



Bakteriyel Taksonomi ve Yeni Türlerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

H. Dilşad AÇIKALIN¹, H. Kaan MÜŞTAK¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara-TÜRKİYE

Özet: Mikroorganizmaların farklı ve benzer özelliklerini dikkate alarak gruplara ayırma ve belirleme işlemlerinin oluşturduğu sisteme taksonomi denir. Bakterilerin sınıflandırması ve adlandırması için kullanılan konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiş, bunlar arasında da 16S rRNA dizi analizi ve DNA:DNA hibridizasyon yöntemleri en geçerli teknikler olarak ortaya konulmuştur. Sınıflandırmada %70 veya daha fazla DNA:DNA hibridizasyonu gösteren ve 16S rRNA sekanslamasında %97 veya daha fazla benzerlik gösteren suşlar aynı tür olarak dikkate alınır. İdentifiye edilen türler belirlenen kurallara göre çeşitli bilimsel dergilerde yayımlanır ve resmi protokoller izlenerek ulusal kültür koleksiyonlarında yer alırlar. Bu derlemede, yeni bakteri türlerini tanımlayabilmek için gerekli olan metotlar kısaca anlatılarak bu türlerin sınıflandırılması ve ulusal kültür koleksiyonlarına girebilmesi için gerekli koşullar özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri, hibridizasyon, taksonomi, 16S rRNA

Bacterial Taxonomy and Methods in Identifying New Species

Summary: The system which separates the microorganisms into the different groups by considering the similar and different characteristics of the microorganisms is named taxonomy. Molecular diagnostic methods as alternatives to conventional methods used for classification and naming of bacteria have been developed, including the 16S rRNA sequence analysis and DNA: DNA hybridization methods have been put forward as the most current techniques. Strains showing 70% or more DNA: DNA hybridization and 97% or more 16S rRNA sequence homology is considered to be the same species. As a result of these rates, strains which have been identified as different bacterial species can be published in various scientific journals and by entering the national culture collection thought monitoring official protocols. In this paper, requisite methods to identify new bacterial species are summarized briefly explaining the conditions to enter into the national culture collections.

Keywords: Bacteria, hybridization, taxonomy, 16S rRNA

Giriş

Mikroorganizmalar birbirinden son derece farklı özellikler taşıdıklarından, ortak özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılmış ve gruplar halinde düzenlenmiştir. Bu amaçla oluşturulmuş ve resmen kabul edilmiş sisteme taksonomi denir (18). Taksonomi (yunanca taxis: düzenleme, sıraya koyma; nomos: kanun) biyolojik sınıflandırma bilimi olarak tanımlanabilir. Taksonomi sınıflandırma, isimlendirme ve tanımlama olmak üzere birbirinden farklı ama kendi

içlerinde birbiri ile ilişkili üç alanı kapsar. Sınıflandırma, ortak benzerlikleri veya evrimsel ilişkileri esas alınarak organizmaların "taksa" adı verilen gruplar içinde düzene konulmasıdır. İsimlendirme, her bir organizmaya, yayımlanmış kurallara uygun olarak isim verme işlemidir. Tanımlama ise taksonominin uygulama tarafıdır; organizmaların hangi taksona ait olduklarını belirleme işlemidir. Bu şekilde organizmalar tam bir taksonomik şema içinde yerleştirilebilirler. Bir sınıflandırma şeması, en büyük ve en genel olan "alem" ile başlayıp en küçük ve en özel olan "tür" ile sona ermek üzere aşağıya doğru inen yedi dizi şeklinde düzenlenir. Böylece bir mikroorganizma hiyerarşik bir düzende daha büyük grup-

ların bir üyesi olan küçük, homojen bir grup içine yerleştirilir (27).

“Bergey’s Manual” ve “The Prokaryotes”

Bergey’s Manual, 1923’den beri mikrobiyologlar tarafından kullanılmaktadır ve bilinen tüm prokaryotik türlere ait özet bilgiler içeren ciltler halinde bir ansiklopedi şeklindedir. Konusunun uzmanı tarafından yazılmış her bölüm, tablolar, şekiller ve teşhiste kullanılabilecek diğer sistematik bilgileri içerir. Bergey’s Manual, ilk defa 1923’te David Hendricks Bergey tarafından basılmıştır (27). Günümüzde Bergey’s Manual, ribozomal RNA dizilemesi (rRNA) ve genomik çalışmaların bol miktarda fenotipik bilgi ile harmanlandığı pek çok kavramı içine alır. Yeni önerilen isimleri onaylayan International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM), bu isimlerin prokaryotların taksonomisinde temel bir kaynak olan Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology adlı kitaba dahil edilmesinin önünü açar (18).

Prokaryotik çeşitliliği inceleme ve araştırmada kullanılan ikinci temel kaynak ise “The Prokaryotes”dur. İlk baskısı 1981’de yayımlanmış olup; bu çalışmanın 4100’den fazla sayfa içeren (dört cilt) ikinci baskısına (1992), şu an online olan üçüncü bir baskısı ile “<http://141.150.157.117:8080/prok-PUB/index.htm>” adresinden ulaşılabilmektedir. Elektronik baskı prokaryotik taksonomi ve filogenide hızla ortaya çıkan yeni verilerin yansıtılabilmesi için sıklıkla güncelleştirilmektedir (6).

Bergey’s Manual ve The Prokaryotes, mikrobiyologlara bugünkü bilgimiz dahilindeki prokaryotik taksonomi ve filogeni hakkında detaylı bilgiler sağlayan hem bir kuruluş, hem de yeni izole ettikleri prokaryotları tanımlamalarında kullanacakları temel kaynaklardır (2).

Mikrobiyal Evrim

Mikroorganizmaların evrimi, mutasyon ve seleksiyon kökenlidir. Bu Darwinist yaklaşımda bütün organizmalar geçmişte var olmuş ortak bir atadan köken alırlar. Last Universal Common Ancestor (LUCA)’dan beri mikroorganizmalar da bu görüşü destekleyecek şekilde atalarından köken almış ve mikrobiyal evrimi gerçekleştirmiştir. LUCA, 3.5-3.8 milyar yıl önce yaşadığı varsayılan dünyadaki tüm organizmaların son ortak atası canlıya verilen isimdir. Dünya üzerinde şu an yaşayan canlıların ortak özelliklerinden yola çıkarak LUCA’nın bazı özellikleri belirtilmiştir. Örneğin; genetik materyali DNA’dır, genetik kod proteine ifade edilmektedir

ve diğer tüm fonksiyonlar proteinlerce yürütülür. Bu görüşler Meksikalı bilim adamı Antonio Lazcano Araujo’nun “The Prodigious Bacteria”, “The Spark of Life” ve “The Origin of Life” adlı kitaplarında desteklenmektedir (12).

Mikrobiyal evrimi moleküler anlamda takip edebilmek ise aşağıda açıklanan çeşitli yöntemlerle mümkündür (16).

Genomik Değişiklikler

DNA sekans varyasyonları organizmaların genomunda tüm gen kazanma ya da kaybetmelerini içeren mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Replikasyondaki hatalardan meydana gelen ya da UV gibi dış faktörlerden kaynaklı mutasyonlar doğal seleksiyon açısından mikroorganizmaların hayatında önemli yer taşımaktadır (14). Adaptif mutasyonlar mikroorganizmaların diğerleriyle yarışını ve doğal seleksiyonla hayatta kalma şanslarını arttırmaktadır. Mikroorganizmaların genomunda birikim yapan bu mutasyonlar yararlı olabildiği gibi mikroorganizma aleyhinde de olabilir. Prokaryotların haploid olması onların evrimini de etkiler. Mutasyonlar ayrıca, gen ürününü ve başka bir yarışma faydasını hücreden elimine eden gen kaybına da yol açmaktadırlar. Gen kaybında ekstrem durumları, genelde zorunlu besinlerini konakçılarından alan zorunlu simbiyontlar ve parazitleri kapsayan evrim hikayeleri oluşturmaktadır. Bu onların daha çok doğal seleksiyon ile ilişkili olduğu durumlarda görülmektedir (18).

rRNA Dizilerinden Elde Edilen Mikrobiyal Filogeni

rRNA, ribozomlarda bulunan bir RNA tipidir, ribozomun protein senteziyle ilişkili katalitik fonksiyonundan sorumludur. Ribozomal RNA’nın görevi, mRNA’daki bilginin translasyon süreci sırasında aminoasit dizisine çevrilmesi için taşıyıcı RNA (tRNA) ile etkileşmek ve uzayan peptid zincirine aminoasit takmaktır. Hücre sitoplazmasında bulunan RNA’nın %80’i rRNA’dan oluşur. Filogenetik analizlerde kullanılan bir molekül olan rRNA’lar, mükemmel sayılabilecek evrimsel kronometreler olup önemli özelliklere sahiptirler (19). 16S rRNA hem yüksek derecede korunmuş, hem de yüksek derecede değişken bölgelere sahiptir. Bu değişken bölgeler sayesinde bakteri ve arkelerden 16S rRNA genlerinin özel primerleri sentezletilir ve bu primerler, her bir gruba ait türlerin varlığını araştırmak için kullanılır. Eğer çok daha özel primerler kullanılırsa her bir gruptaki özel alt gruplar hedeflenebilir (28).

Bakteriyel 16S rRNA genleri, değişik bakteriler arasında önemli sekans farklılıkları gösteren dokuz değişken bölge içerirler. Bu değişken bölgelerin sekansları diagnostik tahliller ve diğer bilimsel çalışmalar için hedef oluşturmaktadır (4). *Oxyphotobacteria*'ya ait bir çalışmada V6, V7 ve V8 değişken bölgelerden 16S rRNA sekanslamasına dayalı sınıflandırma ve suş karakterizasyonu yapılmıştır (25). Yapılan diğer bir çalışmada ise iki laktik asit bakterisine ait (*Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp.) V1 ve V3 değişken bölgelerinden 16S rRNA sekanslamasına dayalı spesifik DNA problemleri geliştirilmiş ve hibridizasyon deneyimleriyle PCR teknikleri birleştirilmiştir. Sonuç olarak identifikasyon için hızlı ve hassas bir metod geliştirilmiştir (17).

Ribozomlar hem prokaryot hem de ökaryotlarda büyük alt birim ve küçük alt birim olmak üzere iki altbirimden oluşur (29).

Prokaryotlarda büyüklükleri 5S, 16S, 23S olan üç çeşit ribozomal RNA molekülü vardır. 16S rRNA ribozomun 30S küçük alt biriminin bir parçası olduğundan "Small Subunit rRNA" (SSU) rRNA küçük alt birim dizilemesi kısaltması, 16S dizilemesi ile eş anlama gelmektedir. "S" Svedberg'i simgeler. Bu alt birimler santrifüjleme sırasında hangi hızda çökdükleri ile ilişkili olarak adlandırılır (23).

rRNA dizilerine ait çok geniş bir veri tabanı mevcuttur. Örneğin, Ribozomal Veri Tabanı Projesi (RDP) şu an sayısı 100.000'i aşan bu tür dizilere sahiptir. RDP'ye internet üzerinde erişilebilmekte ve dizilerin yanı sıra filogenetik eğitimler, referans kaynaklar, yeni oluşturulan dizilerin gösterimi ve diğer birtakım özellikleri de içermektedir (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) (11).

Yeni bulunan diziler, RDP'deki veya GenBank (Amerika Birleşik Devletleri), DDBS (Japonya) ve EMBL (Almanya) gibi diğer genetik veri tabanındaki mevcut dizilerle karşılaştırılabilir. SSU rRNA dizilerinin karşılaştırılmasında saf kültürle çalışılabilir ancak bu kesin bir şart değildir. İşleme başlamak için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak genomik DNA'dan 16S rRNA'yı kodlayan gen çoğaltılır. Daha sonra PCR ürünü Sanger metodu ya da dizilemesi denilen dideoksi DNA dizileme metodu ile dizilenir. Bu prosedür oldukça hızlı ve spesifik çalışır. SSU rRNA'lardaki korunmuş dizilere komplementer PCR primerleri kullanarak, dizileme amacı ile sadece çok az miktardaki materyalden çok yüksek miktarda DNA ürünü elde edilebilir. Dizileme tamamlandıktan sonra dizi verileri bilgisayar analizi için hazır hale gelir. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritmasına dayanan web sitesin-

de (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) homolog genler identifiye edilip daha önce sekansı yapılmış binlerce spesifik diziyle karşılaştırılabilir (10).

Konvansiyonel bakteriyolojik kültürün zaman alıcı olması ve üretilmesi zor olan bakterilerin yarattığı güçlükler nedeniyle, son yıllarda moleküler tanı yöntemleri ön plana çıkmıştır. Bakteri sınıflandırması ve adlandırması için kullanılan moleküler tanı yöntemleri arasında bulunan, bakteri kültüründen 16S rRNA dizi analizi en geçerli yöntemdir (15).

Evrimsel Yaşam Ağacı

Evrimsel yaşam ağacı yaşamın bir haritasıdır. Tüm organizmalara ait hücrelerin evrimsel tarihlerini resmeder ve üç domaini açıkça ortaya çıkarır. Evrimsel ağacın kökü, yeryüzünde mevcut tüm yaşam formlarının ortak bir atayı (LUCA) yani evrensel atayı paylaştığı evrimsel tarihteki bir noktayı temsil eder (14).

Daha önceden canlılar dünyası beş alem içerisinde gruplandırılıyordu: *Plantae*, *Animalia*, *Fungi*, *Protista* ve *Monera*. Moleküler filogeni, beş alem sisteminin beş temel evrimsel soyu temsil etmediğini ortaya çıkarmıştır. Bunun yerine yeryüzündeki hücresel yaşam, ikisi kendine has şekilde mikrobiyal ve sadece prokaryotik hücrelerden oluşan "domain" adı verilen üç temel soy üzerinden evrimleşti. Üçüncü soy ise ökaryotları içerip monera hariç özgün beş alem sisteminin hepsini kapsar. Prokaryotik gruplar, *Bacteria* ve *Archaea*'dir; ökaryotik domain *Eukaryota* olarak adlandırılır. Bu terimler yaşamın üç domainini temsil eder ki domain biyolojik taksonların en üst seviyesidir. Bu sebeple bitkiler, hayvanlar, funguslar ve protistaların hepsi *Eukarya* domaini içerisindeki alemler olarak kabul edilir (2).

Mikrobiyal Taksonomi ve Kullanılan Yöntemler

Klasik Taksonomi: Taksonomi ve filogeniyi birbirinden ayırmak önemlidir çünkü bu iki terim gerçekte farklı anlamlara gelmektedir. Bakteriyel taksonomi klasik anlamda fenotipik analizlere dayanır. Bunlar bir organizmanın neye benzediği, enerji metabolizması, enzimleri ve diğer özelliklerini kapsar. Her ne kadar prokaryotların filogenisini genotipik analizler ortaya çıkarsa da, fenotipik analizler bakteriyel teşhis ve sınıflandırmada önemli rol oynamaktadır. Bu, özellikle mikrobiyal tanı gibi teşhisin kendisinin bir amaç olduğu durumlarda daha da öne çıkmaktadır (27).

Klasik bakteriyel taksonomide pek çok fenotipik karakter değerlendirilir ve elde edilen veriler organizmaları türden domaine kadar olan taksonomik

basamaklara gruplandırmak için kullanılır (30). Taksonomik değere sahip karakterler: morfoloji, beslenme ile fizyoloji ve habitatıdır (22).

GC Oranları: Bir organizmanın genomik DNA'sındaki GC oranı, taksonomik sonuçları yorumlarken kullanılan aydınlatıcı özelliklerden biridir. GC oranı, bir organizmanın, DNA'sındaki guanin (G) ve sitozin (C) bazlarını içeren toplam nükleik asit yüzdesi olarak tanımlanır. Bu oran, DNA'nın erime sıcaklığının ölçümü veya kromatografi yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir (5). GC oranı oldukça değişiklik gösterip, prokaryotlar arasında bilinen en düşük değeri %20 iken en yüksek değeri yaklaşık %80 kadardır. Çok çeşitli organizmaların DNA baz içerikleri belirlenmiş olup, bir organizmanın GC oranı bilgisi duruma bağlı olarak veri olabilir. Mesela iki organizmaya ait GC oranları benzer olabilir fakat hem taksonomik hem de filogenetik açıdan birbirlerinden oldukça farklılık gösterebilirler, çünkü DNA'daki tek bir baz içeriği ile baz dizisinde çeşitlilik gözlenmesi mümkündür. Bu durumun aksine iki organizmanın GC oranlarının %5'den fazla farklılık göstermesi, sadece birkaç ortak DNA dizisi paylaşabilecekleri anlamına gelir ve bu nedenle birbirleriyle yakın ilişkide olma ihtimalleri de düşer (18).

Moleküler Taksonomi (Kemotaksonomi): Kemotaksonomi olarak da adlandırılan moleküler taksonomi, hücredeki bir veya daha çok yapı taşının moleküler analizini kapsar. Rutin olarak kullanılan kemotaksonomik yöntemlerin başında genomik DNA:DNA hibridizasyonu, ribotiplendirme, çok lokuslu dizilerin tiplendirilmesi (MLST) ve lipit profillerinin çıkarılması gelir (24).

DNA:DNA Hibridizasyonları: GC baz yüzdesi bir türün genomik DNA'sında mevcut olan her bir nükleotidin yüzdesini verir ama o nükleotidlerin dizisi hakkında kesin bir bilgi vermez. Diziler önemlidir, çünkü iki organizmanın DNA'sında çok sayıda benzer nükleotid dizisinin olması, muhtemelen oldukça benzer (eğer aynı değilse) genler içerdikleri anlamına gelir. Bu iki DNA birbiri ile hibridize edildiğinde, gen dizilerinde büyük oranda benzerlik olması beklenir. Genomik hibridizasyon, iki DNA arasındaki dizi benzerliğinin derecesini ölçer ve rRNA dizilemesinin ayırım sağlayamadığı durumlarda çok yakın ilişkiye sahip organizmaların ayırt edilmesinde kullanılır (18).

İki organizmanın aynı taksonomik dereceye sahip olduğunu göstermek için, iki DNA arasındaki hibridizasyon miktarının ne kadar olması gerektiği hakkında kesin bir kural yoktur. Yine de iki organizmanın %70 veya üzerindeki hibridizasyon değerine

sahip olması önerilir. Bunun aksine iki organizmayı aynı cinse dahil etmek için, en azından %25 hibridizasyon değeri gereklidir (18).

DNA:DNA hibridizasyonu, iki organizmanın genlerindeki küçük farklılıkları ortaya çıkarmakta kullanılan hassas bir yöntemdir ve bu sebeple yakın akraba olduğu düşünülen mikroorganizmaların yeni bir tür olup olmadığını sorgulamada kullanılır. Taksonomik çalışmalarda kullanılan genomik hibridizasyon aslında SSU rRNA dizilemesi ve fenotipik analizlerin, iki farklı tür olduğundan şüphelenilen organizmalar arasında belirgin bir farklılık ortaya koyamadığı durumlarda kullanılır (24).

Ribotiplendirme: Ribotiplendirme, daha önce ribozomal RNA temelli filogenetik karakterizasyonda konu edilen bazı yöntemleri, bakteriyel sınıflandırmada kullanılan bir tekniktir. Ancak ribotiplendirmede, karşılaştırmalı dizi analizi yöntemlerinde farklı olarak dizileme yapılmaz. Bunun yerine bir mikroorganizmanın genetik materyalinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan kendine özgü deseni ölçer ve bu parçalar ayrılıp bir rRNA probu ile incelenir (26).

İki organizmanın rRNA'ları arasındaki farklılıklar, özel restriksiyon enzimleri kesim bölgelerinin varlığını veya yokluğunu belirlediğinden, belirli bir bakteri türünün restriksiyon deseni de sadece o türe özgüdür. Aslında ribotiplendirme çok tanımlayıcı olduğundan "moleküler ayak izi" olarak da adlandırılır, çünkü neredeyse tüm organizmalar için eşsiz bir seri ortaya çıkar (18).

Pratikte ribotiplendirmeye bir koloninin veya sıvı kültürün DNA'sı ile başlanır. PCR kullanılarak 16S rRNA ve onunla ilgili moleküllerin genleri çoğaltılır, bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile muamele edilir, elektroforezle ayrılır ve sonra problanır. Jelde görülen DNA parçalarının oluşturduğu desenler sayısallaştırılıp, bir veri tabanında mevcut referans organizmaların desenleri ile karşılaştırma yapmak için bilgisayar ortamı kullanılır. Ribotiplendirme hem hızlı (olası bir dizilemeyi, dizi sıralamasını ve ribozomal RNA dizileme yöntemlerinin gerektirdiği analizlere ihtiyaç duymadığından) hem de spesifik bir yöntem olduğundan bakteriyel teşhiste kullanılır. Bu sebeplerden dolayı, ribotiplendirme sadece yeni türlerin belirlenmesinin yanında klinik tanı, gıda, su ve içeceklerin mikrobiyal analizi gibi pek çok uygulama alanına da sahiptir (18).

Çok Lokuslu Dizi Tiplendirmesi (Multilocus Sequence Typing)-MLST: Hem rRNA dizilemesi hem de ribotiplendirmedeki kısıtlamalardan biri de,

analizlerin sadece tek bir gen üzerinde odaklanmasıdır. MLST bu sorunu ortadan kaldıran ve bir tür içerisindeki suşların karakterizasyonunda kullanılan yararlı bir tekniktir (21).

MLST bir organizmadaki “yaşamsal faaliyetleri kodlayan” (house-keeping) yedi adet gene ait parçaların dizilimleri ile aynı organizmanın farklı suşlarındaki özdeş gen gruplarının karşılaştırılmasını içerir. Bu genler, hücrenin temel fonksiyonlarını kodlar ve plazmidlerden ziyade kromozomlar üzerinde yerleşmiştir. Her bir gen için yaklaşık olarak 450 bp'lik dizi, PCR ile çoğaltılır ve dizilenir. Daha sonra karşılaştırmalı dizileme verileri bir dendogram ile ifade edilir (1).

MLST'de bir gen için benzer dizilere sahip suşların, o gende aynı allele sahip olduğu söylenir ve o gen için aynı sayı tayin edilir (7). Bir gen pek çok farklı allele sahip olabilir ve aynı tür içerisindeki bir grup suşa ait bir gende 10 ila 30 adet allel bulunabilir. Her türe, o türe özgü bir seri sayı (çok lokuslu dizi tipi) verilerek sonuçlandırılır. Daha sonra her dizi tipi arasındaki benzersizlik, 0'dan (suşlar benzerdir) 1'e (suşlar sadece uzaktan ilişkilidir) kadar olan bağıllık uzaklığı ile bir dendogram çizilerek ifade edilir (18).

MLST çok yakın akraba suşları bile ayırt edebilme gücüne sahiptir. Bu nedenle organizmaları tür seviyesine kadar tanımlamada, rRNA dizilemesine göre çok daha iyi bir yöntemdir. MLST analizlerinde incelenen yedi genle ve gen başına 20 allele, birkaç milyar farklı genotipin ayrımının yapılabildiği hesaplanmıştır. Bunun aksine MLST organizmaları tür seviyesinin üzerinde karşılaştırma yapmaya uygun değildir. Çünkü daha yüksek seviyelerdeki bir taksonun anlamlı bir filogenisini oluşturamayacak kadar duyarlıdır (21).

Mikrobiyal Türler ve Yeni Türlerin Ortaya Çıkışı

Bir prokaryotik tür birçok bağımsız özellikte yüksek derecede benzerlik gösteren suş grupları olarak tanımlanır. Bu özellikler, halen %70 veya daha fazla DNA:DNA hibridizasyonu içeren ve 16S rRNA sekanslamasında %97 veya daha fazla benzerlik gösteren diğer bir deyişle %3'den daha az farklılık gösteren suşları gruplandırmak için göz önünde bulundurulup dikkate alınır (25). Deneysel verilere göre bu iki kriter geçerli, güvenilir ve prokaryotiklerin yeni tür identifikasyonunda tutarlıdır. Bunun gibi genotipik kriterler 7000'in üzerinde bakteri türü ve arkenin resmi olarak tanımlanmasını sağlamıştır (18).

Yeni bakteri türleri nasıl ortaya çıkar? Bakteriyel türleşmenin yatay (horizontal) gen transferinden etkilenmektedir. Yatay geçiş, genlerin türler arasında konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyonla aktarımıdır. Prokaryotlar seksüel olarak seçici değildir ve gen değişimini geniş bir filogenetik hat üzerinde yapabilirler. Bu nedenle bir ekotipin kazandığı yeni bir genetik yetenek, mutasyondan ve seleksiyondan ziyade diğer ekotipteki hücrelerden gelen genlerden ortaya çıkabilir. Yatay gen akışının etkisine rağmen türleşmenin temelde yatay aktarımdan çok mutasyon ve periyodik seleksiyonla yönlendirildiği düşünülmektedir (20).

Adlandırma ve Bergey's Manual

Biyolojide binominal adlandırma sistemi kullanıldığından, prokaryotlara da cins isimleri ve tür epitetleri verilmektedir. Kullanılan terimler, organizma için uygun tanımlamayı sağlayan Latince veya Yunancanın Latince bir türevidir ve italik yazılır. Örneğin *Bacillus (B) subtilis*, *B. cereus* ve *B. megaterium' u gibi 100'den fazla Bacillus cinsi tanımlanmıştır. Bu tür epitetleri sırasıyla “ince uzun”, “mumsu” ve “iri dört ayaklı” anlamına gelir ve her organizma için karakteristik olan anahtar bir morfolojik, fizyolojik veya ekolojik özelliği ifade eder (18).*

Prokaryotların adlandırılması, Bacteria domaininde olduğu kadar Archaea domaininde de bakteriyolojik kodlama kuralları ile yapılır. “Uluslararası Bakteri Adlandırma Kodu” prokaryotların resmi olarak adlandırılması için yasal bir çerçeve oluşturur ve yeni verilerin taksonomik düzenlemeler gerektirdiği durumlarda kullanılmak üzere var olan isimlerin değiştirilmesi için gerekli talimatları içerir. Hatta özgün isimlendirme işleminde bir hata yapıldığında veya bir isim geçersiz hale geldiğinde, isimleri reddetmek için başvuru kuralları dahi içerir. Kodlama tüm prokaryotik tür, cins, aile ve takım adlandırılması için gerekli kuralları kapsar (18).

Sonuç

Ulusal mikrobiyal kültür koleksiyonları mikrobiyal sistematüğün temelleri için önemli bir kaynaktır. Araştırmacılar bu kalıcı koleksiyonları, mikroorganizmaları istek üzerine ve genellikle belirli bir ücret karşılığında, tıp ve endüstri için sınıflayarak saklarlar. Çeşitli saklama yöntemleri olsa da genellikle bir dondurucuda canlı kültürler olarak saklarlar. Kültür koleksiyonlarının ilişkili ve anahtar rolü suşların zengin kaynaklı depolarıdır (18).

Yeni bir organizma izole edildiğinde ve eşsiz olduğu düşünüldüğünde, bu organizmaların yeni olarak

tanımlanabilmesi için diğer türlerden yeterince farklı olduğundan emin olunmalı veya yeni bir cinsin tanımlanması için ise daha önce tanımlanan cinslerden yeterince farklı olduğuna kesin olarak karar verilmelidir. Yeni bir bakteri türü izole edilip bilimsel bir dergide yayımlandığında, bu suş diğer türlerle ileriki taksonomik araştırmalarda karşılaştırılabilmesi için taksonun *nomenklaturel* tipi olarak tanımlanır ve tayin edilir. Yeni bir cins veya türün resmi bir taksonomik adlandırmasını yapabilmek için, izolasyonun detaylı bir tanımlaması ile önerilen ismi bilimsel olarak yayınlanmalı ve organizmanın canlı kültürü, uluslararası iki kültür koleksiyonuna gönderilmelidir. Kültür koleksiyonlarına örnek olarak American Tür Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Virginia, ABD) veya Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültür Koleksiyonu (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Almanya) verilebilir. Depozit edilen suş yeni türün tip suşu ve ona benzer olduğu düşünülen diğer suşların karşılaştırılabildiği bir standart haline gelir (18).

Kültür koleksiyonları, depozit edilen kültürleri genelde çok düşük sıcaklıklarda dondurarak (-80 ile -196°C) veya dondurup kurutarak liofilize halde muhafaza eder. Bu uygulama taksonomik açıdan botanik ve zoolojik yaklaşımdan farklıdır. Bu disiplinler yeni türler ile karşılaştırmada kullanmak için (ölü) numuneleri (ya kurutulmuş herbaryum materyali veya kimyasal olarak fikse edilmiş hayvan numuneleri) muhafaza ederler. Bunun aksine mikrobiyologlar her zaman bilimsel araştırmalara dağıtılabilecek, farklı laboratuvarlarda geliştirilebilecek ve çalışılıp karşılaştırılabilecek yaşayan tip suşları kullanırlar. Bu yaklaşım mikroorganizmaların özelliklerinin özellikle moleküler seviyede daha detaylı ve verimli şekilde karşılaştırılmasına olanak sağlar (18).

Eğer yeni bir türün tanımlanması *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) yerine başka bir dergide yayınlanmışsa, prokaryotların taksonomisi ve sınıflandırılması için gereken resmi yayın belgesi ile yayınlanmış bir kopyaya makalenin bu dergiye sunulması ve ayrıca yeni bir prokaryotik takson olduğu kabul edilmeden önce isminin onaylanması gerekir. IJSEM her baskıda yeni oluşturulmuş isimlerin onaylanmış bir listesini yayınlar ve prokaryotik taksonomide araştırmalar için kullanılan bir yayın kaynağı olarak iş görür. Yeni ve resmi prokaryotik isimler internet sitesi adresinden (www.bacterio.cict.fr) de takip edilebilir. Site ilk olarak 28 Ocak 1998'de "List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature"

olarak ortaya çıkarılmış, sonradan bu "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" şeklinde değiştirilmiştir. Bu site 1997'de Jean P. Euzéby tarafından kurulmuştur. Nomenklatürdeki listelenmiş bakteriler J.P.Euzéby tarafından derlenmiştir. Araştırmacı için iletişim adresi şöyledir; Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des Capelles, F-31076 Toulouse cedex 3, France (E-mail: j.euzeby@envt.fr) (8).

Bakteriyal nomanklatür ayrıca "<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>" adresinde de güncellenmekte ve araştırmacıların açık erişimine sunulmaktadır. DSMZ'nin açık adı Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mikroorganizmaların Alman Koleksiyonları ve Hücre Kültürleri) olup Leibniz Enstitüsü'ne aittir (9).

Açık erişimlerden biri ise CICSPS (Chairman International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee)'ye ait olup, bakterilerin taksonomisi hakkındaki çeşitli kararlarını "Minutes of the Closed Online Meeting" adı altında IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)'de yayınlamıştır. Oturumlar ve alınan kararlar madde madde düzenlenmiş ve paylaşımına sunulmuştur (3).

ICSP (The International Committee on Systematics of Prokaryotes) bakterilerin ve arkelerin nomanklatürü ve taksonomisini denetlemekten sorumludur. ICSP, IJSEM'in ve International Code of Nomenclature of Bacteria'nın yayınlarını denetler ve prokaryotların farklı grupları içinde yeni türlerin tanımlanması için şart standartları kuran ve revize eden birçok komiteye rehberlik hizmeti vermektedir (18).

Kaynaklar

1. Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S, the *S. enterica* MLST study group. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathogens 2012; 8(6): e1002776.
2. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. Dördüncü baskı. Ankara: Medisan, 2000; pp. 1-13
3. Chairman JFI. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of phototrophic bacteria. Minutes of the closed on-line meeting. June, 10-30, 2014; Tübingen, Germany.

4. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Meth* 2007; 69(2): 330-9.
5. Chun J, Rainey FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64(2): 316-24.
6. SERC, The Prokaryotes, [http:// 141.150.157.117.8080/prokPUB/index.htm](http://141.150.157.117.8080/prokPUB/index.htm), Erişim tarihi: 02.10.14.
7. MLST Databases, Universty of Warwick, <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>, Erişim tarihi: 10.11.14.
8. LPNS, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.net/news.html>, Erişim tarihi: 16.11.14.
9. DSMZ, Prokaryotic Nomenclature Up-to-date, <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>, Erişim tarihi: 16.11.14.
10. NCBI, Blast home, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Erişim tarihi: 01.11.14.
11. RDP Release, Sequence Analysis Tools, <http://rdp.cme.msu.edu/html>, Erişim tarihi: 14.09.14.
12. BISMIS, Bergey's Manual, <http://www.bergeys.org/pubinfo.html>, Erişim tarihi: 21.11.14.
13. UAB Divulga, Barcelona Research and Innovation, www.uab.cat/servlet/satellite, Erişim tarihi: 19.11.14.
14. Freeman S, Herron JC. *Evolutionary Analysis*. Fourth edition. Pearson Education. 2009.
15. Kaya IB, Karacan N, Özdal M, Mete Ş, Diker KS. Veteriner klinik örneklerde direkt 16S rRNA dizi analizi ile bakteriyel tanı. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 4-7 Haziran, 2014; Ankara.
16. Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 103-25.
17. Klijn N, Weerkamp AH, de Vos WM. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57(11): 3390-3.
18. Michael TM, John MM. *Brock Biology of Microorganisms*. Thirteenth Edition. Pearson Education. Inc. Publishing as Prentice Hall, 2012.
19. Nogales B, Moore ER, Llobet-Brossa E, Rosello-Mora R, Amann R, Timmis KN. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(4): 1874-84.
20. Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2010;13(5): 632-9.
21. Piccirillo A, Giacomelli M, Salata C, Bettanello S, De Canale E, Palù G. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in North-Eastern Italy. *New Microbiol* 2014; 37(4): 557-62.
22. Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, Raoult D, Fournier PE. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64(2): 384-91.
23. Rudi K, Skulberg OM, Larsen F, Jakobsen KS. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63(7): 2593-9.
24. Stackebrandt E, Teuber M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 1988; 70(3): 317-24.
25. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 846-9.
26. Thompson CC, Chimento L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL. Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 2013; 14: 913.
27. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kerseters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996; 60(2): 407-38.

28. Willems A, Collins MD. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol 1993; 43(2): 305-13
29. Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmanns T, De Wachter R. The European database on small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res 2002; 30(1): 183-5.
30. Xu XB, Yuan ZA, Jin HM, Xiao WJ, Gu BK, Chen M, Ran L, Diao BW, Cui ZG, Hu QH, Kan B. Study on the epidemiological characteristics and molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg in Shanghai. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 2009; 30(9): 933-7.

Yazışma Adresi:

H. Dilşad Açıkalin

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara

Tel: 03123170315/4369

E-posta: acikalindilsad@gmail.com