

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE TÜR İÇİ VE TÜRLER ARASI AYRIMDA
16S-ARDRA TEKNİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Başak ORAL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

Bülent ORAL'ın anısına

TEZ ONAYI

Başak ORAL tarafından hazırlanan “**Laktik Asit Bakterilerinde Tür İçi ve Türler Arası Ayrımında 16S-ARDRA Tekniğinin Değerlendirilmesi**” adlı tez çalışması 14.01.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç.Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ali ERGÜL
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Üye : Doç. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAKOL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE TÜR İÇİ VE TÜRLER ARASI AYRIMDA 16S-ARDRA TEKNİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başak ORAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyal Genetik laboratuvarımızdaki kültür koleksiyonunda mevcut bulunan ve daha önce fenotipik testler ve API kit kullanımı ile tanımlanmış olan Laktik Asit Bakterilerine ait 148 adet suşun türler arası/tür içi ayrımında 16S-ARDRA tekniğinin taksonomik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışmada kullanmış olduğumuz LAB' nin genomik DNA'ları izole edilmiş ve daha sonraki aşamalarında kalıp DNA görevi görmüştür. 16S evrensel primer çifti [pB (5'd TAACACATGCAAGTCGAACG 3') ve 1492R (5'd TACCTTGTTACGACTT 3')] kullanılarak elde edilen 1458 bp. büyüklüğündeki PZR ürünü 7 farklı restriksiyon enzimi (*HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *MspI*, *PaeI*, *PstI* ve *TaqI*) ile kesilmiştir. Farklı uzunluklara sahip restriksiyon enzim ürünlerin agaroz jel üzerindeki bant profilleri bilgisayar yazılım programına aktarılmıştır. Bantların arasındaki benzerlik "Dice product moment correlation coefficient" ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (aritmetik ortalama kullanarak ağırlıksız gruplama yöntemi) analizi ile kümeleme yapılmış ve tür/suş arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiştir. Kümeleri birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı % 90 olarak belirlenmiştir. Kullanmış olduğumuz 7 farklı restriksiyon enzimine bağlı olarak türler arası/tür içi seviyede birbirleri ile oldukça yakın ilişkide bulunan LAB suşlarının ayrımında bu tekniğin ayırım gücü son derece zayıf bulunmuştur. *Enterococcus* suşlarının *HinfI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda *E. hirae*, *E. faecalis* 135 ve *E. faecalis* 80 suşları sahip oldukları bant profillerine göre diğer *Enterococcus* türlerinden farklılıklar sergilemişlerdir. *Enterococcus* grubuna ait tür ve suşların ayrımında 16S rDNA PZR ürününün *HindIII* ile kesimi neticesinde elde edilen bant profili ile de *E. hirae* suşu diğer enterokoklardan ayrılmıştır. *Lactococcus* suşlarının *HaeIII* ve *MspI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda *Lc. lactis* subsp. *lactis* W1, W2 ve W3 suşları diğer *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarından ayrılmıştır. Bununla beraber, bu 7 enzimin kullanımı ile gerçekleştirilen 16S ARDRA tekniği *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* grubunda yer alan bakterilerin türler arası ve tür içi seviyesinde ayrımı için yeterli olmamıştır. Farklı restriksiyon enzimleri ya da çoklu enzim kombinasyonlarının denenmesi ile bu tekniğin türler arası ve tür içi seviyesinde ayırım sağlayabileceği düşünülmektedir.

Ocak 2010, 223 sayfa

Anahtar Kelimeler: Laktik Asit Bakterileri (LAB), 16S-ARDRA, moleküler taksonomi

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF 16S-ARDRA FOR INTER AND INTRASPECIFIC DIFFERENTIATION OF LACTIC ACID BACTERIA

Başak ORAL

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU

It is the the aim of this study to determine the taxonomic potential of 16S-ARDRA in discrimination (at the species and the intra-species level) of 148 strains of LAB that are present in Microbial Genetic Laboratory within the Biology Department of Science Faculty at Ankara University. The strains used were identified previously by phenotypic tests and by use of API kit. Genomic DNAs of LAB were isolated, used as template in amplification of 16S rRNA gene by use of 16S universal primers [pB (5'd TAACACATGCAAGTCGAACG 3'), 1492R (5'd TACCTTGTTACGACTT 3')] and PCR products (1458bp long) were digested with use of 7 different restriction enzymes (*Hae*III, *Hind*III, *Hin*fI, *Msp*I, *Pae*I, *Pst*I ve *Taq*I). Restriction enzyme products of various lengths were analyzed on agarose gel as band profile/pattern. These band profiles were exported into the software program for further analysis. Calculation of similarities in the profiles of bands was based on Dice product-moment correlation coefficient (r) for 16S ARDRA. The UPGMA clustering algorithm was used to generate a dendrogram. A coefficient of correlation of 90 % was selected to distinguish the clusters for 16S-ARDRA. Depending on the seven restriction enzymes used throughout the studies, the result of the study demonstrated the less discriminative power of these techniques towards the differentiation of highly related LAB strains on species and strains levels. With respect to discrimination of *Enterococcus* by use of *Hin*fI-16S ARDRA band profiles, *E. hirae*, *E. faecalis* 135 and *E. faecalis* 80 strains showed band profile differences as compared to other *Enterococcus* species and strains. Besides, *Hind*III/16S-ARDRA profiles revealed discrimination of *E. hirae* from the rest of *Enterococcus*. In addition, as far as *Hae*III ve *Msp*I-16S ARDRA band profiles of *Lactococcus* strains are concerned, a good discrimination of *Lc. lactis* subsp. *lactis* W1, W2 and W3 from other *Lactococcus* strains was obtained. 16S ARDRA depending on the use of seven restriction enzymes did not achieve discrimination in between *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* strains, neither at species nor at strain levels. This method may provide discrimination at species and/or intra-species level by use of different restriction enzymes or multiple enzymes combinations.

January 2010, 223 pages

Key Words: Lactic Acid Bacteria (LAB),16S-ARDRA, molecular taxonomy

TEŞEKKÜRLER

“Laktik Asit Bakterilerinde tür içi ve türler arası ayırmda 16S-ARDRA tekniğinin değerlendirilmesi” konulu tez çalışmam **TÜBİTAK-TBAG** (Temel Bilimler Araştırma Grubu)’ın 108T280 nolu “Laktik Asit Bakterilerinde tür içi ve türler arası ayırmda RAPD ve 16S-ARDRA tekniklerinin değerlendirilmesi” adlı ve **Ankara Üniversitesi-BAP** (Bilimsel Araştırma Projeleri)’nin 09H4240001 nolu Hızlı Destek Projeleri (HDP) tarafından desteklenmiştir. Tezimin başarılı bir şekilde sonuçlanabilmesi için gerekli desteği sağlayan TÜBİTAK ve BAP’a teşekkür ederiz.

Sayın tez danışmanım, büyük öğreticim ve sabırlı eğitimcim Doç. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı) sizin gibi güçlü bir eğitici ve araştırmacının ışığı altında kendine güvenen, ayakları yere sıkı sıkı basan, ne yapmak istediğini bilen, yaptıklarının arkasında duran, bire bir katabilen, iş bitirici biri olmaya ve size layık olmaya çalışıyorum, hepte çalışacağım. Araştırmamın her aşamasında benimle omuz omuza çalışarak her zaman beni desteklediğiniz, çok değerli fikir ve önerilerinizle beni daha fazla araştırmaya, daha fazla okumaya, daha doğru düşünmeye ve sağlam sentezler yapmaya sevk ettiğiniz, öğrenciniz olma onurunu ve en önemlisi kanatlarınızın altında olma şansını bana verdiğiniz için çok teşekkür ederim.

Sayın Doç. Dr. Ali ERGÜL (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)’e deney aşamasında bizlere ayırmış olduğunuz zaman ve yaptığımız hatalara karşı göstermiş olduğu güler yüzdenden dolayı teşekkür ederim.

Tüm yardım ve destekleri için başta Ar.Gör. Fadime KIRAN ve Başar KARACA olmak üzere birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarım Duygu AKKAYA, Pelin DOĞAN, Burcu BİLER, Elif YÜRÜMEZ, Betül ŞAHİN, Sezen YILDIRIM, İpek ACAR, Guzen HOŞGÖR ve Turabi YILMAZ ’e teşekkür ederim.

Başak ORAL

Ankara, Ocak 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Laktik Asit Bakterileri.....	3
2.1.1 Genel özellikleri.....	3
2.1.2 Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması	3
2.1.2.1 <i>Lactococcus</i> cinsi bakterilerinin temel özellikleri.....	6
2.1.2.2 <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerinin temel özellikleri.....	7
2.1.2.3 <i>Leuconostoc</i> cinsi bakterilerinin temel özellikleri	7
2.1.2.4 <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerinin temel özellikleri	7
2.1.2.5 <i>Pediococcus</i> cinsi bakterilerinin temel özellikleri.....	8
2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi	9
2.2.1 Starter kültür olarak kullanılmaları	9
2.2.2 Bakteriyosin Üretimi.....	10

2.2.3 Probiyotik kültür olarak kullanılmaları	13
2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	14
2.3.1 Fenotipik Yöntemler	15
2.3.2 Genotipik Yöntemler	17
2.3.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	
temelli olmayan yöntemler	19
2.3.2.1.1 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis-Dalgalı Alan Jel	
Elektroforezi).....	19
2.3.2.1.2 Ribotiplendirme	21
2.3.2.1.3 Plazmid profil analizleri	22
2.3.2.1.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon	
Fragment Uzunluk Polimorfizmi)	23
2.3.2.2 PCR temelli yöntemler.....	25
2.3.2.2.1 RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism	
Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi).....	25
2.3.2.2.2 AFLP-PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış	
Fragment Uzunluk Polimorfizmi)	26
2.3.2.2.3 Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindrome PCR-Tekrarlanan	
Palindromlara dayalı PCR).....	27
2.3.2.2.4 RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rastgele	
Çoğaltılmış Polimorfik DNA).....	29

2.3.2.2.5 PCR Ribotiplendirme	33
2.3.2.2.5.1 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer-İç Transkribe Edilen Ayrırcı Bölge)/ ISR (Intergenic 16S-23S rRNA Spacer Region Genler Arası 16S-23S rRNA Ayrırcı Bölge) PCR.....	33
2.3.2.2.5.2 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis-Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi).....	34
2.3.2.2.6 DNA sekans analizi	38
2.4 LAB Taksonomisinde Polifazik Yaklaşımlar	39
2.5 Bilgisayar Destekli Veri Analizleri	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1 Materyal.....	41
3.1.1 Bakteri kültürleri	41
3.1.2 Bakteri gelişimlerinde kullanılan besiyerleri	41
3.1.3 Tampon ve çözeltiler	41
3.1.4 Kromozomal (Genomik) DNA izolasyon kiti.....	41
3.1.5 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler	41
3.1.6 Kimyasallar.....	41
3.1.7 Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu	42
3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması	42
3.2 Yöntem	47
3.2.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi.....	47

3.2.2 Kromozomal (Genomik) DNA izolasyonu	47
3.2.3 Saflık (kalite) ve miktar tayini	48
3.2.4 Agaroz Jel Elektforezi.....	48
3.2.5 Kullanılan primerler	49
3.2.6 PCR amplifikasyonu ve optimizasyonu	51
3.2.7 Kullanılan restriksiyon enzimleri (RE).....	52
3.2.8 Restriksiyon enzimleri ile kesim	52
3.2.9 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	54
4. BULGULAR	56
4.1 DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	56
4.2 Kromozomal DNA nın Agaroz Jel Elektforezi	61
4.3 ARDRA Uygulamaları.....	63
4.3.1 PCR Amplifikasyonu	63
4.3.2 Uygun restriksiyon enzimleriyle kesim	65
4.3.3 Dendogram ve benzerlik indeksinin oluşturulması	101
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	187
KAYNAKLAR	199
EKLER	213
EK 1 Bakteri gelişimlerinde kullanılan besiyerleri.....	214
EK 2 Tampon ve çözeltiler	215

EK 3 Kromozomal DNA izolasyonunda kullanılan Promega Wizard Genomic DNA Isolation Kit prospektüsü.....	217
EK 4 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler	219
EK 5 Kimyasallar	221
ÖZGEÇMİŞ.....	222

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism(Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
API Kit	Analytical Profile Index Kit
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis (Çoğaltılmış rDNA geni Restriksiyon Analizi)
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz Çifti
°C	Santigrat Derece
C	Sitozin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus)
EtBr	Etidyum Bromit
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanin
gr	Gram
GRAS	Generally Regarded As Safe
ISR	Intergenic Spacer Region (Genler Arası Ayırıcı Bölge)
ITS	Internal Transcribed Spacer (İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge)
LAB	Laktik Asit Bakterileri
Mbp	Mega Base Pair (Mega baz çifti)
Mg	Magnezyum
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre

MnSO ₄	Manganez Sülfat
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe Broth
MVSP	Multi Variate Statistical Package
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
NRL	Regional Research Laboratory Collection
OH	Hidroksil
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Dalgalı Alan Jel Elektroforezi)
RAPD-PCR	Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rDNA	Ribozomal RNA gen bölgesi
RE	Restriksiyon Enzimleri
Rep-PCR	Repetitive Extragenic Palindrome-PCR (Tekrarlanan Palindromlara Dayalı- PCR)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sn	Saniye
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TGE	Trypton Glukoz Yeast Ekstrakt
T _m	Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages

UV	Ultra Viyole
V	Volt
WHO	World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)
μ	Mikro
μ l	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu.....	11
Şekil 2.2	Güncel genotipik ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik rezolusyonu	18
Şekil 2.3	RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	32
Şekil 3.1	16S rDNA gen bölgesi için tasarlanmış primerler	50
Şekil 4.1	Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinslerden seçilmiş birer suşa ait kromozomal DNA görüntüsü	62
Şekil 4.2	Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinslerden seçilmiş birer suşa ait amplifiye edilen 16S rDNA bölgesinin jel görüntüsü	64
Şekil 4.3	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	66
Şekil 4.4	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	67
Şekil 4.5	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	68
Şekil 4.6	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	69
Şekil 4.7	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HaeIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	70
Şekil 4.8	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HindIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	71

Şekil 4.9	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HindIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	72
Şekil 4.10	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HindIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	73
Şekil 4.11	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HindIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	74
Şekil 4.12	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HindIII</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	75
Şekil 4.13	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	76
Şekil 4.14	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	77
Şekil 4.15	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	78
Şekil 4.16	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	79
Şekil 4.17	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>HinfI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	80
Şekil 4.18	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	81

Şekil 4.19	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	82
Şekil 4.20	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	83
Şekil 4.21	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	84
Şekil 4.22	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	85
Şekil 4.23	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	86
Şekil 4.24	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	87
Şekil 4.25	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	88
Şekil 4.26	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	89
Şekil 4.27	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PaeI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	90
Şekil 4.28	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PstI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	91

Şekil 4.29	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PstI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	92
Şekil 4.30	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PstI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	93
Şekil 4.31	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PstI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	94
Şekil 4.32	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>PstI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	95
Şekil 4.33	<i>Enterococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	96
Şekil 4.34	<i>Lactococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	97
Şekil 4.35	<i>Pediococcus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	98
Şekil 4.36	<i>Leuconostoc</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	99
Şekil 4.37	<i>Lactobacillus</i> suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü	100
Şekil 4.38.a	<i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	102
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	103

Şekil 4.39.a	<i>Hind</i> III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	104
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Hind</i> III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	105
Şekil 4.40.a	<i>Hin</i> fI enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	106
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Hin</i> fI enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	107
Şekil 4.41.a	<i>Msp</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	108
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Msp</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	109
Şekil 4.42.a	<i>Pae</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	110
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Pae</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	111
Şekil 4.43.a	<i>Pst</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	112
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Pst</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	113
Şekil 4.44.a	<i>Taq</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	114
b	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Taq</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	115
Şekil 4.45.a	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	116

	b	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet <i>Enterococcus</i> suşlarına ait dendogram	117
	c	<i>Enterococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	118
Şekil 4.46.a		<i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram	119
	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	120
Şekil 4.47.a		<i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	121
	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	122
Şekil 4.48.a		<i>HinI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram	123
	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HinI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	124
Şekil 4.49.a		<i>MspI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram	125
	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>MspI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	126
Şekil 4.50.a		<i>PaeI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram	127
	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>PaeI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	128
Şekil 4.51.a		<i>PstI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram	129

	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>PstI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	130
Şekil 4.52.a		<i>TaqI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram	131
	b	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>TaqI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	132
Şekil 4.53.a		ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	133
	b	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet <i>Lactococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	134
	c	<i>Lactococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	135
Şekil 4.54.a		<i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram	136
	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	137
Şekil 4.55.a		<i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	138
	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	139
Şekil 4.56.a		<i>HinfI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram	140
	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HinfI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	141
Şekil 4.57.a		<i>MspI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram	142

	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>MspI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	143
Şekil 4.58.a		<i>PaeI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram	144
	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>PaeI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	145
Şekil 4.59.a		<i>PstI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram	146
	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>PstI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	147
Şekil 4.60.a		<i>TaqI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram	148
	b	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>TaqI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi.....	149
Şekil 4.61.a		ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	150
	b	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet <i>Pediococcus</i> suşlarına ait dendogram.....	151
	c	<i>Pediococcus</i> suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	152
Şekil 4.62.a		<i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	153
	b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	154
Şekil 4.63.a		<i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	155

b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Hind</i> III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	156
Şekil 4.64.a	<i>Hinf</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	157
b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Hinf</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	158
Şekil 4.65.a	<i>Msp</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	159
b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Msp</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	160
Şekil 4.66.a	<i>Pae</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	161
b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Pae</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	162
Şekil 4.67.a	<i>Pst</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	163
b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Pst</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	164
Şekil 4.68.a	<i>Taq</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	165
b	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>Taq</i> I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	166
Şekil 4.69.a	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	167
b	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet <i>Leuconostoc</i> suşlarına ait dendogram	168

c	<i>Leuconostoc</i> suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	169
Şekil 4.70.a	<i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	170
b	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HaeIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	171
Şekil 4.71.a	<i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	172
b	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HindIII</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	173
Şekil 4.72.a	<i>HinfI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	174
b	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>HinfI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	175
Şekil 4.73.a	<i>MspI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	176
b	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>MspI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	177
Şekil 4.74.a	<i>PaeI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	178
b	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>PaeI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	179
Şekil 4.75.a	<i>PstI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	180
b	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>PstI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	181

Şekil 4.76.a	<i>TaqI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	182
b	<i>Lactobacillus c</i> suşları temel alınarak oluşturulan <i>TaqI</i> enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	183
Şekil 4.77.a	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	184
b	ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet <i>Lactobacillus</i> suşlarına ait dendogram.....	185
c	<i>Lactobacillus</i> suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi	186

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	İdeal bir tiplendirme düzeneğinde istenilen özellikler	17
Çizelge 2.2	Arbitrary primer parmakizi yöntemlerinde primer uzunluğu temel alınarak yapılan sınıflandırma	30
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri	43
Çizelge 3.2	16S rDNA gen bölgesi için tasarlanmış primerler, baz dizileri ve PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin büyüklükleri	50
Çizelge 3.3	PCR reaksiyon karışımları	51
Çizelge 3.4	ARDRA çalışmalarında kullanılan restriksiyon enzimleri, kesim noktaları ve optimum çalıştıkları sıcaklık değerleri	53
Çizelge 3.5	Restriksiyon enzim kesim protokolü	53
Çizelge 4.1	Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları	57

1. GİRİŞ

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

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

LAB'nin tanımlanmasında kullanılan yöntemler fenotipik ve genotipik yöntemler olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir. Suşlar arasındaki ayırımı sağlayabilmek için gen ifadesinin ürünü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde cins-

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

Günümüzde, LAB'nin tanımlama ve tiplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere doğru kaymıştır (Babalola 2003). Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan **genotipik yöntemler** DNA'yı yüzlerce fragmanlarına ayıran enzimler ile kromozomun kesimine dayanan DNA restriksiyon patternlerindeki polimorfizmini gibi yöntemi içermektedir.

Çalışmamızda, LAB'ni temsilen 5 genusa (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*) ait 148 suş arasındaki farklılıkların ortaya konulmasında, tür ve suş seviyesinde genetik farklılığın değerlendirilmesinde ve taksonomik tanımlanmalarında “Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA'nın Restriksiyon Analizi” (ARDRA) tekniğinin taksonomik potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. Kaynak Özetleri

2.1 Laktik Asit Bakterileri

2.1.1 Genel özellikleri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) morfolojik, metabolik ve fizyolojik özellikleri göz önünde bulundurulduğunda Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, kok veya çubuk şeklinde, birkaç ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsiz, katalaz negatif ve karbonhidrat fermentasyonu son ürün olarak laktik asit üreten bakteriler olarak tanımlanmaktadır.

Gram-pozitif bakteriler içerisinde düşük düzeyde guanin (G) ve sitozin (C) oranına sahip bir bakteri grubudur (Ludwig vd. 1993). LAB 'nin genomunun G+C içeriği % 50'nin altındadır ve bu bakteriler *Clostridium* filumuna dahil edilirler.

LAB insanların ve hayvanların normal floralarında bulunabildiği gibi gıda fermentasyonuyla yakından ilişkilidir ve gıda teknolojilerinde önemli bir rol oynamaktadırlar. GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak belirlenmiş olmaları (Holzapfel vd. 2001) ve metabolik karakteristikleri geniş alanda endüstriyel uygulamalara olanak tanımaktadır. Bütün bunlara ek olarak ürettikleri antimikrobiyal proteinler olan bakteriyosin sayesinde buldukları ortamdaki saprofit ve patojen bakterilerin gelişimini engellemektedirler. Aynı zamanda probiyotik olan genuslarının da bulunması LAB'nin önemini artırmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı günümüzde endüstriyel olarak kullanılan bu bakterilerin hızlı ve doğru tanımlanması da büyük önem kazanmıştır.

2.1.2 Laktik Asit Bakterilerinin sınıflandırılması

LAB'nin sınıflandırılması fenotipik özelliklere dayalı olan morfolojik özellikleri, glukoz fermentasyon yolları, gelişim gösterdikleri sıcaklıklar, ürettikleri laktik asit konfigürasyonları, yüksek tuz konsantrasyonlarındaki gelişme yetenekleri, asit ya da alkalinelere dayanıklı olup olmamalarına göre oluşmaktadır. Bunlara ek olarak

sınıflandırılmalarında hücre duvarı bileşenleri ve yağ asiti bileşimlerinde kullanılmaktadır. Günümüzde bu fenotipik yöntemlere ek olarak genotipik yöntemler kullanılmaktadır.

Orla-Jensen'in (1919) çalışmalarında LAB *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ayırmaktadır. *Bifidobacterium* larında LAB grubunda yer aldığı düşünülmekteydi. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nın 1957 yılındaki 7. baskısında *Bifidobacterium* cinsi *Lactobacillus bifidum* türü olarak belirlenmiştir. *Bifidobacterium* ların genel özellikleri bu gruba uygunluk gösterebilir. Gram-pozitiflerin bakterilerin Actinomycetaceae grubu ile filogenetik olarak ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak LAB'in den açıkça farklılık gösteren kendilerine özgü bir fermentasyon yolları bulunmaktadır.

1986 yılında yayınlanmış olan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ile LAB'nin *Streptococcus* cinsi *Enterococcus*, *Lactococcus*, ve *Streptococcus* cinsleri olmak üzere üçe ayrılmıştır. Bu yeni sınıflandırma LAB'nin sınıflandırılmasında büyük bir yenilenme olarak kabul edilmektedir (Schleifer 1986, 1987). Daha sonraları hareketsiz olan bazı LAB diğer bir deyişle *Lactococcus* cinsleri ile tanımlanmış olan bakteriler *Vagococcus* ve *Lactococcus* cinsi olmak üzere ikiye ayrılarak LAB'nin sınıflandırılmasında yerini almıştır (Collins vd. 1989).

Lactobacillus, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri ise değişme uğramamıştır. Ancak daha önceden *Lactobacillus* cinsi içinde yer alan çubuk şeklindeki bazı LAB günümüzde *Carnobacterium* cinsi altında toplanmaktadır. Ek olarak *Pediococcus halophilus* türü olarak tanımlanmış olan bakteriler cins seviyesine yükseltilerek *Tetragenococcus* cinsi olarak sınıflandırmada yerini almıştır (Collins vd. 1987).

Heterofermantatif LAB lerinin belirgin kümeleri arasında yer alan ve daha önceleri *Lactobacillus* ya da *Leuconostoc* cinslerine ait olduğu düşünülen bazı bakteriler ise *Weissella* cinsine dahil edilmişlerdir (Collins vd.1993). Şarap *Leuconostoc* ları olarakta bilinen *Leuconostoc oenos* türler ise *Oenococcus* cinsi altında toplanmıştır (Dicks vd. 1995).

Fizyolojik ve filogenetik olarak LAB ile benzerlik gösteren bazı şuşlar ise *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum*, ve *Lactosphaera* gibi yeni cinslerin tanımlanmasını sağlamıştır (Collins vd. 1992, 1999).

LAB, *Weissella* cinsi dışında çubuk şeklinde olanlar (*Lactobacillus* ve *Carnobacterium*) ve kok şeklinde olanlar olmak üzere ikiye ayrıla bilmektedir (Collins vd. 1993; Woese 1987).

Ayrıca kok şeklindeki bakterilerin karakteristik özelliği olan tetrat formu ise *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Tetragenococcus* cinlerini oluştururlar.

LAB'nin cinslerin ayırımında kullanılan önemli bir özellik ise standart koşullar altındaki glukoz fermentasyon yollarıdır. Bu durum göz önüne alındığında LAB iki gruba ayrılabilir. Birinci grup homofermentatif yani glukozu büyük oranda laktik aside dönüştüren LAB. İkinci grup ise heterofermantatif yani glukozu laktik asit, etanol ya da asetik asit ve CO₂ de dönüştüren laktik asit bakterileri. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* cinsleri ve bazı *Lactobacillus* cinsinin alt grupları heterofermantatif, diğer cinsler ise homofermentatif olarak tanımlanmışlardır (Sharpe vd. 1979).

Homofermantatif LAB glukozu Fruktoz Di Fosfat yoluyla parçalayıp fermentasyon sonucu % 95-100 oranında laktik asit üretirler (Drinan vd. 1976).



Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise glukozu; Hegzoz Mono Fosfat yoluyla parçalayarak fermentasyon sonucu % 50 oranında laktik asit üretirken, bunun yanı sıra etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Drinan vd. 1976).



Özet olarak LAB'nin sınıflandırılmasında günümüze kadar gelinen düreç içerisinde fenotipik ve genetik tanımlamaların kullanımı ile 4 ana başlık altında toplayabilmek mümkündür.

1. Grup: *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinsinin dallanmaları ile oluşturulmuş olan *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Vagococcus* cinsleri.
2. Grup: Kendilerine özgü hücre bölünmelerinin ortaya koymuş olduğu tetrat formuna sahip *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Tetragenococcus* cinlerini.
3. Grup: *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Weissella* cinsleri
4. Grup: *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* cinsleri

2.1.2.1 *Lactococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Karşılaştırmalı serolojik çalışmalar, lipit kompozisyonu, nükleik asit hibridizasyonu ve hücre duvarı kimyasal yapısının belirlenmesi sonucu elde edilen veriler ışığında *Streptococcus* cinsinden ayrılan bazı türler, *Lactococcus* cinsi altında sınıflandırılmıştır (Schleifer vd. 1985).

Lactococcus cinsi bakteriler homofermantatif özellikte olup karbonhidrat katabolizması sonucu ana ürün olarak laktik asit üretmektedirler. Bu bakteriler kok şeklinde, küre ya da kısa zincir halinde birarada bulunmaktadır. Optimum gelişme sıcaklıkları 30°C'dir. 10°C'nin altında ve 45°C'nin üzerinde gelişmeme özellikleriyle hem streptokoklardan hemde enterokoklardan ayrılmaktadırlar (Holt vd. 1994). *Lactococcus lactis* alttürleri özellikle fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli role sahiptir.

2.1.2.2 *Lactobacillus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler çeşitli kaynaklarda LAB'ne mensup, ince veya kalın çubuk şeklinde, gram-pozitif, spor oluşturmayan bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Kandler ve Weiss 1986).

Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermentatif veya heterofermentatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun % 33-55'ini G+C oluşturmaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997). Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup % 5 CO₂'li ortamda gelişme gösterebilirler. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinirler (Hammes ve Vogel 1995). *Lactobacillus* cinsi tarafından sentezlenen bakteriyosinler gıda sanayinde kullanıma potansiyeline en fazla sahip bakteriyosinlerdir.

2.1.2.3 *Leuconostoc* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Süt, peynir ve et gibi fermente ürünlerin oluşumunda ve organoleptik adı verilen tat, koku gibi özelliklerin kalitesinin belirlenmesinde büyük öneme sahiptirler (Dellaglio vd. 1995). Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C'dir. Buzdolabı sıcaklığında da üreyebilme özellikleri vardır (Holt vd.1994).

Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda sadece laktik asit üretmediğinden heterofermentatif özellik göstermektedir. Fermentasyon sonucunda D-laktat ve etanol ile gaz oluşumu gözlenir. Starter kültür içeriğine dahil olup sitrattan diasetil oluşumuna nedendirler. Bu da tat oluşumu için önemli bir kriterdir. Fermente ürünlerde baskın olan türleri: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ve *Leuconostoc lactis*'tir (Dellaglio vd. 1995).

2.1.2.4 *Enterococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Enterococcus cinsi de *Lactococcus* cinsi bakteriler gibi *Streptococcus* cinsine dahil edilmişler, daha sonra serolojik D-antijeni grubuna sahip olmaları ile sınıflandırmada ayrılmışlardır (Holt vd. 1994).

Oksijen kullanma bakımından fakültatif anaerobik bakterilerdir. Fermentasyon sonucu farklı karbonhidrat formlarını laktik aside çevirir fakat gaz oluşturmazlar. % 6.5 NaCl 'de ve % 40 tuzda, 10-45°C sıcaklık aralığında gelişim gösterebilirler. Katalaz negatif özellik yansıtmalarına rağmen bazı türleri yalancı katalaz aktivitesi verebilir (Domig vd. 2003). Optimum gelişme sıcaklıkları 37°C'dir.

2.1.2.5 *Pediococcus* cinsi bakterilerin temel özellikleri

Hücreler küre şeklinde olup ikili düzlemde tetrat şeklinde bölünmektedirler. Gram-pozitif ve fakültatif anerobtur. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda sadece laktik asit ürettiğinden homofermantatiftir. Optimum gelişme sıcaklıkları 35°C'dir. *P. acidilactici* gibi 50°C'de gelişen türleri bulunmaktadır. Katalaz negatiftirler. *Pediococcus* cinsi bakteriler 8 tür içermektedir. Bu sekiz türden *P. acidilactici*; *P. pentosaceus*, *P. damnosus* ve *P. parvulusla* yakından ilişkilidir (Collins vd. 1990). *P. cerevisiae* önceden bu cinsin içerisinde yer almasına rağmen şu an türleri *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus* türleri içerisinde yer almaktadır (Kitahara 1974; Garvie 1986; Gherna and Pienta 1989). *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus*'un DNA/DNA homolojileri birbirlerine çok yakın olup sadece az bir karakteristik farkla birbirlerinden ayrılmaktadır. *P. acidilactici* türleri 50°C'de gelişme gösterirken, maltozu fermente edememekte bununla birlikte *P. pentosaceus* 50°C'de gelişme göstermemekte lakin maltozu fermente etmektedir. Ayrıca *P. acidilactici* hücreleri biraz daha ısıya karşı dirençlilik göstermektedirler (Kitahara 1974, Garvie 1986).

Pediococcus cinsi bakteriler bazen *Micrococcus* cinsi bakterilerle karıştırılabilmektedir. Bunun nedeni morfolojik olarak benzemeleri ve tuza olan toleranslarıdır. *Micrococcus*'ların pigmentli olması ve asite karşı toleranslı olmaması iki cins arasındaki ayrımı güvenle sağlamaktadır. *Pediococcus* cinsi bakteriler doğal olarak mandıra ürünlerine, etlerde, taze sebze, bira ve şarap gibi fermente ürünlerde bulunmaktadır. Bunlar doğal olarak sebze ve etlerin fermentasyonlarının kontrolüyle ilişkili olup (Bacus ve Brown 1981; Garvie 1986) peynirin oluşmasında ikinci flora gibidir (Bhowmilk ve Marth 1989). *Pediococcus* cinsi bakteriler sadece aromaya katkıda bulunmayıp, şekil ve renk gelişimini de sağlamaktadır. Fakat bazı *Pediococcus* türleri özellikle kendine yakın LAB'ne ve diğer bazı bakterilere karşı gelişimi engelleme yeteneği göstermekte ve bu gelişimi engellenen bakteriler arasında gıdayı bozan ve hastalık yapan mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Bhunja vd. 1988; Daeschel ve Klaenhammer 1985; Gonzalez ve Kunka 1987).

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin Önemi

Starter kültür olarak kullanılan ve gıda teknolojisi açısından büyük öneme sahip olan LAB, fermente gıdaların tat, koku, tekstür gibi organoleptik özelliklerine etki etme yeteneklerine sahiplerdir. Ek olarak oluşturdukları antimikrobiyal proteinler sayesinde biopreservatif olarak kullanılarak gıdaların raf ömrünün uzamasını sağlamakta öte yandan sahip oldukları probiyotik özellikler ile tüketicilere yarar sağlamaktadır. (Rebecchi vd. 1998). Bu nedenlerden dolayı laktik asit bakterilerini tanımlamak gerek endüstriyel açıdan gerekse bilimsel açıdan oldukça önemli hale gelmiştir (Rademaker ve De Bruijn 1997).

Kısaca endüstriyel ve bilimsel olarak LAB'nin başlıca önemi starter kültür olarak kullanılmaları, bakteriyosin üretmeleri ve probiyotik kültür olarak kullanılmaları şeklinde maddelenebilmektedir.

2.2.1 Starter kültür olarak kullanılmaları

LAB'nin en önemli karakteristik özelliklerinden biri; süt şekeri olan laktozu kullanarak fermentasyon sonucunda laktik asit üretmeleridir. Bu reaksiyonu başlatan kültür ürüne öncelikli olarak verilir, buna da “starter kültür” denir. Fermentatif özellikleri ile laktik asit bakterileri pek çok fermente ürün eldesinde starter kültür olarak kullanılmakta ve gıda üretimi aşamalarında önemli bir görev üstlenmektedirler (Wouters vd. 2002).

Starter bakteriler çeşitli şekilde ürüne bulaşan mikroorganizmalara (gıda zararlısı veya gıda kaynaklı patojenler) üzerinde de inhibisyon özelliği göstermektedir (Bacus ve Brown 1981). Starter bakterilerin oluşturduğu inhibitör maddeler arasında küçük moleküllü antibiyotikler, laktik asit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, litik enzimler, bakteriyosin veya bakteriyosine benzer maddeler bulunmaktadır (Hammes vd. 1990; Andersson vd. 1988; Geisen vd. 1992). Organoleptik özellikler özelliklerin yanı sıra fermentasyonu sağlayıp peynir, krema, tereyağ ve yoğurt gibi birçok ürün oluşumunda önemli görev üstlenmektedirler. Mezofilik starter kültürlerden bazıları laktik asit üretirken, bazıları sitrik asit fermentasyonu gerçekleştirmekte ve asetoin/diasetil, CO₂

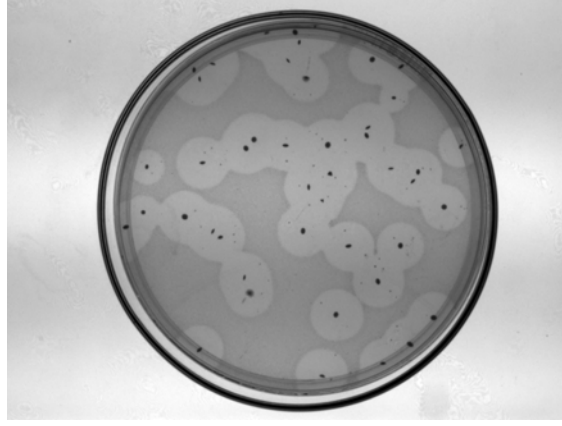
oluşturmaktadır. Diasetil özellikle süt ürünlerinde tat oluşumu için önemlidir (Cogan 1996). Süt ürünlerinde kullanılan starter kültürler mezofilik ve termofilik olmak üzere 2 gruba ayrılır. Mezofilik starter kültürler 26°C, termofilik kültürler ise 42°C civarında gelişim gösterirler.

2.2.2 Bakteriyosin üretimi

Enterococcus, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* ve *Propionibacterium* gibi gıda kaynaklı pek çok LAB gıda fermentasyonunda kullanılan antimikrobiyal özellikleri ile bilinmektedir. Bu antimikrobiyal proteinler birçok Gram-pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte, gıdanın bozulmasını sağlayan ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bazı mikroorganizmaları da inhibe etmektedir (Tagg vd. 1976; Ray ve Daeschel 1992a; Klaenhammer 1993; Hoover ve Steenson 1993; Jack vd. 1995).

Bakteriyosinler; bakteriler tarafından sentezlenen, antimikrobiyal etkiye sahip, genelde yakın türlerin inhibisyonunda etkili, kısa veya uzun zincirli protein benzeri yapılarıdaki maddeler olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer vd. 1995; Gorris 1996; Eijsink vd. 1998).

Bakteriyosinler protein yapısında, doğal olduklarından bunların et ve süt ürünleri başta olmak üzere birçok gıdada kullanımı mümkün olmaktadır. Bakteriyosinler gıda maddesine doğrudan katılabildikleri gibi, bakteriyosin sentezleyen koruyucu kültürlerin gıdaya inokulasyonu veya gıdanın koruyucu ambalaj materyaliyle birlikte de kullanılabilirler. Böylelikle; uygun olan bakteriyosinin veya bakteriyosin üreten LAB'nin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. Bakteriyosinler, fermente gıdalarda güvenilirliği sağlayarak raf ömrünü uzatmaktadırlar. Bu bakterilere ait metabolitlerin binlerce yıldan beri farklı fermente gıdalarda sağlık için hiçbir tehlikesi olmadığı düşünülmektedir. Bununla beraber, gıda kökenli pek çok LAB gıda bozulmalarına ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan organizmalara karşı antibakteriyal etki gösteren ve "bakteriyosin" olarak isimlendirilen protein yapısında ekstraselüler bir madde sentezlemektedir (Klaenhammer 1988; De Vuyst ve Vandamme 1994; Hoover ve Steenson 1993) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Katı besiyeri içeren petri plakada bakteriyosin zonunun oluşumu

Bakteriyosinler, üretici hücreler üzerinde öldürücü etkisi bulunmayan, sınırlı sayıdaki bakterilere etkili olan protein yapılı maddelerdir. Bakteriyosin üreten bakteriye yakın olan türler üzerinde bakteriyosidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip antimikrobiyal proteinler olarak bilinir. LAB tarafından üretilen bakteriyosinler gıda bozulmalarına ve gıda kökenli hastalıklara sebep olan pek çok gram pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki göstermekte ve bu nedenle biopreservative (biyokoruyucu) olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer 1988; Ray 1992). LAB tarafından üretilen bakteriyosinlere ait genel özellikler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır (Jack vd. 1995).

- 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-pozitif 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.

Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bazı gıda katkı maddeleri FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylı olmalarına rağmen yapılan son çalışmalarda tüketici sağlığında çeşitli problemlere neden oldukları belirlenmiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan koruyucular insanlarda astım, damar problemleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar WHO (World Health Organization-Dünya Sağlık Organizasyonu) tarafından, katkı maddeleri sağlıklı olarak belirlenen gıdalara yönelmişlerdir. Kimyasal gıda katkı maddelerine alternatif olarak bakteriyosinler gibi doğal koruyucular tercih edilmeye başlanmıştır. Bunların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır. Bunun nedeni ise; protein yapısında olan bu madde, sindirim sisteminde bulunan ve proteinleri hidrolize eden enzimler tarafından parçalanmaktadır. Dolayısı ile uygun olan bakteriyosin ya da bakteriyosin üreten LAB'in gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. En iyi bilinen bakteriyosin *Lc. lactis* tarafından üretilen Nisin olup gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Pediocin de yine gıdalarda kullanılan biyolojik bir koruyucudur (Teuber 1995).

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

Farklı Gram-pozitif bakterilere ait bakterisidal proteinler, yapılarında mevcut olan modifiye aminoasitlere göre iki gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; doğada nadir bulunan

aminoasitleri içeren “lantibiyotikler” ve lantibiyotik olmayanlardır. Lantibiotiklere örnek olarak nisin verilebilir. Yapısında, translasyon sonrasındaki modifikasyon ile meydana gelmiş olan lantiyonin (Ala- S-Ala), β -metillantionin (Abu-S-Ala) (sülfür grubu içeren aminoasit) ile dehidroalanin (Dha) ve dehidrobütirin (Dhb) gibi dehidre formdaki sıra dışı aminoasitler yer almaktadır. Lantiyonin içermeyen bakteriyosinler ise küçük, ısıya dayanıklı peptitler olup yapısında bu sıra dışı aminoasitleri bulundurmazlar. Bu gruba örnek olarak pediocin AcH/PA-1 lactococcin A, lactococcin B ve sakacin A verilebilir. Bununla beraber, molekülün yapısında lantiyoninlerin varlığı veya yokluğu ile bakteriyosinlerin antimikrobiyal spektrumları arasında herhangi bir ilişki bulunmamaktadır (Jack vd. 1995; Sahl vd. 1995).

2.2.3 Probiyotik kültür olarak kullanılmaları

Probiyotik terimi 2 yunanca kelime olan pros ve bios kelimelerinden türemiş bir terimdir. Bu terim ilk olarak 1974 yılında Paker tarafından sindirim sistemini dengede tutmak için yardımcı olan maddeler ve mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları ise Probiyotikler vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasında olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmışlardır (Kneifel vd. 1999).

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

Probiyotik olarak kullanılan LAB'nin sağlığa faydalı diğer etkilerini de sıralayacak olursak başlıcaları arasında aşağıda verilenler yer almaktadır.

- Laktoz intoleransının hafifletilmesi.
- Kan lipitlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılması.
- Ürogenital infeksiyonlar (Üriner ve vajinal kanal hücrelerine yapışma, H₂O₂ gibi inhibitör maddelerin üretimi).
- Kolon kanseri riskinin azaltılması.
- İmmun sistemin güçlendirilmesi (Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması, IgA üretiminin artırılması).
- İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması (Sitokin sentezinin düzenlenmesi).
- *Helicobacter pylori* infeksiyonu (Laktik asit üretimi).
- İntestinal sistem infeksiyonlarının engellenmesi (İntestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi).
- Barsak florası üzerine olumlu etki (Toksik metabolit üretiminin azaltılması yoluyla, aşırı gelişmiş olan floranın aktivitesinin etkilenmesi).

2.3 Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Laktik asit bakterileri, çeşitli gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları, antimikrobiyal maddeleri üretmeleri ve probiyotik ürünlerin içeriklerinde yer almaları bakımından endüstriyel açıdan büyük öneme sahiptir. LAB'nin endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde en temel amacı kullanılabilir olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir metotların uygulanması oldukça önemlidir (Dics vd. 1990; Dykes vd. 1994).

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

2.3.1 Fenotipik Yöntemler

Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ifadesinin ürününü karakterize eden ve genelde cins-tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlayan geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik/ biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücre sel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, kuininler, 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.

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

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

LAB tanımlanmasında kullanılan fenotipik testler bakterilerin cins ve tür bazında ayrımı için hala önemli bir rol oynasa da LAB'nin çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı, cins ve tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe uyandırıcıdır (Temmerman vd. 2004). Bununla beraber büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanımlama işlemlerinde zorluk yaratmaktadırlar. Bu kriterler kaba bir tanımlama amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir tanımlama amacına yönelik değildir. Bundan dolayıdır ki LAB'nin cins ve tür bazında tanımlanmalarında kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı tanımlama sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış tanımlamalara sebep olabildiğinden mutlaka genotipik yöntemler ile desteklenmesi ve/veya tamamlanması gerekmektedir.

DNA temelli moleküler yöntemler filogenetik çalışmalarda mikroorganizmaların birbirleri ile bağlantısının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlardandır ve kullanılan yönteme bağlı olarak cins düzeyinden suş düzeyine kadar mikroorganizmaların farklı seviyelerde tanımlanmasında gelişmiş bir bakış açısı sunmaktadır. Bu tür stratejiler genelde genotipik özelliklere dayanmaktadır, ancak bazı belirli fenotipik özellikler de kullanılabilir. Bununla beraber, belirli bir stratejiyi kullanmadan önce ilişkili olmayan izolatları ayırmak için kullanılacak yöntemin farklı numunelerde aynı suşu tanımlayabilme yeteneğine sahip olması ve filogenetik olarak birbirine bağlı izolatlar arasında genetik ilişkiyi yansıtması oldukça önemlidir. Uygulamalı bakış açısından bakıldığında, ideal bir tiplendirme sistemi bir takım önemli özelliklere sahip olmalıdır (Çizelge 2.1) ve farklı yöntemler değişen seviyelerde ayırım gücüne sahiplerdir.

Çizelge 2.1 İdeal bir tiplendirme düzeneğinde istenilen özellikler

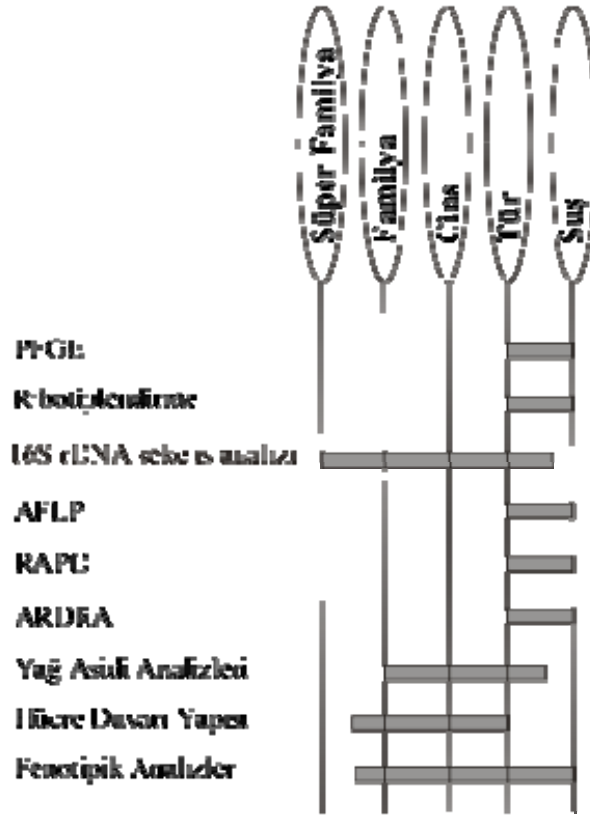
-
- Geniş çeşitlilikteki izolatları tiplendirebilmeli
 - Ayrım gücü yüksek olmalı
 - Uzun zaman sonra ve farklı merkezlerde elde edilen sonuçlar ‘tekrarlanabilirlik’ bakımından güzel sonuç vermeli
 - Laboratuvar koleksiyonlarına ilaveten doğal izolatlara kolayca uygulanabilir olmalı
 - Hızlı olmalı
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

2.3.2 Genotipik Yöntemler

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

Bu yöntemlerin temel avantajları şunlardır: (Farber 1996)

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



Şekil 2.2 Güncel genotipik ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik rezolusyonu (Dijkshoorn vd. 2000, 2001)

LAB suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan genotipik yöntemler arasında plazmid profili, Dalgalı Alan Jel Elektforezi (PFGE; pulsed-field gel electrophoresis), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP; restriction fragment length polymorphism) gibi **PCR temelli olmayan yöntemler**; Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD; randomly amplified polymorphic DNA), Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP; amplified fragment length polymorphism), Tekrarlanan Palindromlara Dayalı PCR (Rep-PCR; repetitive extragenic palindrome-PCR), Çoğaltılmış Ribozomal DNA Geni Restriksiyon Analizleri (ARDRA; amplified ribosomal DNA restriction analysis), 16S-23S Genler Arası Ayırıcı Bölge (ISR; internal spacer region) PCR gibi **PCR temelli yöntemler** ve 16S rDNA'ya dayalı **dizi analizleri** yer almaktadır (Vandamme vd. 1996) (Şekil 2.2).

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

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

2.3.2.1.1 PFGE

(Pulsed Field Gel Electrophoresis-Dalgalı Alan Jel Elektroforezi)

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

PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Liziz işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra içinde

kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kb'lık DNA fragmanlarının net olarak ayırt edilmesine sağlamaktadır.

Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle ilişkileri ortaya konulmaktadır. Bilgisayara dayalı analizlerde incelenen mikroorganizmalara ait PFGE paternlerinin saklanması ile veri bankası oluşturulabilir. Böylece çalışılan suşların paternlerinin daha önce var olan verilerle karşılaştırılma olasılığı oluşmaktadır.

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

PFGE'de yüksek kalitede DNA'nın elde edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle soğuk tampondaki hücrelerin hızlıca işlenmesi, erimiş agaroz eklemenden önce bakterilerin buzda tutulması ve agaroz kalıpların soğukta tutulması gerekmektedir. Restriksiyon enzimlerini seçerken göz önünde tutulması gereken birçok faktör vardır. Birincisi bakteriyel DNA'nın G+C içeriğidir. Düşük G+C içerikli DNA'lar, tanıma bölgesi G+C bakımından zengin olan restriksiyon enzimleri (RE) ile muamele edildiğinde yeteri kadar kesilememektedir. İkincisi ise tanıma bölgesi uzun olan enzimler kısa olanlara kıyasla daha az sayıda kesim parçaları oluştururlar.

Bu teknik taksonomik çalışmalarda ayrı türlerin benzer PFGE profili göstermesinin tür ilişkisini gösterdiği gibi, bakteriyel suşların ayrılmasında da kullanılır (Prakash vd. 2007). Ender kesim yapan endonükleazların kullanılmasıyla kombine edilen PFGE

kromozom bölgelerinin değerlendirilmesi yanında türlerin ayırımına da olanak tanır. Bu teknik yüksek ayırım gücü göstermektedir. PFGE restriksiyon biçimi zamana karşı stabildir, tekrarlanabilir ve yorum için standart kriterler mevcuttur. Bu nedenle bu yöntemin türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanışlı bir araç olduğu bildirilmiştir (Gordillo vd. 1993; Donabedian vd. 1995; Tenover vd. 1995, 1997; Patterson ve Kelly 1998). Birçok araştırmacı prosedürü hızlandırmak için ve zaman tüketen prosedürlerin üstünden gelebilmek için PFGE protokollerinin değişik modifikasyonlarını tanımlamışlardır (Matushek vd. 1996; Turabelidze vd. 2000).

2.3.2.1.2 Ribotiplendirme

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

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

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

Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanır ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilir ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı

kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona uğratılır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için problemlerin bantları olarak melezlendiği yerde probdaki işaret gözlenir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla yakınlıkları gözlenerek bilinmeyen izolatların tanımlanması için kullanılabilir.

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

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

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

2.3.2.1.3 Plazmid profil analizleri

Plazmidler; ekstrakromozomal, replike olabilen, küçük, halkasal çift iplikli DNA molekülleridir. Çoğu plazmid 200 kb'dan düşük boyutta küçük halkasal olarak bulunsa da, doğrusal ve büyük plazmidlerin varlığı da bildirilmiştir. Alkali lizis prosedürlerini kullanan geleneksel plazmid izolasyonu ve çok sayıda türetilmiş yöntemlerin kullanımı, plazmid izolasyonu ve analizlerini mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji laboratuvarlarında düzenli olarak kullanılan teknikler haline getirmiştir. Bu yüzden, plazmid profilleri bakteriyal tanımlama için yardımcı analizler olarak kullanılmaktadır.

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

2.3.2.1.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

Aynı zamanda kromozomal DNA restriksiyon analizi veya DNA mikrorestriksiyon analizi olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde bakteriden alınan kromozomal DNA izole edilir ve restriksiyon enzimiyle muamele edildikten sonra oluşan fragmentlerin agaroz jelde ayırımı yapılır. Fragmentlerin büyüklüğü kullanılan restriksiyon enzimlerine bağlı olarak değişim gösterir. Etidyum bromür ile jel boyandıktan sonra fragmentlerin UV ışık altında gözlemi yapılır. Bantlar ve bantlar arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak her izolatin ayırımı yapılmış olur (Giovanetti ve Ventura 1995).

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

- * Genomik DNA’nın izolasyonu: DNA izolasyonunda birçok yöntem vardır. Araştırmacı yeteneklerine ve laboratuvarın olanaklarına göre uygun olanını seçmelidir. Fiziksel ve kimyasal işlemlerle DNA haricindeki moleküller ortamdan uzaklaştırılır.
- * Spesifik restriksiyon enzimiyle kesim: Saf haldeki DNA eppendorf tüpüne konduktan sonra restriksiyon enzimi (RE) ilave edilerek gerekli zaman ve ısıda inkübasyona bırakılır. Bu esnada RE, DNA’yı belli noktalardan keser ve büyüklü küçüklü parçalar oluşturur.
- * Elektroforez: DNA solüsyonu agaroz jelde veya poliakrilamid jel elektroforezinde bir süre akım altında bırakılır. Akım jelin kalınlığına göre ayarlanır. Büyük parçalar, başlangıç yerinde, küçük parçalarsa jelin sonunda toplanır. Jel etidyum bromür ile boyanırsa bantlar UV altında görünür hale gelir.
- * Southern Blot bantlarının (DNA) membrana transferi: Elektrotransfer, alkali, kapillarite vb yöntemlerle parçalar naylon membrana alınırlar. Naylon membranlar sağlamlıkları, tekrar tekrar kullanılabilirlikleri kuvvetli fiksasyon özellikleri nedeniyle günümüzde tercih edilmektedirler. Transfer sonunda membran kurutulur. NaOH ile DNA’lar denatüre edilir ve membran ısıtılarak DNA’ların fiksasyonu sağlanır.

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

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

2.3.2.2 PCR temelli yöntemler

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.

2.3.2.2.1 RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

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

PCR türlerin varyasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğinin farklarını göstermek için spesifik genetik bölgelerin çoğaltılmasına ve çalışılmasına olanak tanımaktadır. Çalışılacak spesifik lokus, gen spesifik primerler ile çoğaltılmayla RFLP analizlerine maruz bırakılmaktadır. DNA fragmentleri agaroz veya küçük poliakrilamid jelde ayrılırlar ve oluşan bantlar etidyum bromür boyamayla görüntülenirler. Çalışılacak

bölgenin kısıtlı genomu yüzünden bu teknik diğer yöntemler kadar kuvvetli ayırım gücüne sahip değildir (Olive ve Bean 1999).

2.3.2.2.2 AFLP-PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

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 (Koeleman vd. 1997). Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir (Janssen vd. 1996). 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 yöntemlere alternatif olarak sunulan popüler bir tekniktir. Teknik, uygun koşullarda amplifiye edilecek olan kalıp DNA'yı yaratmak için DNA fragmanlarının uçlarına eklenmiş olan çift zincir DNA adaptörlerini tanıyan primerlerle seçici amplifikasyonu gerekli kıldığından elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özellik sergilemektedir (Huys vd. 1996; Vos vd. 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

tekniki kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere artırılır (Babalola 2003). Genelde her bir AFLP reaksiyonunda yaklaşık 30-80 restriksiyon fragmanı beraber amplifiye olduğundan ve denatüre koşullarda gerçekleşen jel elektroforez sisteminde tespit edilebildiklerinden teknik DNA polimorfizmin tespiti için oldukça güçlüdür. Tür ve alt tür seviyesinde ayırım sağlayan bu tekniğin kullanımı diğer DNA tiplendirme yöntemlerine kıyasla sergilemiş olduğu avantajlardan dolayı gün geçtikçe artmaktadır (Mueller ve Wolfenbarger 1999).

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

2.3.2.2.3 Rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindrome PCR-Tekrarlanan Palindromlara dayalı PCR)

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda Rep olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. Versalovic ve ark. 1994'de, bakteriyal parmakizi için bakteriyal genomların içinde bulunan bu tekrarlanan DNA elementlerinin PCR ile amplifikasyonundan elde edilen spesifik bantların incelenmesiyle yapılan bir tiplendirme metodu tanımlamıştır (Versalovic vd. 1994).

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

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

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

Toplu halde bu metodlar Rep-PCR genomik parmak izi tekniği olarak anılmaktadır (Versalovic vd. 1994). Bu teknikte tekrarlanan elementler PCR ile değişik boyutlarda DNA fragmentleri üretmek için çoğaltılır (Farber 1996, Dombek vd. 2000). PCR ürünleri daha sonra boyutlarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılır ve spesifik DNA parmak izi bantları oluştururlar. Daha sonra bu bantlar tanımlayıcı bilgisayar programı kullanılarak analiz edilirler. Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PCR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden biridir (Van der Zee vd. 1999). Carson ve ark. 2003'te Rep-PCR'ın ribotiplendirmeden daha doğru, tekrarlanabilir ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır (Carson vd. 2003). Tekniğin uygulanması kolaydır ve hem çok sayıda hem de az sayıda örneğe uygulanabilir. Yöntemin en önemli dezavantajı söz konusu serilerdeki yüksek değişimdir. Bu nedenle çoğu durumda tür ayırımında kullanılamaz.

Daha fazla türe uygulanabilirlik göstermekte olan Rep-PCR, PFGE ile karşılaştırıldığında daha düşük (Olive ve Bean 1999) ancak plazmid profil analizleri veya genomik parmakizleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek ayırım gücüne sahiptir (Georghiou vd. 1995). 16S rRNA gen veya 16S-23S ara bölgesinin restriksiyon analizlerinden daha iyi bir ayırım gücüne sahiptir (Vila vd. 1996; Appuhamy vd. 1997).

Bununla beraber Rep-PCR'ı multilokus (çoklu bölge) enzim elektroforezi (Woods vd. 1992), biyokimyasal karakterizasyonlar (Clarridge vd. 1995) veya ribotiplendirme gibi diğer tiplendirme yöntemleriyle karşılaştıran çalışmalar Rep-PCR'ın bu yöntemlerden daha üstün olduğunu ortaya koymuştur. Son olarak farklı çalışmalar Rep-PCR'ın PFGE sonuçlarıyla iyi ilişkiye sahip olduğunu fakat genel olarak daha az ayırım gücüne sahip olduğunu göstermiştir (Barbier vd. 1996, Liu ve Wu 1997).

2.3.2.2.4 RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

Geleneksel PCR çalışmaları belirli bir türe veya hatta suşa özgü DNA sekanslarını amplifiye etmek için kullanılabilmeyle beraber sistemin çalışabilirliği spesifik oligonükleotitlerin varlığına ihtiyaç duyduğu için üzerinde çalışılacak organizmanın DNA sekansının bilinmesi gerekmektedir. Bu da özellikle üzerinde çalıştığımız organizmanın DNA sekansı hakkında bilgi sahibi olmadığımız durumlarda dezavantaj olarak karşımıza çıkabilmektedir. RAPD analizleri bu gereksinimi ortadan kaldırmaktadır çünkü primer tasarlamak için parmakizi analizi yapılacak olan genomun sekansını bilmeye gerek yoktur (Welsh ve McClelland 1990; Williams vd. 1990). Williams ve arkadaşları, özgül nükleotit dizisini bilmeye gerek kalmadan PCR ile rastgele bir primer kullanarak polimorfizmin saptanabileceğini bulmuşlardır (Williams vd. 1990). Literatüre RAPD-PCR olarak geçen bu yöntemin analizleri sonucu elde edilen çoğaltılmış ürün polimorfizm göstermekte ve böylelikle genetik markörler olarak kullanılabilir. Aynı yıl diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak isimlendirilmiştir (Welsh ve McClelland 1990). 1991 tarihinde ise bu metodla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmakizi profili elde edilen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir yöntem yayımlanmıştır (Caetano-Anolles vd. 1991).

Bu tekniği tanımlamak için kullanılan terminoloji bazı durumlarda karışıklık yaratmaktadır (Vanechoutte 1996). RAPD parmakizlerinin yaratılmasını gerekli kılan yöntemleri tanımlamada çeşitli farklı isimler kullanılmaktadır. MAAP (Multiple

Arbitrary Amplicon Profiling) ifadesi önerilmekle beraber (Caetano-Anolles vd. 1991,1992) her bir metodun kullanılan primerin uzunluğuna göre sınıflandırılabilceği de önerilmiştir (Çizelge 2.2). Bununla beraber, günümüzde önerilen bu terminolojinin hiçbirisi resmi kabul görmemiştir ve son yıllardaki yayınlarda kullanılan primerin uzunluğuna bakılmaksızın genel yöntem AP-PCR veya RAPD tiplendirme olarak isimlendirilmeye devam etmektedir

Çizelge 2.2 Arbitrary primer parmakizi yöntemlerinde primer uzunluğu temel alınarak yapılan sınıflandırma (Caetano- Anolles vd. 1992)

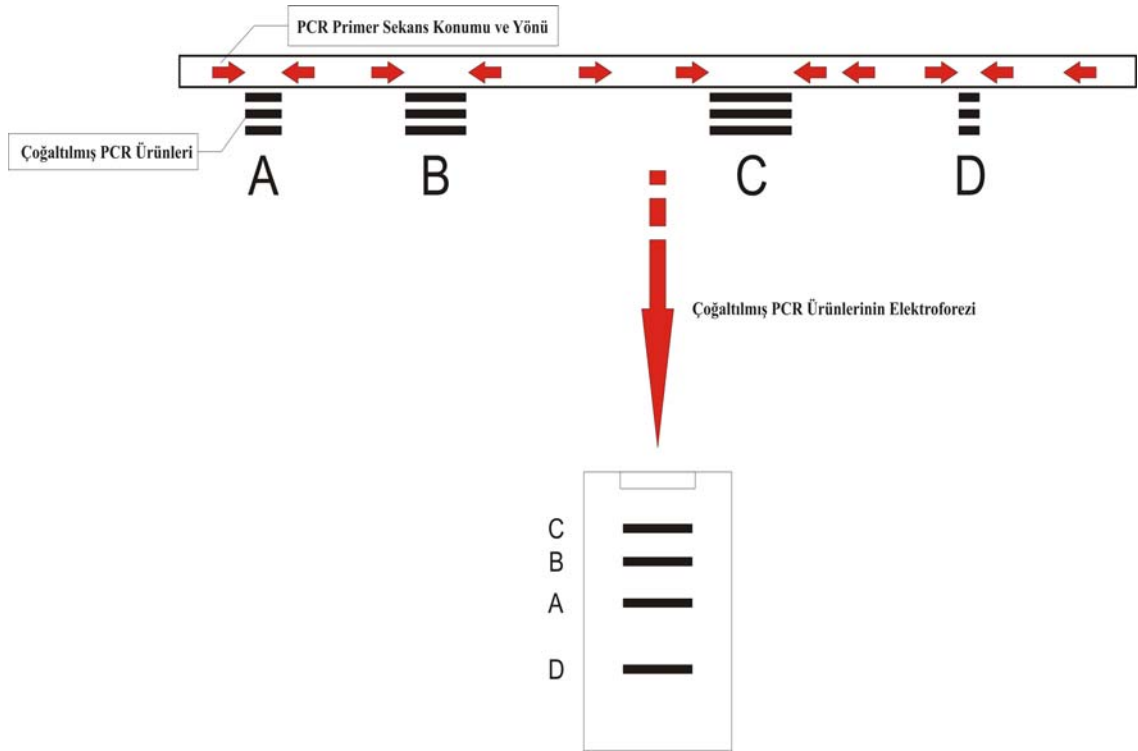
Yöntem	Primer uzunluğu
AP-PCR	c. 18-24 mer
RAPD	c. 10 mer
DAF ^a	c. 5-8 mer

^a 'DNA amplifikasyon parmakizi'

RAPD parmak izi analizi LAB'nin tür içi ve türler arası ayrımında son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılan PCR-temelli bir tekniktir. Yöntem, yakın ilişkili türlerin filogenetik analizleri ve tür içinde ayırım potansiyeline sahiptir (Welsh ve McClelland 1990; Williams vd. 1990).RAPD, bütün PCR temelli markörlerin en basitidir. RAPD markörleri, küçük (10 baz), %50'den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PCR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Oligonükleotit primerleri polimeraz zincir reaksiyonunun anahtarıdır. Oluşan parçaların sayısı ve büyüklüğü; primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA'da bu diziyeye komplementer dizinin varlığına bağlı olarak araştırılan genoma özgü bir desen (patern) verir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA'lar çalışılır. Primer bağlanmasıyla, polimeraz enzimi 5'→3' yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltır ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boyalarla boyanarak izlenebilir.

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

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



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

Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profili gösteren izolatlar filogenetik olarak ilişkili şeklinde yorumlanabilir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tiplleme yöntemleriyle çalışılmalıdır.

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

DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir (Weeden vd. 1992; Hansen vd. 1998).

RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir (Halldén 1998). Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden önce yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir (Tingey ve Del Tufa 1993; Halldén 1998). Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntem diğer moleküler genetik yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. Kullanılan primer sayısı arttıkça ayırım gücü artar (Ehrmann ve Vogel 2005). LAB'ların 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 vd. 1995, 1997; Taillez vd. 1996).

2.3.2.2.5 PCR Ribotiplendirme

2.3.2.2.5.1 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer-İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge)/ ISR (Intergenic 16S-23S rRNA Spacer Region-Genler Arası 16S-23S rRNA Ayırıcı Bölge) PCR

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi vardır. Bunlar ara bölgelerle ayrılır ve sekansta, hem cins hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik gösterirler. 16-23S rRNA arasındaki bölgenin çoğaltılması genellikle ITS-PCR olarak tanımlanır. rRNA genleri arasındaki ara bölge hedef bölge olduğu için yöntem aynı zamanda PCR-ribotiplendirme olarak da adlandırılır. Agaroz jelde ayrılan çoğaltılan bölgeler karşılaştırılır. Çoğaltılmış bölgenin restriksiyon analizi veya sekansı, metodun ayırım gücünü yükseltir (Barry vd. 1991).

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

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

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

Chenoll ve arkadaşları (Chenoll vd. 2003) tarafından yapılan çalışmada, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerinin ISR ve ARDRA gibi ribozomal DNA temelli tekniklerle tanımlaması yapılmıştır. ISR amplifikasyon analizleri sonucu elde edilen profiller kullanılarak *Carnobacterium* ve *Leuconostoc* cins seviyesine kadar tanımlamaya gidilebilmiştir. *Carnobacterium*'larda ise tür seviyesine kadar ayırım sağlanabilmiştir.

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

Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PCR-RFLP temelli bir yöntem olan ARDRA'da türe özgü spesifik primerlerin ya da evrensel primerlerin kullanımı ile 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır (Andrighetto vd. 1998). Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler restriksiyon enzimleri ile kesilir (Bouton vd. 2002). Sonuçta oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya gidilir. Bu jel görüntüleri genelde bilgisayar tabanlı programların yardımı kullanılarak dendogramların oluşturulması ile değerlendirilmektedir. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere

sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır.

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

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

ARDRA yönteminin kullanım kolaylığı ve hızı : ARDRA yöntemi DNA izolasyonu, 16S rDNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu, bu bölgenin restriksiyon enzimleri ile kesimi ve oluşan fragmanların agaroz jel sistemleri ile ortaya konulmasını oluşan bir yöntemdir. Sınırlı sayıda restriksiyon enzimi kullanıldığında bu yöntem sekans analizine nazaran çok daha az zahmetli bir yöntemdir. Buna dayanarak çok sayıda şusun bulunduğu geniş kültür koleksiyonlarında hızlı bir tarama yöntemi olarak düşünülmektedir.

Bir çok bakterinin rDNA bölgelerin tanımlanmış olmasına ve bu verilere kolaylıkla ulaşılabilir olmasına rağmen teorik olarak bu yöntem bakteri kültür koleksiyonlarının oluşumunu sağlamaktadır.

18 genomik tür ve 13 klinik izolattan oluşan 31 adet *Acinetobacter* şusunun tanımlanabilmesi amacıyla; ARDRA, RAPD-PCR VE AFLP teknikleri karşılaştırılmalı olarak kullanılmıştır. ARDRA protokolünde 5 farklı enzim kullanılmış fakat yöntem *Acinetobacter* izolatlarının tür ve suş seviyesinde farklılığını belirlemede düşük

seviyede sonuç vermiştir. Bu çalışmada özellikle *Acinetobacter* izolatlarının tanımlanmasında yüksek ayırım gücü sergileyen yöntem olarak AFLP tekniği gösterilmiştir. Radyoaktif AFLP ile karşılaştırıldığında floresan AFLP'nin teknik olarak daha hızlı ve basit olduğu ve otomatik DNA sekansına izin verdiği belirtilmiştir (Koeleman vd. 1998).

Ruiz ve arkadaşları (Ruiz vd. 2000) tarafından asetik asit bakterilerinin PCR ile çoğaltılmış 16S rDNA ve 16S-23S rDNA genler arası bölgeleri ile tanımlanması üzerine yapılan bir çalışmada; *Acetobacteraceae* familyasına ait 22 ve şarap fermentasyonundan izole edilen 24 asetik asit bakterisi PCR-RFLP ile analiz edilmişlerdir. PCR ürünleri, bu türler arasındaki polimorfizmi değerlendirebilmek için 4-baz-kesimli restriksiyon enzimleri ile muamele edilerek, bu enzimler arasında ayırım gücü en yüksek olanların *TaqI* ve *RsaI* olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar 16S rDNA'nın bu enzimlerle restriksiyon analizlerinin asetik asit bakterilerinin cins ve tür (veya ilişkili türler) bazında tanımlanması için hızlı ve güvenilir bir metot olduğunu belirtmiş ve bu bakterilerde uygulanabilirliğini göstermişler.

2003 yılında Rodas ve ark. ları üzüm pekmezi ve şaraptan izole etmiş oldukları laktik asit bakterilerini 16S-ARDRA yöntemi ile tanımlamışlardır. Bu çalışmada 16S rDNA'nın amplifikasyon için bakteri kolonileri kullanılmıştır. PCR işlemi sonucunda elde edilen ürün *BfaI*, *MseI* ve *AluI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Protokolde öncelikli olarak *BfaI* enzimi daha sonra ise *MseI* enzimi kullanılmış olup eğer gerekli ise *AluI* enzimide kullanılmıştır. Teknik 36 referans suştan 32 sini tanımlayabilmiştir ki buda izole edilen 342 izolatın tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Çalışmada tanımlanan suşlar arasında; *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus parvulus* gibi türler bulunmaktadır (Rodas vd. 2003).

ARDRA yönteminin ayırım gücü : Koeleman ve arkadaşları tarafından 1998 yılında hazırlanan raporda ARDRA yönteminin sonuçlarının yorumlanmasında karşılaşılan sorunlar sebebi ile türlerin tanımlanmasında RAPD ve AFLP yöntemleri kadar yeterli olmadığı düşünülmüştür (Koeleman vd. 1998). Fakat çok sayıda restriksiyon enzimi kullanılması ile bu yöntemin ayırım gücü artırmaktadır (Laguerre vd. 1994; Nesme vd. 1995; Lee vd. 1998).

18 genomik tür ve 13 klinik izolattan oluşan 31 adet *Acinetobacter* suşunun tanımlanabilmesi amacıyla; ARDRA, RAPD-PCR VE AFLP teknikleri karşılaştırılmalı olarak kullanılmıştır. ARDRA protokolünde 5 farklı enzim kullanılmış fakat yöntem *Acinetobacter* izolatlarının tür ve suş seviyesinde farklılığını belirlemede düşük seviyede sonuç vermiştir. Bunun neticesinde çalışmaya otomatik DNA sekansı ile devam edilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Koeleman vd. 1998).

Şaraptan ve bazı alkollü içeceklerden izole edilen laktik asit bakterilerinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise RFLP analizleri için, *AccII* ve *HaeIII* enzimleri kullanılmış ve izole edilen 44 bakterinin tanımlanması yine 16S rDNA bölgesi hedef alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 12 referans suş kullanılmıştır. DNA ekstraksiyonu sonrasında PCR işlemi 16S rDNA bölgesi hedef alınarak gerçekleştirilmiş olup saflaştırma işleminin ardından restriksiyon enzimleri ile kesim gerçekleştirilmiş ve oluşan bant profilleri referans suşlar ile karşılaştırılarak tanımlamaya gidilmiştir. Geliştirilen yöntemin *Oenococcus oeni* suşlarının tanımlanması için kullanışlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Sato vd. 2000).

2001 yılında Foschino ve ark.ları İtalya'da hamur mayasından izole edilen *Lb. sanfranciscensis* türlerini fenotipik ve genotipik olarak tanımlamışlardır. Fenotipik analizler neticesinde ilki glukozu ve maltozu ikincisi ise sadece maltozu fermente eden iki grup oluşturulmuştur. Türler arasındaki genetik ayırım ARDRA ve 16S-23S rDNA bölgesinin analizi ile sağlanmıştır. 16S rDNA bölgesi uygun primerler ile çoğaltılmış ve *HinfI* enzimi ile kesim neticesinde 2 grup oluşturulmuştur. *Lb. sanfranciscensis* türlerini diğer laktik asit bakterilerinden ayıran enzimler olarak ise; *DdeI* ve *HinfI* belirtilmiştir. Gruplama sonuçları neticesinde fenotipik testler ile genotipik sonuçlar arasında ilişki kurulamamıştır. Ayrıca bu sonuç izolasyonların yapıldığı coğrafik alan ve izolasyonun gerçekleştirildiği ürünler arasındada ilişkilendirilememiştir (Foschino vd. 2001).

Jang ve ark. ları 2003 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *Leuconostoc* türlerini tanımlayabilmek için 16S rRNA PCR-RFLP analizini kullanmışlardır. 16S rRNA bölgesini spesifik primerler kullanarak çoğaltmışlardır. PCR neticesinde oluşan 976bp büyüklüğündeki DNA *MseI*, *HaeIII* ve *Tsp509I* enzimleri ile kesime tabi tutulmuştur.

Bu yöntemin, özellikle fermente sebzelerden izole edilen *Leuconostoc* türlerinin tanımlanmasında hızlı ve güvenilir olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Fakat özellikle *Leu. argentinum* ve *Leu. lactis* tanımlamasında bu enzimler yetersiz kalmıştır (Jang vd. 2003).

Sicilyaya özgü doğal fermente yeşil zeytinde baskın olarak bulunan *Lb. casei* nin fenotipik ve genotipik tanımlaması 2004 yılında Randazzo ve ark. ları tarafından yapılmıştır. Sicilya'nın farklı bölgelerinden toplanan fermente yeşil zeytinlerden laktik asit bakterileri izole edilmiş ve hem biyokimyasal testler hem de 16S rRNA PCR-RFLP analizleri neticesinde tanımlamaya gidilmiştir. Biomerieux veritabanı ile yapılan karşılaştırmalar neticesinde izole edilen suşların Api kit sonuçları; 13 heterofermentatif suşun *Lb. brevis*, 24 homofermentatif suşun *Lb. casei* olduğunu, ID 32 STREP ise kok şeklindeki bakterilerin *Enterococcus faecium* olduğunu göstermiştir. Fakat PCR/RFLP analizleri biyokimyasal test sonuçlarını desteklememiştir. Bu amaçla referans suşlar baz alınarak moleküler teknikler içerisinde ARDRA olarak tanımlanan yöntem ile tanımlamaya gidilmiş ve 16S rRNA PCR-RFLP analizi spesifik primerler ve *HaeIII*, *HindI* ve *AluI* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda izole edilen bakterilerin büyük çoğunluğu *Lb. casei* olarak tanımlanmıştır (Randazzo vd. 2004).

2.3.2.2.6 DNA sekans analizi

Bir DNA molekülünün nükleotid kompozisyonunun belirlenmesidir. DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayrımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayrımı için DNA sekanslamanın kullanılmasının en iyi yol olarak görülmesine rağmen her izolatın tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rRNA sekansları bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş ve bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir (Klaenhammer 1993).

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

2.4 LAB Taksonomisinde Polifazik Yaklaşımlar

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

2.5 Bilgisayar Destekli Veri Analizleri

İnsan gözü ve beyni jel üzerinde birbirine komşu olan iki kuyucuktaki elektroforetik paternlerdeki farklılıkları belirlemede ve teknik problemlerden dolayı jeldeki hasarları düzeltmede oldukça etkilidir. Bununla beraber, çoklu profillerin görsel karşılaştırılması ve gruplandırılması oldukça zordur, ve bu nedenle kompleks elektroforetik paternlerin analizleri bilgisayar programlarının kullanımına bağlıdır. Bu durum, otomatize fenotipik tanımlama sistemlerinin kullanımı ile oluşturulabilen çok sayıda fenotipik karakterin

veri analizleri için de geçerlidir. En yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler- küme (cluster) yada patern analizleri izolatların ikili gruplar (pairwise) halinde karşılaştırılmasından sonra benzerlikleri temel alınarak gruplandırılmalarını ve dendogram olarak adlandırılan ağaca benzer yapı ile anlatımını içerir.

Fazla sayıdaki karakterler bakımından toplam benzerlikleri temel alınarak organizmaların gruplanmasına ait fikir ilk olarak botanikçi Michel Adanson tarafından önerilmiştir. Bununla beraber, bu benzerliklerin hesaplanmasında yüksek hıza sahip bilgisayarların gelişimi ve mevcudiyeti neticesinde bu uygulama farklı disiplinlerde uygulanabilir duruma gelmiştir. Nümerikal (sayısal) taksonomi olarak isimlendirilen bu yaklaşım Sneath'in (1957 a,b) çalışmaları önderliğinde mikrobiyoloji alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş ve ilk olarak (+) veya (-) olarak skorlanan fenotipik karakterler için kullanılmıştır (Baumann vd. 1968). Nümerikal taksonomi gerçeğinin altında yatan prensipler başka çalışmalarda detaylı olarak açıklanmıştır (Sneath 1971, 1972; Sneath ve Sokal 1973; Aldenderfer ve Blashfield 1984; Everitt 1993). Nümerikal taksonomide morfolojik ve fizyolojik özellikleri içine alan fenotipik karakterlerin ne şekilde skorlanacağına dair detaylı tanımlama Lockhart ve Liston'un (1970) çalışmasında bulunabilir. Mikroorganizmaların protein elektroforetik parmakizi analizlerine dayanan otomotize sınıflandırılması ilk olarak Kersters ve DeLey (1975) tarafından tanımlanmıştır. Benzer bir yaklaşımda Jackman (1985) tarafından izlenmiştir. 1980 lerden bu yana, mikrobiyal taksonomi ve filogenetikte elektroforetik parmakizlerinin analizlerinde bilgisayar destekli sistemlerin kullanımı giderek artmıştır. Başlangıçta Kersters ve De Ley'in grubu tarafından geliştirilen bilgisayar programı yerini zaman içerisinde GelCompar ve BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) gibi oldukça gelişmiş ticari software paketlerine bırakmıştır. Parmakizi analizlerinde kullanılan diğer ticari software paketleri arasında Taxotron (Institut Pasteur, Paris, France), Dendron (Solltech, Oakdale, IA, USA) ve Bio Image Whole Band Analyser (Bio Image Inc., Ann Arbor, MI, USA) yer almaktadır.

3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Çalışmada *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* genusları ile temsil edilen Laktik Asit Bakteri (LAB) grubuna ait 148 adet suş kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Bu suşlar laboratuvarında daha önceden gerçekleştirilen çalışmalarda fenotipik yöntemler/API CH50 kit kullanımı ile tanımlanmışlardır.

3.1.2 Bakteri gelişimlerinde kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakteri gruplarından *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait olan türler TGE (tryptone glucose yeast extract) besiyerinde 32°C’de, *Lactobacillus* cinsine ait olan türler ise MRS besiyerinde 30°C’de geliştirilmiştir. LAB’lerin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin içerikleri **EK 1**’de verilmiştir.

3.1.3 Tampon ve çözeltiler

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

3.1.4 Kromozomal (Genomik) DNA izolasyon kiti

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

3.1.5 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler

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

3.1.6 Kimyasallar

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

3.1.7 Kullanılan çözeltiler ve malzemelerin sterilizasyonu

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

3.1.8 Bakteri kültürlerinin saklanması

Bu bakteri kültürleri % 50'lik gliserol solüsyonu içinde çözünmüş olarak -86°C'de saklı tutulmakta ve çalışma öncesi aktive edilmektedir (Biswas vd. 1991).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri

	Bakteri	Kaynak
A	<i>Enterococcus</i>	
1	<i>Enterococcus avium</i> ATCC Pasteur (RSKK 500)	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2	<i>Enterococcus hirae</i> 115	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab
3	<i>Enterococcus casseliflavus</i> NRLL 3502	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
4	<i>Enterococcus durans</i> RSKK 05034	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
5	<i>Enterococcus durans</i> 51	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
6	<i>Enterococcus durans</i> 56	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
7	<i>Enterococcus durans</i> 69	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
8	<i>Enterococcus durans</i> 75	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
9	<i>Enterococcus durans</i> 89	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
10	<i>Enterococcus durans</i> 116	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
11	<i>Enterococcus durans</i> 124	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
12	<i>Enterococcus faecalis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
13	<i>Enterococcus faecalis</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
14	<i>Enterococcus faecalis</i> E27	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
15	<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
16	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
17	<i>Enterococcus faecalis</i> 64	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
18	<i>Enterococcus faecalis</i> 74	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
19	<i>Enterococcus faecalis</i> 78	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
20	<i>Enterococcus faecalis</i> 79	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
21	<i>Enterococcus faecalis</i> 80	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
22	<i>Enterococcus faecalis</i> 81	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
23	<i>Enterococcus faecalis</i> 82	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
24	<i>Enterococcus faecalis</i> 139	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
25	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	GATA, Mikrobiyoloji Lab.
26	<i>Enterococcus faecium</i> F1	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
27	<i>Enterococcus faecium</i> H	İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.
28	<i>Enterococcus faecium</i> 1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
29	<i>Enterococcus faecium</i> 2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
30	<i>Enterococcus faecium</i> 3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
31	<i>Enterococcus faecium</i> 5	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
32	<i>Enterococcus faecium</i> 6	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
33	<i>Enterococcus faecium</i> 7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
34	<i>Enterococcus faecium</i> 8	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
35	<i>Enterococcus faecium</i> 71	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
36	<i>Enterococcus faecium</i> 77	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri (devamı)

B.	<i>Lactococcus</i>	
1	<i>Lactococcus lactis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Lactococcus lactis</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
3	<i>Lactococcus lactis</i> OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
4	<i>Lactococcus lactis</i> OZ4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Lactococcus lactis</i> PK1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Lactococcus lactis</i> 30	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
7	<i>Lactococcus lactis</i> 32	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
8	<i>Lactococcus lactis</i> 33	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
9	<i>Lactococcus lactis</i> 57	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
10	<i>Lactococcus lactis</i> 86	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
11	<i>Lactococcus lactis</i> 88	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
12	<i>Lactococcus lactis</i> 93	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
13	<i>Lactococcus lactis</i> 94	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
14	<i>Lactococcus lactis</i> 100	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
15	<i>Lactococcus lactis</i> 102	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
16	<i>Lactococcus lactis</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
17	<i>Lactococcus lactis</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
18	<i>Lactococcus lactis</i> W3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 31	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 34	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 39	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 62	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 63	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 87	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
26	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 99	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
27	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 103	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
28	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B634	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
30	<i>Lactococcus garvieae</i> 38	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
31	<i>Lactococcus garvieae</i> 43	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
32	<i>Lactococcus garvieae</i> 44	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
33	<i>Lactococcus garvieae</i> 46	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
34	<i>Lactococcus garvieae</i> 58	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
35	<i>Lactococcus garvieae</i> 59	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
36	<i>Lactococcus garvieae</i> 65	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
37	<i>Lactococcus garvieae</i> 66	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri (devamı)

38	<i>Lactococcus garvieae</i> 67	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
39	<i>Lactococcus garvieae</i> 83	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
40	<i>Lactococcus garvieae</i> 84	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
41	<i>Lactococcus garvieae</i> 85	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
42	<i>Lactococcus garvieae</i> 90	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
43	<i>Lactococcus garvieae</i> 91	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
44	<i>Lactococcus garvieae</i> 92	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
45	<i>Lactococcus garvieae</i> 95	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
46	<i>Lactococcus garvieae</i> 96	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
47	<i>Lactococcus garvieae</i> 97	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
C.	<i>Pediococcus</i>	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Prokaryot Genetiği Lab.
1	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
4	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
8	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
11	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
13	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
14	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
15	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
16	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
17	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
18	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
19	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
21	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
22	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
23	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
24	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
25	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
26	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
27	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
28	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	Gazi Üniversitesi FEF Biyoloji Bölümü
29	<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri (devamı)

D.	<i>Leuconostoc</i>	
1	<i>Leuconostoc lysis</i> Ly	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL B346	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
E.	<i>Lactobacillus</i>	
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
2	<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRLL B1837	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
3	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
4	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	Ankara Üniveritesi Gıda Mühendisliği
5	<i>Lactobacillus maltoamicus</i> NRLL 148532	Ankara Üniveritesi Gıda Mühendisliği
6	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
7	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
8	<i>Lactobacillus rhamnasus</i> TK2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
9	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
10	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL B21	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği
11	<i>Lactobacillus caseii</i> RSKK 708	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
12	<i>Lactobacillus caseii</i> CG1	ODTÜ Gıda Mühendisliği
13	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
14	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
15	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	Ankara Üniveritesi Gıda Mühendisliği
16	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	H.Ü. Biyoloji Bölümü
17	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	ODTÜ Gıda Mühendisliği
18	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
20	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
21	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	ODTÜ Gıda Mühendisliği
22	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	ODTÜ Gıda Mühendisliği
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215L	ODTÜ Gıda Mühendisliği
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	ODTÜ Gıda Mühendisliği
25	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	ODTÜ Gıda Mühendisliği
26	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	ODTÜ Gıda Mühendisliği
27	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	ODTÜ Gıda Mühendisliği
28	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
29	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.
30	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Bakteri stok kültürlerinin aktifleştirilmesi

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

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

3.2.2 Kromozomal (Genomik) DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan LAB grubuna ait toplam 148 suştan PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamalarında kit tarafından sağlanan prospektüs (EK 3) üzerinden birkaç değişikliğe gidilmiştir. Bu değişiklikler sırasıyla (i) elde edilen hücre miktarını arttırmak için toplam hücre hacminin 2 katına çıkarılması (ii) izopropanol ile DNA muamele edildikten sonra DNA’nın ipliksi yapıdaki zincirleri gözlemlenebilir bir kütle oluşturabilsin diye solüsyon buz üzerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ve bu zaman diliminde ependorf tüpün arada bir yavaş hareketlerle sallanması ve (iii) çalışma sonucunda elde edilen ve içerisinde DNA molekülünün bulunduğu pellet üzerine 40 µl kit tarafından temin edilen DNA Rehidrasyon solüsyonunun (Tris-EDTA) eklenmesi ve önce 65°C’de 15 dk ardından 1 gece +4°C’de inkübasyona bırakılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılacak şekilde 1:10 oranında dehidrasyon tamponu içerisinde seyreltilerek (5 µl DNA + 45 µl *dehidrasyon tamponu* veya) bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır. Bu arada ana stok DNA sı -86°C da muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Saflık (kalite) ve miktar tayini

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

3.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

Promega Wizard[®] Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımıyla izole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleri **% 1 agaroz** içeren jellerde yapılmıştır (Sambrook ve Russell 2001).

Yatay jel elektroforezi için 3 gr agaroz, 300 ml 1XTBE (Tris-Borik asit-EDTA) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C'ye kadar indirilen jelle % 2 Etidyum bromit (10mg/ml) çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş ve bir saat jelin polimerizasyonu için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde "tampon çözelti" (1xTBE) ilave edilmiştir. Ardından jelin hasar görmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdan uzaklaştırılmıştır. -20°C'de saklanan 1:10 seyreltilmiş DNA numuneleri bir süre oda sıcaklığında buz üzerinde bekletildikten sonra 3µl DNA numunesi üzerine 2 µl "yükleme boya çözeltisi" ilave edilerek mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir.

Elektroforez 100 V'da 2.5-3 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak "supercoiled DNA ladder" kullanılmıştır (3µl markör + 2µl yükleme boyası). Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jel Kodak Jel Görüntüleme (Gel Logic 200

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

3.2.5 Kullanılan primerler

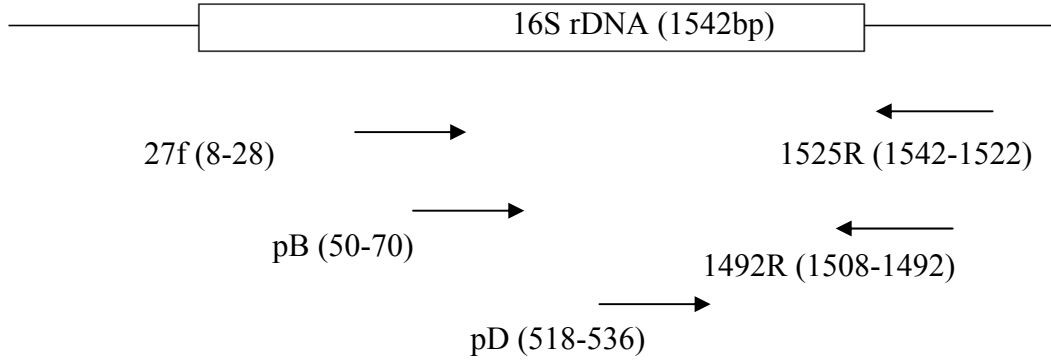
Çalışmamızda 16S rDNA bölgesini çoğaltmak amacıyla öncelikli olarak Escalante ve ark. (2001) tarafından kullanılmış olan ve *E.coli* 16S rDNA sında sırasıyla 8-27 ve 1541-1525 pozisyonlarına karşılık gelen ve Gram-pozitif ve benzer bakterileri hedef alan **fD1** ve **rD1** primer çifti kullanılmıştır

fD1 5' (AGAGTTTGACCTCCTCCTGGCTCAG) 3'

rD1 5'(AAGGAGGTGATCCAGCC) 3' primer çifti kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk optimizasyon aşamalarında fD1+rD1 primer kombinasyonu 1.5 kb lık amplifiye ürün oluşturmuştur. Bu ilk aşamada başarı sağlamış olsa da ilerleyen PCR çalışmalarında istenmeyen bantlar elde edilmiştir. Bu soruna çözüm getirmek amacıyla diğer PCR çeşitlerinden farklı bir optimizasyon yaklaşımı olan ve tek bir tüp içerisinde değişik siklus şartlarının denenmesi esasına dayanan Touch down PCR denenmiştir.

Optimum amplifikasyona ulaşmak amacıyla denenilen bu teknik sonucunda da başarı elde edilememiş ve ürün tek bant olarak gözlenememiştir. Bunun üzerine yapılan literatür çalışmasında forward primerin içerdiği bazı dizilerden dolayı [5'(AGAGTTTGACCTCCTCCTGGCTCAG)3'] kendi üzerinde katlanma yapmış olabileceği sonucuna varılmış ve 16S rDNA gen bölgesini hedef alan primerlerin fiziksel haritası ve sekans stratejileri üzerine bir literatür araştırması yapılmıştır. İlk olarak Şekil 3.1'de bağlantı noktaları detaylı olarak gösterilen 16S rDNA bölgesine özgü primer çiftleri denenmiştir.



Şekil 3.1 16S rDNA gen bölgesi için tasarlanmış primerler

16S rDNA gen bölgesi için farklı büyüklüklerde ampliconlar oluşturan farklı primer kombinasyonları (pB-1525R, pB-1492R, pD-1527R ve pD-1492R) (Catherine vd. 2005; Ulrike vd. 1989; Escalante vd. 2001). Çalışmamızda denemiş olduğumuz bu primerlerin dizileri ve beklenen ürün büyüklüğü ayrıntılı olarak Çizelge 3.2’de belirtilmiştir. Bu primerler bazı alınarak yapılan optimizasyon çalışmasında 1. primer çifti (pB, 1525R) ile yapılan denemelerde herhangi bir bant elde edilememiştir. En ideal PCR ürünü sergileyen 2. primer çifti (pB, 1492R) çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 3.2 16S rDNA gen bölgesi için tasarlanmış primerler, baz dizileri ve PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin büyüklükleri.

	Primer	Sekans	Beklenen Ürün büyüklüğü
1	pB (50-70) 1525R	5' TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3' 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'	1495bp
2	pB (50-70) 1492r	5' TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3' 5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	1458bp
3	pD (518-536) 1525R	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3' 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'	1027bp
4	pD (518-536) 1492R	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3' 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3'	990bp

Sonuç olarak, ARDRA çalışmasında 16S rDNA gen bölgesini çoğaltmak amacıyla; *E.coli* 16S rDNA'sında sırasıyla 50-70 ve 1492-1508 pozisyonlarına karşılık gelen ve Gram-pozitif ve benzer bakterileri hedef alan **pB** 5'd TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3' ve **1492R** 5'd TAC CTT GTT ACG ACT T 3' primer çifti kullanılmıştır.

3.2.6 PCR amplifikasyonu ve optimizasyonu

Laktik asit bakterilerine ait 5 genus'u temsilen seçilen 5 adet suş (*E. faecalis* OZ1, *P. acidilactici/cereviciae* ATCC 666, *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 1061, *Lc. lactis* OZ1 ve *Lb. plantarum* DSM 20174) üzerinden optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonda göz önünde bulundurulmuş temel parametreler arasında PCR reaksiyonlarında kullanılacak MgCl₂ konsantrasyonunun belirlenmesi yer almaktadır. PCR reaksiyonlarında kullanılacak MgCl₂ konsantrasyonunun belirlenmesi için 2 farklı protokol denenmiş (Çizelge 3.3) ve "Gradient PCR thermocycler/Eppendorf" cihazında, detayları aşağıda verilen amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu program; her biri kendi içinde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 34 döngüden oluşmaktadır. Son olarak 72°C de 10 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır. 16S PCR çalışması için protokol 2 seçilmiş ve agaroz jel elektroforezi % 1.5 agaroz içeren jellerde aynen RAPD protolünde olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 PCR reaksiyon karışımları

Reaksiyon Bileşimi	Protokol No. 1 (µl)	Protokol No. 2 (µl)
Su	11	14
DNA (1:10 seyreltilmiş)	6	6
5X KCl Colorless Buffer	5	5
MgCl ₂ (25 Mm)	6	3
dNTP (2.5 Mm)	4	4
16S ileri primer (10 µmol)	6	6
16S geri primer (10 µmol)	6	6
Taq DNA polimeraz (50 ünite)	6	6
Toplam Hacim(µl)	50	50

3.2.7 Kullanılan restriksiyon enzimleri (RE)

Çalışmada *SspI*, *NheI*, *KpnI*, *HinfI*, *HindIII*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *PstI*, ve *PaeI* restriksiyon enzimleri beş farklı genusa ait birer örnekle denenmiştir. Bunların arasından kesim noktasına sahip olan 7 tanesi (*HinfI*, *HindIII*, *HaeIII*, *MspI*, *TaqI*, *PstI*, ve *PaeI*) çalışmadaki 148 adet suşun ARDRA analizleri için kullanılmıştır. Kullanılan restriksiyon enzimleri, baz dizilişleri ve optimum çalıştıkları sıcaklık değeri Çizelge 3.4' de verilmiştir.

3.2.8 Restriksiyon enzimleri ile kesim

Restriksiyon enzimi ile kesim işleminin gerçekleştirebilmesi için Çizelge 3.5'de belirtilen protokol takip edilmiştir. Enzim ile muamele edilen numuneler enzimin çalıştığı sıcaklıkta 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra restriksiyon endonükleazların aktivitesini sonlandırmak amacıyla PCR tüpü 70°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Kesime uğramış DNA fragmanları % 1.5 lik agaroz jelde daha önce anlatılan prosedürler takip edilerek gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.4 ARDRA çalışmalarında kullanılan restriksiyon enzimleri, kesim noktaları ve optimum çalıştıkları sıcaklık değerleri

	Kullanılan RE*	Kesim noktası 5'→3'	T_{opt.}	İnkübasyon süresi
1	<i>HaeIII</i>	5'-G [^] G [^] C C-3' 3'-C C [^] G G-5'	37°C	3 saat
2	<i>HindIII</i>	5'-A [^] A G C T T-3' 3'-T T C G A [^] A-5'	37°C	3 saat
3	<i>HinI</i>	5'-G [^] A N T C-3' 3'-C T N A [^] G-5'	37°C	3 saat
4	<i>MspI</i>	5'-C [^] C G G-3' 3'-G G C [^] C-5'	37°C	3 saat
5	<i>PaeI</i>	5'-G C A T G [^] C-3' 3'-C [^] G T A C G-5'	37°C	3 saat
6	<i>PstI</i>	5'-C T G C A [^] G-3' 3'-G [^] A C G T C-5'	37°C	3 saat
7	<i>TaqI</i>	5'-T [^] C G A-3' 3'-A G C [^] T-5'	65°C	3 saat
8	<i>SspI</i>	5'-A A T [^] A T T-3' 3'-T T A [^] T A A-5'	37°C	3 saat
9	<i>NheI</i>	5'-G [^] C T A G C-3' 3'-C G A T C [^] G-5'	37°C	3 saat
10	<i>KpnI</i>	5'-G G T A C [^] C-3' 3'-C [^] C A T G G-5'	37°C	3 saat

Çizelge 3.5 Restriksiyon enzim kesim protokolü

Reaksiyon Bileşimi	(µl)
Su	9
Restriksiyon Enzim Tamponu	2
BSA (Bovin Serum Albumin)	0.2
Enzim	0.8
16S PCR Ürünü	8
Toplam Hacim(µl)	20

3.2.9 Sonuçların değerlendirilmesi

Bu amaç için Gel Compar II, comparative analysis of electrophoresis patterns, version 4.1 (Applied Maths/Belgium) yazılım paket programı kullanılmıştır. Agaroz Jel üzerinde oluşan bantlar KODAK Görüntüleme Sisteminde görüntülenip TIFF formatında depolandıktan sonra TIFF dosyaları bu software ile çalışabilecek dosya formatına dönüştürülmüştür (8 bit). Moleküler tiplendirme yaklaşımlarında Dice, Jaccard ve Pearson benzerlik katsayıları gibi elektroforetik bant temelli benzerlik katsayıları suş benzerliklerinin kantitatif değerlendirilmesini sağlayan dendrogramların oluşturulmasında kullanılır. Çalışmamızda RAPD sonuçlarının değerlendirilmesinde Pearson, ARDRA sonuçlarının değerlendirilmesinde ise Dice korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

Genel olarak Pearson korelasyon katsayısı düşük benzerlik değerlerinin söz konusu olduğu durumlarda tercih edilir. Pearson korelasyon katsayısının küçük varyasyonlarda daha duyarlı olduğu görülmektedir. Bu katsayılar RAPD ve AFLP gibi bant yoğunluklarının dikkate alındığı suş benzerliklerinin kıyaslandığı tiplendirme metotlarında birer tercih olabilir. Bununla beraber bant yoğunluğun yanında çeşitliliğinin olduğu ve hatta yalnızca bir bantın varlığı ya da yokluğunun önemli olduğu durumlarda tercih edilmektedir. Benzerlik gösteren bantlar toplam bant profiline uyarlanarak sonuca gidilmektedir. Bu nedenle bir çok farklı bant profili sergileyen RAPD bantları arasındaki benzerlik “Pearson product moment correlation coefficient (Pearson korelasyon katsayısı)” değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılmıştır.

Dice ve Jaccard korelasyon katsayıları bant paternlerinin kıyaslanmasında negatif bant eşleşmeleri göz ardı edildiğinden dolayı sadece var olan benzer bant profilleri üzerinden bir sonuca gitmektedir. Bundan dolayı olası tüm bant pozisyonları kullanılmadığı için benzer profillerden kaynaklanan yüksek benzerlik oranı içerir. Bu benzerlik katsayıları arasında kümelendirme ölçümlerinde fark yoktur. Ancak Dice, bantların eşleşmesine önem verirken; Jaccard daha çok farklılıklara önem vermektedir (Carriço vd. 2005). Bu nedenle 16S rDNA gen bölgesinin restriksiyon enzim profil

bantları arasındaki benzerlik “Dice product moment correlation coefficient (Dice korelasyon katsayısı)” değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Çalışmanın ana noktasını ve materyalini oluşturan basamak kromozomal DNA molekülünün izolasyonudur. Başarılı bir izolasyonun ardından ana materyal olarak kullanılacak DNA molekülü diğer basamaklar için temel oluşturmaktadır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz 148 adet Laktik Asit Bakterisine ait kromozomal (genomik) DNA molekülü PROMEGA Wizard Genomik DNA izolasyon Kit sistemi kullanılarak izole edilmiş ve NANODROP spektrofotometre kullanılarak DNA konsantrasyonu ng/µl olarak Çizelge 4.1’de verilmiştir.

OD₂₆₀ nm, DNA molekülünün absorbe edildiği dalga boyudur. Bu değer numunedeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (OD₂₆₀ da 1= 50 µl/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 edicilerin varlığını, 2.0’den daha büyük OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı ise numunenin kloroform veya fenol ile kontamine olmuş olabileceğini göstermektedir. Nükleik asit saflığının tespitinde kullanılan bir diğer ölçüm OD₂₆₀/OD₂₃₀ oranıdır ancak OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranına göre daha az hassas olan ve kullanılan bir değerdir.

Çizelge 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları

BAKTERİ ADI	KONT (ng/µl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260/280	OD 260/230
Enterococcus					
<i>Enterococcus avium</i> ATCC Pasteur (RSKK 500)	880,78	17,616	8,742	2,02	2,20
<i>Enterococcus hirae</i> 115	1507,70	10,955	15,48	2,00	2,01
<i>Enterococcus casseliflavus</i> NRLL 3502	1043,67	20,873	10,664	1,96	2,01
<i>Enterococcus durans</i> RSKK 05034	354,43	7,089	3,57	1,99	1,96
<i>Enterococcus durans</i> 51	887,07	18,550	14,621	2,03	2,03
<i>Enterococcus durans</i> 56	1079,77	19,501	13,532	2,03	2,08
<i>Enterococcus durans</i> 69	1052,43	19,049	19,53	2,00	1,94
<i>Enterococcus durans</i> 75	1079,42	15,592	14,856	2,00	2,04
<i>Enterococcus durans</i> 89	1400,90	18,223	14,045	2,01	2,02
<i>Enterococcus durans</i> 116	1547,47	17,925	15,48	2,00	1,98
<i>Enterococcus durans</i> 124	194,90	15,677	13,04	1,96	1,90
<i>Enterococcus faecalis</i> OZ1	348,28	6,966	3,524	1,98	1,98
<i>Enterococcus faecalis</i> H	521,39	10,428	5,575	1,87	1,75
<i>Enterococcus faecalis</i> E27	812,24	16,245	8,143	1,99	2,07
<i>Enterococcus faecalis</i> EF1	484,88	9,698	4,944	1,96	2,08
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	237,45	24,749	12,205	2,03	2,14
<i>Enterococcus faecalis</i> 64	2053,43	25,008	20,904	2,01	1,98
<i>Enterococcus faecalis</i> 74	2135,02	24,7	22,69	1,97	1,99
<i>Enterococcus faecalis</i> 78	710,34	14,547	17,096	2,00	1,98
<i>Enterococcus faecalis</i> 79	1346,90	14,555	19,179	2,01	2,09
<i>Enterococcus faecalis</i> 80	120,72	12,95	16,02	2,03	2,05
<i>Enterococcus faecalis</i> 81	1280,06	15,617	12,008	1,93	1,91
<i>Enterococcus faecalis</i> 82	969,74	19,786	19,084	2,04	1,92
<i>Enterococcus faecalis</i> 139	820,93	11,511	10,983	2,01	2,07
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057	876,41	17,528	8,567	2,05	2,26
<i>Enterococcus faecium</i> F1	717,65	14,353	7,028	2,04	2,11
<i>Enterococcus faecium</i> H	357,03	7,141	3,615	1,98	2,05
<i>Enterococcus faecium</i> 1	673,05	17,161	14,171	1,85	1,84
<i>Enterococcus faecium</i> 2	715,5	14,131	19,096	2,02	2,09
<i>Enterococcus faecium</i> 3	689,90	13,762	10,859	2,01	2,14
<i>Enterococcus faecium</i> 5	1416,80	8,306	14,139	2,02	1,97
<i>Enterococcus faecium</i> 6	987,45	18,75	16,521	2,05	2,03
<i>Enterococcus faecium</i> 7	1982,56	19,51	19,562	2,00	1,98
<i>Enterococcus faecium</i> 8	1952,90	9,455	19,533	2,00	2,04
<i>Enterococcus faecium</i> 71	1260,60	15,592	12,806	2,00	2,14
<i>Enterococcus faecium</i> 77	414,91	18,283	14,045	2,01	2,02
Lactococcus					
<i>Lactococcus lactis</i> OZ1	1949,86	38,997	19,107	2,04	2,14
<i>Lactococcus lactis</i> OZ2	2949,9	58,998	28,609	2,06	2,27
<i>Lactococcus lactis</i> OZ3	1740,43	34,809	17,216	2,02	2,15

Çizelge 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

<i>Lactococcus lactis</i> OZ4	1819,22	36,384	17,844	2,04	2,17
<i>Lactococcus lactis</i> PK1	999,59	19,992	9,657	2,07	2,17
<i>Lactococcus lactis</i> 30	985,54	9,677	10,04	1,94	1,90
<i>Lactococcus lactis</i> 32	1255,55	15,378	21,104	2,01	1,98
<i>Lactococcus lactis</i> 33	1235,01	12,7	22,76	1,99	1,90
<i>Lactococcus lactis</i> 57	700,30	14,207	7,076	2,00	1,98
<i>Lactococcus lactis</i> 86	741,20	14,820	7,879	2,01	2,09
<i>Lactococcus lactis</i> 88	710,75	12,034	16,902	2,03	2,05
<i>Lactococcus lactis</i> 93	1280,85	15,117	12,908	1,99	1,81
<i>Lactococcus lactis</i> 94	1900,53	9,786	9,752	2,04	2,20
<i>Lactococcus lactis</i> 100	1012,02	13,831	10,825	2,01	2,03
<i>Lactococcus lactis</i> 102	683,90	12,111	14,151	1,89	1,84
<i>Lactococcus lactis</i> W1	985,46	19,709	9,678	2,04	2,21
<i>Lactococcus lactis</i> W2	2696,72	53,934	25,78	2,09	2,39
<i>Lactococcus lactis</i> W3	451,5	9,03	4,53	1,99	2,12
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 31	700,30	14,207	7,076	2,00	1,98
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 34	715,55	14,11	11,916	2,02	2,09
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 35	882,10	13,652	11,729	2,01	2,04
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 39	916,86	10,663	14,13	2,02	1,97
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 62	987,75	12,525	11,821	2,07	2,03
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 63	1480,90	19,502	11,512	2,03	2,01
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 87	950,40	10,049	19,53	2,00	2,04
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 99	1190,60	15,291	12,826	2,00	1,94
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 103	590,00	18,328	14,915	2,01	2,02
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 01018	1107,95	22,159	10,968	2,02	2,08
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NRLL B634	1445,71	28,914	14,254	2,03	2,23
<i>Lactococcus garvieae</i> 38	790,70	10,955	15,48	2,00	2,02
<i>Lactococcus garvieae</i> 43	980,80	9,924	11,104	1,99	1,98
<i>Lactococcus garvieae</i> 44	1250,98	15,908	11,964	2,01	2,00
<i>Lactococcus garvieae</i> 46	1232,01	14,7	12,619	1,97	1,99
<i>Lactococcus garvieae</i> 58	790,10	14,734	7,196	2,00	1,98
<i>Lactococcus garvieae</i> 59	1081,18	14,528	7,119	2,03	2,09
<i>Lactococcus garvieae</i> 65	985,42	12,001	16,02	2,03	2,05
<i>Lactococcus garvieae</i> 66	1280,06	15,617	12,08	1,93	1,81
<i>Lactococcus garvieae</i> 67	950,25	9,687	9,114	2,04	2,20
<i>Lactococcus garvieae</i> 83	993,53	12,973	10,813	2,01	2,17
<i>Lactococcus garvieae</i> 84	872,25	17,601	12,111	1,95	1,84
<i>Lactococcus garvieae</i> 85	715,56	14,39	11,116	2,02	2,09
<i>Lactococcus garvieae</i> 90	881,16	13,12	11,819	2,01	2,04
<i>Lactococcus garvieae</i> 91	1415,85	11,36	12,113	2,02	1,97
<i>Lactococcus garvieae</i> 92	785,57	12,555	10,011	2,05	2,03
<i>Lactococcus garvieae</i> 95	775,55	19,501	12,002	2,03	2,08
<i>Lactococcus garvieae</i> 96	955,433	9,949	9,513	2,00	2,14
<i>Lactococcus garvieae</i> 97	769,69	15,592	12,536	2,00	2,14

Çizelge 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

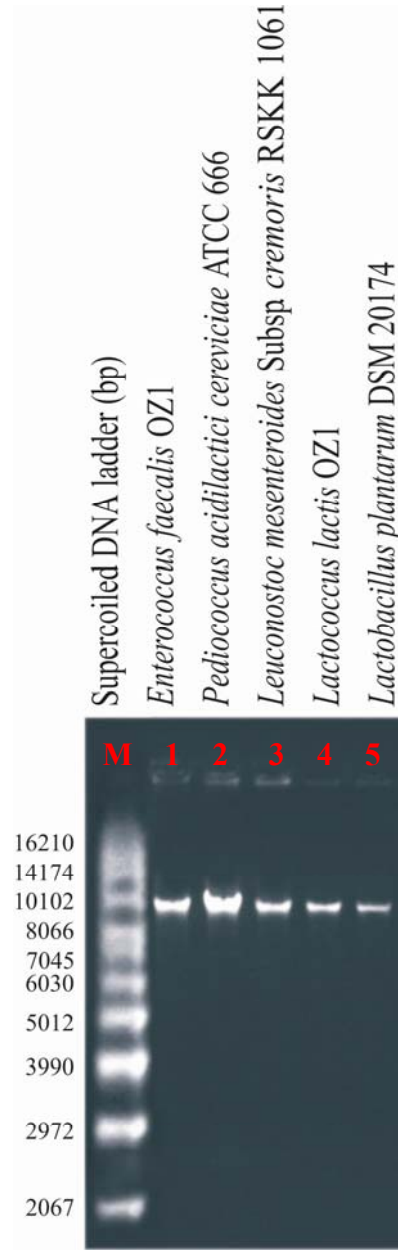
<i>Pediococcus</i>					
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	1087,77	21,755	10,621	2,05	2,23
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	952,43	19,049	9,53	2,00	2,14
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	1279,62	25,592	12,806	2,00	2,14
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	1414,13	28,283	14,045	2,01	2,22
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	547,77	10,955	5,48	2,00	2,08
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	983,83	19,677	10,04	1,96	1,90
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	710,34	14,207	7,096	2,00	1,98
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	1741,23	34,825	17,179	2,03	2,29
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	610,72	12,214	6,02	2,03	2,05
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	280,86	5,617	2,908	1,93	1,81
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	989,28	19,786	9,684	2,04	2,20
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	1092,53	21,851	10,883	2,01	2,17
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	383,05	7,661	4,151	1,85	1,74
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	1715,5	34,31	17,016	2,02	2,19
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	1188,1	23,762	11,849	2,01	2,14
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	416,81	8,336	4,13	2,02	1,97
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	910,36	18,207	9,184	1,98	1,90
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	816,14	16,323	8,053	2,03	2,10
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	863,25	17,265	8,6185	2,005	2,00
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	331,92	6,638	3,379	1,96	1,92
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	2488,49	49,77	24,389	2,04	2,28
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	1096,31	21,926	10,895	2,01	2,13
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	2209,87	44,197	21,994	2,01	2,03
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	1417,9	28,358	13,684	2,07	2,27
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	1082,98	21,66	10,74	2,02	2,14
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	2022,51	40,45	20,178	2,00	2,12
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	2235,02	44,7	22,69	1,97	1,99
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	1479,07	29,581	14,542	2,03	2,08
<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	2253,88	45,078	21,964	2,05	2,28
<i>Leuconostoc</i>					
<i>Leuconostoc lysis</i> Ly	1228,91	24,578	11,698	2,05	2,32
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	590,05	11,801	5,922	1,99	2,25
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	1309,61	26,192	13,435	1,95	1,69
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	1773,96	35,479	17,264	2,06	2,22
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	2905,77	58,115	28,399	2,05	2,06
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	2039,86	40,797	19,81	2,06	2,38
<i>Lactobacillus</i>					
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	1745,57	34,911	17,127	2,04	2,08
<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	839,17	16,783	8,541	1,96	1,78
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	2256,28	45,126	22,956	1,97	1,95
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	680,54	13,611	6,634	2,05	2,09
<i>Lactobacillus maltoramicus</i> NRLL 148532	552,13	11,043	5,641	1,96	1,64
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	1062,73	21,255	10,621	2,00	2,04

Çizelge 4.1 Laktik Asit Bakterilerinin DNA saflık ve miktar tayini sonuçları (devamı)

<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	1371,65	27,433	13,846	1,98	2,05
<i>Lactobacillus rhamnasus</i> TK2	1622,08	32,442	16,497	1,97	1,77
<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	532,67	10,653	5,553	1,92	2,21
<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL B21	2551,93	51,039	25,054	2,04	2,33
<i>Lactobacillus caseii</i> RSKK 706	1834,66	36,693	18,119	2,03	2,21
<i>Lactobacillus caseii</i> CG1	1174,28	23,486	11,438	2,05	2,20
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK	1582,3	31,646	16,432	1,93	1,69
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC	351,71	7,034	3,475	2,02	2,06
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	1904,32	38,086	19,316	1,97	1,73
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	1241,56	24,831	12,331	2,01	2,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	1370,13	27,403	13,68	2,00	2,07
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	1945,61	38,912	19,623	1,98	2,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	446,28	8,926	4,545	1,96	2,00
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	2824,04	56,481	28,266	2,00	2,14
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	1900,93	38,019	19,033	2,00	2,18
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	1208,3	24,166	12,002	2,01	1,83
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	1658,63	33,173	16,752	1,98	1,92
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	1449,19	28,984	15,711	1,84	1,61
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	1589,57	31,791	16,084	1,98	1,91
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	698,82	13,976	7,277	1,92	1,59
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	1144,19	22,883	11,680	1,95	1,75
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	1473,85	29,477	14,687	2,01	2,18
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	1779,14	35,583	17,592	2,02	2,10
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	591,82	11,836	6,114	1,94	1,80

4.2 Kromozomal DNA nın Agaroz Jel Elektroforezi

Promega Wizard DNA izolasyon kit kullanımı ile beş farklı cinsten seçilmiş birer suştan izole edilen ve elektroforezi % 1 agaroz içeren 0.02 µl/ml EtBr eklenmiş jellerde yapılan kromozomal DNA moleküllerine ait agaroz jel görüntüsü (Şekil 4.1). Çalışmada kullanılacak tüm suşlarda yaklaşık 10 kb büyüklüğünde kromozomal DNA görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.1 Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinslerden seçilmiş birer suşa ait kromozomal DNA görüntüsü. M: Supercoiled DNA ladder (bp), 1: *E. faecalis* OZ1, 2: *P. acidilactici cereviciae* ATCC 666, 3: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*; 4: *Lc. lactis* OZ1, 5: *Lb. plantarum* DSM 20174

4.3 ARDRA Uygulamaları

4.3.1 PCR amplifikasyonu:

İzole edilen genomik DNA'lar, evrensel 16S primerlerin (*E.coli* 16S rDNA'sında sırasıyla 50-70 ve 1492-1508 pozisyonlarına karşılık gelen ve Gram-pozitif ve benzer bakterileri hedef alan **pB** 5'd TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG 3' ve **1492R** 5'd TAC CTT GTT ACG ACT T 3' primer çifti) kullanımı ile PCR işlemine tabii tutulmuştur. PCR reaksiyonu ön denemeler sonucu belirlenen en uygun amplifikasyon içeriklerine sahip toplam 50 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir.

PCR çalışmasında kullanılan protokol her biri kendi içinde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından meydana gelen toplam 35 döngüden oluşmaktadır. Son olarak 72°C de 10 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır. Karışım 4°C ye getirildikten sonra elektroforez işlemi gerçekleştirilene kadar -20°C de bekletilmiştir.

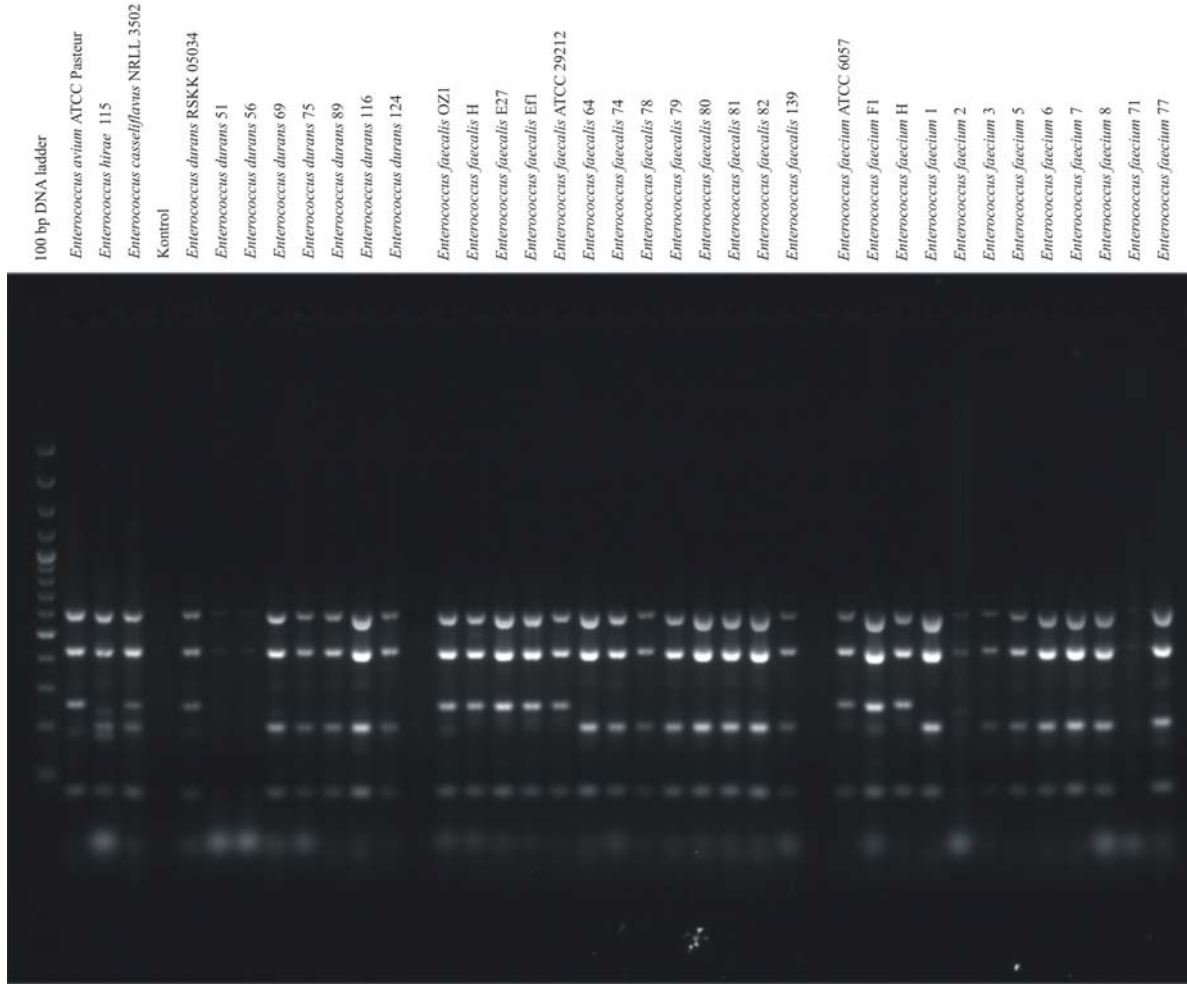
1458 bç'lik 16S-PCR DNA ürünleri daha sonra 0.02 µl/ml EtBr içeren % 1.5'lik agaroz jellerde her bir primer için eşit süre zarfında yürütüldükten sonra KODAK jel görüntüleme cihazında jellerin görüntüsü alınmış ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinslerden seçilmiş birer suşa ait amplifiye edilen 16S rDNA bölgesinin jel görüntüsü (Şekil 4.2). Çalışmamızda kullanılan tüm suşlarda beklenen PCR ürünü büyüklüğüne karşılık gelen yaklaşık 1500 bp büyüklüğündeki bant elde edilmiştir



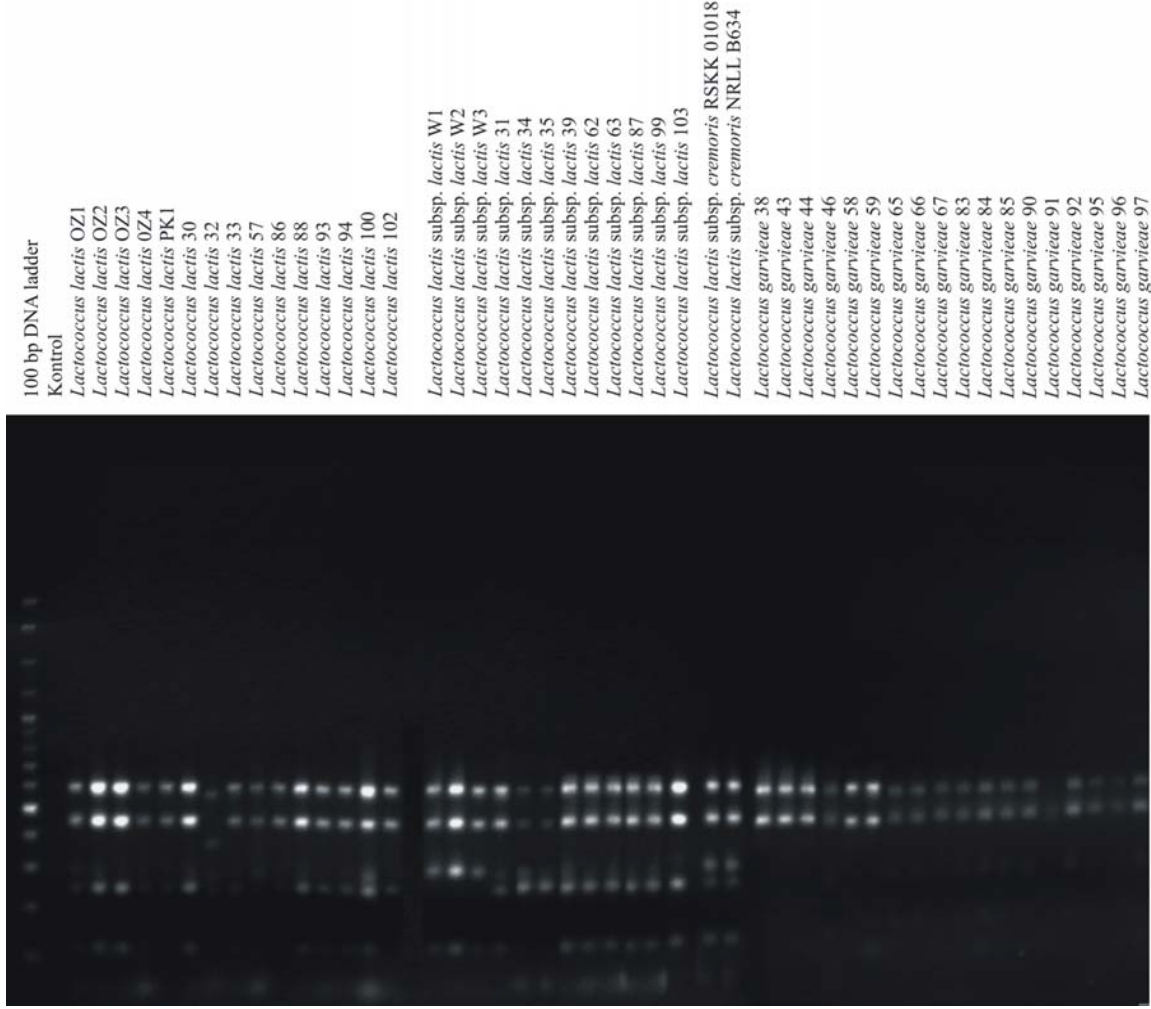
Şekil 4.2 Çalışmamızda kullanılan beş farklı cinslerden seçilmiş birer suşa ait amplifiye edilen 16S rDNA bölgesinin jel görüntüsü M: 100bp plus DNA ladder (bp), 1: *E. faecalis* OZ1, 2: *P. acidilactici cereviciae* ATCC 666,3: *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*; 4: *Lc. lactis* OZ1, 5: *Lb. plantarum* DSM 20174

4.3.2 Uygun restriksiyon enzimleriyle kesim

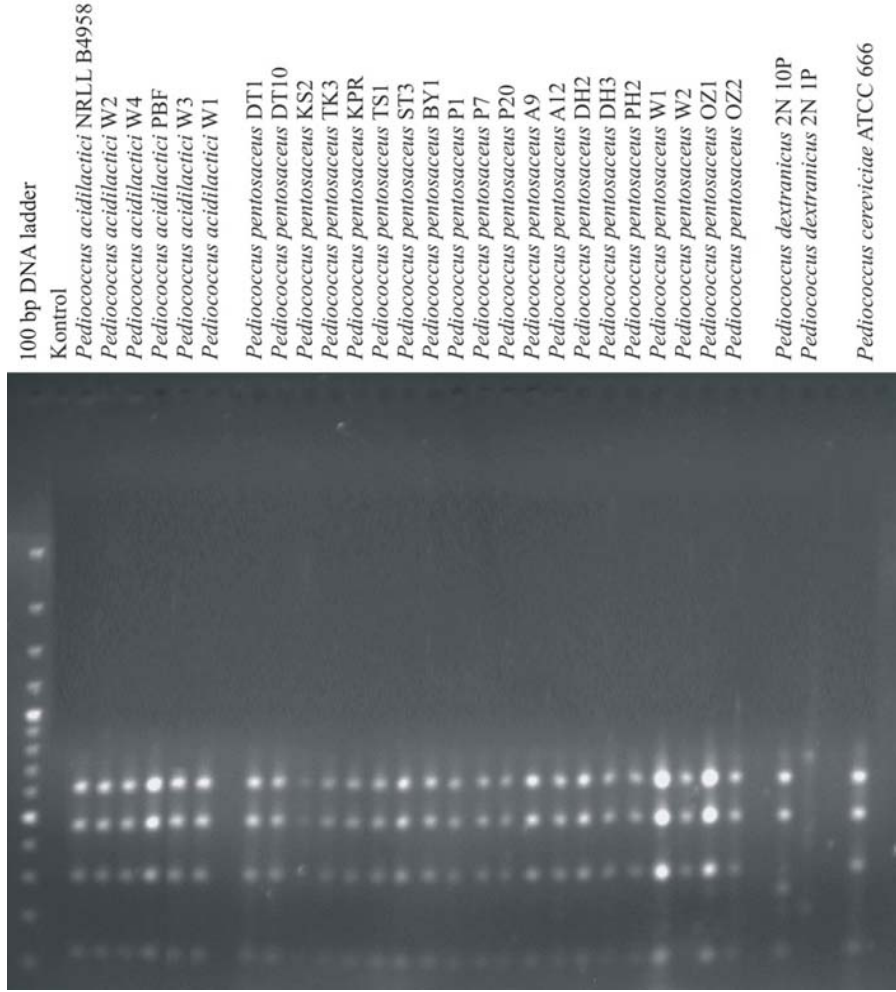
16S-PCR DNA ürünlerinin kesim işlemi ön denemeler sonucu belirlenen en uygun restriksiyon enzimleri ile (*HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *MspI*, *PaeI*, *PstI*, *TaqI*) toplam 20 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Kesim ürünleri 0.02 µl/ml EtBr içeren % 1.5'lik agaroz jellerde her bir primer için eşit süre zarfında yürütüldükten sonra KODAK jel görüntüleme cihazında jellerin görüntüsü alınmış ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Şekil 4.3 - 4.37).



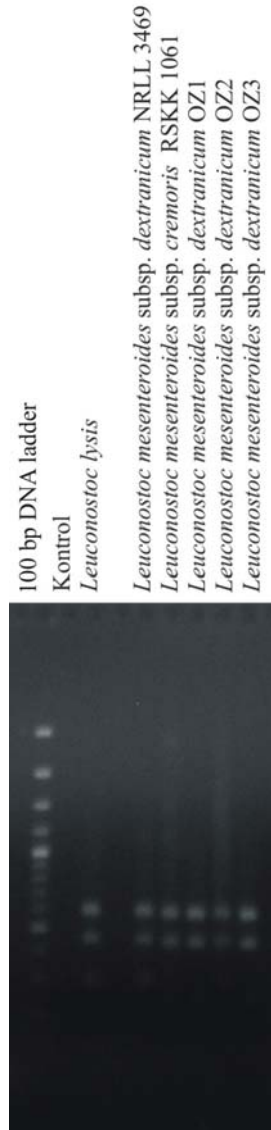
Şekil 4.3 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hae*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



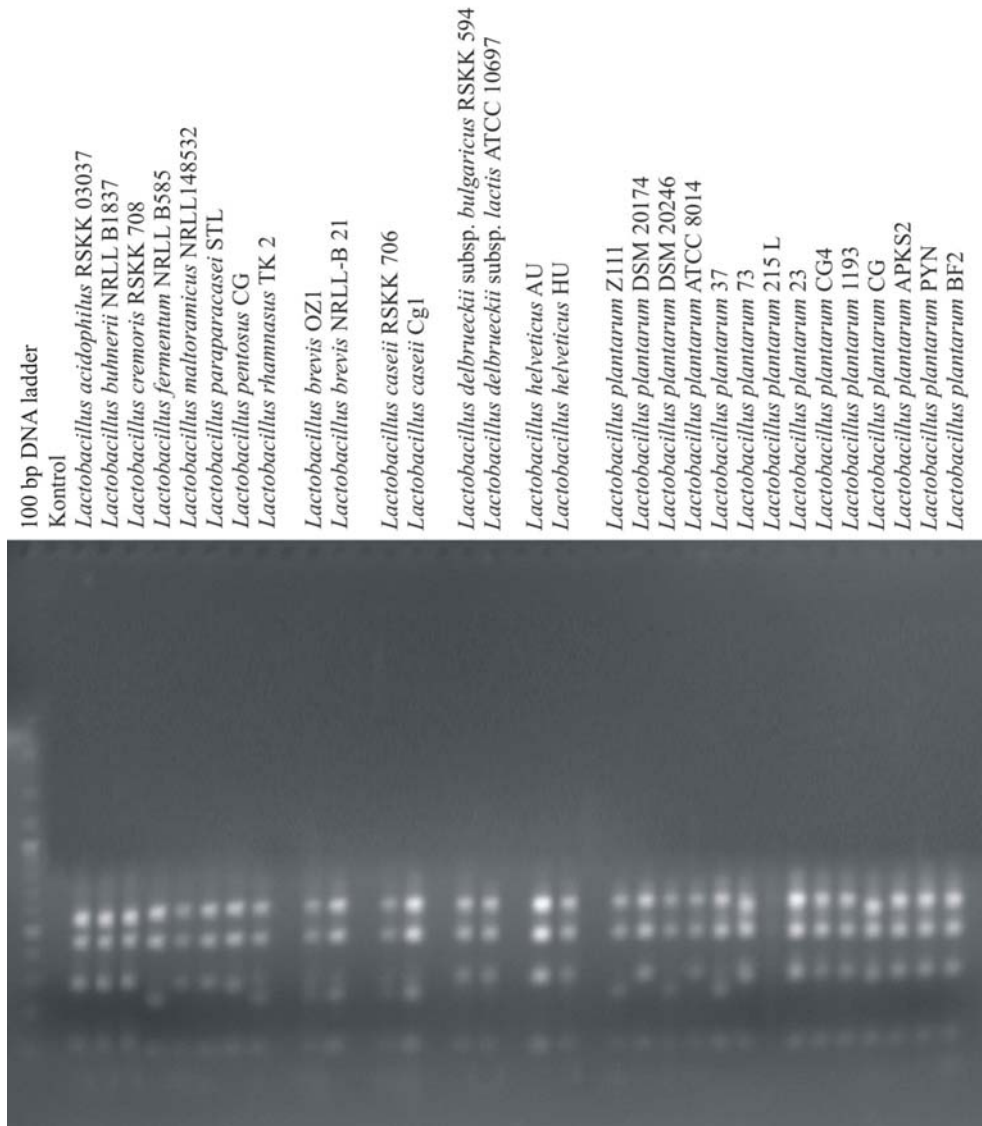
Şekil 4.4 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hae*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



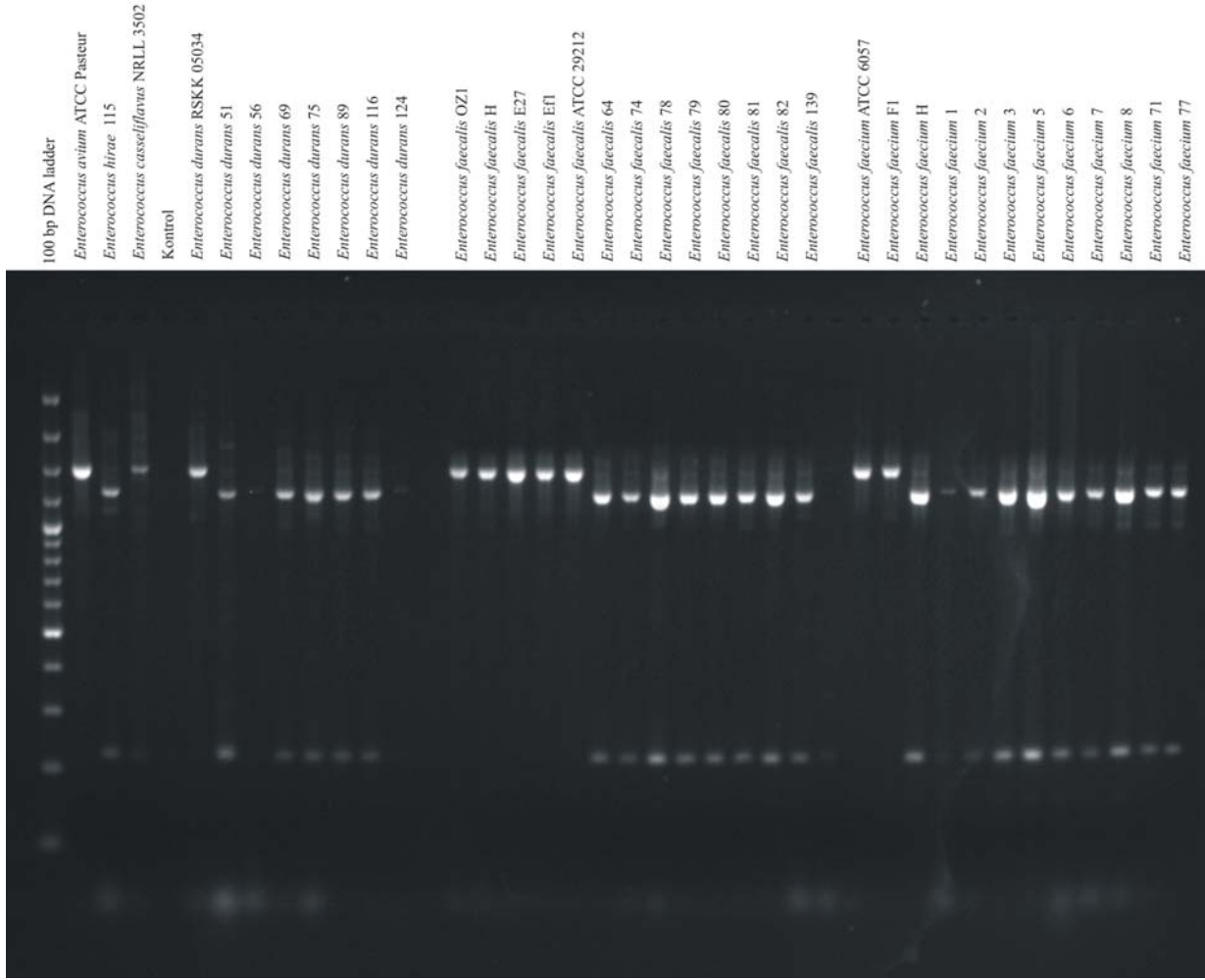
Şekil 4.5 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hae*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların %1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



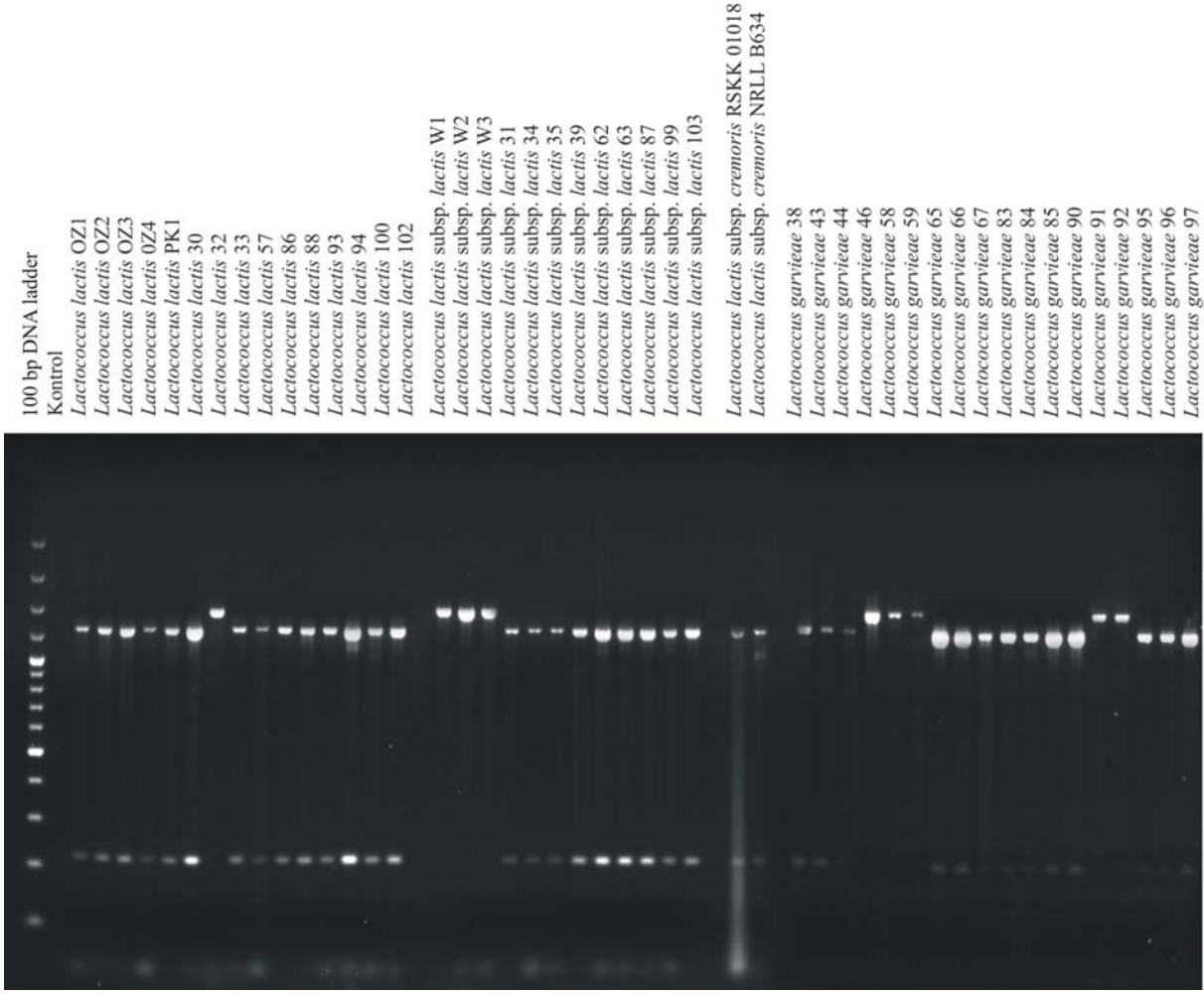
Şekil 4.6 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hae*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



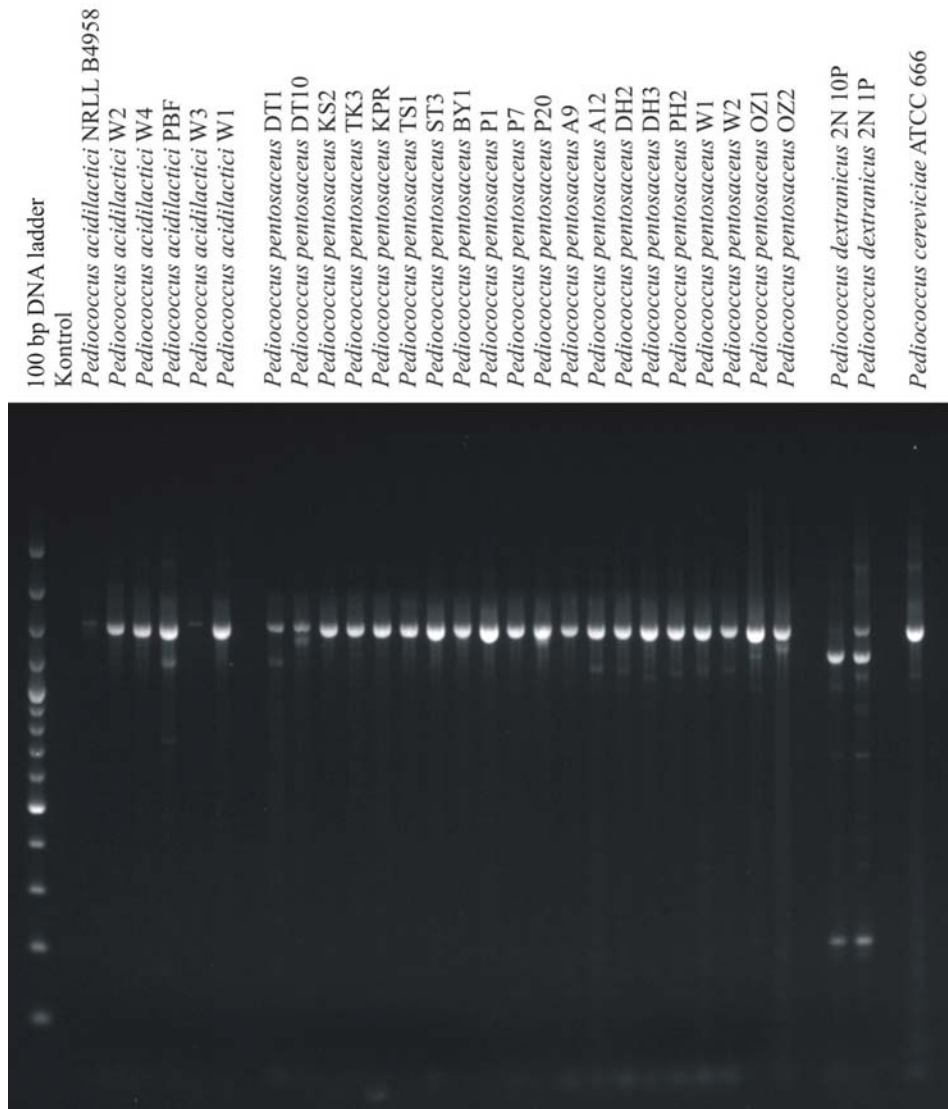
Şekil 4.7 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hae*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



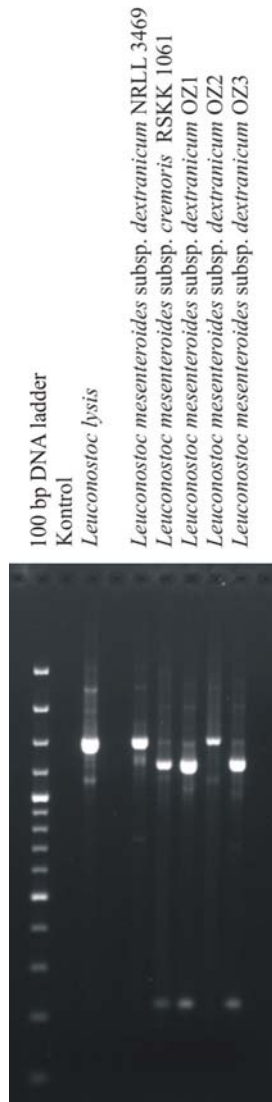
Şekil 4.8 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hind*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



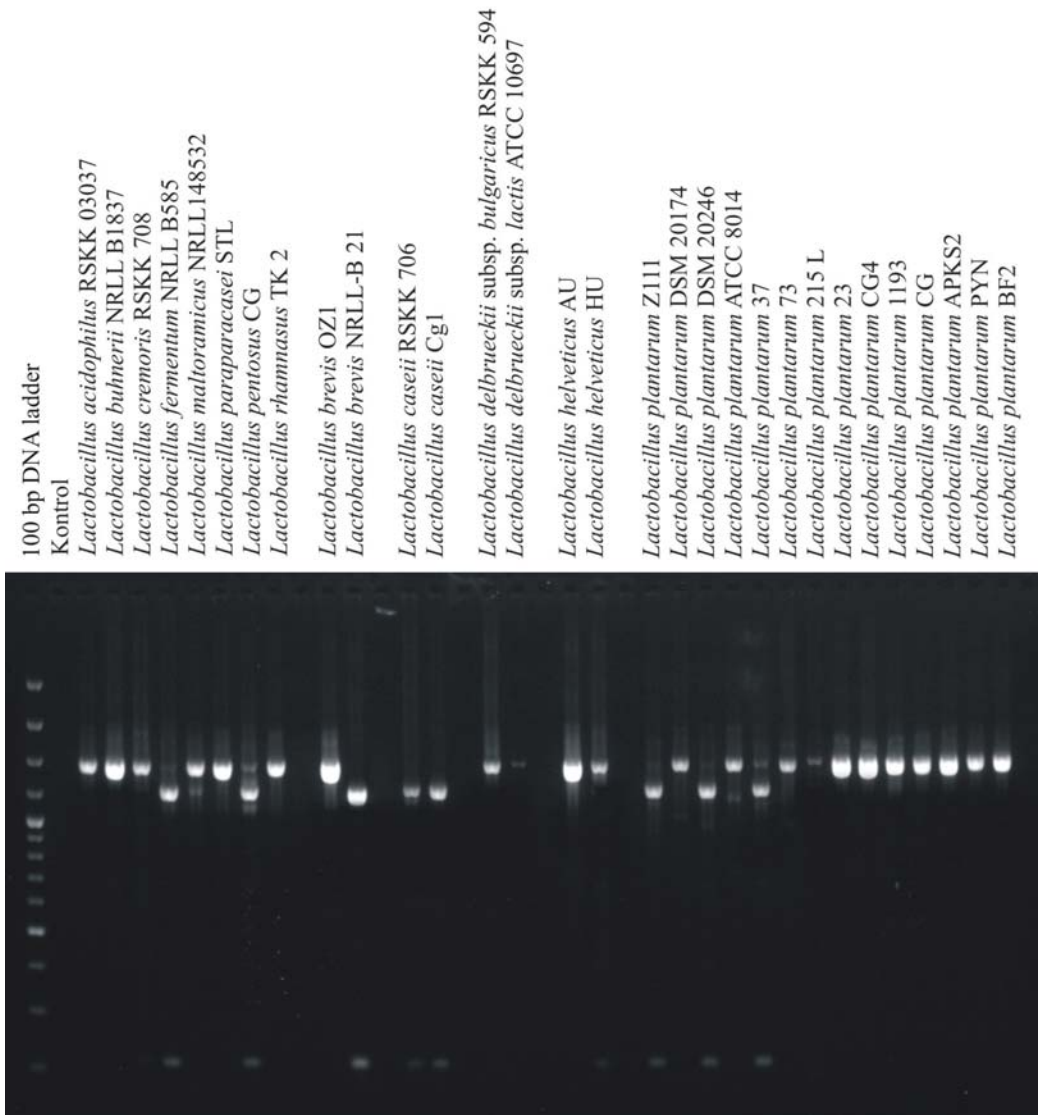
Şekil 4.9 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hind* III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



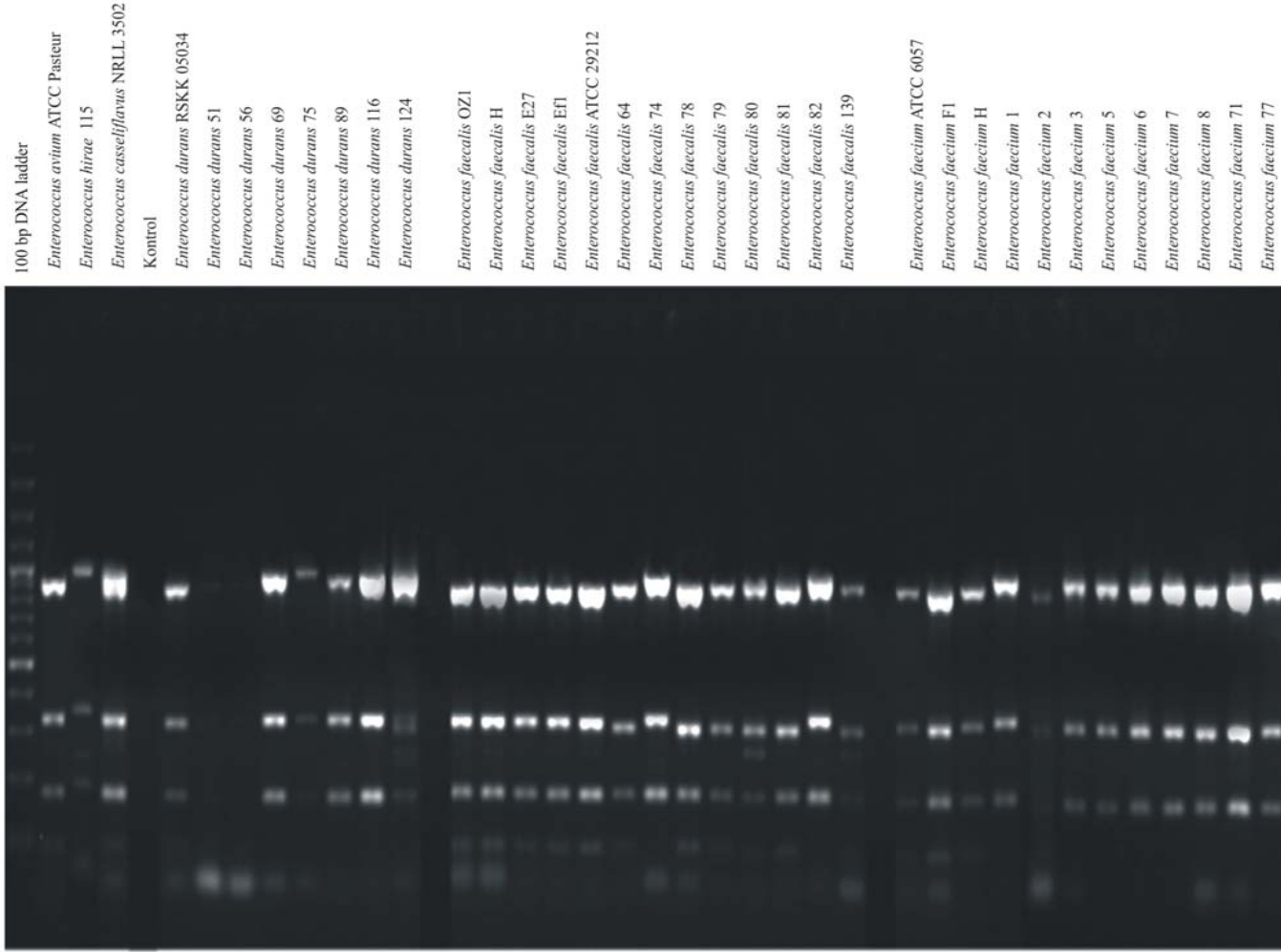
Şekil 4.10 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hind*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



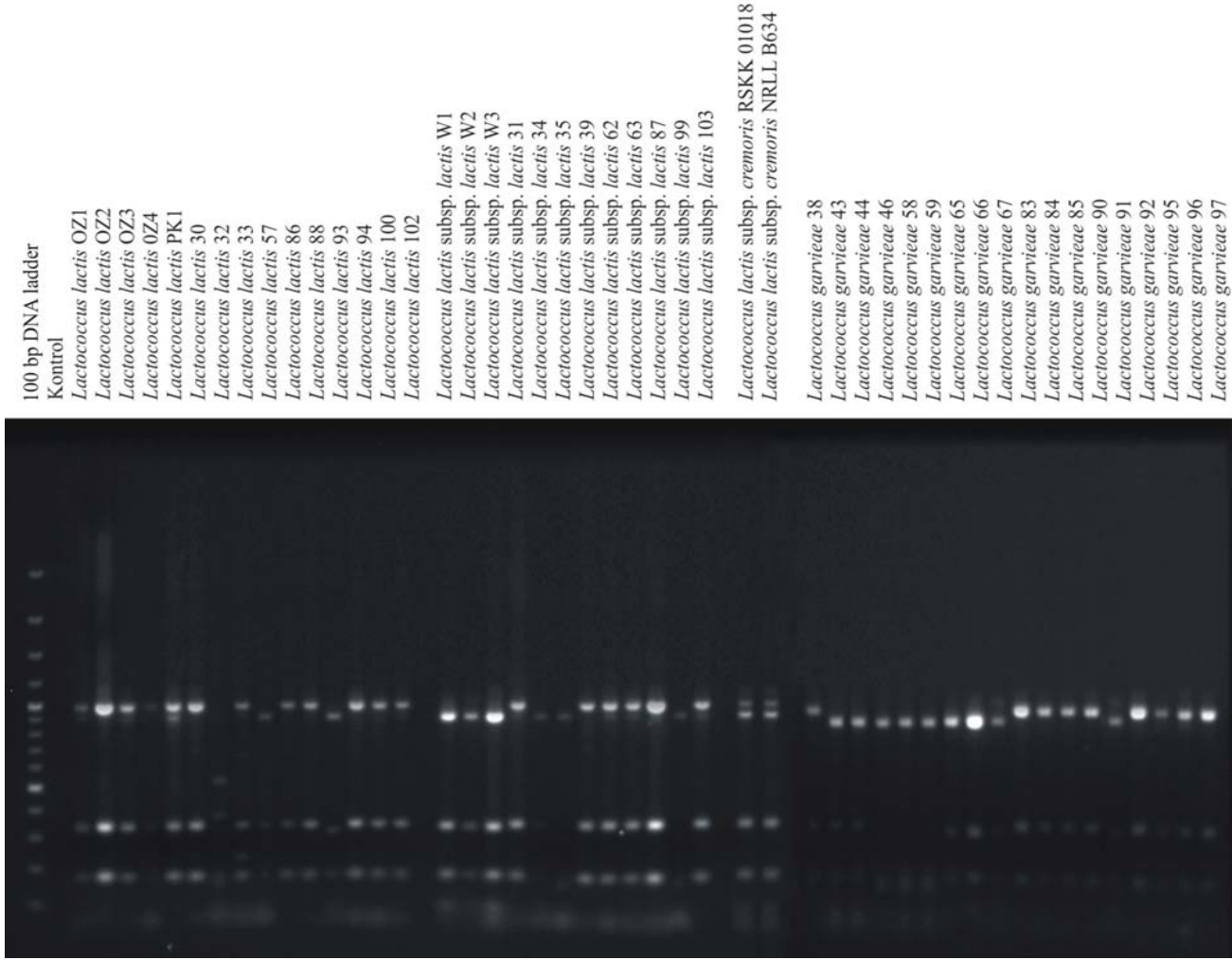
Şekil 4.11 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hind*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



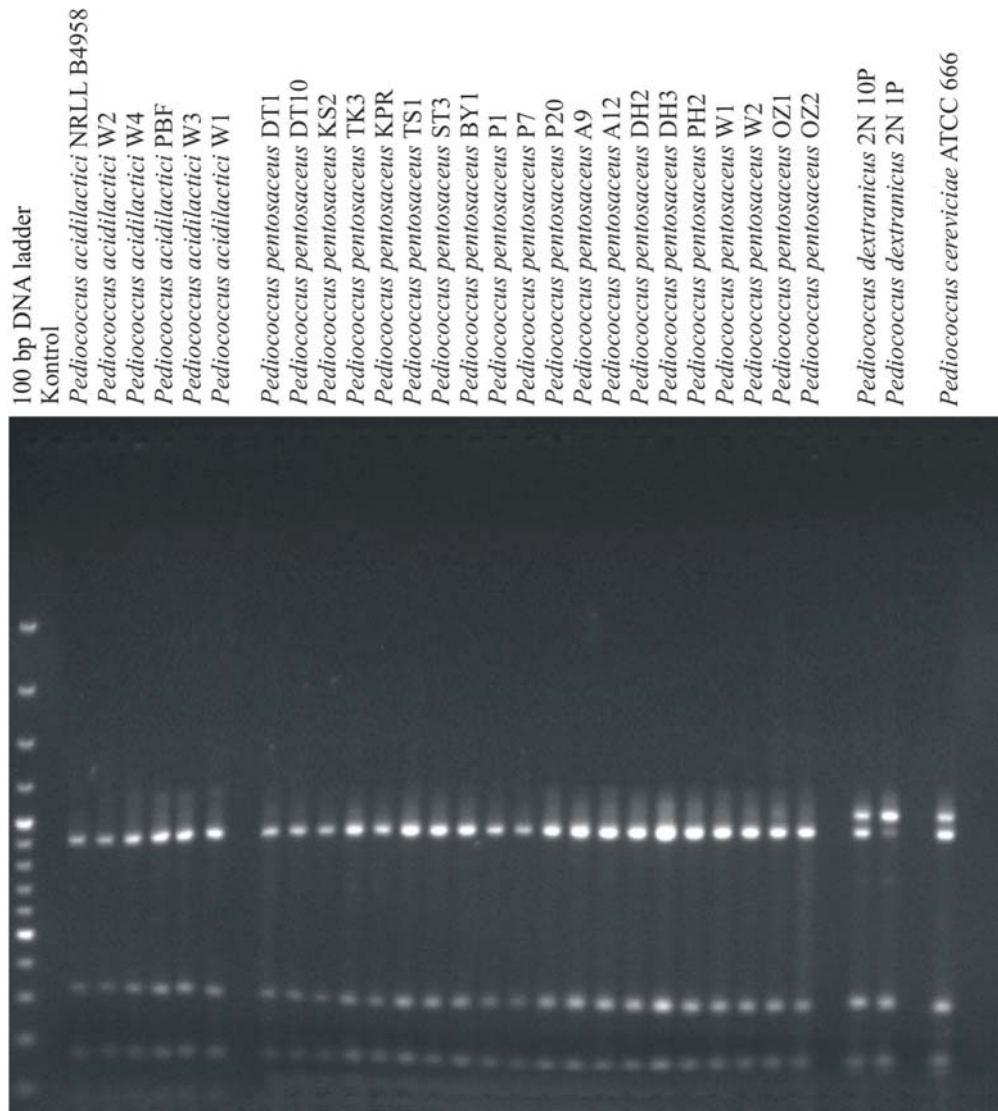
Şekil 4.12 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hind*III enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların %1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



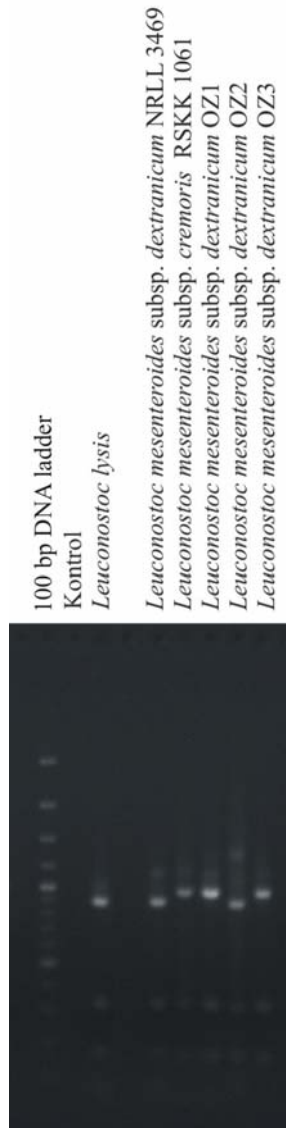
Şekil 4.13 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hinf*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



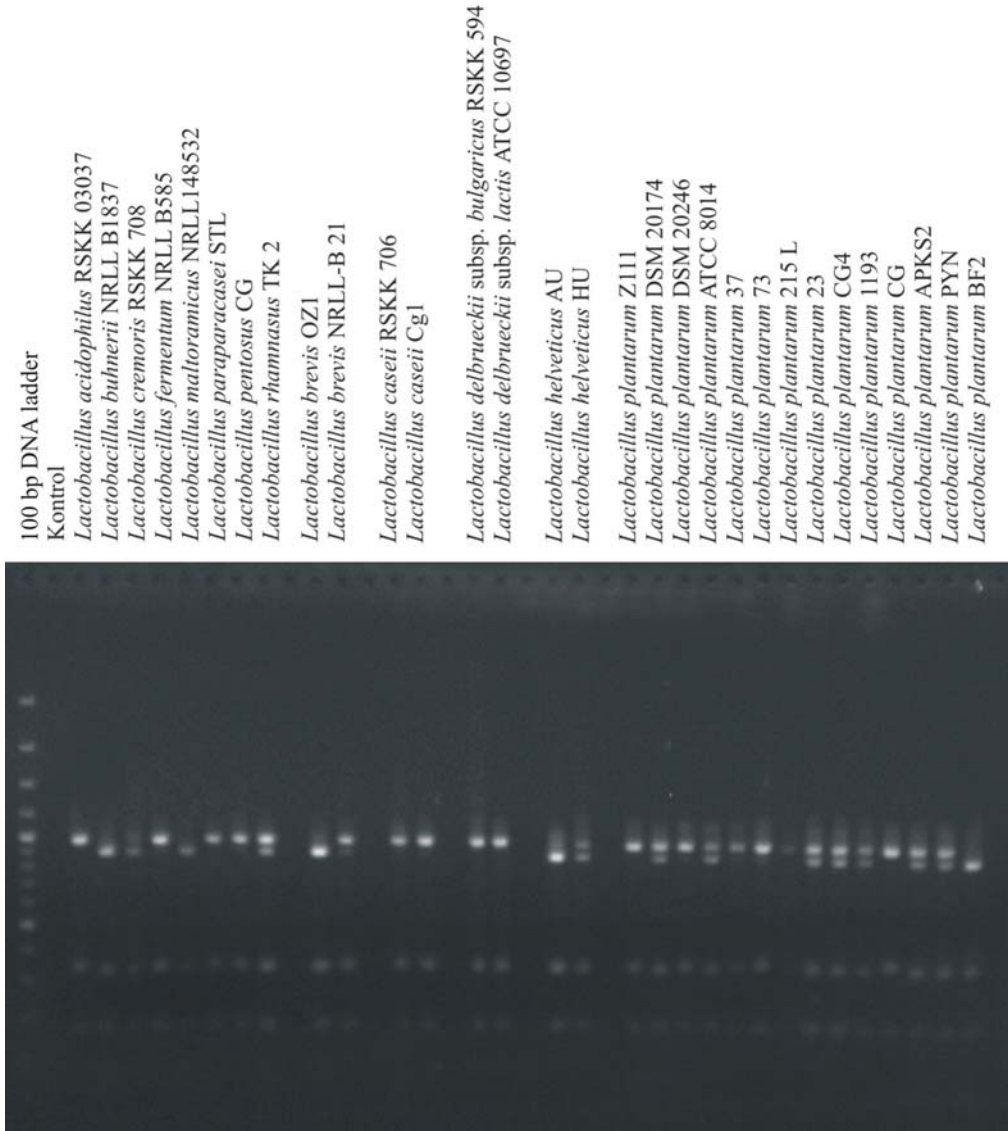
Şekil 4.14 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hinf*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



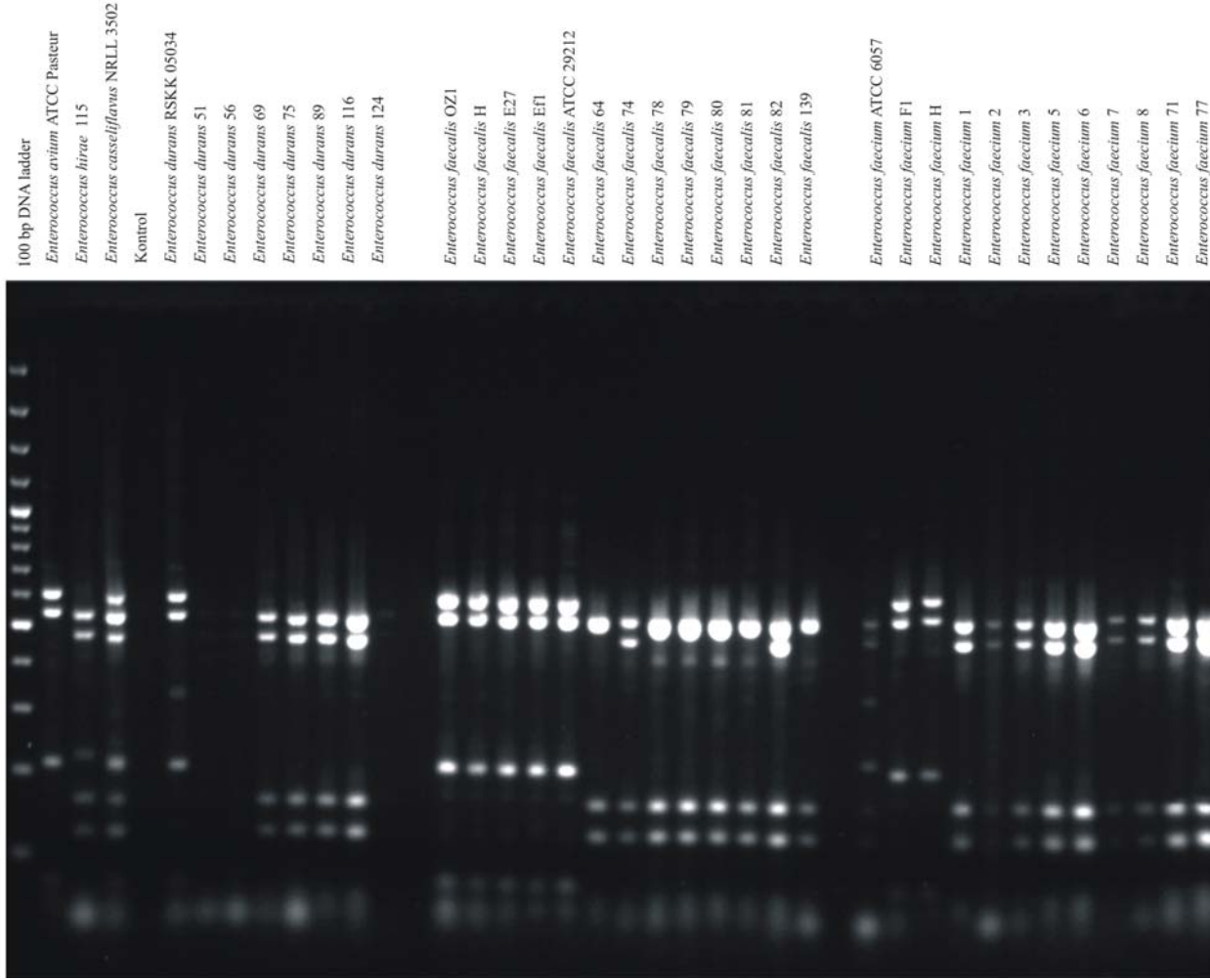
Şekil 4.15 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hinf*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



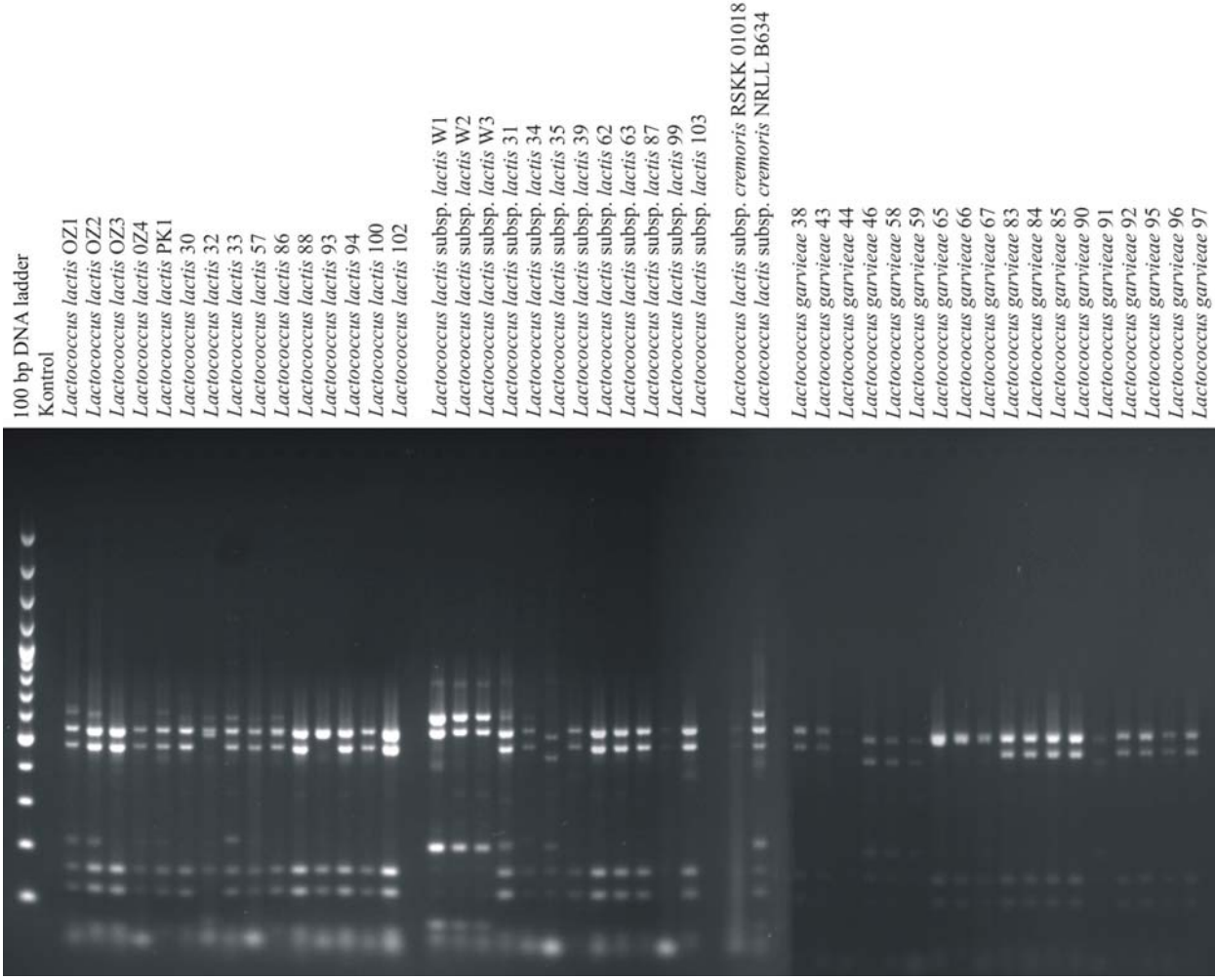
Şekil 4.16 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hinf*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



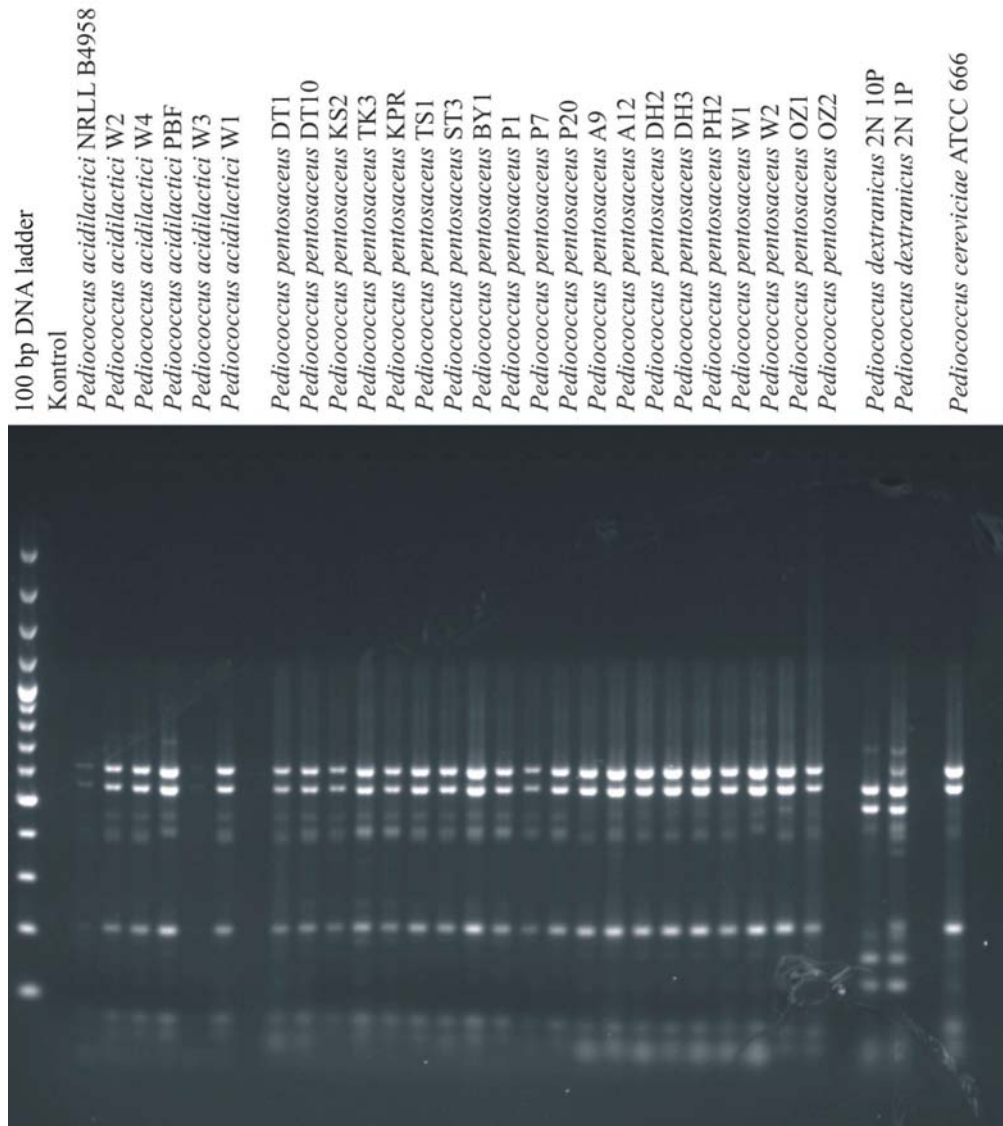
Şekil 4.17 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Hin*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Şekil 4.18 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *MspI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



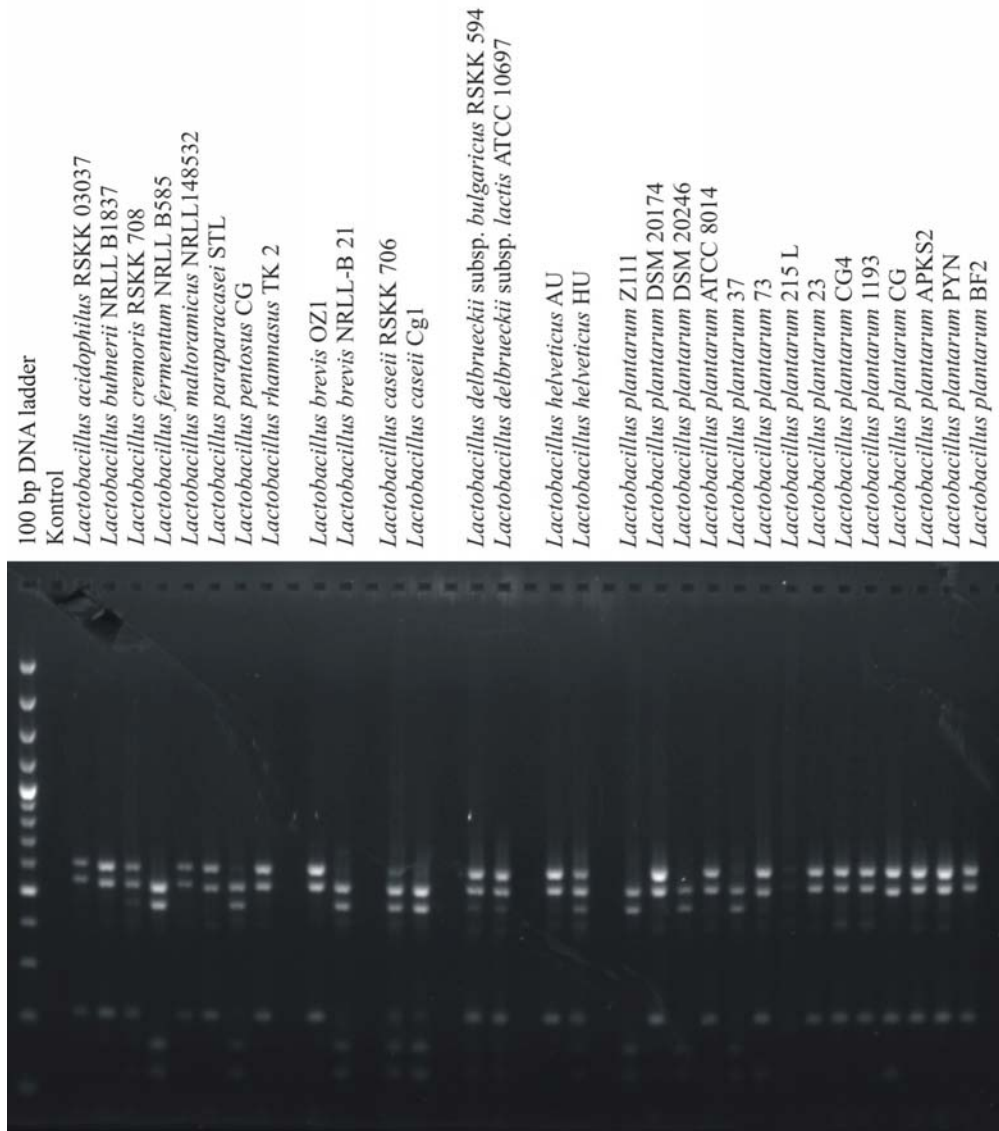
Şekil 4.19 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *MspI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



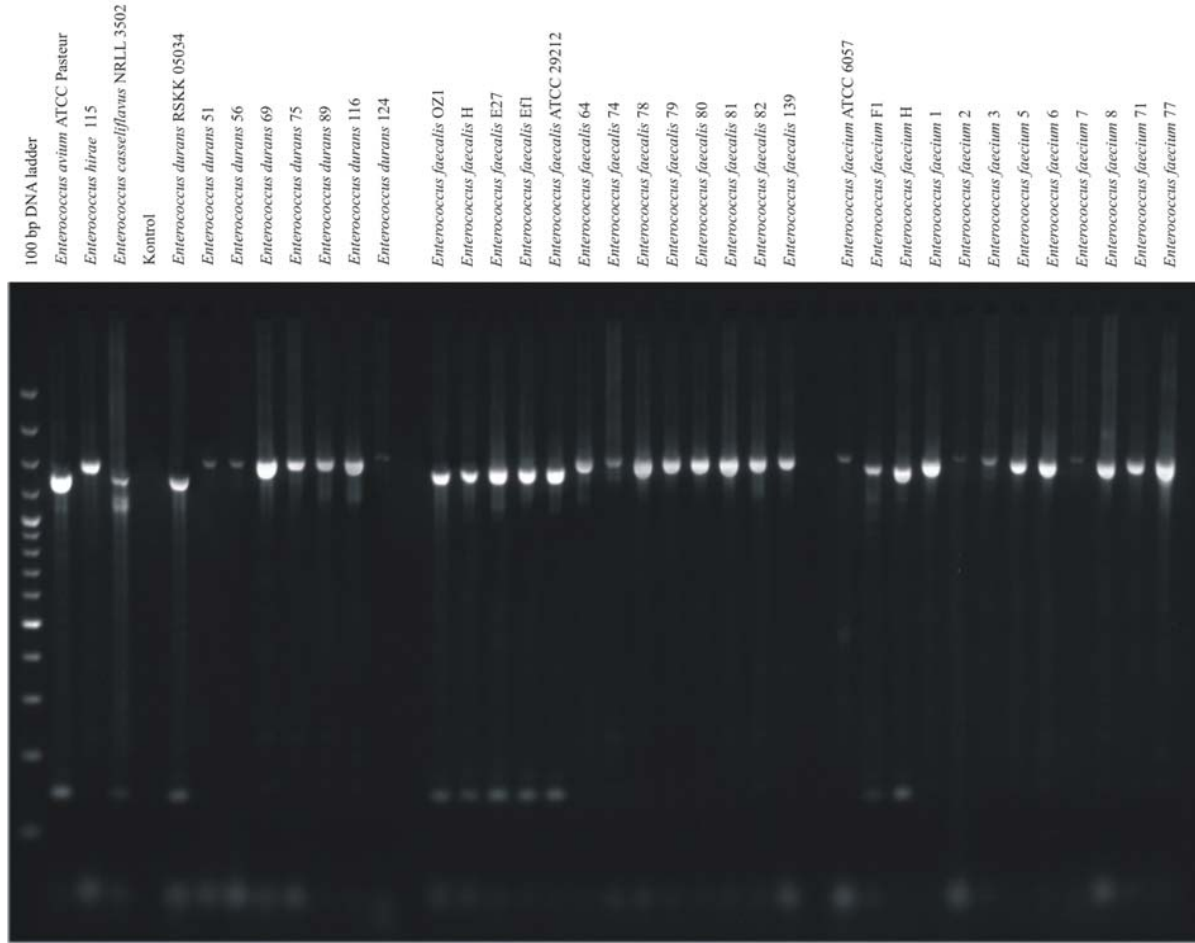
Şekil 4.20 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *MspI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



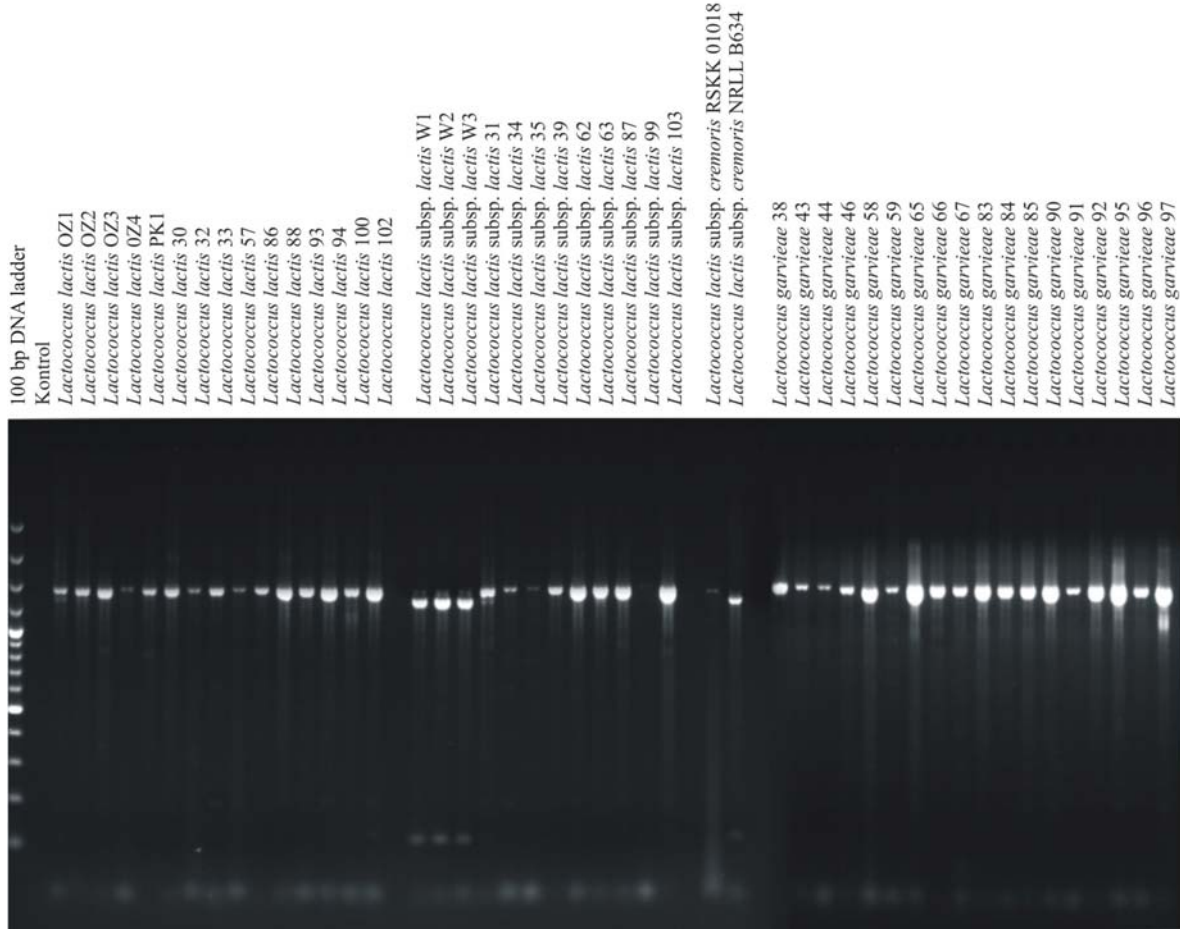
Şekil 4.21 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Msp*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



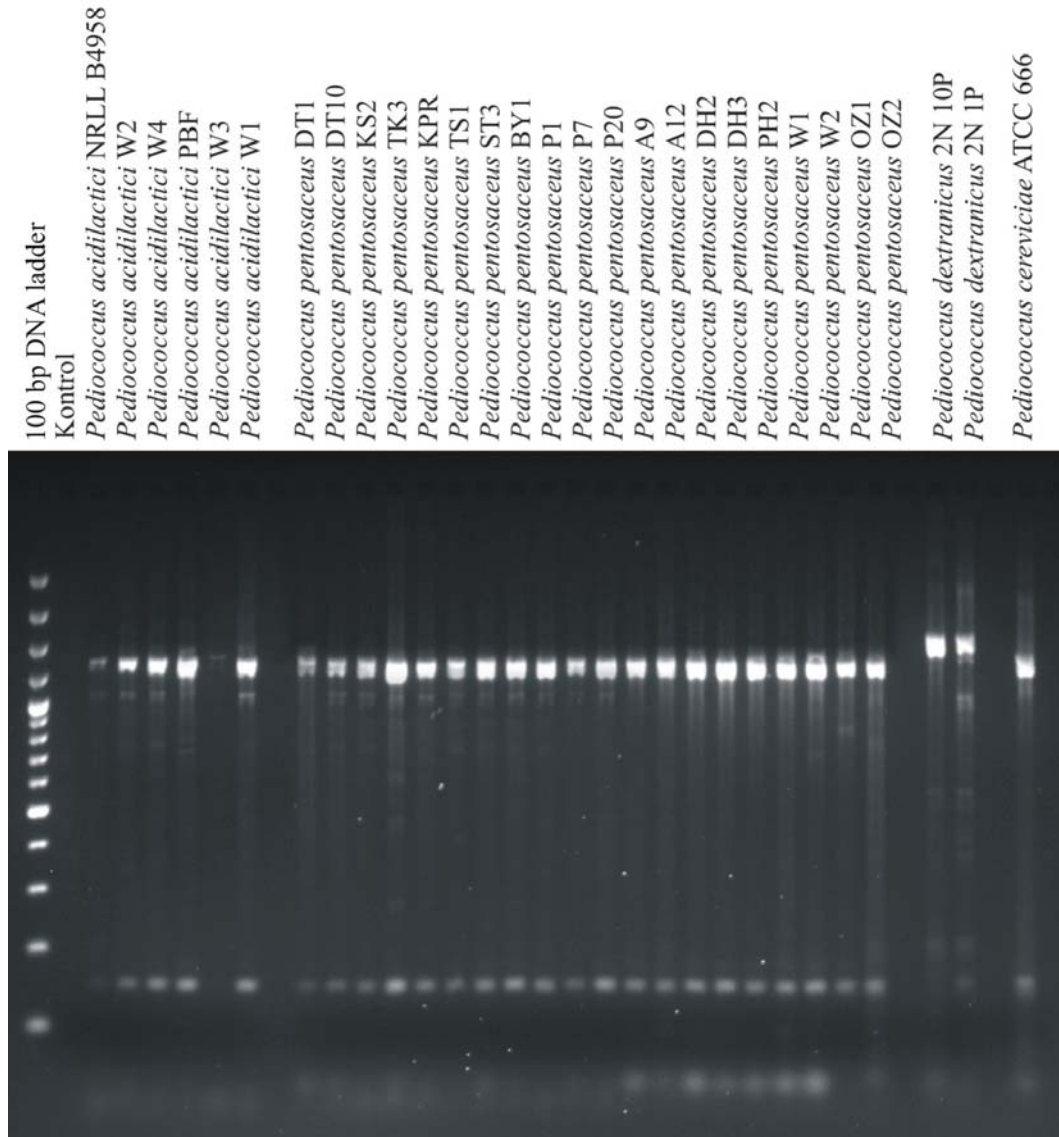
Şekil 4.22 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *MspI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların %1.5 agaroz jel üzerindeki



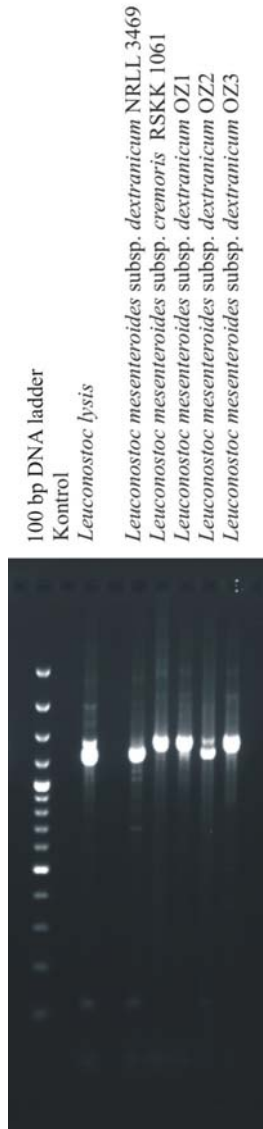
Şekil 4.23 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



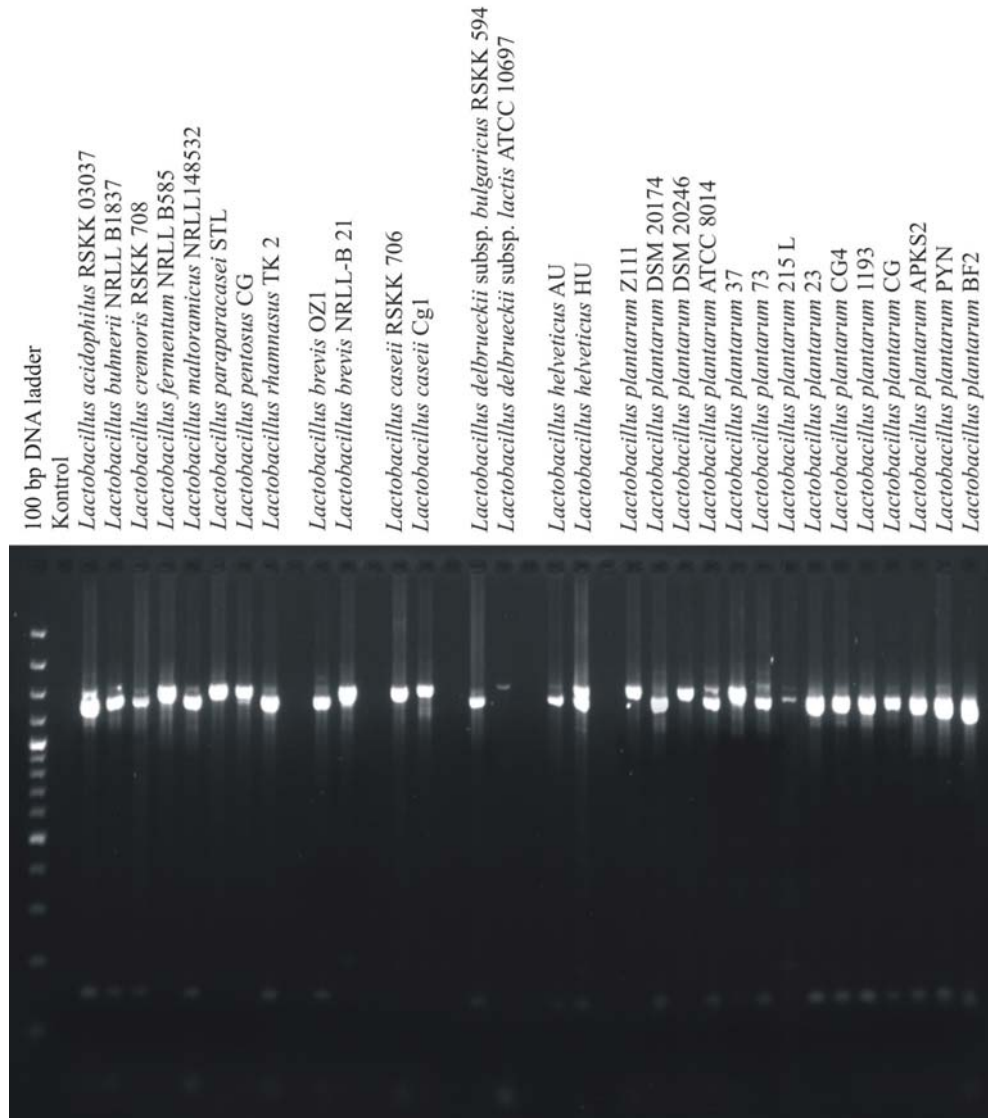
Şekil 4.24 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



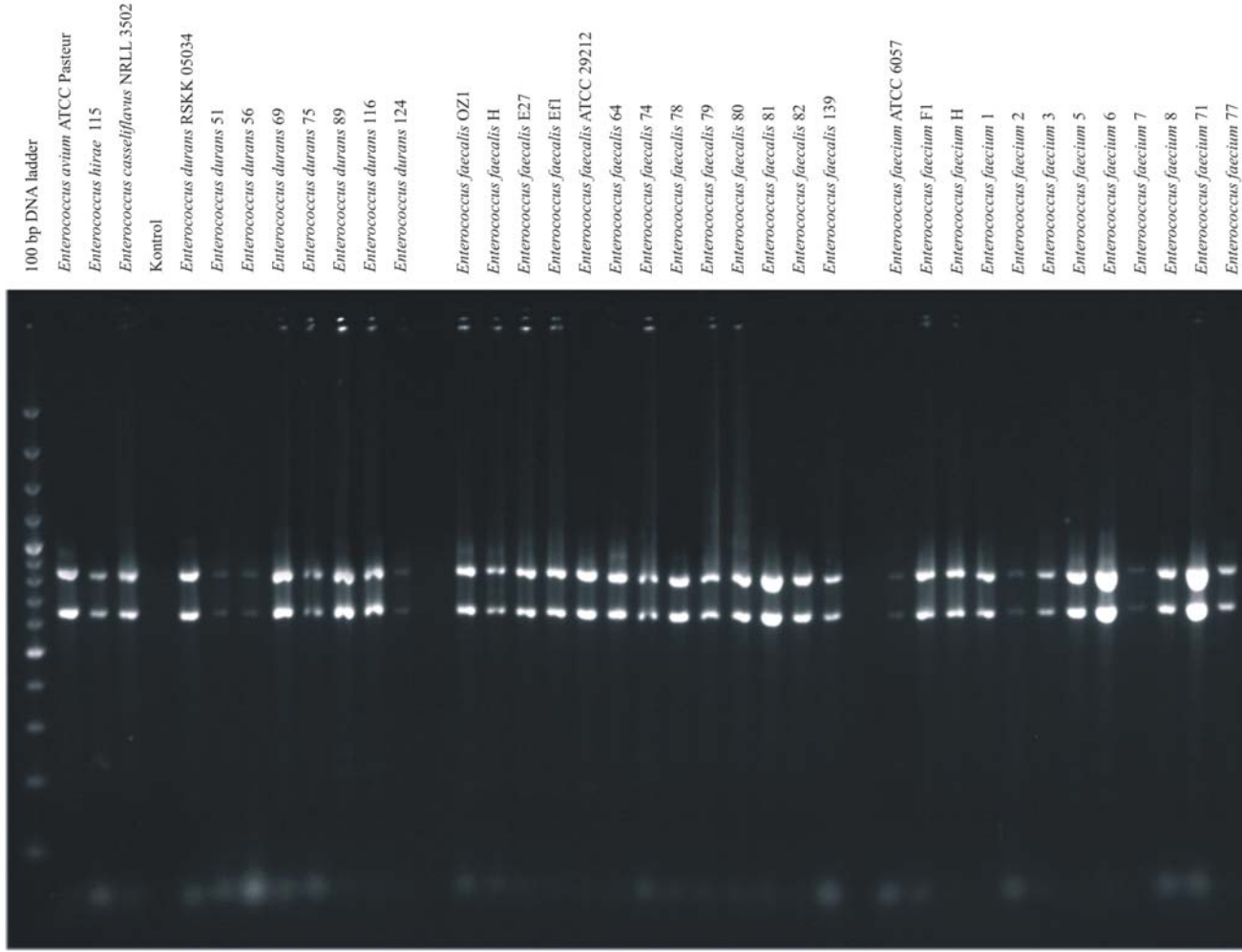
Şekil 4.25 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



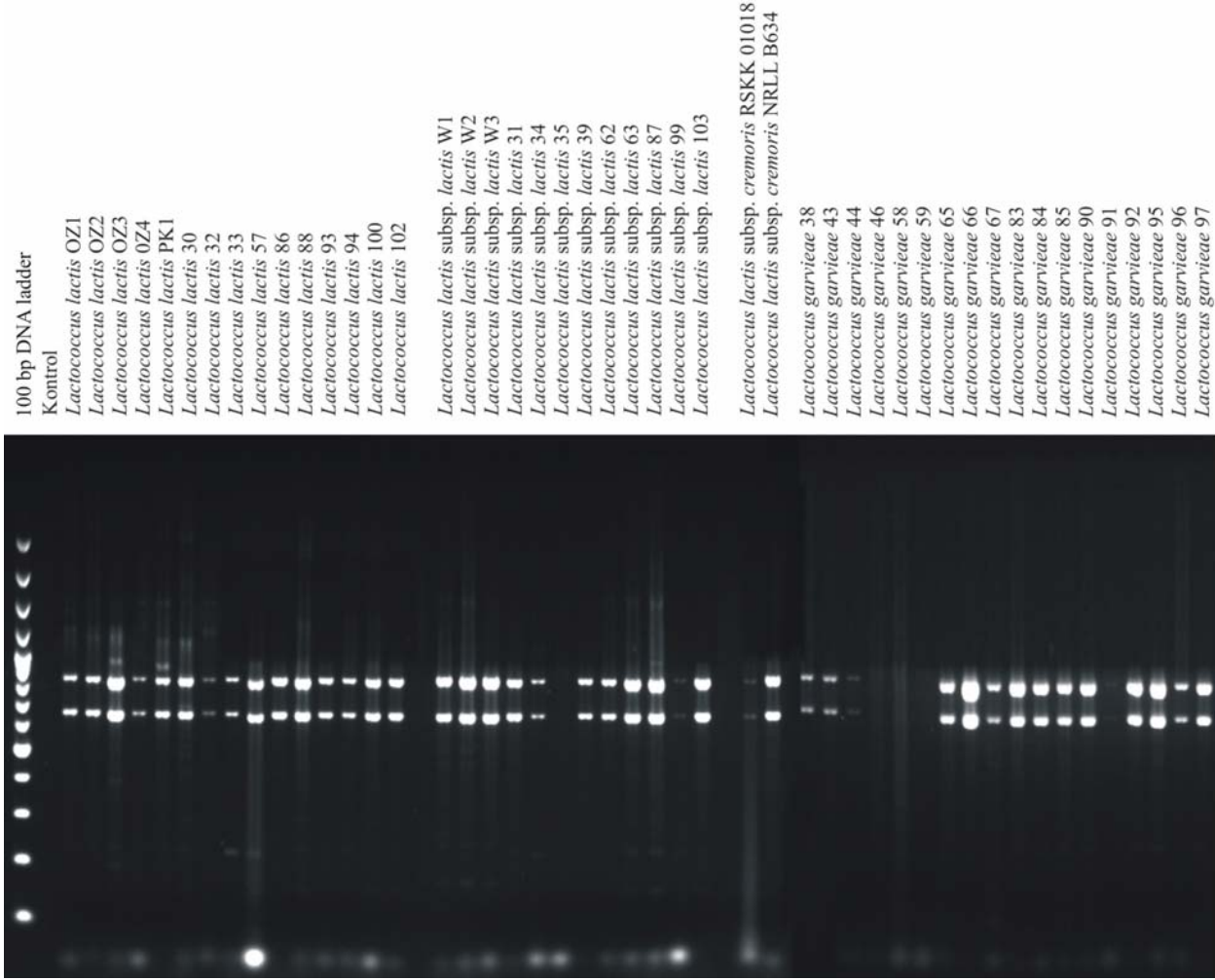
Şekil 4.26 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



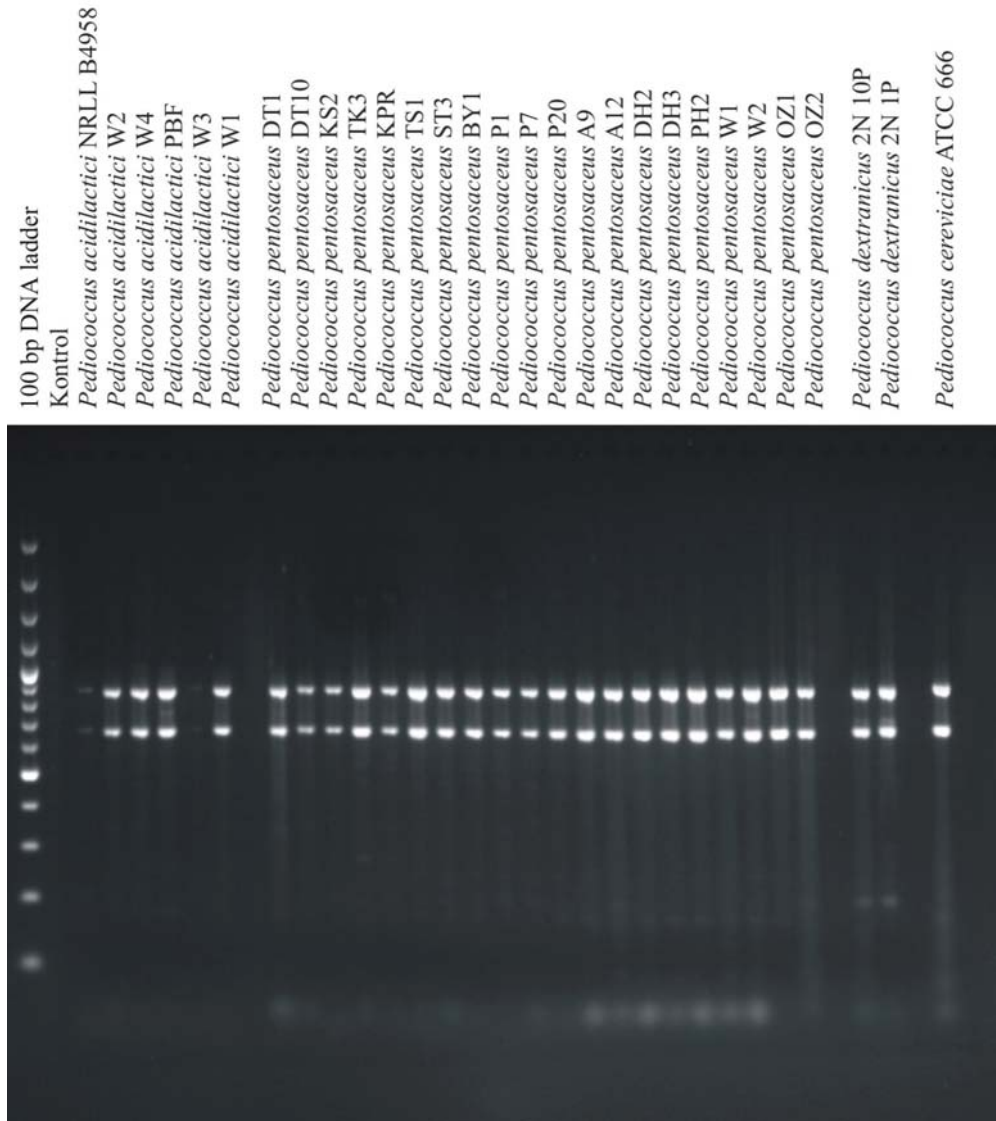
Şekil 4.27 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *PaeI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



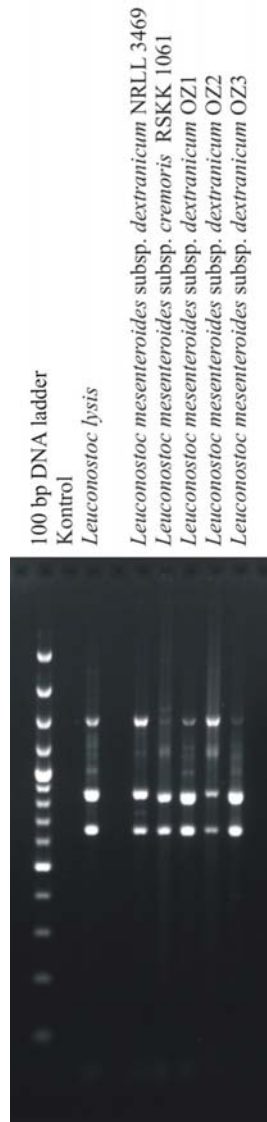
Şekil 4.28 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Pst*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



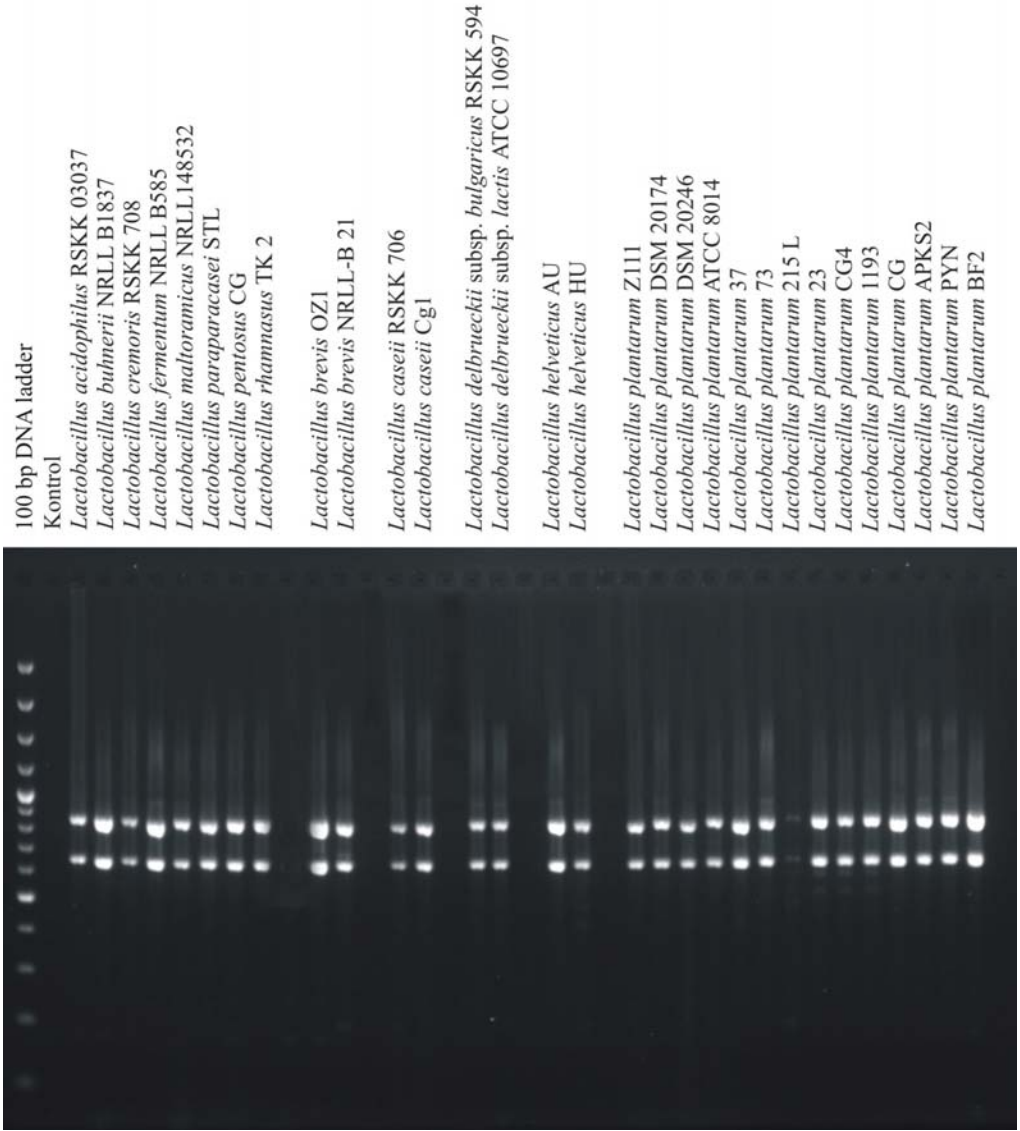
Şekil 4.29 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Pst*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



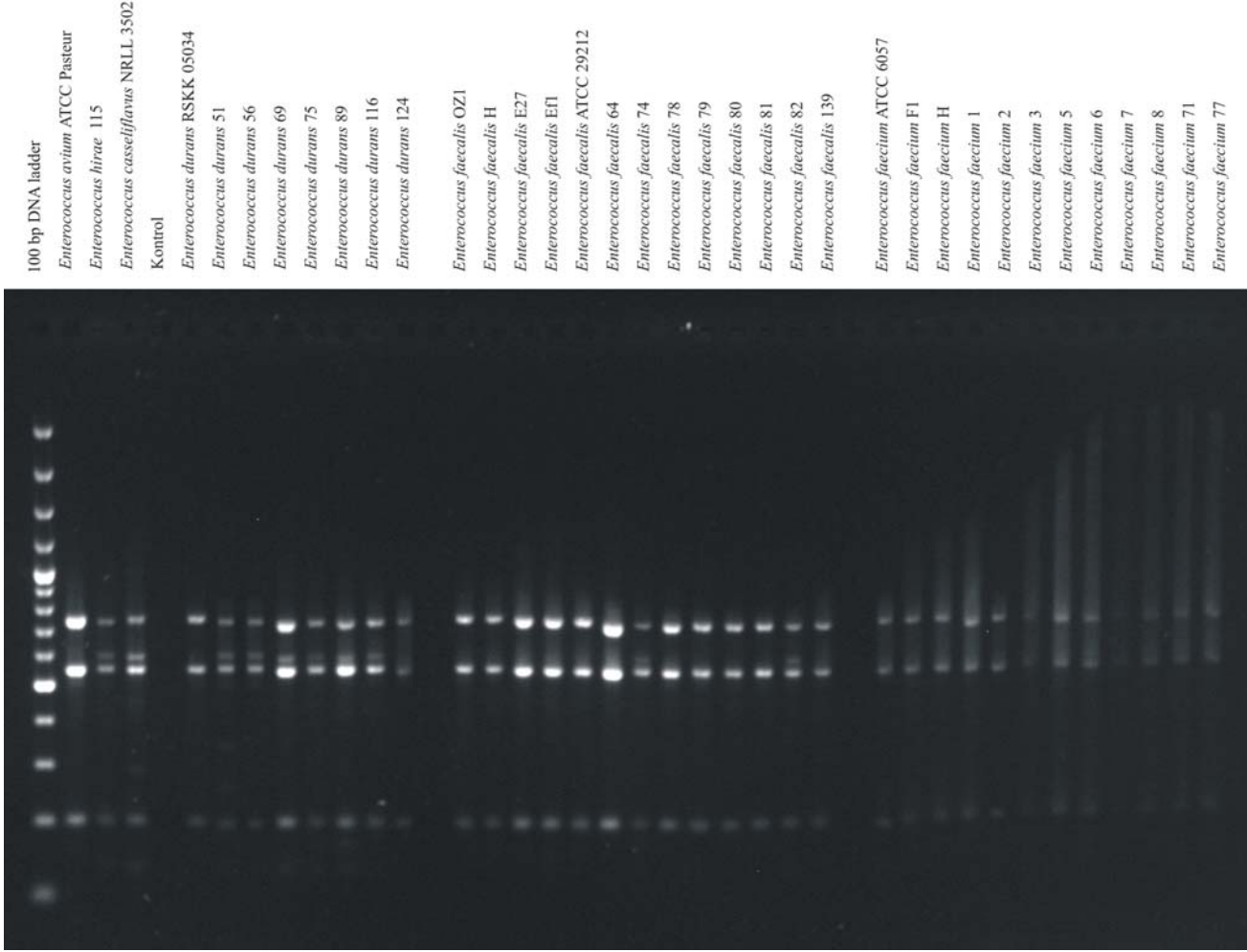
Şekil 4.30 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Pst*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



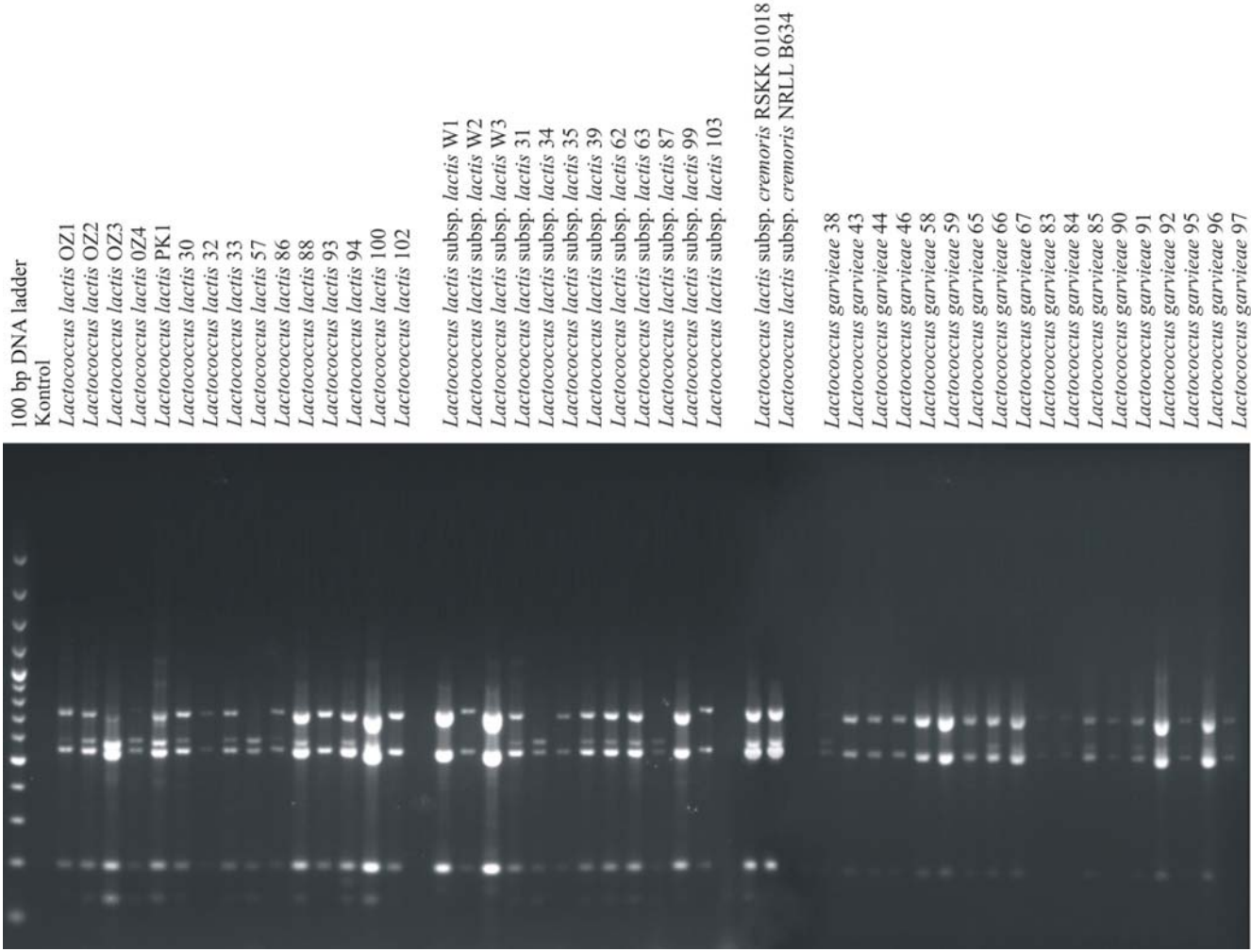
Şekil 4.31 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Pst*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



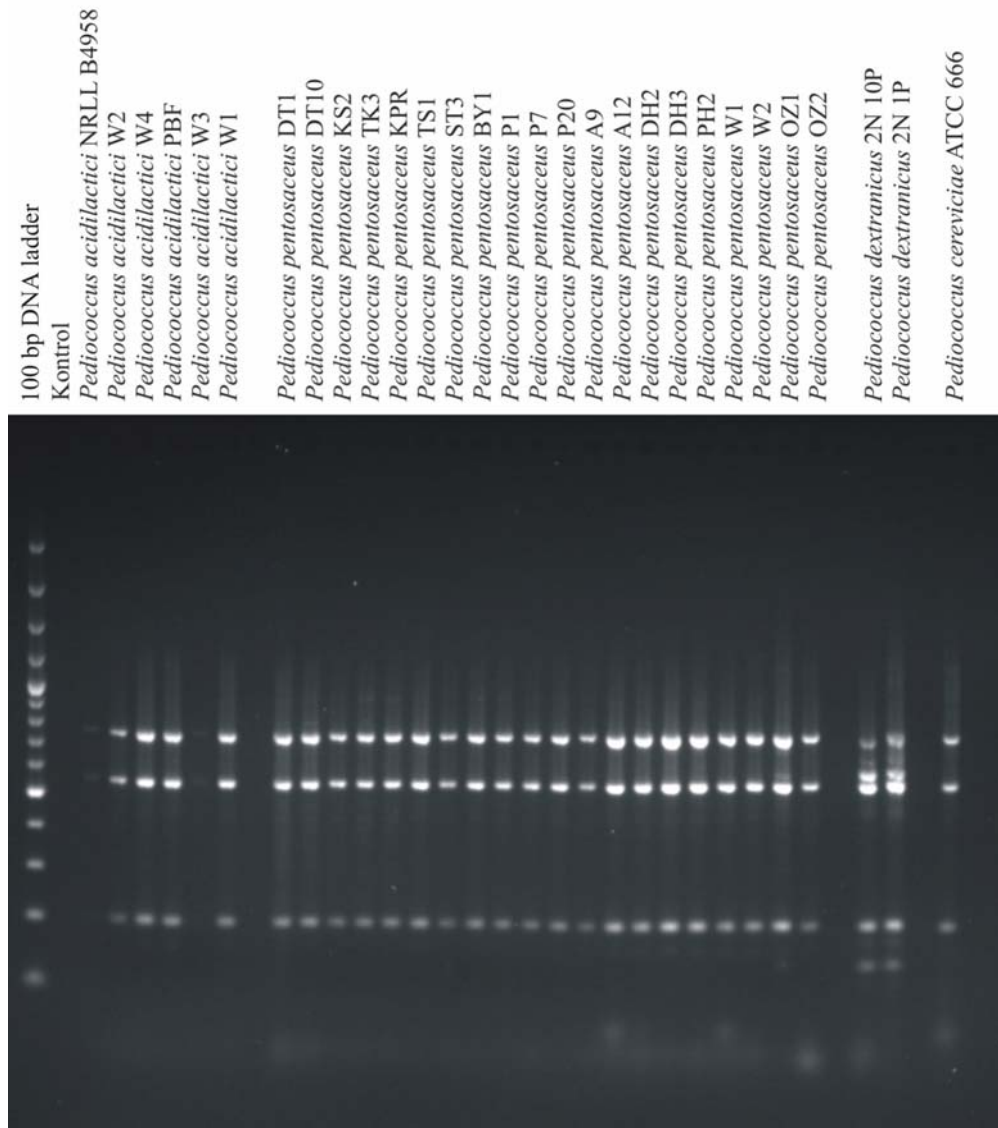
Şekil 4.32 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *Pst*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



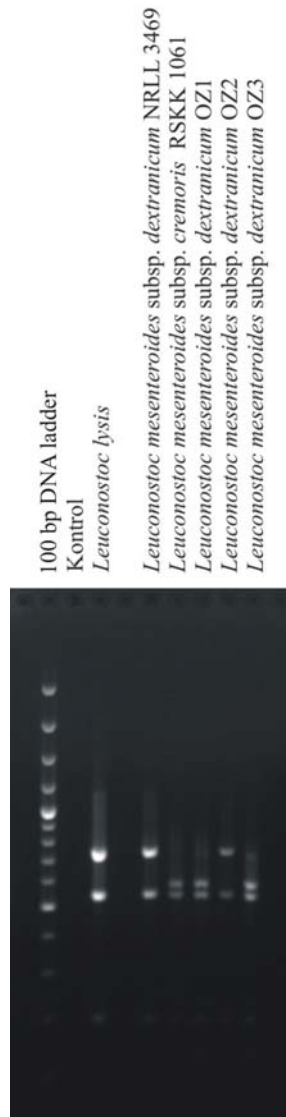
Şekil 4.33 *Enterococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



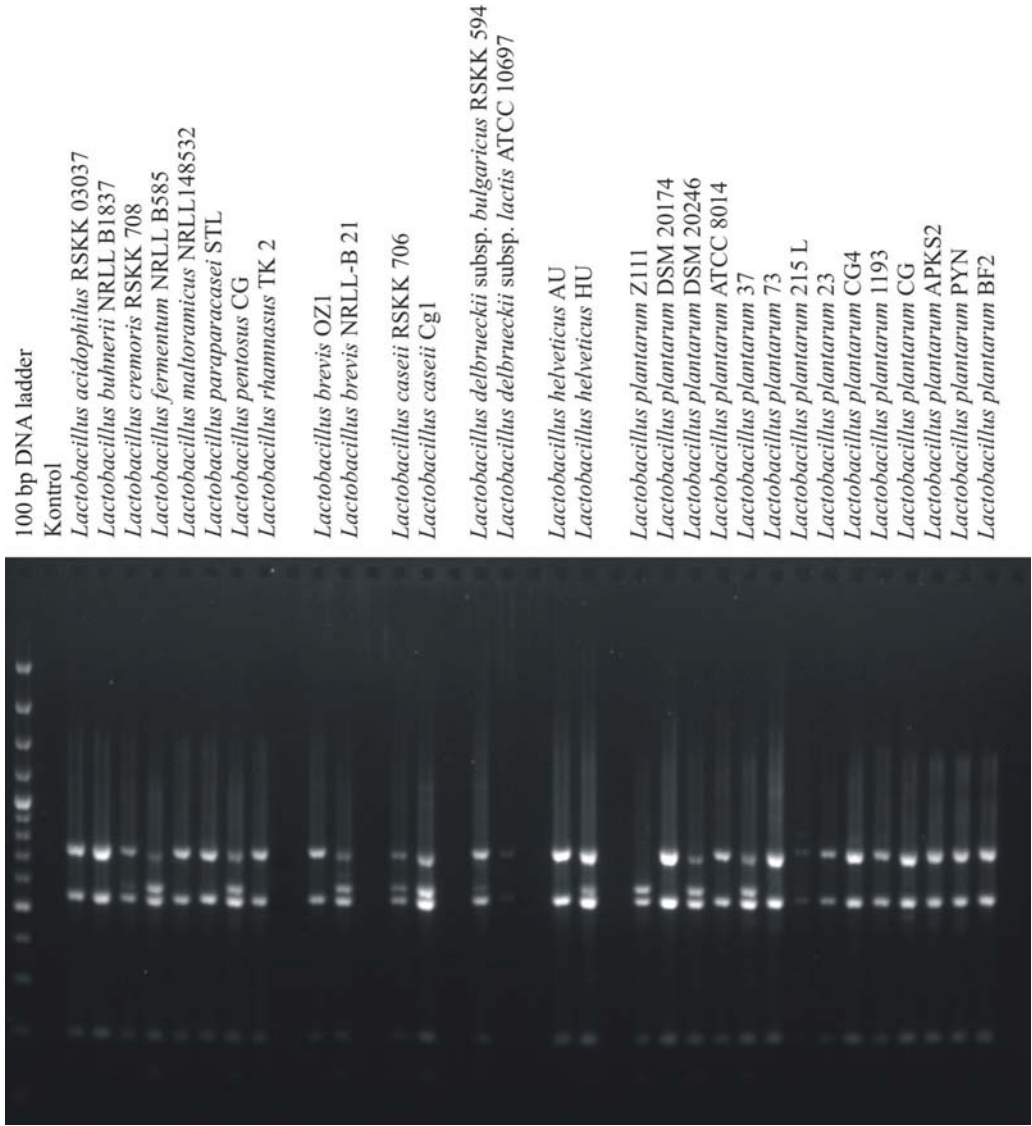
Şekil 4.34 *Lactococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



Şekil 4.35 *Pediococcus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



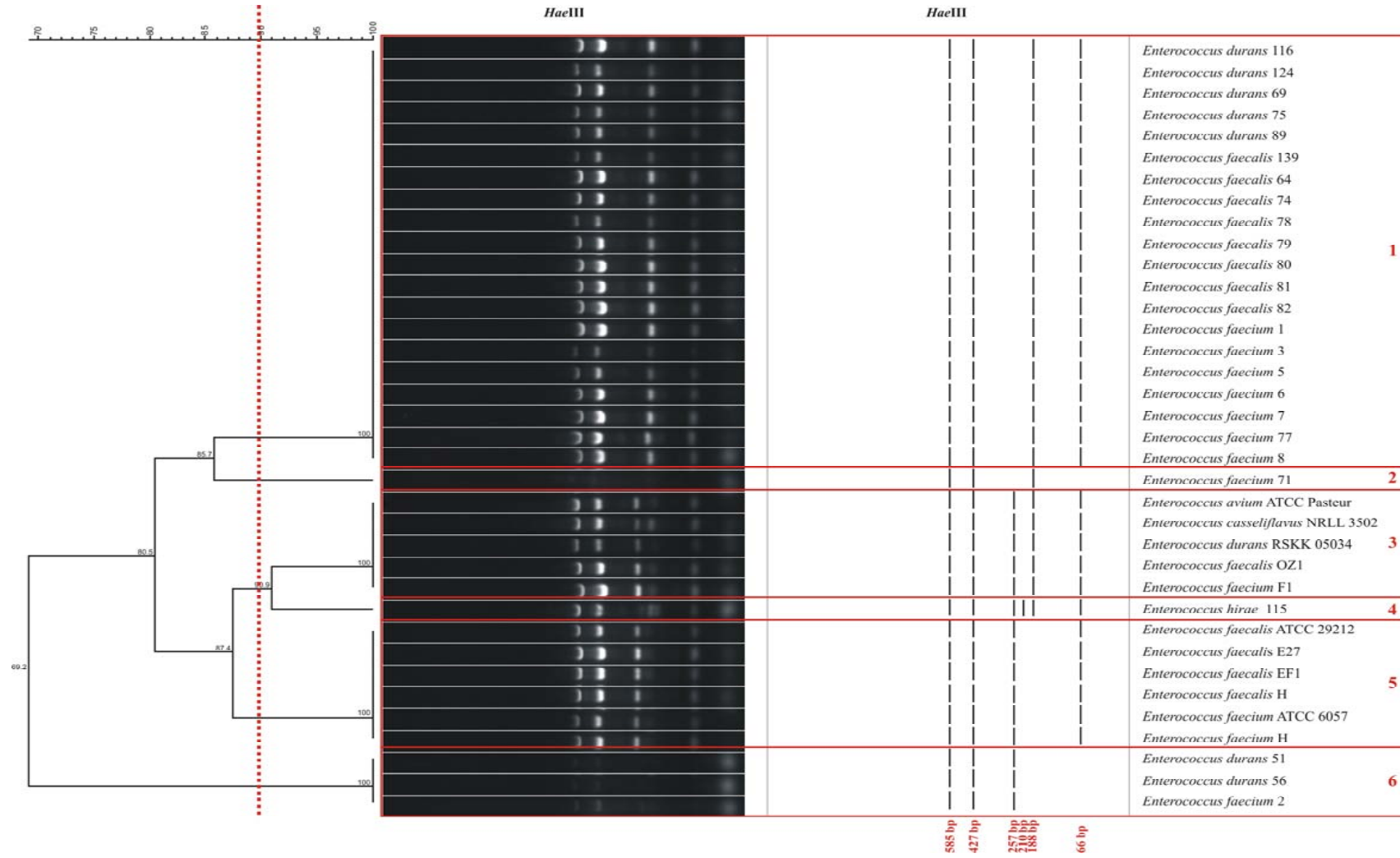
Şekil 4.36 *Leuconostoc* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü



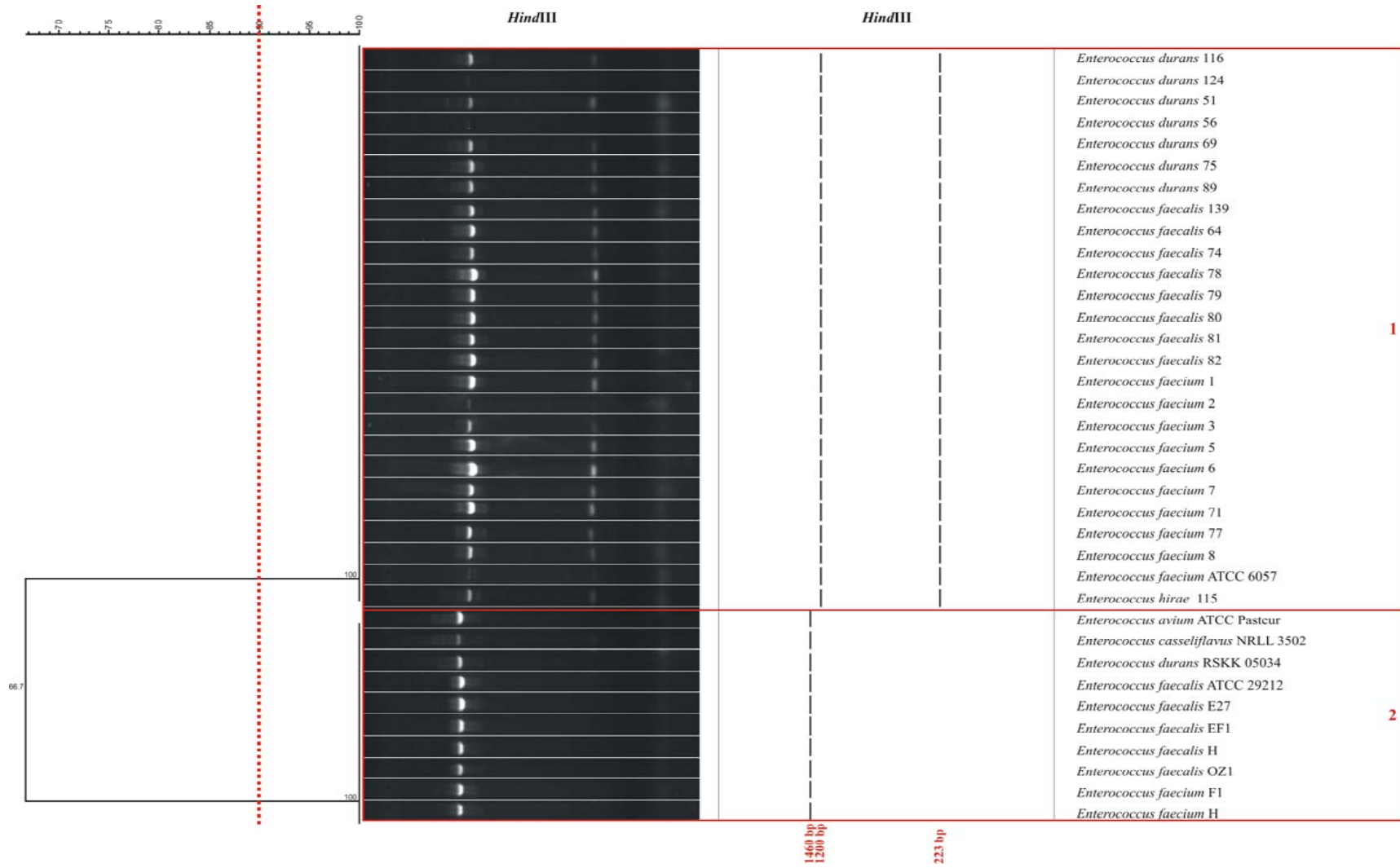
Şekil 4.37 *Lactobacillus* suşlarına ait 16S rDNA PCR ürünlerinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların % 1.5 agaroz jel üzerindeki görüntüsü

4.3.3 Dendogram ve Benzerlik İndeksinin Oluşturulması

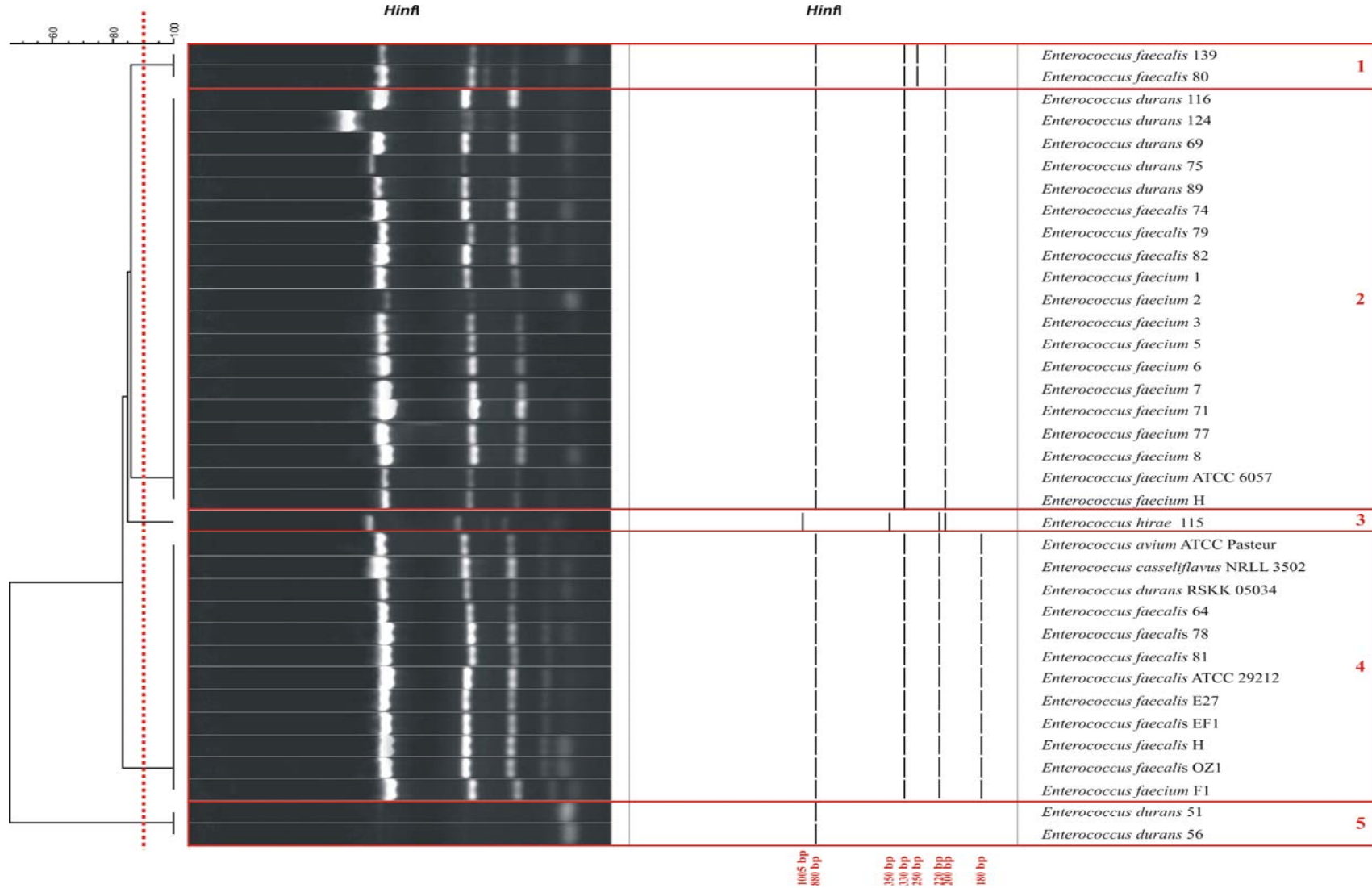
ARDRA uygulamaları neticesinde elde edilen bantlar arasındaki benzerlik ise ‘‘Dice product moment correlation coefficient’’ değeri (r) ile ifade edilip % değerine dönüştürülmüştür. UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılarak neticede tür içi ve türler arasındaki genetik benzerlik ayrı ayrı dendogramlar olarak gösterilmiştir (şekil 4.38 -4. 77).



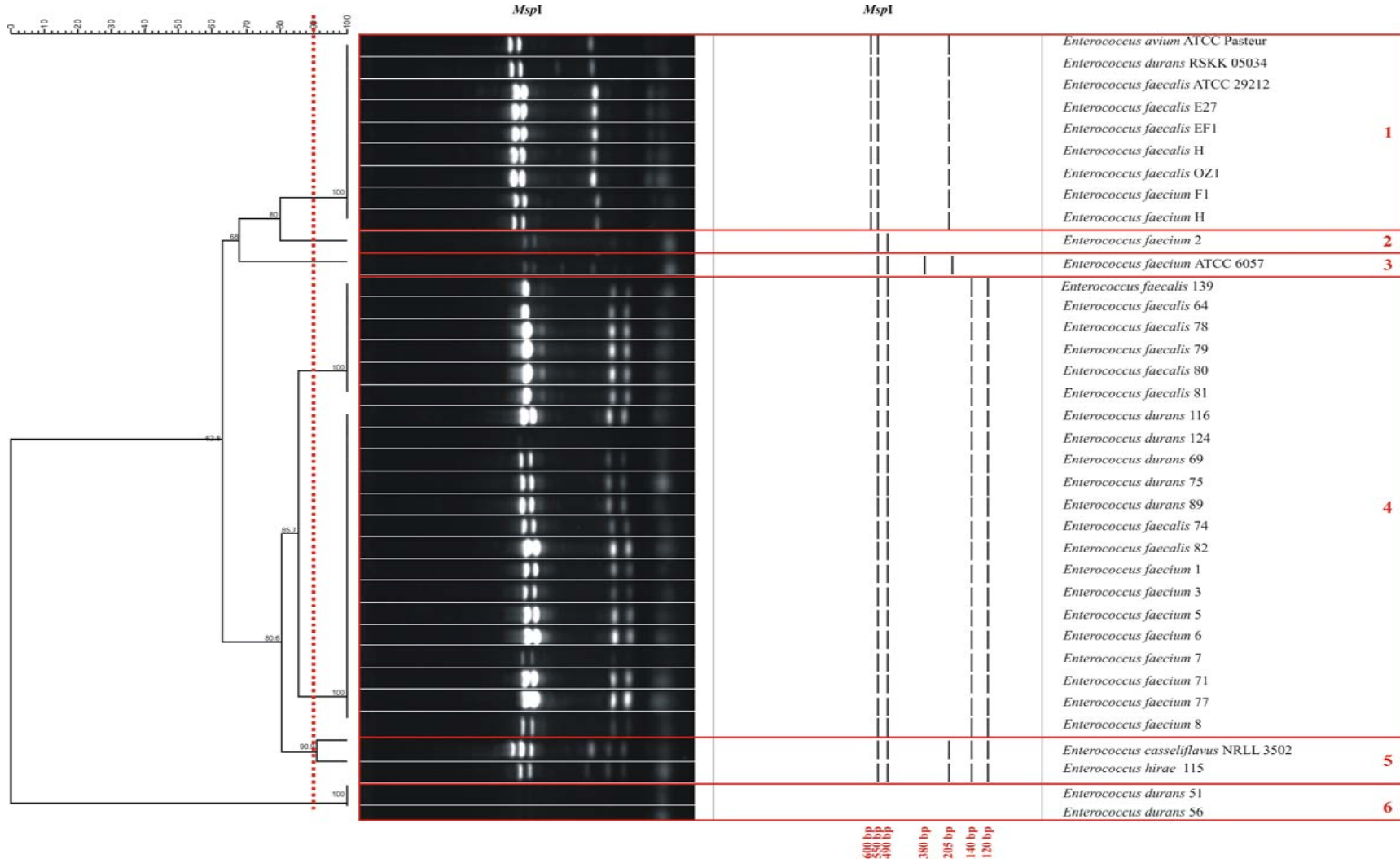
Şekil 4.38 a *Hae*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram



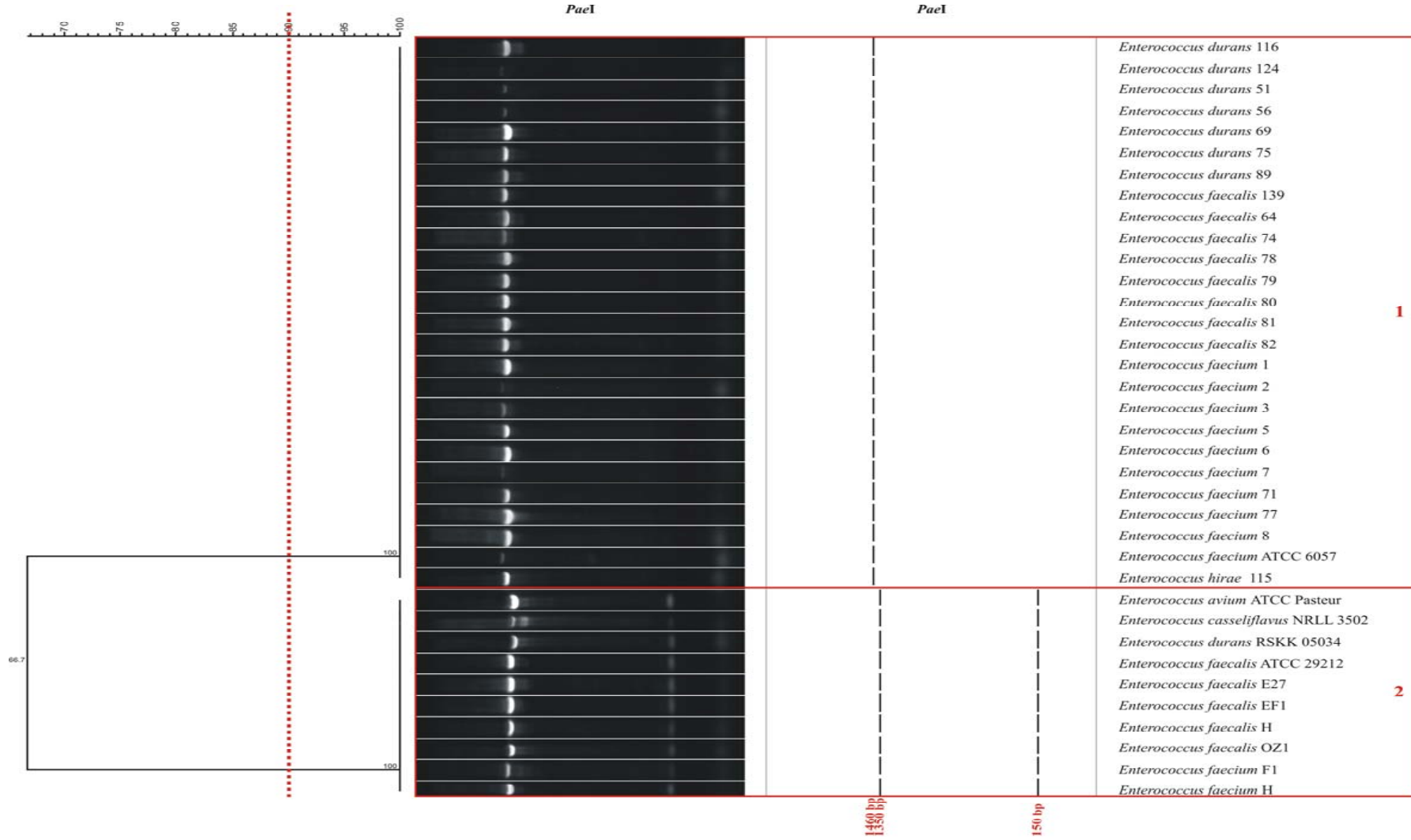
Şekil 4.39a *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşuna ait dendrogram



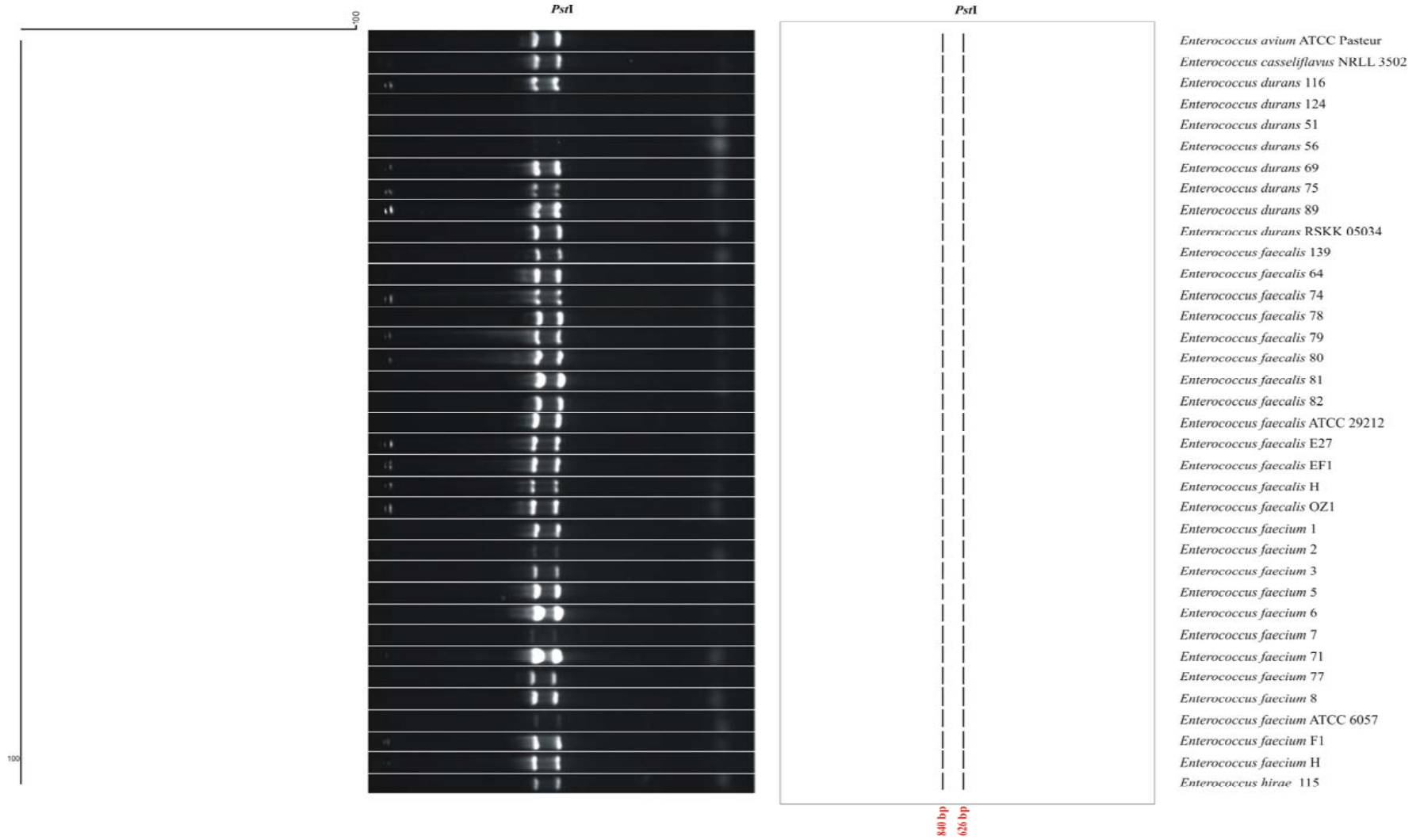
Şekil 4.40a *HinI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



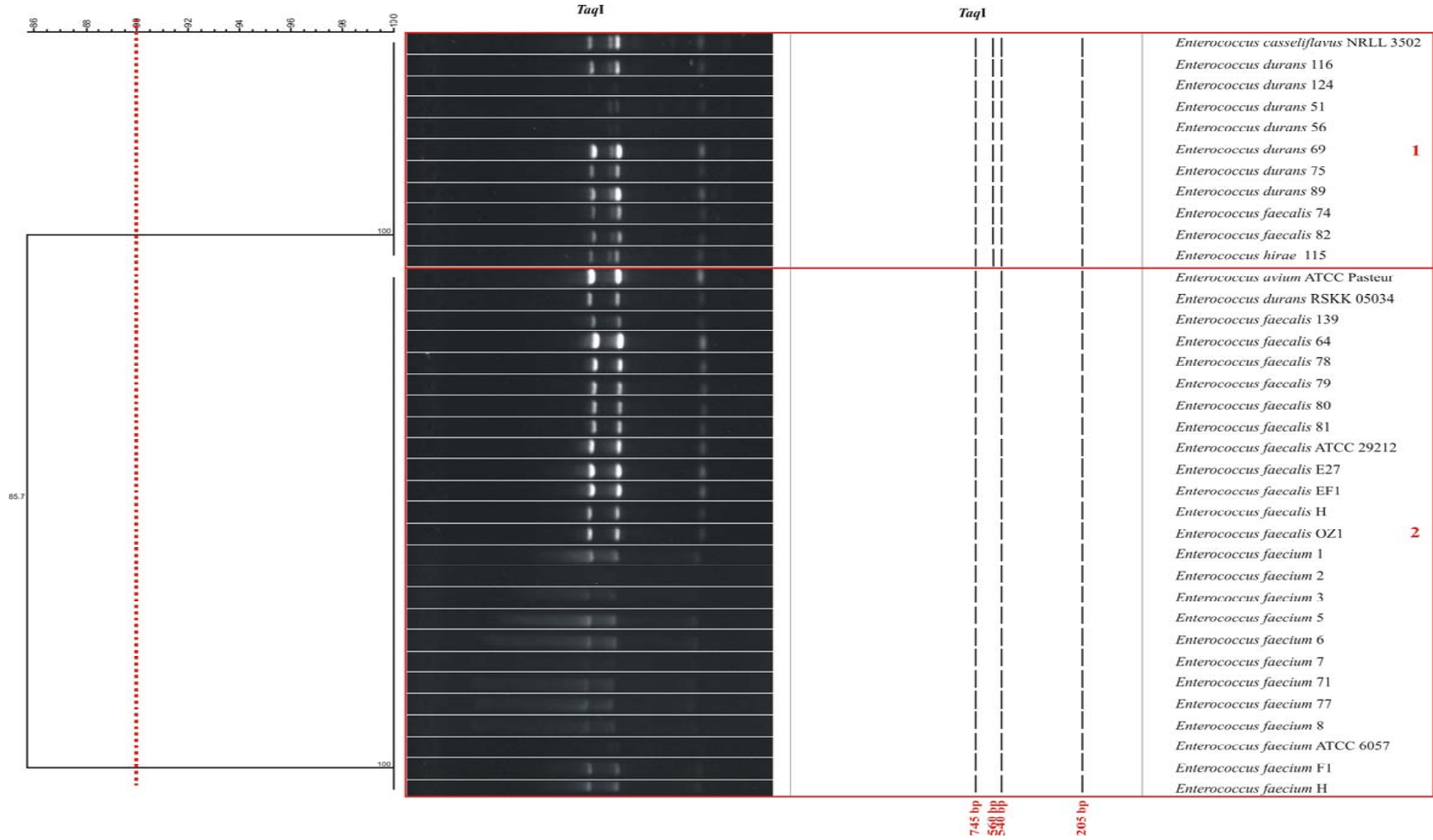
Şekil 4.41a *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



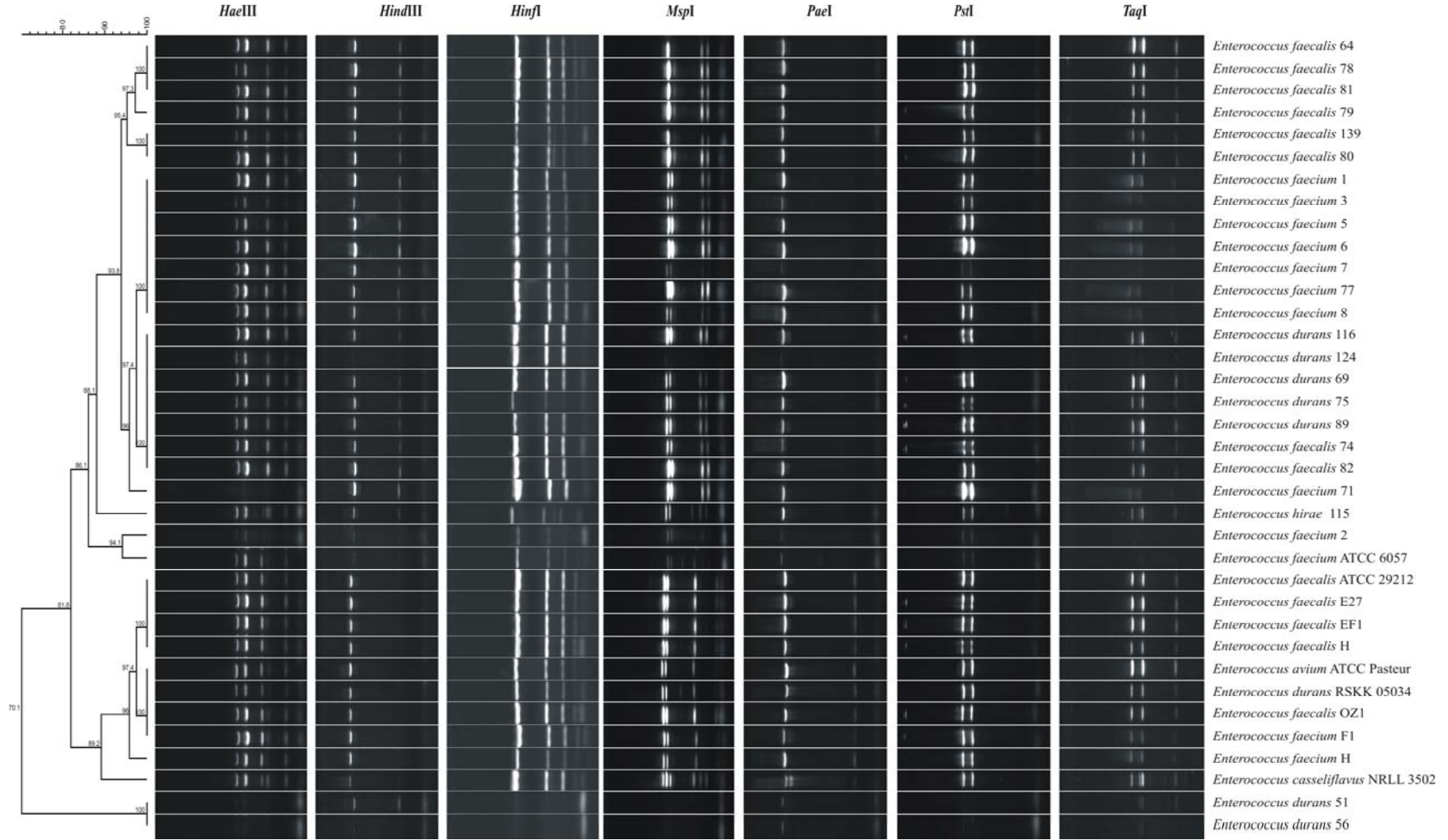
Şekil 4.42a *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



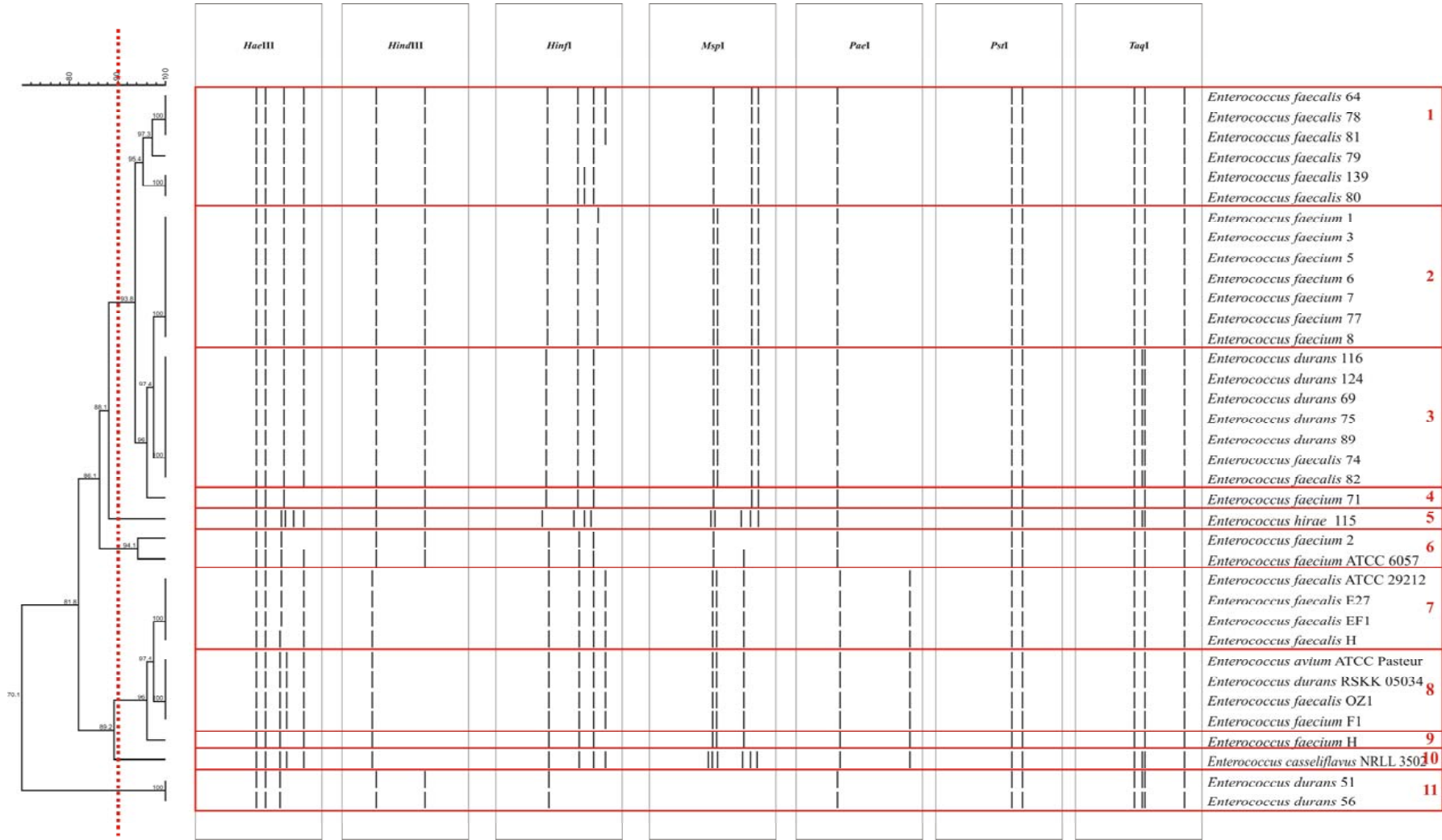
Şekil 4.43a *Pst*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



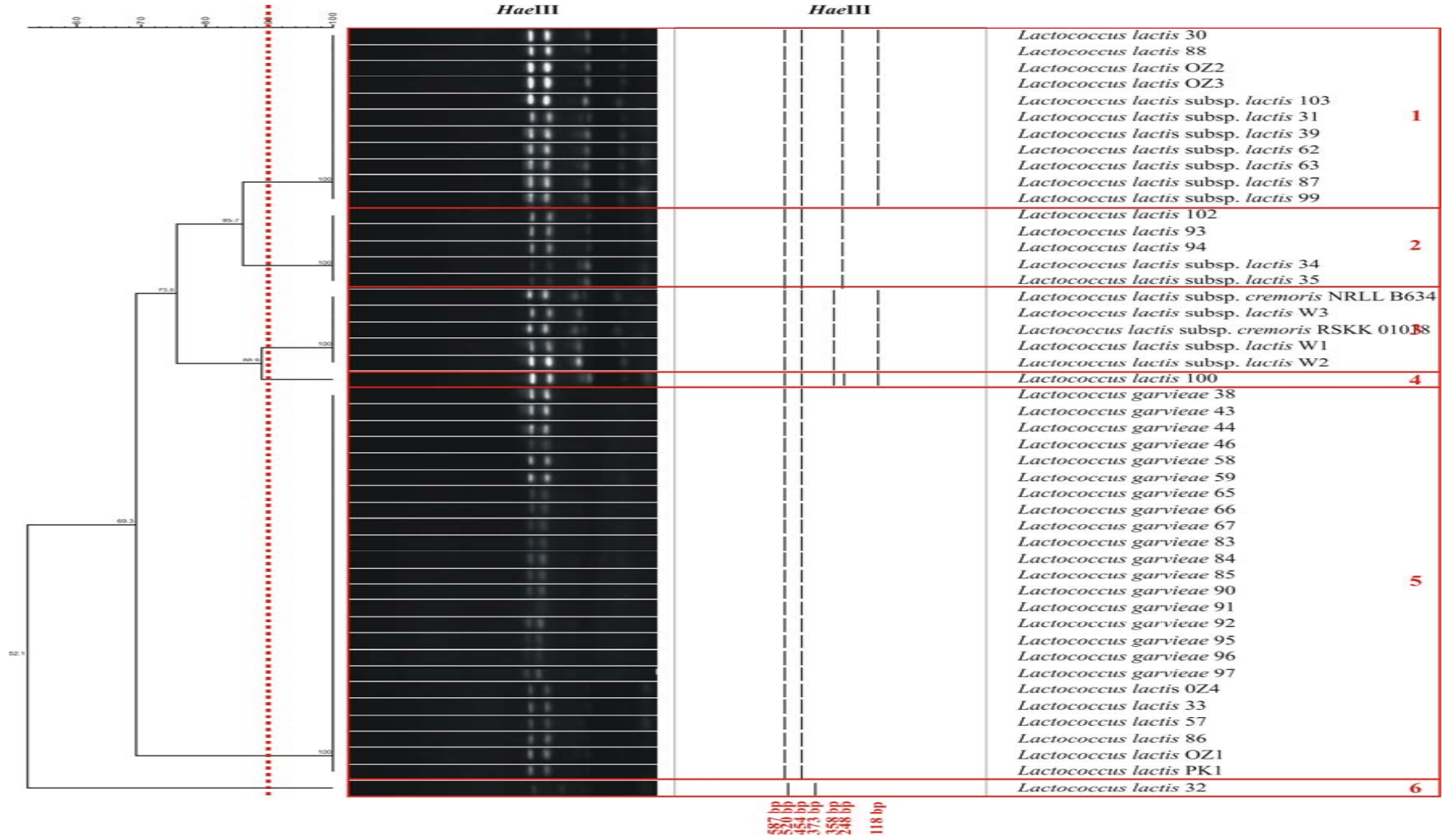
Şekil 4.44a *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



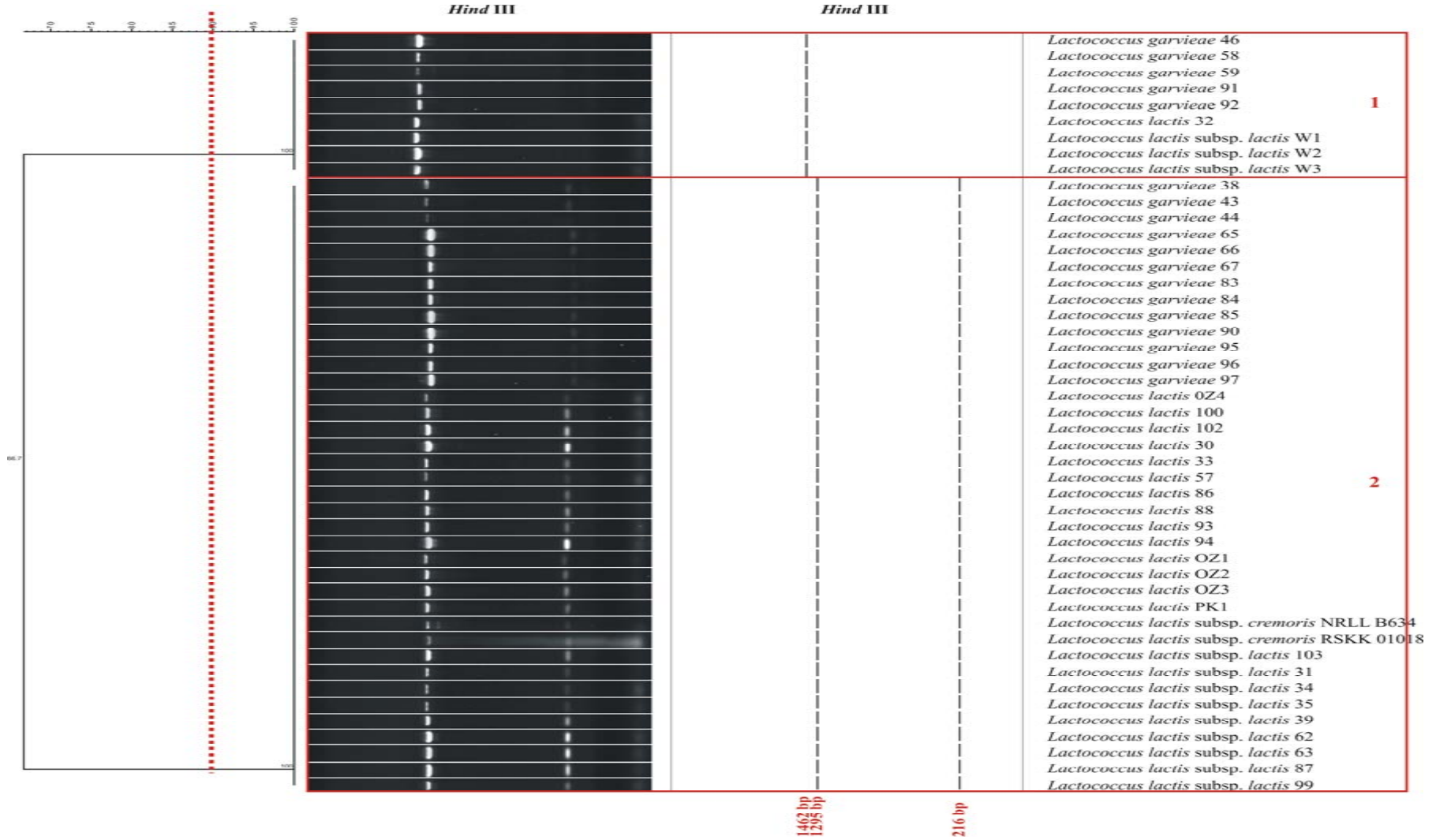
Şekil 4.45a ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



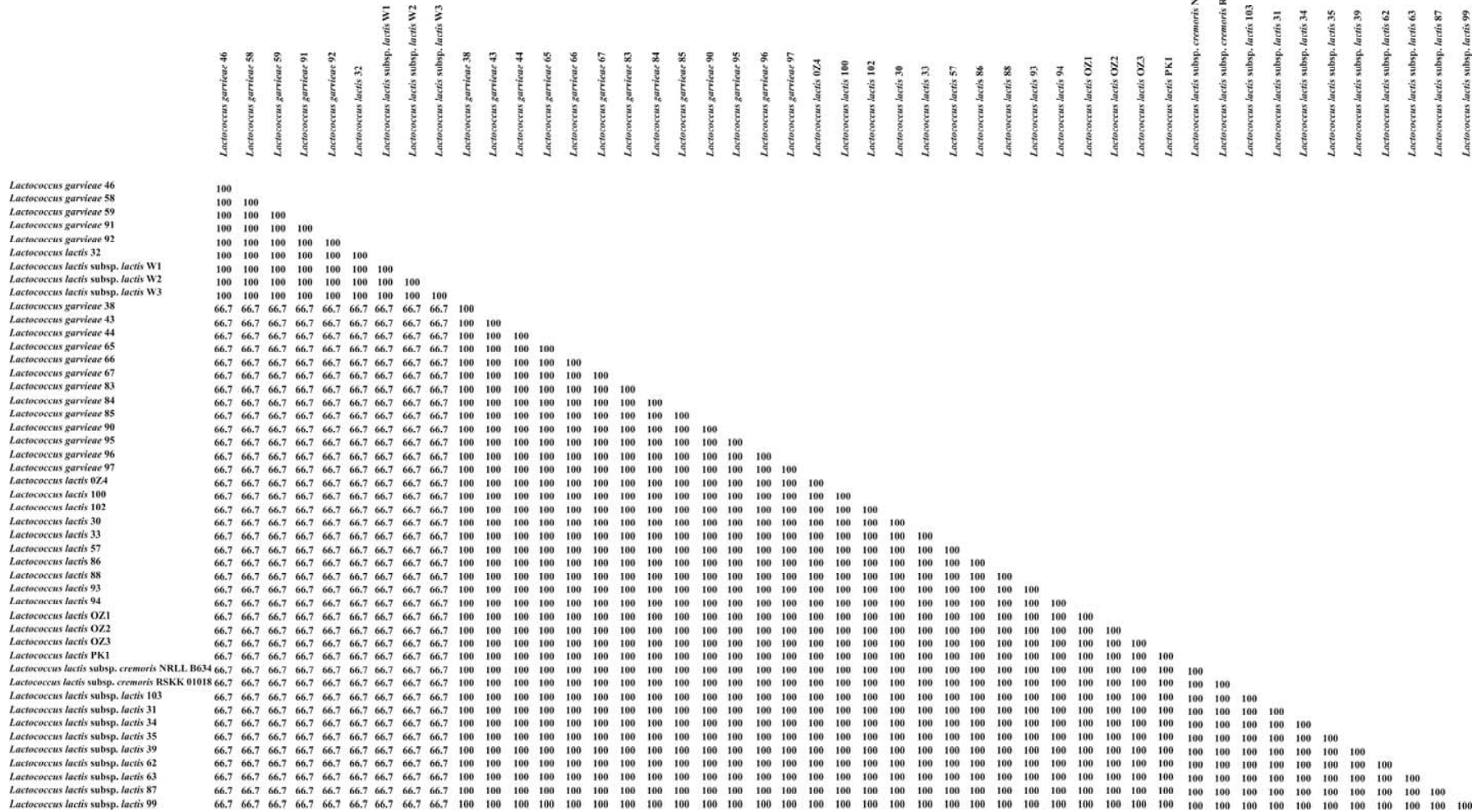
Şekil 4.45b ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 36 adet *Enterococcus* suşlarına ait dendrogram



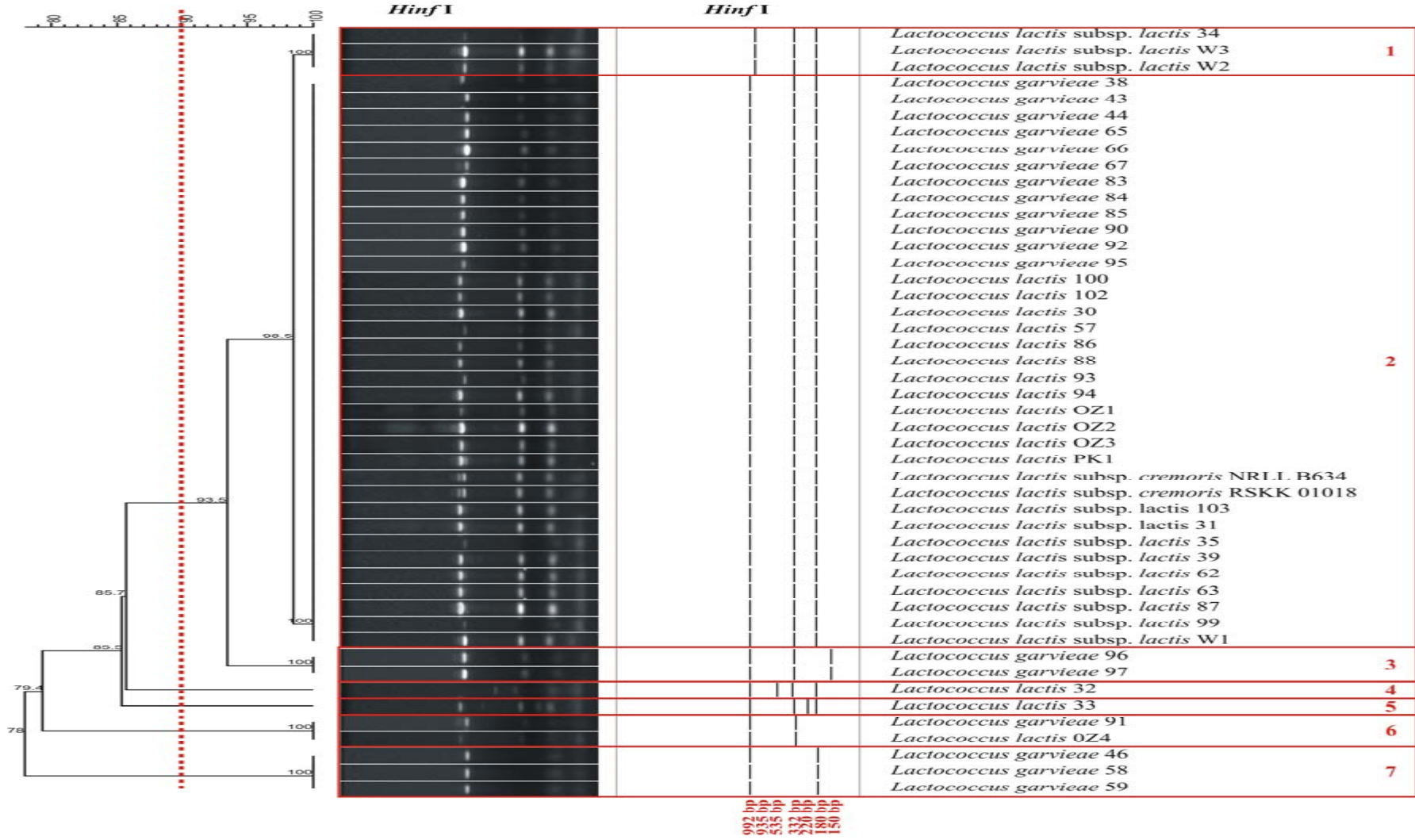
Şekil 4.46a *Hae*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



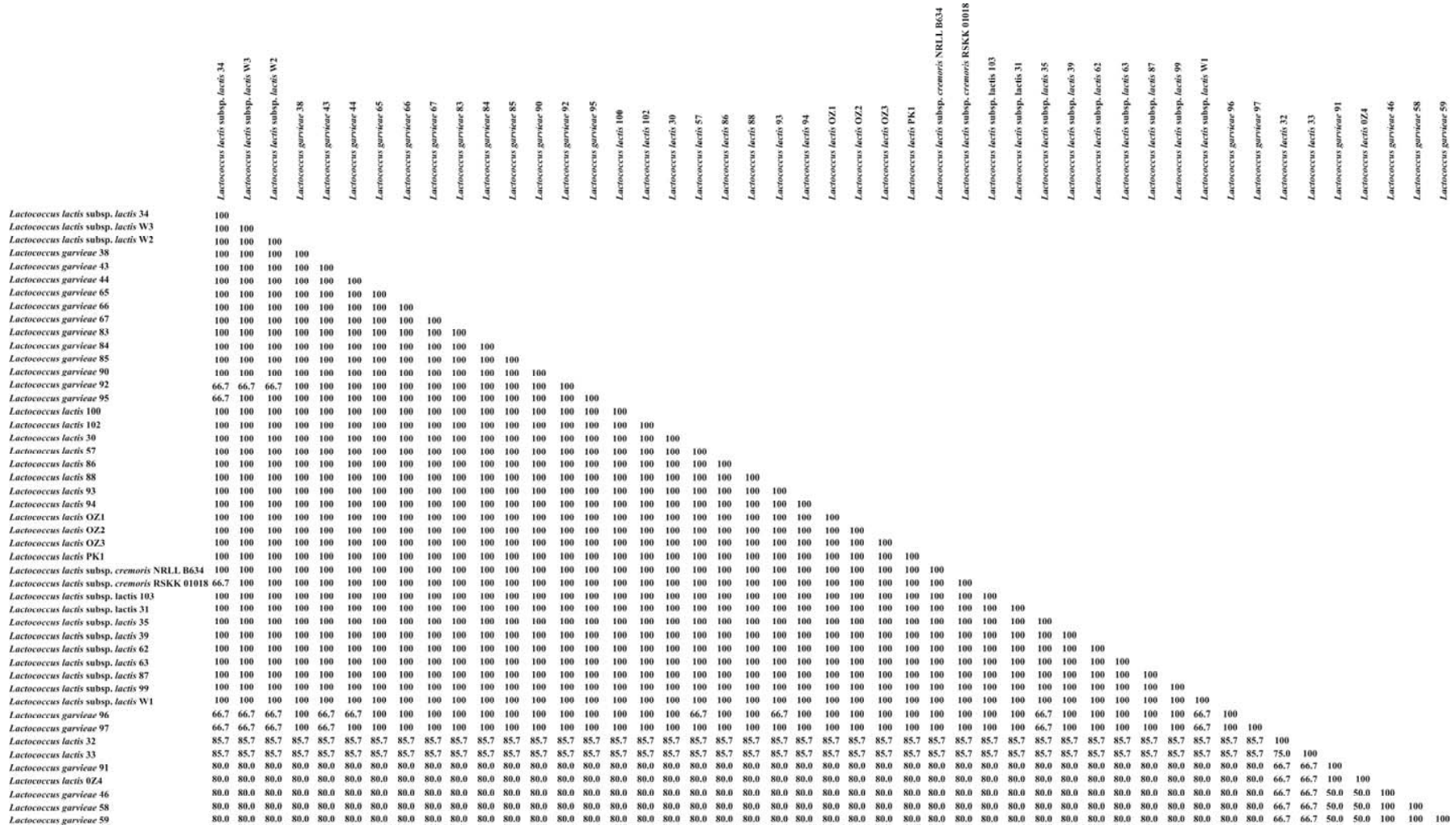
Şekil 4.47a *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



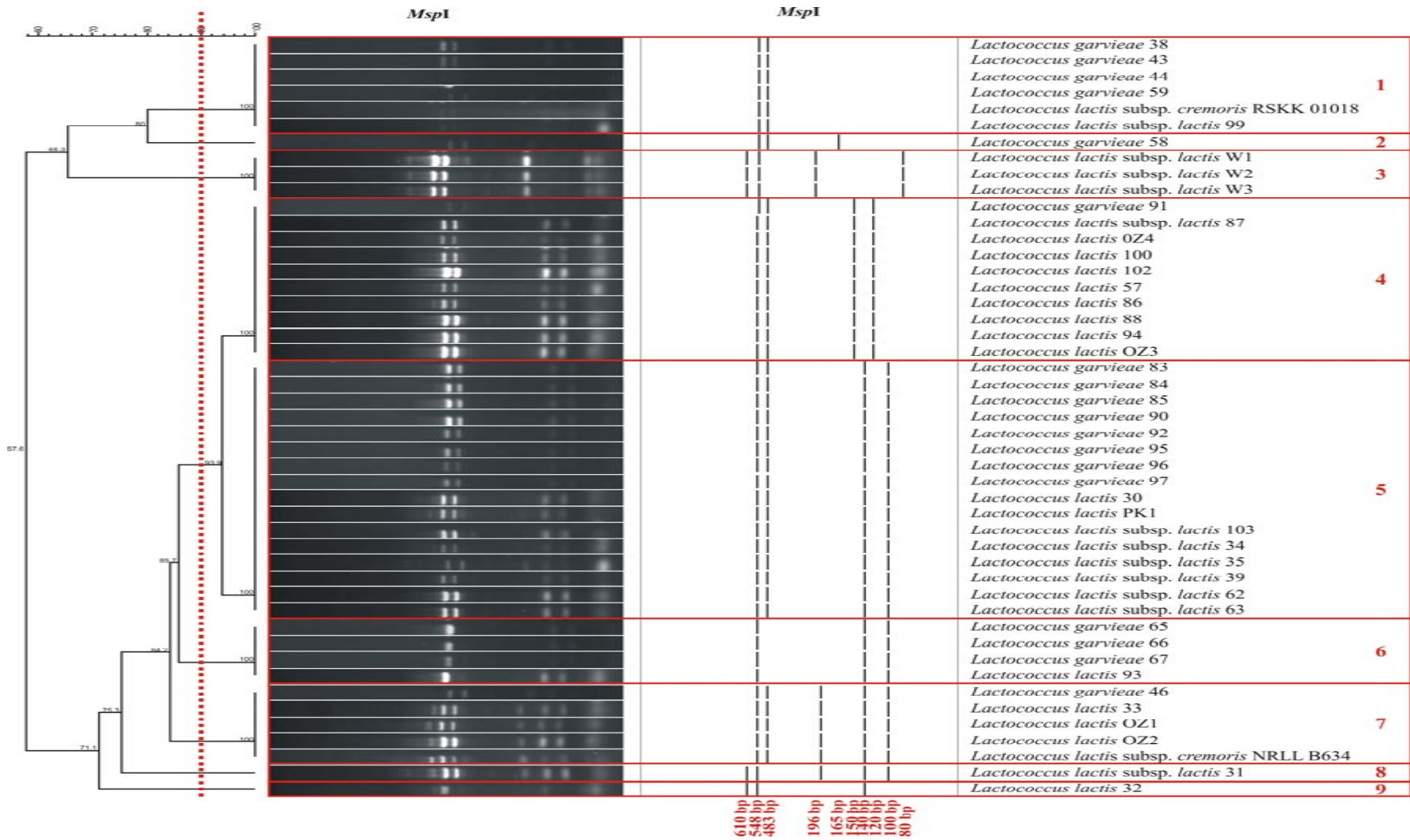
Şekil 4.47b *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



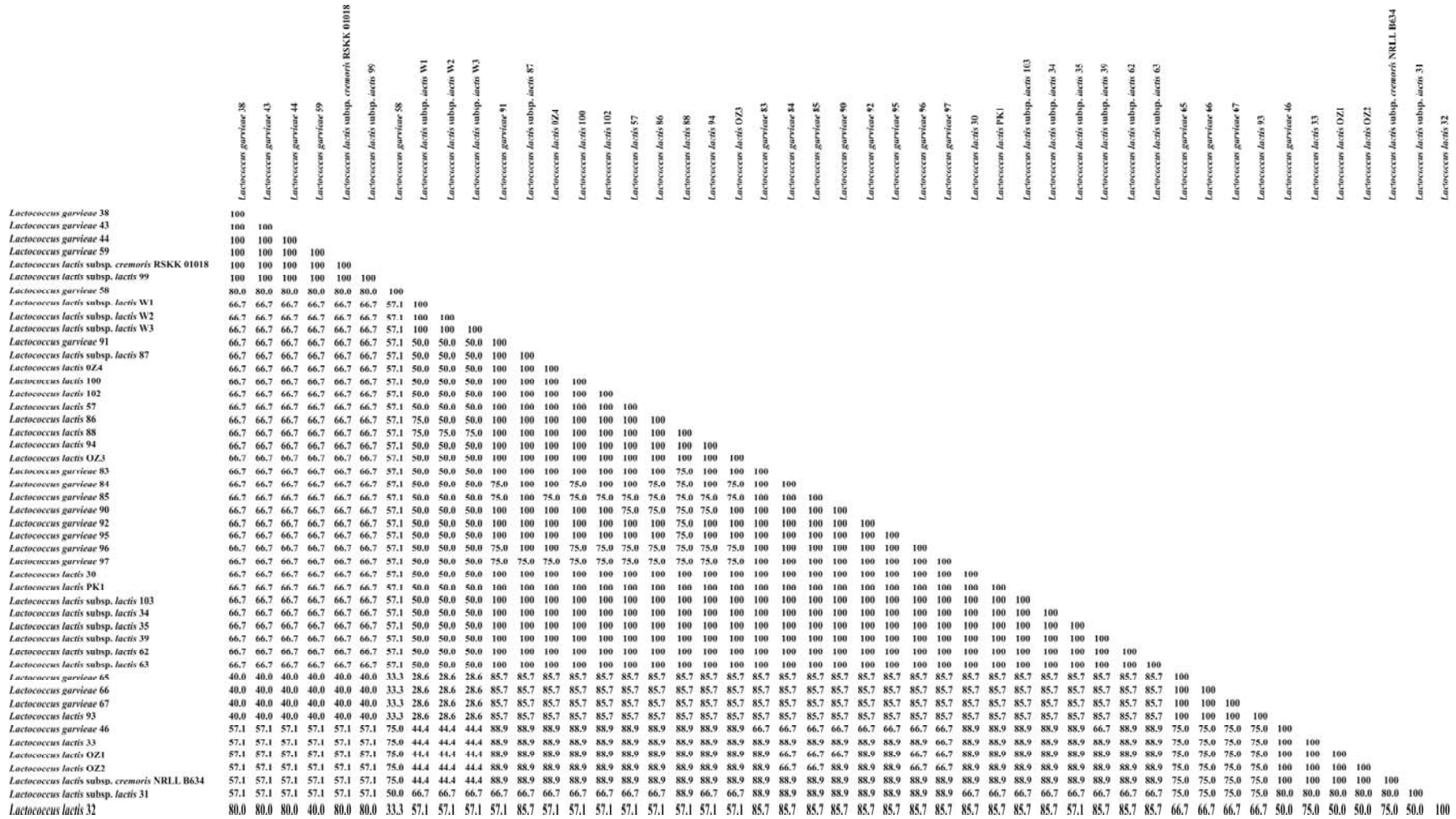
Şekil 4.48a *HinfI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA’ından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



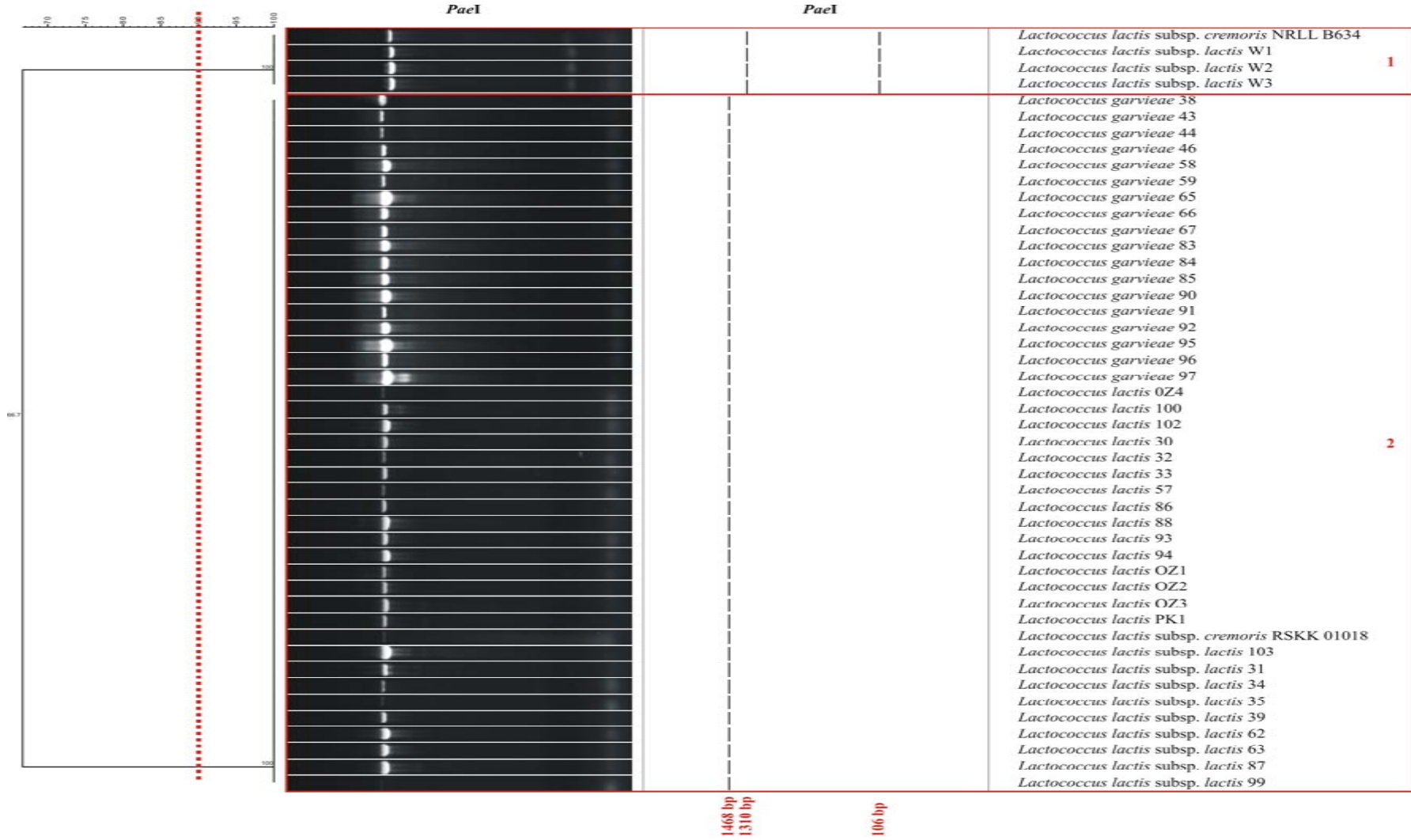
Şekil 4.48b *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hinf*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



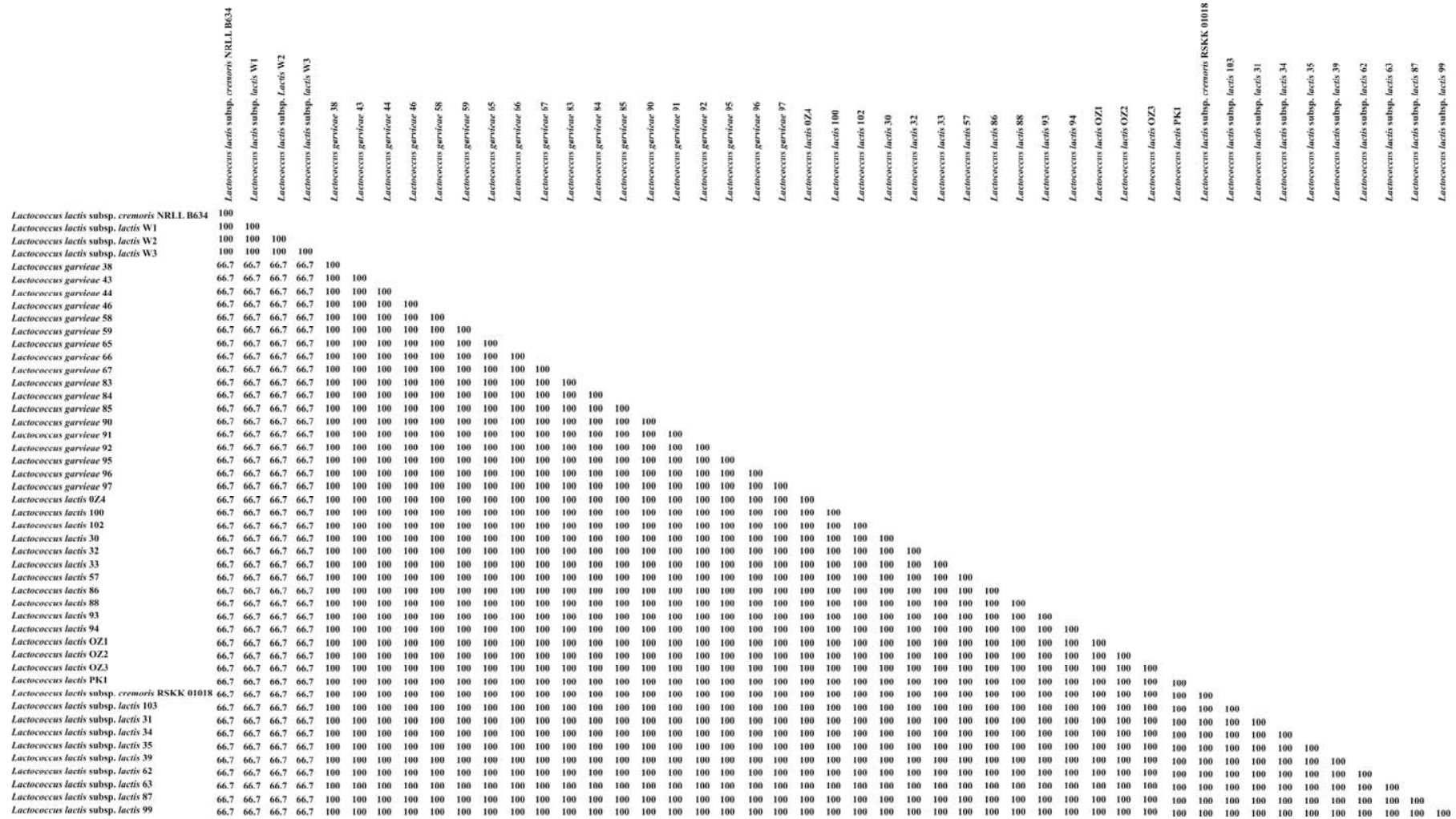
Şekil 4.49a *Msp*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



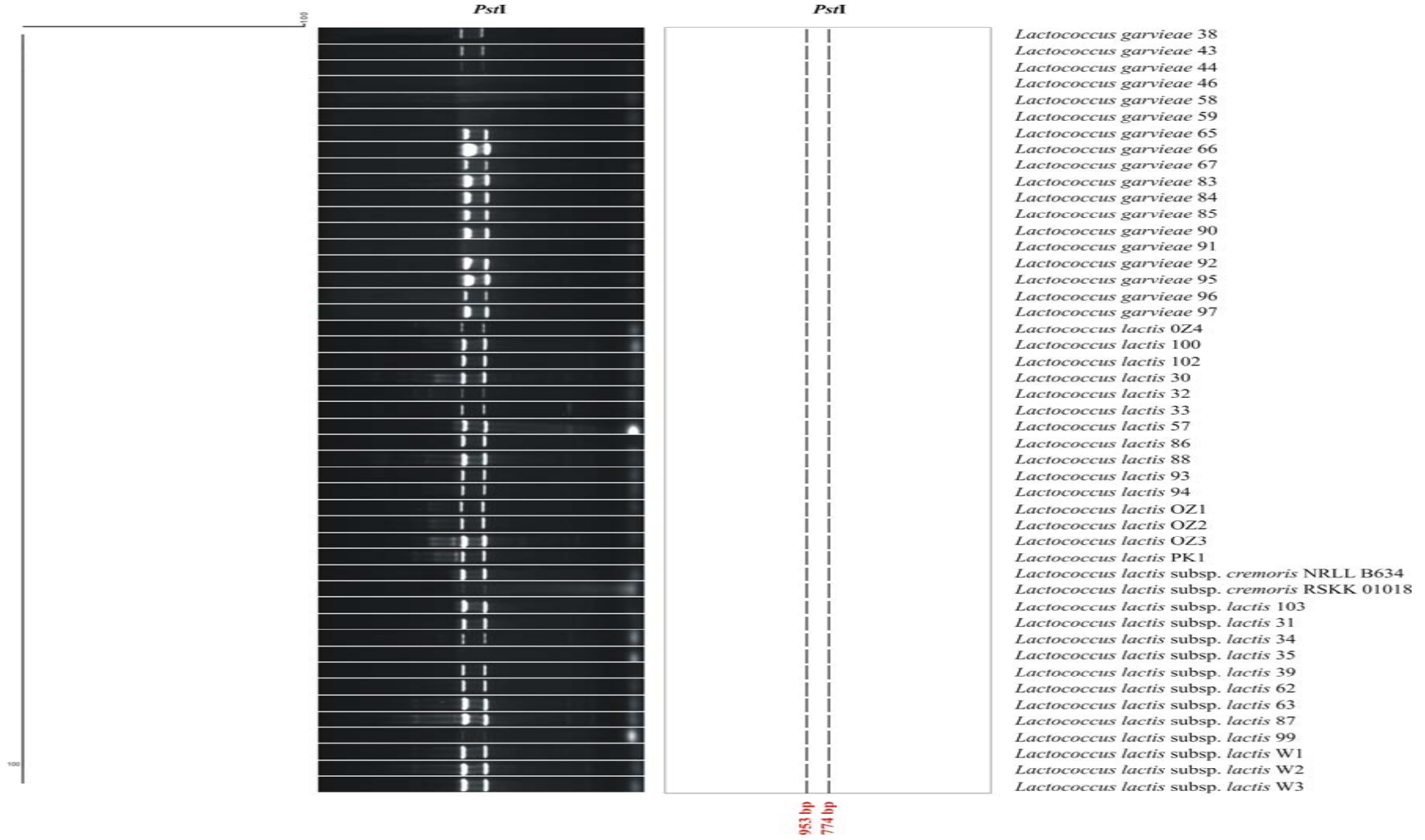
Şekil 4.49b *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



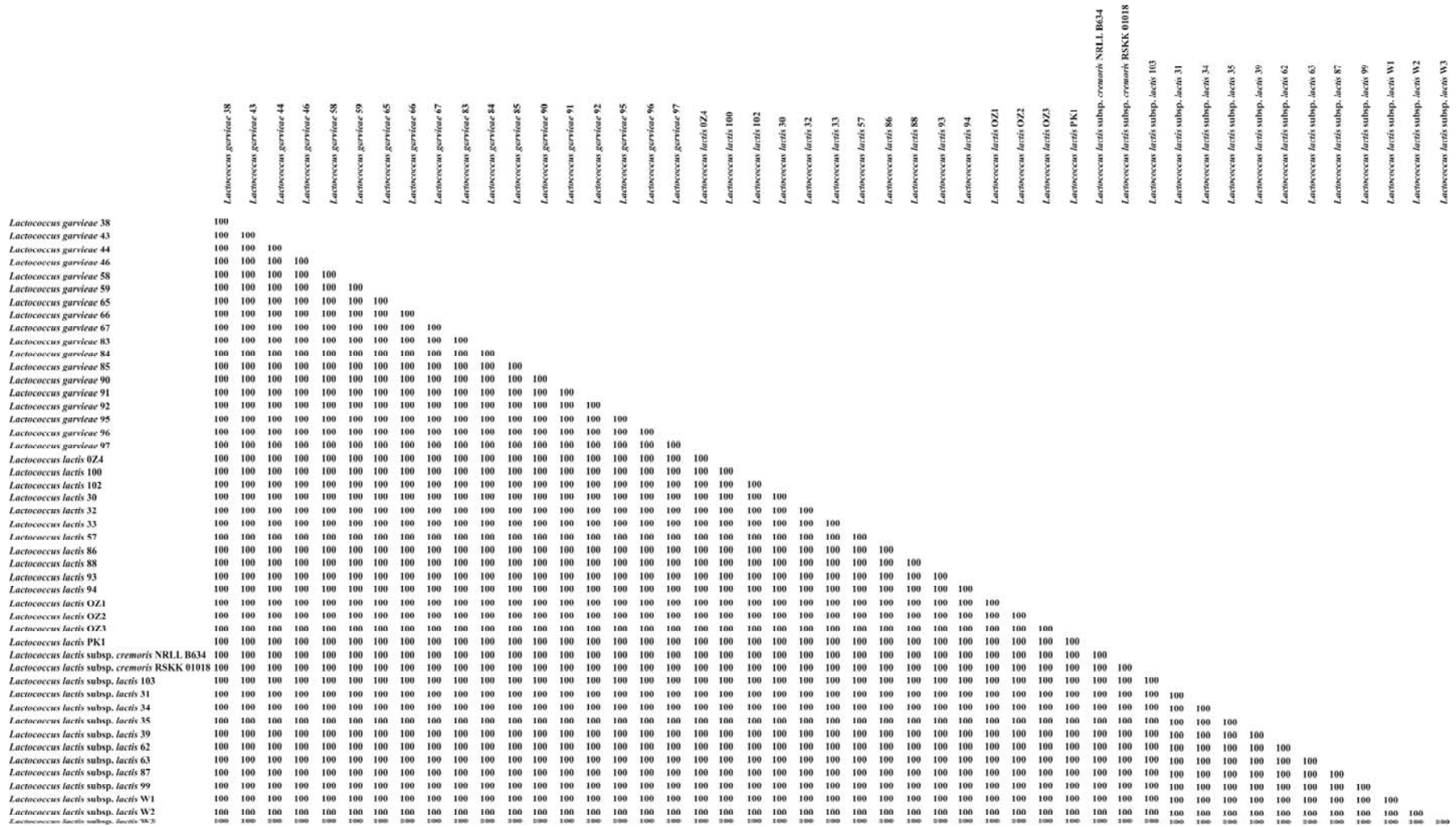
Şekil 4.50a *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



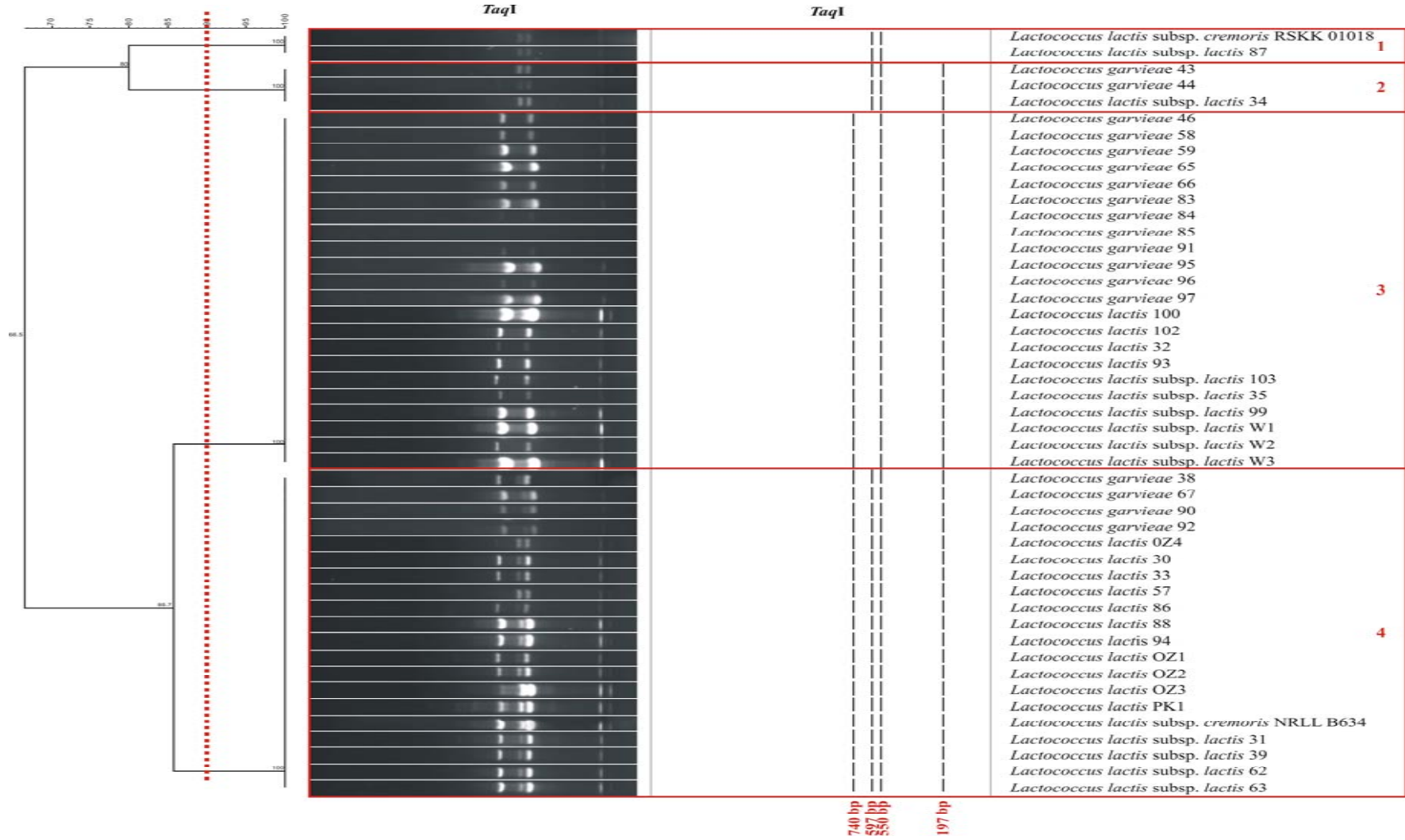
Şekil 4.50b *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



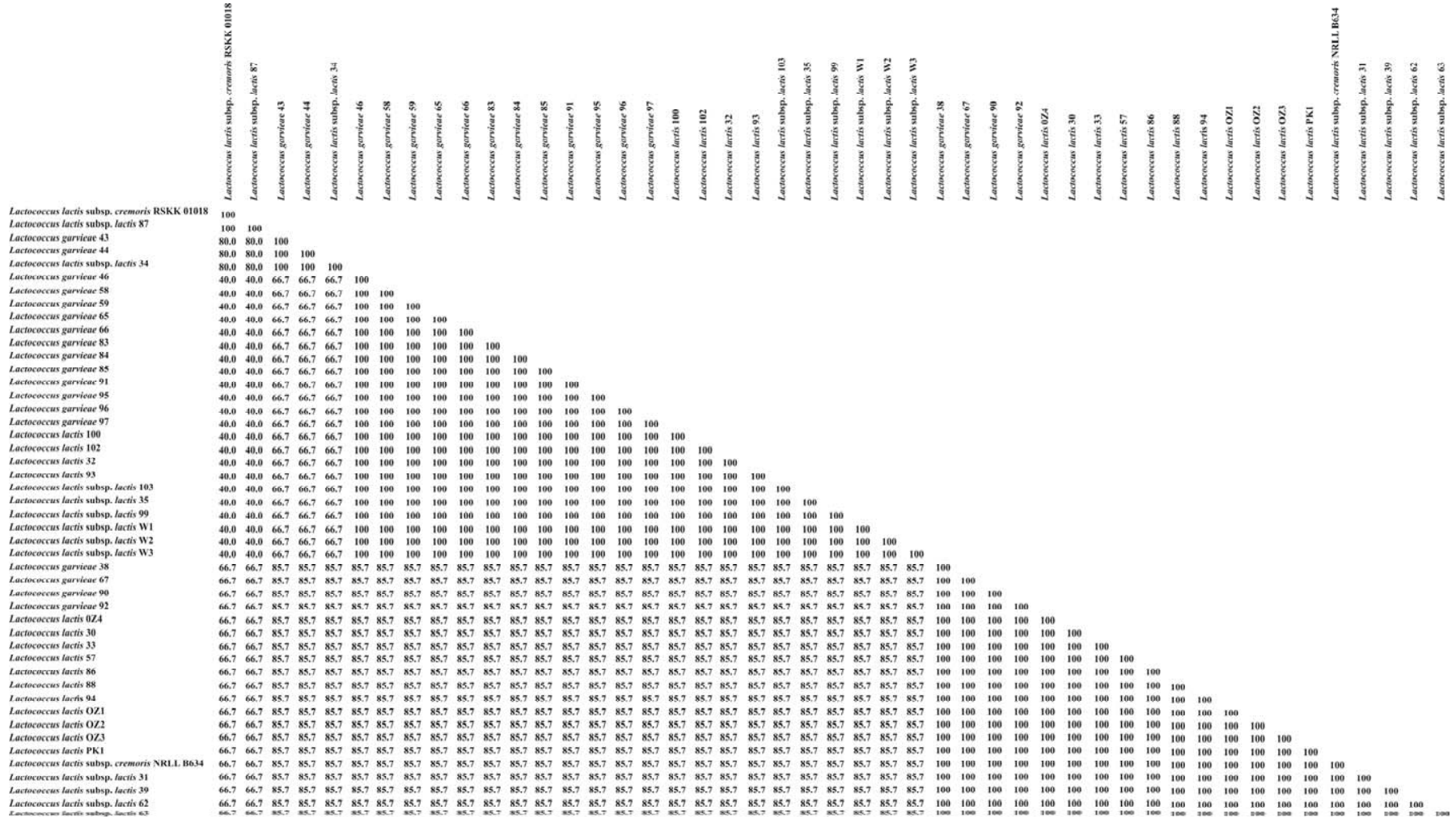
Şekil 4.51a *PstI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



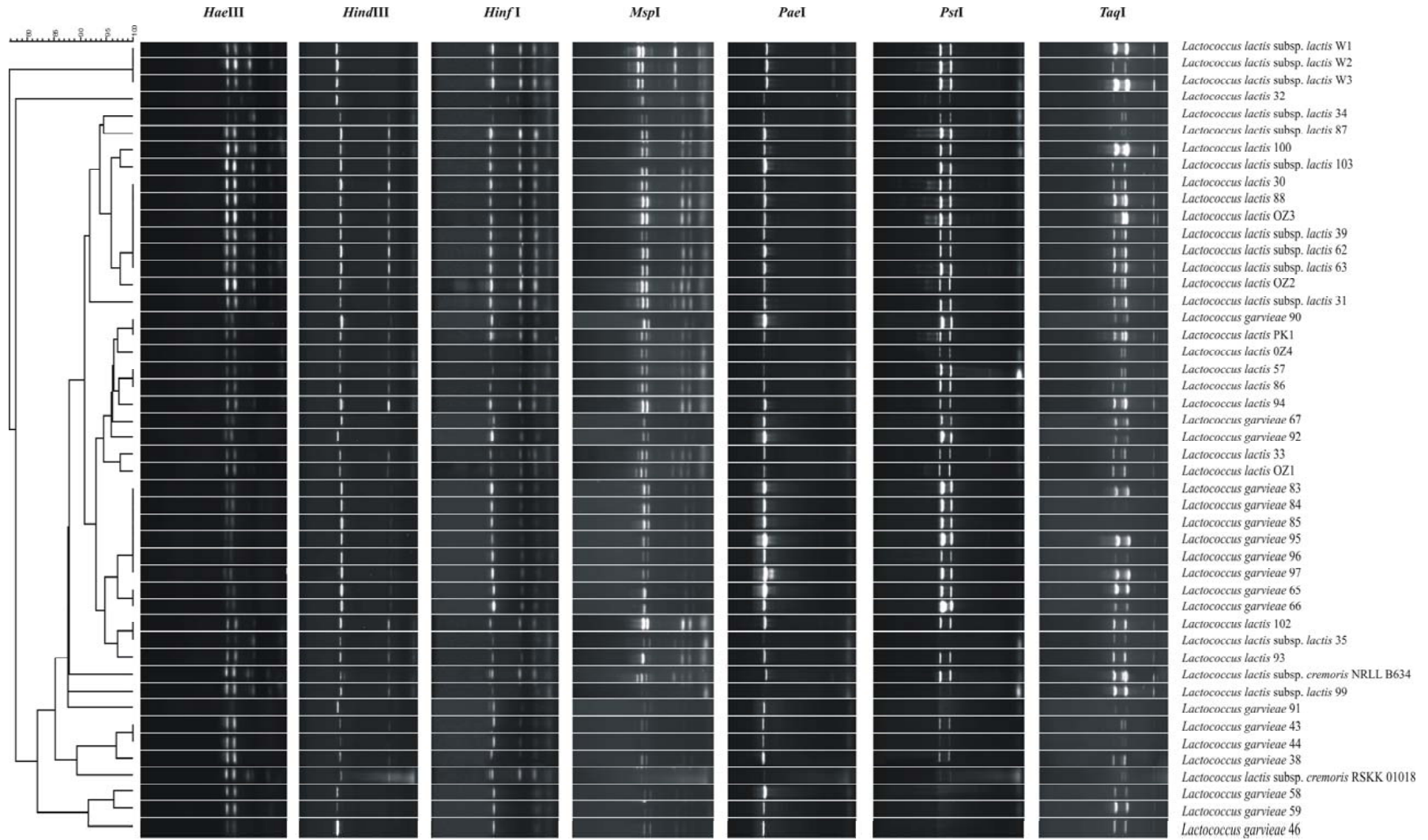
Şekil 4.51b *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *PsfI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



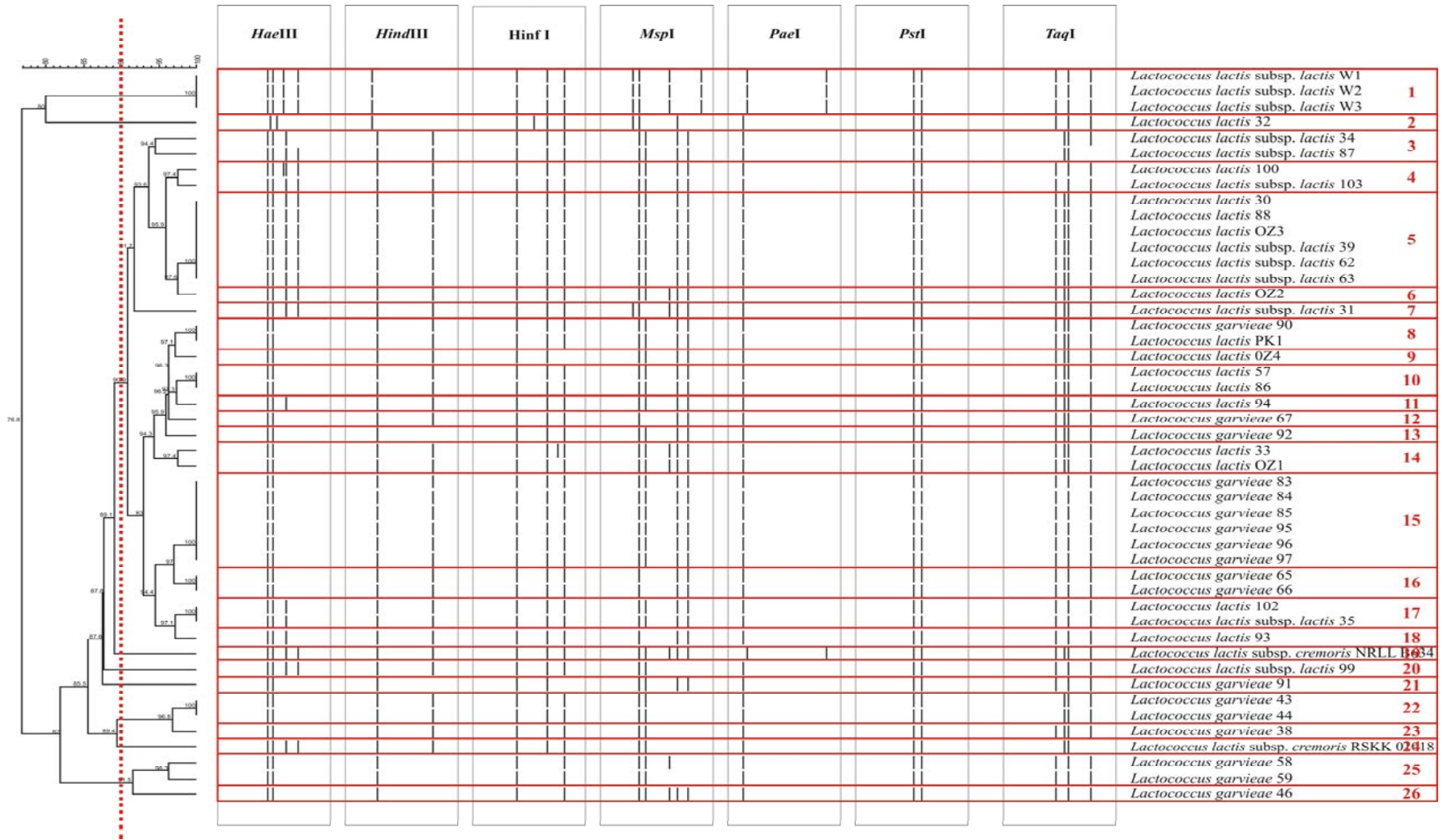
Şekil 4.52a *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



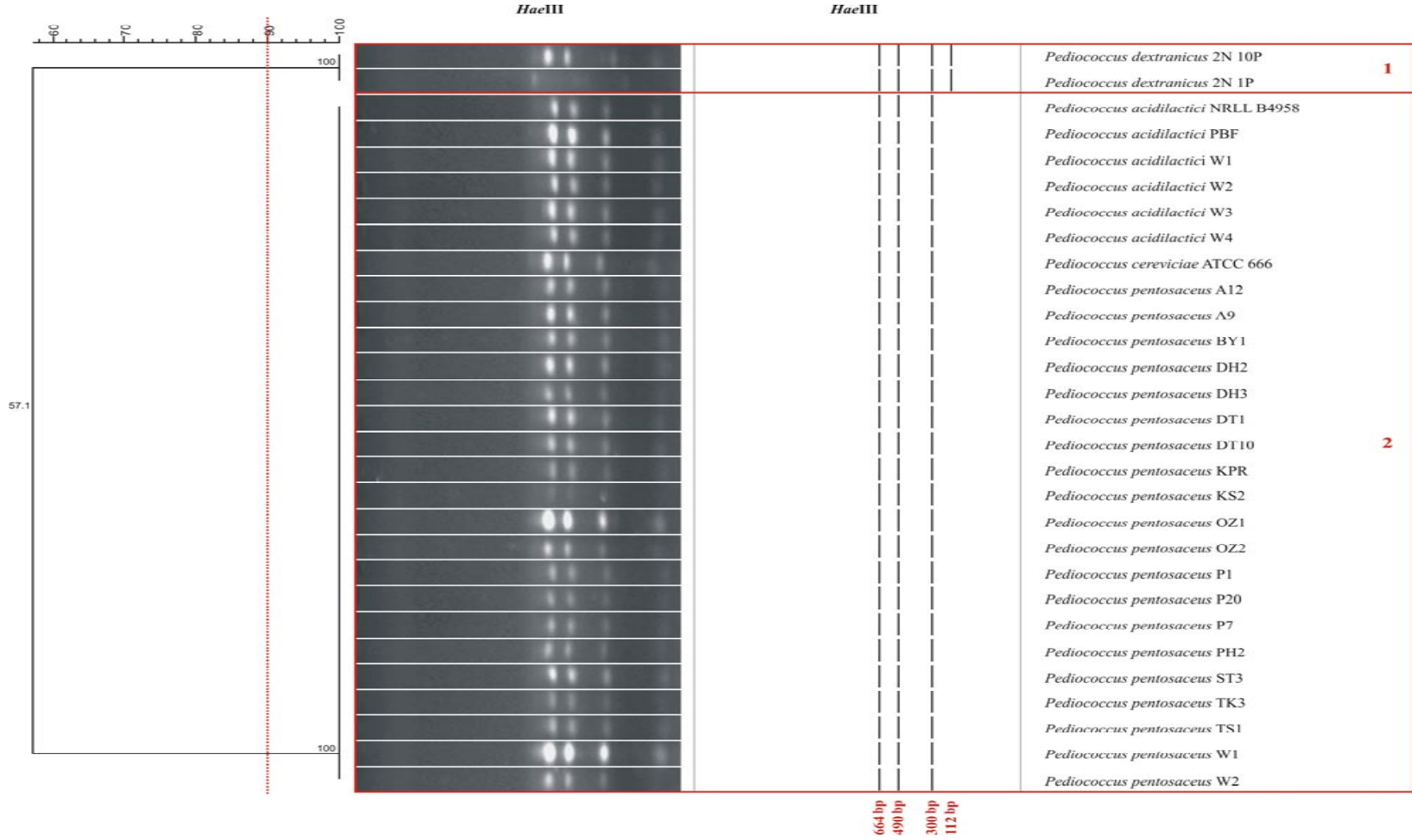
Şekil 4.52b *Lactococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.53a ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



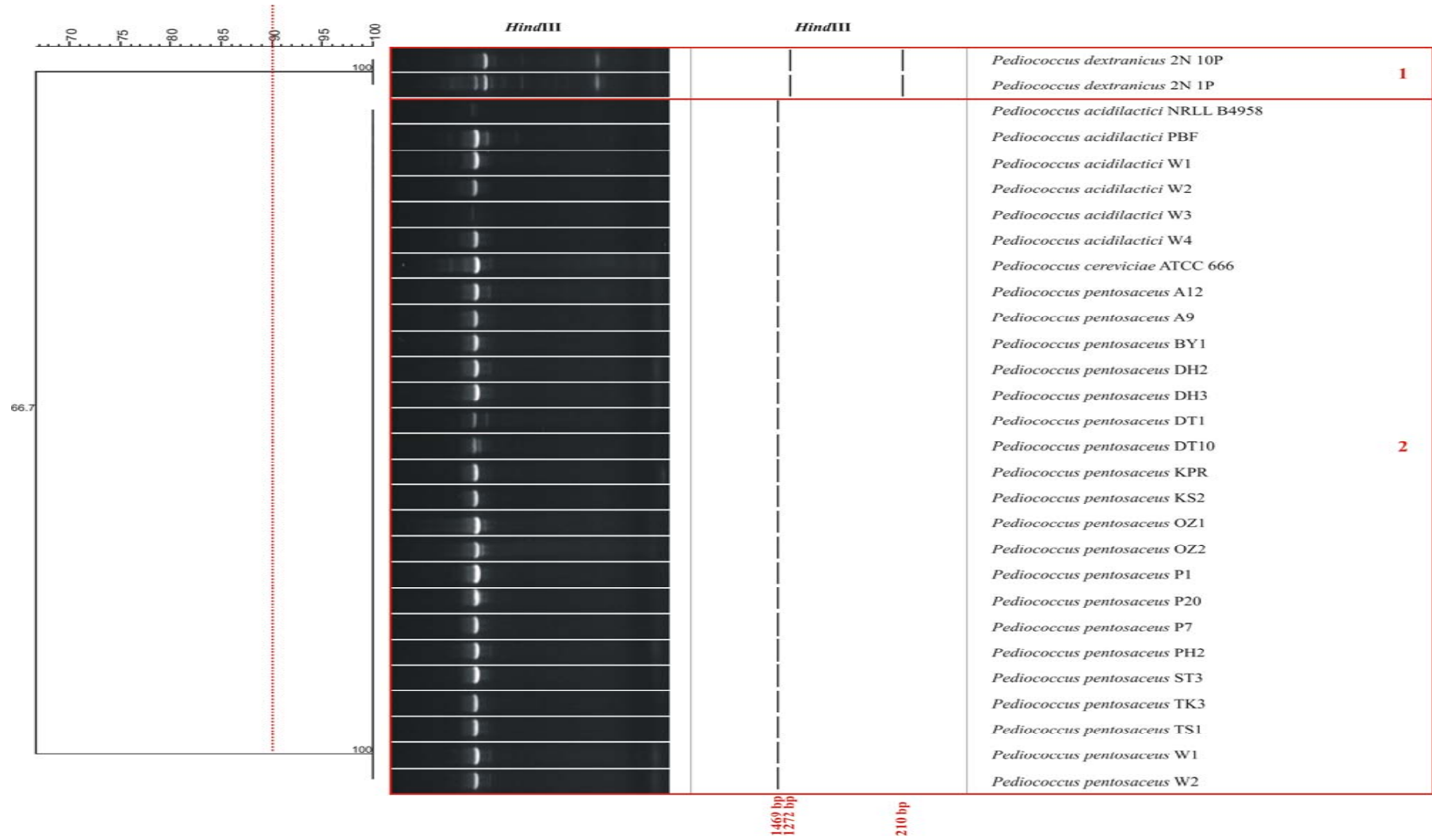
Şekil 4.53b ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 47 adet *Lactococcus* suşlarına ait dendrogram



Şekil 4.54a *HaeIII* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	100																													
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	57.1	57.1	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	57.1	57.1	100	100																										
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	57.1	57.1	100	100	100																									
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	57.1	57.1	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	57.1	57.1	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

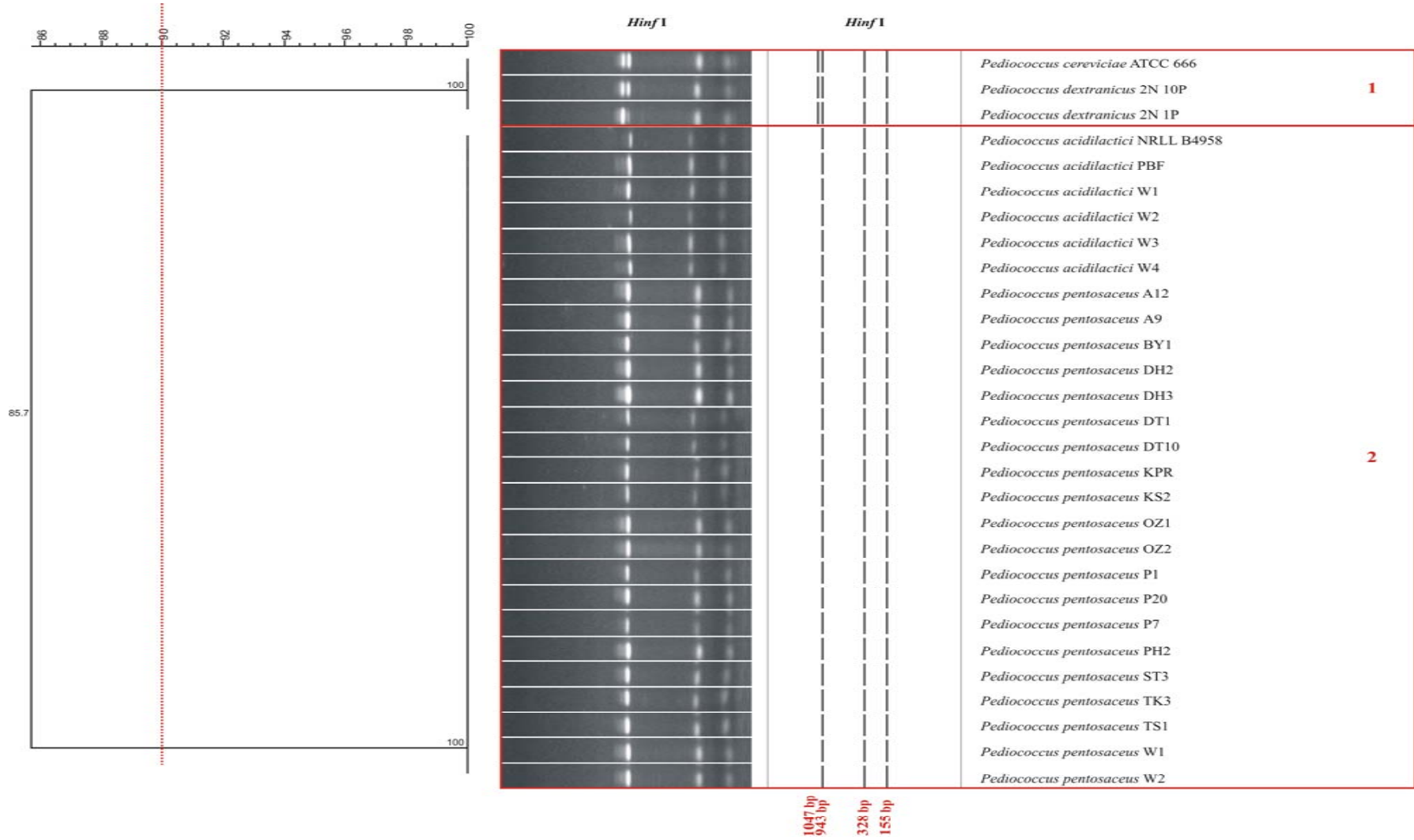
Şekil 4.54b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hae*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.55a *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendogram

	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRL1 B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	100																													
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRL1 B4958	66.7	66.7	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	66.7	66.7	100	100																										
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	66.7	66.7	100	100	100																									
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	66.7	66.7	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	66.7	66.7	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

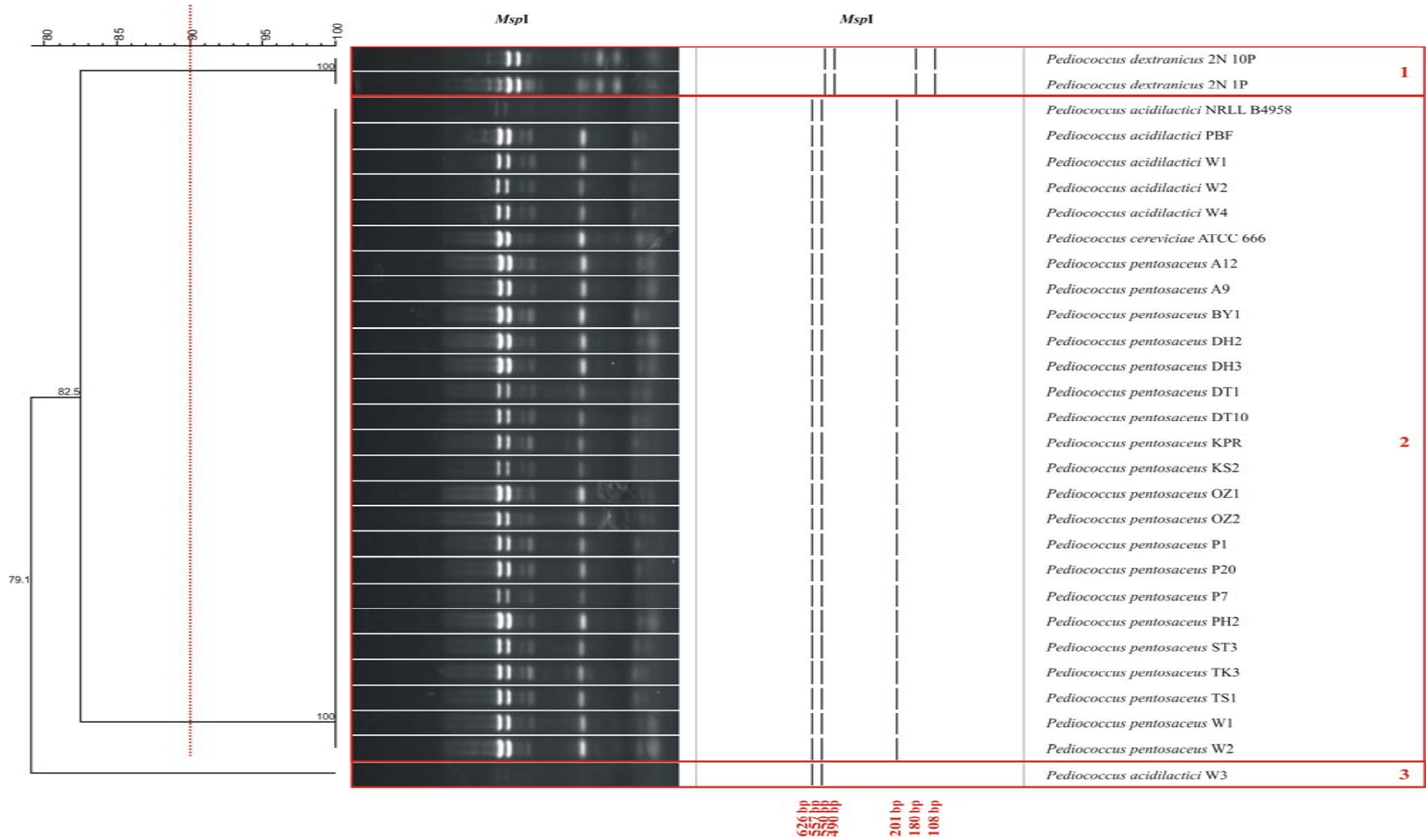
Şekil 4.55b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.56a *HinfI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BV1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2		
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	100																														
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	100	100																													
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	100	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	85,7	85,7	85,7	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	85,7	85,7	85,7	100	100																										
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	85,7	85,7	85,7	100	100	100																									
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BV1	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

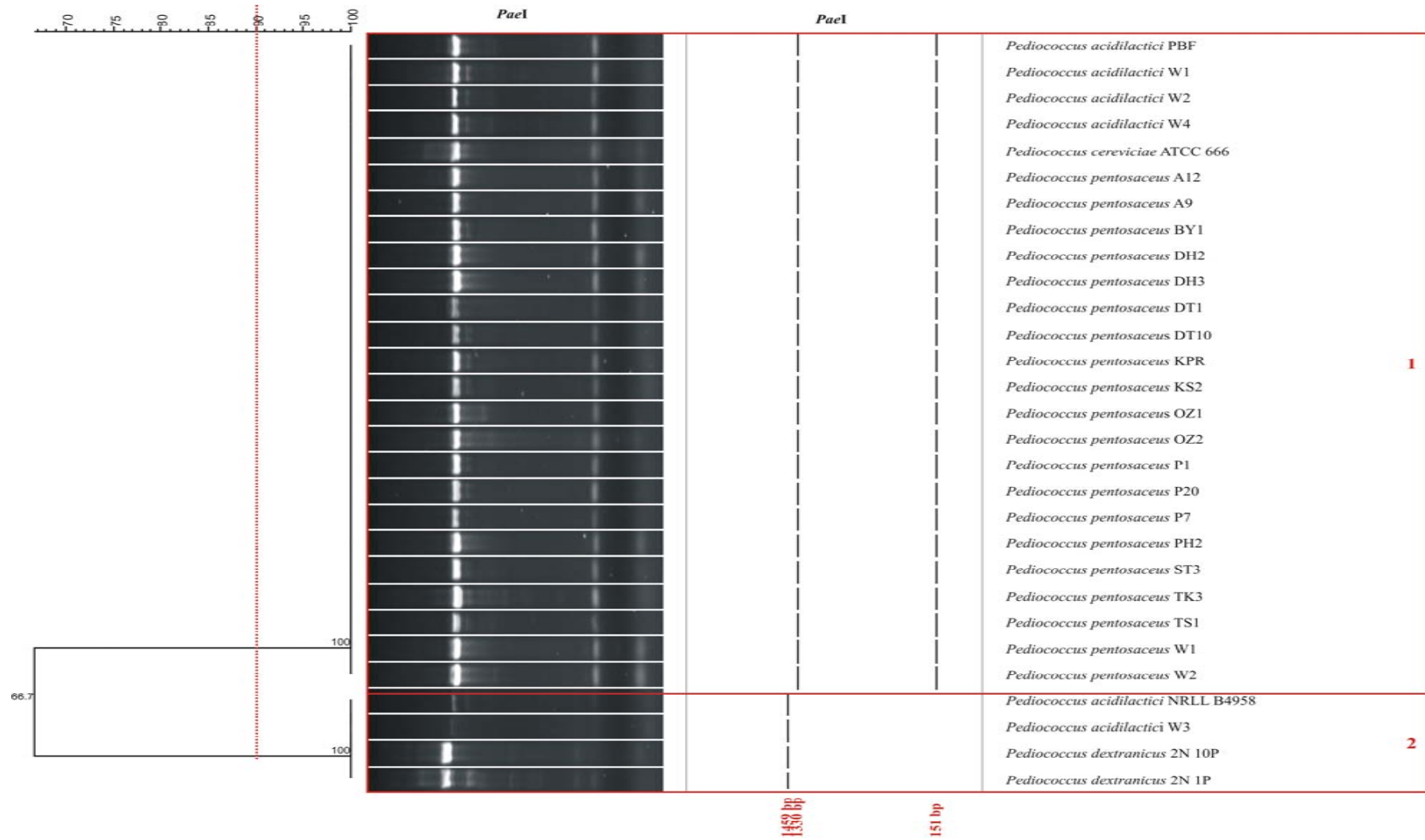
Şekil 4.56b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hinf*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.57a *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	100																													
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	85.7	85.7	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	85.7	85.7	100	100																										
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	85.7	85.7	100	100	100																									
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	85.7	85.7	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	85.7	85.7	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	57.1	57.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	85.7	85.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	66.7	66.7	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100

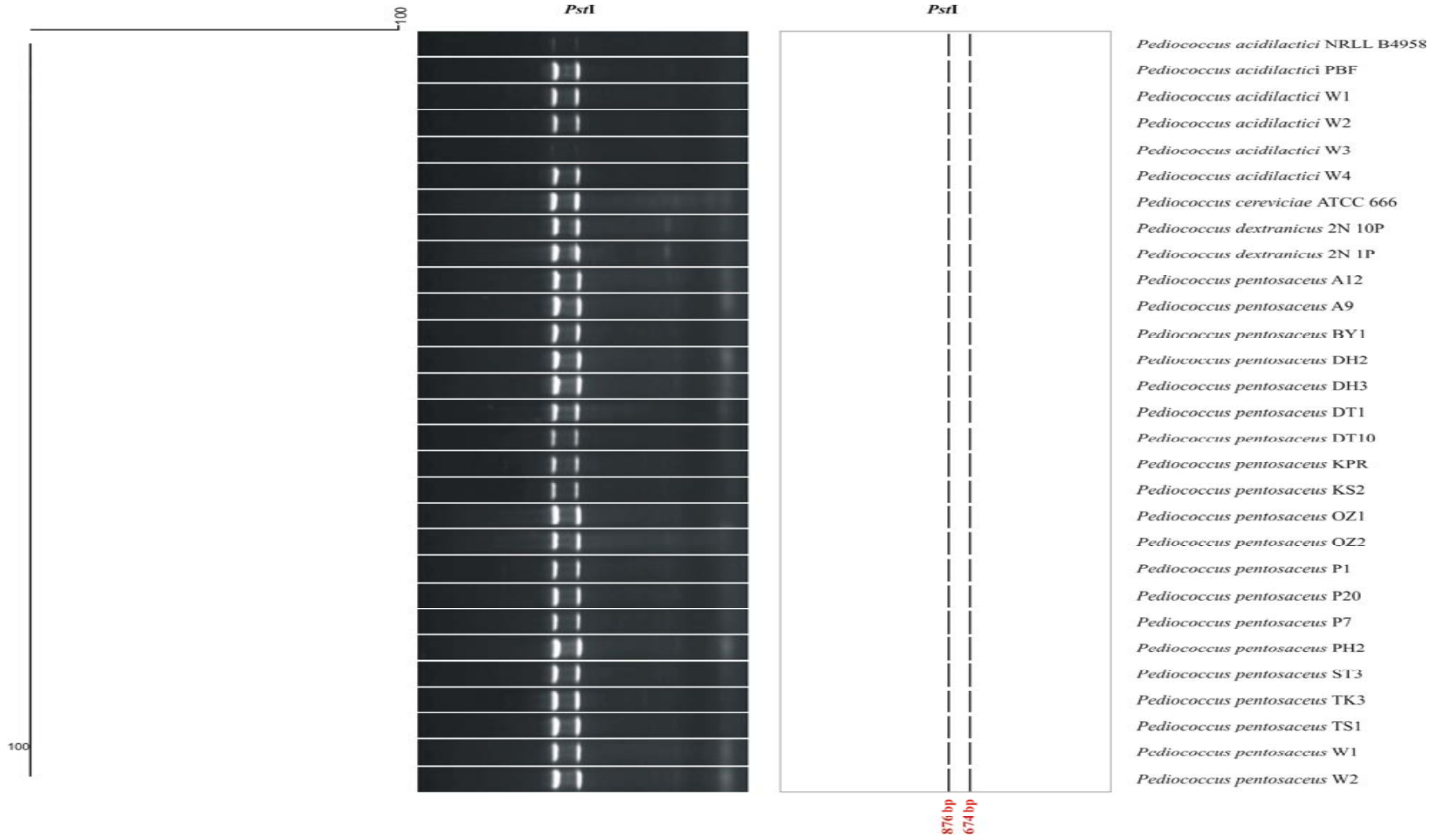
Şekil 4.57b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.58a *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRL1 B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P				
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	100																																
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	100	100																															
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	100	100	100																														
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	100	100	100	100																													
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	100	100	100	100	100																												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	100	100	100	100	100	100																											
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	100	100	100	100	100	100	100																										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	100	100	100	100	100	100	100	100																									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRL1 B4958	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100			
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100		
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100

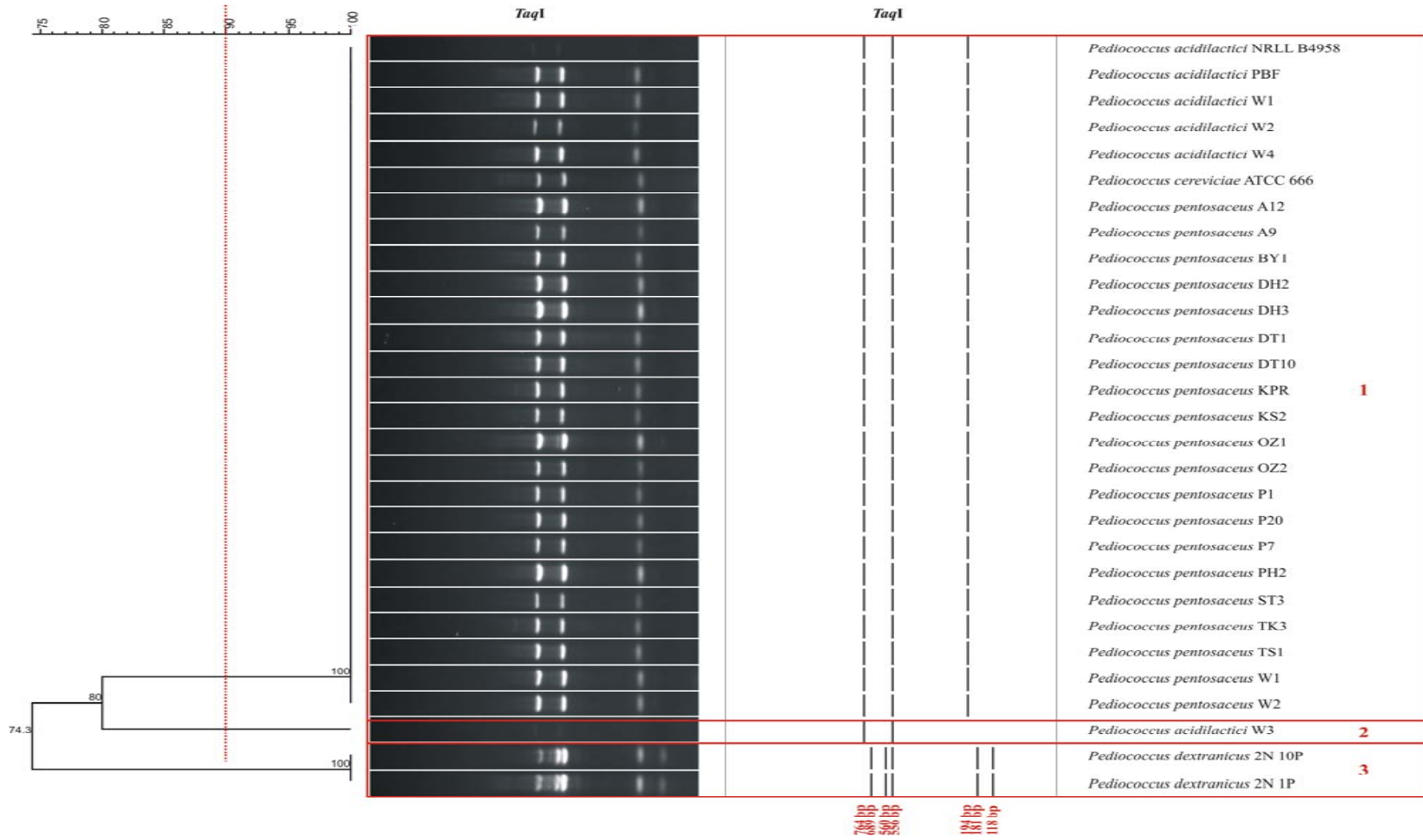
Şekil 4.58b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.59a *PstI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	100																													
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	100	100	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	100	100	100	100																										
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	100	100	100	100	100																									
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	100	100	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

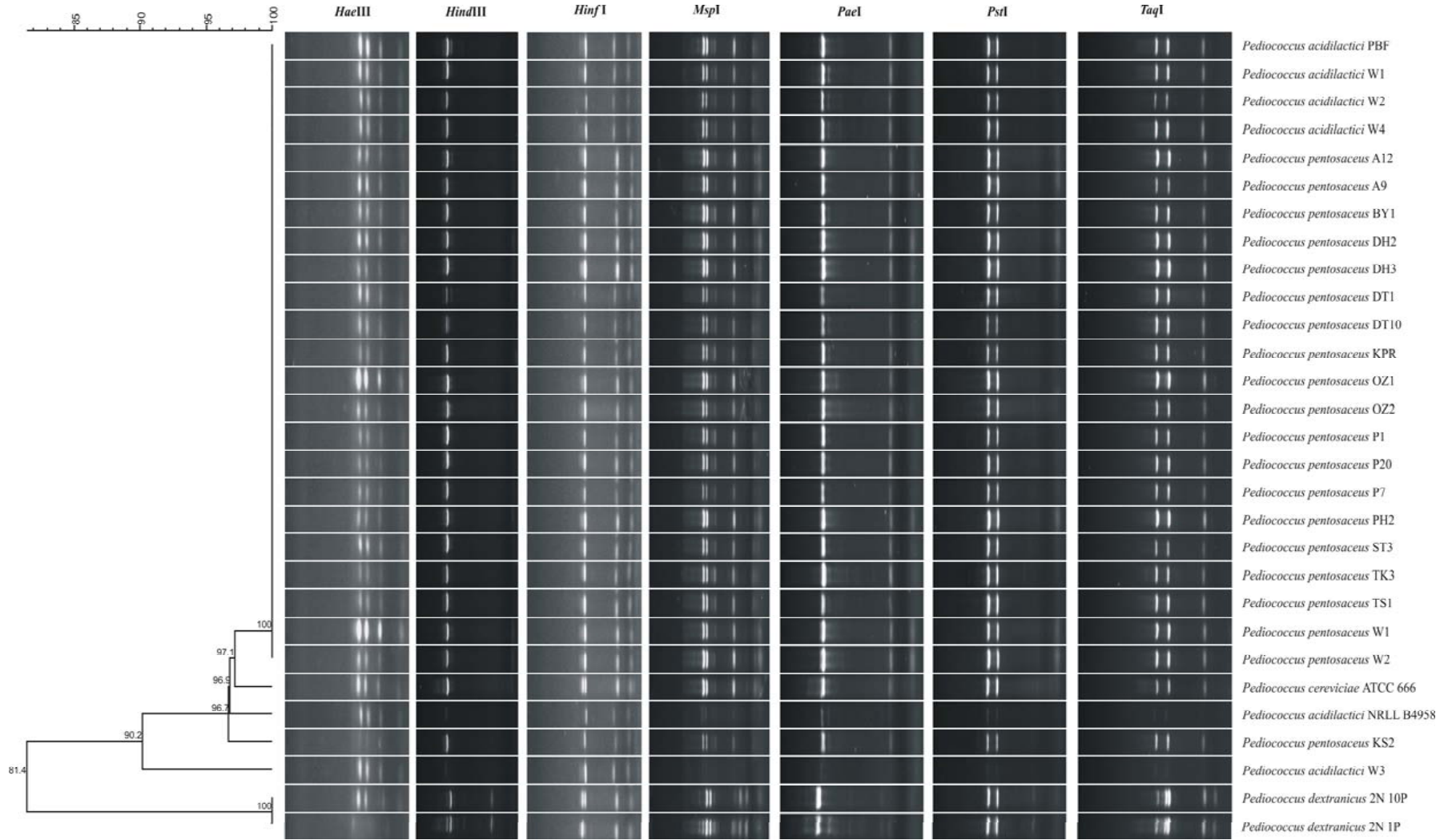
Şekil 4.59b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *PstI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



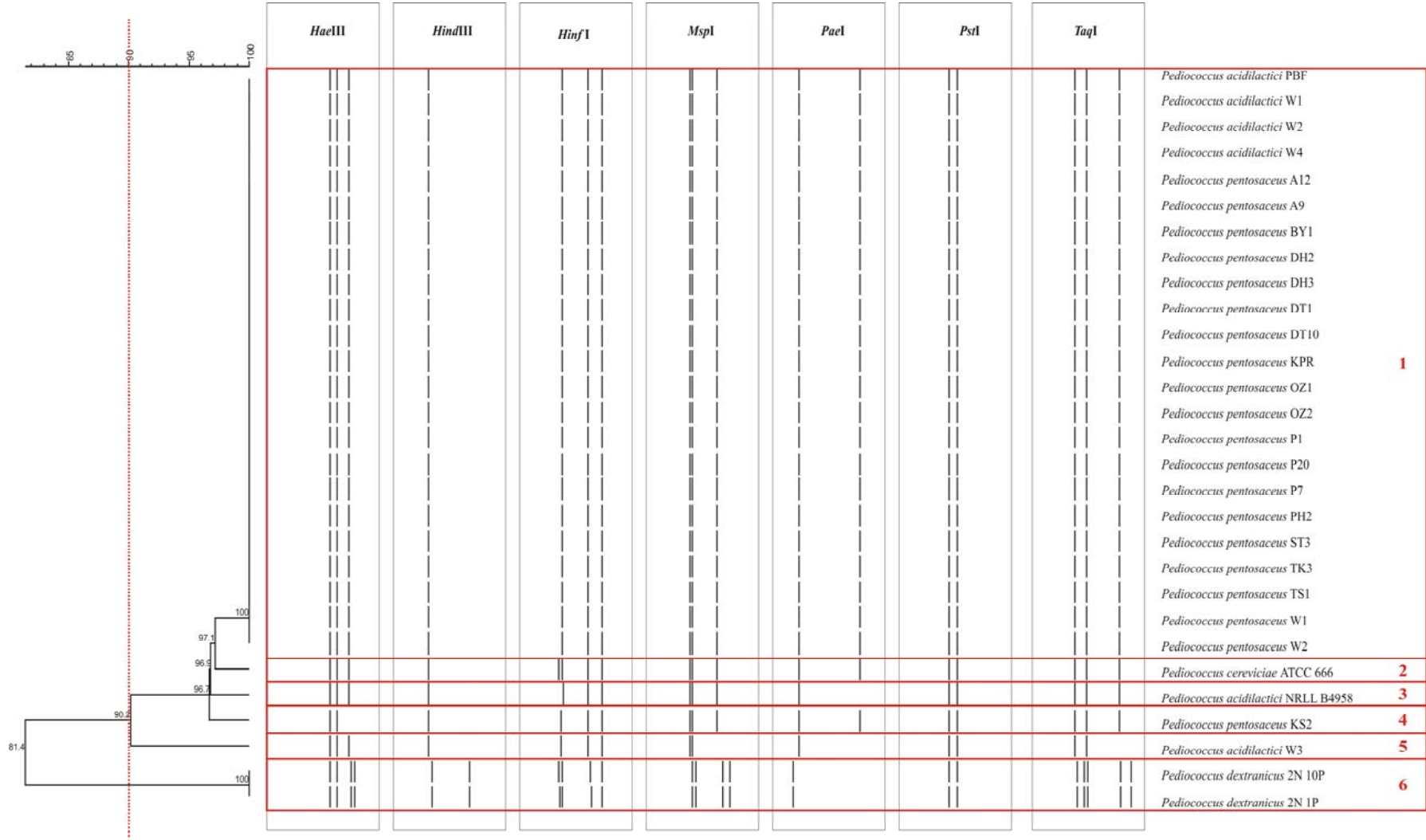
Şekil 4.60a *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	100																													
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	100	100	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	100	100	100	100																										
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	100	100	100	100	100																									
<i>Pediococcus cereviciae</i> ATCC 666	100	100	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0			
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	57.1	100	
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	57.1	100	100

Şekil 4.60b *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



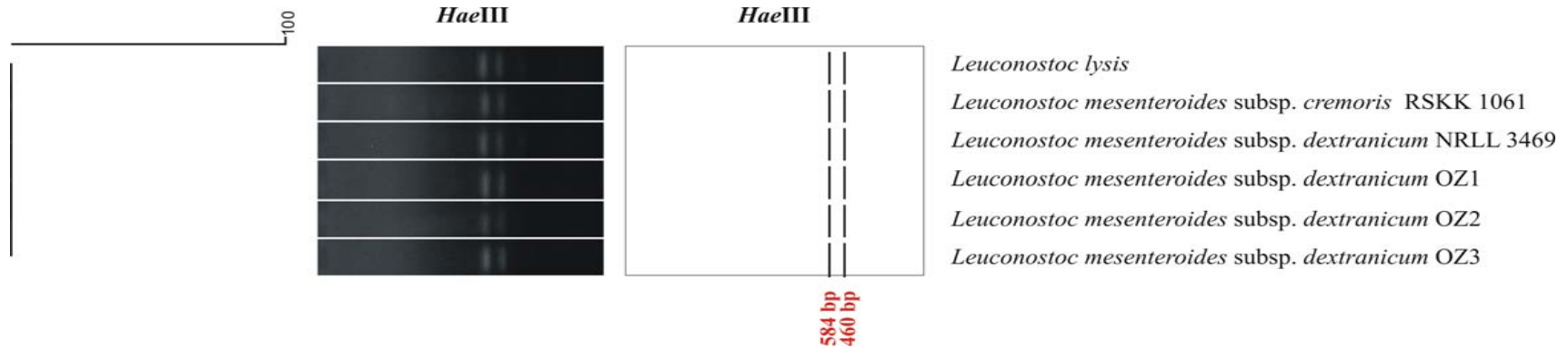
Şekil 4.61a ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram



Şekil 4.61b ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 29 adet *Pediococcus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	
<i>Pediococcus acidilactici</i> PBF	100																													
<i>Pediococcus acidilactici</i> W1	100	100																												
<i>Pediococcus acidilactici</i> W2	100	100	100																											
<i>Pediococcus acidilactici</i> W4	100	100	100	100																										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A12	100	100	100	100	100																									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> A9	100	100	100	100	100	100																								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> BY1	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH2	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DH3	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT10	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KPR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZ2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Pediococcus pentosaceus</i> P7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PH2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ST3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TK3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TS1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Pediococcus pentosaceus</i> W2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Pediococcus cerevisiae</i> ATCC 666	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	100						
<i>Pediococcus acidilactici</i> NRLL B4958	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	94.1	100					
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KS2	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	94.1	93.8	100				
<i>Pediococcus acidilactici</i> W3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	87.5	93.3	86.7	100			
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 10P	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	76.9	82.1	82.1	82.1	82.1	76.9	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	85.0	84.2	79.0	77.8	100		
<i>Pediococcus dextranicus</i> 2N 1P	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	76.9	82.1	82.1	82.1	82.1	76.9	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	82.1	85.0	84.2	79.0	77.8	100	100	

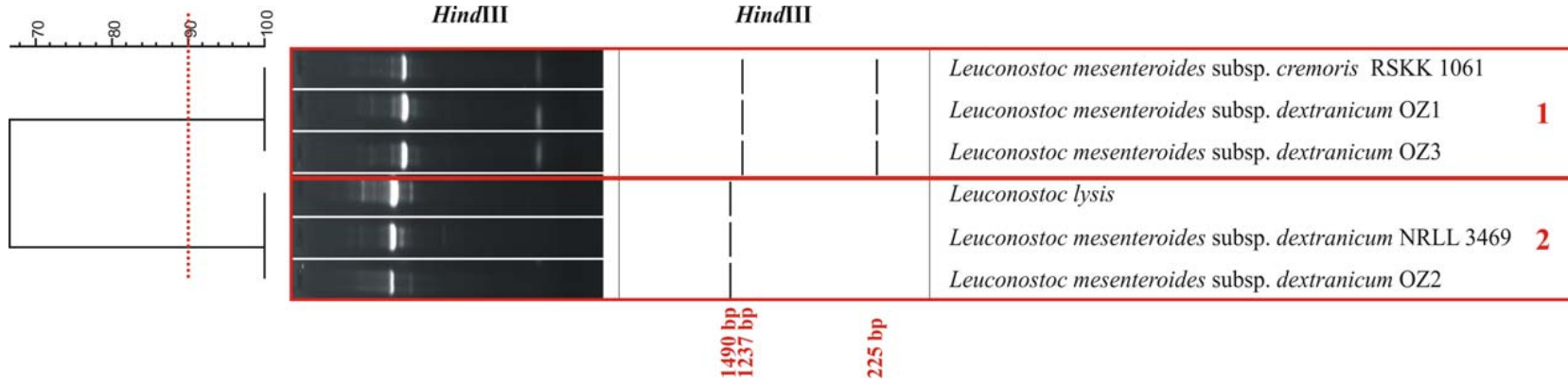
Şekil 4.61c *Pediococcus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.62a *HaeIII* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

	<i>Leuconostoc lysis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3
<i>Leuconostoc lysis</i>	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	100	100	100			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	100	100	100	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	100	100	100	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	100	100	100	100	100	100

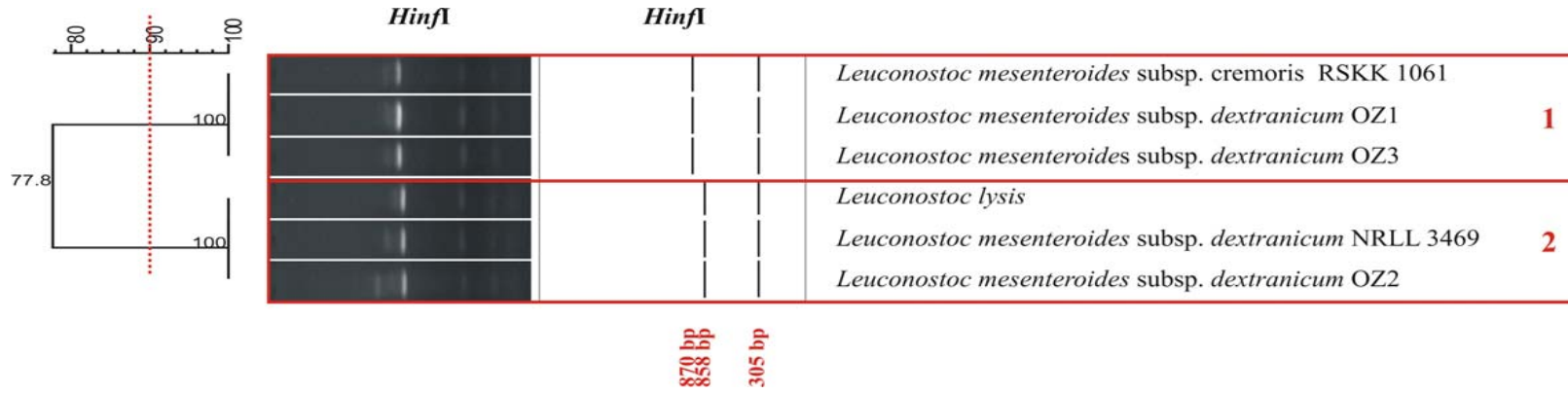
Şekil 4.62b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *Hae*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.63a *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	100	100	100			
<i>Leuconostoc lysis</i>	66.7	66.7	66.7	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	66.7	66.7	66.7	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	66.7	66.7	66.7	100	100	100

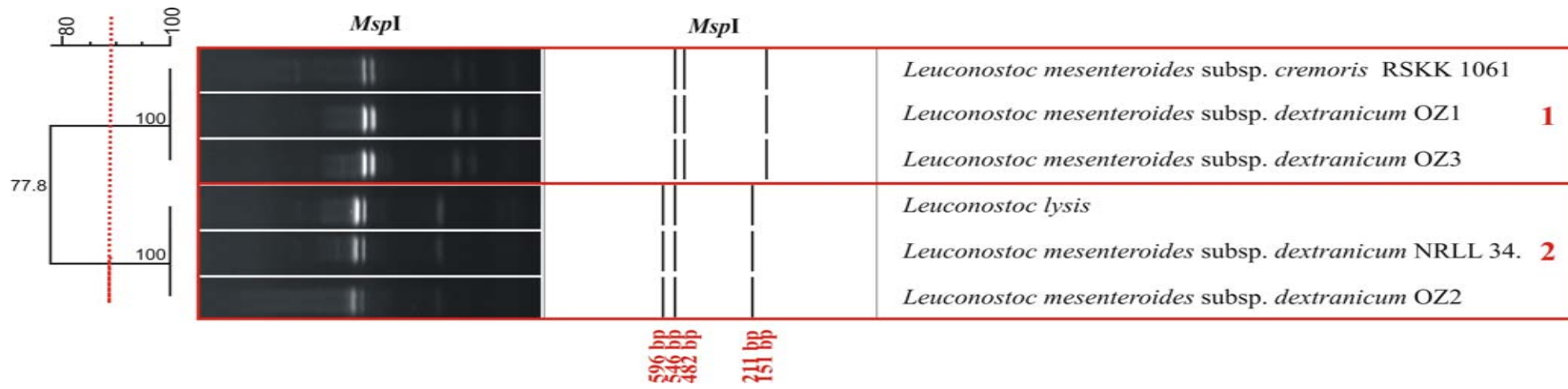
Şekil 4.63b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.64a *Hinf*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	<i>Leuconostoc lysis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	100	100	100			
<i>Leuconostoc lysis</i>	50.0	100	100	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	50.0	50.0	50.0	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	100	100	100	100	100	100

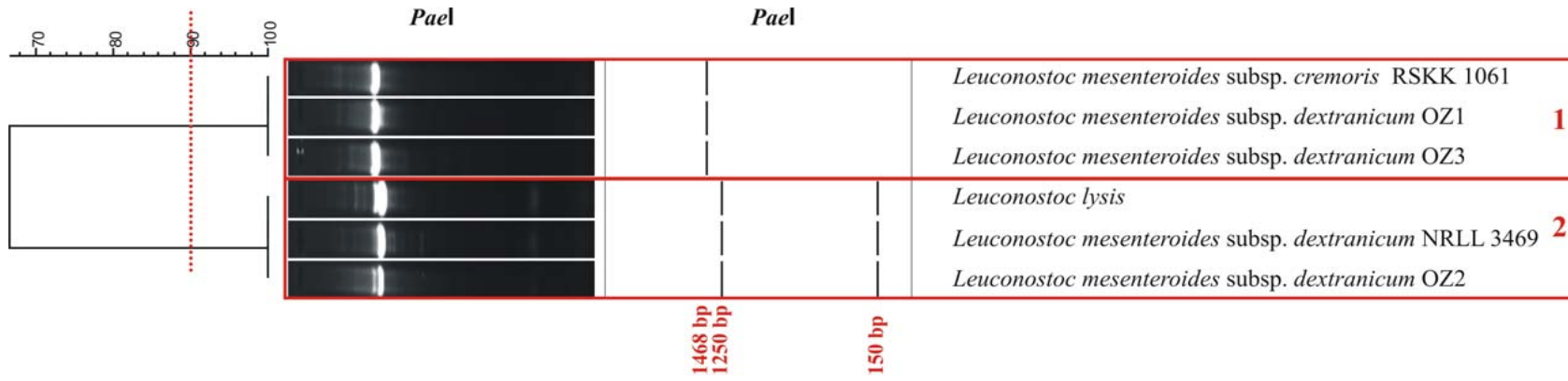
Şekil 4.64b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *Hinf*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.65a *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	<i>Leuconostoc lysis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 34.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	100	100	100			
<i>Leuconostoc lysis</i>	66.7	100	66.7	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 34.	66.7	66.7	66.7	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	100	100	66.7	100	100	100

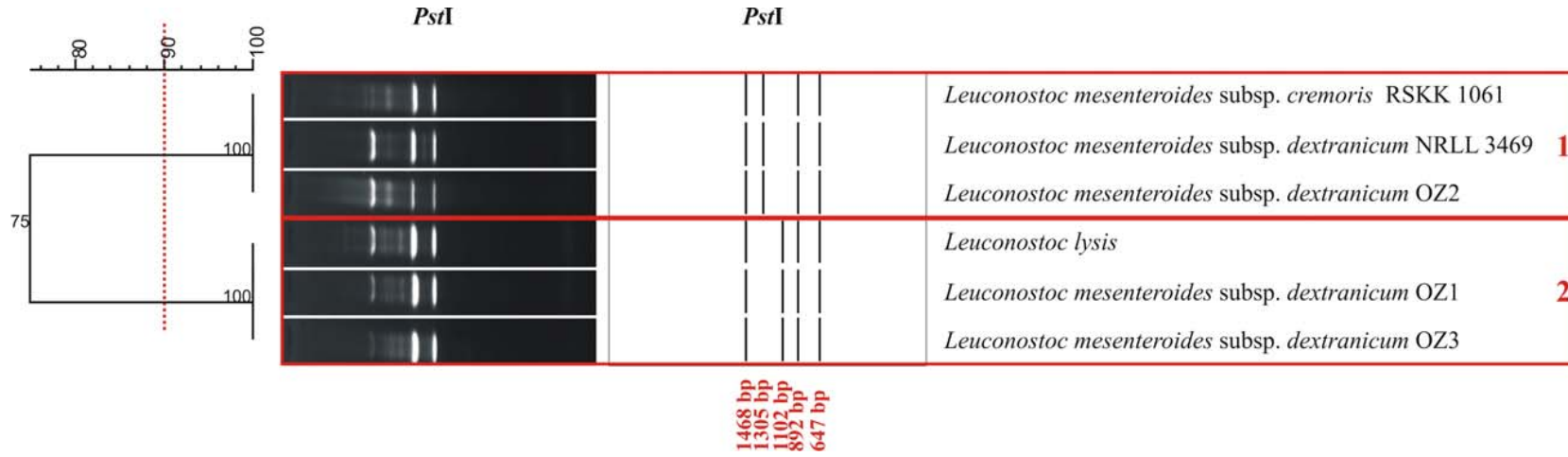
Şekil 4.65b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.66a *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	<i>Leuconostoc lysis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	100	100	100			
<i>Leuconostoc lysis</i>	66.7	66.7	66.7	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	66.7	66.7	66.7	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	66.7	66.7	66.7	100	100	100

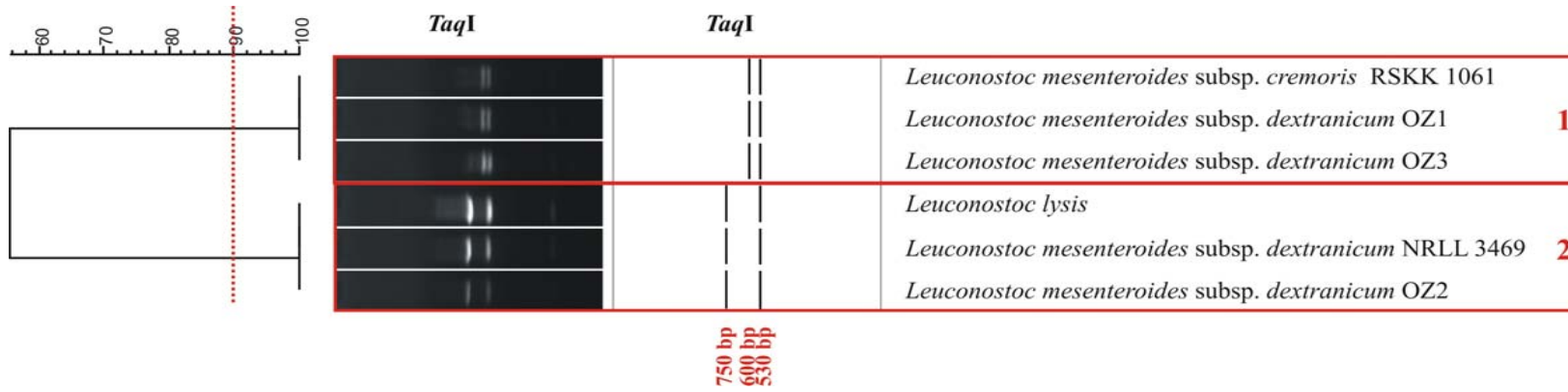
Şekil 4.66b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.67a *PstI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	100	100	100			
<i>Leuconostoc lysis</i>	75.0	75.0	75.0	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	75.0	75.0	75.0	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	75.0	75.0	75.0	100	100	100

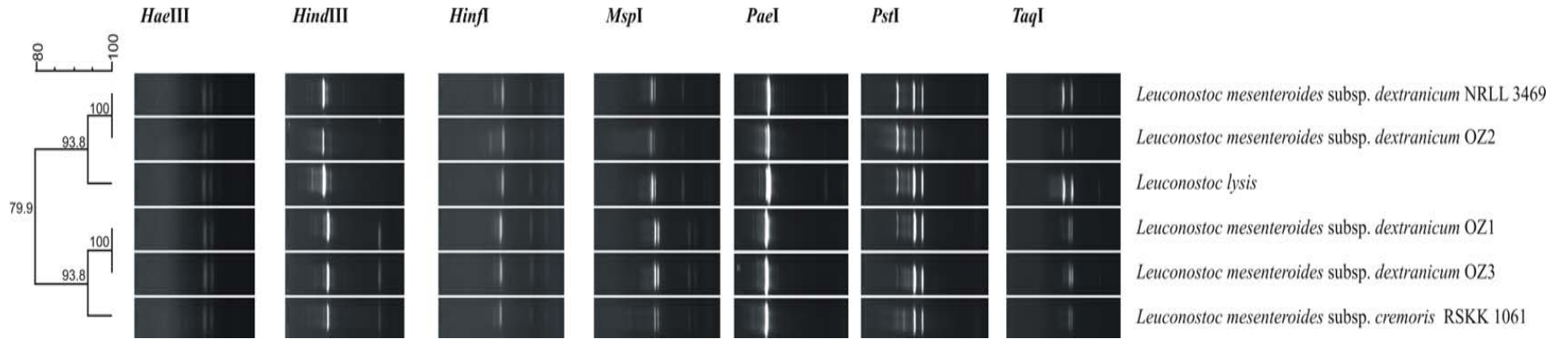
Şekil 4.67b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *PstI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



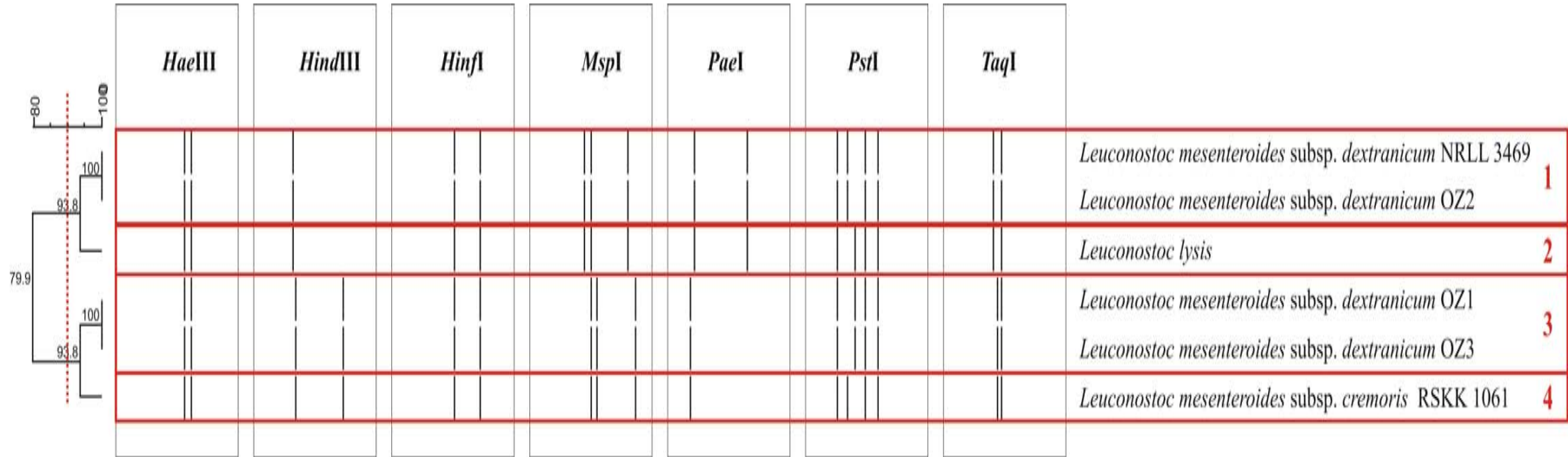
Şekil 4.68a *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	<i>Leuconostoc lysis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	100	100				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	100	100	100			
<i>Leuconostoc lysis</i>	50.0	50.0	100	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	50.0	50.0	50.0	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	50.0	50.0	50.0	100	100	100

Şekil 4.68b *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



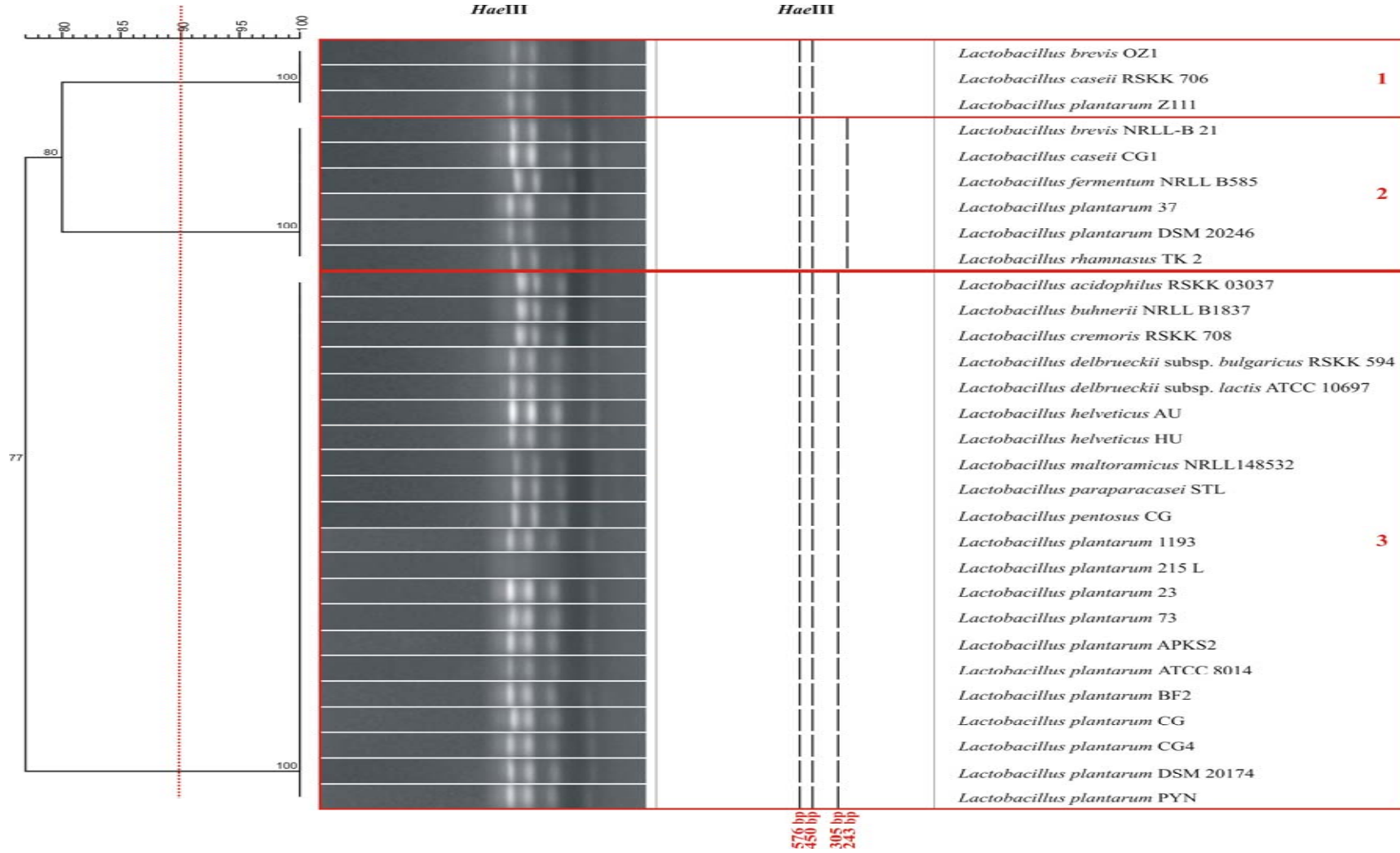
Şekil 4.69a ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram



Şekil 4.69b ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 6 adet *Leuconostoc* suşlarına ait dendrogram

	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	<i>Leuconostoc lysis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NRLL 3469	100					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ2	100	100				
<i>Leuconostoc lysis</i>	93.8	93.8	100			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ1	75.0	81.3	87.5	100		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> OZ3	68.8	81.3	87.5	100	100	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> RSKK 1061	75.0	87.5	75.0	93.8	93.8	100

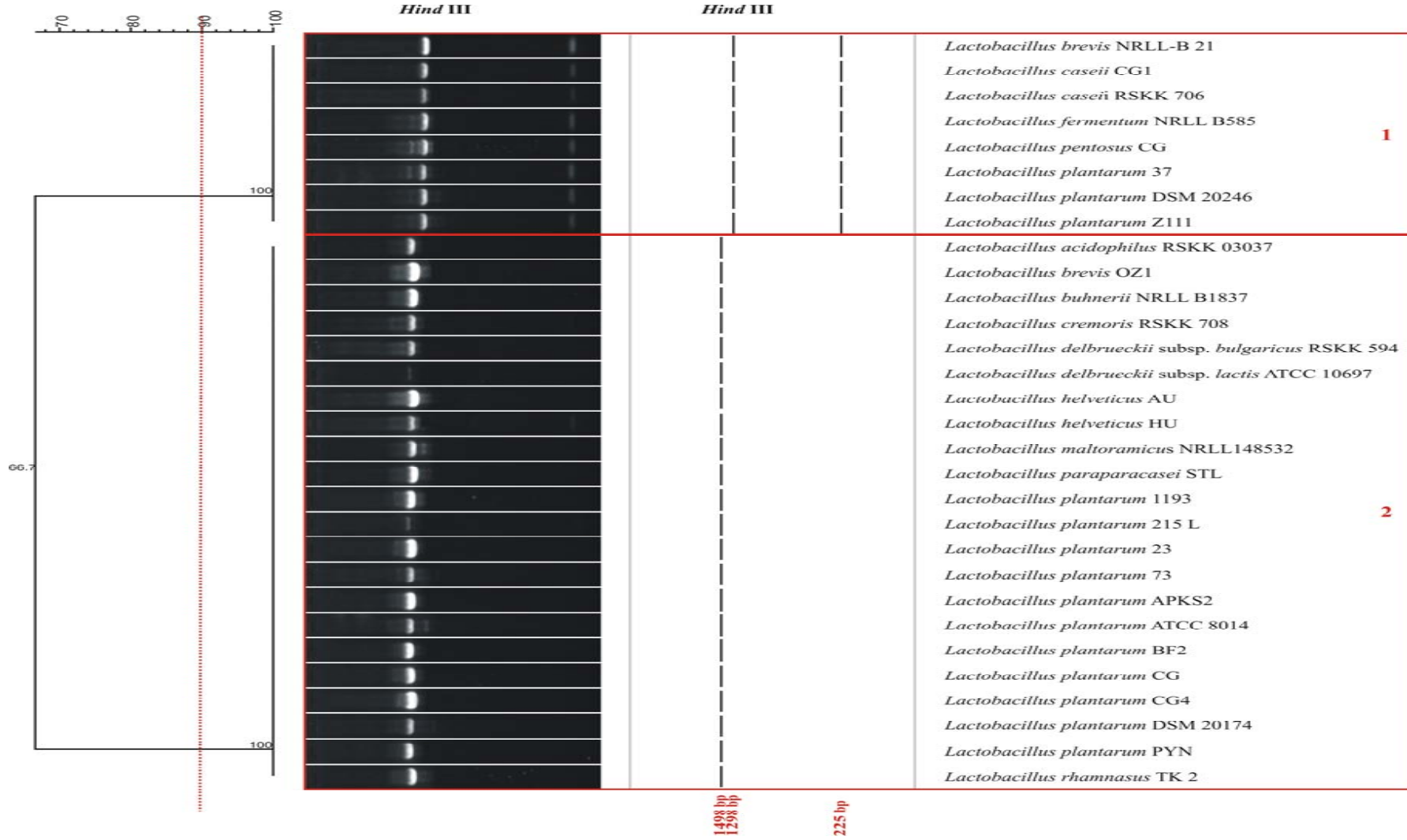
Şekil 4.69c *Leuconostoc* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.70a *HaeIII* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA’ından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Lactobacillus brevis</i> OZI	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	<i>Lactobacillus brevis</i> NRL1-B 21	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRL1.B585	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus buchneri</i> NRL1.B1837	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lacticis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus multivorans</i> NRL1.148532	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	
<i>Lactobacillus brevis</i> OZI	100																														
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	100	100																													
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	100	100	100																												
<i>Lactobacillus brevis</i> NRL1-B 21	80.0	80.0	80.0	100																											
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	80.0	80.0	80.0	100	100																										
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRL1.B585	80.0	80.0	80.0	100	100	100																									
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100																								
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100																							
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100																						
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	100	66.7	100																					
<i>Lactobacillus buchneri</i> NRL1.B1837	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	100	66.7	100	100																				
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	100	100	66.7	100	100	100																			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100																		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lacticis</i> ATCC 10697	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100																	
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	100	100	66.7	100	100	100	100	100	100																
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	100	100	66.7	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Lactobacillus multivorans</i> NRL1.148532	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	100	100	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	100	100	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	100	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	80.0	80.0	80.0	66.7	66.7	66.7	100	100	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

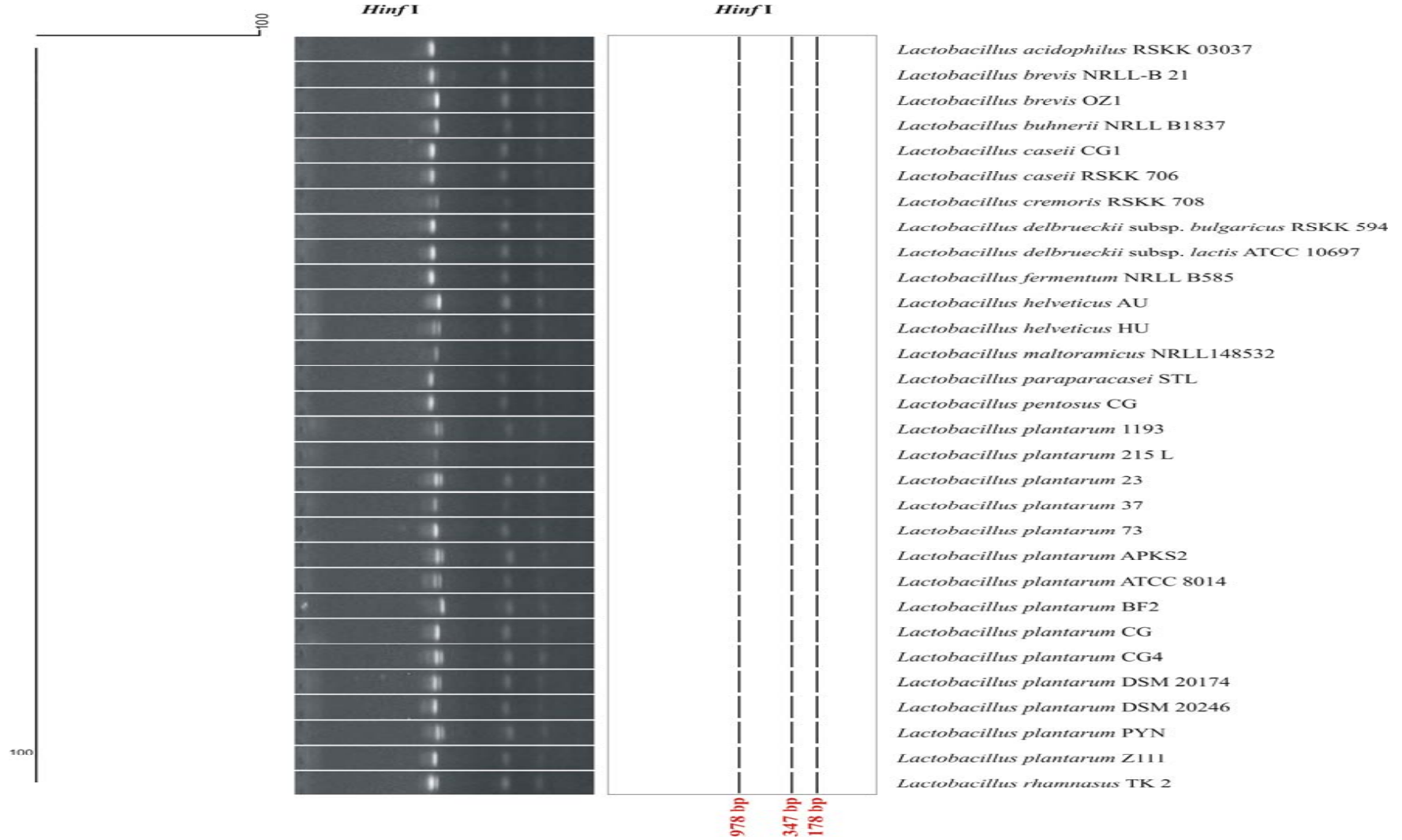
Şekil 4.70b *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hae*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



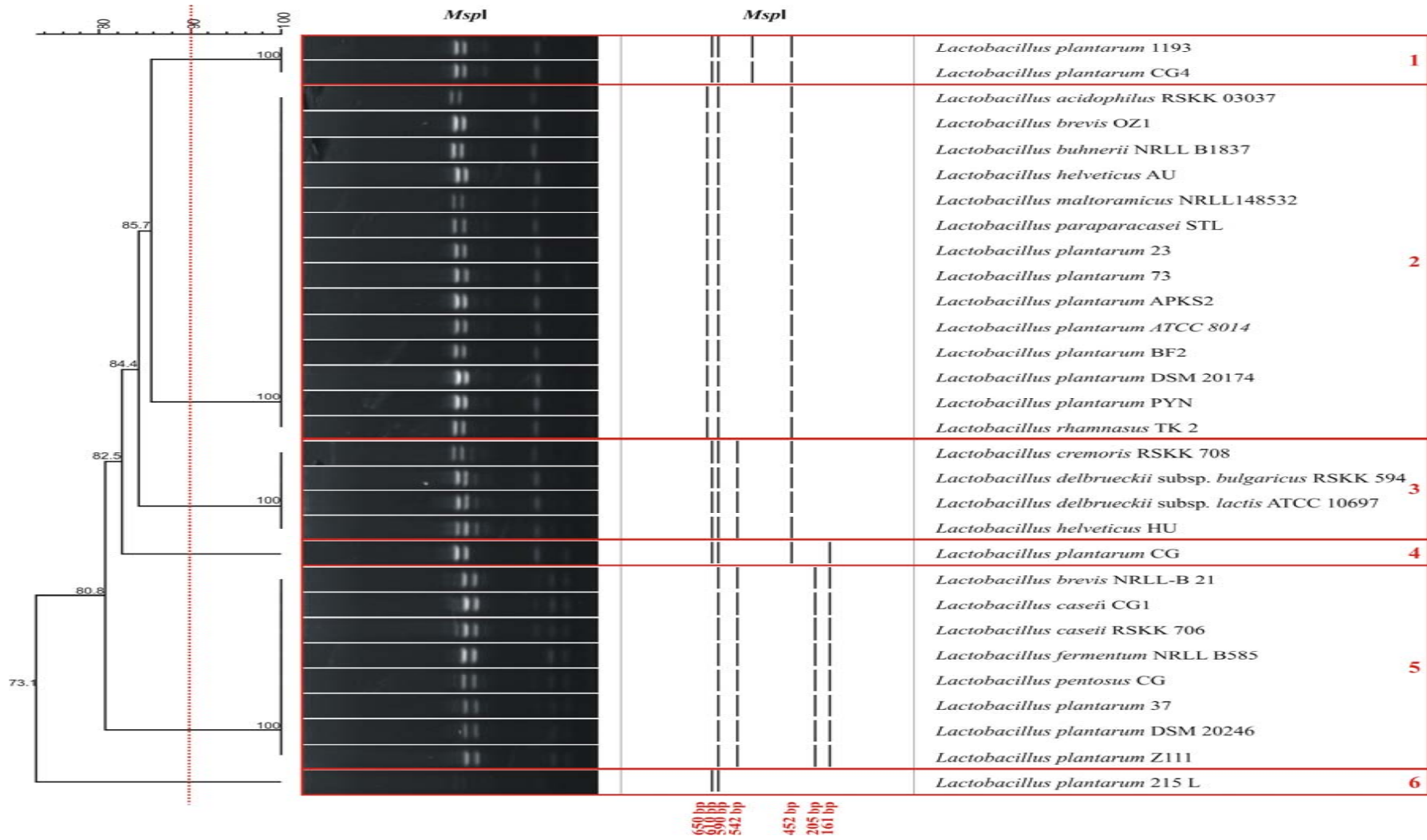
Şekil 4.71a *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus brevis</i> OZI	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRLL B1837	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus mularamicus</i> NRLL148532	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2			
100																																
100	100																															
100	100	100																														
100	100	100	100																													
100	100	100	100	100																												
100	100	100	100	100	100	100																										
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100																								
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100																							
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100																						
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100																					
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100																				
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100																			
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100																		
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100																	
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Şekil 4.71b *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan *Hind*III enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



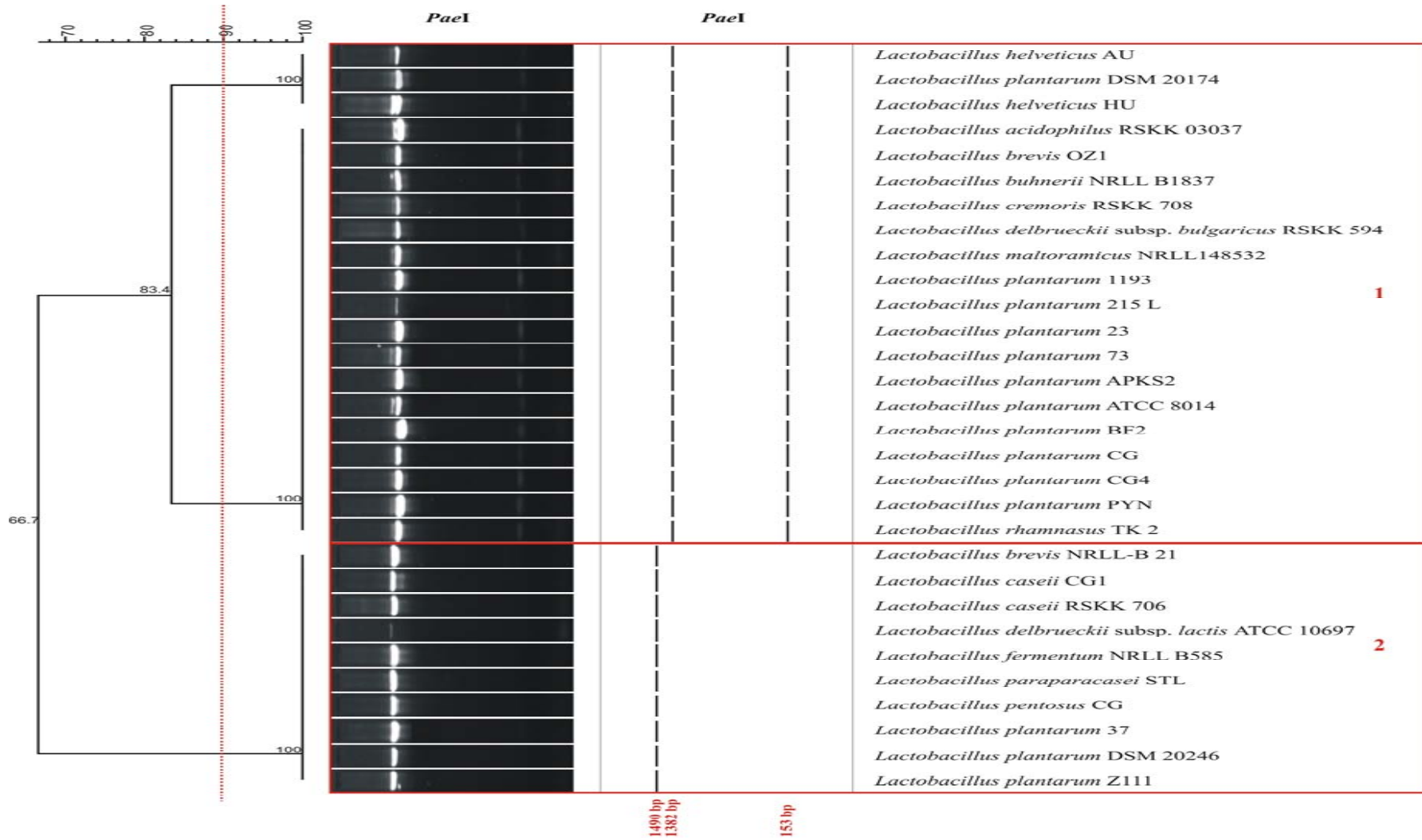
Şekil 4.72a *HinfI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram



Şekil 4.73a *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus brevis</i> OZI	<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus multorum</i> NRLL148532	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> WF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L			
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	100																																
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	100	100																															
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	85,7	85,7	100																														
<i>Lactobacillus brevis</i> OZI	85,7	85,7	100	100																													
<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	85,7	85,7	100	100	100																												
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	85,7	85,7	100	100	100	100																											
<i>Lactobacillus multorum</i> NRLL148532	85,7	85,7	100	100	100	100	100																										
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100																									
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100																								
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Lactobacillus plantarum</i> WF2	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2	85,7	85,7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	100																
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	100	100															
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	100	100	100														
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	100	100	100	100													
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	100												
<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100											
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100	100										
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100	100	100									
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100	100	100	100								
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100	100	100	100	100							
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	57,1	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	57,1	57,1	85,7	75,0	50,0	50,0	75,0	75,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	50,0	50,0	75,0	75,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	75,0	75,0	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	66,7	66,7	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7	100	

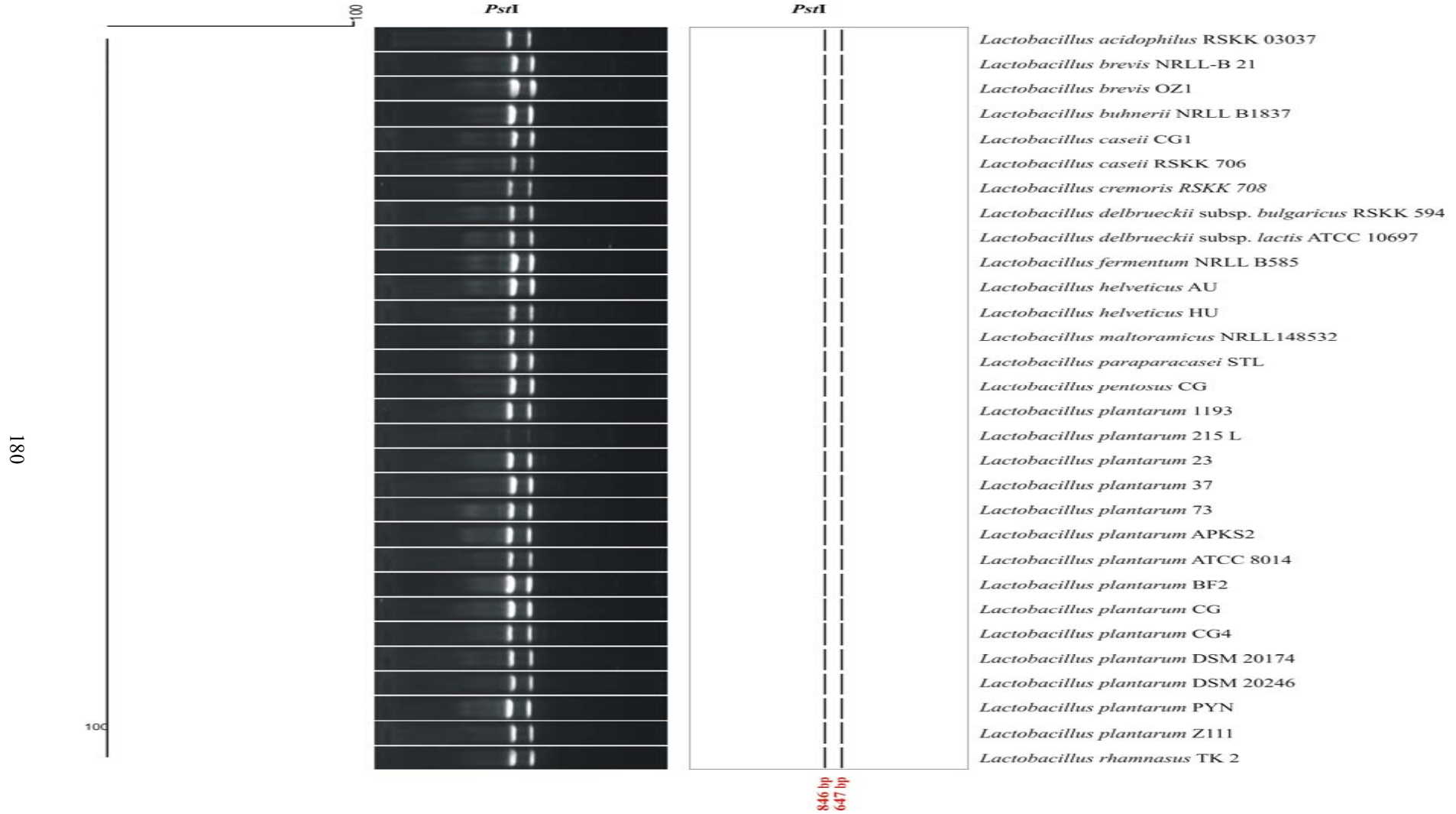
Şekil 4.73b *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan *MspI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.74a *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus malvaramicus</i> NRLL148532	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	100																													
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	100	100																												
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	100	100	100																											
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	50.0	50.0	50.0	100																										
<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	100	100	50.0	100	100																									
<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	50.0	50.0	50.0	100	100	100																								
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	50.0	50.0	50.0	100	100	100	100																							
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Lactobacillus malvaramicus</i> NRLL148532	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	100	100	50.0	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	100	100	50.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	100	100	50.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	50.0	50.0	50.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2	100	100	50.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7	66.7

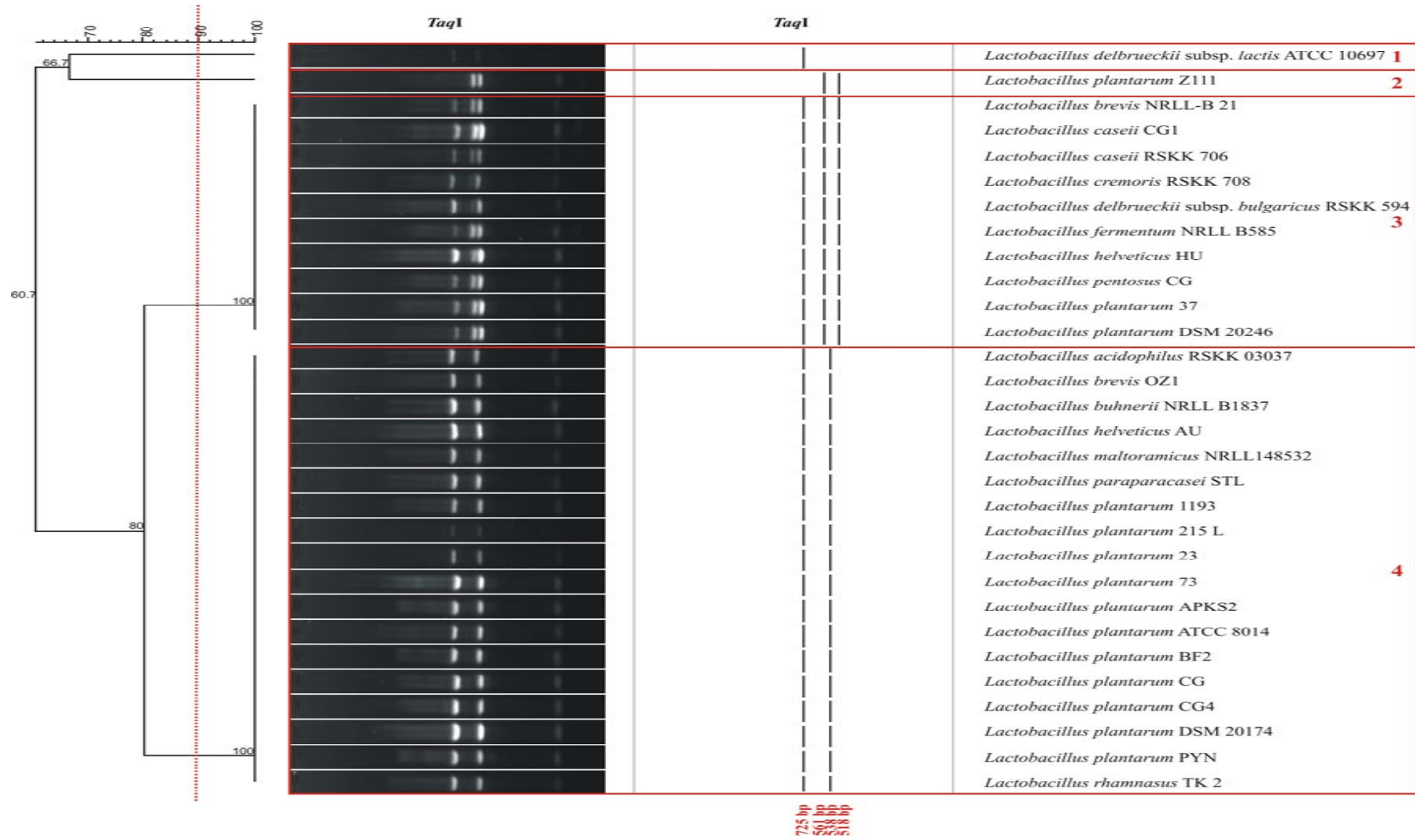
Şekil 4.74b *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan *PaeI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.75a *Pst*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus brevis</i> NRL1-B 21	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRL1.B1837	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRL1.B585	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus malorumenicus</i> NRL1.148532	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK.2	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	100																														
<i>Lactobacillus brevis</i> NRL1-B 21	100	100																													
<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	100	100	100																												
<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRL1.B1837	100	100	100	100																											
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	100	100	100	100	100																										
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	100	100	100	100	100	100																									
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	100	100	100	100	100	100	100																								
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	100	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	100	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRL1.B585	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																				
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																			
<i>Lactobacillus malorumenicus</i> NRL1.148532	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																		
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																	
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100															
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK.2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

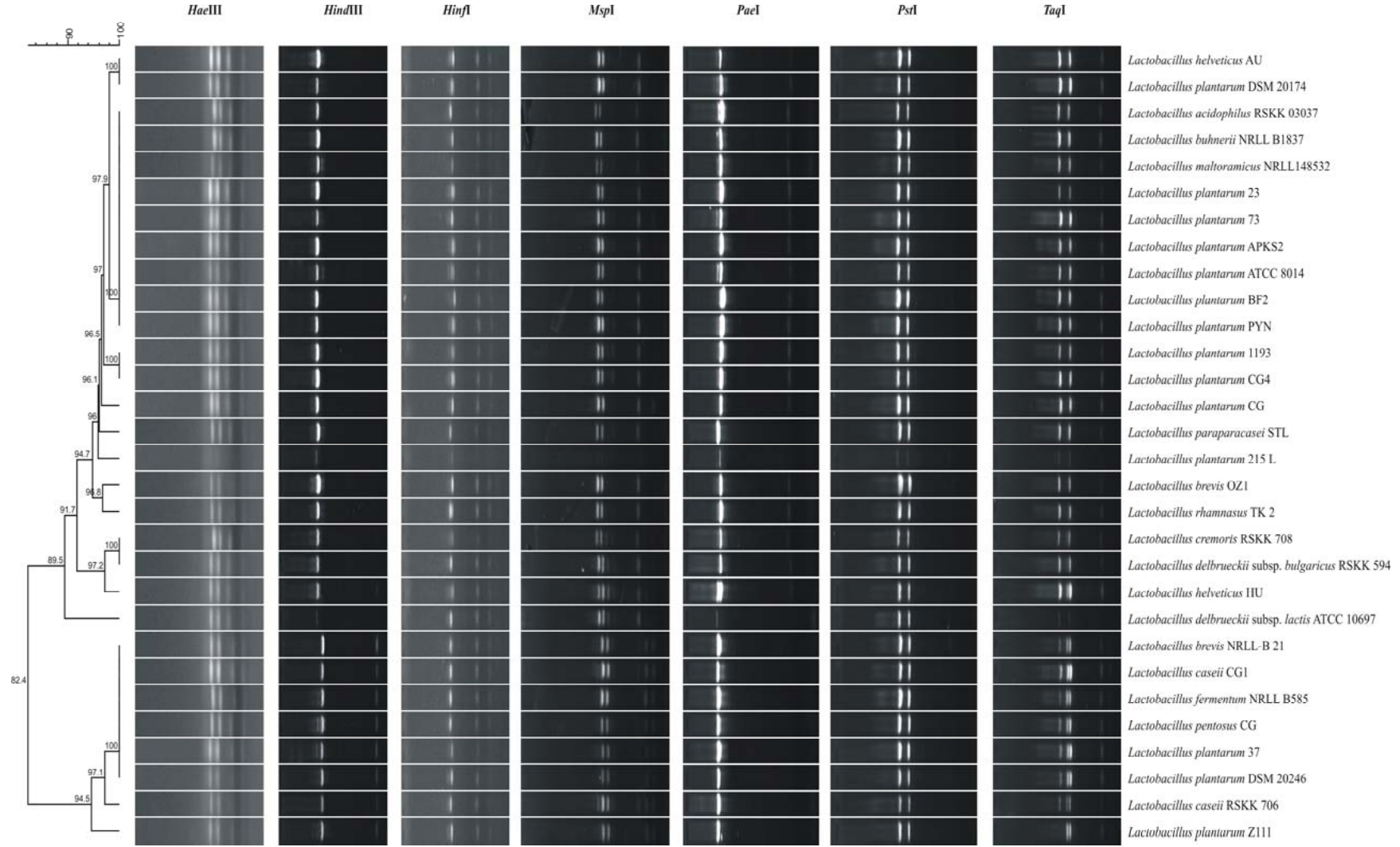
Şekil 4.75b *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan *Pst*I enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



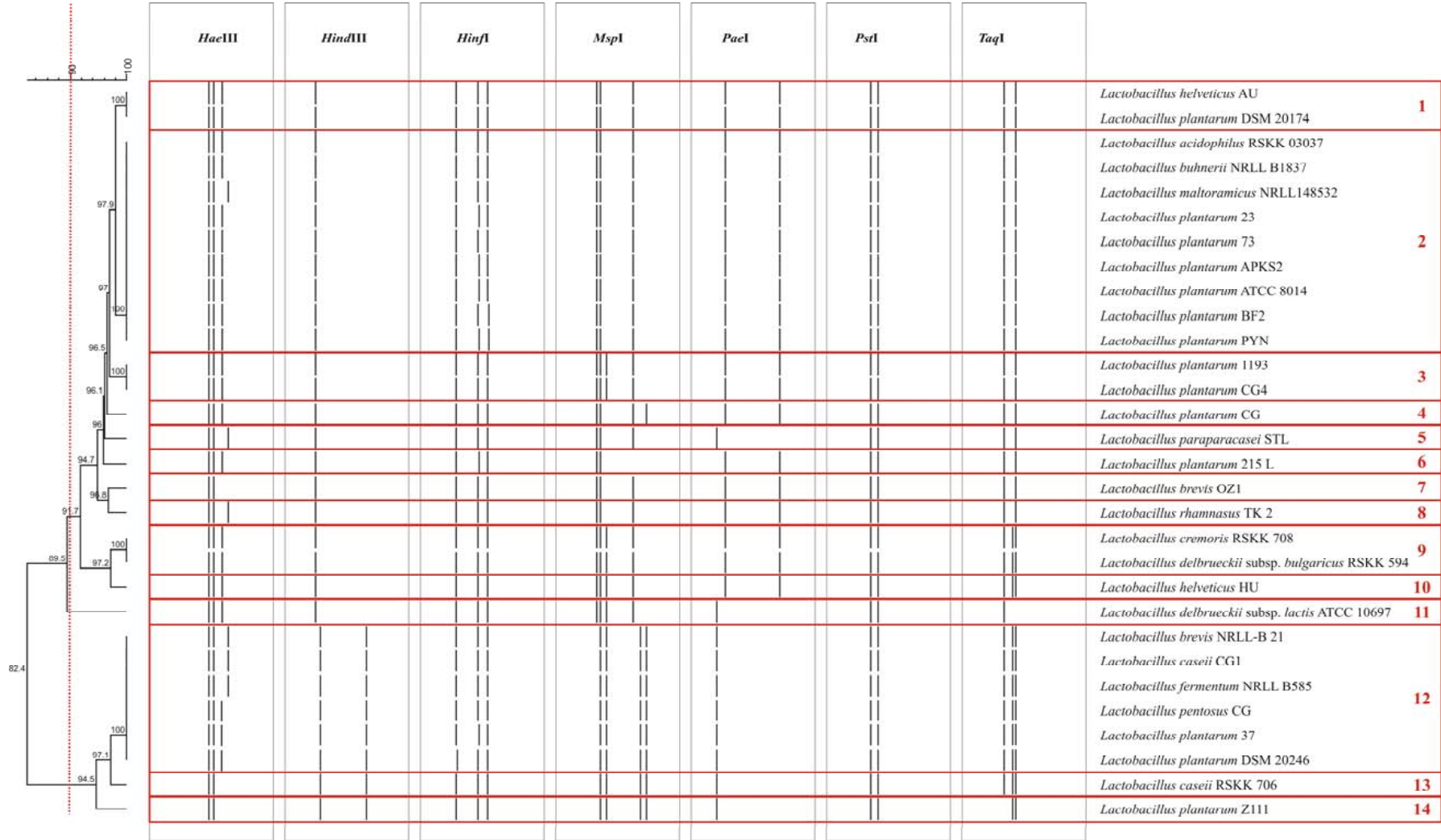
Şekil 4.76a *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus maitoramicus</i> NRLL 148532	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> TK 2		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	100																																
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	66.7	100																															
<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	50.0	80.0	100																														
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	50.0	80.0	100	100																													
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	50.0	80.0	100	100	100																												
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	50.0	80.0	100	100	100	100																											
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	50.0	80.0	100	100	100	100	100																										
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	50.0	80.0	100	100	100	100	100	100																									
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	50.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100																								
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	50.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	50.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100																						
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	50.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																					
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100																				
<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100																			
<i>Lactobacillus buchneri</i> NRLL B1837	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100																		
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100																	
<i>Lactobacillus maitoramicus</i> NRLL 148532	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100																
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100															
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100														
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100													
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100												
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100											
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100										
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
<i>Lactobacillus plantarum</i> TK 2	66.7	50.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			

Şekil 4.76b *Lactobacillus c* suşları temel alınarak oluşturulan *TaqI* enzimi ile oluşan ARDRA paternlerinin UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi



Şekil 4.77a ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram



Şekil 4.77b ARDRA paternlerinin UPGMA'sından elde edilen 30 adet *Lactobacillus* suşlarına ait dendrogram

	<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRLL B1837	<i>Lactobacillus malvaramicus</i> NRLL148532	<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	<i>Lactobacillus rhamnusius</i> TK 2	<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	<i>Lactobacillus casei</i> CG1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111				
<i>Lactobacillus helveticus</i> AU	100																																	
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20174	100	100																																
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RSKK 03037	93.8	93.8	100																															
<i>Lactobacillus buhnerii</i> NRLL B1837	93.8	93.8	100	100																														
<i>Lactobacillus malvaramicus</i> NRLL148532	100	100	100	100	100																													
<i>Lactobacillus plantarum</i> 23	100	100	100	100	100	100																												
<i>Lactobacillus plantarum</i> 73	100	100	100	100	100	100	100																											
<i>Lactobacillus plantarum</i> APKS2	100	100	100	100	100	100	100	100																										
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	100	100	100	100	100	100	100	100	100																									
<i>Lactobacillus plantarum</i> BF2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																								
<i>Lactobacillus plantarum</i> PYN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100																							
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1193	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	100																						
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG4	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	100	100																					
<i>Lactobacillus plantarum</i> CG	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	97.0	94.1	94.1	100																				
<i>Lactobacillus paraparacasei</i> STL	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	93.8	93.8	93.8	100																			
<i>Lactobacillus plantarum</i> 215 L	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	93.8	93.8	93.8	93.3	100																		
<i>Lactobacillus brevis</i> OZ1	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	93.8	93.8	93.8	93.3	93.3	100																	
<i>Lactobacillus rhamnusius</i> TK 2	93.8	93.8	93.8	93.8	100	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	93.8	90.9	90.9	90.9	96.8	90.3	96.8	100																
<i>Lactobacillus cremoris</i> RSKK 708	88.2	88.2	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	91.4	91.4	91.4	90.9	90.9	88.2	100																
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> RSKK 594	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	91.4	91.4	91.4	90.9	90.9	88.2	100	100															
<i>Lactobacillus helveticus</i> HU	94.1	94.1	88.2	88.2	94.1	94.1	94.1	88.2	94.1	94.1	88.2	85.7	91.4	85.7	90.9	90.9	82.4	94.4	100	100														
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 10697	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	90.3	87.5	87.5	87.5	93.3	86.7	86.7	83.9	90.9	90.9	90.9	90.9	100												
<i>Lactobacillus brevis</i> NRLL-B 21	82.4	82.4	82.4	82.4	88.2	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	80.0	80.0	80.0	80.0	90.9	78.8	84.9	88.2	83.3	77.8	83.3	72.7	100											
<i>Lactobacillus casei</i> CG1	82.4	82.4	82.4	82.4	88.2	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	80.0	80.0	80.0	90.9	78.8	84.9	88.2	83.3	83.3	83.3	78.8	100	100											
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRLL B585	82.4	82.4	82.4	82.4	88.2	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	80.0	80.0	80.0	90.9	78.8	84.9	88.2	83.3	83.3	83.3	78.8	100	100	100										
<i>Lactobacillus pentosus</i> CG	82.4	82.4	88.2	88.2	88.2	88.2	88.2	82.4	88.2	82.4	82.4	85.7	80.0	85.7	90.9	84.9	78.8	82.4	88.9	83.3	83.3	78.8	100	100	100	100								
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	82.4	76.5	82.4	82.4	88.2	82.4	82.4	82.4	88.2	82.4	82.4	85.7	80.0	80.0	90.9	78.8	84.9	88.2	88.9	77.8	88.9	72.7	100	100	100	100	100							
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246	82.4	76.5	88.2	88.2	82.4	82.4	82.4	88.2	82.4	82.4	85.7	80.0	80.0	90.9	78.8	84.9	88.2	88.9	77.8	88.9	72.7	100	100	100	100	100	100	100						
<i>Lactobacillus casei</i> RSKK 706	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	84.9	82.4	82.4	82.4	87.5	81.3	87.5	84.9	85.7	80.0	85.7	75.0	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	100					
<i>Lactobacillus plantarum</i> Z111	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	81.3	78.8	78.8	78.8	83.9	77.4	83.9	81.3	82.4	76.5	82.4	77.4	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	94.1	97.0	100			

Şekil 4.77c *Lactobacillus* suşları temel alınarak oluşturulan UPGMA dendrogramından elde edilen benzerlik indeksi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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

Çalışmamızın başlangıcında, A.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonumuzda farklı fenotipik ve biyokimyasal testler ile cins düzeyinde, API CHL50 tanımlama test kit kullanımı ile de tür/alttür düzeyinde tanımlanması önceden yapılmış olan gıda kökenli Laktik Asit Bakterisinin 36 adet *Enterococcus*, 47 adet *Lactococcus*, 29 adet *Pediococcus*, 6 adet *Leuconostoc* ve 30 adet *Lactobacillus* olmak üzere 5 farklı cinsine ait toplam 148 adet suş kullanılmıştır. LAB suşları arasındaki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi için çalışmamızda laktik asit bakterilerine ait önce 148 adet suşun tür, özellikle suş düzeyinde ayrımına ve/veya tiplendirilmesine yönelik olan moleküler tekniklerden ARDRA yöntemi kullanılarak bu yöntem değerlendirilmiştir.

- Çalışmada kullanılan LAB grubuna ait toplam 148 suştan PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen genomik DNA ARDRA çalışmalarında kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

- 5 farklı genusa ait 148 suşun elde edilen genomik DNA 'ları, **pB** (50-70) (5'TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG)3' ve **1492 R** (5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3') primerleri kullanılarak PCR teknolojisi ile çoğaltılmış ve yaklaşık 1458 bp büyüklüğünde olan 16S rDNA bölgesi elde edilmiştir.
- Çalışmada *Ssp I*, *Nhe I*, *Kpn I*, *Hinf I*, *Hind III*, *Hae III*, *Msp I*, *Taq I*, *Pst I*, ve *Pae I* restriksiyon enzimleri beş farklı genusa ait birer örnekle denenmiştir. Bunların arasından kesim noktasına sahip olan 7 tanesi (*Hinf I*, *Hind III*, *Hae III*, *Msp I*, *Taq I*, *Pst I*, ve *Pae I*) çalışmadaki 148 adet suşun ARDRA analizleri için kullanılmıştır.
- Restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin % 1.5 agaroz jel üzerinde ayrılan ve EtBr ile boyama neticesinde gözlemlenebilen farklı uzunluklara sahip bant patternleri daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere GelComparII, Version 4.1 (Applied Math) bilgisayar yazılım programına aktarılmıştır.
- ARDRA bantları arasındaki benzerlik **“Dice product moment correlation coefficient”** değeri (*r*) ile ifade edilip % benzerlik değerine dönüştürüldükten sonra UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) analizi ile kümeleme (clustering) işlemi yapılarak neticede türler arasındaki genetik benzerlik dendogram olarak gösterilmiş ve dendogram üzerinde kümeleri birbirinden ayırt etmek için korelasyon katsayısı % 90 olarak seçilmiş ve bu değere bağlı kalınarak kümeleme yapılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* olmak üzere 5 farklı cinse ait 148 adet suşun amplifiye edilmiş 16S rDNA bölgelerini *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *MspI*, *PaeI*, *PstI* ve *TaqI* olmak üzere 7 farklı restriksiyon enzimi ile kesim neticesinde oluşan bant paternleri sonucu oluşturulan dendogramlar da korelasyon katsayısı %90 olarak belirlendiğinde ve tek tek incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar gözlemlenmektedir.

Enterococcus suşlarının *HaeIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda, bu suşlar 6 kümede toplanmış ve bu kümeler 585 ve 427 bp büyüklüğünde ortak bantları içermektedir. 1. kümede yer alan 3 kesim noktasına karşılık gelen 585, 427, 188 ve 66

bp büyüklüğünde 4 bant bulunmaktadır. 2. kümede 585, 427 ve 188 bp büyüklüğünde 3 bant bulunan *E. faecium* suşları yer almaktadır. 3. kümede 585, 427, 257, 188 ve 66 bp büyüklüğünde olan 5 bant bulunmaktadır. 4. kümede yer alan *Enterococcus hirae* 115 diğer suşlardan farklı olarak 5 kesim noktasına karşılık gelen ve büyüklükleri 585, 427, 257, 210, 188 ve 66 bp olan 6 bant içerek diğer *Enterococcus* türlerinden tür seviyesinde ayrılmaktadır. 5. kümede 585, 427, 257 ve 66 bp büyüklüğünde olan 4 bantı içeren suşlar bulunmak ve 6. kümede ise 585, 427 ve 257 bp büyüklüğünde 3 bantı içeren suşlar yer almaktadır (Şekil 4.38a).

Enterococcus suşlarının *Hind*III-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 2 kümede toplanmaktadır. 1 kümede tek kesim bölgesine karşılık gelen 1200 ve 223 bp büyüklüğündeki 2 banttan oluşan patern yer almaktadır. 2. kümede ise çoğaltılmış 16S rDNA bölgesine karşılık gelen 1460 bp büyüklüğündeki bant paterni dikkati çekmektedir (Şekil 4.39a).

Enterococcus suşlarının *Hinf*III-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 5 kümede toplanmaktadır. 1. kümede yer alan *E. faecalis* 139 ve 80 suşları göstermiş oldukları 880, 330, 250 ve 200 bp büyüklüğündeki 4 bantlar ile diğer *Enterococcus* türlerinden ve diğer *E. faecalis* suşlarında ayrılmaktadır. 2. kümede ise 880, 330 ve 200 bp büyüklüklerindeki 3 bant sergileyen suşlar yer almaktadır. 3. kümede yer alan *E. hirae* 115 suşu ise *Hae*III restriksiyon enzimi sonucu oluşan ARDRA paternlerinde olduğu gibi diğer *Enterococcus* suşlarından tür seviyesinde ayrılmaktadır. 4. kümede 3 kesim noktasına karşılık gelen büyüklükleri 880, 330, 220 ve 180 olan bantları içeren suşlar yer almaktadır. 5. kümede ise büyüklüğü amplifiye edilmiş 16S rDNA bölgesinden küçük olan 880 bp büyüklüğünde tek bantın bulunduran *E. durans* 51 ve 56 suşları dikkat çekmektedir. (Şekil 4.40a).

Enterococcus suşlarının *Msp*I-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 6 kümede toplanmaktadır ve bu kümelerde 550 bp büyüklüğünde olan ortak bir bant bulunmaktadır. 1. kümede büyüklükleri 600, 550 ve 205 bp olan 3 bant bulunmaktadır. 2. kümede 550, 490 bp büyüklüğündeki kayıp bantların olduğu düşünülen *E. faecium* 2 suşu bulunmaktadır. 3. kümede sergilemiş olduğu büyüklükleri 600, 550, 380 ve 205 bp olan bantları sergileyen *E. faecium* ATCC 6057 suşu yer

almaktadır. 4. kümede 550, 490, 140 ve 120 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır. 5. kümede ise ortak olan 550 bp büyüklüğündeki bandın yanı sıra 490, 205, 140 ve 120 bp büyüklüklerindeki bantları içeren suşlar yer almaktadır. 6 kümede ise deneysel sorunlar sebebi ile *MspI* restriksiyon enzimi ile kesim sonrasında bant el edilemediği düşünülen *E. durans* 51 ve 56 suşları bulunmaktadır (Şekil 4.41a).

Enterococcus suşlarının *PaeI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar kesim noktası bulunmayan 1. küme ve tek kesim noktasına karşılık gelen 1350 ve 150 bp büyüklüğündeki bantları bulunduran 2. küme olmak üzere 2 kümeye ayrılmaktadır (Şekil 4.42a).

Enterococcus suşlarının *PstI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşların hepsi için tek kesim noktasına karşılık gelen ve homolog olan 840 ve 626 bp büyüklüklerindeki iki bant bulunmaktadır (Şekil 4.43a).

Enterococcus suşlarının *TaqI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 2 kümede toplanmaktadır. 1. kümede 745, 560, 540 ve 205 bp büyüklüğünde 4 bant bulunurken 2. kümede 745, 540 ve 205 bp büyüklüğünde olan 3 bant bulunmaktadır (Şekil 4.44a).

Lactococcus suşlarının *HaeIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 6. kümede toplanmaktadır ve 6. kümede tek başına yer alan *Lc. lactis* 32 dışında kalan tüm suşlar için 587 ve 454 bp büyüklüğündeki iki bant ortaktır. 1. kümede bu ortak bantlara en olarak 248 ve 118 bp büyüklüğünde olan bantlarla 3 kesim noktasına karşılık gelen toplam 4 bant bulunmaktadır. 2. kümede 2 kesim noktasına karşılık gelen 587, 454 ve 248 bp büyüklüğünde 3 bant bulunmaktadır. 3. kümede ise 3 kesim noktasına karşılık gelen 587,454, 358, ve 118 bp büyüklüğünde olan 4 bant bulunmaktadır. Bu kümede yer alan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşları 1. kümede yer alan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşlarından bu farklı paternleri suş seviyesinde ayrılmaktadır. 4. kümede 587, 454, 358, 248 ve 118 bp büyüklüğündeki 5 bantla *Lactococcus lactis* 100 yer almaktadır. 5. kümede ise sadece ortak olan iki bant paternini içeren suşlar bulunmaktadır. 6. kümede ise 520 ve 373 bp olmak üzere ortak bantlardan farklı büyüklükte olan 2 bandı bulunduran *Lc. lactis* 32 suşu yer almaktadır (Şekil 4.46a).

Lactococcus suşlarının *HindIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar kesim noktası bulunmayan 1. küme ve tek kesim noktasına karşılık gelen 1295 ve 216 bp büyüklüğündeki bantları bulunduran 2. küme olmak üzere 2 kümeye ayrılmaktadır (Şekil 4.47a).

Lactococcus suşlarının *HinfI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 7 küme altında toplanmaktadır. 1. kümede 935, 332 ve 180 bp, 2. kümede 992, 332 ve 180 bp, 3. kümede 992, 332 ve 150 bp, 4. kümede 992, 535, 332 ve 180 bp, 5. kümede 992, 332, 220 ve 180 bp, 6. kümede 992 ve 332 bp, 7. kümede ise 992 ve 180 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.48a).

Lactococcus suşlarının *MspI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 9 küme altında toplanmaktadır. 1. kümede 548 ve 483 bp, 2. kümede 548, 483 ve 150 bp, 3. kümede 610, 548, 196 ve 80 bp, 4. kümede 548, 483, 150 ve 120 bp, 5. kümede 548, 483, 140 ve 100 bp, 6. kümede 548, 140 ve 100 bp, 7. kümede 548, 483, 196, 140 ve 100 bp, 8. kümede 610, 548, 196, 140 ve 100 bp, 9. kümede 610, 548 ve 140 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır. 3. kümede yer alan *Lc. lactis* subsp. *lactis* W1, W2 ve W3 suşları gözlemlenen farklı bant paternleri ile diğer *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarından ayrılmaktadır (Şekil 4.49a).

Lactococcus suşlarının *PaeI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar tek kesim noktasına karşılık gelen 1310 ve 106 bp büyüklüğündeki bantları bulunduran 1. küme ve kesim noktası bulunmayan 2. küme olmak üzere 2 kümeye ayrılmaktadır (Şekil 4.50a).

Lactococcus suşlarının *PstI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşların hepsi için tek kesim noktasına karşılık gelen ve homolog olan 953 ve 774 bp büyüklüklerindeki iki bant bulunmaktadır (Şekil 4.51a).

Lactococcus suşlarının *TaqI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 4 kümede toplanmaktadır ve 550 bp büyüklüğündeki bandın ortak olduğu görülmektedir. 1. kümede 597 ve 550 bp, 2. kümede 597, 550 ve 197 bp, 3. kümede

740, 550 ve 197 bp, 4.kümede 740, 597, 550 ve 197 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.52a).

Pediococcus suşlarının *HaeIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 664, 490, 300 ve 112 bp büyüklüğünde olan 4 bantı içeren *Pediococcus dextranicus* 2N 10P ve 2N 1P suşlarının yer aldığı 1. küme ve 664, 490 ve 300 bp büyüklüğünde olan 3 bantı içeren 2. küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.54a).

Pediococcus suşlarının *HindIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar tek kesim noktasına karşılık gelen ve 1272 ve 210 bp büyüklüğünde olan bantları içeren *P. dextranicus* 2N 10P ve 2N 1P suşlarının yer aldığı 1. kümenin yanı sıra kesim noktası bulunmayan 2. küme olmak üzere 2. küme altında toplanmışlardır (Şekil 4.55a).

Pediococcus suşlarının *HinfI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 2 küme altında toplanmaktadır.1. kümede 1047, 943, 328 ve 155 bp, 2. kümede 943, 328 ve 155 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.56a).

Pediococcus suşlarının *MspI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar gene 3. küme altında toplanmaktadır. *P. dextranicus* 2N 10P ve 2N 1P suşlarının yer aldığı 1. kümede 550, 490, 180 ve 108 bp, 2. kümede ise 626, 557 ve 210 bp, eksik bantların bulunduğu düşünülen 3. kümede ise 626 ve 557 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.57a).

Pediococcus suşlarının *PaeI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar tek kesim noktasına karşılık gelen büyüklükleri 1330 ve 151 olan 2 bant içeren 1. küme ve 1490 bp büyüklüğündeki kesim noktası bulundurmeyen 2. küme olmak üzere 2 küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.58a).

Pediococcus suşlarının *PstI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşların hepsi için tek kesim noktasına karşılık gelen ve homolog olan 876 ve 674 bp büyüklüklerindeki iki bant bulunmaktadır (Şekil 4.59a).

Pediococcus suşlarının *TaqI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 764, 556, ve 194 bp büyüklüğünde olan 3 bantı bulduran 1.küme, 764 ve 556 bp büyüklüğünde olan 2 bant bulduran 2. küme ve *P. dextranicus* 2N 10P ve 2N 1P suşlarının yer aldığı 764, 689, 560, 556, 181 ve 118 bp büyüklüğünde olan 6 bant bulduran 3. küme olmak üzere 3 küme altında toplanmışlardır (Şekil 4.60a).

Pediococcus suşlarının ARDRA paternlerine bakıldığında *P. dextranicus* 2N 10P ve 2N 1P suşları diğer gruplardan ayrı bantlar sergilediği dikkati çekmektedir. Bunu üzerine bu suşlar sekans analizine gönderilerek sonuçlar onaylanmak istenmiştir. Ancak sekans analizleri sonucunda *P. dextranicus* 2N 10P suşunun % 100 *E.durans* ve *P. dextranicus* 2N 1P suşunun % 99 *E.fecalis* olduğu ortaya çıkmıştır. Bu suşların daha önceden yapılan fenotipik testlerde yanlış tanımlandığı düşünülmektedir.

Leuconstoc suşlarının *HaeIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşların tümü için homolog olan 584 ve 460 bp büyüklüklerindeki iki bant bulunmaktadır (Şekil 4.62a).

Leuconstoc suşlarının *HindIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar tek kesim noktası neticesinde meydana gelen 1237 ve 225 bp büyüklüğünde olan 2 bant paternini içeren 1. küme ve kesim noktası bulunmayan 2. küme olmak üzere kümelenmişlerdir (Şekil 4.63a).

Leuconstoc suşlarının *HinfI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 2 küme altında toplanmış ve 305 bp büyüklüğündeki bant iki küme içinde ortaktır.1. kümede 870 ve 305 bp, 2. kümede ise 858 ve 305 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.64a).

Leuconstoc suşlarının *MspI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 546, 482 ve 151 bp büyüklüğünde olan bantları içeren 1. küme, 595, 546 ve 211 bp büyüklüğünde olan bantları içeren 2. küme olmak üzere iki küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.65a).

Leuconostoc suşlarının *PaeI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar kesim noktası bulundurmayan 1486 bp büyüklüğünde olan bantları içeren 1. küme ve tek kesim noktası neticesinde oluştuğu düşünülen 1250 ve 150 bp büyüklüğünde olan bantları içeren 2. küme olmak üzere 2 küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.66a).

Leuconstoc suşlarının *PstI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 1486, 892 ve 647 bp büyüklüğünde olan 3 ortak bandı içeren 2.küme altında toplanmaktadır. 1468 bp büyüklüğünde olan bandın tamamlanmayan kesim sonucunda gözlemlendiği düşünülmektedir. 1. kümede 1468, 1305, 892 ve 647 bp, 2. kümede ise 1468, 1102, 892 ve 647 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar yer almaktadır (Şekil 4.67a).

Leuconstoc suşlarının *TaqI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 600 ve 530 bp büyüklüğünde olan bantları bulunduran 1. küme ve 750, 600 ve 530 bp büyüklüğünde olan bantları bulunduran 2. küme olmak üzere 2 küme altında toplanmaktadır. Bu iki küme içinde 530 bp büyüklüğünde olan bant ortak olduğu görülmektedir (Şekil 4.68a).

Lactobacillus suşlarının *HaeIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 576 ve 450 bp büyüklüğünde olan iki ortak bandı içeren 3 küme altında toplanmaktadır. 1. kümede 576 ve 450 bp büyüklüğünde olan 2 bandı, 2. kümede 576, 450 ve 243 bp büyüklüğünde olan 3 bandı, 3. kümede 576, 450, 305 ve 243 bp bp büyüklüğünde olan 4 bandı içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.70a).

Lactobacillus suşlarının *HindIII*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar tek kesim noktası neticesinde oluştuğu düşünülen 1298 ve 225 bp büyüklüğünde olan 2 bandı içeren 1. küme ve kesim noktası bulunmaması nedeni ile gözlemlenen 1498 bp büyüklüğünde olan tek bandı içeren 2. küme olmak üzere 2 küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.71a).

Lactobacillus suşlarının *HinfI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 978, 347 ve 178 bp büyüklüğünde 3 homolog bant paterni ile tek bir küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.72a).

Lactobacillus suşlarının *MspI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 590 bp büyüklüğünde olan bandı içeren 6 küme altında toplanmaktadır. 1. kümede 610, 590, 490 ve 452 bp büyüklüğünde 4 bant, 2. kümede 650, 590 ve 452 bp büyüklüğünde 3 bant, 3. kümede 610, 590, 542 ve 452 bp büyüklüğünde 4 bant, 4. kümede 610, 590, 452 ve 161 bp büyüklüğünde 4 bant, 5. kümede ise 590, 542, 205 ve 161 bp büyüklüğünde 4 bant ve 6. kümede 610 ve 590 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.73a).

Lactobacillus suşlarının *PaeI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar tek kesim noktasına karşılık gelen 1382 ve 153 bp büyüklüğünde olan 2 bandı içeren 1. küme ve kesim noktası bulundurmaya 1490 bp büyüklüğündeki 2. küme olmak üzere 2 küme altında toplanmaktadır (Şekil 4.74a).

Lactobacillus suşlarının *PstI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşların tümü için homolog olan 846 ve 647 bp büyüklüğünde olan bantlarla tek bir küme oluşturulmuştur (Şekil 4.75a).

Lactobacillus suşlarının *TaqI*-16S ARDRA paternleri göz önünde bulundurulduğunda ise bu suşlar 4 küme altında toplanmaktadır. 1. kümede kayıp bantlar olduğu düşünülen 725 bp, 2. kümede 561 ve 518 bp, 3. kümede 725, 561 ve 518 bp, 4. kümede 725, 538 bp büyüklüğünde olan bantları içeren suşlar bulunmaktadır (Şekil 4.76a).

LAB'ların endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı **kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir**. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayrımını sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir ve özellikle son yıllarda bu amaçla kullanılmaya başlanan DNA temelli moleküler yöntemler var olan çalışmalara tamamlayıcı ve doğrulayıcı olmaları bakımından güvenilir, basit ve pahalı olmayan yöntemler olarak değerlendirilmektedir.

Sekans analizi için normalde **16S rRNA** gen tercih edilir çünkü hem *korunumlu* hem de *değişken* bölgeler içermektedir ve böylece tüm bakteriyal taksonlar arasındaki filogenetik ilişkinin çalışılmasını kolaylaştırmaktadır.

Tüm sekans belirlemesinin yerine farklı restriksiyon enzimlerinin kullanımı neticesinde elde edilen ARDRA paternlerinin küme analizi mikroorganizmaların taksonomik sınıflandırmasında ve/veya filogenetik analizde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda yaklaşık 1500 baz çifti büyüklüğündeki ampikonu amplifiye etmek için evrensel bakteriyal 16S rDNA gen primer seti kullanılmıştır Bununla beraber, çalışmamızda kendini gösterdiği gibi tekniğin bazı limitasyonları bulunmaktadır

1. İlk olarak genus veya türe özgü primerlerden ziyade PCR amplifikasyonu için evrensel bakteriyal primerler kullanıldığı için genus ve tür identifikasyonunun fenotipik ve biyokimyasal yöntemlerle yapılmış olması gerekmektedir.
2. Sadece ufak bir sekans farklılığı sergileyen birbirleri ile yakın ilişkideki organizmalar söz konusu olduğunda kullanılan restriksiyon enzim veya enzimlerinin tanıdığı restriksiyon bölgesinin kaybı veya kazancı şeklinde bir **mutasyon** söz konusu olabileceği düşünülmektedir.
3. Her bir bantın büyüklüğünü belirleyip bunların toplamını aldığımızda bazı skorlanan bantların toplamının amplifiye edilmiş DNA fragmanından büyük bazılarının ise daha küçük olduğu gözlemlenmiştir (Nübel vd.1996)

Toplamdaki bu *fazlalık* veya *azlığı*n nedenleri ekstra zayıf bantların oluşumuna sebep olabilen **mikro-heterojenite**, restriksiyon enzimlerinin **star aktivitesinin** (yani restriksiyon enziminin kendi tanımlanmış olan tanıma sekansına eş değil ancak benzer sekansı kesebilmesi) sebep olduğu patern (bant) oluşumundaki problemler, zayıf bantların yanlış işaretlenmesi veya çift bantların sadece tek bir bant olarak işaretlenmesi gibi **bantların atanmasındaki veya belirlenmesindeki yetersizlik/eksiklik** olduğu düşünülmektedir (Gürtler vd. 1991, Cole ve St. Grions 1994).

4. 16S-ARDRA'nın deneysel düzeneğinin başarısı aynı zamanda seçilen restriksiyon enzimlerine bağlıdır. ARDRA çalışmalarında kullanılan primerler korunumlu bölgelere bağlanacak şekilde dizayn edilmiştir ve değişken bölgeleri amplifiye ederler. **Tekniğin ayırım gücü ise bu değişken bölgeler üzerinde kesim noktası bulunan ve ayırım sağlayabilecek restriksiyon enzim seçimine bağlıdır.**

Direk sekans analizi ile kıyaslandığında ARDRA çalışmasının en önemli avantajı “analizin hızlı olmasına” ve “bant paternlerinin sayısal analizlerinin taksonomik rezolusyonuna ve filogenetik geçerliliğine” bağlı olduğundan, **minimal sayıda ancak iyi belirlenmiş restriksiyon enzimlerinin** (yani değişken sekans bölgelerinden kesim yapan) kullanılması önerilmektedir

Amplifiye edilmiş bölgenin uzunluğu sınırlı olduğundan *tercihen* ortalama 5-6 restriksiyon fragmanı oluşturan **tetramerik restriksiyon enzimleri** (yani 4 baz tanıma sekansına sahip) gibi sıklıkla kesim yapan enzimler kullanılmalıdır (Wilson vd.1995).

Türe ait mevcut 16S rRNA gen sekansının restriksiyon enzimleri ile kesimlerinin bilgisayar simülasyonu ile bu restriksiyon enzimlerinin seçimi ve belirlenmesi teorik olarak yapılabilmektedir.

5. Uzun süren elektroforez esnasında yüksek voltajın yarattığı ısının artması jeli ısıtmakta ve DNA bantlarının smear şeklinde görünmesine veya bozulmasına sebep olmaktadır. Bu durum bantların büyüklüklerinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır.
6. Bazı bantlar *tamamlanmayan kesimden* (incomplete digest) kaynaklanabilir ya da dijitalizasyon kaynaklı artifaktlar olduğu düşünülmektedir.

ARDRA çalışmasında 7 restriksiyon enzim kullanımı pahalı, zaman alıcı ve eziyetli bir işlemdir, teorik olarak ne kadar *fazla restriksiyon enzimi o kadar doğru ve hassas sonuçlar* düşüncesi olsa da RAPD tiplendirmeye cevap verebilen uygun bir yöntemdir.

- Geniş aralıkta mikroorganizmaların tiplendirilmesinde pek çok laboratuvarında kullanılmaktadır.
- Hızlı ve basit bir yöntemdir

ARDRA tiplendirme için uygun bir yöntem değildir çünkü rDNA molekülünün doğal korunumlu yapısından dolayı düşük bir ayırım gücüne sahip olduğu düşünülmektedir.

Bununla beraber DNA polimeraz enziminin markası, jel elektroforezi, kalıp DNA molekülünün kalitesi, DNA konsantrasyonu ve primer bağlanma varyasyonlarının değişkenliği gibi değişkenlerden dolayı RAPD tekniğinin tekrarlanabilirliği neredeyse yoktur ve tekniğin yüksek derecede ayırım gücüne sahip olabilmesi için aynı anda pek çok primer ile çalışılması gerekmektedir

“Yüksek derecede ayırım sağlayan genomik parmak izi” yöntemi olarak AFLP tekniğini önermekteyiz çünkü laboratuvarımızda aynı suşlarla daha önceden yapmış olduğumuz çalışmalar sonucunda AFLP tekniğini yüksek sayıda bakterilerin ayırımını sağlayabilen etkin bir metot olduğu düşünülmektedir.

Yöntem yüksek ayırım gücüne, tekrarlanabilirlik, bilgisayara aktarılabilen uygun temiz bantların oluşumu gibi avantajlara sahiptir. AFLP tekniği, çok sayıda suşun tanımlaması ve tiplendirmesinde tercih edilmesine rağmen ARDRA ve RAPD tekniklerinin basit ve hızlı yaklaşımlarına karşılık pahalı ve ticarileşmiş bir teknik olduğundan dolayı araştırmacılar tarafından tercih edilmemektedir

KAYNAKLAR

- Aldenderfer, M.S. and Blashfield, R.K. 1984. *Cluster analysis*. Sage University Paper series on Quantitative Applications in the Social Sciences, Series No. 07-044, Sage University Press, Beverly Hills, CA, USA
- Aljanabi, S.M., Forget, L. and Dookun, A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polisaccharide and polyphenol-free sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*. 17, 1-8.
- Andersson, R.E., Daeschel, M.A., Hasson, H.M. 1988. Antibacterial activity of plantaricin SIK 83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie*. 70, 381-390.
- 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.
- Appuhamy, S., Parton, R., Coote, J.G. and Gibb, H.A. 1997. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 288-291.
- Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D. and Depledge, M. 2000. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *BioTechniques*. 28, 52-54.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. pp 1-73. In *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects*, Salminen, S., and von Wright, A. (Eds). Marcel Dekker, INC., New York.
- Babalola, O.O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 2, 710-713.
- Bacus, J.N. and Brown, W.L. 1981. Use of microbial culture; meat products. *Food Technology*. 35, 74-78.
- Barbier, N., Saulnier, P., Chachaty, E., Dumontier, S. and Andremont, A. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 106-109.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. and Gannon, F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods and Applications*. 1, 51-56.
- Baumann, P., Doudoroff, M. and Stanier, R.Y. 1968. A study of the *Moraxella* group II. Oxidatively negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology*. 95, 1520-1541.
- Bhowmilk, T. and Marth, E.H. 1989. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *Journal of Dairy Science*. 73, 859-666.

- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*. 65, 261-268.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 1265–1267.
- Björkroth, K.J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W.H., Korkeala, H. J. and Vandamme, P. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 3764-3772.
- Björkroth, K.J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W.H., Korkeala, H.J. and Vandamme, P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 141-148.
- Blears, M.J., De Grandis, S.A., Lee, H. and Trevors, J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): Review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 21, 99-114.
- Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P. and Grappin, R. 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative Lactobacilli during Comte cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 76, 27-38.
- Bush, U. and Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. *Journal of Chromatography B*. 722, 263-278.
- Caetano-anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. 9, 553-57.
- Caetano-annolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, E.M. 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Molecular and General Genetics*. 235, 157-165.
- Carriço, J.A., Pinto, F.R., Simmas, C., Nunes, S., Sousa, N.G., Frazao, N., Lencastre, H. and Almeida, J.S. 2005. Assesment of band-based similarity coefficient for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by Pulse Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 5483-5490.
- Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R. and Schnell, J.D. 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1836–1839.
- Catherine, A., Osborne, M., Parveen S. and Janssen P.H. 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*. 248, 183–187.

- Chenoll, E., Macian, M.C. and Aznar, R. 2003. Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 546–556.
- Clarridge, J.E., Raich, T.J., Pirwani, D., Simon, B., Tai, L., Rodriguez-Barradas, M.C., Regnery, R., Zollo, A., Jones, D.C. and Rambo, C. 1995. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 2107-2113.
- Cocconelli, P.S., Porro, D., Galandini, S. and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and *Enterococci*. *Letters in Applied Microbiology*. 21, 376-379.
- Cocconelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L., Cappa, F. and Bottazzi, V. 1997. Use of RAPD and 16 S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology*. 24, 8-12.
- Cogan, T.M. 1996. History and taxonomy of starter cultures. pp. 1-25. In *Dairy starter cultures*, Cogan T.M. and Accolas, J.P. (Eds.). Wiley-VCH Publishers Inc., New York, N.Y.
- Cole, S.T. and Saint Girons, I. 1994. Bacterial genomics. *FEMS Microbiological Reviews*. 14, 139-160.
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S. and Jones, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37, 310–316.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Williams, A.M. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa. *Journal of Applied Bacteriology*. 67, 453–460.
- Collins, M. D., Williams, A.M. and Wallbanks, S. 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiology Letters*. 70, 255–262.
- Collins, M.D., Aguirre, M., Facklam, R.R., Shallcross, J. and Williams, A.M. 1992. A new gram-positive catalase-negative bacterium from human sources. *Journal of Applied Bacteriology*. 73, 433–437.
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 75, 595–603.
- Collins, M.D., Jovita, M.R., Lawson, P.A., Falsen, E. and Foster, G. 1999. Characterization of a novel gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of *Eremococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1381–1385.
- Daeschel, M.A., and Klaenhammer, T.R. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 1538-1541.

- Dean, D., Patton, M. and Stephens, R.S. 1991. Direct sequence evaluation of the major outer membrane protein gene variant regions of *Chlamydia trachomatis* subtypes D', I' and L2'. *Infection and Immunity*. 59, 1579-82.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torrani, S. 1995. The genus *Leuconoctoc*. pp.235-268. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (Eds.). Blackie Academic Press and Professional, London.
- De vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London, England.
- Dicks, L.M.T. and van Vuuren, H.J.J. 1987. Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37, 437-440.
- Dicks, L.M.T., Van Vuuren, H.J.J. and Dellaglio, F. 1990. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions and DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40, 83-91.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. and Collins, M.D. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45, 395-397.
- Dijkshoorn, L., Ursing, B.M. and Ursing, J.B. 2000. Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology. *Journal of Medical Microbiology*. 49, 397-401.
- Dijkshoorn, L. and Towner, K. J. 2001. An introduction to the generation and analysis of microbial typing data. pp 1-30. In *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Dijkshoorn, L., Towner, K.J. and Struelens, M. (Eds). Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Dombek, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T. and Sadowsky, M.J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2572-2577.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 2. Phenotypic and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 165-188.
- Donabedian, S., Chow, J.W., Shlaes, D.M., Green, M. and Zervos, M.J. 1995. DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of *Enterococci* to the species level. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 141-145.
- Doulis, A.G., Harfouche, A.L. and Aravanopoulos, F.A. 2000. Rapid, high quality DNA isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and optimization of the RAPD marker technique. *Plant Molecular Biology Reporter*. 17, 1-14.
- 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, 481-86.

- DuBose, R.F., Dyhuiszen, D.E. and Hartl, D.L. 1988. Genetic Exchange among natural isolates of bacteria: Recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 85, 7036-7040.
- Duffner, F. and O'Connell, M. 1995. Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage. Journal of Applied Bacteriology. 78, 20–27.
- Durant, J.A., Young, C.R., Nisbet, D.J., Stanker, L.H. and Ricke, S.C. 1997. Detection and quantification of poultry probiotic bacteria in mixed culture using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. International Journal of Food Microbiology. 38, 181–189.
- Dykes, G.A. and von Holy, A. 1994. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. Letters in Applied Microbiology. 19, 63-66.
- Dykes, G.A., Cloete, T.E. and Holy, A. 1994. Identification of *Leuconostoc* species associated with the spoilage of vacuum-packaged Vienna sausage by DNA-DNA hybridization. International Journal of Food Microbiology. 11, 271–274.
- Dykhuizen, D.E. 1998. Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? Antonie Van Leeuwenhoek. 73, 25-33.
- Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. Food Science and Technology. 20, 1-12.
- Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, H.P., Brurberg, M.B. and Nes, I.F. 1998. Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 64, 3275- 3281.
- Escalante, A., Wacher, C and Farre's, A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology. 64, 21–31.
- Everitt, B. S. 1993. *Cluster analysis, 3rd edn*. London. Edward Arnold.
- Farber, J.M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. Journal of Food Protection. 59, 1091-1101.
- Fernández, E., Blume, V., Garrido, P., Collins, M.D., Mateos, A., Domínguez, L. and Fernández- Garayzábal, J.F. 2004. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminant. International Journal of Evolutionary Microbiology. 54, 2291-2296.
- Foschino, R., Arrigoni, C., Picozzi, C., Mora, D. and Galli, A. 2001. Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs in Italy. Food Microbiology. 18, 277-285.
- Garvie, E.I. 1986. Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68^{AL}. pp. 1075-1079. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Geisen, R., Lück, E.K., Kröckel, L. 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. Fleischwirt. 72, 894-898.

- Georghiou, P.R., Hamill, R.J., Wright, C.E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D.A. and Lupski, J.R. 1995. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: Identification of hospital-associated strains by molecular techniques. *Clinical Infectious Diseases*. 20, 84–94.
- Gherna, R. and Pienta, P. 1989. American Type Culture Collection: Catalogue of Bacteria and Phages, 17th edition American Type culture collection, pp.158, Rockville.
- Giovannetti, L. and Ventura, S. 1995. Application of total DNA restriction pattern analysis to identification and differentiation of bacterial strains. pp. 165- 179. In *Diagnostic Bacteriology Protocols*. Howard J. and Whitcombe D.M. (Eds.). Humana Press, Totowa, N.J.
- Giraffa, G., Rossetti, L., Mucchetti, G., Addeo, F. and Neviani, E. 1998. Influence of the temperature gradient on the growth of thermophilic *Lactobacilli* used as natural starters in Grana cheese. *Journal of Dairy Science*. 81, 31–36.
- Gonzales, C. F., and Kunka, B.S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 2534-2538.
- Gordillo, M.E., Singh, K.V. and Murray, B.E. 1993. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 31, 1570–1574.
- Gorris, G.M.L. 1996. Bacteriocins: Potential Applications. In *Food Preservation. Food preservation by combined processes*. Final Report Flair. Concerted Action No:7 Subgroup B.
- Grimont, F. and Grimont, P.A.D. 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur de Microbiologie*. 137, 165-175.
- Gurtler, V., Wilson, V.A. and Mayall, B.C. 1991. Classification of medically important clostridia using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*. 137, 2673–2679.
- Hall, L.M.C., Duke, B., Guiney, M. and Williams, R. 1992. Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 915– 919.
- Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N.O., Hjerdin, A. and Sall, T. 1996. Competition as a of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 92, 1185-1192.
- Halldén, C. 1998. Characterization and use of a multiplex PCR based system: Random amplified polymorphic DNA, (Ph.D. Thesis), Department of Genetics, Lund University, Lund.
- Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*. 87, 165-174.
- Hammes, W.P. and Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. pp. 19-55. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol: 2. Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds). Blackie Academic Professional

- Hansen, M., Halldén, C. and Sall T. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16, 139-146.
- Hartstein, A.I., Phelps, C.L., Kwok, R.Y.Y. and Mulligan, M.E. 1995. *In vivo* stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing by restriction endonuclease analysis of a plasmid DNA compared with those of other molecular methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 2022-2026.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, 9. Edition, USA.
- Holzapfel, W.H., Haberer, B., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 365-373.
- Hoover, D.G. and Steenson, L.R. 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, 572-580.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*. 59, 171-200.
- Jackman, P.J.H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein pattern. pp. 115-129. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Goodfellow, M. and Minnikin, D.E. (Eds.). London: Society for Applied Bacteriology.
- Jang, J., Kim, B., Lee, J. and Han, H. 2003. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 55, 295-302.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*. 142, 1881-1893.
- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H. 2002. Differentiation of closely related carnobacterium food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 5358-5366.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular Non-Sporing gram positive Rods. pp. 1209-1234. In *Bergey's manual*. Williams and Wilkins Publishers, Volume 2, Baltimore.
- Kersters, K. and De Ley, J. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns. *Journal of General Microbiology*. 87, 333-342.
- Khandka, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejidat, A. and Goldhirsh, A.G. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis*. 18, 2852-2856.

- Kitahara, K. 1974. Genus *Pediococcus* Balcke 1884, pp. 513-515. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Buchanan, R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). 8th edition. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kleanhammer, Y.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70, 337-349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 39-86.
- Klaenhammer, T.R., Ahn, C., Fremaux, C. and Milton, K. 1995. Molecular properties of *Lactobacillus* bacteriocins. Bacteriocins, microcins and lantibiotics. NATO ASI Series, Volume H. 65, 37-58.
- Kneifel, W., Jaros, D. and Erhard, F. 1999. Microflora and acidification properties of yoghurt and yoghurt related products fermented with commercially available starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 18, 179-189.
- Koeleman, J.G., Parlevliet, G.A., Dijkshoorn, L., Savelkoul, P.H. and Vandenbroucke-Grauls, C.M. 1997. Nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *Journal of Hospital Infection*. 37, 113-123.
- Koeleman, J.G.M., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H.M. and Vandenbroucke Grauls, C.M.J.E. 1998. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 2522-2429.
- Kohel, R.,J. and Park,Y. 1994. Effect of concentration of MgCl₂ on random amplified DNA polymorphism. *Biotechniques*. 16, 652-656.
- Kondo, J.K. and Mc Kay, L.L. 1985. Gene transfer systems and molecular cloning in group N *streptococci*: A review. *Journal of Dairy Science*. 37, 1193- 1195.
- Kostinek, M., Pukall, R., Rooney, A.P., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H. and Franz, C.M.A.P. 2005. *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 2485-2489.
- Kostman, J.R., Edlin, T.D., LiPuma, J.J. and Stull, T.L. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 2084-2087.
- Laguerre, G., Allard, M.R., Revoy, F. and Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 56-63.
- Leblond-bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. and Decaris, B. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter-and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46, 102-111.

- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis R.E. & Bartozsyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 1153-1169.
- Liu, P.Y.F. and Wu, W.L. 1997. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. 28, 19–28.
- Lockhart, W.R. and Liston, J. 1970. *Methods for Numerical Taxonomy*. Bethesda, Maryland: American Society for Microbiology.
- 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.
- Lupski, J.R. and Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*. 174, 4525– 4529.
- Mainville, I., Robert, N., Lee, B. and Farnworth, E.R. 2005. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Systematic and Applied Microbiology*. 29, 59-68.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E. and Arbeit, R.D. 1993. Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infectious Diseases*. 17, 153-164.
- Matushek, M.G., Bonten, M.J.M. and Hayden, M.K. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 2598– 2600.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*. 9, 190–198.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Vilani, F., Deianna, P. and Coppola, S. 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Applied Microbiology*. 85, 25-36.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., 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.
- Mueller, U.G. and Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*. 14, 389-394.
- Nesme, X., Vanechoutte, M., Orso, S., Hoste, B. and Swings, J. 1995. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene. *Systematic and Applied Microbiology*. 18, 127-135.

- Neve, H., Geis, A. and Teuber, M. 1987. Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starters. *Systematic and Applied Microbiology*. 9, 151-157.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. & Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178, 5636-5643.
- 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. The lactic acid bacteria. Host, Copenhagen.
- Patterson, J.E. and Kelly, C.C. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool for *Enterococci* and *Streptococci*. *Methods in Cell Biology*. 20, 233–239.
- Pot, B., Hertel, C., Descheemaeker, P., Kersters, K. and Schleifer, K.H. 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA targeted oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology*. 139, 513-517.
- Prakash, O., Verma, M., Sharma, P., Kumar, M., Kumari, K., Singh, A., Kumari, H., Jit, S., Gupta, S.K., Khanna, M. and Lal, R. 2007. Polyphasic approach of bacterial classification: An overview of recent advances. *Indianian Journal of Microbiology*. 47, 98-108.
- Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. pp. 151-171. In: *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*. Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P. M. (Eds.), John Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Rafalski, A., Tingey, S.V. and Williams, J.G.K. 1994. RAPD markers. *Plant Molecular Biology Manual*. 114, 1-8.
- Randazzo, C.L., Restuccia, C., Romano, D.A. and Caggia, C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*. 90, 9-14.
- 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. and Daeschel, M.A. 1992. Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcelli, P.S. 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 1043-1049.
- Rodas, A.M., Ferrer, S. and Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. 26, 412-422.

- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A. and Guillamón, J.M. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 1981-1987.
- Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translation modifications. *European Journal of Biochemistry*. 230, 827-853.
- Sall, T., Lind-Halldén, C. and Halldén, C. 2004. Primer mixtures in RAPD. *Hereditas*. 132, 203-208.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T. and Yokotsuk, K. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99, 335-337.
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M.D., Régnault, B., Grimont, P.A.D. and Bouvet, A. 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 50, 1425-1434.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* generation novel. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 183-195.
- Schleifer, K.H. 1986. Gram-positive cocci. pp. 999–1103. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 46, 201-203.
- Sharpe, M.E., Skinner, F.A., Lovelock, D.W. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. 246–255. In *Identification Methods for Microbiologists*. 2nd Ed. Academic Press: London.
- Sneath, P.H.A. 1957a. Some thoughts on bacterial classification. *Journal of General Microbiology*. 17, 184-200.
- Sneath, P.H.A. 1957b. The application of computers to taxonomy. *Journal of General Microbiology*. 17, 201-226.
- Sneath, P.H.A. 1971. Theoretical aspects of microbiological taxonomy. pp. 581-586. In *Recent Advances in Microbiology, X International Congress for Microbiology*. Perez-Miravete, A. and Pelaez, D. (Eds). Mexico. D.F.: Asociacion Mexicana de Microbiologia.
- Sneath, P.H.A. 1972. Computer taxonomy. pp: 29-98. vol 7A. In *Methods in Microbiology*, Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (Eds). Academic Press, London.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco.

- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36, 1-29.
- Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M. and Yamashita, H. 2004. *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *International Journal of Systematic Microbiology*. 54, 115-117.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*. 40, 722-756.
- Taillez, P, Quenee, P. and Chopin, A. 1996. Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ: Application de la RAPD à un groupe de *Lactobacilles*. *Le Lait*. 76, 147-158.
- Temmermann, R., Huys, G. and Swings, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*. 15, 348-359.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 2233-2239.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D. and Goering, R.V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 18, 426-439.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*. pp 173-234. In *The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. (Eds.). Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK.
- Tingey, S.V. and Del Tufa, J.P. 1993. Genetic Analysis With Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology*. 101, 349-352.
- Toth, I.K., Avrova, A.O. and Hyman, L.J. 2001. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 4070-4076.
- Tötsch, M., Brömmelkamp, E., Stticker, A., Fille, M., Gross, R., Wiesner, E, Wemer Schmid, K., Bocker, W. & Dockhom-Dwomiczak, B. 1996. Identification of mycobacteria to the species level by automated restriction enzyme fragment length polymorphism analysis. *Virchows Archives*. 298, 1-5.
- Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, A., Morris Jr., J.G. and Sulakvelidze, A. 2000. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 4242-4245.
- Ulrike, E., Till, R., Helmut, B., Monica, E. and Bottger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 17, 1-11.
- 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.

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. 60, 407–438.
- Vaneechoutte, M., Rossau, R., de Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., de Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G. and Kersters, K. 1992. Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*. 72, 227-233.
- Vaneechoutte, M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology*. 6, 115-142.
- Vaneechoutte, M and Heyndrickx, M. 2001. Application and Analysis of ARDRA Patterns in Bacterial Identification, Taxonomy and Phylogeny. 212-231. In: *New Approaches For The Generation and Analysis of Microbial Typing Data*. Elsevier Science.
- Vauterin, L., Swings, J. and Kersters, K., 1993. Protein electrophoresis and classification. pp. 251-280. In: *Handbook of new bacterial systematics*. Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G. (Eds.). Academic Press Ltd., London.
- Ventura, M., Casas, I.A., Morelli, L. and Callegari, M.L. 2000. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus spp.* isolated from fecal and vaginal samples. *Systematic and Applied Microbiology*. 23, 504-509.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 5, 25–40.
- Vila, J., Marcos, M.A. and Jimenez de Anta, M.T. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA. *Journal of Medical Microbiology*. 44, 482–489.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23, 4407-4414.
- Weeden, N.F., Timmerman G.M., Hermmat, M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD markers. pp:12-17. In *Applications of RAPD Techology to Plant Breeding*. Proc Joint Plant Breeding Symposia, Minneapolis, MN.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*. 18, 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531-6535.
- Wilson, M.J., Wade, W.G. and Weightman, A.J. 1995. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA of human *Capnocytophaga*. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 394-401.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 51, 221-271.

- Woodford, N., Morrison, D., Johnson, A.P., Briant, V., George, R.C. and Cookson, B. 1993. Application of resistant *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 31, 653–658.
- Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. 1992. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, 2921–2929.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 12, 91-109.

EKLER

- EK 1 BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ**
- EK 2 TAMPON ve ÇÖZELTİLER**
- EK 3 KROMOZOMAL (GENOMİK) DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ**
- EK 4 DNA ANALİZİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER**
- EK 5 KİMYASALLAR**

EK 1 BAKTERİ GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

MRS BESİYERİ (52.2gr/l)

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

TGE BESİYERİ (Trypton-glucose-yeast extract)

İçerik	%g
Trypton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstratı	1.0
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.005
MnSO ₄	0.005

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

EK 2 TAMPON VE ÇÖZELTİLER

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

İçerik (pH:8.3)

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

YÜKLEME BOYASI

İçerik

Bromofenol blue	0.25 g
Sakkaroz	40 g
Distile su	100 ml

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

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik

Etidyum bromit	1.0 g
Distile su	100 ml

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

% 1' lik AGARUZ JEL

İçerik	% g
Agaroz	1.0
1 X TBE Tamponu	100 ml

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

% 1.6'lık AGARUZ JEL (RAPD PCR ÜRÜNLERİ İÇİN)

İçerik	% g
Agaroz	1.6
1 X TBE Tamponu	100 ml

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

% 1.5'lık AGARUZ JEL (16S PCR ÜRÜNLERİ İÇİN)

İçerik	% g
Agaroz	1.5
1 X TBE Tamponu	100 ml

Agaroz 1.5 gr tartılarak 100ml 1X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele 4 µl etidyum bromit solüsyonu eklenir.

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



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

Materials to Be Supplied by the User

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

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

Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidum*) lyse efficiently using lysozyme alone.

5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g and remove the supernatant.
6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.
12. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 3 minutes.

13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600 μ l of room temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.
15. Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 2 minutes.
16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600 μ l of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.
17. Centrifuge at 13,000–16,000 $\times g$ for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.
18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10–15 minutes.
19. Add 100 μ l of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2–8°C.

EK 4 DNA ANALİZİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

DNA Ladder, Supercoiled

11 Supercoiled fragments, 2–16 kb

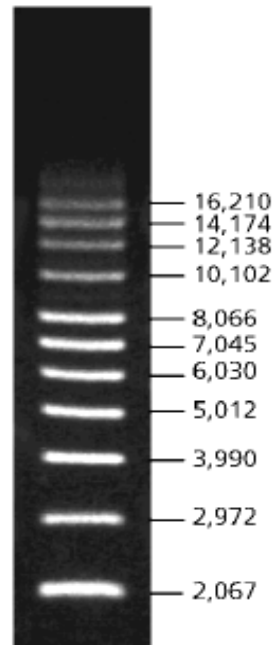
Product Number D5292

Storage Temperature -20 °C

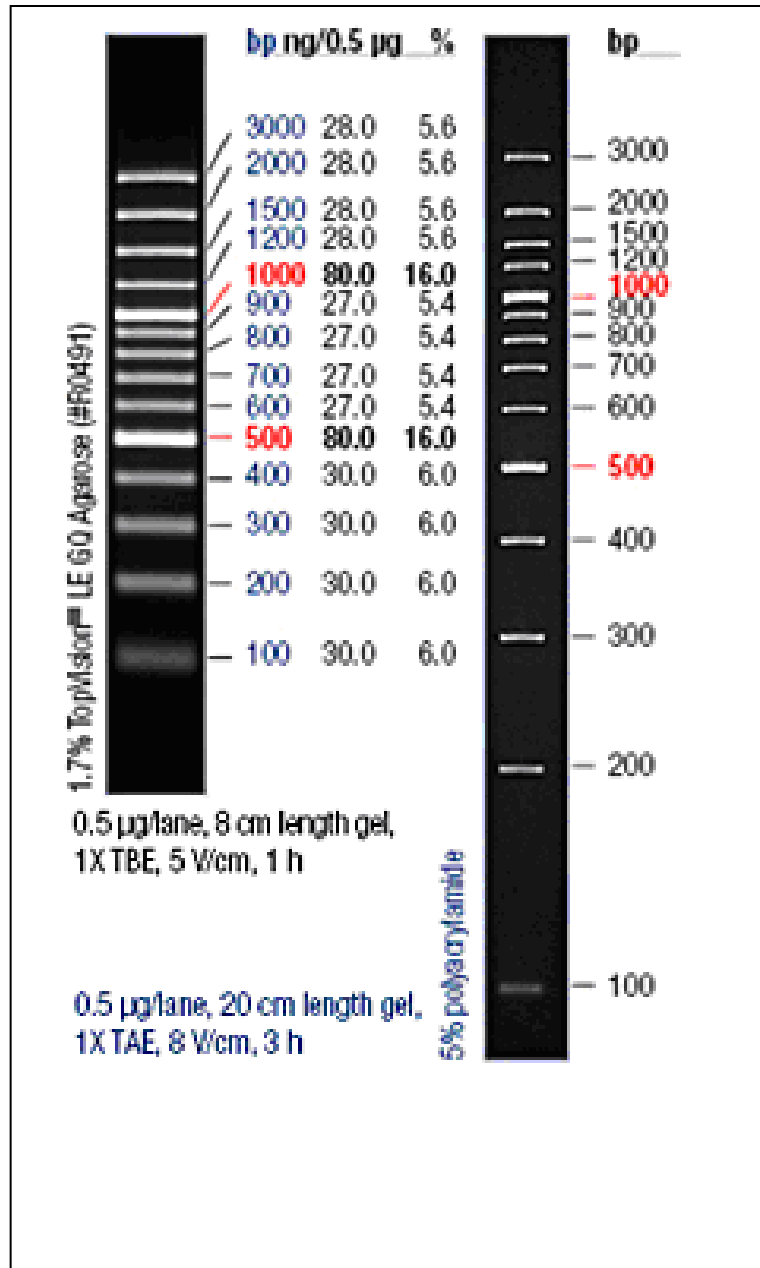
Product Description

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

Plasmid Sizes base pairs (bp)



GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)



EK 5 KİMYASALLAR

Kimyasal Adı	Marka
Agaroz	SIGMA
Borik Asit	MERCK
Bromofenol Blue	MERCK
EDTA	MERCK
Etidyum Bromit	SIGMA
Glukoz	SIGMA
MRS Besiyeri	LAB M
Maya Ekstraktı	OXOID
MgSO ₄	MERCK
MnSO ₄	MERCK
Primerler	THERMO
Restriksiyon Enzimleri	FERMENTAS
Supercoiled DNA Ladder	SIGMA
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	PROMEGA
Tripton	OXOID
Tris	SIGMA
Tween 80	MERCK
100bp DNA Ladder	FERMENTAS

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Başak ORAL
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 22.07.1982
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	: Özel Bilim Fen Lisesi	1996-1999
Lisans	: Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İngilizce Biyoloji Bölümü	2000-2006
Yüksek Lisans	: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2007-2010

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Proje Personeli	2010-
---	-------

Çalıştığı Projeler

“Laktik Asit Bakterilerinin tanımlanmasında amplifiye edilmiş 16S rDNA restriksiyon analizinin kullanımı” Araştırmacı. Ocak 2009-Ocak 2010 (A.Ü.BAP- 09H4240001).

“Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA sekans analizi ile tanımlanması” Araştırmacı. Ocak 2009-Ocak 2010 (A.Ü.BAP- 09H4240002).

“İnsan tükürüğünde post-translasyonel modifikasyona uğramış glikoproteinler ve fosfoproteinler ile birlikte modifikasyon bölgelerinin tanımlanması” Araştırmacı. Ocak 2010-Ocak 2012 (A.Ü.BAP- 10B4240001).

“Bazı Laktik Asit Bakterilerinde 16S rDNA dizi analizi ve 16S-23S rDNA ara bölge (ISR) temel alınarak gerçekleştirilen filogenetik analizler” Araştırmacı. Ocak 2010-Ocak 2012 (A.Ü.BAP- 10B4240002).

“Laktik Asit Bakterilerinde Tür içi ve Türler arası ayırmda RAPD ve 16S-ARDRA tekniklerinin değerlendirilmesi” Araştırmacı. Ağustos 2008-Ağustos 2010 (Tamamlandı) TÜBİTAK TBAG (108T280).