

**BAZI NOCARDİOFORM İZOLATLARIN
16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* GEN DİZİ
ANALİZLERİ İLE MOLEKÜLER
SİSTEMATİĞİ**

**FADİME ÖZDEMİR KOÇAK
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu doktora tez çalışması Ondokuz Mayıs
Üniversitesi PYO.FEN.1904.09.009 Proje ile
desteklenmiştir.

T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI NOCARDİOFORM İZOLATLARIN 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* GEN
DİZİ ANALİZLERİ İLE MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ**

FADİME ÖZDEMİR KOÇAK

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN

DOÇ. DR. KAMİL IŞIK

SAMSUN

AĞUSTOS 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER.....	<u>i</u>
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	<u>v</u>
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	<u>vii</u>
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	<u>viii</u>
ÖZET.....	<u>ix</u>
ABSTRACT.....	<u>x</u>
TEŞEKKÜR.....	<u>xi</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Actinobacteria.....	4
2.2. <i>Nocardiaceae</i> Familyası (Trevisan, 1889).....	6
2.2.1. <i>Gordonia</i>	10
2.2.2. <i>Nocardia</i>	12
2.2.3. <i>Gordonia</i> ve <i>Nocardia</i> Kemotaksonomisi.....	18
2.2.4. <i>Gordonia</i> ve <i>Nocardia</i> 'nın Moleküler Sistematığı	20
2.3. <i>Nocardiodaceae</i> Familyası (Nesterenko ve ark., 1985)	22
2.3.1. <i>Kribbella</i>	22
2.3.2. <i>Nocardioides</i>	24
2.3.3. <i>Kribbella</i> ve <i>Nocardioides</i> Kemotaksonomisi	27

2.3.4. <i>Kribbella</i> ve <i>Nocardioide</i> s'in Moleküler Sistematığı	29
2.4. Prokaryotik Sistematik	32
2.4.1. Kemotaksonomi	34
2.4.1.1. Mikolik Asit	35
2.4.1.2. Mikolik asit metil esterleri	35
2.4.1.3. Kromatografi	37
2.4.2.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	37
2.4.2. Moleküler sistematik	38
2.4.2.1. 16S rRNA Gen Bölgesi	40
2.4.2.2. Multilokus Sekans Analizi (MLSA)	41
2.4.2.2. <i>gyrB</i> Gen Bölgesi	42
2.4.2.3. <i>rpoB</i> Gen Bölgesi	44
2.4.3. Dizi Verisinin Analizi ve Filogeni	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	49
3.1. Farklı Habitatlardan Nocardioform Grubu Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Seçimi	49
3.1.1. Toprak Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları	49
3.1.2. Toprakların pH'sı	50
3.1.3. Mikroorganizmaların İzolasyonu	50
3.1.3.1. Dilüsyon Plaka Yöntemi	50
3.1.3.2. Sükroz Santrifüjasyon Yöntemi	51

3.1.4. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması	52
3.1.5. İzolatların Stoklanması	52
3.2. Mikolik Asit Testi	53
3.2.1. Mikolik Asit Testi İçin Hazırlık	53
3.2.2. Mikolik Asit Ekstraksiyonu	53
3.2.3. Mikolik Asit Metil Esterlerinin (MAMEs) İnce-Tabaka Kromatografi Analizleri	54
3.3. DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini	54
3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	54
3.3.2. DNA İzolasyon Kontrolü	56
3.3.3. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi	57
	57
3.4. 16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>gyrB</i> Gen Bölgelerinin PCR Amplifikasyonu ve Saflaştırılması	
3.4.1. 16S rRNA'nın PCR Amplifikasyonu	57
3.4.2. <i>rpoB</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu	59
3.4.3. <i>gyrB</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu	62
3.4.4. 16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>gyrB</i> Gen Bölgelerinin Dizileme Çalışması	64
3.4.5. 16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>gyrB</i> Sekans Verilerinin Analizi	66
3.4.6. Filogenetik Dendrogramın Oluşturulması	67
4. BULGULAR	68
4.1. Mikroorganizmaların Farklı Lokalitelerden İzolasyonu	68

4.2. Mikolik Asit Metil Esterlerinin TLC Yöntemiyle Belirlenmesi	76
4.3. DNA İzolasyonu ve AgaroZ Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'ların Görüntülenmesi	85
4.4. DNA Miktar Tayini	85
4.5. 16S rRNA, <i>gyrB</i> ve <i>rpoB</i> ' nin PCR Amplifikasyonu	88
4.5.1. 16S rRNA'nın PCR Amplifikasyonu	88
4.5.2. <i>rpoB</i> Gen Bölgesinin PCR amplifikasyonu	89
4.5.3. <i>gyrB</i> Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu	90
4.6. 16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>gyrB</i> Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması	91
4.6.1. 16S rRNA Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması	91
4.6.2. <i>rpoB</i> Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması	103
4.6.3. <i>gyrB</i> Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması.....	111
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	118
6. ÖNERİLER	130
7. KAYNAKLAR	132
EK-A: Kültür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı	167
EK-B: Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı	173
EK-C Toprak İzolasyonu ve Saflaştırma Plaklarının Görüntüleri	181
ÖZGEÇMİŞ	187

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Corynebacterineae subordosunda yer alan cinslerin kimyasal markörlerle ayrımı	8
2.2. Mikolik asit içeren cinslerin karakteristik özellikleri	9
3.1. Nocardioform grubu mikroorganizmaların izolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin laboratuvar numarası, toprak tipi ve lokaliteleri	49
3.2. Toprak örneklerinin pH, kireç ve organik madde miktarı	50
3.3. 16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>gyrB</i> baz dizileme analizinde kullanılan oligonükleotit primerler, bu primerlerin nükleotit dizileri ve bağlanma bölgeleri	65
4.1. Toprak izolasyonu ile elde edilen Aktinomiset izolatlarının Kaynakçaları	69
4.2. Nocardioform grubu mikroorganizma ekstraktlarının tek boyutlu ince tabaka kromatografisine göre Rf Değerleri	76
4.3. 16S rRNA, <i>rpoB</i> ve <i>gyrB</i> gen bölgelerinin analizinde kullanılan Nocardioform test izolatlarının ve tip örneklerinin kaynakçası	82
4.4. Test mikroorganizmalarının ve Tip örneklerinin DNA miktar tayini ve saflık dereceleri	86
4.5. Test izolatları ve <i>Nocardia</i> cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	94
4.6. Test izolatları ve <i>Gordonia</i> cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	98
4.7. Test izolatları ve <i>Kribbella</i> cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	100
4.8. Test izolatları ve <i>Nocardioides</i> cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	102
4.9. Test izolatları ve <i>Nocardia</i> cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki <i>rpoB</i> dizisine bağlı nükleotit sayı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	106

4.10. Test izolatları ve <i>Kribbella- Nocardioides</i> sp. cinslerine ait tip türleri arasındaki <i>rpoB</i> gen bölgesinin bir bölümünün (289 bç) dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	108
4.11. Nocardioform test izolatlarının <i>rpoB</i> gen bölgesinin bir bölümünün nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	110
4.12. Test izolatları ve <i>Nocardia</i> cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki <i>gyrB</i> gen bölgesinin bir bölümünün (587 bç) nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	114
4.13. Test izolatları ve <i>Kribbella</i> ile <i>Nocardioides</i> cinsine ait tip türleri arasındaki <i>gyrB</i> gen bölgesinin bir bölümünün nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	116
4.14. Test izolatları ve <i>Kribbella</i> , <i>Nocardia</i> ile <i>Nocardioides</i> cinsine ait tip türleri arasındaki <i>gyrB</i> gen bölgesinin bir bölümünün nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri	117

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Mikolik asitin genel yapısı	36
4.1. DNA izolasyonu yapılan bazı izolatların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	85
4.2. Farklı lokalitelerden izole edilmiş Nocardioform mikroorganizmaların 16S rRNA gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu	88
4.3. Farklı lokalitelerden izole edilmiş Nocardioform mikroorganizmaların <i>rpoB</i> gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu	89
4.4. Farklı lokalitelerden izole edilmiş Nocardioform mikroorganizmaların <i>gyrB</i> gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu	90
4.5. Test organizmaları ile <i>Corynebacteriaceae</i> familyasından <i>Nocardia</i> cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	93
4.6. Test organizmaları ile <i>Corynebacteriaceae</i> familyasından <i>Gordonia</i> cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	97
4.7. Test organizmaları ile <i>Nocardiodaceae</i> familyasından <i>Kribbella</i> cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	99
4.8. Test organizmaları ile <i>Nocardiodaceae</i> familyasından <i>Nocardiodes</i> cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	101
4.9. <i>Nocardia</i> sp. izolatlarının MF primeri ile okutulan <i>rpoB</i> gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	105
4.10. <i>Kribbella</i> ve <i>Nocardiodes</i> test ve tip suşlarının MF primeri ile okutulan <i>rpoB</i> gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	108
4.11. Test izolatlarının MF primeri ile okutulan <i>rpoB</i> gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	109
4.12. <i>Nocardia</i> sp. izolatlarının Noc-gyrBF-R primerleri ile okutulan <i>gyrB</i> gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	113
4.13. <i>Kribbella</i> sp.ve <i>Nocardiodes</i> sp. izolatlarının Noc-gyrBF-R primerleri ile okutulan <i>gyrB</i> gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	116
4.14. <i>Kribbella</i> sp., <i>Nocardia</i> sp.ve <i>Nocardiodes</i> sp. İzolatlarının Noc-gyrBF-R primerleri ile okutulan <i>gyrB</i> gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı.	117

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC	: American Type Culture Collection
bç	: Baz çifti
CGMCC	: China General Microbiological Culture Collection Center
DDH₂O	: Double distile su
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	: Etilendiamintetra asetat
ISP	: International <i>Streptomyces</i> Project
JCM	: Japan Collection of Microorganism
NCIB	: National Collection of Industrial Bacteria
PCR	: Polymerase chain reaction
<i>rpoB</i>	: RNA polimeraz β alt ünitesi
<i>gyrB</i>	: DNA topoizomerazın β alt ünitesi

ÖZET

BAZI NOCARDİOFORM İZOLATLARIN 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* GEN DİZİ ANALİZLERİ İLE MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ

Gordonia, *Nocardia*, *Kribbella* ve *Nocardioides* izolatlarının tanımlanması multilokus sekans analizleri (MLSA); 16S rRNA (16S), DNA girazın β alt ünitesini kodlayan tip II DNA topoizomeraz (*gyrB*) ve RNA polimerazın β alt ünitesini kodlayan (*rpoB*) bölgeleri ile gerçekleştirilmiştir. Yirmiüç nocardioform test izolattan 16'sı *Nocardia*, 2'si *Gordonia*, 4'ü *Kribbella* ve 1'i *Nocardioides* olan toprak izolatları ve akraba tip türleri çalışmaya dahil edilerek MLSA analizleri uygulanmıştır. İzolatların moleküler tiplendirilmesi, mikolik asit profili ve morfolojik özelliklerle de desteklenmiştir.

İlgili gen bölgeleri için (16S rRNA, *gyrB* ve *rpoB*) tip türlerinin nükleotit sekans verileri, NCBI, DDBJ ve EMBL gibi veri bankalarından elde edilmiştir. MLSA veri seti least-squares, maximum-parsimony ve neighbour-joining algoritmaları ile MEGA 4.1 ve PHYLIP programları kullanılarak analiz edilmiştir. Filogenetik analizlerde yüksek bootstrap değerleri ile test suşları desteklenmiştir. MLSA gen bölgelerinin filogenetik analizleri sonucunda; FMN18, *Nocardia speluncae*'a, FSN27, *N. takadensis* tip türüne; FMN22, *Kribbella swartbergensis*'e, FSN23 *K. hippodromi* tip türlerine ve FMN08 nolu izolatında *Nocardioides albus* tip türüne akraba oldukları belirlenmiştir.

MLSA yaklaşımları, toprak izolatlarının olası yeni birer tür olarak tanımlanmaları için başarıyla uygulanmış ve mevcut *Nocardia*, *Kribbella* ve *Nocardioides* taksonomisine katkıda bulunması beklenmektedir. Aynı zamanda MLSA yaklaşımları, geleneksel yöntemlerle tanımlaması zor olan Nocardioform izolatların belirlenmesinde oldukça yararlı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Gordonia*, *Nocardia*, *Kribbella*, *Nocardioides*, Mikolik asit, 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*

ABSTRACT

MOLECULAR SYSTEMATIC OF SOME NOCARDIOFORM ISOLATES BY 16S rRNA, *rpoB* and *gyrB* GENE SEQUENCING ANALYSES

Identification of *Gordonia*, *Nocardia*, *Kribbella* and *Nocardioides* isolates were achieved through multilocus sequence analysis (MLSA) of 16S rRNA (16S), type II DNA topoisomerase coding DNA gyrase of the β subunit (*gyrB*) and β subunit of RNA polymerase (*rpoB*). Of the total 23 Nocardioform test organisms consist of 16 *Nocardia*, 2 *Gordonia*, 4 *Kribbella* ve 1 *Nocardioides* isolated from the soil samples including also related type species were the subject of MLSA analyses. Molecular typing of the isolates were also supported by mycolic acid profile and morphological features.

The nucleotide sequence information of the type strains for the corresponding gene locus (16S rRNA, *gyrB* and *rpoB*) are retrieved from universal databases including NCBI, DDBJ and EMBL. MLSA datasets were cooperatively analysed using MEGA 4.1 and PHYLIP using least-squares, maximum-parsimony and neighbour-joining algorithms. Test organisms were supported to highest bootstrap value according to phylogenetic analysis. MLSA were unravelled close phylogenetic relationship for FMN18, FSN27 soil isolates to *Nocardia speluncae* and *N. takadensis* type strains respectively and FMN22, FSN23 isolates to the type strains *Kribbella hippodromi* and *K. swartbergensis* of genus *Kribbella* and FMN08 isolate to *Nocardioides albus* type strains.

MLSA approach was successfully applied for species identification from soil isolates and contributed present knowledge of *Nocardia*, *Kribbella* and *Nocardioides* taxonomy. At the same time, it is seen that MLSA approach is so convenient to identify having the difficulties in conventional identification of Nocardioform isolates.

Key Words: *Gordonia*, *Nocardia*, *Kribbella*, *Nocardioides*, 16S rRNA, *rpoB*, *gyrB*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora süresince, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, farklı bakış açılarıyla problemlere çözüm bulma yetisi kazandıran, değerli hocam **Doç. Dr. Kamil IŞIK**'a,

Bu tezin şekillenmesinde ve gerçekleştirilen çalışmalarda bana değerli fikirleri ve tecrübeleriyle yol gösteren Tez İzleme Komitesinde yer alan hocalarım sayın **Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN** ve sayın **Prof Dr. Cafer EROĞLU**'na,

Çalışmalarım boyunca moral desteği esirgemeyen **Prof. Dr. Reşit ÖZKANCA**, bilgi ve tecrübesiyle takıldığım yerlerde yol gösteren **Yrd.Doç.Dr. Haydar KARAKAYA** ve **Yrd. Doç. Dr. Anıl SAZAK** ve laboratuvarını açan ve malzemelerini kullanmamıza izin veren **Prof. Dr. Hümeysra BATI** ve **Yrd. Doç. Dr. Emine DIRAMAN** ve tüm biyokimya branşında çalışan arkadaşlarıma,

Tez savunma sınavıma bizleri kırmayıp katılarak değerli bilgilerini paylaştığı için sayın **Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ** hocama,

Tezimin tüm sürecinde bana destek olan, yardım eden ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım **Elif Çil** ve **Yeliz GENÇ**'e,

Laboratuar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve moral desteğiyle güç veren yüksek lisans öğrencilerimiz **Tuğba KESKİN** ve **Talha GENÇBAY**'a,

Bu tezin hazırlanmasında büyük, küçük pek çok emeği olan arkadaşlarım, **Sadık DEMİRTAŞ**'a, **Cem Tolga GÜRKANLI**'ya, **Kübra Özkul**'a,

Desteklerini esirgemeyen Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi laboratuar çalışanları ve uzmanlarına ve Nükleer Tıp Ünitesindeki çalışma arkadaşlarıma ve uzmanlarıma,

Tüm bu süreçte yanımda olan desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma, dostlarıma,

Her zaman dualarıyla, maddi, manevi destekleriyle yanımda olan aileme,

Bu uzun maratonda benimle birlikte gece gündüz çalışan, stres, sıkıntı, hüznün ve mutluluklarımı paylaşan, sabrından dolayı canım eşim **Ahmet KOÇAK** ve biricik kızım **Zeynep Naz KOÇAK**'a sonsuz teşekkür ve minnetimi sunuyorum.

Fadime ÖZDEMİR KOÇAK

1. GİRİŞ

Actinobacteria'nın ilk hiyerarşik sınıflandırılması Stackebrandt ve arkadaşları (1997) tarafından yapılmış ve on subordo, otuz familya ile 95 cins bu grup içerisinde düzenlenmiştir. Stackebrandt ve arkadaşları (1997) yaptıkları bu revizyonda *Actinobacteria*'nın sınıflandırılmasında üç önemli kriterin olduğunu belirtmişlerdir. *Actinobacteria* sistematigi kemotaksonomik, moleküler ve nümerik taksonomik metodların uygulanmasıyla Zhi ve arkadaşları (2009) tarafından yeniden gözden geçirilmiştir. *Actinobacteria* sınıfı bakteri alemi içerisinde 16S rRNA gen ağaçlarındaki dallanma pozisyonları bakımından temel filumlardan birini oluşturmaktadır. Güncel hiyerarşik sınıflandırmaya göre *Actinobacteria* sınıfı beş alt sınıf, dokuz ordo, elli beş familya, iki yüz kırk cins ve üç bin türden oluşan *Bacteria* domainindeki en büyük ve önemli filumlardan biridir (Zhi ve ark., 2009).

Mikolik asit içeren kemotip IV hücre duvarına sahip aktinomisetler; *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Tsukamurella* ve *Williamsia* cinsleri olup bu cinsler meso-diaminopimelik asit (meso-A2pm), duvar peptidoglikanında arabinoz ve galaktoz içermesi (Duvar kemotip IV), A1 γ peptidoglikan tipine sahip olması ve yüksek moleküler ağırlıklı 2-alkil-3-hidroksi dallanmış zincirli yağ asitleri içermesi gibi birçok ortak özelliklere sahiptir ve 16S rRNA gen ağacında monofiletik bir grup oluşturmaktadır (Goodfellow ve Wayne; 1982, Goodfellow ve Cross, 1984; Goodfellow, 1992; Stackebrandt ve ark., 1997; Goodfellow ve Magee, 1998; Goodfellow ve ark., 1998; Goodfellow ve ark., 1999; Brown-Elliott ve ark., 2006; Conville ve Witebsky., 2010).

Gordonia aerobik, Gram ve katalaz pozitif, kısmen asit faz özellikli, tek, çift veya V şeklinde düzenlenmiş kısa çubuk veya kok şeklinde veya kısa zincirli hareketsiz olan aktinomisetlerdir. Koloni görünümleri, konveks, parlak ve düz, pürüzlü, mat, düzensiz sınırlı kıvrımlara sahiptir. *Gordonia* suşları, toprak ve deniz sedimentlerini de içeren aquatik habitatlarda yaygın olarak bulunmaktadır (Tsukamura, 1971; Colquhoun ve ark., 1998; De los Reyes ve ark., 1998a,b; Kim ve ark., 2000; Shen ve ark., 2006b; Luo ve ark., 2007; Park ve ark., 2009; Kämpfer ve ark., 2011). *Gordonia* cinsi üyelerinin büyük çoğunluğu, dünyanın çeşitli bölgelerindeki fabrikaların aktif çamur

köpüğünden izole edilmiştir (Lechevalier ve Lechevalier, 1974; Goodfellow ve ark., 1996; Goodfellow ve ark., 1998; Stainsby ve ark., 2002). *G. amarae* fabrikalardaki köpük oluşumu için bakteriyel topluluğun temel bileşeni olarak kabul edilmektedir (Dhaliwal, 1979; Sezgin ve ark., 1988; Blackall ve ark., 1989; Blackall ve ark., 1991; De los Reyes ve ark., 1998a; De los Reyes ve ark., 1998b).

Nocardia; aerobik, dallanmış filamentleri 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 cehaletli enfeksiyonlar (Nokardiozis) oluşturmaktadırlar. Enfeksiyon genellikle solumla ve bulaşlı bir yaraya temas ile gerçekleşebilmektedir (Schaal ve Lee, 1992; McNeil ve Brown, 1994; Goodfellow ve ark., 1998; Saubolle ve Sussland, 2003; Munoz ve ark., 2007; Jinno ve ark., 2007). *Nocardia* cinsi üyeleri akuatik ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunduğu gibi çok farklı ekstrem ortamlarda da bulunabilmektedir (Orchard, 1981; Maldonado ve ark., 2000). Farklı *Nocardia* popülasyonları aktif çamur kirli su arıtım tesislerinde havalandırma tanklarının yüzeylerindeki köpük içerisinde ve çamur sedimentlerinin içinde bulunmuştur (Goodfellow ve ark., 1996; Pagilla ve ark., 1998; Yamamura ve ark., 2005).

Kribbella cinsi, hücre duvarında LL-diaminopimelik asit içeren (hücre duvar kemotip I, Lechevalier ve Lechevalier, 1970) nocardioform aktinomiset olarak Park ve arkadaşları tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır. 17 türü bünyesinde bulunduran cins, Gram pozitif, aerobik, asit-alkol dirençsiz, hareketsiz, substrat miselyumları son derece dallanmış ve hava miselyumları kısa çubuk veya kokkoid elementler şeklindedir. 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* ve *K. lupini*) olanlarıda bulunmaktadır.

Nocardioides cinsi, Prauser (1976) tarafından önerilmiş Gram (+), aerobik, asit-faz özelliği göstermeyen ve mezofilik nocardioform actinomyceteslerden olup düzensiz, çubuk veya kok benzeri elementler içinde fragmentli miselyumlarda gelişir. *Nocardioides* suşları hücre duvar peptidoglikanında LL-2,6-diaminopimelik asit ve glisin bulundururken mikolik asit içermez. *Nocardioides* cinsi üyeleri, toprak, yeşil

alan, kaya petrol sütunu, endüstriyel atık su ve yüksek tuz oranına sahip göl suyu gibi farklı habitatlardan izole edilmişlerdir.

Günümüzde, aktinomisetlerin sistematiği nümerik, kemotaksonomik ve moleküler metotların bir bütünü olarak açıklanmaya çalışılmaktadır. Polifazik taksonomi olarak nitelendirilen bu üçlü yaklaşım ile mikroorganizmaların tür seviyesinde tanımlanması daha doğru ve net olarak yapılabilmektedir. Polifazik taksonomi, kimyasal, moleküler ve fenetik analizlerden elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ve bu verilerin birbiri ile uyumlu olması esasına dayanmaktadır.

Bu veriler ışığında, doğal ortamlardan izole edilen nocardioform özellikli izolatların 16S rRNA, *rpoB* ve *gryB* gen bölgelerinin amplifikasyonu ve dizileme çalışmaları yapılarak analizlerinin tamamlanması ve belirtilen moleküler yöntemlerin kullanılarak moleküler sistematik çalışmaların gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Actinobacteria

1875 yılında Ferninand Cohn tarafından *Actinobacteria* sınıfında ilk tanımlanan *Streptothrix* cinsine ait *Streptothrix foersteri* türü olmuş ve daha sonra 1877 yılında Carl Otto Harz tarafından *Aktinomisets bovis* türü tanımlanmıştır (Hassan ve Wellington, 2009). Waksman'ın (1950) aktinomisetlerin generik isimlerinin listesi arasında *Actinomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora* ve *Streptomyces* gibi günümüzde de geçerli olan taksonlar bulunmaktadır (Stackebrandt ve Schumann, 2006).

Actinobacteria'nın ilk hiyerarjik sınıflandırılması Stackebrandt ve arkadaşları (1997) tarafından yapılmış ve on subordo, otuz familya ile 95 cins bu grup içerisinde düzenlenmiştir. Stackebrandt ve arkadaşları yaptıkları bu revizyonda *Actinobacteria*'nın sınıflandırılmasında üç önemli kriterin olduğunu belirtmişlerdir. Bunlardan ilki, hücre içeriklerinin farklı kimyasal kompozisyonlarının kemotaksonomik analizlerle belirlenmesi (peptidoglikan yapılarının, polar lipit ve ağır asitlerin, izoprenoid kinonların ve DNA'nın baz kompozisyonların analizi), ikincisi DNA-DNA hibritleme deneyleri ile yakın akraba organizmalar arasındaki benzerliğin belirlenmesi ve son olarak da 16S rRNA sekans benzerliklerinin belirlenmesidir. Bu üç yaklaşımın kullanımı Colwell tarafından polifazik yaklaşım olarak isimlendirilmiştir (Colwell, 1970).

Actinobacteria sistematigi kemotaksonomik, moleküler ve nümerik taksonomik metodların uygulanmasıyla 2009 yılında Zhi ve arkadaşları tarafından yeniden gözden geçirilmiştir. *Actinobacteria* sınıfı bakteri alemi içerisinde 16S rRNA gen ağaçlarındaki dallanma pozisyonları bakımından temel filumlardan birini oluşturmaktadır. Güncel hiyerarşik sınıflandırmaya göre *Actinobacteria* sınıfı beş alt sınıf, dokuz ordo, elli beş familya, iki yüz kırk cins ve üç bin türden oluşan *Bacteria* domainindeki en büyük ve önemli filumlardan biridir. *Catelliglobosipora*, *Devriesea*, *Fodinicola*, *Glaciibacter*, *Haloactinospora*, *Hamadaea*, *Humibacillus*, *Klugiella*, *Marihabitans*, *Pseudosporangium* ve *Sciscionella* gibi cinsler ise filuma son yıllarda yeni katılanlardandır (Zhi ve ark., 2009).

16S rRNA gen sekans örneklerinin genel veritabanında toplanmasının muazzam bir şekilde artmasıyla 16S rRNA gen sekans nükleotidleri hakkında verilen sonuçlar, *Actinobacteria* filumu içerisindeki taksonomik sınıflandırmaları son derece etkilemiştir. Örneğin, *Cornebacterineae* alt ordosuna ait *Nocardiaceae* ve *Gordoniaceae* familyaları arasındaki nükleotit imza (signature) noktalarının aynı olduğunun belirlenmesiyle *Nocardiaceae* ve *Gordoniaceae* familyaları filogenetik olarak *Nocardiaceae* familyasında birleştirilmiştir (Zhi ve ark., 2009).

Aktinomisetler aerobik, Gram pozitif bakteriler olup dallanmış filamentler veya hipalarla aseksüel spora sahiptirler. *Actinomycet*'ler agar gibi katı ortamlarda geliştiğinde substrat yüzeyine ve içine doğru ağ şeklinde gelişen hipalara sahiptirler. Birçok *Actinomycetes* substrattan yukarı doğru uzanan ve aseksüel olan filamentin uç kısmında konidium veya konidiospora sahip olan hava misellerine sahiptirler. *Actinomycetes* türleri yaygın olarak toprak ve akuatik sistemlerde bulunmasına rağmen son derece ekstrem ortam olan çöl toprağından deniz süngerlerine kadar farklı habitatlarda da bulunabildikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Ventura ve ark., 2007; Wanbanjob, 2008; Hassan ve Wellington., 2009).

Actinobacteria sınıfı üyeleri, farmasötik ve ekolojik olarak önemli doğal biyoaktif bileşiklerin üreticisidirler. *Actinobacteria* sınıfının ürettiği bu biyoaktif bileşiklerin en önemlisi antibakteriyal ve antifungal özellik gösteren antibiyotiklerdir. Aynı zamanda bu gruba dahil olan organizmalar toprakta birçok ekstrasellüler enzim üreterek ölü bitki, hayvan ve fungus materyallerinin çürümesinde etkin rol oynamaktadırlar. Biyoremediasyon, biyodegradasyon ve besinsel ilişkili polimerlerin ayrışmasında da etkindirler. Bazı türler daha kompleks ve zor ayrışan bileşikleri parçalayabilirler (Arenskötter ve ark., 2004; Stackebrandt ve Schumann, 2006; Wanbanjob, 2008; Hassan ve Wellington., 2009; Sahin ve ark., 2010).

Filamentli *Actinobacteria* miselleri katı ortamda gelişebilir ve 0.22 µm boyutundaki küçük porlara penetre olabilmektedir. Bu özellikleri, karışık popülasyonlardan (toprak, su, bitki materyalleri) aktinomisetlerin nütrient agar üzerine yerleştirilmiş selüloz membran filtre yüzeyinden selektif izolasyonu için kullanılmaktadır (Hirsch ve Christensen, 1983; Polsinelli ve Mazza, 1984). İnkübasyon süresince, aktinomiset miselleri alttaki agar ortamına filtrenin porları boyunca penetre olur ve koloniler oluşur, bakteri ve funguslar ise membran tarafından agardan ilişkisi

kesilir. Farklı aktinomiset cinslerinin selektif izolasyonu, seçici besiyerlerinin kullanımı ve toprak örneklerinin farklı ön uygulamalara tabi tutulmasıyla gerçekleştirilebilmektedir (Seong ve ark., 2001; Yamamura ve ark., 2003; Abbas, 2006; Qiu ve ark., 2008; Eccleston ve ark., 2008; Hong ve ark., 2009).

2.2. *Nocardiaceae* Familyası (Trevisan, 1889)

Actinomycetler; meso-diaminopimelik asit (meso-A2pm), duvar peptidoglikanında arabinoz ve galaktoz içermesi (Duvar kemotip IV Lechevalier ve Lechevalier, 1970) gibi temel iki özelliğe göre farklı gruplara ayrılmaktadır (Goodfellow ve Lechevalier 1989; Goodfellow ve ark., 1999). Mikolik asit içeren kemotip IV hücre duvarına sahip aktinomisetler; *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Tsukamurella* ve *Williamsia* cinsleridir. Mikolik asit içeren cinsler meso-diaminopimelik asit (meso-A2pm), duvar peptidoglikanında arabinoz ve galaktoz içermesi (Duvar kemotip IV Lechevalier ve Lechevalier, 1970), A1 γ peptidoglikan tipine sahip olması ve yüksek moleküler ağırlıklı 2-alkil -3- hidroksi dallanmış zincirli yağ asitleri içermesi gibi birçok ortak özelliklere sahiptir ve 16S rRNA gen ağacında monofiletik bir grup oluşturmaktadır (Goodfellow ve Wayne, 1982, Goodfellow ve Cross, 1984; Goodfellow, 1992; Stackebrandt ve ark., 1997; Goodfellow ve Magee, 1998; Goodfellow ve ark., 1998; Goodfellow ve ark., 1999; Brown-Elliott ve ark., 2006; Conville ve Witebsky., 2010).

Mikolik asit içeren aktinomisetlerin, özellikle *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia*'nın sahip olduğu mikolik asitlerin yapısı ve tüm boyutundaki farklılıklarla, hücresel yağ asitleri, menakinon ve polar lipid kompozisyonu ile tanımlanıp ayırt edilebilmektedir (Cross ve Goodfellow, 1973; Goodfellow ve Minnikin, 1977, 1981, 1984; Keddie ve Cure, 1977; Minnikin ve ark., 1978; Baba ve ark., 1997; Çizelge 2.1 ve 2.2).

Mikolik asit içeren aktinomisetler, 16S rRNA gen benzerliği ve takson spesifik imza (signature) nükleotitlerinin dağılımına göre altı familyada düzenlenmiştir (Stackebrandt ve ark., 1997). Tüm familyalar *Actinomycetales* ordosunun on subordosundan biri olan *Corynebacterineae* subordosunda yer almaktadır. *Corynebacteriaceae* familyası *Corynebacterium* cinsini, *Dietziaceae* familyası *Dietzia*

cinsini, *Mycobacteriaceae* familyası *Mycobacterium* cinsini, *Nocardiaceae* familyası *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Williamsia* cinslerini, *Segniliparaceae* familyası *Segniliparus* cinsini ve *Tsukamurellaceae* familyası *Tsukamurella* cinsini bünyesinde barındırmaktadır (Conville ve Witebsky, 2010).

Nocardiaceae familyası üyelerinin bazı özellikleri ile sınırları doğru olarak belirlenmiştir:

- 1) Peptidoglikan içeriklerinde, n-asetilglukozamin, D-alanin, L-alanin ve D-gutamikasit bulundurması, diaminoasit olarak meso-A₂pm sahip olmaları, n-glikolatlarında muramik asit içermesi (Uchida ve Aida, 1977, 1979, 1997)
- 2) Duvar polisakkarit fraksiyonlarının arabinoz ve galaktozca zengin olması (tüm organizma şeker örneği tip A, Lechevalier ve Lechevalier, 1970)
- 3) Fosfolipit olarak difosfatidilgliserol ve fosfatidiletanolamin içermeleri taksonomik olarak önemli nitrojen fosfolipitlerinden, fosfatidilinositol ve fosfatidilkolin veya glukozamin içerikli fosfolipitsiz fosfatidilinositol mannositleri içermeleri (örneğin, fosfolipit tip 2, Lechevalier ve ark., 1977, 1981)
- 4) Ağır asit profillerinde doymamış yağ asitleri ve tuberkulostearik asitli düz zincirlere sahip olmaları
- 5) DNA G+C içeriği 63-73 mol%'dür. Buna karşın, *Dietziaceae* familyası üyeleri, polar lipid örneklerinde fosfatidilinositol ve fosfatidilinositol mannositleri yoktur ve n-asetilat formlarında muramik asite sahiptir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Nocardia, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* ve *Dietzia* cinsi üyeleri, karbonhidrat ve proteinlerin asimilasyon yeteneklerinin yanında alifatik hidrokarbonlar, anilin, bisiklik ve polisiklik hidrokarbonlar, nitroaromatik bileşikler, pyridin ve steroller de içeren katabolik potansiyele sahiptirler (Williams ve ark., 1989). Kompleks lipidleri sentez yeteneği ve mikolik asit içerikleri, *Dietzia*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamurella* cinsi üyelerini *Mycobacteria* ve *Corynebacteria* cins üyeleri ve diğer tüm bakterilerden ayırt etmede kullanılabilir. Mikolik asit içeren cinslerin bazı temel özellikleri Çizelge 2.1. ve 2.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. *Corynebacterineae* subordosunda yer alan cinslerin kimyasal markörlerle ayrımı (Goodfellow ve Maldonado, 2006)

Cins	Duvar Kemotip ^a	Tüm organizma şeker örneği ^b	Peptidoglikan ^c ve muramik asit tipleri ^d	Yağ asit örnekleri ^e	Temel menakinon ^f	Fosfolipit tipi ^g	DNA'nın Mol % G+C
<i>Corynebacterium</i>	IV	A	Alγ A	1a	-8(H ₂), -9(H ₂)	PI	51-63
<i>Dietzia</i>	IV	A	Alγ A	1b	-8(H ₂)	PI	73
<i>Gordonia</i>	IV	A	Alγ G	1b	-9(H ₂)	PII	60-66
<i>Mycobacterium</i>	IV	A	Alγ G	1b	-9(H ₂)	PII	62-70
<i>Nocardia</i>	IV	A	Alγ G	1b	-8(H ₄ , ωcycl)	PII	64-72
<i>Rhodococcus</i>	IV	A	Alγ G	1b	-8(H ₂)	PII	63-73
<i>Tsukamurella</i>	IV	A	Alγ G	1b	-9	PII	67-78

a- Duvar Kemotipleri; IV-mezo-A₂pm, arabinoz ve galaktoz

b- meso-A₂pm içeren aktinomisetlerin tüm organizma şeker örnekleri; A, arabinoz ve galaktoz

c- Peptidoglikan; Tip A, iki peptit alt ünitesinin 3 ve 4. pozisyonu arasında çapraz bağ, 1, direkt çapraz bağ (interpeptit köprü yok)

d- Muramik asit tipi; A, Asetil muramik asit, G, N-glikomuramik asit

e- Yağ asit örnekleri; Tip I, uzun zincirli yağ asitler, doymuş ve doymamış içerir; Tip II, uç kısmı dallanmış yağ asitler, yağ asitlerin iso ve anteiso uçları doymamış bileşiklerden türevlenir

f- Temel menakinon; MK-9(H₂) 9 izopren üniteli oktahidrojenat menakinon

g- Fosfolipit tipi; PI, azot fosfolipitleri yok (fosfotidilgliserol mevcut), PII, sadece fosfotidiletonalamin mevcut

Çizelge 2.2. Mikolik asit içeren cinslerin karakteristik özellikleri (Goodfellow ve Maldonado, 2006)

	<i>Corynebacterium</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Tsukamurella</i>
Morfolojik karakterler						
Hücre morfolojisi	çubuk veya kok şeklinde	çubuk veya kok şeklinde	çubuk veya kok şeklindeki organizmalar dallanmış filamentlere sahiptir	çubuk veya kokkoid elementler içinde substrat miselyumları mevcuttur	substrat miselyumlarına sahip düzensiz çubuk veya kokiler	çubuk şeklinde
Hava hifaları	yok	yok	genellikle yok	Mevcut	yok	yok
Asit-alkol direnci	zayıf asit-alkol direnci	asit-alkol direnci gösterir	güçlü asit-alkol direnci gösterir	asit-alkol direnci gösterir	asit-alkol direnci gösterir	zayıftan güçlüye doğru asit-alkol direnci gösterir
Kolonilerin gözle görülebilirliği (gün)	1 ile 2	1 ile 3	2 ile 40	1 ile 5	1 ile 3	1 ile 3
Kimyasal markörler						
Ağır asitler	yok	var	var	var	var	var
Mikolik asit: C atom sayısı	22-38	46-66	60-90	44-64	34-52	62-78
Çift bağ sayısı	2	4	3	3	4	6
Fosfolipit tipi	1	2	2	2	2	2
Diğer karakterleri						
Solunum	aerobik veya fakültatif anaerobik	aerobik	zorunlu aerobik	Aerobik	aerobik	zorunlu aerobik
Spor oluşumu	yok	yok	yok	Var	yok	yok

2.2.1. *Gordonia*

Gordonia cinsi kısa fakat hareketli bir tarihe sahiptir. Tsukamura (1971) pulmoner infeksiyonlu hastanın balgamı ve topraktan izole edilen hafif asit-faz aktinomisetler için bu cinsi tanımlamıştır. Bu yeni cinsin ismi, Amerikan bakteriolojist Ruth E. Gordon'a ithafen *Gordona* olarak belirlenmiştir (Arenskötter ve ark., 2004). Cins, daha sonra Goodfellow ve Alderson tarafından *Rhodococcus* kompleksi içinde sınıflandırılmış ve cins üyelerinin mikolik asit içerikleri ve menakinon çalışmaları sonucu *Rhodococcus* kompleksinde heterojeniteye neden olduğu görülmüştür (Goodfellow, 1986; Tomiyasu ve Yano, 1986). Mikolik asit içerikleri, menakinon farklılıklarının yanında 16S rRNA dizi analizleri ile *Gordona* cinsinin *Rhodococcus* kompleksinden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir (Stackebrandt ve ark., 1988). *R. bronchialis*, *R. rubripertincta* ve *R. terrae* olarak sınıflandırılan organizmalar *G. bronchialis*, *G. rubra* ve *G. terrae* olarak *Gordona* genusunda yeniden düzenlenmiştir. Bu üç tür, cinsin temsilci türlerini oluşturmuş ve bu çalışma ile *Rhodococcus* cinsi revize edilmiştir (Tsukamura, 1974; Goodfellow ve Alderson, 1977; Stackebrandt ve ark., 1988; Kim ve ark., 2000; Arenskötter ve ark., 2004). Ayrıca bu çalışma ile *R. sputi*, *G. sputi* olarak yeniden adlandırılmıştır (Stackebrandt ve ark., 1988). *R. aichiensis* ve *N. amarae*'nin yeniden sınıflandırılması ile bu iki tür *Gordona* cinsinde *G. aichiensis* ve *G. amarae* olarak yer almıştır (Klatte ve ark., 1994). Stanckebrandt ve arkadaşları tarafından *Gordonia* adı ile etimolojik olarak doğru adlandırılması 1997'de yapılmıştır (Stackebrandt ve ark., 1997; Arenskötter ve ark., 2004; le Roes ve ark., 2008). Zhi ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışma ile *Gordoniaceae* familyasının tip cinsi olan bu taksonu *Nocardiaceae* familyasına aktarmıştır. *Nocardiaceae* familyasında *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Williamsia* cinsleri ile birlikte farklı bir monofilogenetik hatta yer almaktadır (Zhi ve ark., 2009).

Gordonia cinsi, mikolik asit içeren aktinomisetlerin filogenetik olarak farklı bir klad üyesi olup toplam 34 türü bünyesinde bulundurmaktadır. Bu türlerin çoğunun taksonomik yerleri, genotipik ve fenotipik verinin zenginliği ile desteklenmektedir. Fakat, *G. alkalivorans* ve *G. nitida* tip türlerinde olduğu gibi 16S rRNA gen benzerliği % 99,9 sahip olup 1480 lokasyonda sadece 2 nükleotit farklılığı göstermesi nedeni ile aralarındaki ilişkiyi belirlemede predominat menakinon, mikolik asit içerikleri ve hücre duvar analizleri gibi kemotaksonomik ve *secA1* ve *gyrB* gen bölgesi gibi moleküler

markörlerle yapılacak ilave çalışmalar gerekmektedir (Kummer ve ark., 1999; Yoon ve ark., 2000; Kang ve ark., 2009).

Gordoniae aerobik, Gram ve katalaz pozitif, kısmen asit faz özellikli, tek, çift veya V şeklinde düzenlenmiş kısa çubuk veya kok şeklinde veya kısa zincirli hareketsiz olan aktinomisetlerdir. Koloni görünümleri, konveks, parlak ve düz, pürüzlü, mat, düzensiz sınırlı kıvrımlara sahiptir. Pigmentasyon, soluk sarı, bej veya sarımsı kahverengiden turuncu pembeye doğru veya kırmızı olabilir. Organizma oksidatif tipte karbonhidrat metabolizmasına sahip olup arilsülfaz negatif, lizozime duyarlı ve mikobaktin üretimi gerçekleştirir. İlk belirtilen kimyasal özelliklere ek olarak; organizmalar, A1γ tipte peptidoglikana, predominant isoprenoid olarak 9 izopren üniteli dihidrogenat menakinona ve 44-66 C atomlu ve 4 çift bağ bulunduran mikolik asitlere sahiptir. Mikolik esterlerin pylorisiz gaz kromatografisinde serbest kalan ağır asit esterleri 16-18 C atomu içerir. DNA'nın G+C içeriği %63-69 mol'dür. Tip suşu *G. bronchialis* olup (Tsukamura, 1971) 2009 yılında son olarak revize edilmiş olup ATCC 25592^T= DSM 43247^T şeklinde uluslararası kültür koleksiyon numaralarıyla kayıtlıdır (Zhi ve ark., 2009).

Çoğu *Gordonia* türü farklı çevresel kaynaklardan izole edilmiştir, ancak bazı türleri insan infeksiyonlarıyla da ilişkilidir (Klatte ve ark., 1994; Arenskötter ve ark., 2004; Lida ve ark., 2005; Kageyama ve ark., 2006). Çoğunlukla immün düşkün hastalarda sekonder hastalık veya infeksiyonlara neden olmaktadır. Gordonial kaynaklı insan infeksiyonları ile ilgili raporlar nispeten taksonomik olarak yakın ilişkili olduğu *Rhodococcus* ve *Nocardia* kaynaklı fırsatçı patojenlerin neden olduğu infeksiyonlarla kıyaslandığında azdır. Ayrıca, bu infeksiyonların kaynağı ile ilgili araştırmaların ve ayırt edici karakterlerin azlığı nedeniyle yeterli ayırımı sağlamamaktadır (Arenskötter ve ark., 2004).

Gordonia suşları, toprak ve deniz sedimentlerini de içeren sucul habitatlarda yaygın olarak bulunmaktadır (Tsukamura, 1971; Colquhoun ve ark., 1998; De los Reyes ve ark., 1998a; 1998b; Kim ve ark., 2000; Shen ve ark., 2006b; Luo ve ark., 2007; Park ve ark., 2009; Kämpfer ve ark., 2011). Kirli akarsudan ve akarsu ağzından izole edilen türleri de bulunmaktadır (le Roes ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009). Ayrıca, *Gordonia* rizosfer toprağından, biyofiltrelerden, otomobil lastiğınden, katran kontamine topraktan, endüstriyel su atıklarından, sülfonamid antibiyotiğinin duyarlılık test agar

yüzeyindeki geniş skalalı biyofiltrenin filtre metaryalinin nemli çevresinden, su arıtma tesislerinin biyoreaktörlerinden ve biyoloji arıtma tesislerinin havalandırma tanklarındaki aktif çamurdan izole edilmiştir (Lemmer ve Kroppenstedt, 1984; Bendinger ve ark., 1995; Klatte ve ark., 1996; Takeuchi ve Hatano, 1998; Linos ve ark., 1999; Kummer ve ark., 1999; Yoon ve ark., 2000; Kim ve ark., 2003; Soddell ve ark., 2006; Yassin ve ark., 2007; Drzyzga ve ark., 2009).

Gordonia'nın büyük çoğunluğu, dünyanın çeşitli bölgelerindeki fabrikaların aktif çamur köpüğünden izole edilmektedir (Lechevalier ve Lechevalier, 1974; Goodfellow ve ark., 1996; Goodfellow ve ark., 1998; Stainsby ve ark., 2002). İzole edilen bu organizmaların surfaktan ürettiği ve hidrofobik özellik gösterdiği belirlenmiştir (Blackall ve Marshall, 1989). Son dönemde ise, oldukça farklı habitat olan *Neofelis nebulosa* (leopar) dışkısından izole edilen türü de mevcuttur (Liu ve ark., 2011).

2.2.2. *Nocardia*

İlk defa Nocard tarafından (1888) Guadelope'da tümörlü bir sığırdaki akciğer enfeksiyonu, çoğul deri apseleri ve aşırı zayıflama ile karakterize hastalığa neden olan aerob *Nocardia* (Actinomycetes) suşu izole edilip tanımlandı. Daha sonra 1891 yılında Epinger beyin apsisi ile birlikte öldürücü menenjit vakasından, fungus olduğu düşünülen ve *Clodothrix asteroides* adı verilen aerobik, gram pozitif, asit-faz bir organizmayı izole etti. Bu organizma 1896 yılında Blanchard tarafından *N. asteroides* olarak yeniden adlandırıldı. Trevisan (1889) *Nocardia* cinsinin; *N. actinomycetes* ve Harz'ın teşhis ettiği *Actinomyces bovis* dahil olmak üzere 5 tür içerdiğini açıklamıştır (Goodfellow, 1997 ; Conville ve Witebsky., 2010).

Discomyces (Rivolta) ve *Streptothrix* (Cohn) dahil birkaç geçersiz terim yerine kullanılmak üzere, 1889'da Trevisan tarafından önerilen *Nocardia* cinsinin taksonomisinde, birkaç morfolojik ve boyama özelliklerinin kriter olarak alınması sistematik eksikliklere yol açmıştır. Trevisan tanımlamalar ortaya koymayıp sadece *N. actinomyces*, *N. arborescens*, *N. farcinica*, *N. ferruginea*, *N. foersteri* gibi türleri listelemiştir.

Pinoy (1913), Brezilyalı bir hastanın bacağından izole edilen ve Lindenberg tarafından *Discomyces brasiliensis* olarak daha önce adlandırılan organizma için

N. brasiliensis adını önerdi. Bir kobayın enfekte kulağından izole edilen *N. otitidiscaviarum* Snijders (1924) tarafından tanımlanmıştır. 1891'de Rossi-Doria'nın *Streptothrix carnea* olarak tanımladığı toprak izolatını, Castellani ve Chalmers (1913) *N. carnea* olarak yeniden adlandırmıştır.

N. brasiliensis, *N. farcinica* (Grup Kyoto-I) ve *N. otitidiscaviarum* kapsamlı bir şekilde çalışılmış *Nocardia* kümeleridir (Tsukamura, 1969, 1977; Goodfellow, 1971; Tsukamura ve ark., 1979). 1990'da Yano ve meslektaşları DNA:DNA benzerliği, mikolik asit ve nümerik taksonomi verilerini kullanarak *N. nova*'yı *N. asteroides* ve *N. farcinica*'dan ayırmıştır.

Ayrıca, gerçekte farklı türler olabilecek klinik açıdan önemli bazı suşların *N. asteroides* olarak teşhis edildiği konusunda deliller de bulunmaktadır (Conville ve Witebsky., 2010). Gen dizileme çalışmalarının laboratuvarlarda rutin kullanıma girmesiyle *Nocardia asteroides* olarak tanımlanan pek çok klinik *Nocardia* izolatının aslında farklı *Nocardia* türleri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde yapılan gen dizileme çalışmaları sonucunda *Nocardia asteroides*, *N. nova*, *N. transvalensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. cyriacigergica* kompleks grupları yeniden düzenlenmiştir (Conville ve Witebsky., 2010).

Nocardia; aerobik, dallanmış filamentleri bir arada bulunduran, Gram pozitif, hareketsiz, katalaz pozitif, gelişme döngüsünün bazı evrelerinde tipik asit alkol direncine sahip olan aktinomisetlerdir. *Nocardia* türlerinin morfolojisi, türden türe farklılık göstermektedir. Koloni renkleri sabouraud's dekstrozu agar gibi yarısaydam ortamlarda kahveden pembeye, turuncu, mor, sarı, şeftali veya beyaz renkte iyi bir şekilde ayırt edilebilir. Klinik açıdan da önemli olan *Nocardia* cinsi üyeleri, hücre duvarında mikolik asit içeren mycolata grubunun üyesidir. *Nocardia* cinsi üyeleri 0,5-1,2 µm çapında, besiyeri yüzeyinde ve derinlerinde genişçe dallanarak vejetatif hiflerle büyümektedir (Goodfellow ve Cross, 1984; Conville ve Witebsky., 2010).

Oksidatif tipte karbonhidrat metabolizmasına sahip kemoorganotropik organizmalardır. A1γ şeklinde olan peptidoglikan meso-diaminopimelik asit içermektedir. Duvar zarfı 44-64 C atomlu ve üzerinde 3 çift bağ bulunan mikolik asit de bulundurmaktadır. Pirolizis gaz kromatografisinde serbest kalan mikolik asidin metil esterleri 12-18 C atomuna sahiptir. Duvar polisakariti arabinoz ve galaktozdur. Hücreler majör fosfolipit olarak difosfatidilgiserol, fosfatidiletanolamin,

fosfatidilinositol ve fosfatidilinositol mannositleri ve predominant menakinon gibi son iki birimi halkasal olan 8 izopren birimli bir hekzohidrojenad menakinon içerir. DNA'nın G+C oranı % 64-72 mol' dür (Minnikin ve Goodfellow, 1980).

Nocardia suşları insan ve hayvanlarda çeşitli cerahatli infeksiyonlar (Nokardiozis) oluşturmaktadırlar. İnfeksiyon genellikle solunumla ve bulaşlı bir yaraya temas ile gerçekleşebilmektedir (Schaal ve Lee, 1992; McNeil ve Brown, 1994; Goodfellow ve ark., 1998; Saubolle ve Sussland, 2003; Munoz ve ark., 2007; Jinno ve ark., 2007). İnsanlarda görülen nokardial İnfeksiyonlar klinik açıdan incelendiğinde; deri ve katmanlarında kutanöz, subkutanöz, lenfokutanöz nokardiozis; merkezi sinir sistemi (CNS) nokardiozis; solunum sistemi organlarında pulmoner veya ekstrapulmoner nokardiozis; iki ya da daha fazla vücut bölgesini etkileyen sistemik nokardiozis olmak üzere, 5 temel formda gruplandırılmaktadır (Poonwan ve ark., 1995; Schaal, K.P., 1998; Kageyama ve ark., 2004 a, b, c, d; Hoshino ve ark., 2007; Conville ve Witebsky., 2010).

Nokardial infeksiyonlara hayvanlardan sığır, kedi, köpek, tavuk, ördek, balık, keçi ve koyunun hassas olduğu görülür. Pulmoner ve beyin infeksiyonlarını içeren sistemik nokardiozis en sık olarak tanımlanan durumdur, ayrıca; kutanöz ve misetemo lezyonları da meydana gelebilmektedir (Battig ve Wegmann, 1990; Stark ve Anderson, 1992; Manninen ve ark., 1993, Işık ve ark., 1999 a,b; Ramos-Vara ve ark., 2007). Hayvanlarda tanımlanan patojenlerin çoğunu, *N. asteroides*, *N. brasiliensis* ve *N. otidiscaviarum* oluşturduğu belirlenmiştir. *Nocardia crassostreae* istiridyedeki infeksiyondan ve *N. seriolae*'de balıktan ve *N. tenerifensis* kutanoz granulomalı bir kediden izole edilmiştir (Friedman ve ark., 1998; Işık ve ark., 1999a, Ramos-Vara ve ark., 2007).

Fagositoza ve hücre içi öldürmeye filaman yapıdakiler logaritmik üreme formundaki *Nocardia*'ların kokoid-stabil üreme fazındakilerden daha dirençli olmaları nedeniyle virulansları fazladır. Aktive makrofajlardan salınan lizozomal asit fosfataz *N. asteroides* suşlarının makrofajlar içinde üreyebildiği ve avirülen suşların ise hücre içinde L-formu şekline dönüştüğü in vitro çalışmalarla tespit edilmiştir. *N. asteroides*, insan nötrofil ve monositlerinin oksitativ öldürme mekanizmasına salgıladığı katalaz ve süperoksit dismutaz gibi virulans faktörleri ile direnç gösterir. *Nocardia* cinsi bakterilere karşı asıl direnç hücresel olmaktadır. *Nocardia*'lar konakçının nötrofil

seferberliği ile inhibe edilebilir fakat tamamen yok edilemez. Hücredeki immünite makrofajların harekete geçmesiyle tetiklenir ve *Nocardia*'yı yok etmek için gerekli olan T hücre popülasyonunun artmasını sağlar. İlk inhibisyonun sonrasındaki enfeksiyonun ilerlemesi antimikrobiyal terapi veya nötrofiller tarafından engellenir (Ustaçelebi, 1999).

Nocardia, spesifik organ yönelimi göstermektedir. *Nocardia*'nın log-fazındaki hücreleri, mikolik asitten oluşan spesifik hücre duvarı içerir ve beyin gibi belli dokulardaki virulansını bu hücre duvar yapısı etkilemektedir. Farklı organlardaki nokardial metastazlarda granüllü çoklu apseler belirgindir. Plevra ve toraks duvarına yayılabilir ve ampiyem, deri altı absesi, fistül ve kemik tutulumu yaparak aktinomikoz sanılabilir. Ancak visseral yerleşimli nokardiyozda sülfür granülü bulunmaması ayırt edicidir. Misetomada ise cerahat içinde beyaz-sarımsı granüller görülmesi ile birbirinden ayırt edilebilirler (Agterof ve ark., 2007)

Nocardia cinsi üyeleri akuatik ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunduğu gibi çok farklı ekstrem ortamlarda da bulunabilmektedir (Orchard, 1981; Maldonado ve ark., 2000). Farklı *Nocardia* popülasyonları aktif çamur kirli su arıtım tesislerinde havalandırma tanklarının yüzeylerindeki köpük içerisinde ve çamur sedimentlerinin içinde bulunmuştur (Goodfellow ve ark., 1996; Pagilla ve ark., 1998; Yamamura ve ark., 2005). *N. pinensis* ile *N. takadensis* aktif çamurdan izole edilerek literatüre kazandırılmış türlerdir (Blackall ve ark., 1989; Yamamura ve ark., 2005).

Nocardia'nın doğal habitatı topraktır ve toprakta yaygın olarak bulunan cinslerdendir. Bunun dışında asidik ve bazik topraklardan da *Nocardia* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Nocardia jiangxiensis* ve *N. miyunensis* asidik topraktan, *N. neocaledoniensis* ise ultrabazik yüksek miktarda magnezyum içeren topraktan izole edilerek yeni *Nocardia* türleri olarak literatüre kazandırılmıştır (Saintpierre-Bonaccio ve ark., 2004; Cui ve ark., 2005; Yamamura ve ark., 2005). Şeker kamışı tarlası, petrol kontamine toprak, çam ağacı kökü, sahil kumu gibi çok farklı habitatlardan *Nocardia* suşları izole edilebildiği gibi dünyanın farklı lokalitelerini temsil eden topraklardan da izolasyonları yapılmıştır (Chun ve ark., 1998; Işık ve ark., 1999b; Wang ve ark., 2001a; Albuquerque de Barros ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2003; 2004; Kampfer ve ark., 2004; Li ve ark., 2004; Xu ve ark., 2005; Seo ve Lee, 2006; Kampfer ve ark., 2007;

Rodriguez-Nava ve ark., 2007; Yamamura ve ark., 2007; Sun ve ark., 2009; Kaewkla ve Franco, 2010; Sazak ve ark., 2011).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kontamine agar plağından *N. pigrifrangens* izolasyonunu gerçekleştirmiştir (Wang ve ark., 2004). *N. vacinii*, bilinen bitki patojenlerinden biridir ve yaban mersinlerinde urlara neden olmaktadır (Demaree ve Smith, 1952).

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

Kan-emici Arthropodlarla mutualistik birliktelik oluşturdıkları gibi balık patojeni olan türü de bulunmaktadır (Işık ve ark., 1999a). Su ve pis su boruları ile doğal kauçuk birleşim yerlerinde biyolojik bozunmalarda da rol aldıkları belirlenmiştir (Orchard, 1981; Maldonado ve ark., 2000). Bu habitatlardan yapılan izolatların çoğu *N. asteroides* olarak tanımlanmış, fakat, daha sonraki tanımlama metotları ile yapılan çalışmalarda bu izolatların yeniden sınıflandırılması yapılmıştır. Bu belirtilen izolatlar; *N. beijingensis* (Wang ve ark., 2001a), *N. caishijiensis* (Zhang ve ark., 2003), *N. cerradoensis* (Albuquerque de Barros ve ark., 2003), *N. cummidelens* (Maldonado ve ark., 2000), *N. soli* (Maldonado ve ark., 2000), *N. vinnacea* (Kinoshita ve ark., 2001) ve *N. xishanensis* ilk tanımlamaları *N. asteroides* olarak yapılmış organizmalara örnektir (Zhang ve ark., 2004).

Mağaralar genellikle karanlık, organik madde açısından fakir ve sıcaklık açısından nispeten stabil özellik gösteren yaşam ortamlarıdır. Bu özelleşmiş ortamlarda 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 ark., 2007; Jurado ve ark., 2008).

Patojenik suşları da kapsayan cinsin geliştirilmiş sınıflandırılması yeni *Nocardia* türlerinin gruba dahil edilmesi ile cinsin klinik açıdan günümüzdeki önemi daha da belirginleşmektedir (Yasin ve ark., 2000a, b; Gürtler ve ark., 2001; Kim ve ark., 2002;

Kageyama ve ark., 2004a, b, c, d, e; Hoshino ve ark., 2007). Nocardiosis infeksiyonlu hastalardan izole edilen *N. asiatica*, *N. higoensis* (Kageyama ve ark., 2004a, c), *N. exalbida* (Iida ve ark., 2006), *N. terpenica* (Hoshino ve ark., 2007), tükürükten izole edilen *N. elegans* (Yassin ve Brenner, 2005) ve *N. blacklockiae* (Conville ve ark., 2009), bronşiyal sekresyon ve lavajdan izole edilen *N. paucivorans* (Yassin ve ark., 2000a), *N. cyriacigeorgici* (Yassin ve ark., 2001a), *N. veterana* (Gürtler ve ark., 2001), *N. ninae* (Laurent ve ark., 2007) ve misetomalı hastanın cerehat örneklerinden izole edilen *N. mexicana* (Rodriguez-Nava ve ark., 2004), pulmoner infeksiyonlu hastadan izole edilen *N. africana* (Hamid ve ark., 2001), *N. mikamii* (Jannat-Khah ve ark., 2010) ve *N. niwae* (Moser ve ark., 2011), romatoid artritli hastadan izole edilen *N. arthridis* (Kageyama ve ark., 2004e), klinik örneklerden izole edilen *N. abscessus* (Yassin ve ark., 2000b), *N. ignorata* (Yassin ve ark., 2001b), *N. inohanensis*, *N. yamanashiensis* ve *N. niigatensis* (Kageyama ve ark., 2004b), *N. testaceus* ve *N. senatus* (Kageyama ve ark., 2004g), *N. araoensis* ve *N. pneumoniae* (Kageyama ve ark., 2004d), *N. concova* (Kageyama ve ark., 2005) ve *N. wallacei* (Conville ve ark., 2009) son dönemde izole edilen klinik örneklerdir. Aynı zamanda, invaziv hastalıklarla ilişkili olduğu belirlenen *N. pseudobrasiliensis* Ruimy ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Ruimy ve ark., 1996). Ayrıca, yapılan farklı çalışmalarda klinik örneklerin farklı habitatlardan da izolasyonunun yapılabildiği belirlenmiştir (Kageyama ve ark., 2004f).

Yeni biyoaktif bileşiklerin keşfinde aktinomiset ordosuna mensup üyeler oldukça önem taşımaktadır. Farklı ekolojik nişlerden ve denizel ortam gibi çevrelerden yapılan izolasyonlar sonrasında elde edilen yeni mikroorganizmalardan yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi oldukça yüksektir. *Nocardia* gibi patojenik mikroorganizmalar yeni biyolojik olarak aktif bileşiklerin araştırılmasında ilgi çekmektedir. Bunun nedeni ise;

i- patojenik mikroorganizmalar, diğer patojen ve patojen olmayan mikroorganizmaları inhibe edebilmek için benzersiz bir rekabet mekanizmasına sahiptir.

ii- patojenik mikroorganizmalar, biyolojik aktif metabolitlerin yeni kaynağı olarak düşünülmektedir.

iii- patojenik mikroorganizmalar farklı metabolik yollarda patojen olmayan mikroorganizmalardan biyolojik olarak daha aktif oldukları belirlenmiştir (Mikami, 2007).

2.2.3. *Gordonia* ve *Nocardia* Kemotaksonomisi

Mikolik asitin varlığının belirlenmesi için tüm organizmanın asit veya alkalik methanolizis yöntemiyle örneklenmesi, kimyasal prosedürlerin ilk basamağıdır. Yapılar içinde oldukça değişken mikolik asitler, *Corynebacteria*'da doymuş ve doymamış asitlerin nispeten basit karışımı iken, *Mycobacteria*'da yüksek oranda kompleks karışımlarla karakterize olmaları ile sınıflandırılır (Minnikin ve Goodfellow, 1980; Goodfellow ve Magee, 1998). Mikolik asitlerin nitel değerlendirmesi, Minnikin ve arkadaşlarının 1975'de ince tabaka kromatografik teknikleri tasarlayarak kullanımı ile kolay ve hızlı bir şekilde başarılabilmektedir. *Mycobacteria*'ın methanolizatları, *M. fallax* ve *M. triviale* dışındakilerde, multispot örnekler, *Tsukamurella* mycolatları iki spot verirken, *Dietzia*, *Corynebacteria*, *Gordonia*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* tek bir spot oluşturmakta ve Rf değerleri onların zincir uzunluk ve yapılarını yansıtmaktadır (Goodfellow ve ark., 1976; Minnikin ve ark., 1980; Hamid ve ark., 1993; Yassin ve ark., 1995; 1996; 1997). Plaklar metanol-su karışımı içinde yıkandığı zaman mikolik esterlerin karakteristik hareketleri ile ince tabaka kromatografisinde pozitif olarak tanımlanabilirler (Minnikin ve ark., 1975). Mikolik asit tiplerinin örnekleri, mycobakteriyal türlerin tanımlanması için kullanılabilir (Minnikin ve ark., 1984b; 1985; Goodfellow ve Magee, 1998).

Mikolik asit metil esterleri farklı yöntemlerle belirlenmekte ve mikolik asit içeren mikroorganizmaların ayırımında kullanılmaktadır. Mikobakterlerden mikolik asitler, eşit miktarda eter solusyonunun ilave edilmesi veya iki kat etanol ilavesi ile çöktilebilir. *Corynebacteria*, *Gordonia*, *Nocardia* ve *Rhodococcus*'dan mikolik asitler, benzer prosedürlerle çöktilemezler, ancak Hecht ve Causey'in (1976) belirlediği süpernantların ince tabaka kromatografi yöntemiyle mikolik asit varlığı belirlenebilir. Hamid ve arkadaşları (1993) daha güvenilir ve duyarlı çöktirme metodlarını, mikolik asit içeren diğer taksonlardan mikobakterileri ayırmak için geliştirmişlerdir. Bu metod, asetonitril-toluen (1:2 v/v) içersinde tüm mikolik asit metil esterlerinin çözülmesi esasına dayanmaktadır.

Mikolik asitlerin mevcudiyeti belirlendiği zaman, onların esterleri, pilorizis gaz kromatografisi, bozunmamış esterlerin kütle spektrometrisi, trimetisilil eter türevlerinin gaz kromatografisi ve bromofenasil türevlerinin yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC) gibi çalışmalarla izole edilebilir. Pilorisizde, mikolik asit metil

esterlerinin uzun zicirli metil ester ürünleri ve aldehidleri, gaz pilorisizin kullanımı ile direkt analiz edilebilir. *G. amarae*'nin mikolik asit esterleri C₁₆ ve C₁₈ temel bileşenlerinden oluşurken *Nocardia*'nın mikolik asit esterleri C₁₂ ve C₁₈ temel bileşenlerinden oluşmaktadır (Lechevalier ve Lechevalier, 1974; Brown-Elliott ve ark., 2006).

Mikolik asit metil esterlerinin trimetisilil ester türevlerinin kapiller gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi, *Dietzia*, *Gordonia* ve *Rhodococcus* suşları arasındaki ayırmada kullanılmaktadır.

Mikobakteriyal mikolik asitler farklı sınıflara HPLC ile ayrılabilir (Kaneda ve ark., 1995; Rhodes ve ark., 2003). Bu ayırmada, zincir uzunlukları, doymuşluk derecesi ve bu ağır asitlerde bulunan diğer fonksiyonel gruplar etkili olmaktadır. Mikolik asitlerin *p*-bromfenasil esterlerinin HPLC reverse fazı, mikolik asit içeren cinsler arasında ayırım yapmanın hızlı bir yolunu sağlayabilir.

Mikolik asit içeren aktinomisetlerin, özellikle *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia*'nın sahip olduğu mikolik asitlerin yapısı ve tüm boyutundaki farklılıklarla, hücresel yağ asitleri, menakinon ve polar lipid kompozisyonu ile tanımlanıp cins seviyesinde ayırt edilebilmektedir (Cross ve Goodfellow, 1973; Goodfellow ve Minnikin, 1977, 1981; Keddie ve Cure, 1977; Minnikin ve ark., 1978, Baba ve ark., 1997; Brown-Elliott ve ark., 2006).

Gordonia, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamuralla*, sadece onların predominant menakinonlarının özelliklerine göre birbirinden ayrılabilir. Yakın ilişkili olan *Gordonia* ve *Rhodococcus* suşlarını, *Gordonia*'nın 9 izopren üniteli dihidrogenat menakinon içermesi ve *Rhodococcus*'un 8 izopren üniteli menakinon içermesi ile birbirinden ayırt etmek mümkün olmaktadır (Collins, 1985; Collins ve ark., 1985). *Nocardia*, 8 izopren ünitenin sonunda multiprenil zincir halkalı bölge içeren pseudotetrahidrogenat menakinon ile karakterizedirler (Collins ve ark., 1987; Chun ve ark., 1997; Brown-Elliott ve ark., 2006).

Nocardiozis nedeni insan infeksiyonlarının temel ajanlarının kısmi tanımlaması, türlerin tanımlanması birkaç hafta alacağı için bu süreçte, biyokimyasal testler, degradasyon ve besinsel testler gibi birkaç farklı analiz kullanılarak başarılabilmektedir. Tanımlayıcı fenotipik testlerin benzer gücü, çevresel örneklerden nocardial türlerin

izole edilmesinde ayırt edici olarak kullanılabilir. Antibiyotik duyarlılığı ve enzim aktivitesi gibi ilave testlerde bazı *Nocardia* türlerinin ayrımında önerilmektedir (Boiron ve Provost, 1990a, b; Boiron ve ark., 1993; Brown-Elliott ve ark., 2006; Agterof ve ark., 2007).

Bleomycin (2.5 µg/ml), 5-fluororacil (20 µg/ml), β-galaktosidaz aktivitesi ve mitomycine (10 µg/ml) duyarlılık profilleri mikolik asit içeren cinslerinin farklılaşmasında faydalı olabilmektedir (Tsukamura ve ark., 1982).

2.2.4. *Gordonia* ve *Nocardia*'nın Moleküler Sistematiği

Gordonia türleri fenotipik testlerin kombinasyonları kullanılarak birbirinden ayrılabilir. *Gordonia*'nın G+C içeriği %63-69 mol'e sahiptir. *Gordonia* türlerinin 16S rRNA sekans karşılaştırmaları %94,8'den (*G. amarae* ile *G. sihwensis*), %99,9'a (*G. alkanivorans* ve *G. nitida* arasında) varan oranlarda benzerlikler elde edilmiştir. *Gordonia* türlerinin 16S rRNA sekans farklılıkları özellikle iki bölgede oldukça yüksektir, 136 ve 229 arasında nükleotit pozisyonlarında ve 996 ile 1028 nükleotitleri arasındaki bölgeler yüksek çeşitliliğe sahiptir. *G. alkanivorans* ve *G. nitida* türleri hariç tutulursa tüm *Gordonia* türlerinde bu bölgeler birbirinden oldukça farklıdır (Arenskötter ve ark., 2004).

16S rRNA sekans verileri *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* arasındaki yakın ilişkiyi doğrulamaktadır. *Rhodococcus* atasından farklılaşan *Nocardia* cinsi, bu klad içinde farklı bir filogenetik çizgi hattına sahiptir (Goodfellow ve ark., 1999). Türlerin tanımlanması için 16S rRNA geni çoğunlukla kullanılmakta ve veri bankalarından elde edilen verilerle bakteriler arasında gen dizilerinin karşılaştırılması yapılabilmektedir. 16S rRNA geni *Nocardia* türlerinde yüksek oranda korunmuş bölgelerdir ve bu geniş bölgede tüm türler için tanımlanmış tür spesifik değişken bölgeler mevcuttur. Bu şekildeki değişken bölge ilk 500 bp'lik alan içinde bulunmakta ve cinsin bazı üyelerinin moleküler tanımlanmasında partial 16S rRNA gen bölgesi oldukça güvenilir olmaktadır (Cloud ve ark., 2004; Brown-Elliott ve ark., 2006).

Moleküler parmak izleri ve dizileme işlemleri, klinik öneme sahip *Nocardia* türlerinin tanımlanmasında hızlı, duyarlı ve etkili bir yol sağlamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonlarının (PCR) kullanımı ile PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz analizleri, *Nocardia* türlerinin ayrılmasını desteklemektedir ve benzer şekilde ribotiplendirme ve PCR-rastgele amplifiye polimorfik DNA parmak izi çalışmaları da ayırım sağlamada yardımcı olmaktadır. Işık'ın gerçekleştirdiği ribotiplendirme çalışmasında toplamda 47 örnek ve 13 tip türü ile 4 putatif farklı *Nocardia* türü, 19 farklı ribotip grupta toplanmıştır. Pullsid jel elektroforezle *N.asteroides* kompleksinden yeni *Nocardia* türleri ayrılmış ve 16S rRNA gen dizilemesi de tavsiye edilmiştir (Lungu ve ark., 1994; Exmelin ve ark., 1996; Laurent ve ark., 1996; Conville ve ark., 2000; Işık ve Goodfellow, 2002; Brown-Elliott ve ark., 2006; Işık ve Goodfellow, 2010).

Genetik rekombinasyon ve plazmitler *N.asteroides*'te rapor edilmiş ve nokardiofajlar *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. carnea*, *N. otitidiscaviarum* ve *N. vaccinii* için bildirilmiştir. *Nocardiaceae* familyası üyeleri genellikle nokardiofajlara duyarlıyken, *Mycobacteriaceae* ve *Pseudonocardiaceae* familyalarında sınıflandırılan suşlar duyarlı değildir. Bunun tersine, *Amycolatopsis mediterranei*'i lize eden fajlar, *Nocardia* üyelerine karşı inaktiftir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Yakın ilişkili türlerin ayırımında son yıllarda MLST analizleri kullanılmaya başlanmış ve *Gordonia* cinsinde de bu bölgelerle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yirmibeş *Gordonia* türü ile yapılan *gyrB* gen bölgesi analizleri sonucunda türler arasında bu gen bölgesi ile iyi bir ayırım elde edildiği belirlenmiştir (Shen ve ark., 2006a). Yirmiüç *Gordonia* türünün karşılaştırılmasında partial *gyrB* ve *secA1* gen bölgeleri kullanılmıştır. Belirlenen yirmiüç *Gordonia* türünün 16S rRNA sekans analizleri ile birlikte MLST gen bölgelerinin filogenetik metotlarla analiz ederek çalışmak etkili, hızlı ve ekonomik olduğu belirlenmiştir (Kang ve ark., 2009).

Benzer şekilde, *Nocardia* cinsindeki türlerin birbirinden daha iyi ayırımını sağlamak için *rpoB*, *gyrB*, *hsp65* ve *secA1* genlerini içeren MLST gen bölgeleri çalışılmıştır (Kim ve ark., 2003; Conville ve ark., 2006; Rodriguez-Nava ve ark., 2006; Takeda ve ark., 2010). 56 *Nocardia* tip suşunun *gyrB* sekansları ile 16S rRNA gen dizilerinin sonuçları karşılaştırılarak filogenetik analizleri yapılmıştır. *Nocardia* ve yakın ilişkili olan diğer cinsleri morfolojik olarak ve biyokimyasal metotlarla birbirinden ayırmak zordur ve *gyrB* sekans verilerinin bu cinsleri tanımlamak için

faydalı laboratuvar teknikleri geliştirmede yardımcı olabileceği düşünölmektedir (Takeda ve ark., 2010).

Nocardia izolatlarının tanımlanması için partial *secA1* geni toplam 40 klinik izolat, 30 tip veya referans suş ile birlikte çalışılmış ve bu gen bölgesi *secA1* spesifik primeri kullanılarak ogaltılmıştır (Conville ve ark., 2006). Başka bir çalışmada *hsp65* gen bölgesi kullanılarak 44 test organizmasının filogenetik ilişkisi araştırılmıştır (Rodriguez-Nava ve ark., 2006).

2.3. *Nocardioideae* Familyası (Nesterenko ve ark., 1985)

2.3.1. *Kribbella*

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

Hücre duvarında LL-diaminopimelik asit içeren aktinomisetler, *Actinobacteria* sınıfı içinde beş filogenetik hatta beş familya olarak belirlenmiştir: *Streptomyces* (Waskman ve Henrici, 1943; Williams ve ark., 1989) (*Streptomycetaceae*); *Sporichthya* (Rainey ve ark., 1993) (*Sporichthyaceae*); *Nocardioideae* (Prauser, 1976) ve *Aeromicrobium* (Miller ve ark., 1991) (*Nocardioideae*); *Intrasporangium* (Kalakoutskii ve ark., 1967), *Tetrabacter* (Collins ve ark., 1989a) ve *Tetracoccus* (Prauser ve ark.,1997) (*Intrasporangiaceae*); *Propioniferax* (Yokota ve ark., 1994), *Luteococcus* (Tamura ve ark., 1994b), *Microbunatus* (Nakamura ve ark., 1995) ve *Friedmanniella*'dır (Schumann ve ark., 1997) (*Propionibacteriaceae*).

Park ve arkadaşları, *Nocardioideae fulvus* ve *Nocardioideae sp.* ATCC 39419 olarak bilinen suşları kapsayacak şekilde *Kribbella* cinsini tanımlamıştır (Park ve ark.,

1999). Bu iki yeni türü kapsayan cins 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 markörlerle ayırt edilmesi önerilmiştir. Bu türlerin birçok ortak morfolojik ve kemotaksonomik özelliği paylaşmasından dolayı taksonomik pozisyonları yeniden belirlenmiş ve *Kribbella* cinsi içerisinde tanımlamaları yapılmıştır (Sohn ve ark., 2003).

Hongia cinsinde yer alan *Hongia koreensis*'in 16S rDNA sekansları ile *Kribbella* cinsinin oluşturulmasında kullanılan iki türün sekans analizleri yapıldığında, 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 ark., 2003). Yüksek 16S rDNA sekans benzerliği gösteren bu üç türün DNA-DNA homoloji çalışmalarının yapılması sonucunda *Hongia koreensis*'in *Kribbella* cinsine yerleştirilmesi kabul görmüştür (Sohn ve ark., 2003).

17 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_{2pm}) (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 ark., 2004; Li ve ark., 2004; Li ve ark., 2006; Trujillo ve ark., 2006; Kirby ve ark., 2006; Carlsohn ve ark., 2007; Everest ve Meyers, 2008; Urzi ve ark., 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* ve *K. lupini*) olanları da bulunmaktadır. Son dönemde izole edilen iki tür de topraktan izole edilmiştir; *Kribbella aluminosa* Almanya'daki ortaçağa ait maden ocağından ve *Kribbella hippodromi* Güney Afrika'da yarış alanı toprağından izole edilmiştir (Carlsohn ve ark., 2007; Everest ve Meyers, 2008). *Kribbella catacumbae* ve *K. sancticallisti* İtalya

Roma’da bulunan St. Callistus yer altı mezarının hasar görmüş (kötüleşmiş) yüzeyinden izole edilmiştir (Urzi ve ark., 2008).

2.3.2. *Nocardioides*

Nocardioides cinsi Prauser (1976) tarafından önerilmiş Gram (+), aerobik, asit-faz özelliği göstermeyen ve mezofilik nocardioform actinomyceteslerden olup düzensiz veya çubuk veya kok benzeri elementler içinde fragmentli miselyumlarda gelişir. Cinsi temsil eden türler, *Nocardioides albus* ve *N. luteus*’dur ve her iki türün misel gelişimi oldukça iyidir (Yoon ve ark., 1998a). Primer miselyumlarda, bol miktarda dallanmış hifalar yüzeyde gelişir ve agar içine penetre olduğu gözlenir. Hava miselyumların hifaları, *Nocardia*’nın hava miselyumlarına benzer şekilde, dallanmış, seyrek ve düzensiz dallı yapıya sahiptir. Primer ve hava miselyumlarının her ikisi de kısa çubuk benzeri fragmentler içinde dağılabilir ve bunlardan bir veya iki hava hifasının birbirini sıkıştırması ile yeni miseller oluşabilir. *Nocardioides* cinsine yeni türlerin dahil edilmesi cins içersinde morfolojik heterojeniteyle sonuçlanmıştır. *Nocardioides*’e transfer edilen diğer türler arasında *Arthrobacter simplex* (O’Donnell ve ark., 1982) ve *Pimelobacter jensenii* (Suzuki ve Komagata, 1983) görülmektedir. *Pimelobacter* cinsi, Suzuki ve Komagata tarafından peptidoglikanında LL-2,6-diaminopimelik asit içeriği nedeniyle *Arthrobacter* olarak tanımlanması düşünülmüştür. Ancak, üç *Pimelobacter* türü, (*P. jensenii*, *P. tumescens* ve *P. Simplex*) taksonomik düzenlenmenin sonucunda (Collins ve Stackebrandt, 1989) *Pimelobacter jensenii*, *Nocardioides* cinsine *N. jensenii* olarak transfer edilmiştir. *P. tumescens* ise yeni bir cins olan, *Terrabacter* cinsinde yeniden düzenlenmiş ve *T. tumescens* olarak isimlendirilmiştir (Collins ve ark., 1989; Collins ve Stackebrandt, 1989; Yoon ve ark., 1998a; 2004; Yoon ve Park, 2006).

Nocardioides cinsinde yer alan türler, devamlı olarak artmıştır. *Nocardioides fastidiosa* (Collins ve Stackebrandt, 1989b) ve *N. plantarum* (Collins ve ark., 1994) yeşillik alandan izole edilmiştir. *Nocardioides fastidiosa* predominant menakinon olarak MK-9 (H₄)’e sahiptir. Bununla uyumlu olan *Nocardioides* cinsinde de MK-8 (H₄) veya MK-9 (H₄) predominant menakinon içerdiği bilinmesine rağmen Tamura ve Yokota *N. fastidiosa* türünü *Aeromicrobium* genusuna *A. fastidiosum* olarak transfer etmeyi önermiştir (Tamura ve Yokota, 1994a). Daha sonra üç *Nocardioides* türü;

N. pyridinolyticus, *N. nitrophenolicus* ve *N. aquaticus* isimlendirilmesi ile cinse ilave edilmiştir (Yoon ve ark., 1997b; 1999; Lawson ve ark., 2000).

N. flavus (Ruan ve Zhang, 1979), *N. fulvus* (Ruan ve Zhang, 1979) ve *N. thermolilacinus* (Lu ve Yan, 1983) ile yapılan çalışmalarda *N. flavus* tip suşu ilk olarak *N. luteus*'un sinonimi olarak önerilmiştir. Daha sonra, *N. flavus* ve *N. fulvus* suşlarının, *N. luteus* suşu ile 16S rDNA gen benzerliğine göre %100 benzer olduğu belirlenmiştir. *N. thermolilacinus*'un *Streptomyces* cinsi ile yakın ilişkili olduğunu 16S rDNA sekans analizleri göstermiştir (Yoon ve ark., 1998a).

Günümüzde, yayınlanmış 52 *Nocardioide*s türü vardır ki bunlar arasında farklı ekolojilerden izole edilen örnekler mevcuttur (Prauser, 1976; O'Donnell ve ark., 1982; Suzuki ve Komagata, 1983; Prauser, 1984; Collins ve Stackebrandt, 1989; Yoon ve ark., 1999; Lawson ve ark., 2000). Gelgit düzlük sedimentinden izole edilen *N. ganghwensis* (Yi ve Chun, 2004a), zooplanktonca zengin deniz suyundan izole edilen *N. salarius* (Kim ve ark., 2008), bir zooplankton olan *Daphnia cucullata*'dan izole edilen *Nocardioide*s *daphniae* (Toth ve ark., 2008), petrol sütununda yağ katmanlarının oksik zonundan izole edilen *N. pyridinolyticus* (Yoon ve ark., 1997b), yeşil alandan (hayvanların otlama alanı) izole edilen *N. plantarum* (Collins ve ark., 1994), deniz suyundan izole edilen *N. marinus* (Choi ve ark., 2007), plaj kumundan izole edilen *N. marinisabuli* (Lee ve ark., 2007), içme suyu oluşturma sisteminden izole edilen *N. hungaricus* (Toth ve ark., 2011) ve halofitik bir bitki olan *Carex scabrifolia*'dan izole edilen *N. caricicola* (Song ve ark., 2011) örnek olarak verilebilmektedir.

*Nocardioide*s suşları hücre duvar peptidoglikanında LL-2,6-diaminopimelik asit ve glisin bulundururken mikolik asit içermez. Hücrelerin ağır asit profilleri kompleks olup doymamış, düz zincirli, *iso*- ve *anteiso*- dallı ve 10-metil ağır asit içeriğine sahiptir. Temel bileşeni 14-metil pentadekanoik asit (*iso*-C_{16:0})'tir (O'Donnell ve ark., 1982; Miller ve ark., 1991; Park ve ark., 1999). Predominant isoprenoid kinonu 8 izopren üniteli MK-8(H₄); tetrahydrogenat menakinondur (O'Donnell ve ark., 1982; Yoon ve ark., 1997a; 1999). DNA'nın G+C içeriği % 67-74 mol'dür. 16S rDNA sekans temelli filogenetik analizler; *Actinopolymorpha* (Wang ve ark., 2001b), *Aeromicrobium* (Miller ve ark., 1991), *Kribbella* (Park ve ark., 1999), *Hongia* (Lee ve ark., 2000) ve *Marmoricola* (Urzi ve ark., 2000) cinslerini içeren *Nocardioideaceae* familyasında,

Nocardioides'in tip cins olduğunu göstermiştir (Stackebrandt ve ark., 1997; Yoon ve ark., 1998b). *Nocardioides* cinsinin tip türü *N. albus*'tur (Yoon ve Park, 2006).

Nocardioides cinsi üyeleri, toprak, yeşil alan, kaya petrol sütunu, endüstriyel atık su ve yüksek tuz oranına sahip göl suyu gibi farklı habitatlardan izole edilmişlerdir. Cinsin tip örneklerinden biri olan *Nocardioides albus* yaygın olarak toprakta dağılım göstermekte ve dünyanın farklı bölgelerindeki farklı topraklardan izole edilebilmektedir (Prauser, 1976). Diğer bir tip suşu ise *N. luteus* olup subtropikal bölge topraklarından izole edilmiştir (Tille ve ark., 1978; Prauser ve ark., 1984). *N. simplex* suşu da farklı bir toprak habitatı olan pirinç toprağından ve bu türün diğer suşları Japonya'daki petrolü alan toprağından izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Jensen, 1934). 2000'lere kadar olan dönemde yapılan çalışmalarda *Nocardioides* suşları farklı lokalitelerdeki örneklerine; *N. plantarum*'un yeşil alandan (herbage) izole edilmesi (Collins ve ark., 1994), pyridini degrede edebilme özelliğine sahip olan *N. pyridinoliticus*'un kaya petrol sütunlarının oksik zonundan izole edilmiş olması (Yoon ve ark., 1997b), *N. nitrophenolicus* suşunun Güney Kore'nin endüstriyel atık suyundan izole edilmesi (Yoon ve ark., 1999) ve *N. aquaticus*'un hipersalin, heliotermal ve meromiktik göl olan Ekho gölsuyundan izole edilmesi verilebilir (Lawson ve ark., 2000).

Son dönemde de farklı ekolojik çevrelerden *Nocardioides* izolasyonları gerçekleştirilmiş ve yeni türler olarak literatüre kazandırılmıştır. Gelgit düzlük sedimentinden izole edilen *N. ganghwensis* ve *N. aestuarii* (Yi ve Chun, 2004a, Yi ve Chun, 2004b), zooplanktonca zengin deniz suyundan izole edilen *N. aquiterrae* (Yoon ve ark., 2004) ile *N. salarius* (Kim ve ark., 2008), kum sedimentinden izole edilen *N. dokdonensis* (Park ve ark., 2008), deniz suyundan izole edilen *N. marinus* (Choi ve ark., 2007) ve plaj kumundan izole edilen *N. marinisabuli* (Lee ve ark., 2007), *N. furvisabuli* (Lee, 2007) ile *N. basaltis* (Kim ve ark., 2009), içme suyu oluşturma sisteminden izole edilen *N. hungaricus* (Toth ve ark., 2011) ve halofitik bir bitki olan *Carex scabrifolia*'dan izole edilen *N. caricicola* (Song ve ark., 2011) örnek olarak verilebilir. Aynı zamanda topraktan da izole edilmiş pek çok *Nocardioides* türü mevcuttur ki bunlardan bazıları; *N. koreensis*, *N. bigeumensis* ve *N. agariphilus* (Dastager ve ark., 2008), *N. insulae* (Yoon ve ark., 2007a), *N. panacihumi* (An ve ark., 2007), *N. terrigena* (Yoon ve ark., 2007b), *N. hwasunensis* (Lee ve ark., 2008),

N. hankookensis (Yoon ve ark., 2008) ve alkaline topraktan izole edilen *N. kribbesis* (Yoon ve ark., 2005b) ile *N. alkalitolerans* (Yoon ve ark., 2005a) olarak sıralanabilirler.

2.3.3. *Kribbella* ve *Nocardioides* Kemotaksonomisi

Hücre duvarında LL-diaminopimelik asit içeren nocardioform aktinomisetlerden biri olan *Kribbella* cinsi; *Actinopolymorpha*, *Aeromicrobium*, *Hongia*, *Marmoricola*, *Nocardioides*, *Pimelobacter* ve *Thermasporomyces* cinsleri ile birçok ortak morfolojik ve kemotaksonomik özelliğe sahip olup, bazı temel farklılıkları ile birbirinden ayrılmaktadır (Lee ve ark., 2000; Li ve ark., 2004). *Kribbella* cinsi; 9 izoprene üniteli heksahidrojenat menakinone ve peptit alt ünitesinin ilk pozisyonunda L-alanine bulundurması gibi bazı kemotaksonomik markörler ile *Nocardioides* cinsinden ayrıldığı belirlenmiştir. *Kribbella* türleri, peptidoglikanında LL-diaminopimelik asit (meso-A_{2pm}), anteiso ve iso dallanmış ağır asitler, polar lipidlerden difosfatidilgiserol, fosfatidilkolin, fosfatidilgiserol, fosfatidilinositol ve predominant menakinon olarak 9 (H₄) izopren birimli bir heksohidrojenat menakinon içermesi gibi belirtilen kemotaksonomik özellikleri ortaklaşa paylaşırlar (Song ve ark., 2004; Li ve ark., 2004; Li ve ark., 2006; Trujillo ve ark., 2006; Carlsohn ve ark., 2007; Everest ve Meyers, 2008; Urzi ve ark., 2008). Örneğin *K. antibiotica* suşu, hücre duvarında LL-diaminopimelik asit (meso-A_{2pm}) içerir ve tüm hücre şekeri olarak glukoz, xyloze ve riboz bulundurur. Temel menakinonu MK-9 (H₄)'dür. Fosfolipitlerden, difosfatidilgiserol, fosfatidilkolin, fosfatidilgiserol ve fosfatidilinositol içermektedir. Predominant ağır asitleri anteiso-C_{15:0}; iso-C_{15:0}'dır (Li ve ark., 2004).

Nocardioides cinsi, hücre duvar peptidoglikanındaki diaminopimelik asit tipine, menakinon profiline ve hücre ağır asit profiline göre diğer aktinomisetlerden kolaylıkla farklılaştırılabilir (Park ve ark., 1999; Wang ve ark., 2001b). *Nocardioides* cinsi, hücre duvar peptidoglikanında ayırt edici diamino asit olarak LL-2,6 diaminopimelik asite (LL-DAP) sahip olan birkaç cinsten biridir (Prauser, 1976). Bu özellik, hücre duvar peptidoglikanında glisinle birlikte bu cinsin duvar kemotip I (Lechevalier ve Lechevalier, 1970) olduğunu belirler. Bu kimyasal markör, hücre duvar peptidoglikanında diğer aminoasit tiplerine sahip olan diğer birçok aktinomiset cinsinden *Nocardioides*'i ayırt eder. En az 20 tanımlanmış cins hücre duvar

peptidoglikanında LL-DAP içerir. *Nocardioides* cinsi menakinon profiline göre bu cinslerin çoğundan ayırt edilebilir ve predominant menakinon olarak sekiz izoprenoid üniteli (MK[8H₄]) tetrahidrogenad menakinon içerir. *Marmoricola* (Urzi ve ark., 2000), *Terrabacter* (Collins ve ark., 1989) ve *Terracoccus* cinsi (Prauser ve ark., 1997) hücre duvarında LL-DAP içermesi ile ortak bir karakteristik özellik paylaşırlar (Prauser, 1997; Yoon ve ark., 2005b; Choi ve ark., 2007; Lee ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009). *Nocardioides* cinsi ise hücresel ağır asit profili ile bu cinslerden ayırt edilebilmektedir.

Nocardioides türlerinin ağır asit profilleri benzer olup, *iso*- ve *anteiso*- dallar içeren, düz zincirli, doymamış ve 10-metil ağır asit içeriğine sahiptir (O'Donnell ve ark., 1982; Miller ve ark., 1991; Park ve ark., 1999). Cinsi karakterize eden temel ağır asit, *iso*-C_{16:0} (14-metil pentadekanoik asit)'dir. Bu profil net bir şekilde cinsin, *Marmoricola*, *Terrabacter* ve *Terracoccus* cinslerinden ayrımını sağlar. *Marmoricola* profili, C_{16:0} ve C_{18:1} ağır asit profili ile karakterizedir (Urzi ve ark., 2000). *Terracoccus* profili, major ağır asit olarak *iso*-C_{15:0} ve *anteiso*-C_{15:0}'a sahiptir (Prauser, 1997). *Terrabacter* cinsi çok farklı sonuçlar göstermektedir. O'Donnell ve arkadaşları (1982), Park ve arkadaşları (1999) major ağır asit olarak C_{18:1}, C_{16:0} ve C_{15:0} sahip olduğu sonucuna varmış; Miller ve arkadaşları (1991) *anteiso*-C_{18:1}, C_{17:1} ve C_{15:0} sahip olduğunu belirlemiş; Shumann ve arkadaşları ise (1997) *iso*-C_{15:0} ve *iso*-C_{14:0} sonucunu elde etmişlerdir. Bu farklılıklar kültüre etme koşulları ve hazırlama metodundaki farklılıklar nedeniyle olabilir. *Terrabacter* ve *Terracoccus* cinsleri *Nocardioideaceae* familyasının diğer üyeleri ile filogenetik olarak farklılık göstermektedir (Prauser ve ark., 1997; Yoon ve ark., 1998b).

Nocardioides türlerinin fosfolipit profilleri çeşitliliğe sahiptir. Çalışılan tüm türler, fosfotidilgliserol, difosfotidilgliserol ve tanımlanmamış fosfolipitler içermektedir (O'Donnell ve ark., 1982; Collins ve ark., 1989; Lawson ve ark., 2000; Choi ve ark., 2007; Yoon ve ark., 2008; Toth ve ark., 2008; Kim ve ark., 2009). Fosfotidilnositol *Nocardioides* türlerinde farklı şekillerde bulunur. *Nocardioides jensenii* ve *N. aquaticus* fosfotidilnositol içerirken *N. albus* ve *N. simplex* içermez. *Nocardioides jensenii* ve *N. simplex* 2-hidroksi ağır asit içeriğine sahip fosfotidilgliserol içerir. Poliaminler, beş *Nocardioides* türünü de kapsayan LL-DAP içeriğine sahip coryne- ve nocardioform aktinomisetlerin sınıflandırılması için analiz edilmiştir (Busse ve Schumann, 1999). Çoğu *Nocardioides* suşu diamin pütresin ve kadaverinin yüksek konsantrasyonlarına

sahiptir. Bu benzerlik *Nocardioides* türlerinin filogenetik homojenitesi ile uyumludur (Yoon ve ark., 1998b). *N. plantarum* tip suşu, nispeten düşük konsantrasyonda poliamin içerdiği, predominant diaminin ise kadeverin olduğu belirlenmiştir. *Nocardioides* cinsine ait çoğu suş, kadeverin ilaveli pütresinin yüksek konsantrasyonunu içeren R ortamında geliştirildiği zaman *Aeromicrobium* cinsinden ayırt edilebilmektedir.

2.3.4. *Kribbella* ve *Nocardioides*'in Moleküler Sistematığı

DNA' nın G+C oranı %64-72 mol olarak belirlenen yayınlanmış geçerli *Kribbella* türleri arasında 16S rRNA sekans benzerliğinin %97,5 ile 99,1 arasında olduğu belirlenmiştir (Kirby ve ark., 2010). *Nocardioides* türlerinin DNA G+C içeriği %67-74 mol'dür ve bu değer, Garvie (1978) ve Marmur ve Doty (1962)'nin termal denatürasyon (T_m) metodu veya Tamaoka ve Komagata'nın HPLC metodu ile belirlenmektedir. 16S rRNA gen sekansı, tüm *Nocardioides* suşları için belirlenmiştir (Collins ve ark., 1989; Collins ve ark., 1994; Yoon ve ark., 1998b; Lawson ve ark., 2000). Nükleotit benzerlik seviyeleri, %93,5-99'dir. 16S rRNA gen sekans benzerlik temelli intraspesifik filogenetik ilişkiler *N. albus* ve *N. simplex*'de çalışılmıştır (Yoon ve ark., 1998b).

16S rRNA gen sekans temelli filogenetik analizlerde *N. jensenii* istisnai olarak tutulursa tüm *Nocardioides* türlerinin oluşturduğu kümenin farklı bir filogenetik hat oluşturduğu görülmektedir. *N. jensenii* 'nin *Marmoricola aurantiacus* ile bir filogenetik kümede şekillendiği bulunmuştur (Urzi ve ark., 2000). *Nocardioides* cinsi, *Nocardiaceae* familyasında bulunan *Actinopolymorpha* (Wang ve ark., 2001b), *Aeromicrobium* (Miller ve ark., 1991), *Hongia* (Lee ve ark., 2000), *Kribbella* (Park ve ark., 1999) ve *Marmoricola* (Urzi ve ark., 2000) cinslerinden filogenetik olarak farklı bir monofiletik hat oluşturmaktadır. *Nocardioides* türleri ve *Nocardiaceae* familyasının diğer üyeleri arasında 16S rRNA gen benzerlik seviyesi %89,9-94,3 oranındadır. Stackebrandt ve arkadaşları (1997) *Nocardiaceae* familyasının 16S rRNA gen imza nükleotitlerinin karakteristik olduğunu önermiştir, belirlenen pozisyonları, 66-103 (G-C), 328 (C), 370-391 (G-C), 407-435 (A-U), 602-636 (G-C), 658-748 (U-A), 686 (U), 780 (G), 787 (A), 819 (U), 825-875 (G-C) ve 1409-1491 (C-G) olarak vermiştir. Bununla birlikte, familya içersinde yeni önerilen bazı cinsler bu

pozisyonların birkaçında farklılığa sahiptir. *Actinopolymorpha*, *Hongia* ve *Kribbella* cinsleri, 370-391 pozisyonlarında C-G çiftine sahiptir (Wang ve ark., 2001b). *Actinopolymorpha* cinsinin 602-636 pozisyonunda ise A-T çifti yer almaktadır (Wang ve ark., 2001b).

16S-23S rRNA genlerinin internal spacer bölgeleri (ITS) ve ribonükleaz P (RNaz P) genleri, *Nocardioide*s türleri ve *Nocardioide*s cinsi ile diğer ilişkili taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek için kullanılabilir (Yoon ve ark., 1998b; 2000). *Nocardioide*s türü olarak tanımlanmış tip suşlarında, 16S-23S ITS 'lerinde boyut ve sekansında büyük oranda farklılık mevcuttur. Uzunlukları 328 bç (*N. nitrophenolicus*) 514 bp'ne (*N. albus*) kadar düzenlenmiştir. Bu tip suşları arasında ortalama nükleotit benzerliği %68,1±16.8'dir ve bu türler arasındaki ayrım için düşük bir orandır.

*Nocardioide*s türlerinin 16S rDNA baz dizileri tanımlanmış (Park ve ark., 1998) ve bu dizilemeler tür içi primerlerinin dizaynı için kullanılmıştır. Bu primerler; *N. albus* ve *N. flavus* için; 5'-ACCGGATACGACAACCGATT-3' (*E. coli*, pozisyon 174-193), *N. jensenii* için 5'-TGTAACCTCTTTCAGCGGG-3' (*E. coli*, pozisyon 427-446), *N. plantarum* için 5'-AGGCGGTTCTCTGGCAATGTT-3' (*E. coli*, pozisyon 729-749) ve *N. simplex* için 5'- ATAGGGGTCTCTTTGATACT-3' (*E. coli*, pozisyon 1016-1038) olarak belirlenmiştir. Bu durum multiplex polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) ile *Nocardioide*s türlerinin tanımlanmasını hızlandırmıştır (Yoon ve Park, 2006).

16S rRNA analizlerine alternatif olarak belirlenen yapısal (housekeeping) genler, ana metabolizmada bulunan proteinlerin kodlanmasında görevlidir ve yakın ilişkili organizmaların ayrımında kullanılabilirler (Maiden, 2006). Çalışmalarda protein kodlayan genlerin miktarı, farklı bakteriyel cinsler içerisinde filogenetik ilişkiyi belirlediği bulunmuştur. Kirby ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile *Kribbella* cinsinin filogenetik analizleri için *gyrB* kullanımının ve *gyrB*-temelli filogenetik farklılıkların *Kribbella* tip suşları arasında ayırıcı olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemiştir. *K. alba* DSM 15500^T, *K. antibiotica* DSM 15501^T ve *K. solani* CIP 108508^T gibi tip türlerinin amplifiye edilmiş *gyrB* DNA fragmentlerinden sekanslama işlemleri yapılmıştır. Tüm *Kribbella* suşları için elde edilen ortak *gyrB* sekansının maksimum uzunluğu 1108 bp'dir. *Kribbella* tip suşları için *gyrB* sekans benzerliğinin %89,48-98,22 oranında olduğu bulunmuştur (Kirby ve ark., 2010).

IFO14399^T (=DSM 17836= KCTC 9580= JCM 10339= NBRC 14399) suşu *Kribbella flavida* türünün tip suşudur ve *Kribbella* cinsinin de tip türüdür. IFO14399^T suşu Çin’de topraktan izole edilmiş ve ilk olarak ‘*Nocardioides fulvus*’ olarak Ruan ve Zang tarafından 1979’da tanımlanmıştır. İlgili suş, kemotaksonomik özellikler ve 16S rRNA sekans analizlerine göre yeni bir cins olan *Kribbella* içinde yeniden sınıflandırılmıştır (Park ve ark., 1999). Pukall ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışma, *K. flavida* IFO14399^T suşunun özelliklerini tüm genom sekansı ile açıklamayı amaçlamışlardır.

Genomun GC içeriği %70,6 olup 7.579.488 bp uzunluğundadır. 7146 tahmin edilen genin, 7086’sı protein kodlayan genler ve 60 RNAs; 143 yalancı genler (pseudogen) olarak tanımlandı. Protein kodlayan genlerin çoğunluğu (%70,7), varsayılan (hipotetical) protein olarak bilinen farzedilen (putative) fonksiyonları yapmak için görevlidir. Genomda DNA kodlayan bölge 6.893.122 bp, replikon sayısı 1, ekstrakromosomal elementi de bulunmamaktadır. Toplam 7146 gen, 60 RNA geni, 2 rRNA operonu, 7086 protein kodlayan gen ve 143 yalancı gen belirlenmiştir (Pukall ve ark., 2010).

2.4. Prokaryotik Sistematiik

Prokaryotik sistematiik, büyük ölçüde sezgisel bir bilim olarak başlamış ve ilk prokaryotik sınıflandırma kuralları morfolojik kriterlere, daha sonra fizyolojik karakterlere dayandırılarak yapılmıştır. Fakat, numerik, kimyasal, moleküler sistematiğin gelişimiyle gitgide daha objektif hale gelmiştir. Özellikle, moleküler sistematiikteki ilerlemeler, son derece korunmuş makromoleküllerin dizilenmesi, bunlar içinde en değerlisi olan 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi cins ve üzeri taksonomik seviyelerde filogeninin belirlenmesinde değerli bilgiler sağlamıştır (Woese, 1987; Rosselló-Móra ve Amann, 2001; Ludwig ve Klenk 2005). Bununla birlikte DNA:DNA homolojisi, moleküler parmak izi ve fenotipik tekniklerin birlikte kullanılmasıyla tür ve alt tür düzeyinde sınıflandırma yapmak mümkün olmuştur (Rosselló-Móra ve Amann 2001; Stackebrandt ve ark., 2002; Coenye ve ark., 2005; Tindall ve ark., 2010). Günümüzde DNA-DNA hibridizasyonu ve gen sekans ölçümü prokaryotik taksonominin temel taşlarını oluşturmaktadır (Gevers ve ark.,2005).

Prokaryotların sınıflandırılmasında, eski geleneksel metotlar ile yeni geliştirilen metodolojilerin karşılaştırılması gerekmektedir. Moleküler ve fenotipik karakterlerin tamamı kullanılarak yapılan karşılaştırma ile bir suşun bilinen bir taksona mı ait olduğu yoksa yeni bir takson mu olduğu belirlenebilmektedir (Goodfellow ve O'Donnell, 1993; Goodfellow ve Fiedler, 2010; Tindall ve ark., 2010).

Taksonomi, biyolojide bilinen tüm biyolojik varlıklar için referans bir sistemi sağlayan temel bir disiplindir. Prokaryotların taksonomisinde birbiriyle ilgili dört alt bilim dalı yer almaktadır. Bunlar;

1. Sınıflandırma: Sınıflandırma diğer bilimler için temel olup, onlara bağlıdır ve çok geniş konular içerisindeki araştırmalara bağlı bir bilimdir. Taksonomistler, farklı kaynaklardan elde edilen taksonomik verileri bütünleyerek ve sentezleyerek yorum yaptıklarında, birkaç kuralın önemini vurgulayan temel çalışma işlemleriyle, kavramların benzer olmasına gerek duyarlar. Sınıflandırma, prokaryotları ilişki esaslarına göre taksonlar içerisinde düzenleyen bir yöntemdir. Bu yöntem prokaryotlar arasındaki ilişkiyi göstermek için hazırlanmış olan sınıflandırma sistemi ya da düzenlemesidir. Ayrıca geliştirilmiş sistem ve bilgi deposu olarak hizmet görür. Sınıflandırma terimi, genellikle hem sınıflandırmanın ürettiği sistemleri hem de

sınıflandırma prosedürlerini kapsamak için kullanılır. Taksonomi ise, sınıflandırma temellerini, prensiplerini ve kurallarını içeren, sınıflandırmanın teoriksel bir çalışmasıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993). Mikroorganizmaların sınıflandırılması, onların karakteristik bilgilerini gerektirir. Biyokimyasal, kimyasal, moleküler, morfolojik ve fizyolojik karakterler taksonomik çalışma için gerekli olan verilerdir ve bu özelliklere göre düzenli bir sistemde organizasyonun gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

2. Filogenetik analiz; Filogenetik yapının tahmin edilmesinde farklı algoritmaları kullanan bilgisayar destekli istatistiksel programların kullanılmasıdır. rRNA gen dizileri ile MLSA gen bölgelerinin dizileri kullanılarak yapılan bu analizler sonucunda bir organizmanın atasal ilişkisi belirlenebilmektedir (Stackebrandt, 2006).

3. Nomenklatur (isimlendirme); tür, cins, familya gibi taksonomik kategorilerin ilişki sıralarını ele alır ve doğru yapılan bu yöntemle, organizmalar, uluslararası kabul gören isimleri ile tanınır. Bakteriyolojik kod, taksonların isimlendirme kurallarını, isimlendirme tipleri ve düzenlemelerini, takson sıralarını, önceliği ve isimlerin yayınlanmasını, yazarların alıntı ve isimlerini, taksonomik ilerlemeye göre taksonların isim değişikliklerini, epithet ve isimlerin kabul edilmesini, korunmasını ve reddedilmesini içermektedir. Bunların tümü, başlangıçta gereksiz gibi görünebilir ancak, bu kuralların, isimlendirme için düşünülen tüm muhtemel olasılıklarda yararlı olabileceği düşünülmektedir. Bu kurala göre yapılan yeni tür, cins ve diğer taksonomik seviyelerin onaylı yeni isimlerinin kabul edilmesi işleminin tümü IJSEM tarafından üstlenilmiştir (Goodfellow ve O'Donnell, 1993; Goodfellow ve Fiedler, 2010).

4. İdentifikasyon (tanımlama), geçerli ve tanımlanmış bir taksona, bilinmeyen ve yeni bir örneğin yerleştirilmesi için gerekli yöntemleri içerir ve bilinmeyen suşların uygun karakterlerinin saptanmasını ve bilinen taksonlarla karşılaştırılmasını gerektirir. Bununla birlikte, aynı taksonomik sıranın taksonlarıyla yapılan karşılaştırmalar, taksonların birbirlerinden anlamlı bir şekilde ayrıldığını gösterir ve her bir taksonomik kategori, yeni bir takson olarak tanımlanıp isimlendirilir. İdentifikasyon önemli ve uygulamalı olup mikrobiyolojinin çoğunu desteklemektedir. Ayrıca, ekolojik, endüstriyel, tıbbi ve bilimsel araştırmalarda da geçerliliğini korumakta ve uygulanmaktadır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

Prokaryotik sistematikte, mikrobiyolojinin diğer alanlarında olduğu gibi, analitiksel yaklaşımlara olan bağlılığın artmasıyla, otomasyona doğru devam eden bir akım oluşmaktadır. Bugün, modern taksonomi laboratuvarı; gaz kromatografisi, yüksek performans likid kromatografi, kütle ve ultraviyole spektrometri ve taramalı elektron mikroskopu olarak birçok kolaylığa sahiptir, ayrıca, görüntü analizleri, ışık absorpsiyonu, iletkenliğin ilkelerini kullanan enzim aktiviteleri ve farklı substratlardaki gelişimi görüntüleyen aletler içerir. Böylesi aletlerin ortak özelliği, hızlı bir şekilde veri üretmesi ve çoğu zaman yeni örnekler üzerinde çok çeşitli ölçümler yapabilmesidir. Sistematikçiler, mikroorganizmalar arasında ilişki kurmak için deneysel verileri kullanırlar. Bakteriyel sistematik; mikrobiyal kimya, moleküler biyoloji, mikrobiyal fizyoloji ve prosedürlerin ele aldığı verilerden oluşan bilgiler bütününe çalışmayı ve anlamayı gerektirmektedir (Goodfellow ve O'Donnell, 1993; Brown-Elliott ve ark., 2006).

Bakteriyel sistematik, mikroorganizmalar ile onların önemli genetik mekanizmaları arasındaki ilişkinin anlaşılması için kimya, moleküler biyoloji ve bilgisayar bilimindeki gelişmelerin tüm avantajlarına sahip taksonomistler tarafından son yıllarda görülmeye değer değişikliklere uğratılmıştır. Prokaryot çalışan taksonomistlerce, güvenilir sınıflandırmanın polifazik taksonomi olarak tanımlanan çok sayıda tekniğin kullanılması ile taksonların internal çeşitliliğinin gösterilmesine dayandığını kabul etmektedir. Fenotipik ve genomik verilerin birlikte değerlendirilmesi esasına dayanan polifazik taksonomi; nümerik taksonomi, kemotaksonomi ve moleküler taksonomiden oluşmaktadır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

2.4.1. Kemotaksonomi

Yeni yöntemlerin geliştiği ve analitik aletlerin uygulandığı alanlarda, kemotaksomi ve kemosisistematik, bakteriyel sistematikte önemli bir etkiye sahiptir. Kemosisistematik, bakteri türlerini belirlemek, sınıflandırmak ve tanımlamak için hücre parçalarından veya tüm organizmayı kullanarak bilgi elde eden bir bilim dalıdır. Kemosisistematik; aminoasitler, lipitler, proteinler ve şekerler gibi özel kimyasalların dağılımıyla ilgilenmekte ve sınıflandırma ile tanımlama için uygun verilerin elde edilmesini sağlamaktadır.

Bakteriyel sistematikte kullanılan birçok kimyasal teknik, elektroforez ve kromatografi gibi duyarlı, güvenilir ve hızlı analitik yöntemler, sadece, kimyacıların ve biyokimyacıların çalışmaları için yan ürün olarak kullanılmaktadır. Kimyasal prosedürlerin artış gösteren gelişimi, kimyasal markörlerin ve tüm- organizma parmakizlerinin belirlenmesini etkilemiştir. Yetiştirme şartlarındaki değişimden kaynaklanmayan, genetik farklılıkların bir ifadesi olarak görülen kimyasal kompozisyondaki değişim önemli görülmektedir. Genellikle, karşılaştırmalı kemotaksonomik çalışmalarda kültürlerin dikkatlice standardize edilmiş şartlarda geliştirilmesi ve yine kimyasal verilerin miktar analizleriyle ilgili çalışmalarda standardizasyonun önemi vurgulanmaktadır (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Bakteriyel sistematikteki kimyasal çalışmaların önemi, kimyasal kompozisyon bakımından çeşitlilik gösteren Actinomycetes cinslerinin tür sayılarıyla gösterilebilmektedir. Lipit, aminoasit ve duvar şekeri analizleri, Actinomycetes taksonomisini yeniden değerlendirilmesine yol açmıştır. Son zamanlarda yağ asitlerinden, menakinone ve polar lipid analizlerinden elde edilen kimyasal markör, diagnostik özellikler için kullanılmaktadır.

Kimyasal karakterizasyonda, peptidoglikan yapısı, solunum lipokinonları, lipidlerin hidrofobik zincirleri, yağ asiti ve türevleri, polar lipidler, diğer ekstrasellüler bileşikler (lipopolisakkaritler ve mikolik asitler vb), hücrenin lipofilik olmayan yapıları (poliaminler vb) ve Gram(+) bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasının aminoasit kompozisyonu gibi çeşitli yapısal elementler kullanılmaktadır (Tindall ve ark., 2010).

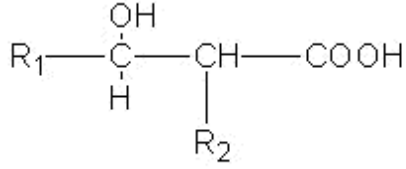
2.4.1.1. Mikolik Asit

2.4.1.2. Mikolik asit metil esterleri

Mikolik asitler 60-90 C atomlu dallanmış ağır asitlerin hidroksilatlarıdır. Aynı zamanda mikolik asitler, metoksi, keto, epoksi ester grupları ve siklopropan halkaları gibi farklı fonksiyonel gruplar içerir (Şekil 2.1.).

Mikolik asitler, Stodola tarafından, 1938'de sirözlü bir hastadan izole edilen *Mycobacterium tuberculosis*'den izole edilmiş ve isimlendirilmiştir. Eterde çözülebilen yüksek moleküler ağırlıkta hidroksi asit içeren bu moleküle mikolik asit adı verilmiştir (Barry ve ark., 1998).

Mikolik asitlerin yapısal özellikleri ilk defa 1950 yılında Asselineau J. tarafından ayrıntılı şekilde tanımlanarak formülize edilmiştir (Nishiuchi ve ark., 1999) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Mikolik asitin genel yapısı

R₁ değişken grup; hidroksi, metoksi, keto veya karboksil grupları gibi diğer oksijenik grupları yapısında bulundurmaktadır. Mikolik asitler basit bileşikler olarak belirlenmiş olsalar da, Actinomyceteslerden *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* gibi cinslerin taksonomik ayrımında kullanılan temel hücre duvar bileşenidir (Ochi, 1995; Baba ve ark., 1997; Kageyama ve ark., 2006).

Mikolik asitler, mikobakteriyal hücre duvarına kovalent bağlarla veya arabino-galaktan polimerleri ile bağlanan yapılardır. Mikolik asitler hücre duvarının dayanıklılığını sağlamaya, hidrofobik antibiyotiklere ve kimyasal ajanlara karşı hücrenin korunmasına ve daha dirençli hale gelmesine yardımcı olan moleküllerdir.

Mikolik asitlerin yapısı α-alkil ve β hidroksi uzun dallanmış yağ asit zincirlerinden oluşmaktadır (Tomiyasu, 1982). Mikolik asit, yüksek moleküler ağırlıklı, uzun 2 alkil-3-hidroksi dallanmış zincirli yağ asitleridir (Chun ve Goodfellow 1995). Her bir cinsten mikolik asit zincir uzunluğu farklıdır. Mikolik asitlerin karbon zincir uzunluğu 22'den 90'a kadar geniş oranda değişiklik gösterir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Mikolik asit içerikli, kemotip IV hücre duvarına sahip aktinomisetler mycolata adı verilen farklı bir filogenetik grup oluştururlar. Mikolik asitler *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamurella* gibi cinslerin bir çok türünde tanımlayıcı taksonomik karakterlerden biri olmuştur (Barry ve ark., 1998). Mikolik asitler Actinomycetales ordosuna ait bakteriler içinde mycolata grubunun en karakteristik hücre duvar bileşimidir ve bu bileşiğin varlığı ile diğer gruplardan kolaylıkla ayrılabilir (Tomiyasu, 1982).

Mikolik asitlerin niteliksel değeriendirilmesi Minnikin'nin ince tabaka kromatografi tekniğı kullanılmasıyla daha kolay ve daha çabuk bir şekilde yapılmaktadır (Minnikin ve ark., 1980). *Mycobacterium* cinslerinde mikolik asit esterleri birden çok spot oluştururken, *Tsukamurella* cinsinde 2 spot, *Dietzia*, *Cornebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* ve *Nocardia* cinslerinde tek spot oluşumu görülür. Rf değerieleri sayesinde zincir uzunluğu ve yapısı değeriendirilebilir. Mikolik asit esterleri sabit hareketsiz özellikleri sayesinde ince tabaka kromatografi yöntemi kullanılarak teşhis edilebilirler. Mikolik asit metil esterlerinin varlığı, pirolizis gaz kromatografisi, kütle spektrometri, gaz kromatografisi ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemlerle belirlenmektedir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

2.4.1.3. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımın bileşenlerini, bunlara seçimsel ilgi gösteren iki ya da daha çok evreli sistemler arasındaki farklı göçlere bakarak tanımak, gerektiğinde niceliklerini belirlemek amacıyla yapılan ve ayırma işlemine dayanan analitik yöntemdir. Kromatografi, bir karışımın gözenekli bir ortamda, hareketli bir çözücü etkisiyle, karışım bileşenlerinin farklı hareketleri sonucu birbirinden ayrılması olgusuna dayanır. Hareket eden faza hareketli faz, bahsedilen gözenekli ortama ise adsorban veya sabit faz denir (Clark, 2007).

Kromatografi, Gordon, Martin ve Synge'in 1940 ve 1950'lerde yaptığı çalışmalarla daha da modernleşmiştir. Kromatografi de adsorpsiyon, dağılma ve değıştirme kuvvetleri rol oynamaktadır. Bu kuvvetlere göre de farklı kromatografik yöntemler farklı gruplarda toplanırlar (Gordon ve ark., 1943).

Kromatografik teknikler hızlı bir şekilde gelişmiş ve kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi ve yüksek performanslı likit kromatografisinin temel teknik ve prensipleri de belirlenmiştir (Burtler, 2005).

2.4.1.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

1950'lerin sonlarına doğru İnce Tabaka Kromatografisi Thin Layer Chromatograph-TLC) basit kalitatif tanımlamalar için hızlı bir teknik olarak

laboratuvarlar da kullanılmaya başlandı. 1960'ların ortalarına doğru, TLC kantitatif analiz metodu olarak kabul gördü. TLC'de durağan faz olarak ince bir "Silika jel", "Alüminyum", "Selüloz" veya "Poliamid" tabakasıyla kaplanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Hareketli faz ise çok çeşitli organik çözücü veya çözücü karışımları olabilmektedir. Non-polar çözücü veya çözücü karışımlarında; hekzan-petrol eteri, benzen-toluen, dietileter, kloroform-diklorometan, etil asetat, butanon, aseton ile polar çözücü olarak asitler kullanılmaktadır (Cardinali ve ark., 1995; Burtler, 2005; Clark, 2007).

2.4.2. Moleküler Sistematiği

Mikrobiyal sistematiği tarihi dönüm noktası olarak görülmüş en değerli gelişim, milyonlarca yıl önce ortak bir atadan ayrılma sonucunda meydana gelen uygun genomlarında kaydedilir bir farklılığa sahip ilişkili mikroorganizmaların belirlenmesi olmuştur. Farklı mikroorganizmalardaki aynı yapıya uygun nükleotit arasındaki farklılıkların ölçüsü ve doğası ilk kez mikrobiyal sistematiğe yani sınıflandırma ve filogeni arasındaki ilişkiye keskin bir görüş sağlamıştır. Nükleik asitlerin korunmuş bölgeleri; ökaryotlarla karşılaştırıldığında prokaryotik çeşitliliğin çok daha fazla olduğunu göstermiştir.

Tüm dünyada canlıları oluşturan genetik yapının çözülmesi, ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, belirlenen hedefe ulaşmayı kolaylaştıracak, hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Basit gibi görünmekle birlikte, geliştirilen bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)'dur.

PCR temelli moleküler yöntemlerden biri olan 16S rRNA gen bölgesi filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve bakteriyel tanımlama çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Genetik yapıyı açıklamak amacıyla kullanılan farklı moleküler teknikler, nükleik asit hibridizasyonu, nükleik asit dizilenmesi (Sequencing), nükleik asit problemleri ve DNA parmakizi (fingerprinting) RAPD analizleri ile PCR ve

PCR-RFLP moleküler analizleri ve ribozomal tiplendirme teknikleridir (Goodfellow ve O'Donnell, 1993; Brown-Elliott ve ark., 2006).

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 ark., 2002; Coenye ve ark., 2005).

Ad Hoc komitesi bakteriyal türlerin, DDH yerine geçebilecek yeni moleküler metotlarla tanımlanabileceğini de önermektedir (Stackebrandt ve ark., 2002). AFLP ve PCR-RFLP, DNA dizileme ve yapısal (housekeeping) genlerin dizilemesi gibi moleküler tekniklerle bakterilerin taksonomik pozisyonu belirlenebilmektedir. En ideali, herhangi yeni tiplendirme sisteminin, güvenilir ve pratik bir şekilde verileri oluşturmayı sağlamasıdır. Birçok mikrobiyal taksonomist, sekans temelli metotların, DDH göre daha ucuz olması, yayınlanmış verilerin depolanabilir olması ve çoğu laboratuarda uygulanabilir olması gibi daha fazla avantaja sahip en makul alternatif metot olabileceği kanısındadır (Stackebrandt ve ark., 2002).

Prokaryotik taksonların tanımlanmasında kullanılan yöntemler Tindall ve arkadaşları tarafından ayrıntılı olarak ele alınmış, genomik metodların güçlü ve zayıf yönleri Schleifer tarafından aydınlatılmıştır (Tindall ve ark., 2010; Schleifer, 2010).

Moleküler sistematikteki önemli gelişmeler genom organizasyonu, genom replikasyonu ve değiştirilen genom kompozisyonu olarak bilinen birçok mekanizmayla düzenlenebilmektedir. Son yıllarda dizileme teknolojisinde kaydedilen gelişmeler artık prokaryotik organizmaların tüm genomunun analizine olanak sağlamıştır. *Haemophilus influenzae* ve *Mycoplasma genitalium* ile 1995 yılında başlayan genom analizleri 2009 yılında 1000'i bulmuştur (Fleischmann ve ark., 1995; Fraser ve ark., 1995; Lagesen ve ark., 2010). Sekanslaması tamamlanan bu 1000 prokaryotik organizmanın %7'si Archeae geri kalan %93'lük kısmı Bacteria domainlerine aittir (Lagesen ve ark., 2010).

2.4.2.1. 16S rRNA Gen Bölgesi

16S rRNA gen bölgesi filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve bakteriyal tanımlama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. 16S rRNA gen bölgesi RNA'nın bir alt birimi olup toplam uzunluğu yaklaşık 1540 nükleotittir. Yüksek oranda korunmuş bölgeleri içeren 16S rRNA gen bölgesi tüm türlerin tanımlanmasında oldukça faydalıdır ve bu bölgeler tür için spesifiktir (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 ark., 2010).

16S rRNA dizisinde, diğer tüm organizmalardan %3'den fazla farklılık gösteren bir prokaryotun yeni bir tür olduğu düşünülebilir. Bunu destekleyen en önemli veri, 16S rRNA dizisinde %97'den az benzerlik gösteren iki prokaryotun genomik DNA'larının genelde %70'den az hibridize olduğudur. 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 ark., 2005, Stackebrandt, 2006; Goodfellow ve Fiedler, 2010). DNA eşleşme çalışmalarının sonuçları ile ribozomal RNA dizi analizleri ve numerik taksonomi gibi diğer teknik uygulamalarından elde edilen veriler arasında uyum olması gerekmektedir. 16S rRNA dizisi, cinsler ve doğru kararlaştırılmış türler arasında ilişki kurmak ve onları birbirlerinden ayırt etmek için kullanılmaktadır, fakat, son dönemde yapılan çalışmalar sadece 16S rRNA gen bölgesinin yeni bir türü belirlemek için yeterli olmadığını göstermiştir (Kirby ve ark., 2010).

16S rRNA gen sekansları, fizyolojik testler ve DNA-DNA hibridizasyon (DDH) analizleri, cins içersindeki türlerin filogenetik olarak sınıflandırılmasında kullanılan başlıca metodlardır. 16S rRNA gen analizleri ve DNA-DNA hibridizasyonu, modern bakteriyal taksonominin 'altın standardı' olmalarına rağmen dezavantajlara da sahiptir. 16S rRNA molekülünün yüksek oranda korunmuş doğası (yapısı) bakteriyal izolatların cins seviyesinde ve cins içindeki türlerin %98,7 sekans benzerliğinin üzerindeki

değerlerle ayırımında oldukça faydalı olmasına rağmen, 16S rRNA gen sekans karşılaştırmaları çok yakın ilişkili türler arasında ayırt edicilik sağlamayabilir. Ayrıca, %99 büyük sekans benzerlik seviyesinde, sekans hatalarının olma ihtimali suşların uzaklık ilişkilerini belirlemede yeterli duyarlılık göstermeyebilir. DDH çalışmaları yakın ilişkili türler arasındaki akrabalığı belirlemeye izin verirken, uzak akraba türler arasındaki ilişkiyi belirlemede kullanılamaktadır. 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 ark., 2010).

2.4.2.2. Multilokus Sekans Analizi (MLSA)

Mikroorganizmalar arasında filogenetik ilişkiler korunmuş makro moleküllerin sekanslarının karşılaştırılmasıyla elde edilmektedir. Ribozomal RNA genleri, universal ve fonksiyonel olarak yüksek derecede korunmuş yapıya ve daha fazla çeşitlilik gösteren alanlara sahip olduğu için filogenetik çalışmalarda en iyi hedeflerden biridir (Woese, 1987). Modern mikrobiyal taksonominin ana çatısını oluşturan 16S ve 23S rRNA gen dizilerinin dışında diğer protein kodlayan gen bölgelerinin de çalışılarak oluşturulan verilerin analizi önerilmektedir. Bu gen bölgeleri; *rpoB*, *recA*, *rpoD* ve *gyrB* genlerini içeren multilokus gen bölgeleri olup bakteriyal moleküler sistematik çalışmalarda kullanılmaktadır (Coenye ve LiPuma, 2002).

Bir multilokus gen bölgesi çalışmasında geliştirilen oligonükleotit problemlerinin 16S rRNA problemlerinden daha yüksek spesifikiteye sahip olması istenmektedir (Yamato ve Harayama, 1995). Bu DNA problemlerinde arzu edilen özellikler;

- i-plazmid DNA gibi horizontal geçişi olmamalı,
- ii- moleküler filogeni oranları 16S rRNA'dan yüksek olmalı,
- iii- bakteri türleri arasında universal olarak dağılım göstermelidir.

Örneğin, DNA giraz'ın β alt ünitesini kodlayan gen bölgesi (Topoizomeraz tip II) yüksek spesifik problemlerin hedefi olarak seçilebilmektedir. Ayrıca, DNA replikasyonu için gerekli olan enzim, bakteriler arasında universal olarak dağılım göstermektedir (Yamato ve Harayama, 1995).

Yapısal (housekeeping) genler, ana metabolizmada bulunan proteinleri kodlayan bölgeler olup 16S rRNA'dan daha hızlı evrimleşmiş olması nedeniyle yakın ilişkili

organizmaları ayırt etmede kullanılabilir (Maiden, 2006; Harayama ve Kasai, 2006). Potansiyel olarak, başlıca protein kodlayan genler, belirtilen koşullar yerine gelirse filogenetik analizlerde kullanılabilir:

1- protein kodlayan gen bölgesi horizontal gen transferinden (HGT) etkilenmediyse

2- tüm bakterilerde mevcutsa

3- tercihen her genomda tek kopya halinde bulunuyorsa

4- en az iki bölgesi uygun PCR primerlerinin dizilenmesine izin verecek düzeyde yüksek oranda korunmuşsa, bu bölgeler analiz için uygundur (Harayama ve Kasai, 2006).

Yapılan araştırmalarla, farklı bakteriyel cinslerde filogenetik ilişkileri protein kodlayan genlerle anlamamanın mümkün olduğu bulunmuştur. Bunlardan, *Pseudomonas* cinsinde *rpoD* geni, *Staphylococcus* cinsinde *hsp60* ve *Actinobacteria* sınıfı içinde *Frankia* suşlarının sınıflandırılmasında nitrogenaz demir protein geni *nifH*, *Mycobacterium* cinsinde *recA* rekombinaz tamir geni, *Microbacterium* ve *Aureobacterium* cinslerinde *gyrB*, *rpoB*, *recA* ve *ppk* genleri filogenetik analizler için araştırılmış protein kodlayan genlerdir (Goh ve ark., 1996; Blackwood ve ark., 2000; Yamamoto ve ark., 2000; Chan ve ark., 2001; Richert ve ark., 2005; Richert ve ark., 2007; Gtari ve ark., 2007). Bu metotların yaygın olarak uygulanmasındaki en büyük problem, gen bölgesinin seçimi ve primer dizilemesi olacaktır. Protein kodlayan genlerin bir bölümünü çoğaltmak için Santos ve Ochman'ın önerdiği metot kullanılarak universal primer dizilemesi gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, primerlerin ortalama başarı oranı sadece % 60'dır ve bu primerle *gyrB*, *lepA* ve *recA* genlerinde daha başarılı olunmuştur (Kirby ve ark., 2010).

2.4.2.2. *gyrB* Gen Bölgesi

gyrB geni, DNA girazın β -altünitesini kodlayan gen olup DNA molekülünde negatif süper sarılı tip II DNA topoizomerazdır. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında universaldir. Moleküler biyolojideki gelişmeler sonucunda, birçok mikrobiyal taksonomist, sekans temelli metotların, türleri belirlemede kullanılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarının yerini almak için geliştirilebileceğine de inanmaktadır.

Filogenetik çalışmalarda kullanılan *gyrB* geninin potansiyeli, *Gordonia*, *Micromonospora* ve *Streptomyces* gibi aktinobakteriyal cinsler içinde araştırılmıştır (Kirby ve ark., 2010).

Actinobacteria sınıfı içinde familya ve cins-spesifik *gyrB* primerleri dizayn etmek gerekecektir. Kirby ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Kribbella* cinsinde *gyrB* geninin 5' ucunun 3' ucundan daha değişken olduğu bulunmuştur ve bu bölge PCR primerlerinin dizaynında kullanılabilecek büyük oranda korunmuş alanlar içerdiği belirlenmiştir. Richert ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada *Microbacterium* cinsinde *gyrB* geninin 5' ucunun yüksek değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir.

Tek gen üzerinden yapılan filogenetik analizlerin başlıca dezavantajı çeşitli mutasyon oranları ve horizontal gen transferinden (HGT) etkilenmeleridir (Coenye ve ark., 2005). Bu yüzden, tiplendirme şemalarında multiple lokuslar karşılaştırılarak kullanılmalı ve böylece HGT'nin etkisi göz ardı edilmiş olacaktır. Filogenetik çalışmalar için *gyrB* geninin seçilmesinin nedenlerinden biri de, transkripsiyon ve translasyon genlerinde nadir olarak HGT meydana gelirken, bu gen bölgesinde HGT meydana gelmediği varsayılmaktadır (Harayama ve Kasai, 2006).

gyrB geni, inter ve intra tür ilişkilerini belirlemek amacıyla da birçok Gram (+) ve Gram (–) bakteri gruplarında çalışılmıştır. *Pseudomonas putida* suşları üzerine 1995 ve 1998'de Yamamoto ve Harayama'nın yapmış olduğu çalışmalarında yakın ilişkili olan bu test organizmalarının *gyrB* gen bölgesinin kullanımı ile ayırt edilebildiği bildirilmiştir.

Guo ve arkadaşları (2008) çalışmalarında *Streptomyces griseus*'un 16S rRNA gen kladına ait 55 suş kullanmış ve multilokus gen bölgelerinden altı gen bölgesi seçilerek; *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* ve 16S rRNA filogenetik karşılaştırmaları yapılmıştır (Guo ve ark., 2008).

Sekonder metabolit üreten türleri de bünyesinde bulunduran *Roseobacter* kladının *Phaeobacter* ve *Ruegeria* türlerinin ayrımında 16S rRNA gen bölgesiyle birlikte *gyrB* gen bölgesinin analizleri yapılmış ve 16S rRNA sekansından elde edilen kümeleri *gyrB* sekansının desteklediği ve *gyrB* gen bölgesinin bu cinslerin ayrımında kullanılabileceği belirlenmiştir (Porsby ve ark., 2008).

Tüm bu çalışmalara ilave olarak birçok çalışma daha örnek olarak verilebilir. *Ensifer* cinsinin multisekans analizlerinde *gyrB* ve *rpoB* gen bölgesi ile birlikte toplam

10 gen bölgesinin analizi yapılmıştır (Martens ve ark., 2008). *Listeria monocytogenes*'in klinik ve çevresel izolatları ile yapılan çalışmada, gölün farklı lokalitelerinden izole edilen *Micromonospora* suşlarına, *Streptomyces albidoflavus* kladi üyelerinin ve helezon şeklindeki *Streptomyces* türlerinin yeniden sınıflandırılmasında *gyrB* gen bölgesi kullanılmıştır (Hatano ve ark., 2003; Revazishvili ve ark., 2004; de Menezes ve ark., 2008; Rong ve ark., 2009). *Gordonia*, *Microbacterium* ve yavaş gelişen *Mycobacterium* türleri gibi bazı aktinobakteriyal cinslerde bu gen bölgesi araştırılmıştır (Kasai ve ark., 2000; Richert ve ark., 2005; Shen ve ark., 2006a; Richert ve ark., 2007).

2.4.2.3. *rpoB* Gen Bölgesi

MLST gen bölgelerinden biri olan *rpoB* gen bölgesi, bakterilerde DNA bağımlı RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan bölgedir ve rifampisin gibi antimikrobiyal ilaçlar için önemli bir hedeftir. *E. coli*'deki rifampisin direnci, *rpoB* bölgesindeki dört iyi bilinen bölgedeki nokta mutasyonları ile gösterilmiştir (Hetherington ve ark., 1995). Farklı organizmalarla yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda RNA polimeraz β alt ünitesinin bakteriyal sekonder metabolizmadaki yapı ve fonksiyonu arasında bir ilişkisi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fines ve ark., 2001; Hu ve ark., 2002; Asoh ve ark., 2003; Ishikawa ve ar., 2006; Tala ve ark., 2009).

DNA bağımlı RNA polimeraz (RNAP), iki alfa alt ünitesi (*rpoA* geni tarafından kodlanan), bir beta alt ünitesi (*rpoB*) ve β' alt ünitesini (*rpoC*) içeren çok üniteli bir enzimdir. β ve β' alt ünitesinin boyutu filogenetik ilişkinin belirlenmesinde ve filogenetik analizlerde güçlü bir moleküler kronometre olabileceği tespit edilmiştir. RNA polimeraz β alt ünitesini kodlayan gen bölgesi, *rpIL*, *rpoB* ve *rpoC* operonları ile kontrol edilmektedir (Veronique ve ark., 2003). RNAP, DNA'nın transkripsiyonunda önemli bir rol oynamaktadır ve bu gen bölgesi tek kopya halinde bulunduğu için filogenetik analizlerde kargaşaya neden olmamaktadır (Morse ve ark., 2002; Kim ve ark., 2003; Veronique ve ark., 2003; Adékambi ve ark., 2006). *Actinomycete* cinslerinin farklılaştırılmasında, *rpoB* gen bölgesi 16S rRNA gen bölgesinden farklı olarak iki önemli avantaja sahiptir. *rpoB* gen bölgesinin ilk avantajı, tek kopya halinde olmasından dolayı direkt dizileme metotları bu hedef geni kullandığı zaman farklı çoklu gen dizileri meydana getirmemesi ve ikili sonuçlar oluşturmamasıdır. İkinci olarak da

rpoB fonksiyonel bir gen olup DNA dizi verilerine ek olarak aminoasit dizi verilerinin de cins ayrımı için kullanılabilir olmasıdır (Kim ve ark., 2003).

Ellialtı *Corynebacterium* suşunun tanımlanması ve farklılıklarının belirlenmesi amacıyla *rpoB* gen bölgesi çalışılmış ve türler arasındaki benzerlik oranının 16S rRNA gen bölgesinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni ise; bu gen bölgesinin 16S rRNA gen bölgesinden daha polimorfik ve 16S rRNA dizi analizleri ile iyi ayrımı sağlanamayan türler için yüksek polimorfizmin özellikle gerekliliği belirlenmiştir (Khamis ve ark., 2004).

Klinik öneme sahip olan mikobakterilerin hızlı tanımlanması ve yakın akraba türleri daha iyi birbirinden ayırt edebilmek amacıyla farklı MLST gen bölgeleri çalışılmış ve bu bölgeler arasında *rpoB* bölgesi özellikle antibiyotik direnç bölgesi olduğu için klinik suşların ayrımında önem kazanmıştır. Multigen çalışmalarına bir model olarak sunulan Devulder ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 97 suş kullanılarak 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* ve *sod* genleri çoğaltılmış ve dizileri elde edilmiştir. Bu dizilerin karşılaştırması filogenetik analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir (Devulder ve ark., 2005).

Hızlı gelişen mikobakterilerin (HGM) doğru tanımlanması için *rpoB* gen bölgesinin PCR amplifikasyonu ile partial sekansı uygun bir moleküler teknik olarak belirlenmiştir (Kim ve ark., 1999). Adékambi ve arkadaşları 2006'da 52 hastadan elde ettikleri 59 izolata *rpoB* gen bölgesi analizleri uygulamış ve bu izolatlardan üç tanesinde orijinal *rpoB* gen sekansının mevcut olduğu belirlenerek klinik HGM'lere protip suş olarak kullanılması amaçlanmıştır. Farklı mikobakterilerle yapılan çalışmalarda da yakın akraba türlerin ayrımında *rpoB* gen bölgesi kullanılmıştır (Hetherington ve ark., 1995; Lee ve ark., 2003; Salah ve ark., 2008).

2.4.3. Dizi Verisinin Analizi ve Filogeni

Türlerin filogenetik tarihini inceleyen bilim dalı filogeni olarak adlandırılır ve bir filogenetik ağaç bu tarihin grafik bir özetidir. Filogenetik analiz, yaygın bir ata soyundan gelen türlerin soyları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi süreci anlamındadır. Daha pratik bir anlamda ise, bu analiz mevcut organizmaların yakın ilişkilerini belirlemek ve organizmaları filogenetik soylar kapsamında sistematik

konumları için kullanılır. Moleküler filogenetik analiz ise hızlı DNA dizilenmesinin oluşumu ile daha yaygın hale gelmiştir. Analizler sonucu oluşturulan filogenetik ağaçlar hangi organizmaların daha yakın ilişkili, hangilerinin ise uzak olduklarını belgelemektedir (Leep ve Relman, 2006).

Nükleotit dizileri ya da aminoasit dizileri, filogenetik analizleri için en çok kullanılan moleküllerdir. Filogenetikte, nükleik asitlerin kullanımı, nükleik asit dizilenmesinin hızlı, ucuz ve güçlü olması avantajına sahiptir. Bunun yanında, Ribozomal Veritabanı Projesi gibi büyük veritabanlarının mevcut olması, filogenetik analizini kolaylaştırmaktadır (Leep ve Relman, 2006; Stackebrandt, 2006).

Bir nükleik asit ya da aminoasit dizisi elde edildikten sonra, bir filogenin ortaya çıkarılmasından sonraki aşama, analiz için görelî bir sistem sağlayan benzer dizilerin tanımlanmasıdır. Örneğin Ribozomal Veritabanı Projesi gibi bazı veritabanları verisetlerinin oluşturulması ve başlangıç filogenetik analizin yapılması için web tabanlı destek sağlayabilir. Bunun yanı sıra Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST) gibi otomatik araştırma ve karşılaştırma aracı da bulunmaktadır. Bu araçtan yararlanılarak çalışmada kullanılan dizi ile en yakın ilişkili diziler belirlenir (Leep ve Relman, 2006).

Filogenetik ağacı oluşturmak için birçok algoritma kullanılmaktadır. Tindall ve arkadaşlarının 2010'da gerçekleştirdikleri çalışmada da önerildiği gibi organizmalar arasındaki genetik mesafeyi hesaplamak için bakteri sistematğinde en sık kullanılan ve kullanımı tavsiye edilen parametre, 1969 yılında Jukes ve Cantor tarafından önerilen ve kendi isimleriyle anılan parametredir. Jukes-Cantor modelinde tüm nükleotit pozisyonlarında bağımsız değişimin olduğu ve bu sebeple diğer üç bazın birbirine dönüşümünde eşit olasılık olduğu kabul edilmektedir. Yani, değişim oranlarının tüm konumlar boyunca eşit olduğunu, değişimlerin rastgele ve nükleotit sıklığının 0,25 olduğunu, dizi içinde ekleme ya da çıkarma meydana gelmediğini, her bir değişimin başlangıç nükleotitinden bağımsız olduğunu varsaymaktadır (Leep ve Relman, 2006; Stackebrandt, 2006).

Bir uzaklık matrisinin oluşturulmasını takiben ikinci aşama, bu filogenetik uzaklıkların ilişkilerini anlamlı bir gösterime dönüştürülmesidir. Kümeleme analizine benzer, ultrametrik olmayan, toplumsal ağaç oluşturmak için farklı bir algoritma kümesi olan NJ (Neighbor-joining) algoritması en popüler olanıdır. Kümeleme analizinde

olduğu gibi bu algoritma bir uzaklık matrisi ile başlar fakat ikinci oran düzeltilmiş matrisin oluşturulması ile farklılık gösterir (Leep ve Relman, 2006). NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) yöntemi genetik mesafe (distance) matrisinden faydalanarak kümelemeyi gerçekleştiren bir yöntemdir. Filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının farklı olabileceğini kabul eder. Bu sebeple OTU'lar arasındaki genetik mesafenin hesaplanmasına olanak sağlar (Saitou ve Nei, 1987).

UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages); Aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıklandırılmamış eş karşılaştırma yöntemi gibi kümeleme analizleri filogenlerin yeniden oluşturulması için en temel yaklaşımlardan biridir. Genetik benzerliği en yakın olan iki OTU'dan başlayıp adım adım en uzak genetik benzerlik gösterene kadar tüm üniteleri bu bileşik topolojiye dahil etmektedir. Yöntem filogenetik ağacın dalları boyunca mutasyon hızının sabit olduğunu kabul eder ve dalların köklerini esas alarak kümeleme gerçekleştirir (Stackebrandt, 2006).

Uzaklık yöntemlerinde en çok kullanılan Maksimum-parsimoni (tutumluluk) ve Maksimum Likelihood (en çok olabilirlik) metodlarıdır. Maksimum-parsimoni 'en basit çözüm en doğru olandır' prensibine dayanır. Bu prensip, moleküler veri cinsinden gözlenen dizi verisini açıklamak için kullanılır. Maksimum-parsimoni (tutumluluk) metodu muhtemel ağaç topolojileri içinde en parsimonik ağacı bulmak için kullanılır. Tüm değişim sayısının en az olduğu ağaç en parsimonik olandır ve filogenetik olarak en yakın çıkarsama tutumluluğu oluşturmaktadır (Felsenstein, 1981).

Maksimum Likelihood (en çok olabilirlik) metodunda Maksimum-parsimoni metodunda olduğu gibi belirli sayıdaki alternatif ağaçları değerlendirmek için en çok olabilirlik ölçütünü kullanır. Maksimum Likelihood algoritması, her bir düğümdeki her bir özelliğin ortaya çıkma olasılığının çarpımının hesaplamasını kullanır ve bu hesaplamalardan elde edilen sonuçlarla ağaç topolojisindeki dizi verilerinin uyum sağlama olabilirliğini arttırmaktadır (Leep ve Relman, 2006; Stackebrandt, 2006).

Ağaçların güvenilirlik derecesini istatistiksel olarak değerlendirmek için kullanılan yaklaşımlardan biri seç-bağla (bootstrapping) olarak adlandırılan yöntemdir. Seç bağla testinde, bilgisayar mevcut veri setinden tekrarlı örnekleme yoluyla yeni bir veri seti oluşturur. Çalışmada kullanılan dizinin baz çifti kadar yeni bir dizi oluşturmak için bu pozisyonlardan birini rastgele seçer, bunu yeni dizinin ilk ögesi yapar ve seç bağla testine başlar. Daha sonra rastgele seçtiği bir pozisyon yeni veri setinin ikinci veri

noktasını oluşturur ve bu ekleme orijinal verinin boyutu elde edilene kadar devam eder. Daha sonra yeni veri seti filogeni hesaplamak için kullanılır. Yeniden örneklenmiş veri setinden oluşan ağaçlarda belirli bir dalın ortaya çıkma yüzdesi hesaplanır. Seç-bağla tahmininde bir dal ne kadar çok kere açığa çıkarsa, o dalın gerçekte var olduğuna dair güven artmaktadır. Seç-bağla testi belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir (Felstenstain, 1985; Freeman ve Herron, 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Farklı Habitatlardan Nocardioform Grubu Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Seçimi

3.1.1. Toprak Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları

Bu çalışma için Türkiye'nin iki ilini temsil eden değişik lokalitelerden ve Fransa ile Moskova'dan elde edilen toprak örnekleri ve köpük faunası steril kaplara ve plastik steril poşetlere alınmış ve laboratuvar numaraları verilerek kullanıma kadar +4°C'de korunmuşlardır. İzolasyon çalışmasının yapıldığı köpük ve toprak örneklerinin laboratuvar kodu, toprak tipleri ve alındıkları lokaliteler Çizelge 3.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Nocardioform grubu mikroorganizmaların izolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin laboratuvar numarası, toprak tipi ve lokaliteleri

Kodu	Toprak Tipi	Lokalitesi
01	Orman toprağı	Moskova (Yuga Zapadnaya Mevkii, güney batı park ormanı)
02	Tarla toprağı	Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
03	Çam ağacı dip toprağı	Kütahya-Simav-gölcük krater gölü
04	Orman toprağı	Kütahya-Simav-gölcük krater gölü
05	Göl kenarı açık alan toprağı	Kütahya-Simav-gölcük krater gölü
06	Meşe ağacı kök toprağı	Kütahya-Simav-gölcük krater gölü
07	Bataklık bölge toprağı (su içinden)	Kütahya-Simav-gölcük krater gölü
08	Köpük florası	Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
09	Göl kenarındaki killi toprak	Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
10	Orman toprağı	Balıkesir-Sındırgı baraj gölü

3.1.2. 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. Toprak örneklerinin pH, kireç ve organik madde miktarı

Kodu	pH	%CaCO ₃	Organik madde miktarı
01	7.48	4.70	5.45
02	7.06	58.93	1.39
03	4.46	1.47	5.63
04	6.05	0.87	4.33
05	5.53	2.24	3.59
06	5.77	1.58	4.40
07	6.11	0.43	4.14
09	8.41	2.51	0.71
10	7.12	3.99	4.58

3.1.3. Mikroorganizmaların İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan Nocardioform grubu mikroorganizmaların kullanılan her türlü kültür ortamı ve solüsyonların içeriği ve hazırlanışları Ek-A ve Ek-B'de verilmiştir.

3.1.3.1. Dilüsyon Plaka Yöntemi

Her bir toprak örneğinden 20-25 g alınıp oda ısısında etiketli petriler içinde 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, Anachem Ltd., Luton Bedfordshire, England, 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} ve 10^{-4} lük dilüsyonlardan otomatik pipet (P200: Nicheryo) ile alınan çözeltiler (0,2 ml), cycloheximide ($50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), rifampicin ($0,5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilic asit (10 mg ml^{-1}) ilaveli humik asit vitamin agar (Yamamura ve ark., 2003), tripton yeast glukoz ekstrakt agar (Blackall ve ark., 1989), tripton yeast ekstrakt vitaminli agar, glukoz yeast ekstrakt malt agar (Rapp, 1974) ve glukoz yeast ekstrakt malt vitaminli agar yüzeyine inoküle edildi. Her bir dilüsyon için 2 plak hazırlandı. İnokulasyonlu plaklar, O_2 girişine izin verecek şekilde 30°C 'deki etüvde 10-14 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Çalışma boyunca tek kullanımlık steril plastik petriler (90 mm, disposable petri dishes, Sterillin, UK) kullanıldı.

3.1.3.2. Sükroz Santrifügasyon 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 pipet (P1000: Nicheryo) ile alınan 1 ml toprak çözeltisi ilave edildi (Abbas, 2006).

Ardışık izolasyonda spor süspansiyonunun 1ml'si süktroz gradientinin en üst tabakasını oluşturacak şekilde steril pipetle ilave edildi ve spor süspansiyonu ilave edilmiş tüpler santrifüj (oda sıcaklığında 30 dk, 240xg) yapıldı (Yamamura ve ark., 2003). Santrifüj işleminden sonra her bir tabaka için farklı steril pipet kullanılarak gradientin en üst kısmı ardışık olarak alındı ve ringer çözeltisi ile 10'luk seri sulandırma yapıldı. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} lük dilüsyonlardan otomatik pipet pipet (P200:Nicheryo) ile alınan çözeltiler (0,2 ml), cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), rifampicin ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilik asit (10 mg ml^{-1}) ilaveli humik asit vitamin agar (Yamamura ve ark., 2003), tripton yeast glukoz ekstrakt agar (Blackall ve ark., 1989), tripton yeast ekstrakt vitaminli agar, glukoz yeast ekstrakt malt agar (Rapp, 1974) ve glukoz yeast ekstrakt malt vitaminli agar yüzeyine inoküle edildi. Her bir dilüsyon için 2 plak hazırlandı. İnokulasyonlu plaklar, O_2 girişine izin verecek şekilde 30°C 'deki etüvde 10-14 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Çalışma boyunca tek kullanımlık steril plastik petripler (90 mm, disposable petri dishes, Sterillin, UK) kullanıldı.

3.1.4. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması

Ardışık dilüsyonlarla farklı seçici besiyerlerine aktarılan örnekler 30°C 'de 10 gün inkübasyona bırakıldı ve bu izolasyon plaklarında Nocardioform benzeri kolonileri belirleyebilmek için gözle ve binoküler mikroskopla (X 400 büyütme; Nikon Kogaku K. K.; Tokyo, Japan) araştırma yapıldı. Belirlenen Nocardioform ve benzeri koloniler steril kürdanlar kullanılarak cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ilaveli glukoz yeast extract agar (GYEA; Gordon ve Mihm, 1962) ve tryptone yeast glucose extract agar (TYGA; Blackall ve ark., 1989) yüzeyine transfer edildi. 30°C 'de 14 günlük inkübasyon sonrasında transferi yapılmış plaklardan saf izolatlar elde edildi.

3.1.5. İzolatların Stoklanması

Toprak izolasyonu sonucunda, makroskopik ve mikroskopik görüntülerine göre seçilen toplam 125 izolat ve çalışmada kullanılan tip örnekleri 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) veya tryptone yeast glucose extract agar (TYGA; Blackall ve ark., 1989), üzerine yoğunlaştırılarak ekildi ve 30°C’de ve 14 gün boyunca inkübe edildi (Ek-C).

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 stoklandı (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.

3.2. Mikolik Asit Testi

3.2.1. Mikolik Asit Testi İçin Hazırlık

Mikolik asit testi için; üzerine 0,45 µm por çaplı steril selüloz asetat membran filtre konmuş Tryptone Yeast Glucose Agar (TYGA)’a test örnekleri inoküle edildi (Blackall ve ark., 1989). İzolatlar 28°C’de 10 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra elde edilen biyomaslar asit metanolizis yöntemiyle (Minnikin ve ark., 1985) degrede edilerek mikolik asit esterleri (MAME) elde edildi.

3.2.2. Mikolik Asit Ekstraksiyonu

Test suşlarından elde edilen biyomas örnekleri asit metanolizis yöntemiyle parçalandı (Minnikin ve ark., 1985). Elde edilen biyomaslar (~50 mg) 10 ml’lik test tüplerine alındı, 3 ml metanol/toluen/konsantre sülfürik asit (30:15:1, v/v) eklendi ve karışım bir gece 80°C’de inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına düşürüldükten sonra 2 ml hekzanla muamele edildi. Tüpler 15 dk boyunca çalkalandı ardından iki tabakanın ayrılmasını kolaylaştırmak için 5 dk 4000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant, 4 ml 0,3 M fosfat tamponu ve ardından 2 ml 0,3 M fosfat tamponu içeren temiz bir tüpe transfer edildi. Üstteki tabaka toplandı ve 40°C’nin altındaki bir sıcaklıktaki azot gazı altında buharlaştırıldı. Böylece mikolik asit esterleri elde edildi ve tüm örnekler gerek duyulana kadar 4°C’de depolandı.

3.2.3. Mikolik Asit Metil Esterlerinin (MAMEs) İnce-Tabaka Kromatografi Analizleri

Kurutulmuş ekstratlar (MAMEs) 25-30 µl petrol eter (60-80°C) içinde çözüldü. 10x20 cm ebatındaki alüminyum bazlı silika jel tabakalarına (Merck 5554FRG) otomatik pipet kullanılarak çözülmüş ekstraktan 8-10 µl emdirildi ve tabakalar petrol eter-aseton (95:5 v/v) içinde yürütüldü, ardından oda sıcaklığında kurutuldu.

Tabakaların üzerine etanolde molibde fosforik asit solusyonu (50 g l⁻¹) spreylendi ve 120°C'de 2-3 dk ısıtıldı. Mikolik asit metil esterleri ve diğer uzun zincir bileşenleri sarı bir arka planda mavi/siyah noktalar olarak görülür hale getirildi. İnce tabaka kromatografik (TLC) yöntemde standart olarak numaralı *Nocardia* tip suşları ile birlikte mikolik asit içeren *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* ve *Williamsia* tip örneklerinin mikolik asit spotları görüntülendi ve standart olarak kullanıldı.

3.3. DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Pithcer ve ark. (1989) tarafından tanımlanan “Guanidin Tiyosiyonat DNA İzolasyon” metodu modifiye edilerek test organizmalarının DNA izolasyonu için kullanıldı. Metoda ilave olarak hücreler proteinaz K (2 mg/ml; AppliChem) ile muamele edildi. DNA izolasyonu için hazırlanan besiyerlerinin içerikleri EK-A'da, kullanılan stok solüsyonların içerikleri ve hazırlanışı Ek-B'de verilmiştir.

DNA İzolasyonu

Test organizmaları besiyeri isteklerine göre cycloheximide (50 µg ml⁻¹) ilaveli trypton-glukoz-yeast extract veya glukoz-yeast ekstrakt 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 nütrient broth bulunan 50 ml'lik erlenlere transfer edildi. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 28°C'de 160 rpm'de 3-10 gün süre ile geliştirildi. Safılıkları 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 DDH₂O içinde 1 defa, TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) tamponunda 2 defa olmak üzere toplam 3 kez yıkandı (Sambrook ve ark., 2001) ve DNA ekstraksiyonuna hazır hale getirildi.

Test suşlarından DNA'nın ekstraksiyonunda Pithcer ve ark. (1989) tarafından tanımlanan metot kullanılarak aşağıda verilen işlemlerin uygulanması sonucunda 1-5 µg arasında genomik DNA elde edildi.

İşlem Basamakları

1. Steril DDH₂O ile yıkanan hücre pelleti üzerine 100 µl TE tamponu (pH 8) ilave edildi. Kültür 13 000 rpm'de 24°C'de 10 dk santrifüj edilerek yıkandı. Yıkama sonrası TE tamponu eppendorf tüpten otomatik pipet ile uzaklaştırıldı.
2. 50 mg ml⁻¹ çözülmüş lizozim (Sigma) içeren 100 µl TE tampona (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) ilave edildi ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası, 500 µl guanidin tiyosiyanat karışımına ilave edildi ve 37°C'de 10 dk inkübe edilerek liziz işlemi gerçekleştirildi.
4. Lizata 250 µl 7,5 M amonyum asetat eklendi ve birkaç defa tüp altüst edilerek 10 dk buzda soğutuldu.
5. Lizata 500 µl kloroform-izoamil alkol (24:1 v/v) ilave edilip birkaç defa tüp altüst edilerek 13 000 rpm'de 5 dk 24°C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant otomatik pipet ile steril yeni bir eppendorf tüpe transfer edildi ve 500 µl soğuk izo-propanol ilavesi ile DNA'nın çökmesi sağlandı. Tüpler beyaz fibril görülünceye kadar hafifçe altüst edildi. Hemen sonra 13 000 rpm'de 10 dk 24°C'de santrifüj edildi.
7. Izo-propanol dikkatli bir şekilde otomatik pipet ile uzaklaştırıldı. 100–150 µl soğuk %70'lik etanol ilave edildi. DNA'nın tüp çeperinden ayrılması ve yıkama işleminin tüm DNA yüzeyinde gerçekleşmesi için tüpün dip kısmına hafifçe parmak ucu ile birkaç defa vuruldu. Hemen sonra 13.000 rpm' de 10 dk 24°C'de santrifüj edildi. Bu işlem 2 defa gerçekleştirildi. İşlem sonrası alkol uzaklaştırıldı ve kapaklar açık bırakılarak yaklaşık 20-25 dk kurumaya bırakıldı.
8. 90 µl TE tamponu DNA pelletine ilave edilerek süspanse edildi.
9. 10 µl RNAaz ilave edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildikten hemen sonra 20

- μ l proteinaz K eklendi ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi.
10. 10 μ l, 8 M LiCl eklendikten sonra ilave edilen tuz ile karışımın sağlanması için otomatik pipet ile solüsyondan birkaç defa çekilip bırakıldı.
 11. 130 μ l fenol-kloroform-izo-amil alkol ilave edilecek ve tüpün dip kısmına hafifçe parmak ucu ile birkaç defa dokunularak karışım sağlandı. 13.000 rpm'de 10 dk 24°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz steril yeni eppendorf tüplere aktarıldı.
 12. 130 μ l kloroform-izo-amil alkol (24:1 v/v) ilave edildi ve tüpün dip kısmına hafifçe parmak ucu ile birkaç defa dokunularak karışması sağlanıp 13 000 rpm'de 10 dk 24°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz steril yeni eppendorf tüplere aktarıldı.
 13. Toplam hacmin 2,5 katı olacak şekilde izo-propanol ilave edilip ve tüpler altüst edilerek 13 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Alkol otomatik pipet ile uzaklaştırıldı.
 14. 100 μ l %70'lik etanol ilave edilerek 13 000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve alkol otomatik pipet ile uzaklaştırıldı. Bu işlem 1 defa daha tekrarlandı.
 15. DNA pelleti kurutulup 30-50 μ l DDH₂O ilave edilerek süspanse edildi ve -18°C'de gereksinim duyulana kadar stoklandı.

3.3.2. DNA İzolasyon 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.

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

3.3.3. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi, UV spektrofotometrede sulandırılmış örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarında okuma değerleri alınarak belirlendi. 260 nm dalga boyunda ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) DNA solüsyonu içerisindeki DNA miktarını ve 280 nm dalga boyunda ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{280}) ise protein miktarını göstermektedir.

DNA örneğinin saflık derecesi 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran (A_{260} / A_{280}) hesaplanarak belirlendi. (Sambrook ve ark., 2001).

3.4. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* Gen Bölgelerinin PCR Amplifikasyonu ve Saflaştırılması

3.4.1. 16S rRNA'nın PCR Amplifikasyonu

16S rRNA'nın polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0,5 ml'lik PCR tüplerinde Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27f ve 1525r; Lane, 1991) kullanıldı. PCR reaksiyonu için hazırlanan bütün stok solüsyonlar otoklav edilmiş DDH₂O ile hazırlandı. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 µl) steril eppendorflara bölünerek kullanıma kadar tüm stok solüsyonlarla birlikte -18°C'de saklandı. Hedef DNA bölgesinin amplifikasyonundan otomatik sekanslama aşamasına kadar olan tüm işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

Hazırlık

1. Primer stoklar (20 µM, Invitrogen)

27f (forward primer: 16S rRNA'nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

1525r (reverse primer: 16S rRNA'nın son bölgesine bağlanan evrensel primer 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3')

2. dNTP mix stok (100 µl'lik stok solüsyonda her biri 25 mM olacak şekilde dATP, dCTP, dGTP ve dTTP karışımı; Promega)
3. *Taq* DNA polimeraz (HotStarTaq®, QIAGEN) 10x*Taq* DNA polimeraz tampon (HotStarTaq®)
4. 5- 10 µl DDH₂O içinde çözülmüş, saf genomik DNA (50-300 ng)

Uygulama

1. dNTP mix, primer solüsyonları, MgCl₂ ve 10x*Taq* tampon buz üzerinde çözüldü ve buzda tutulmaya devam edildi. *Taq* DNA polimeraz gereksinim duyuluncaya kadar -18°C' de tutuldu.
2. PCR amplifikasyonu için kullanılan bir örnek için 50 µl ölçüdeki reaksiyon karışımı örnek sayısınınca artırılarak *Taq* DNA polimeraz ve DNA örnekleri hariç 1,5 ml steril eppendorf tüpü içerisine buz üzerinde transfer edildi.
3. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DDH₂O ve DNA örnekleri toplam 10 µl olacak şekilde steril PCR tüpü içerisine transfer edildi ve Thermal Cycler' da 95°C' de 5 dk ön denatürasyona tabi tutuldu.
4. Ön denatürasyonu takiben tüpler buz ortamına alınıp 5 dk bekletildi.
5. -18°C' den *Taq* DNA polimeraz alınarak buzda bekletilen reaksiyon karışımına hızlı bir şekilde ilave edildi.
6. Reaksiyon karışımı her bir örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde tüplere buz üzerinde transfer edildi.

10x <i>Taq</i> tampon	5	µl
MgCl ₂	1,5	µl
dNTP (25 mM)	1	µl
27f (20 µM)	2,5	µl
1525r (20 µM)	2,5	µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz (HotStarTaq®, QIAGEN)	0,25	µl
DNA (50-300 ng)	1-3	µl
DDH ₂ O	X	µl
	50	µl Toplam hacim

7. Transfer işleminden hemen sonra PCR reaksiyonu (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) aşağıdaki şartlarda başlatıldı.

Denatürasyon	Amplifikasyon			Bitiş	Soğuma
	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Uzama	
95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
5 dk	1 dk	2 dk	3 dk	10 dk	1 dk
1 döngü	35 döngü			1 döngü	

8. 3 µl PCR ürünü, %1'lik agaroz jelde (40 ml 1xTBE tampon 0,4 g agaroz) PCR DNA marker ile 100 voltta 30 dakika yürütüldü ve UV transillüminatör' de (Vilber Lourmat, UV) kontrol edildi. Görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, DK) fotoğraflanarak kaydedildi.
9. PCR ürünü -18°C' de saflaştırılma işlemine kadar tutuldu.
10. PCR ile Amplifiye Edilmiş 16S rRNA Gen Bölgesi ürünlerinin Saflaştırılması Wizard SV Gel PCR Clean-up saflaştırma kiti (Promega) ve QIAquick (Qaigen) kullanılarak yapıldı.

3.4.2. *rpoB* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

rpoB (RNA polimeraz β alt ünitesi) gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0,5 ml'lik PCR tüplerinde Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin *rpoB* genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için 2 farklı evrensel primer (MF, MR) kullanıldı (Kim ve ark., 2003). PCR reaksiyonu için otoklavlanmış DDH₂O ile hazırlanan bütün stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 µl) steril eppendorflara bölünerek kullanıma kadar -18°C'de saklandı. Hedef DNA bölgesinin amplifikasyonundan otomatik sekanslama aşamasına kadar olan tüm işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

Hazırlık

- 1- Primer stoklar (20 μ M, Alpha DNA)

MF (*rpoB* forward primeri 5'-CGACCACTTCGGCAACCG-3')

MR (*rpoB* reverse primeri 5'-TCGATCGGGCACATCCGG-3')

- 2- dNTP mix stok (100 μ l'lik stok solüsyonda her biri 25 mM olacak şekilde dATP, dCTP, dGTP ve dTTP karışımı; Promega)
- 3- *Taq* DNA polimeraz (HotStarTaq®, QIAGEN) 10x*Taq* DNA polimeraz tampon (HotStarTaq®)
- 4- 1 μ l DDH₂O içinde çözülmüş, saf genomik DNA

Uygulama

1. dNTP mix, primer solüsyonları, MgCl₂ ve 10x*Taq* tampon buz üzerinde çözüldü ve buzda tutulmaya devam edildi. *Taq* DNA polimeraz gereksinim duyuluncaya kadar -18°C' de tutuldu.
2. 25 μ l ölçüdeki reaksiyon karışımı örnek sayısınca artırılarak *Taq* DNA polimeraz ve DNA örnekleri hariç 1,5 ml steril eppendorf tüpü içerisine buz üzerinde transfer edildi.
3. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DDH₂O ve DNA örnekleri toplam 10 μ l olacak şekilde steril PCR tüpü içerisine transfer edildi ve Thermal Cycler' da 95°C' de 3 dk ön denatürasyona tabi tutuldu.
4. Ön denatürasyonu takiben tüpler buz ortamına alınıp 5 dk bekletildi.
5. -18°C' den *Taq* DNA polimeraz alınarak buzda bekletilen reaksiyon karışımına derhal ilave edildi.
6. Reaksiyon karışımı her bir örnek için toplam hacim 25 μ l olacak şekilde tüplere buz üzerinde transfer edildi.
7. PCR amplifikasyonu için kullanılan bir örnek için 25 μ l ölçüdeki bir reaksiyon karışımı:

10x <i>Taq</i> tampon	2,5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	µl
dNTP (25 µM)	1	µl
MF (20 µM)	0,5	µl
MR (20µM)	0,5	µl
<i>Taq</i> polimeraz (HotStar <i>Taq</i> ®, QIAGEN)	0,2	µl
DNA (50-300 ng)	0,5-1	µl
DDH ₂ O	X	µl
	25	µl Toplam hacim

8. Transfer işleminden hemen sonra PCR reaksiyonu (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) aşağıdaki şartlarda başlatıldı (Kim ve ark., 2003; Ishikawa, 2006).
9. 2 µl PCR ürünü, %2'lik agaroz jelde (50 ml 1xTBE tampon 1 g agaroz) PCR DNA marker ile 100 voltta 30 dakika yürütülerek UV transillüminatör' de (Vilber Lourmat, UV) kontrol edildi ve görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, DK) fotoğraflanarak kaydedildi.

Denatürasyon	Amplifikasyon			Bitiş	Soğuma
	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Uzama	
95°C	95°C	45-65°C	68°C	68°C	25°C
3 dk	20 sn	20 sn	20 sn	5 dk	1dk
1 döngü	30 döngü			1 döngü	

10. PCR ürünü saflaştırılma işlemine kadar -18°C' de tutuldu.
11. PCR ile amplifiye edilmiş *rpoB* gen bölgesi ürünlerinin saflaştırılması Wizard SV Gel PCR Clean-up saflaştırma kiti (Promega) ve QIAquick (Qiagen) saflaştırma kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.3. *gyrB* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

gyrB gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0,5 ml'lik PCR tüplerinde Thermal Cyclers (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin *gyrB* genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için Noc-*gyrB*-F (bp 972–992) (5'-CTTCGCCAACACCATCAACAC-3') ve Noc-*gyrB*-R (bp 1563–1582) (5'-TGATGATCGACTGGACCTCG-3') primer çifti kullanıldı (McTaggart ve ark., 2010). Hedef DNA bölgesinin amplifikasyonundan otomatik sekanslama aşamasına kadar olan tüm işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

Hazırlık

1. Primer stoklar (20 μ M, IDT)

Noc-*gyrB*-F (bp 972–992) (5'-CTTCGCCAACACCATCAACAC-3')

Noc-*gyrB*-R (bp 1563–1582) (5'-TGATGATCGACTGGACCTCG-3')

2. dNTP mix stok (100 μ l'lik stok solüsyonda her biri 25 mM olacak şekilde dATP, dCTP, dGTP ve dTTP karışımı; Promega)
3. GoTaq® Hot Start Polimeraz (Promega) 10xTaq DNA polimeraz tampon (GoTaq®)
4. 1 μ l DDH₂O içinde çözülmüş, saf genomik DNA

Uygulama

- 1- dNTP mix, primer solüsyonları, MgCl₂ ve 10xTaq tampon buz üzerinde çözüldü ve buzda tutulmaya devam edildi. Hot Start Polimeraz gereksinim duyuluncaya kadar -18°C' de tutuldu.
- 2- PCR amplifikasyonu için kullanılan bir örnek için 50 μ l ölçüdeki bir reaksiyon karışımı:

10xTaq tampon (Promega)	10	µl
MgCl ₂ (25 mM)	2-4	µl
dNTP (25 µM)	2	µl
Noc- <i>gyrB</i> -F (20 µM)	2,5	µl
Noc- <i>gyrB</i> -R (20µM)	2,5	µl
GoTaq® Hot Start Polimeraz (Promega)	0,25	µl
DNA (50-300 ng)	1-3	µl
DDH ₂ O	50	µl Toplam hacim

- 3- 50 µl ölçüdeki reaksiyon karışımı örnek sayısınınca artırılarak *Taq* DNA polimeraz ve DNA örnekleri hariç 1,5 ml steril eppendorf tüpü içerisine buz üzerinde transfer edildi.
- 4- DNA örnekleri steril PCR tüpü içerisine transfer edildi ve hazırlanan reaksiyon karışımına *Taq* DNA polimeraz ilave edilerek 49 µl bu karışımdan alınıp her bir tüpe ilave edildi.
- 5- Transfer işleminden hemen sonra PCR reaksiyonu (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) aşağıdaki şartlarda başlatıldı (McTaggart ve ark., 2010).

Denatürasyon	Amplifikasyon			Bitiş	Soğuma
	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Uzama	
95°C	95°C	55-65°C	72°C	72°C	4°C
5 dk	1 dk	1 dk	1 dk	5 dk	1dk
1 döngü	35 döngü			1 döngü	

- 6- 3 µl PCR ürünü, %2'lik agaroz jelde (50 ml 1xTBE tampon 1 g agaroz) geneRuler™ 50 kb DNA markörle (Fermentas) 100 volt 70 mA'de 30 dakika yürütülerek UV transillüminatör' de (Vilber Lourmat, UV) kontrol edildi ve görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, DK) fotoğraflanarak kaydedildi.

3.4.4. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* Gen Bölgelerinin Dizileme Çalışması

PCR amplifikasyon ürünleri elde edildikten sonra çalışma izolatlarımızın 16S, *gyrB* ve *rpoB* gen bölgelerinin saflaştırılması ve baz dizi analizi MacroGen firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi, farklı 4 oligonükleotit primeri; *gyrB* gen bölgesinin baz dizilimi ise 2 oligonükleotit primeri ve *rpoB* gen bölgesinin baz dizilimide bir oligonükleotit primeri ile MacroGen firması tarafından ABI 3730XL (otomatik baz dizileme) cihazı ile okunmuştur (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* baz dizileme analizinde kullanılan oligonükleotit primerler, bu primerlerin nükleotit dizileri ve bağlanma bölgeleri

Primer Adı	Sekans (5' ve 3')	Büyüklik	Bağlanma Bölgesi ^a		Kullanım		Kaynak
			5'	3'	PCR	Sekans	
27f	AGAGTTTGATCTGGCTCAG	20	8	27	√	√	Lane, 1991
MG3f	CAGCAGCCGCGGTAATAC	18	520	536		√	Kagayemave ark., 2004f
MG5f	AAACTCAAAGGAATTGACGG	20	907	926		√	Chun, 1995
1525r	AAGGAGGTGWTCCARCC	17	1544	1525	√	√	Lane, 1991
1115r	AGGGTTGCGCTCGTTG	16	1115	1131		√	Gyobu ve Miyadoh, 2001
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACT	21	1492	1474		√	Gyobu ve Miyadoh, 2001
MF	CGACCACTTCGGCAACCG	18	203	221	√	√	Kim ve ark., 2003
MR	TCGATCGGGCACATCCGG	18	554	536	√		Kim ve ark., 2003
Noc-gyrB-F	CTTCGCCAACACCATCAACAC	21	972	992	√	√	McTaggart ve ark., 2010
Noc-gyrB-R	TGATGATCGACTGGACCTCG	20	1563	1582	√	√	McTaggart ve ark., 2010

Lane (1991)'e göre: M, A:C; R, A:G; W, A:T

^a Sayılar *Escherichia coli rrnB* suşunun (GenBank JO1695, Brosius ve ark., 1978) 16S rRNA'nın gen dizisine karşılık gelir

3.4.5. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* Sekans Verilerinin Analizi

ABI formatındaki dosyalar fasta formatına dönüştürüldükten sonra Sequencer 4.10.1, MEGA 4.1 (Kumar ve ark., 2008), Finch TV programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak dört farklı primerden elde edilen diziler birleştirildi ve 16S rRNA dizileri elde edildi. 16S üzerinde değişken bölgelerin yoğun olarak bulunduğu yaklaşık 800 nükleotitlik bölge hem 27f hem de 800r primerleri karşılaştırılarak kontrol edildi ve MG3f ve MG5f primerlerinin belirli bölgeleri üst üste karşılaştırılarak 16S rRNA gen bölgesinin birçok alanı tekrarlı olarak çalışıldı. 4 farklı primer kullanılarak hazırlanan 1446-1515 nt uzunluğundaki 16S rRNA gen dizileri filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi amacıyla analizlerde kullanıldı.

gyrB gen dizisinin oluşturulmasında ABI formatındaki dosyalar fasta formatına dönüştürüldükten sonra Sequencer 4.10.1, MEGA 4.1 (Kumar ve ark., 2008), Finch TV programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak iki farklı primerden elde edilen diziler birleştirildi ve *gyrB* dizileri elde edildi.

rpoB gen bölgesinin analizinde, bir primer kullanılarak okutulan bölgenin kalitesi Finch TV programı ile kontrol edildi. Fasta formatına dönüştürülen diziler DSMZ ve EMBL, NCBI gibi genbanklardan elde edilen tip türlerinin dizileri ile karşılaştırıldı.

Ez Taxon Server 2.1 (Chun ve ark., 2007) kullanılarak test izolatlarına en yakın akraba olan türlerin 16S rRNA gen dizileri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.arb-silva.de> ve <http://www.ebi.ac.uk> web adreslerinden tek tek indirilerek elde edilen Nocardioform tip örneği 16S rRNA nükleotit baz dizileri ile test örneklerinin baz dizileri MEGA 4.1 (Kumar ve ark., 2008) ve PHYLIP (Felsenstein, 1993) programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak dizilendi. Alignment yapılacak tip türlerin 16S rRNA gen dizileri tanımsız (N) baz içermediği, tip türün makalesinin IJSEM’de yayınlanmış olduğu, sinonimi olup olmadığı DSMZ ve EMBL, NCBI gibi genbanklardan kontrol edildikten sonra geçerli olan en uzun 16S rRNA gen dizisi tercih edildi (Tindall ve ark., 2010). Bu diziler test organizma dizileriyle MEGA 4.1 programlarına aktararak hizalandı. Zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırıldı. Aynı test organizması için 4 farklı primer kullanılarak elde edilen baz dizi verileri yan yana getirilerek 1446-1515 bp’den oluşan 16S rRNA bölgesinin baz dizileri

oluşturuldu. Tüm 16S rRNA baz dizileri filogenetik dendrogramın oluşturulması için kullanıldı.

342 bç'den oluşan MF ve MR primerleri ile amplifiye edilen *rpoB* gen bölgelerinin tüm baz dizileri oluşturuldu. Alignment yapılacak tip türlerin *rpoB* gen dizileri tanımsız (N) baz içermediği, sinonimi olup olmadığı DSMZ ve EMBL, NCBI gibi genbanklardan kontrol edildikten sonra geçerli *rpoB* gen dizisi veri bankalarından elde edildi (Tindall ve ark., 2010). Bu diziler test organizma dizileriyle Mega 4.1 programlarına aktararak hizalandı ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırıldı. Tüm *rpoB* nükleotid baz dizileri (285-306 bç) filogenetik dendrogramın oluşturulmasında veya ikili karşılaştırmalarda kullanıldı.

610 bp'den oluşan Noc-gyrB-F ve Noc-gyrB-R primerleri ile amplifiye edilen *gyrB* gen bölgelerinin tüm baz dizileri oluşturuldu. Alignment yapılacak tip türlerin *gyrB* gen dizileri tanımsız (N) baz içermediği, sinonimi olup olmadığı DSMZ ve EMBL, NCBI gibi genbanklardan kontrol edildikten sonra geçerli *gyrB* gen dizisi veri bankalarından elde edildi (Tindall ve ark., 2010). Bu diziler test organizma dizileriyle Mega 4.1 programlarına aktararak hizalandı ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırıldı. Elde edilen *gyrB* nükleotid baz dizileriyle (597-610 bç), filogenetik dendrogram oluşturulması veya ikili karşılaştırmalar gerçekleştirildi.

3.4.6. Filogenetik Dendrogramın Oluşturulması

MEGA4.1'e göre oluşturulan son veri matrisi; 16S rRNA, *gyrB* ve *rpoB* baz dizi analizi filogenetik dendrogramları, maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) ve neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritmaları kullanılarak oluşturuldu. Neighbour-joining ve maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) metotları için filogenetik uzaklık matrisi olarak: Jukes ve Cantor (1969) metodu izlenerek gerçekleştirildi. Filogenetik analizler için MEGA4.1 ve PHYLIP paket programı kullanıldı ve analizler sonucu elde edilen son veri matrisine uygun filogenetik dendrogramlar TreeView (v1.6.6) ve MEGA4.1 programlarında görüntülendi (Felsenstein, 1993).

4. BULGULAR

4.1. Mikroorganizmaların Farklı Lokalitelerden İzolasyonu

Toprak izolasyonunda, 5 farklı besiyeri; tryptone yeast glucose extract agar (TYGA), tryptone yeast glucose extract vitaminli agar (TYGA), glucose yeast extract malt agar (GYM), glucose yeast extract malt vitaminli agar (GYM) ve hümik asit vitamin agar (HV Agar) kullanılarak farklı 10 lokaliteden elde edilen toprak örneklerine uygulanan dekontaminasyon işlemleri sonucunda toprak izolasyonunda yaygın olarak kullanılan dilüsyon plak yöntemi ve nadir aktinomisetlerin izolasyonunda kullanılan sükröz santrifügasyon yöntemi uygulanan örnekler seri olarak sulandırıldı (10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3}) ve yayma plaka yöntemiyle ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan plaklar 10-14 günlük inkübasyona bırakıldı (Ek-C; Yamamura ve ark., 2003). İnkübasyon sonrasında nocardioform benzeri mikroorganizmalar glukoz yeast ekstrakt agar (GYEA) ortamına aktararak saflaştırılma prosedürüne geçildi (Ek-C). Kontaminasyonsuz mikroorganizmalar tek koloni için GYEA besiyerine aktarıldı ve gelişen bu organizmalar daha sonrasında aynı besiyeri kullanılarak yoğun ekim yapıldı (Ek-C). İnkübasyon süresi sonunda her bir izolat %20'lik gliserol içeren otoklavlanabilir 1,5 ml'lik vidalı kapaklı tüpler içerisine steril bir öze yardımı ile transfer edilerek -18°C de stoklandı (Wellington ve Williams, 1978).

Farklı 10 lokaliteden izole edilen Aktinomiset izolatlarının ve Özdemir-Koçak'ın (2005) yüksek lisans çalışmasında kullanılan ve mikolik asit testleri yapılan izolatların kaynakçaları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Toprak izolasyonu ile elde edilen Aktinomiset izolatlarının Kaynakçaları

İzolat No:	İzolatın Adı:	Kaynakça
NEA01	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; OMÜ, Fen Fak. Biyoloji Böl. Bahçe toprağı, Samsun
NEA03	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Tarla toprağı, Altınoluk-Balıkesir
NEA04	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Bahçe toprağı, Konya
NEA07	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Ekin tarlası toprağı, Tarsus-Mersin
NEA09	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Ekin tarlası toprağı, Tarsus-Mersin
NEA10	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Ekin tarlası toprağı, Tarsus-Mersin
NEA14	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Bahçe toprağı, Çakırlar Köyü, Antalya
NEA16	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Tarla toprağı, Uşak
NEA26	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Bahçe toprağı, Konya
NEA37	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Orman toprağı, Eskipazar-Karabük
NEA39	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Dağlık Alan Orman toprağı, Muğla
NEA44	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Tarla toprağı, Altınoluk-Balıkesir
NEA53	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Kayısı toprağı, Hanımın Çiftliği-Malatya
NEA57	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Bahçe toprağı, Çakırlar Köyü, Antalya
NEA59	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Bahçe toprağı, Çakırlar Köyü, Antalya
NEA64	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Orman toprağı, Eskipazar-Karabük
NEA67	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Dağlık Alan Orman toprağı, Muğla
NEA70	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Dağlık Alan Orman toprağı, Muğla
NEA84	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Bahçe toprağı, Samsun
NEA85	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Tarla toprağı, Altınoluk-Balıkesir

Moskova izolatları

FMN01	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN02	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN03	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova

Çizelge 4.1. (devamı)

FMN04	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN05	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN06	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN07	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN08	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN09	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN10	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN11	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN12	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN13	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN14	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN15	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN16	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN17	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN18	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii-Moskova
FMN19	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN20	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN21	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN22	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN23	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN24	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN25	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN26	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN27	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova

Çizelge 4.1. (devamı)

FMN28	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN29	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN30	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN31	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN32	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova

Gölcük izolatları

FGN01	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **G1, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN02	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **G5, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN03	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G1, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN04	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN05	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN06	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN07	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN08	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G1, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN09	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN10	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN11	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G1, Kütahya-simav-Gölcük krater gölü
FGN12	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G5, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN13	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN14	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN15	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN16	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN17	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü

Çizelge 4.1. (devamı)

FGN18	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN19	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN20	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN21	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN22	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN23	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **G3, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN24	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G3, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN25	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G3, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN26	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN27	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN28	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-simav-Gölcük krater gölü
FGN29	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN30	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN31	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN32	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G3, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN33	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G5, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN34	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN35	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN36	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G5, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN37	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN38	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G2, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN39	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN40	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN41	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü

Çizelge 4.1. (devamı)

FGN42	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN43	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN44	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN45	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN46	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü

Balıkesir- Sındırgı izolatları

FSN01	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN02	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN03	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; **S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN04	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN05	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN06	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN07	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN08	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN09	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN10	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN11	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN12	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN13	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN14	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN15	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN16	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN17	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü

Çizelge 4.1. (devamı)

FSN18	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN19	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN20	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN21	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN22	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN23	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN24	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN25	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN26	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN27	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN28	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN29	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN30	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN31	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN32	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN33	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN34	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN35	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN36	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN37	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN38	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; S1, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü

Fransa izolatları

FFN01	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
FFN02	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant

Çizelge 4.1. (devamı)

FFN03	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
FFN04	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
FFN05	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
FFN06	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
FFN07	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant
FFN08	Actinomycetes	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Gap-Veynes Kasabası-Saint Aubant

** G1, Çam ağacı dip toprağı; G2, Orman toprağı; G3, Göl kenarı açık alan toprağı; G4, Meşe ağacı kök toprağı; G5, Bataklık bölge toprağı (su içinden); S1, Köpük florası; S2, Göl kenarındaki killi toprak; S3, Orman toprağı

4.2. Mikolik Asit Metil Esterlerinin TLC Yöntemiyle Belirlenmesi

Test izolatlarına uygulanan mikolik asit testi (Minnikin, 1984b) sonucunda mikolik asit metil esterleri (MAME) elde edilmiş ve ince tabaka kromatografi (TLC) yöntemi ile görülür halde saptanmıştır (Ek-C). TLC analizleri sonucunda Rf değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Aynı zamanda, Nocardioform olarak belirlenen izolatların moleküler analizler için kullanılanlarıda Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Nocardioform grubu mikroorganizma ekstraktlarının tek boyutlu ince tabaka kromatografisine göre Rf Değerleri

İzolat Numarası	İzolat Adı	Rf Değeri
NEA01	Nocardioform	0,45
NEA03	Actinomycetes	- *
NEA04	Actinomycetes	-
NEA07	Actinomycetes	-
NEA09	Actinomycetes	-
NEA10	Actinomycetes	-
NEA14	Actinomycetes	-
NEA16	Actinomycetes	-
NEA26	Actinomycetes	-
NEA37	Actinomycetes	-
NEA39	Actinomycetes	-
NEA44	Nocardioform	0.47
NEA53	Actinomycetes	-
NEA57	Actinomycetes	-
NEA59	Actinomycetes	-
NEA62	Actinomycetes	-

Çizelge 4.2. (devamı)		
NEA63	Actinomycetes	-
NEA64	Actinomycetes	-
NEA67	Actinomycetes	-
NEA70	Actinomycetes	-
NEA75	Actinomycetes	-
NEA84	Actinomycetes	-
NEA85	Actinomycetes	-
Moskova izolatları		
FMN01	Actinomycetes	-
FMN02	Actinomycetes	-
FMN03	Actinomycetes	-
FMN05	Actinomycetes	-
FMN06	Nocardioform	0.55
FMN07	Actinomycetes	-
FMN08	Nocardioform	-
FMN11	Actinomycetes	-
FMN12	Actinomycetes	-
FMN13	Actinomycetes	-
FMN14	Actinomycetes	-
FMN15	Nocardioform	0.53
FMN16	Actinomycetes	-
FMN17	Actinomycetes	-
FMN18	Nocardioform	0.47

Çizelge 4.2. (devamı)		
FMN19	Actinomycetes	-
FMN21	Actinomycetes	-
FMN22	Nocardioform	-
FMN23	Actinomycetes	-
FMN24	Actinomycetes	-
FMN25	Actinomycetes	-
FMN26	Nocardioform	-
FMN27	Actinomycetes	-
FMN28	Actinomycetes	-
FMN29	Actinomycetes	-
FMN32	Actinomycetes	-
Gölcük izolatları		
FGN01	Actinomycetes	-
FGN02	Actinomycetes	-
FGN03	Actinomycetes	-
FGN04	Actinomycetes	-
FGN05	Actinomycetes	-
FGN06	Actinomycetes	-
FGN07	Actinomycetes	-
FGN09	Actinomycetes	-
FGN11	Actinomycetes	-
FGN12	Actinomycetes	-
FGN13	Actinomycetes	-

Çizelge 4.2. (devamı)		
FGN15	Actinomycetes	-
FGN16	Actinomycetes	-
FGN17	Nocardioform	0.48
FGN18	Actinomycetes	-
FGN19	Nocardioform	0.40
FGN20	Actinomycetes	-
FGN22	Actinomycetes	-
FGN23	Actinomycetes	-
FGN26	Actinomycetes	-
FGN27	Actinomycetes	-
FGN28	Actinomycetes	-
FGN29	Actinomycetes	-
FGN30	Actinomycetes	-
FGN31	Actinomycetes	-
FGN32	Actinomycetes	-
FGN36	Actinomycetes	-
FGN37	Actinomycetes	-
FGN38	Actinomycetes	-
FGN39	Nocardioform	0.53
FGN40	Actinomycetes	-
FGN41	Actinomycetes	-
FGN43	Nocardioform	0.48
FGN44	Actinomycetes	-

Çizelge 4.2. (devamı)		
FGN46	Nocardioform	0.46
Balıkesir- Sındırgı izolatları		
FSN02	Actinomycetes	-
FSN03	Actinomycetes	-
FSN04	Nocardioform	0.55
FSN06	Nocardioform	-
FSN07	Actinomycetes	-
FSN09	Actinomycetes	-
FSN13	Nocardioform	0.45
FSN14	Nocardioform	0.48
FSN20	Actinomycetes	-
FSN21	Actinomycetes	-
FSN22	Actinomycetes	-
FSN23	Nocardioform	-
FSN26	Actinomycetes	-
FSN27	Nocardioform	0.47
FSN30	Actinomycetes	-
FSN32	Actinomycetes	-
FSN33	Actinomycetes	-
FSN34	Nocardioform	0.46
FSN35	Nocardioform	0.47
FSN37	Nocardioform	0.47
FSN38	Actinomycetes	-

Çizelge 4.2. (devamı)		
FSN271	Nocardioform	0.47
Fransa izolatları		
FFN01	Actinomycetes	-
FFN04	Actinomycetes	-
FFN05	Actinomycetes	-
FFN06	Actinomycetes	-
FFN07	Actinomycetes	-

*** - Mikolik asit içermeyen Aktinomiset izolatları**

Çizelge 4.3. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* gen bölgelerinin analizinde kullanılan Nocardioform test izolatlarının ve tip örneklerinin kaynakçası

İzolat No:	İzolatın Adı:	Kaynakça
NEA01	<i>Gordonia sp.</i>	E. Aymen Peker; OMÜ, Fen Fak. Biyoloji Böl. Bahçe toprağı, Samsun
NEA44	<i>Nocardia sp.</i>	E. Aymen Peker; Tarla toprağı, Altınoluk-Balıkesir
FMN06	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN08	<i>Nocardioides sp.</i>	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN15	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN18	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN22	<i>Kribbella sp.</i>	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FMN26	<i>Kribbella sp.</i>	F. Özdemir Koçak; Orman toprağı, Yugo Zapadnaya Mevkii- Moskova
FGN17	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN19	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN39	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN43	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FGN46	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; G4, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
FSN04	<i>Gordonia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN06	<i>Kribbella sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN13	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN14	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN23	<i>Kribbella sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN27	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN34	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN35	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN37	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S2, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
FSN271	<i>Nocardia sp.</i>	F. Özdemir Koçak; S3, Balıkesir-Sındırgı baraj gölü
18824 ^T	<i>Kribbella aluminosa</i>	Carlsohn ve ark., DSM 18824, HKI 0478, JCM 14599, ortaçağ maden ocağından

Çizelge 4.3. (devamı)

19227 ^T	<i>K. hippodromi</i>	Everest ve Meyers, DSM 19227, NRRL B-24553, S1.4, güney Afrika'da at yarış alanından (hippodrom)
17345 ^T	<i>K. swartbergensis</i>	Kirby ve ark., DSM 17345, HMC25, NRRL B-24426, Güney Afrika Batı Burnundan alınan topraktan
N1356 ^T	<i>Nocardia abcessus</i>	A. F. Yassin; IMMIB D-1592, DSM 44432, Inst. of Medical Microbiology, Hannover. J 56 yaşındaki bir erkek hastanın dizindeki endoprotezden izole.
N1357 ^T	<i>N. alba</i>	Li ve ark., CCTCC AA 001030, DSM 44684, YIM 30243, Çinde topraktan
N317 ^T	<i>N. asteroides</i>	R.E. Gordon, Rutgers University, New Brunswick, USA, IMRU 727; L. Ajello, M 170-6; W.M. Bowman, PSA 165[Goodfellow (1971), alt grup 1D; Orchard ve Goodfellow (1980) alt küme 1A; Hookey (1983), küme 27 (N. asteroides)]
43397 ^T	<i>N. carnea</i>	(Rossi Doria 1891) Castellani and Chalmers 1913, ATCC 6847, DSM 43397, IMET 7504, NCTC 3527.
N898 ^T	<i>N. farcinica</i>	M. Tsukamura, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-Chen 474, Japonya, 23102 (R-3318); ATCC 3318; R.E: Gordon [Orchard ve Goodfellow (1980), alt küme 1A; Hookey (1983), küme 28 (N. farcinica)]
N1111 ^T	<i>N. flavorosea</i>	Chun ve ark., DSM 44480, JCM 3332, NRRL B-16167, Çinde topraktan
45048 ^T	<i>N. jinanensis</i>	Sun ve ark., 04-5195, CGMCC 4.3508, DSM 45048, amicoumacin B üretici aktinomiset, topraktan
N1158 ^T	<i>N. otitidiscaviarum</i>	Gordon; NCTC 19439; ATCC 14269; R.E. infekte ergin kobay'dan (klinik izolat).
J5 ^T	<i>N. soli</i>	Maldonado ve ark., Type strain W30 (DSM 44488= NCIMB) Thames nehri suyu, Meelmenham, UK
45078 ^T	<i>N. speluncae</i>	Seo ve ark., DSM 45078, JBRI 2006, KCTC 19223, N2-11, Mağaradan
N1371 ^T	<i>N. shimofusensis</i>	Kageyama ve ark., Toprak, DSMZ No 44733 Japan
N1373 ^T	<i>N. takedensis</i>	Yamamura ve ark., DSM 44801, MS1-3, NBRC 100417, Aktif çamur köpüğü ve hendek sedimentinden
N1374 ^T	<i>N. tenerifensis</i>	Kämpfer ve ark., CIP 107929, DSM 44704, GW39-1573, Kutonöz granulomalı bir kediden
N1383 ^T	<i>N. xishanensis</i>	Zhang ve ark., Toprak, DSMZ No 44895 Beijing, Xishan dağı, China
43109 ^T	<i>Nocardioides albus</i>	Prauser, ATCC 27980, DSM 43109, IMET 7807, topraktan

Çizelge 4.3. (devamı)

43366^T *N. luteus* Prauser, DSM 43366, IMET 7830, subtropikal bölge toprağı

Dış grubu temsil eden tip örnekleri

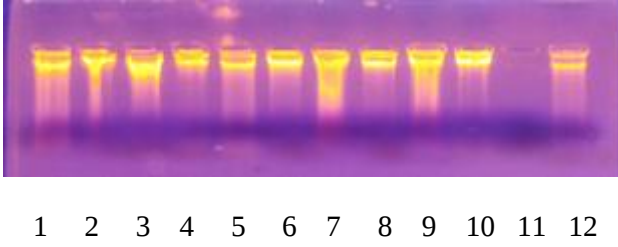
*N1261 ^T	<i>Williamsia muralis</i>	M. Andersson, Univ. Helsinki, MA 140/96. Çocuk koruma merkezinin yapım materyalinde su hasarlı bölgeden, Finland
*N654 ^T	<i>Gordonia bronchialis</i>	(Tsukamura 1971) Stackebrandt <i>et al.</i> 1989; DSMZ 43247, Her iki akciğer bölgesini kaplayan kaviter hastalıklı bir kadının tükürüğünden
*R260 ^T	<i>Rhodococcus fascians</i>	(Tilford 1936) Goodfellow 1984. DSMZ 20131, Atık su arıtma tesisinin aktif çamur köpüğünden
*N663 ^T	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	(Steinhaus 1941) Collins <i>et al.</i> 1988, DSMZ 20162, <i>Cimex lectularis</i> 'un overleri ve myçetomadan izole edilmiştir
*N1015 ^T	<i>Dietzia maris</i>	(Nesterenko <i>et al.</i> 1982) Rainey <i>et al.</i> 1995, DSMZ 43672, Toprakdan
*N1238 ^T	<i>T. inchonensis</i>	Yassin <i>et al.</i> 1995, DSMZ 44067, mide rahatsızlığı olan hastanın kan kültüründen

^T, Tip örneğı. Kısaltmalar: **ATCC**, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md., USA; **DSMZ**, Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany; **JCM**, Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan; **NCIMB**, The National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria; **NCTC**, National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, UK

* Tabloda yer alan *W. muralis*, *G. bronchialis*, *R. fascians*, *T. paurometabola*, *D. maris* ve *T. inchonensis* suşları filogenetik dendrogram oluşturulurken ve mikolik asit metil esterlerinin analizinde dış grubu temsil edecek mikroorganizmalar olarak seçilmiştir.

4.3. DNA İzolasyonu ve Agaroz jel elektroforez yöntemiyle DNA'ların görüntülenmesi

Mikolik asit metil ester (MAMEs) içeriğine sahip ve morfolojik olarak nocardioform özelliğe sahip mikroorganizmalar seçilerek, bu organizmaların genomik DNA'ları Pitcher ve ark. (1989) tarafından tanımlanan Guanidin tiyosiyonat DNA izolasyonu metodu ile elde edilmiş ve DNA kontrolü %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. DNA izolasyonu yapılan bazı izolatların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü; 1, FMN06-A; 2, FMN27; 3, FGN19-A; 4, FGN17; 5, FSN14; 6, FGN19-B; 7, FMN08; 8, FMN15; 9, FMN22; 10, FMN18; 11, FSN13; 12, FMN06-B.

4.4. DNA Miktar Tayini

Tip örneklerinin de dahil olduğu toplam 40 organizmanın DNA'sı, Pitcher ve ark. (1989) tarafından tanımlanan modifiye edilmiş "Guanidin tiyosiyonat DNA izolasyon metodu" kullanılarak izole edildi.

Tüm test organizmalarının DNA miktar tayinleri, UV spektrofotometre'de 260 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınarak hesaplandı (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Test mikroorganizmalarının ve Tip örneklerinin DNA miktar tayini ve saflık dereceleri

Test Org. No.	260 nm	280 nm	260/280 nm	DNA Miktarı (µg/ml)
NEA01 <i>Gordonia</i> sp.	0,060	0,034	1,76	600
NEA44 <i>Nocardia</i> sp.	0,052	0,028	1,85	520
FMN06 <i>Nocardia</i> sp.	0,036	0,019	1,89	360
FMN08 <i>Nocardioiodes</i> sp.	0,042	0,024	1,75	420
FMN15 <i>Nocardia</i> sp.	0,064	0,037	1,72	640
FMN18 <i>Nocardia</i> sp.	0,059	0,033	1,78	590
FMN22 <i>Kribbella</i> sp.	0,064	0,037	1,72	640
FMN26 <i>Kribbella</i> sp.	0,064	0,037	1,72	640
FGN17 <i>Nocardia</i> sp.	0,069	0,037	1,86	690
FGN19 <i>Nocardia</i> sp.	0,046	0,026	1,76	460
FGN39 <i>Nocardia</i> sp.	0,058	0,032	1,81	580
FGN43 <i>Nocardia</i> sp.	0,050	0,028	1,78	500
FGN46 <i>Nocardia</i> sp.	0,052	0,029	1,79	520
FSN04 <i>Gordonia</i> sp.	0,044	0,025	1,76	440
FSN06 <i>Kribbella</i> sp.	0, 053	0, 029	1,83	530
FSN13 <i>Nocardia</i> sp.	0,040	0,022	1,81	400
FSN14 <i>Nocardia</i> sp.	0,055	0,029	1,89	550
FSN23 <i>Kribbella</i> sp.	0, 050	0,028	1,78	500
FSN27 <i>Nocardia</i> sp.	0,055	0,030	1,83	550
FSN34 <i>Nocardia</i> sp.	0,055	0,030	1,83	550
FSN35 <i>Nocardia</i> sp.	0,048	0,026	1,84	480

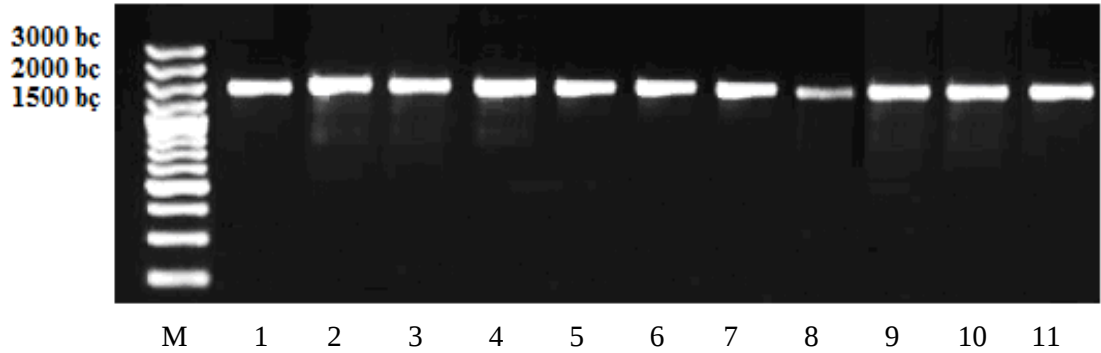
Çizelge 4.4. (devamı)				
FSN37 <i>Nocardia</i> sp.	0,046	0,026	1,76	460
FS271 <i>Nocardia</i> sp.	0,052	0,028	1,85	520

Tip Org. No.	260 nm	280 nm	260/280 nm	DNA Miktarı (µg/ml)
18824 ^T <i>K. Aluminosa</i>	0,075	0,042	1,78	750
19227 ^T <i>K. hippodromi</i>	0,035	0,019	1,84	350
17345 ^T <i>K. Swartbergensis</i>	0,068	0,036	1,88	680
N1356 ^T <i>N. abscessus</i>	0,296	0,146	1,78	296
N1357 ^T <i>N. alba</i>	0,035	0,019	1,84	350
N317 ^T <i>N. asteroides</i>	0,052	0,029	1,79	520
43397 ^T <i>N. carnea</i>	0,044	0,025	1,76	440
N898 ^T <i>N. farcinica</i>	0, 053	0, 029	1,83	530
N1111 ^T <i>N. flavorosea</i>	0,040	0,022	1,81	400
45048 ^T <i>N. jinanensis</i>	0,055	0,029	1,89	550
N1158 ^T <i>N. otitidiscaviarum</i>	0, 050	0,028	1,78	500
45078 ^T <i>N. speluncae</i>	0,055	0,030	1,83	550
N1371 ^T <i>N. shimofusensis</i>	0, 053	0, 029	1,83	530
N1373 ^T <i>N. takedensis</i>	0, 050	0,028	1,78	500
N1374 ^T <i>N. tenerifensis</i>	0,055	0,030	1,83	550
N1383 ^T <i>N. xishanensis</i>	0,052	0,029	1,79	520
43109 ^T <i>N. albus</i>	0,036	0,019	1,89	360
43366 ^T <i>N. luteus</i>	0,042	0,024	1,75	420

4.5. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB*'nin PCR Amplifikasyonu

4.5.1. 16S rRNA'nın PCR Amplifikasyonu

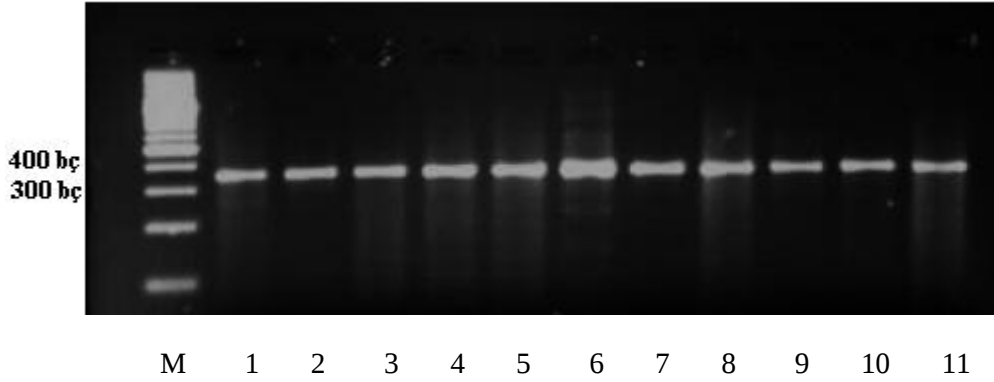
Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27f ve 1525r; Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifiye ürünler %1'lik kontrol agaroz jelde (40 ml 1xTBE tampon, 0,4 g agaroz) 100 Voltta 30 dakika DNA markör ile birlikte yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, UK) fotograflanarak kaydedildi. Test izolatlarının 16S PCR amplifikasyon ürünlerinin %1'lik kontrol agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı lokalitelerden izole edilmiş Nocardioform mikroorganizmaların 16S rRNA gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu. M, PCR DNA Markör (Fermentas™; 100kb Gene Ruler); 1, FSN14; 2, FSN04; 3, FGN46; 4, FSN27; 5, FMN22; 6, FGN17; 7, FSN13; 8, FMN08; 9, FMN15; 10, FMN18; 11, NEA44

4.5.2. *rpoB* Gen Bölgesinin PCR amplifikasyonu

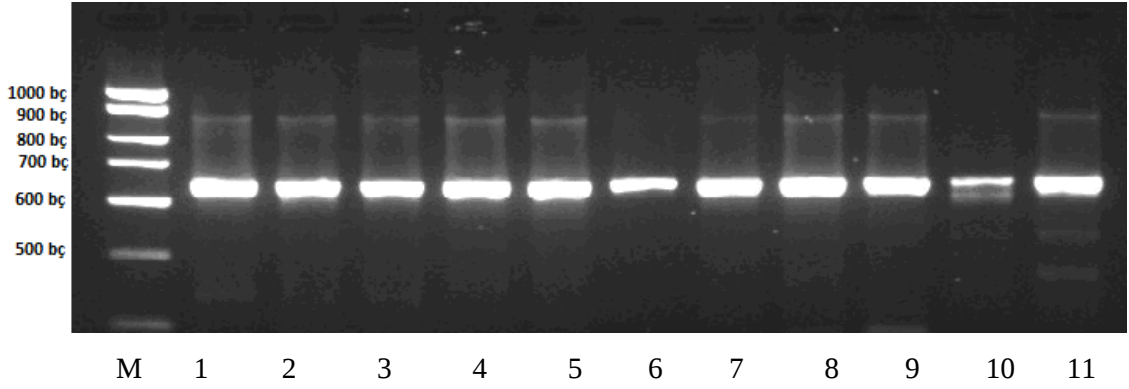
Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin *rpoB* genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki farklı primer (MF, MR; Kim ve ark., 2003) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifiye ürünler %3'lük kontrol agaroz jelde (40 ml 1xTBE tampon, 1,2 g agaroz) 100 Voltta 30 dakika DNA markör ile birlikte yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, UK) fotoğraflanarak kaydedildi. Test izolatlarının *rpoB* gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin %3'lük kontrol agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı lokalitelerden izole edilmiş Nocardioform izolatların *rpoB* gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu. M, markör; 1, FMN15; 2, FSN27; 3, FSN35; 4, FSN271; 5, FMN06; 6, FSN37; 7, FMN08; 8, FMN22; 9, FSN13; 10, FGN46; 11, FGN17

4.5.3. *gyrB* Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin *gyrB* genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki farklı primer (Noc-*gyrB*-F, Noc-*gyrB*-R; McTaggart ve ark., 2010) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifiye ürünler %2'lik kontrol agaroz jelde (50 ml 1xTBE tampon, 1,0 g agaroz) 100 Volta 30 dakika DNA markör ile birlikte yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, UK) fotoğraflanarak kaydedildi. Test izolatlarının *gyrB* gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin %2'lik kontrol agaroz jeldeki görüntüsü şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı lokalitelerden izole edilmiş Nocardioform mikroorganizmaların *gyrB* gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu. M, PCR DNA Markör (Fermentas™; 50kb DNA Ladder); 1, FSN13; 2, FSN34; 3, FSN14; 4, FMN15, 5, FSN27; 6, FMN18; 7, FSN37; 8, *N.speluncae*; 9, *N.jinanensis*; 10, FMN06; 11, FSN23

4.6. 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması

4.6.1. 16S rRNA Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması

Zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırılarak elde edilen 16S rRNA gen bölgesi, gen bankalarından elde edilen ilgili tip türlerin 16S rRNA gen bölgeleri için elde edilen veri setleri MEGA 4.1 ve PYHLIP programları kullanılarak farklı algoritma ve metotlarla filogenetik olarak incelendi.

Test organizmaları ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) ve maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) algoritmaları kullanılarak oluşturuldu. Neighbour-joining, maximum-parsimony algoritmaları için filogenetik uzaklık matriksi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirildi (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak MEGA 4.1 (Kumar ve ark., 2008) ve PYHLIP -3.69 paket programlarında gerçekleştirildi. *Nocardia* filogenetik dendrogramında *Gordonia terrae* ile *Rhodococcus equi*, *Gordonia* dendrogramında *Kribbella flavida*, *Nocardioide* dendrogramında *Rhodococcus triatoma*, *Kribbella* dendrogramında *Nocardioide basaltis* dış grup olarak kullanıldı. Nocardioform gruplarını temsil eden çalışma izolatları ve ilgili tip türlerinin 16S rRNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbour-joining matriksiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 4.5.-4.8.'da verilmiştir.

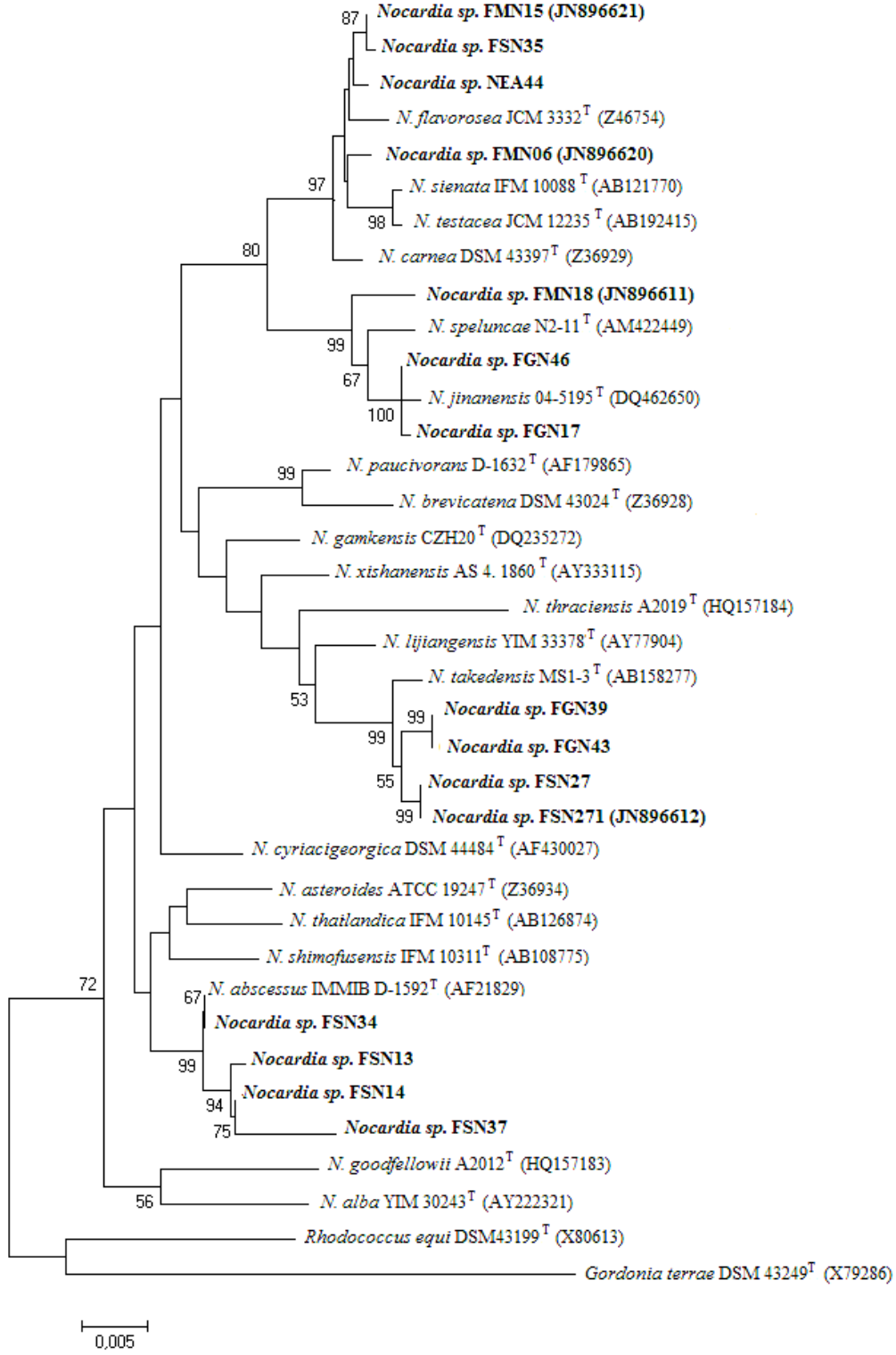
Toplam 23 test izolatının ilgili cinslere ait tip suşları arasındaki 16S rRNA % benzerlik değerleri ve nükleotit farklılıkları da çizelgeler 4.5.-4.8.'da görülmektedir. *Nocardia* cinsine ait 16 izolat ile *Nocardia* tip türleri MEGA 4.1'de hizalanmış ve boşluklar (gaplar) çıkarılarak toplamda 1312 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Nocardia* cinsine ait izolatlar ve tip türler arasında %99-100 oranlarında benzerlik ve 0-13 nükleotit aralığında nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5.). İki *Gordonia* sp. izolatı *Gordonia* tip türleri ile hizalanmış ve boşluklar (gaplar) çıkarılarak toplamda 1363 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Gordonia* izolatları ve *Gordonia* tip türleri

arasında 2 nükleotit farklılığı ve %99,8 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen izolatlardan bir tanesinin *Nocardioidea* cinsi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve filogenetik analizlerde 1344 nt'lik hizalanmış bölge kullanılmıştır (Çizelge 4.6. ve 4.8.; Şekil 4.6. ve 4.8.). *Kribbella* sp. izolatları ise *Kribbella* tip türleri ile hizalanmış ve boşluklar (gaplar) çıkarılarak toplamda 1332 nt'lik dizi elde edilmiştir. *Kribbella* sp. izolatları ise *Kribbella* tip türleri ile % 98,2-99,2 benzerlik ve 10-20 nükleotit farklılığı bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.7., Şekil 4.7.).

16S rRNA dizi analizlerinde FSN35, FMN15, NEA44 ve FMN06 izolatlarının *N. carnea*'a ile karşılaştırılan 1461 nt'lik bölgesinde 4-6 nükleotit farklılığına ve % 99,5-99,6 oranında benzerliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlar, 1454 nt'lik alanda *N. flavorosea* tip örneğine ise 6-8 nükleotit farklılığı ve %99,3-99,6 benzerlik oranı ile aynı dalda yer almışlardır. FMN18; 1407 nt'lik karşılaştırılan bölgede 13 nükleotit farklılığı ve %99,0 benzerlik ile *N. speluncae* ve *N. jinanensis*'e benzerlik göstermektedir. FMN18 izolatı 1455 nt'lik bölgede *N. carnea* ve *N. sienata* tip türlerine 26 nükleotit farklılığı (%98 nt benzerliği) gösterirken 27 nükleotit farklılığı ve %97,6 nükleotit benzerliği ile *N. flavorosea* tip türüyle filogenetik ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5., Şekil 4.5.).

FGN46 ve FGN17 izolatları ise 1397 nt'lik karşılaştırılan bölgede *N. jinanensis*'e 2-3 nükleotit farklılığı ile %99,7- 99,8 farklılık göstermektedir. 1407 nt'lik karşılaştırılan bölgede *N. speluncae* tip türüne 8-9 nükleotit farklılığı (%99,3 nt benzerliği) olan FGN17 ve FGN46 nolu izolatlar ise filogenetik dendrogramda aynı dalda yer almaktadırlar (Çizelge 4.5., Şekil 4.5.).

FSN27 ve FSN271 ile FGN39, FGN43 nolu toprak izolatları karşılaştırılan 1446 nt'lik bölgede 6-7 nükleotit farklılığı ve %99,4-99,5 oranında *N. takadensis*'e benzerlik göstererek aynı monofiletik hatta yer almıştır. FGN39 ve FGN43 izolatları en yakın akraba oldukları *N. takadensis*'le 1446 nt'lik bölgede 6 nükleotit farklılığı ve %99,5 benzerliği paylaşırlarken, *N. lijiangensis* tip türüne ile 17 nükleotit farklılığı ve %98,7 benzerlik paylaştığı belirlenmiştir. *N. takadensis*'le yakın ilişkili olan FSN27 ve FSN271 izolatlarının karşılaştırılan 1446 nt'lik bölgede 7 nükleotit farklılığı ve %99,4 benzerlik göstermektedir. Diğer en yakın tür olan *N. lijiangensis*'le ise 18 nükleotit farklılığı ve %98,6 benzerlik paylaşmaktadır (Çizelge



Şekil 4.5. Test organizmaları ile *Corynebacteriaceae* familyasından *Nocardia* cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 1000 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri nodlarda %50 üzerinde olanlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,05'dir.

Çizelge 4.5. Test izolatları ve *Nocardia* cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
1. <i>Rhodococcus equi</i> DSM4319T		72	81	57	63	62	60	61	64	62	66	42	67	53	57	59	63	54	72	61	41	57	63	64	64	62	60	66	58	61	45	45	62	42	57	55	62
2. <i>Gordonia terrae</i> DSM 43249T	94,4		74	71	92	95	92	93	95	93	83	77	87	77	90	81	90	90	82	71	84	76	94	71	71	93	93	91	94	92	77	77	68	77	93	85	68
3. <i>Nocardia thraciensis</i> A.2019T	93,7	94,3		57	44	50	52	53	54	52	43	54	50	53	61	49	56	61	38	38	67	43	49	42	42	48	52	44	52	53	57	57	38	54	51	67	38
4. <i>N. goodii</i> ATCC 2012T	95,6	94,5	95,6		47	48	48	47	50	50	37	36	30	36	31	49	56	35	37	42	34	41	47	43	43	46	44	46	46	45	41	39	42	36	47	49	42
5. <i>N. spelunceae</i> NZ-11T	95,1	92,9	96,6	96,4		10	23	28	29	29	34	35	34	39	38	43	46	47	40	44	42	39	9	44	44	8	23	13	23	24	38	38	42	35	24	48	42
6. <i>N. jinanensis</i> 04-5195T	95,2	92,7	96,1	96,3	99,2		22	29	28	30	34	34	38	40	37	44	47	48	42	48	41	40	3	48	48	2	24	13	22	25	37	37	46	34	23	47	46
7. <i>N. carneae</i> DSM 43397T	95,4	92,9	96,0	96,3	98,2	98,3		11	11	11	37	26	51	22	28	27	30	40	45	48	35	35	21	48	48	20	6	26	4	5	29	29	46	26	5	39	46
8. <i>N. flavorosea</i> JCM 3332T	95,3	92,8	95,9	96,4	97,8	97,7	99,1		11	11	41	31	49	23	35	28	31	41	47	51	41	40	28	51	51	27	7	27	7	6	34	34	49	31	8	44	49
9. <i>N. sienata</i> IFM 10088T	95,0	92,7	95,8	96,1	97,7	97,8	99,1	99,1		2	41	33	49	25	33	29	34	39	43	48	40	42	27	48	48	26	8	26	8	8	36	36	46	33	9	46	46
10. <i>N. testacea</i> JCM 12235T	95,2	92,8	96,0	96,1	97,7	97,7	99,1	99,8		41	33	49	25	33	29	34	39	45	48	40	42	29	48	48	28	8	28	8	8	36	36	46	33	7	46	46	
11. <i>N. vishniensis</i> AS 4.1860T	94,9	93,6	96,7	97,1	97,3	97,3	97,1	96,8	96,8	96,8		25	30	28	28	26	33	29	10	22	36	18	33	22	22	32	34	32	40	38	30	28	23	25	41	38	23
12. <i>N. abscessus</i> IMMIB D-1592T	96,7	94,1	95,8	97,2	97,3	97,3	98,0	97,6	97,4	97,4	98,0		36	15	16	24	29	20	32	35	15	17	33	38	38	32	30	36	28	29	5	3	39	0	29	13	39
13. <i>N. alba</i> YIM 30243T	94,8	93,3	96,1	97,7	97,3	97,0	96,0	96,2	96,2	96,2	97,7	97,2		37	32	45	54	31	24	35	32	38	37	34	34	36	47	37	47	46	41	39	35	36	48	49	35
14. <i>N. cyriacigeorgica</i> DSM 44484T	95,9	94,1	95,9	97,2	97,0	96,9	98,3	98,2	98,0	98,0	97,8	98,8	97,1		22	19	27	23	33	38	28	28	39	42	42	38	22	38	24	21	18	18	37	15	25	28	37
15. <i>N. asteroides</i> ATCC 19247T	95,6	93,1	95,3	97,6	97,0	97,1	97,8	97,3	97,4	97,4	97,8	98,7	97,5	98,3		31	36	18	32	39	20	29	36	38	38	35	31	39	29	31	21	19	39	16	30	29	39
16. <i>N. paucivorans</i> D-1632T	95,4	93,7	96,2	96,2	96,7	96,6	97,9	97,8	97,7	97,7	98,0	98,1	96,5	98,5	97,6		12	34	28	35	38	25	43	33	33	42	27	41	27	28	27	27	30	24	28	37	30
17. <i>N. brevicatena</i> DSM 43024T	95,1	93,1	95,7	95,7	96,4	96,4	97,7	97,6	97,3	97,3	97,4	97,7	95,8	97,9	97,2	98,0		42	39	42	43	27	46	42	42	45	32	44	28	31	32	32	39	29	29	42	39
18. <i>N. thailandica</i> IFM 10145T	95,8	93,1	95,3	97,3	96,4	96,3	96,9	96,8	97,0	97,0	97,7	97,7	97,6	98,2	98,6	97,3	96,7		31	40	19	37	47	40	40	46	38	44	40	37	25	23	41	20	41	33	41
19. <i>N. lijiangensis</i> YIM 33378T	94,4	93,7	97,0	97,1	96,9	96,7	96,5	96,4	96,7	96,5	99,2	97,5	98,1	97,4	97,5	97,8	97,0	97,6		18	41	21	41	16	16	40	42	38	46	44	37	35	17	32	47	45	17
20. <i>N. takelensis</i> MSI-3T	95,3	94,5	97,0	96,7	96,6	96,3	96,3	96,0	96,3	96,3	98,3	97,3	97,3	97,0	97,0	97,3	96,7	96,9	98,6		45	24	47	6	6	46	46	44	48	49	40	38	7	35	49	48	7
21. <i>N. shimofensis</i> IFM 10311T	96,8	93,5	94,8	97,3	96,7	96,8	97,3	96,8	96,9	96,9	97,2	98,8	97,5	97,8	98,4	97,0	96,7	98,5	96,8	96,5		32	40	47	47	39	37	43	35	36	20	18	48	15	36	28	48
22. <i>N. gamkensis</i> CZH20T	95,6	94,1	96,7	96,8	97,0	96,9	97,3	96,9	96,7	96,7	98,6	98,6	97,0	97,8	97,7	98,0	97,9	97,1	98,3	98,1	97,5		39	27	27	38	39	41	37	38	22	20	28	17	38	30	28
23. <i>Nocardia</i> sp. FGN17	95,1	92,8	96,2	96,4	99,3	99,7	98,3	97,8	97,9	97,7	97,4	97,4	97,1	97,0	97,2	98,0	96,4	96,4	96,8	96,4	96,9	97,0		47	47	1	23	12	21	24	36	36	45	33	22	46	45
24. <i>Nocardia</i> sp. FGN39	95,0	94,5	96,7	96,7	96,6	96,3	96,3	96,0	96,3	96,3	98,3	97,0	97,3	96,7	97,0	97,4	96,7	96,9	98,7	99,5	96,4	97,9	96,4		0	46	46	44	48	49	43	41	5	38	49	51	5
25. <i>Nocardia</i> sp. FGN43	95,0	94,5	96,7	96,7	96,6	96,3	96,3	96,0	96,3	96,3	98,3	97,0	97,3	96,7	97,0	97,4	96,7	96,9	98,7	99,5	96,4	97,9	96,4	100		46	46	44	48	49	43	41	5	38	49	51	5
26. <i>Nocardia</i> sp. FGN46	95,2	92,8	96,3	96,4	99,3	99,8	98,4	97,9	98,0	97,8	97,5	97,5	97,2	97,0	97,3	96,7	96,5	96,4	96,9	96,4	97,0	97,0	99,9	96,4	96,4		22	11	20	23	35	35	44	32	21	45	44
27. <i>Nocardia</i> sp. FMN06	95,4	92,8	96,0	96,6	98,2	98,1	99,5	99,4	99,3	99,3	97,3	97,7	96,4	98,3	97,6	97,9	97,5	97,0	96,7	96,4	97,1	97,0	98,2	96,4	96,4	98,3		26	6	5	33	33	44	30	7	43	44
28. <i>Nocardia</i> sp. FMN18	94,9	93,0	96,6	96,4	99,0	99,0	98,0	97,9	98,0	97,8	97,5	97,2	97,1	97,0	97,0	96,8	96,6	96,6	97,0	96,6	96,7	96,8	99,0	96,6	96,6	99,1	98,0		22	23	39	39	42	36	23	49	42
29. <i>Nocardia</i> sp. FMN15	95,5	92,8	96,0	96,4	98,2	98,3	99,6	99,4	99,3	99,3	96,9	97,8	96,4	98,1	97,7	97,9	97,8	96,9	96,4	96,3	97,3	97,1	98,3	96,3	96,3	98,4	99,5	98,3		3	31	31	46	28	1	41	46
30. <i>Nocardia</i> sp. NE444	95,3	92,9	95,9	96,5	98,1	98,0	99,6	99,5	99,3	99,3	97,0	97,7	96,4	98,3	97,6	97,8	97,6	97,1	96,6	96,2	97,2	97,0	98,1	96,2	96,2	98,2	99,6	98,2	99,7		32	32	47	29	4	42	47
31. <i>Nocardia</i> sp. FSN13	96,5	94,1	95,6	96,8	97,0	97,1	97,7	97,3	97,2	97,2	97,7	99,6	96,8	98,6	98,3	97,9	97,5	98,0	97,1	96,9	98,4	98,3	97,2	96,7	96,7	97,3	97,4	97,0	97,6	97,5		2	42	5	32	12	42
32. <i>Nocardia</i> sp. FSN14	96,5	94,1	95,6	97,0	97,0	97,1	97,7	97,3	97,2	97,2	97,8	99,7	97,0	98,6	98,5	97,9	97,5	98,2	97,3	97,0	98,6	98,4	97,2	96,8	96,8	97,3	97,4	97,0	97,6	97,5	99,8		42	3	32	10	42
33. <i>Nocardia</i> sp. FSN27	95,2	94,7	97,0	96,7	96,7	96,4	96,4	96,2	96,4	96,4	98,2	97,0	97,3	97,1	97,0	97,7	97,0	96,8	98,6	99,4	96,3	97,8	96,5	99,6	99,6	96,6	96,6	96,7	96,4	96,4	96,7	96,7		39	47	52	0
34. <i>Nocardia</i> sp. FSN34	96,7	94,1	95,8	97,2	97,3	97,3	98,0	97,6	97,4	97,4	98,0	100	97,2	98,8	98,7	98,1	97,7	98,4	97,5	97,3	98,8	98,6	97,4	97,0	97,0	97,5	97,7	97,2	97,8	97,7	99,6	99,7	97,0		29	13	39
35. <i>Nocardia</i> sp. FSN35	95,6	92,8	96,0	96,4	98,1	98,2	99,6	99,3	99,3	99,4	96,8	97,7	96,3	98,0	97,7	97,8	97,7	96,8	96,4	96,2	97,2	97,0	98,3	96,2	96,2	98,3	99,4	98,2	99,9	99,6	97,5	97,5	96,4	97,7		42	47
36. <i>Nocardia</i> sp. FSN37	95,7	93,4	94,8	96,2	96,3	96,4	97,0	96,6	96,4	96,4	97,0	99,0	96,2	97,8	97,7	97,1	96,7	97,4	96,5	96,3	97,8	97,7	96,4	96,0	96,0	96,5	96,7	96,2	96,8	96,7	99,0	99,2	96,0	99,0	96,7		52
37. <i>Nocardia</i> sp. FSN271	95,2	94,7	97,0	96,7	96,7	96,4	96,4	96,2	96,4	96,4	98,2	97,0	97,3	97,1	97,0	97,7	97,0	96,8	98,6	99,4	96,3	97,8	96,5	99,6	99,6	96,6	96,6	96,7	96,4	96,4	96,7	96,7	100	97,0	96,4	96,0	

4.5., Şekil 4.5.). FGN39 ve FGN43 izolatlarının FSN27 ve FSN271 izolatlarından 5 nükleotit farklılığına ve %99,6 benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Nocardia cinsi ile ilişkili olduğu belirlenen FSN34, FSN13, FSN37 ve FSN14 izolarlarının *N. abscessus*'la 1446 nt'lik karşılaştırılan lokusunda 0-13 nükleotit farklılığı gösterdiği ve filogenetik ağaçta aynı dalda yer aldığı belirlenmiştir. FSN13 izolatı *N. abscessus*'la 5 nükleotit farklılığı gösterirken, *N. cyriacigeorgica* ile 18 nükleotit farklılığı gözlemlenmiştir. FSN14 izolatı *N. abscessus*'la 3 nükleotit farklılığı ve *N. cyriacigeorgica* ile 18 nükleotit farklılığına sahip olduğu görülmektedir. FSN34 izolatının *N. abscessus*'la %100 nükleotit benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir. FSN37 izolatı bu grup içerisinde *N. abscessus*'la 13 nükleotit farklılığı ve %99 benzerlik ve *N. cyriacigeorgica* ile 28 nükleotit farklılığı ile %97,8 benzerlik paylaştığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.5., Şekil 4.5.).

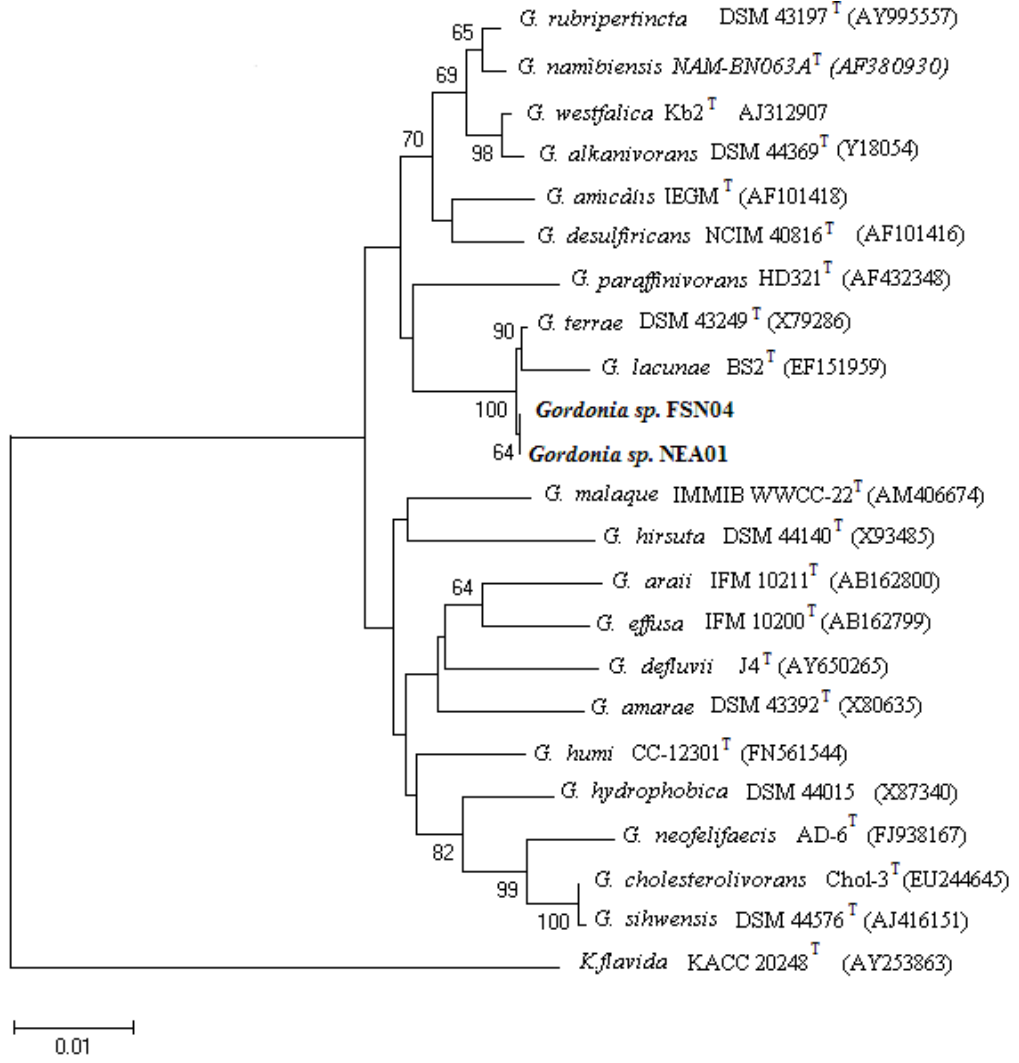
FSN04 ve NEA01 izolatları *Gordonia terrae* 1445 nt'lik karşılaştırılan lokusunda 2 nükleotit farklılığı (%99,8 nt benzerliği) ve *G. lacunae* ile 1428 nt'lik bölgede 9 nükleotit farklılığı (%99,3 nt benzerliği) göstererek *Gordonia* cinsine ait tip türleri ile birlikte filogenetik bir ağaç oluşturmaktadır (Çizelge 4.6., Şekil 4.6.).

FMN08 test organizması, 1452 nt'lik bölgede *Nocardioides albus*'a 6 ve *N. luteus* tip türüne 9 nükleotit farklılığı ve sırasıyla %99,5 ve 99.3 oranında benzerlik göstererek aynı dalda yer almıştır. *N. marinus* tip türüne ise 45 nükleotit farklılığı ve %96,6 benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.8., Şekil 4.8.).

FMN26, FSN06, FMN22 ve FSN23 izolatları karşılaştırılan 1412-1421 nt'lik bölgelerde *Kribbella* cinsine ait *K. hippodromi*, *K. aluminosa*, *K. jejuensis* ve *K. swartbergensis* tip örnekleri ile en yakın filogenetik ilişki gösterdiği belirlenmiştir. FSN06 izolatı *K. swartbergensis* tip örneğine 1412 nt'lik bölgede 11 nükleotit farklılığı (%99,1 nt benzerliği) ve *K. aluminosa* türü ile karşılaştırılan 1421 nt'lik bölgede ise 17 nükleotit farklılığına (%98,7 nt benzerliği) sahip olduğu belirlenmiştir. FSN23, 1412 nt'lik bölgede *K. hippodromi* ve *K. aluminosa*'a 15 nükleotit farklılığı ve %98,8 benzerlik gösterirken, karşılaştırılan 1412 nt'de FMN22 ve FMN26 izolatlarının da *K. swartbergensis* ve *K. aluminosa* tip türleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Belirtilen izolatlar, 10-12 nükleotit farklılığı (%99,2-99 nt benzerliği) ile

K. swartbergensis tip örneğine filogenetik olarak en yakın olduğu belirlenmiştir. *K. aluminosa* tip türüne ise 15-18 nükleotit farklılığı ve %98,6-98,8 benzerlik göstermektedirler (Çizelge 4.7., Şekil 4.7.).

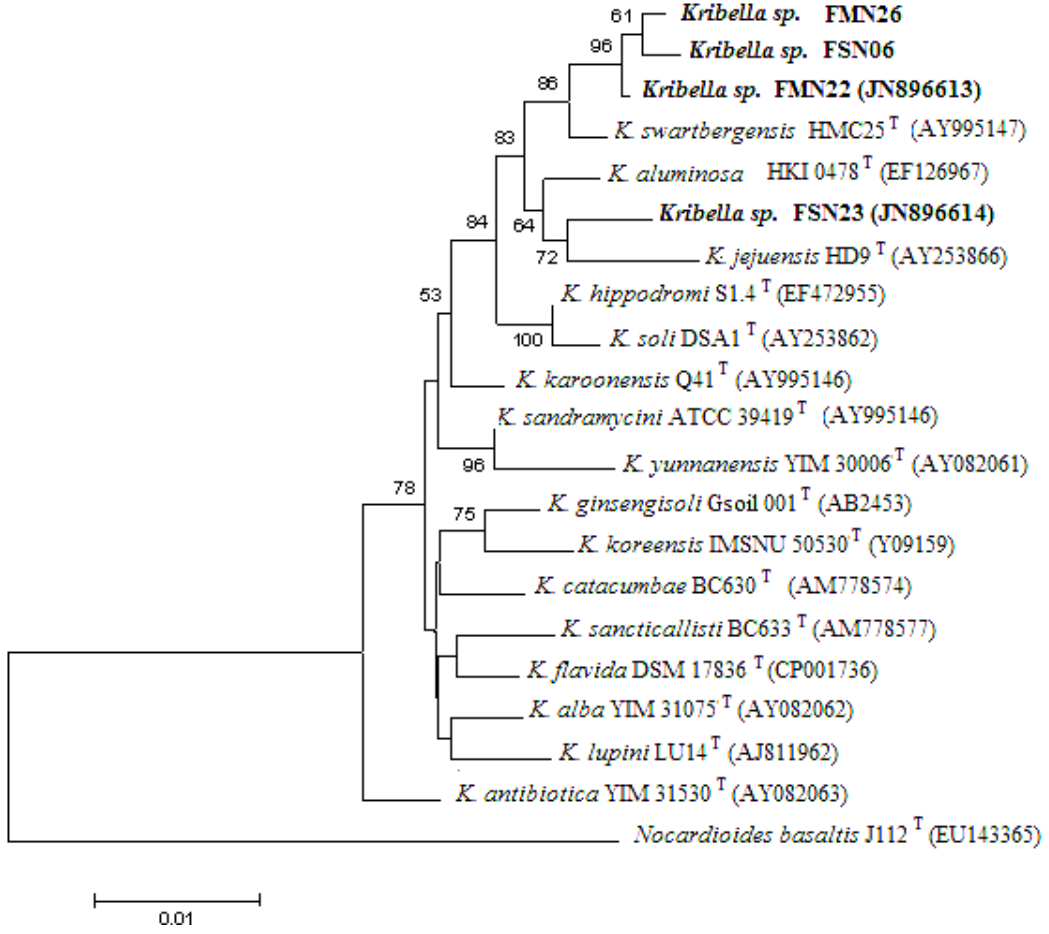
İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen nocardioform izolatların 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri sonucunda filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. *Nocardia* sp. izolatları kendi aralarında 0-53 nükleotit farklılığı ve %95,9-100 nükleotit benzerliği göstermiştir. *Gordonia* sp. izolatlarının ise birbirleriyle %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Kribbella* sp. izolatları birbirlerinden 3-22 nükleotit farklılığına ve %98,3-99,7 nükleotit benzerliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5.-4.8., Şekil 4.5.-4.8.).



Şekil 4.6. Test organizmaları ile *Corynebacteriaceae* familyasından *Gordonia* cinsine ait tip türlerinin **16S rRNA** gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 1000 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri nodlarda %50 üzerinde olanlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,1'dir.

Çizelge 4.6. Test izolatları ve *Gordonia* cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

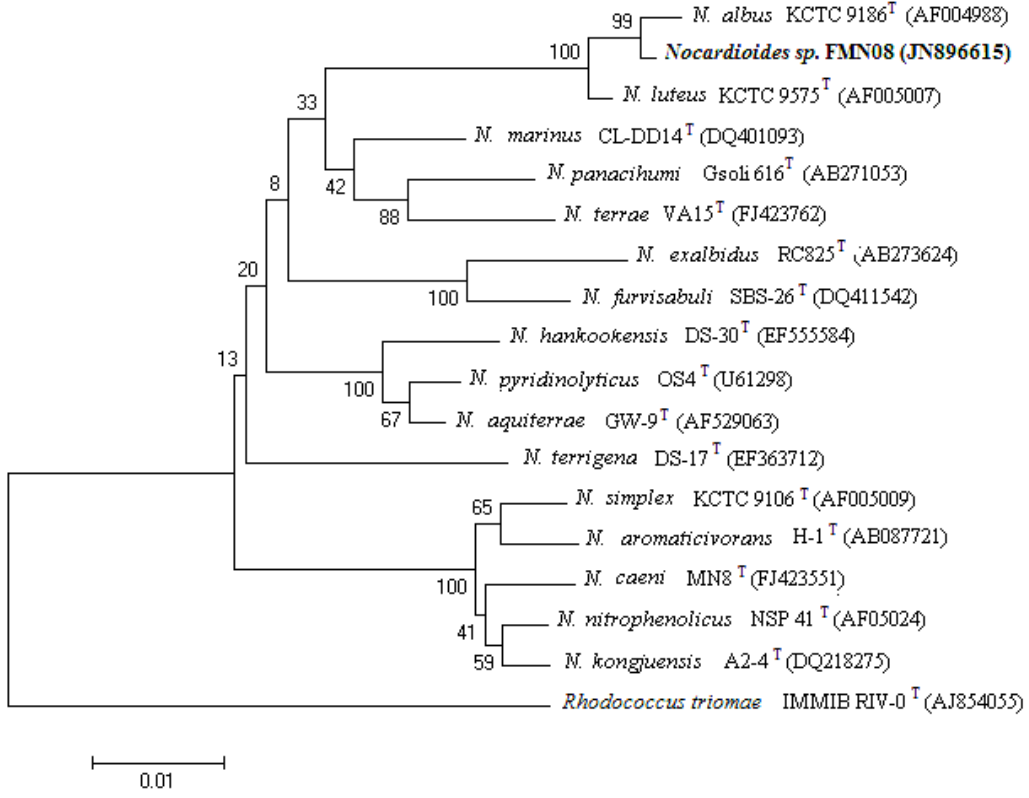
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. <i>K. flava</i> DSM 17836T		143	141	148	138	141	143	142	143	141	151	145	148	146	143	148	138	151	149	148	146	143	143
2. <i>G. terrae</i> DSM 43249T	89,5		24	9	29	26	33	31	35	33	37	30	37	36	37	42	47	43	43	47	56	2	2
3. <i>G. rubripertincta</i> DSM 43197T	89,6	98,2		31	10	5	36	11	31	12	44	17	42	43	33	31	35	41	32	42	56	22	22
4. <i>G. lacunae</i> BS2T	89,1	99,3	97,7		36	33	40	38	42	40	44	37	44	43	44	49	54	50	50	54	63	9	9
5. <i>G. westfalica</i> Kb2T	89,8	97,8	99,2	97,3		8	35	21	31	4	39	27	44	38	39	31	37	45	32	38	53	27	27
6. <i>G. namibiensis</i> NAM-BN063AT	89,6	98,0	99,6	97,5	99,4		38	16	32	12	40	22	42	42	35	32	36	41	33	37	58	24	24
7. <i>G. humi</i> CC-12301T	89,5	97,5	97,3	97,0	97,4	97,2		40	29	35	39	39	33	32	56	32	31	35	33	32	41	33	33
8. <i>G. amicalis</i> IEGMT	89,5	97,7	99,1	97,2	98,4	98,8	97,0		40	21	52	18	46	45	33	24	42	48	25	31	56	29	29
9. <i>G. hydrophobica</i> DSM 44015T	89,5	97,4	97,7	96,9	97,7	97,6	97,8	97,0		35	35	36	37	37	46	25	32	43	26	27	50	35	35
10. <i>G. alkanivorans</i> DSM 44369T	89,6	97,5	99,1	97,0	99,7	99,1	97,4	98,4	97,4		40	25	45	40	43	33	37	43	34	40	53	31	31
11. <i>G. araii</i> IFM 10211T	88,9	97,2	96,7	96,7	97,1	97,0	97,1	96,1	97,4	97,0		46	36	27	57	41	43	32	42	40	54	35	35
12. <i>G. desulfuricans</i> NCIMB 40816T	89,3	97,7	98,7	97,2	98,0	98,3	97,1	98,6	97,3	98,1	96,6		37	39	42	34	38	40	35	40	53	30	30
13. <i>G. amarae</i> DSM 43392T	89,1	97,2	96,9	96,7	96,7	96,9	97,5	96,6	97,2	96,6	97,3	97,2		33	49	45	42	36	46	47	44	35	35
14. <i>G. effusa</i> IFM 10200T	89,2	97,3	96,8	96,8	97,2	96,9	97,6	96,6	97,2	97,0	98,0	97,1	97,5		58	39	45	39	40	37	49	34	34
15. <i>G. paraffinivorans</i> HD321T	89,5	97,2	97,5	96,7	97,1	97,4	95,8	97,5	96,6	96,8	95,8	96,9	96,4	95,7		44	52	60	45	52	59	35	35
16. <i>G. cholesterolivorans</i> Chol-3T	89,1	96,9	97,7	96,4	97,7	97,6	97,6	98,2	98,1	97,5	96,9	97,5	96,6	97,1	96,7		37	45	1	16	52	42	42
17. <i>G. malaquae</i> IMMIB WWCC-22T	89,8	96,5	97,4	96,0	97,2	97,3	97,7	96,9	97,6	97,2	96,8	97,2	96,9	96,6	96,1	97,2		32	38	37	40	47	47
18. <i>G. defluvii</i> J4T	88,9	96,8	96,9	96,3	96,6	96,9	97,4	96,4	96,8	96,8	97,6	97,0	97,3	97,1	95,5	96,6	97,6		46	50	54	43	43
19. <i>G. sihwensis</i> DSM 44576T	89,0	96,8	97,6	96,3	97,6	97,5	97,5	98,1	98	97,5	96,9	97,4	96,6	97,0	96,6	99,9	97,2	96,6		17	53	43	43
20. <i>G. neofelifaecis</i> AD-6T	89,1	96,5	96,9	96,0	97,2	97,2	97,6	97,7	98,0	97,0	97,0	97,0	96,5	97,2	96,1	98,8	97,2	96,3	98,7		55	47	47
21. <i>G. hirsuta</i> DSM 44140T	89,2	95,8	95,8	95,3	96,1	95,7	96,9	95,8	96,3	96,1	96,0	96,1	96,7	96,4	95,6	96,1	97,0	96,0	96,1	95,9		54	54
22. <i>Gordonia</i> sp. FSN04	89,5	99,8	98,3	99,3	98,0	98,2	97,5	97,8	97,4	97,7	97,4	97,7	97,4	97,5	97,4	96,9	96,5	96,8	96,8	96,5	96,0		0
23. <i>Gordonia</i> sp. NEA01	89,5	99,8	98,3	99,3	98,0	98,2	97,5	97,8	97,4	97,7	97,4	97,7	97,4	97,5	97,4	96,9	96,5	96,8	96,8	96,5	96,0	100	



Şekil 4.7. Test organizmaları ile *Nocardoidaceae* familyasından *Kribbella* cinsine ait tip türlerinin **16S rRNA** gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 1000 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri nodlarda %50 üzerinde olanlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,1'dir.

Çizelge 4.7. Test izolatları ve *Kribbella* cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. <i>K. hippodromi</i> S1.4T		13	14	19	20	21	4	11	12	14	19	20	21	24	23	21	94	18	20	19	15
2. <i>K. aluminosa</i> HKI 0478T	99,0		15	16	21	23	17	21	16	22	20	24	31	23	26	24	99	15	18	17	15
3. <i>K. swartbergensis</i> HMC25T	98.9	98.8		21	22	26	18	20	16	23	22	19	30	26	30	26	100	10	12	11	20
4. <i>K. jejuensis</i> HD9T	98.5	98.7	98.4		32	34	23	26	24	29	30	33	36	34	35	34	104	20	23	22	18
5. <i>K. catacumbae mbae</i> BC630	98.4	98.4	98.3	97.5		15	24	14	16	16	14	17	24	16	19	16	93	22	24	29	27
6. <i>K. sancticallisti</i> BC633T	98.4	98.2	98,0	97.4	98.8		25	17	17	13	17	16	27	21	21	21	95	28	30	31	28
7. <i>K. solani</i> DSA1T	99.6	98.7	98.6	98.2	98.1	98.1		15	16	18	23	24	25	28	27	25	97	22	24	23	19
8. <i>K. sandramycini</i> ATCC 39419T	99.1	98.4	98.4	98,0	98.9	98.7	98.8		10	12	16	16	10	18	15	13	93	22	24	27	22
9. <i>K.karoonensis</i> Q41T	99,0	98.7	98.7	98.1	98.7	98.7	98.7	99.2		12	14	15	20	18	18	15	96	22	24	23	24
10. <i>K.flavida</i> DSM 17836T	98.9	98.3	98.2	97.8	98.7	99,0	98.6	99,0	99,0		12	15	22	20	22	14	93	25	27	28	25
11. <i>K.alba</i> YIM 31075T	98.5	98.4	98.3	97.7	98.9	98.7	98.2	98.7	98.9	99,0		15	26	18	23	14	90	27	29	28	25
12. <i>K.ginsengisoli</i> Gsoil 001T	98.4	98.1	98.5	97.5	98.7	98.7	98.1	98.7	98.8	98.8	98.8		26	12	21	20	96	21	23	24	29
13. <i>K.yunnanensis</i> YIM 30006T	98.4	97.6	97.7	97.2	98.1	97.9	98.1	99.2	98.4	98.3	98,0	98,0		28	23	23	98	32	34	37	32
14. <i>K.koreensis</i> IMSNU 50530T	98.1	98.2	98,0	97.4	98.7	98.4	97.8	98.6	98.6	98.4	98.6	99,0	97.8		19	21	97	30	32	33	31
15. <i>K.antibiotica</i> YIM 31530T	98.2	98,0	97.7	97.3	98.5	98.4	97.9	98.8	98.6	98.3	98.2	98.4	98.2	98.5		22	87	30	32	37	34
16. <i>K.lupini</i> LU14T	98.4	98.1	98,0	97.4	98.7	98.4	98.1	99,0	98.8	98.9	98.9	98.4	98.2	98.4	98.3		96	28	30	33	29
17. <i>N.basaltis</i> J112T	92.9	92.5	92.4	92.1	93,0	92.8	92.7	93,0	92.7	93,0	93.2	92.7	92.6	92.7	93.4	92.7		100	102	105	99
18. <i>Kribbella</i> sp.FMN22	98.6	98.8	99.2	98.4	98.3	97.8	98.3	98.3	98.3	98.1	97.9	98.4	97.5	97.7	97.7	97.8	92.4		3	8	19
19. <i>Kribbella</i> sp.FMN26	98.4	98.6	99,0	98.2	98.1	97.7	98.1	98.1	98.1	97.9	97.8	98.2	97.4	97.5	97.5	97.7	92.3	99.7		5	22
20. <i>Kribbella</i> sp.FSN06	98.5	98.7	99.1	98.3	97.8	97.6	98.2	97.9	98.2	97.8	97.8	98.1	97.2	97.5	97.2	97.5	92.1	99.3	99.6		21
21. <i>Kribbella</i> sp.FSN23	98.8	98.8	98.4	98.6	97.9	97.8	98.5	98.3	98.1	98.1	98.1	97.8	97.5	97.6	97.4	97.8	92.5	98.5	98.3	98.4	



Şekil 4.8. Test organizmaları ile *Nocardioideae* familyasından *Nocardioideae* cinsine ait tip türlerinin **16S rRNA** gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 1000 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,1'dir.

Çizelge 4.8. Test izolatları ve *Nocardioidea* cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>R. triatomae</i> IMMIB RIV-0T		119	118	116	108	106	111	110	115	125	116	120	127	111	120	118	131	116
2. <i>N. albus</i> KCTC 9186T	91,1		13	49	60	67	67	69	70	68	79	72	73	69	73	74	66	6
3. <i>N. luteus</i> KCTC 9575T	91,2	99,0		36	47	61	60	56	68	66	76	68	63	58	69	70	60	9
4. <i>N. marinus</i> CL DD14T	91,3	96,3	97,3		27	35	32	26	62	57	57	60	48	38	60	62	43	45
5. <i>N. panacihumi</i> Gsoil 616T	91,9	95,5	96,5	97,9		28	42	35	70	64	65	71	65	42	67	70	60	56
6. <i>N. terrae</i> VA15T	92,1	95,0	95,4	97,3	97,9		50	44	61	65	61	61	62	48	62	66	64	63
7. <i>N. pyridinolyticus</i> OS4T	91,7	95,0	95,5	97,6	96,8	96,2		9	57	46	46	56	59	17	49	57	47	65
8. <i>N. aquiterrae</i> GW-9T	91,8	94,8	95,8	98,0	97,3	96,7	99,3		56	55	47	59	58	22	56	58	45	65
9. <i>N. simplex</i> KCTC 9106T	91,4	94,7	94,9	95,3	94,7	95,4	95,7	95,8		20	63	17	67	64	22	15	61	68
10. <i>N. nitrophenolicus</i> NSP 41T	90,6	94,9	95,0	95,7	95,2	95,1	96,5	95,9	98,5		63	18	65	57	10	17	60	68
11. <i>N. terrigena</i> DS-17T	91,3	94,1	94,3	95,7	95,1	95,4	96,5	96,5	95,3	95,3		69	68	56	64	63	55	80
12. <i>N. caeni</i> MN8T	91,0	94,6	94,9	95,5	94,7	95,4	95,8	95,6	98,7	98,6	94,8		66	62	14	21	63	70
13. <i>N. exalbidus</i> RC825T	90,5	94,5	95,3	96,4	95,1	95,3	95,6	95,6	95,0	95,1	94,9	95,0		63	64	67	27	69
14. <i>N. hankookensis</i> DS-30T	91,7	94,8	95,6	97,1	96,8	96,4	98,7	98,3	95,2	95,7	95,8	95,3	95,3		57	68	55	65
15. <i>N. kongjuensis</i> A2-4T	91,0	94,5	94,8	95,5	95,0	95,3	96,3	95,8	98,3	99,2	95,2	98,9	95,2	95,7		17	60	71
16. <i>N. aromaticivorans</i> H-1T	91,2	94,4	94,7	95,3	94,7	95,0	95,7	95,6	98,8	98,7	95,3	98,4	95,0	94,9	98,7		60	74
17. <i>N. furvisabuli</i> SBS-26T	90,2	95,0	95,5	96,8	95,5	95,2	96,5	96,6	95,4	95,5	95,9	95,3	97,9	95,9	95,5	95,5		64
18. <i>Nocardioidea</i> sp. FMN08	91,3	99,5	99,3	96,6	95,8	95,3	95,1	95,1	94,9	94,9	94,0	94,7	94,8	95,1	94,7	94,4	95,2	

4.6.2. *rpoB* Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması

MF ve MR primerleri kullanılarak *rpoB* gen bölgesi amplifiye edilen test organizmalarının, dizi eldesinde de MF primeri kullanılmıştır (Kim ve ark., 2003). <http://www.ebi.ac.uk> web adresinden elde edilen *rpoB* dizileri MEGA4.1 programı kullanılarak hizalanmış ve 285-306 bp'lık elde edilen diziler filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

Nocardia cinsine ait izolat ve tip türlerinin toplu hizalaması yapılmış ve boşluklar çıkartıldıktan sonra elde edilen 302 nt'lik bölgenin filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Test organizmaları ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritması kullanılarak oluşturuldu. Neighbour-joining algoritmasında filogenetik uzaklık matriksi olarak Jukes-Cantor metodu kullanıldı (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 100 tekrarlı olarak Mega 4.1. (Kumar ve ark., 2008) ve Phylip-3.69 paket programlarında gerçekleştirildi. *Nocardia* filogenetik dendrogramında *Micromonospora coxensis*, *Kribbella* ve *Nocardioides* dendrogramında *Nonomuraea salmonea* dış grup olarak kullanıldı. Nocardioform gruplarını temsil eden çalışma izolatları ile oluşturulan toplu analizler sonucu elde edilen filogenetik ağaçta *Streptomyces althioticus*, *Actinomadura formosensis* ile *Micromonospora coxensis* dış grup olarak kullanıldı. Nocardioform gruplarını temsil eden çalışma izolatları ile ilgili tip türlerinin *rpoB* nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbour-joining matriksiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 4.9.-4.11.'de verilmiştir.

FSN35 ve FMN15 nolu izolatlarda 6-9 nükleotit farklılığı ve %97-98 benzerlik oranıyla *N. testacea*'a, *N. speluncae*'a tip türü ile de 12-17 nükleotit farklılığı ve %95,8-97,9 nükleotit benzerliği paylaştığı belirlenmiştir. FMN18 nolu izolat, 11 nükleotit farklılığı ve %96,2 nükleotit benzerliği ile filogenetik olarak en yakın ilişkisinin *Nocardia testacea*'a tip türü ile olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatın, *N. speluncae*'a ile %93,1 nükleotit benzerliği paylaştığı ve 20 nükleotit farklılığına sahip olduğu görülmüştür. FMN06 toprak izolatı ise *N. testacea*'a 11 nükleotit farklılığı (%96,2 nt benzerliği) ve 15 nükleotit farklılığı (%93 nt benzerliği) ile *N. speluncae*'a benzerlik

göstermektedir (Çizelge 4.9.).

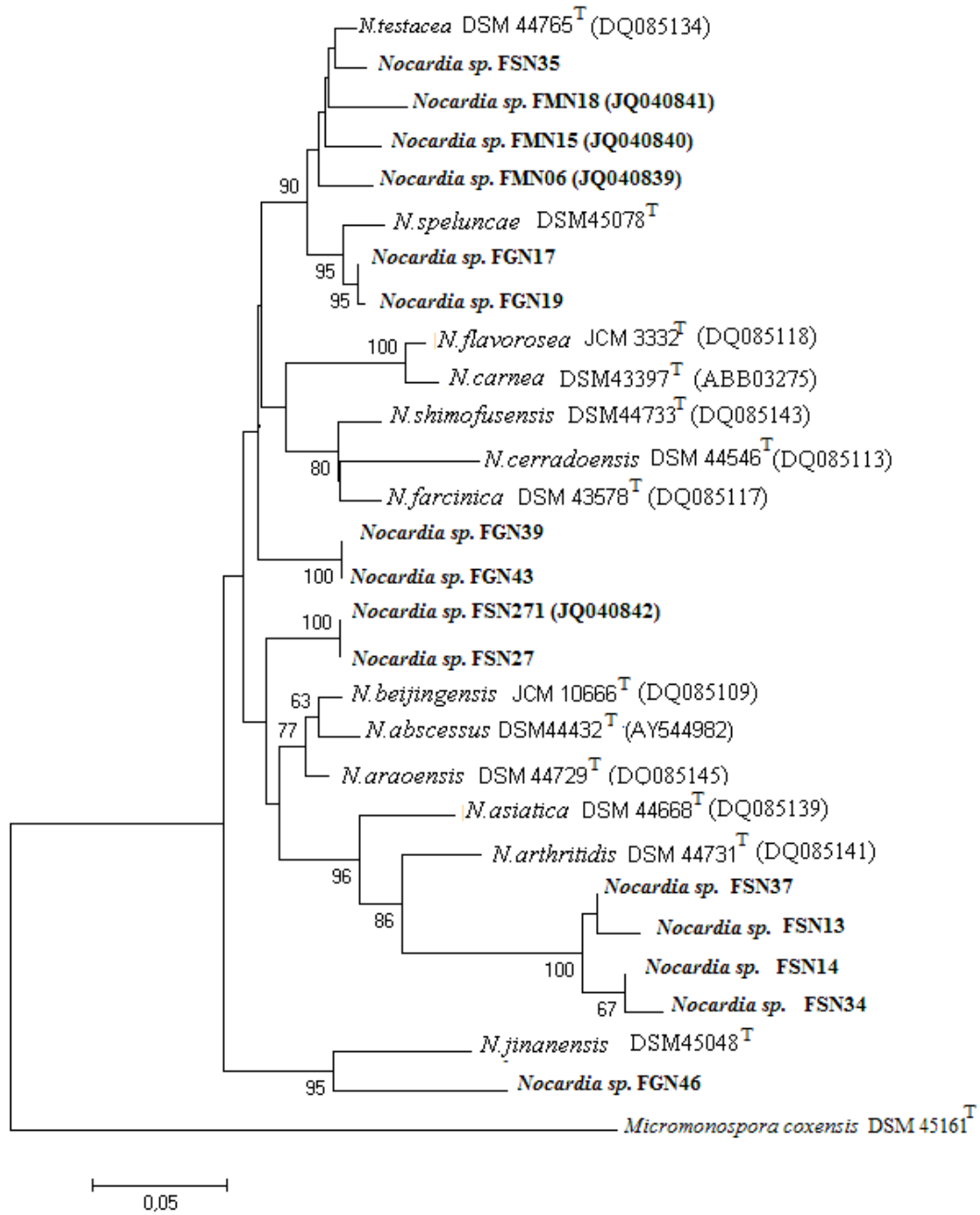
N. speluncae'a 6-7 nükleotit farklılığı (97,5-97,9 nt benzerliği) olduğu belirlenen FGN17 ve FGN19 toprak izolatları *N. testacea* ile 11-12 nükleotit farklılığı (%96-96,3 nt benzerliği) göstermektedir (Çizelge 4.9., Şekil 4.9.).

FGN39, FGN43; FSN27 ve FSN271 *rpoB* gen bölgesi analiz sonuçlarına göre; FGN39 ile FGN43 nolu izolatlar *N. araoensis* ile *N. beijingensis* tip türlerine 17 (%94,1), *N. abscessus*'a 22 nükleotit farklılığı (%92,4 nt benzerliği) göstermektedirler. FSN27 ve FSN271 izolatlarında *N. abscessus*'a 14 nükleotit farklılığı (%95,1 nt benzerliği), *N. araoensis* ile *N. beijingensis* tip türleri ile 15 nükleotit farklılığı (%94,8 nt benzerliği) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9.).

FSN37, FSN13, FSN14 ve FSN34 test izolatları 26-36 nükleotit farklılığı (%87,6-91 nt benzerliği) ile *N. arthritidis* tip türüne en yakın ilişkili iken 33-40 nükleotit farklılığı (% 86,2-88,6 nt benzerliği) ile *N. asiatica* tip suşuyla beraber dendrogramda yer almaktadırlar (Çizelge 4.9.).

Kribbella ve *Nocardioide*s cins üyeleri ile ilişkili olan izolatların toplu hizalaması yapılmış ve boşluklar çıkartıldıktan sonra elde edilen 289 nt'lik bölgenin filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. FMN22, FMN26 ve FSN23 toprak izolatları *rpoB* dizi analizleri sonucu *K. hippodromi*, *K. aluminosa* ve *K. swartbergensis* tip türleri ile 7-35 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir. FMN22 ile FMN26 izolatları *K. aluminosa*'a 9 nükleotit farklılığı (%96,8 nt benzerliği), *K. hippodromi*'e 11 nükleotit farklılığı (%96,1 nt benzerliği) ve *K. swartbergensis* tip suşu ile 13 nükleotit farklılığı (%95,5 nt benzerliği) olduğu görülmektedir. FSN23 *K. hippodromi*'e 7 nükleotit farklılığı (%97,5 nt benzerliği), *K. aluminosa*'a 11 nükleotit farklılığı (%96,1 nt benzerliği) ve *K. swartbergensis* tip suşu ile 13 nükleotit farklılığı (%95,5 nt benzerliği) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10., Şekil 4.10.).

*Nocardioide*s sp. FMN08 izolatu ve *N. luteus* tip türü arasında 6 nükleotit farklılığı ve %97,9 nükleotit benzerliği, *N. albus*'la ise 7 nükleotit farklılığı ve %97,5 nükleotit benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10.).

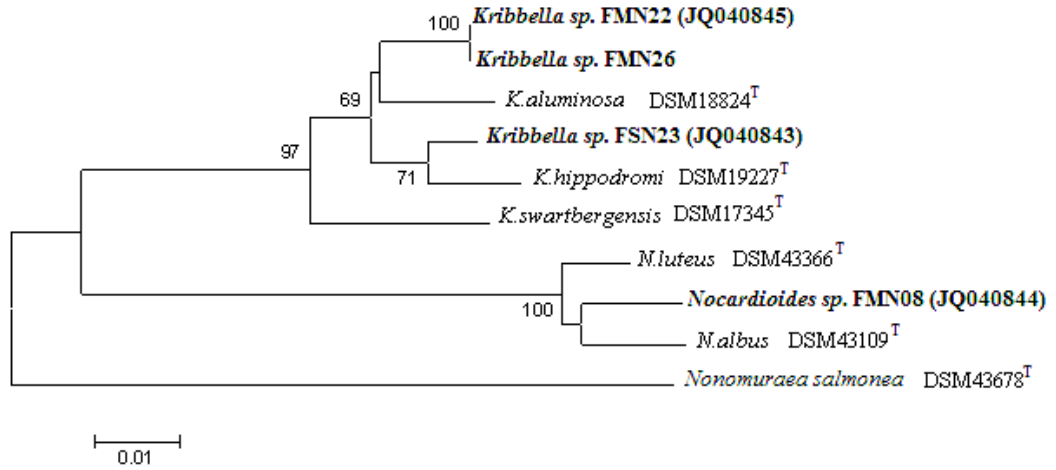


Şekil 4.9. *Nocardia* sp. izolatlarının MF primeri ile okutulan *rpoB* gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 100 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,5'dir.

Çizelge 4.9. Test izolatları ve *Nocardia* cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki *rpoB* dizisine bağlı nükleotit sayı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1. <i>Micromonospora coxensis</i> DSM 45161T		95	88	84	82	92	90	86	87	89	92	88	89	88	84	86	87	87	87	93	83	102	85	87	90	105	102	84	104
2. <i>N. jinanensis</i> DSM45048T	64,9		42	39	38	43	41	41	47	41	53	40	41	38	35	38	37	34	34	32	41	59	41	41	47	61	59	35	62
3. <i>N. speluncae</i> DSM45078T	67,2	85,5		23	25	32	32	15	34	26	35	24	32	27	24	6	7	21	21	39	12	45	15	17	20	48	45	24	49
4. <i>N. araoensis</i> DSM44729T	68,5	86,5	92,0		6	30	28	18	23	17	23	15	30	9	15	22	23	17	17	44	21	42	23	25	25	47	47	15	51
5. <i>N. beijingensis</i> JCM10666T	69,2	86,9	91,4	97,9		30	29	20	25	19	20	16	30	7	15	25	26	17	17	44	23	40	25	29	29	45	45	15	49
6. <i>N. cerraensis</i> DSM44546T	65,8	85,2	89,0	89,6	89,6		31	32	39	19	44	19	32	30	31	31	32	33	33	53	33	56	33	36	39	58	51	31	54
7. <i>N. flavovirens</i> JCM3332T	66,5	85,9	89,0	90,3	90,0	89,3		24	42	22	46	27	6	29	30	27	26	25	25	48	28	53	30	28	33	55	55	30	58
8. <i>N. testacea</i> DSM44765T	67,8	85,9	94,8	93,8	93,1	89,0	91,7		33	18	32	21	24	23	23	11	12	19	19	38	6	46	11	9	11	51	48	23	52
9. <i>N. asiatica</i> DSM44668T	67,5	83,8	88,3	92,0	91,4	86,5	85,5	88,6		34	22	28	43	24	28	35	36	32	32	48	34	33	32	39	38	38	36	28	40
10. <i>N. farcinica</i> DSM43578T	66,8	85,9	91,0	94,1	93,4	93,4	92,4	93,8	88,3		34	10	24	21	24	22	23	22	22	48	23	49	24	22	26	51	48	24	51
11. <i>N. arthritidis</i> DSM44731T	65,8	81,7	87,9	92,0	93,1	84,8	84,1	89,0	92,4	88,3		30	49	25	32	37	38	36	36	46	35	26	37	41	41	31	32	32	36
12. <i>N. shimojensis</i> DSM44733T	67,2	86,2	91,7	94,8	94,5	93,4	90,7	92,7	90,3	96,5	89,6		27	16	20	23	24	24	24	49	24	46	24	26	28	51	47	20	51
13. <i>N. carnea</i> DSM43397T	66,8	85,9	89,0	89,6	89,6	89,0	97,9	91,7	85,2	91,7	83,1	90,7		32	33	28	27	25	25	51	28	58	29	29	35	59	60	33	62
14. <i>N. abscessus</i> DSM44432T	67,2	86,9	90,7	96,9	97,5	89,6	90,0	92,0	91,7	92,7	91,4	94,5	89,0		14	26	27	22	22	42	26	37	25	30	30	42	44	14	48
15. <i>Nocardia</i> sp. FSN271	68,5	87,9	91,7	94,8	94,8	89,3	89,6	92,0	90,3	91,7	89,0	93,1	88,6	95,1		23	22	16	16	43	20	35	24	27	26	40	40	0	44
16. <i>Nocardia</i> sp. FGN17	67,8	86,9	97,9	92,4	91,4	89,3	90,7	96,2	87,9	92,4	87,2	92,0	90,3	91,0	92,0		1	19	19	37	9	46	13	11	17	49	45	23	49
17. <i>Nocardia</i> sp. FGN19	67,5	87,2	97,5	92,0	91,0	89,0	91,0	95,8	87,6	92,0	86,9	91,7	90,7	90,7	92,4	99,6		20	20	38	10	47	14	12	18	50	46	22	50
18. <i>Nocardia</i> sp. FGN39	67,5	88,3	92,7	94,1	94,1	88,6	91,4	93,4	89,0	92,4	87,6	91,7	91,4	92,4	94,5	93,4	93,1		0	42	18	45	22	22	24	48	48	16	52
19. <i>Nocardia</i> sp. FGN43	67,5	88,3	92,7	94,1	94,1	88,6	91,4	93,4	89,0	92,4	87,6	91,7	91,4	92,4	94,5	93,4	93,1	100		42	18	45	22	22	24	48	48	16	52
20. <i>Nocardia</i> sp. FGN46	65,5	89,0	86,5	84,8	84,8	81,7	83,5	86,9	83,5	83,5	84,1	83,1	82,4	85,5	85,2	87,2	86,9	85,5	85,5		38	50	40	40	44	54	55	43	58
21. <i>Nocardia</i> sp. FSN35	68,8	85,9	95,8	92,7	92,0	88,6	90,3	97,9	88,3	92,0	87,9	91,7	90,3	91,0	93,1	96,9	96,5	93,8	93,8	86,9		45	12	11	12	50	47	20	51
22. <i>Nocardia</i> sp. FSN37	62,5	79,7	84,5	85,5	86,2	80,7	81,7	84,1	88,6	83,1	91,0	84,1	80,0	87,2	87,9	84,1	83,8	84,5	84,5	82,8	84,5		45	50	49	5	9	35	13
23. <i>Nocardia</i> sp. FMN06	68,2	85,9	94,8	92,0	91,4	88,6	89,6	96,2	89,0	91,7	87,2	91,7	90,0	91,4	91,7	95,5	95,1	92,4	92,4	86,2	95,8	84,5		13	14	49	48	24	51
24. <i>Nocardia</i> sp. FMN15	67,5	85,9	94,1	91,4	90,0	87,6	90,3	96,9	86,5	92,4	85,9	91,0	90,0	89,6	90,7	96,2	95,8	92,4	92,4	86,2	96,2	82,8	95,5		14	54	51	27	55
25. <i>Nocardia</i> sp. FMN18	66,5	83,8	93,1	91,4	90,0	86,5	88,6	96,2	86,9	91,0	85,9	90,3	87,9	89,6	91,0	94,1	93,8	91,7	91,7	84,8	95,8	83,1	95,1	95,1		54	52	26	56
26. <i>Nocardia</i> sp. FSN13	61,5	79,0	83,5	83,8	84,5	80,0	81,0	82,4	86,9	82,4	89,3	82,4	79,7	85,5	86,2	83,1	82,8	83,5	83,5	81,4	82,8	98,2	83,1	81,4	81,4		12	40	8
27. <i>Nocardia</i> sp. FSN14	62,5	79,7	84,5	83,8	84,5	82,4	81,0	83,5	87,6	83,5	89,0	83,8	79,3	84,8	86,2	84,5	84,1	83,5	83,5	81,0	83,8	96,9	83,5	82,4	82,1	95,8		40	4
28. <i>Nocardia</i> sp. FSN27	68,5	87,9	91,7	94,8	94,8	89,3	89,6	92,0	90,3	91,7	89,0	93,1	88,6	95,1	100	92,0	92,4	94,5	94,5	85,2	93,1	87,9	91,7	90,7	91,0	86,2	86,2		44
29. <i>Nocardia</i> sp. FSN34	61,9	78,6	83,1	82,4	83,1	81,4	80,0	82,1	86,2	82,4	87,6	82,4	78,6	83,5	84,8	83,1	82,8	82,1	82,1	80,0	82,4	95,5	82,4	81,0	80,7	97,2	98,6	84,8	

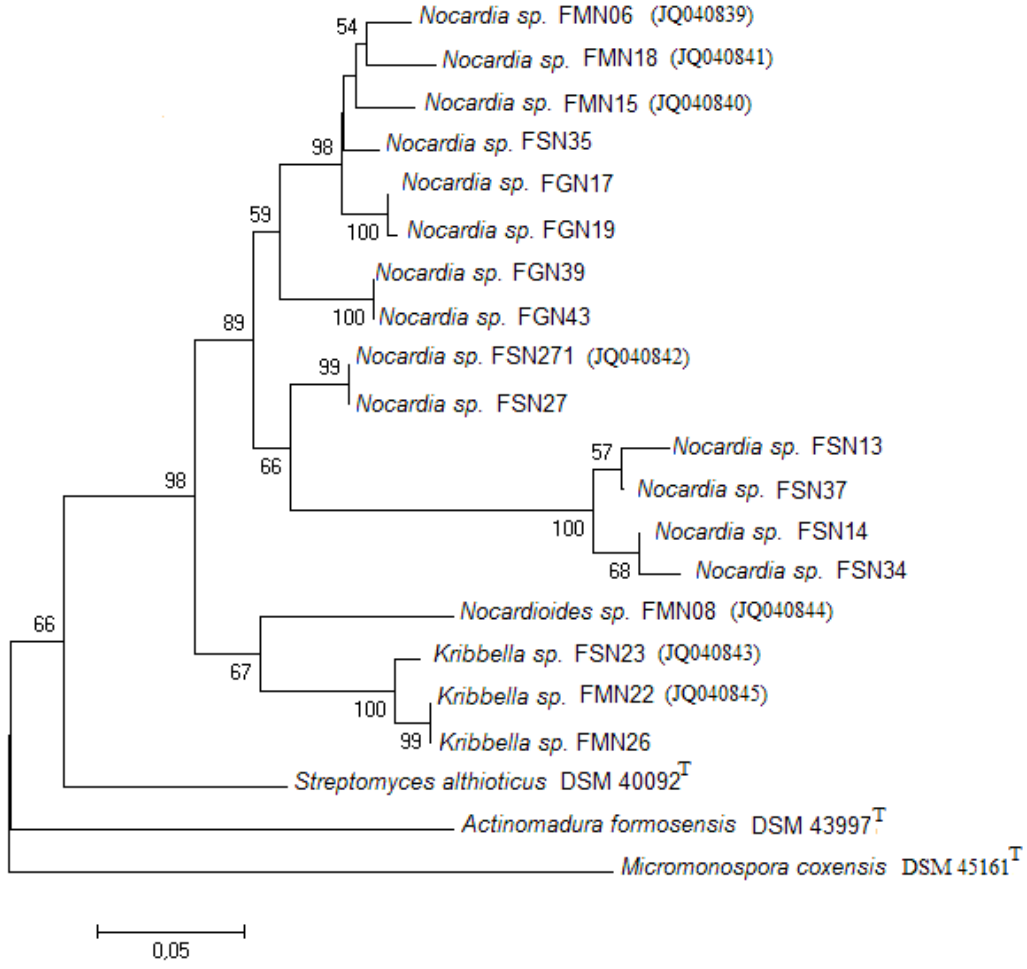
MF ve MR primerleri kullanılarak *rpoB* gen bölgesi çoğaltılan ve dizileri elde edilen test organizmaların hizalamaları yapılmış ve boşluklar çıkartılmasıyla elde edilen 283 nt'lik hizalanmış bölge filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Test izolatları arasında 0-62 nükleotit farklılığı ve %78-100 nükleotit benzerliği olduğu belirlenmiştir. *Nocardia* sp. test izolatları arasında 0-55 nükleotit farklılığı ve %80,5-100 nükleotit benzerliği elde edilmiştir. *Kribbella* sp. test izolatları kendi aralarında 0-39 nükleotit farklılığı ve %86,5-100 nükleotit benzerliği olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11., Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. *Kribbella* ve *Nocardioideae* test ve tip suşlarının MF primeri ile okutulan *rpoB* gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 100 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,1’dir.

Çizelge 4.10. Test izolatları ve *Kribbella* - *Nocardioideae* sp. cinslerine ait tip türleri arasındaki *rpoB* gen bölgesinin bir bölümünün (289 bp) dizilemesine nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>K. swartbergensis</i> DSM17345T		12	11	31	30	40	13	13	13	31
2. <i>K. aluminosa</i> DSM18824T	95,8		9	29	28	35	11	9	9	29
3. <i>K. hippodromi</i> DSM19227T	96,1	96,8		36	33	34	7	11	11	36
4. <i>N. albus</i> DSM43109T	89,2	89,9	87,5		7	35	36	34	34	7
5. <i>N. luteus</i> DSM43366T	89,6	90,3	88,5	97,5		37	33	33	33	6
6. <i>N. salmonea</i> DSM43678T	86,1	87,8	88,2	87,8	87,1		37	39	39	37
7. <i>Kribbella</i> sp. FSN23	95,5	96,1	97,5	87,5	88,5	87,1		6	6	36
8. <i>Kribbella</i> sp. FMN22	95,5	96,8	96,1	88,2	88,5	86,5	97,9		0	34
9. <i>Kribbella</i> sp. FMN26	95,5	96,8	96,1	88,2	88,5	86,5	97,9	100		34
10. <i>Nocardioideae</i> sp. FMN08	89,2	89,9	87,5	97,5	97,9	87,1	87,5	88,2	88,2	



Şekil 4.11. Test organizmalarının MF primeri ile okutulan *rpoB* gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 100 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,5'dir.

Çizelge 4.11. Nocardioform test izolatlarının *rpoB* gen bölgesinin bir bölümünün nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. <i>Actinomadura formosensis</i> DSM 43997T		87	62	63	64	64	78	65	64	63	69	69	65	69	71	88	81	65	84	64	84
2. <i>Micromonospora coxensis</i> DSM 45161T	69,2		75	81	83	83	95	81	82	83	83	83	82	84	85	103	99	81	101	80	100
3. <i>Streptomyces althioticus</i> DSM 40092T	78,0	73,4		41	41	41	56	46	49	48	45	45	49	50	52	68	65	46	68	49	65
4. <i>Kribbella</i> sp. FSN23	77,7	71,3	85,5		6	6	33	37	37	38	39	39	36	38	42	55	56	37	59	39	51
5. <i>Kribbella</i> sp. FMN22	77,3	70,6	85,5	97,8		0	31	38	38	39	39	39	37	39	43	56	55	38	58	41	54
6. <i>Kribbella</i> sp. FMN26	77,3	70,6	85,5	97,8	100		31	38	38	39	39	39	37	39	43	56	55	38	58	41	54
7. <i>Nocardioides</i> sp. FMN08	72,4	66,4	80,2	88,3	89,0	89,0		38	38	39	37	37	38	40	45	61	59	38	62	41	59
8. <i>Nocardia</i> sp. SFN271	77,0	71,3	83,7	86,9	86,5	86,5	86,5		22	21	15	15	22	27	25	40	40	0	44	20	35
9. <i>Nocardia</i> sp. FGN17	77,3	71,0	82,6	86,9	86,5	86,5	86,5	92,2		1	19	19	12	10	15	50	45	22	49	8	47
10. <i>Nocardia</i> sp. FGN19	77,7	70,6	83,0	86,5	86,2	86,2	86,2	92,5	99,6		20	20	13	11	16	51	46	21	50	9	48
11. <i>Nocardia</i> sp. FGN39	75,6	70,6	84,0	86,2	86,2	86,2	86,9	94,6	93,2	92,9		0	21	21	22	50	49	15	53	17	47
12. <i>Nocardia</i> sp. FGN43	75,6	70,6	84,0	86,2	86,2	86,2	86,9	94,6	93,2	92,9	100		21	21	22	50	49	15	53	17	47
13. <i>Nocardia</i> sp. FMN06	77,0	0,71	82,6	87,2	86,9	86,9	86,5	92,2	95,7	95,4	92,5	92,5		11	11	49	47	22	50	10	45
14. <i>Nocardia</i> sp. FMN15	75,6	70,3	82,3	86,5	86,2	86,2	85,8	90,4	96,4	96,1	92,5	92,5	96,1		13	54	50	27	54	11	50
15. <i>Nocardia</i> sp. FMN18	74,9	69,9	81,6	85,1	84,8	84,8	84,0	91,1	94,6	94,3	92,2	92,2	96,1	95,4		54	51	25	55	11	49
16. <i>Nocardia</i> sp. FSN13	68,9	63,6	75,9	80,5	80,2	80,2	78,4	85,8	82,3	81,9	82,3	82,3	82,6	80,9	80,9		13	40	9	51	5
17. <i>Nocardia</i> sp. FSN14	71,3	65,0	77,0	80,2	80,5	80,5	79,1	85,8	84,0	83,7	82,6	82,6	83,3	82,3	81,9	95,4		40	4	47	10
18. <i>Nocardia</i> sp. FSN27	77,0	71,3	83,7	86,9	86,5	86,5	86,5	100	92,2	92,5	94,6	94,6	92,2	90,4	91,1	85,8	85,8		44	20	35
19. <i>Nocardia</i> sp. FSN34	70,3	64,3	75,9	79,1	79,5	79,5	78,0	84,4	82,6	82,3	81,2	81,2	82,3	80,9	80,5	96,8	98,5	84,4		51	14
20. <i>Nocardia</i> sp. FSN35	77,3	71,7	82,6	86,2	85,5	85,5	85,5	92,9	97,1	96,8	93,9	93,9	96,4	96,1	96,1	81,9	83,3	92,9	81,9		46
21. <i>Nocardia</i> sp. FSN37	70,3	64,6	77,0	81,9	80,9	80,9	79,1	87,6	83,3	83,0	83,3	83,3	84,0	82,3	82,6	98,2	96,4	87,6	95,0	83,7	

4.6.3. *gyrB* Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendrogram Oluşturulması

Noc-*gyrB*BF ve Noc-*gyrB*BR primerleri kullanılarak *gyrB* gen bölgesi amplifiye edilen test organizmalarının, sekans dizi eldesinde de Noc-*gyrB*BF ve Noc-*gyrB*BR primerleri kullanılmıştır (McTaggart ve ark., 2010). Zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırılarak elde edilen diziler karşılaştırılmak suretiyle ikili kontrolü yapılmış ve elde edilen 590-615 bp'lik diziler DSMZ ve EMBL, NCBI gibi gen bankalarından elde edilen *gyrB* dizileri ile MEGA4.1 programı kullanılarak hizalanmış ve filogenetik analizler MEGA4.1 ve PHYLIP paket programlarında gerçekleştirilmiştir.

Nocardia cinsine ait izolat ve tip türlerinin toplu hizalaması yapılmış ve boşluklar çıkartıldıktan sonra elde edilen 587 nt'lik bölgenin filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Test organizmaları ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritması kullanılarak oluşturuldu. Neighbour-joining algoritmasında filogenetik uzaklık matriksi olarak Jukes-Cantor metodu kullanıldı (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 100 tekrarlı olarak MEGA 4.1. (Kumar ve ark., 2008) ve PHYLIP paket programlarında gerçekleştirildi. *Nocardia* filogenetik dendrogramında *Gordonia amicalis*, *Kribbella* ve *Nocardioides* dendrogramında *Nonomuraea salmonea* ile *Nonomuraea maheshaliensis* dış grup olarak kullanıldı. Nocardioform gruplarını temsil eden çalışma izolatları ile oluşturulan toplu analizler sonucu elde edilen filogenetik ağaçta *Nonomuraea salmonea* ile *Nonomuraea maheshaliensis* dış grup olarak kullanıldı. Nocardioform gruplarını temsil eden çalışma izolatları ile ilgili tip türlerinin *rpoB* nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbour-joining matriksiyle oluşturulan filogenetik ağaçlar Şekil 4.12-4.14'de verilmiştir.

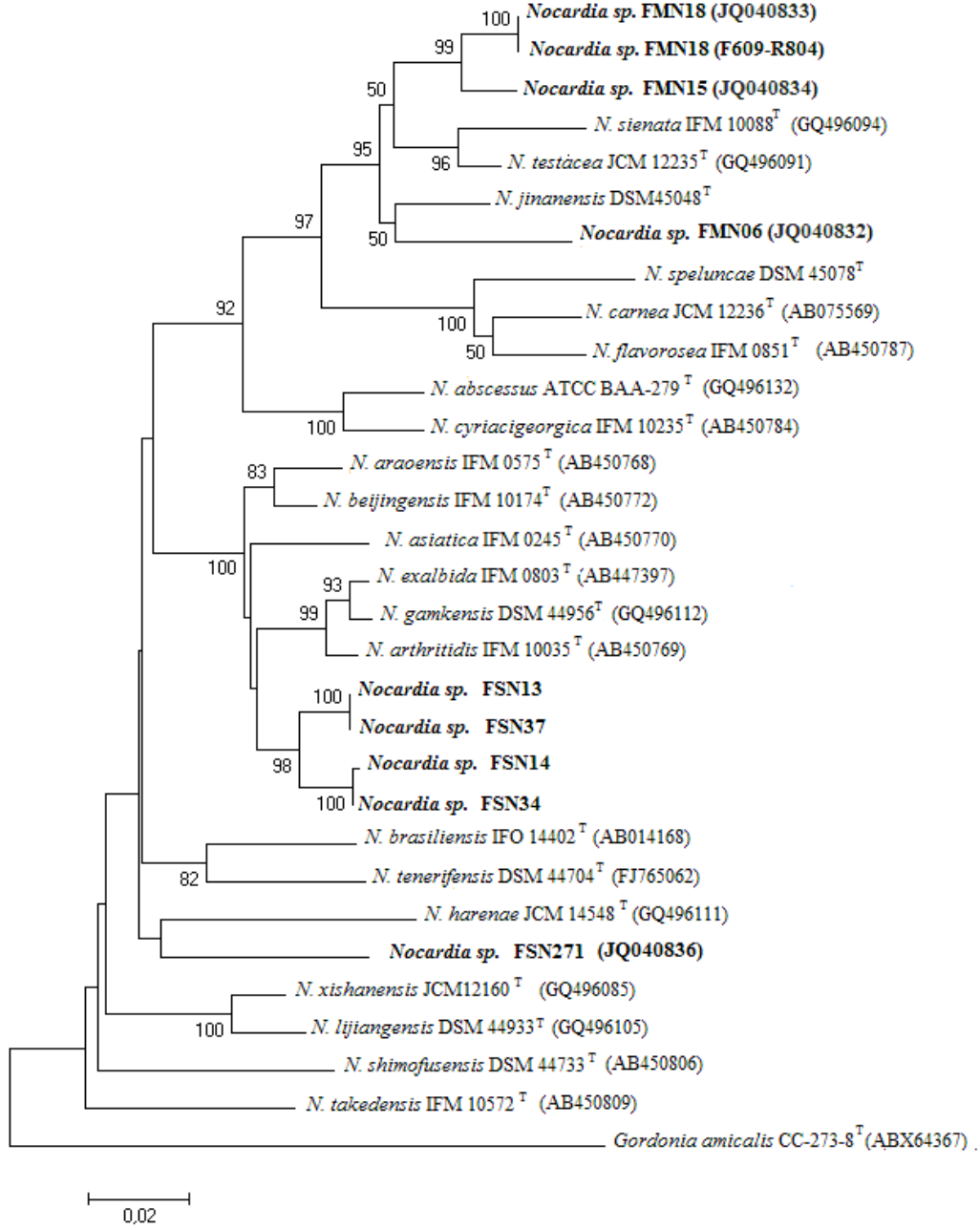
FMN18 (NocgyrBF ve 804R ile okutulan diziler) ile FMN06, FMN15 izolatları aynı monofiletik hatta yer almaktadırlar. FMN18 (NocgyrBF ve 804R ile okutulan diziler) nolu toprak izolatı yine *N. testacea* ve *N. jinanensis*'e sırasıyla 27-29 nükleotit farklılığı (%95,4- 95,0 nt benzerliği) olduğu görülmektedir. FMN15 izolatı

N. jinanensis ve *N. testacea*'a 24 nükleotit farklılığı (%95,9 nt benzerliği) olduğu belirlenmiştir. FMN06; *N. jinanensis* ve *N. testacea* tip suşlarına sırasıyla 31-38 nükleotit farklılığı ve %93,5-94,7 nükleotit benzerliği göstermektedir (Çizelge 4. 12., Şekil 4.12.).

gyrB gen bölgesi sekans analizlerine göre, FSN13, FSN37, FSN14 ve FSN34 izolatları *Nocardia arthritidis*, *N. asiatica* ve *N. beijingensis* tip türleri ile 21-23 nükleotit farklılığına ve %96,0-96,4 nükleotit benzerliğine sahip oldukları belirlenmiştir. FSN13, ve FSN37 izolatları *N. arthritidis*'e 21 nükleotit farklılığı (%96,4 nt benzerliği) gösterirken, *N. asiatica* ve *N. beijingensis* tip örneklerine 23 nükleotit farklılığı (%96,0 nt benzerliği) olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12., Şekil 4.12.). FSN14 ve FSN34 nolu toprak izolatları da en yakın *N. arthritidis*'e 21-22 nükleotit farklılığı (%96,2-96,4 nt benzerliği) ile *N. asiatica* ve *N. beijingensis*'e 25-26 nükleotit farklılığı (%95,5-95,7 nt benzerliği) tespit edilmiştir. FSN271; *N. beijingensis*'e 41 ve *N. araoensis*'e 43 nükleotit farklılığı (%92,6-93 nt benzerliği) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12., Şekil 4.12.).

Nocardia sp. izolatları *gyrB* gen bölgesi dizilerine göre kendi aralarında nükleotit farklılıklarının 0-90 ve % benzerlik değerlerinin 84,6-100 olduğu belirlenmiştir. FMN18 izolatının NocgyrBF ve NocgyrBR primerleri ile çoğaltılan ve yine bu primerlerle elde edilen 610 nt'lik diziyle, F1-R1296R primerleri ile çoğaltılan ve bu primerlerle birlikte F609-804R primeri ile elde edilen 1200 nt dizilerin karşılaştırılması yapılmış ve 610 nt'lik bölgenin %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek nükleotit farklılığı ise FSN271 ile FMN06 izolatu arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12., Şekil 4.12.).

FMN18, FMN15 izolatu ile 13 nükleotit farklılığı (%97,7 nt benzerliği) ve FMN15 izolatu da FMN06 izolatu ile 37 nükleotit farklılığına (%93,6) sahip olduğu belirlenmiştir. FSN37 izolatu ile yakın ilişkili olan FSN13, FSN14 ve FSN34 izolatları 0-13 nükleotit farklılığı ve %97,7-100 nükleotit benzerliğine sahip oldukları belirlenmiştir. FSN37 ile FSN13 izolatları %100 benzerlik değeri paylaşırken, FSN14 ile 13 nükleotit farklılığı (%97,7 nt benzerliği) ve FSN34 ile de 12 nükleotit farklılığı (%97,9 nt benzerliği) gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12., Şekil 4.12.).



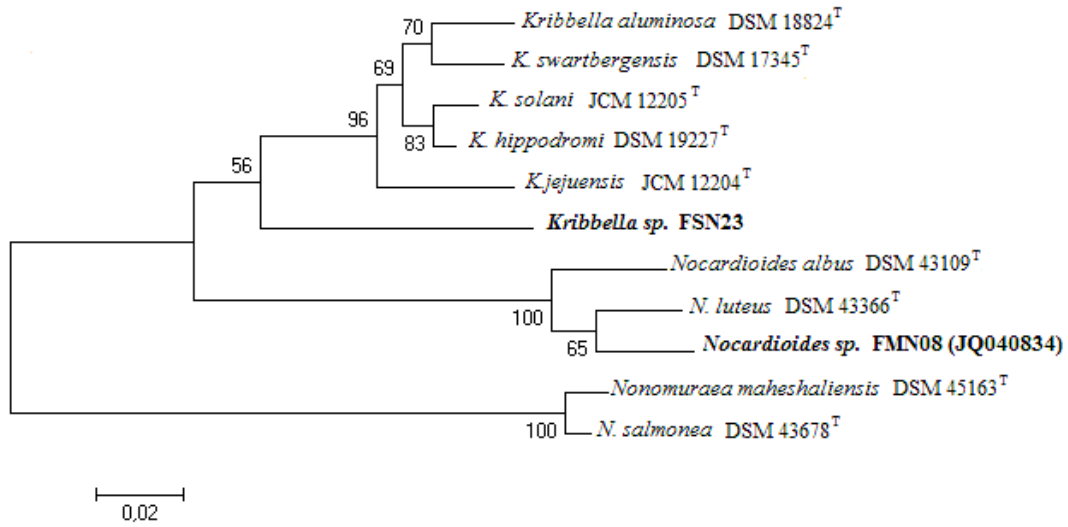
Şekil 4.12. *Nocardia* sp. izolatlarının Noc-gyrBF primeri ile okutulan *gyrB* gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 100 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,2'dir.

Çizelge 4.12. Test izolatları ve *Nocardia* cinsine ait tanımlanmış tip türleri arasındaki *gyrB* gen bölgesinin bir bölümünün (587 bp) nükleotid dizilemesine bağlı nükleotid sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1. <i>Gordonia amicalis</i> CC-273-8T		106	93	107	102	103	105	100	98	108	105	101	111	103	113	93	99	108	95	98	103	121	110	110	108	108	110	108	107	107	110
2. <i>N. jinanensis</i> DSM45048T	81,9		65	48	55	61	62	55	61	46	52	62	52	62	74	68	71	39	62	59	28	56	31	24	29	29	57	57	59	56	57
3. <i>N. xishanensis</i> JCM12160T	84,1	88,9		49	47	50	46	48	45	78	44	51	78	51	53	15	46	75	51	48	64	84	78	68	69	69	46	45	51	44	46
4. <i>N. abscessus</i> ATCC BAA-279T	81,7	91,8	91,6		53	52	50	52	63	53	19	54	54	54	64	54	58	55	60	54	50	61	61	51	54	54	48	51	56	50	48
5. <i>N. araoensis</i> IFM 0575T	82,6	90,6	91,9	90,9		25	24	13	48	66	51	24	66	25	59	50	48	69	54	48	62	73	64	56	58	58	24	26	43	25	24
6. <i>N. arthritidis</i> IFM 10035T	82,4	89,6	91,4	91,1	95,7		26	20	47	68	53	9	68	9	61	51	54	70	55	47	61	70	64	62	62	62	21	22	50	21	21
7. <i>N. asiatica</i> IFM 0245T	82,1	89,4	92,1	91,4	95,9	95,5		24	51	72	51	28	72	29	59	50	53	71	56	50	61	75	67	61	62	62	23	26	51	25	23
8. <i>N. beijingensis</i> IFM 10174T	82,9	90,6	91,8	91,1	97,7	96,5	95,9		43	69	52	19	67	20	56	48	46	65	51	41	57	74	64	57	55	55	23	26	41	25	23
9. <i>N. brasiliensis</i> IFO 14402T	83,3	89,6	92,3	89,2	91,8	91,9	91,3	92,6		68	59	50	67	52	59	51	56	71	47	35	59	75	66	66	65	65	49	51	50	50	49
10. <i>N. carneae</i> JCM 12236T	81,6	92,1	86,7	90,9	88,7	88,4	87,7	88,2	88,4		52	69	22	69	84	76	78	57	83	68	52	27	53	49	54	54	66	68	77	67	66
11. <i>N. cyriacigeorgica</i> IFM 10235T	82,1	91,1	92,5	96,7	91,3	90,9	91,3	91,1	89,9	91,1		53	54	53	61	52	64	57	58	53	48	63	66	54	57	57	51	52	61	51	51
12. <i>N. exalbidus</i> IFM 0803T	82,7	89,4	91,3	90,8	95,9	98,4	95,2	96,7	91,4	88,2	90,9		70	5	60	52	54	74	55	49	66	73	69	65	63	63	27	26	49	25	27
13. <i>N. farcinica</i> ATCC 3318T	81,0	91,1	86,7	90,8	88,7	88,4	87,7	88,5	88,5	96,2	90,8	88,0		70	88	77	78	62	83	68	57	36	57	53	52	52	64	68	72	67	64
14. <i>N. flavorosea</i> IFM 0851T	82,4	89,4	91,3	90,8	95,7	98,4	95,0	96,5	91,1	88,2	90,9	99,1	88,0		61	52	54	76	55	51	66	72	69	65	63	63	26	25	47	24	26
15. <i>N. gamkensis</i> DSM 44956T	80,7	87,3	90,9	89,0	89,9	89,6	89,9	90,4	89,9	85,6	89,6	89,7	85,0	89,6		57	63	81	59	53	70	89	82	75	73	73	61	61	54	60	61
16. <i>N. harencae</i> JCM 14548T	84,1	88,4	97,4	90,8	91,4	91,3	91,4	91,8	91,3	87,0	91,1	91,1	86,8	91,1	90,2		48	74	51	54	63	81	77	70	69	69	47	46	53	45	47
17. <i>N. lijiangensis</i> DSM 44933T	83,1	87,9	92,1	90,1	91,8	90,8	90,9	92,1	90,4	86,7	89,0	90,8	86,7	90,8	89,2	91,8		80	50	63	69	82	76	73	69	69	49	52	55	51	49
18. <i>N. sienata</i> IFM 10088T	81,6	93,3	87,2	90,6	88,2	88,0	87,9	88,9	87,9	90,2	90,2	87,3	89,4	87,0	86,2	87,3	86,3		70	68	20	63	40	35	38	38	68	70	71	69	68
19. <i>N. takedensis</i> IFM 10572T	83,8	89,4	91,3	89,7	90,8	90,6	90,4	91,3	91,9	85,8	90,1	90,6	85,8	90,6	89,9	91,3	91,4	88,0		53	64	90	74	68	65	65	51	53	50	52	51
20. <i>N. tenerifensis</i> DSM 44704T	83,3	89,9	91,8	90,8	91,8	91,9	91,4	93,0	94,0	88,4	90,9	91,6	88,4	91,3	90,9	90,8	89,2	88,4	90,9		57	71	71	67	65	65	47	44	52	43	47
21. <i>N. testacea</i> JCM 12235T	82,4	95,2	89,0	91,4	89,4	89,6	89,6	90,2	89,9	91,1	91,8	88,7	90,2	88,7	88,0	89,2	88,2	96,5	89,0	90,2		56	38	24	27	27	60	62	64	61	60
22. <i>N. speluncae</i> DSM 45078T	79,3	90,4	85,6	89,6	87,5	88,0	87,2	87,3	87,2	95,4	89,2	87,5	93,8	87,7	84,8	86,2	86,0	89,2	84,6	87,9	90,4		54	59	60	60	66	71	81	70	66
23. <i>Nocardia</i> sp. FMN06	81,2	94,7	86,7	89,6	89,0	89,0	88,5	89,0	88,7	90,9	88,7	88,2	90,2	88,2	86,0	86,8	87,0	93,1	87,3	87,9	93,5	90,8		37	40	40	63	65	72	64	63
24. <i>Nocardia</i> sp. FMN15	81,2	95,9	88,4	91,3	90,4	89,4	89,6	90,2	88,7	91,6	90,8	88,9	90,9	88,9	87,2	88,0	87,5	94,0	88,4	88,5	95,9	89,9	93,6		13	13	60	60	61	59	60
25. <i>Nocardia</i> sp. FMN18	81,6	95,0	88,2	90,8	90,1	89,4	89,4	90,6	88,9	90,8	90,2	89,2	91,1	89,2	87,5	88,2	88,2	93,5	88,9	88,9	95,4	89,7	93,1	97,7		0	59	61	60	60	59
26. <i>Nocardia</i> sp. FMN18 (609F-804R)	81,6	95,0	88,2	90,8	90,1	89,4	89,4	90,6	88,9	90,8	90,2	89,2	91,1	89,2	87,5	88,2	88,2	93,5	88,9	88,9	95,4	89,7	93,1	97,7	100		59	61	60	60	59
27. <i>Nocardia</i> sp. FSN13	81,2	90,2	92,1	91,8	95,9	96,4	96,0	96,0	91,6	88,7	91,3	95,4	89,0	95,5	89,6	91,9	91,6	88,4	91,3	91,9	89,7	88,7	89,2	89,7	89,9	89,9		13	45	12	0
28. <i>Nocardia</i> sp. FSN14	81,6	90,2	92,3	91,3	95,5	96,2	95,5	95,5	91,3	88,4	91,1	95,5	88,4	95,7	89,6	92,1	91,1	88,0	90,9	92,5	89,4	87,9	88,9	89,7	89,6	89,6	97,7		48	1	13
29. <i>Nocardia</i> sp. FSN271	81,7	89,9	91,3	90,4	92,6	91,4	91,3	93,0	91,4	86,8	89,6	91,6	87,7	91,9	90,8	90,9	90,6	87,9	91,4	91,1	89,0	86,2	87,7	89,6	89,7	89,7	92,3	91,8		47	45
30. <i>Nocardia</i> sp. FSN34	81,7	90,4	92,5	91,4	95,7	96,4	95,7	95,7	91,4	88,5	91,3	95,7	88,5	95,9	89,7	92,3	91,3	88,2	91,1	92,6	89,6	88,0	89,0	89,9	89,7	89,7	97,9	99,8	91,9		12
31. <i>Nocardia</i> sp. FSN37	81,2	90,2	92,1	91,8	95,9	96,4	96,0	96,0	91,6	88,7	91,3	95,4	89,0	95,5	89,6	91,9	91,6	88,4	91,3	91,9	89,7	88,7	89,2	89,7	89,9	89,9	100	97,7	92,3	97,9	

Kribbella ve *Nocardioides* cins üyeleri ile ilişkili olan izolatların toplu hizalaması yapılmış ve boşluklar çıkartıldıktan sonra elde edilen 320 nt'lik bölgenin filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. İzolatların elde edilen dizileri 590-615 nt uzunluğunda olmasına rağmen, *N. luteus* tip türünün elde edilen dizisinin sadece 320 nt'lik kısmı izolatların *gyrB* gen dizileri ile hizalanmış ve bu nedenle istenilenden daha kısa bir bölgenin analizi gerçekleştirilmiştir. FSN23 nolu toprak izolatı, *K. aluminosa*, *K. swartbergensis*, *K. hippodromi* ve *K. jejuensis* ile 31-39 nükleotit farklılığı ve %87,3-89,9 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. FMN08 nolu izolat *N. albus* tip türüne 15 nükleotit farklılığı (%95,1 nt benzerliği) ve *N.luteus*'a da 13 nükleotit farklılığı (%95,7 nt benzerliği) göstermektedir. (Çizelge 4.13., Şekil 4.13.).

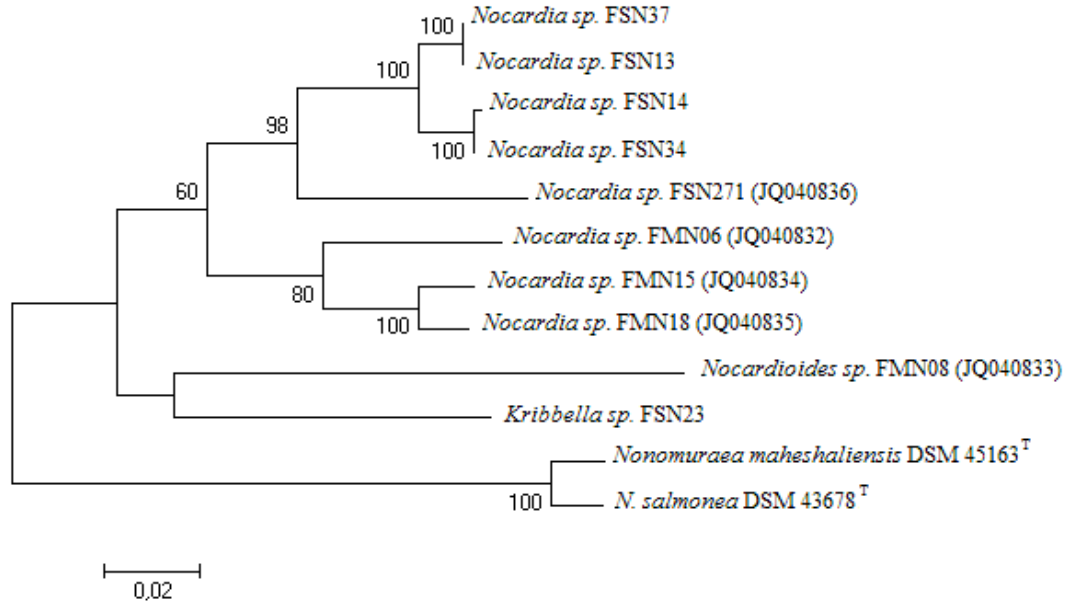
Noc-gyrBF- Noc-gyrBR primerleri ile okutulan *Kribbella* sp., *Nocardia* sp. ve *Nocardioides* sp. izolatlarının toplu hizalaması yapılmış ve boşluklar çıkartıldıktan sonra elde edilen 582 nt'lik uzunluktaki diziler arasında 0-110 nükleotit farklılığı ve % 81-100 benzerlik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14., Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. *Kribbella* sp.ve *Nocardioides* sp. izolatlarının Noc-gyrBF primeri ile okutulan *gyrB* gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 100 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,2’dir.

Çizelge 4.13. Test izolatları ve *Kribbella* ile *Nocardioides* cinsine ait tip türleri arasındaki *gyrB* gen bölgesinin bir bölümünün nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>Nonomuraea maheshaliensis</i> DSM 45163T		5	70	70	70	75	78	79	79	70	71
2. <i>N. salmonea</i> DSM 43678T	98,3		70	68	70	75	78	79	79	68	67
3. <i>K. aluminosa</i> DSM 18824T	77,3	77,3		19	13	11	49	48	51	12	38
4. <i>K. jejuensis</i> JCM 12204T	77,3	77,9	93,8		18	17	49	49	49	15	39
5. <i>K. solani</i> JCM 12205T	77,3	77,3	95,7	94,1		12	49	48	51	5	32
6. <i>K. swartbergensis</i> DSM 17345T	75,7	75,7	96,4	94,4	96,1		49	47	50	11	37
7. <i>Nocardioides luteus</i> DSM 43366T	74,7	74,7	84,1	84,1	84,1	84,1		20	13	49	59
8. <i>N. albus</i> DSM 43109T	74,4	74,4	84,4	84,1	84,1	84,7	93,5		15	50	57
9. <i>Nocardioides</i> sp. FMN08	74,4	74,4	83,4	84,1	83,4	83,8	95,7	95,1		51	60
10. <i>K. hippodromi</i> DSM 19227T	77,3	77,9	96,1	95,1	98,3	96,4	84,1	83,8	83,4		31
11. <i>Kribbella</i> sp. FSN23	77,0	78,3	87,7	87,3	89,6	88,0	80,9	81,5	80,5	89,9	



Şekil 4.14. *Kribbella* sp., *Nocardia* sp. ve *Nocardioidea* sp. izolatlarının Noc-gyrBF primeri ile okutulan **gyrB** gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. 100 tekrarlı uygulanan bootstrap değeri %50 ve üzerinde olan nodlar verilmiştir. Nükleotit pozisyon değişimi %0,2’dir.

Çizelge 4.14. *Kribbella*, *Nocardia* ile *Nocardioidea* cinsine ait test izolatları arasındaki *gyrB* gen bölgesinin bir bölümünün nükleotit dizilemesine bağlı nükleotit sayısı farklılıkları ve % benzerlik değerleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Nonomuraea maheshaliensis</i> DSM 45163T		15	122	130	142	133	127	122	129	125	126	124
2. <i>N. salmonea</i> DSM 43678T	97,4		118	130	144	131	127	118	126	122	125	121
3. <i>Nocardia</i> sp. FSN37	79,0	79,7		63	110	60	59	0	77	13	45	12
4. <i>Nocardia</i> sp. FMN06	77,6	77,6	89,1		83	37	40	63	87	65	72	64
5. <i>Nocardioidea</i> sp. FMN08	75,6	75,2	81,0	85,7		92	94	110	96	110	122	109
6. <i>Nocardia</i> sp. FMN15	77,1	77,4	89,6	93,6	84,1		13	60	90	60	61	59
7. <i>Nocardia</i> sp. FMN18	78,1	78,1	89,8	93,1	83,8	97,7		59	88	61	60	60
8. <i>Nocardia</i> sp. FSN13	79,0	79,7	100	89,1	81,0	89,6	89,8		77	13	45	12
9. <i>Kribbella</i> sp. FSN23	77,8	78,3	86,7	85,0	83,5	84,5	84,8	86,7		75	82	74
10. <i>Nocardia</i> sp. FSN14	78,5	79,0	97,7	88,8	81,0	89,6	89,5	97,7	87,1		48	1
11. <i>Nocardia</i> sp. FSN271	78,3	78,5	92,2	87,6	79,0	89,5	89,6	92,2	85,9	91,7		47
12. <i>Nocardia</i> sp. FSN34	78,6	79,2	97,9	89,0	81,2	89,8	89,6	97,9	87,2	99,8	91,9	

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, aktinomisetlerin sistematigi nümerik, kemotaksonomik ve moleküler metotların bir bütünü olarak açıklanmaya çalışılmaktadır. Polifazik taksonomi olarak nitelendirilen bu üçlü yaklaşım ile mikroorganizmaların tür seviyesinde tanımlanması daha doğru ve net olarak yapılabilmektedir. Polifazik taksonomi, kimyasal, moleküler ve fenetik analizlerden elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ve bu verilerin birbiri ile uyumlu olması esasına dayanmaktadır. Moleküler sistematikteki önemli gelişmeler genom organizasyonu, genom replikasyonu ve değiştirilen genom kompozisyonu olarak bilinen birçok mekanizmayla düzenlenebilmektedir (Coenye ve ark., 2005; Brown-Elliott ve ark., 2006).

Polifazik yaklaşımların; fenetik, kemotaksonomik ve moleküler özelliklerin kullanılması ve DNA-DNA homoloji çalışmaları ile yeni tür tanımlamaları yapılmaktadır. Farklı habitatlardan selektif izolasyon yöntemlerinin ve çeşitli ön uygulamaların yapılması ile farklı aktinomisetlerin izolasyonu gerçekleştirilmekte ve yeni tür tanımlamasının yapılabilmesi için polifazik taksonomik yaklaşımlar kullanılmaktadır (Coenye ve ark., 2005; Eccleston ve ark., 2008; Hong ve ark., 2009; Tindall ve ark., 2010). Hayakawa ve Nonomura 1987 yılında geliştirdikleri hümitik asit vitamin agar (HV) ortamı ile topraktan nadir aktinomisetlerin izolasyonunu amaçlamışlardır. Hayakawa ve arkadaşlarının (1996) yapmış olduğu başka bir çalışmada topraktan aktinomisetlerin selektif izolasyonu için trimoprim ve nalidiksik asit kullanmışlardır. Farklı aktinomisetlerin selektif izolasyon sağlamak amacıyla Yamamura ve arkadaşları ise süktroz gradient santrifügasyon yöntemini uygulamışlar ve seçici besiyeri olarak HV agar ortamını kullanmışlardır (Yamamura ve ark., 2003).

Aynı çalışmada, *Nocardia* populasyonu en çok süktroz gradientinde %20'lik süktroz içerikli tabakada bulunurken, %30, 40 ve 50 oranlarındaki süktroz tabakalarda *Streptomyces* cinslerinin sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Zoospor oluşturan flagella formunda hareketli aktinomiset olan *Actinoplanes* cinsi üyelerinin sadece %10 süktroz tabakada yoğun halde bulundukları bildirilmiştir. Süktroz gradient santrifügasyon yönteminde % 20 oranında süktroz 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 ark.,2003).

Toprak izolasyon çalışmasında, 10 farklı lokaliteden alınan toprak örnekleri belirtilen toprak izolasyon prosedürlerine uygun olarak, beş farklı besiyeri; tryptone yeast glucose extract agar (TYGA), tryptone yeast glucose extract agar (TYGA) vitaminli, glucose yeast extract malt agar (GYM), glucose yeast extract malt agar (GYM) vitaminli ve hümkik asit vitamin agar (HV Agar) kullanılarak dekontaminasyon işlemleri uygulanmış ve dilusyon (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4}) plakları 10-14 günlük inkübasyona bırakılmıştır (Yamamura ve ark., 2003). Nocardioform organizmaların izolasyon oranını arttırmak amacıyla %20'lik sükröz yoğunluğu kullanılarak santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. HV ve vitaminli hazırlanan agar plaklarından nocardioform benzeri mikroorganizmalar glukoz yeast ekstrakt agar (GYEA) ortamına aktararak saflaştırılma prosedürüne geçilmiştir. Oat meal (Shirling ve Gottlieb, 1966) ve malt extract agardaki gelişimleri diğer organizmalardan farklı olduğu belirlenen 125 test organizması mikolik asit metil esterlerini belirlemek amacıyla TYGA ortamında asetat membran filtre yüzeyine aktarılmıştır (Çizelge 4.1.).

Gerçekleştirdiğimiz izolasyon çalışmasında, HV agar ve farklı dört besiyeri kullanılarak ve iki farklı izolasyon prosedür (dilusyon plaka tekniği, sükröz santrifügasyon yöntemi) uygulanarak toplam 125 Aktinomiset izolatu elde edilmiş ve 16S rRNA gen bölgesi analizleri ile nocardioform grubu mikroorganizmaların filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. HV agar ve sükröz santrifügasyon yönteminin nadir aktinomisetlerin izolasyonunda başarı sağladığını sonuçlarımız da desteklemekte ve aynı zamanda literatürlerle uyum içersindedir (Yamamura ve ark., 2003).

Aerobik filamentli aktinomisetlerin karakterizasyonu için kullanılan geleneksel metodlardan biri olan mikolik asit testleri, mikolik asit içeren organizmaları diğer aktinomisetlerden ayırmaya yarayan hızlı bir kromatografi yöntemidir (Hamid ve ark., 1993; Leite ve ark., 1998; Zuber ve ark., 2008). Mikolik asit içeren aktinomisetler “Mycolata” olarak adlandırılmakta ve çoğunlukla, Mycolata grubu üyesi organizmaların hücre zarflarında esterlenmiş mikolik asitlere bağlanan peptidoglikan-arabinogalaktan

hücre duvarı iskeletleri yapıyı oluşturmaktadır (Chun ve ark., 1996). Mikolik asit içeren aktinomisetlerin, özellikle *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia*'nın sahip olduğu mikolik asitlerin yapısı ve tüm boyutundaki farklılıklarla, hücresel yağ asitleri, menakinon ve polar lipid kompozisyonu ile tanımlanıp ayırt edilebildiği belirlenmiştir (Cross ve Goodfellow, 1973; Goodfellow ve Minnikin, 1977, 1981, 1984, Keddie ve Cure, 1977; Minnikin ve ark., 1978, Baba ve ark., 1997). Mikolik asitlerin nitel değerlendirmesi, Minnikin ve arkadaşlarının 1975'de ince tabaka kromatografik teknikleri tasarlayarak kullanımı ile kolay ve hızlı bir şekilde başarılabilmektedir. *Mycobacteria*'ın metanolizatları, *M. fallax* ve *M. triviale* dışındaki diğerlerinde, multispot örnekler, *Tsukamurella* mycolatları iki spot verirken, *Dietzia*, *Corynebacteria*, *Gordonia*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* tek bir spot oluşturmakta ve Rf değerleri onların zincir uzunluk ve yapılarını yansıtmaktadır (Goodfellow ve ark., 1976; Minnikin ve ark., 1980; Hamid ve ark., 1993; Yassin ve ark., 1995; Yassin ve ark., 1996; Yassin ve ark., 1997).

Kageyama ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada (2004) 121 patojen *Nocardia* suşunun mikolik asit varlığı araştırılmış ve bilinen *Nocardia* suşlarının kabul gören Rf değerinden (0,47) farklı olarak *N. abscessus* izolatının Rf değerini 0,91 olarak belirlemişlerdir. Aynı zamanda bu çalışmada mikolik asit varlığının belirlenmesinin birçok kemotaksonomik yöntemle göre daha kolay ve ucuz bir yöntem olduğu da belirtilmiştir (Kageyama ve ark., 2004f).

Belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilen mikolik asit testi (Minnikin ve ark., 1984b) sonucunda elde edilen mikolik asit esterleri (MAME) ince tabaka kromatografik (TLC) yöntemle, uluslararası kültür koleksiyon numaralı *Nocardia* tip suşları ile birlikte mikolik asit içeren *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* ve *Williamsia* tip örneklerinin mikolik asit spotları alüminyum destekli silika jellerde kontrol amaçlı olarak görülür halde saptanmıştır (Çizelge 4.2.; Ek-C). İzolasyonu gerçekleştirilen toplam 125 Aktinomiset izolatı ve Özdemir-Koçak (2005)'in yüksek lisans çalışmasında sulfonamid duyarlılığı incelenen toplam 20 test suşuna asit metanolizis ve TLC uygulanması sonucunda, 18 nocardioform izolatın mikolik asit içerdiği belirlenmiştir (Cardinali ve ark., 1995). Mikolik asit testleri sonucunda hesaplanan Rf değerlerinin 0,40 ila 0,55 arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol amaçlı olarak farklı zamanlarda aynı organizmaya uygulanan TLC analizleri sonucunda dahi Rf değerinde çok küçük farklılıklar meydana gelebildiği, bunun

nedeninin ise sıcaklık, solvent miktarı, yürütme süresi ve solvent derişimi olabileceği belirtilmiştir (Cardinali ve ark., 1995). Elde ettiğimiz sonuçların literatürle uyumlu olduğu ve Rf değerlerinin 0,40-0,55 aralığında elde edilmesinin de optimize koşullarda dahi Rf değerlerinin değişim göstermesine bağlı olduğu belirlenmiştir. 16S rRNA gen bölgesi çalışması sonucunda bu izolatların onaltısının *Nocardia*, ikisinin *Gordonia* cinsine ait oldukları tespit edilmiştir. Diğer izolatlarımızda mikolik asit varlığı tesbit edilememiş ve 16S rRNA gen bölgesi çalışması sonucunda bu izolatların yine nocardioform mikroorganizma gruplarından *Kribbella* (dört izolat) ve *Nocardioides* (bir izolat) cinsine ait olduğu tespit edilmiştir.

Moleküler çalışmaların ilk basamağı olan genomik DNA izolasyonu, seçilen izolatlara uygulanmış ve bu organizmalarının genomik DNA'ları Pitcher ve arkadaşları (1989) tarafından tanımlanan guanidin tiyosiyonat DNA izolasyonu metodu kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.). DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi UV spektrofotometrede sulandırılmış örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki değerleri alınarak belirlenmiştir. UV spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda 260/280 nm oran değerleri, literatüre uyumlu olarak 1,72 ile 1,89 değerleri arasında elde edilmiştir (Sambrook ve ark., 2001; Çizelge 4.4.).

Moleküler yöntemlerden biri olan 16S rRNA gen dizileme bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin açıklanmasında, herhangi bir ortamdan izole edilen bakterilerin tanımlanmasında kullanılan güçlü bir tekniktir (Busse ve ark., 1996). 2000'li yıllardan itibaren PCR kullanımının ve DNA dizilemenin yaygınlaşmasının sonucu olarak 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi bakteriyal izolatların doğru şekilde tanımlanmasında ve yeni bakteriyal izolatların literatüre kazandırılmasında büyük öneme sahip olmuştur. 16S rRNA gen bölgesi tüm türlerin tanımlanmasında oldukça faydalı ve korunmuş bölgelerin ise tür için spesifik bilgi verici özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Brown-Elliott, 2006). Korunmuş bölgeler yavaş evrimleştikleri için cins, tür ve alt tür seviyesinde filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. 16S rRNA sekans verileri gen bankalarına deposit edilmekte ve ihtiyaç duyulduğunda bu veri bankalarından kolaylıkla elde edilebilmektedir. Veri bankalarında deposit edilmiş olan sekans dizilerinin kalitesi yapılan moleküler çalışmaların güvenilirliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Son yirmi yılda 1,3 milyon bakterilere ait, 54 bin arkelere ait 16S rRNA gen dizisi RDP'de arşivlenmiştir (Brown-Elliott, 2006; Kim ve ark., 2011).

16S rRNA gen bölgesiyle birlikte moleküler taksonominin en temel analizlerinden biri olan DNA-DNA hibridizasyonunun (DDH) diğer moleküler analizlerden üstünlüğüne rağmen, bazı dezavantajları da vardır. İlki, veri oluştururken karşılaştırmalı veri tabanı oluşturmada kullanılamaz. İkincisi, parametrelerin miktarı, genom boyutu, DNA'nın saflığı, %15 karşılıklı farklılaşma değerlerini etkileyebilir. Üçüncüsü, DDH çok zaman alan ve zahmetli analizlerdir. Son olarak, bu metot yüksek seviyede uzmanlık gerektirdiği için sadece özel laboratuvarlarda gerçekleştirilebilmektedir (Gevers ve ark., 2005). Bu nedenle, Ad Hoc komite bakteriyal türlerin, DDH yerine geçebilecek yeni moleküler metotlarla tanımlanabilmesini önermektedir (Stackebrandt ve ark., 2002). AFLP ve PCR-RFLP, DNA dizileme ve yapısal genlerin dizilemesi gibi moleküler teknikler bakteriyel taksonomide kullanılabilir. En ideali, herhangi yeni tiplendirme sisteminin, güvenilir ve pratik bir şekilde verileri oluşturmayı sağlamasıdır. Mikrobiyal taksonomistler, baz dizi temelli metotların, DDH'a göre daha ucuz olması, yayınlanmış verilerin depolanabilir olması ve çoğu laboratuvarda uygulanabilir olması gibi daha fazla avantaja sahip en makul alternatif metot olabileceği kanısındadır (Stackebrandt ve ark., 2002).

Karşılaştırmalı genomik diziler, bakteriyal tanımlama, taksonomi ve filogeniye yeni çığırklar açmaktadır. Hücresel fonksiyonlar için gerekli olan gen bölgelerinin belirlenmesi, *Actinobacteria* alt sınıfındaki türlerin tanımlanması, taksonomisi ve filogenesi için kullanılan ortak değişmez genlerin saptanmasıyla yapılabilir. Bu bölgeler, yeterli filogenetik veriyi sunacak uzunlukta olmak, horizontal gen transferinden etkilenmemiş olmak, tek kopya halinde bulunmak ve primer dizilemesi için en az iki yüksek derecede korunmuş bölge içermek gibi belirli kriterlere sahip olmalıdır (Harayama ve Kasai, 2006; Adékambi ve ark., 2011). Ribozomal RNA genleri, universal ve fonksiyonel olarak yüksek derecede korunmuş yapıya ve daha fazla çeşitlilik gösteren alanlara sahip olduğu için filogenetik çalışmalarda en iyi hedeflerden biri olduğu belirlenmiştir (Woose, 1987). Modern mikrobiyal taksonomide filogenetik ilişkileri belirlemede en çok tercih edilen 16S ve 23S rRNA gen dizilerinin dışında diğer protein kodlayan gen bölgelerinin de çalışılarak oluşturulan verilerin analizi Ad Hoc komite tarafından önerilmiş ve en az üç yada dört gen bölgelesinin (*rpoB*, *recA*, *rpoD* ve *gyrB*) çalışılması gerektiği belirlenmiştir (Coenye ve LiPuma, 2002; Stackebrandt ve ark., 2002; McTargat ve ark., 2010).

McTaggart ve arkadaşları 2010 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada; 16S rRNA gen bölgesiyle birlikte dört farklı yapısal gen bölgesinin (*gyrB*, *secA1*, *hsp65* ve *rpoB*) dizilemesini 190 klinik, 36 tip ve 11 referans *Nocardia* suşuna uygulamışlardır. MLSA analizleriyle yapılan tanımlamanın korelasyonunun, mikroskopik örnekleme, biyokimyasal testler ve ağır asit analizleriyle uyumluluk oranının %95 olduğu belirlenmiştir. Bu durum, MLSA analizlerinin daha iyi ayırım yapma gücünü desteklemektedir.

56 *Nocardia* tip suşunun *gyrB* sekansları ile 16S rRNA gen dizilerinin sonuçları karşılaştırılarak filogenetik analizleri Takeda ve arkadaşları tarafından 2010 yılında gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, *Nocardia gyrB* gen sekanslarının tür içi benzerlik oranı %82,4-99,9 ve 270-2 nükleotit farklılığı olarak belirlenmiştir. 16S rRNA sekans benzerlik oranı ise %94,4-100 ve nükleotit farklılığı 75-0 olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler *gyrB* genlerinin farklılaşma derecesinin 16S rRNA geninden yaklaşık 3,6 kez (270-75) daha büyük olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda bu çalışma ile *Nocardia* ve diğer ilişkili cinsler arasındaki *gyrB* nükleotit benzerliği %68,1-87,3 ve 16S rRNA sekans benzerliğinin de %88,9-97,2 olarak belirlenmiştir (Takeda ve ark., 2010).

Kim ve arkadaşları 14 *Streptomyces*, 11 *Micromonospora*, 3 *Amycolaptosis*, 4 *Tsukamurella* ve 2 *Nocardia* olmak üzere toplam 34 referans suş ve 16 aktinomiset toprak izolatu ile yaptıkları *rpoB* gen bölgesi analizleri sonucunda farklı aktinomiset cinslerindeki farklılaşma için faydalı bir genetik metot olduğunu göstermişlerdir (Kim ve ark., 2003). *rpoB* gen bölgesinin filogenetik ilişkiyi göstermede kullanılabilecek önemli bir moleküler markör olduğunu gösteren farklı organizma grupları ile yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır (Morse ve ark., 2002; Conville ve ark., 2006; Rodriguez-Nava ve ark., 2006; Guo ve ark., 2008; Adékambi ve ark., 2009).

Türler arasındaki filogenetik akrabalığın değerlendirilmesinde tüm genom sekans analizine doğru bir eğilim olsa da günümüzde aktinomisetlerin taksonomik pozisyonlarının belirlenmesinde 16S rRNA sekans verileri temel oluşturmaktadır. Ad-Hoc komitesi 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 belirlenmesi gerektiğini belirtmiştir. 16S rRNA dizilerinin çoklu hizalanması sonrasında filogenetik dendrogram neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987)

ve maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) algoritmaları kullanılarak oluşturulmuştur. Neighbour-joining ve maximum-parsimony algoritmaları için filogenik uzaklık matrisi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirilmiştir (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan soy ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak MEGA 4.1. (Kumar 2008) ve PHYLIP 3.69 paket programlarında yapılmıştır (Şekil 4.5.-4.8.).

Nocardia cinsine ait toplam onaltı izolatin 16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizlerinde; *Nocardia* sp. FMN18 izolatinın karşılaştırılan 1407 nt'lik bölgede 13 nükleotit farklılığı ve %99 benzerlik ile *N. speluncae* ve *N. jinanensis*'e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *rpoB* gen bölgesi analizleri sonucunda ise bu izolatin, karşılaştırılan 302 nt'lik bölgede 11 nükleotit farklılığı (%96,2 nt benzerliği) ile *N. testacea*'a ve *N. speluncae* ile 20 nükleotit farklılığına (%93,1 nt benzerliği) sahip olduğu görülmüştür. *gyrB* gen bölgesinin filogenetik incelemelerinde karşılaştırılan 587 nt'lik bölgede *Nocardia* sp. FMN18 nolu izolatin *N. jinanensis* ve *N. testacea* tip suşları ile 27-29 nükleotit farklılığı (%95,0-95,4 nt benzerliği) göstermektedir. Mağaradan izole edilen *N. speluncae*'a 16S rRNA analizlerine göre en yakın filogenetik ilişki gösteren *Nocardia* sp. FMN18 izolatinın, *rpoB* dizi analizlerinde bu tip türüne 20 nükleotit farklılığı (%93,1 nt benzerliği) ve *gyrB* gen bölgesi analizlerinde ise 60 nükleotit farklılığı (%88,7 nt benzerliği) göstermiş olması bu izolatin yeni bir tür olarak literatürde statüsünü alacağı düşünülmektedir (Çizelge 4.5., 4.9., 4.12.; Şekil 4.5., 4.9., 4.12.).

Nocardia sp. FMN06 toprak izolatu ile birlikte *Nocardia* sp. FMN15, *Nocardia* sp. NEA44 ve *Nocardia* sp. FSN35 izolatları 16S rRNA gen bölgesinin karşılaştırılan 1461 bç'lik bölgesinde *N. carnea*'a 4-6 nükleotit farklılığı (%99,5-99,6 nt benzerliği) gösterirken *N. flavorosea* tip örneğine 6-8 nükleotit farklılığı (%99,3-99,6 nt benzerliği) gösterdiği belirlenmiştir. *rpoB* gen bölgesi analizleri sonucunda, bu izolatlardan *Nocardia* sp. FMN06'nın 11 nükleotit farklılığı (%96,2 nt benzerliği) ile *N. testacea*'a ve 15 nükleotit farklılığı (%96,2 nt benzerliği) ile *N. speluncae* ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. *rpoB* gen bölgesi analizlerine göre *Nocardia* sp. FSN35 nolu izolatta 6-12 nükleotit farklılığı (%95,8-97,9 nt benzerliği) ile *N. testacea* ve *N. speluncae* tip türlerine benzerlik göstermektedir. *gyrB* gen bölgesinin filogenetik incelemelerinde bu izolatlardan *Nocardia* sp. FMN06; *N. jinanensis* ve *N. testacea* tip suşlarına sırasıyla

31-38 nükleotit farklılığı ve %93,5-94,7 nükleotit benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. *Nocardia* sp. FMN15 izolatı, *N. jinanensis* ve *N. testacea*'a 24 nükleotit farklılığı (%95,9 nt benzerliği) olduğu belirlenmiştir. *N. carnea* ile 16S rRNA analizlerine göre en yakın filogenetik ilişki gösteren *Nocardia* sp. FMN06, *Nocardia* sp. FMN15 ve *Nocardia* sp. FSN35 no'lu izolatların, 302 nt'lik *rpoB* gen dizi analizlerinde bu tip türüne 28-29 nükleotit farklılığı (%90,0-90,3 nt benzerliği) ve 587 nt'lik *gyrB* gen bölgesi analizlerinde ise 49-53 nükleotit farklılığı (%90,9-91,7 nt benzerliği) göstermiş olması bu izolatların daha detaylı çalışmalarla yeni birer tür olarak literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır (Çizelge 4.5., 4.9., 4.12.; Şekil 4.5., 4.9., 4.12.).

Nocardia cinsi ile 16S rRNA dizine göre ilişkili olduğu belirlenen *Nocardia* sp. FSN13, *Nocardia* sp. FSN14, *Nocardia* sp. FSN34 ve *Nocardia* sp. FSN37 izolatlarının 1446 bç'lik bölgede *N. abscessus*'la 0-13 nükleotit farklılığı gösterdiği ve filogenetik ağaçta aynı dalda yer aldığı belirlenmiştir. *N. cyriacigeorgica* ile 15-28 nükleotit farklılığı (%97,8-98,8 nt benzerliği) belirlenen bu izolatların *rpoB* gen bölgesi analizlerinde 302 nt'lik bölgede ise 26-36 nükleotit farklılığı (%87,6-91,0 nt benzerliği) ile *N. arthritidis* tip türüne en yakın akraba olduğu görülmüştür. *N. asiatica* ile 33-40 nükleotit farklılığı (%86,2-88,6 nt benzerliği) gösteren izolatlar, 587 nt'lik *gyrB* gen bölgesi dizi analizlerine göre yine *N. arthritidis*, *N. asiatica* ve *N. beijingensis* tip türleri ile filogenetik olarak ilişkili oldukları belirlenmiştir. *Nocardia* sp. FSN13, *Nocardia* sp. FSN14, *Nocardia* sp. FSN34 ve *Nocardia* sp. FSN37 nolu izolatlar *N. arthritidis*, *N. asiatica* ve *N. beijingensis* ile 21-23 nükleotit farklılığına (%96,0-96,4 nt benzerliğine) sahip oldukları tespit edilmiştir. Benzer kümelenen bu organizmalar *rpoB* gen bölgesi analizlerine göre birbirlerinde 4-14 nükleotit farklılığı gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.9.). *gyrB* gen bölgesinde ise 0-13 nükleotit farklılığı göstermeleri bu organizmaların birbirinden farklı fakat yakın ilişkili olduklarını göstermektedir (Çizelge 4.12.). Farklı besiyerlerindeki morfolojik görüntüleride farklı olan bu izolatların, yapılacak daha detaylı kemotaksonomik ve moleküler teknik ve analizlerle taksonomik pozisyonları netleşecektir (Ek-C).

16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri ile karşılaştırılan 1446 nt'lik bölgede *N. takadensis*'le yakın ilişkili olduğu belirlenen *Nocardia* sp. FSN27 ve *Nocardia* sp. FSN271 izolatlarının 7 nükleotit farklılığı ve %99,4 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Diğer en yakın olan tür *N. lijiangensis*'le ise 17 nükleotit farklılığı ve %98,7 benzerlik

paylaşmaktadırlar (Çizelge 4.5., Şekil 4.5.). 302 nt içeren *rpoB* gen bölgesi dizi analizleri sonucunda *Nocardia* sp. FSN27 ve *Nocardia* sp. FSN271 izolatları da *N.abscessus*'a 14 nükleotit farklılığı (%95,1 nt benzerliği), *N. araoensis* ile *N. beijingensis* tip türleri ile 15 nükleotit farklılığı (%94,8 nt benzerliği) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9.). 587 nt'lik *gyrB* gen bölgesi dizi analizleri ile *Nocardia* sp. FSN271'in *N. beijingensis*'e 41 ve *N. araoensis*'e 43 nükleotit farklılığı (%92,6-93,0 nt benzerliği) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12., Şekil 4.12.). Dizileme analizleri sonucunda *rpoB* ve *gyrB* gen bölgelerine göre *Nocardia* sp. FSN271 nolu izolatin benzer tip türleri ile filogenetik ilişki göstermesi bu gen bölgelerinin birbirleriyle tutarlılığını göstermektedir.

Kribbella tip suşlarının 16S rRNA gen bölgesi ile yapılan filogenetik analizleri iyi bir şekilde ayırım sağlamasına rağmen *gyrB* geninin filogenetik ağacının *K. solani* ve *K. hippodromi* kümelerinin birbirinden daha iyi ayırım sağladığı belirlenmiştir (Kirby ve ark., 2010). *Kribbella* tip suşlarının *gyrB* sekans benzerliği %89,48- 98,22 olarak tespit edilmiş ve karşılaştırılan 1108 nükleotitte 130-22 nükleotit farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmada DNA bağımlı verilerle *gyrB* kullanılarak yapılan filogenetik analizler arasında iyi bir korrelasyon olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *Kribbella* cinsi içerisindeki yakın ilişkili türlerin ayırımında *gyrB* gen bölgesinin 16S rRNA gen bölgesinden daha iyi ayırım sağladığını göstermiştir. Aynı zamanda *gyrB* gen bölgesinin DNA–DNA hibridizasyon deneyleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur (Kirby ve ark., 2010).

16S rRNA dizi analizlerine göre karşılaştırılan 1412-1421 bç'lik bölgede, *Kribbella* sp. FMN22, *Kribbella* sp. FMN26, *Kribbella* sp. FSN06 ve *Kribbella* sp. FSN23 izolatlarının *K. hippodromi*, *K. aluminosa*, *K. jejuensis* ve *K. swartbergensis* tip örnekleri ile 10-18 nükleotit farklılığı (%98,6-99,2 nt benzerliği) gösterdiği belirlenmiştir. *K. hippodromi*, *K. aluminosa* ve *K. swartbergensis* tip türleri ile ilişkili olan *Kribbella* sp. FMN22, *Kribbella* sp. FMN26, *Kribbella* sp. FSN06 ve *Kribbella* sp. FSN23 toprak izolatlarının 289 nt'lik *rpoB* gen bölgesi dizi analizleri sonucunda ilgili tip türlerine 7-35 nükleotit farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. *gyrB* gen bölgesi çalışılan FSN23 nolu izolat, 320 nt'lik karşılaştırılan *gyrB* gen bölgesinde ise *K. hippodromi*, *K. solani* tip türlerinden 31-39 nükleotit farklılığı göstermektedir.

Nocardioides sp. FMN08 test izolatu, 1452 bç'lik 16S rRNA gen bölgesinde *Nocardioides albus* ve *N. luteus tip* örneklerine 6-9 nükleotit farklılığı ve %99,3-99,5 oranında benzerlik göstererek aynı dalda yer almıştır (Çizelge 4.8., Şekil 4.8.). Benzer şekilde, bu izolat, 289 nt'lik *rpoB* gen bölgesi dizi analizleri sonucunda *N. luteus* ve *N. albus* 'la 6-7 nükleotit farklılığı ve %97,5-97,9 nükleotit benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10., Şekil 4.10.). *Nocardioides* sp. FMN08, *Nocardioides albus* ve *N. luteus tip* örneklerine 320 nt'lik karşılaştırılan *gyrB* gen bölgesi analizlerine göre 13-15 nükleotit farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13., Şekil 4.13.).

Kageyama ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada hem topraktan hem de klinik örneklerden *N. abscessus* izole etmeyi başarmışlardır (Kageyama ve ark., 2004f). Son dönemde, Türkiye'de *Nocardia* cinsi ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (Babayiğit ve ark., 2006; Dervişoğlu ve ark., 2008; Perçin ve ark., 2010; Sazak ve ark., 2011). Bu çalışmalar daha çok klinik öneme sahip *Nocardia* suşları ile ilgilidir ve farklı nokardiosiz enfeksiyonuna neden olan farklı cinslerin Türkiye'de de tanımlandığını göstermektedir.

Nocardia ve yakın ilişkili olan diğer cinsleri morfolojik olarak ve biyokimyasal metotlarla birbirinden ayırmak zordur ve *gyrB* sekans verilerinin bu cinsleri tanımlamak için faydalı laboratuvar teknikleri geliştirmede yardımcı olabileceği de düşünülmektedir (Takeda ve ark., 2010). 16S rRNA sekans karşılaştırmaları cins ve daha yüksek taksonomik grupların ayrımı için etkilidir (Monciardini ve ark., 2001; Patel ve ark., 2004; Kirby ve ark., 2010). *gyrB* sekans karşılaştırmaları ise tür seviyesinde filogenetik ilişkileri belirlemek için daha iyi tanımlayıcı bir bölge olduğu belirtilmektedir (Yamato ve Harayama, 1995). Fakat, *gyrB* gen bölgesinin amplifikasyonu 16S rRNA gen bölgesinden daha zordur. Bunun nedeni ise, yüksek primer dejenerasyonunun sonucu olarak kompetitif inhibisyon meydana geldiği için spesifik amplifikasyon düşük ürün miktarı ile sonuçlanmaktadır (Harayama ve Kasai, 2006).

Aktinomiset üyelerinin tanımlanması, türleri ayırmada kullanılan hücresel ağır asitlerin ve 16S rRNA'nın yetersizliği ile kompleks ve hızlı değişen taksonomi nedeniyle zordur. Moleküler çalışmaların temelini oluşturan 16S rRNA dizi analizleri çok yakın ilişkili türlerin ayrımında yeterli olmadığı belirlenmiştir. Çoklu gen analizleri ile türlerin birbirinden ayrımı daha net olduğu ve *gyrB* gen bölgesi gibi değişken bölgelere sahip çoklu genlerin DDH ile uyumlu olduğu da birçok çalışma ile

belirlenmiştir (Yanez ve ark., 2003; Adékambi ve Drancourt, 2004; Everest ve Meyers, 2009; Kang ve ark., 2019).

Çalışmanın multilokus gen bölgelerinden; *rpoB* analizlerinde iki farklı primer kullanılarak sekans verileri elde edilmiştir. NFrpoBF ve NFrpoBR primerlerinin kullanılması ile gerçekleştirilen *rpoB* gen bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin dizilemesinde NFrpoBF primeri kullanılmıştır (Ishikawa ve ark., 2006). Elde edilen sekanslar ile gen bankalarında depolanmış *rpoB* sekansları indirilerek MEGA 4.1 programında hizalanmıştır. Yapılan hizalama çalışmalarında NFrpoBF primeri kullanılarak elde edilen sekansların piklerinin kaliteli olmaması nedeniyle analiz edilememiştir. Bu nedenle, farklı bir primer kullanılarak deneysel aşama devam ettirilmiştir. Literatür taraması sonucunda farklı aktinomiset cinslerinin amplifikasyonunda başarılı olmuş MF ve MR primerleri kullanılarak izolatların *rpoB* gen bölgeleri amplifiye edilmiştir (Kim ve ark., 2003). Dizileme çalışmalarında MF primeri kullanılmış ve elde edilen diziler mevcut tip türlerinin dizileri ile analiz edilmiştir.

gyrB gen bölgesiyle yapılan çalışmada, *gyrB1-gyrB2* (Shen ve ark., 2006a), 2F-6R (Richert ve ark., 2005) ve F1-R1296R (Takeda ve ark., 2010) primerleri kullanılmıştır. Çoğaltılan gen bölgelerinin dizilemesinde çoğaltma primerleri ile birlikte F609, R804 primerleri kullanılarak dizileme analizleri gerçekleştirilmiştir. *gyrB1-gyrB2* ve 2F-6R primerleri ile okutulan bölgelerden elde edilen sekanslarda da piklerinin kaliteli olmaması nedeniyle analizleri gerçekleştirilememiştir. F1-R1296, F609 ve R804 primerleri ile okutulan diziler çok iyi şekilde çakışmış, ancak sınırlı sayıda organizmanın ilgili gen bölgesi çoğaltılabilmektedir. Bu durum, *gyrB* gen bölgesinin amplifikasyonunun 16S rRNA gen bölgesinden daha zor olduğunu ve literatürlerde de bahsedildiği gibi aynı cinsin üyeleri arasında dahi amplifikasyon koşullarında farklılaşma olabileceği tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2006a; Kang ve ark., 2009; Takeda ve ark., 2010; McTaggart ve ark., 2010).

NocgyrBF ve NocgyrBR primerleri ile elde edilen *gyrB* gen bölgesinin dizi analizleri sonucunda, *Nocardia* tip ve toprak izolatlarının 0-90 nükleotit farklılığı gösterirken, 16S rRNA gen bölgesinin analizlerinde 0-67 nükleotit farklılığı gösterdiği belirlenmiştir. *rpoB* gen bölgesinin dizi analizleri sonucunda ise 0-62 nükleotit farklılığı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar multilokus gen bölgelerinin, 16S rRNA gen

bölgesi gibi veya daha iyi ayırt ediciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, *gyrB* geni, *rpoB* ve 16S rRNA'dan daha güçlü bir ayırt edicilik göstermiş ve herhangi iki *Nocardia* türünün, *gyrB* gen analizleri kullanılarak net olarak birbirinden ayrıldığı belirlenmiştir.

Kribbella ve *Nocardioides* tip türlerine ait *rpoB* ve *gyrB* gen dizilerinin gen bankalarında bulunmaması nedeniyle izolatlarımızı, DSMZ'den temin edilen en yakın tip türlerinin ilgili gen bölgelerinin dizileriyle karşılaştırmak mümkün olmuştur. *Kribbella* ve *Nocardioides* izolat ve tip türlerinin ilgili gen bölgeleri ile sağlıklı bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamaktadır. Bu çalışmada ile *Kribbella* ve *Nocardioides* izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre en yakın ilişkili olan tip türleriyle MLSA dizi karşılaştırmaları da yapılmıştır. Sonuçta, MLSA gen bölgelerinin dizi analizlerinde ilgili izolatlardan *Kribbella* sp. olanların *rpoB* gen bölgesinde 0-13 nükleotit farklılığı, *gyrB* gen bölgesinde ise 5-39 nükleotit farklılığı belirlenmiştir. *Nocardioides* sp. izolatı ise *rpoB* dizi analizlerinde 6-7, *gyrB* gen bölgesi analizlerinde 13-15 nükleotit farklılığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlarda, MLSA gen bölgesi analizlerinin de 16S rRNA dizi analizleri gibi ayırt edici bir markör özelliği taşıdığını göstermektedir. Ayrıca, 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* gen bölgesi dizi analizlerinde uyum olması, özellikle yeni tür tanımlamasında analizler arasında korelasyon olması gerekliliğini taşıması da olası yeni türleri belirlemede bize ışık tutmaktadır.

6. ÖNERİLER

1- Bu çalışmanın sonucunda, *Nocardia* sp., FMN18; *Nocardia* sp., FSN271; *Kribbella* sp., FMN22; *Kribbella* sp., FSN23 ve *Nocardioides* sp. ve FMN08 izolatlarının 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* gen bölgesi analizleri ile en yakın tip türlerinden farklılaştıkları belirlenmiştir. İlgili toprak izolatlarına uygulanacak DNA-DNA homolojisi, tüm hücre analizleri, detaylı yağ asidi ve menaquinon analizleri gibi kimyasal karakterizasyon, elektron mikroskopisi spor morfolojisi görüntüleme ve en yakın ilişkili oldukları tip türleriyle yapılacak nümerik testlerle literatüre birer yeni tür olarak kazandırılması amaçlanmaktadır.

2- Tüm bu çalışma planlamaları olası yeni türlerin sistematik konumlarını kazanmaları ve aynı zamanda yakın disiplinlere de enzim ve aktif bileşik gibi konular için araştırma materyali kazandıracağı da öngörülmektedir.

3- *N. jinanensis* gibi potansiyel antibiyotik üreticisi türle ilişkili olan izolatların sekonder metabolit yapılarının da incelenmesi yakın hedeflerimiz arasındadır.

4- Çalışmadan elde edilen 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* gen bölgesi dizilerinin verileri, gen bank'a (NCBI=National Center for Biotechnology Information, US) Ekim-Kasım 2011 tarihlerinde deposit edilmiş ve 16S rRNA gen bölgesi için; *Nocardia* cinsine ait FMN06, FMN15, FMN18, FSN271; *Kribbella* cinsine ait FMN22 ve FSN23 ve aynı zamanda *Nocardioides* cinsine ait FMN08 nolu izolatlar için gen bank erişim numaraları alınmıştır (Şekil 4.5., Şekil 4.7.- 4.8.)

rpoB gen bölgesi için, *Nocardia* cinsi üyelerinden FMN06, FMN15, FMN18, FSN271; *Kribbella* cinsi üyelerinden FMN22 ve FSN23 ile *Nocardioides* cinsi üyesi FMN08 nolu izolatlar ve *gyrB* gen bölgesi için de, *Nocardia* cinsi örneklerinden FMN06, FMN15, FMN18, FSN271 ve *Nocardioides* cinsi üyesi FMN08 nolu izolatlar için gen bank erişim numaraları elde edilmiştir (Şekil 4.9.- 4.10., Şekil 4.12.- 4.13.).

Çalışma izolatlarımıza en yakın ilgili tip türlerin de *rpoB* ve *gyrB* gen bölgesi dizileri elde edilmiş ve bu dizilerin deposit işlemlerinin en kısa zamanda tamamlanması yakın hedeflerimiz arasındadır. Aynı zamanda *rpoB* ve *gyrB* gen bölgesi dizileri mevcut olan diğer izolatlarımızında ilgili gen bölgelerine ait dizilerin deposit işlemlerinin tamamlanması hedeflenmektedir.

DSMZ'den alınan *N. speluncae* ve *N. jinanensis* tip türlerinin *gyrB* gen bölgelerinin dizileri elde edilmiş, fakat Ekim 2011'de (Everest ve ark., 2011) bu tip türlerinin *gyrB* dizileri gen bankasına deposit edildiği belirlenmiştir. İlgili tip türlerin deposit edilmiş olan dizileri ile çalışmamızda elde ettiğimiz diziler karşılaştırılmış ve bu dizilerin %100 benzer olması yapılan çalışmanın doğruluğunu göstermesi açısından oldukça önemlidir.

5- *Kribbella* ve *Nocardioides* cinsleri ile ilgili MLSA dizi verilerinin yetersiz olması ve çalışmamızda da sınırlı sayıda ilgili cinslere ait tip türlerinin kullanılmış olması, bu cinslerle yapılan çalışmalarda sağlıklı karşılaştırmaların yapılmasına izin vermemiştir. Bu nedenle bu cinslere ait daha fazla sayıda tip türünün eldesi ve farklı MLSA bölgelerinin çalışılarak literatüre kazandırılması da amaçlarımız arasındadır.

7. KAYNAKLAR

- Abbas I.H., 2006. A Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. *Journal of Applied Science Research*, 2(10), 809-815.
- Adékambi, T., Drancourt, M., 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 2095–2105.
- Adékambi, T., Berger, P., Raoult, D., Drancourt, M., 2006. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 133-143.
- Adékambi, T., Butler, R.W., Hanrahan, F., Delcher, A.L., Drancourt, M., Shinnick, T.M., 2011. Core gene set as the basis of multilokus sequence analysis of the subclass Actinobacteridae. *PLoS ONE* 6(3) e14792.
- Agterof, M.J., van der Bruggen, T., Tersmette, M., ter Borg, E.J., van den Bosch, J.M.M., Biesma, D.H., 2007. Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. *Neth. J. Med.*, 65, 199–202.
- Albuquerque de Barros, E.V., Manfio, G.P., Ribiero Maitan, V., Mendes Bataus, L.A., Kim, S.B., Maldonado, L.A., Goodfellow, M., 2003. *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 29-33.
- An, D-S., Wan-Taek Im, W-T., Lee, S-T., Yoon, M-H., 2007. *Nocardioides panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 57, 2143–2146.
- Arenskötter, M., Bröker, D., Steinbüchel, A., 2004. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. *Applied and Environm. Microbiol.*, 70, 3195-3204.
- Asoh, N., Watanabe, H., Fines-Guyon, M., Watanabe, K., Oishi, K., Kositsakulchai, W., Sanchai, T., Kunsuikmengrai, K., Kahintapong, S., Khantawa, B., Tharavichitkul, P., Sirisanthana, T., Nagatake, T., 2003. Emergence of rifampin-resistant

- Rhodococcus equi* with several types of mutations in the *rpoB* gene among AIDS patients in northern Thailand. J. Clin. Microbiol., 41, 2337-40.
- Asselineau, J., 1950. The chemical structure of the mycolic acid isolated from *Mycobacterium tuberculosis* var hominis; determination of the position of the hydroxyl. Compt. Rend., 230, 1620-1622.
- Baba, T., Nishiuchi, Y., Yano, I., 1997. Composition of Mycolic Acid Molecular Species as a Criterion in Nocardial Classification. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 795-801.
- Babayiğit, A., Olmez, D., Sozmen, S. C., Makay, B., Uzuner, N., Karaman, O., Anal, O., Gulay, Z., 2010. Infection caused by *Nocardia farcinica* mimicking pulmonary metastasis in an adolescent girl. Pediatr Emerg Care., 26, 203-205.
- Barry, C.H., Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., Yuan, Y., 1998. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. Progress in Lipid Research, 37(2-3), 143-179.
- Battig, U., Wegmann, P., 1990. *Nocardia* mastitis in cattle. 1. Clinical observations and diagnosis in 7 particular cases. Schweiz Arch. Tierheilkd., 132, 315-322.
- Bendinger, B., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., Moormann, M., Klatte, S., 1995. *Gordona hydrophobica* sp. nov., isolated from biofilters for waste gas treatment. Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 544-548.
- Blanchard, R., 1896. Parasites végétaux à l'exclusion des bacteries. Traite de Pathologie Generale, G Masson, Paris, 2, 811-923.
- Blackall. L.L., Marshall, C., 1989. The mechanism of stabilization of actinomycete foam and the prevention of foaming under laboratory conditions. J. Indust. Microbiol., 4, 181-188.
- Blackall. L.L., Parlett. J.H., Hayward, A.C., Minnikin, D.E., Greenfield, P.F., Harbers, A.E., 1989. *Nocardia pinenensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. Journal of General Microbiology, 135, 1547-1558.
- Blackall, L.L., Harbers, A.E., Greenfield, P.F., Hayward, A.C., 1991. Foaming activated sludge plants: A survey in Queensland, Australia and an evaluation of some control strategies. Water Res., 25, 313-317.

- Blackwood, K.S., He, C., Gunton, J., Turenne, C.Y., Wolfe, J., Kabaini, A.M., 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2846–2852.
- Boiron, P., Provost, F., 1990a. Characterisation of *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Gordona* species by in vitro susceptibility testing. *Zbl. Bacteriol.*, 274, 203-213.
- Boiron, P., Provost, F., 1990b. Enzymatic characterisation of *Nocardia* species and related bacteria by API ZYM profile. *Mycopatol.*, 110, 51-56.
- Boiron, P., Provost, F., Duport, B., 1993. *Laboratory Methods for the Nocardiosis*. Paris: Institut Pasteur.
- 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.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 75, 4801–4805.
- 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.
- Busse, H.J., Denner, E.B.M., and Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotech.*, 47, 3-38.
- Busse, H.J., Schumann, P., 1999. Polyamine profiles within genera of the class *Actinobacteria* with LL-diaminopimelic acid in the peptidoglycan. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 179-184.
- Butler, W.R., Floyd, M.M., Brown, J.M., Toney, S.R., Daneshvar, M.I., Cooksey, R.C., Carr, J., Steigerwalt A.G., Charles, N., 2005. Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1615-1624.

- Cardinali, S., Szulin, E., Milani, F., 1995. TLC of mycolic acids for the identification of *Tsukamurella* and related organisms. *Actinomycetes*, 6(3), University Udine, Mycology Department. Gorizia
- 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 in. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1943–1947.
- Castellani, A., Chalmers, A.J., 1913. *Manual of Tropical Medicine*. 2nd Edition., Bailliére, Tindall and Cox: London.
- Chan, M-S., Maiden, M.C., Spratt, B.G., 2001. Database-driven Multi Locus Sequence Typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*, 17, 1077-1083.
- Choi, D.H., Kim, H.M., Noh, J-H., Cho, B.C., 2007. *Nocardioides marinus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 775-779.
- Chun, J., 1995. Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. Ph.D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne, UK., 444 s.
- Chun, J., Goodfellow, M., 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 240-245.
- Chun, J., Kang, S.O., Hah, Y.C., Goodfellow, M., 1996. Phylogeny of mycolic acid containing actinomycetes. *J. Ind. Microbiol.*, 17, 205-213.
- Chun, J., Blackall, L.L., Kang, D-O., Hah, Y.C., Goodfellow, M., 1997. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.*, as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *Int. Syst. Evol. Microbiol.*, 47, 127-131.
- Chun, J., Liu, Z., Ruan, J.S., Yan, X.C., 1998. The new species of *Nocardia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 901-905.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W., 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2259-2261.
- Clark, J., 2007. The chromatography. Colorado University site
- Cloud, J.L., Conville, P.S., Croft, A., Harmsen, D., Witebsky, F.G., Carroll, K.C., 2004. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of *Nocardia* species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 578–584.

- Coenye, T., LiPuma, J.J., 2002. Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandoraea* species. FEMS Microbiology Letters, 208, 15-19.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol. Rev., 29, 147–167.
- Collins, M.D., 1985. Isoprenoid quinones analyses in bacterial classification and identification. (Edit: Goodfellow, M. And Minnikin, D.E.). *Chemical Methods In Bacterial Systematics*. s: 267-287. Academic Press. London.
- Collins, M.D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Alderson, G., 1985. Menaquinone composition of mycolic-acid-containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. J. Appl. Bacteriol., 58, 77-86.
- 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.
- Collins, M.D., Howarth, O.W., Grund, E., Kroppenstedt, R.M., 1987. Isolation and structural determination of new members of the vitamin K₂ series from *Nocardia brasiliensis*. FEMS Microbiol. Lett., 41, 35-39.
- Collins, M.D., Dorsch, M., Stackebrandt, E., 1989. Transfer of *Pimelobacter tumescens* to *Terrabacter* gen. nov. as *Terrabacter tumescens* comb. nov. and of *Pimelobacter jensenii* to *Nocardioides* as *Nocardioides jensenii* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 1-6.
- Collins, M.D., Cockcroft, S., Wallbanks, S., 1994. Phylogenetic Analysis of a New LL-Diaminopimelic Acid-Containing Coryneform Bacterium from Herbage, *Nocardioides plantarum* sp. nov. Int. J. of Syst. Bacteriol., 44, 523-526.
- Colquhoun, J.A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., 1998. Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. Antonie van Leeuwenhoek, 74, 27–40.
- Colwell, R.R., 1970. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. Journal of Bacterio., 194, 410-433.
- Conville, P.S., Fischer, S.H., Cartwright, C.P., Witebsky, R.G., 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol., 38, 158-164.

- Conville, P.S., Zelazny, A.M., Witebsky, F.G., 2006. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 2760–2766.
- Conville, P.S., Brown, J.M., Steigerwalt, A.G., Brown-Elliott, B.A., Witebsky, F.G., 2009. *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., human pathogens and members of the "*Nocardia transvalensis* Complex". *J. Clin. Microbiol.*, 46, 1178-84.
- Conville, S.P., Witebsky, F.G., 2010. The Complexity of *Nocardia* Taxonomy: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology newsletter*, 32, 119-125.
- Cross, T., Goodfellow, M., 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. In: (Edit: Sykes, G. and Skinner, F.A.). *Actinomycetales*. Academic Press, s: 11-112. London.
- Cui, Q., Wang, L., Huang, Y., Liu, Z., Goodfellow, M., 2005. *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1921–1925.
- Dastager, S.G., Lee, J-C., Ju, Y-J., Park, D-J., Kim, C-J., 2008. *Nocardioides koreensis* sp. nov., *Nocardioides bigeumensis* sp. nov., and *Nocardioides agariphilus* sp. nov., isolated from soil from Bigeum Island, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2292-2296.
- De los Reyes, M.F., De los Reyes, F.L., 3rd, Hernandez, M., Raskin, L., 1998a. Identification and quantification of *Gordonia amarae* strains in activated sludge schemes using comparative rRNA sequence analysis and phylogenetic hybridization probes. *Water Sci. Technol.*, 37, 521-525.
- De los Reyes, M.F., De los Reyes, F.L., 3rd, Hernandez, M., Raskin, L., 1998b. Quantification of *Gordonia amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2503-2512.
- 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.

- Demaree, J.B., Smith, N.R., 1952. *Nocardia vaccinii* sp. nov. causing galls on blueberry plants. *Phytopathology*. 42, 249-252.
- Dervişoğlu, E., Willke, A., Kalendar, B., Dişçi, E.A., Irvem, A., Gündeş, S., 2008. Pulmonary nocardiosis with a large solitary cavitary nodule caused by *Nocardia cyriacigeorgica* in a patient receiving corticosteroid therapy. *Mikrobiyol Bul.*, 42, 489-96.
- Devulder, G., Perouse de Montclos, M., Flandrois, J.P., 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 55, 293-302.
- Dhaliwal, B.S., 1979. *Nocardia amarae* and activated sludge foaming. *J. Water Pollut. Cont. Fed.*, 51, 340-350.
- Drzyzga, Llorens, J.M.N., Fernandez de las Heras, L., Garcia Fernandez, E., Perera, J., 2009. *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesterol degrading actinomycete isolated from sewage sludge *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 1011–1015.
- Eccleston, G.P., Brooks, P.R., Kurtböke, D.I., 2008. The Occurrence of Bioactive *Micromonosporae* in Aquatic Habitats of the Sunshine Coast in Australia. *Mar. Drugs*, 6, 243-261.
- Eppinger, H., 1891. Über eine neue pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (*Cladothrichia*). *Beitr. Pathol. Ana.t Allg. Pathol.*, 9, 287-328.
- Exmelin, L., Malbruny, B., Vergnaud, M., Prosvost, F., Boiron, P., Morel, C., 1996. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 1014-1016.
- Everest, G.J., Meyers, P.R., 2008. *Kribbella hippodromi* sp. nov., isolated from soil from a racecourse in South Africa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 443–446.
- 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., Cook, A.E., le Roes-Hill, M., Meyers, P.R., 2011. *Nocardia rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34, 508-512.

- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368-376.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogeny: an appropriate use of the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5.1 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> 14.10.2010).
- Fines, M., Pronost, S., Maillard, K., Taouji, S., Leclercq, R., 2001. Characterization of mutations in the *rpoB* gene associated with Rifampin resistance in *Rhodococcus eui* isolated from foals. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2784-2787.
- 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., *et al.* 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496-512.
- 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.
- Freeman, S., Herron, J.C., 2007. *Evolutionary analysis*, 4th edition. Pearson Education.
- Friedman, C.S., Beaman, B.L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A., Hedrick, R.P., 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Bacteriol.*, 48, 237-246.
- Garvie, E.I., 1978. *Streptococcus raffinolactis* Orla-Jensen and Hensen a group N streptococcus found in raw milk. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28, 190-193.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L., 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 733-739.
- Goh, S.H., Potter, S., Wood, J.O., Hemmingsen, S.M., Reynolds, R.P., Chow, A.W., 1996. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species

- identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 818–823.
- Goodfellow, M., 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. of Gen. Microbiol.*, 69, 33-80.
- Goodfellow, M., Collins, M.D., Minnikin, D.E., 1976. Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolysates of coryneform and related taxa. *J. Gen. Microbiol.*, 96, 351-358.
- Goodfellow, M., Alderson, G., 1977. The actinomycete genus *Rhodococcus*: a home for the *rhodochrous* complex. *J. Gen. Microbiol.*, 100, 99–122.
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1977. Nocardioform Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 159-180.
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1981. The genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. *The Prokaryotes: A handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, (Edit: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G. Schlegel.). s: 2016-2027. Springer Verlag, Berlin.
- Goodfellow, M., Wayne, L.G., 1982. Taxonomy and Nomenclature. *The Biology of Mycobacteria*, Vol 1. Physiology, Identification and Classification, (Edit: C. Ratledge and J.S. Stanford). s: 471-521. Academic Press. London,
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1984. Circumscription of the genus. (Edit: Kubica, G.P. and Wayne, L.G.): *The Mycobacteria*. s: 1-24. Marcel Dekker. New York.
- Goodfellow, M., Cross, T., 1984. Classification, *The biology of the actinomycetes*. (Edit: Goodfellow M., Mordarski J.G. and Williams S.T.). s: 7-164. Academic Press,
- Goodfellow, M., 1986. Genus *Rhodococcus* Zopf 4891. (Edit: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt), vol. 2. s. 1472–1481. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Goodfellow, M., Lechevalier, M.P., 1989. Genus *Nocardia* Trevisan 1889, 9^{AL}, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, ed. Williams ST, Williams ve Wilkins, Baltimore, 4, 2350-2361.

- 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., O'Donnell, A.G., 1993. Handbook of new bacterial systematics. Academic Press Ltd., London.
- 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., 1997. The actinomycetes: *Actinomyces*, *Nocardia* and related genera. In: *Nocardia* and Related genera. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, (Edited by Balows, A and Duerden, B. I., Edward Arnold) Ninth edition, s: 464-489. Systematic Bacteriology, London
- Goodfellow, M., Magee, J.G., 1998. Taxonomy of mycobacteria. (Edit: P.R.J. Gangadharam and P.A. Jenkins). *Mycobacterial Basic Aspects*. s: 1-71. Chapman and Hall. New York.
- Goodfellow, M., Alderson, G., Chun, J., 1998. *Rhodococcal* systematics: problems and developments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74, 3-20.
- Goodfellow, M., Işık, K., Yates, E., 1999. Actinomycete systematics: An unfinished synthesis. *Nova acta Leopoldina* NF80, 312, 47-82.
- 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., Fiedler, H.P., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 119–142.
- A. H. Gordon, Martin, A. J. P., Synge, R. L. M., 1943. Partition chromatography in the study of protein constituents. *Biochem J.*, 37, 79–86
- Gordon, R.E., Mihm, J.M., 1962. The type species of the genus *Nocardia*. *J. Gen. Microbiol.*, 27, 1-10.

- Gtari, M., Brusetti, L., Hassen, A., Mora, D., Daffonchio, D., Boudabous, A., 2007. Genetic diversity among *Elaeagnus* compatible *Frankia* strains and sympatric-related nitrogen-fixing actinobacteria revealed by *nifH* sequence analysis. *Soil Biol. Biochem.*, 39, 372–377.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y., 2008. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 149-159.
- Gürtler, V., Smith, R., Mayall, B.C., Potter-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., Miyadoh, S., 2001. Proposal to transfer *Actinomadura carminata* to a new subspecies of *Nonomuraea* as *Nonomuraea roseviolaceae* subsp. *carminata* comb nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 881-889.
- Hamid, M.E., Minnikin, D.E., Goodfellow, M., 1993. A simple chemical test to distinguish mycobacteria from other mycolic-acid-containing actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 2203-2213.
- Hamid E.M., Maldonado, L., Eldin, G.S.S., Mohamed, M.F., Saeed, N.S., Goodfellow, M., 2001. *Nocardia africana* sp. nov, a New Pathogen Isolated from Patients with pulmonary infections. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 625-630.
- Harayama, S., Kasai, H., 2006. *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*, (Edit: Stackebrandt, E.) Chap 5. Springer, Berlin.
- Hassan, U.L., Wellington, E.M., 2009. *Actinobacteria*. *Encyclopedia of Microbiology* Third Edition. S: 26-44.. Moselio Schaechter.
- 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., Nonomura, H., 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 65 (5), 501-509.

- Hecht, S.T., Causey, W.A., 1976. Rapid methods for the detection and identification of mycolic acid in aerobic actinomycetes and related bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 4, 284-287.
- Hetherington, S.V., Watson, A.S., Patrick, C.C., 1995. Sequence and Analysis of the *rpoB* Gene of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 2164-2166.
- Hirsch, C.F., Christensen, D.L., 1983. Novel Method for Selective Isolation of Actinomycetes. *App. and Environ. Microbiol.*, 46, 925-929.
- Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, X-S., Goodfellow, M., Ruan, J-S., 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs*, 7, 24–44.
- Hoshino, Y., Watanabe, K., Iida, S., Suzuki, S-I., Kudo, T., Kogure, T., Yazawa, K., Ishikawa, J., Kroppenstedt, R.M., Mikami, Y., 2007. *Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1456–1460.
- Hu, H., Zhang, Q., Ochi, K., 2002. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase β subunit) of *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 184, 3984-3991.
- Ishikawa, J., Chiba, K., Kurita, H., Satoh, H., 2006. Contribution of *rpoB2* RNA Polymerase β Subunit Gene to Rifampin Resistance in *Nocardia* Species. *Antimic. Agent and Chemothe.*, 50, 1342–1346.
- Işık, K., Chun, J., Hah, Y.C., Goodfellow, M., 1999a. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 833-837 .
- Işık, K., Chun, J., Hah, Y.C., Goodfellow, M., 1999b. *Nocardia uniformis* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1227-1230 .
- Işık, K., Goodfellow, M., 2002. Differentiation of *Nocardia* species by PCR-randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Syst. Appl. Microbiol.*, 25, 60-67.
- Işık, K., Goodfellow, M., 2010. Molecular fingerprinting of some clinically significant *Nocardia* and related strains by restriction polymorphism ribosomal RNA analyses. *Turk J. Biol.*, 34, 355-365.

- Jannat-Khah, D., Kroppenstedt, R.M., Klenk, H-P., Spröer, C., Schumann, P., Lasker, B.A., Steigerwalt, A.G., Hinrikson, H.P., Brown, J.M., 2010. *Nocardia mikamii* sp. nov., isolated from human pulmonary infections in the USA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 2272-2276.
- Jensen, H.L., 1934. Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria. *Proc. Linn. Soc. New South Wales*, 59, 19-61.
- 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.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, vol. 3, Edited by H.N. Munro. New York: Academic Press., 21-132.
- 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., Rodríguez-Nava, V., 2008. *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2210-2214.
- Kaewkla, O., Franco, C.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.
- Kageyama, A., Poonwan, N., Yazawa, K., Mikami, Y., Nishimura, K., 2004a. *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 125–130.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Nishimura, K., Mikami, Y., 2004b. *Nocardia inohanensis* sp. nov., *Nocardia yamanashiensis* sp. nov. and *Nocardia niigatensis* sp. nov., isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 563–569.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Mukai, A., Kinoshita, M., Takata, N., Nishimura, K., Kroppenstedt, R.M., Mikami, Y., 2004c. *Nocardia shimofusensis* sp. nov., isolated from soil, and *Nocardia higoensis* sp. nov., isolated from a patient with lung nocardiosis in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1927–1931.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Mukai, A., Kohara, T., Nishimura, K., Kroppenstedt, R. M., Mikami, Y., 2004d. *Nocardia araoensis* sp. nov. and *Nocardia pneumoniae* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 2025–2029.

- Kageyama, A., Torikoe, K., Iwamoto, M., Masuyama, J-I., Shibuya, Y., Okazaki, H., Yazawa, K., Minota, S., Kroppenstedt, R.M., Mikami, Y., 2004e. *Nocardia arthritidis* sp. nov., a new pathogen isolated from a patient with rheumatoid arthritis in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2366–2371.
- Kageyama A., Yazawa K., Kudo T., Taniguchi H., Nishimura K., Mikami Y., 2004f. First Isolates of *Nocardia abscessus* from Humans and Soil in Japan. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 45, 17-21.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Nishimura, K., Mikami, Y., 2004g. *Nocardia testaceus* sp. nov. and *Nocardia senatus* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 48, 271–276.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Taniguchi, H., Chibana, H., Nishimura, K., Kroppenstedt, R.M., Mikami, Y., 2005. *Nocardia concava* sp. nov., isolated from Japanese patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 2081–2083.
- Kageyama, A., Iida, S., Yazawa, K., Kudo, T., Suzuki, S-I., Koga, T., Saito, H., Inagawa, H., Wada, A., Kroppenstedt, R.M., Mikami, Y., 2006. *Gordonia araii* sp. nov. and *Gordonia effusa* sp. nov., isolated from patients in Japan. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 56, 1817-1821.
- 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., Buczolits, S., Jackel, U., Grun-Wollny, I., Busse, H.J., 2004. *Nocardia tenerifensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 381–383.
- Kämpfer, P., Huber, B., Buczolits, S., Thummes, K., Grun-Wollny, I., Busse, H.-J., 2007. *Nocardia acidivorans* sp. nov., isolated from soil of the island of Stromboli. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 57, 1183–1187.
- Kämpfer, P., Young, C.C., Chu, J.N., Frischmann, A., Busse, H.J., Arun, A.B., Shen, F.T., Rekha, P.D., 2011. *Gordonia humi* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 65-70.
- Kaneda, K., Imaizumi, S., Yano, I., 1995. Distribution of C22-; C24- and C26- alpha-unit-containing mycolic acid homologues in mycobacteria. *Microbial. Immun.*, 39, 563-570.

- Kang, Y., Takeda, K., Yazawa, K., Mikami, Y., 2009. Phylogenetic Studies of *Gordonia* Species Based on *gyrB* and *secA1* Gene Analyses. *Mycopathologia*, 167, 95-105.
- Kasai, H., Tamura, T., Harayama, S., 2000. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 127-134.
- Keddie, R.M., 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.
- Khamis, A., Raoult, D., Scola, B.L., 2004. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3925-3931.
- Kim, B-J., Lee, S.H., Lyu, M.A., Kim, S.J., Bai, G-H., Kim, S-J., Chae, G-T., Kim, E-C., Cha, C-Y., Kook, Y-H., 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1714–1720.
- Kim, B-J., Koh, Y.H., Chun, J., Kim, C.J., Lee, S.H., Cho, M., Hyun, J.W., Lee, K.H., Cha, Y.C., Kook, Y.H., 2003. Differentiation of Actinomycete genera based on partial *rpoB* gene sequences. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 13(6), 846-852.
- Kim, S.B., Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S.C., Iliarionov, S., Goodfellow, M., 2000. *Gordonia amicalis* sp. nov., a novel dibenzothiophene-desulphurizing actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 50, 2031–2036.
- Kim, K.K., Roth, A., Andrees, S., Lee, S.T., Kroppenstedt, R.M., 2002. *Nocardia pseudovaccinii* spp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1825-1829.
- Kim, K.K., Lee, C.S., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Lee, S.T., 2003. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium isolated from a wastewater treatment bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1427–1433.
- Kim, H.M., Choi, D.H., Hwang, C.Y., Cho, B.C., 2008. *Nocardioides salarius* sp. nov., isolated from seawater enriched with zooplankton. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2056-2064.

- Kim, K-H., Roh, S.W., Chang, H-W., Nam, Y-D., Yoon, J-H., Jeon, C.O., Oh, H-M., Bae, J-W., 2009. *Nocardioides basaltis* sp. nov., from black beach sand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59, 42-47.
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. Journal of Microbiological Methods, 84, 81-87.
- Kinoshita, N., Homma, Y., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M., Hamada, M., 2001. *Nocardia vinacea* sp. nov. Actinomycetologica, 15, 1–5.
- 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.
- Kirby, B.M., Everest, G.J., Meyers, P.R., 2010. Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. Antonie van Leeuwenhoek, 97, 131–142.
- Klatte, S., Rainey, F.A., Kroppenstedt, R.M., 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the Genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. Int. J. of Sys. Bacteriol., 44, 769-773.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Altendorf, K., Rainey, F.A., 1996. *Gordonia hirsuta* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 876-880.
- Kluge, A., Farris, J.S., 1969. Quantitative phylogenetics and evolution of the annurans. Systematic Zoology, 18, 1-32.
- 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.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefing in Bioinformatics, 9 (4), 299-306.
- Kummer, C., Schumann, P., Stackebrandt, E., 1999. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. Int. J. of Syst. Bacteriol., 49, 1513-1522.

- Lagesen, K., Ussery, D.W., Wassenaar, T.M., 2010. Genome Update: The Thousandth Genome A Cautionary Tale. *Microbiology*, 156, 603-608.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, (Edited by Stackebrandt, E and Goodfellow, M. John Wiley and Sons), s: 115-175. New York.
- Laurent, F., Carlotti, A., Boiron, P., Villard, J., Freney, J., 1996. Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species, *J. Clin. Microbiol.*, 34, 1079-1082.
- Laurent, F., Rodríguez-Nava, V., Noussair, L., Couble, A., Nicolas-Chanoine, M-H., Boiron, P., 2007. *Nocardia ninae* sp. nov., isolated from a bronchial Aspirate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 661–665.
- Lawson, P.A., Collins, M.D., Schumann, P., Tindall, B.J., Hirsch, P., Labrenz, M., 2000. New LL-diaminopimelic acid-containing actinomycetes from hypersaline, heliothermal and meromictic Antarctic Ekho Lake: *Nocardioides aquaticus* sp. nov. and *Friedmanniella* [correction of Friedmannielly] *lacustris* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 23, 219–229.
- le Roes, M., Goodwin, C.M., Meyers, P.R., 2008. *Gordonia lacunae* sp. nov., isolated from an estuary. *Syst. Appl. Microbiol.* 31,17-23.
- 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, M.P., Lechevalier, H.A., 1974. *Nocardia amarae* sp. nov. an actinomycete common in foaming activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 278-288.
- Lechevalier, M.P., De Bièvre, C., Lechevalier, H.A., 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.
- Lechevalier, M.P., Stern, A.E., Lechevalier, H.A., 1981. Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. *Zentralbl. Bakteriologie. Suppl.*, 11, 111-116.
- 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., 2007. *Nocardioides furvisabuli* sp. nov., isolated from black sand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 35-39.
- 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, H., Bang, H.E., Bai, G.H., Cho, S.N., 2003. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. J. Clin. Microbiol., 41, 2213–2218.
- Lee, D.W., Hyun, C-G., Lee, S.D., 2007. *Nocardioides marinisabuli* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from beach sand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 2960-2963.
- Lee, S.D., Lee, D.W., Kim, J-S., 2008. *Nocardioides hwasunensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 278-281.
- Leite, C.Q.F., Oliveira de Souza, C.W., Roberto de Andrade Leite, S. 1998. Identification of Mycobacteria by Thin Layer Chromatographic Analysis of Mycolic Acids and Conventional Biochemical Method: Four Years of Experience. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 93(6), 801-805.
- Lemmer, H., Kroppenstedt, M., 1984. Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. Syst. Appl. Microbiol., 5, 124-135.
- Lepp, P.W., Relman D.A., 2004. Molecular Phylogenetic Analysis. In Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. (Edited by Persing, D.H, Tenover, F.C., Versalovic J., Tang Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A., White., T.J.) ASM Pres, Chapter 13, s:161-180., Washington D.C.
- 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.

- Lida, S., Taniguchi, H., Kageyama, A., Yazawa, K., Chibana, H., Murata, S., Nomura, F., Kroppenstedt, R.M., Mikami Y., 2005. *Gordonia otitidis* sp. nov., isolated from a patient with external otitis. Int.l J. of Syst. and Evol. Microbiol., 55, 1871–1876.
- Lida, S., Kageyama, A., Yazawa, K., Uchiyama, N., Toyohara, T., Chohnabayashi, N Suzuki, S-C., Nomura, F., Kroppenstedt, R.M., Mikami, Y., 2006. *Nocardia exalbida* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., 56, 1193–1196.
- Linos, A., Steinbuchel, A., Sproer, C., Kroppenstedt, R.M., 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 1785–1791.
- Liu, Y., Ge, F., Chen, G., Li, W., Ma, P., Zhang, G., Zeng, L., 2011. *Gordonia neofelifaecis* sp. nov., a cholesterol side-chain-cleaving actinomycete isolated from the faeces of *Neofelis nebulosa*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61, 165-169.
- Lu, Y., Yan, X., 1983. Studies of classification of thermophilic actinomycetes: Determination of thermophilic members of *Nocardiaceae*. Acta Microbiol., Sinica., 23, 220-228.
- Ludwig, W, Klenk, H.P., 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. (Edit: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M.). 2nd edn, vol 2, the proteobacteria, part A, s: 49–65. Introductory essays. Springer, USA.
- Lungu, O., Latta, P.D., Weitzman, I., Silverstein, S., 1994. Differentiation of *Nocardia* from rapidly growing *Mycobacterium* species by PCR-RFLP analysis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 18, 13- 18.
- Luo, H., Gu,Q., Xie, J., Hu, C., Liu, Z., Huang, Y., 2007. *Gordonia shandongensis* sp. nov., isolated from soil in China. Int.l J. of Syst. and Evol. Microbiol., 57, 605–608.
- Maiden, M.C.J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 60, 561–588.
- Maldonado, L., Hookey, J.V., Ward, A.C., 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.
- Manninen, K.I., Smith, R.A., Kim, L.O., 1993. Highly presumptive identification of bacterial isolates associated with the recent Canada-wide mastitis epizootic as *Nocardia farcinica*. Can. J. Microbiol., 39, 635-641.
- Marmur, J., Doty, P., 1962. Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its denaturation temperature. J. Mol. Biol., 5, 109–118.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., Vos, P., Willems, A., 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., 58, 200–214.
- McNeil, M.M., Brown, J.M., 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clinical Microbiological Reviews, 7, 357-417.
- McTaggart L.R., Richardson, S.E., Witkowska, M., Zhang, S.X., 2010. Phylogeny and Identification of *Nocardia* Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. J. of Clinical Microbiol., 48, 4525–4533.
- Mervat. M.A., Gendy, E.L., 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.
- Mikami, Y., 2007. Biological work on medically important *Nocardia* Species. Actinomycetologica, 21, 46-51.
- 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.
- Minnikin, D.E., Alshamaony, L., Goodfellow, M., 1975. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole organism methanolysates. J. Gen. Microbiol., 88, 200-204.
- Minnikin, D.E., Goodfellow, M., Collins, M.D., 1978. Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. (Edit, Bousfield, I.J. and Calley, A.G.). Academic Press., s: 85-160. London.

- Minnikin, D.E., Goodfellow, M., 1980. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. (Edit, M. Goodfellow and R.G. Board). s: 189-256. Academic Press, London.
- Minnikin, D.E., Hutchinson, I.G., Caicott, A.B., Goodfellow, M., 1980. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. J. Chromatogr., 188, 221-233.
- Minnikin, D.E., O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A., Parlett, J.H., 1984a. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. J. Microbiol. Methods, 2, 233-241.
- Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Parlett, J.H., Goodfellow, M., Magnusson, M., 1984b. Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. Arch. Microbiol., 139, 225-231.
- Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Parlett, J.H., Goodfellow, M., 1985. Mycolic acid patterns of some rapidly growing species of *Mycobacterium*. Zbl. Bacteriol. Hyg., A259, 446-460.
- Monciardini, P., Sasio, M., Cavaletti, L., Chiocchini, C., Donadio, S., 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. FEMS Microbiol. Ecol., 42, 419-429.
- Morse, R., O'Hanlon, K., Collins, M.D., 2002. Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the β subunit of DNA-dependent RNA polymerase of gram-positive and gram negative bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1477-1484.
- Moser, B.D., Klenk, H.P., Schumann, P., Pötter, G., Lasker, B.A., Steigerwalt, A.G., Hinrikson, H.P., Brown, 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.
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., Kamagata, Y., 1995. *Microlunatus phosphovoratus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphateaccumulating bacterium isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 17-22.

- Nesterenko, O. A., Kvasnikov, E. I., Nogina, T. M., 1985. *Nocardioideaceae* fam. nov., a new family of the order *Actinomycetales*. Microbiol. Zh., 47, 3–12.
- Nishiuchi, Y., Baba, T., Hotta, H.H., Yano, I., 1999. Mycolic acid analysis in *Nocardia* species: The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, and *N. Nova*. Journal of Microbiological Methods, 37, 111-122.
- Nocard, E., 1888. Note sur la maladie de boeufs de la Guadeloupe, connue sous le nom de farcin. Annis. Inst. Pasteur. 2, 293-302. Paris.
- Ochi, K., 1995. Phylogenetic Analysis of Mycolic Acid-Containing Wall-Chemotype IV *Actinomycetes* and Allied Taxa by Partial Sequencing of Ribosomal Protein AT-L30. Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 653-660.
- O'Donnell, A.G., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1982. Lipids in the classification of *Nocardioideae*: reclassification of *Arthrobacter simplex* (Jensen) located in the genus *Nocardioideae* (Prauser) emend. O'Donnell *et al.* as *Nocardioideae simplex* comb. nov. Arch. Microbiol., 133, 323–329.
- Orchard, V.A., 1981. The ecology of *Nocardia* and related taxa. Zentrallblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, 1. Abteilung, Supplement, 11, 167-180.
- Özdemir-Koçak, F., Doğal ve Klinik *Nocardia* Suşlarına Bazı Sulfonamid Türevlerinin Antimikrobiyal Etkileri ve Taksonomik Uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 86 s.
- Pagilla, K.R., Jenkins, D., Kido, W., 1998. *Nocardia* effects in waste activated sludge. Wat. Sci. Tech., 38 (2), 49-54.
- Park, Y.H., Yoon, J.H., Lee, S.T., 1998. Application of multiplex PCR using species-specific primers within the 16S rRNA gene for rapid identification of *Nocardioideae* strain. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 895-900.
- 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 '*Nocardioideae fulvus*' IFO 14399 and *Nocardioideae* sp. ATCC 39419 in *Kribbella* gen. nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and *Kribbella sandramycini* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 743–752.
- Park, S.C., Baik, K.S., Kim, M.S., Chun, J., Seong, C.N., 2008. *Nocardioideae dokdonensis* sp. nov., an actinomycete isolated from sand sediment. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. 58, 2619-2623.

- Park, S., Kang, S.J., Kim, W., Yoon, J.H., 2009. *Gordonia hankookensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 3172-3175.
- Patel, J.B., Wallace Jr. R.J., Brown-Elliott, B.A., Taylor, T., Imperatrice, C., Leonard, D.G.B., Wilson, R.W., Mann, L., Just, K.C., Nachamkin, I., 2004. Sequence based identification of aerobic actinomycetes. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2530-2540.
- Peela, S., Kurada, V.B., Terli, R., 2005. Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 583-585.
- Perçin, D., Sümerkan, B., İnci, R., 2011. Comparative Evaluation of E-Test and Disk Diffusion Methods for Susceptibility Testing of *Nocardia* Species. *Mikrobiyol. Bul.*, 45, 274-279.
- Pinoy, E., 1913. Actinomycoses et mycetomes. *Bull. Inst. Pasteur*, 11, 929-938.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151-156.
- Polsinelli, M., Mazza, P.G., 1984. Use of membrane filters for selective isolation of actinomycetes from soil. *FEMS Microbiology Letters*, 22, 79-83.
- Poonwan, N., Kusum, M., Mikami, Y., Yazawa, K., Tanaka, Y., Gono, T., Hasegawa T., Konyama, K., 1995. Pathogenic *Nocardia* isolated from clinical specimens including those of AIDS patients in Thailand. *Eur. J. Epidemiol.*, 11, 507-512.
- Porsby, C.H., Nielsen, K.F., Lone Gram, L., 2008. *Phaeobacter* and *Ruegeria* Species of the *Roseobacter* Clade Colonize Separate Niches in a Danish Turbot (*Scophthalmus maximus*)-Rearing Farm and Antagonize *Vibrio anguillarum* under Different Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7356-7364.
- Prauser, H., 1976. *Nocardioides*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 58-65.
- Prauser, H., 1984. *Nocardioides luteus* spec. nov. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 24, 647-648.

- Prauser, H., Schumann, P., Rainey, F.A., Krappenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 1997. *Tetracoccus luteus* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 1218-1224.
- Pukall, R., Lapidus, A., Glavina Del Rio, T., Copeland, A., Tice, H., Cheng, J-F., Lucas, S., Chen, F., Nolan, M., LaButti, K., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pitluck, S., Bruce, D., Goodwin, L., Land, M., Hauser, L., Chang, Y-J., Jeffries, C.D., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N.C., Klenk, H-P., Brettin, T., 2010. Complete genome sequence of *Kribbella flavida* type strain (IFO 14399^T). *Standards in Genomic Sciences*, 2, 186-193.
- Qui, D., Ruan, J., Huang, Y., 2008. Selective Isolation and Rapid Identification of Members of the Genus *Micromonospora*. *Appl. and Environm. Micro.*, 17, 5593-5597.
- Rainey, F.A., Schumann, P., Prauser, H., Toalster, R., Stackebrandt, E., 1993. *Sporichthya polymorpha* represents a novel line of descent within the order *Actinomycetales*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 109, 263-268.
- Ramos-Vara, J.A., Wu, C.C., Lin, T.L., Miller, M.A., 2007. *Nocardia tenerifensis* genome identification in a cutaneous granuloma of a cat. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19, 577-580.
- Rapp, M., 1974. Indikatorzusätze zur Keimdifferenzierung auf Würze- und Malzextrakt-Agar. - *Milchwiss.*, 29, 341-344.
- Revazishvili, T., Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A.S., Morris, J.G., Sulakvelidze, A., 2004. Comparative Analysis of Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterizing *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Environmental and Clinical Sources. *J. of Clin. Microbiol.*, 42, 276–285.
- Rhodes, M.W., Kator, H., Kotob, S., van Berkum, P., Kaattari, I., Vogelbein, W., Quinn, F., Floyd, M.M., Butler, W.R., Ottinger, A., 2003. *Mycobacterium shottsii* sp. nov., a slow-growing species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 421-424.

- Richert, K., Brambilla, E., Stackebrandt, E., 2005. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from microbacteria, order Actinomycetales. J. Microbiol. Methods, 60, 115–123.
- Richert, K., Brambilla, E., Stackebrandt, E., 2007. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16S rRNA genes. Syst. Appl. Microbiol., 30, 102–108.
- Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Molinard, C., Sandoval, H., Boiron, P., Laurent, F., 2004. *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. J. Clin. Microbiol., 42, 4530–4535.
- Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Devulder, G., Flandrois, J-P., Boiron, P., Laurent, F., 2006. Database for *hsp65* Gene-Based Identification of *Nocardia* Species. Journal of Clinical Microbiology, 44, 536–546.
- Rodríguez-Nava, V., Khan, Z. U., Potter, G., Kroppenstedt, R.M., Boiron, P., Laurent, F., 2007. *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., 57, 1482–1486.
- 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. *solivifaciens*. Syst. and Appl. Microbiol., 32, 314–322.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concepts for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 25, 39-67.
- Rossi-Doria, T., 1891. Su di alcune specie di “Streptothrix” trovate nell’aria studiate in rapporto a quelle già note e specialmente all’Actinomyces. Ann. Ist. Igiene Sper. Univ.; Roma, 1, 399-438.
- Ruan, J.S., Zhang, Y.M., 1979. Two new species of *Nocardioideae*. Acta Microbiol. Sin., 19, 347-352.
- 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.

- Sahin, N., Sazak, 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.
- Saintpierre-Bonaccio, D., Maldonado, L.A., Amir, H., Pineau, R., 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 reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4, 406–425.
- Salah, I.B., Adékambi, T., Raoult, D., Drancourt, M., 2008. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. Microbiology, 154, 3715–3723.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saubolle, M.A., Sussland, D., 2003. Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. Journal of clin. Microbiol., 41, 4497–4501.
- Sazak, A., Sahin, N., Camas, M., 2011. *Nocardia goodfellowii* sp. nov. and *Nocardia thraciensis* sp. nov., isolated from soil in Turkey. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., ijs.0.031559-0.
- Schaal, K.P., Lee, H.J., 1992. Actinomycete infections in humans-a review. Gene, 115, 201–211.
- Schaal, K.P., 1998. Actinomycosis, actinobacillosis and related diseases. (Edit. A. Balows and D.I. Duerden). Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, ninth edition volume 3, bacterial infections, s: 777–798. Edward Arnold, London
- Schleifer, K.H., 2010. Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. Syst. Appl. Microbiol., 32, 533–542.
- 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, UK.
- Seo, J.P., 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., Lee, S.D., 2007. *Nocardia speluncae* sp. nov., isolated from a cave. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57, 2932–2935.
- Seong, C.N., Choi, J.H., Baik, K-S., 2001. An Improved Selective Isolation of Rare Actinomycetes from Forest Soil. The J. of Microbiol., 39, 17–23.
- Sezgin, M., Lechevalier, M.P., Karr, P.R., 1988. Isolation and identification of actinomycetes present in activated sludge scum. Water Sci. Techno., 20, 257–263.
- Shen, F-T., Lu, H-L., Lin, J-L., Huang, W-S., Arun, A.B., Young, C-C., 2006a. Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the *gyrB* gene. Res Microbiol., 157, 367–375.
- Shen, F-T., Goodfellow, M., Jones, A.L., Chen, Y.-P., Arun, A.B., Lai, W.-A., Rekha, P.D., Young, C-C., 2006b. *Gordonia soli* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 2597–2601.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 16, 313–340.
- Siva Kumar, K., 2001. Actinomycetes of an Indian Mangrove (Pichavaram) environment: An Inventory. Doktora Tezi, Annamalai University, India, 91 s.
- Snijders, E.P., 1924. Cavis-scheefkopperijeon nocardiose. Geneesk. Tijdschr. Ned. Ind., 64, 85–87.
- Soddell, J.A., Stainsby, F.M., Eales, K.L., Seviour, R.J., Goodfellow, M., 2006. *Gordonia defluvii* sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 2265–2269.
- Sohn, K., Hong, S.G., Kyung S.B., Chun, J., 2003. Transfer of *Hongia koreensis* Lee et al. 2000 to the genus *Kribbella* Park et al. 1999 as *Kribbella koreensis* comb. nov. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., 53, 1005–1007.
- 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.

- Song, G.C., Yasir, M., Bibi, F., Chung, E.J., Jeon, C.O., Chung, Y.R., 2011. *Nocardioides caricicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61, 105-109.
- Stackebrandt, E., 2006. *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. (Stackebrandt, E., Ed.) s: 320. Springer. Berlin.
- Stackebrandt, E., Ebers, J., 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today, 33, 152–155.
- Stackebrandt, E., Schumann, P., 2006. Introduction to the taxonomy of actinobacteria. *The Prokaryotes*. A Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd edn, vol. 3, s: 297–321. (Editorler: M., Dworkin, S., Falkow, E., Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt). Springer-Verlag. New York.
- Stackebrandt, E., Smida, J., Collins, M.D., 1988. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). J. Gen. Appl. Microbiol., 34, 341– 348.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov.* Int. Syst. Bacteriol., 47, 479-491.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, 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.
- Stainsby, F.M., Soddell, J.A., Seviour, R.J., Upton, J., Goodfellow M., 2002. Dispelling the *Nocardia amarae* myth. A phylogenetic and phenotypic study of mycolic acid-containing actinomycetes isolated from activated sludge foam. Water Sci. Technol., 46, 81-90.
- Stark, D.A., Anderson, N.G. 1992. A case-control study of *Nocardia* mastitis in Ontario dairy herds. Can. Vet. J., 31, 197-201.
- Stodola, F.H., Lesuk, A., Anderson, R.J., 1938. The Chemistry of the Lipids of tübercle Bacilli Liv. The Isolation and Properties of Mycolic Acid. The Journal of Biological Chemistry, 126, 505-513

- Sun, W., Zhang, Y.Q., Huang, Y., Zhang, Y.Q., Yang, Z.Y., Liu, Z.H., 2009. *Nocardia jinanensis* sp. nov., an amicoumacin B-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 417-420.
- 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.
- Takeda, K., Kang, Y., Yazawa, K., Gono, T., Mikami, Y., 2010. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 165–171.
- Takeuchi, M., Hatano, K., 1998. *Gordonia rhizosphaera* sp. nov. isolated from the mangrove rhizosphere. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 48, 907-912.
- Tala, A., Wang, G., Zemanova, M., Akamoto, S., Ochi, K., Alifano, P., 2009. Activation of dormant bacterial genes by *Nonomuraea* sp. Strain ATCC 39727 mutant-type RNA polymerase. *J. Bacteriol.*, 191(3), 805–814.
- Tamaoka, J., Komagata, K., 1984. Determination of DNA base composition by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.*, 25, 125-128.
- Tamura, T., Yokota, A., 1994a. Transfer of *Nocardioides fastidiosa* Collins and Stackebrandt 1989 to the genus *Aeromicrobium* as *Aeromicrobium fastidiosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 608–611.
- 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.
- Tille, D., Prauser, H., Szyba, K., Mordarski, M., 1978. On the taxonomic position of *Nocardioides albus* Prauser by DNA-DNA hybridization. *Zeitschr. Allgem. Microbiol.*, 18, 459-462.
- 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.
- Tomiyasu, I., 1982. Mycolic acid composition and thermally adaptive changes in *Nocardia asteroides*. *J. Bacteriol.*, 151, 828–837.
- Tomiyasu, I., Yano, I., 1986. The mycolic acids and the chemotaxonomy of the genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. *J. Jpn. Soc. Actinomycetes*, 48, 1–20.

- Toth, E.M., Kéki, Z., Homonnay, Z.G., Borsodi, A.K., Márialigeti, K., Schumann, P., 2008. *Nocardioides daphniae* sp. nov., isolated from *Daphnia cucullata* (Crustacea: Cladocera). Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., 58, 78–83.
- Toth, E.M., Kéki, Z., Makk, J., Homonnay, Z.G., Márialigeti, K., Schumann, P., 2011. *Nocardioides hungaricus* sp. nov., isolated from a drinking water supply system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61, 549-553.
- Trevisan, V., 1889. I. Generi e le Specie delle Battieriacee. Milan i Zanaboni and Gabuzzi.
- 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.
- Tsukamura, M., 1969. Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*. J. Gen. Microbiol., 56, 265-287.
- Tsukamura, M., 1971. Proposal of a New Genus, *Goudona*, for Slightly Acid-fast Organisms Occurring in Sputa of Patients With Pulmonary Disease and in Soil Journal of General Microbiology, 68, 15-26.
- Tsukamura, M., 1974. A further numerical taxonomic study of the rhodochrous group. Japanese microbiol., 18, 37-44.
- Tsukamura, M., 1977. Extended numerical taxonomy study of *Nocardia*. Int. J. Syst. Bacteriol., 27, 311-323.
- Tsukamura, M., Zuno, S., Tsukamura, S., Tsukamura, J., 1979. Comprehensive numerical classification of 369 strains of *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia*. Int. J. Syst. Bacteriol., 29, 110-129.
- Tsukamura, M., 1982. Differentiaton between the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and between species of the genus *Mycobacterium* by susceptibility to bleomycin. J. Gen. Microbiol., 128, 2385-2388.
- Uchida, K., Aida, K., 1977. Acyl type of bacteria cell wall: its simple identification by colorimetric method. J. Gen. Appl. Microbiol., 23, 249-260.

- Uchida, K., Aida. K., 1979. Taxonomic significance of cell-wall acyl type in *Corynebacterium-Nocardia* group by a glycolate test. J. Gen. Appl. Microbiol., 25, 169-183.
- Uchida, K., Aida. K., 1997. Intra and intergen relationship of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 182-190.
- Ustaçelebi, Ş., 1999. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Anabilim Dalı, Güneş Kitabevi, 1. Basım. s: 81-89. Ankara,
- Urzi, C., Salamone, P., Schumann, P., Stackebrandt, E., 2000. *Marmoricola aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a coccoid member of the family *Nocardioideaceae* isolated from a marble statue. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 529–536.
- 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.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D., 2007. Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. Microbiol. and Molek. Biolo. Review, 71(3) 495–548.
- Veronique, A., Bisch, T., Raoult, D., Drancourt, M., 2003. RNA polymerase β -subunit-based pylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. 53, 455-458.
- Wanbanjob, A., 2008. Investigation of bioactive compounds from endophytic Actinomycete. Silpakorn University, Department Chemistry. Yüksek Lisans Tezi, 92 s.
- Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y., Liu, Z., Maldonado, L., Goodfellow, M., 2001a. *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51, 1783-1788.
- 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, L., Zhang, Y., Huang, Y., Maldonado, L.A., Liu, Z., Goodfellow, M., 2004. *Nocardia pigrifrangens* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a contaminated agar plate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1683–1686.
- Waksman, S.A., 1950. The actinomycetes: Their nature, occurrence, activities and importance. *Ann. Crypt. Phytopathol.*, 9, 1-230.
- Waksman, S.A., Henrici, A.T., 1943. The nomenclature and classification of Actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 46 (4), 337-41.
- Wellington, E.M.H., Williams, S.T., 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters*, 6, 151-159.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, (Editörler: Williams and Wilkins), 4, 2452-2492. Baltimore,
- Woose, R.C., 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
- Xu, P., Li, W-J., Tang, S-K., Jiang, Y., Chen, H-H., Xu, L-H., Jiang, C-L., 2005. *Nocardia polyresistens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1465–1470.
- 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.
- Yamamoto, S., Harayama, S., 1995. PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1104–1109.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A., Harayama, S., 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*, 146, 2385–2394.
- Yamamura H., Hayakawa M., Iimura Y., 2003. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. 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.

- Yamamura, H., Tamura, T., Sakiyama, Y., Harayama, S., 2007. *Nocardia amamiensis* sp. nov., isolated from a sugar-cane field in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1599-1602.
- Yanez, M.A., Catalán, V., Apraiz, D., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 53, 875–883.
- Yano, I., Imaeda, T., Tsukamura, M., 1990. Characterisation of *Nocardia nova*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 170-174.
- Yassin, A.F., Brenner, S., 2005. *Nocardia elegans* sp. nov., a member of the *Nocardia vaccinii* clade isolated from sputum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1505–1509.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Brzezinka, H., Burghardt, J., Lee, H.J., Schaal, K.P., 1995. *Tsukamurella inchonensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 522-527.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Brzezinka, H., Burghardt, J., Rafai, M., Seifert, P., Feldmann, K., Schaal, K.P., 1996. *Tsukamurella pulmonis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 429-436.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Burghardt, J., Brzezinka, H., Schmitt, S., Seifert, P., Zimmermann, O., Mauch, H., Gierth, D., Lux, I., Schaal, K.P., 1997. *Tsukamurella tyrosinosolvans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 429-436.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Burghardt, J., Brzezinka, H., Mauch, M., Schaal, K.P., 2000a. *Nocardia paucivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 803–809.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Mendrock, U., Brzezinka, H., Schaal, K.P., 2000b. *Nocardia abscessus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1487-1493.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Steiner, U., 2001a. *Nocardia cyriacigeorgici* sp. nov., *Microbiol.*, 51, 1419-1423.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Steiner, U., 2001b. *Nocardia ignorata* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 2127–2131.
- Yassin, A.F., Shen, F-T., Hupfer, H., Arun, A.B., Lai, W-A., Rekha, P.D., Young, C.C., 2007. *Gordonia malaquae* sp. nov., isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 57, 1065–1068.
- Yi, H., Chun, J., 2004a. *Nocardioides ganghwensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 54, 1295-1299.

- Yi, H., Chun, J., 2004b. *Nocardioides aestuarii* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., 54, 2152-2154.
- 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., Park, Y-H., 2006. The genus *Nocardioides*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. 3rd edn, vol. 3, s: 1099–1113. Springer. New York.
- Yoon, J-H., Lee, J.-S., Shin, Y.K., Park, Y.-H., Lee, S.T., 1997a. Reclassification of *Nocardioides simplex* ATCC 13260, ATCC 19565, and ATCC 19566 as *Rhodococcus erythropolis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 904-907.
- Yoon, J-H., Rhee, S-K., Lee, J-S., Park, Y-H., Lee, S.T., 1997b. *Nocardioides pyridinoliticus* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium isolated from the oxic zone of an oil shale column. Int. J. of Syst. Bacteriol., 47, 933-938.
- Yoon, J-H., Lee, S.T., Park, Y-H., 1998a. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. Int. J. of Syst. Bacteriol., 48, 187–194.
- Yoon, J-H., Lee, S.T., Park, Y-H., 1998b. Genetic analyses of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. Int. J. of Syst. Bacteriol., 48, 641–650.
- Yoon, J-H., Cho, Y-G., Lee, S.T., Suzuki, K., Nakase, T., Park, Y-H., 1999. *Nocardioides nitrophenolicus* sp. nov., a *p*-nitrophenol-degrading bacterium. Int. J. of Syst. Bacteriol., 49, 675-680.
- Yoon, J- H., Lee, J.J., Kang, S.S., Takeuchi, M., Shin, Y.K., Lee, S.T., Kang, K.H., Park, Y.H., 2000. *Gordonia nitida* sp. nov., a bacterium that degrades 3-ethylpyridine and 3-methylpyridine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, 1203–1210.
- Yoon, J-H., Kim, I-G., Kang, K.H., Oh, T-K., Park, Y-H., 2004. *Nocardioides aquiterrae* sp. nov., isolated from groundwater in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 71-75.

- Yoon, J-H., Kim, I-G., Lee, M-H., Lee, C-H., Oh, T-K., 2005a. *Nocardioides alkalitolerans* sp. nov., isolated from an alkaline serpentinite soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 809-814.
- Yoon, J-H., Kim, I-G., Lee, M-H., Oh, T-K., 2005b. *Nocardioides kribbensis* sp. nov., isolated from alkaline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1611-1614.
- Yoon, J-H., Kang, S-J., Lee, C-H., Oh, T-K., 2007a. *Nocardioides insulae* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 136-140.
- Yoon, J-H., Kang, S.J., Lee, S-Y., Oh, T-K., 2007b. *Nocardioides terrigena* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2472-2475.
- Yoon, J-H., Kang, S-J., Lee, M-H., Oh, T-K., 2008. *Nocardioides hankookensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 434-437.
- Zhang, J., Liu, Z., Goodfellow, M., 2003. *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 999-1004.
- Zhang, J., Liu, Z., Goodfellow, M., 2004. *Nocardia xishanensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 2301-2305.
- 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.
- 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.
- Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G., Daffe, M., 2008. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J. Bacteriol.*, 190, 5672-5680.

EK-A: Kùltür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı

Humik Asit Vitamin Agar (HV agar, Hayakawa ve Nomomura, 1987)

Humik asit vitamin agar (HV agar), nocardioform ve nadir aktinomisetlerin izolasyonunda selektif besiyeri olarak kullanıldı.

Humik asit	1 gr
Na ₂ HPO ₄	0,5 g
KCl	1,7 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	50 mg
FeSO ₄ -7H ₂ O	10 mg
CaCO ₃	10 mg
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Ortama ilave edilmeden önce, humik asit 10 ml 0,2 N NaOH içinde çözüldü ve diğer ortam bileşenleriyle birlikte birkaç dakika homojen olana kadar kaynatıldı ve oda ısısında biraz soğutulduktan sonra pH'sı 0,1 M NaOH veya HCl ile ayarlandı. Agar ilave edilip homojen hale gelene kadar karıştırılarak kaynatıldı. Kaynama esnasında buharlaşan su kısmı tamamlandı ve hazırlanan kùltür ortamı otoklava dayanaklı 500 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere 400'er ml olacak şekilde bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

Distile suda çözülen vitamin karışımı, steril 0,45 µm çapındaki membran filtreden geçirilerek steril edildi ve stoklama yapılan şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak +4 °C'de saklandı.

Otaklavlanan ve 55°C'de bir süre bekletilen besiyeri ortamına antibiyotiklerle birlikte her 400 ml'ye 1 ml olacak şekilde vitamin stok solusyonundan ilave edildi.

Vitamin Stok Solusyonu

Thiamine 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

Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA, Blackall ve ark., 1989)

Tryptone yeast glucose extract agar (TYGA), topraktan mikroorganizmaların izolasyonunda ayırt edici besiyeri olarak ve mikolik asit analizlerinde kullanılacak organizmaların geliştirilmesinde kültür ortamı olarak kullanıldı.

Tripton	3 g
Maya	5 g
Glukoz	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,0

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve pH 7'e (0,1 M) NaOH veya HCl ile ayarlandı. Agar ilave edilerek sürekli karıştırmak suretiyle kaynamaya bırakıldı ve kaynama esnasında buharlaşan su kısmı tamamlandı ve hazırlanan kültür ortamı otoklava dayanaklı 500 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere 400'er ml olacak şekilde bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

Tryptone Yeast Glucose Extract Vitaminli Agar

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

Glukoz Yeast Malt Ekstrakt Agar (GYME, Rapp, 1974)

Mikroorganizmaların topraktan izolasyonunda ve morfolojik incelemelerinde kullanıldı.

Glukoz	4 g
Yeast ekstrakt	4 g
Malt ekstrakt	10 g
CaCO ₃	2 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH	7,2

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve pH 7,2'e (0,1 M) NaOH veya HCl ile ayarlandı. Agar ilave edilerek sürekli karıştırmak suretiyle kaynamaya bırakıldı ve kaynama esnasında buharlaşan su kısmı tamamlandı ve hazırlanan kültür ortamı otoklava dayanaklı 500 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere 400'er ml olacak şekilde bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

Glukoz Yeast Malt Ekstrakt Vitaminli Agar

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

Glucose Yeast Estract Agar (GYEA, Gordon ve Mihm, 1962)

Glukoz yeast extract agar, tüm nocardioform izolatların ve tip türlerinin geliştirilmesi için kültür ortamı olarak kullanıldı.

Glukoz	10 g
Maya	10 g
Agar	18 g
Distile su	1000 ml
pH	6,8

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve pH (0,1 M) NaOH veya HCl ile ayarlandı. Agar ilave edilerek sürekli karıştırmak suretiyle kaynamaya bırakıldı ve kaynama esnasında buharlaşan su kısmı tamamlandı ve hazırlanan kültür ortamı otoklava dayanaklı 500 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere 400'er ml olacak şekilde bölünerek 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

Oat meal Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Oat meal agar (ISP 3) ortamı, mikroorganizmaların morfolojik incelemelerinde kültür ortamı olarak kullanıldı.

Oat meal	20 g
Agar	18 g
Trace salt solution (Shirling ve Gottlieb, 1966)	1 ml
Saf su	1000 ml
pH	7,2

Pridham ve Gottlieb's Trace Salt Solution (Shirling ve Gottlieb, 1966)

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,15 g
Saf su	100 ml

Ortam içerikleri 100 ml saf suda çözüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve sonrasında +4°C'de saklandı.

Oat meal (Ticari organik ürün), 1000 ml saf su içerisinde 20 dk kaynatılarak çözüldü ve süzgeçten geçirildi. Ardından oda ısısında soğumaya bırakıldı ve soğuduktan sonra eksilen su miktarı tamamlanarak pH'sı 0,1 M NaOH veya HCl ile ayarlandı ve agar ilave edilerek homojen hale gelene kadar karıştırılarak kaynatıldı. Hazırlanan oat meal agar, otoklava dayanıklı cam şişelere aktarılıp, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Sterilizasyon işleminden sonra 50-55°C'ye ayarlı su banyosunda bekletildi ve 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra aseptik koşullarda trace salt solution'dan 1 ml/ L olacak şekilde ilave edildi ve besiyeri petrilere döküldü.

Malt Extract Agar

Malt Extract Agar	48 g
Distile su	1000 ml

Uygun miktarda tartılan besiyeri 1000 ml distile suda ısıtmalı mağnetik karıştırıcı üzerinde agar eriyinceye kadar karıştırıldıktan sonra 121°C' de 1,1 atm' de 20 dk otoklav edildi.

Glukoz Yeast-Extract Broth

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

Glukoz	10 g
Yeast extract	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 1,1 atm' de 20 dk otoklavla steril edildi.

Glukoz-Malt-Yeast Extract Broth

Glukoz-malt-yeast-extract broth, DNA izolasyon çalışması için hücre pelleti elde edilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

Glukoz	4 g
Yeast extract	4 g
Malt extract	10 g
Saf su	1 litre
pH	7,2-7,4

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 50 ml'lik erlenlere 30 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve ağızları önce pamukla kapatılıp ardından alüminyum folyoyla sarıldıktan sonra 121°C' de 1,1 atm' de 20 dk otoklavla steril edildi.

Tryptone Yeast Glukoz Extract Broth

Tryptone yeast glukoz extract broth organizmaların geliştirilmesinde sıvı kültür ortamı olarak kullanıldı.

Tripton	3 g
Maya	5 g
Glukoz	5 g
Distile su	1000 ml
pH	7,0

Ortam içerikleri 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve pH 7'e (0,1 M) NaOH veya HCl ile ayarlandı. Hazırlanan kültür ortamı otoklava dayanıklı 50 ml'lik cam erlenlere 30'ar ml olacak şekilde bölünerek ve ağızları önce pamukla kapatılıp ardından alüminyum folyoyla sarıldıktan sonra 121°C'de 20 dk otoklavda steril edildi.

EK-B: Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı

Mikroorganizmaların İzolasyonu Aşamasında kullanılan Çözeltiler

Ringer çözeltisi

10'luk sulandırma işlemlerinde kullanıldı.

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 nocardioform grubu organizmaların en yoğun şekilde elde edildiği %20 'lik sükroz konsantrasyonuna uygun olarak %20'lik 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 süspansiyonu, test örneklerinin ve tip suşlarının spor veya miselyumlarının uzun süreli -18°C'de stoklanması için hazırlandı.

Gliserol (Park, Northampton, UK) 20 ml

Distile su 80 ml

%20 v/v gliserol süspansiyonu yaklaşık 1,5 ml miktarında ağzı kapaklı küçük tüplere konularak 121°C’de 15 dk otoklavda steril edildi.

Mikolik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Çözeltiler

0,3 M Fosfat Tamponu pH ~ 12

Bu çözelti, lize edilen örneklerin yıkanması ve diğer hücre kısımlarından mikolik asit esterlerinin daha saf şekilde ayrılması için kullanıldı.

NaOH	1 g
Na ₂ HPO ₄	3,55 g
Distile Su	200 ml

1 g NaOH, 3,55 g Na₂HPO₄ 200 ml distile su içinde çözüldü ve 100 ml’lik otoklavlanabilir ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C’de 20 dk otoklavda steril edildi.

Metanol/ Toluen/ Konsantre Sülfürik Asit Çözeltisi (30:15:1 v/v)

Metanol/toluen/konsantre sülfürik asit çözeltisi (30:15:1 v/v) mikroorganizmaların lize edilmesi amacıyla kullanıldı.

Metanol	90 ml
Toluen	45 ml
Konsantre Sülfürik Asit	3 ml

Aseptik koşullarda, steril edilmiş cam pipet kullanılarak 90 ml metanol, 45 ml toluen ve 3 ml konsantre sülfürik asitten alınarak ana stok oluşturuldu ve her örneğe 3 ml ilave edildi.

Petrol Eter Aseton Çözeltisi (95:5 v/v)

Petrol eter aseton çözeltisi (95:5 v/v), izole edilen mikolik asit metil esterlerinin alüminyum bazlı silika jel tabakalarına yüklenmesinden sonra yürütme işleminde kullanılan solvent ortamdır.

Petrol Eter	95 ml
Aseton	5 ml

Aseptik koşullarda, steril edilmiş cam pipet kullanılarak 95 ml petrol eter içine 5 ml aseton ilave edilerek hazırlanır.

Etanolde Molibde Fosforik Asit Solusyonu (50 g/ l⁻¹)

Etanolde molibde fosforik asit solusyonu (50 g/ l⁻¹), mikolik asit metil esterlerini görülür hale getirmek için kullanıldı.

Molibde fosforik asit	5 g
Etanol	100 ml

Molibde fosforik asitten 5 g ölçülerek 100 ml etanolde çözdürüldü ve spreyleme yapıldı. Her bir plaka için 50 ml'lik etanolde molibde fosforik asit solusyonu yeterli geldiği için bu orana göre spreyleme solusyonu hazırlandı.

Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

0,5 M EDTA, pH 8

EDTA (Merck)	186,1 g
DDH ₂ O (Double distile su)	1000 ml

800 ml DDH₂O içerisine 186,1 g EDTA ve ~ 20 g NaOH pelleti ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşınca kadar çözüldü. Son hacim DDH₂O 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 (Merck)	121,1 g
DDH ₂ O	1000 ml

800 ml DDH₂O 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 DDH₂O 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 ₂ O	1000 ml

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)	2 mg
TE tamponu	10 ml

2 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.

7,5 M Amonyum asetat

Amonyum asetat (AppliChem)	57,81 g
----------------------------	---------

DDH ₂ O	100 ml
--------------------	--------

57,81 g amonyum asetat 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişeye konularak üzerine yaklaşık 40 ml DDH₂O ilave edildi. Son hacim DDH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C'de berraklaşmaya kadar çözüldü. Solüsyon 121 °C'de 15 dk otoklav edilerek +4°C'de saklandı.

%10'luk Sarkosil

N-Laurylsarcosine (Sigma)	1 g
---------------------------	-----

DDH ₂ O	10 ml
--------------------	-------

1 g N-laurylsarcosine 8 ml DDH₂O 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 DDH₂O 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 ₂ 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 DDH₂O 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 DDH₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak 0,45 µm çapındaki membran filtreden geçirildi. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında saklandı.

Kloroform-izo-amil alkol (24:1 v/v)

Kloroform (Merck)	24 ml
-------------------	-------

İzo-amil alkol (Merck)	1 ml
------------------------	------

Steril 100 ml’lik ağzı kapaklı cam şişe içerisinde steril cam pipetler kullanılarak solüsyon hazırlandı. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak +4°C’de saklandı.

Izo-propanol

100 ml izo-propanol (J.T. Baker) steril 100 ml’lik ağzı kapaklı cam şişeye konuldu ve şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak –18°C’de saklandı.

%70’lik etanol

%100’lük alkol 70 ml

DDH₂O (otoklav edilmiş) 30 ml

Steril 100 ml’lik ağzı kapaklı cam şişe içerisinde steril cam pipetler kullanılarak solüsyon hazırlandı ve –18°C’de saklandı.

RNAaz (10 mg/ml)

RNAaz (AppliChem) 10 mg

TE tamponu 1 ml

10 mg RNA az 1 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 1,5 ml’lik steril eppendorf tüplere 1’er ml bölünerek –18°C’de saklandı.

8M LiCl₂

LiCl₂ (Merck) 33,912 g

DDH₂O 100 ml

33,912 g LiCl tartılarak bir beher içerisinde konuldu ve üzerine 60 ml DDH₂O ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde 50°C’de ile berraklaşınca kadar çözüldü ve son hacim 100 ml’ye tamamlanarak 100 ml’lik ağzı kapaklı cam şişeye konuldu. Solüsyon 121°C’de 15 dk otoklav edilerek oda sıcaklığında saklandı.

Fenol-kloroform-izo-amil alkol (25:24:1 v/v)

Fenol-kloroform--izo-amil alkol (25:24:1 v/v; AppliChem) istenilen oranlarda hazır olarak alındı. Bu kimyasal maddenin moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılabilir özelliğini taşıması önemlidir. 100 ml’lik steril edilmiş ağzı kapaklı cam

şişeye aseptik şartlarda transfer edildi. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak +4°C’de saklandı.

DNA İzolasyonu Kontrolünde Kullanılan Çözeltiler

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

Tris	121,10 g
Borik asit (Merck)	61,83 g
EDTA (susuz)	5,84 g
DDH ₂ O	1000 ml

Solüsyon içerikleri tartıldı ve 1000 ml’lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 ml DDH₂O ilave edilerek solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşmaya kadar tutuldu. Son hacim 1000 ml’ye tamamlanıp, %33’lük HCl kullanılarak pH 8’e ayarlandı ve +4°C’de saklandı. Presipitat oluştuğu takdirde kullanılmamalıdır.

1XTBE, pH 8

10xTBE tamponu	50 ml
DDH ₂ O	450 ml

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

Etidyum Bromür (10 mg/ml stok)

Etidyum bromür (Sigma)	100 mg
DDH ₂ O	10 ml

100 ml’lik ağzı kapaklı cam şişe içerisine 100 mg etidyum bromür ve 10 ml DDH₂O su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde birkaç saat karıştırılarak hazırlandı. Şişenin etrafı alüminyum folyo kapatılarak +4°C’de saklandı. Hazırlanan bu solüsyondan her 100 ml agaroz 5 µl olacak şekilde ilave edilmektedir.

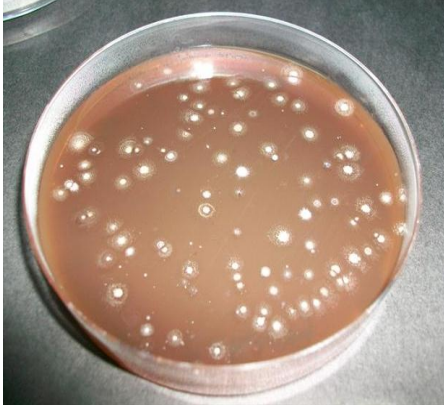
Agaroz hazırlarken etidyum bromürün buharlaşmasını engellemek için sıcaklık ~ 60°C’ye gelince ilave edilmelidir.

Brom fenol mavisi (Yükleme Tamponu)

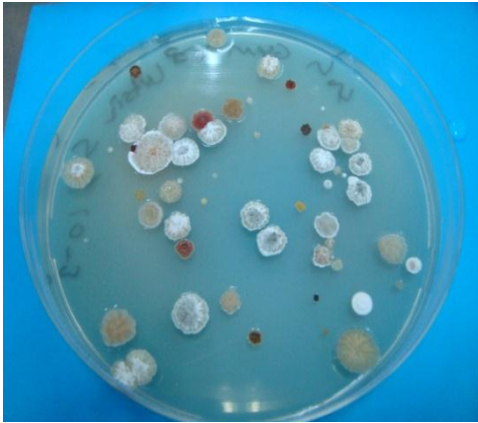
Brom fenol mavisi (AppliChem)	40 mg
Gliserol	5 ml
0,5 M EDTA	1,5 ml
DDH ₂ O	3,5 ml

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

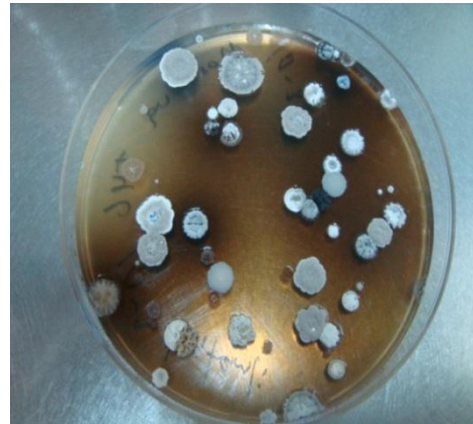
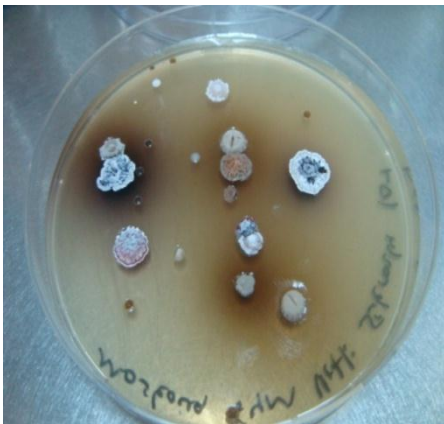
Ek-C

Toprak İzolasyonu ve Saflaştırma Plaklarının Görüntüleri

HV agar ortamında Moskova toprağının toprak izolasyon prosedürü ve sükröz gradient prosedürüne göre hazırlanan 10^{-2} ve 10^{-3} dilusyon plakları



Gölcük ve Moskova topraklarının 10^{-3} ve 10^{-2} dilusyon plakları



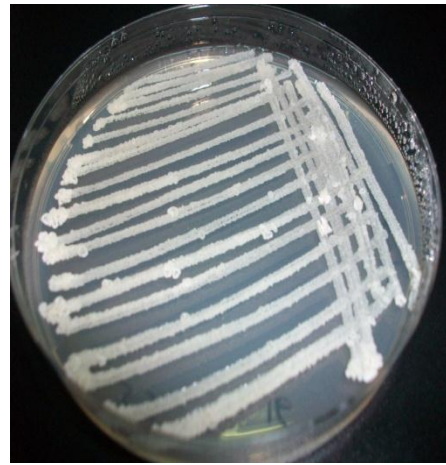
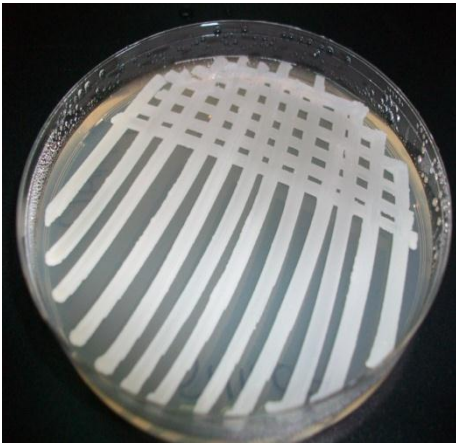
Sındırgı ve Moskova topraklarının sükröz gradienti uygulanarak hazırlanan 10^{-2} ve 10^{-3} dilusyon plakları



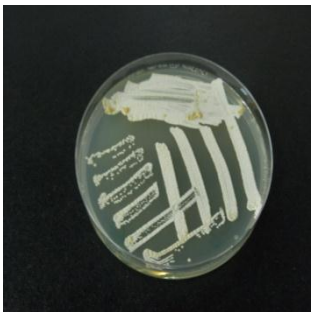
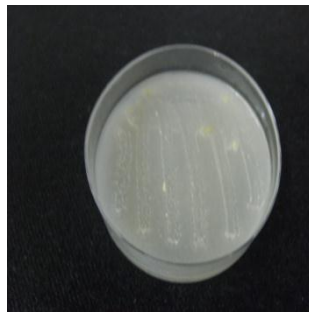
Saflaştırmak amacıyla GYE agar üzerine aktarılan mikroorganizmalar



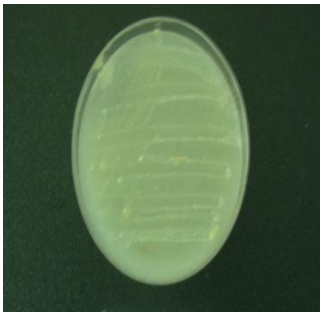
Tek koloni elde etmek iin GYE agar üzerinde görülen mikroorganizmalar



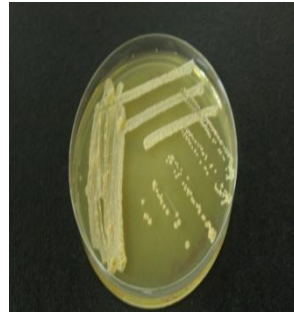
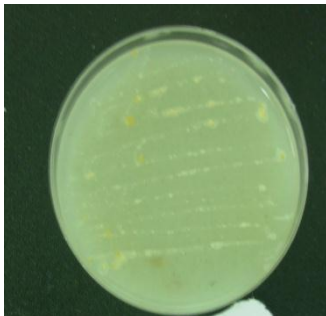
Stok yapmak amacıyla GYE agar üzerine yoğun ekimi yapılmış mikroorganizmalar

*N. speluncea* TYG agar*N. speluncea* Oat meal agar

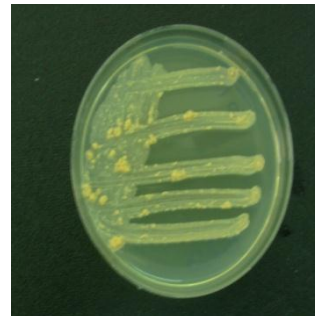
FMN18 TYG agar



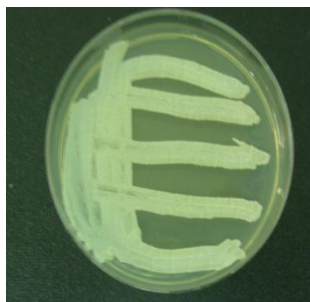
FMN18 Oat meal agar

*N. jinanensis* GYM*N. jinanensis* Oat meal agar

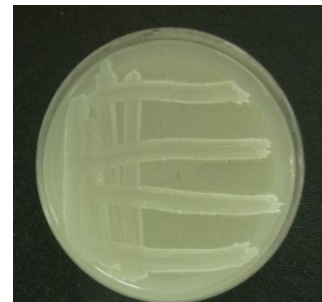
FGN17 Oat meal agar



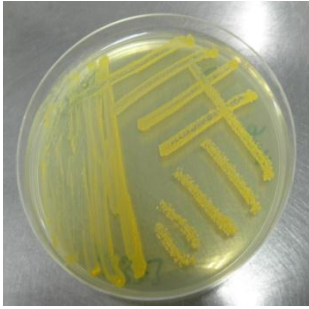
FGN19 TYG agar

*N. carnea* TYG agar*N. carnea* Oat meal agar

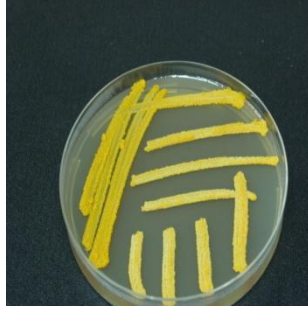
NEA44 TYG agar



NEA44 Oat meal agar



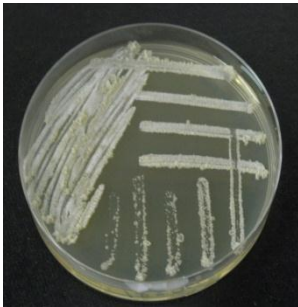
N. takadensis TYG agar



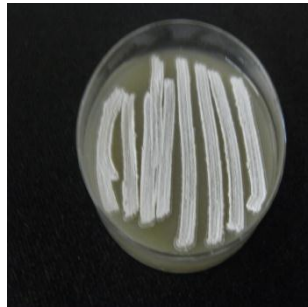
FSN27 TYG agar



FSN27 Oat meal agar



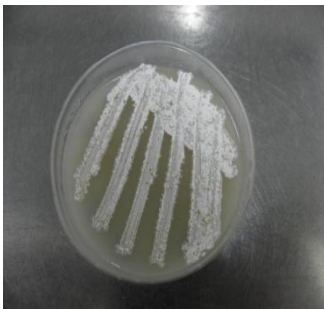
K. aluminosa TYG agar



K. aluminosa Oatmeal agar



FSN06 Oat meal agar



K. hippodromi Oat meal agar



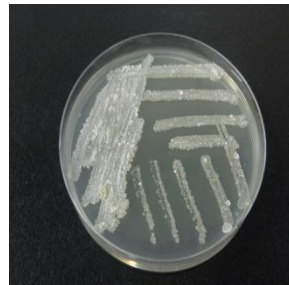
K. hippodromi TYG agar



FSN23 Oat meal agar



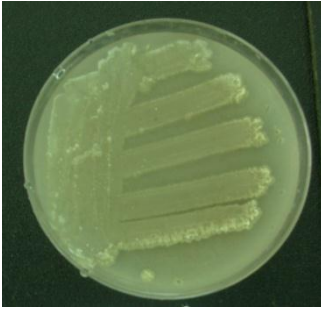
K. swartbergensis
Oat meal agar



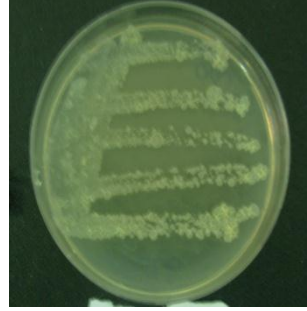
K. swartbergensis TYG agar



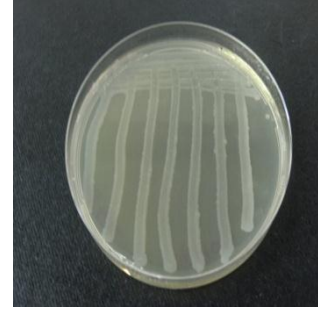
K. swartbergensis GYMA



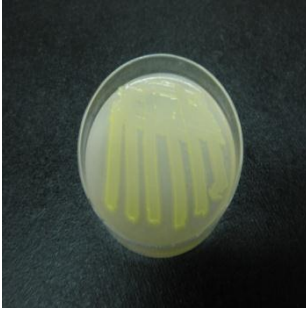
FMN22 Oat meal agar



FMN26 TYG agar



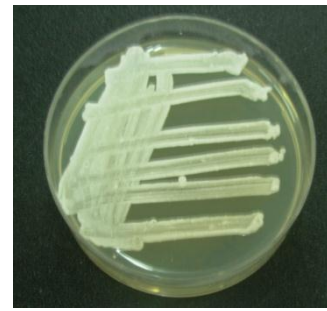
***N. albus* TYG agar**



***N. luteus* Oat meal agar**



FMN08 Oat meal agar



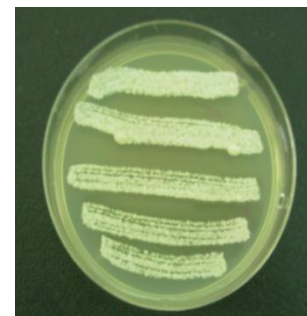
FSN13 TYG agar



FSN14 TYG agar

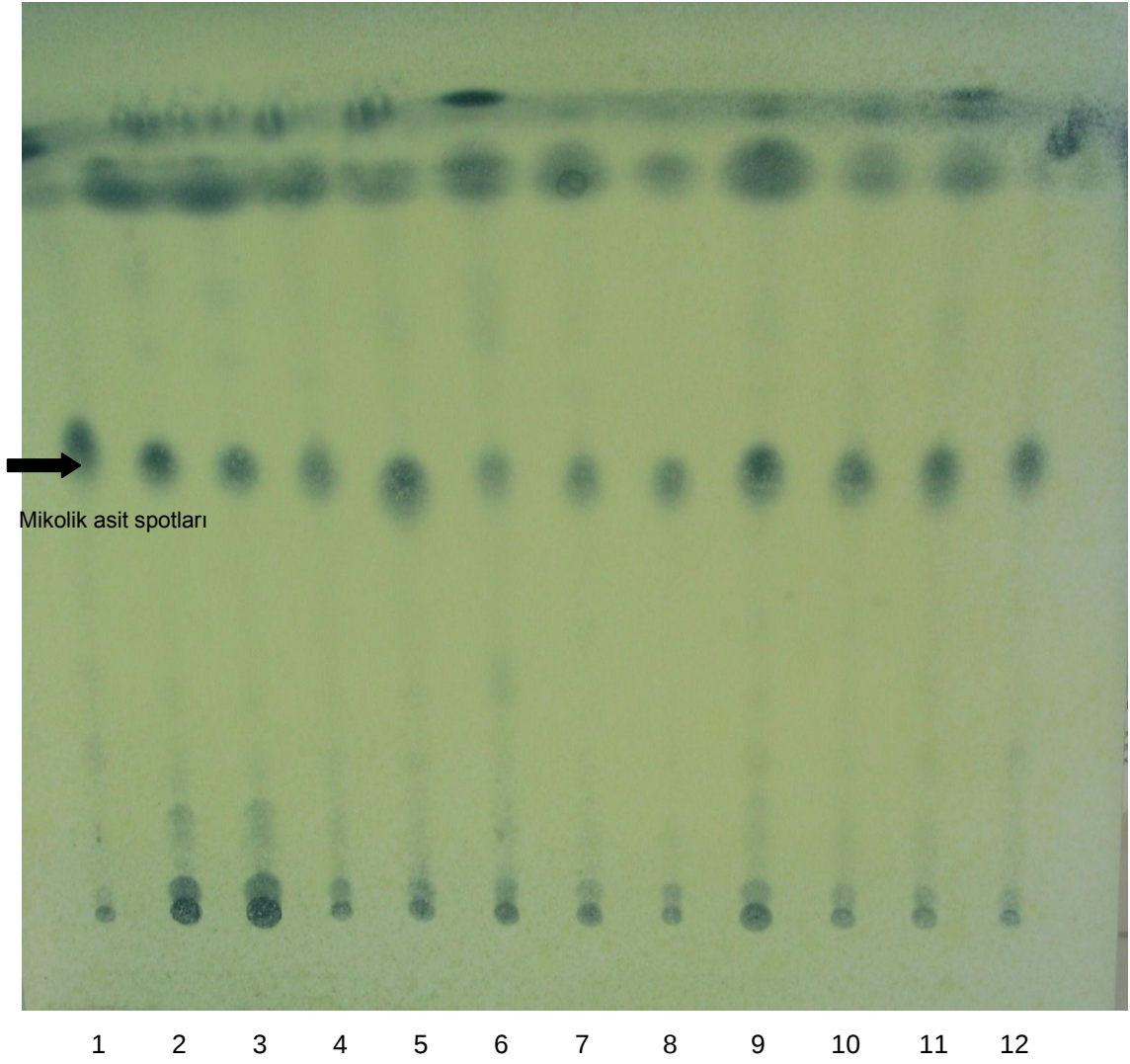


FSN34 TYG agar



FSN37 TYG agar

TLC Yöntemiyle Belirlenen Mikolik Asit Metil Esterlerinin Görüntüleri



1, N317T; 2, FMN06; 3, FMN15; 4, FMN18; 5, FSN13; 6, FSN14; 7, FSN27; 8, FGN17; 9, FGN19; 10, FGN39; 11, FGN43; 12, FSN37

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Yeri: Sivaslı / UŞAK

Doğum Tarihi: 27.12.1979

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Antalya Sağlık Meslek Lisesi (1994-1998)

Lisans: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü (1998-2002)

Yüksek Lisans: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Biyoloji Bölümü (2003-2005)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Ladik Merkez Sağlık Ocağı (2001-2002)

Tekkeköy Merkez Sağlık Ocağı (2002-2003)

Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi (2003-2011)

İletişim Bilgileri:

Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Nükleer Tıp Bölümü / PET-CT Ünitesi

Samsun / Merkez

Tel : 0536 4684024

e-posta: fadikocak@hotmail.com