



Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Fadime KIRAN, Özlem OSMANAĞAOĞLU*

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Tandoğan-ANKARA

ÖZET

Laktik asit bakterileri (LAB) gıda endüstrisinde genellikle starter kültür olarak kullanılmaktadırlar. Bakteriyosin üretim özelliklerinden dolayı gıdalarda raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu rolüne sahiptirler. Ayrıca, probiyotik ürünlerin içeriğinde bulunmakta, bazıları ise gıdalarda bozulmaya sebep olmaktadır. Tüm bu özellikler bu bakteri grubunu hem endüstriyel açıdan hem de bilimsel arenada üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı oldukça önemli bir grup haline getirmiştir. LAB'ların endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, suş bazında güvenilir tiplendirme yöntemleri hem LAB starter kültürlerin performanslarının incelenmesinde hem de fonksiyonel gıda ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılacak olan kültürlerin incelenmesinde önem kazanmaktadır. Günümüzde, LAB identifikasyon/tiplendirme çalışmaları ilgi odağı olan fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere (genotipik) doğru kaymıştır. Bu derlemede LAB'ların tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler özetlenmiştir.

Keywords

Laktik asit bakterileri (LAB), Moleküler (genotipik) identifikasyon, Tiplendirme

Molecular methods used for identification/typing of lactic acid bacteria (LAB)

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used as starter cultures in the food industry. Because of their bacteriocin production speciality, they make expire date of the food longer and thought to be potential biopreservatives. Besides, they are used in probiotic products and some of them causes food spoilage. All of these properties make this group of bacteria very important both industrially and scientifically. As far as the industrial applications of LAB are concerned, reliable strain typing methods will become increasingly important in the study of the performance of LAB starter cultures and cultures used as additives in functional food type products. Nowadays, the main focus for the identification/typing of LAB has moved from phenotypic to molecular (genotypic) methods as they yield more sensitive and accurate results. In this review, molecular methods used for typing of LAB were summarised.

Anahtar

Kelimeler

Lactic acid bacteria (LAB), Molecular (genotypic) identification, Typing

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-posta: osmanaga@science.ankara.edu.tr

1. Giriş

Orla-Jensen'a [1] göre "gerçek laktik asit bakterileri" karbonhidrat fermentasyonu neticesinde son ürün olarak laktik asit oluşturan, çubuk ya da kok şeklinde, spor oluşturmeyen, katalaz negatif ve Gram-pozitif doğal bir gruptur. Birkaç ayrıcalık gösteren üye dışında hepsi hareketsizdir. Endüstriyel uygulamalar dahilinde genellikle yararlı ve patojen olmayan altı anahtar genus kullanılmaktadır: *Lactococcus* (süt ürünlerinde), *Lactobacillus* (sebzeler, tahıl süt ve et ürünleri), *Leuconostoc* (sebzeler ve süt ürünleri), *Pediococcus* (sebzeler ve et ürünleri), *Oenococcus* (şarap) ve *Streptococcus* (süt ürünleri). Özellikle *Lactobacillus* türlerinde olduğu gibi LAB'ların bazı üyeleri ise insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde önemli bir alanı işgal etmektedir [2].

LAB'lar tüketiciler tarafından sıklıkla kullanılan fermente gıda maddelerinin doğal florasında baskın halde bulunmakla beraber, ekzopolisakkarit üretmekte, gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmakta ve probiyotik ürünlerin içeriğinde bulunmaktadır [3]. LAB'lar yüzlerce yıldır fermentasyon işlemlerinde yeni besinlerin üretimi ve bozulabilir gıda ürünlerini korumak için sıklıkla kullanılmaktadır. Fermente besinlerin ana tipleri LAB'lar tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermentasyonu sonucu oluşturulmaktadır. Fermentasyon işleminden sonra karakteristik aroma ve tatlara sahip yeni besinler meydana gelmekte, ham materyallerin raf ömrü uzatılmış olmakta ve patojenik veya gıdalarda bozulmalara sebep olan organizmaların gelişmesi önlenmektedir. Sonuç olarak gıda endüstrisinde, LAB'ların gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler çeşitli fermente gıdaların tat, koku, tıksür özelliklerine etki etmektedir. Ayrıca, ürettiği peptid yapısındaki "bakteriyosin" molekülü gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin gelişimini engellemekte ve böylece gıdanın raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu (biopreservatif) görevi görmektedir [4]. 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 beraber özellikle buzdolabı ısısında gelişebilen bazı LAB'larda gıdalarda bozulmaya sebep olmaktadır. Son zamanlarda LAB'lar; biopolimer (*Leuconostoc sp.*), bulk enzim (*Lactobacillus brevis*), etanol ve laktik asit (*Lactobacillus casei*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb.*

brevis) içeren endüstriyel, kimyasal ve biyolojik ürünlerin üretilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. LAB'lar aynı zamanda sindirim enzimleri ve aşı antijenleri için oral araç olarak geliştirilmede güçlü adaylardır. LAB'ların doğal asit toleransı, gastrik yolda yaşayabilme kabiliyetleri ve insan tüketimi sırasındaki güvenilirlik kaydı, biyolojik moleküllerin hedef lokasyonlara ve dokulara etkili olarak ulaşmalarında kullanılan anahtar özellikleridir [5].

Tüm bu özellikler bu bakteri grubunu hem endüstriyel hem de bilimsel açıdan üzerinde yoğun çalışmaların yapıldığı oldukça önemli bir grup haline getirmiştir. LAB'ların endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilir olacak olan LAB suşlarının seçimidir. Bundan dolayı, LAB'ların tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel ve bilimsel açıdan gittikçe daha fazla önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayırımı sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir [6,7]. LAB'ların identifikasyonunda kullanılan yöntemler genel olarak fenotipik yöntemler ve moleküler (genotipik) yöntemler olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir.

2. LAB tiplendirmesinde kullanılan fenotipik yöntemler

Suşlar arasındaki ayırımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürünü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde genus-tür düzeyinde identifikasyona olanak sağlayan geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücre yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininler, poliaminler, hücre duvarı bileşikler, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyel duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternleri (1D yada 2D) yer almaktadır. Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler genus identifikasyonunda kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermentasyonu gibi biyokimyasal testler fenotipik yöntemler olarak kullanılmakta ve tür bazında ayırım sağlayabilmektedir [8,9]. Kullanışlı olmasına rağmen, türler arası varyasyonlar ve tekrarlanabilirliğinin zayıf olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bununla birlikte; standardize edilmiş sonuçlardan oluşturulmuş veri tabanlarından

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

hazırlanmış API CHL50 gibi ticari amaçlı sistemler yüksek sayıdaki suşların tanımlanmasında kullanılmakla beraber yeni özellik kazanmış türlerin veya alt türlerin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Şimdiye kadar identifikasyonda kullanılan fermentasyon özellikleri ve API Kit prensibine dayalı biyokimyasal testler tür ve genus bazında ayırım sağlarken; identifikasyonda kullanılan fenotipik yöntemler arasında en güvenilir yöntemin protein profil analizi olduğu belirtilmiştir. LAB'larda en iyi bilindik türlere ait protein patern veri bankası oluşturularak bu problemin de üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır [10]. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez sisteminde elde edilen toplam hücre protein profillerinin kıyaslanması, tür ve alt tür bazında identifikasyon için oldukça güvenilir bir yöntem olmakla beraber bazı türler için limitlidir. Dolayısıyla, protein profiline dayalı tiplendirme tekniğinin yeterli olmadığı ve doğruluğunu kanıtlamak için moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [11]. Bununla beraber, fenotipik yöntemler ile gen ekspresyonunun ürünü karakterize edildiğinden bu özelliklerin hepsi spontan mutasyon ve büyüme koşullarındaki farklılıklar neticesinde değişim göstermeye meyillidirler. LAB'ların çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe uyandırıcıdır. Bununla beraber büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda genus düzeyinde dâhi identifikasyon işlemlerinde zorluk yaratmaktadır. Bu kriterler kaba bir identifikasyon amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir identifikasyon amacına yönelik değildir. Bundan dolayıdır ki LAB'ların genus ve tür bazında identifikasyonunda kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış identifikasyonlara ve hayal kırıklığı yaratan identifikasyon sonuçlarının ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir [12].

3.LAB Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler (Genotipik) Yöntemler

Organizmanın genetik yapısının analizini temel alan yöntemlerdir. DNA temelli yöntemler, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların genus seviyesinden suş seviyesine kadar identifikasyonunu sağlayabilmektedir. Nükleotid sekanslarının kullanımını içeren bu teknikler oldukça

hızlı teknikler olup besiyerindeki değişikliklerden etkilenmemeleri bakımından fenotipik identifikasyon yöntemlerine kıyasla oldukça önemli avantajlar sunmaktadır [13, 14]. Bununla beraber, genotipik yöntemler kromozomal DNA molekülünün insersiyon ve delesyonu, ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına veya var olan kesim bölgelerinin elimine olmasına sebep olan rastgele mutasyonlardan etkilenmekle beraber doğal varyasyona daha az maruz kalmaktadırlar. Fenotipik ya da genotipik olsun, tüm identifikasyon sistemleri yorum ve performans rahatlığı, ayırım gücü, üretilebilirlik ve tiplendirilebilirlik bakımından karakterize edilmelidir.

Günümüzde, LAB identifikasyon/teplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler (genotipik) yöntemlere doğru kaymıştır [12]. DNA temelli moleküler yöntemler filogenetik çalışmalarda mikroorganizmaların birbirleri ile bağlantısının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlardandır ve kullanılan yönteme bağlı olarak genus düzeyinden suş düzeyine kadar mikroorganizmaların farklı seviyelerde tanımlanmasında gelişmiş bir bakış açısı sunmaktadır. Uygulamalı bakış açısından bakıldığında, ideal bir tiplendirme sistemi Tablo 1'de belirtilen bir takım önemli özelliklere sahip olmalıdır

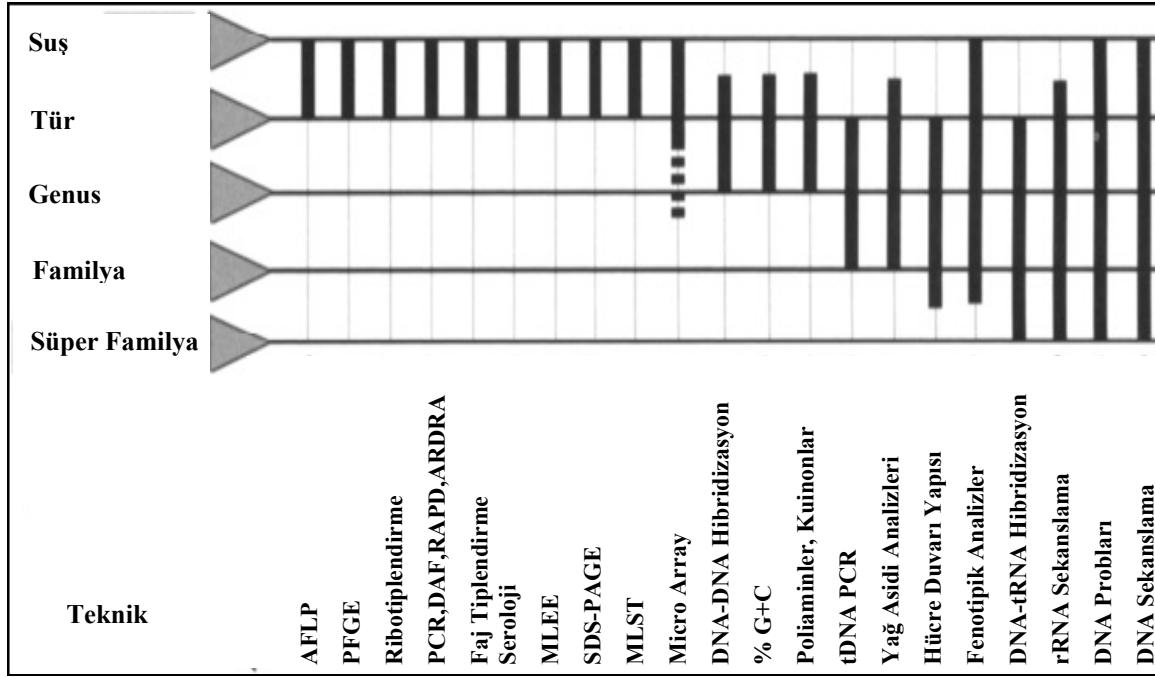
Tablo 1. İdeal bir tiplendirme düzeneğinde istenilen özellikler

Geniş çeşitlilikteki izolatları tiplendirebilmeli

- Ayırım gücü yüksek olmalı
- Uzun zaman sonra ve farklı merkezlerde elde edilen sonuçlar 'tekrarlanabilirlik' bakımından başarılı 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

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 [13,14]. LAB suşlarının identifikasyonunda/teplendirilmesinde kullanılan

yöntemler karşılaştırmalı olarak Şekil 1'de gösterilmiştir [15,16].



Şekil 1. Literatürde kullanılan moleküler ve fenotipik tiplendirme yöntemlerinin taksonomik rezolusyonu

3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Olmayan Moleküler Yöntemler

3.1.1 Dalgalı Alan Jel Elektrofrez (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis): 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 [16]. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin en başarılısı olarak kabul edilen bu yöntemde 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 izolasyonuna tabi tutulmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu uygun değildir. Liziz işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalmaktadır. 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 edilmesini 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.

Son senelerde, PFGE ile DNA parmakizi tiplendirmeleri büyük restriksiyon fragmentlerinin karşılaştırılmasına imkân vererek çeşitli LAB suş tiplendirmelerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [17]. Bununla beraber, oldukça fazla zaman/iş gücü harcanmasını gerekli kılan bu yöntem aynı zamanda da türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmakta (farklı restriksiyon enzimleri ve elektroforez koşulları) ve dolayısıyla genelde tür içi ayırım veya ilişkilerin ortaya konulmasında [14], bakteriyel suşların ayrılmasında da kullanılmaktadır [18]. PFGE'i yüksek ayırım gücü gösteren bir yöntem olarak kabul edilmektedir. PFGE restriksiyon biçimi zamana karşı stabildir, tekrarlanabilir ve yorum için standart kriterler mevcuttur. Bu nedenle bu yöntemin türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

kullanışlı bir araç olduğu bildirilmiştir [19,20,21,22]. Birçok araştırmacı prosedürü hızlandırmak için ve zaman tüketen prosedürlerin üstünden gelebilmek için PFGE protokollerinin değişik modifikasyonlarını tanımlanmış bulunmaktadır [23,24].

3.1.2 Ribotiplendirme (Ribotyping): Bakterilerde, ökaryotlarda ve arkelerde bulunan rRNA moleküllerinin birçoğunun moleküler evrimin gidişatında çok az değişmiş olduğu görülmektedir [25], bundan dolayı bu sekanslara spesifik problemler bakterilerin geniş bir sınıflandırmasını, benzer rRNA sekanslarıyla belirleyebilmektedir. Diğer prob tipleri ise belirli türler veya tür içinde sınırlı kalmaktadır. Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanmakta ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılmaktadır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilmekte ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir problemler hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde probdaki işaret gözlenmektedir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması için kullanılabilir. Ribotiplendirme aynı zamanda muhtemelen bu yöntemin en yaygın kullanım amacında olduğu gibi, izolatların filogenetik amaçlar için tiplendirilmesinde de kullanılabilir. Geçmiş yıllarda bu yöntem *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* türlerinin veya alttürlerinin taksonomik çalışmalarında da kullanılmıştır [26,27,28,29,30].

Yöntemin ayırım gücü kullanılan oligonükleotit problemlerin ve restriksiyon enzimlerinin sayısına ve tipine bağlıdır. PFGE ile karşılaştırıldığında ribotiplendirme, alttür ve suş identifikasyonu için yetersiz kalmaktadır buna rağmen türlerin ayırımında uygulanabilir bir yöntemdir [31,32,33]. Ribotiplendirme; araştırmacıların yanlış bir şekilde PCR-ribotiplendirme olarak tanımladığı, 16S-23S ara bölgesinin PZR bazlı fragment uzunluk polimorfizminden ayrılmalıdır [34].

3.1.3 Plazmid profil analizleri: Plazmidler; ekstrakromozomal, replike olabilen, küçük, halkasal çift iplikli DNA molekülleridir. 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

bakteriyel tiplendirme için yardımcı analizler olarak kullanılmaktadır. Aynı türe ait olan suşların sahip oldukları plazmidlerin sayı ve büyüklüklerindeki varyasyonları olarak bilinen plazmid profili analizi, 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'larda plazmidlerin yüksek oranda bulunmasına rağmen 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. Suşların, yaşam süreçleri boyunca kazandıkları ve kaybettikleri plazmid, yöntemin güvenilirliğini etkilemektedir [35]. Plazmidler fermentasyon ve diğer teknolojik işlemler sırasında kaybolabileceği için plazmid profilleri tür içi tiplendirmede güvenilir bir yöntem olmaktan çıkmaktadır [36,37]. Ayrıca, plazmid profil analizlerinin birçok durumda diğer genotipik yöntemlerden daha düşük ayırım gücü gösterdiği göz önünde bulundurulmalıdır [38,39]. Buna ek olarak benzer moleküler ağırlıklı plazmidlerin varlığı bunların her zaman aynı plazmid olduğunu göstermemektedir. Bu durumda restriksiyon endonüklez kesimleri kullanılabilir, aynı olduğu düşünülen plazmid DNA, değişik bölgelerden belirli bir restriksiyon enzimi ile kesildiği zaman oluşan fragment bantlarının elektroforez sırasındaki hareketlerinin farklı olması beklenmektedir.

3.1.4 Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism): Aynı zamanda kromozomal DNA restriksiyon analizi veya DNA mikrorestriksiyon analizi olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde kromozomal DNA izole edilmekte ve restriksiyon enzimiyle muamele edildikten sonra oluşan fragmentlerin agaroz jelde ayırımı yapılmaktadır. Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalara "restriksiyon parçaları" denmektedir. Bunların büyüklüğü kullanılan restriksiyon enzimlerine bağlı olarak değişim göstermektedir. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilmektedir. DNA parçalarında görülen bu polimorfizmin nedeni nokta mutasyonu olabileceği gibi, inversiyon, delesyon, translokasyondan kaynaklanan büyük mutasyonlar da olabilmektedir. Kısaca; bu yöntemde RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA'daki kesim noktalarındaki değişimlerden faydalanılmaktadır. Bantlar ve bantlar arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak her izolatın ayırımı sağlanmaktadır

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

[40,41]. 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 güçleşmektedir. Bu nedenle tutarlı sonuçların oluşması için birden fazla restriksiyon enziminin kullanımı gerekebilmektedir.

3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temelli Moleküler Yöntemler

Tür/tür içi seviyede yüksek ayırım gücü tercih edildiğinde PZR temelli moleküler parmak izi tekniklerinin daha yüksek potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

3.2.1 Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PZR):

Hızlı bir yöntemdir. Genomdaki hedef bölgeler, spesifik primerlerin kullanımıyla çoğaltılmakta ve daha sonra restriksiyon enzimiyle kesilmektedirler. Restriksiyon enzimi hedef bölgenin bilinen kompozisyonuna dayanarak seçilmektedir. Elde edilen restriksiyon fragmentleri, agaroz jel elektroforezi neticesinde ayrılmakta ve karşılaştırılmaktadır. Bu yöntemde hedef bölgenin önceden bilinmesi gerekmektedir. Bu durum teknik açısından bir dezavantajdır. Bu nedenle genellikle evrensel primerler kullanılmaktadır [42].

3.2.2 Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PZR (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR):

Geleneksel PZR çalışmaları belirli bir türe veya hatta suşa özgü DNA sekanslarını amplifiye etmek için kullanılabilirle 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 parmak izi analizi yapılacak olan genomun sekansını bilmeye gerek yoktur [43,44]. Williams ve arkadaşları, özgül nükleotit dizisini bilmeye gerek kalmadan PZR ile rastgele bir primer kullanarak polimorfizmin saptanabileceğini bulmuşlardır [44]. Literatüre RAPD-PZR olarak geçen bu yöntemin analizleri sonucu elde edilen çoğaltılmış ürün polimorfizm göstermekte ve böylelikle genetik markörler olarak kullanılabilir. Yöntem aynı yıl diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PZR (Arbitrarily Primer PCR) olarak isimlendirmiştir [43].1991 tarihinde ise bu yöntemle

aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmak izi profili elde edilen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir yöntem yayınlanmıştır [45]. Bu tekniği tanımlamak için kullanılan terminoloji bazı durumlarda karışıklık yaratmaktadır [46]. RAPD parmakizlerinin yaratılmasını gerekli kılan yöntemleri tanımlamada çeşitli farklı isimler kullanılmaktadır. MAAP ('multiple arbitrary amplicon profiling') ifadesi önerilmekle beraber [45] her bir yöntemin kullanılan primerin uzunluğuna göre sınıflandırılabilceği de önerilmiştir. Bununla beraber, günümüzde önerilen bu terminolojinin hiçbiri resmi olarak kabul görmemiştir ve son yıllardaki yayınlarda kullanılan primerin uzunluğuna bakılmaksızın genel yöntem AP-PZR veya RAPD tiplendirme olarak isimlendirilmektedir.

RAPD parmak izi analizi LAB'ların tür içi ve türler arası ayırımında son zamanlarda oldukça yaygın olarak kullanılan PZR-temelli bir tekniktir. Yöntem, yakın ilişkili türlerin filogenetik analizleri ve tür içinde ayırım potansiyeline sahiptir [43,44]. RAPD, bütün PZR temelli markörlerin en basitidir. RAPD markörleri, küçük (10 baz), %50'den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PZR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleşmektedir. Oligonükleotit primerleri PZR'nin anahtarıdır. Oluşan parçaların sayısı ve büyüklüğü; primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA'da bu diziye komplementer dizinin varlığına bağlı olarak araştırılan genoma özgü bir desen (patern) vermektedir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA'lar çalışılmaktadır. Primer bağlanmasıyla, polimeraz enzimi 5'→3' yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltılmakta ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boyalarla boyanarak izlenebilmektedir. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olmaktadır. 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

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

sayı ve büyüklükleri de farklı olacaktır. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon (delesyon veya insersiyon) bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılmaktadır. Aynı bant profili gösteren izolatlar filogenetik olarak ilişkili şeklinde yorumlanabilmektedir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tiplendirme yöntemleriyle çalışılmalıdır.

RAPD yönteminin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı değişken bulunmaktadır. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. Tekniği etkileyen diğer temel değişkenler arasında; MgCl₂ konsantrasyonu, Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denatürasyonu ve primer karışımları önem taşımaktadır [43,44]. 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. 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 [47]. Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntem diğer moleküler yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. Kullanılan primer sayısı arttıkça ayırım gücü artmaktadır [16]. LAB'ların türler arası ayırımında, bazı türlerin (*Enterococci*, *Pediococci* ve *Lactobacilli*) tür içi ayırımında ve gıdalardan izole edilen suşların genus bazında ayırımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [48,49].

3.2.3 Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism): AFLP; moleküler markör teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir [50]. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde

kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir [51]. AFLP temelde RFLP ve RAPD-PZR tekniklerinin bir arada kullanıldığı ve identifikasyonda özellikle RFLP ve RAPD-PZR'de olduğu gibi tür-suş düzeyinde oldukça yüksek oranda başarıya ulaşan ve son yıllarda diğer moleküler yöntemlere alternatif olarak sunulan popüler bir tekniktir. Yöntem, 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 [52,53]. 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 olmaktadır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına pre-selektif amplifikasyon adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranmakta ve daha sonra PZR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere artırılmaktadır [12]. 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 (Tablo 2) gün geçtikçe artmaktadır [54].

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 [52,52,55].

Tablo 2. AFLP tekniğinin avantaj ve dezavantajları

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

3.2.4 Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (Rep-PZR: Repetitive Extragenic Palindrome PCR):

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda Rep olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. Versalovic ve arkadaşları 1994'de, bakteriyel parmakizi için bakteriyel genomların içinde bulunan bu tekrarlanan DNA elementlerinin PZR ile amplifikasyonundan elde edilen spesifik bantların incelenmesiyle yapılan bir tiplendirme yöntemi tanımlamıştır [56]. Rep-PZR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmakizi tekniğidir [57]. Bugüne kadar tekrarlanan DNA sekanslarının 3 türü tanımlanmıştır [57]. Bunlardan birincisi; tekrarlanan ekstrasjenik palindromik (REP) olarak adlandırılan 35-40 baz çifti büyüklüğünde ve çeşitli halkaları yapısında bulunduran elementlerdir. Enterobakteriyel tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC) ise; 124-127 baz çifti büyüklüğünde ve merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Son olarak BOX dizisi ise 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 [58]. Bu primerlerin kullanımıyla REP, ERIC ve BOX elementlerinin arasında yerleşmiş ayırıcı bölgeler çoğaltılabilmekte ve REP-PZR, ERIC-PZR ve BOX-PZR genomik parmakizi olarak adlandırılmaktadır.

Toplu halde bu yöntemler Rep-PZR genomik parmak izi tekniği olarak tanımlanmaktadır [56]. Bu teknikte tekrarlanan elementler PZR ile değişik boyutlarda DNA fragmentleri üretmek için çoğaltılmaktadır. PZR ürünleri daha sonra boyutlarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılmakta ve spesifik DNA parmak izi bantları oluşturulmaktadır. Daha sonra bu bantlar tanımlayıcı bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmektedir. Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PZR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri arasındadır [59]. Carson ve ark. 2003'te Rep-PZR'nin ribotiplendirmeden daha doğru, tekrarlanabilir ve etkili bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır [60]. Tekniğin uygulanması kolaydır, ayrıca hem çok sayıda hem de az sayıda örneğe uygulanabilir. Yöntemin en önemli dezavantajı söz konusu serilerdeki yüksek değişimdir. Bu nedenle çoğu durumda tür ayrımında kullanılamaz. Daha fazla türe uygulanabilirlik göstermekte olan Rep-PZR, PFGE ile karşılaştırıldığında daha düşük [61] ancak plazmid profil analizleri veya genomik parmakizleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek ayırım gücüne sahiptir [62].

3.2.5 PZR Ribotiplendirme

3.2.5.1 Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi (ARDRA: Amplified rDNA Restriction Analysis): Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PZR-RFLP esaslı bir yöntem olan ARDRA’da 16S rDNA genleri evrensel primerler veya tür spesifik primerler kullanılarak 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır. Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilmektedir [63]. Restriksiyon enzimlerinin seçimi, çoğaltılmış bölgenin nükleotit kompozisyonuna göre yapılır, bu seçim ayrıca geniş sayıda türün net bir ayrımı için gereklidir. Sonuçta oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bazı yakın türler arasında ayırım elde edebilmek için birden fazla restriksiyon profilinin karşılaştırılması önemlidir.

3.2.5.2 16S-23S İç Transkribe Edilen Ayrııcı Bölge PZR (16S-23S ITS: Internal Transcribed Spacer PCR) / Genler Arası 16S-23S rRNA Ayrııcı Bölge PZR (ISR: Intergenic 16S-23S rRNA Spacer Region PCR): Prokaryotlarda rRNA’yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem genus hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir [64]. 16-23S rRNA arasındaki bölgesinin çoğaltılması genellikle ITS-PZR olarak tanımlanmaktadır. ITS-PZR; 16S-23S rRNA’nın intergenik transkripsiyon bölgesi içindeki polimorfizmleri ortaya çıkarmakta ve bakteriyel türlerin karakterizasyonunda kullanılabilir. Bu yüzden filogenetik analizler için önemli bir araç olarak görev yapabilir [65]. rRNA genleri arasındaki ara bölge hedef bölge olduğu için yöntem aynı zamanda PZR-ribotiplendirme olarak da adlandırılmaktadır. Agaroz jelde ayrılan çoğaltılan bölgeler karşılaştırılmaktadır. Çoğaltılmış bölgenin restriksiyon analizi veya sekansı, yöntemin ayırım gücünü yükseltmektedir [66]. 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 [16].

3.3 DNA sekans analizi

Bir DNA molekülünün nükleotid kompozisyonunun belirlenmesidir. DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA’daki farklılıkların ayrımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayrımı için DNA sekanslamasının kullanılması en ideal yol olarak görülmesine rağmen, her izolata 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 olup bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir [67]. DNA sekanslaması için en popüler yöntem dideoksi veya “Sanger” yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli gen sekanslarına ait DNA dizi analizi bir identifikasyon/iplendirme yöntemi olarak umut vericidir. Birçok laboratuvar için bu teknik şu an için uygulanabilir olmadığı için daha ucuz DNA sekans araçlarının uygulanabilirliği bu tekniği gelecekte daha ulaşılabilir hale getirebilir.

PZR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla beraber bazı güçlükler de mevcuttur, örneğin, çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi [16].

3.4 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 filogenetik 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 [68] ve nümerik taksonomide karakterlerin hepsi temelde eşit olarak muamele görmektedir. Çalışmada kullanılmak üzere seçilen numunelerin taksonomik seviyesi operasyonel taksonomik ünite’dir (OTU: Operational Taxonomic Unit) ve çalışmaya bağlı olarak bu OTU tür, popülasyon, birey vs. olabilir. Organizmaların karşılaştırılmalarında (pair-wise) benzerlik

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

(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 veya ortalama (unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA) bağlantı gruplandırma yöntemleri ile hiyerarşik olarak kümelemek için kullanılmaktadır. Bu kümeleme daha sonra araştırmacıya bir dendogram şeklinde sunulmaktadır [69].

3.5 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, bu nedenle kompleks elektroforetik paternlerin analizleri bilgisayar programlarının kullanımına bağlıdır. Bu durum, otomatize fenotipik identifikasyon sistemlerinin kullanımı ile oluşturulabilen çok sayıdaki fenotipik karakterin veri analizleri için de geçerlidir. En yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler; küme (cluster) yada patern analizlerini, izolatların ikili gruplar (pairwise) halinde karşılaştırılmasından sonra benzerlikleri temel alınarak gruplandırılmalarını ve dendogram olarak adlandırılan ağaca benzer yapı ile anlatımını içermektedir. 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) çalışmaları önderliğinde [70] mikrobiyoloji alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş ve ilk olarak (+) veya (-) olarak skorlanan fenotipik karakterler için kullanılmıştır [71]. Nümerikal taksonomide morfolojik ve fizyolojik özellikleri içine alan fenotipik karakterlerin ne şekilde skorlanacağına dair detaylı tanımlama Lockhart ve Liston'un (1970) çalışmasında bulunabilir [72]. Mikroorganizmaların protein elektroforetik parmakizi analizlerine dayanan otomatize sınıflandırılması ilk olarak Kersters ve De Ley (1975) tarafından tanımlanmıştır [73]. 1980'lerden bu yana, mikrobiyel 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 GelCompare ve BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) gibi oldukça gelişmiş ticari yazılım paketlerine bırakmıştır. Parmakizi analizlerinde kullanılan diğer ticari yazılım 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.

4. Sonuç

Laktik asit bakterilerinin endüstriyel uygulamaları düşünüldüğünde, araştırmaların en temel amacı kullanılabilecek olan LAB suşlarının seçimidir. Bu nedenle, herhangi bir suşun spesifik ve belirgin olarak ayırımı sağlayan güvenilir yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir. LAB identifikasyonunda/teplendirmesinde kullanılan fenotipik yöntemler bakterilerin genus ve tür bazında ayırımı için halen önemli bir rol oynasa da yorumlaması oldukça zordur. Bu yöntemler aynı zamanda zaman alıcı olup moleküler yöntemler ile karşılaştırıldıklarında ise daha az ayırım gücüne sahiptirler. Günümüzde, LAB identifikasyon/teplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler yöntemlere doğru kaymıştır. Moleküler yöntemler (genotipik), birbirine çok yakın akraba türlerin tespiti, türlerin identifikasyonu ve ayırımı, starter kültür analizleri, gıdalarda bozulmalara ve gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan önemli mikroorganizmaların karakterizasyonlarında kullanılarak önem kazanmıştır. Bu yöntemler, güçlü bir ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Orla-Jensen, S., In S. Orla-Jensen (Ed.), The lactic acid bacteria, pp. 1-196, Copenhagen: A.F. Host and Son, 1919.
2. Axelsson, L., Lactic acid bacteria: Classification and physiology, Lactic Acid Bacteria, pp. 1-73, Microbiol. and Funct. Asp., 1998.
3. Rebecchi, A., et al., Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation, J. of Appl. Microbiol., 84, 1043-1049, 1998.
4. Kleenhammer, Y.R., Bacteriocins of lactic acid bacteria, Biochimie., 70, 337-349, 1988.

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

5. Rademaker, J.L.W. and de Bruijn, F.J., Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, <http://www.msu.edu.edu/user/debruijn/dna1-4htm>, Nov. 2000.
6. Dicks, L.M.T., et al., 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, *Int. J. of Sys. Bacteriol.*, 40, 83-91, 1990.
7. Dykes, G.A., et al., Strain typing in the genus *Lactobacillus*, *Lett. in Appl. Microbiol.*, 19, 63-66, 1994.
8. Khaled, D.K., et al., Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR, *FEMS Microbiol. Lett.*, 153, 191-197, 1997.
9. Falsen, E., et al., Phenotyping and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov., *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 49, 217-221, 1999.
10. Pot, B., et al., Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA targeted oligonucleotide probe hybridization, *J. of General Microbiol.*, 139, 513-517, 1993.
11. Temmermann, R., et al., Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods, *Trends in Food Sci. & Techn.*, 15, 348-359, 2004.
12. Babalola, O.O., Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria, *African J. of Biotechnol.*, 2(12), 710-713, 2003.
13. Moschetti, G., et al., Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains, *J. of Appl. Microbiol.*, 85, 25-36, 1998.
14. Bush, U. and Nitschko, H., Methods for differentiation of microorganisms, *J. of Chromat. B*, 722, 263-278, 1999.
15. Dijkshoorn, L., et al., Strain, clone and species: comments on three basic concepts of bacteriology, *J. of Medical Microbiol.*, 49, 397-401, 2000.
16. Ehrmann, M.A and Vogel, R.F., Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria, *Food Sci. and Techn.*, 20, 1-12, 2005.
17. Moschetti, G., et al., Nisin producing organisms during traditional Fior di latte cheese making monitored by multiplex-PCR and PFGE analysis, *Int. J. of Food Microbiol.*, 63, 109-116, 2001.
18. Prakash, O., et al., Polyphasic approach of bacterial classification: An overview of recent advances, *Indian J. of Microbiol.*, 47, 98-108, 2007.
19. Gordillo, M.E., et al., Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*, *J. of Clinical Microbiol.*, 31; 1570-1574, 1993.
20. Donabedian, S., et al., DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of *Enterococci* to the species level, *J. of Clinical Microbiol.*, 33, 141-45, 1995.
21. Tenover, F.C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction pattern produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J. of Clinical Microbiol.*, 33, 2233-2239, 1995.
22. Patterson, J.E. and Kelly, C.C., Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool for Enterococci and Streptococci, *Methods in Cell Biol.*, 20, 233-239, 1998.
23. Matushek, M.G., et al., Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis, *J. of Clinical Microbiol.*, 34, 2598-2600, 1996.
24. Turabelidze, D., et al., Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant Enterococci, *J. of Clinical Microbiol.*, 38, 4242-4245, 2000.
25. Woese, C.R., Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.*, 51, 221-271, 1987.
26. Björkroth, K.J., et al., Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 66, 3764-3772, 2000.
27. Fernández, E., et al., *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants, *Int. J. of Evolutionary Microbiol.*, 54, 2291-2296, 2004.
28. Kostinek, M., et al., *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*, *Int. J. of Syst. and Evolutionary Microbiol.*, 55, 2485-2489, 2005.
29. Schlegel, L., et al., *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food, *Int. J. of Syst. Evolutionary Microbiol.*, 50, 1425-1434, 2000.

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

30. Suzuki, K., et al., *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *Int. J. of Syst. Evolutionary Microbiol.*, 54, 115-117, 2004.
31. Hall, L.M.C., et al., Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis, *J. of Clinical Microbiol.*, 30, 915-919, 1992.
32. Gordillo, M.E., et al., Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*, *J. of Clinical Microbiol.*, 31, 1570-1574, 1993.
33. Woodford, N., et al., Application of resistant *Enterococci*, *J. of Clinical Microbiol.*, 31, 653-658, 1993.
34. Kostman, et al., Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping, *J. of Clinical Microbiol.*, 30, 2084-2087, 1992.
35. Duffner, F. and O'Connell, M., Comparative evaluation of plasmid profiling and ribotyping in the analysis of *Lactobacillus plantarum* strain heterogeneity in silage, *J. of Appl. Bacteriol.*, 78, 20-27, 1995.
36. Kondo, J.K. and Mc Kay, L.L., Gene transfer systems and molecular cloning in group N streptococci: A review, *J. of Dairy Sci.*, 37, 1193-1195, 1985.
37. Neve, H., et al., Conjugation, a common plasmid transfer mechanism in lactic acid streptococci of dairy starters, *Syst. and Appl. Microbiol.*, 9, 151-157, 1987.
38. Maslow, J.N., et al., Molecular epidemiology: Application of contemporary techniques to the typing of microorganisms, *Clin. Infect. Dis.*, 17, 153-164, 1993.
39. Hartstein, A.I., et al., 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, *J. of Clinical Microbiol.*, 33, 2022-2026, 1995.
40. Grimont, F. and Grimont, P.A.D., DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 249-280, Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., John Wiley and Sons, Chichester, 1991.
41. Giovanetti, L. and Ventura, S., Application of total DNA restriction pattern analyses to identification and differentiation of bacterial strains, *Methods in Molecular Biology*, Vol 46: *Diagnostics Bacteriology Protocols*, pp. 165-179, Howard, J. and Whitcombe, D.M., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995.
42. Kabadjova, P., et al., Differentiation of closely related carnobacterium food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 68, 5358-5366, 2002.
43. Welsh, J. and Mc Clelland, M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nuc. Acids Res.*, 18, 7213-7218, 1990.
44. Williams, J.G.K., et al., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nuc. Acids Res.*, 18, 6531-6535, 1990.
45. Caetano-Anolles, G., et al., High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers, *Biotech.*, 9, 553-557, 1991a.
46. Vanechoutte, M., DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature, *Mol. Biotech.*, 6, 115-142, 1996.
47. Tingey, S.V. and Del Tufa, J.P., Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers, *Plant Phys.*, 101, 349-352, 1993.
48. Cocconelli, P.S., et al., Use of RAPD and 16 S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture, *Lett. in Appl. Microbiol.*, 24, 8-12, 1997.
49. Taillez, P., et al., Estimation de la diversité parmi les souches de la collection CNRZ: Application de la RAPD a un groupe de *Lactobacilles*, *Le Lait*, 76, 147-158, 1996.
50. Koeleman, J.G., et al., Nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *J. of Hosp. Infect.*, 37, 113-123, 1997.
51. Janssen, P., et al., Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy, *Microbiol.*, 142, 1881-1893, 1996.
52. Huys, G., et al., High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting, *Int. J. of Sys. Bacteriol.*, 46(2), 572-580, 1996.
53. Vos, P., et al., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nuc. Acids Res.* 23(21), 4407-4414, 1995.
54. Mueller, U.G. and Wolfenbarger, L.L., AFLP genotyping and fingerprinting, *TREE*, 14, 389-394, 1999.
55. Blears, M.J., et al., Amplified fragment length polymorphism (AFLP): Review of the procedure and its applications, *J. of Indust. Microbiol. and Biotech.*, 21, 99-114, 1998.

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27(1): 62-74(2011)

56. Versalovic, J., et al., Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR), *Methods in Mol. and Cell. Biol.*, 5, 25-40, 1994.
57. Lupski, J.R. and Wolfenbarger, L.L., Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes, *J. of Bacteriol.*, 174, 4525-4529, 1992.
58. Prakash, O., et al., Polyphasic approach of bacterial classification: An overview of recent advances, *Indian J. of Microbiol.*, 47, 98-108, 2007.
59. Van der Zee, A., et al., Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of novel epidemicity marker, *J. of Clinical Microbiol.*, 37, 342-349, 1999.
60. Carson, C.A., et al., Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 69,1836-1839, 2003.
61. Olive, D.M. and Bean, P., Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *J. of Clinical Microbiol.*, 37, 1661-1969, 1999.
62. Georghiou, P.R., et al., Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: Identification of hospital-associated strains by molecular techniques, *Cli. Infect. Diseases.*, 20, 84-94, 1995.
63. Andrighetto, C., et al., Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products, *Res. in Microbiol.*, 149, 631-643, 1998.
64. Leblond-Bourget, et al., 16s rRNA and 16s to 23s internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny, *Int. J. of Sys. Bacteriol.*, 102-111, 1996.
65. Toth, I.K., et al., Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 67, 4070-4076, 2001.
66. Barry, T., et al., The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria, *PCR Methods and Appl.*, 151-56, 1991.
67. Klaenhammer, T.R., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbol. Rev.*, 12, 39-86, 1993.
68. Sneath, P.H.A., et al., Numerical taxonomy, Freeman, San Francisco, 1973.
69. Mohania, D., et al., Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria, *J. of Digestive Dis.*, 9, 190-198, 2008.
70. Sneath, P.H.A., The application of computers to taxonomy, *J. of General Microbiol.*, 17, 201-226, 1957b.
71. Baumann, P., et al., A study of the *Moraxella* group II. Oxidativenegative species (genus *Acinetobacter*), *J. of Bacteriol.*, 95, 1520-1541, 1968.
72. Lockhart, W.R. and Liston, J., *Methods for numerical taxonomy*, American Society for Microbiol., Bethesda, MD, 1970.
73. Kersters, K. and De Ley, J., Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns, *J. of General Microbiol.*, 87, 333-342, 1975.