

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BURGAZADA, BÜYÜKADA, HEYBELİADA ve KINALIADA  
TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSET İZOLASYONLARI ve MOLEKÜLER  
TİPLENDİRİLMELERİ**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**Salih SARICAOĞLU**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**OCAK 2014  
SAMSUN**





**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURGAZADA, BÜYÜKADA, HEYBELİADA ve KINALIADA  
TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSET İZOLASYONLARI ve MOLEKÜLER  
TİPLENDİRİLMELERİ**

**YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**Salih SARICAOĞLU  
(11210105)**

**Tezin Savuma Tarihi : 27 Ocak 2014**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kamil IŞIK**

Bu Yüksek Lisans Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
PYO.FEN.1904.13.004 nolu Proje ile Desteklenmiştir.



**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalında**

**Salih SARICAOĞLU Tarafından Hazırlanan**

**BURGAZADA, BÜYÜKADA, HEYBELİADA ve KINALIADA  
TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSET İZOLASYONLARI ve  
MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMELERİ**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 27/01/2014 tarihinde yapılan sınav ile  
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Başkan : Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN**  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi .....

**Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Kamil IŞIK**  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi .....

**Yrd. Doç. Dr. Fadime Ö. KOÇAK**  
Şeyh Edebali Üniversitesi .....

**....../....../2014**

**Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ**

Enstitü Müdürü



*Merhum dayım Celal TOPEL'in aziz hatırasına,*



## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarımın her anında sabır ve özveri ile bana doğru yolu gösteren, planlı ve programlı çalışmayı öğreten, maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, akademik duruş ve terbiyeyi aşılayan, bilgi ve birikimlerini bizimle paylaşan, üzerimde büyük emeği olan danışmanım, çok kıymetli hocam Doç. Dr. Kamil IŞIK'a en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Fikir ve tecrübeleriyle her daim yanımda olup bana güven veren Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN hocama çok teşekkür ederim.

Yüksek lisan çalışmamın her aşamasında tecrübelerinden faydalandığım, samimi görüşleri ile beni her zaman cesaretlendiren kıymetli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Fadime ÖZDEMİR KOÇAK ve Yrd. Doç. Dr. Elif ÇİL'e şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve çalışkanlığıyla örnek aldığım çok değerli hocam Arş. Gör. Hilal AY'a en samimi duygularıyla minnettarlığımı ifade etmek isterim. Çalışmalarım boyunca samimi desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Arş. Gör. Aysel VEYİSOĞLU'na ve Demet TATAR'a; yine bu süreçte; maddi manevi desteklerini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Tuğba KESKİN'e, Talha GENÇBAY'a ve A. Rıdvan TOPKARA'ya; her durum ve şartta yardımlarını esirgemeyen kadim dostum Hayrettin SAYGIN'a ve tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Üzerimdeki emek ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim muhtereme anneme, muhterem babama ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak 2014

Salih SARICAOĞLU



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                                                         |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ.....                                                                                              | vii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                       | ix   |
| ÇİZELGELER LİSTESİ.....                                                                                 | xi   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                                                                   | xiii |
| KISALTMALAR .....                                                                                       | xv   |
| ÖZET.....                                                                                               | xvii |
| ABSTRACT .....                                                                                          | xix  |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                           | 1    |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....                                                                                 | 9    |
| 2.1 Genel Bilgiler .....                                                                                | 9    |
| 2.1.1 <i>Actinomadura</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri.....                     | 9    |
| 2.1.2 <i>Agromyces</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri.....                        | 13   |
| 2.1.3 <i>Geodermatophilus</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri....                  | 17   |
| 2.1.4 <i>Kribbella</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri .....                       | 19   |
| 2.1.5 <i>Micromonospora</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri.....                   | 21   |
| 2.1.6 <i>Nocardia</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri .....                        | 25   |
| 2.1.7 <i>Nonomuraea</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri.....                       | 31   |
| 2.1.8 <i>Rhodococcus</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri .....                     | 33   |
| 2.1.9 <i>Streptomyces</i> cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri .....                    | 37   |
| 2.2 Prokaryotik Sistematik .....                                                                        | 42   |
| 2.2.1 Moleküler sistematik .....                                                                        | 44   |
| 3. MATERYAL-METOT .....                                                                                 | 47   |
| 3.1 Toprak Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları .....                                                      | 47   |
| 3.2 Toprakların pH'sı .....                                                                             | 47   |
| 3.3 Mikroorganizmaların İzolasyonu .....                                                                | 48   |
| 3.3.1 Dilüsyon plaka yöntemi .....                                                                      | 48   |
| 3.3.2 Sükroz santrifügasyon yöntemi.....                                                                | 49   |
| 3.3.3 % 1.5'luk fenol yöntemi.....                                                                      | 50   |
| 3.3.4 İzolatların seçimi ve saflaştırılması.....                                                        | 50   |
| 3.3.5 İzolatların stoklanması .....                                                                     | 50   |
| 3.4 DNA İzolasyonu.....                                                                                 | 51   |
| 3.4.1 Genomik DNA izolasyonu .....                                                                      | 51   |
| 3.4.2 DNA izolasyon kontrolü .....                                                                      | 53   |
| 3.4.3 16S rDNA'nın PZR çoğaltması.....                                                                  | 53   |
| 3.4.4 16S rRNA sekans verilerinin eldesi, analizi ve filogenetik<br>dendrogramların oluşturulması ..... | 55   |
| 4. BULGULAR .....                                                                                       | 57   |
| 4.1 Mikroorganizmaların Farklı Lokalitelerden İzolasyonu .....                                          | 57   |
| 4.2 DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'ların<br>Görüntülenmesi .....              | 62   |

|                       |                                                                                               |            |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3                   | 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu .....                                                         | 62         |
| 4.4                   | 16S rRNA Sekans Verilerinin Eldesi, Analizi ve Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması ..... | 63         |
| <b>5.</b>             | <b>TARTIŞMA.....</b>                                                                          | <b>95</b>  |
| <b>6.</b>             | <b>SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>                                                                 | <b>103</b> |
| 6.1                   | Sonuçlar.....                                                                                 | 103        |
| 6.2                   | Öneriler.....                                                                                 | 105        |
| <b>KAYNAKLAR.....</b> |                                                                                               | <b>107</b> |
| <b>EKLER.....</b>     |                                                                                               | <b>141</b> |
| EK A:                 | Kültür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı.....                                              | 143        |
| EK-B:                 | Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı.....                                                     | 149        |
| EK-C:                 | Farklı Besiyerleri ile Yapılan Toprak İzolasyonundan Petri Görüntüleri...                     | 155        |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  |                                                                                               | <b>158</b> |

## ÇİZELGELER LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. Bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan tekniklerin taksonomik seviyelerdeki kullanımı.....                                                                                                                         | 46 |
| Çizelge 3.1. <i>Actinobacteria</i> sınıfı mikroorganizmaların izolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin laboratuvar numarası, toprak tipi ve lokaliteleri .....                                                            | 47 |
| Çizelge 3.2. Marmara Bölgesi'ndeki adalardan alınan toprak örneklerinin ortalama pH değerleri .....                                                                                                                                   | 48 |
| Çizelge 3.3. 16S rRNA gen bölgesinin PZR koşullarında çoğaltılmasında kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları .....                                                                                                            | 54 |
| Çizelge 3.4. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PZR sıcaklık döngü düzeni. ....                                                                                                                                | 54 |
| Çizelge 3.5. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyon ve sekans primerleri.....                                                                                                                                                             | 56 |
| Çizelge 4.1. Toprak izolasyonu ile Heybeliada'dan elde edilen aktinomiset izolatları .....                                                                                                                                            | 58 |
| Çizelge 4.2. Toprak izolasyonu ile Büyükada'dan elde edilen aktinomiset izolatları.....                                                                                                                                               | 59 |
| Çizelge 4.3. Toprak izolasyonu ile Burgazada'dan elde edilen aktinomiset izolatları .....                                                                                                                                             | 59 |
| Çizelge 4.4. Toprak izolasyonu ile Kınalıada'dan elde edilen aktinomiset izolatları .....                                                                                                                                             | 60 |
| Çizelge 4.5. 16S rRNA dizi analizleri yapılan <i>Actinomyces</i> izolatları .....                                                                                                                                                     | 61 |
| Çizelge 4.6. <i>Actinomyces</i> cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                                                        | 69 |
| Çizelge 4.7. <i>Agromyces</i> cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                                                          | 71 |
| Çizelge 4.8. <i>Geodermatophilus</i> cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                                                   | 73 |
| Çizelge 4.9. <i>Kribbella</i> cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                                                          | 75 |
| Çizelge 4.10. <i>Micromonospora</i> cinsine ait K2F72, K2R47, K2R49, K2R55, K2S19, K2S20, Z1R61 ve Z1R8 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları ..... | 77 |
| Çizelge 4.11. <i>Micromonospora</i> cinsine ait K2F73 ve K2R33 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....                                           | 78 |

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 4.12.</b> <i>Micromonospora</i> cinsine ait H2F23, H2F8, H2R10, K2R35 ve Z1F35 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları..... | 79 |
| <b>Çizelge 4.13.</b> <i>Micromonospora</i> cinsine ait H3F25 ve H3F6 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....                      | 80 |
| <b>Çizelge 4.14.</b> <i>Nocardia</i> cinsine ait H3S3 ve H3S24 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                           | 82 |
| <b>Çizelge 4.15.</b> <i>Nocardia</i> cinsine ait K2R37 izolatu ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                                      | 83 |
| <b>Çizelge 4.16.</b> <i>Nonomuraea</i> cinsine ait H1R4, H2R11, H2R15, Z1R24 ve Z2R54 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....     | 85 |
| <b>Çizelge 4.17.</b> <i>Nonomuraea</i> cinsine ait H2R3, H2R16 ve H2R21 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                  | 86 |
| <b>Çizelge 4.18.</b> <i>Rhodococcus</i> cinsine ait H3R2 ve K1R19 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....                         | 88 |
| <b>Çizelge 4.19.</b> <i>Rhodococcus</i> cinsine ait B1R8 izolatu ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....                                    | 89 |
| <b>Çizelge 4.20.</b> <i>Streptomyces</i> cinsine ait K2R76 ve Z2S13 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....                       | 91 |
| <b>Çizelge 4.21.</b> <i>Streptomyces</i> cinsine ait Z1R34, K1R16 ve K1R21 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları .....               | 92 |
| <b>Çizelge 4.22.</b> <i>Streptomyces</i> cinsine ait Z1R7 ve K2R77 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....                        | 93 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

|             |                                                                                                                                                          |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1.  | List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature'da <i>Actinobacteria</i> Filumu için güncel taksonomik tablo. ....                               | 2  |
| Şekil 1.2.  | Ezbiocloud veri tabanında Bacteria domaini ait genom çalışmaları yapılmış organizma gruplarına ait sayı ve yüzdeleri gösteren grafik.....                | 4  |
| Şekil 4.1.  | Farklı lokalitelerden izole edilmiş aktinomisetlerin 16S rRNA gen bölgesinin PZR metodu ile amplifikasyonu. ....                                         | 63 |
| Şekil 4.2.  | MacroGen firmasına okutulan baz dizilerinin Finch TV programındaki görüntüsü. ....                                                                       | 63 |
| Şekil 4.3.  | <i>Actinomadura</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....     | 68 |
| Şekil 4.4.  | <i>Agromyces</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....        | 70 |
| Şekil 4.5.  | <i>Geodermatophilus</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. .... | 72 |
| Şekil 4.6.  | <i>Kribbella</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....        | 74 |
| Şekil 4.7.  | <i>Micromonospora</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....   | 76 |
| Şekil 4.8.  | <i>Nocardia</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....         | 81 |
| Şekil 4.9.  | <i>Nonomuraea</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....       | 84 |
| Şekil 4.10. | <i>Rhodococcus</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....      | 87 |
| Şekil 4.11. | <i>Streptomyces</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı. ....     | 90 |



## KISALTMALAR

|       |                                                                     |
|-------|---------------------------------------------------------------------|
| %     | : Yüzde                                                             |
| °     | : Derece                                                            |
| Mg    | : Mikrogram                                                         |
| µl    | : Mikrolitre                                                        |
| µM    | : Mikromolar                                                        |
| ATCC  | : Amerika Tip Tür Kültür Koleksiyonu                                |
| bç    | : Baz Çifti                                                         |
| C     | : Santigrat                                                         |
| DAP   | : Diaminopimelik Asit                                               |
| DDH   | : DNA:DNA Hibridizasyonu                                            |
| dk    | : Dakika                                                            |
| dNTP  | : Deoksiribonükleotit trifosfat                                     |
| DSMZ  | : Almanya Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu                         |
| g     | : Gram                                                              |
| IJSEM | : International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology |
| KCTC  | : Güney Kore Tip Tür Kültür Koleksiyonu                             |
| M     | : Molarite                                                          |
| mA    | : Miliamper                                                         |
| ml    | : Mililitre                                                         |
| NCBI  | : Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi                          |
| NRRL  | : Amerika ARS (Agricultural Research Service)Kültür Koleksiyonu     |
| Nt    | : Nükleotit                                                         |
| PZR   | : Polimerize Zincir Reaksiyonu                                      |
| rRNA  | : Ribozomal Ribonükleik Asit                                        |
| TBE   | : Tris-Borik Asit-EDTA                                              |
| TE    | : Tris-EDTA                                                         |
| UV    | : Ultraviyole                                                       |
| α     | : Alfa                                                              |
| β     | : Beta                                                              |



# **BURGAZADA, BÜYÜKADA, HEYBELİADA ve KINALIADA TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSET İZOLASYONLARI ve MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMELERİ**

## **ÖZET**

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi'nde bulunan Burgazada, Büyükada, Heybeliada ve Kınalıada'nın 9 farklı lokalitesinden alınan toprak örneklerinden aktinomiset izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatların 16S rRNA bölgesine ait nükleotit dizileri elde edilmiş ve filogenetik analizlerle moleküler tiplendirilmeleri yapılmıştır.

Toprak örneklerine dilüsyon plaka, sükröz gradient ve % 1.5'luk fenol yöntemleri uygulanarak beş farklı besiyeri ortamı kullanılmış ve test suşlarının izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen 142 organizma içerisinde 62 organizmanın 16S rRNA gen bölgesinin PZR çalışmaları tamamlanmıştır. 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizi sonuçlarına göre izolatların *Actinomadura*, *Agromyces*, *Geodermatophilus*, *Kribbella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus* ve *Streptomyces* olmak üzere 9 farklı aktinomiset cinsinin üyesi oldukları belirlenmiştir. Mega 5 paket programı kullanılarak bu izolatlar içerisinde 45 tanesinin en yakın tip türleri ile filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. PHYDIT programı kullanılarak izolatların en yakın tip türleri ile yüzde benzerlik ve nükleotit farklılık tabloları oluşturulmuştur.

Mega 5 programı kullanılarak oluşturulan dendogramlar ve PHYDIT programı ile oluşturulan tabloların verileri birlikte yorumlanarak yeni tür olma ihtimali yüksek olan izolatlar belirlenmiştir.

16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlerine göre; B2F13 (*Actinomadura* sp.), H1R4, H2R15 (*Nonomuraea* sp.), K1R19 (*Rhodococcus* sp.), K2R35 (*Micromonospora* sp.), K2R76, K2R77, Z1R7, Z1R34, Z2S13 (*Streptomyces* sp.) ve Z2R53 (*Geodermatophilus* sp.) izolatlarının olası yeni türler olarak ülkemiz adalarından literatüre girecekleri tahmin edilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Actinomycetes*; 16S rRNA; Moleküler Karakterizasyon.



## ISOLATED OF ACTINOMYCETES FROM BURGAZADA, BUYUKADA, HEYBELIADA and KINALIADA, and MOLECULAR IDENTIFICATION

### ABSTRACT

In this study, actinomycetes isolation from soil samples taken from nine different localities of Burgazada, Büyükada, Heybeliada and Kınalıada in Marmara Region was carried out. 16S rRNA gene sequence data of isolates was obtained and molecular typing by phylogenetic analyses was performed.

Isolation of test strains was performed by applying dilution plate, sucrose gradient and %1.5 phenol treatment to soil samples using five different media. Out of 142 isolates, PCR amplification of 16S rRNA gene region of 62 isolates was completed. With respect to 16S rRNA gene sequence analyses, the isolates were determined to belong to the genera of *Actinomadura*, *Agromyces*, *Geodermatophilus*, *Kribbella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*. Phylogenetic analyses of 45 isolates with the closest type species were performed by using MEGA 5 pocket programme. Similarity indices and nucleotide differences tables of isolates compared to the closest type species were constructed by using PHYDIT programme.

The isolates probably new for the literature were determined by interpreting data obtained from dendrograms constructed by MEGA 5 and tables composed by PHYDIT.

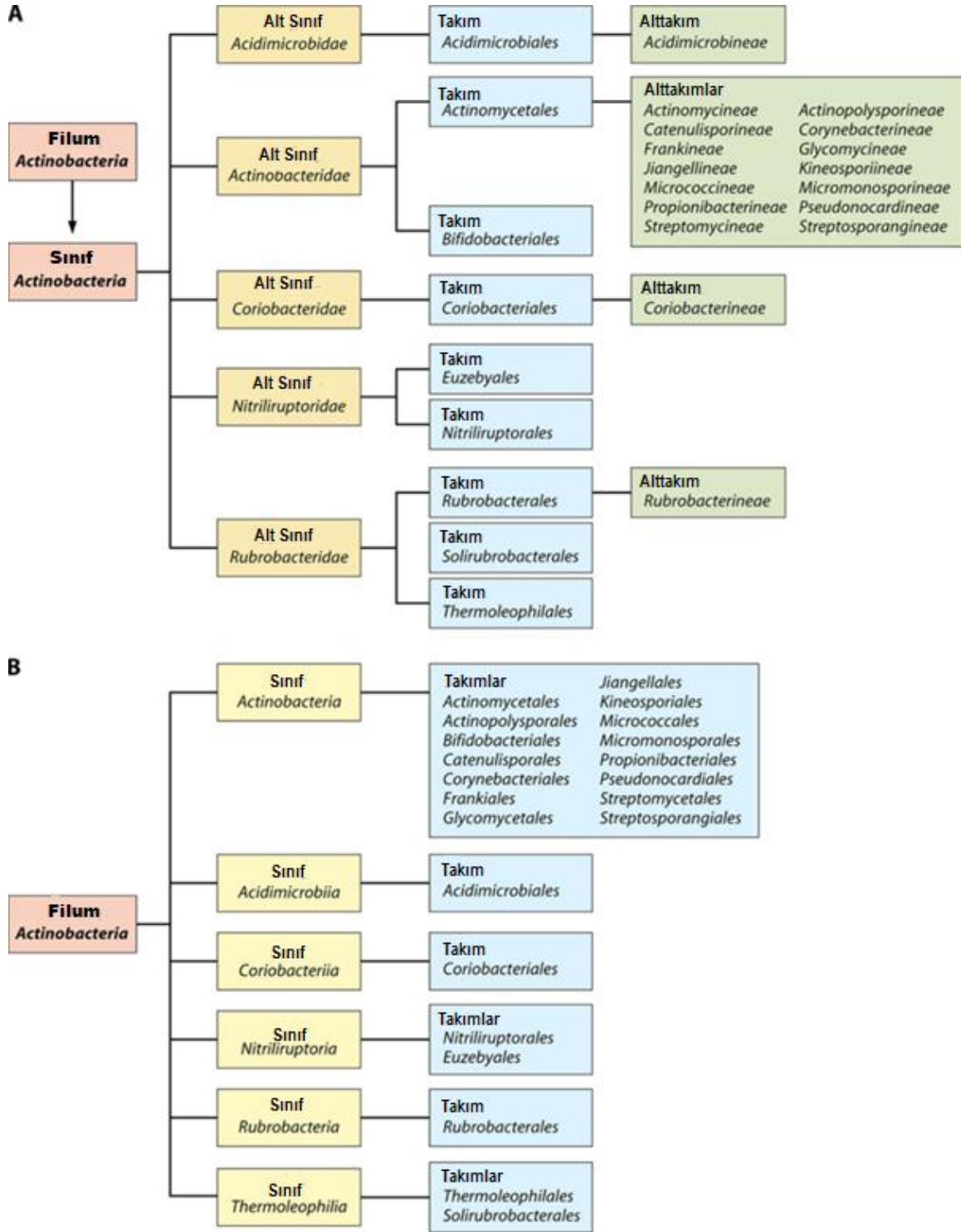
According to the phylogenetic analyses of 16S rRNA gene region, the isolates of B2F13 (*Actinomadura* sp.), H1R4, H2R15 (*Nonomuraea* sp.), K1R19 (*Rhodococcus* sp.), K2R35 (*Micromonospora* sp.), K2R76, K2R77, Z1R7, Z1R34, Z2S13 (*Streptomyces* sp.) and Z2R53 (*Geodermatophilus* sp.) from our country's islands are estimated to have potential to be novel for the literature.

**Key Words:** *Actinomycetes*, 16S rDNA, Molecular Chracterisation.



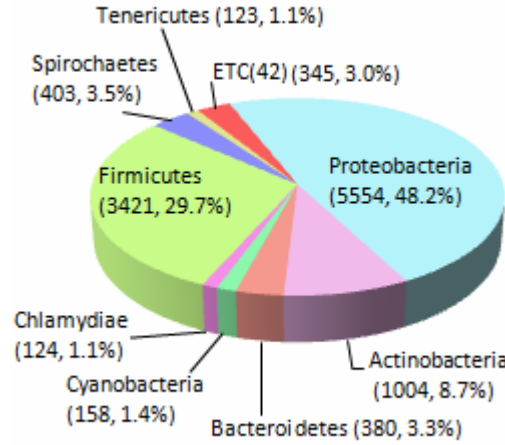
## 1 GİRİŞ

*Actinobacteria* sistematiki 2009 yılında Zhi ve diğeri tarafından kemotaksonomik, moleküler ve nümerik taksonomik metodların uygulanmasıyla yeniden gözden geçirilmiştir. Güncel hiyerarşik sınıflandırmaya göre *Actinobacteria* sınıfı beş alt sınıf, dokuz takım, elli beş familya, iki yüz kırk cins ve üç binden fazla türden oluşan *Bacteria* üstaleminde bulunan en büyük ve en önemli alemlerden biridir. Aktinobakter terimi *Actinobacteria* aleminin tamamını tanımlarken, aktinomiset terimi *Actinomycetales* ordusuna ait suşları tanımlamakta kullanılmaktadır (Goodfellow ve diğ., 2010). J. P. Euzéby tarafından sürdürülen taksonomi çalışmalarının güncel versiyonunda (<http://www.bacterio.cict.fr> Kasım-2013) *Actinobacteria* filumu en üst seviyede *Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae*, *Coriobacteridae*, *Nitriliruptoridae* ve *Rubrobacteridae* olarak adlandırılan beş alt sınıfa ayrılır. Bu alt sınıflar çok sayıda takım ve alt takımlara ayrılmaktadır. Son zamanlarda 16S rRNA ağaçlarına dayalı olarak *Actinobacteria* filumunun diğer güncel taksonomisi *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'de *Actinobacteria* filumu en üst seviyede *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* ve *Thermoleophilia* adında altı alt sınıfa ayrılmaktadır. *Actinobacteria* sınıfı toplamda 15 takım içermektedir (Zhi ve diğ., 2009).



**Şekil 1.1.**List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature'da *Actinobacteria* Filumu için güncel taksonomik tablo (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html#Actinobacteria>) (A) ve *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'de mevcut önerilen taksonomi (B) (Gao ve Gupta, 2012).

*Actinobacteria* grubu temsil eden en kapsamlı çalışmalarda en büyük antibiyotik üreticisi olan *Streptomyces spp.* (Bentley ve diğ., 2002; Chater, 2006; Hopwood, 2006; Hopwood, 2007; Ventura ve diğ., 2007) ve bakteriyel enfeksiyonlar ile çok sayıda insan ölümüne sebep olan önemli insan patojeni *Mycobacterium* cinsinin (*M. tuberculosis* ve *M. leprae*) toprakta bulunduğu tespit edilmiştir (Bentley ve diğ., 2004). Bunlara ilaveten; yaygın olarak toprakta bulunan aktinomiset üyelerinin aynı zamanda suda, derin denizlerde ya da kutup buzunda, kimyasal olarak kontamine olmuş yerler ve radyoaktif çevreler gibi ekstrem ortamlarda veya hayvanlar, insanlar ve bitkilerle faydalı ya da patojen olarak bulunabildikleri belirlenmiştir (Barabote ve diğ., 2009; Bull ve diğ., 2005; Smith ve diğ., 2006; Ventura ve diğ., 2007). Son yıllarda; genom dizileme teknolojilerindeki hızlı ilerlemeden dolayı *Actinobacteria*'nın biyolojisi ve çeşitliliği üzerindeki çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır (Şekil 1.2). Bu çalışmaların ana odağında; üretken ve faydalı yeni doğal ürünlerin keşfi için potansiyele sahip olan bakteriler (*Streptomyces*, *Salinispora*, *Saccharopolyspora*, *Cellulomonas*, *Verrucosispora*, *Pseudonocardia* ve *Micromonospora*) (Baltz, 2008; Behal, 2000; Berdy, 2005; Bull ve Stach, 2007; Olano ve diğ., 2009) ya da ciddi insan ve hayvan hastalıkları ile zirai kayıplara sebebiyet veren bakteriler (*Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Renibacterium*, *Atopobium*, *Gordonia*, *Gardnerella*, *Leifsonia* ve *Clavibacter*) vardır (Bull ve Stach, 2007; Demangel ve diğ., 2009). Bunlara ilaveten diğer endüstriyel öneme sahip türlerin (*Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Acidothermus*, *Thermobifida* ve *Nocardioide*s) ve çevresel olarak faydalı türlerin (*Arthrobacter*, *Kocuria*, *Frankia*, *Kineococcus*, *Pseudonocardia* ve *Rubrobacter*) keşfi yeni biyokaynaklar ve teknolojilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (Bagwell ve diğ., 2008; Barabote ve diğ. 2009; Little ve Currie, 2007) .



**Şekil 1.2.** Ezbiocloud veri tabanında Bacteria domaini ait genom çalışmaları yapılmış organizma gruplarına ait sayı ve yüzdeleri gösteren grafik (<http://ezgenome.ezbiocloud.net/> Ekim-2013)

Farmakolojik aktif metabolitlerin ve özellikle yeni antibiyotiklerin şüphesiz en önemli üreticileri actinomisetlerdir (Kumar, 2007). Patojenlerin ilaçlara karşı hızla direnç kazanması, kullanılan bileşiklerin toksik etkisi ve yetersiz oluşu nedeniyle yeni antibiyotiklerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır (Demain, 1998; Wright, 2007). Bundan dolayı farmakolojik araştırmalar ve keşif programlarında uygun biyolojik materyali seçebilmek için actinomycetes taksonomisi ve onların biyoaktif bileşik üretme yetenekleri arasındaki ilişkiyi anlamak önemlidir (Kumar, 2007). Filamentli actinomycetes üyelerinin 10000'den fazla biyoaktif bileşik ürettiği belirlenmiş ve bunlarında yaklaşık 7600'ünün *Streptomyces* cinsine ait türlerden elde edildiği tespit edilmiştir (Sanglier ve diğ. 1996; Watve ve diğ., 2001; Bentley ve diğ., 2002; Ikeda ve diğ., 2003; Ward ve Goodfellow, 2004). Bundan dolayı, ticari olarak önemli sekonder metabolitler için bu organizmaların izolasyonu ve sekonder metabolitler bakımından araştırılmasına devam edilmektedir (Bérdy, 2005; Fiedler ve diğ., 2005). Bununla birlikte; *Streptomycetaceae* familyasının dışında *Actinomycetales* ordosuna ait değişik cins ve familyalar arasında en çok sekonder metabolit üreticisi olan aktinomiset familyaları *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Nocardiaceae* ve *Streptosporangiaceae* familyaları olarak sıralanmaktadır (Choi ve diğ., 2003).

*Thermomonosporaceae* familyasının bir üyesi olan *Actinomadura* cinsinin üyeleri organik madde döngüsünde rol oynadıkları için toprakta bol miktarda bulunmaktadır (Trujillo ve diğ., 2003). *Actinomadura* cinsinin zengin bir antibiyotik

kaynağı olduğunun keşfedilmesi ile *Actinomadura* suşlarının metabolizmaları ve genetikleri hakkındaki bilgiler son on yıl içerisinde artmıştır. Bu cinse ait organizmaların önceleri mantar oldukları kabul edilmesine karşın son zamanlarda *Actinomadura* hakkında elde edilen bilgiler ışığında, oksijenli solunum yapan aktinomisetlere ait bir cins olduğu belirlenmiştir. *Actinomadura* üyelerinin genellikle mezofilik bir yapıya sahip olup 25-40 °C’de gelişim gösterirken bazı türleri termofilik olup 50-65 °C’de optimum sıcaklığa ihtiyaç duydukları ve kırmızı, pembe, sarı, portakal ve beyaz gibi farklı koloni renklerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970; Kroppenstedt ve Goodfellow, 2006).

*Agromyces* cinsi üyelerinin doğal habitatı farklı orijinli topraklardır. Bu cinsin bazı türleri antitümör, antiviral, yüksek ölçüde sıcaklık vasıtasıyla interferonu tetikleyen immunostimulant (bağışıklığı uyarıcı) üretmekte ve bağışıklık tepkisini ve aktivitelerin gücünü artırmayı sağlamaktadır. *Agromyces* cinsinin türleri ve alt türleri koloni renkleri, hücre morfolojileri ve hücre duvar şekerleri gibi bazı fizyolojik özellikleri bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedirler (Evtushenko ve Takeuchi, 2006).

*Geodermatophilus* cinsinin üyeleri sıklıkla kurak topraklardan izole edilmiştir (Urzi ve diğ., 2001). Buna ilaveten bazı üyelerinin rizosfer toprağından izole edildiğı de bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2011; Jin ve diğ., 2013). Bu cinsin bir üyesi olan *Geodermatophilus obscurus* maya hücre duvarını parçalama (Kudukhashvili ve diğ., 2001), UV-C’ye karşı direnç (Kuhlman ve diğ., 2005) ve hücre dışı işlevsel manganez üretme yeteneğindedir (Jordal ve diğ., 2009).

Çoğu türü topraktan izole edilmiş olan *Kribbella* cinsinin bitkilerle ilişkili olan (*Kribbella solani* ve *K. lupini*) türleri de bulunmaktadır. Son dönemlerde maden ocağı (*Kribbella aluminosa*) ve at yarışı alanları olan hipodromlardan alınan toprak örneklerinden izole edilen (*Kribbella hippodromi*) türleri de mevcuttur (Carlsohn ve diğ., 2007; Everest ve Meyers, 2008).

*Micromonospora* cinsi genelde humuşça zengin topraklarda yayılış göstermekle birlikte sucul ekosistemlerden de izole edilebilmektedir ve denizden izole edilen *Micromonospora* cinsi üyelerinin probiyotik olarak kullanılma potansiyellerinin olduğu rapor edilmiştir (Lazzarini ve diğ., 2000; Das ve diğ., 2008). Bunun yanında *Micromonospora* cinsi üyeleri toprak dışında, deniz ve göl sularında, böceklerin bağırsaklarında ve özellikle bitkilerin kök sisteminde yayılış göstermekte olup sentezlediğı antibiyotik ve antifungal gibi sekonder metabolitler ile bitki

patojenleriyle rekabet halindedirler (Tian ve diğ., 2007; Trujillo ve diğ., 2006, 2010; Garcia ve diğ., 2010). *Micromonospora* cinsi *Actinomycetales* takımındaki *Streptomyces* cinsinden sonra ikinci en çok antibiyotik ve enzim inhibitörü üreten taksondur (Houge-Frydrych ve diğ., 2000; Antal ve diğ., 2005; Gutierrez-Lugo ve diğ., 2005; Berdy, 2005; Qiu ve diğ., 2008). Bu cinsin üyeleri dallanmış, bölmeli hifler oluşturur ve koloniler beyaz, turuncu, gül kurusu veya kahverengi renkte olabilirken, besiyerine çözünür pigment salgılayanların da mevcut olduğu bilinmektedir (Hirsch ve Valdés, 2010). Genellikle genç koloniler soluk sarı, açık turuncu gibi renklerde iken yaşlı kolonilerin rengi koyulaşmakta ve koyu turuncu, kırmızı, kahverengi hatta siyah renge dönebilmektedir (Vobis, 2006).

*Nocardia* cinsi üyeleri akuatik ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunduğu gibi çok farklı ekstrem ortamlarda da bulunabilmektedir (Orchard, 1981; Maldonado ve diğ., 2000). Farklı *Nocardia* populasyonları aktif çamur kirli su arıtım tesislerinde havalandırma tanklarının yüzeylerindeki köpük içerisinde ve çamur sedimentlerinin içinde bulunmuştur (Goodfellow ve diğ., 1996; Pagilla ve diğ., 1998; Yamamura ve diğ., 2005). *Nocardia*; aerobik, dallanmış flamentleri bir arada bulunduran, Gram pozitif, hareketsiz, katalaz pozitif, gelişme döngüsünün bazı evrelerinde tipik asit alkol direncine sahip olan aktinomisetlerdir. *Nocardia* suşları insan ve hayvanlarda çeşitli cerahatli enfeksiyonlar (Nokardiozis) oluşturmaktadırlar. Enfeksiyon genellikle solumla ve bulaşmış bir yaraya temas ile gerçekleşmektedir (Schaal ve Lee, 1992; McNeil ve Brown, 1994; Goodfellow ve diğ., 1998; Saubolle ve Sussland, 2003; Munoz ve diğ., 2007; Jinno ve diğ., 2007).

*Nonomuraea* cinsi Zhang ve diğ. tarafından 1998 yılında önerilmiştir ve *Streptosporangiaceae* familyasının bir üyesidir. Bu cinsin üyeleri aerobik, Gram-pozitif, non-asit-fast, aşırı dallanmış substrat ve hava miselyumlarına sahip hareketsiz aktinomisetlerdir. Hava hifleri çengel, spiral yada katlanmış, düzensiz, pürüzsüz ve değişen yüzey görünümüne sahip uzun spor zincirleri şeklinde farklılaşabilir. Bu cins kemotaksonomik olarak hücre duvarında meso-diaminopimelik asit mevcudiyeti, tüm hücre lizatlarında karakteristik şeker olarak maduroz bulundurması, baskın izoprenolog olarak dokuz izopren alt birimi ile di-, tetra- ve hekza-hidrojen atomuna sahip menakinonlara sahip olmasıyla karakterize edilmektedir. *Streptosporangiaceae* familyası içinde antibiyotik üreten cinsler arasında yer almaktadır (Ara ve diğ., 2007a, b; Camas ve diğ., 2013; Cao ve diğ., 2012; Chiba ve diğ., 1999; Kampfer ve diğ., 2005, 2010; Le Roes & Meyers, 2008;

Li ve diğ., 2011, 2012; Nakaew ve diğ., 2012; Qin ve diğ., 2009; Stackebrandt ve diğ., 2001; Wang ve diğ., 2011; Zhang ve diğ., 1998; Zhao ve diğ., 2011).

*Rhodococcus* cinsi aerobik, Gram-pozitif veya Gram-değişken, hareketsiz, katalaz pozitif, gelişimin bazı evrelerinde asit-alkol-fast, çubuk biçiminde veya oldukça dallanmış substrat miselyumu oluşturabilen aktinomisetlerden oluşmaktadır. Rodokoklar standart laboratuvar besi ortamlarında 30 °C’de iyi gelişmektedir. Koloniler pürüzlü, pürüzsüz veya mukoid özellikte olup soluk sarı, krem, sarı, turuncu veya kırmızı pigmentlidir; ancak renksiz çeşitleri de bulunmaktadır (Goodfellow ve Maldonado, 2006). Bu cinsin üyeleri; sucul ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Rodokok türleri topraktan, deniz sedimentlerinden ve mutualistik birliktelik kurabildikleri kan emici böceklerin bağırsak içeriklerinden izole edilmişlerdir (Cross ve diğ., 1976; Goodfellow ve Aubert, 1980; Colquhoun ve diğ., 1998; Zhang ve diğ., 2002).

*Streptomyces* türleri; tıp, ekoloji ve biyoteknoloji endüstrisindeki önemli rollerinden dolayı en iyi çalışılmış ve karakterize edilmiş bakterilerdir (Bentley ve diğ., 2002; Alam ve diğ., 2010). *Streptomyces* cinsi üyeleri, oldukça karmaşık bir sekonder metabolizmaya sahip olup, çok miktarda biyolojik açıdan kullanışlı bileşikler üretmektedirler. Tüm mikrobiyal biyoaktif sekonder metabolitlerin yaklaşık % 45’inin kaynağı aktinomisetlerdir ve bu metabolitlerin (7600 bileşik) % 80’ini de *Streptomyces* üyeleri tarafından üretilmektedir (Berdy, 2005). Bu bileşenlerden en önemlileri tıp ve veterinerlikte kullanılan antibiyotik, antifungal, antiparazitik ajanlar, herbisitler, immünbaskılayıcılar ile gıda endüstrisi ve diğer alanlarda kullanılan çeşitli önemli enzimlerdir (Ilic ve diğ., 2007; Savic ve diğ., 2007; Sembiring ve diğ., 2008; Anzai ve diğ., 2008; Alam ve diğ., 2010). *Streptomyces*’ler toprakta baskın olarak bulunan actinomycetesler olarak anılsalar da son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, *Streptomyces* üyeleri bitki köklerindeki rizosfer, bitki dokuları, yaprakla beslenen karıncalar, kümes hayvanı dışkısı ve deniz süngeri gibi farklı habitatlarda da bulunabilmektedir (Kim ve diğ., 2000; Castillo ve diğ., 2002; Tokala ve diğ., 2002; Strap ve diğ., 2006; Kost ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2008; Sazak, 2009; Sembiring, 2009; Şahin ve diğ., 2010).

Bu çalışmada Marmara Denizi’nde bulunan Büyükada, Burgazada, Heybeliada ve Kınalıada topraklarından farklı aktinomiset üyelerinin izolasyonu, moleküler

metotlardan 16S rRNA gen bölgesi ile moleküler tiplendirmesi ve olası yeni aktinomisetlerin literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

## 2 LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Genel Bilgiler

#### 2.1.1 *Actinomadura* cinsinin sistematığı, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Altsınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Streptosporangineae* (Ward-Rainey ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familya:** *Thermomonosporaceae* (Rainey ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Cins:** *Actinomadura* (Lechevalier ve Lechevalier, 1970)

Lechevalier ve Lechevalier tarafından 1970’de tanımlanan *Actinomadura* cinsi Zhang ve diğerleri (1998, 2001) ve Miyadoh ve Miyara (2001) tarafından yeniden düzenlemiş olup, günümüzde geçerli olarak tanımlanmış 75 tür, 2 alt türü bünyesinde barındırmaktadır (<http://www.bacterio.cict.fr/a/actinomadura.html> Kasım 2013).

1970 yılında Lechevalier ve Lechevalier cinsi tanımlarken kullandıkları “aerobik, Gram pozitif, asit-fast özellik göstermeyen, hareketsiz, hücre duvarı *mezo*-diamilopimelik asitçe (*mezo*-A<sub>2</sub>pm) zengin fakat karakteristik hücre duvar şekeri içermez (hücre duvar tipi III)” tanımı üzerine *Actinomadura* cinsi pek çok farklı cinsin üyelerini bir dönem bünyesinde barındırmıştır (Lechevalier ve Lechevalier, 1970; Lu ve diğ., 2003). İzleyen süreçte *Actinomadura* cinsi endospor oluşturmadığı için *Thermomonosporaceae* familyasına geçmiştir (Cross ve Goodfellow, 1973). *Actinomadura* cinsinin *Nocardia* cinsinden ayrılması nümerik analizler, DDH, faj tiplendirmesi, kimyasal ve serolojik verilerle yapılmaya çalışılmıştır (Tsukamura, 1969; Goodfellow, 1971; Prauser, 1978; Mordarski ve diğ., 1978; Goodfellow ve Minnikin, 1978). Bunlara rağmen cinsin içerdiği türler ve taksonomik tarihçesindeki belirsizlik sebebiyle *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*’nin sekizinci

baskısında *Actinomadura* “*incertae sedis*” (Lat. taksonomik yeri belirsiz) bir cins olarak tanımlanmıştır (Lacey ve diğ., 1978; Goodfellow ve Alderson, 1979).

Miyadoh ve diğ. 1989 yılında yaptıkları çalışmayla *Microtetraspora viridis* türünün (Nonomura ve Ohara, 1971) kemotaksonomik özellikleri bakımından *Microtetraspora* cinsinden oldukça farklı olduğunu görmüşler, ayrıca *Actinomadura malachitica* ile sinonim olduğunu ve *Actinomadura viridis* olarak sınıflandırılmasını önermişlerdir. 1990 yılında Kroppenstedt ve diğ. *Microbispora echinospora* türünün kimyasal özelliklerinin *Actinomadura* cinsine benzerliği bakımından bu cins içerisinde sınıflandırılmasını önermişlerdir. 1992 yılında *Thermomonosporaceae* ve *Streptosporangiaceae* familyaları Kroppenstedt ve Goodfellow tarafından taksonomik olarak yeniden düzenlenmiştir. Ardından Miyadoh ve diğ. 1997’de Atlas of Actinomycetes’de bu familyalar arasındaki morfolojik farklılıkları göstermişlerdir (Kroppenstedt ve Goodfellow, 1992).

1997 yılına gelindiğinde Stackebrandt ve diğ. her bir taksonu 16S rRNA gen dizisini kriter alarak analiz etmişler ve sonuç olarak, *Actinobacteria* sınıfını önermiş ve tanımlamışlardır. *Thermomonosporaceae* familyasının taksonomik pozisyonu kemotaksonomik ve moleküler sistematik metotların beraber uygulanmaya başlaması ile birlikte netlik kazanmaya başlamıştır. Bu takson *Nocardiopsaceae* ve *Streptosporangineae* familyaları ile birlikte, *Actinomycetales* takımının 13 alt takımından biri olan *Streptosporangineae* alttakımında sınıflandırılmıştır. (Stackebrandt ve diğ., 1997). *Thermomonosporaceae* familyası; *Actinomadura* (Lechevalier ve Lechevalier, 1970), *Actinocorallina* (Inuma ve diğ., 1994), *Spirillospora* (Couch, 1963) ve tip cinsi *Thermomonospora* (Henssen, 1957) Zhang ve diğ. tarafından 2001’de yeniden düzenlenmiştir. Bu taksonun üyeleri 16S rRNA gen ağacında farklı bir filogenetik hat oluşturduğundan, morfolojik, fizyolojik ve kimyasal özelliklerin kombinasyonları kullanılarak birbirinden ve yakın akraba familyalar olan *Nocardiopsaceae* (Rainey ve diğ., 1996) ve *Streptosporangiaceae* (Goodfellow ve diğ., 1990) familyalarından ayrılabilir (Stackebrandt ve diğ., 1997; Zhang ve diğ., 1998, 2001; Miyadoh ve Miyara, 2001; Trujillo ve Goodfellow, 2003).

Kemotaksonomik ve moleküler tekniklerin bir arada kullanımının yaygınlaşmaya başlamasıyla *Actinomadura* cinsi içindeki pek çok türün taksonomik yeri değişmiştir. Buna en iyi örnek olarak Zhang ve diğ. 1998 yılında 16S

rRNA analizlerini temel alarak gerçekleştirdikleri çalışma verilebilir. Toplam on iki adet *Actinomadura* türü yeni bir aktinomiset cinsi olarak önerilen *Nonomuria* cinsine geçirilmiştir. Chiba ve diğerleri ise 1999 yılında *International Code of Nomenclature of Bacteria* kurallarına göre *Nonomuria* ismini *Nonomuraea* olarak değiştirmiştir. Zhang ve diğerlerinin 1998 yılında yaptıkları bu çalışma ile kimyasal, moleküler ve nümerik metotların birlikte uygulanmasının önemi bir kez daha vurgulanırken, cinsin taksonomik revizyona ihtiyacı olduğunu da açıkça gösterilmiştir (Zhang ve diğ., 1998, 2001).

Zhang ve diğerlerinin 2001 yılına yaptığı yeni bir çalışmada ise *Actinomadura* cinsi içindeki dört türün *Actinocorallina* cinsine, *Thermomonospora* cinsine ait iki türün de *Actinomadura* cinsine transferi önerilmiştir. Ayrıca *Excellospora viridilutea* *Actinomadura* cinsine geçip *Actinomadura viridilutea* olarak değiştirilince *Excellospora* cinsi taksonomik statüsünü kaybetmiştir (Zhang ve diğ., 2001; Zhi ve diğ., 2009). Yine Gauze ve diğerlerinin 1973’de tanımladıkları *Actinomadura carminata* Gyobu ve Miyadoh tarafından 2001 yılında *Nonomuraea roseoviolacea* subsp. *carminata* olarak yeniden isimlendirilmiştir ve böylece cins morfolojik ve kemotaksonomik açıdan daha homojen hale gelmiştir.

*Actinobacteria* sınıfının 16S rRNA gen dizisini kriter alan tanımlaması 2009 yılında Yunnan Üniversitesin’den Zhi ve diğerlerinin, Stackebrandt’la gerçekleştirdikleri ortak çalışma ile güncelleştirilmesi sağlanmıştır (Zhi ve diğ., 2009). 2011 yılında ise Promnuan ve diğerlerinin yaptıkları çalışmadan elde ettikleri genotipik ve fenotipik verilerle *Actinomadura cremea* subsp. *rifamycini*’nin taksonomik pozisyonunun yeniden düzenlenip, *A. rifamycini* olarak tür düzeyinde isimlendirilmesini önerilmiş ve bu öneri komisyon tarafından kabul edilmiştir (Promnuan ve diğ., 2011).

*Actinomadura* cinsi aerobik, gram pozitif, asit-fast negatif ve hareketsiz aktinomisetlerden oluşmaktadır. DNA’nın % G+C içeriği % 66-72 mol’dür (Kroppenstedt ve diğ., 1990; Lu ve diğ., 2003; Wink ve diğ., 2003; Wang ve diğ., 2007; Ara ve diğ., 2008b). Kemoorganotrofik aktinomisetlerden olan *Actinomadura* dallanmış substrat misellerine sahip olmasının yanı sıra tek veya kısa zincirli 15 veya daha fazla arthrosporlar taşıyan hava miselyumuna sahiptir. Yüzeydeki spor zincirleri farklı uzunluklara sahip olup düz, kanca veya spiral şekilli olan düzenli, pürüzsüz, dairesel sporlara sahiptir (Lu ve diğ., 2003; Tseng ve diğ., 2009).

Çoğu mezofilik olan cins üyeleri 25-40°C’de gelişim gösterirken, gelişmek için 50-65°C’de optimum sıcaklığa ihtiyaç duyan termofilik türleride mevcuttur. Toprak izolatlarının büyük bir kısmı optimum 28°C’de gelişmektedir. Termofilik *Actinomadura* olan *Actinomadura rubrobrunea* optimum sıcaklık olarak 55°C’ye, *A. viridilutea* ise 45°C’de ihtiyaç duymaktadır ve bu iki termofilik tür, mezofilik *Actinomadura* üyelerinden ağır asit kompozisyonundaki farklılıklarla ayrılabilir. Polar lipidleri difosfotidil gliserol, fosfotidilinositol ve fosfotidilinositol mannositleridir. *Actinomadura* cinsi üyeleri kemotaksonomik olarak mezo-diaminopimelik asit ve maduroz gibi şekerleri içeren tip III-B hücre duvarına sahiptir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970).

*Actinomadura* cinsinin üyeleri gelişimleri sırasında enerji kaynağı olarak şekerleri kullanmakta ve proteolitik aktivite olarak çoğu suşu kazein, jelatin ve lignoselülozu parçalamaktadır; ancak kitin, ksantin ve ksilan gibi maddeleri metabolize edememektedir (Kroppenstedt ve Goodfellow, 2006). Bunların dışında, Puhl ve diğerleri 2009 yılında Kanada’da sığır gübresinden pek çok bakterinin parçalayamadığı bir polimer olan keratini degrade edebilen bir *Actinomadura* türü (*A. keratinilytica*) izole etmeyi başarmış ve yine aynı yıl Tseng ve diğerleri termotolerant poliestere degrade edebilen bir *Actinomadura* türü (*A. miaoliensis*) izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Cins bu özelliklerinin dışında iyi bir antibiyotik üreticisi olarak da bilinmektedir. Topraktan izole edilen bazı türleri antibiyotik endüstrisinde kullanılan çeşitli antibiyotikleri üretmektedir. 1991 yılında Fiji adalarındaki topraktan izole edilen *Actinomadura hibisca*, *A. kijaniata*, *A. macra*, *A. oligospora* antibiyotik üreticisi olarak bilinen türlerden bazılarıdır (Huang, 1980; Mertz ve diğ., 1986; Tomita ve diğ., 1990; Waitz ve diğ., 1981;).

İlk tanımlanan *Actinomadura* örnekleri klinik izolatlardan elde edilmiştir. Cinsin tip türü olan daha çok topraktan izole edilen *Actinomadura madurae* ve *A. pelletieri* insanda miçetomanın birincil ajanlarıdır. Klinik önemi olan *Actinomadura* türlerine ek olarak *Actinomadura chibensis*, *A. latina*, *A. pelletieri*, *A. sputi* verilebilir (Trujillo ve Goodfellow, 1997; Hanafy ve diğ., 2006). *A. latina* ve *A. pelletieri* sadece klinik materyallerden izole edilmiştir.

*Actinomadura* cinsi üyeleri organik madde döngüsünde rol oynadıkları toprakta bol miktarda bulunur (Trujillo ve Goodfellow, 2003). *Actinomadura alba*, *A. bangladeshensis*, *A. chokoriensis*, *A. fibrosa* habitatı toprak olan *Actinomadura* türlerine örnek olarak verilebilir (Mertz ve Yao, 1990; Wang ve diğ., 2007; Ara ve diğ., 2008b). Baskın olan kırmızı renk pigmenti siylononilprodigin, nonilprodigin ve andesilprodigin olarak tanımlanan tripyrol iskeletiyle karakterizedir (Lechavalier ve Lechavalier, 1970).

*Actinomadura* cinsi insan dışında bitkilerden de izole edildiği rapor edilmiştir. Qin ve diğerleri 2009 yılında Çin'nin Yunnan bölgesindeki bir yağmur ormanında bulunan *Maytenus austroyunnanensis* bitkisinin yapraklarından endofitik *Actinomadura* türü izole etmiş ve bu yeni türü *A. flavalba* olarak isimlendirmişlerdir.

Amonyak içeren atık gazların işlendiği tesislerde toksik bir bileşik olan nitrit üretimi görülmektedir. Nitrit ortamın pH'sını düşürerek biyofiltrelerin verimliliğini düşürmektedir. Nitrit üreten bir *Actinomadura* türü olan *A. nitritigenes*'in böyle biyofiltreden izole edildiği 1995 yılında Lipski ve Altendorf tarafından bildirilmiştir.

### 2.1.2 *Agromyces* cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalemler:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Alt sınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Micrococcineae* (Prévot, 1940) (Stackebrandt ve diğ., 1997)

**Familiya:** *Microbacteriaceae* (Park ve diğ., 1995)

**Cins:** *Agromyces* (Gledhill ve Casida, 1969)

Gledhill ve Casida (1969) *Agromyces* cinsini; dallanmış, fragmentli filamentlere sahip olan besinsel olarak seçici ve katalaz negatif bir toprak izolatu olan *Agromyces ramosus* tip türü ile tanımlamıştır. Benzidin ve tetramethyl-*p*-phenylenediamine ile negatif oksidaz reaksiyonu gösteren *Agromyces ramosus* tip suşu sitokrom *b*, *c* ve *aa*<sub>3</sub> üretmektedir (Jones ve diğ., 1970b). Bu suşun; B2γ tip peptidoglikan (Schleifer ve Kandler, 1972; Fiedler ve Kandler, 1973a), önemli menakinonu MK-12, baskın

doymamış yağ asidi *iso-* ve *anteiso* dallanmış yağ asitleri ve polar lipidleri difosfotidilgliserol, fosfotidilgliserol ve glikolipid olarak tanımlanmıştır (Collins, 1982a). 1992’de Zgurskaya ve diğerleri *Agromyces* cinsinin tipik morfolojik ve kemotaksonomik özelliklerine sahip 14 toprak izolatu tanımlamıştır. Fakat genel ortamlar üzerinde hızlı bir şekilde gelişen ve pozitif katalaz ve oksidaz reaksiyonları gösteren türlerdir. Yazar bu türlerin ikisini yeni tür ve *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus*, *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus*, *Agromyces fucosus* subsp. *fucosus*, ve *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* dört alt tür olarak sınıflamış ve cinsin tanımlamasındaki düzeltmeleri de yapmıştır (Zgurskaya ve diğ., 1992). Daha sonra Suzuki ve diğerleri (1996) *Agromyces fucosus* türünün alt türlerinin arasındaki DNA-DNA uyumluluğunun genomik türlerin genellikle kayda değer uyumluluğundan daha düşük olarak %45-47 oranında olduğunu bulmuştur. Bu cins mangrov rizosferinden izole edilen *Agromyces luteolus*, *Agromyces rhizospherae* ve *Agromyces brachium* (Takeuchi ve Hatano, 2001), Çin’de orman toprağından izole edilen *Agromyces aurantiacus* (Li ve diğ., 2003) ve *Androsace* sp. bitkisinden izole edilen *Agromyces albus* (Dorofeeva ve diğ., 2003) türleri ile genişlemiştir.

*Agromyces* cinsi şu anda 4 alt tür ve 25 tür içermektedir (<http://www.bacterio.net/agromyces.html> Kasım 2013).

Cinsin üyeleri opak bir görünüm, yumuşak koloni oluşturan ve bütün koloniler genelde agar içine dalmış olmasıyla tanımlanırlar. Dallanmış hifler (0.2–0.8 µm çapında) difterioide benzer ve çubuksu, düzensiz, hareketsiz fragmentlidir. Hava miselyumu oluşturan *A. aurantiacus* haricinde hava miselyumu ve spor oluşumu gliserol asparajin agar üzerinde genellikle gözlenmez (Li ve diğ., 2003). Hücreler aerobiktir. Katalaz testi ve tetrametil-*p*-fenilenediamine ile oksidaz reaksiyonu farklı türler için değişebilir. Mezofilik ve optimal gelişim 24-30°C de meydana gelir ve bazı suşlar 37°C’de gelişir. Suşlar geniş bir aralıkta C ve N kaynağı kullanırlar ve organik ve inorganik nitrojen içeren ortamlar üzerinde gelişirler. Peptidoglikan DAB’ dan ötürü (çoğunlukla L-izomer; Sasaki ve diğ.,1998) B2γ’a sahiptir (Schleifer ve Kandler, 1972) ve molar oranı yaklaşık 1:1:2:1 olan glisin, glutamat, DAB ve alanin amino asitlerini içermektedir. Galaktoz ve rhamnoz çoğu suşta hücre duvarında bulunur; fukoz, früktoz, glukoz, mannoz, riboz ve tiveloz farklı türlerde değişiklik göstermektedir. Mikolik asit içermemektedir. Baskın menakinon MK-12’dir ve türe göre değişen ikinci en yaygın içerik MK-11 ya da MK-13’dür. Polar

lipitler difosfotidilgliserol, fosfotidilgliserol ve glikolipidler ile temsil edilir; dallanmış *iso*- ve *anteiso*- yağ asitleri baskındır ve 94% oranına ulaşabilir (Zgurskaya ve diğ., 1992; Suzuki ve diğ., 1996; Takeuchi ve diğ., 2001). Hücre duvarında teikoik asitler ve anoksik polimerlerle ilişkiler bazı tür ve alt türlerde bulunmuştur (Naumova ve diğ., 2001). *Agromyces* türlerinin bazılarındaki araştırmalarda toplam poliamin içeriği *Microbacteriaceae* familyasının diğer çoğu suşunda olduğundan daha düşüktür ve baskın bileşik olarak putresin ile yalnızca 0.21–0.28  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 'den oluşmaktadır (Altenburger ve diğ., 1997).

*Agromyces* cinsi üyelerinin doğal habitatı farklı özellikli topraklardır (Gledhill ve Casida, 1969; Zgurskaya ve diğ., 1992; Suzuki ve diğ., 1996; Takeuchi ve Hatano, 1999; Takeuchi ve Hatano, 2001; Li ve diğ., 2003). *Agromyces ramosus* türünün sayısal olarak toprakta baskın organizma olduğu tespit edilmiştir (Gledhill ve Casida, 1969). Bununla birlikte *Agromyces luteolus*, *Agromyces rhizospherae* ve *Agromyces brachium* (Takeuchi ve Hatano, 2001) Japonya Okinawa'nın tropikal ve subtropikal bölgelerindeki *Bruguiera gymnorhiza* ve *Sonneratia alba* bitkilerinin rizosferinden izole edilmiştir (Hatano, 1997; Takeuchi ve Hatano, 1999). *Agromyces mediolanus* ATCC 13990 suşu preslenmiş kuru mayadan izole edilmiş (Cummins ve diğ., 1974) ve *Agromyces albus* Rusya'da Belgorod bölgesindeki *Androsace* sp. bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilmiştir (Dorofeeva ve diğ., 2003). Bu cinsin mikroorganizmaları İtalya, Porto Badisco, Grotta dei Cervi (Laiz ve diğ., 2000); Çin'in Guliya bölgesindeki 500.000 yıldan daha eski olan bir buzul buzundan (Christner, 2002), bir ortaçağ duvar resminden (Altenburger ve diğ., 1996), Tyrolean buz adamın cilt ve kaslarından (Rollo ve diğ., 2000) ve diğer bazı kaynaklardan izole edilmiştir.

*Agromyces* cinsinin üyesi olan çoğu suшта hücre duvarındaki DAP mevcudiyeti ve dallanmış fragmentli miselyum mevcudiyeti tespit edilmiştir. Sadece *Agromyces mediolanus* genellikle miselyum üretmez (Suzuki ve diğ., 1996). Bu cinsin türleri baskın menakinon MK-12 ve hareketsiz çubuksu hücreler sayesinde çoğu DAP içeren cinslerden farklıdır. *Agromyces* türleri için karakteristik önemli menakinon olan MK-12 *Agrococcus* cinsinin üyelerinde de bulunur ve bununla birlikte ikinci baskın bileşik olan MK-11 *Leifsonia* cinsinin bazı türlerinde bulunmaktadır. Buna ilaveten *Agromyces* spp. yalnızca peptidoglikanında L-DAB içerir (Sasaki ve diğ., 1998). *Agromyces* cinsinin türleri ve alt türleri koloni renkleri,

hücre morfolojileri, hücre duvar şekerleri, gelişim için bileşik ortam gereksinimleri, tetrametil-p-fenilendiamin ile oksidaz testi ve diğer bazı fizyolojik özellikleri bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler.

*Agromyces ramosus* ATCC 25173 ve *Agromyces okinawai* türünün bazı suşları antitümör, antiviral, interferonu tetikleyen yüksek ölçüde sıcaklık vasıtasıyla immunostümulant üretir ve bağışıklık tepkisini ve aktivitelerin gücünü artırmaya sağlar (Wakuzaka ve diğ., 1983). İmünoaktif özellikleri *Agromyces cerinus* türünün hücre duvar polimerlerinde de bulunmuştur (Evtushenko ve Takeuchi, 2006). 3,6-dideoksi-D-arabinose'un (tyvelose) üretiminin *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* suşu tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Zgurskaya ve Evtushenko, 1996). *Agromyces* sp.'yi bloke etmek için kullanılan hidantoini dönüştüren D-N-karbamil- $\alpha$ -amino asidinin üretimi belirtilmiştir. Bu bileşikler tıbbi ilaçlar ve kimyasal tarım ürünlerinin üretimi için faydalıdır (Mitsubishi Kaseo Corporation, 1989). Ağaç kabuğu içeren deneysel biyolojik filtreler, hayvansal dönüşümlerde aldehit, keton, furan, tiyofen ve alkil sülfid bileşikler, hidrojen sülfid, amonyak ve karbondioksit gibi ham gaz emisyonlarında kullanılır. *Corynebacterium* ve *Gordonia* suşları ile birlikte *Agromyces* cinsinin iki suşu bitki ve kirletici degradasyonunda atık gazı arıtmak için kullanılan biyolojik filtrelerde mevcut olan bakteriler arasında yer aldığı tespit edilmiştir (Bendinger ve diğ., 1990). Bazı *Agromyces mediolanus* suşları anilini asimile ettiği belirlenmiştir (Aoki ve diğ., 1982; Suzuki ve diğ., 1996). *Agromyces mediolanus* ATCC 14004 ve *Agromyces mediolanus* ATCC 13930 steroidleri oksitleme yeteneğindedir (Mamoli, 1939; Arnaudi, 1942) ve *Agromyces mediolanus* ATCC 13930 oxoalkilsantin hazırlanması için mikrobiyolojik süreç için kullanılabilir (Nesemann ve diğ., 1974). *Agromyces ramosus*'un ATCC 25173 ve PSU 35 suşları *Saccharomyces cerevisiae* ve *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas fluorescens* türlerini de içeren bazı bakterilerin hücrelerine saldırır ve yıkar. Bu suşlar; bu habitatlarda bulunan faydalı organizmaların sayısını düşürmeksizin *Agrobacterium tumefaciens* ve diğer patojenlerin kontrol seviyelerini manüple edebilmektedir (Casida, 1983).

### 2.1.3 *Geodermatophilus* cinsinin sistematiki, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Altsınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familiya:** *Geodermatophilaceae* (Normand ve diğ., 1966)

**Cins:** *Geodermatophilus* (Luedemann, 1968)

*Geodermatophilaceae* familyası ilk olarak Normand ve diğerleri tarafından 1966'da tanımlanmıştır. Fakat familyanın adının resmi tanımlanması on yıl sonra yapılmıştır (Normand, 2006). Familya *Blastococcus*, *Modestobacter* ve *Geodermatophilus* (tip cinsi) cinslerinden oluşmaktadır. *Geodermatophilus* cinsi ilk olarak Luedemann (1968) tarafından önerilmiştir ve bu isim Skerman ve diğerleri (1980) tarafından Approved Lists of Bacterial Names' de kabul edilmiştir. Bu cinsin üyeleri sıklıkla kurak topraklardan izole edilmiştir (Urzı' ve diğ., 2001). Buna rağmen rizosfer toprağından izole edilmiş üyeleri de vardır (Zhang ve diğ., 2011; Jin ve diğ., 2012). Fakat bu cins için yapılan çalışmalar ve kültüre edilmesindeki zorluklardan dolayı örneklenmesi uzun zaman yetersiz kalmıştır (Urzı' ve diğ., 2004).

*Geodermatophilaceae* familyası çoğunlukla yavaş gelişim oranı ve gelişim ihtiyaçlarının karşılanması da zor olması nedeniyle birkaç yıldır yetersiz bir oranda çalışılmaktadır (Stackebrandt ve diğ., 1997). Bu familya bugün *Frankineae* alt takımı içinde yer almaktadır. *Geodermatophilaceae* familyasının üyeleri topraktan izole edilmiştir. *Geodermatophilus* 16S rRNA çalışmaları ile filogenetik ilişkisizliği ortaya çıkartılana kadar *Dermatophilaceae* familyası içinde *Dermatophilus* cinsi ile birlikte gruplandırılmıştır (Stackebrandt ve diğ., 1983).

*Geodermatophilaceae* familyası ile ilgili yapılan ilk filogenetik çalışma kısmen 16S üzerindeki ters dizilenme ve çoğunlukla 16S rRNA oligonükleotidlerin dizilenmesine dayanmaktadır (Hahn ve diğ., 1989). Bu çalışmaların temel sonucu Baltık Denizi'nden izole edilen *Blastococcus* (Ahrens ve Moll, 1970) ve *Geodermatophilus*'un (Luedemann, 1968) *Frankia* ile yakından ilişkili olduğudur. Fakat yapılan çalışmalar, nadir morfolojik özellikleri paylaşımlarına rağmen

*Dermatophilus* cinsi ile aynı kökenden oluştuğunu gösteren çalışmaları doğrulamıştır (Normand, 2006 ).

İlk olarak çöl toprağından izole edilen izolatlardan tanımlanan *Geodermatophilus* cinsine yeni izolatlar da düzenli bir şekilde ilave edilmiştir (Normand, 2006 ). Bunlar çeşitli ortamlardan (toprak, taş ve barajlar gibi) elde edilmiştir ve adlandırılmış on tür *Geodermatophilus* cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Bunlar; *G. obscurus* (Luedemann, 1968), *G. ruber* (Zhang ve diğ., 2011), *G. nigrescens* (Nie ve diğ., 2012), *G. arenarius* (Montero-Calasanaz ve diğ., 2012, 2013b), *G. siccatus* (Montero-Calasanaz ve diğ., 2013f, g), *G. saharensis* (Montero-Calasanaz ve diğ., 2013c, d), *G. telluris* (Montero-Calasanaz ve diğ., 2013e), ‘*G. tzadiensis*’ (Montero-Calasanaz ve diğ., 2013a), *G. soli* ve *G. terrae* (Jin ve diğ., 2013) olarak sıralanmaktadır. Yalnızca bir tip türünün; *G. obscurus* genom analizi yapılmıştır (Ivanova ve diğ., 2010). Ayrıca adlandırılmış üç alt tür de belirlenmiştir. Bunlar; *G. obscurus* subsp. *amargosae*, ‘*G. obscurus* subsp. *utahensis*’ and ‘*G. obscurus* subsp. *dictyosporus*’ (Luedemann, 1968) türleridir (<http://www.bacterio.net/g/geodermatophilus.html> Kasım 2013).

*Geodermatophilus* ilk olarak; yeast ekstrakt 0.1%, glukoz 0.1%, soluble starch 0.1%, CaCO<sub>3</sub> 0.1% ve 1.5% agar içeren sulandırılmış ortam üzerinde çöl ve orman toprağından izole edilmiştir (Luedemann, 1968). Mikroskopik gözlemden sonra koloniler zenginleştirilmiş ortam (yeast extract, 0.5%; mixture of amines, 0.5%; glucose, 1%; soluble starch, 2%; CaCO<sub>3</sub>, 0.1% ve 1.5% agar) üzerine saf kültür edilmiştir. *Geodermatophilus* cinsinin terminal flagellalar vasıtasıyla hareket eden zoosporlara sahip olduğu gerçeğine dayanan son zamanlarda tanımlanan bir teknik (Hayakawa ve diğ., 2000) seçici besi yerine ekim yapılmadan önce hareketsiz aktinomisetlerin hafif bir santrifüj aşamasıyla dibe çöktürülmesini içermektedir. *Geodermatophilus* cinsine ait olan izolatlar kuru topraklar ve kaya yüzeylerinden de düzenli olarak tanımlanmıştır (Urzi ve diğ., 2001).

*Geodermatophilus* izolatlarının kullandığı karbonhidratlar genelde L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-levulose, D-mannitol, sucrose ve D-xylose olarak tespit edilmiştir (Luedemann, 1968).

Tip türü olan *G. obscurus* maya hücre duvarını parçalama (Kudukhashvili ve diğ., 2001), UV-C'ye karşı direnç (Kuhlman ve diğ., 2005) ve hücre dışı işlevsel amyloid ve manganez üretme yeteneğindedir (Jordal ve diğ., 2009).

#### **2.1.4 *Kribbella* cinsinin sistematığı, tarihçesi ve genel özellikleri**

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Altsınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Propionibacterineae* (Rainey ve diğ., 1997)

**Familiya:** *Nocardioidaceae* (Nesterenko ve diğ., 1990)

**Cins:** *Kribbella* (Nesterenko ve diğ., 1985),

*Kribbella* cinsi Park ve diğerleri tarafından 1999 yılında, hücre duvarında LL-diaminopimelik asit içeren (hücre duvar kemotip I, Lechevalier ve Lechevalier, 1970) nocardioform aktinomiset olarak belirlenmiştir. *Nocardioidaceae* familyasına ait 8 cinsten biri olan ve *Actinopolymorpha* (Wang ve diğ., 2001b), *Aeromicrobium* (Miller ve diğ., 1991), *Hongia* (Lee ve diğ., 2000), *Marmoricola* (Urzi ve diğ., 2000), *Nocardioides* (Prauser, 1976), *Pimelobacter* (Suzuki ve Komagata, 1983) ve *Thermasporomyces* (Yabe ve diğ., 2011) cinsleri ile birçok ortak morfolojik ve kemotaksonomik özelliğe sahip olan *Kribbella* cinsi bazı temel farklılıkları ile bu cinslerden ayrılmaktadır (Lee ve diğ., 2000; Li ve diğ., 2004 ).

Hücre duvarında LL-diaminopimelik asit içeren aktinomisetler, *Actinobacteria* sınıfı içinde *Streptomyces* (Waskman ve Henrici, 1943; Williams ve diğ., 1989) (*Streptomycetaceae*); *Sporichthya* (Rainey ve diğ., 1993) (*Sporichthyaceae*); *Nocardioides* (Prauser, 1976) ve *Aeromicrobium* (Miller ve diğ., 1991) (*Nocardioidaceae*); *Intrasporangium* (Kalakoutsii ve diğ., 1967), *Tetrabacter* (Collins ve diğ., 1989a) ve *Tetracoccus* (Prauser ve diğ., 1997) (*Intrasporangiaceae*); *Propioniferax* (Yokota ve diğ., 1994), *Luteococcus* (Tamura ve diğ., 1994b), *Microlunatus* (Nakamura ve diğ., 1995) ve *Friedmanniella* (Schumann ve diğ., 1997) (*Propionibacteriaceae*) şeklinde beş familiya olarak belirlenmiştir.

Park ve diğeri, *Nocardioides fulvus* ve *Nocardioides* sp. ATCC 39419 olarak bilinen suşlarını da içine alacak şekilde *Kribbella* cinsini tanımlamıştır (Park ve diğ., 1999). Bu iki yeni türü kapsayan cinsin ayırt edilmesi için; dokuz izopren üniteli tetrahidrogenatlı menakinon içermesi, peptit alt ünitelerinin ilk pozisyonunda L-alanin bulundurması, fosfolipit kompozisyonları ve 16S rRNA temelli filogenetik analizler gibi yegane kemotaksonomik markörleri önerilmiştir. Birçok ortak morfolojik ve kemotaksonomik özelliği paylaşmasından dolayı bu türlerin taksonomik pozisyonları yeniden belirlenmiş ve tanımlamaları *Kribbella* cinsi içerisinde yapılmıştır (Sohn ve diğ., 2003).

*Kribbella* cinsinin oluşturulmasında kullanılan iki türün sekans analizleri yapıldığında; *Hongia* cinsinde yer alan *Hongia koreensis* türünün 16S rRNA sekansının bu iki türle yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Hongia koreensis*, *K. flavida* ve *K. sandramycine* sırasıyla % 98.37 ve 98.57 benzerlik gösterdiği görülmüştür (Sohn ve diğ., 2003). Yüksek 16S rRNA sekans benzerliği gösteren bu üç türün DNA-DNA homoloji çalışmalarının yapılması sonucunda *Hongia koreensis*'in *Kribbella* cinsine yerleştirilmesi kabul görmüştür (Sohn ve diğ., 2003).

20 türü bünyesinde bulunduran cins, Gram pozitif, aerobik, asit-alkol dirençsiz, hareketsiz, substrat miselyumları son derece dallanmış ve hava miselyumları kısa çubuk veya kokoid elementler şeklindedir. *Kribbella* türleri, peptidoglikanında LL-diaminopimelik asit (meso-A<sub>2</sub>pm) (hücre duvar kemotip I, Lechevalier ve Lechevalier, 1970), anteiso ve iso dallanmış ağır asitler, polar lipidlerden difosfatidilgiserol, fosfatidilkolin, fosfatidilgiserol, fosfatidilinositol ve predominant menakinon olarak 9 (H4) izopren birimli bir heksohidrogenatlı menakinon içermek gibi ortak kemotaksonomik özelliklere sahiptirler. DNA' nın G+C oranı % 64-72 mol' dür (Song ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2006; Trujillo ve diğ., 2006; Kirby ve diğ., 2006; Carlsohn ve diğ., 2007; Everest ve Meyers, 2008; Urzi ve diğ., 2008).

Suşların coğrafik dağılımı Kore, Çin, Güney Afrika, Yunanistan, İtalya ve İspanya gibi farklı lokalitelerde yaygın olarak bulunmakta ve çoğunlukla izolasyonlar topraktan yapılması ile beraber bitkilerle ilişkili (*Kribbella solani*, *K. lupini* ve *K.endophytica*) olanları da bulunmaktadır (Kaewkla ve Franco, 2013; Song ve diğ., 2004; Trujillo ve diğ., 2006). Son dönemde izole edilen altı türün üç tanesi

topraktan izole edilmiştir. *Kribbella aluminosa* Almanya'daki ortaçağa ait maden ocağından ve *Kribbella hippodromi* Güney Afrika'da yarış alanı toprağından *Kribbella shirazensis* İran toprağından izole edilmiştir (Carlsohn ve diğ., 2007; Everest ve Meyers, 2008; Mohammadipanah ve diğ., 2013). *Kribbella catacumbae*, *K. sancticallisti* ve *K. albertanoniae* İtalya Roma'da bulunan St. Callistus yer altı mezarının hasar görmüş (kötüleşmiş) yüzeyinden izole edilmiştir (Urzi ve diğ., 2008; Everest ve diğ., 2013).

#### 2.1.5 *Micromonospora* cinsinin sistematığı, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalemler:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Alt sınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Micromonosporineae* (Stackebrandt ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familiya:** *Micromonosporaceae* (Krasil'nikov, 1938) (Zhi ve diğ., 2009)

**Cins:** *Micromonospora* (Ørskov, 1923)

İlk kez Krasil'nikov tarafından 1938 yılında tanımlanmış *Micromonosporineae* alt takımı yalnızca *Micromonosporaceae* familyasını içermekte olup günümüze kadar 1990, 1997, 2009 yıllarında toplam üç kez revizyondan geçmiştir (Goodfellow ve diğ., 1990; Stackebrandt ve diğ., 1997; Zhi ve diğ., 2009). *Micromonosporaceae* familyası ile ilgili Zhi ve diğerlerinin 2009 yılında 16S rRNA analizlerine göre gerçekleştirdiği çalışma incelendiğinde, bu familyanın tip cinsi olan *Micromonospora*'nın da içinde bulunduğu 17 cinsi içerdiği ve bu on yedi cinsten *Actinocatenispora* (Thawai ve diğ., 2006), *Asanoa* (Lee ve Hah, 2002), *Longispora* (Matsumoto ve diğ., 2003), *Polymorphospora* (Tamura ve diğ., 2006), *Planosporangium* (Wiese ve diğ., 2008), *Pseudosporangium* (Ara ve diğ., 2008a), *Salinispora* (Maldonado ve diğ., 2005), *Verrucosispora* (Rheims ve diğ., 1998) ve *Virgisporangium* (Tamura ve diğ., 2001)'la beraber toplam sekiz tanesinin 2000'li yıllarda literatüre kazandırıldığı görülmektedir.

1923 yılında Ørskov'un yayınladığı makalede ıslıl küf olarak kastettiği mikroorganizmaların, bugün *Micromonospora* adıyla anılan aktinomiset grubu bakteriler olduğu bilinmektedir. Küçük tek sporlu organizma anlamına gelen

*Micromonospora* adı ile anılan bu cins bundan yaklaşık yarım yüzyıl sonra 1980 yılında onaylanmış ve International Journal of Systematic Bacteriology (yeni ismi International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) dergisinde yayınlanmıştır. Cins günümüze kadar 57 tür ve 7 alt türü bünyesinde barındırmaktadır ([www.bacterio.cict.fr/m/micromonospora.html](http://www.bacterio.cict.fr/m/micromonospora.html), Kasım 2013).

Cinsin tip türü olan *Micromonospora chalcea* 'ya Ørskov'un 1923'de yaptığı çalışmadan önce 1905 yılında Foulerton tarafından "*Streptothrix chalcea*", "*Nocardia chalcea*" ve "*Micromonospora chalcease*" olmak üzere üç farklı isim verilmiştir (Luedemann, 1971).

Lee ve diğerlerinin 1999'da yaptıkları çalışmayla *Catellatospora matsumotoense* *Micromonospora* cinsine transfer edilmiş ve ismi *M. matsumotoense* olarak değiştirilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma *Micromonospora* cinsinin revizyonundaki ilk basamak olmuştur ve hemen bir yıl sonra, Kasai ve diğerlerinin *gyrB* gen bölgesini kullanarak yaptıkları filogenetik çalışma, cinsin taksonomik düzenlenmesinde çığır açmıştır. 16S rRNA gen bölgesine dayalı filogenetik analizlerin cinsteki türlerin tanımlamasında istenilen sonucu vermemesi, % 99 ve üzerinde oldukça yüksek 16S rRNA gen bölgesi benzerliğine rağmen DDH çalışmalarında % 50'nin altında hibridizasyon değerlerinin elde edilmesi yeni moleküler markör arayışını gündeme getirmiştir. Kasai ve diğerlerinin *Micromonospora* cinsine ait on beş tür, dört alt türle gerçekleştirdikleri çalışma sonucunda; *gyrB* gen bölgesinin cinsin filogenetik analizlerinde kullanılabilir, oldukça iyi ayırım sağlayan, uygun bir markör olduğu, sonuçların DDH çalışmasını desteklediği belirtilmiş ve bu bakış açısıyla cins toplamda on dört tür olacak şekilde yeniden düzenlemiştir.

Neticede Kasai ve diğerlerinin 2000'deki çalışmasına göre *Micromonospora* cinsi yeniden sınıflandırılmış, alt türlerin bir kısmı birleştirilmiş, bir kısmı ise yeni tür olarak sınıflandırılmıştır. *gyrB* gen bölgesinin temel alınarak cinsin revizyonunun yapıldığı bu çalışma sonucunda; cinsin sınırları *Micromonospora aurantiaca* (Sveshnikova ve diğ., 1969), *M. carbonacea* (Luedemann ve Brodsky, 1965), *M. chalcea* (Ørskov, 1923), *M. chersina* (Tomita ve diğ., 1992), *M. coerulea* (Jensen, 1932), *M. echinospora* (Luedemann ve Brodsky, 1964), *M. gallica* (Waksman, 1961), *M. halophytica* (Weinstein ve diğ., 1968), *M. inositola* (Kawamoto ve diğ.,

1974), *M. nigra* (Weinstein ve diğ., 1968), *M. olivasterospora* (Kawamoto ve diğ., 1983), *M. pallida* (Luedemann ve Brodsky, 1964), *M. purpureochromogenes* (Luedemann, 1971), *M. rosaria* (Horan ve Brodsky, 1986) olmak üzere toplam on dört türle çizilmiştir.

*Micromonospora* cinsi gram pozitif, aerobik ve % G+C oranı yüksek bakterilerden oluşmaktadır. Peptidoglikanında mezo-diaminopimelik asit ve N-glikolil muramik asit, fosfolipit tip II ve hücresel ağır asitlerden tip 3b'yi bünyesinde bulundurmaktadır (Lechevalier ve Lechevalier, 1970, 1977; Kroppenstedt, 1985). *Micromonospora*'lar Kemotip II hücre duvarına sahiptir ve tüm organizma şeker örneği Lechevalier ve Lechevalier'in 1970'teki çalışmasında belirtildiği gibi D tipindedir. Karakteristik hücre duvar polisakkariti arabinoz ve ksiloz'dur (Lechevalier ve Lechevalier, 1970).

*Micromonospora* cinsini üyeleri mezofilik organizmalardır. Bu nedenle yüksek sıcaklık ve kurumaya karşı son derece hassastırlar (Takahashi ve Omura, 2003).

*Micromonospora* türlerinde sporlar substrat miselyumunda oluşur, hava miselyumu oluşturmazlar. Nadiren hava miselleri oluşsa bile bu miseller sterilidir. *Micromonosporaceae* familyasındaki diğer cinsler gibi bu cinsin üyeleri de benzer mikroskopik hücre morfolojisine sahiptir. Bunlar 0,25-1,5µm çapında dallanmış, bölmeli hifler oluşturur ve koloniler beyaz, turuncu, gül kurusu veya kahverengi renkte olabilirken, besiyerine çözünür pigment salgılayanların da mevcut olduğu bilinmektedir (Hirsch ve Valdés, 2010). Genellikle genç koloniler soluk sarı, açık turuncu gibi renklerde iken yaşlı kolonilerin rengi koyulaşmakta ve koyu turuncu, kırmızı, kahverengi hatta siyah renge dönebilmektedir (Vobis, 2006).

*Micromonospora* cinsi üyelerinin *Micromonosporaceae* familyasındaki diğer bazı cinslerin üyeleri ile mikroskopik hücre morfolojileri bakımından oldukça yüksek oranda benzerlik göstermesi nedeniyle, bu türlerin morfolojik temelli tanımlamaları kolay olmamaktadır. Bu sebeple tür düzeyinde tanımlama yapabilmek için sıklıkla 16S rRNA yada *gryB* gen bölgesi (DNA topoizomerazı kodlayan gen bölgesi) dizi analizleri kullanılmaktadır (Koch ve diğ., 1996; Kasai ve diğ., 2000a). *Micromonospora* cinsine ait türler arası farklılıkları göstermek için *gryB* gen bölgesini kullanmak, 16S rRNA gen bölgesini kullanmaktan daha avantajlı olduğu

kanısı hakimdir. İlgili gen bölgesi, rRNA gen bölgesinden daha az korunduğu için daha fazla değişikliğe uğramıştır ve bu cinsin üyeleri arasındaki farklılığı daha iyi yansıttığı düşünülmektedir (de Menezes ve diğ., 2008).

*Micromonospora* üyeleri özellikle humusça zengin topraklarda yayılış göstermekte ve sahip olduğu hidrolitik enzimler sayesinde organik madde döngüsünde önemli rol oynamaktadır (Songsumanus ve diğ., 2013; Gurovic ve diğ., 2013; Ren ve diğ., 2013). Sahip olduğu hidrolitik enzimlerle selüloz, kitin, lignin ve diğer kompleks polisakkaritleri parçalayabilmektedir (Erikson, 1941; Wilson, 1992; Gacto ve diğ., 2000; de Menezes ve diğ., 2008). Toprak verimliliğini arttıran ve bitki gelişimine katkı sağlayan bu tip mikroorganizmalar, "biyogübreler" olarak adlandırılmakla birlikte tarımda da mikrobiyal aşı materyallerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Çoğu aktinomisetle olduğu gibi *Micromonospora* türleri de bitki sağlığını arttıran ve yüksek verim alınmasına katkı sağlayan maddeleri (Ör. Vitaminler ve bitki hormonları gibi) ürettiğinden dolayı toprakta "fitostimulatör" veya bitki büyüme promotorları olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda *Micromonospora* türleri, bitki köklerinde endofitik olarak ürettikleri antibiyotik ve antifungal ajanlarla bitki köklerinde hastalığa sebep olan toprak kaynaklı pek çok bitki patojenine karşı savaşır ve bitki gelişimini destekledikleri için biyokontrol ajanı olarak da kullanılmaktadırlar (El-Tarabily ve diğ., 1996a, 1996b; El-Tarabily ve Sivasithamparam, 2006; Kurtböke, 2000; Kurtböke ve diğ., 2007). *Micromonospora* türleri; havuç, buğday, çin lahanası ve salatalık gibi bitkileri koruma amaçlı biyokontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (El-Tarabily ve diğ., 1997; Coombs ve Franco, 2003; Lee ve diğ., 2008; El-Tarabily ve diğ., 2009). *Micromonospora* ve diğer endofitik aktinomisetler üzerinde 2008 yılında Conn ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada çoğu *Micromonospora* türünün birçok patojen organizmanın gelişmesini baskılayan genlere sahip olan oldukça etkili bir biyokontrol ajanı olduğunu belirtmişlerdir.

*Micromonospora* cinsinin üyeleri doğada sahil, göl ve deniz diplerindeki sedimentler, bitki rizosferi, turba bataklık toprakları ve hatta Antartika kıtası gibi birbirinden tamamen farklı topraklarda oldukça geniş şekilde yayılış göstermektedir (Erikson, 1941; Hirsch ve diğ., 2004; Merzaeva ve Shirokikh, 2006; Maldonado ve diğ., 2009; Mincer ve diğ., 2002; Nimaichand ve diğ., 2013; Supong ve diğ., 2013; Takahashi ve Omura, 2003; Tanasupawat ve diğ., 2010; Zhao ve diğ., 2004).

Toprak dışında yayılış gösteren *Micromonospora* cinsi üyeleri, deniz ve göl sularında, böceklerin bağırsaklarında ve özellikle bitkilerin kök sistemleri gibi ortamlarda tespit edilmiş olup sentezledikleri antibiyotik ve antifungal gibi sekonder metabolitler ile bu ortamlardaki bitki patojenleriyle rekabet halindedir. Bazı *Micromonospora* türlerinin bitkilerin iç dokularına yerleşerek endofitik faaliyet gösterdiği rapor edilmiştir. *Micromonospora* cinsi bakteriler pirinç, buğday gibi kültürü yapılan bitkilerin kökünden, azot fiksasyonunun gerçekleştiği ağaç ve çalı formunda bulunan *Casuarina equisetifolia* (Demir ağacı), *Coriaria myrtifolia* (Kır sumağı) gibi bitkilerin ve yine kültürü yapılan *Pisum sativum* (Bezelye) ve *Lupinus angustifolius* (Acı bakla) gibi legüm bitkilerinin kök nodüllerinden izole edilmiştir (Takahashi ve Omura, 2003; Tian ve diğ., 2007; Combs ve Franco, 2003; Valdés ve diğ., 2005; Trujillo ve diğ., 2006, 2010; Garcia ve diğ., 2010).

*Micromonospora* cinsinin üyeleri deniz suyunda, derin deniz sedimentlerinde ve sahil bölgelerinde baskındır (Fernandez-Chimeno ve diğ., 2000; Stach ve diğ., 2003; Zhao ve diğ., 2004; Jiao ve diğ., 2008). Bu ortamlarda baskın olan türlere örnek olarak *Micromonospora marina* verilebilir. *Micromonospora* üyeleri deniz tuzunu iyi tolere edebildiklerinden dolayı deniz suyuyla hazırlanan besiyerinde de iyi üreyebilmektedir. Topraktan yapılan izolasyonlarda görülen durumun aksine sediment izolasyonlarında 20 cm derinlikte *Micromonospora* sayısı iki katına çıktığı, *Streptomyces* sayısının ise önemli oranda azaldığı bilinmektedir (Vobis, 2006). *Micromonospora* cinsi üyelerinin sporları hidrofilik ve ıslanabilir olduğu için çeşitli su ekosistemlerinde suyun akışıyla birlikte topraktan kolayca ayrılır. Son yıllarda aktinomiset izolasyonlarında karasal ekosistemlerden çok deniz ekosistemleri tercih edilmektedir. Gezegenimizin %70'inin su ile kaplı olduğunu ve daha önce bu ekosistemlerin yeterince çalışmadığı düşünüldüğünde, deniz ekosistemlerden daha önce keşfedilmemiş organizma ve dolayısıyla sekonder metabolit izole etme oranı karasal ekosistemlerden yapılan izolasyonlara göre çok daha fazla olacaktır (Vobis, 2006; Ward ve Bora, 2006; Tanasupawat ve diğ., 2010).

#### **2.1.6 Nocardia cinsinin sistematigi, tarihçesi ve genel özellikleri**

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Alt sınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Corynebacterineae* (Stackebrandt ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familiya:** *Nocardiaceae* (Castellani ve Chalmers, 1919) (Zhi ve diğ., 2009)

**Cins:** *Nocardia* (Trevisan, 1889)

Günümüzde *Nocardia* cinsi başta kemotaksonomik özellikler kullanılarak tanımlanmaktadır (Goodfellow ve Lechevalier, 1989; Goodfellow, 1992). Goodfellow "*Nocardia* ve ilişkili Cinsler" adlı yayınında *Nocardia* cinsine ait kemotaksonomik özellikleri belirtmiştir.

1889 yılında Trevisan; Fransız bir veteriner olan Edmond Nocard'ın ismine atfen *Nocardia* ismi ile anılan bu cinsin *N. actinomyces* ve Harz'ın teşhis ettiği *Actinomyces bovis* dahil olmak üzere 5 tür içerdiğini açıklamıştır. Ancak *Actinomyces bovis* anaerobik bir türdür ve zorunlu aerobik bir tür olan *N. farcinica* ile birlikte sınıflandırılmış olması birçok araştırmacıyı herhangi bir çelişkiye düşürmemiştir (Buchanan, 1918; Orskov, 1923; Jensen, 1931). Fakat diğer araştırmacılardan farklı olarak Wright anaerobik patojenik aktinomisetlerin, hava miselyumu ve spor üreten aerobik aktinomisetlerden (*Nocardia*+*Streptomyces*) olan *Nocardia* cinsinden ayrılıp *Actinomyces* cinsi içinde sınıflandırılması gerektiğini önermiştir.

1891'de Eppinger tarafından beyin apsесinden izole edilen ve aerobik, gram pozitif, asit-alkol dirençli bir organizma olan *Cladothrix asteroides* olarak adlandırdığı organizma, 1896 yılında, Blanchard tarafından *N. asteroides* olarak yeniden adlandırılmıştır. Yine Brezilyalı bir hastanın bacağından izole edilen ve Lindenberg tarafından *Discomyces brasiliensis* olarak adlandırılan organizma daha sonra Pinoy tarafından *N. brasiliensis* olarak yeniden adlandırılmıştır. 1891'de Rossi-Doria'nın *Streptothrix carnea* adını verdiği toprak organizmasını, Castellani ve Chalmers *N. carnea* olarak yeniden adlandırmışlardır.

*Nocardia* cinsinin uzun ve karışık taksonomi tarihi Lechevalier tarafından ana hatlarıyla açıklanmıştır. Waksman (1961)'in çalışmasıyla, *Nocardia*'nın heterojenitesinin altını çizen modern taksonomik tekniklerin kullanımı, cinsin

sınıflandırılmasında gelişmelere ve gelecek çalışmalar için sağlam bir temel oluşturmuştur (Tsukamura, 1969, 1977; Bradley ve Mordarski, 1976; Mordarski ve diğ., 1978; Goodfellow ve Minnikin, 1978; Orchard ve Goodfellow, 1980; Goodfellow ve diğ., 1982).

Nümerik çalışmalar neticesinde *Nocardia* cinsinin aerobik nocardioform aktinomisetlerin oldukça geniş heterojen bir grubu olduğu dikkat çekicidir. McClung (1974) 31 *Nocardia* türünü tanımlayıp listeleyerek Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'nin 8. baskısında durumla ilgili düşüncelerini açıklamıştır. McClung, cins üyelerini misel gelişimi derecesine göre 3 morfolojik gruba ayırmakla beraber; bazı kültürlerin genç kolonilerin mikroskopik mikromorfolojileri ve kültürel özelliklerindeki ağırlıklarından dolayı eşit geçerlilikle *Corynebacterium*, *Mycobacterium* ya da *Nocardia* cinslerine yerleştirilebileceğine de dikkat çekmiştir.

Hücre duvarı majör şeker ve aminoasit kompozisyonu ile peptidoglikan yapısının saptanması aktinomiset sistematığının yeniden gözden geçirilmesine ve çeşitli duvar kemotipleri ve peptidoglikan tiplerine göre taksonların belirlenmesini sağlamıştır (Lechevalier ve Lechevalier, 1970; Schleifer ve Kandler, 1972). Ayrıca, hücre duvarında nitel duvar kompozisyon analizleri *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia* arasındaki yakın ilişki için anlamlı ve açık bir delil sağlamıştır (Cummins ve Harris, 1956, 1958). Bu organizmaların tümü büyük miktarda mezo-diaminopimelik asit (meso-A2pm), arabinoz ve galaktoz içermekte; Kemotip-IV hücre duvarı ve A1<sup>γ</sup> peptidoglikan tipine sahiptir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970; Schleifer ve Kandler, 1972). Bu taksonlar arasındaki yakın ilişki, onların mikolik asit yani yüksek moleküler ağırlıklı 2-alkil-3-hidroksi dallanmış zincirli yağ asitlerini içerdiklerinin keşfedilmesi ile daha ileri düzey kazanmıştır. Mikolik asit içeren aktinomisetler "Mycolata" olarak adlandırılmakta ve çoğunlukla, Mycolata grubu üyesi organizmaların hücre zarflarında esterlenmiş mikolik asitlere bağlanan peptidoglikan-arabinogalakattan hücre duvarı iskeletleri yapıyı oluşturmaktadır (Chun ve diğ., 1996).

*Nocardia*'lar dallanmış filamentlileri bir arada bulunduran, aerobik, katalaz pozitif, hareketsiz, Gram boyamada gram pozitif sonuç veren ve tipik olarak da büyüme devrinin bazı safhalarında asit-alkol dirençli mikroorganizmalardır

(Goodfellow ve Cross, 1984). *Nocardia* cinsi üyeleri 0,5-1,2 µm çapında, besi yeri yüzeyinde veya derinliklerinde genişçe dallanarak vejetatif hiflerle büyümektedirler. Genelde koloniler sert, kolayca kırılan bir yoğunluğa, çok iyi bir biçimde kıvrımlı bir yüzey ile kıvrımlı bir görünüme sahiptir. Bazen koloninin gerçek rengini maskeleyen bir hava miselyumu ya da sekonder miselyum tarafından çevrelenmektedir (Goodfellow ve diğ., 1999).

Oksidatif tipte karbonhidrat metabolizmasına sahip kemoorganotropik organizmalardır. *Nocardia* hücre duvarı A1<sup>γ</sup> tipinde mezo-diaminopimelik asit içeren peptidoglikana sahiptir. *Nocardia* cinsinin hücre duvarı mikolik asit bulundurmaktadır. *Nocardia*'ların hücre duvar tipi Kemotip IV A'dır ve karakteristik hücre duvar polisakkariti olarak arabinoz ve galaktoz içermektedir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970). DNA'nın G+C oranı % 64-72 mol' dür.

Aktinomiset sistematğinde değerli olduğu gösterilen diğer kimyasal belirleyiciler hücresel yağ asitleri, izoprenoid quinonlar ve polar lipit analizlerinden belirlenmiştir (Lechevalier ve diğ., 1977; Minnikin ve Goodfellow, 1980; Kroppenstedt, 1985; Baba ve diğ., 1997). Mikolik asit içeren aktinomisetlerin, özellikle *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia*'nın sahip olduğu mikolik asitlerin yapısı ve tüm boyutundaki farklılıklarla, hücresel yağ asitleri, menaquinon ve polar lipit kompozisyonu ile tanımlanıp ayırt edilebildiği sonradan ortaya çıkarılmıştır (Cross ve Goodfellow, 1973; Goodfellow ve Minnikin, 1977, 1981a, b, 1984; Keddie ve Cure, 1977; Minnikin ve diğ., 1978; Baba ve diğ., 1997). Yeni *Nocardia* türlerinin durumunu belirlemek için ilave karşılaştırmalı çalışmalara gereksinim duyulmuştur. Bu sebeple 1990'da Yano ve diğ., DNA:DNA benzerliği, mikolik asit ve nümerik taksonomi verilerini kullanarak *N. nova*'yı *N. asteroides* ve *N. farcinica*'dan ayırmıştır.

Gen dizileme çalışmalarının laboratuarlarda rutin kullanıma girmesiyle *Nocardia asteroides* olarak tanımlanan pek çok klinik *Nocardia* izolatının aslında farklı *Nocardia* türleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak *Nocardia asteroides* (ATCC 19247T) "sensu stricto" yani gen dizilimi ile tanımlanan tip örneğinin, aslında önemli bir insan patojeni olmadığı düşünülmektedir (Conville ve Witebsky, 2010).

*Nocardia* türleri doğada oldukça yaygındır ve toprakta bol miktarda bulunurlar. Bazı suşlar insan ve hayvanlar için fırsatçı patojendir (Gürtler ve diğ., 2001; Jannat-Khah ve diğ., 2010; Moser ve diğ., 2011). Kan emici arthropodlarla mutualistik birliktelik oluşturdıkları gibi su ve pis su boruları ile doğal kauçuk birleşim yerlerinde biyolojik bozulmalarda da rol almaktadırlar (Hutchinson ve diğ., 1977; Orchard, 1981; Maldonado ve diğ., 2000). *N. amarae* ve *N. otitidiscaviarum* popülasyonları aktif çamur kirli su arıtım tesislerinde havalandırma tanklarının yüzeylerindeki köpük içerisinde bulunmuştur (Cross, 1981; Goodfellow ve diğ., 1996; Lechevalier ve Lechevalier, 1974; Lemmer ve Kroppenstedt, 1984; Pagilla ve diğ., 1998; Sezgin ve diğ., 1988; Soddell ve Seviour, 1990).

Denizel habitatlarda da *Nocardia* türlerine rastlanmıştır (Peela ve diğ., 2005; Bredholdt ve diğ., 2007; El-Gendy ve diğ., 2008). Derin denizlerde ve deniz sedimentlerinde yapılan çalışmalar sanıldığından çok daha fazla aktinomiset çeşitliliğinin olduğunu göstermiştir (Kokare ve diğ., 2004). Zhang ve diğerlerinin (2008) Çin’de yaptıkları çalışmada *N. abscessus*, *N. shimofusensis* ve *N. asteroides* türlerini deniz süngerinden izole etmeyi başarmışlardır.

*Nocardia*’nın doğal habitatı topraktır ve pH 6,8-7,2 arası optimum büyüme göstermektedirler. Bunun dışında asidik ve bazik topraklardan da *Nocardia* izolasyonu gerçekleşmiştir. *Nocardia jiangxiensis* ve *Nocardia miyunensis* asidik topraktan, *N. neocaledoniensis* ise ultrabazik yüksek miktarda magnezyum içeren topraktan, yine topraktan izole edilen *Nocardia goodfellowii* ve *Nocardia thraciensis* yeni *Nocardia* türleri olarak literatüre kazandırılmışlardır (Cui ve diğ., 2005; Saintpierre- Bonaccio ve diğ., 2004; Sazak ve diğ., 2012; Yamamura ve diğ., 2005).

*Nocardia* mezofilik aktinomisetlerden olmakla birlikte Takahashi ve Omura, 2003 yılında yayınladıkları çalışmada çöl kumundan 50 °C’de gelişebilen *Nocardia* suşunu izole etmeyi başardıklarını bildirmişlerdir. Bunu takiben 2006 yılında Seo ve Lee deniz kumundan yeni bir *Nocardia* türü izole etmiş ve *Nocardia harenae* olarak literatüre kazandırmışlardır. Kampf ve diğerleri ise 2012 yılında Karayip Deniz kumundan *Nocardi agrenadensis* türünü izole etmiştir.

*Nocardia* cinsi genellikle yaz aylarında arıtım tanklarında köpürmeye sebep olan bir bakteridir ve *N. pinensis* ile *N. takadensis* aktif çamur’dan izole edilerek literatüre kazandırılmış türlerdir (Blackall ve diğ., 1989; Yamamura ve diğ., 2005).

Genellikle karanlık, organik madde açısından fakir ve sıcaklık açısından nispeten stabil özellik gösteren yaşam ortamları olarak tanımlanan mağaralarda yaşayan aktinomiset cinslerinden biri de *Nocardia* cinsidir. *N. jejuensis*, *N. speluncae* ve *N. altamirensis* gibi *Nocardia* türleri çeşitli mağaralardan izole edilip literatüre kazandırılmışlardır (Lee, 2006; Seo ve diğ., 2007; Jurado ve diğ., 2008).

Sekonder aktif metabolit üretimi yönünden zengin *Nocardia* türlerine örnek olarak 2009 yılında literatüre kazandırılmış, amicoumacin B üreten *N. jinnensis* ve nitrik oksit sentetaz enziminin zengin *N. iowensis* türleri verilebilir (Lamm ve diğ., 2009; Sun ve diğ., 2009)

2010 yılında Kaewkla ve Franco, ananas ağacının kökünde patojen organizmalarla antagonistik ilişki içinde olan *Nocardia callitridis* türünü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Böylece endofitik önemi olan yeni bir aktinomiset türü literatüre eklenmiştir. 2011 yılında Zhao ve diğerleri *Artemisia annua* bitkisinin gövdesinden endofitik *Nocardia artemisiae* türünü, Xing ve diğerleri *Jatropha curcas* bitkisinin yağlı tohumundan endofitik *Nocardia endophytica* türünü izole etmiştir.

*Nocardia* cinsi günümüzde sistematikte geçerli olarak tanımlanmış 101 türü bünyesinde barındırmaktadır ([www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html](http://www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html) Kasım 2013).

Yapılan çeşitli çalışmalarda *Nocardia* cinsi üyelerinin antibiyotik üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Patojen bir organizma olan *Vibrio damsela* türünü gelişimini inhibe etme potansiyeline sahip türler üzerine yapılan bir çalışmada, 16 aktinomiset üyesi suş içerisinde *Nocardia brasiliensis* türünün en geniş inhibisyon zonunu oluşturduğu tespit edilmiştir (El-sersy ve Abou-Elela, 2006). *Nocardia brasiliensis* türü üzerine yapılan çalışmalarda bu organizmanın bir indol alkaloid olan brasilikardin A ile brasiliquinon A, B, C29 olarak adlandırılan sitotoksin antifungal ve antibakteriyel antibiyotikleri sentezlediği tespit edilmiştir. Bunun yanında *Nocardia transvalensis* IFM 10065 türünden çinko kompleksli bir antibiyotik olan Transvalensis A'yı sentezlediği rapor edilmiştir (Hoshino, 2004).

### 2.1.7 *Nonomuraea* cinsinin sistematiki, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Altsınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alttakım:** *Streptosporangineae* (Ward-Rainey ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familiya:** *Streptosporangiaceae* (Goodfellow ve diğ., 1990) (Zhi ve diğ., 2009)

**Cins:** *Nonomuraea* (Zhang ve diğ., 1998)

*Nonomuraea* cinsi Zhang ve diğerleri tarafından 1998 yılında önerilmiştir ve *Streptosporangiaceae* familyasının bir üyesidir. Bu takson *Microtetraspora pusilla* olarak tanımlanan türün yeniden tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır (Fischer ve diğ., 1983; Poschner ve diğ., 1985; Goodfellow ve diğ., 1988; Kroppenstedt ve diğ., 1990). *Nonomuraea* cinsi üyeleri aerobik, Gram-pozitif, non-asit-fast, aşırı dallanmış substrat ve hava miselyumlarına sahip hareketsiz aktinomisetlerdir. Hava hifleri çengel, spiral yada katlanmış, düzensiz, pürüzsüz ve değişen yüzey görünümüne sahip uzun spor zincirleri şeklinde farklılaşabilir. Gelişim sıcaklık aralığı 20-45 °C'dir ve bazı suşlar 55 °C'de gelişmektedir. Hücre duvarları meso-A2pm içerir ve maduroz tüm organizmalardaki hidrolizatlarda mevcuttur. Baskın menakinonlar MK-9 (H<sub>0</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>)'dur (Ara ve diğ., 2007a, b; Camas ve diğ., 2013; Cao ve diğ., 2012; Chiba ve diğ., 1999; Kañmpfer ve diğ., 2005, 2010; Le Roes ve Meyers, 2008; Li ve diğ., 2011, 2012; Nakaew ve diğ., 2012; Qin ve diğ., 2009; Stackebrandt ve diğ., 2001; Wang ve diğ., 2011; Zhang ve diğ., 1998; Zhao ve diğ., 2011). Fosfolipid şekilleri glukozamin içeren fosfotidiletanolamin, fosfotidilmetiletanolamin, difosfotidilgliserol ve fosfotidilinositol gibi lipidler ile karakterize edilmiştir (Lechevalier ve diğ., 1977) ve baskın yağ asitleri 10- methyl-17- ve iso-16-dallanmış bileşikleridir (Kroppenstedt, 1985). DNA'nın G+C içeriği 64-69 mol%'dür. Tip türü; Zhang ve diğerleri tarafından 1998 yılında tanımlanan *Nonomuraea pusilla* türüdür. Tip suşu; ATCC 27296<sup>T</sup>=DSM 43357<sup>T</sup>.

*Nonomuraea* cinsi tanımlanmış 34 tür ve 2 alttür içermektedir (<http://www.bacterio.net/nonomuraea.html> Kasım-2013).

*Streptosporangiaceae* familyasının üyeleri genellikle toprak ile ilişkilidir, fakat bu ortamdaki rolleri hakkında çok az şey bilinir. Bunun yanında seçici izolasyon prosedürlerindeki gelişmeler doğal habitatlarındaki aktinomiset taksonlarının varoluşları, dağılımları, sayıları ve aktiviteleri hakkında yeni bilgiler sunmaktadır (Suzuki ve diğ., 2001a, 2001b). Bu familyanın üyelerinin topraktaki bitki materyallerinin ilk ayrışmasında rol aldığı muhtemeldir.

*Nonomuraea* cinsinin türlerinin çoğunun kökeni topraktır (Nonomura ve Ohara, 1971c; Meyer, 1979; Galatenko ve diğ., 1981).

*Nonomuraea* suşları hava hifleri üzerinde yalancı kesecikler ve spor zincirleri oluşturabilmeleriyle aynı familyadaki cinslerin üyelerinden ayırt edilir. Bu cinsi oluşturan türler spor zincir morfolojileri, spor duvar şekilleri, olgun sporlanmış hava miselyumlarının rengi ve substrat miselyumlarının pigmentasyonu vasıtasıyla ayırt edilebilir . Fakat bu türlerin çoğunun tanımlanması zordur. Çünkü yalnızca bir suş ya da birkaç suş örneklenmiş durumdadır. Hatta bazı suşlar çalışıldığında biyokimyasal ve fizyolojik testlerin sonuçları literatür verileri ile kıyaslandığı zaman bunların literatürdeki veriler ile tutarlı ya da tutarsız olabileceğini ispatlamıştır. Fakat nümerik taksonomi verileri takson içinde tanımlanan türlerin çoğunun yerinin doğru olduğunu göstermiştir (Goodfellow ve diğ., 1979; Goodfellow ve Pirouz, 1982).

*Nonomuraea* ATCC 39727 suşundaki glikopeptid antibiyotiğinin biyosentezini kodlayan gen kümesi 2003 yılında Sosio ve diğerleri tarafından izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Glikopeptidlerin teikoplanin ailesinin bir üyesi olan bu glikopeptid Sosio ve diğerleri tarafından deklorommannozil-A40926 aglikanını yeni bir bileşik olarak izole edilmiştir.

*Streptosporangiaceae* familyasının üyelerinin zengin bir ticari ürün, kayda değer bir antibiyotik ve enzim üreticisi olduğu düşünülmektedir. *N. roseoviolacea*, carminomicin (Nakagawa ve diğ., 1983; Nakagawa ve diğ., 1989); *N. rubra*, maduromycin (Fleck ve diğ., 1978), *N. pusilla*, actinotiocin (Tamura ve diğ., 1973) ve *N. spiralis*, pyralomicin (Naganawa ve diğ., 2002) gibi antibiyotikleri sentezlemektedir.

### 2.1.8 *Rhodococcus* cinsinin sistematığı, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Altsınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Corynebacterineae* (Stackebrandt ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familiya:** *Nocardiaceae* (Castellani ve Chalmers, 1919) (Zhi ve diğ., 2009)

**Cins:** *Rhodococcus* (Zopf, 1891)

İlk olarak Zopf (1891) tarafından kullanılan '*Rhodococcus*' cins ismi 1977'de *Nocardia*, *Corynebacterium* ve *Mycobacterium* üyelerine benzeyen ancak bu cinslerden birine dâhil edilmeyen birçok suşu içeren '*rhodochrous*' kompleksine yerleştirilerek tekrar tanımlanmıştır (Goodfellow ve Alderson, 1977). Rodokoklar aerobik, Gram-pozitif, hareketsiz, mikolat içeren, nokardioform aktinomisetler olarak tanımlanmaktadır. 'Nokardioform' terimi morfolojik olarak tanımlayıcı olup çubuk veya küre biçimli elementlere ayrılan miselli gelişimi ifade etmektedir (Lechevalier, 1989; Bell ve diğ., 1998).

*Rhodococcus* cinsi içerisinde konumu belirsiz olan dört türle birlikte toplam 20 tür listeleyen Bergey'in Sistemik Bakteriyoloji Kılavuzunun yayımlanmasından itibaren cinsin sınıflandırılmasında önemli değişiklikler yapılmıştır. Bazı türler birleştirilmiş, tanımlanmış olan başka cinslere aktarılmış veya yeni cinsler içerisinde sınıflandırılmıştır. *Rhodococcus obuensis* türünün *R. sputi* ile sinonim olduğu belirtilmiştir (Zakrzewska-Czerwinska ve diğ., 1988). Daha önce *Rhodococcus* cinsi içerisinde tanımlanan *R. auranticus* *Tsukamurella* cinsine yerleştirilirken *R. bronchialis*, *R. rubropertinctus*, *R. sputi* ve *R. terrae* *Gordona* cinsine aktararak iki yeni cins tanımlanmıştır (Collins ve diğ., 1988; Stackebrandt ve diğ., 1988). Daha sonra *R. chlorophenolicus* türü *Mycobacterium* cinsine dahil edilmiş (Briglia ve diğ., 1994; Haggblom ve diğ., 1994); *R. aichiensis* ve *R. chubuensis* *Gordona* cinsine aktarılmış (Klatte ve diğ., 1994; Riegel ve diğ., 1994); *R. luteus*'un *R. fascians* ile sinonim olduğu tanımlanmış (Klatte ve diğ., 1994) ve *R. maris* *D. maris* olarak yeni tanımlanmış *Dietzia* cinsine transfer edilmiştir (Rainey ve diğ., 1995). *Rhodococcus*

*roseus*, *R. zopfii*, *R. opacus* ve *R. percolatus* yeni türler olarak tanımlanmış, ancak daha sonra *R. roseus*'un *R. rhodochrous* türünün bir üyesi olduğu gösterilmiştir (Rainey ve diğ., 1995; Bell ve diğ., 1998).

*Rhodococcus* cinsinin filogenetik olarak mikolat içeren cinslerden oluşan bir klad içerisine yerleştiği gösterilmiştir. Aslında sadece bu cinsler hücre duvarlarında mikolik asit içermektedir (Embley ve Stackebrandt, 1994). *Corynebacterium*, *Mycobacterium* ve *Nocardia* cinslerinin oluşturduğu 'CMN grubu' *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella* ve *Dietzia* cinslerini de dahil ederek genişletilebilir (Ruimy ve diğ., 1994). Bu klad içerisinde yerleşim gösteren iki yeni cins daha bulunmaktadır. Bunlardan *Turicella* cinsi yeni bir klinik izolat olan *T. otitidis* için oluşturulmuştur (Funke ve diğ., 1994). *Skermania* cinsi ise daha önce *Nocardia pinensis* olarak bilinen tür için oluşturulmuştur (Chun ve diğ., 1997). Ancak, Ruimy ve diğ. (1995) *Turicella otitidis*'in *Corynebacterium* cinsi içerisinde değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle *Turicella* cinsinin geçerliliği tartışmalıdır. Familya düzeyinde de farklı sınıflandırmalar önerilmiştir. Goodfellow (1992) *Rhodococcus*, *Gordona*, *Tsukamurella* ve *Nocardia* cinslerinin Nocardiaceae familyası içerisinde gruplandırılmasını önermiş, ancak daha sonra Chun ve diğ. (1996) bu cinslerin *Mycobacterium* ile birlikte *Mycobacteriaceae* familyası içerisinde gruplandırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Bell ve diğ., 1998).

*Rhodococcus* cinsi aerobik, Gram-pozitif veya Gram-değişken, hareketsiz, katalaz pozitif, gelişimin bazı evrelerinde asit-alkol-fast, çubuk biçiminde veya oldukça dallanmış substrat miselyumu oluşturabilen aktinomisetlerden oluşmaktadır. Gelişim döngüsü kok veya kısa çubuk olarak başlar ve daha sonra farklı organizmalar az ya da çok kompleks morfolojik aşamalar serisi gösterirler: koklar kısa çubuklar halinde veya yan uzantılara sahip filamentler halinde veya dallanmış hifler üreterek (en fazla farklılaşmış formlar) gelişmeye başlamaktadır. Çubukların, filamentlerin veya hiflerin parçalanmasıyla yeni nesil koklar veya kısa çubuklar oluşmaktadır. Bazı suşlar birleşerek yukarı uzanan dallanmamış filamentlerden oluşan, seyrek, mikroskobik olarak görülebilir hava hifleri oluşturmaktadır (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Rodokoklar standart laboratuvar besi ortamlarında 30 °C'de iyi gelişmektedir. Ancak bazı suşlar tiamine gereksinim duymaktadır. Koloniler pürüzlü, pürüzsüz veya

mukoid özellikte olup soluk sarı, krem, sarı, turuncu veya kırmızı pigmentlidir; ancak renksiz çeşitleri de bulunmaktadır. Rodokoklar katalaz pozitif, lizozime duyarlı, arilsülfat negatif olup glukozdan oksidatif olarak asit üretmektedir. Ayrıca A1 $\gamma$  tipi peptidoglikana sahip olup 30-54 karbon uzunlukta en fazla iki çift bağlı mikolik asitler içermektedir. Mikolik asitlerin pirolizis gaz kromatografisinde salınan yağ asidi esterleri 12-16 karbona sahiptir. Ayrıca rodokoklar baskın izoprenolog olarak sekiz izopren birimine sahip dihidrojenlenmiş menakinonlar içermektedir. DNA'nın G + C içeriği %67-73 mol'dur. Cinsin tip türü *Rhodococcus rhodochrous* (Zopf, 1889) Tsukamura 1974, 43<sup>AL</sup> olup tip suşunun koleksiyon numarası ATCC 13808<sup>T</sup> = DSM 43241<sup>T</sup> (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

*Rhodococcus* cinsinin gelişen sınıflandırması başka türlerin de tanımlanmasına imkân tanımıştır. *Rhodococcus* cinsi mevcut durumda mikolik asit içeren aktinomisetlerin oluşturduğu evrimsel yayılım içerisinde tanımlanabilir bir grup oluşturan 50 türden oluşmaktadır (<http://www.bacterio.net/rhodococcus.html> Kasım-2013). Rodokok türlerinin taksonomik bütünlüğü genotipik ve fenotipik özelliklerin kombinasyonu ile desteklenmektedir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Rodokoklar sucul ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Rodokok türleri topraktan, deniz sedimentlerinden ve mutualistik birliktelik kurabildikleri kan emici böceklerin bağırsak içeriklerinden izole edilmişlerdir (Cross ve diğ., 1976; Goodfellow ve Aubert, 1980; Colquhoun ve diğ., 1998; Zhang ve diğ., 2002). *Rhodococcus erythropolis*, *R. rhodochrous* ve *R. ruber* topraktan (Goodfellow ve Williams, 1983); *R. marinonascens* ve *R. nanhaiensis* deniz sedimentlerinden (Helmke ve Weyland, 1984; Li ve diğ., 2013) ve *R. rhodochrous* atık çamuru tesisindeki havalandırma tanklarının yüzeyindeki köpükten (Lemmer ve Kroppenstedt, 1984) izole edilmiştir. Ayrıca, bazı türler daha kısıtlı kaynaklardan izole edilmiştir; *R. baikonurensis* Rus uzay laboratuvarı Mir'deki havadan (Li ve diğ., 2004), *R. gordoniae* fenolle kontamine olmuş topraktan (Jones ve diğ., 2004), *R. jostii* bir ortaçağ mezarından (Takeuchi ve diğ., 2002), *R. koreensis*, *R. jialingiae* ve *R. pyridinivorans* endüstriyel atık sudan (Yoon ve diğ., 2000a, Wang ve diğ., 2010) *R. canchipurensis* kireç taşı yarığında (Nimaichand ve diğ., 2013) izole edilmiştir.

*Rhodococcus coprophilus* türü birçok ekolojik çalışmaya konu olmuştur. Bu organizma otçul hayvanların gübrelerinde gelişmektedir. Ancak çayır, ırmak, dere ve göl çamurundan da izole edildiği bildirilmiştir. *Rhodococcus cerastii* ve *Rhodococcus trifolii* türleri yaprak yüzeyinden (Kampfer ve diğ., 2013), *Rhodococcus artemisiae* türü *Artemisia annua* bitkisinden (Zhao ve diğ., 2012), *Rhodococcus cercidiphylli* türü ise *Cercidiphyllum japonicum* yaprağından (Li ve diğ., 2008) izole edilmiştir.

*Rhodococcus* türlerinin ticari potansiyeli bulunmaktadır. Rodokoklar, birçok kimyasal dönüştürmeleri veya parçalamaları, yüzey aktif maddeler, pıhtılaştırıcı ajanlar, amidler ve polimerler gibi çeşitli ürünleri sentezleyebilmeleri nedeniyle çevresel ve endüstriyel biyoteknolojide potansiyel öneme sahiptir.

Rodokokların hidrokarbonları ve diğer kimyasalları parçalayabilmeleri, bu tür bileşiklerin doğada ayrıştırılmasında ve biyoremediasyonda önemli işlevleri olduğunu gösterebilir. Rodokoklar kirli ortamlarda doğal olarak bulunmakta ve biyoremediasyon amacıyla ortama aşılacak için bazı avantajlara sahiptir. Rodokokların toprakta açlık koşullarında bile sürekli olarak bulunabildiği ve rodokoklar tarafından kirleticilerin ayrıştırılmasının, kolaylıkla kullanılabilen karbon kaynaklarının varlığından olumsuz olarak etkilenmeyebileceği bildirilmiştir. *Rhodococcus* hücreleri, hücre duvarlarındaki alifatik mikolik asit zincirlerinden dolayı hidrofobik özelliktedirler. Bu nedenle yağ/su ara yüzlerinde birleşerek hidrofobik kirleticileri ayrıştırabilirler (Neu, 1996). Bazı *Rhodococcus* suşları ise psikrotrofik olup soğuk iklimlerde biyoremediasyon uygulamalarında kullanım için potansiyele sahip olabilir (Koronelli, 1996; Yagafarova ve Skvortsova, 1996).

Rodokoklar genellikle hidrokarbonların bulunduğu ortamlardan izole edilmektedir. Cinsin bazı suşları tek karbon kaynağı olarak propan, bütan ve asetilen gibi gaz haldeki hidrokarbonları kullanarak gelişebilmektedir. Toprakta veya yeraltı sularında bulunan gaz haldeki alkanları yükseltgeyebilen rodokokların ortaya çıkarılması yeraltı hidrokarbon depolarının bir göstergesi olabilir. Rodokokların bu özelliği petrol araştırmalarında da kullanılabilir (Ashraf ve diğ., 1994).

### 2.1.9 *Streptomyces* cinsinin sistematiki, tarihçesi ve genel özellikleri

**Üstalem:** *Bacteria*

**Sınıf:** *Actinobacteria*

**Altsınıf:** *Actinobacteridae*

**Takım:** *Actinomycetales* (Buchanan, 1917) (Zhi ve diğ., 2009)

**Alt takım:** *Streptomycineae* (Rainey ve diğ., 1997) (Zhi ve diğ., 2009)

**Familiya:** *Streptomycetaceae* (Waksman ve Henrici, 1943) (Zhi ve diğ., 2009)

**Cins:** *Streptomyces* (Waksman ve Henrici, 1943)

Waksman ve Henrici tarafından 1943 yılında tanımlanan *Streptomyces* cinsi günümüze kadar tanımlanmış 638 tür ve 38 alttür ile aktinomisetlerin en geniş grubunu oluşturmaktadır (<http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomyces.html> Kasım-2013). Waksman ve Henrici yayınladıkları çalışmada, *Streptomycetaceae* familyasını dallanma gösteren ince miselyumlara sahip, spor oluşturan, nadiren bölmeli ya da bölmesiz hava hiflerine sahip, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinslerini içeren bir takson olarak tanımlamıştır. *Streptomyces* isminin; aerobik, saprofitik ve spor oluşturan bu bakteri cinsi için uygun olduğunu önermiştir (Waksman ve Henrici, 1943).

*Streptomyces* cinsinin 1943 yılında Waskman ve Henrici tarafından tanımlanmasında kapsaya süreç içerisinde (1940- 1957 yılları arasında) kısıtlı fenotipik özelliklere dayalı olarak yapılan çalışmalarda binin üzerinde *Streptomyces* cinsine ait tür tanımlanmıştır (Pridham ve diğ., 1958). 1958’de Pridham ve diğerleri *Streptomyces* cinsini morfolojik özelliklerine göre değerlendirmiş, *Streptomyces* cinsinin morfolojik olarak bakterilerden çok mikrofungalara benzediğini görüp, botaniksel kodlamaya göre cins ve tür düzeyinde ikili adlandırmaya gitmişlerdir (Wellington, 2009).

1960’lı yıllara gelindiğinde *Streptomyces*’lerin yetersiz tanımlanması nedeniyle *Streptomyces* cinsi için tanımlayıcı standart kriterler, metotlar ve besiyerleri geliştirmek amacıyla “Taxonomy of Actinomycetes, American Society

for Microbiology ve International Committee on Bacteriological Nomenclature” gibi komitelerin denetimi altında International *Streptomyces* Project (ISP) olarak adlandırılan kapsamlı bir çalışma başlatılmıştır. 1964- 1972 yılları arasında yapılan bu çalışmayla *Streptomyces* cinsinin, spor yüzey ve spor zincir morfolojileri, koloni rengi, melanin pigmenti üretilip üretilmediği ve karbon kullanımı gibi fenotipik özellikleri belirlenmiştir (Gotlieb, 1961; Shirling ve Gotlieb, 1967, 68a, 68b, 69, 72).

ISP projesini, 1983 yılında tamamlanan ve *Streptomyces* cinsinin nümerik sınıflandırmasını içeren çalışma takip etmiştir (Williams ve diğ., 1983). 1992 yılında Goodfellow ve diğerlerinin 252 *Streptomyces* türüne 273 birim karakterden oluşan nümerik taksonomik çalışmasıyla *Streptomyces* cinsi oldukça iyi tanımlanmıştır. 2001 yılında Anderson ve diğerlerinin “Taxonomy of *Streptomyces* and Related Genera” adlı çalışması *Streptomyces* literatürüne ışık tutmuştur.

Woese ve Fox’un rRNA molekülünün moleküler sistematiğe kullanılmasıyla birlikte tür tanımlamasında olmazsa olmaz taksonomik kriterlerden biri olan 16S rRNA gen bölgesi analizi eklenmiştir (Fox ve diğ., 1977; Woese, 1987; Jansen, 2006, Tindall, 2010). Ayrıca modern taksonomik prosedürlerin uygulanmasıyla *Streptomyces* cinsinin sınıflandırılmasında önemli gelişmeler olmuştur (Anderson ve Wellington, 2001; Hatano ve diğ., 2003; Lanoot ve diğ., 2004, 2005). Tanımlı türlerin birçoğu hem fenotipik hem de genotipik metodların beraberce kullanılmasıyla iyi şekilde tanımlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalar 16S rRNA gen dizisinin çok yakın akraba türler arasındaki ayrımı yapmakta yetersiz kaldığını göstermektedir. Bu vesileyle özellikle DNA-DNA hibridizasyonu (DDH), çoklu gen bölgesi analizleri (MLSA) gibi diğer moleküler tekniklerle de çalışılması gerektiği vurgulanmaktadır (Rong ve diğ., 2009). Ayrıca son on beş yılda gelişen moleküler teknikler sadece 16S rRNA gen bölgesinin değil tüm genomun dizi analizini yapmaya olanak sağlamıştır.

*Streptomyces*’lerin birçoğu kemoorganotroftir ve enerji gereksinimlerini karşılayıp gelişebilmek için temel karbon ve azot kaynağı olarak organik bileşikleri geniş çapta kullanabilirler. Bu organizmalar oksidatif metabolizmaya sahiptir ve DNA’nın yüzde G+C mol oranı, % 69-78 mol arasındadır (Kim ve diğ., 1999).

Çoğu *Streptomyces* mezofilik olmakla birlikte, psikrofilik ve termofilik *Streptomyces*'ler de mevcuttur. pH 6,5-8'de optimum gelişme gözlenirken asidik ya da alkali pH'da gelişen türlere de rastlanmaktadır.

*Streptomyces*'ler Kemotip II hücre duvarına sahip olup hücre duvarı LL-DAP ve glisin içerirken karakteristik bir polisakkarite sahip değildir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970). A3γ tipinde peptidoglikan yapısındadır (Schleifer ve Kandler, 1972). Aynı zamanda teikoik asitleri de içerir fakat mikolik asitleri içermezler (Naumova ve diğ., 1978; Vylegzhanina ve diğ., 1986; Goodfellow, 1989; Korn-Wendisch ve Kutzner, 1992).

*Streptomyces* türleri çok iyi gelişmiş bir miselyum yapısına sahiptir. Yaşam döngüsü boyunca morfolojik özellikleri birbirinden farklı üç yapı oluşturur. Bu üç yapıdan substrat miselyumu ortama çok kuvvetli bir şekilde tutunma özelliği göstererek ortamdaki besin maddelerini alır. Ardından yine toprak yüzeyine doğru gelişen diğer bir morfolojik yapı olan hava miselyumları oluşur. Substrat miselyumlarının üzerinde pek spor oluşumu gözlenmezken hava miselyumlarının üzerinde veya içinde spor zincirleri oluşur. Üreme bu hareketsiz sporlarla gerçekleşir ve yaşam döngüsü tamamlanır.

Hava miselyumları ince, uzun, oval veya küre şeklinde olup hareketsizlerdir. Cins 0,5-2 µm çapında hifler üretir ve genellikle hava miselyumları substrat miselyumlarına göre daha kalındır. Hava miselyumu bol miktarda spor (conidia) ihtiva eder. Bazı suşların sporları düz olduğu halde bazılarının dikenlidir. Bunlarla birlikte tüyümsü veya siğilimsi olanlar da bulunabilmektedir (Anderson ve Wellington, 2001).

*Streptomyces*'lerin pigment üretme yeteneği sayesinde substrat ve hava miselyumları çok farklı renklerde olabilir. Aynı zaman da bu cins çözünür pigmentte üretmektedir ve böylece petri kapları üzerinde *Streptomyces* kolonileri mikromantar ve aktinomiset dışındaki diğer bakterilerden kolayca ayırt edilebilmektedirler (Goodfellow ve Simpson, 1987).

*Streptomyces* cinsinin sınıflandırılmasına ilişkin bu kadar çalışma yapılmasına karşın ekolojisi ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. *Streptomyces* türlerinin coğrafik dağılımı, mevsimsel, iklimsel farklılıkların ya da

tarım ve çiftçilik uygulamaları ile insan müdahalesinin *Streptomyces* populasyonları üzerindeki etkisi hakkında bilgi sınırlıdır. Bu sınırlılığın sebeplerinden bir tanesi sayısız seçici olmayan besiyerinin *Streptomyces* izolasyonu için kullanılmasıdır. Seçici olmayan besiyerleri izolasyon yapılan bölgedeki gerçek *Streptomyces* oranının belirlenmesini engellemektedir. Doğal habitatlardan yapılacak ekolojik çalışmalarda seçici besiyerinin kullanılması ile bu sorunun aşılacağı düşünülmektedir (Sembring ve Goodfellow, 2008).

Toprağa kokusunu veren geosmin denilen seskiterpen bileşikler sentezleyen *Streptomyces* cinsinin üyeleri toprak bakterileri olarak bilinmelerine rağmen, doğada hem sucul hem de karasal ortamlarda yoğun olarak bulunabilmektedir (Cao ve diğ., 2004; Semêdo ve diğ., 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki *Streptomyces* üyeleri bitki köklerindeki rizosfer, göl ve deniz sedimenti, bitki dokuları, yaprakla beslenen karıncalar gibi farklı habitatlarda da bulunabilmektedir (Jiang ve Xu, 1996; Castillo ve diğ., 2002; Tokala ve diğ., 2002; Ward ve Bora, 2006; Strap ve Crawford, 2006; Kost ve diğ., 2007; Ray ve diğ., 2013; Sembiring, 2009; Sazak, 2009; Şahin ve diğ., 2010; Veyisoglu ve Şahin, 2013).

*Streptomyces*'lerin toprak içerisinde dağılımını, gelişimini ve aktivitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; besine ulaşılabilirlik, nem, sıcaklık, pH, toprak tipi ve mevsimsel değişimlerdir (Williams ve diğ., 1972; Williams, 1978; Atalan, 1993; Upton, 1994; Basilio ve diğ., 2003). *Streptomyces* türleri toprak içerisinde düşük oksijen konsantrasyonunda da gelişebilmektedir. Fakat karbondioksit oranı % 10'u aştığında mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir. *Streptomyces* sporları kuraklığa dayanıklı olduğu için diğer bakterilerin toprakta bulunan vejetatif formdaki üyelerine oranla *Streptomyces* sayısı daha fazladır (Sembiring ve Goodfellow, 2008).

*Streptomyces* cinsinin termofilik, psikrofilik, asidofilik ve alkalofilik türleri de mevcuttur. Şahin 1995 yılında, kurak ve tropikal toprak örneklerinden termofilik *Streptomyces* türleri izole etmiştir. Ekstrem ortamlarda varolan bu bakteriler besin durumuna göre sporulasyon ve çimlenme periyodunu izlerler (Vionis ve diğ., 1998). *Streptomyces* cinsine ait bazı türler insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hastalık etkeni olarak bilinmektedir. Bir çok araştırmacı *Actinomycetes* bakterilerinin bitkilerle ilişkili olduğunu belirtmiştir (Coombs ve Franco, 2003; Qin ve diğ., 2009).

Örneğin *Streptomyces scabies* patates, havuç ve turp gibi bitkilerde hastalık etkenidir (Hiltunen ve diğ., 2005). Bu türe ek olarak benzer etkileri olan *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* ve *S. reticuliscabiei* örnek olarak verilebilir (Miyajima ve diğ., 1998; Lambert ve Loria, 1989b; Bouček-Mechiche ve diğ., 2000).

Asidik topraklara uyum sağlamış bir *Streptomyces* türü olan *Streptomyces acidophilus* genellikle 25-35°C arasındaki sıcaklıklarda gelişme göstermektedir. Buna karşılık +4°C'de gelişebilen psikrofilik ve 45-55°C'de gelişebilen termofilik türlerine de rastlanmaktadır (Goodfellow ve diğ., 1987; Kim ve diğ., 1996).

Son zamanlarda *Actinomycetales* takımına ait bakterilerin izolasyonu, teşhisi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik açıdan üretmiş oldukları primer ve sekonder metabolitlerden dolayı geçmiş yıllarda özellikle *Streptomyces* türleri başta olmak üzere önemli çalışmalar yapılmıştır (Goodfellow ve diğ., 2007; Özdemir, 2008).

*Streptomyces* cinsi üyeleri en iyi bilinen antibiyotik ve biyoaktif sekonder metabolit üreticisidirler. Bu cinsi üyeleri kimyasal savaş için potansiyel olarak donatılmış olup doğal habitatlarda bakteriyal ve fungal rakiplerine karşı rekabet edebilmelerini sağlayan birçok antimikrobiyal bileşik üretme yeteneğine sahiptirler (Thompson ve diğ., 2002). Eritromisin, tetrasiklin gibi antibiyotikler, daunorubisin gibi antitümör ajanlar, rapamisin gibi immün baskılayıcı ve avermektin gibi antihelmitikler bu sekonder metabolitlerden sadece birkaç tanesini oluşturmaktadır (Chater, 1993). Üzerinde daha önce çalışılmamış bitki kök sistemi (Sembring ve diğ., 2000), derin deniz sedimentleri (Bull ve Goodfellow, 2000) gibi habitatlardan izole edilen *Streptomyces* cinsi üyelerinin ticari olarak önemli yeni biyoaktif bileşikler için potansiyel birer kaynak olduğu rapor edilmiştir (Qin ve diğ., 2009).

*Streptomyces* cinsinin üyeleri topraktaki biyopolimerlerin degradasyonunda önemli rol oynamaktadır (Wang ve diğ., 1989; McCarthy ve Williams, 1990). Bu sebeplerden dolayı endüstriyel öneme sahip ekstrasellüler karakterdeki; ksilanaz, sellülaz ve lipaz gibi birçok enzimin sentezinden sorumludurlar (Liu ve diğ., 1986; Baker ve diğ., 2000; Guo ve diğ., 2002). Bu açıdan da endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip organizma grubundadırlar.

Ayrıca birçok parçalanması zor bitki ve hayvan materyalini ve ksenobiyotik polimerik maddeleri parçalayarak karbon çevrimine katkıda bulunan az sayıda mikroorganizma grubundan birini oluşturmaktadırlar. Parçalayabildikleri polimerik maddeler arasında; (i) Polisakkaritler: nişasta, pektin, selüloz, kitin, lignoselüloz, (ii) Kopolimer (kazein, jelatin, hipoksantin), (iii) Proteinler (keratin, elastin) ve (iv) aromatik bileşikler gelmektedir (Kämpfer, 2006).

*Streptomyces violaceusniger*, *Streptomyces griseus* ve *Streptomyces hygroscopicus* suşlarının çok sayıda biyoaktif metabolit üretme yetenekleri yönünden diğer *Streptomyces* türlerine üstünlük sağladığı görülmektedir (Hayakawa ve diğ., 2004). Genom projesi tamamlanmış olan *Streptomyces coelicolor* türünün sekonder metabolit üretiminden sorumlu 29 gen kümesinin olduğu tahmin edilmektedir (Nett ve diğ., 2009). Bu nedenle nadir bulunan ve yaygın olmayan *Streptomyces* türlerinin izolasyonu ve sekonder metabolitler açısından taranması, doğal ürünlerin keşfinin çok önemli bir parçasıdır (Goodfellow ve Williams, 1986). Yapılan çalışmalar sonucunda cinsin üyelerinden yaklaşık 8000 kadar doğal biyoaktif sekonder metabolit elde edilmiştir (Berdy, 2005).

## 2.2 Prokaryotik Sistematik

Archaea ve Bacteria domainlerine mensup cinslerin, çeşitliliğinin ve birbirleriyle ilişkilerinin araştırılıp, incelendiği çalışmalar prokaryotik sistematigi oluşturmaktadır. Taksonomi ve sistematik kelimeleri genellikle eş anlamlı kullanılmasına rağmen birbirinden farklı iki biyolojik terimdir. Sistematik; organizmaları düzenli biçimde karakterize edip sıraya koyan bilimsel bir çalışmadır (Madigan ve Martinko, 2009). Taksonomi genelde biyolojik sınıflandırma bilimi olarak tanımlanmaktadır. Cowan (1968), taksonominin bileşenlerini; sınıflandırma, isimlendirme ve tanımlama şeklinde belirtmiştir.

Sınıflandırma; organizmaları benzerlikleri ya da farklılıklarına göre taksonomik gruplara ayırma yöntemi olup sonuçta sistematik bir düzen oluşmaktadır. İki takson arasındaki akrabalık ilişkilerini göstermek için en kısa ve akılcı yol olan sınıflandırma, sabit bir isimlendirme ve güvenilir bir tanımlama için ön koşuldur ve genellikle tanımlama ile karıştırılmaktadır. (Trüper ve Schleifer, 2006; Goodfellow ve Fiedler, 2010).

İsimlendirme, tür, cins, familya gibi taksonomik bir hiyerarşinin oluşturulmasında kullanılan terimlerden ve kurallardan oluşmaktadır. İsimlendirilmenin doğru şekilde yapılması için International Nomenclature of Bacteria (Lapage ve diğ., 1992)'nin birbirini izleyen basımlarında uluslararası kurallar ve tanımlanan isimlere değinilmektedir. Lapage ve diğerleri tarafından 1975 yılında yayımlanan "Bacteriological Code" daki iki yeniliğin prokaryotik nomenclature (adlandırma) üzerinde geniş kapsamlı etkileri olmuştur. 1 Haziran 1980'den itibaren uluslararası literatüre girmiş olan türlerin tanınması için "Bakteri isimlerinin onaylanmış listesi" (Approved lists of bacterial names)"nde yayınlanma zorunluluğu gelmiştir. Ayrıca yeni takson isimleri International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM; eski ismi International Journal of Systematic Bacteriology) adlı dergide yayınlandığında geçerli olmaktadır. Bu düzenleme tür, cins ve diğer taksonomik seviyelerin onaylı yeni isimlerinin kabul edilmesi işleminin tümünün IJSEM tarafından üstlenildiğini ifade etmektedir (Goodfellow ve Fiedler, 2010).

Son adım olan tanımlama; incelenen organizmanın daha önce belirli bir taksonomik kategoriye yerleştirilmiş bir organizma olup olmadığının araştırılması işlemidir. Bir organizma tanımlanırken kemotaksonomik, moleküler sistematik, nümerik taksonomik metodların uygulanmasıyla elde edilen fenetik ve genetik özellikler temel alınmaktadır. Polifazik taksonomi olarak adlandırılan bu uygulama Colwell tarafından 1970 yılında yüksek kaliteli veri setleri elde etmek amacıyla literatüre kazandırılmıştır (Vandamme ve diğ., 1996; Goodfellow ve diğ., 1997; Gillis ve diğ., 2005). Polifazik taksonominin kullanılması, sınırlarının sürekli revize edildiği *Actinobacteria* ve *Cyanobacteria* gibi prokaryot grupların sınıflandırılmasında nitelikli gelişmelere yol açmıştır (Goodfellow ve diğ., 2006; Kroppenstedt ve diğ., 2006; Gupta, 2009; Goodfellow ve diğ., 2010). Son derece korunmuş makromoleküllerin dizilenmesi özellikle 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi cins ve üzeri taksonomik seviyelerde filogeninin belirlenmesinde değerli bilgiler sağlamıştır (Woose, 1987; Rossello-Mora ve Amann, 2001; Ludwig ve diğ., 2005). Bununla birlikte DNA:DNA homolojisi, moleküler parmak izi ve fenotipik tekniklerin birlikte kullanılmasıyla tür ve alt tür düzeyinde sınıflandırma yapmak mümkün olmuştur (Bassam ve diğ., 1992; Rosseló- Mora ve diğ., 2001; Stackebrandt ve diğ., 2002; Coenye ve diğ., 2005; Tindall ve diğ., 2010).

### 2.2.1 Moleküler sistematik

Nümerik taksonomi; nümerik olarak kodlanan ve birer karakter şeklinde ifade edilen veriler için matematiksel yöntemlerin uygulanması ve organizmaların kapsamlı benzerliğine dayanarak kümelere yerleştirilmesiyle, dendogram şeklinde ilişkilerin ortaya konması iken (Manfio, 1995), moleküler sistematikte farklı mikroorganizmalardaki nükleotitler arasındaki farklılıklar, sınıflandırma ve filogeni arasındaki ilişkiyi açıklamada bir görüş sağlamıştır. Mikrobiyal sistematikte tarihi dönüm noktası olarak görülmüş en değerli gelişim; milyonlarca yıl önce ortak bir atadan ayrılma sonucunda meydana gelen mikroorganizmalarla, genomlarında kaydedilir bir farklılığa sahip mikroorganizmaların arasındaki ilişkinin belirlenmesi olmuştur. Ökaryotlarla karşılaştırıldığında prokaryotlardaki nükleik asitlerin korunmuş bölgelerinin çok daha fazla olduğu bilinmektedir (Koçak, 2012).

Bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında fenotipik yöntemler yeterli olmadığından moleküler tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. Canlılığı oluşturan genetik yapının çözülmesi ve bu genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu çalışmalarla geliştirilen yöntemlerin en önemlilerinden birisi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)'dur.

Prokaryotik türlerin tanımlanmasıyla ilgili bir standardın oluşturulması amacıyla 2002 yılında Ad-Hoc komitesi tarafından araştırmacılara çeşitli önerilerde bulunulmuş ve prokaryotik sistematığın gelişmesine önemli katkıda bulunulmuştur. Bu komitenin aldığı kararlardan biri prokaryotik tür tanımlanırken % 70 ve üzeri DNA:DNA hibridizasyonu, % 97'nin üzerinde 16S rRNA gen dizisi özdeşliği ve belirli derecede fenotipik tutarlılığın temel alınması önerilmiştir. Ayrıca yeni tanımlanan bakteri türlerinin en az iki kültür koleksiyonuna depozit edilmesi de karara bağlanmıştır (Stackebrandt ve diğ., 2002; Coenye ve diğ., 2005).

Son yıllarda dizileme teknolojisinde ortaya çıkan gelişmeler artık prokaryotik organizmaların tüm genomunun analizine olanak sağlamıştır. Ekim 2013'te 11512 prokaryotik genom analizi tamamlanmıştır (Fleischmann ve diğ., 1995; Fraser ve diğ., 1995; Lagesen ve diğ., 2010). Prokaryotik taksonların tanımlanmasında kullanılan yöntemler Tindall ve diğerleri tarafından ayrıntılı olarak ele alınmış,

genomik metodların güçlü ve zayıf yönleri Schleifer tarafından aydınlatılmıştır (Tindall ve diğ., 2010; Schleifer, 2010 ).

### **16S rRNA gen bölgesi**

Çoğaltılma işlemi oldukça kolay olan 16S rRNA molekülünün dizi analizi çalışmaları mikrobiyal taksonomide en çok kullanılan tekniklerden biridir. Bu teknik ile tüm canlılar Archaea (Arkeler), Bacteria (Bakteriler) ve 18S rRNA ile de Eukaryote (Ökaryotlar) olmak üzere üç büyük üst aleme ayrılmıştır (Woese, 1987; Embley ve Stanckebardt, 1994).

RNA'nın bir alt birimi olan ve toplam uzunluğu yaklaşık 1540 nükleotiten ibaret olan 16S rRNA gen bölgesi, filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve bakteriyal tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek oranda korunmuş bölgeleri içeren ve tür için spesifik olan 16S rRNA gen bölgesi tüm türlerin tanımlanmasında oldukça faydalıdır (Brown-Elliott, 2006). Korunmuş bölgeler yavaş evrimleştikleri için taksonomik karşılaştırmaları sağlayacak verileri içermektedir. 16S rRNA sekans verileri genbanklarda deposit edilmekte ve ihtiyaç duyulduğunda bu veriler gen bankalarından kolaylıkla elde edilebilmektedir (Brown-Elliott, 2006; Zhi ve Stackebrandt, 2009; Tindall ve diğ., 2010).

Yapılan karşılaştırmalar sonucu prokaryotik bir organizmanın 16S rRNA dizisinin diğer prokaryotlardan % 3'den fazla farklılık göstermesi, bu organizmanın yeni bir tür olduğunu gösterir. Bunu destekleyen en önemli veri, 16S rRNA dizisinde % 98,5'den az benzerlik göstermiş olup, bu iki bakterinin DNA:DNA homolojisi yapıldığında % 70'den daha yüksek bir değer elde edildiği hiçbir örneğin varolmamasıdır (Konstantinidis ve Tiedje, 2007). Yapılan çalışmalar 16S baz dizilemenin bazı durumlarda genomik DNA hibridizasyonuna göre organizmaları tür seviyesinde ayırma gücünün yetersizliğini göstermektedir. 16S baz dizisi çok benzer ve hatta birebir olan bazı organizmaların oldukça farklı bir genoma sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden %97'den fazla dizi benzerliği görülen durumlarda genomik hibridizasyon yeni türlerin tanımlanması için önemli bir taksonomik tekniktir (Coenye ve diğ., 2005, Stackebrandt, 2006; Goodfellow ve Fiedler, 2010). Bunlarla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar sadece 16S rRNA gen bölgesinin yeni bir türü belirlemek için yeterli olmadığını gösteren literatürler mevcuttur (Kirby ve diğ., 2010).

16S rRNA gen sekansları ve DNA-DNA hibridizasyon (DDH) analizleri, cins içersindeki türlerin filogenetik olarak sınıflandırılmasında kullanılmaları, tür ve tür üstü kategorilerde filogenetik ilişkileri ortaya koymaları bakımından modern bakteriyal taksonominin ‘altın standardı’ olmalarına rağmen aynı türe ait organizmalar arasındaki ayırt ediciliği ortaya koyması bakımından yetersiz kalmaktadır (O’Donnell ve diğ., 1993). Bunun için yapısal (housekeeping) gen sekanslarının kullanımı, 16S rRNA gen sekans analizlerinin tamamlayıcısı olarak tür seviyesinde belirlemeyi sağlamak için önerilmektedir (Stackebrandt ve Ebers, 2006; Everest ve Meyers, 2009; Kirby ve diğ., 2010).

**Çizelge 2.1.** Bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan tekniklerin taksonomik seviyelerdeki kullanımı (Staley, 2006).

| <b>Takson Seviyesi</b> | <b>Fenotipik Özellikler</b> | <b>16S rRNA</b> | <b>DNA:DNA Hibridizasyonu</b> |
|------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------------------|
| <b>Domain</b>          | +                           | +               | -                             |
| <b>Alem</b>            | +                           | +               | -                             |
| <b>Şube</b>            | +                           | +               | -                             |
| <b>Sınıf</b>           | +                           | +               | -                             |
| <b>Ordo</b>            | +                           | +               | -                             |
| <b>Familya</b>         | +                           | +               | -                             |
| <b>Cins</b>            | +                           | +/-             | +/-                           |
| <b>Tür</b>             | +                           | -               | +/-                           |
| <b>Alttür</b>          | +/-                         | -               | -                             |

### 3 MATERYAL-METOT

#### 3.1 Toprak Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları

Bu çalışma için Marmara Bölgesi'nde bulunan dört farklı adanın (Büyükada, Burgazada, Heybeliada, Kınalıada) dokuz lokalitesinden elde edilen toprak örnekleri steril kaplara ve steril plastik poşetlere alınmış ve laboratuvar numaraları verilerek kullanıma kadar +4°C'de korunmuşlardır. İzolasyon çalışmasının yapıldığı örneklerinin laboratuvar kodu, toprak tipleri ve alındıkları lokaliteler Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *Actinobacteria* sınıfı mikroorganizmaların izolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin laboratuvar numarası, toprak tipi ve lokaliteleri

| Kodu | Toprak Tipi       | Lokalitesi |
|------|-------------------|------------|
| H1   | Kıyı Toprağı      | Heybeliada |
| H2   | Orman Toprağı     | Heybeliada |
| H3   | Açık Alan Toprağı | Heybeliada |
| B1   | Tepe Toprağı      | Büyükada   |
| B2   | Orman Toprağı     | Büyükada   |
| Z1   | Tepe Toprağı      | Burgazada  |
| Z2   | Kıyı Toprağı      | Burgazada  |
| K1   | Orman Toprağı     | Kınalıada  |
| K2   | Kıyı Toprağı      | Kınalıada  |

#### 3.2 Toprakların pH'sı

Her bir toprak örneğinden 20-25 g tartılarak 100 ml'lik behere konuldu ve iyonizasyon için yavaşça saf su eklenerek toprak örneği suya doyuncaya kadar karıştırıldı. Saf su ilavesi örnekler üzerinde ince bir su tabakası oluşunca kesildi. Örneklerin pH'ları 24 saat sonunda cam elektrod pH metre ile ölçüldü (Model 292, Unicam Ltd.). Son pH, örnekler içinde küçük lokal çeşitlilikler olabileceği düşünülerek aynı örnekten alınan 3 ölçümün ortalaması hesaplanarak belirlendi (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Marmara Bölgesi’ndeki adalardan alınan toprak örneklerinin ortalama pH değerleri

| Toprak Örneği                      | Ortalama Toprak pH’sı |
|------------------------------------|-----------------------|
| Heybeliada- Kıyı Toprağı (H1)      | 7,35                  |
| Heybeliada- Orman Toprağı (H2)     | 7,45                  |
| Heybeliada- Açık Alan Toprağı (H3) | 7,05                  |
| Büyükada-Tepe Toprağı (B1)         | 6,67                  |
| Büyükada-Orman Toprağı (B2)        | 6,74                  |
| Burgazada- Tepe Toprağı (Z1)       | 7,55                  |
| Burgazada- Kıyı Toprağı (Z2)       | 6,55                  |
| Kınalıada-Orman Toprağı (K1)       | 7,90                  |
| Kınalıada-Kıyı Toprağı (K2)        | 7,40                  |

### 3.3 Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan kültür ortamları ile solüsyonların içeriği ve hazırlanışları Ek-A ve Ek-B’de verilmiştir

#### 3.3.1 Dilüsyon plaka yöntemi

Her bir toprak örneğinden 20-25 g alınıp oda sıcaklığında etiketli petriler içinde yaklaşık 15 gün bekletildi ve kuru toprak örnekleri birbirine karışmayacak şekilde havanla dövülerek toz haline getirildi. İzolasyona hazır hale gelen her bir toprak örneğinden 1 g tartılarak daha önce steril olarak hazırlanan ve içinde 9 ml ringer çözeltisi ve cam boncuk bulunan 20 ml’lik şişelere kondu.  $10^{-1}$ ’lik dilüsyonların her biri, toprak kolloidlerine tutunmuş olan mikroorganizma sporlarını ve miselyumlarını toprak kolloidlerinden ayırmak için 30 dakika boyunca çalkalandı. İzolasyon plaklarındaki vejetatif formlara bağlı kontaminasyonu azaltmak için 50 °C’ye ayarlı sıcak su banyosunda 20 dakika bekletildi.  $10^{-2}$  dilüsyonunu hazırlamak için, içerisinde steril 4.5 ml Ringer çözeltisi bulunan tüplere vorteks karıştırıcı (Fisons Scientific Apparatus Ltd., Loughborough, Leicestershire, England, UK) ile karıştırılan  $10^{-1}$  dilüsyonundan, otomatik pipet (P1000:Gilson, Anacham Ltd., Luton Bedfordshire, England, UK) ile alınan 0.5 ml toprak çözeltisi ilave edildi. Aynı işlem  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  lük dilüsyonlar için de tekrarlandı (Sembiring, 2000; Sivakumar, 2008 ).

$10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  lük dilüsyonlardan otomatik pipet (P200:Gilson, Anachem Ltd.) ile alınan çözeltiler (0.2 ml), cycloheximide ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), rifampicin ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve nalidiksik asit ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) ilaveli hümkik asit vitamin agar (Yamamura ve diğ., 2003), Bennett's agar (Jones, 1949), ISP5 agar (Pridham ve diğ., 1956–1957), tripton yeast ekstrakt agar (Bower ve Hucker, 1930) ve tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (Bower ve Hucker, 1930) yüzeyine inoküle edildi. Her bir dilüsyon için 2 plak hazırlandı. İnokülasyonlu plaklar,  $\text{O}_2$  girişine izin verecek şekilde  $30^\circ\text{C}$ 'deki etüvde 10-14 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Çalışma boyunca tek kullanımlık steril plastik petriler (90 mm, disposable petri dishes, Sterillin, UK) kullanılmıştır.

### 3.3.2 Sükroz santrifüjasyon yöntemi

Dilüsyon plaka yönteminde bahsedilen toprak kolloidlerinden mikroorganizmaların spor ve miselyumlarını ayırmak amacıyla uygulanan çalkalama işlemi ile dekontaminasyon işlemleri ilk etapta uygulandı.  $10^{-2}$  dilüsyonunu hazırlamak için, içerisinde steril 9 ml % 20'lik sükroz çözeltisi bulunan tüplere vorteks karıştırıcı (Fisons Scientific Apparatus Ltd., Loughborough, Leicestershire, England, UK) ile karıştırılan  $10^{-1}$  dilüsyonundan, otomatik pipet (P1000:Gilson, Anachem Ltd., Luton Bedfordshire, England, England, UK) ile alınan 1 ml toprak çözeltisi ilave edildi (Yamamura ve diğ., 2003).

Ardışık izolasyonda spor süspansiyonunun 1 ml'si sükroz gradientinin en üst tabakasını oluşturacak şekilde steril pipetle ilave edildi ve spor süspansiyonu ilave edilmiş tüpler santrifüjlendi (oda sıcaklığında 30 dk,  $240\times g$ ) (Yamamura ve diğ., 2003). Santrifüj işleminden sonra her bir tabaka için farklı steril pipet kullanılarak gradientin en üst kısmı ardışık olarak alındı ve ringer çözeltisi ile  $10^3$ 'luk seri sulandırma yapıldı.  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  lük dilüsyonlardan otomatik pipet (P200:Gilson, Anachem Ltd.) ile alınan çözeltiler (0.2 ml), cycloheximide ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), rifampicin ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve nalidiksik asit ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) ilaveli hümkik asit vitamin agar (Yamamura ve diğ., 2003), Bennett's agar (Jones, 1949), ISP5 agar (Pridham ve diğ., 1956–1957), tripton yeast ekstrakt agar (Bower ve Hucker, 1930), ve tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (Bower ve Hucker, 1930) yüzeyine inoküle edildi. Her bir dilüsyon için 2 plak hazırlandı. İnokülasyonlu plaklar,  $\text{O}_2$  girişine izin verecek şekilde  $30^\circ\text{C}$ 'deki etüvde 10-14 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Çalışma boyunca

tek kullanımlık steril plastik petriler (90 mm, disposable petri dishes, Sterillin, UK) kullanılmıştır.

### **3.3.3 % 1.5'luk fenol yöntemi**

Dilüsyon plaka yönteminde bahsedilen toprak kolloidlerinden mikroorganizmaların spor ve miselyumlarını ayırmak amacıyla uygulanan çalkalama işlemi ile dekontaminasyon işlemleri ilk etapta uygulandı.  $10^{-2}$  dilüsyonunu hazırlamak için, içerisinde steril 9 ml % 1.5'luk fenol çözeltisi bulunan tüplere vorteks karıştırıcı (Fisons Scientific Apparatus Ltd., Loughborough, Leicestershire, England, UK) ile karıştırılan  $10^{-1}$  dilüsyonundan, otomatik pipet (P1000:Gilson, Anacham Ltd., Luton Bedfordshire, England, England, UK) ile alınan 1 ml toprak çözeltisi ilave edildi. Bu karışım 30 °C' de 30 dk inkübe edildikten sonra,  $10^{-2}$  'lik dilüsyondan otomatik pipet ile alınan 0.2 ml karışım cycloheximide ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), rifampicin ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve nalidiksik asit ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) ilaveli HV agar (Yamamura ve diğ., 2003) üzerine inoküle edildi. İnokülasyonlu plaklar, O<sub>2</sub> girişine izin verecek şekilde 30 °C'deki etüvde 10-21 gün süreyle inkübasyona bırakıldı (Istianto ve diğ., 2012). Çalışma boyunca tek kullanımlık steril plastik petriler (90 mm, disposable petri dishes, Sterillin, UK) kullanılmıştır.

### **3.3.4 İzolatların seçimi ve saflaştırılması**

Ardışık dilüsyonlarla farklı seçici besiyerlerine aktarılan örnekler 30 °C'de 14-21 gün inkübasyona bırakıldı ve bu izolasyon plaklarında aktinomiset benzeri kolonileri belirleyebilmek için gözle ve binoküler mikroskopla (X 400 büyütme; Nikon Kogaku K. K., Tokyo, Japan) araştırma yapıldı. Belirlenen aktinomiset ve benzeri koloniler steril kürdanlar kullanılarak cycloheximide ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ilaveli glukoz yeast extract agar (GYEA; Gordon ve Mihm, 1962) , tryptone yeast glucose extract agar (TYGA; Bower ve Hucker, 1930) ve NZ-Amin agar yüzeyine transfer edildi. 30 °C'de 14 günlük inkübasyon sonrasında transferi yapılmış plaklardan saf izolatlar elde edilmişlerdir.

### **3.3.5 İzolatların stoklanması**

Toprak izolasyonu sonucunda, makroskobik ve mikroskobik görüntülerine göre seçilen toplam 142 izolat cycloheximide ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve rifampisin ( $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ilaveli glukoz- yeast extrat agar (GYEA, Gordon ve Mihm, 1962), tryptone yeast

glukoz extract agar (TYGA; Bower ve Hucker, 1930) veya NZ-amin agar üzerine yoğunlaştırılarak ekildi ve 30 °C'de ve 14 gün boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda her bir suş % 20'lik gliserol içeren otoklavlanabilir 1,5 ml'lik vidalı kapaklı tüpler içerisine steril bir öze veya kürdan yardımı ile transfer edilerek -18 °C de stoklanmıştır (Wellington ve Williams, 1978).

Gliserolde stoklama tekniği; gliserolün hücre zarını yumuşak tutarak erime ya da donma sırasında zarın parçalanmasına engel olma özelliği olmasından dolayı suşların uzun süreli muhafazasında liyofilizasyondan sonra en güvenilir teknik olarak kabul edilmektedir.

### **3.4 DNA İzolasyonu**

#### **3.4.1 Genomik DNA izolasyonu**

Test organizmalarının DNA izolasyonu; DNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen,USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Test organizmaları, iyi gelişebildikleri besiyerine göre cycloheximide (50 µg ml<sup>-1</sup>) ilaveli tripton yeast glukoz ekstrakt agar (Blackall ve diğ., 1989) veya glukoz yeast ekstrakt agar (Gordon ve Mihm, 1962) kültür ortamında 28 °C'de 7 gün süre ile geliştirildi. İnkübasyon sonrası, her bir izolattan bir öze dolusu kültür alınarak yine besiyeri isteklerine göre 30 ml trypton yeast glikoz (TYG) extract broth, glukoz yeast ekstrakt (GYE) broth veya N-Z amine broth bulunan 50 ml'lik erlenlere transfer edildi. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 28 °C'de 160 rpm (dakikadaki devir)'de 3-10 gün süre ile geliştirildi. Saflıkları kontrol edildikten sonra steril eppendorflara kültürlerden 1,5 ml ilave edildi ve 13 000 rpm 'de 10 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılıp ddH<sub>2</sub>O 1 defa, TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) tamponunda 2 defa olmak üzere toplam 3 kez yıkandı (Sambrook ve diğ., 2001) ve hücre pelletleri DNA ekstraksiyonuna hazır hale getirildi.

## **İşlem Basamakları**

### Lizatin Hazırlanması;

1. Hücre pelletini lizozim içeren 180 µl lizozim sindirim tamponunda süspanse edildi ve kısa vortekslemeyle iyice karıştırılarak ve 37 °C 'de 12 saat bekletildi.
2. İki ayrı su banyosunu (veya ısıtıcı bloku) 37 °C ve 55 °C sıcaklığa ayarlandı.
3. 50 µl tiriton-x veya guanidin tiyosiyonat ilave edilip pipetaj yapıldı ve 30 dk 37 °C'de bekletildi.
4. 20 µl RNaz eklendi ve 37 °C'de 30-45 dk bekletildi.
5. 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra kısa vortekslemeyle iyice karıştırıldı ve 37 °C'de 30-45 dk bekletildi.
6. 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve kısa vortekslemeyle iyice karıştırıldı.
7. 55 °C'de 30 dakika bekletildi.
8. Lizata 200 µl % 96-100'lük etanol eklendikten sonra homojen bir çözelti elde etmek amacıyla 5 sn vorteksleyerek iyice karıştırıldı.

### Uygulama;

1. PureLink genomik parçalama/bağlama tamponu ve etanolle hazırlanan lizat (yaklaşık 640 µl) PureLink spin kolona aktarıldı.
2. Kolonu oda sıcaklığında 10,000 x g'de 1 dk santrifüjlendi.
3. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir PureLink toplama tüpüne yerleştirildi.
4. Kolona, daha önceden etanolle hazırladığımız yıkama tamponu 1'den 500 µl eklendi.
5. Kolon oda sıcaklığında 10,000 x g'de 1 dk santrifüjlendi.
6. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
7. Kolona, daha önceden etanolle hazırladığınız yıkama tamponu 2'den 500 µl eklendi.

8. Kolon, oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı.
9. Spin kolonu temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. Kolona 25-200 µl PureLink genomik ayırma tamponu (Genomic Elution Buffer) eklendi.
11. Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 1.5 dk santrifüjlendi ve böylece saf hücre DNA'sı elde edildi.
12. Saflaştırılan DNA -20 °C'de saklandı.

### **3.4.2 DNA izolasyon kontrolü**

DNA örnekleri, izolasyon işleminin bir sonucu olarak geleneksel bir metot olan agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edildi. İzole edilen DNA örneklerinin agaroz jelde görünür hale gelebilmesi için agaroz jel içerisine floresan özellik gösteren etidyum bromür boyası ilave edildi. Etidyum bromür, çift zincirli DNA'nın baz çiftlerine bağlanarak 254 veya 312 nm dalga boyunda UV transillüminatörde kırmızı floresans yayma özelliği gösterir. Bu özellik, şayet DNA izole edilmiş ise UV transillüminatör üzerinde, agaroz jelde kırmızı bantların oluşmasını sağlayacaktır.

Elektroforez tablası çalışma alanı üzerinde zemini düz olan bir yere bırakıldı. DNA örneklerini görüntülemek için 35 ml 1xTBE içerisinde % 1 (w/v)'lik, 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilaveli agaroz jel hazırlandı. Hemen sonra tablaya hava kabarcığı oluşmayacak şekilde agaroz jel döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve elektroforez tablası içinde 1xTBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tarağın oluşturduğu hollere her bir DNA örneğinden 3 µl alınarak jel yükleme tamponu (brom fenol mavisi) ile birlikte yüklendi.

Agaroz jel elektroforez için gerekli solüsyonların hazırlanışı ve saklama koşulları Ek-B'de verilmiştir.

### **3.4.3 16S rDNA'nın PZR çoğaltması**

Test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi 27f ve 1525r primerleri (27f:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1525R:5'AAGGAGGTGWTCCARCC-3'

Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cyclers (PCR Express, ThermoHybaid, Middlex, UK)’da amplifiye edildi.

Polimerize zincir reaksiyonları için Promega firmasından temin edilen GoTaq Hot Start Master Mix (Promega Corporation,USA) kullanıldı. 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan her bir örnek için 50 µl ölçüdeki bir reaksiyon karışımı Çizelge 3.3’de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** 16S rRNA gen bölgesinin PZR koşullarında çoğaltılmasında kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

| Reaktif                        | Stok Yoğunluğu | Miktar (µl) |
|--------------------------------|----------------|-------------|
| Hot Start Master Mix (Promega) | 2x             | 25          |
| 27f primeri (AlfaDNA)          | 10 pmol        | 1           |
| 1525r primeri (Alfa DNA)       | 10 pmol        | 1           |
| Kalıp DNA                      | 50-100 ng      | 2           |
| Nükleaz İçermeyen Su           |                | 21          |

Reaksiyon karışımı her bir örnek için kalıp DNA dahil 50 µl olacak şekilde tüplere buz üzerinde transfer edildi. Düşük devirde vortekslenip, mikrosantrifüjde kısa süreli döndürüldü.

PZR reaksiyonu Çizelge 3.4.’deki şartlarda başlatıldı.

**Çizelge 3.4.** 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PZR sıcaklık döngü düzeni.

| İşlem                     | Sıcaklık (°C) | Süre (dk) | Döngü Sayısı |
|---------------------------|---------------|-----------|--------------|
| Ön denatürasyon           | 94            | 2         | 1            |
| Denatürasyon              | 94            | 1         | 35           |
| Bağlanma                  | 55            | 2         | 35           |
| Uzama                     | 72            | 3         | 35           |
| Son uzama                 | 72            | 8         | 1            |
| Reaksiyon sonrası saklama | 4             |           |              |

%1’lik kontrol agarozunda (Agaroz Serva) 3 µl PZR ürünü DNA markör ile yürütülerek hedef bölgenin varlığı tespit edildi.

#### **3.4.4 16S rRNA sekans verilerinin eldesi, analizi ve filogenetik dendrogramların oluşturulması**

PZR amplifikasyon ürünleri elde edildikten sonra çalışma izolatlarımızın 16S gen bölgesinin baz dizi analizi MacroGen firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi, farklı 5 oligonükleotit primeri (Çizelge 3.5) ile MacroGen firması tarafından ABI 3730XL otomatik baz dizi cihazı ile belirlenmiştir.

ABI formatındaki dosyalar fasta formatına dönüştürüldükten sonra Mega 5 (Tamura ve diğ., 2011) programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak üç farklı primerden (MG3f, MG5f ve 800r) elde edilen diziler birleştirilmiş ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırılarak 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi elde edilmiştir. Farklı primerler kullanılarak hazırlanan 16S rRNA gen dizileri, filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi amacıyla analizlerde kullanılmıştır.

Ez Taxon Server (URL-1; Kim ve diğ., 2012) kullanılarak test izolatlarına en yakın akraba olan türlerin 16S rRNA gen dizileri NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Silva; <http://www.ebi.ac.uk> adreslerinden indirilerek elde edilmiştir. 16S rRNA nükleotid baz dizileri ile test örneklerinin baz dizileri Mega 5 (Tamura ve diğ., 2011) programı kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak dizilenmiştir. Bu diziler ve test organizma dizilerinin hizalama işlemleri Mega 5 (Tamura ve diğ., 2011) programlarında birbirleriyle hizalandırılmış ve daha sonra aynı programda, filogenik analiz bölümüne geçilmiştir. 16S rRNA baz dizilerinin çoklu hizalanması sonrasında filogenetik soyağaçları neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritması kullanılarak oluşturulmuştur. Neighbour-joining algoritması için filogenik uzaklık matrisi Jukes-Cantor metodu kullanılmıştır (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak Mega 5 (Tamura ve diğ., 2011) paket programında elde edilmiştir. Test izolatlarının yüzde benzerlik tabloları ve nükleotid farklılıklarını gösteren tablolar PHYDIT paket programı kullanılarak yapılmıştır.

**Çizelge 3.5.** 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyon ve sekans primerleri

| <b>Primer Adı</b> | <b>Sekans (5' ve 3')*</b> | <b>Büyüklik (bp)</b> | <b>Kaynak</b> |
|-------------------|---------------------------|----------------------|---------------|
| 800r              | TACCAGGGTATCTAATCC        | 18                   | Chun, 1995    |
| MG3f              | CAGCAGCCGCGGTAATAC        | 18                   | Chun, 1995    |
| MG5f              | AAACTCAAAGGAATTGACGG      | 20                   | Chun, 1995    |
| 27f               | AGAGTTTGATCTGGCTCAG       | 20                   | Lane, 1991    |
| 1525r             | AAGGAGGTGWTCCARCC         | 17                   | Lane, 1991    |

\*R; adenin veya guanin, S; guanin veya sitozini ifade etmektedir.

## 4 BULGULAR

### 4.1 Mikroorganizmaların Farklı Lokalitelerden İzolasyonu

Marmara Bölgesi'nde yer alan Burgazada, Büyükada, Heybeliada ve Kınalıada'nın 9 farklı lokalitesinden elde edilen toprakların izolasyonunda 5 farklı besiyeri hümitik asit vitamin agar (Yamamura ve diğ., 2003), Bennett's agar (Jones, 1949), ISP5 agar (Pridham ve diğ., 1956–1957), tripton yeast ekstrakt agar (Bower ve Hucker, 1930) ve tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (Bower ve Hucker, 1930) kullanıldı. Dekontaminasyon işlemleri uygulanan toprak örneklerine, toprak izolasyonunda yaygın olarak kullanılan dilüsyon plak yöntemi, nadir aktinomisetlerin izolasyonunda kullanılan süktroz santrifügasyon yöntemi ve % 1,5'lük fenol yöntemi uygulanarak örnekler seri olarak sulandırıldı ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) ve yayma plaka yöntemiyle ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan plaklar 14 günlük (2 hafta) inkübasyona bırakıldı (Yamamura ve diğ., 2003). İnkübasyon sonrasında farklı aktinomiset gruplarına dahil olduğu düşünülen mikroorganizmalar tripton yeast glukoz ekstrakt agar (Blackall ve diğ., 1989), GYM ve NZ-amin agar ortamına aktararak saflaştırılma prosedürüne geçildi (Ek-C). Dekontamine haldeki mikroorganizmalar tek koloni için glukoz yeast ekstrakt agar (Gordon ve Mihm, 1962) ortamına aktarıldı. Gelişen organizmaların daha sonra glukoz yeast ekstrakt agar (Gordon ve Mihm, 1962) ortamına yoğun ekimleri gerçekleştirildi (Ek-C). İnkübasyon süresi sonunda her bir izolat % 20'lik gliserol içeren otoklavlanabilir 1,5 ml'lik vidalı kapaklı tüpler içersine steril bir öze yardımı ile transfer edilerek  $-18^{\circ}\text{C}$  de stoklandı (Wellington ve Williams, 1978). Bu adaların 9 farklı lokalitesinden izole edilen aktinomiset izolatlarının kaynakçaları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Toprak izolasyonu sonucunda seçilen toplam 142 izolat içersinde, makroskobik ve mikroskobik görüntülerine göre 62 izolat 16S rRNA gen bölgesi analizleri için seçilmiş ve bunlardan 45 organizmanın filogenetik analizleri bu çalışmada gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1.** Toprak izolasyonu ile Heybeliada'dan elde edilen aktinomiset izolatları

[illegible]

**Çizelge 4.1. Devamı**

|              |                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------|
| <b>H3R23</b> | <b>S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul</b> |
| <b>H3R24</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |
| <b>H3R25</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |
| <b>H3R26</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |
| <b>H3R27</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |
| <b>H3R28</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |
| <b>H3R29</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |
| <b>H3R30</b> | S.Saricaoğlu,Orman Toprağı,Heybeliada,İstanbul        |

**Çizelge 4.2.**Toprak izolasyonu ile Büyükada'dan elde edilen aktinomiset izolatları

| <b>Organizma</b> | <b>Büyükada</b>                                 |
|------------------|-------------------------------------------------|
| <b>B1R8</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B1R25</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B1R26</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B1F34</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B2R7</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B2R8</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B2F13</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |
| <b>B2F16</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Büyükada, İstanbul |

**Çizelge 4.3.**Toprak izolasyonu ile Burgazada'dan elde edilen aktinomiset izolatları

| <b>Organizma</b> | <b>Burgazada</b>                                 |
|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Z1R8</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R9</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R16</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R17</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R21</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R23</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R24</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R25</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R26</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R27</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R28</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R34</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1F34</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1F35</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R37</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R39</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z1R61</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z2R34</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z2R53</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |
| <b>Z2R54</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Burgazada, İstanbul |

**Çizelge 4.4.**Toprak izolasyonu ile Kınalıada'dan elde edilen aktinomiset izolatları

| <b>Organizma</b> | <b>Kınalıada</b>                                 |
|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>K1R7</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R9</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R11</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R13</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R15</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R16</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R18</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R19</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R21</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R23</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R24</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R28</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R32</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R36</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K1R61</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R2</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R5</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R8</b>      | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S18</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S19</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S20</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S25</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R32</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R33</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R34</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R35</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R37</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R38</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R40</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R41</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R42</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R44</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R47</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R49</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R51</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R55</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R56</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R59</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S63</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S64</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S65</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2S66</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2F72</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2F73</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R76</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |
| <b>K2R77</b>     | S.Saricaoğlu, Orman Toprağı, Kınalıada, İstanbul |

**Çizelge 4.5.** 16S rRNA dizi analizleri yapılan *Actinomycetes* izolatları

| Cins                    | İzolat | İzolasyon Besi Yeri | Dilüsyon Plaka | Sükroz Gradient | %1.5'luk Fenol |
|-------------------------|--------|---------------------|----------------|-----------------|----------------|
| <i>Actinomadura</i>     | B2F13  | HV Agar             |                |                 | X              |
| <i>Agromyces</i>        | K1R23  | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | K2R23  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
| <i>Geodermatophilus</i> | Z2R53  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
| <i>Kribbella</i>        | H2R4   | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | H2R22  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | H3R5   | TYG Agar            | X              |                 |                |
| <i>Micromonospora</i>   | H2F8   | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | H2F23  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | H2R10  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | H3F6   | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | H3F25  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | K2F72  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | K2F73  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | K2R33  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K2R35  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K2R47  | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | K2R49  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K2R55  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K2S19  | Bennett's Agar      |                | X               |                |
|                         | K2S20  | Bennett's Agar      |                | X               |                |
|                         | Z1F35  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | Z1R8   | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | Z1R61  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
| <i>Nocardia</i>         | H3S3   | TYGV Agar           |                | X               |                |
|                         | H3S24  | TYGV Agar           |                | X               |                |
|                         | K2R37  | HV Agar             | X              |                 |                |
| <i>Nonomuraea</i>       | H1R4   | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | H2R3   | TYG Agar            | X              |                 |                |
|                         | H2R11  | TYG Agar            | X              |                 |                |
|                         | H2R15  | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | H2R16  | TYG Agar            | X              |                 |                |
|                         | H2R21  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | Z1R24  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
| <i>Rhodococcus</i>      | Z2R54  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | H3R2   | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | B1R8   | TYGV Agar           | X              |                 |                |
| <i>Streptomyces</i>     | K1R19  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | H1R6   | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | H1R9   | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | H2R12  | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | H3R8   | TYG Agar            | X              |                 |                |
|                         | H3S9   | TYG Agar            |                | X               |                |
|                         | H3R17  | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | H3R21  | TYG Agar            | X              |                 |                |
|                         | H3S23  | TYG Agar            |                | X               |                |
|                         | B1F34  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | B2F16  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | K1R16  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K1R18  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K1R21  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | K1R24  | TYGV Agar           | X              |                 |                |
|                         | K1R61  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | K2R2   | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | K2R40  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K2R76  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | K2R77  | HV Agar             | X              |                 |                |
|                         | Z1R7   | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | Z2S13  | TYGV Agar           |                | X               |                |
|                         | Z1F34  | HV Agar             |                |                 | X              |
|                         | Z1R34  | Bennett's Agar      | X              |                 |                |
|                         | Z2R34  | HV Agar             | X              |                 |                |

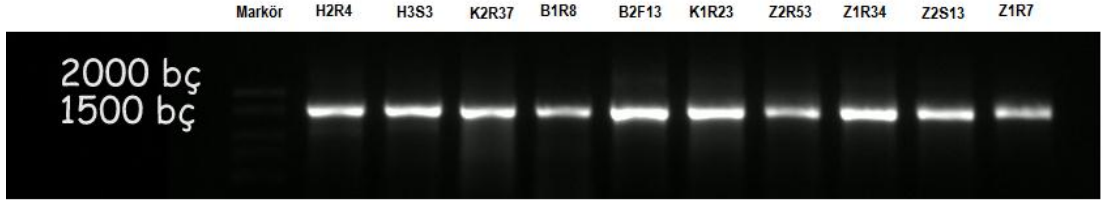
62 aktinomiset izolatı içerisinde 29 izolat hümik asit vitamin agar (HV) ortamından, 13 izolat Bennett's agar ortamından, 12 izolat tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamından ve 8 izolatta tripton yeast ekstrakt agar (TYG) ortamından izole edilmiştir. 62 test izolatının elde edildiği izolasyon yöntemleri kıyaslandığında; dilüsyon plaka yöntemi ile 44 izolat, % 1.5'luk fenol ön uygulaması ile 11 izolat ve süroz gradient santrifügasyon yöntemi ile de 7 izolat izole edilmiştir.

#### **4.2 DNA İzolasyonu ve Agaroze Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'ların Görüntülenmesi**

İzolasyon çalışmaları sırasında, morfolojik olarak farklı aktinomiset grupları olduğu düşünülen mikroorganizmalar seçilerek, bu organizmaların genomik DNA'ları; DNA İzolasyon Kiti (Invitrogen,USA) ile elde edilmiş ve DNA kontrolü % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

#### **4.3 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu**

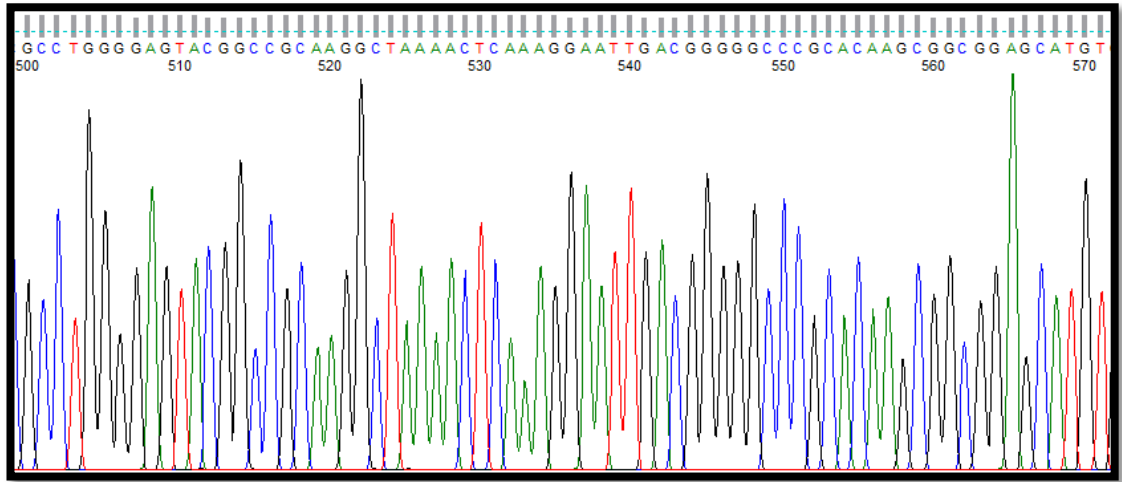
Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27f ve 1525r; Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)' da PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifiye ürünler % 1'lik kontrol agaroz jelde (35 ml 1xTBE tampon, 0.35 gr agaroz) DNA markör ile birlikte 100 Voltta 30 dakika yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde (GeneGenius, Syngene, Bio Imaging Systems, UK) fotoğraflanarak kaydedilmiştir. Test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi PZR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik kontrol agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir. Jelde görüldüğü üzere 1500 baz çifti (bp) uzunluğunda tek bir bant elde edilmiştir.



**Şekil 4.1.** Farklı lokalitelerden izole edilmiş aktinomisetlerin 16S rRNA gen bölgesinin PZR metodu ile amplifikasyonu. M, DNA Markör (Fermentas™; 100kb Gene Ruler)

#### 4.4 16S rRNA Sekans Verilerinin Eldesi, Analizi ve Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması

PZR amplifikasyon ürünleri elde edildikten sonra çalışma izolatlarımızın 16S rRNA gen bölgesinin baz dizi analizi MacroGen firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi, farklı 3 oligonükleotit primeri ile MacroGen firması tarafından ABI 3730XL otomatik baz dizileme cihazıyla belirlenmiştir. Baz dizi sonuçlarının kontrolü Finch TV programında görüntülenerek yapılmıştır. Bu kontrol neticesinde düzgün okunmadığı düşünülen diziler MacroGen firmasına tekrarlatılmıştır. Tekrar okutulan baz dizilerinin Finch TV deki görüntüleri incelenmiş ve dizilerin analizine geçilmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.2.** MacroGen firmasına okutulan baz dizilerinin Finch TV programındaki görüntüsü.

Organizmaların 16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlerinden elde edilen baz dizileri ait oldukları cinslerin tip türleriyle Mega 5 paket programında hizalanmış ve mega formatında kaydedilmiştir.

Mega 5 parogramında kaydedilen sonuçlar fasta formatındada kaydedilerek benzerlik tabloları oluşturulmuştur.

Test izolatları ve ilgili cinslerin tip türlerinin filogenetik analizlerinde Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) ve maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) algoritmaları kullanıldı. *Actinomadura* sp. B2F13'ün baz dizisi, 10 adet *Actinomadura* cinsine ait tip türle birlikte hizalanmış ve toplamda 1409 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Actinomadura* sp. B2F13'ün % 98.4 ile *A. bangladeshensis*'e komşu olduğu ve 22 farklı nükleotide sahip olduğu, % 97.6 *A. mexicana*'ya yakın ilişkili ve 33 farklı nükleotide sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6, Çizelge 4.3.).

*Agromyces* cinsine ait izolatların dizileri, 11 adet *Agromyces* cinsine ait tip tür ile birlikte hizalanmış olup toplamda 1374 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Agromyces* sp. K1R23 izolatu % 98.8 *A. neolithicus*'a komşu olduğu ve 16 nükleotit farklılığı bulunmaktayken, *A. humatus* ile % 98.6 komşu olduğu ve 19 nükleotit farklılığı bulunduğu tespit edilmiştir. Yine bu cinsin üyesi olduğu belirlenen *Agromyces* sp. K2R23 izolatu % 99 *A. neolithicus*'a komşu olduğu ve 13 nükleotit farklılığı bulunmaktayken, *A. humatus* ile % 98.8 komşu olduğu ve 16 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3, Çizelge 4.4).

*Geodermatophilus* cinsine ait izolatın baz dizisi en yakın 10 tip türü ile birlikte hizalanmış olup, toplamda 1442 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Geodermatophilus* sp. Z2R53 izolatu % 98,4 benzerlik ile *G.saharensis*'e komşu olduğu ve 36 nükleotit farklılığı bulunduğu belirlenmişken, *G. tzadiensis* ile % 98 benzerlik oranı ile komşu olduğu ve 28 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4,Çizelge 4.5).

*Kribbella* cinsine ait 3 izolatın dizileri, 13 adet *Kribbella* cinsine ait tip türle birlikte hizalanmış olup toplamda 1369 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Kribbella* sp. H2R4 izolatu % 99.3 oranında *K. shirazensis*'e komşu olduğu ve 10 nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmişken, *K. swartbergensis*'e % 98 oranında yakın ilişkili ve 16 nükleotit farklılığı bulunduğu tespit edilmiştir. *Kribbella* sp. H2R22 izolatu % 98.5 oranında *K. karoonsensis* ile ilişkili olup 21 nükleotit farklılığı göstermekte, *K. swartbergensis* ile de % 98.4 benzerlik ve 22 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Kribbella* sp. H3R5 izolatu ise % 99.5 benzerlik oranı ile *K. karoonsensis*'le yakın ilişki göstermekte ve 6 nükleotit farklılığı bulunmakta olup, *K. swartbergensis* türü

ile % 99.2 oranında yakınlık ve 10 nükleotit farklılığı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5, Çizelge 4.6).

*Micromonospora* cinsine ait izolatların dizileri, *Micromonospora* cinsi üyesi 33 tip tür ile birlikte hizalanmış ve 1430 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Micromonospora* sp. K2R49, *Micromonospora* sp. K2R55, *Micromonospora* sp. K2S19, *Micromonospora* sp. K2S20, *Micromonospora* sp. Z1R8 ve *Micromonospora* sp. Z1R61 izolatlarının % 99.3-100 oranlarında *M. saelicesensis*'le yakın ilişkili olduğu ve 0-4 nükleotit farklılığına sahip oldukları tespit edilmiştir. *Micromonospora* sp. K2F72 izolatının ise yine *M. saelicesensis* türü ile % 99 oranında benzerlik ve 13 nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. *Micromonospora* sp. H3F25 ve *Micromonospora* sp. H3F6 izolatları % 97.8-98 benzerlik oranı ile *M. eburnea* türüne benzemekte ve 17-15 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Micromonospora* sp. H3F23 ve *Micromonospora* sp. H3R10 izolatları % 99.5 oranında *M. crema*'ya benzediği ve 6 nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. *Micromonospora* sp. K2F73 izolatı % 99.4 oranında *M. chaiyaphumensis* türü ile benzerlik ve 4 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Micromonospora* sp. K2R47 izolatı % 99.8 benzerlik ve 1 nükleotit farklılığı ile *M. zamorensis*'e, *Micromonospora* sp. K2R35 izolatı % 98 benzerlik ve 23 nükleotit farklılığı ile *M. endolithica*'ya, *Micromonospora* sp. K2R33 izolatı % 99.1 benzerlik ve 13 nükleotit farklılığı ile *M. coxensis* türüne, *Micromonospora* sp. H2F8 izolatı % 98.6 benzerlik ve 20 nükleotit farklılığı ile *M. narathivatensis* tip türüne benzemektedir (Şekil 4.6, Çizelge 4.10-13).

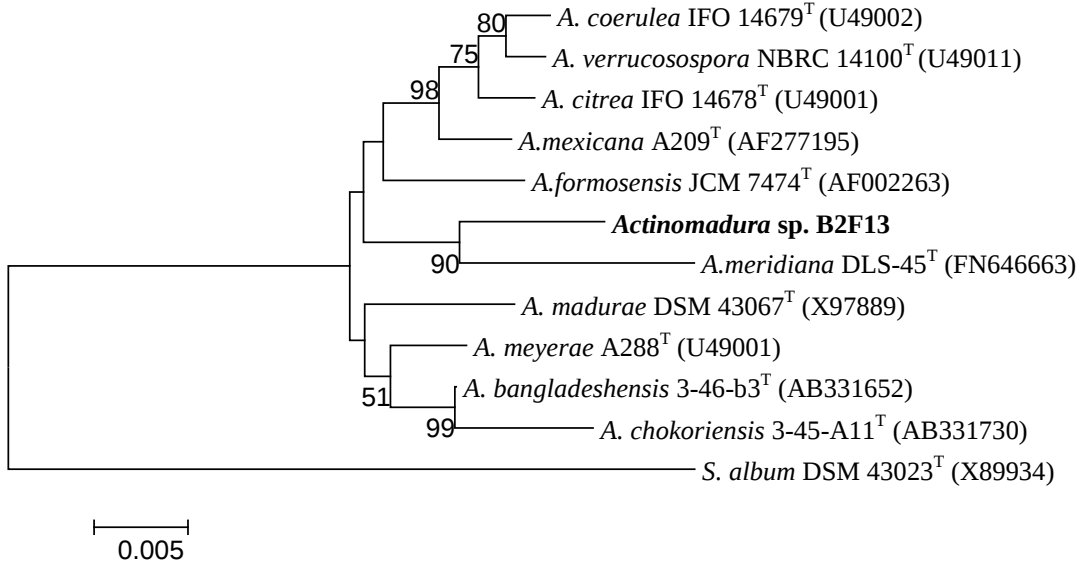
*Nocardia* cinsine ait izolatların dizileri, *Nocardia* cinsi üyesi 19 tip tür ile birlikte hizalanmış ve 1409 nt'lik dizi elde edilmiştir. İzolatlardan *Nocardia* sp. H3S3 izolatı %98 benzerlik oranı ile *N. takedensis*'e yakınlık ve 28 nükleotit farklılığı gösterirken *N. lijiangensis* türü ile de % 97.1 benzerlik ve 41 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Nocardia* sp. H3S24 izolatı % 99.1 benzerlik ile *N. takedensis*'e yakınlık ve 13 nükleotit farklılığı göstermekte, *N. lijiangensis* türü ile de % 98.1 benzerlik ve 25 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Nocardia* sp. K2R37 izolatı ise % 99.3 benzerlik oranı ile *N. speluncae* türüne benzemekte ve 10 nükleotit farklılığı göstermekte olup, *N. jinanensis* türü ile de %99.1 benzerlik oranı ve 13 nükleotit farklılığı göstermektedir (Şekil 4.7, Çizelge 4.14; 15).

*Nonomuraea* cinsine ait izolatların dizileri *Nonomuraea* cinsine ait 21 tip türü ile birlikte hizalanmış toplamda 1381 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Nonomuraea* sp. H1R4 izolatı % 98.1 benzerlik oranı ile *N. candida* türüne benzediği ve 26 nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. Yine bu izolat % 97.6 benzerlik oranı ile *N. salmonea* tip türüne yakınlık göstermekte ve 32 nükleotit farklılığına sahiptir. *Nonomuraea* sp. H2R3 izolatı % 96.8 benzerlik oranı ile *N. solani* türü ile akraba olup 44 nükleotit farklılığı göstermektedir. Bu izolatın % 96.2 benzerlik ile *N. rhizophila* türüne yakınlık gösterdiği ve 52 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Nonomuraea* sp. H2R15 izolatının % 98 benzerlik oranı ile *N. candida* türüne benzediği ve 27 nükleotit farklılığına sahip olduğu , % 98.4 benzerlik ile de *N. helvata* türüne yakınlık gösterip 22 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. *Nonomuraea* sp. H2R16 izolatı % 97.5 benzerlik oranı ile *N. solani* türüne yakınlık ve 34 nükleotit farklılığı göstermektedir. Bu izolatın % 96.9 benzerlik ile *N. rhizophila* türüne yakınlık gösterdiği ve 42 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir. *Nonomuraea* sp. H2R21 izolatı % 97.4 benzerlik oranı ile *N. solani* türüne yakınlık ve 34 nükleotit farklılığı göstermektedir. Bu izolatın % 97 benzerlik ile *N. maheshkhaliensis* türüne yakınlık gösterdiği ve 41 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir. *Nonomuraea* sp. H2R11 izolatı % 99.3 benzerlik oranı ile *N. candida* türüne benzediği ve 9 nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. Yine bu izolat % 98.9 benzerlik oranı ile *N. salmonea* tip türü ile 15 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. *Nonomuraea* sp. Z1R24 izolatının *N. turkmeniaca* türüne % 99 benzer olduğu ve 14 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Yine bu izolat % 98.6 benzerlik oranı ile *N. candida* tip türün ile akraba olup 19 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Nonomuraea* sp. Z2R54 izolatı % 98.4 benzerlik oranı ile *N. helvata* türüne benzediği ve 21 nükleotit farklılığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine bu izolat % 98.1 benzerlik oranı ile *N. candida* tip türüne yakınlık göstermekte ve 26 nükleotit farklılığına sahiptir (Şekil 4.8, Çizelge 4.16; 17).

*Rhodococcus* cinsine ait izolatların dizileri *Rhodococcus* cinsine ait 14 tip türü ile birlikte hizalanmış toplamda 1443 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Rhodococcus* sp. H3R2 izolatı % 99.3 benzerlik oranı ile *R. wratislaviensis* türü ile yakın akrabalık göstermekte olup 12 nükleotit farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. *Rhodococcus* sp. B1R8 izolatı % 99.9 benzerlik oranı ile *R. equi* türü ile yakın ilişkili olduğu ve 2 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. *Rhodococcus* sp. K1R19 izolatı ise

%98.5 benzerlik oranı ile *R. koreensis* türü ile yakın ilişkili olup 21 nükleotit farklılığı göstermektedir. *R. marinonascens* türü ile de % 98.5 yakınlık göstermekte olup 21 nükleotit farklılığına sahiptir (Şekil 4.9, Çizelge 4. 18; 19).

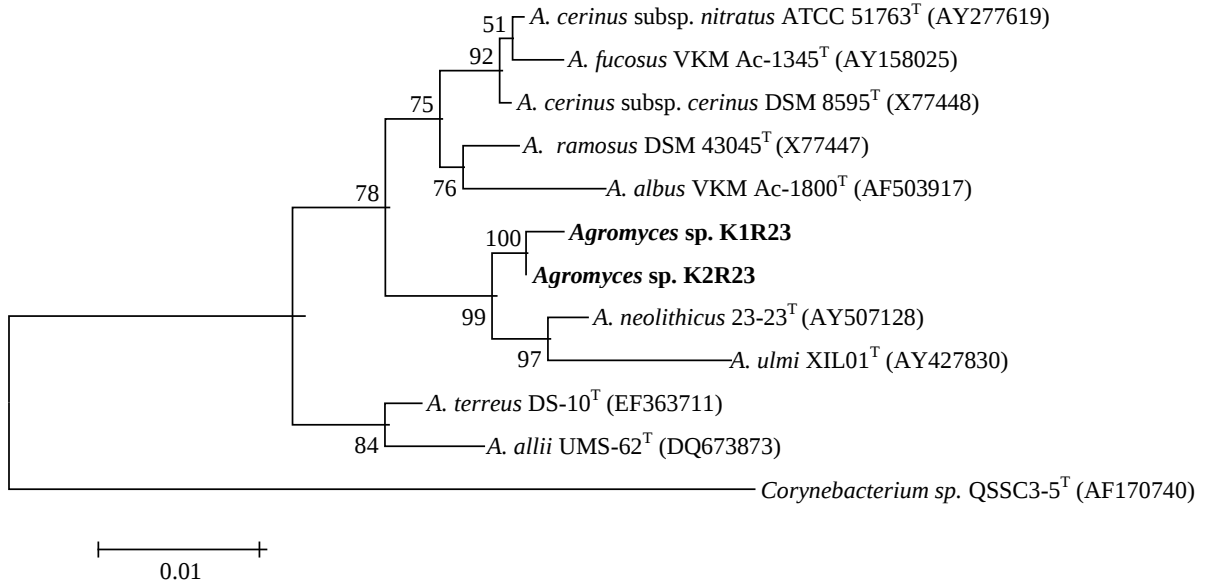
*Streptomyces* cinsine ait izolatların dizileri *Streptomyces* cinsine ait 39 tip türü ile birlikte hizalanmış toplamda 1445 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Streptomyces* sp. Z1R7 izolatı % 95.5 benzerlik oranı ile *S. specialis* türü ile yakınlık göstermekle birlikte 65 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. *S. mayteni* türü ile % 95.5 benzerlik oranına sahip olduğu ve 62 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. Z1R34 izolatı %97 benzerlik ile *S. vastus* türü ile yakın ilişki göstermekte ve 44 nükleotit farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolatın *S. violarius* türü ile % 95.3 benzerlik gösterdiği ve 68 nükleotit farklılığına sahip olduğu tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. K1R21 izolatı % 98.9 benzerlik oranı ile *S. vastus* türü ile yakın ilişkili olup 15 nükleotit farklılığına sahiptir. *S. cinereus* türüyle ise % 97.5 benzerlik oranı ve 36 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Streptomyces* sp. K1R16 izolatı % 98.9 benzerlik oranı ile *S. vastus* türü ile yakın ilişki göstermekte ve 16 nükleotit farklılığına sahiptir. *S. cinereus* türüyle ise % 97.6 benzerlik oranı ve 35 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Streptomyces* sp. K2R76 izolatı % 98.2 benzerlik oranı ile *S. seoulensis* türüne yakınlık göstermekle birlikte 26 nükleotit farklılığına sahiptir. *S. peucetius* türüyle de % 97.8 benzerlik oranı ve 31 nükleotit farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. K2R77 izolatı % 98.4 benzerlik oranı ile *S. glycovorans* türüne yakınlık göstermekle birlikte 23 nükleotit farklılığına sahiptir. *S. abyssalis* türüyle de % 97.9 benzerlik oranı ve 30 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. Z2S13 izolatı % 98.3 benzerlik oranı ile *S. endophyticus* türüne yakınlık göstermekte ve 25 nükleotit farklılığına sahiptir. *S. kunmingensis* türüyle de % 97.1 benzerlik oranı ve 42 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10, Çizelge 4. 20- 22).



**Şekil 4.3.** *Actinomadura* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 0.05'tir ve dış grup olarak *Streptosporangium album* DSM 43023<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.6.** *Actinomadura* cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

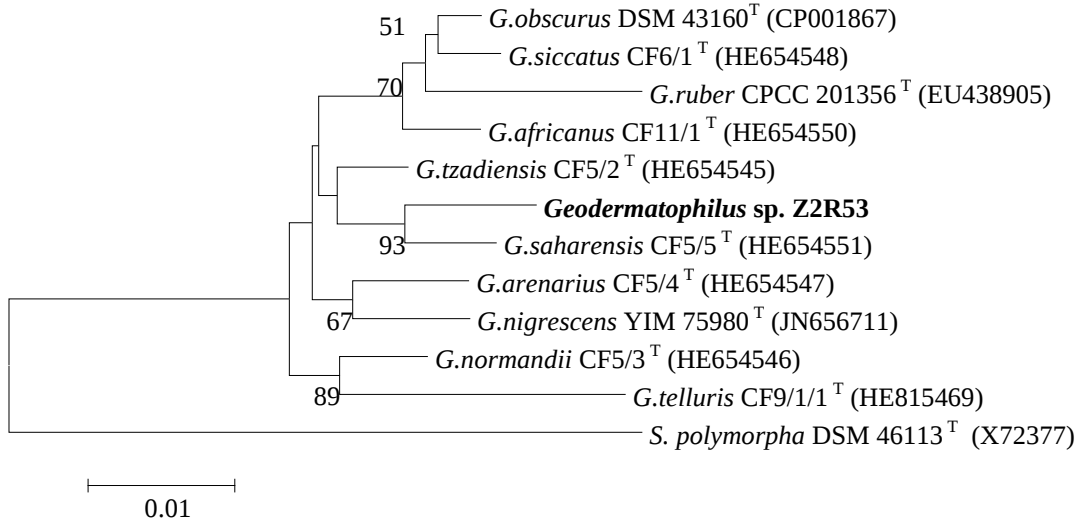
|    |                                     | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      |
|----|-------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Actinomadura</i> sp. B2F13       | ---   | 22/1390 | 33/1384 | 30/1381 | 33/1387 | 34/1386 | 33/1385 | 36/1385 | 31/1386 | 31/1391 | 39/1385 |
| 2  | <i>A. bangladeshensis</i> 3-46-b3   | 98.42 | ---     | 25/1386 | 10/1383 | 33/1387 | 26/1387 | 15/1387 | 25/1387 | 20/1388 | 25/1392 | 23/1386 |
| 3  | <i>A. mexicana</i> A209             | 97.62 | 98.20   | ---     | 35/1377 | 38/1383 | 13/1383 | 24/1382 | 17/1382 | 22/1384 | 23/1386 | 19/1381 |
| 4  | <i>A. chokoriensis</i> 3-45-a/11    | 97.83 | 99.28   | 97.46   | ---     | 42/1378 | 36/1378 | 25/1378 | 35/1378 | 30/1379 | 35/1383 | 33/1377 |
| 5  | <i>A. meridiana</i> DLS-45          | 97.62 | 97.62   | 97.25   | 96.95   | ---     | 39/1383 | 39/1382 | 44/1382 | 42/1387 | 37/1388 | 43/1382 |
| 6  | <i>A. citrea</i> IFO 14678          | 97.55 | 98.13   | 99.06   | 97.39   | 97.18   | ---     | 28/1383 | 8/1385  | 27/1383 | 25/1388 | 10/1385 |
| 7  | <i>A. meyeræ</i> A288               | 97.62 | 98.92   | 98.26   | 98.19   | 97.18   | 97.98   | ---     | 28/1383 | 22/1383 | 28/1387 | 26/1382 |
| 8  | <i>A. coerulea</i> IFO 14679        | 97.40 | 98.20   | 98.77   | 97.46   | 96.82   | 99.42   | 97.98   | ---     | 31/1383 | 25/1387 | 6/1385  |
| 9  | <i>A. maduræ</i> DSM 43067          | 97.76 | 98.56   | 98.41   | 97.82   | 96.97   | 98.05   | 98.41   | 97.76   | ---     | 31/1388 | 29/1382 |
| 10 | <i>A. formosensis</i> JCM 7474      | 97.77 | 98.20   | 98.34   | 97.47   | 97.33   | 98.20   | 97.98   | 98.20   | 97.77   | ---     | 26/1387 |
| 11 | <i>A. verrucosospora</i> NBRC 14100 | 97.18 | 98.34   | 98.62   | 97.60   | 96.89   | 99.28   | 98.12   | 99.57   | 97.90   | 98.13   | ---     |



**Şekil 4.4.** *Agromyces* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'dir ve dış grup olarak *Corynebacterium* sp. QSSC3-5<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.7.** *Agromyces* cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

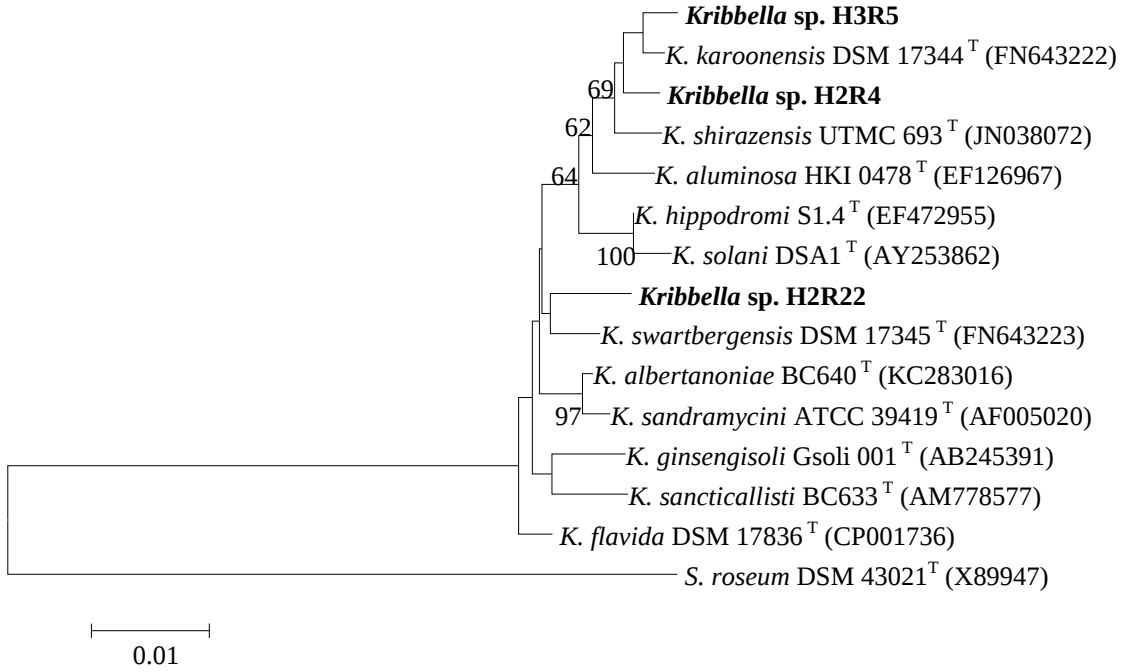
|    |                                                     | 1     | 2      | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      |
|----|-----------------------------------------------------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Agromyces</i> sp. K1R23                          | ---   | 3/1361 | 16/1360 | 22/1352 | 32/1352 | 41/1351 | 32/1353 | 32/1350 | 29/1352 | 45/1352 | 34/1357 | 19/1358 | 48/1352 |
| 2  | <i>Agromyces</i> sp. K2R23                          | 99.78 | ---    | 13/1360 | 19/1352 | 29/1352 | 38/1351 | 29/1353 | 29/1350 | 26/1352 | 42/1352 | 31/1357 | 16/1358 | 45/1352 |
| 3  | <i>A. neolithicus</i> 23-23                         | 98.82 | 99.04  | ---     | 23/1352 | 30/1351 | 37/1351 | 30/1352 | 20/1350 | 36/1352 | 44/1351 | 32/1356 | 16/1358 | 46/1352 |
| 4  | <i>A. ramosus</i> DSM 43045                         | 98.37 | 98.59  | 98.30   | ---     | 12/1351 | 38/1351 | 12/1352 | 38/1349 | 16/1352 | 45/1351 | 20/1352 | 27/1350 | 47/1352 |
| 5  | <i>A. cerinus</i> subsp. <i>cerinus</i> DSM 8595    | 97.63 | 97.86  | 97.78   | 99.11   | ---     | 42/1350 | 0/1352  | 43/1348 | 20/1351 | 47/1351 | 8/1352  | 36/1349 | 49/1351 |
| 6  | <i>A. terreus</i> DS-10/EF363711                    | 96.97 | 97.19  | 97.26   | 97.19   | 96.89   | ---     | 42/1351 | 47/1348 | 50/1351 | 10/1352 | 46/1351 | 43/1349 | 17/1352 |
| 7  | <i>A. cerinus</i> subsp. <i>nitratus</i> ATCC 51763 | 97.63 | 97.86  | 97.78   | 99.11   | 100.00  | 96.89   | ---     | 43/1349 | 20/1352 | 47/1352 | 8/1353  | 36/1350 | 49/1352 |
| 8  | <i>A. ulmi</i> XIL01                                | 97.63 | 97.85  | 98.52   | 97.18   | 96.81   | 96.51   | 96.81   | ---     | 49/1349 | 50/1348 | 43/1350 | 30/1348 | 54/1349 |
| 9  | <i>A. albus</i> VKM Ac-1800                         | 97.86 | 98.08  | 97.34   | 98.82   | 98.52   | 96.30   | 98.52   | 96.37   | ---     | 57/1351 | 28/1352 | 34/1350 | 58/1352 |
| 10 | <i>A. allii</i> UMS-62                              | 96.67 | 96.89  | 96.74   | 96.67   | 96.52   | 99.26   | 96.52   | 96.29   | 95.78   | ---     | 51/1352 | 50/1349 | 21/1352 |
| 11 | <i>A. fucosus</i> VKM Ac-1345                       | 97.49 | 97.72  | 97.64   | 98.52   | 99.41   | 96.60   | 99.41   | 96.81   | 97.93   | 96.23   | ---     | 33/1354 | 53/1352 |
| 12 | <i>A. humatus</i> CD5                               | 98.60 | 98.82  | 98.82   | 98.00   | 97.33   | 96.81   | 97.33   | 97.77   | 97.48   | 96.29   | 97.56   | ---     | 52/1350 |
| 13 | <i>A. salentinus</i> 20-5                           | 96.45 | 96.67  | 96.60   | 96.52   | 96.37   | 98.74   | 96.38   | 96.00   | 95.71   | 98.45   | 96.08   | 96.15   | ---     |



**Şekil 4.5.** *Geodermatophilus* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'tir ve dış grup olarak *Sporichthya polymorpha* DSM 46113<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.8.** *Geodermatophilus* cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

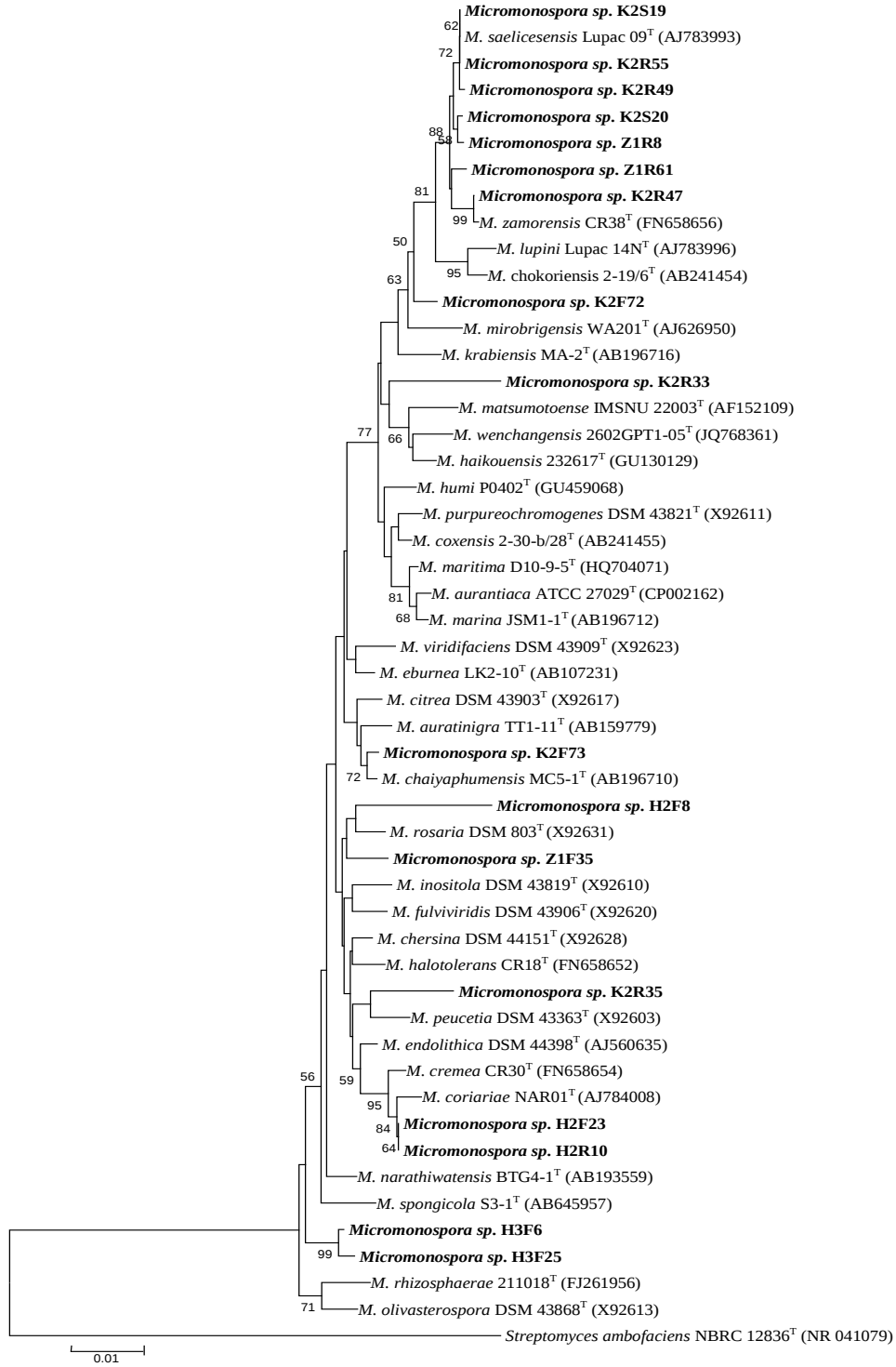
|    |                                          | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      |
|----|------------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <b><i>Geodermatophilus</i> sp. Z2R53</b> | ---   | 24/1466 | 31/1466 | 37/1434 | 36/1464 | 44/1465 | 41/1462 | 42/1464 | 65/1466 | 44/1435 | 56/1445 |
| 2  | <i>G. saharensis</i> CF5/5               | 98.36 | ---     | 25/1466 | 32/1434 | 30/1464 | 38/1465 | 33/1463 | 37/1464 | 54/1466 | 38/1435 | 60/1445 |
| 3  | <i>G. tzadiensis</i> CF5/2               | 97.89 | 98.29   | ---     | 24/1435 | 23/1465 | 23/1466 | 28/1463 | 32/1465 | 40/1467 | 36/1436 | 54/1446 |
| 4  | <i>G. normandii</i> CF5/3                | 97.42 | 97.77   | 98.33   | ---     | 35/1433 | 41/1434 | 28/1432 | 40/1433 | 35/1435 | 41/1433 | 57/1433 |
| 5  | <i>G. africanus</i> CF11/1               | 97.54 | 97.95   | 98.43   | 97.56   | ---     | 35/1467 | 37/1461 | 13/1466 | 52/1467 | 19/1437 | 43/1447 |
| 6  | <i>G. arenarius</i> CF5/4                | 97.00 | 97.41   | 98.43   | 97.14   | 97.61   | ---     | 22/1462 | 35/1467 | 51/1468 | 37/1438 | 53/1448 |
| 7  | <i>G. nigrescens</i> YIM 75980           | 97.20 | 97.74   | 98.09   | 98.04   | 97.47   | 98.50   | ---     | 35/1461 | 55/1463 | 33/1432 | 56/1442 |
| 8  | <i>G. obscurus</i> DSM 43160             | 97.13 | 97.47   | 97.82   | 97.21   | 99.11   | 97.61   | 97.60   | ---     | 61/1467 | 13/1438 | 35/1448 |
| 9  | <i>G. telluris</i> CF9/1/1               | 95.57 | 96.32   | 97.27   | 97.56   | 96.46   | 96.53   | 96.24   | 95.84   | ---     | 63/1438 | 79/1448 |
| 10 | <i>G. siccatatus</i> CF6/1               | 96.93 | 97.35   | 97.49   | 97.14   | 98.68   | 97.43   | 97.70   | 99.10   | 95.62   | ---     | 30/1438 |
| 11 | <i>G. ruber</i> CPCC 201356              | 96.12 | 95.85   | 96.27   | 96.02   | 97.03   | 96.34   | 96.12   | 97.58   | 94.54   | 97.91   | ---     |



**Şekil 4.6.** *Kribbella* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'dir ve dış grup olarak *Streptosporangium roseum* DSM 43021<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.9.** *Kribbella* cinsine ait test izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                    | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      |
|----|------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Kribbella</i> sp. H2R4          | ---   | 23/1357 | 6/1364  | 21/1357 | 23/1357 | 10/1364 | 23/1357 | 13/1364 | 17/1364 | 17/1362 | 20/1357 | 23/1354 | 12/1296 | 19/1296 |
| 2  | <i>Kribbella</i> sp. H2R22         | 98.31 | ---     | 23/1357 | 17/1357 | 14/1357 | 24/1357 | 17/1357 | 22/1357 | 20/1357 | 26/1355 | 21/1357 | 19/1354 | 21/1289 | 14/1296 |
| 3  | <i>Kribbella</i> sp. H3R5          | 99.56 | 98.31   | ---     | 24/1357 | 27/1357 | 14/1364 | 23/1357 | 18/1364 | 17/1364 | 22/1362 | 22/1357 | 26/1354 | 6/1296  | 21/1296 |
| 4  | <i>K. albertanoniae</i> BC640      | 98.45 | 98.75   | 98.23   | ---     | 12/1357 | 19/1357 | 16/1357 | 13/1357 | 21/1357 | 17/1355 | 17/1357 | 4/1354  | 22/1289 | 11/1296 |
| 5  | <i>K. flavida</i> DSM 17836        | 98.31 | 98.97   | 98.01   | 99.12   | ---     | 24/1357 | 15/1357 | 16/1357 | 22/1357 | 20/1355 | 13/1357 | 14/1354 | 25/1289 | 13/1296 |
| 6  | <i>K. shirazensis</i> UTM 693      | 99.27 | 98.23   | 98.97   | 98.60   | 98.23   | ---     | 23/1357 | 13/1364 | 13/1364 | 17/1362 | 29/1357 | 21/1354 | 8/1296  | 17/1296 |
| 7  | <i>K. ginsengisoli</i> Gsoli 001   | 98.31 | 98.75   | 98.31   | 98.82   | 98.89   | 98.31   | ---     | 22/1357 | 24/1357 | 26/1355 | 16/1357 | 18/1354 | 21/1289 | 16/1296 |
| 8  | <i>K. hippodromi</i> S1.4          | 99.05 | 98.38   | 98.68   | 99.04   | 98.82   | 99.05   | 98.38   | ---     | 15/1364 | 4/1362  | 23/1357 | 15/1354 | 16/1296 | 15/1296 |
| 9  | <i>K. aluminosa</i> HKI 0478       | 98.75 | 98.53   | 98.75   | 98.45   | 98.38   | 99.05   | 98.23   | 98.90   | ---     | 19/1362 | 23/1357 | 23/1354 | 11/1296 | 17/1296 |
| 10 | <i>K. solani</i> DSA1              | 98.75 | 98.08   | 98.38   | 98.75   | 98.52   | 98.75   | 98.08   | 99.71   | 98.60   | ---     | 27/1355 | 19/1352 | 20/1294 | 19/1294 |
| 11 | <i>K. sancticallisti</i> BC633     | 98.53 | 98.45   | 98.38   | 98.75   | 99.04   | 97.86   | 98.82   | 98.31   | 98.31   | 98.01   | ---     | 19/1354 | 28/1289 | 18/1296 |
| 12 | <i>K. sandramycini</i> ATCC 39419  | 98.30 | 98.60   | 98.08   | 99.70   | 98.97   | 98.45   | 98.67   | 98.89   | 98.30   | 98.59   | 98.60   | ---     | 24/1286 | 13/1293 |
| 13 | <i>K. karoensis</i> DSM 17344      | 99.07 | 98.37   | 99.54   | 98.29   | 98.06   | 99.38   | 98.37   | 98.77   | 99.15   | 98.45   | 97.83   | 98.13   | ---     | 19/1289 |
| 14 | <i>K. swartbergensis</i> DSM 17345 | 98.53 | 98.92   | 98.38   | 99.15   | 99.00   | 98.69   | 98.77   | 98.84   | 98.69   | 98.53   | 98.61   | 98.99   | 98.53   | ---     |



**Şekil 4.7.** *Micromonospora* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'dir ve dış grup olarak *Streptomyces ambofaciens* NBRC 12836<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.10.** *Micromonospora* cinsine ait K2F72, K2R47, K2R49, K2R55, K2S19, K2S20, Z1R61 ve Z1R8 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                 | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      |
|----|---------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Micromonospora</i> sp. K2F72 | ---   | 18/1401 | 15/1401 | 13/1401 | 13/1401 | 15/1401 | 12/1401 | 14/1401 | 20/1399 | 22/1399 | 19/1401 | 17/1400 | 17/1400 |
| 2  | <i>Micromonospora</i> sp. K2R47 | 98.72 | ---     | 11/1401 | 11/1401 | 11/1401 | 11/1401 | 11/1401 | 13/1401 | 22/1399 | 27/1399 | 2/1402  | 31/1400 | 23/1400 |
| 3  | <i>Micromonospora</i> sp. K2R49 | 98.93 | 99.21   | ---     | 2/1401  | 2/1401  | 4/1401  | 6/1401  | 6/1401  | 13/1401 | 20/1401 | 12/1401 | 24/1400 | 22/1400 |
| 4  | <i>Micromonospora</i> sp. K2R55 | 99.07 | 99.21   | 99.86   | ---     | 0/1401  | 2/1401  | 4/1401  | 4/1401  | 11/1399 | 18/1399 | 12/1401 | 22/1400 | 20/1400 |
| 5  | <i>Micromonospora</i> sp. K2S19 | 99.07 | 99.21   | 99.86   | 100.00  | ---     | 2/1401  | 4/1401  | 4/1401  | 11/1399 | 18/1399 | 12/1401 | 22/1400 | 20/1400 |
| 6  | <i>Micromonospora</i> sp. K2S20 | 98.93 | 99.21   | 99.71   | 99.86   | 99.86   | ---     | 6/1401  | 2/1401  | 13/1399 | 20/1399 | 12/1401 | 24/1400 | 18/1400 |
| 7  | <i>Micromonospora</i> sp. Z1R61 | 99.14 | 99.21   | 99.57   | 99.71   | 99.71   | 99.57   | ---     | 6/1401  | 13/1399 | 22/1399 | 12/1401 | 22/1400 | 20/1400 |
| 8  | <i>Micromonospora</i> sp. Z1R8  | 99.00 | 99.07   | 99.57   | 99.71   | 99.71   | 99.86   | 99.57   | ---     | 12/1399 | 21/1399 | 14/1401 | 23/1400 | 18/1400 |
| 9  | <i>M. chokoriensis</i> 2-19/6   | 98.57 | 98.43   | 99.07   | 99.21   | 99.21   | 99.07   | 99.07   | 99.14   | ---     | 9/1399  | 23/1399 | 20/1398 | 23/1398 |
| 10 | <i>M. lupini</i> Lupac 14N      | 98.43 | 98.07   | 98.57   | 98.71   | 98.71   | 98.57   | 98.43   | 98.50   | 99.36   | ---     | 28/1399 | 24/1398 | 29/1398 |
| 11 | <i>M. zamorensis</i> CR38       | 98.64 | 99.86   | 99.14   | 99.14   | 99.14   | 99.14   | 99.14   | 99.00   | 98.36   | 98.00   | ---     | 32/1400 | 24/1400 |
| 12 | <i>M. mirobrigensis</i> WA201   | 98.79 | 97.79   | 98.29   | 98.43   | 98.43   | 98.29   | 98.43   | 98.36   | 98.57   | 98.28   | 97.71   | ---     | 20/1399 |
| 13 | <i>M. krabiensis</i> MA-2       | 98.79 | 98.36   | 98.43   | 98.57   | 98.57   | 98.71   | 98.57   | 98.71   | 98.35   | 97.93   | 98.29   | 98.57   | ---     |

**Çizelge 4.11.** *Micromonospora* cinsine ait K2F73 ve K2R33 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

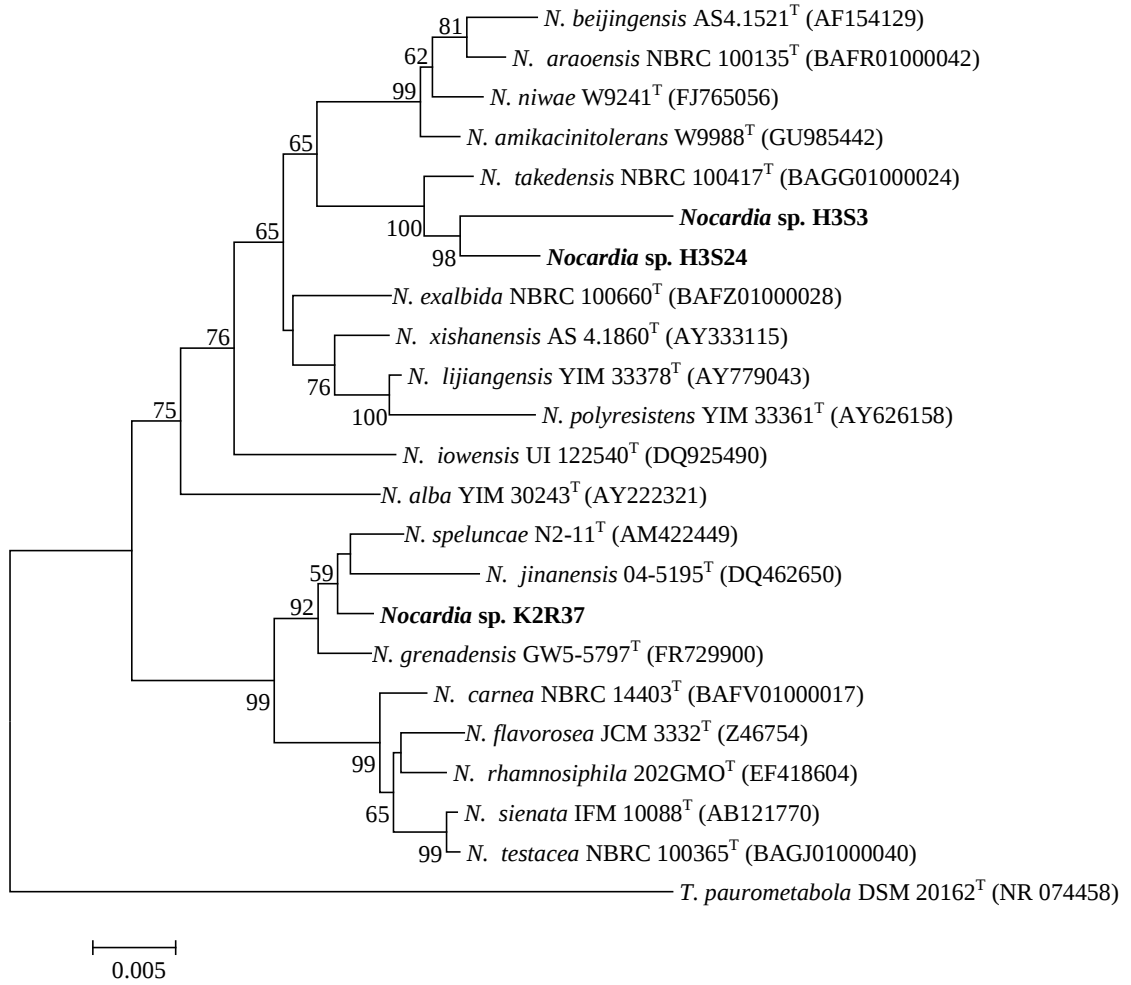
|    |                                        | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      | 15      | 16      |
|----|----------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Micromonospora</i> sp. K2F73        | ---   | 35/1386 | 33/1397 | 32/1397 | 32/1397 | 21/1397 | 25/1397 | 11/1396 | 13/1397 | 15/1397 | 21/1397 | 19/1396 | 21/1397 | 22/1397 | 13/1392 | 5/1396  |
| 2  | <i>Micromonospora</i> sp. K2R33        | 97.47 | ---     | 29/1386 | 25/1386 | 27/1386 | 26/1386 | 28/1386 | 38/1385 | 35/1386 | 37/1386 | 22/1386 | 21/1385 | 27/1386 | 31/1386 | 34/1382 | 37/1385 |
| 3  | <i>M.matsumotoense</i> IMSNU 22003     | 97.64 | 97.91   | ---     | 18/1397 | 15/1397 | 19/1397 | 26/1397 | 29/1396 | 35/1397 | 35/1397 | 22/1397 | 22/1396 | 25/1397 | 27/1397 | 29/1392 | 32/1396 |
| 4  | <i>M.wenchangensis</i> 2602GPT1-05     | 97.71 | 98.20   | 98.71   | ---     | 13/1397 | 22/1397 | 21/1397 | 27/1396 | 33/1397 | 31/1397 | 20/1397 | 20/1396 | 21/1397 | 24/1397 | 29/1392 | 33/1396 |
| 5  | <i>M.haikouensis</i> 232617            | 97.71 | 98.05   | 98.93   | 99.07   | ---     | 20/1397 | 23/1397 | 29/1396 | 34/1397 | 29/1397 | 22/1397 | 21/1396 | 22/1397 | 26/1397 | 22/1392 | 31/1396 |
| 6  | <i>M.humi</i> P0402                    | 98.50 | 98.12   | 98.64   | 98.43   | 98.57   | ---     | 15/1397 | 20/1396 | 20/1397 | 22/1397 | 16/1397 | 11/1396 | 10/1397 | 14/1397 | 14/1392 | 20/1396 |
| 7  | <i>M.aurantiaca</i> ATCC 27029         | 98.21 | 97.98   | 98.14   | 98.50   | 98.35   | 98.93   | ---     | 23/1396 | 22/1397 | 27/1397 | 11/1397 | 9/1396  | 6/1397  | 5/1397  | 23/1392 | 20/1396 |
| 8  | <i>M.auratinigra</i> TT1-11            | 99.21 | 97.26   | 97.92   | 98.07   | 97.92   | 98.57   | 98.35   | ---     | 11/1396 | 20/1396 | 21/1396 | 18/1395 | 19/1396 | 20/1396 | 17/1391 | 8/1395  |
| 9  | <i>M.citrea</i> DSM 43903              | 99.07 | 97.47   | 97.49   | 97.64   | 97.57   | 98.57   | 98.43   | 99.21   | ---     | 16/1397 | 18/1397 | 15/1396 | 16/1397 | 19/1397 | 14/1392 | 10/1396 |
| 10 | <i>M.viridifaciens</i> DSM 43909       | 98.93 | 97.33   | 97.49   | 97.78   | 97.92   | 98.43   | 98.07   | 98.57   | 98.85   | ---     | 23/1397 | 22/1396 | 23/1397 | 25/1397 | 11/1392 | 18/1396 |
| 11 | <i>M.purpureochromogenes</i> DSM 43821 | 98.50 | 98.41   | 98.43   | 98.57   | 98.43   | 98.85   | 99.21   | 98.50   | 98.71   | 98.35   | ---     | 9/1396  | 13/1397 | 16/1397 | 23/1392 | 18/1396 |
| 12 | <i>M.coxensis</i> 2-30-b/28            | 98.64 | 98.48   | 98.42   | 98.57   | 98.50   | 99.21   | 99.36   | 98.71   | 98.93   | 98.42   | 99.36   | ---     | 7/1396  | 12/1396 | 17/1391 | 17/1395 |
| 13 | <i>M.maritima</i> D10-9-5              | 98.50 | 98.05   | 98.21   | 98.50   | 98.43   | 99.28   | 99.57   | 98.64   | 98.85   | 98.35   | 99.07   | 99.50   | ---     | 5/1397  | 17/1392 | 18/1396 |
| 14 | <i>M.marina</i> JSM1-1                 | 98.43 | 97.76   | 98.07   | 98.28   | 98.14   | 99.00   | 99.64   | 98.57   | 98.64   | 98.21   | 98.85   | 99.14   | 99.64   | ---     | 22/1392 | 19/1396 |
| 15 | <i>M.eburnea</i> LK2-10                | 99.07 | 97.54   | 97.92   | 97.92   | 98.42   | 98.99   | 98.35   | 98.78   | 98.99   | 99.21   | 98.35   | 98.78   | 98.78   | 98.42   | ---     | 12/1391 |
| 16 | <i>M.chaiyaphumensis</i> MC5-1         | 99.64 | 97.33   | 97.71   | 97.64   | 97.78   | 98.57   | 98.57   | 99.43   | 99.28   | 98.71   | 98.71   | 98.78   | 98.71   | 98.64   | 99.14   | ---     |

**Çizelge 4.12.** *Micromonospora* cinsine ait H2F23, H2F8, H2R10, K2R35 ve Z1F35 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    |
|----|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | <i>Micromonospora</i> sp. H2F23 | ---   | 45/13 | 0/140 | 31/13 | 20/14 | 17/14 | 5/140 | 6/140 | 13/14 | 23/14 | 20/14 | 23/14 | 24/14 | 27/14 |
| 2  | <i>Micromonospora</i> sp. H2F8  | 96.7  | ---   | 45/13 | 54/13 | 38/13 | 36/13 | 50/13 | 47/13 | 40/13 | 35/13 | 40/13 | 37/13 | 43/13 | 36/13 |
| 3  | <i>Micromonospora</i> sp. H2R10 | 100.0 | 96.7  | ---   | 31/13 | 20/14 | 17/14 | 5/140 | 6/140 | 13/14 | 23/14 | 20/14 | 23/14 | 24/14 | 27/14 |
| 4  | <i>Micromonospora</i> sp. K2R35 | 97.7  | 96.1  | 97.7  | ---   | 30/13 | 24/13 | 35/13 | 30/13 | 24/13 | 33/13 | 25/13 | 31/13 | 27/13 | 28/13 |
| 5  | <i>Micromonospora</i> sp. Z1F35 | 98.5  | 97.2  | 98.5  | 97.8  | ---   | 16/13 | 25/14 | 21/14 | 11/14 | 18/13 | 16/14 | 20/13 | 19/14 | 13/14 |
| 6  | <i>M.chersina</i> DSM 44151     | 98.7  | 97.4  | 98.7  | 98.2  | 98.8  | ---   | 22/14 | 19/14 | 10/14 | 17/14 | 11/14 | 13/14 | 23/14 | 12/14 |
| 7  | <i>M.corariae</i> NAR01         | 99.6  | 96.4  | 99.6  | 97.5  | 98.2  | 98.4  | ---   | 9/140 | 18/14 | 28/14 | 25/14 | 28/14 | 29/14 | 31/14 |
| 8  | <i>M.cremea</i> CR30            | 99.5  | 96.6  | 99.5  | 97.8  | 98.5  | 98.6  | 99.3  | ---   | 17/14 | 25/14 | 23/14 | 26/14 | 26/14 | 27/14 |
| 9  | <i>M.endolithica</i> DSM 44398  | 99.0  | 97.1  | 99.0  | 98.2  | 99.2  | 99.2  | 98.7  | 98.7  | ---   | 19/14 | 11/14 | 16/14 | 22/14 | 18/14 |
| 10 | <i>M.fulviviridis</i> DSM 43906 | 98.3  | 97.4  | 98.3  | 97.6  | 98.7  | 98.7  | 98.0  | 98.2  | 98.6  | ---   | 17/14 | 18/13 | 22/13 | 22/14 |
| 11 | <i>M.halotolerans</i> CR18      | 98.5  | 97.1  | 98.5  | 98.2  | 98.8  | 99.2  | 98.2  | 98.3  | 99.2  | 98.7  | ---   | 19/14 | 22/14 | 20/14 |
| 12 | <i>M.inositola</i> DSM 43819    | 98.3  | 97.3  | 98.3  | 97.7  | 98.5  | 99.0  | 98.0  | 98.1  | 98.8  | 98.7  | 98.6  | ---   | 29/14 | 19/14 |
| 13 | <i>M.peucetia</i> DSM 43363     | 98.2  | 96.9  | 98.2  | 98.0  | 98.6  | 98.3  | 97.9  | 98.1  | 98.4  | 98.4  | 98.4  | 97.9  | ---   | 26/14 |
| 14 | <i>M.rosaria</i> DSM 803        | 98.0  | 97.4  | 98.0  | 98.0  | 99.0  | 99.1  | 97.7  | 98.0  | 98.7  | 98.4  | 98.5  | 98.6  | 98.1  | ---   |

**Çizelge 4.13.** *Micromonospora* cinsine ait H3F25 ve H3F6 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|          |                                        | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> |
|----------|----------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>1</b> | <b><i>Micromonospora</i> sp. H3F25</b> | ---      | 4/1400   | 20/1400  | 22/1400  | 24/1400  | 26/1400  |
| <b>2</b> | <b><i>Micromonospora</i> sp. H3F6</b>  | 99.71    | ---      | 18/1401  | 20/1401  | 22/1401  | 24/1401  |
| <b>3</b> | <i>M.narathiwatensis</i> BTG4-1        | 98.57    | 98.72    | ---      | 32/1401  | 32/1401  | 20/1402  |
| <b>4</b> | <i>M.olivasterospora</i> DSM 43868     | 98.43    | 98.57    | 97.72    | ---      | 20/1401  | 35/1401  |
| <b>5</b> | <i>M.rhizosphaerae</i> 211018          | 98.29    | 98.43    | 97.72    | 98.57    | ---      | 33/1401  |
| <b>6</b> | <i>M.spongicola</i> S3-1               | 98.14    | 98.29    | 98.57    | 97.50    | 97.64    | ---      |



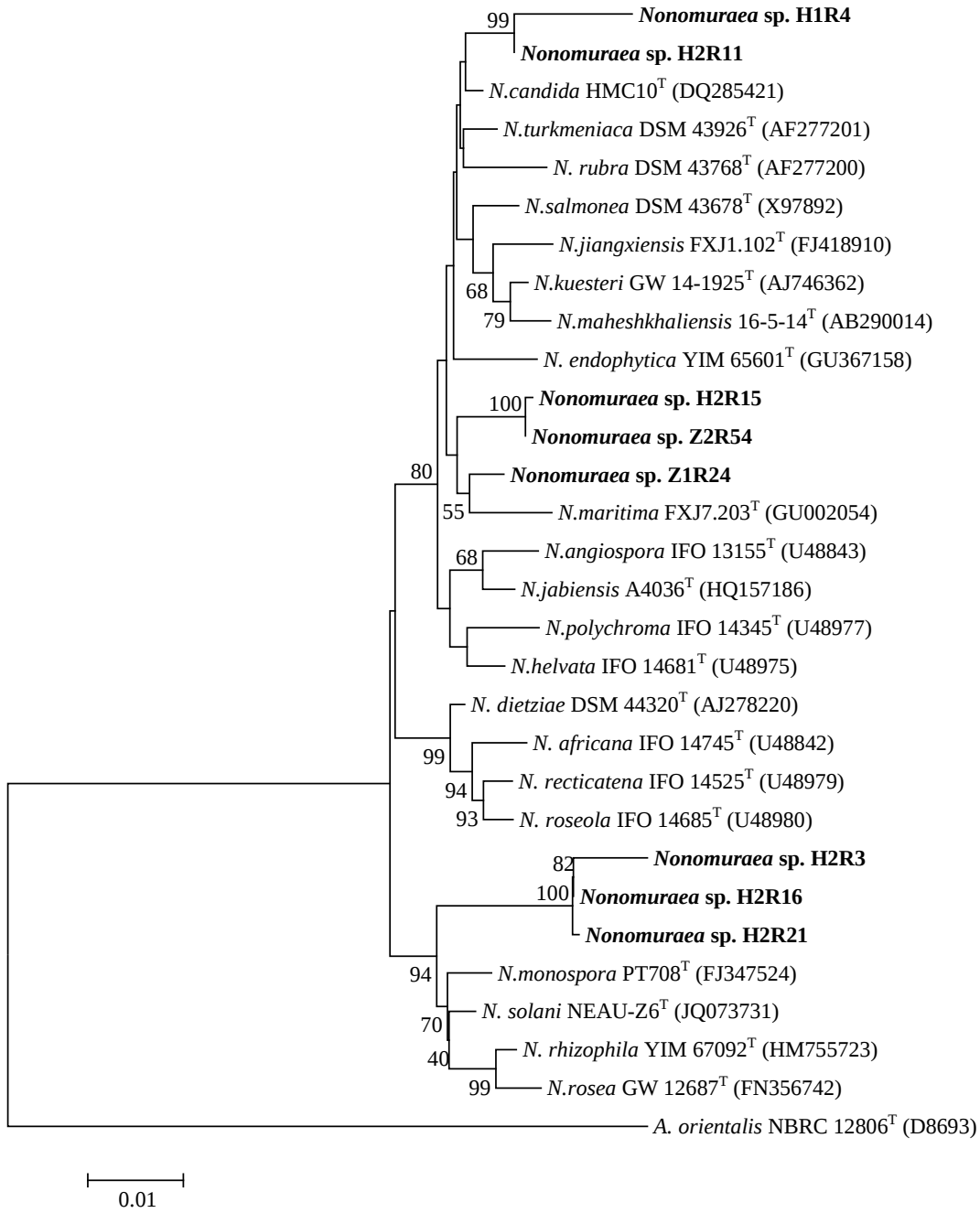
**Şekil 4.8.** *Nocardia* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 0.05'tir ve dış grup olarak *Tsukamurella paurometabola* DSM 20162<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.14.** *Nocardia* cinsine ait H3S3 ve H3S24 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                  | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      |
|----|----------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Nocardia</i> sp. H3S3         | ---   | 24/1395 | 46/1394 | 48/1395 | 47/1395 | 44/1395 | 28/1395 | 48/1395 | 46/1395 | 41/1395 | 52/1392 | 51/1395 | 57/1392 |
| 2  | <i>Nocardia</i> sp. H3S24        | 98.28 | ---     | 30/1402 | 31/1403 | 30/1403 | 27/1403 | 10/1403 | 31/1403 | 29/1403 | 23/1403 | 34/1400 | 34/1403 | 43/1400 |
| 3  | <i>N.beijingensis</i> AS4.1521   | 96.70 | 97.86   | ---     | 10/1402 | 14/1402 | 12/1402 | 29/1402 | 26/1402 | 32/1402 | 38/1402 | 49/1399 | 40/1402 | 57/1399 |
| 4  | <i>N.araoensis</i> NBRC 100135   | 96.56 | 97.79   | 99.29   | ---     | 12/1403 | 11/1403 | 26/1403 | 22/1403 | 27/1403 | 34/1403 | 43/1400 | 36/1403 | 52/1400 |
| 5  | <i>N.niwae</i> W9241             | 96.63 | 97.86   | 99.00   | 99.14   | ---     | 10/1403 | 30/1403 | 25/1403 | 27/1403 | 29/1403 | 40/1400 | 32/1403 | 48/1400 |
| 6  | <i>N.amikacinitolerans</i> W9988 | 96.85 | 98.08   | 99.14   | 99.22   | 99.29   | ---     | 25/1403 | 23/1403 | 23/1403 | 29/1403 | 40/1400 | 30/1403 | 49/1400 |
| 7  | <i>N.takedensis</i> NBRC 100417  | 97.99 | 99.29   | 97.93   | 98.15   | 97.86   | 98.22   | ---     | 26/1403 | 27/1403 | 23/1403 | 34/1400 | 29/1403 | 42/1400 |
| 8  | <i>N.exalbida</i> NBRC 100660    | 96.56 | 97.79   | 98.15   | 98.43   | 98.22   | 98.36   | 98.15   | ---     | 15/1403 | 18/1403 | 29/1400 | 28/1403 | 38/1400 |
| 9  | <i>N.xishanensis</i> AS 4.1860   | 96.70 | 97.93   | 97.72   | 98.08   | 98.08   | 98.36   | 98.08   | 98.93   | ---     | 10/1403 | 21/1400 | 29/1403 | 33/1400 |
| 10 | <i>N.lijiangensis</i> YIM 33378  | 97.06 | 98.36   | 97.29   | 97.58   | 97.93   | 97.93   | 98.36   | 98.72   | 99.29   | ---     | 13/1400 | 30/1403 | 27/1400 |
| 11 | <i>N.polyresistens</i> YIM 33361 | 96.26 | 97.57   | 96.50   | 96.93   | 97.14   | 97.14   | 97.57   | 97.93   | 98.50   | 99.07   | ---     | 41/1400 | 37/1397 |
| 12 | <i>N.iowensis</i> UI 122540      | 96.34 | 97.58   | 97.15   | 97.43   | 97.72   | 97.86   | 97.93   | 98.00   | 97.93   | 97.86   | 97.07   | ---     | 32/1400 |
| 13 | <i>N.alba</i> YIM 30243          | 95.91 | 96.93   | 95.93   | 96.29   | 96.57   | 96.50   | 97.00   | 97.29   | 97.64   | 98.07   | 97.35   | 97.71   | ---     |

**Çizelge 4.15.** *Nocardia* cinsine ait K2R37 izolatu ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|   |                               | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       |
|---|-------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | <i>Nocardia</i> sp. K2R37     | ---   | 25/1401 | 25/1401 | 12/1401 | 13/1393 | 27/1401 | 27/1401 | 10/1401 | 27/1401 |
| 2 | <i>N.carnea</i> NBRC 14403    | 98.22 | ---     | 12/1401 | 20/1401 | 28/1393 | 9/1401  | 12/1401 | 24/1401 | 12/1401 |
| 3 | <i>N.flavorosea</i> JCM 3332  | 98.22 | 99.14   | ---     | 23/1401 | 34/1393 | 10/1401 | 12/1401 | 28/1401 | 12/1401 |
| 4 | <i>N.grenadensis</i> GW5-5797 | 99.14 | 98.57   | 98.36   | ---     | 15/1393 | 19/1401 | 23/1401 | 12/1401 | 21/1401 |
| 5 | <i>N.jinanensis</i> 04-5195   | 99.07 | 97.99   | 97.56   | 98.92   | ---     | 32/1393 | 34/1393 | 15/1393 | 36/1393 |
| 6 | <i>N.rhamnosiphila</i> 202GMO | 98.07 | 99.36   | 99.29   | 98.64   | 97.70   | ---     | 10/1401 | 26/1401 | 10/1401 |
| 7 | <i>N.sienata</i> IFM 10088    | 98.07 | 99.14   | 99.14   | 98.36   | 97.56   | 99.29   | ---     | 30/1401 | 2/1401  |
| 8 | <i>N.speluncae</i> N2-11      | 99.29 | 98.29   | 98.00   | 99.14   | 98.92   | 98.14   | 97.86   | ---     | 30/1401 |
| 9 | <i>N.testacea</i> NBRC 100365 | 98.07 | 99.14   | 99.14   | 98.50   | 97.42   | 99.29   | 99.86   | 97.86   | ---     |



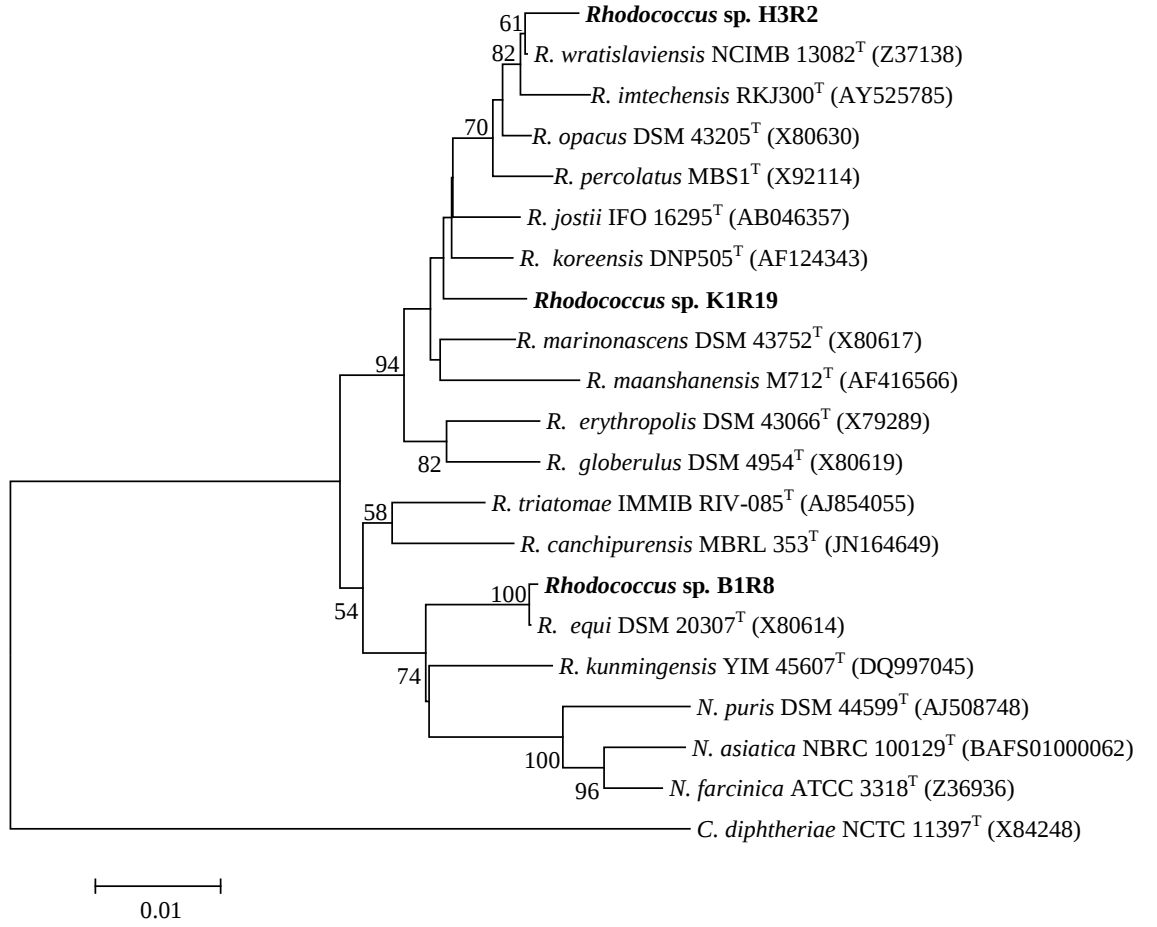
**Şekil 4.9.** *Nonomuraea* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'dir ve dış grup olarak *Amycolatopsis orientalis* NBRC 12806<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.16.** *Nonomuraea* cinsine ait H1R4, H2R11, H2R15, Z1R24 ve Z2R54 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                   | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      |
|----|-----------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Nonomuraea</i> sp. H1R4        | ---   | 17/1364 | 51/1362 | 39/1364 | 50/1361 | 26/1363 | 34/1363 | 37/1364 | 32/1361 | 49/1364 | 40/1362 | 45/1362 | 39/1364 | 54/1360 |
| 2  | <i>Nonomuraea</i> sp. H2R11       | 98.75 | ---     | 34/1362 | 22/1364 | 33/1361 | 9/1363  | 17/1363 | 25/1364 | 15/1361 | 32/1364 | 23/1362 | 28/1362 | 22/1364 | 37/1360 |
| 3  | <i>Nonomuraea</i> sp. H2R15       | 96.26 | 97.50   | ---     | 29/1364 | 1/1363  | 28/1361 | 26/1363 | 36/1363 | 34/1361 | 34/1364 | 28/1362 | 29/1362 | 36/1364 | 33/1362 |
| 4  | <i>Nonomuraea</i> sp. Z1R24       | 97.14 | 98.39   | 97.87   | ---     | 28/1363 | 19/1363 | 14/1365 | 32/1365 | 31/1363 | 33/1366 | 26/1364 | 31/1364 | 30/1366 | 27/1362 |
| 5  | <i>Nonomuraea</i> sp. Z2R54       | 96.33 | 97.58   | 99.93   | 97.95   | ---     | 27/1360 | 25/1362 | 35/1362 | 33/1360 | 33/1363 | 27/1361 | 28/1361 | 35/1363 | 32/1361 |
| 6  | <i>N.candida</i> HMC10            | 98.09 | 99.34   | 97.94   | 98.61   | 98.01   | ---     | 11/1362 | 19/1363 | 14/1360 | 24/1363 | 19/1361 | 24/1361 | 20/1363 | 32/1360 |
| 7  | <i>N.turkmeniaca</i> DSM 43926    | 97.51 | 98.75   | 98.09   | 98.97   | 98.16   | 99.19   | ---     | 22/1364 | 23/1363 | 24/1365 | 23/1364 | 28/1364 | 21/1365 | 30/1361 |
| 8  | <i>N.rubra</i> DSM 43768          | 97.29 | 98.17   | 97.36   | 97.66   | 97.43   | 98.61   | 98.39   | ---     | 28/1362 | 33/1365 | 30/1363 | 35/1363 | 29/1365 | 36/1361 |
| 9  | <i>N.salmonella</i> DSM 43678     | 97.65 | 98.90   | 97.50   | 97.73   | 97.57   | 98.97   | 98.31   | 97.94   | ---     | 26/1363 | 20/1363 | 21/1363 | 23/1363 | 33/1359 |
| 10 | <i>N.jiangxiensis</i> FXJ1.102    | 96.41 | 97.65   | 97.51   | 97.58   | 97.58   | 98.24   | 98.24   | 97.58   | 98.09   | ---     | 19/1364 | 24/1364 | 39/1366 | 38/1362 |
| 11 | <i>N.kuesteri</i> GW 14-1925      | 97.06 | 98.31   | 97.94   | 98.09   | 98.02   | 98.60   | 98.31   | 97.80   | 98.53   | 98.61   | ---     | 8/1364  | 34/1364 | 34/1360 |
| 12 | <i>N.maheshkhaliensis</i> 16-5-14 | 96.70 | 97.94   | 97.87   | 97.73   | 97.94   | 98.24   | 97.95   | 97.43   | 98.46   | 98.24   | 99.41   | ---     | 35/1364 | 35/1360 |
| 13 | <i>N.endophytica</i> YIM 65601    | 97.14 | 98.39   | 97.36   | 97.80   | 97.43   | 98.53   | 98.46   | 97.88   | 98.31   | 97.14   | 97.51   | 97.43   | ---     | 38/1362 |
| 14 | <i>N.maritima</i> FXJ7.203        | 96.03 | 97.28   | 97.58   | 98.02   | 97.65   | 97.65   | 97.80   | 97.35   | 97.57   | 97.21   | 97.50   | 97.43   | 97.21   | ---     |

**Çizelge 4.17.** *Nonomuraea* cinsine ait H2R3, H2R16 ve H2R21 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      |
|----|--------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Nonomuraea</i> sp. H2R3     | ---   | 10/1362 | 11/1362 | 48/1355 | 46/1361 | 61/1359 | 54/1357 | 52/1358 | 50/1358 | 48/1358 | 46/1354 | 44/1363 | 52/1363 | 48/1360 |
| 2  | <i>Nonomuraea</i> sp. H2R16    | 99.27 | ---     | 1/1364  | 38/1357 | 36/1363 | 51/1361 | 44/1359 | 42/1360 | 40/1360 | 40/1360 | 36/1355 | 34/1364 | 42/1364 | 38/1361 |
| 3  | <i>Nonomuraea</i> sp. H2R21    | 99.19 | 99.93   | ---     | 39/1357 | 37/1363 | 52/1361 | 45/1359 | 43/1360 | 39/1360 | 41/1360 | 37/1355 | 35/1364 | 43/1364 | 39/1361 |
| 4  | <i>N.angiospora</i> IFO 13155  | 96.46 | 97.20   | 97.13   | ---     | 12/1358 | 27/1358 | 15/1357 | 32/1359 | 32/1358 | 32/1359 | 50/1349 | 46/1357 | 55/1358 | 56/1355 |
| 5  | <i>N.jabiensis</i> A4036       | 96.62 | 97.36   | 97.29   | 99.12   | ---     | 29/1361 | 22/1360 | 39/1361 | 38/1361 | 38/1361 | 47/1354 | 37/1363 | 46/1364 | 46/1361 |
| 6  | <i>N.polychroma</i> IFO 14345  | 95.51 | 96.25   | 96.18   | 98.01   | 97.87   | ---     | 16/1360 | 35/1361 | 39/1361 | 40/1360 | 55/1352 | 45/1361 | 58/1362 | 52/1360 |
| 7  | <i>N.helvata</i> IFO 14681     | 96.02 | 96.76   | 96.69   | 98.89   | 98.38   | 98.82   | ---     | 25/1360 | 30/1359 | 31/1360 | 49/1350 | 43/1359 | 52/1360 | 54/1358 |
| 8  | <i>N.africana</i> IFO 14745    | 96.17 | 96.91   | 96.84   | 97.65   | 97.13   | 97.43   | 98.16   | ---     | 17/1361 | 17/1361 | 46/1351 | 42/1360 | 49/1361 | 53/1358 |
| 9  | <i>N.recticatena</i> IFO 14525 | 96.32 | 97.06   | 97.13   | 97.64   | 97.21   | 97.13   | 97.79   | 98.75   | ---     | 8/1360  | 41/1351 | 44/1360 | 45/1361 | 51/1358 |
| 10 | <i>N.roseola</i> IFO 14685     | 96.47 | 97.06   | 96.99   | 97.65   | 97.21   | 97.06   | 97.72   | 98.75   | 99.41   | ---     | 40/1351 | 43/1360 | 46/1361 | 51/1358 |
| 11 | <i>N.monospora</i> PT708       | 96.60 | 97.34   | 97.27   | 96.29   | 96.53   | 95.93   | 96.37   | 96.60   | 96.97   | 97.04   | ---     | 15/1356 | 26/1356 | 27/1353 |
| 12 | <i>N.solani</i> NEAU-Z6        | 96.77 | 97.51   | 97.43   | 96.61   | 97.29   | 96.69   | 96.84   | 96.91   | 96.76   | 96.84   | 98.89   | ---     | 24/1365 | 20/1362 |
| 13 | <i>N.rhizophila</i> YIM 670    | 96.18 | 96.92   | 96.85   | 95.95   | 96.63   | 95.74   | 96.18   | 96.40   | 96.69   | 96.62   | 98.08   | 98.24   | ---     | 13/1363 |
| 14 | <i>N.rosea</i> GW 12687        | 96.47 | 97.21   | 97.13   | 95.87   | 96.62   | 96.18   | 96.02   | 96.10   | 96.24   | 96.24   | 98.00   | 98.53   | 99.05   | ---     |



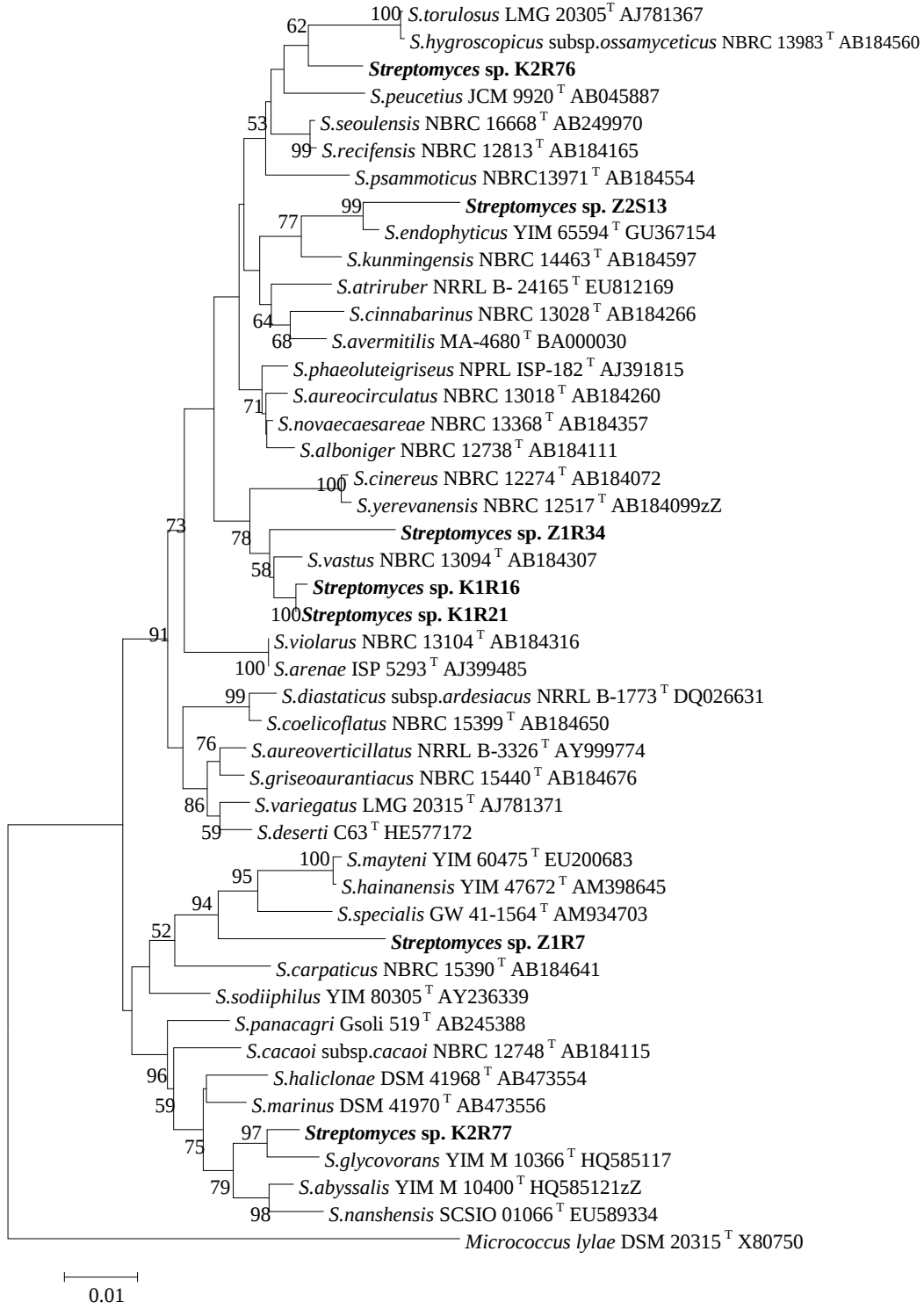
**Şekil 4.10.** *Rhodococcus* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'dir ve dış grup olarak *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 11397<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.18.** *Rhodococcus* cinsine ait H3R2 ve K1R19 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                      | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      |
|----|--------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <b><i>Rhodococcus</i> sp. H3R2</b>   | ---   | 29/1442 | 10/1443 | 20/1443 | 16/1442 | 24/1429 | 32/1442 | 36/1436 | 32/1441 | 43/1411 | 44/1441 | 46/1443 |
| 2  | <b><i>Rhodococcus</i> sp. K1R19</b>  | 97.99 | ---     | 24/1442 | 28/1442 | 25/1441 | 23/1428 | 21/1442 | 22/1436 | 21/1441 | 31/1411 | 30/1441 | 28/1442 |
| 3  | <i>R.wratislaviensis</i> NCIMB 13082 | 99.31 | 98.34   | ---     | 10/1443 | 6/1442  | 14/1429 | 22/1442 | 26/1436 | 22/1441 | 37/1411 | 34/1441 | 36/1443 |
| 4  | <i>R.imtechensis</i> RKJ300          | 98.61 | 98.06   | 99.31   | ---     | 16/1442 | 20/1429 | 26/1442 | 30/1436 | 32/1441 | 41/1411 | 38/1441 | 40/1443 |
| 5  | <i>R.opacus</i> DSM 43205            | 98.89 | 98.27   | 99.58   | 98.89   | ---     | 11/1428 | 23/1441 | 24/1435 | 21/1440 | 36/1410 | 37/1440 | 37/1442 |
| 6  | <i>R.percolatus</i> MBS1             | 98.32 | 98.39   | 99.02   | 98.60   | 99.23   | ---     | 21/1428 | 22/1422 | 23/1427 | 34/1397 | 35/1427 | 35/1429 |
| 7  | <i>R.koreensis</i> DNP505            | 97.78 | 98.54   | 98.47   | 98.20   | 98.40   | 98.53   | ---     | 18/1436 | 22/1441 | 34/1411 | 31/1441 | 24/1442 |
| 8  | <i>R.jostii</i> IFO 16295            | 97.49 | 98.47   | 98.19   | 97.91   | 98.33   | 98.45   | 98.75   | ---     | 26/1436 | 33/1406 | 34/1435 | 29/1436 |
| 9  | <i>R.marinonascens</i> DSM 43752     | 97.78 | 98.54   | 98.47   | 97.78   | 98.54   | 98.39   | 98.47   | 98.19   | ---     | 31/1410 | 27/1440 | 34/1441 |
| 10 | <i>R.maanshanensis</i> M712          | 96.95 | 97.80   | 97.38   | 97.09   | 97.45   | 97.57   | 97.59   | 97.65   | 97.80   | ---     | 34/1410 | 45/1411 |
| 11 | <i>R.erythropolis</i> DSM 43066      | 96.95 | 97.92   | 97.64   | 97.36   | 97.43   | 97.55   | 97.85   | 97.63   | 98.13   | 97.59   | ---     | 22/1441 |
| 12 | <i>R.globerulus</i> DSM 4954         | 96.81 | 98.06   | 97.51   | 97.23   | 97.43   | 97.55   | 98.34   | 97.98   | 97.64   | 96.81   | 98.47   | ---     |

**Çizelge 4.19.** *Rhodococcus* cinsine ait B1R8 izolatu ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|   |                                    | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       |
|---|------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | <b><i>Rhodococcus</i> sp. B1R8</b> | ---   | 44/1440 | 42/1441 | 2/1442  | 31/1418 | 43/1440 | 46/1440 | 46/1431 |
| 2 | <i>R.triatomae</i> IMMIB RIV-085   | 96.94 | ---     | 29/1441 | 42/1441 | 34/1421 | 47/1443 | 43/1443 | 42/1434 |
| 3 | <i>R.canchipurensis</i> MBRL 353   | 97.09 | 97.99   | ---     | 40/1442 | 54/1419 | 55/1441 | 49/1441 | 61/1432 |
| 4 | <i>R.equi</i> DSM 20307            | 99.86 | 97.09   | 97.23   | ---     | 30/1419 | 41/1441 | 44/1441 | 46/1432 |
| 5 | <i>R.kunmingensis</i> YIM 45607    | 97.81 | 97.61   | 96.19   | 97.89   | ---     | 41/1421 | 42/1421 | 43/1420 |
| 6 | <i>N.asiatica</i> NBRC 100129      | 97.01 | 96.74   | 96.18   | 97.15   | 97.11   | ---     | 18/1443 | 26/1434 |
| 7 | <i>N.farcinica</i> ATCC 3318       | 96.81 | 97.02   | 96.60   | 96.95   | 97.04   | 98.75   | ---     | 29/1434 |
| 8 | <i>N.puris</i> DSM 44599           | 96.79 | 97.07   | 95.74   | 96.79   | 96.97   | 98.19   | 97.98   | ---     |



**Şekil 4.11.** *Streptomyces* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rRNA baz dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda % 50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Nükleotit pozisyon değişimi % 1'dir ve dış grup olarak *Micrococcus lylae* DSM 20315<sup>T</sup> kullanılmıştır.

**Çizelge 4.20.** *Streptomyces* cinsine ait K2R76 ve Z2S13 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                                                  | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      | 15      | 16      |
|----|------------------------------------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Streptomyces</i> sp. K2R76                                    | ---   | 67/1442 | 29/1444 | 30/1444 | 31/1444 | 26/1444 | 27/1443 | 28/1444 | 46/1444 | 33/1443 | 41/1444 | 47/1444 | 44/1444 | 42/1444 | 45/1444 | 37/1436 |
| 2  | <i>Streptomyces</i> sp. Z2S13                                    | 95.35 | ---     | 80/1442 | 81/1442 | 78/1442 | 62/1442 | 63/1441 | 63/1442 | 25/1442 | 42/1441 | 52/1442 | 47/1442 | 57/1442 | 60/1442 | 51/1434 |         |
| 3  | <i>S.torulosus</i> LMG 20305                                     | 97.99 | 94.45   | ---     | 1/1445  | 50/1444 | 48/1444 | 46/1443 | 39/1445 | 59/1444 | 42/1443 | 45/1444 | 44/1444 | 44/1444 | 45/1444 | 48/1444 | 41/1436 |
| 4  | <i>S.hygroscopicus</i> subsp.<br><i>ossamyceticus</i> NBRC 13983 | 97.92 | 94.38   | 99.93   | ---     | 49/1444 | 49/1444 | 47/1443 | 40/1445 | 60/1444 | 43/1443 | 46/1444 | 45/1444 | 45/1444 | 46/1444 | 49/1444 | 42/1436 |
| 5  | <i>S.peucetius</i> JCM 9920                                      | 97.85 | 94.59   | 96.54   | 96.61   | ---     | 26/1444 | 28/1443 | 48/1444 | 63/1444 | 50/1443 | 47/1444 | 52/1444 | 48/1444 | 33/1444 | 36/1444 | 38/1436 |
| 6  | <i>S.seoulensis</i> NBRC 16668                                   | 98.20 | 95.70   | 96.68   | 96.61   | 98.20   | ---     | 3/1443  | 32/1444 | 47/1444 | 42/1443 | 35/1444 | 45/1444 | 39/1444 | 22/1444 | 27/1444 | 25/1436 |
| 7  | <i>S.recifensis</i> NBRC 12813                                   | 98.13 | 95.63   | 96.81   | 96.74   | 98.06   | 99.79   | ---     | 30/1443 | 48/1443 | 40/1442 | 35/1443 | 43/1443 | 39/1443 | 22/1443 | 27/1443 | 25/1435 |
| 8  | <i>S.psammodicus</i> NBRC1397                                    | 98.06 | 95.63   | 97.30   | 97.23   | 96.68   | 97.78   | 97.92   | ---     | 42/1444 | 31/1443 | 33/1444 | 39/1444 | 39/1444 | 34/1444 | 38/1444 | 34/1436 |
| 9  | <i>S.endophyticus</i> YIM 65594T                                 | 96.81 | 98.27   | 95.91   | 95.84   | 95.64   | 96.75   | 96.67   | 97.09   | ---     | 21/1443 | 36/1444 | 32/1444 | 40/1444 | 42/1444 | 45/1444 | 40/1436 |
| 10 | <i>S.kunmingensis</i> NBRC 14463T                                | 97.71 | 97.09   | 97.09   | 97.02   | 96.53   | 97.09   | 97.23   | 97.85   | 98.54   | ---     | 33/1443 | 27/1443 | 30/1443 | 34/1443 | 35/1443 | 30/1435 |
| 11 | <i>S.atriruber</i> NRRL B-24165T                                 | 97.16 | 96.39   | 96.88   | 96.81   | 96.75   | 97.58   | 97.57   | 97.71   | 97.51   | 97.71   | ---     | 27/1444 | 21/1444 | 26/1444 | 31/1444 | 26/1436 |
| 12 | <i>S.cinnabarinus</i> NBRC 13028T                                | 96.75 | 96.74   | 96.95   | 96.88   | 96.40   | 96.88   | 97.02   | 97.30   | 97.78   | 98.13   | 98.13   | ---     | 18/1444 | 31/1444 | 34/1444 | 32/1436 |
| 13 | <i>S.avermitilis</i> MA-4680T                                    | 96.95 | 96.05   | 96.95   | 96.88   | 96.68   | 97.30   | 97.30   | 97.30   | 97.23   | 97.92   | 98.55   | 98.75   | ---     | 25/1444 | 28/1444 | 26/1436 |
| 14 | <i>S.phaeoluteigriseus</i> NPRL ISP-182                          | 97.09 | 96.05   | 96.88   | 96.81   | 97.71   | 98.48   | 98.48   | 97.65   | 97.09   | 97.64   | 98.20   | 97.85   | 98.27   | ---     | 11/1444 | 14/1436 |
| 15 | <i>S.novaecaesareae</i> NBRC 13368                               | 96.88 | 95.84   | 96.68   | 96.61   | 97.51   | 98.13   | 98.13   | 97.37   | 96.88   | 97.57   | 97.85   | 97.65   | 98.06   | 99.24   | ---     | 15/1436 |
| 16 | <i>S.alboniger</i> NBRC 12738T                                   | 97.42 | 96.44   | 97.14   | 97.08   | 97.35   | 98.26   | 98.26   | 97.63   | 97.21   | 97.91   | 98.19   | 97.77   | 98.19   | 99.03   | 98.96   | ---     |

**Çizelge 4.21.** *Streptomyces* cinsine ait Z1R34, K1R16 ve K1R21 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                                              | 1     | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10      | 11      | 12      | 13      | 14      |
|----|--------------------------------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1  | <i>Streptomyces</i> sp. Z1R34                                | ---   | 46/1444 | 44/1445 | 71/1443 | 69/1443 | 44/1444 | 67/1440 | 67/1430 | 72/1441 | 69/1443 | 72/1442 | 70/1438 | 78/1441 | 79/1432 |
| 2  | <i>Streptomyces</i> sp. K1R16                                | 96.81 | ---     | 5/1445  | 39/1444 | 35/1444 | 16/1445 | 51/1440 | 51/1430 | 57/1441 | 51/1443 | 59/1442 | 54/1438 | 64/1441 | 67/1432 |
| 3  | <i>Streptomyces</i> sp. K1R21                                | 96.96 | 99.65   | ---     | 40/1444 | 36/1444 | 15/1445 | 52/1441 | 52/1431 | 58/1442 | 52/1444 | 58/1443 | 55/1439 | 63/1442 | 66/1433 |
| 4  | <i>S.yerevanensis</i> NBRC 12517                             | 95.08 | 97.30   | 97.23   | ---     | 6/1447  | 37/1444 | 72/1441 | 72/1432 | 70/1442 | 72/1444 | 72/1443 | 66/1439 | 80/1442 | 76/1434 |
| 5  | <i>S.cinereus</i> NBRC 12274                                 | 95.22 | 97.58   | 97.51   | 99.59   | ---     | 33/1444 | 70/1441 | 70/1431 | 68/1442 | 69/1444 | 68/1443 | 62/1439 | 76/1442 | 72/1433 |
| 6  | <i>S.vastus</i> NBRC 13094 AB184307                          | 96.95 | 98.89   | 98.96   | 97.44   | 97.71   | ---     | 55/1440 | 55/1430 | 58/1441 | 50/1443 | 56/1442 | 56/1438 | 62/1441 | 64/1432 |
| 7  | <i>S.violarius</i> NBRC 13104                                | 95.35 | 96.46   | 96.39   | 95.00   | 95.14   | 96.18   | ---     | 0/1433  | 49/1441 | 39/1443 | 41/1443 | 42/1440 | 37/1443 | 26/1435 |
| 8  | <i>S.arenae</i> ISP 5293                                     | 95.31 | 96.43   | 96.37   | 94.97   | 95.11   | 96.15   | 100.00  | ---     | 49/1431 | 39/1433 | 41/1433 | 42/1430 | 37/1433 | 26/1433 |
| 9  | <i>S.diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i><br>NRRL B-1773 | 95.00 | 96.04   | 95.98   | 95.15   | 95.28   | 95.98   | 96.60   | 96.58   | ---     | 14/1445 | 42/1442 | 35/1442 | 43/1443 | 44/1434 |
| 10 | <i>S.coelicoflatus</i> NBRC 15399                            | 95.22 | 96.47   | 96.40   | 95.01   | 95.22   | 96.53   | 97.30   | 97.28   | 99.03   | ---     | 39/1444 | 40/1442 | 39/1445 | 42/1436 |
| 11 | <i>S.aureoverticillatus</i> NRRL B-3326                      | 95.01 | 95.91   | 95.98   | 95.01   | 95.29   | 96.12   | 97.16   | 97.14   | 97.09   | 97.30   | ---     | 24/1441 | 19/1444 | 24/1436 |
| 12 | <i>S.griseoaurantiacus</i> NBRC 15440                        | 95.13 | 96.24   | 96.18   | 95.41   | 95.69   | 96.11   | 97.08   | 97.06   | 97.57   | 97.23   | 98.33   | ---     | 28/1442 | 33/1433 |
| 13 | <i>S.variegatus</i> LMG 20315                                | 94.59 | 95.56   | 95.63   | 94.45   | 94.73   | 95.70   | 97.44   | 97.42   | 97.02   | 97.30   | 98.68   | 98.06   | ---     | 19/1436 |
| 14 | <i>S.deserti</i> C63                                         | 94.48 | 95.32   | 95.39   | 94.70   | 94.98   | 95.53   | 98.19   | 98.19   | 96.93   | 97.08   | 98.33   | 97.70   | 98.68   | ---     |

**Çizelge 4.22.** *Streptomyces* cinsine ait Z1R7 ve K2R77 izolatları ve tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

|    |                                                  | 1     | 2        | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       | 9       | 10       | 11      | 12       | 13      | 14      |
|----|--------------------------------------------------|-------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|
| 1  | <i>Streptomyces</i> sp. Z1R7                     | ---   | 100/1442 | 65/1441 | 62/1377 | 66/1441 | 67/1437 | 69/1443 | 82/1442 | 74/1444 | 101/1439 | 95/1430 | 104/1445 | 82/1442 | 78/1401 |
| 2  | <i>Streptomyces</i> sp. K2R77                    | 93.07 | ---      | 78/1441 | 85/1375 | 88/1440 | 68/1438 | 67/1444 | 57/1443 | 53/1445 | 36/1440  | 41/1431 | 23/1445  | 30/1443 | 35/1401 |
| 3  | <i>S. specialis</i> GW 41-1564                   | 95.49 | 94.59    | ---     | 39/1375 | 37/1440 | 53/1435 | 69/1441 | 71/1440 | 52/1443 | 76/1437  | 69/1430 | 77/1443  | 75/1440 | 74/1398 |
| 4  | <i>S. mayteni</i> YIM 60475                      | 95.50 | 93.82    | 97.16   | ---     | 10/1378 | 49/1369 | 61/1375 | 77/1374 | 62/1377 | 86/1375  | 79/1375 | 89/1377  | 73/1374 | 74/1342 |
| 5  | <i>S. hainanensis</i> YIM 47672                  | 95.42 | 93.89    | 97.43   | 99.27   | ---     | 47/1434 | 54/1440 | 71/1439 | 64/1442 | 81/1438  | 77/1431 | 93/1442  | 74/1439 | 76/1398 |
| 6  | <i>S. carpaticus</i> NBRC 15390                  | 95.34 | 95.27    | 96.31   | 96.42   | 96.72   | ---     | 45/1437 | 65/1436 | 53/1439 | 60/1433  | 60/1424 | 70/1438  | 64/1436 | 66/1394 |
| 7  | <i>S. sodiiphilus</i> YIM 80305                  | 95.22 | 95.36    | 95.21   | 95.56   | 96.25   | 96.87   | ---     | 32/1446 | 52/1445 | 52/1441  | 46/1431 | 67/1447  | 55/1445 | 61/1403 |
| 8  | <i>S. panacagri</i> Gsoli 519                    | 94.31 | 96.05    | 95.07   | 94.40   | 95.07   | 95.47   | 97.79   | ---     | 40/1444 | 45/1440  | 33/1430 | 58/1446  | 46/1444 | 53/1402 |
| 9  | <i>S. cacaoi</i> subsp. <i>cacaoi</i> NBRC 12748 | 94.88 | 96.33    | 96.40   | 95.50   | 95.56   | 96.32   | 96.40   | 97.23   | ---     | 48/1440  | 36/1432 | 60/1446  | 48/1444 | 52/1402 |
| 10 | <i>S. haliclonae</i> DSM 41968                   | 92.98 | 97.50    | 94.71   | 93.75   | 94.37   | 95.81   | 96.39   | 96.88   | 96.67   | ---      | 24/1433 | 43/1444  | 39/1440 | 48/1400 |
| 11 | <i>S. marinus</i> DSM 41970                      | 93.36 | 97.13    | 95.17   | 94.25   | 94.62   | 95.79   | 96.79   | 97.69   | 97.49   | 98.33    | ---     | 46/1434  | 36/1430 | 45/1390 |
| 12 | <i>S. glycovorans</i> YIM M 10366                | 92.80 | 98.41    | 94.66   | 93.54   | 93.55   | 95.13   | 95.37   | 95.99   | 95.85   | 97.02    | 96.79   | ---      | 36/1446 | 35/1405 |
| 13 | <i>S. abyssalis</i> YIM M 10400                  | 94.31 | 97.92    | 94.79   | 94.69   | 94.86   | 95.54   | 96.19   | 96.81   | 96.68   | 97.29    | 97.48   | 97.51    | ---     | 17/1402 |
| 14 | <i>S. nanshensis</i> SCSIO 01066                 | 94.43 | 97.50    | 94.71   | 94.49   | 94.56   | 95.27   | 95.65   | 96.22   | 96.29   | 96.57    | 96.76   | 97.51    | 98.79   | ---     |



## 5 TARTIŞMA

Geçmişte prokaryotik canlıların sınıflandırılmasında morfolojik kriterler göz önünde bulundurulmakta iken, günümüzde bakterilerin sınıflandırılması; fenotipik ve genotipik karakterlerin belirlenmesine dayanan teknikleri içermektedir. Prokaryotik taksonların tanımlanmasında kullanılan yöntemler Tindall ve diğerleri tarafından detaylı olarak ele alınmış, genomik metodların güçlü ve zayıf yönleri de Schleifer tarafından ortaya konulmuştur. Nümerik ve moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile de sistematik biliminin daha objektif hale gelmesini sağlamıştır. 16S rRNA gen dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyonu bakteriyal taksonomide altın standart olarak görülmektedir. Ancak DNA-DNA hibridizasyonunun yoğun işgücü maliyeti ve uygulanmasındaki zorluk, 16S rRNA gen dizilerinin cins seviyesinin altında yeterli bir ayırıştırma gücünün olmaması nedeniyle de alternatif metotlar aranmıştır (Stackebrandt ve diğ., 2002; Schleifer, 2010; Tindall ve diğ., 2010).

Türler arasındaki filogenetik akrabalığın değerlendirilmesinde tüm genom dizi analizine doğru bir eğilim olsa da günümüzde aktinomisetlerin taksonomik pozisyonlarının belirlenmesinde 16S rRNA gen bölgesi baz dizisi verileri temel oluşturmaktadır. Ad-Hoc komitesinin 2005 raporuna göre yeni bir prokaryotik taksonun tanımlanmasında çalışılan organizmanın en az 1300 nt'den oluşan 16S rRNA gen dizisi temel alınıp en yakın akraba taksonlar belirlenmelidir (Koçak, 2011).

*Actinobacteria* sınıfının ilk hiyerarşik sınıflandırması Stackebrandt ve diğerleri (1997) tarafından yapılmış, daha sonra moleküler ve nümerik taksonomik metodların uygulanmasıyla Zhi ve diğerleri (2009) tarafından yeniden gözden geçirilmiştir. Bakteri alemi içerisinde çok geniş yeri olan *Actinobacteria* sınıfı, 16S rRNA gen bölgesine ait soy ağaçlarındaki dallanma pozisyonları bakımından temel filumlardan birini oluşturmaktadır. Aktinomisetler; aerobik, gram pozitif bakteriler olup (Küster, 1968) farklı habitatlarda bulunmaları, morfolojik yapıları, bazı türlerin patojenite özelliği göstermesi, genom uzunlukları, genomunun içerdiği G+C oranı ve

genomunda kodlanan bölge sayısı gibi özellikleri bakımından bakteriler içerisinde önemli bir grubu oluşturmaktadır (Embley ve Stackebrandt, 1994; Kieser ve diğ., 2000; Ventura ve diğ., 2007). Aktinomisetler genelde toprak ve akuatik sistemlerde bulunmasına rağmen bataklıklar (Suzuki ve diğ., 1994), yeraltı mağaraları (Groth ve diğ., 1999), çeltik tarlaları (Hayakawa ve diğ., 1988), kaplıcalar (Barabote ve diğ., 2009), gama ışınlarına maruz kalmış yüzeyler (Phililips ve diğ., 2002), deniz süngerleri ve çöl toprağı (Ventura ve diğ., 2007; Wanbanjob, 2008; Hassan ve Wellington., 2009) gibi çok değişik habitatlarda dağılım göstermektedir.

Bu çalışmada farklı aktinomiset gruplarının izolasyonunun gerçekleştirmek amacıyla geleneksel bir metot haline gelen dilüsyon plaka uygulaması, aktinomisetlerin seçici izolasyonu için kullanılan sükroz gradient santrifügasyon yöntemi (Yamamura ve diğ., 2003) ve *Micromonospora* cinsinin üyelerini izole etmek için kullanılan %1.5'luk fenol ön uygulamaları (Hayakawa ve diğ., 1991a) kullanılmıştır. Sükroz gradient santrifügasyon yönteminde (Yamamura ve diğ., 2003) zoospor oluşturan flagella formunda hareketli aktinomiset olan *Actinoplanes* cinsi üyelerinin sadece %10 sükroz tabakada yoğun halde bulundukları bildirilmiştir. Sükroz gradient santrifügasyon yönteminde %20 oranında sükroz tabaka kullanılarak ve daha sonra bu yöntemin cycloheximide, chlortetracycline ve nalidiksik asit gibi antibiyotikleri içeren HV agara uygulanması hem *Streptomyces* cinslerinin hem de filamentli olmayan bakterilerin petride görülme ihtimalini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu yöntem, *Nocardia* cinsi üyelerin izolasyonu için büyük bir avantaj sağladığı belirlenmiştir (Yamamura ve diğ., 2003). Hyakawa ve diğerleri tarafından geliştirilen % 1.5'luk fenol ön uygulaması Istianto ve diğerleri tarafından 25 toprak örneğine uygulanmış ve büyük oranda *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Microbispora* ve *Polymorphospora* gibi cinslerin izolasyonunda sırasıyla % 49.2, % 13.1, % 9.8 ve % 3.3 oranında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (İstianto ve diğ., 2012).

Bu çalışmada Marmara Bölgesi'nin 4 farklı adasından 9 farklı lokaliteden elde edilen toprak örnekleri için Hayakawa ve Nonomura tarafından 1987 yılında geliştirilen hümitik asit vitamin agar (HVA), izolasyon çalışmalarında dilüsyon plaka, sükroz gradient santrifügasyon yöntemi ve % 1.5'luk fenol ön uygulaması ile birlikte kullanılmış, farklı aktinomisetlere ulaşma ihtimali arttırılmaya çalışılmıştır. Dilüsyon plaka, sükroz gradient ve % 1.5'luk fenol ön uygulaması ile HV agar ortamından elde edilen organizmalar tripton yeast glukoz ekstrakt agar (Blackall ve diğ., 1989)

ortamına ekilerek daha rahat gözlenebilir hale getirilmişlerdir. Ayrıca dilüsyon plaka ve sükröz gradient uygulamaları ile Bennett's agar (Jones, 1949), ISP5 agar (Pridham ve diğ., 1956–1957), tripton yeast ekstrakt agar (Bower ve Hucker, 1930), ve tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (Bower ve Hucker, 1930) ortamlarına da ekim yapılmış ve farklı aktinomiset gruplarını izole etme şansının artırılması amaçlanmıştır.

Tryptone yeast glucose extract agar (TYGA; Bower ve Hucker, 1930) ortamında saflaştırılan 142 izolat; glukoz yeast extract agar (GYEA; Gordon ve Mihm, 1962), tryptone yeast glucose extract agar (TYGA; Bower ve Hucker, 1930) ve Bennett's agar (Jones, 1949) yüzeyine transfer edilmiştir. Bu besiyeri ortamlarında geliştirilen 142 izolat içerisinde; morfolojik benzerlikleri ve farklılıkları göz önüne alınarak öncelikli olarak çalışılmak üzere 63 izolat seçilmiştir. Aynı genomik türe ait suşlar arasında farklı morfolojik ve pigmentasyon özellikleri görülebildiği gibi, farklı tür ve cins üyeleri arasında da benzer morfolojik ve pigmentasyon özellikleri görülebilmektedir. Bu durumda, izolatlar arasından seçilerek oluşturulacak test organizmalarının, biyoçeşitliliği tam olarak temsil etmemesine neden olabilmektedir.

16S rRNA gen bölgesi çalışmasında ilk aşamada örnekler 27f ve 1525r primerleri ile çoğaltılıp, ardından ilgili gen bölgesinin nükleotit dizisi 800r, MG3 ve MG5 evrensel primerleriyle belirlenmiştir. Bu primerler ile elde edilen okuma dizilerinin birleştirilmesi Mega 5 (Tamuta ve diğ., 2011) paket programında yapılmıştır. 16S rRNA dizilerinin çoklu hizalanması sonrasında filogenetik dendogramlar neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritması kullanılarak oluşturulmuş ve bu algoritma için uzaklık matriksi Jukes- Cantor metodu izlenerek gerçekleştirilmiştir (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak Mega 5 (Tamuta ve diğ., 2011) paket programında gerçekleştirilmiştir. Test izolatlarının en yakın tip türleri ile yüzde benzerlik ve nükleotit farklılıklarını gösteren tablolar PHYDIT programı (<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit>) kullanılarak oluşturulmuştur.

Morfolojik özelliklerine göre seçilen 62 test organizmasının genomik DNA izolasyonu ve 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi verilerinin filogenetik analizleri sonucunda, *Streptomyces* cinsi üyesi 24,

*Micromonospora* cinsi üyesi 17, *Nonomuraea* cinsi üyesi 8, *Nocardia* cinsi üyesi 3, *Rhodococcus* cinsi üyesi 3, *Kribbella* cinsi üyesi 3, *Agromyces* cinsi üyesi 2, *Actinomadura* cinsi üyesi 1 ve *Geodermatophilus* cinsi üyesi 1 olmak üzere 62 test organizması içerisinde 45 izolatın 16S rRNA verileri bu çalışmada değerlendirilmiştir.

62 aktinomiset izolatı içerisinde 29 izolat hümik asit vitamin agar (HV) ortamından, 13 izolat Bennett's agar ortamından, 12 izolat tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamından ve 8 izolatta tripton yeast ekstrakt agar (TYG) ortamından izole edilmiştir. 62 test izolatının elde edildiği izolasyon yöntemleri kıyaslandığında; dilüsyon plaka yöntemi ile 44 izolat, %1.5'luk fenol ön uygulaması ile 11 izolat ve süroz gradient yöntemi ile de 7 izolat izole edilmiştir.

24 *Streptomyces* izolatının 11'i hümik asit vitamin agar (HV) ortamından, 5'i Bennett's agar ortamından, 4'ü tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamından ve 4'ü de tripton yeast ekstrakt agar (TYG) ortamından izole edilmiştir. 18 izolat dilüsyon plaka yöntemi ile izole edilirken 3'ü süroz gradiet yöntemi ile 3 tanesi de %1.5'luk fenol ön uygulaması ile izole edilmiştir.

17 tane olan *Micromonospora* izolatları içerisinde 12 izolat hümik asit vitamin agar (HV) ortamından, 4 izolat Bennett's agar ortamından ve 1 izolatta tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamından izole edilmiştir. Bu izolatlardan 8 tanesi dilüsyon plaka yöntemi ile izole edilirken, 7 tanesi %1.5'luk fenol ön uygulaması ile izole edilmiş ve 2 izolatta süroz gradient yöntemi ile izole edilmiştir.

Tamamı dilüsyon plaka yöntemi ile izole edilen 8 *Nonomuraea* izolatının 3 tanesi tripton yeast ekstrakt agar (TYG) ortamından, 2 tanesi hümik asit vitamin agar (HVA) ortamından, 2 tanesi Bennett's agar ortamından ve 1 tanesi de tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamından izole edilmiştir.

Dilüsyon plaka yöntemi ile izole edilmiş olan *Kribbella* (3 izolat) ve *Rhodococcus* (3 izolat) cinsi üyesi izolatlardan *Kribbella* izolatlarının her biri farklı besi yeri ortamlarında izole edilirken; *Rhodococcus* izolatlarının 2'si tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamından 1'i ise hümik asit vitamin agar (HV) ortamından izole edilmiştir. *Nocardia* izolatlarının da 2tanesi süroz gradient

yöntemi ile izole edilmişken 1 tanesi dilüsyon plaka yöntemi ile izole edilmiştir. 2 tanesinin izolasyon ortamı tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) iken diğeri hümik asit vitamin agar (HVA) ortamından izole edilmiştir.

*Agromyces* cinsi üyesi olan 2 izolat dilüsyon plaka yöntemi ile Bennett's agar ve tripton yeast ekstrakt vitaminli agar (TYGV) ortamlarından izole edilmiştir. Birer izolat ile temsil edilen *Actinomadura* ve *Geodermatophilus* cinslerinde; *Actinomadura* izolatu %1.5'luk fenol ön uygulaması ile hümik asit vitamin agar (HVA) ortamından, *Geodermatophilus* izolatu da dilüsyon plaka yöntemi ile Bennett's agar ortamından izole edilmiştir.

Bakteri sistematğinde yeni bir tür tanımlamak için gerekli ilk aşama 16S rRNA gen bölgesi dizi verilerinin elde edilmesidir. 16S rRNA molekülü, yapısında bulunan değişken ve korunmuş bölgeler ile filogenetik bilgiyi içerebilecek özellikte ve dizi analizinin yapılmasının kolay olması, bu molekülü bakteri filogenisinde önemli bir parametre haline getirmektedir (Woese, 1987). 16S r RNA sekans analizleri iki organizma arasındaki akrabalığı tür ve cins düzeyinde ortaya koymaktadır (O'Donnell ve diğ., 1994).

Farklı lokalitelerden alınan topraklardan izole edilen izolatların öncelikle hangi cinse ait olduklarını belirlemek için 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri gerçekleştirilmiş ve 62 izolatın dokuz farklı *Actinobacteria* cinsinin üyelerini içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma 16S rRNA sekansı tamamlanan test organizmalarının filogenetik analizlerine göre potansiyel yeni türlerin varlığını belirlemek ve toprak örneklerinin alındığı dört farklı adanın aktinomiset biyoçeşitlilik potansiyelini belirleyebilmek için yapılmıştır.

Son yıllarda %98 ve daha düşük 16S r RNA gen bölgesi dizi benzerliği gösteren suşlar arasında yapılan DNA:DNA hibridizasyon çalışmalarının tür tanımı için kabul edilen %70 DNA:DNA hibridizasyon üst değerinden her zaman daha düşük verdiği, bundan dolayı %98 ve daha düşük nükleotid benzerliği gösteren suşlar arasında DNA:DNA hibridizasyonuna gerek olmadığı belirtilmiştir (Stackebrandt ve Ebers, 2006; Konstantinidis ve Tiedje, 2007; Meier-Kolthoff ve diğ., 2013). Meier-Kolthoff ve diğerlerinin 2013 yılında yaptığı bir çalışmada; farklı filumlardan toplam 571 adet DNA-DNA hibridizasyon ve 16S rRNA dizi verileri istatistiksel olarak kıyaslanmış, %97-98.5 arası 16S rRNA dizi benzerliğine sahip

bakterilerin ölçülen DNA-DNA hibridizasyon verilerinin %40'ın altında olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçları değerlendiren araştırmacılar DNA-DNA hibridizasyonunun yapılmasında karar için yeni bir eşik değeri olabileceğini belirtmişlerdir (Meier-Kolthoff ve diğ., 2013). Yaptığımız bu çalışmada da yeni tür olma ihtimali olan izolatlar bu literatür bilgisi dikkate alınarak belirlenmiştir.

16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlere göre izolatlar içerisinde akraba tip türleri ile yüzde benzerlikleri ve nükleotid farklılıklarına göre yeni tür olma ihtimali olan izolatlar *Actinomadura* cinsi üyesi olduğu belirlenen B2F13 izolatı; *Geodermatophilus* cinsi üyesi olduğu belirlenen Z2R53 izolatı; *Rhodococcus* cinsi üyesi olduğu belirlenen K1R19 izolatı; *Nonomureae* cinsi üyesi oldukları belirlenen H1R4, H2R3, H2R15, H2R16, H2R21 izolatları, *Micromonospora* üyesi olduğu belirlenen K2R35 izolatı ve *Streptomyces* cinsi üyesi oldukları belirlenen Z1R7, Z1R34, K2R76, K2R77 ve Z2S13 izolatlarıdır.

*Actinomadura* cinsine ait bir suş olan B2F13 izolatı en yakın tip türleri olan *Actinomadura bangladeshensis* 3-46-b3<sup>T</sup> ile %98.2 benzerlik ve 26 nükleotit farklılığı, *Actinomadura mexicana* A209<sup>T</sup> türü ile %97.82 benzerlik ve 31 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Geodermatophilus* cinsine ait bir suş olan Z2R53 izolatı en yakın tip türleri olan *Geodermatophilus saharensis* CF5/5<sup>T</sup> ile %98.36 benzerlik ve 24 nükleotit farklılığı, *Geodermatophilus tzadiensis* CF5/2<sup>T</sup> ile %98.29 benzerlik ve 25 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Rhodococcus* cinsine ait bir suş olduğu belirlenen K1R19 izolatı en yakın tip türü olan *Rhodococcus koreensis* DNP505<sup>T</sup> ile %98.56 benzerlik ve 21 nükleotit farklılığı göstermektedir. *Micromonospora* cinsine ait bir suş olan K2R35 izolatı da en yakın tip türü olan *Micromonospora endolithica* DSM 44398<sup>T</sup> ile %98 benzerlik ve 23 nükleotit farklılığı göstermektedir.

16S rRNA dizi verilerinin filogenetik değerlendirmeleri sonucunda *Nonomureae* cinsine ait suşlardan Heybeliada izolatı olan H1R4 suşu; en yakın akrabaları *Nonomureae candida* HMC10<sup>T</sup> ile %98.1 (26 nükleotit farklılığı), *Nonomureae salmonea* DSM 43678<sup>T</sup> ile %97.8 (32 nükleotit farklılığı), *Nonomureae endophytica* YIM 65601<sup>T</sup> ile %97.6 (35 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği bulunmaktadır. Heybeliada izolatı olan H2R3; en yakın akrabaları olan *Nonomureae solani* NEAU-Z6<sup>T</sup> ile %97.74 (33 nükleotit farklılığı), *Nonomureae rhizophila* YIM 67092<sup>T</sup> ile %97.61 (35 nükleotit farklılığı),

*Nonomuraea monospora* PT708<sup>T</sup> %97.31 (38 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği bulunmaktadır. H2R15 suşu en yakın akrabaları olan; *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> ile %98.2 (25 nükleotit farklılığı), *Nonomuraea helvata* IFO 14681<sup>T</sup> ile %98.16 (26 nükleotit farklılığı), *Nonomuraea maheshkhaliensis* 16-5-14<sup>T</sup> ile %97.78 (32 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği bulunmaktadır. H2R16 suşu en yakın akrabaları olan *Nonomuraea solani* NEAU-Z6<sup>T</sup> ile %98.23 (26 nükleotit farklılığı), *Nonomuraea rhizophila* YIM 67092<sup>T</sup> ile %98.1 (28 nükleotit farklılığı), *Nonomuraea monospora* PT708<sup>T</sup> ile %97.88 (30 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği bulunmaktadır. H2R21 suşu en yakın akrabaları olan *Nonomuraea solani* NEAU-Z6<sup>T</sup> ile %97.9 (31 nükleotit farklılığı), *Nonomuraea maheshkhaliensis* 16-5-14<sup>T</sup> ile %97.86 (31 nükleotit farklılığı), *Nonomuraea dietziae* DSM 44320<sup>T</sup> ile %97.78 (32 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği bulunmaktadır.

*Streptomyces* cinsine ait suşlardan, 16S rRNA dizi verilerinin filogenetik değerlendirmeleri sonucunda; Burgazada toprağından izole edilen Z1R7 izolatu *Streptomyces specialis* GW 41-1564<sup>T</sup> türü ile %95.5 (62 nükleotit farklılığı), *Streptomyces mayteni* YIM 60475<sup>T</sup> ile %95.6 (60 nükleotit farklılığı), *Streptomyces sodiiphilus* YIM 80305<sup>T</sup> ile %95.57 (65 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği göstermektedir. Yine Burgazada'dan izole edilen Z1R34 izolatu en yakın filogenetik akrabaları *Streptomyces vastus* NBRC 13094<sup>T</sup> ile %97.40 (38 nükleotit farklılığı), *Streptomyces violarius* NBRC 13104<sup>T</sup> ile %96.3 (54 nükleotit farklılığı), *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773<sup>T</sup> ile %96.23 (55 nükleotit farklılığı) dizi benzerliği göstermektedir. Kınalıada izolatu olan K2R76 suşu en yakın akrabaları olan *Streptomyces seoulensis* NBRC 16668<sup>T</sup> ile %98.22 (26 nükleotit farklılığı), *Streptomyces peucetius* JCM 9920<sup>T</sup> ile %98.16 (25 nükleotit farklılığı), *Streptomyces torulosus* LMG 20305<sup>T</sup> ile %98.15 (25 nükleotit farklılığı) dizi benzerliği göstermektedir. Diğer bir Kınalıada izolatu olan K2R77 suşu da en yakın akrabaları olan *Streptomyces glycovorans* YIM M 10366<sup>T</sup> ile %98.5 (22 nükleotit farklılığı), *Streptomyces abyssalis* YIM M 10400<sup>T</sup> ile %97.9 (31 nükleotit farklılığı), *Streptomyces nanshensis* SCSIO 01066<sup>T</sup> ile %97.6 (34 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği göstermektedir. Bir Burgazada izolatu olan Z2S13 suşu en yakın akrabaları olan *Streptomyces endophyticus* YIM 65594<sup>T</sup> ile %98.57 (21 nükleotit farklılığı), *Streptomyces kunmingensis* NBRC 14463<sup>T</sup> ile

%97.4 (38 nükleotit farklılığı), *Streptomyces kunmingensis* NBRC 14463<sup>T</sup> ile %97.1 (43 nükleotit farklılığı) 16S rRNA gen bölgesi dizi benzerliği göstermektedir.

## 6 SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Marmara Bölgesi'nde bulunan Burgazada, Büyükada, Heybeliada ve Kınalıada'dan 9 farklı lokalitiden alınan toprak örneklerinden HV, TYG, TYGV, ISP5 ve Bennett' Agar besi yerlerinden bakteri izolasyonu yapılmış ve 142 izolat kültüre alınarak saflaştırılmıştır. Bu izolatlardan kültür besiyerlerinde koloni oluşumu ve pigmentasyon özelliklerine göre seçilen 62 temsilci organizmanın 16S rRNA gen bölgesi analizleri yapılmış ve 24 izolatın *Streptomyces* cinsine, 17 izolatın *Micromonospora* cinsine, 8 izolatın *Nonomuraea* cinsine, 3'er izolatın *Nocardia*, *Kribbella*, *Rhodococcus* cinslerine, 2 izolatın *Agromyces* cinsine ve birer izolatın da *Actinomadura* ve *Geodermatophilus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir.

### 6.1 Sonuçlar

16S rRNA gen bölgesi filogenetik analiz sonuçlarına göre izolasyon çalışmalarında kullanılan seçici besi yeri ortamları içerisinde 62 aktinomiset izolatından 29'unun humik asit vitamin agar (HVA), 13'ünün Bennett's agar, 12'sinin tryptone yeast glucose extract vitamin agar (TYGVA) ve 8'inin tryptone yeast glucose extract agar (TYGA) ortamından izole edildiği göz önüne alındığında; aktinomiset grubu organizmaların izolasyonunda hümitik asit vitamin agar ortamının daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Yine bu sonuçlara göre; uygulanan izolasyon metotları içerisinde dilusyon plaka metodu ile izole edilen izolat sayısını (9 cinse üye 44 izolat) göz önüne aldığımızda bu metodun aktinomiset izolasyonu için diğer iki uygulamadan daha başarılı sonuçlar verdiği yorumlanabilmektedir.

Yapılan çalışmalar neticesinde K1R23, K2R23 nolu *Agromyces* izolatları en yakın tip türü *Agromyces neolithicus* 23-23<sup>T</sup> ile %99'un üzerinde; H2R4, H2R22, H3R5 nolu *Kribbella* izolatları en yakın tip türleri ile %99'un üzerinde; H3S3, H3S24, K2R37 nolu *Nocardia* izolatları en yakın tip türleri ile %98.7'nin üzerinde; H2R11, Z1R24 nolu *Nonomuraea* izolatları en yakın tip türleri ile %98.9'un üzerinde; B1R8, H3R2 nolu *Rhodococcus* izolatları en yakın tip türleri ile %99.25'in üzerinde; H2F8, H2F23, H2R10, H3F6, H3F25, K2F72, K2F73, K2R33, K2R47,

K2R49, K2R55, K2S19, K2S20, Z1F35, Z1R8, Z1R61 nolu *Micromonospora* izolatları en yakın tip türleri ile en az %98.7 ve üzerinde; H1R6, H1R9, H2R12, H3R8, H3S9, H3R17, H3R21, H3S23, B1F34, B2F16, K1R16, K1R18, K1R21, K1R24, K1R61, K2R2, K2R40, Z1F34, Z2R34 nolu *Streptomyces* izolatları en yakın tip türleri ile %98.85 ve üzeri 16S rRNA dizi benzerliği göstermektedir.

En yakın tip türü olan *Streptomyces specialis* GW 41-1564<sup>T</sup> ile %95.76 16S rRNA gen bölgesi benzerliği ve 62 nükleotit farklılığı gösteren Z1R7 izolatının tüm fenotipik çalışmaları yapılmış ve kemotaksonomik analizleri de yapılmaya devam edilmektedir. Filogenetik analizlerde *Streptomyces vastus* NBRC 13094<sup>T</sup> ile 38 nükleotit farklılığı gösteren Z1R34 izolatı; *Streptomyces seoulensis* NBRC 16668<sup>T</sup> ile 26 nükleotit farklılığı gösteren K2R76 izolatı; *Streptomyces seoulensis* NBRC 16668<sup>T</sup> ile 26 nükleotit farklılığı gösteren K2R76 izolatı; *Streptomyces glycovorans* YIM M 10366<sup>T</sup> ile 22 nükleotit farklılığı gösteren K2R77 izolatı; *Streptomyces endophyticus* YIM 65594<sup>T</sup> ile 21 nükleotit farklılığı gösteren Z2S13 izolatı diğer *Streptomyces* izolatlarıyla kıyaslandığında tür statüsü kazanma şansı daha yüksek olan izolatlar olarak değerlendirilmiştir.

*Nonomuraea* izolatların yapılan filogenetik analizleri neticesinde birbiriyle 10 nükleotitin altında benzerlik gösteren H2R3, H2R21 ve H2R16 suşları *Nonomuraea solani* NEAU-Z6<sup>T</sup> ile sırasıyla 33-31-26 nükleotit farklılığı, birbiri arasında 50 nükleotit farklılığı gösteren H1R4 ve H2R15 suşları *Nonomuraea candida* HMC10<sup>T</sup> ile sırasıyla 26-25 nükleotit farklılığı gösterdiği için diğer izolatlara göre yeni tür olma ihtimali daha yüksek olan izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir.

16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlerine göre B2F13 izolatı en yakın tip türü olan *Actinomadura bangladeshensis* 3-46-b3<sup>T</sup> ile 26 nükleotit farklılığı, Z2R53 izolatı en yakın tip türleri olan *Geodermatophilus saharensis* CF5/5<sup>T</sup> ile 24 nükleotit farklılığı, K1R19 izolatı en yakın tip türü olan *Rhodococcus koreensis* DNP505<sup>T</sup> ile 21 nükleotit farklılığı ve K2R35 izolatı da en yakın tip türü olan *Micromonospora endolithica* DSM 44398<sup>T</sup> ile 23 nükleotit farklılığı göstermelerinden dolayı yeni tür olma potansiyeline sahip izolatlar olarak değerlendirilmişlerdir.

## 6.2 Öneriler

*Streptomyces* izolatu olan Z1R7 suşunun kemotaksonomik analizleri tamamlanarak ve elektron mikroskop görüntüsü elde edilerek izolasyon habitatına ve nomenklature uygun isimlendirmeye “*Streptomyces burgaziensis*” adıyla literatüre tip tür olarak en kısa sürede sunulmalıdır.

Filogenetik analizlere göre 38 nükleotit farklılığı ile yeni tür olma potansiyeli yüksek olan; Z1R34 *Streptomyces* izolatının da fenetik ve kemotaksonomik analizlerinin tamamlanarak literatüre kazandırılması hızlandırılmalıdır.

Ayrıca baz dizi analizleri üç evrensel primer ile tamamlanmış olan potansiyel yeni tür izolatlarının dizileme işlemlerinin kontrol amaçlı olarak tekrarlanması ve 2 ilave evrensel primer ile dizilenerek filogenetik analizlere uyumlu olarak tanımlama çalışmalarının ivedilikle yapılması önerilmektedir.



## KAYNAKLAR

- Ahrens R., ve Moll G., 1970. Ein neues Knospendes Bacterium aus der Ostsee, *Arch. Microbiol.* 70:243–265.
- Alam M.T., Merlo E.M., Takano E., Breitling R., 2010. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 763–722.
- Altenburger P., P. Kämpfer A. Makristathis W. Lubitz ve Busse H.-J., 1996. Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J. Biotechnol.* 47:39–52.
- Altenburger P., P. Kämpfer V. N., Akimov W., Lubitz H.- J., 1997. Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Tsukamurella*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:270–277.
- Anderson A.S., Wellington E.M., 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 797–814.
- Antal N., Fiedler H.P., Stackebrandt E.W., Beil K., Stroch A., Zeeck. 2005. Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tu 6368. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J. Antibiot.*, 58, 95-102.
- Anzai K., Ohno M., Nakashima N., Kuwahara N., Suzuki R., Tamura T., Komaki H., Miyadoh S., Harayama S., Ando F., 2008. Taxonomic distrubition of *Streptomyces* species capable of producing bioactive compounds among strains preserved NITE/NBRC, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80, 287-295.
- Aoki K., Shinke R. ve Nishira H., 1982. Identification of aniline-assimilating bacteria, *Agric. Biol. Chem.* 46:2563–2570.
- Ara I., Kudo T., Matsumoto A., Takahashi Y. ve Omura S., 2007a, *Nonomuraea maheshkhaliensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from mangrove rhizosphere mud, *J Gen Appl Microbiol* 53, 159–166.
- Ara I., Kudo T., Matsumoto A., Takahashi Y. Omura S., 2007b. *Nonomuraea bangladeshensis* sp. nov. and *Nonomuraea coxensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 1504–1509.
- Ara I., Matsumoto A., Bakır M.A., Kudo T., Ōmura S. ve Takahashi Y., 2008b. *Actinomadura bangladeshensis* sp. nov. and *Actinomadura chokoriensis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1653-1659.
- Arnaudi C., 1942. Flavobacterium dehydrogenans (Micrococcus dehydrogenans) und seine Fahigkite zur Oxidation von Steroiden sowie Substanzen aus der Sexualhormonreihe. Zentrbl. Bakteriell. Rarasitenkd. Infektionskr., *Hyg. Abt. II, Orig.* 105:52–366.

- Ashraf W., Mihdir A. ve Murrell J.C., 1994 Bacterial oxidation of propane, *FEMS Microbiology Letters* 122, 1–6.
- Atalan E., 1993. Selective Isolation, Characterisation and Identification of some *Streptomyces* species, Thesis, Newcastle upon Tyne UK, Univ of Newcastle, England.
- Baba T., Nishiuchi Y. ve Yano I., 1997. Composition of Mycolic Acid Molecular Species as a Criterion in Nocardial Classification, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 795–801.
- Bagwell C.E., ve diğ. 2008. Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of *Kineococcus radiotolerans* SRS30216. *PLoS One* 3:e3878.
- Baker D., Mocek U., Garr C., 2000. Natural Products vs. Combinatorials: A Case Study, S. K. Wrigley M. A., Hayes R., Thomas E. J. T., Chrystal N., Nicholson, Eds.; Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries, *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK, 66-72.
- Baltz RH., 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8:557–563.
- Barabote RD, ve diğ. 2009. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations, *Genome Res.* 19:1033–1043.
- Basilio A., González I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., González A., Genilloud O., 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil *actinomycetes* isolated under different conditions of pH and salinity, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 814-823.
- Bassam, J.B., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M., 1992. DNA amplification fingerprinting of bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 70-76.
- Behal V. 2000. Bioactive products from *Streptomyces*, *Adv. Appl. Microbiol.* 47:113–156.
- Bell K.S., Philp J.C., Aw D.W.J. ve Christofi N., 1994. The genus *Rhodococcus*, *Journal of Applied Microbiology* 85, 195–210.
- Bendinger, B., Kroppenstedt R. M., Rijnaarts H., Van- Langenhove H. R., Oberthuer R. C. ve Altendorf K., 1990. Studies on the microbiology and the degradation capacities of a biofilter, *Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen* (DECHEMA). Biotechnol. Conf. 4 Pt. A:529–534.
- Bentley S.D., Brosch R., Gordon S.V., Hopwood D.A., Cole S.T., 2004. Genomics of *Actinobacteria*, the high G\_C Gram-positive bacteria, p 333–359. In Fraser CM, Read TD, Nelson KE (ed), *Microbial genomes*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G.L., Thomson, N.R. ve 38 Other Co-authors., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2), *Nature* 417: 141-147.
- Berdy J., 2005. Bioactive microbial metabolites, *J. Antibiototechnol.* (Tokyo), 58, 1-26.

- Blackall, L., Parlett, J.H., Hayward, A.C., Minnikin, D.E., Greenfield, P.F., Harbers, A.E., 1989. *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia, *Journal of General Microbiology*, 135, 1547-1558.
- Bouchek-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., Jouan, B. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. Associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab, *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 91–99.
- Bower, C.S., Hucker, G.J., 1930. Tech. Bull. 228. New York State Agr. Exp. Sta., Geneva, N.Y.
- Bradley, S.G., ve Mordarski, M., 1976. Association of polydeoxyribonucleotides of deoxyribonucleic acids from nocardioform bacteria. In: The Biology of the Nocardiae (M. Goodfellow, G.H. Brownell and J.A. Serrano eds), Academic Press, London, 310-336.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S., 2007. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity, *Environmental Microbiology*, 9 (11), 2756–2764.
- Briglia, M., Middeldorp, P.J.M. and Salkinoja-Salonen, M.S., 1994b. Mineralization performance of *Rhodococcus chlorophenolicus* strain PCP-1 in contaminated soil simulating on site conditions, *Soil Biology and Biochemistry* 26, 377–385.
- Brown-Elliott, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S., Wallace, R.J., 2006. Clinical and Laboratory features of the *Nocardia* spp. Based on current molecular taxonomy, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 259-282.
- Buchanan, R.E., 1918. Studies in the classification and nomenclature of the Bacteria, VIII. The subgroups and genera of the Actinomycetales, *J. Bacteriol.*, 3, 403-406.
- Bull A., T., Goodfellow M., 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift, *Microbiology and Molecular Biology Review* 64.
- Bull AT, Stach JE, Ward AC, Goodfellow M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions, *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:65–79.
- Bull A.T., Stach J.E.M.. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery, *Trends Microbiol.* 15:491– 499.
- Camas M., Sazak A., Sproer C., Klenk H. P., Cetin D., Guven K. ve Sahin N., 2013. *Nonomuraea jabiensis* sp. nov., isolated from Nigerian arid soil, *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 212–218.
- Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou S., 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots, *Letters in Applied Microbiology*, 39, 425-430.
- Cao Y. R., Jin R. X., Jiang Y., He W. X. ve Jiang C. L. 2012. *Nonomuraea soli* sp. nov., an actinomycete isolated from soil, *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1587–1591.

- Carlsohn M.R., Groth I., Sproer C., Schutze, B., Saluz H.P., Munder T., Stackebrandt E., 2007. *Kribbella aluminosa* sp. nov., isolated from a medieval alum slate ine, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1943–1947.
- Casida J., 1983. Integracton of *Agromyces ramosus* with other bacteria in soil, *Appl. Environ. Microbiol.* 46:881–888.
- Castellani A., ve Chalmers A.J., 1919. Manual of tropical medicine, 3rd ed., Williams Wood & Co., New York. 959-960.
- Castillo U.F., Strobel G.A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robinson R., Condrón M.A., Teplov D.B., Stevens D., Yaver D., 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*, *Microbiology*, 148, 2675-2685.
- Chater K. F., 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*, *Annu Rev Microbio*, 47, 685-713.
- Chater KF. 2006. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361:761–768.
- Chiba, S., Suzuki, M. ve Ando, K., 1999. Taxonomic re-evaluation of ‘*Nocardiopsis*’ sp. K-252T (5 NRRL 15532T): a proposal to transfer this strain to the genus *Nonomuraea* as *Nonomuraea longicatena* sp. nov., *Int J Syst Bacteriol* 49, 1623–1630.
- Choi S., Lee C. K., Hwang Y., Kinoshita H., Nihira T., 2003.  $\gamma$ -Butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites, *Arch Microbiol* 180:303\_307
- Christner, B. C. 2002. Recovery of Bacteria from Glacial and Subglacial Environments (Thesis). Ohio State University. Columbus, OH.
- Chun J., 1995. *Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes*.
- Chun J., Kang S. O., Hah Y. C. ve Goodfellow M., 1996. Phylogeny of mycolic acid containing actinomycetes, *J. Ind. Microbiol.*, 17, 205-213.
- Coenye T., Gevers D., Van de Peer Y., Vandamme P., Swings J., 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 147–167.
- Collins M. D. 1982a. Lipid composition of *Agromyces ramosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 14:187–189.
- Collins M.D., Smida J., Dorsch M. and Stackebrandt E., 1988. *Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium parometabolum* and *Rhodococcus auranticus*, *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 385–391.
- Collins M.D., Stackebrandt E., 1989. Molecular taxonomic studies on some LL-diaminopimelic acid containing coryneform from herbage. description of *Nocardioides fastidiosa* sp. nov., *FEMS Microbiol. Lett.*, 57, 289-294.
- Colquhoun J. A., Mexson J., Goodfellow M., Ward A. C., Horikoshi K. ve Bull A. T., 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea, *Ant. v. Leeuwenhoek* 74:27–40.

- Colwell R.R., 1970. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species, *J. of Bacterio.*, 194, 410-433.
- Conville S.P., ve Witebsky F.G., 2010. The Complexity of *Nocardia* Taxonomy: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology newsletter*, 32 (16), 119-125.
- Coombs J.T., Franco C.M.M., 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots, *App. and Env. Microbio.*, 69, 5603-5608.
- Couch J.N., 1963. Some new genera and species of *Actinoplanaceae*, *J Elisha Mitchell Sci Soc.*, 79, 53-70.
- Cowan S.T., 1968. A dictionary of microbial taxonomic usage. Edinburg, Oliver, Boyd.
- Cross T. ve Goodfellow M., 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. In: Sykes, G. and Skinner, F.A. (eds.): *Actinomycetales*; London: *Academic Press*, 11-112.
- Cross T., 1981. Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycets in aquatic habitats. *J. Appl.Bacteriol.*, 50, 397-423.
- Cross T., T. J., Rowbotham E. N., Mishustin E. Z., Tepper F., Antoine-Portaels K., Schaal P., ve Bickenbach H.. 1976. The ecology of nocardioform actinomycetes. In: M. Goodfellow, Brownell G. H. ve Serrano J. A. (Eds.) *The Biology of the Nocardiae*, *Academic Press*. London, UK. 337–371.
- Cui Q., Wang L., Huang Y., Liu Z. ve Goodfellow M., 2005. *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1921–1925.
- Cummins C. S., Lelliott R. A., ve Rogosa M., 1974. Genus *Corynebacterium*. In: R. E. Buchanan and N. E. Bibbons (Eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 602–617.
- Cummins C.S. ve Harris H., 1956. The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character, *J. Gen. Microbiol.*, 14, 583-600.
- Cummins C.S. ve Harris H., 1958. Studies on the cell wall composition and taxonomy of *Actinomycetales* and related groups, *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173-189.
- Das S., Ward L.R., Burke C., 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture, *Appl. Microbiol. Botechnol.*, 81, 419–429.
- de Menezes A. B., Lockhart R.J., Cox M.J., Allison H.E., McCarthy A.J., 2008. Cellulose degradation by *Micromonosporas* recovered from freshwater lakes and classification of these actinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7080-7084.
- Demain A.L., 1998. Microbial natural products: alive and well in 1998, *Nature Biotechnology* 16: 3-4.
- El-Gendy M.M.A., Hawas U.W., Jaspars M., 2008. Novel Bioactive Metabolites from a Marine Derived Bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000, *The Journal of Antibiotics*, 61, 379–386; doi:10.1038/ja.2008.53.

- El-sersy N. A., Abou-Elela G. M., 2006. Antagonistic effect of marine *Nocardia brasiliensis* against the fish pathogen *Vibrio damsela*: application of Plackett-Burman experimental desing to evaluate factors affecting the production of the antibacterial agent IJOO 1(1): 141-150In: International Journal of Oceans and Oceanography, *Research Idia Publication*: Delhi. ISSN 0973-2667
- El-Tarabily K.A., Hardy G.E. St.J., Sivasithamparam K., Hussein A.M., Kurtböke I.D., 1997. The potential for biological control of cavityspot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes, *New Phytol.*, 137, 495-507.
- El-Tarabily K.A., Hardy G.E., Sivasithamparam K., Kurtböke I.D., 1996a. Microbiological differences between limed and unlimed soils and their relationship with cavity spot disease of carrots (*Daucus carota* L.) caused by *Pythium coloratum* in Western Australia, *Plant. and Soil.*, 183, 279-290.
- El-Tarabily K.A., Nassar A.H., Hardy G.E. St.J., Sivasithamparam K., 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J. of App, Microbiol.*, 106, 13-26.
- El-Tarabily K.A., Sivasithamparam K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (7), 1505-1520.
- El-Tarabily K.A., Sykes M.L., Kurtböke I.D., Hardy G.E. St.J., Barbosa A.M., Dekker R.F.H., 1996b. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root-rot of *Banksia grandis*, *Canadian Journal of Botany.*, 74, 618-624.
- Embley T. M., Stackebrandt E., 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes, *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 257-289.
- Erikson D., 1941. Studies on some lake-mud strains of *Micromonospora*. *Journal of Bacteriology*, 41, 277-300.
- Everest G. J., Meyers P. R., 2009. The use of gyrB sequence analysis in the phylogeny of the genus *Amycolatopsis*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 95, 1-11.
- Everest G. J., Curtis S. M., Leo F. D., Urzi C. ve Meyers P. R. 2013. *Kribbella albertanoniae* sp. nov., isolated from a Roman catacomb, and emended description of the genus *Kribbella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:3591-3596
- Everest G.J., Meyers P.R., 2008. *Micromonospora equina* sp. nov., isolated from soil from a racecourse. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 879-885
- Everest G.J., Meyers P.R., 2013. *Kribbella hippodromi* sp. nov., isolated from soil from a racecourse in South Africa, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 443-446.
- Evtushenko L. I. ve Takeuchi M., 2006. The Family *Microbacteriaceae*. In The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, volume 3, Chapter 1.1.28., Springer, 1020-1098, Springer.

- Fernandez-Chimeno I., Gravalos D.G., 2000. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporin and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. strain, *J. Antibiot.* (Tokyo), 53, 895-902.
- Fiedler F., ve O. Kandler. 1973a. Die Aminosäuresequenz von 2,4-diaminobuttersäure enthaltenden murein bei verschiedenen coryneformen bacterian und *Agromyces ramosus*, *Arch. Microbiol.* 89:51–66.
- Fiedler H.P., Bruntner C., Bull A.T., Ward A.C., Goodfellow M. ve Mihm G., 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites, *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 37-42.
- Fischer A., R. M. Kroppenstedt ve E. Stackebrandt. 1983. Molecular-genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadura* and *Nocardiopsis*, *J. Gen. Microbiol.* 129:3433–3446.
- Fleck W. F., Strauss D. G., Meyer J. ve Porstendorfer G.. 1978. Fermentation, isolation, and biological activity of maduramycin: A new antibiotic from *Actinomadura rubra*, *Z. Allg. Mikrobiol.* 18:389–398.
- Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult J.C., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M., ve diğ. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*, *Rd. Science*, 269, 496–512.
- Fox G. E., Peckman K. J. ve Woese C. R., 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 44-57.
- Fraser C.M., Gocayne D.J., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult J.C., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelly M.J., Fritchman J.L., Weidmann J.F., Small K.V., Sandusky M., Fuhrmann J., Nguyen D., Utterback T.R., Saudek M.D., Philips C.A., Merrick J.M., Tomb J.F., Dougherty B.A., Bott K.F., Hu P.C., Lucier T.S., Petterson S.N., Smith H.O., Hutchison III, C.A., Venter J.C., 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*, *Science*, 270, 397–403.
- Funke G., Stubbs S., Altweigg M., Carlotti A. and Collins M.D., 1994. *Turicella otitidis* gen. nov., sp. nov., a coryneform bacterium isolated from patients with otitis media, *Int. J. of Syst.c Bacteriol.* 44, 270–273.
- Gacto M., Vicente-Soler J., Cansado J., Villa T.G., 2000. Characterization of an extracellular enzyme system produced by *Micromonospora chalicea* with lytic activity on yeast cells, *J.of App. Microbiol.*, 88, 961-967.
- Galatenko O. A., Terekhova L. P. ve Preobrazhenskaya T. P., 1981. New *Actinomadura* species isolated from Turkmen soil samples and their antagonistic properties [in Russian], *Antibiotiki* 26:803–807.
- Garcia L.C, Martínez-Molina E, Trujillo M.E., 2010. *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 331-337.
- Gauze G. F., Terekhova L. P., Galatenko O. A., Preobrazhenskaya T. P., Borisova V. N. ve Federova G. B., 1984. *Actinomadura recticatena* sp. nov., a new species and its antibiotic properties [in Russian]. *Antibiotiki* 29:3–7.

- Gauze G. F., Sveshnikova M. A., Ukholina R. S., Gaurilina D. V., Filicheva V. A. ve K. Gladkikh G.. 1973. Production of antitumor antibiotic carminomycin by *Actinomadura carminata* sp. nov., *Antibiotiki* 18:675– 678.
- Gillis M., Vandamme P., de Vos P., Swings J., Kersters K., 2005. Polyphasic taxonomy. Bergey's Manual® Systematic Bacteriology, 43-48, DOI: 10.1007/0-387-28021-9\_7.
- Goodfellow M. ve Maldonado L. A., 2006. The Families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. In *The Prokaryotes*, A handbook on the Biology of Bacteria, (Editörler: S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, M. Dworkin), 3<sup>th</sup> edition, volume 3, s: 682-724, New York.
- Goodfellow M., Fiedler H. P., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98:,119–42.
- Goodfellow M., Williams E. 1986. New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 4, 213–262.
- Goodfellow M. ve Alderson G., 1977. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex, *Journal of General Microbiology* 100, 99–122.
- Goodfellow M. ve Cross T., 1984. Classification. In: The biology of the actinomycetes, eds Goodfellow M, Mordarski J.G and Williams S.T. *Academic Press*, 7-164.
- Goodfellow M. ve Lechevalier M.P., 1989. Genus *Nocardia* Trevisan 1889, 9AL, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. Williams ST, Williams ve Wilkins, Baltimore, 4, 2350-2361.
- Goodfellow M. ve Minnikin D.E., 1981a. The genus *Nocardia* and *Rhodococcus*. In: Starr, M.P., Stolp, B., Trüper, H.G. and Schlegel, H.G. (eds.) Berlin; Springer. *The Prokaryotes*, II, 2016-2027.
- Goodfellow M. ve Minnikin D.E., 1984. Circumscription of the genus. In: Kubica, G.P. and Wayne, L.G. (eds.): *The Mycobacteria*; New York: Marcel Dekker, 1-24.
- Goodfellow M., 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria, *J. of Gen. Microbiol.*, 69, 33-80.
- Goodfellow M., 1989. The Actinomycetes I. Suprageneric classification of actinomycetes. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, Edited by S.T. Williams, M.E. Sharpe, J.G. Holt. Baltimore: Williams, Wilkins. 2333-2339.
- Goodfellow M., 1992. The family *Nocardiaceae*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. And Schleifer, K.H. (eds.): *The Prokaryotes* 2nd Edition, New York, Springer, 2, 1188-1213.
- Goodfellow M., Alderson G., 1979. Numerical Taxonomy of *Actinomadura* and Related *Actinomycetes*, *Journal of General Microbiology*, 112, 95-111.
- Goodfellow M., Alderson G., Chun J., 1998. *Rhodococcal* systematics: problems and developments, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74, 3-20.

- Goodfellow M., ve Aubert E., 1980. Characterization of rhodococci from the intestinal tract of Rapa Nui cockroaches. *In: G. L. Nogrady (Ed.) Microbiology of Easter Island*. Sovereign Press. Oakville, Canada. 2:231–240.
- Goodfellow M., Maldonado, L.A., 2006. The families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae. *In The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria*, (Edit: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M.). 3th edition, volume, 3, 843-888.,
- Goodfellow M., ve T. Pirouz. 1982. Numerical classification of sporoactinomycetes containing meso-diaminopimelic acid in the cell Wall, *J. Gen Microbiol.* 128:503–527.
- Goodfellow M., Davenport R., Stainsby F.M. ve Curtis T.P., 1996. Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants, *J. of Ind. Microbiol.*, 17 (3-4), 268-280.
- Goodfellow M., Davenport R., Stainsby F.M., Curtis T.P., 1996. Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants, *J. of Ind. Microbiol.*, 17(3-4), 268-280.
- Goodfellow M., E. Stackebrandt ve R. M. Kroppenstedt. 1988. Chemotaxonomy and actinomycete systematics. *In: Y. Okami, T. Beppu, and H. Ogawara (Eds.) Biology of Actinomycetes, Japan Scientific Societies Press*. Tokyo, Japan. 233–238.
- Goodfellow M., Fiedler H.P., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics, *Antonie van Leeuwenhoek* 98, 119–142.
- Goodfellow M., G. Alderson ve Lacey J., 1979. Numerical taxonomy of *Actinomadura* and related actinomycetes, *J. Gen. Microbiol.* 112:95–111.
- Goodfellow M., Işık K., Yates E., 1999. Actinomycete systematics: An unfinished synthesis. *Nova acta Leopoldina* NF80, 312, 47-82 .
- Goodfellow M., Kumar Y., Labeda D.P., Sembiring L., 2007. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for *Streptomyces* with rugose ornamented spores, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92, 173–199.
- Goodfellow M., Maldonado L.A., 2006. The families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae. *In The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria*, (Edit: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M.). 3th edition, volume, 3, 843-888.
- Goodfellow M., Manfilo G.P., Chun J., 1997. Towards a practical species, concept for cultivable bacteria. *In Species: The biodiversity*, (Edited by M.F. Claridge, H.A., Dawah, and M.R. Wilson) Chapman and Hall, London. 25-59.
- Goodfellow M., Simpson K.E., 1987. Ecology of streptomycetes, *Front. Appl. Microbiol.*, 2, 97-125.
- Goodfellow M., Stanton L.J., Simpson K.E., Minnikin D.E., 1990. Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes, *J. Gen. Microbiol.*, 136, 19-36.
- Goodfellow M., ve Minnikin D.E., 1977. Nocardioform Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 159-180.

- Goodfellow M., ve Minnikin D.E., 1978. Numerical and chemical methods in the classification of *Nocardia* and related taxa. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektion skrankheiten und Hygiene. I. Abteilung, Supplement, 6, 43-51.
- Goodfellow M., ve Minnikin D.E., 1981b. Classification of nocardioform bacteria. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektion skrankheiten und Hygiene. I. Abteilung, Supplement, 11, 7-16.
- Goodfellow M., Weaver C.R. ave Minnikin D.E., 1982. Numerical classification of some rhodococci, corynebacteria and related organisms. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 731-745.
- Gordon R.E., Mihm J.M., 1962. The type species of the genus *Nocardia*, *J. Gen. Microbiol.*, 27, 1-10.
- Gotlieb D., 1961. An evaluation of criteria and procedures used in the description and characterization of the streptomycetes. A cooperative study, *Applied Microbiology*, 9, 55-65.
- Guo D., Su Y., Dai J., Guo H. 2002. Lecture on the 23rd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Florence.
- Gupta R.S., 2009. Protein signatures (molecular synapomorphies) that are distinctive characteristics of the major cyanobacterial clades, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59, 2510-2526; DOI 10.1099/ijms.0.005678-0
- Gurovic M. S. V., Müller S., Domin N., Seccareccia I., Nietzsche S., Martin K. and Nett M., 2013. *Micromonospora schwarzwaldensis* sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil, *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63, 3812–3817
- Gutierrez-Lugo, M.T., Woldemichael G.M., Singh M.P., Suarez P.A., Maiese W.M., Montenegro G., Timmermann B.N., 2005. Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068. *Nat. Prod. Res.*, 19, 645-652.
- Gürtler V., Smith R., Mayall B.C., Pötter-Reinemann G., Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M., 2001. *Nocardia veterana* sp. nov., isolated from human bronchial lavage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 933-936.
- Gyobu Y., ve S. Miyadoh. 2001. Proposal to transfer *Actinomadura carminata* to a new subspecies of the genus *Nonomuraea* subsp. *carminata* comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51:881–889.
- Hagblom M.M., Nohyék L.J., Palleroni N.J., 1994 Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti ve diğ. 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 485–493.
- Hahn M. W., Lunsdorf H., Wu Q., Schauer M., Hofle M. G., Boenigk J., ve Stadler P., 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia, *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1442–1451.
- Hanafy A., Ito J., Iida S., Kang Y., Kogure T., Yazawa K., Yaguchi T. ve Mikami Y., 2006. Majority of *Actinomadura* clinical isolates from sputa or bronchoalveolar lavage fluid in Japan belongs to the cluster of *Actinomadura*

- cremea* and *Actinomadura nitritigenes*, and the description of *Actinomadura chibensis* sp. nov. *Mycopathologia*. 162, 281-287.
- Hatano, K. 1997. Actinomycete populations in mangrove rhizospheres. *IFO Res. Commun.* 18:26–31.
- Hatano, K., Nishii, T., Kasai, H., 2003. Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA–DNA hybridization and sequences of *gyrB*, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1519–1529.
- Hayakawa M., Otoguro M., Takeuchi T., Yamazaki T., ve Iimura Y., 2000. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter, *Ant. v. Leeuwenhoek* 78:171–185.
- Hayakawa M., Yoshida Y. ve Iimura Y., 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology* 96: 973-981.
- Helmke E., ve Weyland H., 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:127–138.
- Henssen A., 1957. Beitrage zur Morphologie and Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Arch Mikrobiol*, 26, 373-414.
- Hiltunen L. H., Weckman A., Ylhainen A., Rita H., Richter E., Valkonen J. P. T., 2005. Responses of potato cultivars to the common scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*, *Ann. Appl. Biol*, 146, 395-403.
- Hirsch A.M., Valdés M., 2010. *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels, *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 536-542.
- Hirsch P., Mevs U., Kroppenstedt R.M., Schumann P. ve Stackebrandt, E., 2004. Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932, *Syst. Appl. Microbiol.*, 27, 166–174.
- Hopwood DA. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome, *Annu. Rev. Genet.* 40:1–23.
- Hopwood DA. 2007. *Streptomyces in nature and medicine*. Oxford University Press, New York, NY.
- Horan A.C., Brodsky B.C., 1986. *Micromonospora rosaria* sp.nov. nom. rev., the rosaramicin producer, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36, 478-480.
- Hoshino Y., Mukai A., Yazawa K., Uno J., Ando A., Mikami Y., Fukai T., Ishikawa J., Yamaguchi K., 2004. Transvalencin A, thiazolidine zinc complex antibiotic produce by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis*. II. Structure elucidation, *J Antibiot*, 57, 803-807
- Houge-Frydrych C.S., Readshaw S.A., Bell D.J., 2000. SB-219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a *Micromonospora* sp. II. Structure determination, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 53, 351-356.

- Huang L.H. 1980. *Actinomadura macra* sp. nov., the producer of antibiotics CP-47, 433 and CP-47,434. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 565-568.
- Hutchinson M., Ridgway J.W., Cross, T., 1977. Biodeterioration of rubber in contact with water, sewage and soil. In: Lovelock D.W., Gilbert R.J. (Ed), *Microbial Aspects of Deterioration of Materials*, Academic Press, London, 187-202.
- Iinuma S., Yokota A., Hasegawa T. ve Kanamaru T., 1994. *Actinocorallia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 230- 234.
- Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakoki Y., Hattori M. ve Ōmura S., 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nature Biotechnology* 21: 526-531.
- Ilic S.B., Konstantinovic S.S., Todorovic Z.B., Lazic M.L., Velkovic V.B., Jokovic N., Radonovic B.C., 2007. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomyces isolates, *Microbiology*, 76, 421-428.
- Istianto Y., Koesoemowidodo R. S. A., Saputra H., Watanabe Y., Pranamuda H., And Marwoto B. 2012. Application of Phenol Pretreatment for the Isolation of Rare *Actinomycetes* from Indonesian Soil, *Microbiology Indonesia*, 6,42-47.
- Ivanova N., Sikorski J., Jando M., Munk C., Lapidus A., Glavina Del Rio,T., Copeland A., Tice H., Cheng J. F. Ve other authors, 2010. Complete genome sequence of *Geodermatophilus obscurus* type strain (G-20T), *Stand Genomic Sci* 2, 158–167.
- Jannat-Khah D., Kroppenstedt R. M., Klenk H. P., Sproer C., Schumann P., Lasker B. A., Steigerwalt A. G, Hinrikson H. P. and Brown J. M., 2010. *Nocardia mikamii* sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 60, 2272–2276
- Jansen P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes, *App. and Env. Microbiol.*, 72, (3), 1719-1728.
- Jensen, H.L., 1932. Contributions to our knowledge of the actinomycetes. III. Further observations on the genus *Micromonospora*, *Proc. Linn. Soc. NSW*57, 173-180.
- Jensen J.L., 1931. Contributions to our knowledge of the Actinomycetales. II. The definition and subdivision of the genus *Actinomyces* with a preliminary account of Austrilian soil actinomycetes, *Proc. Linnean. Soc. NSW*, 56,345-370.
- Jiang C.-L., Xu L.-H., 1996. Diversity of aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau, Yunnan, China, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 249-253.
- Jiao W., Zhao X., Yuan W., Liao W., Li, M., Fang L., 2008. Two *Micromonospora* Strains from Dalian Area Marine Mud Sample. *Journal of Microbiology* (Chinese), DOI, CNKI:SUN: WSWX.0.2008-05-007.
- Jin L., Lee H. G., Kim H. S., Ahn C. Y. ve Oh, H. M., 2013. *Geodermatophilus soli* sp. nov. and *Geodermatophilus terrae* sp. nov., two novel actinobacteria isolated from grass soil. *Int J Syst Bacteriol* 63, 2625–2629.
- Jinno S., Jirakulaporn T., Bankowski M.J., Kim W., Wong R., 2007. Rare Case of *Nocardia asteroides* Pericarditis in a Human Immunodeficiency Virus-Infected Patient, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2330-2333.

- Jones A. L., J. M. Brown J. M., V. Mishra V., Perry J. D., Steigerwalt A. G. ve Goodfellow M., 2004. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:407–411.
- Jones D., Watkins J. ve Meyer D. J., 1970. Cytochrome composition and effect of catalase on growth of *Agromyces ramosus*, *Nature* 226:1249–1250.
- Jordal P. B., Dueholm M. S., Larsen P., Petersen S. V., Enghild J. J., Christiansen G., Højrup P., Nielsen P. H. ve Otzen D. E., 2009. Widespread abundance of functional bacterial amyloid in mycolata and other Gram-positive bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4101–4110.
- Jukes T.H., Cantor C.R., 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, vol. 3, Editörler: Munro, H.N., Academic Press. s: 21-132, New York.
- Jurado V., Boiron P., Kroppenstedt R.M., Laurent F., Couble A., Laiz L., Klenk H.P., Gonzáles J.M., Saiz-Jimenez C., Mounié D., Bergeron E. ve Rodríguez-Nava V., 2008. *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2210-2214.
- Kaewkla O., ve Franco C. M. M., 2013. *Kribbella endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized leaf of a native apricot tree, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:1249-1253
- Kalakoutskii L.V., Kirillova I.P., Krassilnikov N.A., 1967. A new genus of the Actinomycetales, *Intrasporangium* gen. nov., *J. Gen. Microbiol.*, 48, 79-85.
- Kämpfer P., 2006. *The family Streptomycetaceae- Part 1: Taxonomy*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E., (eds) *The Prokaryotes*, New York, Springer, 3, 538-604.
- Kämpfer P., Lodders N., Grun-Wollny I., Martin K. ve Busse H. J., 2012. *Nocardia grenadensis* sp. nov., isolated from sand of the Caribbean Sea. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* , 62, 693–697
- Kämpfer P., Busse H.-J., Tindall B. J., Nimtz M. & Grun-Wollny I., 2010. *Nonomuraea rosea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1118–1124.
- Kämpfer P., Kroppenstedt R. M. ve Grun-Wollny I., 2005. *Nonomuraea kuesteri* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 847–851.
- Kämpfer P., Wellner S., Lohse K., Lodders N. ve Martin K., 2013. *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1024–1029
- Kasai H., Tamura T., Harayama S., 2000a. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB* based phylogeny and DNA relatedness, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 127–134.
- Kawamoto I., Okachi R., Kato H., Yamamoto S., Takahashi I., Takasawa S., Nara T., 1974. The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization, *J. Antibiot.*, 27, 493-501.
- Kawamoto I., Yamamoto M., Nara T., 1983. *Micromonospora olivatetraspora* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33, 107-112.

- Keddie R.M. ve Cure G.L., 1977. The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural resources, *J. Appl. Bacteriol.*, 42, 229-252.
- Kewkla O. ve Franco C.M.M., 2010. *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 1532-1536.
- Kim D., Chun J., Sahin N., Hah Y-C., Goodfellow M., 1996. Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparison, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 46, 581-587.
- Kim B., Al-Tai A.M., Kim S.B., Somasundaram P., Goodfellow M., 2000. *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endoxylanase-producing streptomycete, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 505-509.
- Kim B.J., Lee S.H., Lyu M.A., Kim S.J., Bai G.H., Chae G.T., Kim E.C., Cha C.Y. ve Kook Y.H., 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*), *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1714-1720.
- Kim O.-S., Cho Y.-J., Lee K., Yoon S.-H., Kim M., Na H., Park S. C., Jeon Y. S., Lee J. H., Yi H., Won S. Chun J., 2012. Introducing Ez Taxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species, *Int J Syst Evol Microbiol*, 62, 716-721
- Kirby B.M., Meyers P.R., 2010. *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 1328-1333.
- Kirby B.M., Roes M.L., Meyers P.R., 2006. *Kribbella karoonsensis* sp. nov. and *Kribbella swartbergensis* sp. nov., isolated from soil from the Western Cape, South Africa, *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 56, 1097-1101.
- Klatte S., Rainey F.A. ve Kroppenstedt R.M., 1994a. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. & *Gordona amarae* comb. nov., *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 44, 769- 773.
- Koch C., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., 1996. Intragenic relationships of the Actinomycete Genus *Micromonospora*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 383-387.
- Koçak F. Ö., 2011. Bazı Nocardioform İzolatların 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* Gen Dizi Analizleri İle Moleküler Sistematığı, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Türkiye.
- Kokare C.R., Mahadik K.R., Kadam S.S., 2004. Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian Journal of Marine Sciences*, 33 (3), 248-256.
- Konstantinidis K. T., Tiedje J. M., 2007. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead, *Curr Opin Microbiol*, 10, 504-509
- Korn-Wendisch F. ve Kutzner H.J., 1992. The family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification. Applications*, pp. 921-995. Edited by A. Balows, H.G. Trüper, M.

- Dworkin, W. Harder. and K-H. Schleifer, 2nd edition, volume 1. Springer-Verlag, New York.
- Koronelli T.V., 1996. Principles and methods for raising the efficiency of biological degradation of hydrocarbons in the environment: review, *Applied Biochemistry and Microbiology* 32, 519–525.
- Kost C., Lakatos T., Böttcher I., Wolf-Rüdiger A., Redenbach M., Wirth R., 2007. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 94, 821-828.
- Kost C., Lakatos T., Böttcher I., Wolf-Rüdiger A., Redenbach M., Wirth R., 2007. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 94, 821-828.
- Krasil'nikov N.A., 1938. Ray fungi and related organisms. Actinomycetales. Iz vest. Akad. Nauk. S. S. S. R., 1-328.
- Kroppenstedt R. M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: M. Goodfellow and D. E. Minnikin (Eds.) Chemical Methods in Bacterial Systematics, *Academic Press*. London, UK. 173–199.
- Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. ve Goodfellow M., 1990. Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*, *Syst. Appl. Microbiol.* 13:148–160.
- Kroppenstedt R.M., 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. Chemical Methods in Bacterial Systematics, (ed. Goodfellow, M. and Minnikin, D. E.) *Academic Press*, London. 173–199.
- Kroppenstedt R.M., Goodfellow M., 1992. The family *Thermomonosporaceae*. The Prokaryotes (Edited by A. Balows, H.G. Trupper, M. Dworkin, W. Harder, K. Schleifer). Berlin: Springer, 1085-1110.
- Kroppenstedt R.M., Goodfellow M., 2006. The family *Thermomonosporaceae*: *Actinocorallina*, *Actinomadura*, *Spirillospora* and *Thermomonospora*. In The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, volume 3, 682-724.
- Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. ve Goodfellow M., 1990. Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 13, 148-160.
- Kudukhashvili P. G., Gurielidze M. A. ve Pataraya D. T. 2001. Study of the lytic activities of actinomycetes isolated from different soils in Georgia, *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 251–252.
- Kuhlman K. R., Allenbach L. B., Ball C. L., Fusco W. G., La Duc M. T., Kuhlman G. M., Anderson R. C., Stuecker T., Erickson I. K. ve other authors 2005. Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. *Icarus* 174, 585–595.
- Kumar Y., 2007. Mapping metabolites to the phylogeny of strains belonging to the *Streptomyces violaceusniger* 16SrRNA Gene Clade PhD. Thesis. Newcastle Univeristy, Medical School, Newcastle upon Tyne, U.K.

- Kurtböke D.I., 2000. Australian Actinomycetes: An Unexhausted Source for Biotechnological Applications. *Actinomycetologica*, 14 (2), 43-53.
- Kurtböke D.I., Neller R.J., Bellgard S.E., 2007. Dune Vegetation Zones of Fraser Island, Australia, *Microbial Ecology*, 54, 332–340.
- Lacey J., Goodfellow M., Alderson G., 1978. The genus *Actinomadura* Lechevalier and Lechevalier. Zentralblatt für Bakteriologie, Pflanzenerkrankungskunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Abteilung I), Supplement 6, 107-117.
- Lagesen K., W. Ussery D. ve Wassenaar M., T. 2010. Genome Update: The Thousandth Genome A Cautionary Tale. *Microbiology*, 156, 603-608.
- Laiz L., I. Groth P. Schumann F. Zezza A. Felske B. Hermosin ve C. Saiz-Jimenez. 2000. Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Int. Microbiol.* 3:25–30.
- Lambert D.H., Loria H., 1989b. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 393–396.
- Lamm A.S., Khare A., Conville P., Lau P.C.K., Bergeron H. ve Rossazza J.P.N., 2009: *Nocardia iowensis* sp. nov., an organism rich in biocatalytically important enzymes and nitric oxide synthase, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2408-2414.
- Lane D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-148. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow, JohnWiley and Sons, Chichester.
- Lanoot B., Vancanneyt M., Dawyndt P., Cnockaert M., Zhang J., Huang Y., Liu Z., Swings J., 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 27, 84–92.
- Lanoot B., Vancanneyt M., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Cnockaert M.C., Dawyndt P., Liu Z., Huang Y., Swings J., 2005. Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting, *Res. Microbiol.*, 156, 755–762.
- Lapage, S.P., Sneath P.H.A, Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R. ve Clark, W.A., 1992. International Code of Nomenclature of Bacteria. Bacteriological Code, 1990 Revision. Washington (DC): ASM Press.
- Lavrova N. V. ve Preobrazhenskaya T. P., 1975. Isolation of new species of the genus *Actinomadura* on selective media with rubromycin [in Russian], *Antibiotiki* 20:438– 448.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F., 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producer of new antibiotics, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 399–405.
- Le Roes M. ve Meyers P. R., 2008. *Nonomuraea candida* sp. nov., a new species from South African soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 93,133–139.
- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P., 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes, *Int J. Syst. Bacteriol.*, 20, 435-443.

- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P., 1970. A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: H. Prauser (Ed.) *The Actinomycetales*, Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 393-405.
- Lechevalier M.P., DeBievre C., Lechevalier H.A., 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition, *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.
- Lechevalier M.P., Lechevalier H.A., 1974. *Nocardia amarae* sp. nov. an actinomycete common in foaming activated sludge, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 278-288.
- Lee S.D., 2006: *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 559-562.
- Lee S.D., Goodfellow M., Hah Y.C., 1999. A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoensis* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. nov., *Microbiology letters*, 178 (2), 349-354.
- Lee S.D., Hah Y.C., 2002. Proposal to transfer *Catellatospora ferruginea* and "*Catellatospora ishikariensis*" to *Asanoa* gen. nov. as *Asanoa ferruginea* comb. nov. and *Asanoa ishikariensis* sp. nov., with emended description of the genus *Catellatospora*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 967-972.
- Lee S.D., Kang S-O., Hah Y.C., 2000. *Hongia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 191-199.
- Lee S.O., Choi G.J., Choi Y.H., Jang K.S., Park D.J., Kim C.J., Kim J.C., 2008. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 1741-1746.
- Lemmer H., Kroppenstedt R.M., 1984. Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge, *System. Appl. Microbiol.*, 5, 124-135.
- Li J., Zhao G. Z., Huang H. Y., Zhu W. Y., Lee J. C., Xu L. H., Kim C. J. ve Li W. J., 2011. *Nonomuraea endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Artemisia annua* L., *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 757-761.
- Li J., Zhao G. Z., Chen H. H., Qin S., Xu L. H., Jiang C. L., Li W. J., 2008. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf, *Syst Appl Microbiol.* 31(2):108-13
- Li J., Zhao G. Z., Long L. J., Wang F. Z., Tian X. P., Zhang S. and Li W. J., 2012. *Rhodococcus nanhaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from marine sediment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2517-2521
- Li W. J., Zhang L.-P., Xu X.-L., Cui X.-L., Xu L.-H., Stackebrandt E. ve Jiang C.-L., 2003. *Agromyces aurantiacus* sp. nov., isolated from a Chinese primeval forest, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:303-307.
- Li W. J., Wang D., Zhang Y.-Q., Schumann P., Stackebrandt E., Xu L.-H., Jiang C.-L., 2004. *Kribbella antibiotica* sp. nov., a novel nocardioform actinomycete strain isolated from soil in Yunnan, China, *Syst. Appl. Microbiol.*, 27, 160-165.

- Li W. J., Wang D., Zhang Y.-Q., Xu L.-H., Jiang C.-L., 2006. *Kribbella yunnanensis* sp. nov., *Kribbella alba* sp. nov., two novel species of genus *Kribbella* isolated from soils in Yunnan, China, *Syst. Appl. Microbiol.*, 29, 29–35.
- Li X. M., Zhang L. M., Ding Y., Gao Y. S., Ruan J. S. ve Huang Y., 2012. *Nonomuraea jiangxiensis* sp. nov., isolated from acidic soil, *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1409–1413.
- Li Y., Kawamura Y., Fujiwara N., Naka T., Liu H., Huang X., Kubayashi K. ve Ezaki T., 2004. *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:827–835.
- Lipski A., Altendorf K., 1995. *Actinomadura nitritigenes* sp. nov., Isolated from Experimental Biofilters, *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 45(4) 717-723.
- Little AEF, Currie CR. 2007. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis, *Biol. Lett.* 3:501–504.
- Liu J., Zhou Y., Yu C., Han Y., Wu F., Qi B., 1986. The Structures of Huperzine A and B, Two New Alkaloids Exhibiting Marked Anticholinesterase Activity, *Canadian Journal of Chemistry*, 64, 837–839.
- Lu Z., Wang L., Zhang Y., Shi Y., Liu Z., Quintana E.T., Goodfellow M. 2003. *Actinomadura catellatispora* sp. nov. and *Actinomadura glauciflava* sp. nov., from a sewage ditch and soil in southern China, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 137-142.
- Ludwig W, Klenk H.P., 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn, vol 2, the proteobacteria, part A, introductory essays. Springer, USA, 49–65.
- Luedemann G. M., 1968. *Geodermatophilus*, a new genus of the *Dermatophilaceae* (*Actinomycetales*). *J. Bacteriol.* 96, 1848–1858.
- Luedemann G.M., 1971. *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis 1916) comb. nov. (subjective synonym: *Micromonospora fusca* Jensen 1932), *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21, 240-247.
- Luedemann G.M., Brodsky B., 1965. *Micromonospora carbonacea* sp. nov, an everninomicin-producing organism. *Antimicrob Agents Chemother*, 1964, 47-52.
- Luedemann G.M., Brodsky B.C., 1964. Taxonomy of gentamycin-producing *Micromonospora*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1963, 116-124.
- Madigan M.T., Martinko J.M., 2009. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Onbirinci Baskıdan Çeviri, Syf 324-325.
- Maldonado L., Hookey J.V., Ward A.C., ve Goodfellow M., 2000. The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov., *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 367–377.
- Maldonado L.A., Fenical W., Jensen P.R., Kauffman C.A., Mincer T.J., Ward A.C., Bull A.T., Goodfellow M., 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. And *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1759-1766.

- Maldonado L.A., Fragoso-Yáñez D., Pérez-García A., Rosellón-Druker J., Quintana E.T., 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95, 111-120.
- Matsumoto A., Takahashi Y., Shinose M., Seino A., Iwai Y., Omura S., 2003. *Longispora albida* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Micromonosporaceae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1553-1559.
- McCarthy A. J., Williams S. T., 1990. Methods for studying the ecology of *actinomycetes*, *Methods in Microbiology*, 22, 533–563.
- McClung N. M., 1974. Family VI. *Nocardiaceae* Castellani and Chalmers 1919, 1040. In: Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. (Eds.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Edition: Baltimore: Williams and Wilkins, 726-746.
- McNeil M.M., Brown J.M., 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology, *Clinical Microbiological Reviews*, 7, 357-417.
- Mertz F.P. ve Yao R.C., 1986. *Actinomadura oligospora* sp. nov., the producer of a new polyether antibiotic, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36, 179-182.
- Mertz F.P. ve Yao R.C., 1990. *Actinomadura fibrosa* sp. nov. isolated from soil, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 28-33.
- Merzaeva O.V., Shirokikh I.G., 2006. Colonization of plant rhizosphere by actinomycetes of different genera, *Microbiology*, 75, 226-230.
- Meyer J. 1979. New species of the genus *Actinomadura*. *Z. Allgem. Mikrobiol.* 19:37–44.
- Meyer J. 1981. Validation of the publication of new names and new combinations previously affectively published outside the IJSB List No. 6. *Int J. Syst. Bacteriol.* 31:215– 218.
- Meyer J. 1989. Genus *Actinomadura* Lechevalier and Lechevalier 1970, 400AL. In: S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 4:2511– 2526.
- Miller E.S., Woese C.R., Brenner S., 1991. Description of the erythromycin-producing bacterium *Arthrobacter* sp. strain NRRL B-3381 as *Aeromicrobium erythreum* gen. Nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 363-368.
- Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical W., 2002. Widespread and persistent populations of a major actinomycete taxon in ocean sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5005-5011.
- Minnikin D.E. ve Goodfellow M., 1976. Lipid composition in the classification and identification of nocardiae and related taxa. In: *The Biology of the Nocardiae* (M. Goodfellow, G.H. Brownell and J.A. Serrano eds). Academic Press, London, 160- 219.
- Minnikin D.E. ve Goodfellow M., 1980. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. In: *Microbiological Classification and Identification* (M. Goodfellow and R.G. Board, eds). Academic Press, London, 189-256.

- Minnikin D.E. ve Goodfellow M., 1981. Lipids in the classification of actinomycetes. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. I. Abteilung, Supplement*, 11, 99-109.
- Minnikin D.E., Goodfellow M. ve Collins M.D., 1978. Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. In: Bousfield, I.J. and Calley, A.G. (eds.): *Coryneform Bacteria*, London, Academic Press., 85-160.
- Minnikin D.E., Hutchinson I.G., Caldicott A.B., Goodfellow M., 1980. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria, *Journal of Chromatography A*, 188 (1), 221-233.
- Mitsubishi Kasei Corporation (MKC). 1989. Production of D-N-carbamyl-alpha-amino acids. Patent JP 01228489.
- Miyadoh S., Miyara T., 2001. Family *Thermomonosporaceae*. In *Identification Manual of Actinomycetes*, (Edited by the Society for Actinomycetes, Japan) 281–291. Business Center for Academic Societies. Tokyo:
- Miyajima K., Tanaka F., Takeuchi T., Kuninaga S., 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 48, 495–502.
- Mohammadipanah F., Hamed J., Göker M., Fiebig A., Pukall R., Spröer C., ve Klenk H. P., 2013. *Kribbella shirazensis* sp. nov., isolated from Iranian soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:3369-3374
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Broughton W. J., Cattaneo A., Favet J., Pötter G., Rohde M., Spröer C., Schumann P., 2013a. *Geodermatophilus tzadiensis* sp. nov., a UV radiation-resistant bacterium isolated from sand of the Saharan desert, *Syst Appl Microbiol* 36, 177–182.
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Pötter G., Rohde M., Spröer, C., Schumann, P., Gorbushina, A. A. & Klenk, H.-P., 2012. *Geodermatophilus arenarius* sp. nov., a xerophilic actinomycete isolated from Saharan desert sand in Chad. *Extremophiles* 16, 903– 909.
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Pötter, G., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Gorbushina, A. A. ve Klenk, H.-P., 2013b. *Geodermatophilus arenarius* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 150. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 797–798.
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Pötter G., Rohde M., Spröer C., Schumann P., Gorbushina A. A. ve Klenk H.-P., 2013c. *Geodermatophilus saharensis* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 151. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1577–1580.
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Pötter G., Rohde M., Spröer C., Schumann P., Gorbushina A. A. ve Klenk H.-P., 2013d. *Geodermatophilus saharensis* sp. nov., isolated from sand of the Saharan desert in Chad. *Arch Microbiol* 195, 153–159.
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Pötter G., Rohde M., Spröer C., Schumann P., Klenk H.-P. ve Gorbushina A. A., 2013e. *Geodermatophilus telluris* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan desert sand. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 2254–2259.

- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Rohde M., Schumann P., Pötter G., Spröer C., Gorbushina A. A. ve Klenk H.-P., 2013f. *Geodermatophilus siccatus* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List no. 151. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1577–1580.
- Montero-Calasanz M. C., Göker M., Rohde M., Schumann P., Pötter G., Spröer C., Gorbushina, A. A. ve Klenk H.-P., 2013g. *Geodermatophilus siccatus* sp. nov., isolated from arid sand of the Saharan desert in Chad. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 449–456.
- Mordarski M., Schaal K.P., Tkacz A., Sayba K. ve Goodfellow M., 1978. Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies on *Nocardia*. Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektion skrankheiten und Hygiene. I. Abteilung, Supplement, 6, 91-97.
- Moser B. D., Klenk H. P., Schumann P., Potter G., Lasker B. A., Steigerwalt A. G., Hinrikson H. P. and Brow J. M., 2011. *Nocardia niwae* sp. nov., isolated from human pulmonary sources. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 438–442
- Munoz J., Mirelis B., Aragon L.M., Gutierrez N.F., Sanchez M., Espanol O., Esparcia M., Gurgui P., Domingo P., 2007. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997-2003. *J. Med. Microbiol.*, 56, 545–550.
- Naganawa H., Hashizume H., Kubota Y., Sawa R., Takahashi Y., Arakawa K., Bowers S. G. ve Mahmud T., 2002. Biosynthesis of the aminocyclitol moiety of pyralomicin 1a in *Nonomuraea spiralis* MI178-34F18. *J. Antibiot.* 55:578–584.
- Nakaew N., Sungthong R., Yokota A. ve Lumyong S., 2012. *Nonomuraea monospora* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil in Thailand, and emended description of the genus *Nonomuraea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 3007–3012.
- Nakagawa M., Hayakawa Y., Kawai H., Imamura K., Inoue H., Shimazu A., Seto H. ve Otake N. 1983. A new anthracycline antibiotic N-formyl-13-dehydrocarminomycin. *J. Antibiot.* 36:457–458.
- Nakagawa M., Hayakawa Y., Imamura K., Seto M. ve Otake N., 1989. Microbial conversion of anthracyclines to carminomycins by a blocked mutant of *Actinomadura roseoviolacea*, *J. Antibiot.* 42:1698–1703.
- Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K., Kamagata Y., 1995. *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphateaccumulating bacterium isolated from activated sludge, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 17-22.
- Naumova I. B., Shashkov A. S., Tul'skaya E. M., Streshinskaya G. M., Kozlova Yu. I., Potekhina N. V., Evtushenko L. I. ve Stackebrandt E., 2001. Cell Wall teichoic acids: structural diversity, species-specificity in the genus *Nocardia* and chemotaxonomic perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:269–284.
- Naumova I.B., Zaretskaya M.S., Dmitrieva N.F. ve Streshinskaya G.M., 1978. Structural features of teichoic acids of certain *Streptomyces* species. In *Nocardia and Streptomyces*, pp. 75-83. Edited by Mordarski, M., Kurilowicz, W., and Jeljaszewicz, J., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Nesemann G., Thurm H. ve Soeder A., 1974. Mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Oxoalkylxanthenen. German Federal Patent DE2302772.
- Nesterenko O. A., Kvasnikov E. I., Nogina T. M., 1985. *Nocardiodaceae* fam. nov., a new family of the order *Actinomycetales*, *Microbiol. Zh.*, 47, 3–12.
- Nett M., Ikeda H., Moore B. S., 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes, *Nat Prod Rep*, 26: 1362–1384.
- Neu T.R., 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces, *Microbiological Reviews* 60, 151–166.
- Nie G. X., Ming H., Li S., Zhou E. M., Cheng J., Yu T. T., Zhang J., Feng H. G., Tang S. K. ve Li W. J., 2012. *Geodermatophilus nigrescens* sp. nov., isolated from a dry-hot valley, *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 811–817.
- Nimaichand S., Zhang Y. G., Cheng J., Li L., Zhang D. F., Zhou E. M., Dong L., Ningthouja D. S. ve Li W. J., 2013. *Micromonospora kangleipakensis* sp. nov., isolated from a sample of limestone quarry. *Int. J. of Sys. Evol. Microbiol.*, 63, 4546–4551
- Nimaichand S., Sanasam S., Zheng L. Q., Zhu W. Y., Yang L. L., Tang S. K., Ningthoujam D. S and Li W. J., 2013. *Rhodococcus canchipurensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a limestone deposit site. *Int. J. of Sys. Evol. Microbiol.*, 63, 114–118
- Nonomura H. ve Ohara Y., 1971c. Distribution of actinomycetes in soil. XI. Some new species of the genus *Actinomadura*. Lechevalier ve diğ. J. Ferment. Technol., 49, 904-912.
- Normand P., 2006. Geodermatophilaceae fam. nov., a formal description. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2277–2278.
- Normand P., 2006. The Families Frankiaceae, Geodermatophilaceae, Acidothermaceae and Sporichthyaceae. In *The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria*, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, volume 3, Chapter 1.1.28., Springer, 669-681, Springer.
- O'Donnell A. G., Falconer C., Goodfellow M., Ward A. C., Williams E., 1993. Biosystematics and diversity amongst novel carboxydophilic actinomycetes, *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 325-340.
- Olano C, Mendez C, Salas JA. 2009. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 26:628–660.
- Ōmura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y. ve Hattori M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12215-12220.
- Orchard V.A. ve Goodfellow M., 1980. Numerical classification of some named strains of *Nocardia asteroides* and related isolates from soil, *J. Gen. Microbiol.*, 118, 295-312.

- Orchard V.A., 1981. The ecology of *Nocardia* and related taxa. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 1. Abteilung, Supplement, 11, 167-180.
- Ørskov J. 1923. Investigations into the Morphology of the Ray Fungi. Copenhagen: Levin and Munksgaard.
- Özdemir K., 2008. *Lens orientalis* (Boiss.) Hand and Mazz. ve *Cicer anatolicum* Alef. Rizosferden *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu, Teşhisi ve Karakterizasyonu, Doktora tezi. YYÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Pagilla K.R., Jenkins D. ve Kido W., 1998. *Nocardia* effects in waste activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 38 (2), 49-54.
- Park Y.H., Yoon J.H., Shin Y.K., Suzuki K., Kudo T., Seino A., Kim H.J., Lee J. S., Lee S.T., 1999. Classification of '*Nocardiodides fulvus*' IFO 14399 and *Nocardiodides* sp. ATCC 39419 in *Kribbella* gen. nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and *Kribbella sandramycini* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 743-752.
- Peela S., Kurada V.B. ve Terli R., 2005. Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 583- 585.
- Poschner J., Kroppenstedt R. M., Fischer A.ve Stackebrandt E., 1985. DNA : DNA reassociation and chemotaxonomic studies on *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Micropolyspora* and *Nocardiopsis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 6:264-270.
- Prauser H., 1976. *Nocardiodides*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 58-65.
- Prauser H., 1978. Considerations on taxonomic relations among Gram positive, branching bacteria. *Zentralbl. Bakt. I. Abt. Suppl.*, 6, 99-106.
- Prauser H., Schumann P., Rainey F.A., Krppenstedt R.M., Stackebandt E., 1997. *Tetracoccus luteus* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from soil, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 1218-1224.
- Preobrazhenskaya T. P., ve Sveshnikova M. A., 1974. New species of the genus *Actinomadura* [in Russian]. *Microbiologiya* 43:864-868.
- Preobrazhenskaya T. P., Lavrova N. V., Ukholina R. S. ve Nechaeva N. P., 1975. Isolation of new species of *Actinomadura* on selective media with streptomycin and bruneomycin [in Russian]. *Antibiotiki* 20:404-409.
- Promnuan Y., Kudo T., Ohkuma M., Chantawannakul P., 2011. *Actinomadura apis* sp. nov., isolated from a honey bee (*Apis mellifera*) hive, and the reclassification of *Actinomadura cremea* subsp. *rifamycini* Gauze ve diğ. 1987 as *Actinomadura rifamycini* (Gauze ve diğ. 1987) sp. nov., comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61 (9), 2271-2277.
- Qin S., Zhao G. Z., Klenk H. P., Li J., Zhu W. Y., Xu L. H. ve Li W. J. 2009. *Nonomuraea antimicrobica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a leaf of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2747-2751.
- Qin S., Zhao G.Z., Li J., Zhu W.Y., Xu L.H. ve Li W.J., 2009. *Actinomadura flavalba* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from leaves of *Maytenus austroyunnanensi*., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2453-2457.

- Qiu D., Ruan J., Huang Y., 2008. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*, *Appl. Environ. Microbiol.*, doi:10.1128/AEM.00303-08.
- Quintana E., Maldonado L. ve Goodfellow M., 2003. *Nonomuraea terrinata* sp. nov., a novel soil actinomycete, *Ant. v. Leeuwenhoek* 84:1–6.
- Rainey F.A., Burghardt J., Kroppenstedt R.M., Klatte S. ve Stackebrandt E., 1995b. Polyphasic evidence for the transfer of *Rhodococcus roseus* to *Rhodococcus rhodochrous*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 45, 101–103.
- Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M. ve Stackebrandt E., 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 1088-1092.
- Ray L., Suar M., Pattnaik A. K. and Raina V., 2013. *Streptomyces chilikensis* sp. nov., a halophilic streptomycete isolated from brackish water sediment, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 63, 2757–2764
- Ren J., Li L., Wei B., Tang Y. L., Deng Z. X., Sun M. and Hong K., 2013. *Micromonospora wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 63, 2389–2395
- Rheims H., Schumann P., Rohde M., Stackebrandt E., 1998. *Verrucosispora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family *Micromonosporaceae*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 1119-1127.
- Riegel P., Kamne-Fotso M.V., de Briel D. ve diğ. (1994) *Rhodococcus chubuensis* Tsukamura 1982 is a later subjective synonym of *Gordona sputi* (Tsukamura 1978) Stackebrandt 1989 comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* 44, 764–768.
- Rollo F., Luciani S., Canapa A. ve Marota I., 2000. Analysis of bacterial DNA in skin and muscle of the Tyrolean iceman offers new insight into the mummification process. *Am. J. Phys. Anthropol.* 111:211–219.
- Rong X., Guo Y., Huang Y., 2009. Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *Solvifaciens*, *Syst Appl Microbiol*, 32, 314–322.
- Rosselló-Mora R., Amann R., 2001. The species concepts for prokaryotes, *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39-67.
- Ruimy R., Riegel P., Carlotti A., Boiron P., Bernardin G., Monteil H., Wallace R. J. Jr., Christen R., 1996. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. *Int. Syst. Bacteriol.*, 46, 259-264.
- Saintpierre-Bonaccio D., Maldonado L. A., Amir H., Pineau R. ve Goodfellow M., 2004. *Nocardia neocaledoniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 599–603.

- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees, *Molecular and Biological Evolution*, 4, 406-425.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanglier J.J., Haag, H., Huck, T.A. and Fehr. T., 1996. Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Exp Opin Invest Drugs* 5: 207-233.
- Sasaki J., Chijimatsu M. ve Suzuki K.-I.. 1998. Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:403–410.
- Saubolle M.A., Sussland D., 2003. Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *Journal of clin. Microbiol.*, 41, 4497–4501.
- Savic M., Bratic I., Vasiljevic B., 2007. *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2119–2124.
- Sazak A., Sahin N. and Camas M., 2012. *Nocardia goodfellowii* sp. nov. and *Nocardia thraciensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 62, 1228–1234
- Sazak A., 2009. Rizosfer İzolatı *Streptomyces violaceusniger* Klad Üyesi *Streptomyces* sp.“lerin Moleküler Taksonomisi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 213 s.
- Schaal K.P., Lee H.J., 1992. Actinomycete infections in humans-a review. *Gene*, 115, 201-211.
- Schleifer K.H., 2010. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32, 533–542.
- Schleifer K.-H., ve Kandler O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36:407–477.
- Schumann P., Prauser H., Rainey F.A., Stackebrandt E., Hirsch P., 1997. *Friedmanniella antarctica* gen. nov., sp. nov., an ll-diaminopimelic acid-containing actinomycete from antarctic sandstone, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 278-283.
- Sembiring L., 2000. Selective isolation and characterisation of *Streptomyces* associated with the rhizosphere of the tropical legume *Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen Ph. D.Thesis. University of Newcastle Upon Tyne, 78, 353-366, Newcastle.
- Sembiring L., 2009. Molecular phylogenetic classification of streptomycetes isolated from the rhizosphere of tropical legume (*Paraserianthes falcataria*) (L.) Nielsen. *HAYATI Journal of Biosciences*, 16 (3), 100-108.
- Sembiring L., Goodfellow M., 2008. Ecological approach to unravel streptomycete diversity as an unsurpassed sources of natural bioactive products. *Microbiology*, 2 (2), 49-56.
- Sembiring L., Ward, A.C. ve Goodfellow M., 2000. Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated

- with the roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 353-366.
- Semêdo L., Gomes R. C., Linhares A. A., Duarte G. F., Nascimento R. P., Rosado, A. S., Margis-Pinheiro M., Margis R., Silva K., Alviano C. S., Manfio G. P., Soares R., Linhares L. F., Coelho R., 2004. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1323-1328.
- Seo J.P. ve Lee S.D., 2006. *Nocardia harenae* sp. nov., an actinomycete isolated from beach sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2203–2207.
- Seo J.P., Yun Y.W. ve Lee S.D., 2007: *Nocardia speluncae* sp. nov., isolated from a cave, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2932-2935.
- Sezgin M., Lechevalier M.P. ve Karr P.R., 1988. Isolation and identification of actinomycetes present in activated sludge scum., *Wat. Sci. Tech.* 20 (11-12), 257- 263.
- Shirling E.B., Gottlieb D., 1967. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. I. The International *Streptomyces* Project. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 17, 315-322.
- Shirling E.B., Gottlieb D., 1968a. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. The International *Streptomyces* Project. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 18, 69-189.
- Shirling E.B., Gottlieb D., 1968b. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. The International *Streptomyces* Project. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 18, 279-392.
- Shirling E.B., Gottlieb D., 1969. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. The International *Streptomyces* Project. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 19, 391-512.
- Shirling E.B., Gottlieb D., 1972. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. V. The International *Streptomyces* Project. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 22, 265-394.
- Sivakumar K., 2008. Actinomycetes. In Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University.
- Skerman V. B. D., McGowan V. ve Sneath P. H. A., 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol* 30, 225–420.
- Smith J.J., Tow L.A., Stafford W., Cary C., Cowan D.A, 2006. Bacterial diversity in three different Antarctic cold desert mineral soils. *Microb. Ecol.* 51:413– 421.
- Soddell J.A. ve Seviour R.J., 1990. A Review Microbiology of foaming in activated sludge plants, *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 145-176.
- Sohn K., Hong S.G., Kyung S.B., Chun J., 2003. Transfer of *Hongia koreensis* Lee ve diğ. 2000 to the genus *Kribbella* Park ve diğ. 1999 as *Kribbella koreensis* comb. nov. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 53, 1005–1007.
- Soina U. S., Sokolov A. A. ve Agre N. S., 1975. Ultrastructure of mycelium and spores of *Actinomadura fastidiosa* sp. nov. [in Russian]. *Microbiologiya* 44:883–887.

- Song J., Kim B.-Y., Hong S.-B., Cho H.-S., K., Chun J., Suh J.W., 2004. *Kribbella solani* sp. nov. and *Kribbella jejuensis* sp. nov., isolated from potato tuber and soil in Jeju, Korea, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1345–1348.
- Songsumanus A., Tanasupawat S., Igarashi Y. and Kudo T., 2013. *Micromonospora maritima* sp. nov., isolated from mangrove soil, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 554–559
- Sosio M., Stinchi S., Beltrametti F., Lazzarini A. ve Donadio S., 2003. The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by *Nonomuraea* species, *Chem. Biol.* 10:541–549.
- Stach J.E., Maldonado L.A., Masson D.G., Ward A.C., Goodfellow M., Bull A.T., 2003. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69; 6189-6200.
- Stackebrandt E., 2006. *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. (Stackebrandt, E., Ed.) s: 320. Springer. Berlin.
- Stackebrandt E., Lewis B. J. Ve Woese C. R., 1980. The phylogenetic structure of the coryneform group of bacteria, *Zbl. Bakt., Abt. 1, Orig. C* 2:137–149.
- Stackebrandt E., Ebers J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, *Microbiol Today*, 33, 152–155.
- Stackebrandt E., Rainey F. ve Ward-Rainey N. L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:479– 491.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kampf P., Maiden M.C., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman, W.B., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1043–1047.
- Stackebrandt E., Kroppenstedt R. ve Fowler V., 1983. A phylogenetic analysis of the family *Dermatophylaceae*, *J. Gen. Microbiol.* 129:1831–1838.
- Stackebrandt E., Smida J. ve Collins M.D., 1988. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordona* (Tsukamura), *Journal of General and Applied Microbiology* 34, 341–348.
- Stackebrandt E., Wink J., Steiner U. ve Kroppenstedt R. M., 2001. *Nonomuraea dietzii* sp. nov., *Int J Syst Evol Microbiol.*, 51, 1437–1441.
- Strap J.L., Crawford D.L., 2006. Ecology of *Streptomyces* in soil and rhizosphere. (Cooper, J., Rao, J. R. eds) *Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. CABI Publishing, Oxfordshire, 166-182s.
- Sun W., Zhang Y.Q., Huang Y., Zhang Y.Q., Yang Z.Y. ve Liu Z.H., 2009: *Nocardia jinanensis* sp. nov., an amicoumacin B-producing actinomycete, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 417-420.
- Supong K., Suriyachadkun C., Tanasupawat S., Suwanborirux K., Pittayakhajonwut P., Kudo T. ve Thawai C., 2013. *Micromonospora sediminicola* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 570–575
- Suzuki K., Sasaki J., Uramoto M., Nakase T. ve Komagata K., 1996. *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for “*Corynebacterium*

- mediolanum*” Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:88–93.
- Suzuki K., Komagata K., 1983. *Pimelobacter* gen. nov., a new genus of coryneform bacteria with LL-diaminopimelic acid in the cell Wall, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29, 59–71.
- Suzuki S.-I., Okuda T. ve Komatsubara S., 2001a. Selective isolation and distribution of the genus *Planomonospora* in soils. *Can. J. Microbiol.* 47:253–263.
- Suzuki S.-I., Okuda T. ve Komatsubara S., 2001b. Selective isolation and study of the global distribution of the genus *Planobispora* in soils, *Can. J. Microbiol.* 47:979–986.
- Staley J. T., 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.B. Biol. Sci.* 361, 1899–1909.
- Sveshnikova M., Maxinova T. ve Kudrina E. 1969. The species belonging to the genus *Micromonospora* Oerskov 1923, and their taxonomy [in Russian]. *Microbiologiya* 38:883–893.
- Sveshnikova M.A., Maksimova T.S., Kudrina E.S., 1969. The species of the *Micromonospora* Orskov, 1923 and their taxonomy, *Mikrobiologiya*. 38, 883–893.
- Şahin N., 1995. Selective isolation, characterisation and classification of novel thermotolerant streptomycetes. PhD thesis, University of Newcastle upon Tyne.
- Şahin N., Saza A., Güven K., Dogramaci M., 2010. Diversity of member of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade in the legumes rhizosphere in Turkey. *Ann. Microbiol.*, DOI: 10.1007/s13213-010-0112-6.
- Takahashi Y., Omura S., 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 49, 141–154.
- Takeuchi M. ve Hatano K., 1999. Phylogenetic analysis of actinobacteria in the mangrove rhizosphere. *IFO Res. Commun.* 19:47–62.
- Takeuchi M. ve Hatano K., 2001. *Agromyces luteolus* sp. nov., *Agromyces rhizosphaerae* sp. nov. and *Agromyces brachium* sp. nov., from the mangrove rhizosphere, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1529–1537.
- Takeuchi M., Hatano K., Sedlacek I. ve Pacova Z., 2002. *Rhodococcus jostii* sp. nov., isolated from a medieval grave, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:409–413.
- Tamura A., Furuta R., Naruto S. ve Ishii H., 1973. Actinotiocin, a new sulfur-containing peptide antibiotic from *Actinomadura pusilla*. *J. Antibiot.* 26:343–350.
- Tamura T., Hatano K., Suzuki K., 2006. A new genus of the family *Micromonosporaceae*, *Polymorphospora* gen. nov., with description of *Polymorphospora rubra* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 1959–1964.
- Tamura T., Hayakawa M., Hatano K., 2001. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Virgosporangium* gen. nov., with descriptions of *Virgosporangium ochraceum* sp. nov. and *Virgosporangium aurantiacum* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1809–1816.

- Tamura T., Takeuchi M., Yokota A., 1994b. *Luteococcus japonicus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive coccus with ll-diaminopimelic acid in the cell wall, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 348-356.
- Tanasupawat S., Jongrungruangchok S., Kudo T., 2010. *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 648-652.
- Terekhova L. P., Galatenko O. A. ve Preobrazhenskaya T. P., 1987. Validation of the publication of new names and combinations previously effectively published outside the IJSB List No. 23. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:179– 180.
- Thawai C., Tanasupawat S., Itoh T., Kudo T., 2006. *Actinocatenispora thailandica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 1789-1794.
- Thompson C.J., Fink D. ve Nguyen D., 2002. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology Reviews* 3: 1020.1-1020.4.
- Tian X., Cao L., Tan H., Han W., Chen M., Liu Y., Zhou S., 2007. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice, *Microbial Ecology*, 53, 700-707.
- Tindall J., Rosselló-Móra R., Busse H. J., Ludwig W., Kämpfer P., 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 249-266.
- Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M., Crawford D.L., Salove M.H., DeBald L.A., Bailey J.F., Morra M.J., 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2161-2171.
- Tomita K., Hoshino Y., Ohkusa N., Tsuno T., Miyaki T., 1992. *Micromonospora chersina* sp. nov., *Actinomycetol.* 6, 21-28.
- Tomita K., Nishio M., Yamamoto H., Hoshino Y., Ohkuma H., Konishi M., Miyaki T., Oki, T., 1990. Pradimicins A, B and C": New Antifungal Antibiotics I. Taxonomy, Production, Isolation and Physico-Chemical Properties. *J. Antibiotics*, XLIII (7), 755-762.
- Trujillo M.E. ve Goodfellow, M., 1997. Polyphasic taxonomic study of clinically significant actinomadurae including the description of *Actinomadura latina* sp. nov. *Zentralbl. Bakteriologie*, 285, 212-233.
- Trujillo M.E. ve Goodfellow M., 2003. Numeric phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms, *Ant. V. Leewenhoek*, 84, 39-68.
- Trujillo M.E., Alonso-Vega P., Rodríguez R., Carro L., Cerda E., Alonso P., Martínez-Molina E., 2010. The genus *Micromonospora* is widespread in Legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *International Society for Microbial Ecology*, 4, 1265-1281.
- Trujillo M.E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Carro L., Martínez-Molina E., 2006. *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2381-2385.

- Trujillo M.E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Martí'nez-Molina E., 2006. *Kribbella lupini* sp. nov., isolated from the roots of *Lupinus angustifolius*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 407–411.
- Trüper H.G., Schleifer K.-H., 2006. Prokaryote Characterization and Identification, *Prokaryotes*, 1, 58-79.
- Tseng M., Yang S.-F., Hoang K.-C., Liao H.-C., Yuan G.-F. ve Liao C.-C. 2009. *Actinomadura miaoliensis* sp. nov., a thermotolerant polyester-degrading actinomycete, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 517-520.
- Tsukamura M., 1969. Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*,. *J. Gen. Microbiol.*, 56, 265-287.
- Tsukamura M., 1977. Extended numerical taxonomy study of *Nocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 311-323.
- Tsukamura M., Mizuno S., Tsukamura S. ve Tsukamura J., 1979. Comprehensive Numerical Classification of 369 Strains of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia*. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 29 (2), 110-129.
- Upton M., 1994. Ecological Approaches to Selective Isolation of Actinomycetes for Bioactivity Screening, Thesis, Newcastle upon Tyne UK, Univ of Newcastle.
- Urzi C., Brusetti L., Salamone P., Sorlini C., Stackebrandt E. ve Daffonchio D., 2001. Biodiversity of *Geodermatophilaceae* isolated from altered stones and monuments in the Mediterranean basin, *Environ Microbiol* 3, 471–479.
- Urzi C., La Cono V. ve Stackebrandt E., 2004. Design and application of two oligonucleotide probes for the identification of *Geodermatophilaceae* strains using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environ Microbiol* 6, 678–685.
- Urzi C., Leo, F.D., Schumann P., 2008. *Kribbella catacumbae* sp. nov. and *Kribbella sancticallisti* sp. nov., isolated from whitish-grey patinas in the catacombs of St Callistus in Rome, Italy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2090–2097.
- Urzi C., Salamone P., Schumann P., Stackebrandt E., 2000. *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family *Nocardioidaceae* isolated from a marble statue, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 529–536.
- Valdés M., Pérez N.O., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado J., Peña-Cabria J.J., Normand P., Hirsch A.M., 2005. Non-Frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 460-466.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. ve Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60 (2), 407-438.
- Ventura M, ve diğ. 2007. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:495–548.
- Veyisoglu A. ve Sahin N., 2013. *Streptomyces hoynatensis* sp. nov., isolated from Black Sea deep sediment, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, doi:10.1099/ijso.0.055640-0

- Vionis A. P., Katsifas E. A., Karagouni A. D., 1998. Survival, metabolic activity and conjugative interactions of indigenous and introduced *Streptomyces* strains in soil microcosms, *Antonie van Leeuwenhoek*, 73,103-115.
- Vobis G., 2006. The genus *Actinoplanes* and related genera. In *The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria*, Edited by Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Dworkin, M., 3th edition, volume 3, Chapter 1.1.9., Springer, 623-653, Springer.
- Vylegzhanina E.S., Dmitriva N.F., Polin A.N., Naumova I.B. ve Epishin, I.N., 1986. Structure of teichoic acid of a poly (glycerophosphate) nature from *Streptomyces levoris* K-3053 and its biological properties. *Antibiot. Med. Bioteknol.*, 31, 584-587.
- Waitz J.A., Horan A.C., Kalyanpur M.B., Lee K.D., Loebenberg J.A., Marquez G., Miller, ve Patel, M.G., 1981. Kianimicin (Sch 25663), a novel antibiotic produced by *Actinomadura kijaniata* SCC 1256. Fermentation, isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiot.*, 34, 1101-1106.
- Waksman S. A., 1961. *The Actinomycetes*, vol. 2, Classification, Identification and Description of Genera and Species. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Waksman S.A., Henrici, A.T., 1943. The nomenclature and classification of Actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 46 (4), 337-41.
- Wakuzaka Y., ve others. 1983. Immunoactivating agent originated from bacteria belonging to Agromyces genus. *Patent J.P.* 58043790.
- Wang Z., Crawford D. L., Pometto A. L., Rafii F., 1989. Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem, *Can. J. Microbiol.*, 35, 535-543.
- Wang F., Xu X. X., Qu Z., Wang C., Lin H. P., Xie Q. Y., Ruan J. S., Sun M. ve Hong K. 2011. *Nonomuraea wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil, *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 1304–1308.
- Wang Z., Xu J., Li Y., Wang K., Wang Y., Hong Q., Li W. J. and Li S. P., 2010. *Rhodococcus jialingiae* sp. nov., an actinobacterium isolated from sludge of a carbendazim wastewater treatment facility, *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 378–381
- Wang Y.M., Zhang Z.S., Xu X.L., Ruan J.S., Wang Y., 2001b. *Actinopolymorpha singaporensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from the tropical rainforest of Singapore, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 467–473.
- Wang Y.X., Zhi X.Y., Chen H.H., Zhang Y.Q., Tang S.K., Jiang C.L., Xu L.H. ve Li W.J., 2007. *Actinomadura alba* sp. nov., isolated from soil in Yunnan, China. *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1735-1739.
- Ward A.C. ve Goodfellow M., 2004. Phylogeny and functionality: Taxonomy as a roadmap to genes. In: *Microbial Diversity and Bioprospecting*, pp. 288-313. Edited by A.T. Bull. ASM Press, Washington D.C.
- Ward C.A., Bora N., 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Ecology and industrial microbiology*, 9, 279–286.
- Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. ve Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* *Archives of Microbiology* 176: 386-390.

- Weinstein M. J., Luedemann G. M., Oden E. M., Wagman G.H., 1968. Halomicin, a new *Micromonospora*-produced antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, 1967, 435-441.
- Wellington E.M., 2009. *Actinobacteria*. Encyclopedia of Microbiology. (Moselio Schaechter, Editor), Oxford:Elsevier, 26-44.
- Wellington E.M.H., Williams S. T., 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters*, 6, 151-159.
- Wiese J., Jiang Y., Tang S., Thiel V., Schmaljohann, R., Xu, L., Jiang, C., Imhoff, J.F. 2008. A new member of the family *Micromonosporaceae*, *Planosporangium flavigriseum* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1324–1331.
- Williams S. T., 1978. *Streptomyces* in the soil ecosystem. Zentral Bakteriell Parasiten Infektion Hygiene, Abteilung 1. Suppl, 6, 137-144.
- Williams S. T., Shameemullah M., Watson E. T., Mayfield C. I., 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil, VI The influence of moisture tension on growth and survival, *Soil Biol. Biochem*, 4, 215-225.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, (Editörler: Williams and Wilkins), 4, 2452-2492. Baltimore
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E.M.H., Sneath P.H.A., Sackin M.J., 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*, 129, 1743-1813.
- Wilson D., 1992. Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 45-63.
- Wink J., Kroppenstedt R.M., Seibert G. ve Stackebrandt E., 2003. *Actinomadura namibiensis* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 721-724.
- Woese C. R., 1987. Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
- Wright G.D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 5: 175-186.
- Xing K., Qin S., Fei S. M., Lin Q., Bian G. K., Miao Q., Wang Y., Cao C.L., Tang S. K., Jiang J. H. and Li W. J., 2011. *Nocardia endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 1854–1858
- Yabe S., Aiba Y., Sakai Y., Hazaka M., Yokota A., 2011. *Thermasporomyces composti* gen. nov., sp. nov., a thermophilic actinomycete isolated from compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 86-90.
- Yagafarova G.G. ve Skvortsova I.N., 1996. A new oil-oxidizing strain of *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 32, 207–209.
- Yamamura H., Hayakawa M., Limura Y., 2003. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* sp. from soil, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 677–685.
- Yamamura H., Hayakawa M., Nakagawa Y., Tamura T., Kohno T., Komatsu F., Iimura Y. 2005. *Nocardia takedensis* sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 433–436.

- Yano I., Imadea T. ve Tsukamura M., 1990. Characterization of *Nocardia nova*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 40 (2), 170-174.
- Yokota A., Tamura T., Takeuchi M., Weiss N., Stackebrandt E., 1994. Transfer of *Propionibacterium innocuum* Pitcher and Collins 1991 to *Propioniferax* gen. nov. as *Propioniferax innocua* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 579-582.
- Yoon J. H., Cho Y.-G., Kang S.-S., Kim S. B., Lee S. T. ve Park Y.-H., 2000a. *Rhodococcus koreensis* sp. nov., a 2, 4-dinitrophenoldegrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1193–1201.
- Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M. ve Goodfellow M., 1988. DNA Base composition and homology values for some *Rhodococcus* species. *Journal of General Microbiology* 134, 2807– 2813.
- Zgurskaya H. I., ve Evtushenko L. I., 1996. *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* strain for dideoxyarabinose production. Patent RU 2055887.
- Zgurskaya H. I., Evtushenko L. I., Akimov V. N., Voyevoda H. V., Dobrovolskaya T. G., Lysak L. V. ve Kalakoutsii L. V., 1992. Emended description of the genus *Agromyces* and description of *Agromyces cerinus* subsp. *cerinus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces cerinus* subsp. *nitratus* sp. nov., subsp. nov., *Agromyces fucosus* subsp. *fucosus* sp. nov., subsp. nov. and *Agromyces fucosus* subsp. *hippuratus* sp. nov., subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:635–641
- Zhang H., Zhang W., Jin Y., Jin M., Yu X., 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(3), 241-248.
- Zhang J., Zhang Y., Xiao C., Liu Z. ve Goodfellow M., 2002. *Rhodococcus maanshanensis* sp. nov., a novel actinomycete from soil, *Int. J. Syst. Microbiol.* 52:2121– 2126.
- Zhang Y.-Q., Chen J., Liu H.-Y., Zhang Y.-Q., Li W.-J. ve Yu L.-Y. 2011. *Geodermatophilus ruber* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 190–193.
- Zhang Z., Kudo T., Nakajima Y., Wang Y., 2001. Clarification of the relationship between the members of the family *Thermomonosporaceae* on the basis of 16S rRNA, 16S–23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rRNA sequences and chemo-taxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbio.*, 51, 373-383.
- Zhang Z., Wang Y., Ruan J., 1998. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 411-422.
- Zhao G. Z., Li J., Zhu W. Y., Klenk H. P., Xu L.H. and Li W.J., 2011. *Nocardia artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized stem of *Artemisia annua* L.. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2933–2937
- Zhao G. Z., Li J., Huang H. Y., Zhu W. Y., Xu L. H. ve Li W. J. 2011. *Nonomuraea rhizophila* sp. nov., an actinomycete isolated from rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2141–2145.
- Zhao G. Z., Li J., Zhu W. Y., Tian S. Z., Zhao L. X., Yang L. L., Xu L. H. ve Wen-Jun L., 2012. *Rhodococcus artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the pharmaceutical plant *Artemisia annua* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 900–905

- Zhao H., Kassama Y., Young M., Kell D.B., Goodacre R., 2004. Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6619- 6627.
- Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 589-608.
- Zhukova R. A., Tsyganov V. A. ve Morozov V. M., 1968. A new species of *Micropolyspora-Micropolyspora angiospora* sp. nov. [in Russian]. *Microbiologiya* 97:724– 728.
- Zopf W., 1889. Über das Mikrochemische Verhalten von Fettfarbstoff-haltigen Organen. *Z. Wissensch. Mikrosk.* 6:172–177
- Zopf W., 1891. Über Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 9, 22–28.
- URL-1: <http://ezgenome.ezbiocloud.net/>, (Ziyaret tarihi: Ekim-2013).
- URL-2: <http://www.bacterio.cict.fr/a/actinomadura.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım-2013).
- URL-3: <http://www.bacterio.net/agromyces.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım-2013).
- URL-4: <http://www.bacterio.net/g/geodermatophilus.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-5: <http://www.bacterio.net/k/kribbella.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-6: <http://www.bacterio.cict.fr/m/micromonospora.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-7: <http://www.bacterio.net/n/nocardia.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-8: <http://www.bacterio.net/n/nonomurea.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-9: <http://www.bacterio.net/r/rhodococcus.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-10: <http://www.bacterio.net/s/streptomyces.html>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-11: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).
- URL-12: <http://www.ebi.ac.uk>, (Ziyaret tarihi: Kasım 2013).

## **EKLER**

**EK A:** Kùltür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı

**EK-B:** Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı

**EK-C:** Farklı Besiyerleri ile Yapılan Toprak İzolasyonudan Petri Görüntüleri



## **EK A: Kùltür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı**

### **Hümik Asit Vitamin Agar (HV agar, Hayakawa ve Nonomura, 1987)**

Hümik Asit Vitamin Agar (HV agar), nadir aktinomiset izolasyonunda seçici besiyeri olarak kullanıldı.

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Hümik asit                           | 1 g     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 0,5 g   |
| KCl                                  | 1,7 g   |
| MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O | 50 mg   |
| FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O | 10 mg   |
| CaCO <sub>3</sub>                    | 10 mg   |
| Agar (Acumedia)                      | 15 g    |
| Distile su                           | 1 litre |
| pH                                   | 7,2     |

Önce, hümik asit 10 ml 0,2 N NaOH içinde çözüldü ve agar hariç diğer ortam bileşenleriyle birlikte birkaç dakika homojen olana kadar kaynatıldı. Oda ısısında soğumaya bırakıldıktan sonra pH'sı 0,1 M NaOH veya HCl ile ayarlandı ve agar ilave edilerek homojen hale gelene kadar karıştırılarak kaynatıldı. Hazırlanan kùltür ortamı otoklava dayanaklı 500 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelerde 400'er ml olacak şekilde bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra 50-55 °C'ye ayarlı su banyosunda bekletildi ve 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda vitamin stok solusyonundan 400 ml'de 1 ml olacak şekilde ilave edildi ve besiyeri petrilere döküldü.

### **Vitamin Stok Solusyonu**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| 41Thiamine hydrochloride | 0,5 mg  |
| Riboflavin               | 0,5 mg  |
| Niacin                   | 0,5 mg  |
| Pyridoxine hydrochloride | 0,5 mg  |
| İnositol                 | 0,5 mg  |
| Calcium pantothenote     | 0,5 mg  |
| p-Aminobenzoik acid      | 0,5 mg  |
| Biotin                   | 0,25 mg |
| Distile su               | 10 ml   |

Distile suda çözülen vitamin karışımı, steril 0,45 µm çapındaki membran filtreden (Corning, Germany) geçirilerek steril edildi ve şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak +4 °C’de saklandı.

### **Glucose Yeast-Extract Agar (GYEA, Gordon ve Mihn, 1962)**

Organizmaların geliştirilmesinde genel besiyeri olarak kullanılmıştır.

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Glukoz (Merck)        | 10 g    |
| Maya özütü (Acumedia) | 10 g    |
| Agar (Acumedia)       | 18 g    |
| Saf su                | 1 litre |
| pH                    | 6,8-7,2 |

Agar dışındaki tüm ortam içerikleri 1 litre saf suda çözülüp pH metre (Hanna Instruments) ile ortam pH’ si ölçüldü. pH ayarlaması ortama 0,1 M NaOH veya HCl ilave edilerek yapıldı ve agar ilave edilerek besi yeri kaynatıldı. Otoklava dayanıklı şişelere besi yeri konularak 121°C’ de 20 dk otoklavla (Nüve, OT4060) steril edilip, 50 °C’ ye kadar su banyosunda (Nüve, BM402) soğutulduktan sonra aseptik şartlarda steril kabinde (Pbi, Miniflo International, Milano-İtaly) petrilere döküldü.

### **Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA, Bower and Hucker, 1930)**

Tryptone Yeast Glucose Extract Agar ortamı, topraktan bakteri izolasyonunda kullanılacak organizmaların geliştirilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Trypton (Oxoid)       | 3 g     |
| Maya özütü (Acumedia) | 5 g     |
| Glukoz (Merck)        | 5 g     |
| Agar (Acumedia)       | 15 g    |
| Distile su            | 1 litre |
| pH                    | 7,0     |

Agar dışındaki tüm ortam içerikleri 1 litre saf suda çözülüp pH metre ile ortam pH' sı ölçüldü. pH ayarlaması ortama 0,1 M NaOH veya HCl ilave edilerek yapıldı ve agar ilave edilerek besi yeri kaynatıldı. Otoklava dayanıklı şişelere besi yeri konularak 121°C'de 20 dk otoklavla steril edilip, 50°C' ye kadar su banyosunda soğutulduktan sonra aseptik şartlarda petrilere döküldü.

TYGA içine, hazırlanan vitamin stok çözeltisinden 400 ml'de 1 ml olacak şekilde ilave edilerek GYME vitaminli ortam hazırlandı.

### **NZ-Amine Agar**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Glukoz (Sigma)          | 10 g    |
| Starch, soluble (Sigma) | 20 g    |
| Maya özütü (Acumedia)   | 5 g     |
| N-Z-Amine (Sigma)       | 5 g     |
| CaCO <sub>3</sub>       | 1 g     |
| Agar (Acumedia)         | 15 g    |
| Saf su                  | 1 litre |
| pH                      | 7,2     |

Agar dışındaki tüm ortam içerikleri 1 litre saf suda çözülüp pH metre ile ortam pH' sı ölçüldü. pH ayarlaması ortama 0,1 M NaOH veya HCl ilave edilerek yapıldı ve agar ilave edilerek besi yeri kaynatıldı. Otoklava dayanıklı şişelere besi yeri konularak 121°C'de 20 dk otoklavla steril edilip, 50°C' ye kadar su banyosunda soğutulduktan sonra aseptik şartlarda petrilere döküldü.

### **Glucose Yeast-Extract Broth**

Glucose Yeast-Extract Broth, DNA izolasyon çalışması için hücre pelleti elde edilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Glukoz (Merck)        | 10 g    |
| Maya özütü (Acumedia) | 10 g    |
| Saf su                | 1 litre |
| pH                    | 6,8-7,2 |

Tüm ortam içerikleri 1 litre saf suda çözülüp pH metre ile ortam pH' sı ölçüldü. pH ayarlaması ortama 0,1 M NaOH veya HCl ilave edilerek yapıldı ve besi yeri manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Otoklava dayanıklı 100 ml'lik erlenlere 40 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve ağızları önce pamukla kapatılıp ardından alüminyum folyoyla sarıldıktan sonra 121°C' de 20 dk otoklavla steril edildi.

### **Tryptone Yeast Glucose Extract Broth**

Tryptone yeast glucose extract broth ortamı, DNA izolasyon çalışması için hücre pelleti elde edilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Trypton (Oxoid)       | 3 g     |
| Maya özütü (Acumedia) | 5 g     |
| Glukoz (Merck)        | 5 g     |
| Distile su            | 1 litre |
| pH                    | 7,0     |

Tüm ortam içerikleri 1 litre saf suda çözölüp pH metre ile ortam pH' sı ölçüldü. pH ayarlaması ortama 0,1 M NaOH veya HCl ilave edilerek yapıldı ve besi yeri manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Otoklava dayanıklı 100 ml'lik erlenlere 40 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve ağızları önce pamukla kapatılıp ardından alüminyum folyoyla sarıldıktan sonra 121°C' de 20 dk otoklavla steril edildi.



## **EK-B: Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı**

### **Mikroorganizmaların İzolasyonu Aşamasında kullanılan Çözeltiler**

#### **Ringer çözeltisi**

İzolasyon çalışmasına başlamadan önce, toprak süspansiyonu elde edilmesi ve testlerin uygulama aşamasından önce spor süspansiyonunun hazırlanması için kullanılmıştır.

|            |          |
|------------|----------|
| Ringer     | 1 tablet |
| Distile su | 500 ml   |

500 ml saf su içinde çözülen ringer çözeltisi 500 ml'lik otoklavlanabilir cam şişelere konularak 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

#### **Sükroz çözeltisi (Yamamura ve ark., 2003)**

Literatüre uygun olarak aktinomiset grubu organizmaların en yoğun şekilde elde edildiği sükroz konsantrasyonu %20 olduğu için, %20'lik olarak sükroz çözeltisi hazırlandı ve sükroz gradient tekniğinde kullanıldı.

|            |       |
|------------|-------|
| Sükroz     | 20 g  |
| Distile Su | 80 ml |

80 ml saf suda çözülen sükroz, 0.45 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edildi ve 10 ml'lik cam şişelere 9 ml ilave edilerek hazırlandı.

#### **% 20'lik Gliserol Stok Çözeltisi (Wellington ve Williams, 1978)**

Gliserol stok çözeltisi test izolatlarının spor ve/veya miselyumlarının -18°C'de uzun süreli saklanması için hazırlanmıştır.

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Gliserol (Park, Northampton, UK) | 20 ml |
| Distile su                       | 80 ml |

Hazırlanan gliserol stok solüsyonu 1,5 ml'lik dıştan kapaklı cryo tüplerin içine 1 ml olacak şekilde paylaştırılıp 121°C'de 20 dk otoklavlandı.

## Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

### 0.5 M EDTA, pH 8

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| EDTA(Merck)                            | 186,1 g |
| DDH <sub>2</sub> O (Double distile su) | 1 litre |

800 ml DDH<sub>2</sub>O içerisine 186,1 g EDTA ve ~ 20 g NaOH pelleti ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşmaya kadar çözüldü. Son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

### 1 M Tris, pH 8

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Tris (Amresco)     | 121,1 g |
| DDH <sub>2</sub> O | 1 litre |

800 ml DDH<sub>2</sub>O içerisine 121,1 g tris ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C'de berraklaşmaya kadar çözülerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. pH 8'de 1 M Tris elde etmek için solüsyon içerisine 42 ml % 38'lik HCl ilave edildi. Son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

### TE tamponu, pH 8

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 0.5M EDTA, pH 8 (Merck) | 2 ml    |
| 1M Tris, pH 8           | 10 ml   |
| DDH <sub>2</sub> O      | 1 litre |

Tampon 1000 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrolü yapıldı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

### Lizozim (50 mg/ml)

|                                          |        |
|------------------------------------------|--------|
| Lizozim (Sigma)                          | 500 mg |
| TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) | 10 ml  |

500 mg lizozim 10 ml TE tampon içerisinde çözülerek hazırlandı. 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18°C'de kullanım zamanına kadar saklandı.

**Proteinaz K (2 mg/ml)**

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Proteinaz K (AppliChem)      | 20 mg |
| TE tamponu (Otoklav edilmiş) | 10 ml |

20 mg proteinaz K 10 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18°C'de kullanım zamanına kadar saklandı.

**% 10'luk Sarkosil**

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| N-Laurylsarcosine (Sigma) | 1 g   |
| DDH <sub>2</sub> O        | 10 ml |

1 g N-Laurylsarcosine 8 ml DDH<sub>2</sub>O içeren 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişeye konularak manyetik karıştırıcı üzerinde 50°C'de berraklaşmaya kadar çözüldü. Solüsyon 25 ml'lik mezüre aktarılıp son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 10 ml'ye tamamlandı ve stok şişesine aktarılıp otoklav ile steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra şişenin etrafı alüminyum folyo kapatılarak oda sıcaklığında saklandı.

**Guanidin thiosiyanat solüsyonu** (5 M guanidin thiosiyanat, 100 mM EDTA, % 0,5 sarkosil)

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| Guanidine thiosiyanat (AppliChem)    | 60 g  |
| DDH <sub>2</sub> O (otoklav edilmiş) | 20 ml |
| 0,5 M EDTA, pH 8                     | 20 ml |

60 g guanidine thiosiyanat steril 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişeye konuldu ve üzerine steril 20 ml DDH<sub>2</sub>O ve 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ilave edildi. Solüsyon manyetik karıştırıcıda 65°C'de berraklaşmaya kadar çözüldü ve oda sıcaklığında soğuduktan sonra, 5 ml N-Laurylsarcosine % 10 v/v (otoklav edilmiş) ilave edilip son hacim steril DDH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlanarak 0,45 µm çapındaki membran filtreden (Corning, Germany) geçirildi. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında saklandı.

**RNAaz (1 mg/ml)**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| RNAaz (AppliChem) | 10 mg |
| TE tamponu        | 10 ml |

10 mg RNA az 10 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 0,5 ml'lik steril eppendorf tüplere bölünerek -18°C'de saklandı.

**TBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA; 10x, pH 8)**

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Tris (Amresco)     | 121,10 g |
| Borik asit (Merck) | 61,83 g  |
| EDTA (susuz)       | 5,84 g   |
| DDH <sub>2</sub> O | 1litre   |

Solüsyon içerikleri tartıldı ve 1000 ml'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 ml DDH<sub>2</sub>O ilave edilerek solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşmaya kadar tutuldu. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanıp, % 33'lük HCl (Merck) kullanılarak pH 8'e ayarlandı ve +4°C'de saklandı. Presipitat oluştuğu takdirde kullanılmamalıdır.

**1xTBE, pH 8**

|                    |        |
|--------------------|--------|
| 10xTBE tamponu     | 50 ml  |
| DDH <sub>2</sub> O | 450 ml |

Solüsyon içerikleri mezürle ölçülüp, ağzı kapaklı 500 ml'lik cam şişe içine konularak oda sıcaklığında tutuldu.

**Brom fenol mavisi (Yükleme Tamponu)**

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Brom fenol mavisi (AppliChem) | 40 mg  |
| Gliserol (Merck)              | 5 ml   |
| 0.5 M EDTA                    | 1.5 ml |
| DDH <sub>2</sub> O            | 3,5 ml |

Toplam hacim 10 ml hazırlandıktan sonra eppendorf tüplere 500 µl şeklinde dağıtıldı ve +4°C'de saklandı.

**Agaroz jel hazırlanışı (% 1'lik)**

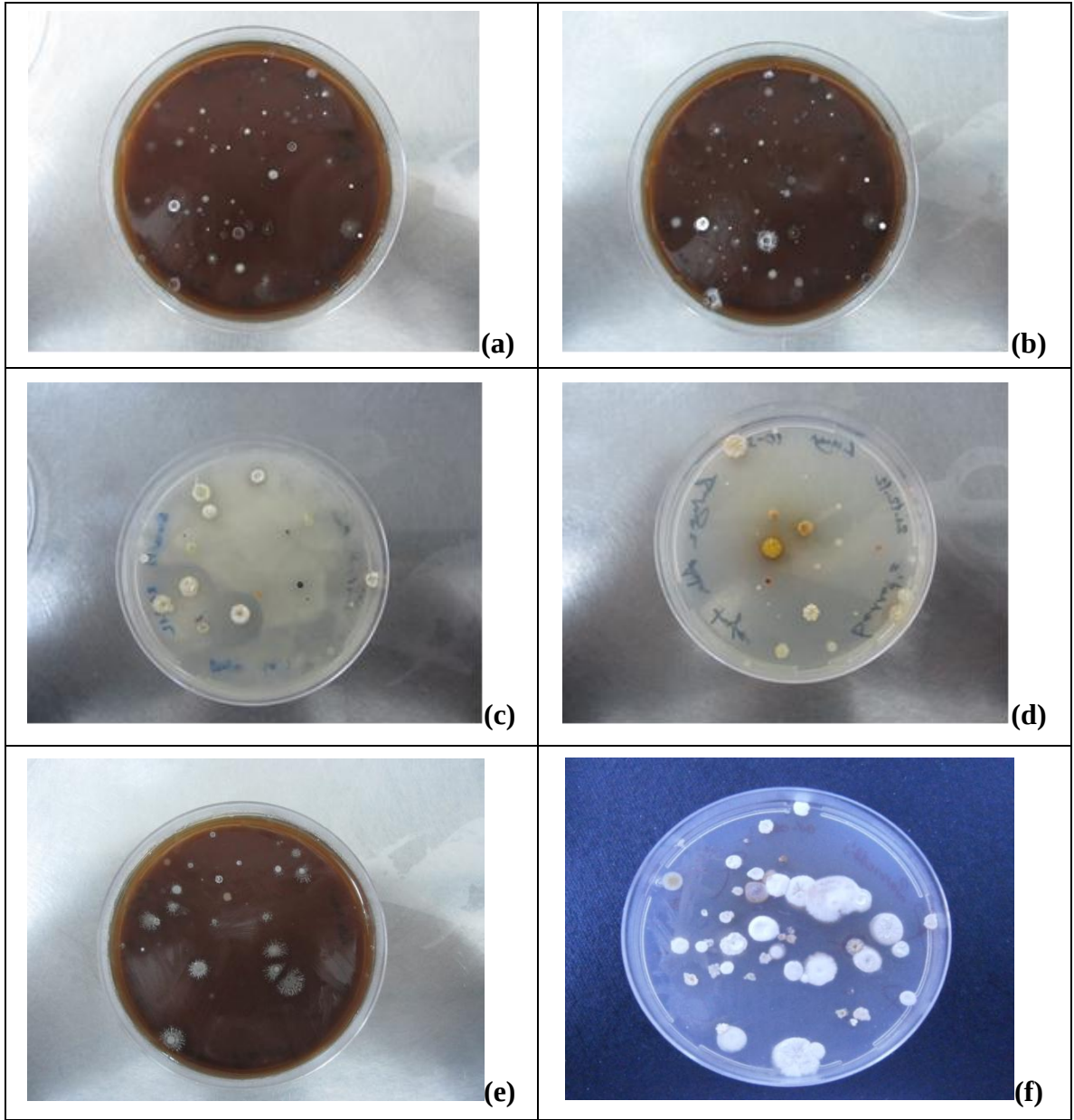
İzole edile DNA'yı ve yapılan PZR ürünlerini kontrol etmek amacıyla hazırlanmıştır.

|                |        |
|----------------|--------|
| Agaroz (Serva) | 0.35 g |
| 1xTBE tamponu  | 35 ml  |

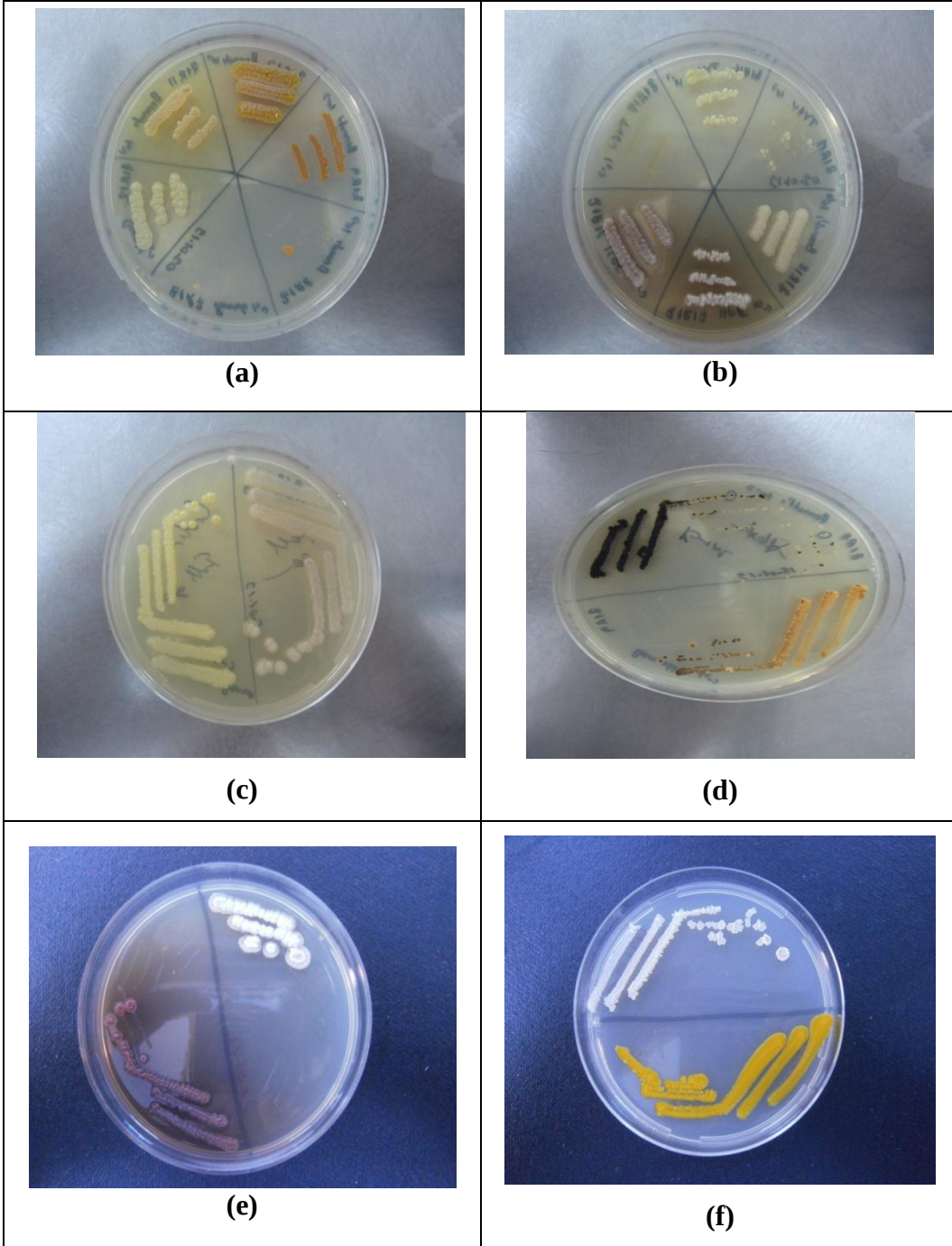
0.35 g agaroz 35 ml 1xTBE tamponu bulunan 50 ml'lik erlene ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde tamamen berraklaşınca kadar eritildi. Sıcaklık ~ 60°C olunca içerisine 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi. Erlen hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hafifçe helezonik şekilde kendi eksenini etrafında döndürülerek karışım sağlandı. Elektroforez tablası çalışma alanı üzerinde zemini düz olan bir yere bırakıldı. Hemen sonra tablaya hava kabarcığı oluşmayacak şekilde döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve içinde 1xTBE, pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.



### EK-C: Farklı Besiyerleri ile Yapılan Toprak İzolasyonundan Petri Görüntüleri



**Şekil C.0.1.** Farklı toprak örneklerinin dilüsyon plak görüntüleri. **a-)** Büyükada toprağı HV agar ortamındaki dilüsyon plak görüntüsü **b-)** Burgazada toprağı HV agar ortamındaki dilüsyon plak görüntüsü **c-)** Burgazada toprağı TYGV agar ortamında süktroz gradient uygulanarak hazırlanan dilüsyon plak görüntüsü **d-)** Kınalıada toprağı Bennett's agar ortamında süktroz gradient uygulanarak hazırlanan dilüsyon plaka görüntüsü **e-)** Büyükada toprağı HV agar ortamında %1.5'luk fenol uygulanarak hazırlanan dilüsyon plak görüntüsü **f-)** Heybeliada toprağı TYG agar ortamında süktroz gradient uygulanarak hazırlanan dilüsyon plaka görüntüsü.



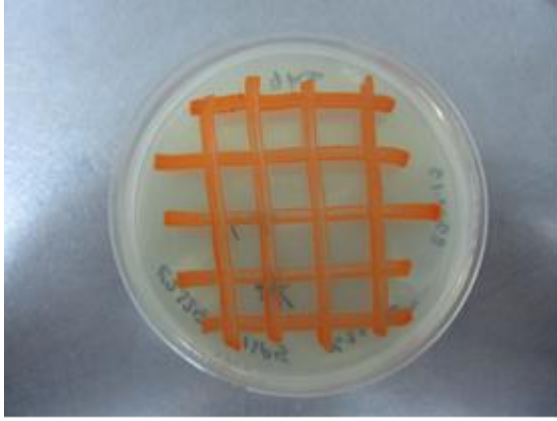
Şekil C.0.2.Bazı izolatların saflaştırma ekimleri



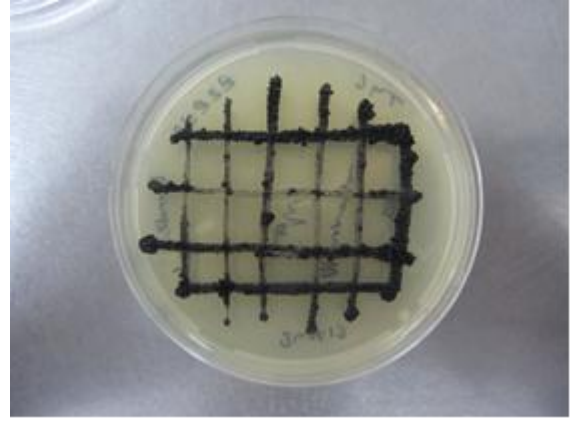
(a)



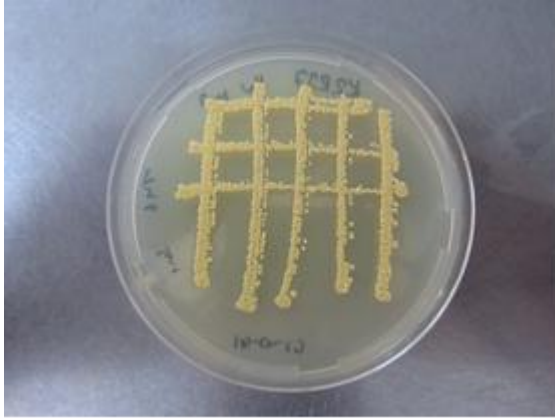
(b)



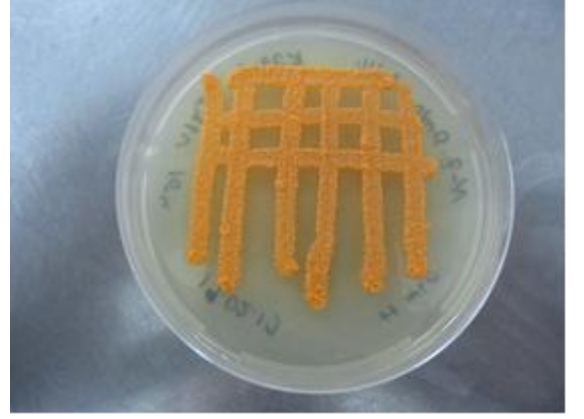
(c)



(d)



(e)



(f)

**Şekil C.0.3.**Bazı izolatların yoğun ekim görüntüleri (a) Z1R7 (b) Z2S13 (c) K2S25 (d) Z2R53 (e) K2R37 (f) Z1R9.

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Ad Soyad:**Salih SARICAOĞLU

**Doğum Yeri ve Tarihi:** OF / 11.05.1987

**Adres:** Mimar Sinan Mah. Atatürk Bulv. Sahil Ap. No:277/4 Atakum/Samsun

**E-Posta:** salihsarica61@gmail.com

**Lisans:**

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Orta Öğretim Biyoloji Öğretmenliği Bölümü