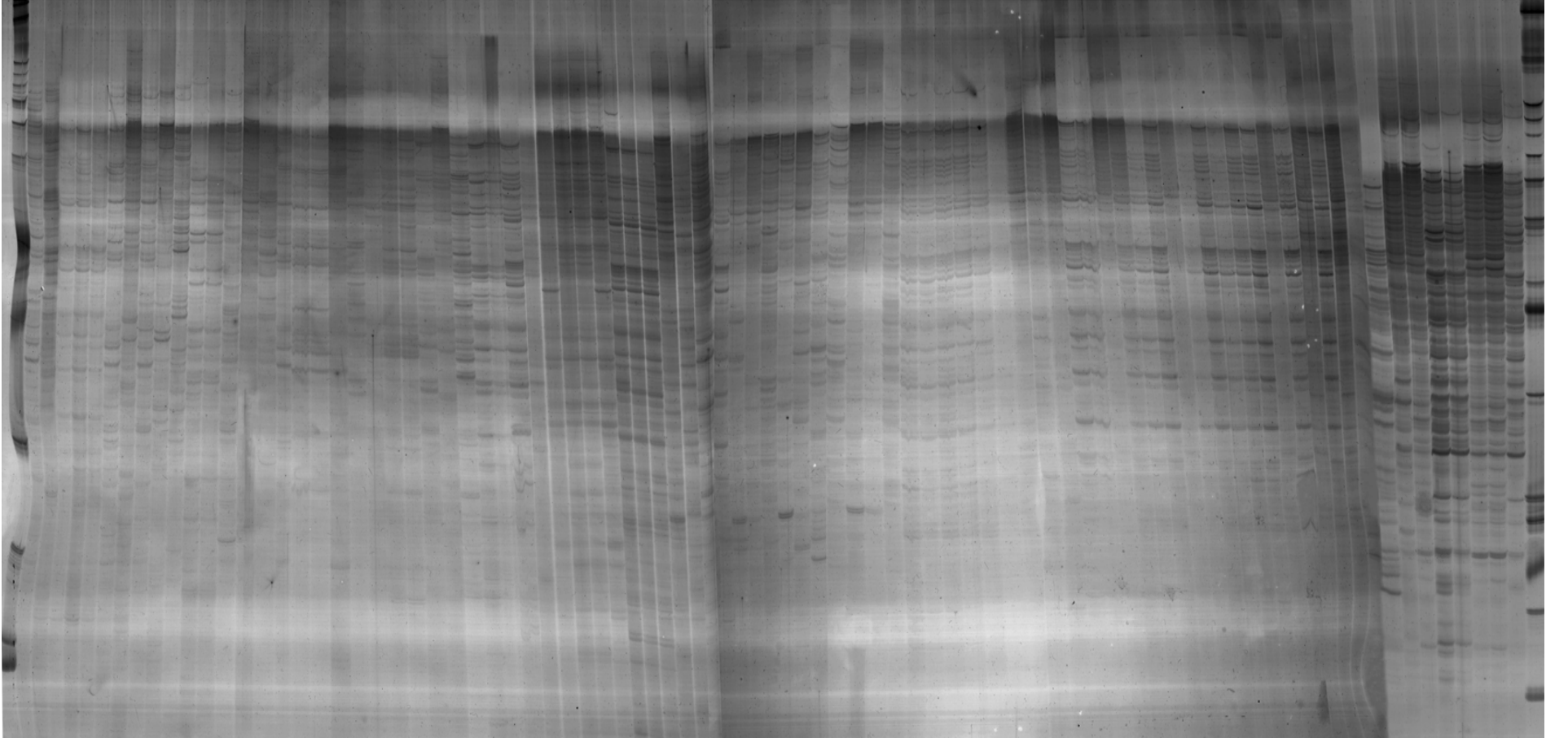


Şekil 4.13 Primer 3 (E-T/M-T) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü

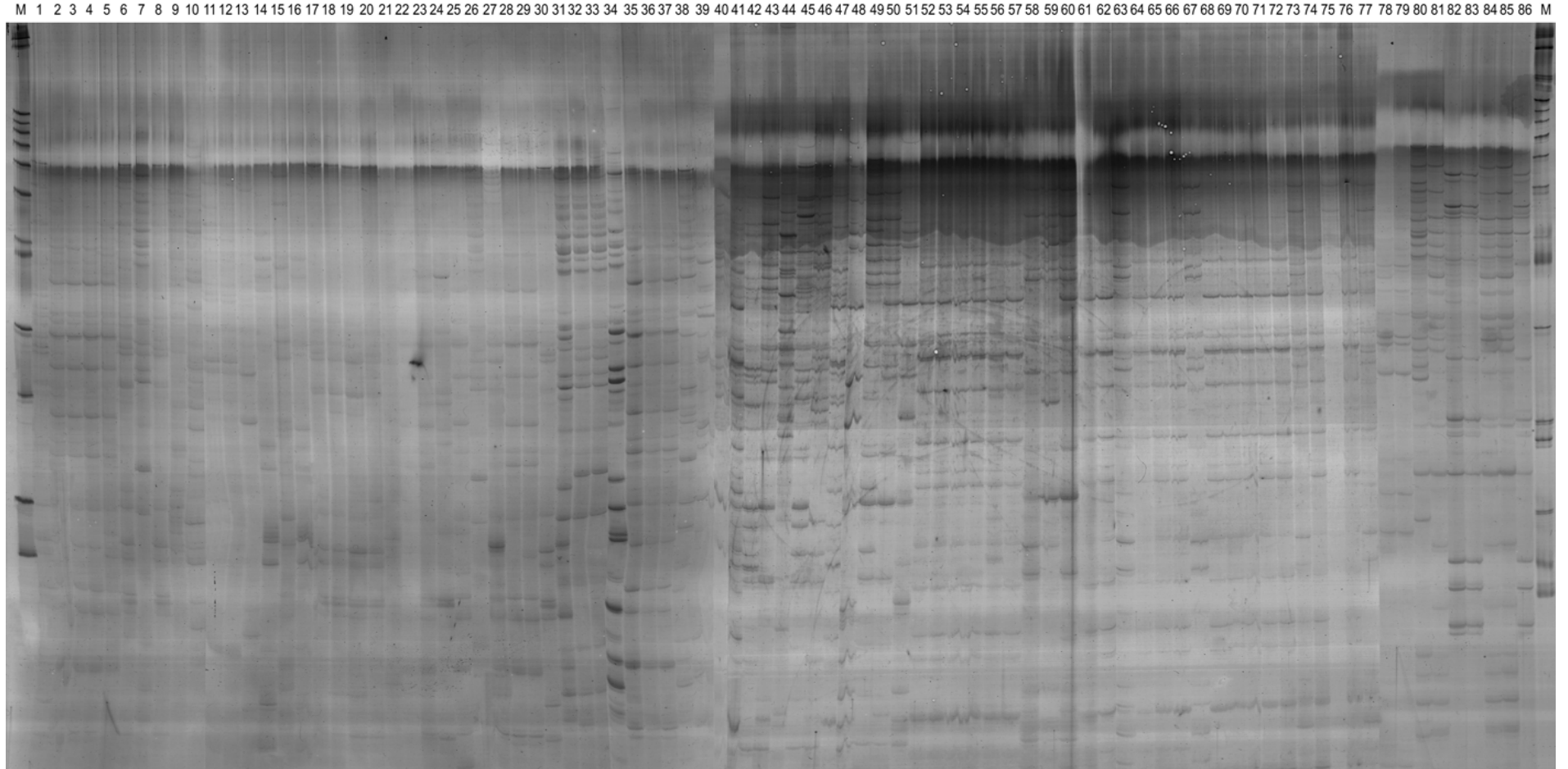


Şekil 4.14 Primer 4 (E-T/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü

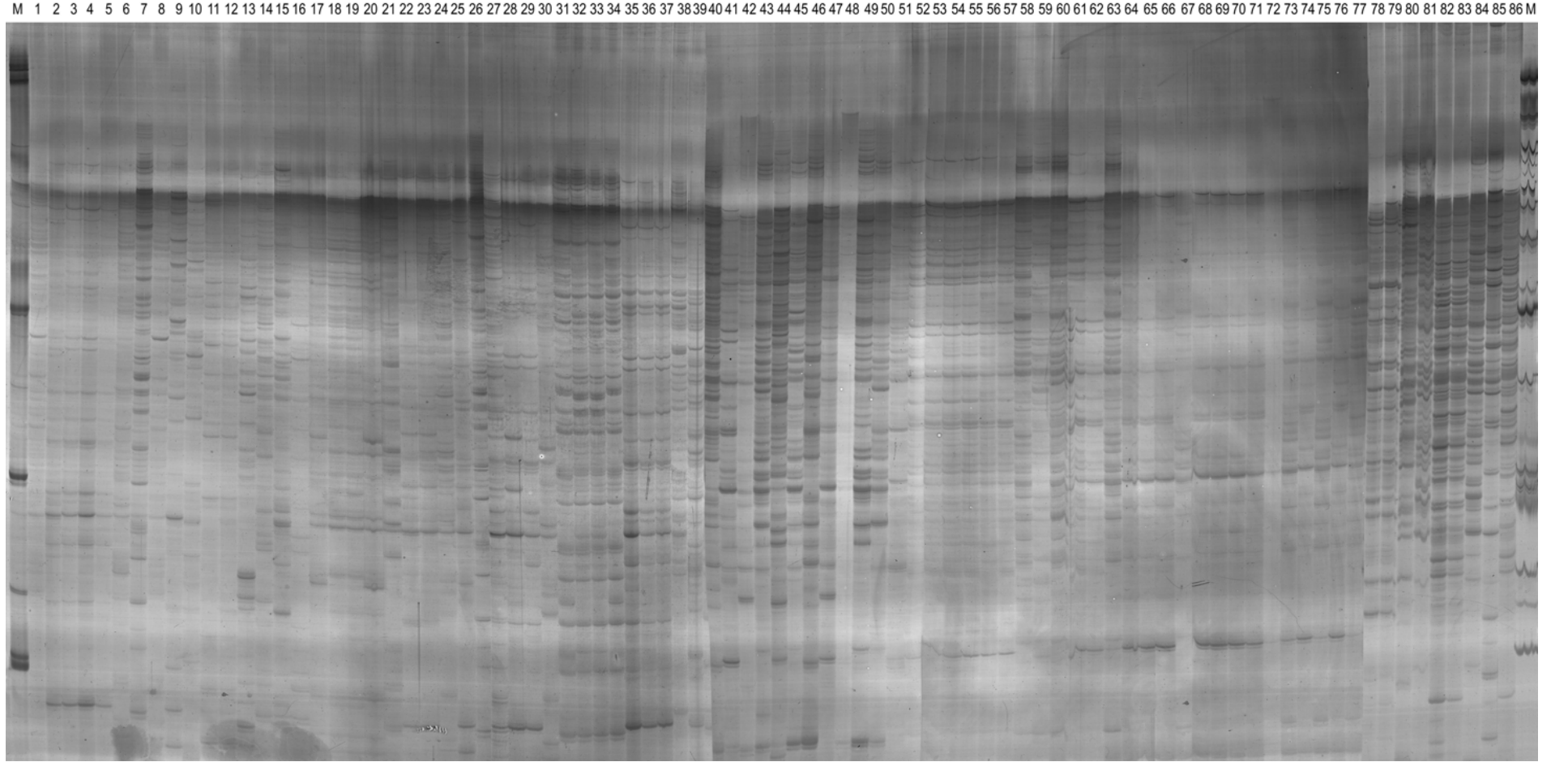
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 M



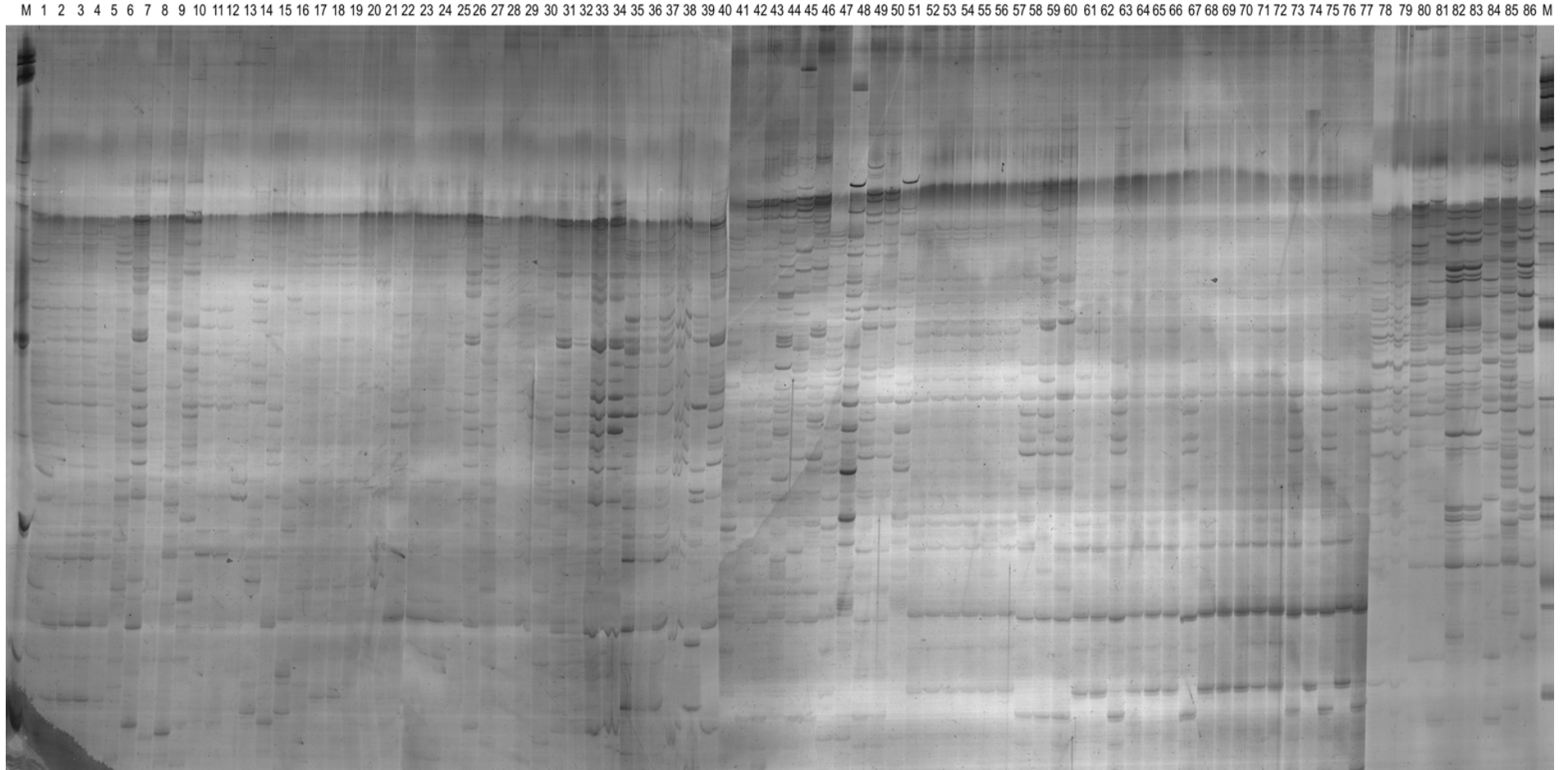
Şekil 4.15 Primer 5 (E-T/M-A) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.16 Primer 6 (E-G/M-T) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü



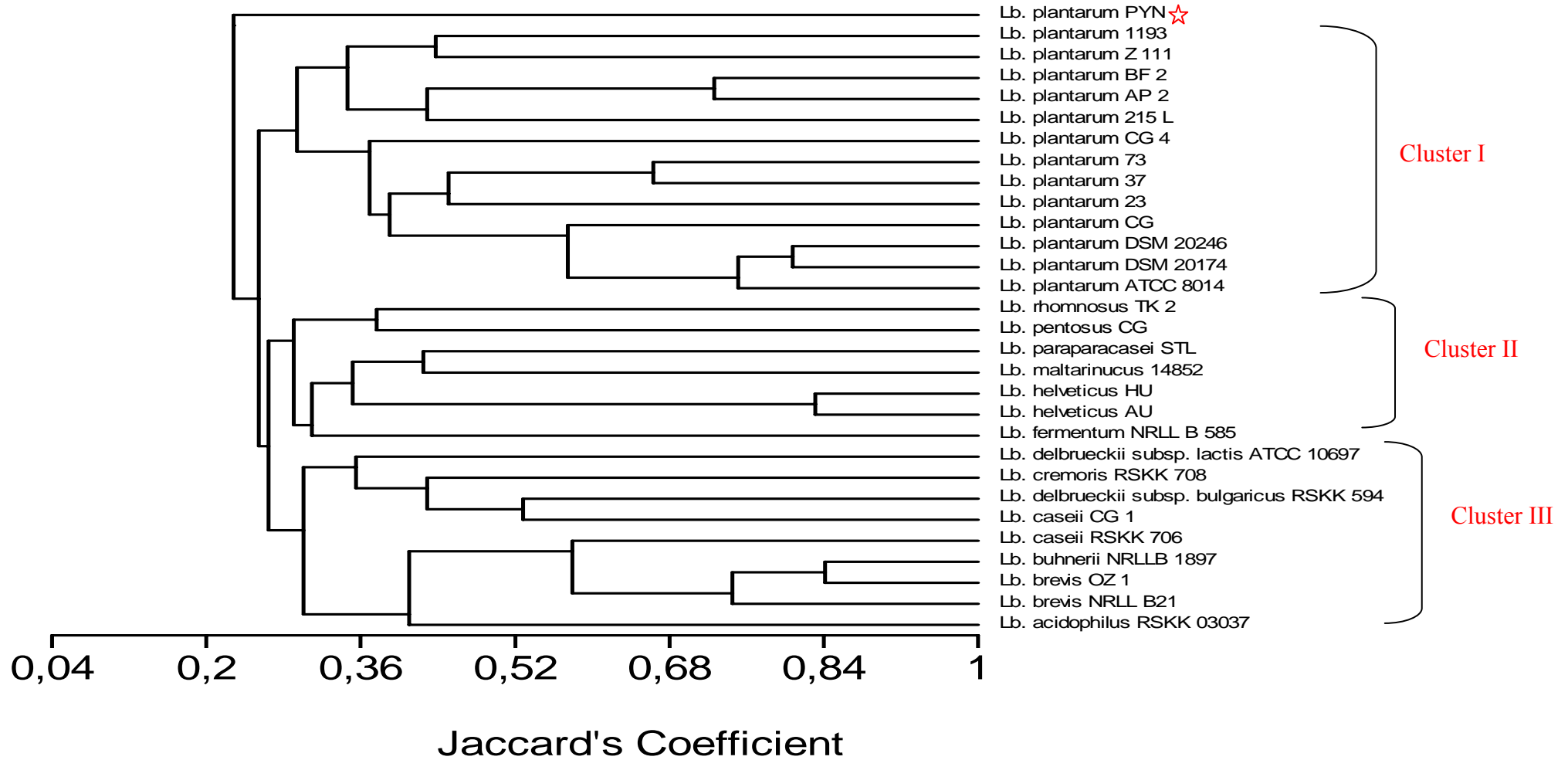
Şekil 4.17 Primer 7 (E-G/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamit jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.18 Primer 8 (E-C/M-G) ile gerçekleştirilen selektif PCR ürünlerinin denatüre poliakrilamid jel elektroforez görüntüsü

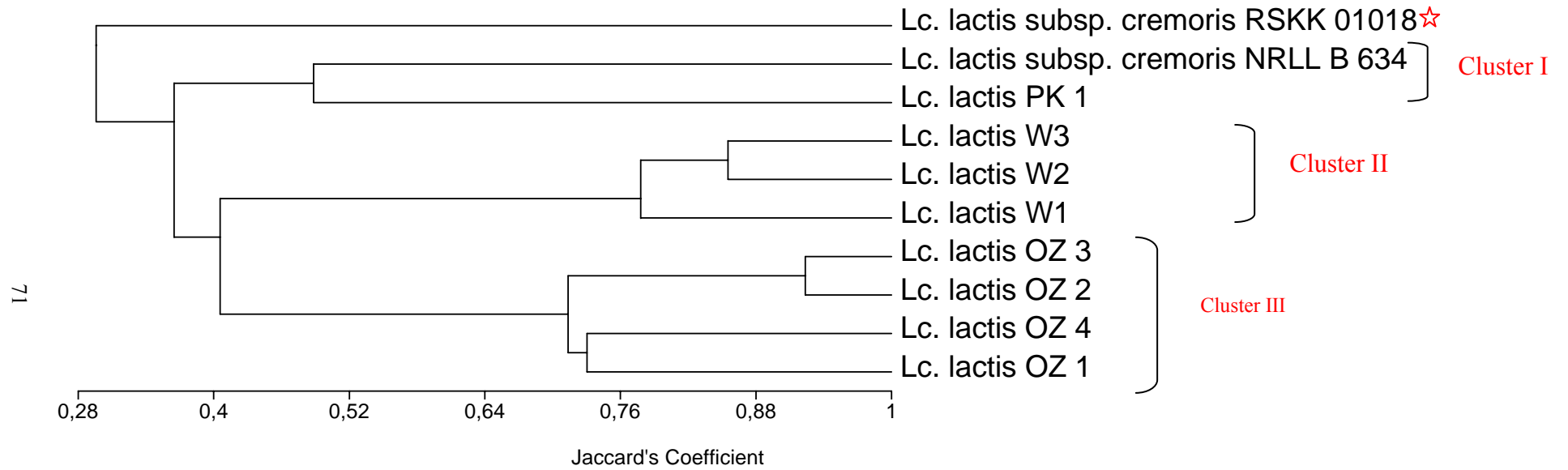
4.7 Dendogramın ve benzerlik indeksinin oluşturulması

Tarayıcı ile taranan cam plakalardaki jel görüntüleri bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra sonuçlar var-yok şeklinde skorlanmıştır. Elde edilen ham veriler Jaccard (1908) benzerlik indeksine, UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic averages) göre değerlendirilmiş ve Multi-Variate Statistical Package (MVSP) programının kullanımı ile bilgisayarda elde edilen dendogram ve benzerlik indeksi sırasıyla Şekil 4.19 - 4.30 da verilmiştir



Şekil 4.19 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşuna ait dendrogram

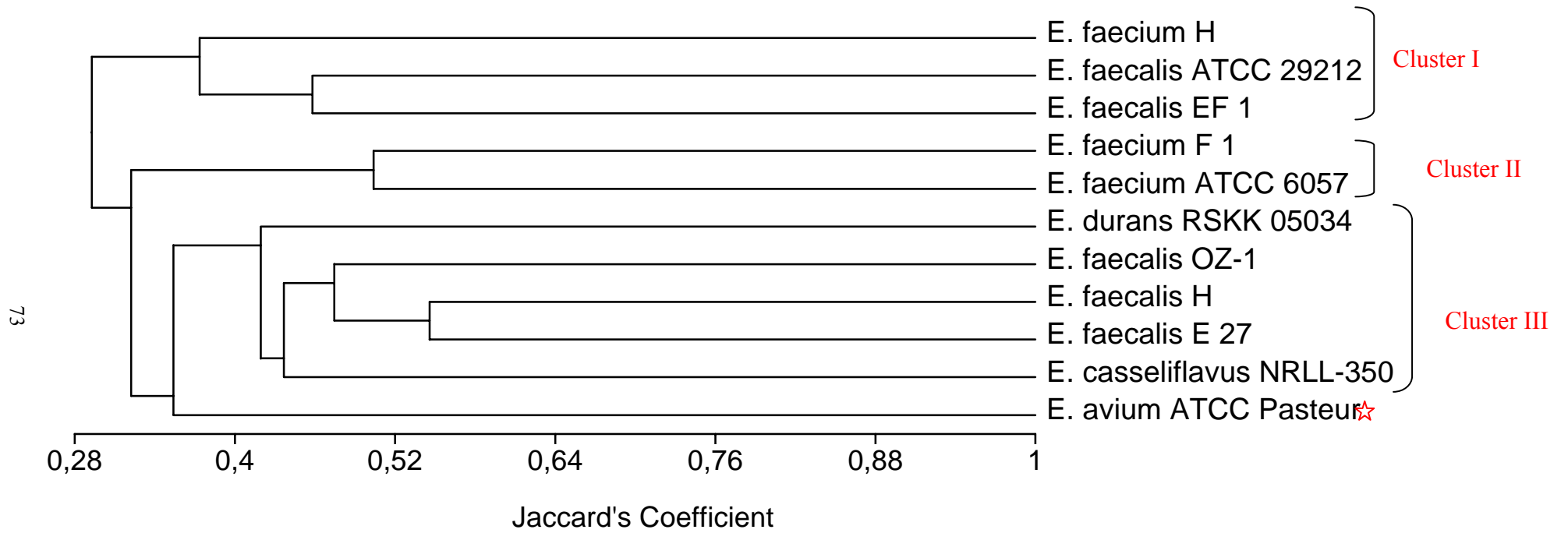
Şekil 4.20 *Lactobacillus* suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.21 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 10 adet *Lc. lactis* suşuna ait dendrogram

	<i>Lc. lactis</i> OZ1	<i>Lc. lactis</i> OZ2	<i>Lc. lactis</i> OZ3	<i>Lc. lactis</i> OZ4	<i>Lc. lactis</i> W1	<i>Lc. lactis</i> W2	<i>Lc. lactis</i> W3	<i>Lc. lactis</i> PK1	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B 634	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018
<i>Lc. lactis</i> OZ1	1,000									
<i>Lc. lactis</i> OZ2	0,701	1,000								
<i>Lc. lactis</i> OZ3	0,713	0,924	1,000							
<i>Lc. lactis</i> OZ4	0,730	0,696	0,743	1,000						
<i>Lc. lactis</i> W1	0,403	0,396	0,411	0,480	1,000					
<i>Lc. lactis</i> W2	0,381	0,382	0,404	0,430	0,811	1,000				
<i>Lc. lactis</i> W3	0,386	0,372	0,387	0,437	0,745	0,855	1,000			
<i>Lc. lactis</i> PK 1	0,371	0,398	0,398	0,391	0,327	0,394	0,455	1,000		
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLLB634	0,295	0,337	0,345	0,339	0,318	0,351	0,390	0,489	1,000	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK01018	0,258	0,342	0,333	0,287	0,266	0,247	0,249	0,312	0,368	1,000

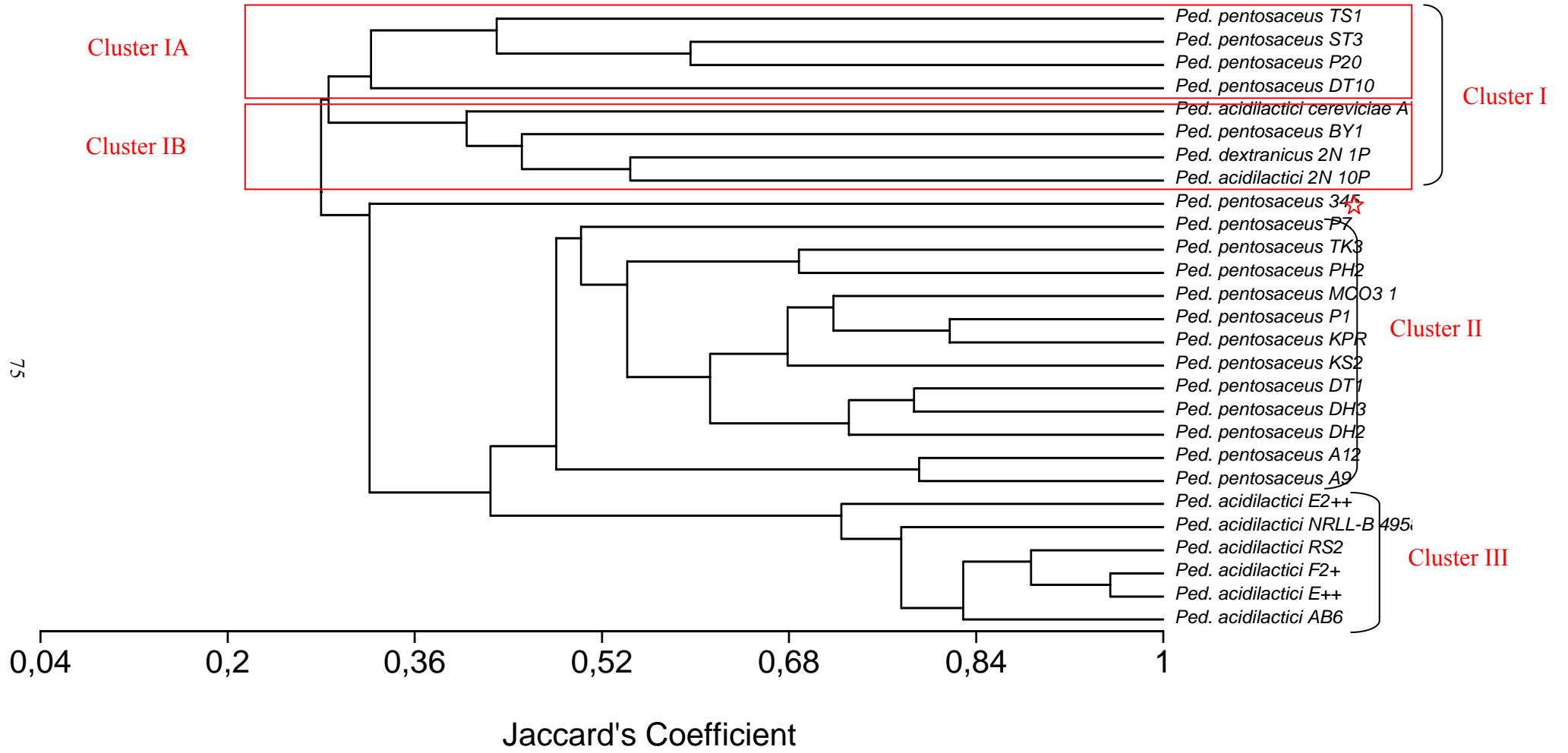
Şekil 4.22 *Lc. lactis* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.23 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 11 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram

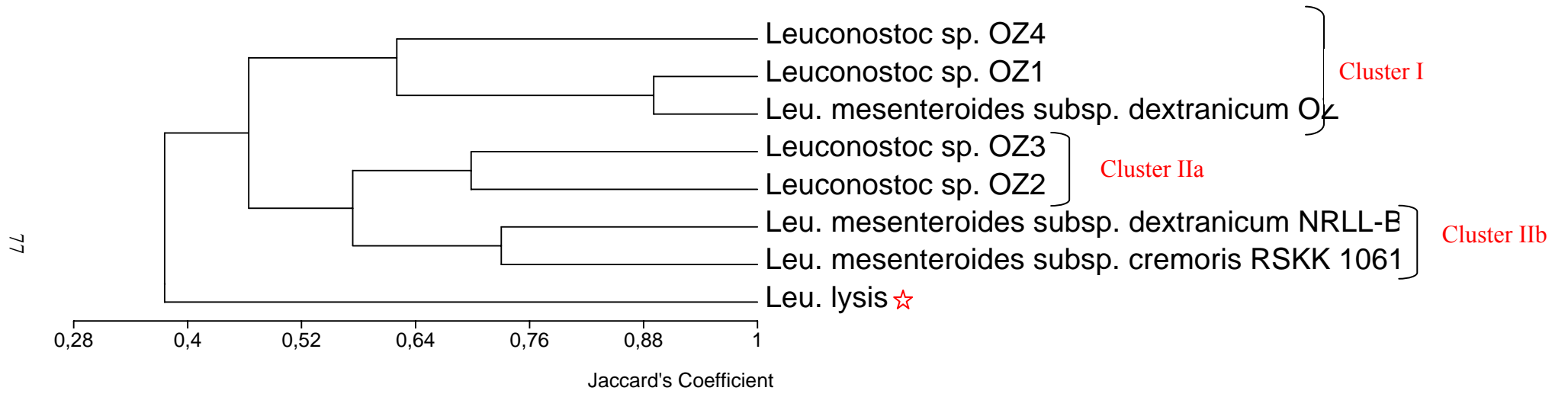
	<i>E. avium</i> ATCC Pasteur	<i>E. casseliflavus</i> NRLL-3502	<i>E. faecalis</i> E 27	<i>E. durans</i> RSKK 05034	<i>E. faecalis</i> H	<i>E. faecalis</i> OZ1	<i>E. faecalis</i> EF1	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecium</i> ATCC 6057	<i>E. faecium</i> F1	<i>E. faecium</i> H
<i>E. avium</i> ATCC Pasteur	1,000										
<i>E. casseliflavus</i> NRLL-3502	0,380	1,000									
<i>E. faecalis</i> E 27	0,361	0,492	1,000								
<i>E. durans</i> RSKK 05034	0,338	0,388	0,422	1,000							
<i>E. faecalis</i> H	0,365	0,444	0,546	0,466	1,000						
<i>E. faecalis</i> OZ1	0,327	0,374	0,452	0,401	0,497	1,000					
<i>E. faecalis</i> EF1	0,385	0,309	0,323	0,358	0,319	0,396	1,000				
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,341	0,242	0,250	0,303	0,353	0,286	0,458	1,000			
<i>E. faecium</i> ATCC 6057	0,265	0,311	0,384	0,335	0,473	0,365	0,315	0,293	1,000		
<i>E. faecium</i> F1	0,212	0,248	0,319	0,257	0,406	0,293	0,228	0,277	0,504	1,000	
<i>E. faecium</i> H	0,279	0,264	0,219	0,228	0,300	0,255	0,321	0,426	0,243	0,259	1,000

Şekil 4.24 *Enterococcus* suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.25 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 27 adet *Pediococcus* suşuna ait dendrogram

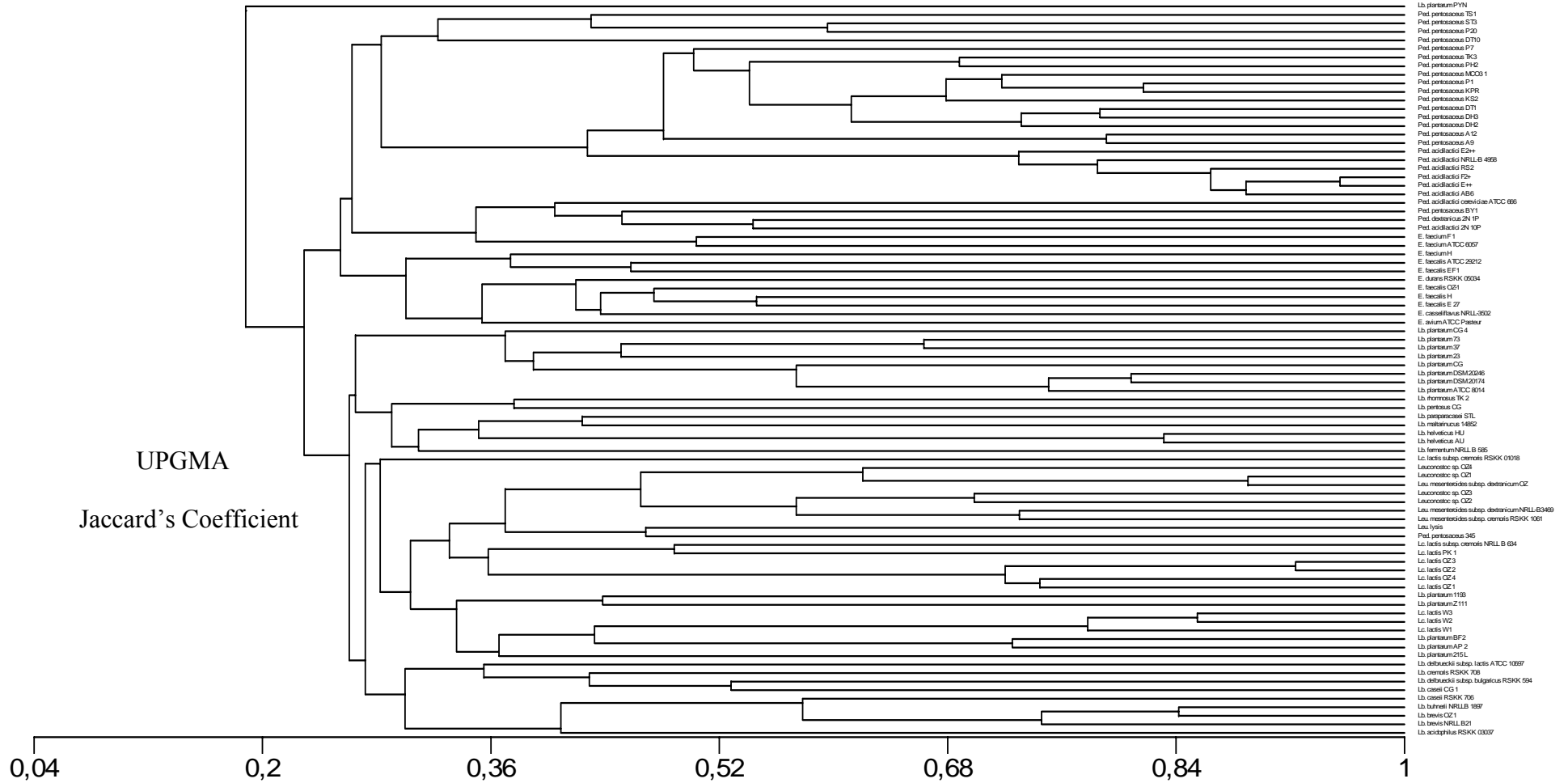
Şekil 4.26 *Pediococcus* suşlar temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.27 AFLP paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 8 adet *Leuconostoc* suşuna ait dendrogram

	<i>Leu. lysis</i>	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B3469	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ1	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ2	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ3	<i>Leuconostoc</i> sp. OZ4
<i>Leu. lysis</i>	1,000							
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	0,364	1,000						
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL-B3469	0,359	0,730	1,000					
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ	0,392	0,464	0,486	1,000				
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ1	0,401	0,459	0,465	0,890	1,000			
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ2	0,364	0,610	0,641	0,514	0,520	1,000		
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ3	0,387	0,515	0,531	0,529	0,503	0,699	1,000	
<i>Leuconostoc</i> sp. OZ4	0,362	0,382	0,369	0,599	0,642	0,432	0,453	1,000

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



Şekil 4.29 Değişik primer kombinasyonlarının kullanımı neticesinde 86 adet LAB suşuna ait AFLP paternlerinin UPGMA'sından oluşturulan dendrogram

Şekil 4.30 Oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

LAB lerinin endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilir olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayırımını sağlayan güvenilir metotların uygulanması oldukça önemlidir ve özellikle son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan yöntemler olarak değerlendirilmektedir.

LAB identifikasyonunda kullanılan fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayırımı için halen önemli bir rol oynasa da yorumlaması oldukça zor olan bu teknikler aynı zamanda zaman alıcı ve moleküler metotlar ile karşılaştırıldıklarında ise daha az ayırım gücüne sahiplerdir (Temmerman *et al.* 2004). Bununla beraber, fenotipik testler ile gen ekspresyonunun ürünü karakterize edildiğinden bu özelliklerin hepsi spontan mutasyon ve büyüme koşullarındaki değişimler neticesinde değişim göstermeye meyillidirler. LAB'lerin çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı LAB lerin tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe uyandırıcıdır. Bununla beraber büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanımlama işlemlerinde zorluk yaratmaktadırlar. Bu kriterler kaba bir tanımlama amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir identifikasyon amacına yönelik değildir. Bundan dolayıdır ki LAB lerinin cins ve tür bazında tanımlanmalarında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış identifikasyonlara ve hayal kırıklığı yaratan 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, organizmanın genetik yapısının analizini temel alan metotlar olup DNA'yı yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon paternlerindeki polimorfizmini ve ekstrakromozomal DNA'nın varlığını ya da yokluğunu içeren çalışmalardır. DNA temelli teknikler, 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 *et al.* 1998; Bush and Nitschko 1999). Bununla beraber, kromozomal DNA molekülünün insersiyon ve delesyonu, ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına veya var olan kesim bölgelerinin elimine olmasına sebep olan rastgele mutasyonlardan etkilenmekle beraber genotipik metotlar doğal varyasyona daha az maruz kalmaktadırlar.

Laktik asit bakterilerinin moleküler identifikasyonuna yönelik pek çok moleküler teknik kullanılmasına rağmen (DNA baz oran analizi, ribotiplendirme, protein profilleri, RAPD analizi, AFLP analizi gibi) bu yöntemlerin bazılarında da birtakım sınırlayıcı faktörler söz konusu olmaktadır. Bu faktörler arasında sonuçların her defasında aynı olmaması bunun dışında özellikle çok fazla zamana ve işgücüne gerek duyulması çalışmaların devamı için sınırlayıcı olmaktadır.

Tür-suş düzeyinde oldukça yüksek oranda başarıya ulaşan, son yıllarda diğer genotipik metotlara alternatif olarak sunulan ve PCR temelli bir DNA parmakizi tekniği olan AFLP'de farklı restriksiyon enzimlerinden oluşan kombinasyon ve PCR da kullanılacak primerlerde selektif nükleotitlerin seçimi bu tekniği mikroorganizmaların moleküler tiplendirmesinde faydalı, kullanılabilir yeni bir sistem yapmaktadır. AFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon endonükleazların her biri DNA üzerinde spesifik bir bölgeyi veya sekansı tanımakta ve kesim işlemi neticesinde DNA fragmanları meydana gelmektedir. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına pre-

selektif amplifikasyon adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılır. Genelde her bir AFLP reaksiyonunda yaklaşık 30-80 restriksiyon fragmanı beraber amplifiye olduğundan ve denatüre koşullarda gerçekleşen jel elektroforez sisteminde tespit edilebildiklerinden teknik DNA polimorfizmin tespiti için son derece güçlü bir tekniktir. Tekniğin çok geniş bir alanı taraması, az miktarda işgücüne gereksinim duyması, kısa sürede neticelenmesi ve yorumlanabilmesinin oldukça kolay oluşu en temel avantajlarından olup bu yeni tekniğe olan ilgiyi arttırmaktadır.

Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel olarak kullanılan taksonomik sınıflandırmanın temeli fizyolojik, morfolojik ve farklı sıcaklıklarda, pH değerlerinde, tuz konsantrasyonlarında gelişim, arjinin degradasyonu ve karbonhidrat katabolizması gibi metabolik/biyokimyasal özelliklerin incelenmesini içeren **fenotipik özelliklere** dayanmaktadır. A.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Kültür Koleksiyonumuzda farklı fenotipik ve biyokimyasal testler ile cins düzeyinde, API CH 50 tanımlama test kiti kullanımı ile de tür/alttür düzeyinde tanımlanması önceden yapılmış farklı 5 cinse ait toplam 86 adet Laktik Asit Bakterisi suşu bulunmaktadır.

1. Uygun besiyerlerinde geliştirilen LAB'lerinden PROMEGA Wizard DNA isolation kit kullanımı ile genomik DNA izole edildikten sonra farklı hedef sekansları tanıyan *EcoRI* ve *MseI* restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları ile farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşumuna olanak sağlanmıştır. Genomik DNA'nın *EcoRI* ve *MseI* restriksiyon enzimleri ile kesimi neticesinde 3 farklı restriksiyon fragmanı ortaya çıkmıştır: *MseI-MseI*, *EcoRI-EcoRI* ve *EcoRI-MseI*. Elde edilen bu kromozomal DNA fragmanlarına amplifikasyon için kalıp DNA yaratmak amacıyla *EcoRI* ve *MseI* adaptörleri eklenmiştir.
2. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına *pre-selektif amplifikasyon* adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranmış ve daha sonra tek nükleotit uzatmalı farklı primer kombinasyonlarının PCR'da kullanımı ile istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılmıştır (*selektif amplifikasyon*). Selektif PCR çalışmalarında

kullanılabilecek en uygun-skorlanabilir bantlar veren primer kombinasyonlarını seçebilmek için olası 16 primer kombinasyonunun kullanımı ile (E-A/M-A; E-A/M-T; E-A/M-C; E-A/M-G; E-T/M-A; E-T/M-T; E-T/M-C; E-T/M-G; E-C/M-A; E-C/M-T; E-C/M-C; E-C/M-G; E-G/M-A; E-G/M-T; E-G/M-C; E-G/M-G) amplifikasyon çalışmaları ardı ardına gerçekleştirildi ve jel üzerinde vermiş oldukları bant paternlerine göre en iyi çalışan *EcoRI/MseI* primer kombinasyonları (E-A/M-T; E-A/M-G; E-T/M-T; E-T/M-G; E-T/M-A; E-G/M-T; E-G/M-G ve E-C/M-G) seçilerek selektif PCR çalışmasında kullanıldı. Bununla beraber, çift uzatmalı primerlerin kullanımı ile gerçekleştirilen çalışmada amplifikasyon gözlenmedi ve çalışmada kullanılmadı.

3. Amplifiye edilen fragmanlar parmakizi yaratmak için denatüre koşullarda gerçekleşen poliakrilamid jel elektroforezde yürütüldü.
4. Tarayıcı ile taranan cam plakalardaki jel görüntülerine ait fotoğraflar incelendi ve her bir primer kombinasyonu için her bir numunedeki bant var (1) – yok (0) şeklinde skorlandı. Elde edilen ham veriler Jaccard (1908) benzerlik indeksine göre değerlendirilerek UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic averages) temelli dendogramlar oluşturulmuş ve Multi-Variate Statistical Package (MVSP) programının kullanımı ile de benzerlik indeksi ortaya çıkarılmıştır.
5. UPGMA kullanılarak elde edilen dendogramlar oldukça ümit vaat etmektedir. Üzerinde çalışma yaptığımız *Lactobacillus* grubuna ait türler ve alt türler ile ilgili AFLP çalışması ve bu çalışmadan elde edilen dendogram göz önünde bulundurulduğu zaman (Şekil 4.19), temelde 3 büyük grubun (cluster) varlığı dikkati çekmektedir. *Lactobacillus plantarum* türlerinin bir tanesi dışında (*L. plantarum* PYN) tamamı aynı temel gruba ait olup ortak bir klondan türediği düşünülmektedir. *L. plantarum* olarak daha önceden tanımlamış olduğumuz PYN suşunun bu grubun tamamen dışarısında yer alması ve cluster I de yer alan diğer *Lactobacillus plantarum* suşlarına en fazla %31.6 benzerlik göstermesi (şekil 4.20) bize bu suşun fenotipik özelliklere dayalı tanımlamasında bir hata olabileceğini düşündürmektedir.

İkinci büyük grubu oluşturan cluster III de toplam 9 adet suş bulunmaktadır ve bu temel grup da kendi içerisinde iki minor gruba ayrılmaktadır. Kendi içlerinde birbirlerine yakınlık gösteren *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 10697, *Lb. cremoris* RSKK 708, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RSKK 594, *Lb. casei* CG1 in içerisinde yer aldığı grup ile yine kendi içlerinde birbirlerine yakınlık gösteren *Lb. casei* RSKK 706, *Lb. buhnerii* NRLLB 1897, *Lb. brevis* OZ1, *Lb. brevis* NRLL B21 ve bu gruba biraz daha uzak olan ancak yine bu grubun içinde yer alan *Lb. acidophilus* RSKK 03037 in yer aldığı diğer grup.

Cluster II de *Lactobacillus* grubuna ait farklı 7 adet suş bulunmaktadır. Aynı grupta kümelenmelerine rağmen birbirlerine olan benzerlik oranları %50 nin altında gözükmektedir. Bununla beraber, izole edildikleri kaynaklar farklı olmasına rağmen birbirlerine oldukça yüksek oranda (> %80) benzerlik gösteren iki suş, *Lb. helveticus* AU ve *Lb. helveticus* HU'da bu grup içerisinde yer almakta ve ortak klondan türediklerini düşündürmektedir.

6. 10 adet *Lactococcus lactis* suşuna ait DNA elektroforetik paternlerinden elde edilen veriler bu suşları temelde 3 cluster altında toplamaktadır. Dendogramda ilk göze çarpan, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* RSKK 01018 suşunun bu temel 3 grubun tamamen dışında yer alması ve cluster I de yer alan ve yine *Lc. lactis* subsp. *cremoris* olarak tanımlanan NRLL B634 suşu ile % 36.8 benzerlik göstermesi yine fenotipik tanımlamadan kaynaklanabilen bir hata olabileceğini düşündürmektedir ki genel LAB lerine ait çıkartmış olduğumuz dendogram sonuçları da düşüncemizi desteklemektedir (şekil 4.29). Bununla beraber, önemli olduğunu düşündüğümüz diğer bir husus ise Cluster II de yer alan ve birbirlerine kendi içlerinde >% 75 benzerlik gösteren *Lc. lactis* W1, *Lc. lactis* W2, ve *Lc. lactis* W1 suşlarının ortak bir klondan gelip bu bağlamda yine ortak bir klondan gelip ancak cluster III de yer alan ve yine kendi içlerinde birbirlerine >% 75 benzerlik gösteren *Lc. lactis* OZ1, *Lc. lactis* OZ2, *Lc. lactis* O3 ve *Lc. lactis* O4 suşlarından ayrıldığı görülmektedir. Bu düşüncemizi destekleyen bir veri ise W1,W2, ve W3 suşlarının ABD orijinli; OZ1, OZ2 , OZ3 ve OZ4 suşlarının ise

Türkiye orijinli olduğudur. Daha detaylandırılacak olursak OZ2 ve OZ3 suşunun bir kaynaktan, OZ1 ve OZ4 suşunun ise diğer başka bir kaynaktan izole edilmiş olan aynı klon olduğunu düşünebiliriz.

7. *Enterococcus* suşlarının gerçek klonal kimliklerinin tespiti için yapılan 8 primer kombinasyonlu AFLP çalışmasından elde edilen paternlerden oluşturulan dendogramda 3 major cluster göze çarpmaktadır. Cluster I de birbirleri ile yakın ilişkide olduğunu düşündüğümüz *E. faecalis* ATCC 29212 ile *E. faecalis* EF 1 ve bu grupta olmasına rağmen hem bu iki suştan hem de fenotipik testler neticesinde aynı tür olarak tanımlanmasına rağmen cluster II de yer alan *E. faecium* F1 ve *E. faecium* ATCC 6057 den farklılık gösteren *E. faecium* H. Farklı klonlardan köken alan ve dolayısıyla da farklı metabolik aktiviteler sergilemeleri neticesinde farklı cluster'lar içerisinde yer almış olabilecekleri gibi yanlış tanımlama da olabilir. Bununla beraber, cluster I de yer alan bu iki *E. faecalis* suşu yine muhtemelen sahip olmuş oldukları metabolik/biyokimyasal özelliklerden dolayı cluster III de yer alan *E. faecalis* OZ1, *E. faecalis* H ve *E. faecalis* E27 suşlarından farklılık göstermektedir ve her bir grupta yer alan bu suşların farklı klonlardan türediği düşünülmektedir. Tür bazındaki farklılaşma bu teknik kullanımı neticesinde başarılı bir şekilde yakalanmıştır: *E. avium* ATCC Pasteur, *E. casseliflavus* NRLL 350 ve *E. durans* RSKK 05034 suşlarının yaratmış olduğu farklılıklar da görüldüğü gibi.
8. *Pediococcus* suşları ile gerçekleştirilen AFLP bant paternleri göz önünde bulundurulduğunda 3 temel cluster göze çarpmaktadır. Tür ve suş bazında ayırımın başarılı bir şekilde sağlandığı Cluster II ve cluster III deki kümeleşmeler ile görülmüştür. Cluster II de *Pediococcus pentosaceus* türüne ait değişik suşlar, cluster III de ise *Pediococcus acidilactici* türüne ait değişik suşlar yer almaktadır. Bununla beraber, *Pediococcus pentosaceus* türüne ait 345 suşu cluster II de yer alan *Pediococcus pentosaceus* suşlarından klonal kimlik olarak ayrı düşmüştür ve farklı klonlardan köken aldıkları ve dolayısıyla da farklı fenotipik özelliklere sahip olduğu için cluster II de yer alan benzer türlerden farklılık göstermektedir. Farklı klonlara ait olduğunu bize düşündüren bir gerçek ise *P. pentosaceus* 345

suşunun USA, cluster II de yer alan diğer *P. pentosaceus* suşlarının ise Türkiye orijinli olmasıdır. Bununla beraber, tüm bakteri gruplarını içeren dendogram göz önünde bulundurulduğunda *P. pentosaceus* 345 suşunun Leuconostoc grubuna yakınlık göstermesi ve bu grubun içerisinde yer alması yanlış fenotipik tanımlama ihtimalinde düşündürmektedir. Tamamı USA orijinli izolatlar olan *P. acidilactici* türüne ait suşlar cluster III de kümelenmiş olup ortak bir klonlardan türediklerini bize düşündürmektedir. Cluster IA da Türkiye orijinli, farklı kaynaklardan izole edilen toplam 4 adet *P. pentosaceus* suşu bulunmaktadır. Ancak, bu grupta yer alan suşlar yine Türkiye orijinli olan ve her biri farklı kaynaklardan izole edilmiş olan Cluster II deki *P. pentosaceus* suşlarından taksonomik olarak uzak kalmaktadır. Bu da bize bu iki clusterın farklı klonlardan türediğini düşündürmektedir. Bununla beraber, Cluster IB de yer alan 4 adet suşun kimliği bizde şüphe uyandırmakta ve fenotipik identifikasyondan kaynaklanan hatalar olduğunu düşündürmektedir. Şekil 4.29 daki dendogram göz önünde bulundurulduğunda şüphelerimiz desteklenmektedir.

9. 8 adet *Leuconostoc* suşuna ait DNA elektroforetik paternlerinden elde edilen veriler bu suşları temelde 2 cluster altında kümelendirmektedir. Benzer suşlar aynı cluster içerisinde yer alırken, *Leu. lysis* bu kümeleşmelerin dışında kalmaktadır. Cluster IIa de yer alan yabancı kaynaklı *Leuconostoc* OZ2 ve OZ3 suşu taksonomik olarak cluster I de yer alan Türkiye kaynaklı *Leuconostoc* OZ1 ve OZ4 suşundan ayrı düşmektedir ve OZ1 suşu yine aynı kümede yer alan *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* OZ suşu ile % 90 benzerlik göstermektedir.

Genomik restriksiyon fragmanlarının PCR ile amplifikasyonunu temel alan AFLP tekniği her hangi bir orijine veya kompleksliğe sahip DNA'larda kullanılabilir. Bununla beraber, AFLP de elde edilen polimorfik bantların sayısı genomun kompleks olup olmadığına ve primerlerin 3' ucundaki selektif nükleotit seçimine bağlı olarak değişmektedir. AFLP primerlerine selektif nükleotitlerin eklenmesi band sayısını ilave her bir selektif bazda yaklaşık 4 kat azaltmaktadır. Farklı restriksiyon enzimlerinin ve farklı selektif nükleotit kombinasyonlarının denenmesi polimorfizm bulabilme olasılığını arttırmaktadır. Ancak, selektif baz sayısı arttıkça polimorfizmin tespit

olasılığı da azalmaktadır. Çalışmamızda, şüphe uyandırmadan skorlanabilecek, tekrarlanabilir AFLP profilleri yaratmak için olası 16 primer kombinasyonu denendi ve bunlardan iyi-skorlanabilir sonuç veren 8 tanesi kullanılarak bu çalışma gerçekleştirildi. Bununla beraber, bu çalışmada birbirlerine oldukça benzer paternler veren suşların gerçek klonal kimliklerini tespit edebilmek için daha fazla primer kombinasyonlarının ve her bir kombinasyona ait daha fazla tekrarların denenebileceği ilave AFLP-temelli çalışmalara ihtiyaç var dűřüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- 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.
- Arias, C.R., Verdonck, L., Swings, J., Garay, E. and Aznar, R. 1997. Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7); 2600-2606.
- Babalola, O.O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12); 710-713.
- 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.
- 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; 263-278.
- Cocconelli, P.S., Porro, D., Galandini, S. and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and *enterococci*. *Letters in Applied Microbiology*, 21; 376-379.

- Cocconelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L., Cappa, F. and Bottazzi, V. 1997. Use of RAPD and 16 S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology*, 24; 8-12.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. and Vernoux, J.P. 2003. Isolation, characterization and identification of *lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. *INRA, EDP Sciences*, 83; 269-306.
- Cogan, T.M. 1996. History and taxonomy of starter cultures in dairy starter cultures Wiley-VCH Inc. 1-25.
- Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., and Hillier, A.J. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70, 161-183.
- 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.
- Dellaglio, F., Felis, G., Castioni, A., Torriani, S. and Germord J.E. 2005. *Lactobacillus delbrucki* subsp.*indicus* isolated from Indian dairy products. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*, 55; 401-404.
- Ding, Y., Karie, O., Labbe, J., Palcic, M.M., Ernat, B. and Hindsgaul, O. 1995. Synthesis and biological activity of oligosaccharide libraries. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 376; 261-269.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 2.pheno-and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88; 165-188.

- Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 31; 481-486.
- Duffner, F. and O'Connell, M. 1995. Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 78; 20-27.
- Ehrmann M.A. and Vogel, R.F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*. 20; 1-12.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49; 217-221.
- Farber, J.M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*. 59; 1091-1101.
- 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.
- 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.
- 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.

- Hoover, D. G. and Steenson, L. R. (eds). 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K. 1996. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. International Journal of Systematic Bacteriology, 46(2); 572-580.
- Huys, G., Rigouts, L., Chemlal, F., Portaels, F. and Swings, J. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* and *M. ulcerans*. Journal of Clinical Microbiology, 3675-3680.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., 44, 22–270.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiology Reviews, 59; 171-200.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 142; 1881-1893.
- Jureen, R., Harthug, S., Sorner, S., Digranes, A., Willems, R.J.L., and Langeland, N. 2004. Comparative analysis of amplified fragment length polymorphism and pulsed field gel electrophoresis in a hospital outbreak and subsequent endemicity of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 40; 33-39.
- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S., Richmond, K., Adair, D.M., Hugh-Jones, M., Kuske, C.R. and Jackson, P. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. Journal of Bacteriology, 179(3); 818-824.

- 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.
- Kleanhammer, Y.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 70; 337-349.
- Kneifel, W., Jaros, D. and Erhard, F. 1999. Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt related products fermented with commercially available starter cultures. International Journal of Food Microbiology, 18, 179-189.
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, 1043-1234, Baltimore.
- Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.M.H. and Vandebroucke-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.
- Kunene, N.F., Geornaras, I., Von Holy, A., and Hastings, J.W. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology. 66(3); 1084-1092.
- Laursen, B.G., Bay, L., Cleenweck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., and Leisner, J.J. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood, phenotypic and genotypic characterization. Systematic and Applied Microbiology, 28; 151-164.

- Lily, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.
- Lin, J.J., Kuo, J. and Ma, J. 1996. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Researches*, 24(18); 3649-3650.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbayer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U. and Scheleifer, K.H. 1993. Phylogenetic relationships of bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64; 285-304.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1986. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory (CSH), New York, 455.
- Miller, KW., Schamber., R, Osmanağaoğlu, Ö. and Ray, B. 1998. Isolation and characterization of pediocin ACh chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (6); 1997-2005.
- 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.
- Moschietti, G., Blaiotta, G., Villani, F. and Coppola, S., 2001. Nisin producing organisms during traditional Fior di latte cheese making monitored by multiplex-PCR and PFGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 63; 109-116.
- Olive, D.M. and Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37; 1661-1669.

- Orla-Jensen S. 1919. In S. Orla-Jensen (Ed.), The lactic acid bacteria. P 1-196. Copenhagen: A.F. Host and Son.
- Pot, B., Hertel, C., Descheemaeker, P., Kersters, K., 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.
- 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>.
- Ray, B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservatives: an overview. pp 177-206. *In* Food biopreservatives of microbial origin. Bibek Ray and Mark Daeschel (eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Ray, B. 1996. Lactic acid bacteria: Current Advances in Metabolism Genetics and Applications T.F. Bozoğlu and B. Ray (eds.), p: 101-136 Springer, Verlag, Berlin.
- 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.
- Sahl, H-G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translation modifications. *Eur. J. Biochem.* 230; 827-853.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T. and Yokotsuka, K. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(3); 335-337.
- Savelkoul, P.M.H., Aarts, H.J.M., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.L.W., Schouls, L. and Lenstra, A. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism analysis the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10); 3083–3091.
- Sow, N'D.M., Dauphin, R.D., Roblain, D., Guuro, A.T. and Thonart, P. 2005. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *African Journal of Biotechnology*, Vol: 4(5); 409-421.
- 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.
- Tailleux, P., Quenee, P. and Chopin, A. 1996. Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ: Application de la RAPD a un groupe de *Lactobacilles*. *Le Lait*, 76; 147-158.
- Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science and 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.
- Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F. and Kersters, K. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 554-560.

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60, 407–438.
- Van der Zee, A., Verbakel, H. and Von Zon, J. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of novel epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology*, 37; 342-349.
- Ventura, M. and Zink, R. 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 217; 141-154.
- 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.
- Vuyst, L.D, and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins p. 107-123. *In* Bacteriocins of lactic acid bacteria. L. De vuyst, and E. J. Vandamme (ed.), Blackie academic and Professional. England.
- Weiss, R.A., Eichne, R., and Sun, T.T. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: A 48 and 56 kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *The Journal of Cell Biology*, 98, 1397-1406.
- Welsh, J. and Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*, 18, 7213-7218.
- Wouters, J.T.M., Ayed, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, S. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.

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

DNA İZOLASYONU VE AFLP ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN KİTLER

Kullanılan kitleler	Marka
----------------------------	--------------

Kromozomal DNA izolasyon kiti

PROMEGA WIZARD

AFLP Core Reagent Kit

INVITROGEN

AFLP Analysis System for Microorganism Primer Kit

INVITROGEN

EK 3

TAMPON VE SOLÜSYONLAR

EK 3.1 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

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

İçerik (pH :8.3)	% g
Tris	10.8
Borik asit	5.5
EDTA (1M) pH:8.0	4.0 ml
Distile su	1 lt

❖ YÜKLEME BOYASI

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

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

❖ ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik	% g
Etidyum bromit	1.0
Distile su	100 ml

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

❖ **% 1' lik AGARUZ JEL**

İçerik	% g
Agaroz	1.0
1 X TBE Tamponu	100 ml

Agaroz 1.0 gr tartılarak 100 ml 1 X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele 5µl etidyum bromit solüsyonu eklenir.

EK 3.2 POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ

POLİAKRİLAMİT JEL (%6'lık-Üre içeren)

İçerik	% g
Akrilamit	5.7
Bisakrilamit	0.3
Üre	45
10 X TBE	10 ml
Ultra saf su (Son Hacim)	100 ml

Bu içerik 60°C'de 200 rpm de manyetik karıştırıcıda yaklaşık 30 dakika karıştırılır. Son hacim ultra saf su ile 100 ml. ye tamamlanır. Jel oda sıcaklığına gelene kadar soğutulur. Jel iki cam arasına dökülmeden hemen önce oda sıcaklığına gelmiş jele 45 µl TEMED ve 600 µl APS aynı anda eklenir. Ve jel dikkatli bir şekilde dökülür.

TBE TAMPONU (Tris-Borik asit-EDTA) 10X

İçerik (pH :8.3)	% g
Tris	108
Borik asit	55
EDTA (1M) pH:8.0	20 ml
Distile su	1 lt

AMONYUM PERSÜLFAT(APS)

İçerik	% g
Amonyum persülfat	0.1
Ultra saf su	1 ml

SEKANS BOYASI

İçerik	% g
Bromofenol	0.0125
EDTA	1 ml
Formamide	49 ml
Xylencyanol	0.0125

Bu içerik koyu renk bir tüp içerisinde -20°C'de saklanır.

POLİAKRİLAMİT JEL (%6'lık-Üre içeren) BOYAMA SOLÜSYONLARI

▪ **FİKSE EDİCİ SOLÜSYON**

(Son hacim 5 lt olacak şekilde içerik karıştırılır)

Asetik asit	500 ml
Ultra saf su	4500ml

▪ **GÜMÜŞ BOYAMA SOLÜSYONU**

Gümüş nitrat	3 gr
Formaldehit	4500µl
Ultra saf su	3 lt

Gümüş nitrat ve formaldehit ultra saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözülür.

▪ **DEVELOPPING SOLÜSYONU**

Sodyum karbonat	90 gr
Formaldehit	4500µl
Sodyum thiosülfat	600 µl
Ultra saf su	3 lt

Developping solüsyonu için sodyum karbonat ile ultra saf su manyetik karıştırıcıda iyice çözülür. Bu solüsyon kullanılana kadar -20°C’de soğutulur. Kullanmadan hemen önce sodyum thiosülfat (0.01gr sodyum thiosülfat +1000 µl ultra saf su içinde iyice çözülür.) ve formaldehit eklenir.

DIKEY JEL İÇİN KULLANILAN CAMLARIN TEMİZLİĞİ

▪ **BIND SILANE**

Bind silane	4 µl
Asetik asit	10 µl
Etanol (% 95)	1500 µl

Hazırlanan bu bind silane sürekli buzdolabında (+4°C’de) tutulur ve her iki ya da üç uygulamadan sonra yenisi hazırlanır.

▪ **ETANOL (%95)**

Etanol (%99.9)	95 ml
dH ₂ O	5 ml

▪ **ETANOL (%70)**

Etanol (%99.9)	70 ml
dH ₂ O	30 ml

EK 4

MOLEKÜLER MARKÖRLER

Denatüre Polakrilamid Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Markör

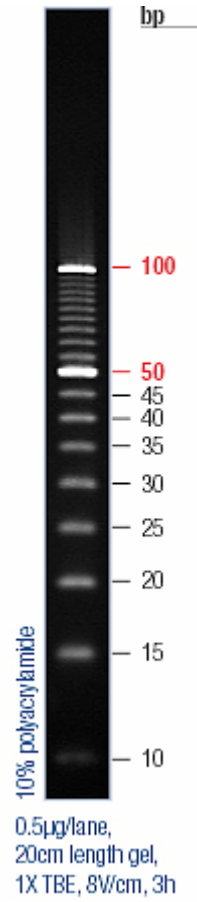
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)

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

The ladder is dissolved in TE buffer.

Storage Buffer (TE buffer)

10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM EDTA.



Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Markör

Lambda DNA/Hind III Markers (FERMENTAS)

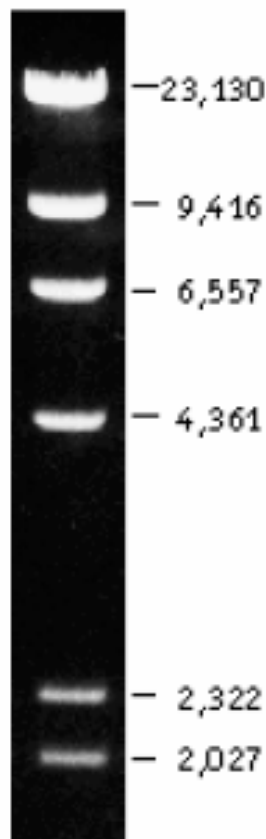
Description Lambda DNA (cI857 Sam 7)/Hind III Markers are prepared by digesting Lambda DNA with Hind III, followed by heat-inactivation of the enzyme. The DNA fragments are then ethanol-precipitated and resuspended in storage buffer.

Fragments (Base Pairs) 1- 23,130; 2- 9,416; 3- 6,557; 4- 4,361; 5- 2,322; 6- 2,027; 7- 564, 8 – 125

Storage Buffer 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA.

Concentration: 0.2-0.5µg/µl.

Number of Bands: 8



EK 5

KİMYASALLAR

Kimyasal Adı	Marka
Agaroz	SIGMA
Akrilamit	MERCK
Amonyum persülfat	SIGMA
Asetik asit	MERCK
Borik asit	MERCK
Bromofenol blue	MERCK
Bromofenol	SIGMA
EDTA	MERCK
Etanol	MERCK
Etidyum bromit	SIGMA
Formaldehit	MERCK
Formamide	MERCK
Gliserol	MERCK
Glukoz	SIGMA
Gümüş nitrat	APPLICHEM
Lambda DNA/Hınd III Markör	FERMENTAS
Lizozim	SIGMA
Maya ekstrat	OXOID
MRS besiyeri	LAB M
MgSO ₄	MERCK
MnSO ₄	MERCK
N'N-Methylene-bisakrilamit	MERCK
Sodyum asetat	MERCK
Sodyum azid	MERCK
Sodyum karbonat	MERCK
Sodyum thiosülfat	SIGMA
Sorbik asit	APPLICHEM
Sukroz	MERCK
Taq DNA polimeraz	PROMEGA

Kimyasal Adı	Marka
TEMED	MERCK
Tripton	OXOID
Tris	SIGMA
Tween 80	MERCK
Ultra saf su	MİLİPORE
Üre	APPLICHEM
Xylencyanol	MERCK
0.22-0.45 mikron por çapına sahip membran filtre	SARTORIUS
100bp DNA ladder	FERMENTAS

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: TÛLİZ YILDIRIM
Doğum Yeri: Erzurum
Doğum Tarihi: 27. 04. 1981
Yabancı Dil: İngilizce
e-mail: tulizyildirim@hotmail.com

► EĞİTİM

Lise: Aydın Nazili Lisesi. 1996-2000
Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü.2000-2004
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji ABD, 2004-2007

► VERDİĞİ SEMİNERLER

Moleküler seviyede Likenlerin taksonomisi (Yüksek Lisans Semineri).Nisan 2006.

► BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA (*PROCEEDINGS*) BASILAN POSTER BİLDİRİLERİ

A. ULUSLAR ARASI

- A1.** Osmanağaoğlu Ö, Kıran F, **YILDIRIM T.** “Determination of pediocin DT10 in SDS-PAGE” **1th International Food and Nutrition Congress,** İstanbul, Turkey, June 15-18, 2005
- A2.** Osmanağaoğlu Ö, Kıran F, **YILDIRIM T.** “Plasmid associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus pentosaceus* DT 10” **8th Symposium on Lactic Acid Bacteria:**

Genetics, Metabolism, and Applications, Egmond aan Zee, Netherland, August 28 to September 1, 2005

- A3.** Osmanağaoğlu Ö, Kıran F, **YILDIRIM T.** “Characterization of pediocin DT 10, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* DT10” **8th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism, and Applications**, Egmond aan Zee, Netherland, August 28 to September 1, 2005

B. ULUSAL

- B1.** Osmanağaoğlu Ö., Atuntaş İ., **YILDIRIM T.** “Geleneksel bir Türk içeceği olan bozadan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* AK 12 tarafından üretilen Anti-listerial bakteriyosin Pediocin AK 12” **19. Ulusal Biyokimya Kongresi**, 22-25 Nisan, Antalya, Türkiye, 2005 .

► PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER:

Laktik Asit Bakterilerine ait bazı türlerin AFLP (çoğaltılan parça boy farklılaşması) yöntemi ile parmak izi analizleri

TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu, Hızlı Destek Projesi, 2007-Yardımcı Araştırmacı, devam etmekte.

PROJE NO: 106T742