

**MİKOLİK ASİT İÇERİKLİ
AKTİNOMİSETLERDEN *Nocardia* ve
Dietzia İZOLATLARININ 16S rDNA
YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ ve
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ**

TUĞBA KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu yüksek lisans tez çalışması Ondokuz Mayıs
Üniversitesi PYO.FEN.1904.09.024'nolu
Proje ile desteklenmiştir.

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKOLİK ASİT İÇERİKLİ AKTİNOMİSETLERDEN *Nocardia* ve *Dietzia* İZOLATLARININ 16S rDNA YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ ve ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

TUĞBA KESKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN
DOÇ.DR. KAMİL IŞIK

SAMSUN-2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından 27/10/2011 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Üye: Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN

Üye: Doç. Dr. Kamil IŞIK

ONAY:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

MİKOLİK ASİT İÇERİKLİ AKTİNOMİSETLERDEN *Nocardia* ve *Dietzia* İZOLATLARININ 16S rDNA YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ ve ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

ÖZ

Bu çalışmada mikolik asit içerikli mikroorganizmaları elde etmek amacıyla 7 farklı habitatdan izolasyon çalışması yapılmıştır. İzolasyon çalışmalarında Hayakawa ve Nonomura tarafından 1987 yılında geliştirilen humik asit vitamin agar (HV) kullanılmıştır. Hem HV agar hem de süktroz gradient santrifigasyon yöntemi kullanılarak ilgili şartlarda istenilen grubun çıkma ihtimali artırılmış ve mikolik asit içerikli aktinomiset grubu bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon çalışmalarından elde edilen izolatların morfolojilerine öncelik verilerek mikolik asit testleri uygulanmıştır ve sadece pozitif sonuç veren organizmalar tez çalışmaları için seçilmiştir.

Mikolik asit testleri sonucu belirlenen 18 test organizmanın olası yeni türler olarak araştırılması amacıyla, moleküler taksonomik yöntemlerden 16S rDNA yöntemi uygulanmıştır. 16S rDNA gen bölgesinin nükleotit dizilimi, farklı 3 oligonükleotit primeri (MG3, MG5 ve 800R) ile MacroGen firması tarafından ABI 3730XL automated sequences cihazıyla okunmuştur. Baz dizi analizleri Sequencer 4.10.1 ve Mega 4.1 (Kumar, 2008) programlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Ez Taxon Server 2.1 (Chun ve ark., 2007) kullanılarak test izolatlarına en yakın akraba olan türlerin 16S rDNA gen dizileri ilgili web adreslerinden indirilerek elde edilmişlerdir.

16S rDNA nükleotit dizilerinin çoklu hizalanması sonrasında filogenetik ağaçlar neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritması kullanılarak oluşturulmuştur. Analizlerin sonuçlarına göre 18 organizmanın 16'sı *Nocardia* cinsine ait, 2'si ise *Dietzia* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Hem *Nocardia* hem de *Dietzia* cinsine ait test organizmalarının literatüre de uyumlu olarak, ilgili cinsin tip kültürleriyle kümelendikleri görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Nocardia*, *Dietzia*, Mikolik Asit, 16S rDNA

IDENTIFICATION OF *Nocardia* and *Dietzia* ISOLATES CONTAINING MYCOLIC ACIDS ACTINOMYCETES BY 16S rDNA METHOD AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

ABSTRACT

In this study, an isolation practice consist of 7 different habitats was done to obtain microorganisms containing mycolic acids. Humik acid vitamin agar (HV) which was discovered 1987 by Hayakawa and Nonomura has been used in the isolation practices by being used of both HV agar and sucrose gradient centrifugation method, the possibility of occurrence of the desired group in the related conditions was increased and the isolation of actinomycetes grouped bacterium containing mycolic acids was achieved.

By being prioritized to the morphologies of isolates obtained from isolation practices, mycolic acids tests were applied and only the organisms that resulted positive were chosen for the study of the thesis.

On the purpose of researching as the possible new species of the 18 test organisms which were determinated from the results of the mycolic acid tests, 16S rDNA method was applied out of the molecular taxonomic methods. The nucleotide sequencing of 16S rDNA gene region was read by ABI 3730XL automated sequences device by MicroGen firm and different 3 oligonükleotit primary (MG3, MG5, and 800R). The base sequence analyses was achieved in Sequencer 4.10.1 Program and Mega 4.1 Program (Kumar, 2008). Moreover, by being used of Ez Taxon Server2.1 (Chun and ark., 2007), the 16S rDNA gene sequencing of the closest relative species to the test isolates were obtained from the related websites by downloading.

The phylogenetic trees were formed by using neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) algorithm after multi alignments of 16S rDNA nucleotide sequences. According to the results of analyses, it is observed that sixteen of eighteen organisms belonging to the genus of *Nocardia*, two organisms belonging the genus of *Dietzia*. It is seen that the test organisms which situated in the genus of both *Nocardia* and *Dietzia* were in good agreement with literature and also clustered with related genus type cultures.

Key Words: *Nocardia*, *Dietzia*, Mycolic Acid, 16S rDNA.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans başladığım ilk günden itibaren her türlü imkan ve desteği sağlayan, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım boyunca farklı fikirler sunarak yardımcı olan kıymetli danışman hocam **Doç. Dr. Kamil IŞIK’a**

Bu tezin hazırlanması sırasında desteğini daima hissettiğim, çalışma azmini örnek aldığım değerli hocam **Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN’e**

Beni bu alanda yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden, kısa zamanda da olsa akademik bilgisinden yararlandığım değerli hocam **Prof. Dr. Reşit ÖZKANCA’ya**

Yüksek lisans çalışmalarına başladığım andan itibaren, laboratuvar çalışmalarında ve tezin hazırlanmasının her evresinde çok büyük emekleri olan hocalarım **Arş. Gör. Elif ÇİL**, doktora öğrencileri **Fadime Özdemir KOÇAK** ve **Yeliz GENÇ’e**

Laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen, benimle aynı kaderi paylaşan, tüm sıkıntı ve sevinçlerime ortak olan meslektaşım **Talha GENÇBAY’a**

Akademik hayata başladığım ilk zamanlarda tanıştığım ve şu ana kadar manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, dostum **Arş. Gör. Melek ZENGİN’e**

Aldığım eğitim boyunca ilgi, destek ve sevgilerini esirgemeyen, bu aşamaya gelene kadar her daim maddi manevi yanımda olan canım annem **Sevilay KESKİN** ve babam **Selahattin KESKİN**, biricik ablam **Tülay KESKİN ÇALIK** ve eniştem **Akın ÇALIK’a**

Sonsuz Teşekkürler

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	8
2.1. Genel Bilgiler.....	8
2.1.1. <i>Dietzia</i> Cinsinin Sistematığı, Genel Özellikleri ve Tarihçesi.....	8
2.1.2. <i>Dietzia</i> Cinsinin Ekolojisi ve Patojenitesi.....	9
2.1.3. <i>Nocardia</i> Cinsinin Sistematığı, Genel Özellikleri ve Tarihçesi.....	11
2.1.4. <i>Nocardia</i> Cinsinin Ekolojisi ve Patojenitesi.....	15
2.1.5. <i>Nocardia</i> ve <i>Dietzia</i> Cinsleri İçin Seçici İzolasyon Ortamları.....	18
2.2. Prokaryotik Sistematik.....	21
2.2.1. Moleküler Taksonomi.....	24
2.2.1.1. 16S rDNA Gen Dizileme.....	24
2.2.1.2. Dizi Verisinin Analizi ve Filogeni.....	26
2.2.2. Kemotaksonomi.....	27
2.2.2.1. Mikolik Asit.....	27
2.2.2.2. İnce Kağıt Kromatografisi.....	30
2.2.2.3. Kromatogramın Değerlendirilmesi.....	31
2.2.2.4. Mikolik Asit İçerikli Bakterilerin Hücre Duvar Fonksiyonları.....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	33
3.1. Test Organizmalarının Seçimi	33
3.1.1. Toprak Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları.....	33
3.1.2. Organizmaların İzolasyonu.....	34
3.1.2.1. Dilüsyon Plaka Yöntemi.....	34
3.1.2.2. Sükroz Santrifüjasyon Yöntemi.....	35
3.1.3. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması.....	36
3.1.4. İzolatların Stoklanması.....	36
3.2. Mikolik Asit Testi.....	37

	<u>Sayfa No</u>
3.2.1. Mikolik Asit Testi İçin Hazırlık.....	37
3.2.2. Mikolik Asit Estraksiyonu.....	37
3.2.3. Mikolik Asit Metil Esterlerinin (MAMEs) İnce-Tabaka Kromotografi Analizleri.....	37
3.3. DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini.....	38
3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	38
3.3.2. DNA' nın Ekstraksiyonu.....	38
3.3.3. DNA İzolasyon Kontrolü.....	40
3.3.4. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi.....	40
3.3.5. 16S rDNA' nın PCR Çoğaltması.....	41
3.3.6. 16S rDNA Sekans Verilerinin Eldesi, Analizi ve Filogenetik Dendogramların Oluşturulması.....	43
3.4. Antimikrobiyal Aktivite Testleri.....	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. Mikolik Asit.....	46
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Testi.....	50
4.3. DNA İzolasyonu ve Agaro Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA' ların Görüntülenmesi.....	52
4.4. DNA Miktar Tayini.....	52
4.5. 16S rDNA' nın PCR Amplifikasyonu.....	54
4.6. 16S rDNA Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendogram Oluşturulması.....	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	64
6. KAYNAKLAR.....	70
EKLER.....	81
EK-A: Kültür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı.....	81
EK-B: Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı.....	87
EK-C :Farklı Besiyerleri ile Yapılan Toprak İzolasyonun Petri Görüntüleri....	95-96
ÖZGEÇMİŞ.....	97

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABL	: Antibiyotik Literatür Veritabanı
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATCC	: American Type Culture Collection
bp	: Baz çifti
DDH	: DNA –DNA hibridizasyonu
DDH₂O	: Double distile su
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DST agar	: Diagnostic Sensivity Test agar-Tanısal Duyarlılık Test agar
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
HV agar	: Humic asit vitamin agar
MAME	: Mikolik asit metil esterleri
meso-A_{2pm}	: meso-diaminopimelik asit
MLST	: Multilocus Sequence Typing
NJ	: Neighbor-joining
nt	: Nükleotit
NRRL	: Nothern Regional Research Laboratory (National Center for Agricultural Utilization Research), Peoria, Illinois, USA.
OTU's	: Operational Taxonomy Units

PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Rf	: Retention factor
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
TLC	: Thin Layer Chromatography-İnce Tabaka Kromatografi
UPGMA	: Unweighted pair group method with arithmetic averages

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. ABL veritabanında tanımlanmış ve nadir aktinomisetler tarafından üretimi belirlenmiş olan 1578 biyoaktif ürünün farklı familyalara ve cinslere olan dağılımı.....	3
Şekil 1.2. <i>Actinobacteria</i> sınıfı içerisindeki 5 ordonun 16S rDNA gen sekans benzerliklerine göre yapılan ve benzerlik ilişkilerini gösteren diyagram.....	7
Şekil 1.3. <i>Corynebacterineae</i> alt ordosunun filogenetik ilişkilerini gösteren diyagram.....	8
Şekil 2.1. Mikolik asit yapısı.....	28
Şekil 2.2. Rf değerinin hesaplanması.....	31
Şekil 4.1-4.2. Mikolik asit metil esterlerinin ince tabaka kromatografi görüntüsü.....	48-49.
Şekil 4.3. Mikolik asit içerikli bazı izolatların bazı test patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite test sonuç görüntüleri.....	51
Şekil 4.4. DNA izolasyonu yapılan bazı izolatların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü...	52
Şekil 4.5. Farklı lokalitelerden izole edilmiş mikolik asit içerikli mikroorganizmaların 16S rDNA gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu.....	55
Şekil 4.6. <i>Dietzia</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı.....	57
Şekil 4.7. <i>Nocardia</i> cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı.....	58

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Mikolik asit içeren <i>Dietzia</i> cinsinin bazı karakteristik özellikleri.....	9
Çizelge 2.2. Mikolik asit içeren <i>Nocardiaceae</i> familya üyelerinin bazı karakteristik özellikleri.....	15
Çizelge 2.3. <i>Dietzia</i> ve <i>Nocardia</i> cinslerinin bazı kimyasal markörlerle karşılaştırılması.....	20
Çizelge 3.1. . İzolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin laboratuvar kodu toprak tipi, lokaliteleri ve pH'ları.....	34
Çizelge 3.2. 16S rDNA gen bölgesinin PCR koşullarında çoğaltılmasında kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları.....	42
Çizelge 3.3. 16S rDNA gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngü düzeni.....	42
Çizelge 3.4. PCR amplifikasyonu ve 16S rDNA baz dizileme analizinde kullanılan oligonükleotit primerler, bu primerlerin nükleotit dizileri ve bağlanma bölgeleri.....	43
Çizelge 3.5. Antimikrobiyal Aktivite Testi İçin Kullanılan Patojen Test Organizmaları.....	45
Çizelge 4.1. Test Suşları ve Kaynakları.....	46-47
Çizelge 4.2. Mikolik aist pozitif sonuç veren mikroorganizma ekstraktlarının tek boyutlu ince tabaka kromatografisine göre Rf Değerleri.....	49-50
Çizelge 4.3. Test mikroorganizmalarının DNA miktar tayini ve saflık dereceleri.....	53
Çizelge 4.4. <i>Dietzia</i> cinsine ait test izolatları ve bu cinse ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....	59
Çizelge 4.5. <i>Nocardia</i> cinsine ait test izolatları ve bu cinse ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları.....	60-63

1. GİRİŞ:

Actinobacteria sınıfı çok geniş bir cins topluluğu içeren, Gram (+) bakterilerin ayrı bir kladını oluşturur. *Actinobacteria* sınıfının ilk tanımlanmaları 1875 yılında Ferninand Cohn tarafından *Streptothrix foersteri* bakteri türünün teşhisiyle, daha sonra 1877 yılında Carl Otto Harz tarafından *Actinomyces bovis* türünün tanımlanmasıyla gerçekleşmiştir (Hassan ve Wellington, 2009).

Actinobacteria sınıfının şu an bakteri aleminin en geniş filumlarından biri olduğu düşünülmektedir. Bu organizmaların GC içeriği bazı *Corynebacteria*'larda olduğu gibi %54 gibi bir orandan, *Streptomyces*'lerde olduğu gibi %70 arasındaki bir orana kadar değişkenlik gösterir (Hassan ve Wellington, 2009).

Actinobacteria sınıfı çeşitli morfolojik karakterlere sahiptir. Kokoid formdan, çubuk forma, dallanmış miselyumdan, spor formlara kadar değişkenlik gösterir. *Actinobacterial* türler çevremizde çöl toprağından deniz süngerlerine kadar farklı habitatlarda bulunabilen ve izole edilebilen türlerdir (Hassan ve Wellington, 2009).

Actinobacteria sınıfı üyeleri yaşadıkları çevrelerde, çeşitli ekstrasellüler hidrolitik enzimler üretebilme kabiliyetine sahiptirler. Özellikle toprakta yaşayanlar ölü bitki, hayvan ve fungus materyallerinin çürümesinden sorumludurlar ve bu materyalleri karbon döngüsünde kullanırlar. Bazı türler daha kompleks ve zor ayrışan bileşikler parçalayabilirler. Örneğin *Rhodococcus* türleri nitro-, di-nitrofenol, piridin ve nitroaromatik bileşikler parçalayabilmektedirler (Hassan ve Wellington, 2009).

Actinobacteria sınıfı sekonder metabolitleri üretebilme kabiliyetine sahip bir sınıf olarak bilinir. Bu metabolitlerin çoğu antibakteriyal ve antifungal özelliktedir. *Actinobacteria* sınıfı tarafından üretilen antibiyotiklerin %80'inden *Streptomyces* türleri sorumludur. Daha küçük oranlarda ise *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Actinoplanes* ve *Nocardia* türleri tarafından üretilir (Hassan ve Wellington, 2009).

Actinobacteria sınıfı, çevredeki kompleks ksenobiyotik bileşiklerin biyodegradasyonunda ve biyoremediasyonunda önemli bir rol oynar. Bu sınıftaki üyeler, genetik kabiliyetleri sayesinde bu bileşikler hem enerji kaynağı olarak kullanırlar, hem de diğer organizmaların kullanabileceği daha basit formlarına dönüştürürler. *Actinobacteria* sınıfı ayrıca müthiş bir biyoteknolojik potansiyele sahiptir. Özellikle

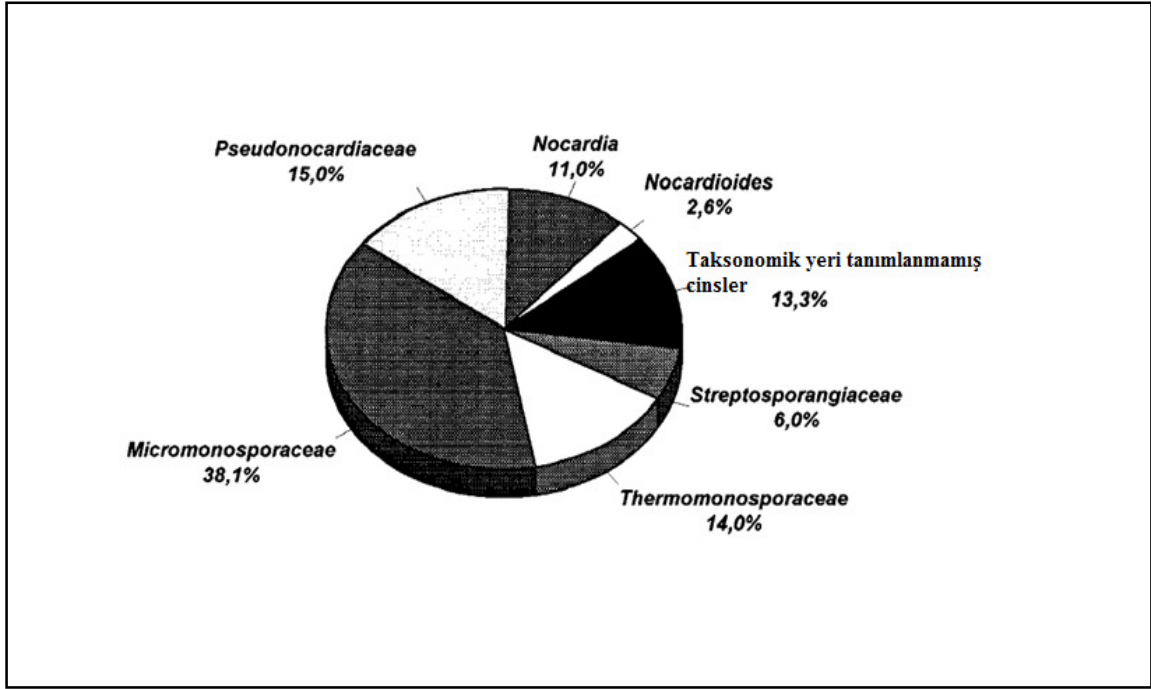
Streptomyces cinsi medikal öneme sahip birçok antibiyotik üretmektedir (Hassan ve Welligton, 2009).

Aktinomisetlerden elde edilen yeni moleküllerin keşfi, antibiyotik araştırmalarında ve sonradan gelişen antibiyotik tedavilerinde yeni bir dönemi başlatmıştır. Streptomisin'in ve tedavi edici özelliğe sahip birçok antibiyotik, *Streptomyces* ve *Streptoverticillium* cinsi bakteri kültürlerinden elde edilmiştir. Bu antibiyotikler; aminoglikozitler, kloramfenikol, tetrasilinler, makrolidler ve günümüzdeki β -laktam sefamisin grubu gibi önemli özelliğe sahip antibiyotiklerdir (Lazzarani ve ark., 2000). Özellikle *Streptomyces* cinsi, yararlı biyoaktif bileşenlerin verimli üreticileri olarak tanımlanmaktadır. Bu cinsin üyeleri günümüzde doğal olarak bulunan antibiyotiklerin yarısından fazlasını sağlayan ve yeni biyoaktif metabolitlerin en önemli kaynağı olarak kabul edilmektedirler (Hayakawa, 2008).

Günümüze kadar birçok antibiyotiğin keşfedilmesiyle, bugün bilinen aktinomiset gruplarından yeni antimikrobiyal bileşiklerin elde edilebilme şansı gün geçtikçe azalmaktadır. Bu yüzden daha nadir görünen aktinomiset cinslerinden faydalanarak yeni antibiyotiklerin endüstriyel açıdan değerlendirilmesine günümüzde daha çok dikkat çekilmektedir (Lazzarani ve ark., 2000). Doğal ürün elde etme amacıyla yapılan modern stratejiler sayesinde, yaygın olarak bulunmayan ve daha az çalışılan nadir aktinomisetlerin izolasyon çalışmaları geliştirilmektedir. Sınırlı ortamlardan elde edilen suşlar sayesinde yeni doğal ürünlerin görünme olasılığı artabilmektedir (Hayakawa, 2008).

Antibiyotik Literatür Veritabanı (ABL) olarak bilinen İtalya biyolojik araştırma veritabanı 1900 yılından bu yana keşfedilen mikrobiyal ürünler hakkında bilgi edinmemizi sağlayan özel olarak tasarlanmış bir veri tabanıdır. Bilimsel dergiler ve patent uygulamalardan elde edilen veriler standart kriterlere uygun olarak ABL veri tabanına girmektedir. Bu veritabanı sürekli olarak yeni bileşiklerin eklenmesiyle güncellenmektedir. Şu anda bakteri ve mantarlardan elde edilen 23 binden fazla mikrobiyal ürün veritabanında yer almaktadır. ABL veritabanında tanımlanan antimikrobiyal ürünlerin 8 bininden daha fazlası (%45.6) *Streptomyces* türleri tarafından üretilmektedir. %21,5'i mantarlar tarafından, %16'sı ise aktinomisetlerin nadir cinslerine ait suşlar tarafından üretilmektedir. Nadir aktinomisetler içerisinde

antimikrobiyal ürün üreten suşların dağılımı şekil 1.1’de görülmektedir (Lazzarani ve ark., 2000).



Şekil 1.1. ABL veritabanında tanımlanmış ve nadir aktinomisetler tarafından üretimi belirlenmiş olan 1578 biyoaktif ürünün farklı familyalara ve cinslere olan dağılımı (Lazzarani ve ark., 2000)

Actinobacteria sınıfı bakteri alemi içerisinde 16S rRNA gen ağaçlarındaki dallanma pozisyonları bakımından temel filumlardan birini oluşturmaktadır. Son 10 yılda bir çok yeni üye *Actinobacteria* sınıfına dahil edildi, aynı zamanda bazı üyelere yeniden sınıflandırıldı. Taksonomistlerin temel çalışmalarını oluşturan taksonlar son 10 yıl içerisinde filogenetik olarak birbirleriyle uyumlu taksonomik birimler meydana getirmek amacıyla yeniden gözden geçirildi (Zhi ve ark., 2009). 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 (Goodfellow ve Fiedler, 2010). *Catelliglobospora*, *Devriesea*, *Fodinicola*, *Glaciibacter*, *Haloactinospira*, *Hamadaea*, *Humibacillus*, *Klugiella*, *Marihabitans*, *Pseudosporangium* ve *Sciscionella* gibi cinsler ise filuma yeni katılanlara örnek oluşturmaktadır (Zhi ve ark., 2009). Ayrıca *Actinobacteria* sınıfı içerisindeki 5

ordonun 16S rRNA gen sekans benzerliklerine göre yeniden düzenlenerek yapılan sınıflandırılması Şekil 1.2’de verilmiştir.

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 *Corynebacterineae* alt ordosunu ele alırsak, *Nocardiaceae* ve *Gordoniaceae* familyalarının arasındaki nükleotit modellerindeki farkın ortadan kalktığını görmekteyiz. *Millisia*, *Skermania* ve *Williamsia* cinsleri *Gordoniaceae* familyasının üyelerinden önemli ölçüde ayrılmaktadır. İlk olarak bu 3 cinsin filogenetik pozisyonu *Nocardiaceae* ve *Gordoniaceae* familyalarının arasına yerleştirilmiştir. *Nocardiaceae* ve *Gordoniaceae* familyaları ise *Nocardiaceae* familyası adı altında birleştirilmiştir (Zhi ve ark., 2009).

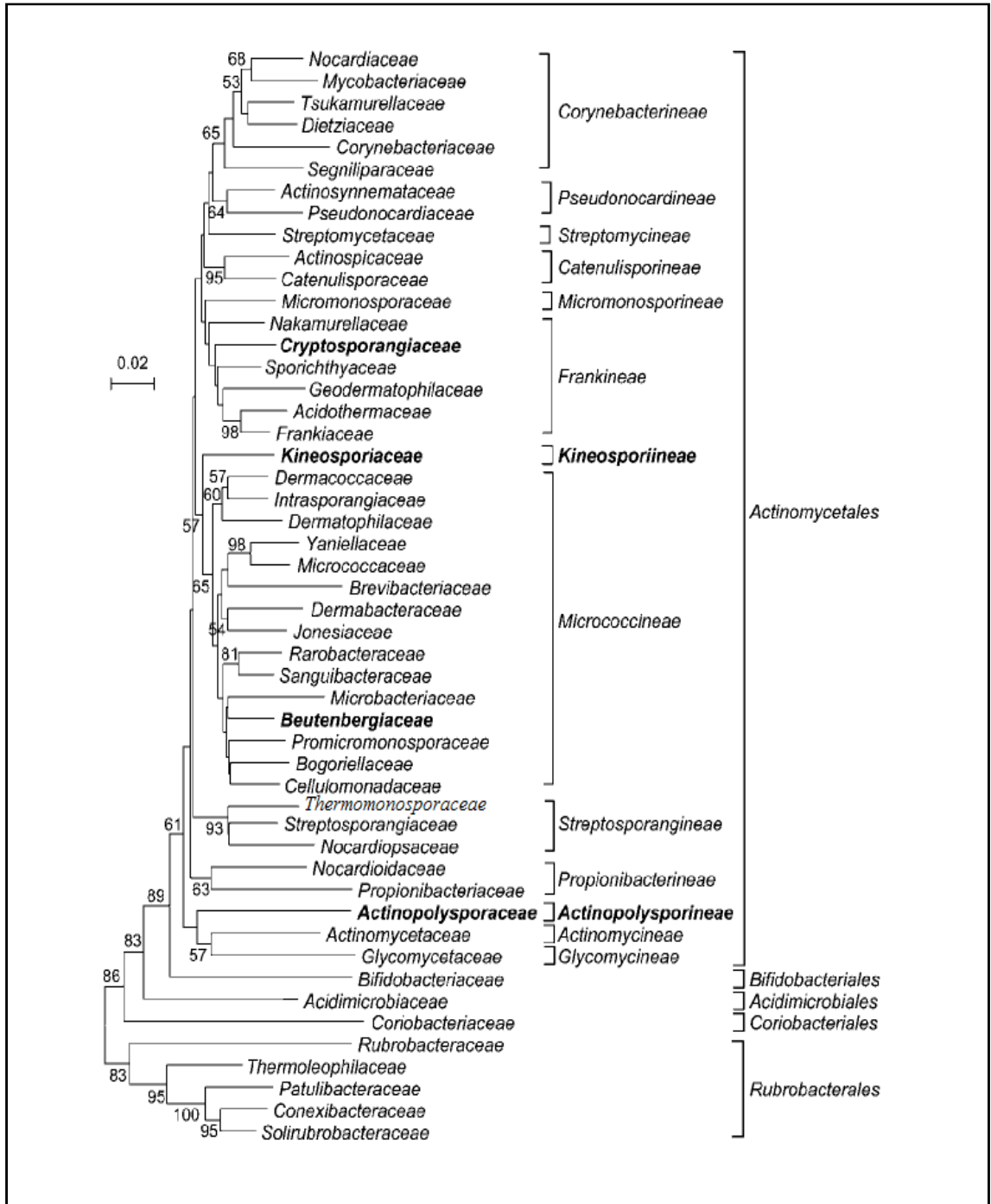
Corynebacterineae alt ordosu *Actinobacteria* sınıfı içerisinde önemli bir yere sahiptir. Alt ordo içerisinde 6 familya ve 9 cins bulunur. Alt ordonun en önemli üyesini *Nocardiaceae* familyası oluşturmaktadır. Bu familyada yeni sınıflandırmaya göre *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Williamsia* olmak üzere 4 cins bulunmaktadır (Şekil 1.3).

Goodfellow ve Maldonado ‘The Prokaryotes’ adlı kitapta yayınlanan makalelerinde *Nocardiaceae* familyasının üyelerini şu anda geçerli olan bazı karakterlere göre aktinomisetler içerisinde yer aldığını vurgulamışlardır. Bunlar;

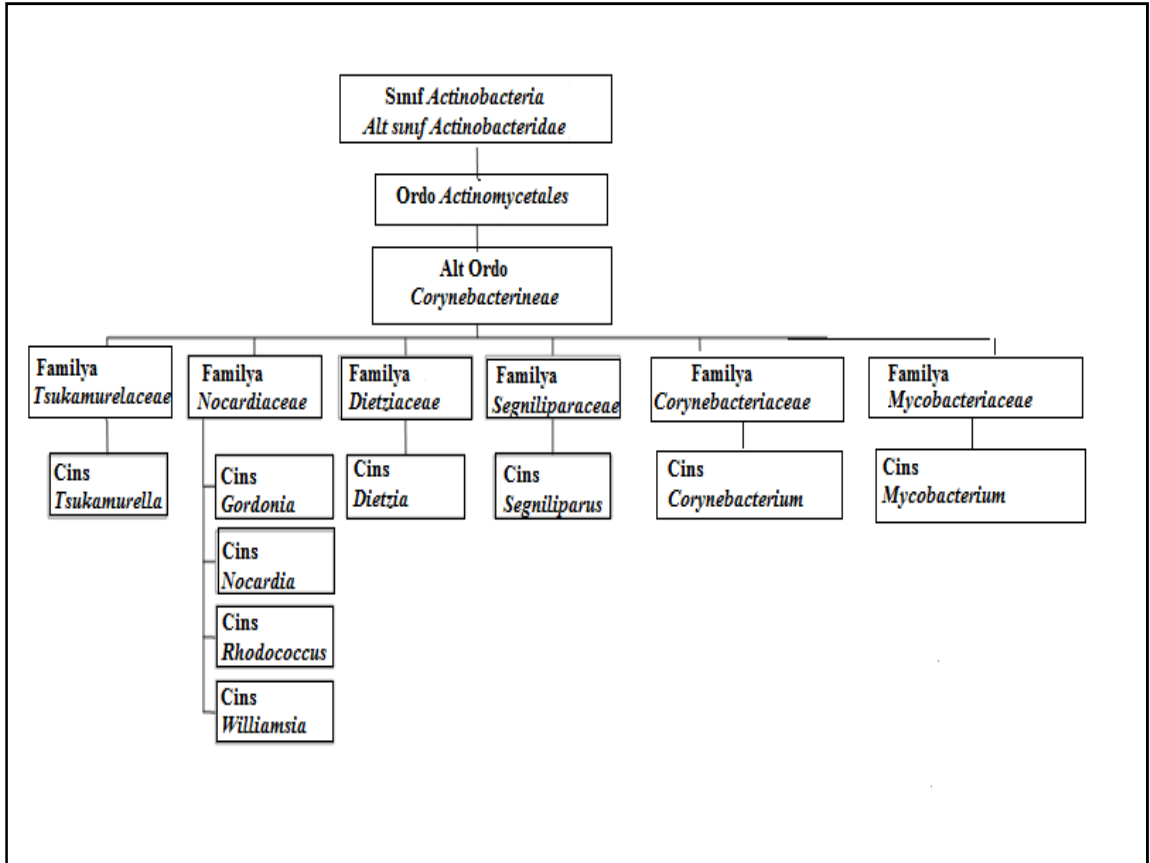
1. n-asetilglukozamin, D-alanin, L-alanin ve D-glutamik asit ile mesodiaminopimelik asit ve ayrıca n-glukat formdaki muramik asit içeren peptidoglikan yapısına sahiptirler (Uchida ve Aida 1977, 1979, 1997).
2. Polisakkarit duvar parçası zengin arabinoz ve galaktoz içerir. Tüm organizma şeker örneği Lechevalier ve Lechevalier (1970a), çalışmasında belirttiği gibi A tipindedir.
3. Fosfolipit örneği difosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol ve fosfatidilinositol mannosidlerden meydana gelir (Lechevalier ve ark., 1977, 1981 çalışmalarında belirtildiği gibi fosfolipit örneği 2 şeklindedir).
4. Yağ asiti kesiti, büyük miktarda doymamış yağ asitleri, tüberkülostearik asitler içeren ve düz zincirlerden oluşan bir yağ asit profili gösterir (Kroppenstedt, 1985).
5. DNA yapılarının G+C oranı %63- %73 moldür (Rainey ve ark., 1995a).

6. Mikolik asitler 34-78 karbon atomludur (Alshamaony ve ark., 1976a; Alshamaony ve ark., 1976b; Goodfellow ve ark., 1978, 1982).

Bu familyada yer alan *Nocardia* cinsinin üyeleri aerobik, katalaz pozitif, yaygın olarak basit dallanmış aktinomisetleri oluştururlar. Ayrıca peptidoglikan yapıları n-asetilglukozamin, D-alanin, L-alanin, D-glutamik asit ve mesodiaminopimelik asitten oluşur. Muramik asit glikolatlanmış N formunda, yağ asiti profilleri büyük miktarda düz zincirli ve doymamıştır. Ayrıca tüberkülostik asit ve 3 çift bağ ile bağlı 40-64 karbon atomlu mikolik asit içerirler. DNA içeriğinde G+C oranı %64-%72 moldür (Işık ve ark., 2001; Goodfellow ve Maldonado, 2006).



Şekil 1.2. Actinobacteria sınıfı içerisindeki 5 ordonun 16S rRNA gen sekans benzerliklerine göre yapılan ve benzerlik ilişkilerini gösteren diyagram. Actinobacteria sınıfı içerisindeki familyaların filogenetik ilişkileri ana hatlarıyla belirtilmiştir. Yeni tanımlanan taksonlar ise koyu renkte yazılmıştır (Zhi ve ark., 2009)



Şekil 1.3. *Corynebacterineae* alt ordosunun filogenetik ilişkilerini gösteren diyagram (Conville ve Witebsky, 2010)

Corynebacterineae alt ordosundaki cinsler tip IV hücre duvarına sahiptirler. Tip IV hücre duvarı ise mesodiaminopimelik asit, arabinoz ve galaktoz şekerlerinden yapılmış peptidoglikan tabakasına sahip mikroorganizmalara verilen karakteristik özelliktir. Ayrıca hücre duvar yapılarında çeşitli uzunlukta bulunan mikolik asitlere sahiptirler. Bu alt ordoda *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamurella* modifiye edilmiş asite karşı dirençliyen, *Corynebacterium*, *Williamsia* ve *Dietzia* modifiye edilmiş asite karşı dirençsizdir. *Mycobacterium* ve *Segniliparus* cinsleri ise asite karşı kuvvetli direnç gösterirler. Bu grubun içerisinde sadece *Nocardia* cinsi üyeleri modifiye edilmiş asite dirençli özelliğine ek olarak, hava hiflerine de sahiptirler (Saubolle ve Sussland 2003; Conville ve Witebsky., 2010).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. *Dietzia* Cinsinin Sistematığı, Genel Özellikleri ve Tarihçesi

Üstalemler: *Bacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Alt sınıf: *Actinobacteridae*

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

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

Familiya: *Dietziaceae* (Rainey ve ark., 1997) (Zhi ve ark., 2009)

Cins: *Dietzia* (Rainey ve ark., 1995b).

Dietzia cinsi günümüzde sistematığı geçerli olarak tanımlanmış 11 türü bünyesinde barındırmaktadır (J.P.Euzéby; www.bacterio.cict.fr/d/dietzia.html, 15.06.2011). *Dietzia* cinsi *Dietziaceae* familyasına ait bir cinsdir. Bu familiya ise *Corynebacterineae* alt takımında yer alan diğer 6 familyadan biridir (Şekil 1.3).

Dietzia cinsi ilk olarak 1929 yılında Harrison tarafından *Flavobacterium maris* türü olarak önerilmiştir. Daha sonra 1982 yılında Nesterenko ve arkadaşları tarafından *Rhodococcus maris* olarak gösterilmiştir. (Goodfellow ve Maldonado, 2006; Koerner ve ark., 2009). 1995 yılında ise Rainey ve arkadaşları tarafından *Dietzia* olarak doğru teşhisi yapılmıştır. *Dietzia* cinsinin tip türü *Dietzia maris*'dir (Goodfellow ve Maldonado, 2006; Li ve ark., 2008).

Dietzia cinsi üyeleri aerobik, gram pozitif, asit-alkole dayanıklı olmayan, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif aktinomisetlerdir. Kok, kısa çubuk veya V formunda olabilmektedirler. Agar ortamında dairesel, dış bukey, kabarık ve parlak şekilde görülürler. Pigmentasyon turuncu ile mercan kırmızısı arasında değişkenlik gösterir. Fosfolipid karakterizasyonlarına bakılırsa azotlu fosfolipidleri yoktur ve fosfatidil gliserol değişkendir. Ayrıca oksidatif tip metabolizmaya ve Aly tip peptidoglikan yapısına sahip olan organizmalardır. Peptidoglikan tabakası 34- 39 karbon atomlu mikolik asit içeriklidir ve bu karbon atomları bir çift bağla birbirlerine bağlıdır. Hidrojensiz menakuiononlar 8 izopren birimlidir. DNA yapısındaki G+C içeriği % 66-73 mol'dür. Peptidoglikan tabakasının ayırt edici aminoasiti mesodiaminopimelik

asittir. Uzun zincirli yağ asitleri ağırlıklı olarak düz zincirli doymuş ve doymamış bileşenlerdir ve ayrıca tüberkülostearik asit mevcuttur (Goodfellow ve Maldonado, 2006; Koerner ve ark., 2009). Bu cinsin bazı karakteristik özellikleri Çizelge 2.1’de verilmektedir.

Dietzia cins üyelerinin yavaş ve 37°C’den düşük bir sıcaklıkta gelişmesi, tanımlanmasında basit güvenilir metotların kullanılamaması bu cinsin teşhisinde zorluklara neden olmaktadır (Koerner ve ark., 2009).

Çizelge 2.1. Mikolik asit içeren *Dietzia* cinsinin bazı karakteristik özellikleri (Goodfellow ve Maldonado, 2006)

Karakteristik Özellikler	<i>Dietzia</i>
Hücre morfolojisi	Kısa, çubuk ve kok şeklinde
Hava hifleri	Yok
Koloni morfolojisinin görülebileceği zamanı	1-3 Gün
Asit- Alkol dirençliliğinin derecesi	Dirençsiz
Mikolik asit spot sayısı	Tek spot
Mikolik asit karbon sayısı	34-39

2.1.2. *Dietzia* Cinsinin Ekolojisi ve Patojenitesi

Diğer mikolik asit içerikli aktinomisetlerde olduğu gibi *Dietzia* cinsi de aquatik ve karasal habitatlarda geniş bir oranda ve ayrıca klinik materyallerden de giderek artan bir yoğunlukta izole edilmektedir. Örneğin *Dietzia maris* topraktan, sazan balığının derisinden ve sindirim borusundan, ayrıca Pasifik Okyanusunun derin deniz sedimentlerinden izole edilmiştir. *D. natronolimnaios* türü ise kısmen tuzlu ve alkalın içerikli olan Kuzey Afrika gölünden izole edilmiştir. Bu cinsin üyeleri ayrıca kemik enfeksiyonlarından da izole edilmektedir. *D. cercidiphylli* ve *D. schima* bitki dokularının yüzeyinden, *D. dagingensis* Çin’deki Dagenging petrol alanından, *Dietzia*

timorensis Endonezya’ da maun ağacının altında bir toprak kolonisinden izole edilmişlerdir (Goodfellow ve Maldonado, 2006; Koerner ve ark., 2009).

Mikolik asit içerikli aktinomisetlerin sınıflandırılması ile ilgili gelişmeler *Corynebacterium*, *Mycobacterium* ve *Nocardia* gibi cinslerin açık bir şekilde tanımlanmasıyla birlikte yeni fırsatçı patojenlerin belirlenmesi çalışmalarını hızlandırmıştır. Günümüzde en çok tanımlanması yapılan *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, özellikle *Dietzia* gibi taksonlar bu patojenlerin teşhisinin yapılmasını kolaylaştırmıştır (Koerner ve ark., 2009).

Dietzia suşlarının mikromorfolojik ve klinik görünümü *Rhodococcus equi* türüne çok benzemektedir. Bu yüzden *Dietzia* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonlar kaydedilmemiş ve doğru teşhisi yapılamamıştır. *Dietzia* cinsi ancak günümüzde açık bir şekilde patojenik rolünün tanımlanmasıyla dikkat çekmiştir. *Dietzia* cinsinin doğru metotlarla kesin tanımlanması sonucu *Rhodococcus* cinsinden ayrılarak yanlış tanımlanması sona ermiştir. Böylelikle bu cinsin üyelerinin klinik öneme sahip organizmalar olduğu da belirlenmiştir (Koerner ve ark., 2009).

Dietzia, *Corynebacteria* ve diğer fırsatçı patojenler gibi insan derisine kolonize olabilen bir cinsdir. Örneğin *D. cinnamomea*, *D. maris* ve *D. psychrocaliphila* türleri n-alkan ve izo alkan çeşitlerinin çoğunu okside edebilirler. Bilindiği üzere insan derisi n-alkan salgılamaktadır. Bu gibi organizmalar bu ürünü karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Ayrıca *Dietzia* cinsi üyelerinin hücre duvar yapısı, bilinen bakteriyel patojenik faktörlere sahip olduğunu göstermektedir. Bu cinsin üyeleri tüberkülostearik asit ve lipoarabinomannan bileşiği içermektedir. Bu bileşik insan makrofajlarında α faktörlü tümör nekroz hastalığına neden olan güçlü bir uyarıcıdır (Koerner ve ark., 2009).

Geçerli olarak tanımlanmış *Dietzia* türleri içerisinde özellikle 3 üye ağır enfeksiyonlu hastalardan alınan numunelerden izole edilmiştir. Ayrıca bu 3 tür çevrede de yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar; *D. maris*, *D. cinnamomea* ve *D. pepillomatosus*’dir. Örneğin *D. maris* bağışıklık sistemi hasarlı hastalardan izole edilmektedir. Ayrıca prostetik kalça enfeksiyonunun etiyolojik ajanlarından biridir. Ana atar damara ikinci dereceden zarar veren akut A tipi enfeksiyonuna neden olan bir patojen olup, geri dönüşümsüz hasarlar verebilmektedir (Koerner ve ark., 2009).

2.1.3. *Nocardia* Cinsinin Sistematığı, Genel Özellikleri ve Tarihçesi

Üstalemler: *Bacteria*

Sınıflar: *Actinobacteria*

Alt sınıflar: *Actinobacteridae*

Takımlar: *Actinomycetales* (Buchanan 1917) (Zhi ve ark., 2009)

Alt takımlar: *Corynebacterineae* (Stackebrandt ve ark.,1997) (Zhi ve ark., 2009)

Familiyalar: *Nocardiaceae* (Castellani ve Chalmers,1919) (Zhi ve ark., 2009)

Cinsler: *Nocardia* (Trevisan,1889)

Nocardiaceae familyasına ait *Nocardia* türleri, *Actinomycetales* ordosunun *Corynebacterineae* alt takımı içerisinde sınıflandırılmaktadırlar (Elliott ve ark.,2006). *Nocardia* cinsi günümüzde sistematığı geçerli olarak tanımlanmış 93 türü bünyesinde barındırmaktadır (J.P.Euzéby; www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html. 15.06. 2011). Şu an kabul edilen bu türlerin yaklaşık olarak yarısı insan ve hayvan patojeni olarak kabul edilir (Elliott ve ark., 2006).

Nocardia cinsi aerobik aktinomiset cins grubuna aittir. Bu cinsteki türlerin hepsi gram (+) ve çoğu dallanmış çubuk şeklindedir, ayrıca hareketsiz, katalaz pozitif aktinomisetlerdir. *Nocardia* türleri kemoorganotrofik organizmalardır ve oksidatif tipte metabolizmaya sahiptirler. Bu kimyasal özelliklere ek olarak, nocardiyal peptidoglikan tabakası A1 γ tipindedir. Genellikle büyüme devrelerinin bazı aşamalarında asit alkole karşı dirençlidirler. Yaygın olarak dallanmış substrat hif oluştururlar. Bazen mikroskopik olarak görülebilen hava hifleri neredeyse her zaman mevcuttur. Kısa ya da uzun zincirli konidyumlar ara sıra hava hiflerinde ya da daha nadir olarak hem hava hem de substrat miselyumlarında görülebilirler. Çoğu *Nocardia* türü karotenoid benzeri pigmentler meydana getirir. *Nocardia* cins üyeleri gram boyamada uzun ince, dallanmış parçacıklar halinde ve gram (+) çubuklar şeklinde görülür. Bu morfoloji hasta numunelerinde en yaygın görülen morfoloji olup, daha kısa çubuk şeklinde yada küçük dallanmış filamentler şeklinde görülebilmektedir (Goodfellow ve Maldonado, 2006; Conville ve Witebsky, 2010).

Nocardia cins üyelerinin koloni morfolojisi türden türe hatta aynı tür içerisinde dahi değişiklik gösterebilir. Sabouraud agar gibi yarı saydam bir ortamda koloni rengi en iyi şekilde gözlemlenir. Kahverengi, pembe, turuncu, mor, sarı, şeftali rengi veya beyaz renkte görülebilir. Koloniler kireçli, mat veya yumuşak düzensiz şekilde ya da kırışık, küme şeklinde düzgün olabilmektedir. Hava hifleri genellikle inkübasyonun 7

günlük devresi içerisinde görülür. Çok nadir durumlarda hava hifleri üretmeye bilmektedirler. (Conville ve Witebsky., 2010).

Hava hifleri sayesinde koloni dış yüzey görünümü toz halinde ya da kadifemsi şeklindedir (Goodfellow ve Maldonado, 2006). Hava hiflerinin varlığı sayesinde *Nocardia* cinsi, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Cornebacterium* ve *Mycobacterium* cinslerini içine alan diğer akraba cinslerinden ayırt edilebilir. Ayrıca *Streptomyces* türleri ve aerobik aktinomisetlerin diğer üyeleri hava hifleri şeklinde görülebilir ancak bu cinsler modifiye edilmiş asite karşı dirençli suşlar olarak görünmezler. Mikroskopik *Nocardia* kültürleri kompleks substrat hif dallanmaları gösterirler (Elliott ve ark., 2006).

Nocardia kültürünün mikroskopik ve makroskopik incelenmesi bu cinsin tanımlayıcı teşhisini sağlayan ilk basamaktır. Özellikle gram boyama ve modifiye edilmiş asite karşı dirençli suşların boyanması hızlı tanımlanmalarını sağlayan oldukça önemli bir teşhistir. Koloniler belirginleşmeden önce *Nocardia* kültürleri minimum 48-72 saate ihtiyaç duyarlar. Mikroskopik kültürler 2 ila 3 hafta içerisinde inkübe edildikten sonra görünür hale gelirler. Substrat ve hava miselyumları ayrıca sporülasyon aşamaları gözlemlenebilir. *Nocardia* cinslerinin gelişimini sağlayan bazı seçici ortamlar sayesinde yeni türler keşfedilebilir. Bu besiyerleri diğer organizmaların gelişimini minimuma indirebilir. Bu besiyerleri parafin agar, antimikrobiyal bileşikler içeren agarlar, Thayer- Martin besiyeri ve organik kömür tamponlu yeast extract agar gibi birçok farklı ortamı içermektedir (Elliott ve ark., 2006).

Nocardia cinsine ait organizma ilk defa 1888 yılında veteriner hekim olan Edmund Nocard tarafından bir sığırın lenf bezi iltihabından izole edildi. Bir yıl sonra, Trevisan organizmayı karakterize etti ve ona *Nocardia farcinica* ismini verdi ve bu organizma 1954 yılında cinsin tip türü olmuştur. 1890 yılında Eppinger, insan beyin absesinden filamentli yapıda bir organizma izole etmişlerdir. Bu izolata 1896 yılında *Nocardia asteroides* adı verilmiştir. 1962 yılında Gordon ve Mihm tarafından yapılan taksonomik çalışmalar, önceden tanımlanan *Nocardia farcinica* suşu ile *N.asteroides* olarak bilinen suşlar arasında hiçbir fenotipik farklılığın bulunmadığını ortaya koydu. *N.farcinica* tip suşunun belirsiz taksonomik durumu nedeniyle ve *N.asteroides* türünün, *Nocardia* cinsinin en yaygın gösterilen izolatları olduğu için Gordon ve Mihm Uluslararası Adli Komisyonuna bu iki türü birden rapor ettiler. *N.asteroides*, *Nocardia* cinsinin tip türü olarak *N. farcinica* ile yer değiştirdi. Böylelikle *N.asteroides*, *Nocardia*

cinsinin yeni tip türü olarak seçilmiş oldu (Elliott ve ark., 2006; Conville ve Witebsky., 2010).

N.asteroides cinsinin tarihçesindeki karışıklık, *Nocardia* izolatlarının tanımlanmasında gen sekans analizlerinin kullanımının artmasıyla sona ermiştir. Sekans analizleri, *N.asteroides* tip türünün gen sekansının, şu ana kadar incelenen *N. asteroides* klinik izolatlarının neredeyse tümünden farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Conville ve Witebsky., 2010).

Hücre duvarı majör şeker ve aminoasit kompozisyonu ve peptidoglikan yapısı'nın saptanması aktinomiset sistematığının yeniden gözden geçirilmesine ve çeşitli duvar kemotipleri ve peptidoglikan tiplerine göre taksonların belirlenmesini sağlamıştır (Lechevalier ve Lechevalier, 1970b; Schleifer ve Kandler, 1972). Ayrıca, hücre duvarında nitel duvar kompozisyon analizleri *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia* arasındaki yakın ilişki için anlamlı ve açık bir delil sağlamıştır (Cummins ve Harris, 1956, 1958). Bu organizmaların tümü büyük miktarda meso-diaminopimelik asit (meso-A_{2pm}), arabinoz ve galaktoz içermekte; Kemotip-IV hücre duvarı ve A1γ peptidoglikan tipine sahiptir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970b; Schleifer ve Kandler, 1972). Bu taksonlar arasındaki yakın ilişki, onların mikolik asit yani yüksek moleküler ağırlıklı 2-alkil -3- hidroksi dallanmış zincirli yağ asitlerini içerdiklerinin keşfedilmesi ile daha ileri düzey kazanmıştır. Mikolik asit içeren aktinomisetler "Mycolata" olarak adlandırılmakta ve çoğunlukla, Mycolata grubu üyesi organizmaların hücre zarflarında esterlenmiş mikolik asitlere bağlanan peptidoglikan-arabinogalakthan hücre duvarı iskeletleri yapıyı oluşturmaktadır (Chun ve ark., 1996).

Aktinomiset sistematığında değerli olduğu gösterilen diğer kimyasal belirleyiciler hücresel yağ asitleri, isoprenoid quinonlar ve polar lipid analizlerinden belirlenmiştir (Lechevalier ve ark., 1977; Minnikin ve Goodfellow, 1980; Kroppenstedt, 1985; Baba, 1997). Her bir kimyasal elemanın aralıksız dağılımı özellikle *Corynebacterium*, *Mycobacterium* ve *Nocardia* cinslerine yerleştirilen bakterilerin yeniden sınıflandırılmasında yeni deliller sağlamıştır (Goodfellow ve Minnikin, 1977, Minnikin ve ark., 1978; Collins ve ark., 1977, 1979, 1982; Keddie ve Bousfield, 1980).

Mikolik asit içeren aktinomisetlerin, özellikle *Corynebacteria*, *Mycobacteria* ve *Nocardia*'nın sahip olduğu mikolik asitlerin yapısı ve tüm boyutundaki farklılıklarla, hücresel yağ asitleri, menakuionon ve polar lipid kompozisyonu ile tanımlanıp ayırt

edilebildiği sonradan ortaya çıkarılmıştır (Cross ve Goodfellow, 1973; Goodfellow ve Minnikin, 1977, 1981a, 1981b, 1984; Keddıe ve Cure, 1977; Minnikin ve ark., 1978; Baba ve ark., 1997).

Mikolik asit içeren suşlar birçok ortak özelliklere sahiptirler ve 16S rRNA gen ağacında monofiletik bir grup oluştururlar. (Goodfellow ve Maldonado, 2006). Ayrıca bu cinsler farklı karakteristik özelliklerde de bulunabilirler (izelge 2.2).

Son 10 yıl içinde 16S rDNA ve hsp65 gen polimorfizmini ve sekans analizlerini temel alan genomik metotların benimsenmesi birçok türün tanımlanmasında önemli bir yerdedir. Bu durum bu cins için büyük bir taksonomik değişim sağlamıştır (Nava ve ark., 2004).

Çizelge 2.2. Mikolik asit içeren *Nocardiaceae* familya üyelerinin bazı karakteristik özellikleri (Goodfellow ve Maldonado, 2006; Yassin ve ark., 2007; Conville ve Witebsky, 2010)

Karakteristik Özellikler	<i>Gordonia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Williamsia</i>
Hücre morfolojisi	Çubuk, kok veya kısmen dallanmış hifler	Sonradan çubuk ve kok formuna parçalanmış miselyumlar	Çubuk formdan geniş ölçüde dallanmış miselyum, daha sonra ise çubuk, kok forma parçalanmış düzensiz yapılar	İnce düzensiz çubuk ya da kok yapılar ya ayrı ayrı ya da küçük kümeler halinde bir araya gelirler
Hava hifleri	Yok	Var	Yok	Yok
Koloni morfolojisinin görülebileceği zamanı	1-3 Gün	1-5 Gün	1-3 Gün	1-4 Gün
Asit- Alkol dirençliliğinin derecesi	Genelde kısmen dirençli	Genelde kısmen dirençli	Genelde kısmen dirençli	Dirençli değil
Mikolik asit spot sayısı	Tek spot	Tek spot	Tek spot	Tek spot
Yağ asit esterlerinin pirolizde açığa çıkan karbon atom sayısı	16-18	12-18	12-16	16-18

2.1.4. *Nocardia* Cinsinin Ekolojisi ve Patojenitesi

Nocardia cinsinin üyeleri çevrede her yerde olan ve saprofit toprak mikroorganizmaları olarak değerlendirilir. Bu organizmalar tatlı ve tuzlu sulardan, çürüyen vejetasyondan ve hayvan dışkı atıklarından izole edilebilmektedir. Bazı türleri özel bir iklime sahip coğrafi yerlerde daha yaygındırlar. Örneğin; deri enfeksiyonu ve miçetoma hastalığına neden olan *Nocardia brasiliensis* tropikal veya tropikal iklime yakın iklim şartları görülen bölgelerde daha yaygın olarak izole edilir (Elliott ve ark.,2006; Conville ve Witebsky., 2010). Bazı *Nocardia* türleri ise hayvan

patojeni olduklarından hastalığa neden olduğu canlıdan izole edilmişlerdir. Örneğin *N. crassostreae* istiridyede meydana gelen enfeksiyondan, *N. seriole* ise balıklardaki enfeksiyonlardan elde edilmiştir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Nocardia'nın doğal habitatı topraktır ve pH 6.8 ve 7.2 arası optimum büyüme göstermektedirler. Bunun dışında asidik ve bazik topraklardan da *Nocardia* izolasyonu gerçekleşmiştir. *Nocardia jiangxiensis* ve *Nocardia miyunensis* asidik topraktan, *N. neocaledoniensis* ise ultrabazik yüksek miktarda magnezyum içeren topraktan, yeni *Nocardia* türleri olarak literatüre kazandırılmışlardır (Cui ve ark., 2005, Saintpierre-Bonaccio ve ark., 2004; Yamamura ve ark., 2005).

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).

Farklı *Nocardia* populasyonları aktif çamur kirli su arıtım tesislerinde, havalandırma tanklarının yüzeylerindeki köpük içerisinde bulunmuştur (Goodfellow ve ark., 1996; Pagilla ve ark., 1998). Biyolojik arıtım tesislerinde genellikle görülen problemler çamur kabarması ve köpürmesidir. *Nocardia* cinsi genellikle yaz aylarında arıtım tanklarında köpürmeye sebep olmakta olan bir bakteridir ve *N. pinensis* ile *N. takadensis* aktif çamur'dan izole edilerek literatüre kazandırılmış türlerdir (Blackall ve ark., 1989; Yamamura ve ark., 2005).

Nocardia cinsi hayvanlarda ve insanlarda yerleşen ve yayılış gösteren enfeksiyonlardan sorumlu aerobik bir aktinomiset cinsidir (Corti ve Fioti, 2003). *Nocardia* enfeksiyonlarına duyarlı olan hayvanları şu şekilde sıralayabiliriz; kuşlar, kediler, büyük baş hayvanlar, tavuklar, köpekler, ördekler, balıklar, keçiler, Gine domuzları ve koyunlardır. Günümüzde ise özellikle ineklerde bazı *Nocardia* cinslerinin neden olduğu meme iltihabı büyük bir problem oluşturmaktadır. Çoğunlukla hayvan patojeni olarak tanımlanan türü *N. asteroides*'dir. Onu *N. brasiliensis* ve *N. otitidiscaviarum* takip eder. Bazı *Nocardia* türleri ise simbiyoz ve bitki patojeni olabilmektedir. Örneğin *N. vaccinii* çay üzümünde gal oluşumuna neden olan bir bitki patojendir. Ayrıca kan emen eklembacaklılarla mutualistik ilişki içerisinde olan türler de mevcuttur (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Nocardia türleri çeşitli insan enfeksiyonuna, ciddi hastalıklara neden olur. Özellikle bağışıklık sistemini baskılamış konakçı olarak bilinir. Bu hastalıklarda *Nocardia* enfeksiyonları çoğunlukla nefes almaya bağlı olarak akciğerlerde başlamaktadır. Öncelikle ciddi akciğer enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Daha sonra vücudun hemen hemen tüm bölgelerine yayılmaktadırlar. Enfeksiyonun en çok görüldüğü ikinci bölgesi ise beyindir (Conville ve Witebsky, 2010).

Nokardiyoz genellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalarda lokalize olan ve yayılış gösteren nocardial bir enfeksiyondur. Nokardiyoz evrensel bir dağılım gösteren ve 20-60 yaş arası insanlarda etkili olan bir enfeksiyondur. *Nocardia* cinsi insanlarda birbirinden farklı iltihap enfeksiyonlarına neden olur. 5 çeşit hastalık formu tanımlanmıştır. Bunlar; akciğer nokardiyozisi, iki veya daha fazla vücut bölgesini içeren sistemik nokardiyozu, merkezi sinir sistemi nokardiyozu, akciğer dışı nokardiyozu ve cilt deri altı nokardiyozudur. Ayrıca Cross ve Bindford'un raporuna göre nokardiyozis lenfoproliferatif sendromlar, neoplazi, AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), karaciğer sirözü gibi çeşitli hastalıklara zemin hazırlar. İnsanlarda enfeksiyonun görülme sıklığı son 10 yıl içinde büyük ölçüde artmıştır. İnsanları enfekte edebilen türlere *N.asteroides* ve *N.brasiliensis*'i örnek olarak verebiliriz. *N.asteroides* çoğunlukla akciğerlerde görülür. *N.brasiliensis* ise deri lezyonu ve lenf bezi iltihabı ile ilgilidir. Ayrıca bazı *Nocardia* türleri, özellikle *N.farcinica* ve *N.transvalensis*'in yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olduğu görülmektedir (Corti ve Fioti, 2003; Goodfellow ve Maldonado, 2006; Conville ve Witebsky, 2010).

Sulfonamitler, nokardiozis enfeksiyonları için standart tedavidir. Bu vakaların çoğuna etkilidirler. Bu hastalıklarda ayrıca imipenem, amikacin, minocycline, amoxicilin clavulanic acid gibi bazı ilaçlarda kullanılmaktadır. İltihabın alınması için yapılan ameliyatlarda genellikle uygulanmaktadır (Corti ve Fioti, 2003).

Ayrıca, *Nocardia* cinsi, özellikle antibiyotikleri içeren biyolojik olarak aktif sekonder metabolit üreticiler adı altında endüstriyel açıdan da öneme sahiptirler. Nocardisin ve brailinolit gibi çeşitli antibiyotikler *Nocardia* türlerinden elde edilmiştir. Bu nedenle izolasyonları, ekolojik yönlerinin anlaşılması ve sağlıkla ilgili tehlikelerini değerlendirmek oldukça önemlidir. Ayrıca yeni biyoaktif metabolitler üreten faydalı türlerinin tanımlanması da bu açıdan önem arz etmektedir (Yamamura ve ark., 2003).

2.1.5. *Nocardia* ve *Dietzia* Cinsleri İçin Seçici İzolasyon Ortamları

Nocardia türleri genellikle, alışılan aktinomiset seçici agar ortamlarında çok az sayıda bulunmaktadır. Bu agarlarda öncelikli olarak *Streptomyces* cinsleri izole edilmektedir. Bu yüzden bu türlerin etkili bir verimde izolasyonunu kolaylaştırmak için çeşitli metotlar geliştirilmiştir (Yamamura ve ark., 2003).

Örneğin Söhnghen tarafından 1913 yılında modifiye edilmiş parafin-baiting tekniği topraktan *Nocardia* türlerinin izolasyonunda kullanılmıştır. Topraktaki *Nocardia* türleri parafini kullanmışlar ancak diğer bakteri ve mantar türlerinin neden olduğu kontaminasyonlar ortaya çıkmıştır. *Nocardia* türlerinin dirençli olduğu farklı antibiyotikler esas alınarak, Orchard ve Goodfellow tarafından 1974 yılında tasarlanan yeni bir izolasyon ortamı bulunmuştur. Bu metotta antifungal antibiyotikler olan cycloheximide ile demothylchlortetracycline, methacycline ve chlortetracycline içeren antibakteriyel antibiyotikler eklenerek, DST (diagnostic sensitivity test- tanısal duyarlılık test) agar metodunun kullanılmasıyla 47 toprak örneğinin 15'inde *Nocardia* türleri görülmüştür (Yamamura ve ark., 2003). Bu güne kadar DST agar ortamında birçok izolat teşhis edilmiştir. Bunlardan bazıları *N.asteroides*, *N.brasiliensis* ve *N.otitidiscaviarum* türleridir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Toprakta yaşayan diğer mikroorganizmaların aktinomisetlerle, agar ortamında rekabetçi olmaları dezavantaj bir durumdur. Bu yüzden rekabetçi mikroorganizmaların gelişimini azaltan özel bir ortam hazırlanmalıdır (Hayakawa, 2008). Bugün ise topraktan *Nocardia* türleri için daha yüksek seviyede seçici izolasyon ortamı oluşturan yeni bir metot tanımlanmaktadır. Bu metot diğer aktinomiset taksonlarından özellikle en fazla yaygınlıkta olan *Streptomyces* türlerinden *Nocardia* türlerini santrifüjasyon yöntemiyle ayırt etme aşamasına dayanır. Sükroz gradient santrifüjasyon yöntemi, klortetrasiklin gibi antibiyotikler eklenerek hazırlanan ve seçici izolasyon ortamı sunan humik asit vitamin agar (HV agar) 'la birlikte kullanılmıştır (Yamamura ve ark., 2003).

Hayakawa ve Nonomura 1987 yılında humik asit vitamin agarı (HV agar) formüle etmişlerdir. Bu yeni ortam tek karbon ve nitrojen kaynağı olarak toprak humik asiti içermektedir. Hüyük asitler çapraz bağlarla bağlı polimerler olduğundan heterojenlerdir ve genellikle biyolojik bozulmaya dirençlidirler. Bununla birlikte aktinomisetlerin humik asiti kullandığı gösterilmiştir. Hayakawa ve Nonomura ayrıca HV agarın çeşitli

nadir aktinomisetlerin gelişiminde etkili ve elverişli bir ortam sağladığını ispat etmişlerdir. HV agar filamentli olmayan bakteri kolonilerinin gelişimini kısıtlamaktadır. HV agar nadir aktinomisetlerin spor oluşturmalarını destekleyerek morfolojik tanımlarını hızlandıran önemli bir avantaj konumundadır. HV agar bu aktinomisetler için yeterli büyüme ve iyi sporulasyon sağlamaktadır. HV agara nalidixic asit ve trimethoprim gibi ajanlar eklenerek, bakteriyel kontaminasyon başarılı bir şekilde elemine edilmektedir (Yamamura ve ark., 2003; Hayakawa, 2008).

Aktinomisetler, farklı spor oluşturma özellikleriyle karakterize edilirler. Toprak habitatlarında mevcut besinler kısıtlandığı zaman aktinomisetler hayatta kalmak için çeşitli spor formlarında yaygınlıkla görülürler. Birçok değişik metot, *Streptomyces* türleri dışındaki aktinomiset cinslerini izole etmek için geliştirilmiştir. Bu metotlar bu cinslerin spor oluşturma yeteneklerine dayanır. Bu yüzden daha etkili bir izolasyon çalışmasına yardımcı olabilmek adına, hedef aktinomiset cinsinin farklı spor oluşturma özelliklerinden yararlanılması tavsiye edilir. Sonuç olarak, izolasyon metotlarında ısıtmaya, kurutmaya veya sporları öldüren kimyasallara karşı önlemler alınır. Ayrıca aktinomiset sporlarının batmayan yoğunluk farklılıklarının kullanılması arzu edilen cinsin seçici izolasyonunu kolaylaştırmıştır (Yamamura ve ark., 2003).

Günümüzde ise izole edilen saf aktinomiset kültürlerinin arthrospor süspansiyon özellikleri kullanılmıştır. Bu özellikler kullanılarak düşük hızda sükröz gradient santrifigasyonu yöntemiyle *Nocardia* cinsleri izole edilmiştir. Bu yöntem sayesinde çoğu toprakta dominant olan ve her izolasyon ortamında hızlıca gelişebilme eğiliminde olan ve genellikle diğer aktinomiset kolonilerinin gelişimini engelleyen *Streptomyces* türlerinden farklı olarak *Nocardia* cinsleri de görülmektedir. Yamamura ve arkadaşları ayırt edici olan santrifigasyon aşamasını toprak süspansiyonuna uygulayarak ekimden önce, *Nocardia* populasyonunu diğer aktinomisetlerden ayırdıklarını göstermişlerdir (Yamamura ve ark., 2003).

Dietzia türlerinin izolasyon çalışmalarında farklı olarak birkaç agar denemesi gerçekleştirilmiştir. Örneğin n-alkanla zenginleştirilmiş mineral salts agar *D. maris* türü için, alkalın agar *D. natronolimnaios* türü için başarılı sonuçlar vermiştir. Ayrıca karbon kaynağı olarak buharlaştırılmış n-tetradekan ilave edilmiş bir sentetik ortam sunan AT ortamı *D. psychrocaliphila* türünün izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Sonuç olarak, mikolik asit içerikli olan ve aynı alt ordo içerisinde yer alan *Dietzia* ve *Nocardia* cinslerinin hem benzer hemde farklı özellikleri mevcuttur. Çizelge 2.3'te bu özelliklerden bazıları verilmektedir.

Çizelge 2.3. *Dietzia* ve *Nocardia* cinslerinin bazı kimyasal markörlerle karşılaştırılması (Goodfellow ve Maldonado, 2006)

Kimyasal Markörler	<i>DIETZIA</i>	<i>NOCARDIA</i>
Duvar Kemotip ^a	IV	IV
Tüm organizma şeker örneği ^b	A	A
Peptidoglikan ^c ve muramik asit tipleri ^d	Alγ A	Alγ G
Yağ asiti örnekleri ^e	1b	1b
Fosfolipit tipi ^f	PI	PII
DNA'nın Mol % G+C	66- 73	64-72

- a- Duvar Kemotipleri; IV-meso-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 asiti örnekleri; Numara; yağ asiti metabolik yolunun, harf ise yağ asiti sentezinin tipini göstermektedir. 1; düz yağ asiti zincirlerini üreten metabolik yol, b; 10-metil dallanmış
- f- Fosfolipit tipi; PI, azot fosfolipitleri yok (fosfotidilgliserol mevcut), PII, sadece fosfotidiletonalamin mevcut

2.2. Prokaryotik Sistematiik

Prokaryotik sistematiik tarih boyunca, teknolojik gelişmelerin ışığı altında tür tanımlaması için daha doğru sonuçlar verme yolunda gelişme göstermiştir. Eski prokaryotik sınıflandırma kuralları ilk önce morfolojik kriterlere, daha sonra fizyolojik karakterlere dayandırılarak yapılmaktaydı. Günümüze doğru ise DNA, RNA ve protein sekanslarından elde edilen filogenetik bilgiler uygulanmaya başlanmıştır. Bu bilgiler DNA-DNA hibridizasyonu (DDH), DNA-RNA hibridizasyonu, rRNA gen ve protein sekansını içeren genetik ilişkilerin ölçülmesini sağlayan metotlardır. Günümüzde DNA-DNA hibridizasyonu ve gen dizi analizi prokaryotik taksonominin temel taşlarını oluşturmaktadır (Gevers ve ark., 2006).

Çeşitli yeni metotlar, 100 yılı aşkın bir süredir gelişmesine rağmen, hem daha iyi metodolojiler hem de geleneksel kurallar, bir suşun bilinen bir taksonamı ait olduğu yoksa yeni bir taksonumu oluşturduğuna karar vermek için kullanılmaktadır. Eğer suş, bilinen bir taksonsa seçilen testler, varolan taksonun bir üyesi olarak tanımlanması için uygulanır. Ancak suş veya suşlar yeni bir taksonun olabileceğini gösteriyorsa ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmelidir. Bu karakterizasyonda en önemli nokta hiyerarşik sınıflandırma içerisinde suşları yerleştirerek bakteriyolojik kodlamayla belirlenmiş uygun bir teşhisin yapılmasıdır (Tindall ve ark., 2010).

Taksonomi, biyolojide bilinen tüm biyolojik varlıklar için referans bir sistemi sağlayan temel bir disiplindir. Prokaryotlar içinse 4 ana maddeden oluşur;

1. Sınıflandırma; Çok sayıda suşun her birinin biyokimyasal, fizyolojik, genetik, morfolojik karakterlerinin benzerliklerini temel alan ve bu özelliklere göre düzenli bir sistemde organizasyonun gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

2. Filogenetik analiz; Filogenetik yapının tahmin edilmesini sağlamak

3. Adlandırma; Sistematiik kurallarına göre yapılan iki terimli adlandırmayla her bir grup etiketlenir.

4. Tanımlama; Yeni izolatların hızlıca tanımlanması için ayırt edici özelliklerin belirlenmesidir (Gevers ve ark., 2006).

Mikrobiyolojinin ilk zamanlarından itibaren, bilim insanları prokaryotlar için tahmini bir sınıflandırma arayışı içerisinde olmuşlardır. Bu sistem türlerin doğal akrabalığını ve hiyerarşik evrim planını temel alan, ayırt edici objektif metotlara göre şekillenmektedir (Gevers ve ark., 2006). Prokaryotlar için resmi bir sınıflandırma olmasa da Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı mikrobiyologlar kominitesi tarafından sınıflandırma sistemini temsil eden bir kitap olarak kabul edilmiştir. Resmi bir sınıflandırmaya en yakın tahmini yaptığından dolayı günümüzde dikkate alınmaktadır. Bergey'in sınıflandırma sistemi küçük alt birim rRNA genlerinin filogenetik analizlerini temel almaktadır. Bununla birlikte organizmaların birbirleri arasındaki ilişkileri açıklamada klasik mikroskobik ve biyokimyasal gözlemlerde kullanılır. Bu sistem prokaryotik çeşitliliğin durumunu tanımlamada ve taksonlar arasındaki ilişkiyi belirlemede son derece önemlidir. Bununla birlikte tüm gen sekanslarının elde edilmesiyle sağlanan yeni yaklaşımlardan çıkan sonuçlar bu sistemi daha değerli hale getirmiştir (Konstantinidis ve Tiedje, 2005).

Sistematikte asıl amaç farklı organizmaları belirlemek ve sınıflandırmaktır. Geleneksel olarak tür, çeşitliliğin esas birimidir. Wayne ve arkadaşları 1987 yılında filogenetik tür kavramını ortaya koymuşlardır. Filogenetik tür kavramı;

“genellikle ~ %70 veya daha fazla DNA-DNA benzerlik değeri veren ve 5°C veya daha az ΔT_m gösteren organizmaları içerir. Her iki değerinde dikkate alınması zorunludur.”

Bakteri türleri için bu tanımlama taksonomistler tarafından genellikle kabul edilen bir tanımlamadır. DNA hibridizasyonu türler arasında ve tür içerisinde var olan ilişkiler için referans metot olarak kabul görülmüştür. Wayne tarafından bulunan bu genomik tür tanımlaması literatürde sık sık uygulanmaktadır (Stackebrandt, 2006).

1987 yılında tüm DNA sekans verilerinin, taksonomiye tanımlayan filogeniyi belirlemede standart referans olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. DDH verilerinin kullanılmasının en iyi uygulanabilir prosedür olduğuna dikkat çekilmiştir. 2002 yılında bu metotun değerli olduğu kanaatine varılmıştır. Bu metot daha iyi bir alternatifi olmadığından dolayı tür tanımlamalarında standart yöntem olarak tavsiye edilmiştir. Fakat aynı zamanda araştırmacılar yeni metotların gelişmesini desteklemektedirler (Gevers ve ark., 2006).

Sistematik, organizmaların adlandırılmasında kullanılan hiyerarşik bir sistemdir ve sınıflandırmada filogenetik ilişkileri temel alan modern sistematik hedefler kullanılır. 1960'lı yıllarda, sistematikte protein sekans veri uygulamaları yaygınlaşmıştır. Bilim adamları filogeni konusunda yararlı bilgiler içeren protein, aminoasit sekanslarını tanımlamışlardır. Ancak DNA sekans metodlarının ve PCR kullanılarak yapılan DNA amplifikasyon yönteminin gelişmesinden sonra moleküler sistematik ancak günümüzde popülerliğini kazanmıştır. Bununla birlikte ribosomal RNA'ların küçük alt birimleri moleküler sistematik çalışmaları için bir seçenek oluşturmuştur. Protein kodlayan genlerin ve nükleotid sekanslarından çıkarılan aminoasit sekansları filogenetik araştırmalarda ayrıca yarar sağlamıştır (Stackebrandt, 2006).

Son 10 yılda taksonomide, nükleotid ve protein sekanslarını içeren yeni tekniklerin tanımlanmasıyla birlikte dikkat çekici başarılar meydana gelmiştir. Bu teknikler, filogeni içerisinde karışıklığı azaltıcı ve taksonomik duyarlılığı arttıran köklü değişikliklere neden olmuştur. Günümüzde organizmaların taksonomik sınıflandırılmasında, bakteri ve arkeler için rRNA gen sekanslarının arasındaki sekans karşılaştırmaları özellikle kullanılmaktadır (Stackebrandt, 2006).

Faydalı bir polifazik yaklaşım farklı çeşitteki verileri entegre ederek ortak bir sınıflandırma sistemi elde etmeyi amaçlar ve sınıflandırmadaki çelişkileri minimal düzeye indirir. Bu yaklaşım fenotipik, kemotaksonomik, genotipik ve filogenetik verileri içermektedir. İzolatların tipik karakterizasyonu 3 temel seviyeye göre ayrılabilir. Bu yöntemlerin ilki; çeşitli teknikler kullanılarak yapılan suş tarama metodudur. Bu metotta birbirlerine daha yakın izolatlar kümelenir ve birbirlerinden daha uzak ilişkili izolatlar ayrılır. Bu kümeleme işlemi temel alınarak farklı kümelerden temsili gruplar seçilir ve 16S rRNA gen sekans yöntemiyle de her bir kümenin filogenetik pozisyonu bu temsilciler esas alınarak belirlenebilmektedir. Bu analizlerin sonuçlarına göre, eğer gerekli görülürse organizmalar DDH deneylerinin yapılması amacıyla seçilmekte ve bu yöntemle tanımlanmaktadır (Gevers ve ark., 2006).

Yaygın olarak kabul edilen esas, sistematik yaklaşıma göre; iki suşun 16S rRNA gen sekans benzerliği %97'den daha az bir oranda ise, bu suşlar aynı türe ait değildirler. Aynı zamanda 16S rRNA gen sekansları yeni bir türün teşhisinde tek başına yeterli değildir. Ancak izole edilen yeni türün ilk teşhisi hakkında bilgi verebilir. Eğer 16S rRNA gen sekans benzerlik değerleri %97'den daha fazla bir oranda ise DDH veya

diğer gen sekans analizleri kullanılmalıdır. Bu metotlar ayrıca fenotipik testler esas alınarak yapılan karakterizasyonla ilişkili olmalıdır (Tindall ve ark., 2010).

2.2.1. Moleküler Taksonomi

2.2.1.1. 16S rRNA Gen Dizileme

Moleküler metotlar, türlerin ilişkilerinin anlaşılmasında nümerik ve kemotaksonomik tekniklerle birlikte kullanılan metotlardır (Hassan ve Wellington., 2009). Modern prokaryot taksonomisi, genetik metotlardaki gelişmeler tarafından fazlasıyla etkilenmiştir. DNA yapısının aydınlatılmasıyla ve genetik kodların şifresinin çözülmesiyle biyolojide büyük mesafeler katedilmiştir (Tindal ve ark.,2010).

Ribozom, her biri protein sentezini sağlamak üzere RNA ve protein molekülleri içeren iki alt üniteden oluşmaktadır. Prokaryotik küçük alt ünite rRNA molekülü 16S sedimentasyon katsayısına sahip bir fragman iken; büyük alt ünite rRNA 23S ve 5S moleküller taşır. 16S ve onu kodlayan genomik dizi, bakterilerin sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. 16S rRNA molekülleri iyi korunmuş ve heterojen bölgeler taşımaktadır. Korunmuş bölgeler, bütün veya çoğu bakteri türlerinin ribozomal hedeflerine yapışan PCR (Polimeraz zincir reaksiyonları) amplifikasyon primerleri oluşturmakta kullanılmaktadır. DNA dizi farklılığı gösteren bölgeler ise, izolatları cins veya tür düzeyinde sınıflandıracak dizi polimorfizmleri taşır. Ancak 16S rRNA molekülündeki dizi farklılık derecesi, bazı çok yakın ilişkili türleri birbirinden ayırmaya yeterli olmayabilir (Kolbert ve ark., 2004).

Woese ve Fox, ribozomal RNA moleküllerinin, moleküler sistematik analizlerini kullanarak organizmaların filogenetik ilişkilerinin yapılmasını sağlamışlardır. Tüm 16S rRNA bölgeleri korunaklı bir yapıya sahiptir. Edward ve meslektaşları bu genin çoğaltılmasını sağlayan universal primerleri dizilemişlerdir. Strackebrandt ve meslektaşları ise 16S rRNA gen bölgesinde varyasyon gösteren 3 bölge tanımlamışlardır;

1. **α bölgesi**; 982-998 baz uzunluğundadır.
2. **β bölgesi**; 1102-1122 baz uzunluğundadır. Türleri cins seviyesinde gruplandırır.
3. **γ bölgesi**; 150-200 baz uzunluğundadır. Tür seviyesinde tanımlamada oldukça yararlı bilgiler sağlamıştır. (Hassan ve Wellington, 2009).

16S rRNA gen sekansı tarafından çözümlenemeyen durumlarda, protein kodlayan diğer korunaklı genler (housekeeping genler) kullanılır. Protein kodlayan korunaklı diğer gen sekansları 16S rRNA gen sekans analizlerinden daha kesin sonuç vermektedir (Tindall ve ark., 2010).

Korunaklı genlerle yapılan çalışmalar Multilocus Sequence Typing (MLST) metodu adı altında yapılmaktadır. MLST, yakın ilişkili türlerin genotipik karakterizasyonu için kullanılan bir metottur. Bu metotta bir takım korunaklı genin allellik uyumsuzluğu kullanılır. Bu metot ayrıca bakteriyel patojenlerin filogenetik analizleri için moleküler epidemiyolojide kullanılan etkili bir araçtır. Korunaklı genlerin kullanılmasıyla yapılan çalışmaların çoğu 16S rRNA gen analizlerinden elde edilen filogeniyi desteklemektedir. Filogenetik analizler için seçilen genler belli kriterleri esas almalıdır. Yani cinsler arasındaki düzeni sağlamalıdır. Ayrıca bu genlerin evrimsel oranı 16S rRNA geninden daha yüksektir. Böylelikle yakın ilişkili suşların tanımlanmasında daha kesin sonuçlar vermektedir. Korunaklı genler, 16S rRNA geni ile bağlantılı olarak kullanılır. Bu genler; *hsp65*, *recA*, *gyrB*, *trpB*, *rpoB*, *secA1* ve *sodA* olup genellikle 7 tanedir. Yakın türler arasındaki ilişkileri açığa çıkarmada bu alternatif genler, çoğu çalışmada kullanılmaktadır (Hassan ve Wellington., 2009).

16S rDNA gen sekansı, *Nocardia* türlerinin tanımlanmasında en çok yaygınlıkla değerlendirilen genidir. Ayrıca *hsp65* ve *secA1* genleri gibi protein kodlayan genlerin sekans analizleri bu cinsin tür seviyesindeki tanımlanmasında kullanılabilinen analizlerdir. Bu gen bölgeleri 16S rDNA gen sekansından daha kısadır. Bu yüzden bu gen bölgelerinin kullanılması maliyetten ve zamandan tasarruf yapılmasına olanak sağlar. Buna ek olarak *Nocardia* türleri arasında bu genler, 16S rDNA gen bölgesinden daha heterojendirler (Elliott ve ark., 2006).

DDH veya DNA-RNA hibridizasyon teknikleri 1960 yılından itibaren, prokaryotik sistematikte uygulanmaktadır. Bu metotlar 16S rRNA gen sekansı yerine kullanılan daha kullanışlı yöntemlerdir. 16S rRNA gen sekans analizleri ile DNA-RNA analiz sonuçları arasında gözlenen sonuçlarda genelde iyi bir korelasyon görünmektedir. Çünkü DDH metodu, suşlar arasında 16S rRNA gen sekans benzerliği açısından %97'den daha fazla bir sekans benzerliği varsa uygulanması gerekir (Tindall ve ark., 2010). Tüm genom sekansı analizleri ise genotip ve fenotip arasındaki bağlantıyı anlamamızda daha güçlü bir şekilde yardımcı olabilmektedir (Gevers ve ark., 2010).

2.2.1.2. Dizi Verisinin Analizi ve Filogeni

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 anlamda bir yere koymak için kullanılır. Moleküler filogenetik analizi ise hızlı DNA dizilenmesinin oluşumu ile daha yaygın hale gelmiştir. Bugüne kadar, filogenetik analiz için yararlı olan büyük veritabanları oluşturulmuştur (Leep ve ark., 2004).

Tindall ve ark. (2010)'na göre 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 nükleotid pozisyonlarında bağımsız değişimin olduğu kabul edilir ve bu sebeple diğer üç bazın birbirine dönüşümünde eşit olasılık vardır.

UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages; Aritmetik ortalamaları kullanan ağırlıksız eş-grup yöntemi) yöntemi OTU (Operational taxonomic units; Üzerinde çalışılan taksonomik birimler) arasındaki benzerlik algoritmasına dayalı bir gruplama yöntemidir. 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 yapmaktadır (Stackebrandt, 2006).

Kümeleme analizine benzer, ultrametrik olmayan, toplumsal ağaçlar oluşturmak için farklı bir algoritma kümesi olan NJ (Neighbor-joining; Komşu katılımı-bağlama) algoritması en popüler olanıdır. (Leep ve ark., 2004). NJ yöntemi genetik mesafe (distance) matriksinden 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).

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).

2.2.2. Kemotaksonomi

Kemotaksonomi ya da kemosistematik bakterileri tiplendirmek, tanımlamak ve sınıflandırmak için hücre bölümlerini ya da tüm organizmayı kullanarak bilgi elde eden bir bilim dalıdır (Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

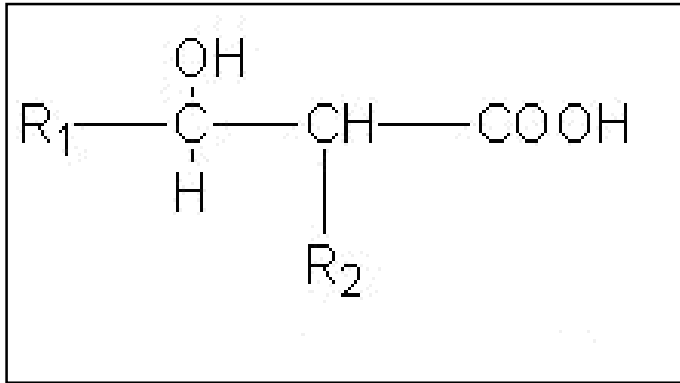
Tipik olarak bir hücrenin kimyasal kompozisyonu fenotipik karakterizasyonunun bir parçasını oluşturmaktadır. Yani bir hücrenin kimyasal kompozisyonu kemotaksonomisi olarak bilinir. Kimyasal karakterizasyonda, peptidoglikan yapısı, solunum lipokinonları, lipidlerin hidrofobik zincirleri, yağ asiti ve 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).

2.2.2.1. Mikolik Asit

Mikolik asitler, yüksek moleküler ağırlıklı, uzun, 2 alkil-3-hidroksi dallanmış zincirli yağ asitleridir (Chun ve Goodfellow, 1995). Kompleks, yüksek karbon birimli, hidroksillenmiş ve dallanmış yapıdadırlar. Mikolik asitler α dallanma gösteren β hidroksillenmiş büyük yağ asitleridir. Ayrıca metoksi, keto, epoksi ester grupları ve siklopropan halkaları gibi çeşitli fonksiyonel gruplar da içerebilirler (Köksal ve Yaman, 2003; <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0006.htm>, 15.06.2011).

Mikolik asit içerikli, kemotip IV hücre duvarına sahip aktinomisetler mycolata adı verilen farklı bir filogenetik sıralama oluştururlar. Mikolik asitler *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Cornebacterium*, *Dietzia*, *Nocardia* ve *Tsukamurella* gibi cinslerin bir çok türünde tanımlayıcı taksonomik karakterlerden biri olmuştur. Çeşitli aktinomisetlerin mycolata yapılarındaki boyut farklılığı bu bakterileri ayırmada değerlendirilen yaygın bir taksonomik araçtır (Barry ve ark., 1998).

Mikolik asitler ilk olarak 1929 yılında R.J Anderson tarafından *M. tuberculosis* suşlarında gösterilmiş ve iyi pürifiye edilemedikleri için sabunlaştırılmayan mum olarak tanımlanmışlardır. Devam eden çalışmalarda Stodola RJ (1939) ve R.J Anderson (1939) *M.tuberculosis* suşlarının balmumu maddesinin daha saf pürifikasyonlarından mikolik asitleri izole ederek isimlendirdiler. Mikolik asitlerin yapısal özellikleri ilk defa 1950 yılında Asselineau J tarafından ayrıntılı şekilde tanımlanarak formülize edildi. (Şekil 2.1) (Köksal ve Yaman, 2003).



ŞEKİL2.1. Mikolik asit yapısı (Asselineau J-1950; Köksal ve Yaman, 2003)

R₁ değişken grup; hidroksi, metoksi, keto veya karboksil grupları gibi diğer oksijenik grupları yapısında bulundurmaktadır (<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0006.htm>, 15.06.2011).

Mikolik asitler *Actinomycetales* ordosuna ait bakteriler için en karakteristik hücre duvar bileşiğidir (Tomiyasu, 1982). *Mycobacteria* cinsinden izole edilen mikolik asitlere eumycolic asit adı verilir ve 60-90 karbon atomundan oluşur (<http://www.cyberlipid.org/fa/acid0006.htm>, 15.06.2011).

Corynebacteria üyeleri corynomycolic asit üretirler. Genellikle 30-36 karbonludurlar ve 16-18 karbon atomu α dallanma gösterir. *Nocardia* cinsi nocardomycolata üretirler. Genellikle 46-60 karbon atomludur. Karbon atomları 0-3 çift bağlıdır ve çoğunlukla 16-18 karbonu α dallanma gösterir. *Rhodococcal* mycolatlar tipik olarak 34-52 karbon uzunluğundadır ve *Nocardia* cinsinden daha kısadır. 12-18 karbon uzunluğunda α dallanma gösterir. *Gordonia* cinsi mycolatası 48-66 karbon atomludur. 1-4 çift bağlıdır ve 16-18 karbonu α dallanma gösterir. *Tsukamurella* cinsi ise 62-78 karbonlu mycolataya sahiptir. 20-22 karbon atomu α dallanma gösterir ve karbon atomları 0-6 çift bağlıdır. Bu cinsin mycolatları yüksek oranda doymamış olduğundan *Mycobacteria* cinsinden daha farklıdır (Barry ve ark., 1998).

Mikolik asit içeren bakterileri, bilindik boyama yöntemleri ve morfolojik özellikleri kullanılarak birbirlerinden ve diğer aktinomisetlerden ayırmak oldukça zordur. Bu yüzden cins düzeyde güvenilir bir ayırım yapabilmek geniş oranda kemotaksonomik tekniklerin uygulanmasına bağlıdır. Kimyasal prosedürlerde ise ilk aşama mikolik asit varlığının araştırılmasıdır. Mikolik asitler yapısal olarak oldukça değişkendirler. *Corynebacteria* üyelerinde bulunan doymuş ve doymamış yağ asitlerinin basit yapısından, *Mycobacteria* üyelerindeki yüksek kompleks karakteristik yapısına kadar değişkenlik gösterirler (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

Mikolik asit esterlerinin varlığını tespit etmek amacıyla piroliz gaz kromatografisi, kitlesel spektrometri, gaz kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri kullanılmaktadır. Her bir mikolik asit içeriğine sahip sınıf için yapılan ince tabaka kromatografisi (TLC) analizleri ve saflaştırma aşamaları bu sınıfların yapısal karakterizasyonunun birçok teknik yardımıyla aydınlatılmasına olanak sağlar. IR, proton ve karbon NMR, elektron etkisi MS, prolitik GS gibi birçok temel kimyasal analizler karakterizasyon çalışmaları için kullanılır. Günümüzde yapılan GC/MS, FAB/MS, MS-MS gibi analitik teknikler ise mikolik asit yapılarının daha detaylı çalışılmasına olanak sağlamaktadır (Barry ve ark., 1998; Goodfellow ve Maldonado, 2006).

2.2.2.2. İnce Kağıt Kromatografisi

Mikolik asitlerin niteliksel değerlendirilmesi Minnikin ve arkadaşları (1975) tarafından bulunan ince tabakalı kromatografi tekniği kullanılarak daha kolay ve daha çabuk bir şekilde yapılmaktadır. Mikolik asit esterleri sabit hareketsiz özellikleri sayesinde ince tabaka kromatografi (TLC) yöntemi kullanılarak teşhis edilebilirler. (Goodfellow ve Maldonado, 2006). Mikolik asitlerin TLC analizi çeşitli mycobacterial türün sınıflandırılmasında önemli bir araçtır (Barry ve ark., 1998).

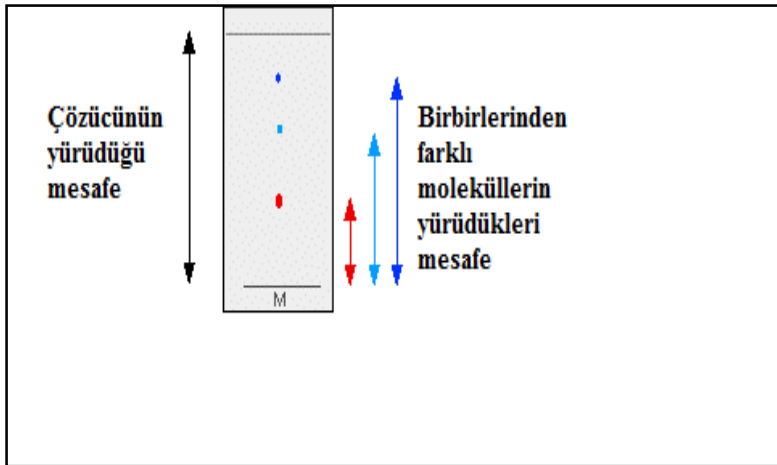
Kromatografi, bir karışımın bileşenlerini, bunlara seçimsel ilgi gösteren iki ya da daha çok evreli sistemler arasındaki farklı göçlere bakarak tanımak, gerektiğinde niceliklerini belirlemek amacıyla yapılan ve ayırma işlemine dayanan analitik yöntemidir. Kromatografi, bir karışımın gözenekli bir ortamda, 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). Kromatografik teknikler hızlı bir şekilde gelişmiş ve kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi ve yüksek basınçlı likit kromatografisinin temel teknik ve prensipleri de belirlenmiştir (Butler, 2005).

1950'lerin sonlarına doğru İnce Tabaka Kromatografisi ("Thin Layer Chromatography"-TLC) basit kalitatif tanımlamalar için hızlı bir teknik olarak laboratuvarlar da kullanılmaya başlanmıştır. 1960'ların ortalarına doğru, TLC kantitatif analiz metodu olarak kabul görmüştür. 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 kullanılır (Butler, 2005; Clark, 2007).

2.2.2.3. Kromatogramın değerlendirilmesi

Her saf maddenin, belli bir sabit fazda ve belli bir çözücü ile ortaya koyacağı davranış hep aynıdır. Yani her saf madde için söz konusu sistemde sabit bir göç noktası vardır. Bu nokta Rf (retention factor) değeri ile ifade edilir. Genellikle mikolik asit gibi aynı renk spot veren moleküller için Rf değeri kullanılırken, diaminopimelik asit gibi diğer aminoasitlerden renk skalası ile kolaylıkla ayrılabilen moleküllerde Rf değeri hesaplamasına ihtiyaç duyulmaz. Aynı şartlar altında deney uygulandığında, her defasında Rf değeri her bir spot için aynı çıkacaktır (Cardinali ve ark., 1995; Kageyama ve ark., 2004; Clark, 2007).

Tabakadan alınan ölçümler genellikle bileşiklerin tanımlanmasını kolaylaştırmak için kullanılır. Çözücü plakanın tepe noktasına yaklaştığında plaka tanktan çıkarılır. Ölçümler çözücünün yer değiştirdiği mesafe ve her bir spotun yol aldığı mesafe olarak hesaplanır (Clark, 2007) (Şekil2.2).



Şekil 2.2. Rf değerinin hesaplanması (Clark, 2007)

$$Rf = \text{molekölün yürüdüğü mesafe} / \text{çözücünün yürüdüğü mesafe}$$

Mycobacteria cinslerinde mikolik asit esterleri birden fazla spot şeklinde, *Tsukamurella* cinsinde 2 spot, *Dietzia*, *Corynebacteria*, *Gordonia*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* cinslerinde tek spot şeklinde görülür. Rf değerleri sayesinde zincir uzunluğu ve yapısı değerlendirilebilir (Goodfellow ve Maldonado, 2006).

2.2.2.4. Mikolik Asit İçerikli Bakterilerin Hücre Duvar Fonksiyonları

Mycobacteria ve ilgili cinslerin hücre duvar yapılarını korumada fizyolojik rol oynayan mikolik asitler özgün karakterlere sahiptirler. α - alkil dallanmaya ek olarak β -hidroksinin işlevsel varlığı stereokimyasal konfigürasyonu sağlamada önemli rol oynar. Hücreye bükölmez bir yapı sağlarlar. Çevrede oluşan çeşitli ozmolariteye karşı turgor basıncı oluştururlar. Bu hücre duvar bariyer fonksiyonlarına ek olarak *Mycobacteria* ve ilgili cinsler, hücre duvarlarındaki mikolik asit içeriğıyle doğrudan ilgili çeşitli özgün karakteristik özelliklere sahiptirler. Bu yapının kazandırdığı en önemli karakteristik özellikleri kimyasal ajanlara direnç sağlaması, hidrofobik antibiyotik yapılara karşı düşük permeabilite ve dehidrasyona direnç göstermesi, makrofaj fagozizomlu evre içerisinde yaşayabilme başarısını göstermesidir (Barry ve ark., 1998).

Mycobacteria cinsli bir grup bakteri hücre duvarlarında geniş boyutta hidrofobik molekülleri geçirmeme özelliğine sahiptirler. Ayrıca glukoz, gliserol gibi besin moleküllerini ve β -laktam gibi antibiyotikleri de geçirmezler. Hücre duvar yapılarındaki mikolik asitlerin bu özellikleri sayesinde hidrofobik çözücülere karşı düşük permeabilite gösterirler. Düşük permeabilite özelliğı gösteren bu bakteriler, asit ile muamele edildikten sonra suda çözülebilen triarilmetan boyası ile boyandığında yapılarının bozulmadığı gözlemlenir. Yani mikolik asit içeriğine sahip olduklarından dolayı asite karşı dirençlidirler (Barry ve ark., 1998).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Test Organizmalarının Seçimi

3.1.1. Toprak Örneklerinin Seçimi ve Kaynakları

Bu çalışmada öncelikli olarak *Actinomycetales* ordosu üyeleri içerisinde mikolik asit pozitif sonuç veren organizmalarla çalışılması planlanmıştır. Bu amaçla farklı habitatlardan toprak izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Habitat olarak ise; Arabistan'daki dağlık alan toprakları ile ülkemizde Giresun, Gümüşhane'deki yayla toprakları, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü ve Samsun'daki kanal toprakları izolasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur (Çizelge 3.1) Toprak örnekleri steril kaplara ve plastik steril poşetlere alınmış ve laboratuvar numaraları verilerek kullanıma kadar +4°C'de korunmuşlardır.

İzolasyon çalışmalarında ilk önce toprak örneklerinin pH ölçümü yapıldı. Her bir toprak örneğinden 20-25gr 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 elektrotlu 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 3.1).

Toprak izolasyonunda farklı 5 besiyeri; Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA, Bower and Hucker, 1930), Tryptone Yeast Glucose Extract Agar vitaminli, Glukoz Yeast Malt Ekstrakt (GYME, Rapp, 1974), Glucose Yeast Malt Estract Agar (GYME) vitaminli ve Humik Asit Vitamin Agar (HV agar, Hayakawa ve Nomomura, 1987) kullanılmıştır.

Farklı 7 lokaliteden elde edilen toprak örneklerine uygulanan dekontaminasyon işlemleri sonucunda dilusyon (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) plakları 2 farklı prosedüre göre (sükroz santrifigasyonlu ve dilüsyon plaka yöntemi) hazırlanmış ve 10-14 günlük inkübasyona bırakılmıştır (Yamamura ve ark., 2003). İnkübasyon sonrasında izole edilen mikroorganizmalar Glikoz Yeast Ekstrakt Agar (GYEA, Gordon ve Mihn, 1962) ortamına aktarılarak saflaştırılma prosedürüne geçilmiştir. Kontaminasyonsuz

mikroorganizmalar tek koloni için GYEA besiyerine aktarılmış ve gelişen bu organizmalar daha sonrasında aynı besiyeri kullanılarak yoğun ekim yapılmıştır.

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 stoklanmıştır (Wellington ve Williams, 1978).

Çizelge 3.1. İzolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin laboratuvar kodu, toprak tipi, lokaliteleri ve pH'ları

Kodu	Toprak Tipi	Lokalitesi	pH
01	Dağlık alan toprağı	Arabistan- Mekke- Arafat Dağı	7,7
02	Dağlık alan toprağı	Arabistan- Mekke- Hira Dağı	7,6
03	Dağlık alan toprağı	Arabistan-Medine- Uhud dağı	7,5
04	Göl kenarı açık alan toprağı	Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü	4,4
05	Yayla toprağı	Giresun-Çomoluk	6,9
06	Yayla toprağı	Gümüşhane-Şiran	6,4
07	Bataklık bölge toprağı (su içinden)	Samsun-Ondokuz Mayıs	6,8

3.1.2. Organizmaların İzolasyonu

3.1.2.1.Dilüsyon Plaka Yöntemi

Her bir toprak örneğinden 20-25 gr, 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 bulunan 20 ml'lik şişelere aktarıldı.

10^{-1} 'lik dilüsyonların her biri, toprak kolloidlerine tutunmuş olan mikroorganizma sporlarını ve miselyumlarını toprak kolloidlerinden ayırmak için 30 dakika boyunca

alkalandı. 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 özeltisi 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:Gilson, Anachem Ltd.) ile alınan çözelti (0.2 ml), cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve rifampicin ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilik asit (10 mg ml^{-1}) ilaveli, tripton yeast ekstrakt agar (Bower and Hucker, 1930), tripton yeast ekstrakt vitaminli agar , glukoz yeast ekstrakt malt agar (Rapp, 1974), glukoz yeast ekstrakt malt vitaminli agar ve humik asit vitamin agar (Hayakawa ve Nonomura, 1987) yüzeyine inoküle edildi. Her bir dilüsyon için 2 plak hazırlandı. İnokulasyonlu plaklar, O₂ 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) kullanılmıştır.

3.1.2.2. Sükroz Santrifüstasyon Yöntemi

Dilüsyon plaka yönteminde bahsedilen toprak kolloidlerinden mikroorganizmaların spor ve miselyumlarını ayırmak amacıyla uygulanan çalkalama işlemi ile dekontaminasyon işlemleri ilk etapta uygulandı. 10^{-2} dilüsyonunu hazırlamak için, içerisinde steril 9 ml %20'lik sükroz çözeltisi bulunan tüplere vorteks karıştırıcı (Fisons Scientific Apparatus Ltd., Loughborough, Leicestershire, England, UK) ile karıştırılan 10^{-1} dilüsyonundan, otomatik pipet (P1000:Gilson, Anachem Ltd., Luton Bedfordshire, England, England, UK) ile alınan 1 ml toprak çözeltisi ilave edildi (Abbas, 2006).

Ardışık izolasyonda spor süspansiyonunun 1 ml'si sükroz 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 işleminde 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^{-2} ve 10^{-3} ve 10^{-4} lük dilüsyonlardan otomatik pipet (P200:Gilson, Anachem Ltd.) ile alınan çözeltiler (0.2 ml), cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve rifampicin ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve nalidilik asit (10 mg ml^{-1}) ilaveli tripton yeast ekstrakt agar (Bower and Hucker, 1930), tripton yeast ekstrakt vitaminli agar, glukoz yeast ekstrakt malt agar (Rapp, 1974), glukoz yeast ekstrakt malt vitaminli agar ve humik asit vitamin agar (HV agar (Hayakawa ve Nonomura, 1987) 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) kullanılmıştır.

3.1.3. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması

Hazırlanan bu beş çeşit agarda 30°C 'de 10 gün inkübasyona bırakılan izolasyon plakları *Nocardia* ve benzeri kolonileri belirleyebilmek için gözle ve binoküler mikroskopla ($\times 400$ büyütme; Nikon Kogaku K. K., Tokyo, Japan) araştırıldı. Belirlenen *Nocardia* ve benzeri koloniler steril kürdanlar kullanılarak cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ilaveli glukoz yeast extract agar (GYEA; Gordon ve Mihm, 1962) yüzeyine transfer edildi. 30°C 'de 14 günlük inkübasyon sonrasında transferi yapılmış plaklardan saf izolatlar elde edilmişlerdir.

3.1.4. İzolatların Stoklanması

Test mikroorganizmaları; toprak izolasyonu sonunda farklı toprak örneklerinden izole edilmiş 165 test suşu içerisinde mikolik asit pozitif sonuç verenler seçilerek belirlenmiştir. Bunların içerisinde mikolik asit pozitif sonucu alınarak belirlenen 18 organizmanın ve diğer organizmaların daha sonradan kullanılmak üzere stoklanma aşamasına geçilmiştir.

165 test suşu cycloheximide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve rifampisin ($0,5\mu\text{g ml}^{-1}$) ilaveli Glucose- Yeast Extrat Agar (GYEA, Gordon ve Mihm, 1962) üzerine yoğunlaştırılarak ekildi ve 30°C 'de ve 14 gün boyunca inkübe edildi .

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

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 Ekstract 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, 1984) degrede edilerek mikolik asit metil esterleri (MAME) elde edildi. Daha sonra TLC yöntemi kullanılarak, standart olarak da numaralı *Nocardia* tip suşuyla birlikte (N1111^T; *Nocardia flavorosea*) mikolik asit içeren toprak izolatlarının mikolik asit spotları, alüminyum destekli silika jellerde sarı arka planda mavi/siyah noktalar olarak görüntülendi.

3.2.2. Mikolik Asit Estraksiyonu

Test suşlarından elde edilen biyomas örnekleri asit metanolizis yöntemiyle parçalandı (Minnikin ve ark, 1984). Elde edilen biyomaslar (~50mg) 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 heksanla 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) 30-50 µl petrol eter (60-80°C) içinde çözüldü. 10x20 cm ebatındaki alüminyum destekli silika jel tabakalarına (Merck 5554FRG) otomatik pipet kullanılarak çözülmüş ekstraktan 20-30 µl emdirildi ve tabakalar petrol eter-aseton (95:5 v/v) içinde yürütüldü, ardından oda sıcaklığında kurutuldu.

Tabakaların üzerine etanolde molibde fosforik asit solusyonu (50g 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.

3.3. DNA İzolasyonu ve DNA Miktar Tayini

3.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Pithcer ve ark. (1989) tarafından tanımlanan “Guanidin Thiosiyanat DNA İzolasyon” metodu modifiye edilerek test organizmalarının DNA izolasyonu için kullanıldı. Metoda ilave olarak hücreler proteinaz K (2 mg/ml ; AppliChem) ile muamele edildi.

3.3.2. DNA' nın Ekstraksiyonu

Test organizmaları, cycloheximide ($50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) ilaveli Trypton-Glukoz-Yeast Extract kültür ortamında 28°C 'de 7 gün süre ile geliştirildi. İnkübasyon sonrası, her bir izolattan bir öze dolusu kültür alınarak besiyeri isteğine göre 30 ml Trypton-Yeast-Glikoz extract broth ve Glukoz-Yeast Ekstrakt broth ve Glucose-Malt-Yeast Extract broth bulunan 50 ml'lik erlenlere transfer edildi. Kültürler çalkalamalı inkübatörde 28°C 'de 160 rpm (dakikadaki dönüş sayısı)'de 3-10 gün süre ile geliştirildi. Saflıkları kontrol edildikten sonra steril eppendorflara kültürlerden 1.5 ml ilave edildi ve 13 000 rpm 'de 10 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılıp DDH_2O 'da (Double distile su) 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 Aşamaları

1. Steril DDH₂O ile yıkanan hücre pelleti üzerine 100 µl TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 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 guanidine thiocyanate karışıma 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. İzo-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 µl proteinaz K eklendi ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi.
10. 10 µl, 8 M LiCl eklendikten sonra ilave edilen tuz ile karışımın sağlanması için otomatik pipet ile solüsyondan birkaç defa çekilip bırakıldı.
11. 130 µl 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 µl 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 µl %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 µl DDH₂O ilave edilerek süspanse edildi ve -20°C'de gereksinim duyulana kadar stoklandı.

3.3.3. 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.

DNA örneklerini görüntülemek amacıyla 35 ml 1xTBE içerisinde %1 (w/v)'lik, 4 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilaveli agaroz jel hazırlandı. Elektroforez tablası çalışma alanı üzerinde zemini düz olan bir yere bırakıldı. Hemen sonra tablaya hava kabarcığı oluşmayacak şekilde agaroz jel döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve içinde 1xTBE, pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

Tarağın oluşturduğu hollere her bir DNA örneğinden 3 µl alınarak jel yükleme tamponu (brom fenol mavisi) ile birlikte yüklendi.

Agaroz jel 75 voltta 30 dakika elektroforez edildi ve UV transillüminatörde kırmızı bantlar şeklinde gözlemlendi ve görüntüleme sistemi (GeneGenius, Syngene, Bio Imaging Systems, UK) kullanılarak fotoğraflandı ve kaydedildi.

3.3.4. 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.

Uygulama

1. Kuvartz küvetten birinin içerisine 995 μ l DDH₂O ve 5 μ l DNA örneği ilave edildi. Diğer kuvartz küvet içerisine 1000 μ l DDH₂O transfer edildi ve bu küvet, kör çözelti olarak kullanıldı.
2. Çift zincirli DNA'nın miktar tayini aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \text{ (Sambrook ve ark., 2001)}$$

(Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50 μ g/ml'ye karşılık geldiği bilinmektedir.)

3. DNA örneğinin saflık derecesi 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran (A_{260} / A_{280}) hesaplanarak belirlendi. İzole edilen saf DNA'da A_{260} / A_{280} oranı 1.8 olmalıdır (Sambrook ve ark., 2001).

3.3.5. 16S rDNA'nın PCR Çoğaltması

Test izolatlarının 16S rDNA gen bölgesi 27f ve 1525r primerleri (27f:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1525R:5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlex, UK)'da amplifiye edildi.

İşlem

1. dNTP mix, 27f ve 1525r primer solüsyonları (İnvitrogen), MgCl₂ ve 10 x Taq tampon buz üzerinde çözüldü.
2. 16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan bir örnek için 50 µl ölçüdeki bir reaksiyon karışımı Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. 16S rDNA gen bölgesinin PCR koşullarında çoğaltılmasında kullanılan reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Stok Yoğunluğu	Miktar (µl)
Taq Tamponu (Sigma)	10X	5
MgCl ₂	25mM	3
dNTP _{mix}	25 mM	1
27f primer (İnvitrogen)	20 pmol	2.5
1525r primer (İnvitrogen)	20 pmol	2.5
Taq Polimeraz (Sigma)	5 U/µl	0.5
Kalıp DNA	50-100 ng	1
DDH ₂ O		34.5

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

4. PCR reaksiyonu Çizelge 3.3’deki şartlarda başlatıldı.

Çizelge 3.3. 16S rDNA gen bölgesi amplifikasyonu için optimize edilmiş PCR sıcaklık döngü düzeni

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	55	2	35
Uzama	72	3	35
Son uzama	72	8	1
Reaksiyon sonrası saklama	4		

5. %1’lik kontrol agarozunda (Agaroz Serva) 3 µl PCR ürünü DNA markör ile yürütülerek hedef bölgenin varlığı tesbit edildi.

3.3.6. 16S rDNA Sekans Verilerinin Eldesi, Analizi ve Filogenetik Dendogramların Oluşturulması

PCR amplifikasyon ürünleri elde edildikten sonra çalışma izolatlarımızın 16S gen bölgesinin baz dizi analizi MacroGen firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA gen bölgesinin baz dizilimi, farklı 3 oligonükleotit primeri (Çizelge 3.4) ile MacroGen firması tarafından ABI 3730XL automated sequences cihazı ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. PCR amplifikasyonu ve 16S rDNA 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	AGAGTTTGATC MTGGCTCAG	20	8	27	√		Lane, 1991
800r	TACCAGGGTAT CTAATCC	18	800	782		√	Chun, 1995
MG3f	CAGCAGCCGC GGTAATAC	18	520	536		√	Kageyama ve ark., 2004
MG5f	AAACTCAAAG GAATTGACGG	20	907	926		√	Chun, 1995
1525r	AAGGAGGTGW TCCARCC	17	1544	1525	√		Lane, 1991

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 gelmektedir.

AB1 formatındaki dosyalar fasta formatına dönüştürüldükten sonra Sequencer 4.10.1 ve Mega 4.1 (Kumar, 2008), programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak üç farklı primerden (MG3f, MG5f ve 800r) elde edilen diziler birleştirilmiş ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu ve birkaç duplike baz) yoğun olduğu genellikle sekans sonları veri setinden uzaklaştırılarak 16S rDNA gen bölgesinin baz dizilimi elde edilmiştir. Farklı primerler kullanılarak hazırlanan 16S rDNA gen dizileri, filogenetik ilişkilerin belirlenebilmesi amacıyla analizlerde kullanılmıştır.

Ez Taxon Server 2.1 (Chun ve ark., 2007) kullanılarak test izolatlarına en yakın akraba olan türlerin 16S rDNA gen dizileri NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Silva; <http://www.arb-silva.de> ve EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk> adreslerinden tek tek indirilerek elde edilmiştir. 16S rDNA nükleotid baz dizileri ile test örneklerinin baz dizileri MEGA 4.1 (Kumar, 2008) programı kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak dizilenmiştir. Bu diziler ve test organizma dizilerinin alignment işlemleri Mega 4.1 programlarında birbirleriyle hizalandırılarak gerçekleştirildikten sonra aynı programda, filogenik analiz bölümüne geçilmiştir. 16S rDNA baz dizilerinin çoklu hizalanması sonrasında filogenetik soyağaçları neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987), algoritması kullanılarak oluşturulmuştur. Neighbour-joining algoritması için filogenik uzaklık matriksi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirilmiştir (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak Mega 4.1. (Kumar, 2008) paket programında elde edilmiştir.

Dış grup olarak *Dietzia* cinsi için *Tsukamurella inchoensis* ve *Rhodococcus coprophilus* türleri, *Nocardia* cinsi için ise *Corynebacterium resistens* türü analizler için kullanılmıştır.

3.4. Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Mikolik asit pozitif sonuç veren izolatların antimikrobiyal aktivelerini belirlemek için 8 patojen test organizmanın gelişmelerini inhibe etme kabiliyetlerine göre incelenmiştir (Çizelge 3.5). Patojen test organizmaları gram (+), gram (-), mantar ve maya örneklerini oluşturacak şekilde seçilmiştir. Test suşlarının kültür ortamına inokülasyonu, otomatik pipet vasıtasıyla nokta ekim yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Her bir izolat için hazırlanan spor solüsyonlarından 7 µl alınarak antibiyotik ilavesiz Sensitest Agar (Ericsson ve Sherris, 1971) yüzeyine 5'li gruplar halinde nokta ekim yoluyla inoküle edilmiştir. Gelişen koloniler üzerine, otomatik pipet aracılığıyla 3-5 ml

'lik kloroform döküldü ve kloroformun buharlaşması için petri plaklarının kapağı, 45 dakika boyunca yarı açık bir şekilde tutuldu.

Daha sonra, her biri steril %0.5'lik nutrient agar (Williams ve ark, 1983) içerisinde 3 gün süreyle gelişen patojen test organizmaları yayma plak yöntemiyle inoküle edildi. İnokülasyonlu plaklar, 28°C 'de 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Koloni etrafında, o patojene karşı bir inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığına bakılmıştır.

Çizelge 3.5. Antimikrobiyal Aktivite Testi İçin Kullanılan Patojen Test Organizmaları

Suş No	Suşun Adı
ATCC 10231	<i>Candida albicans</i>
NRRL B-1018	<i>Micrococcus luteus</i>
NRRL B-123	<i>Proteus vulgaris</i>
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
İzolat	<i>Aspergillus niger</i>
NRRL B-209	<i>Bacillus subtilis</i>
ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Test suşlarının geliştirildiği besiyerlerinin içerikleri, uzun süreli saklandığı stok solüsyonunun hazırlanışı, DNA izolasyonu ve kontrolü, mikolik asit ve antimikrobiyal aktivite testleri için gerekli olan tüm kimyasallar, Ek-A ve Ek-B'de, ayrıca bazı organizmaların petri görüntüleri ise Ek-C'de 'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Mikolik Asit

Toprak izolasyonu sonucu morfolojik olarak *Nocardia* ve ilgili cinslere benzeyen suşlara mikolik asit testleri uygulanmıştır. Bu testlerin sonunda mikolik asit metil esterleri TLC yöntemiyle görünür hale getirilerek mikolik asit içerikli organizmalar tez çalışmasında incelenmek üzere belirlenmiştir. Mikolik asit pozitif sonuç veren test suşları ve kaynakları Çizelge 4.1’de verilmektedir.

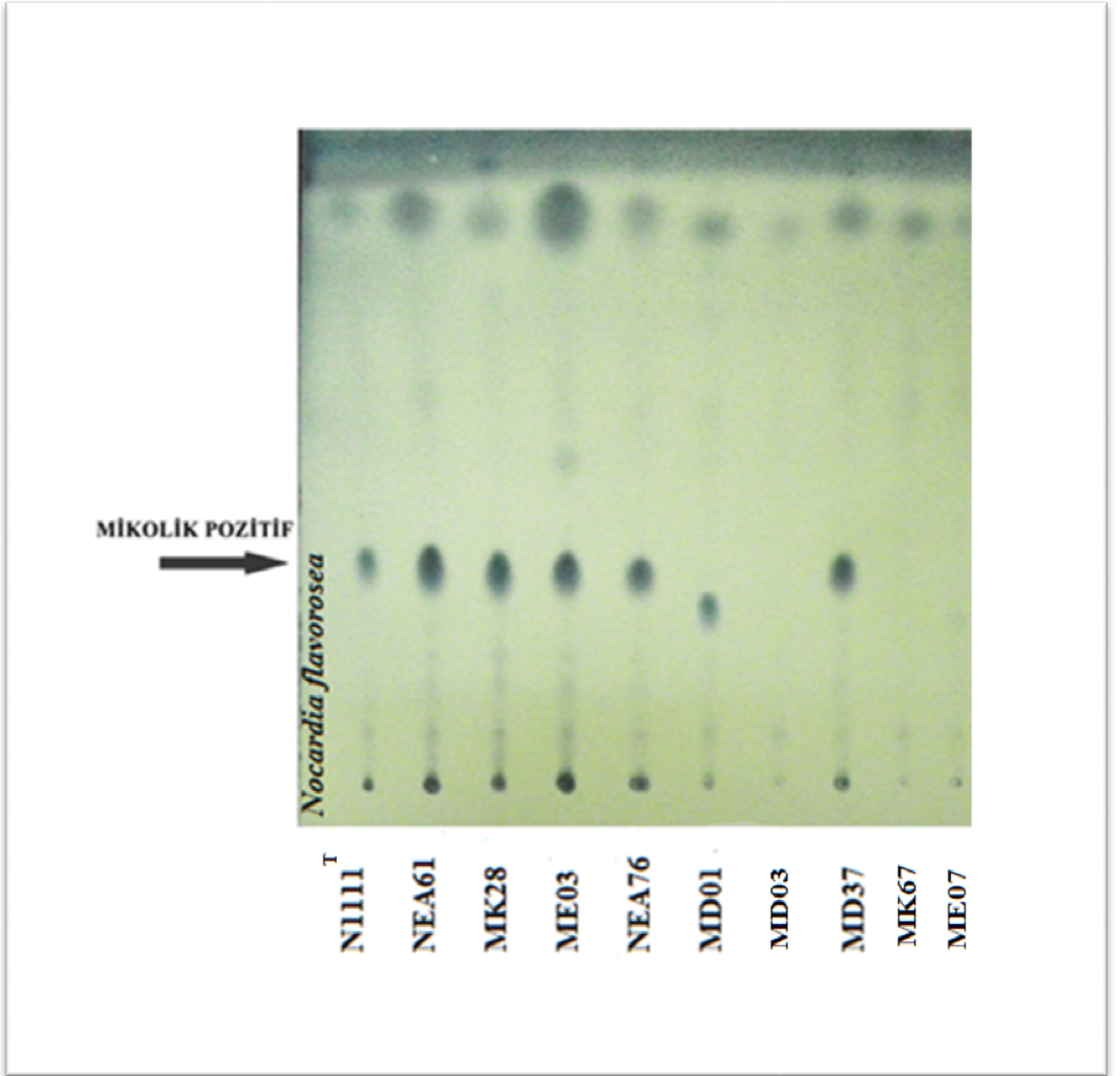
Çizelge 4.1. Test Suşları ve Kaynakları

Suş No	Suşun Adı	Kaynakça
G13	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Orman toprağı, Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü
GRS29	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Yayla toprağı, Giresun-Çomoluk
GS21	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Yayla toprağı, Gümüşhane-Şiran
GS96	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Yayla toprağı, Gümüşhane-Şiran
KA35	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Kanal toprağı, Samsun-Ondokuz Mayıs
KA138	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Kanal toprağı, Samsun-Ondokuz Mayıs
MD01	<i>Dietzia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Medine- Uhud dağı
MD37	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Medine- Uhud dağı
MD70	<i>Dietzia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Medine- Uhud dağı

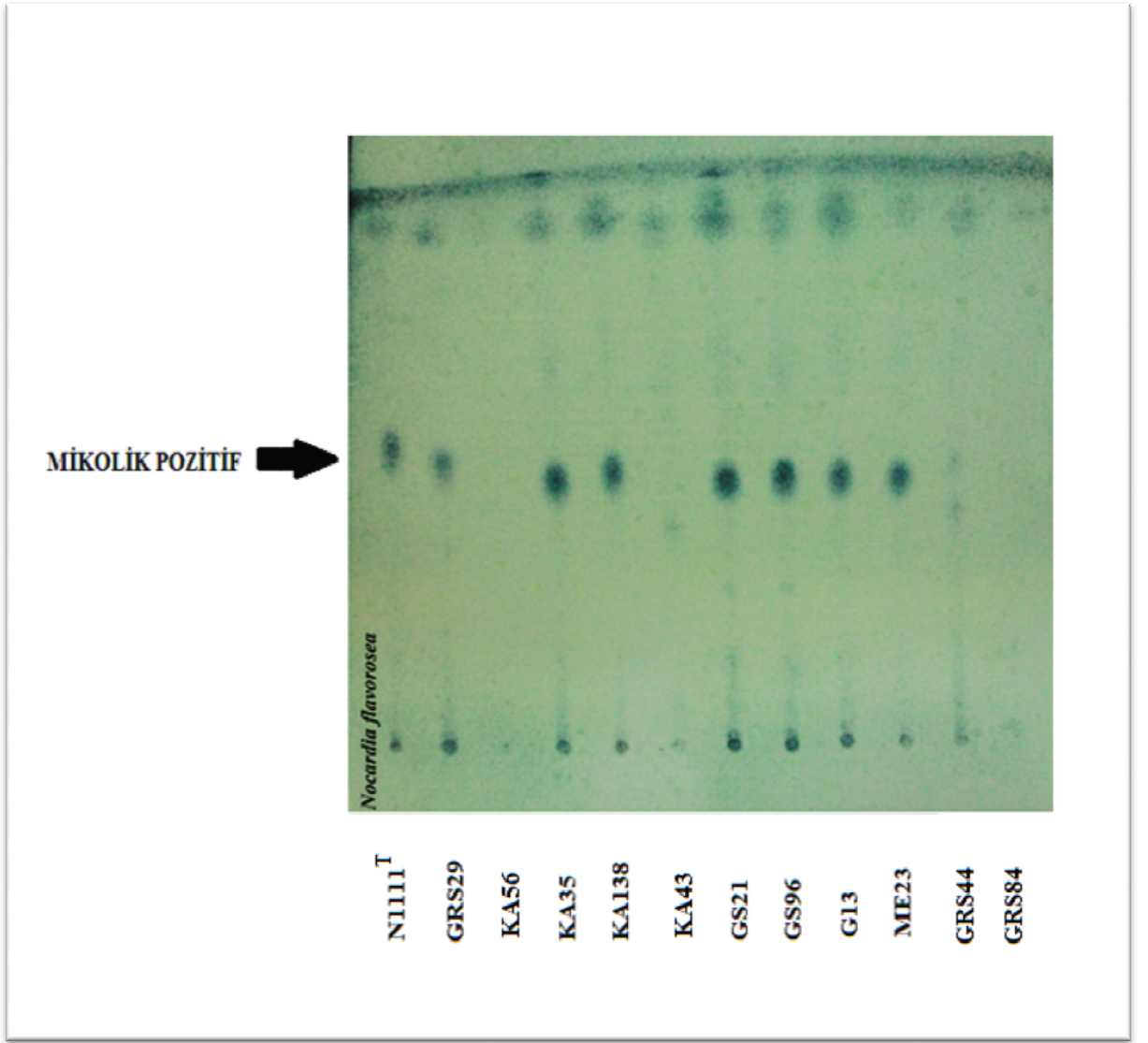
Çizelge 4.1. (devamı)

Suş No	Suşun Adı	Kaynakça
ME03	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Arafat dağı
ME23	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Arafat dağı
MK14	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Hira dağı
MK22	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Hira dağı
MK26	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Hira dağı
MK28	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Hira dağı
MK32	<i>Nocardia sp.</i>	T.Keskin; Dağlık alan toprağı, Arabistan-Mekke-Hira dağı
NEA61	<i>Nocardia sp.</i>	E.Aymen Peker; Tarla toprağı, Balıkesir- Altınoluk
NEA76	<i>Nocardia sp.</i>	E.Aymen Peker; Dağlık Alan Orman toprağı, Muğla

Mikolik asit pozitif sonuç veren bazı organizmaların ince tabaka kromotografik görüntüsü ve Rf değerleri Şekil 4.1 ve 4.2 ile, Çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Mikolik asit metil esterlerinin ince tabaka kromatografi görüntüsü



Şekil 4.2. Mikolik asit metil esterlerinin ince tabaka kromatografi görüntüsü

Çizelge 4.2. Mikolik asit pozitif sonuç veren mikroorganizma ekstraktlarının tek boyutlu ince tabaka kromatografisine göre Rf Değerleri

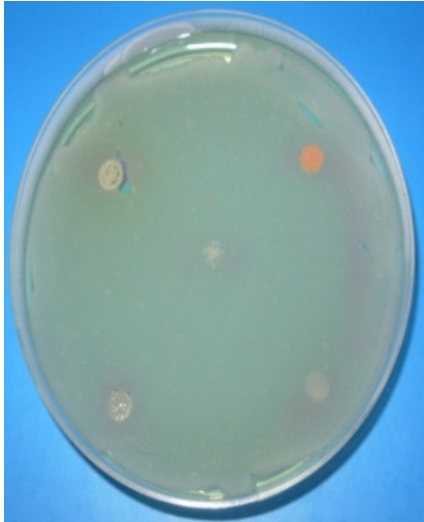
Suş No	Rf Değeri
G13	0,531
GRS29	0,472
GS21	0,514
GS96	0,536
KA35	0,510
KA138	0,521
MD01	0,372

Çizelge 4.2. (devamı)

Suş No	Rf Değeri
MD37	0,412
MD70	0,360
ME03	0,453
ME23	0,482
MK14	0,456
MK22	0,460
MK26	0,389
MK28	0,490
MK32	0,398
NEA61	0,440
NEA76	0,406

4.2. Antimikrobiyal Aktivite Testi

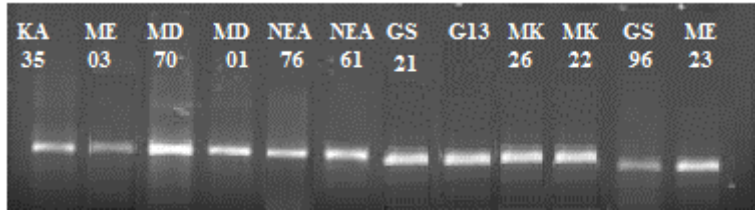
Mikolik asit pozitif sonuç veren mikroorganizmaların yeni biyoaktif metabolit içerip içermediğini ölçmek amacıyla antimikrobiyal aktivite testi uygulanmıştır. Bu isolatlar 8 patojene (Çizelge 3.5) karşı test edilmiş ve inhibisyon zon çapı ölçülmek üzere inkübasyona bırakılmıştır. Ancak elde edilen verilere göre bu isolatların test patojenlerine karşı bir zon çapı oluşturamadığı görülmüştür (Şekil 4.3).

A. *Aspergillus niger***B. *Candida albicans*****C. *Escherichia coli*****D. *Bacillus subtilis***

Şekil 4.3. Mikolik asit içerikli bazı izolatların bazı test patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite test sonuç görüntüleri

4.3. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforez Yöntemiyle DNA'ların Görüntülenmesi

Mikolik asit metil ester (MAMEs) içeriğine sahip olan mikroorganizmalar seçilerek, bu organizmaların genomik DNA'ları Pitcher ve ark. (1989) tarafından tanımlanan Guanidin thiosiyanat DNA izolasyonu metodu ile elde edilmiş ve DNA kontrolü %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. DNA izolasyonu yapılan bazı izolatların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

4.4. DNA Miktar Tayini

DNA'sı izole edilen tüm test organizmalarının DNA miktar tayinleri, UV spektrofotometre'de 260 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Sulandırma oranı} \times 50 \text{ (Sambrook ve ark., 1989).}$$

DNA örneğinin saflık derecesi 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran (A_{260} / A_{280}) hesaplanarak belirlenmiştir. İzole edilen saf DNA'da A_{260} / A_{280} oranı 1.8 olmalıdır (Sambrook ve ark., 2001).

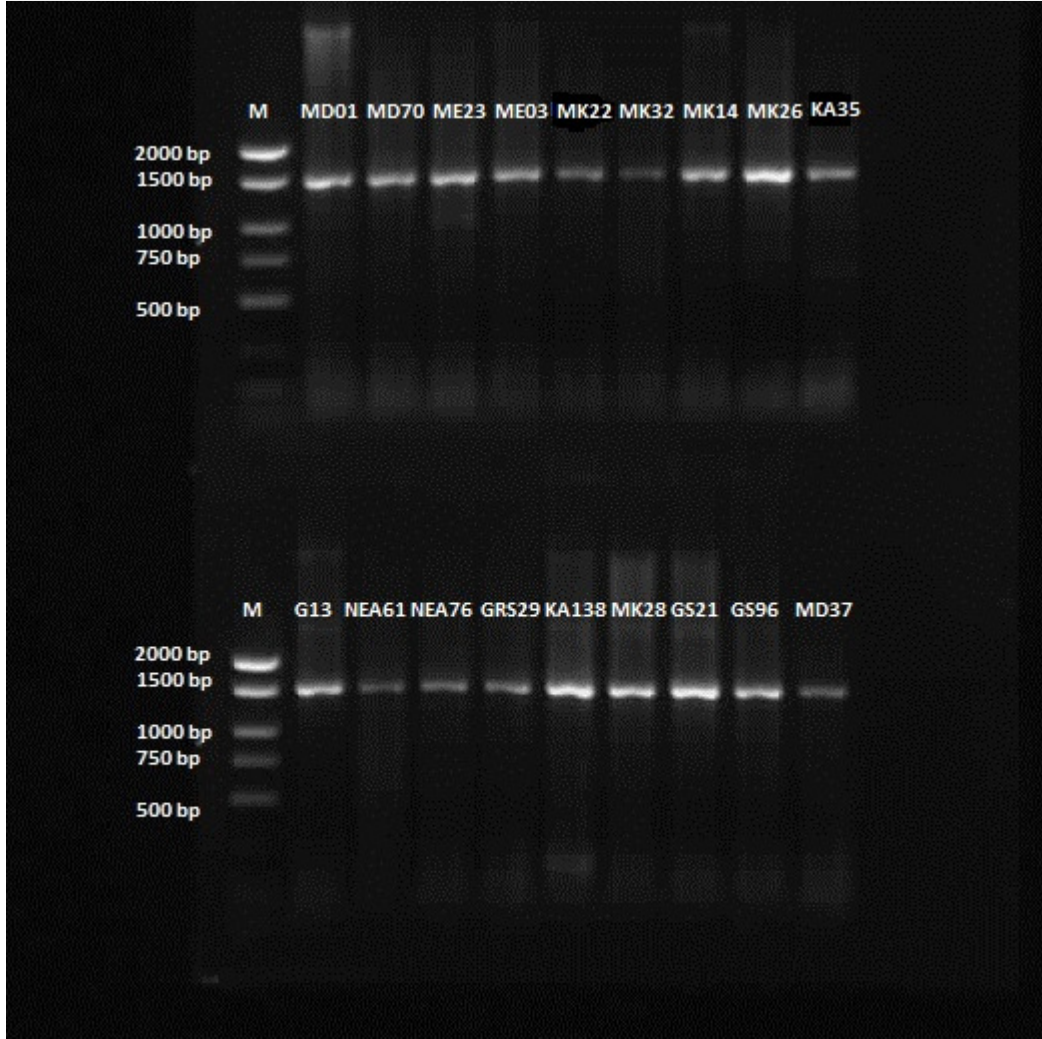
Test organizmalarının DNA miktar tayini ve saflık derecelerinin sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Test mikroorganizmalarının DNA miktar tayini ve saflık dereceleri

Test Org. No.	260 nm	280 nm	260/280 nm	DNA Miktarı (µg/ml)
G13	0.060	0.034	1.76	600
GRS29	0.039	0.021	1.85	390
GS21	0.030	0.017	1.70	300
GS96	0.021	0.012	1.75	210
KA35	0.064	0.037	1.72	640
KA138	0.075	0.042	1.78	750
MD01	0.014	0.008	1.75	140
MD37	0.012	0.007	1.71	120
MD70	0.049	0.028	1.75	490
ME03	0.009	0.005	1.8	90
ME23	0.038	0.022	1.70	380
MK14	0.045	0.025	1.80	450
MK22	0.065	0,036	1.80	650
MK26	0.024	0,013	1.75	137
MK28	0,032	0,017	1,78	179
MK32	0.059	0.033	1.78	590
NEA61	0.041	0.024	1.7	241
NEA76	0.052	0.029	1.79	520

4.5. 16S rDNA'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 (35 ml 1xTBE tampon, 0.35 gr 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 4.5'de verilmiştir. Jelde görüldüğü üzere 1500 baz çifti (bp) uzunluğunda tek bir bant elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı lokalitelerden izole edilmiş mikolik asit içerikli mikroorganizmaların 16S rDNA gen bölgesinin PCR metodu ile amplifikasyonu. M; markör.

4.6. 16S rDNA Sekans Verilerinin Analizi ve Filogenetik Dendogram Oluşturulması

Çalışma izolatları ve ilgili tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenik uzaklık modeli kullanılarak oluşturulan ve *Dietzia* cinsi içerisinde konumlanan filogenetik ağaç Şekil 4.6’da verilmektedir. Bu analizlere göre MD01 ve MD70 numaralı izolatlar %99,80 ve 2 nükleotit (nt) farklılığı ile *Dietzia cinnamea* türü ile en yakın benzerlik göstermektedirler. Ayrıca *Dietzia* cinsine ait test organizmaları ve bazı tanımlanmış *Dietzia* türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çalışma izolatları ve ilgili tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenik uzaklık modeli kullanılarak oluşturulan ve *Nocardia* cinsi içerisinde konumlanan filogenetik ağaç Şekil 4.7’de verilmektedir. Bu analizlere göre hazırlanan filogenetik ağaca baktığımızda çalışma izolatlarımızın ilgili tip türleri arasında 6 farklı kümede konumlandıkları görülmektedir. Ayrıca *Nocardia* cinsine ait test organizmaları ve bazı tanımlanmış *Nocardia* türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

GS21 %99,70 benzerlik oranı ve 3 nt farklılığı ile *Nocardia rhamnosiphila* türü ile filogenetik ağaçta en yakın izolat olmuştur. GS96 izolatı %99,70 benzerlik oranı 3 nt farklılığıyla *Nocardia flavorosea* türüyle yakın ilişkilidir. Benzer şekilde NEA61, NEA76, MK32, MK28 4 nt farklılığı ve %99,60 benzerlik oranıyla *Nocardia flavorosea* türüyle yakın ilişkili oldukları görülmektedir. MD37 ise 7 nt farklılığı ile bu izolatlardan farklılaşmıştır.

G13 numaralı çalışma izolatı ise 1nt farklılığı ve %99,90 benzerlik oranı ile *Nocardia jinanensis* türünün en yakın izolatı olduğu görülmektedir.

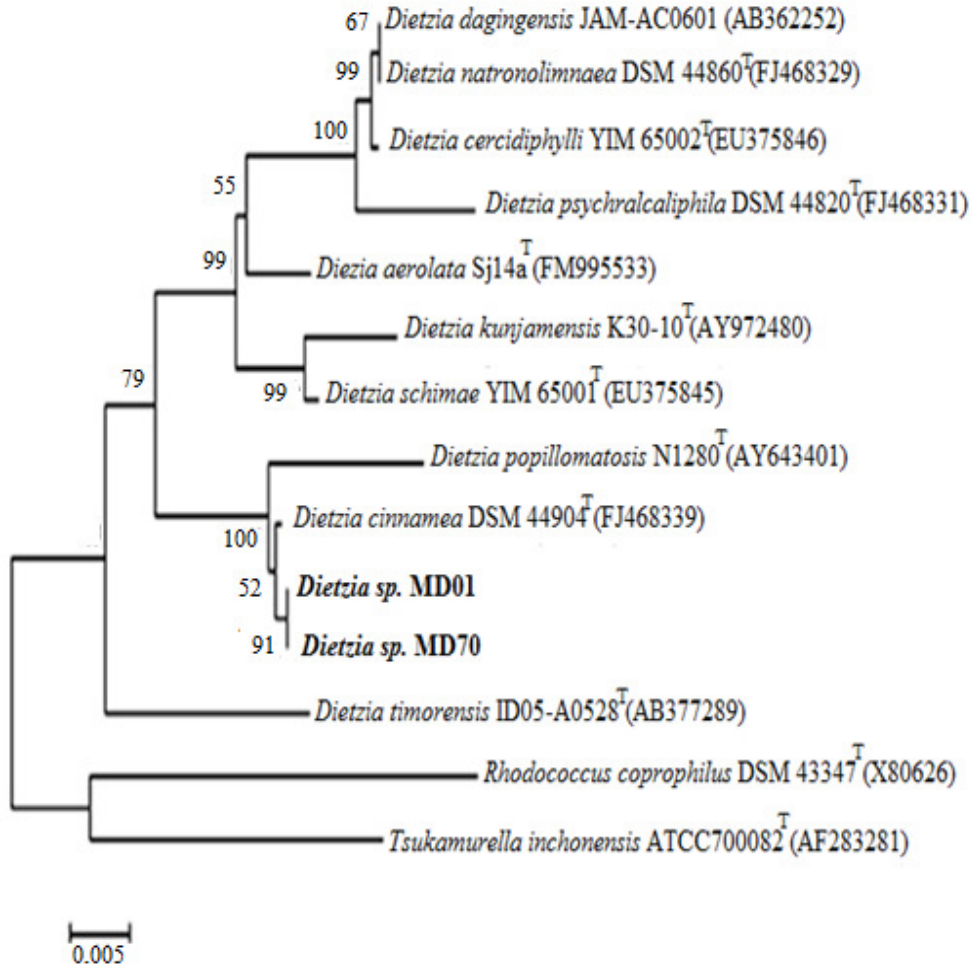
MK14, MK22 VE MK26 numaralı çalışma izolatları *Nocardia cyriacigeorgica* ile 16S rDNA gen bölgesi bakımından %100 benzerlik göstererek filogenetik soy ağacında ayrı bir küme oluşturmuşlardır. GRS29 numaralı çalışma izolatı ise 1 nt farklılığı ile bu izolatlardan ayrılmaktadır.

Nocardia cinsine ait izolatlarımız içerisinde KA138 numaralı izolat 3 nt farklılığı ve %99,70 benzerlik oranı ile *Nocardia abscessus* türüne en yakın izolat olduğu görülmektedir.

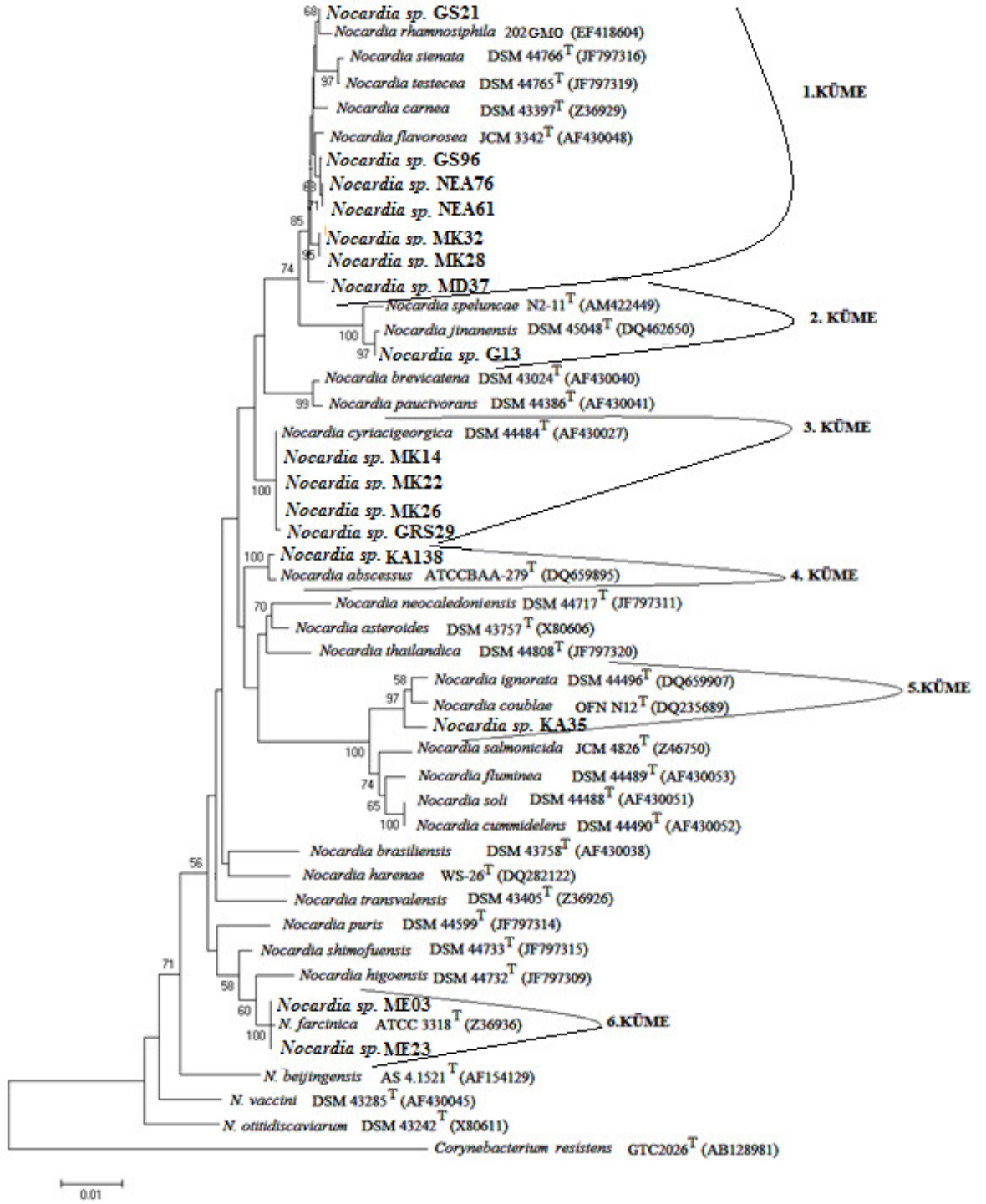
KA35 numaralı izolat 8 nt farklılığı ve %99.30 benzerlikle *N. coubleae* ile birlikte farklı bir dal oluşturarak ayrılmıştır.

ME03 VE ME23 numaralı izolatlar %99,90 benzerlik oranı ve 1nt farklılığı ile *Nocardia farcinica* türüne filogenetik soy ağacında yakın konumlanmışlardır.

Sonuç olarak *Nocardia* cinsine ait izolatlar içerisinde en büyük farklılığı MD37 ve KA35 numaralı izolatlar göstermiştir.



Şekil 4.6. *Dietzia* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda %50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *Rhodococcus coprophilus* ve *Tsukamurella inchoensis* türleri kullanılmıştır.



Şekil 4.7. *Nocardia* cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizi analizine dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soyağacı (nodlarda %50'nin üzerinde bootsrap değerleri verilmiştir). Dış grup olarak *Corynebacterium resistens* türü kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. *Dietzia* cinsine ait test izolatları ve bu cinse ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	<i>Tsukamurella inchoensis</i>	<i>Dietzia aerolata</i>	<i>Dietzia cercidiphylli</i>	<i>Dietzia cinnamea</i>	<i>Dietzia dagingsensis</i>	<i>Dietzia kunjamensis</i>	<i>Dietzia natronolimnaea</i>	<i>Dietzia papillomatosus</i>	<i>Dietzia psychralcaliphila</i>	<i>Dietzia schimae</i>	<i>Dietzia timorensis</i>	MD01	MD70
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	-												80	80
<i>Tsukamurella inchoensis</i>	94,4	-	70	77	68	77	76	77	80	87	68	73	70	70
<i>Dietzia aerolata</i>	94	94,6	-	22	33	22	27	22	45	32	17	45	31	31
<i>Dietzia cercidiphylli</i>	93,4	94,1	98,3	-	39	2	33	2	53	16	25	55	37	37
<i>Dietzia cinnamea</i>	93,7	94,8	97,5	97	-	39	41	39	18	51	33	40	2	2
<i>Dietzia dagingsensis</i>	93,4	94,1	98,3	99,8	97	-	33	0	53	16	25	55	37	37
<i>Dietzia kunjamensis</i>	93,6	94,2	97,9	97,5	96,8	97,5	-	33	55	43	12	60	39	39
<i>Dietzia natronolimnaea</i>	93,4	94,1	98,3	99,8	97	100	97,5	-	53	16	25	55	37	37
<i>Dietzia papillomatosus</i>	92,7	93,9	96,5	95,9	98,6	95,9	95,8	95,9	-	63	47	57	20	20
<i>Dietzia psychralcaliphila</i>	92,8	93,4	97,5	98,7	96,1	98,7	96,7	98,7	95,2	-	35	64	49	49
<i>Dietzia schimae</i>	94,2	94,8	98,7	98,1	97,5	98,1	99	98,1	96,4	97,3	-	52	31	31
<i>Dietzia timorensis</i>	93,9	94,4	96,5	95,8	96,9	95,8	95,4	95,8	95,6	95,1	96	-	40	40
MD01	93,9	94,6	97,6	97,1	99,8	97,1	97	97,1	98,4	96,2	97,6	96,9	-	0
MD70	93,9	94,6	97,6	97,1	99,8	97,1	97	97,1	98,4	96,2	97,6	96,9	100	-

Çizelge 4.5. *Nocardia* cinsine ait test izolatları ve bu cinsle ait tanımlanmış tip türleri arasındaki 16S rDNA sekansına bağlı yüzde benzerlik değerleri ve nükleotit sayı farklılıkları

	<i>N. abscessus</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. beijingensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brevicatena</i>	<i>N. carnaria</i>	<i>N. coublae</i>	<i>N. cummideiens</i>	<i>N. cyathigeorgica</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>N. flavovasea</i>	<i>N. fluminea</i>	<i>N. harenae</i>	<i>N. higoensis</i>	<i>N. ignorata</i>	<i>N. jinaneensis</i>	<i>N. neocaledonia</i>	<i>N. nitidiscaviarum</i>	<i>N. paucivorans</i>	<i>N. puris</i>	<i>N. rhamnosphila</i>	<i>N. salmonicida</i>	<i>N. shimofuensis</i>	<i>N. stenata</i>	<i>N. soli</i>	<i>N. spelunca</i>	<i>N. testacea</i>	<i>N. thailandica</i>	<i>N. transvalensis</i>	<i>N. vacinii</i>	G13	GRS29	G821	G596
	15	33	24	23	23	23	46	42	15	25	28	42	32	27	47	31	25	44	25	31	29	43	16	30	42	32	30	19	25	40	30	16	26	26
		40	27	28	28	28	40	36	17	29	30	38	36	29	40	34	16	50	30	36	30	39	18	29	36	35	29	13	29	38	33	18	27	29
	96,8		29	26	48	66	58	41	29	48	57	36	32	62	49	51	31	30	29	48	61	35	52	58	48	52	36	37	36	48	42	47	49	
	98	97,8	97,6	39	39	47	46	24	24	24	41	44	27	28	51	46	38	45	41	32	41	49	31	43	46	47	43	30	31	53	45	25	40	39
	98,1	97,7	97,9	24	58	50	19	41	24	50	40	44	54	37	39	41	4	30	24	50	33	28	50	36	28	32	34	30	36	20	23	25		
	98,1	97,7	96,1	96,8	98		57	52	18	42	6	52	31	44	58	22	36	52	24	36	7	51	33	10	52	23	8	36	38	47	21	19	4	4
	96,3	96,8	94,7	96,2	95,3	95,4		20	45	59	58	20	69	61	7	52	49	61	60	67	61	24	50	61	20	53	61	45	55	52	51	46	58	57
	96,6	97,1	95,3	96,3	96	95,8	98,4		42	56	54	8	57	59	14	42	46	61	48	59	55	11	48	53	0	45	55	40	47	56	41	43	53	55
	98,6	96,7	98	98,4	98,5	96,4	96,6	97,9		26	20	42	31	34	49	33	27	44	19	27	21	41	23	21	42	34	21	20	26	37	32	1	19	18
	98	97,6	97,6	98	96,7	96,6	95,3	95,5	97,9		42	55	35	12	63	47	31	40	41	20	43	58	13	43	56	48	43	20	27	43	46	27	41	40
	97,7	97,6	96,1	96,7	98	99,5	95,3	95,7	98,4	96,6		52	31	46	57	22	37	55	24	34	6	54	35	10	54	23	8	37	39	48	21	21	4	3
	96,6	96,9	95,4	96,4	96	95,8	98,4	99,3	96,6	95,6	95,8		60	60	16	42	44	64	52	58	55	14	50	56	8	45	58	41	50	60	41	43	53	53
	97,4	97,1	97,1	97,8	96,8	97,5	94,5	95,4	97,2	99	96,3	95,2		40	65	35	47	48	38	33	31	63	43	33	57	36	33	42	27	52	34	32	30	32
	97,8	97,6	97,4	97,7	96,4	96,4	95,1	95,3	97,2	99	96,3	95,2	96,8		64	49	33	47	46	16	46	63	11	46	59	50	46	26	34	50	48	35	43	44
	96,2	96,8	95	95,9	95,7	95,3	99,4	95,8	96,1	94,9	95,4	98,7	94,8	94,9		50	50	59	56	63	59	20	53	61	14	51	61	46	52	50	49	50	57	59
	97,5	97,2	96,1	96,3	97	98,2	95,8	96,6	97,3	96,2	98,2	96,6	97,2	96,1	96		41	56	39	46	24	47	38	24	42	8	26	43	42	53	1	34	21	23
	98	98,7	95,9	96,9	96,8	97,1	96,1	96,3	97,8	97,5	97	96,4	96,2	97,3	96	96,7		60	41	39	37	47	22	38	46	42	38	24	40	47	40	28	34	35
	96,4	96	97,5	96,4	96,7	95,8	95,1	95,1	96,4	96,8	95,6	94,9	96,1	96,2	95,3	95,5	95,2		39	40	55	66	48	55	61	55	55	40	36	27	55	45	53	52
	98	97,6	97,6	99,6	98	95,2	96,1	96,1	98,4	96,7	98	95,8	96,9	96,3	95,5	96,8	96,7	96,8		32	24	51	35	28	48	40	26	32	32	28	38	20	23	25
	97,5	97,1	97,6	97,4	97,6	97,1	94,6	95,3	97,8	98,4	97,2	95,3	97,3	98,7	94,9	96,3	96,8	96,8	97,4		34	59	25	38	59	47	38	32	29	41	45	28	33	35
	97,6	97,6	96,1	96,7	98	99,4	95,1	95,6	98,3	96,5	99,5	95,6	97,5	96,3	95,3	98	97	95,6	98	97,2		54	35	10	55	25	8	38	40	46	23	22	3	6
	96,5	96,8	95,1	96,1	96	95,9	98	99,1	96,7	95,3	95,7	98,8	94,9	94,9	98,4	96,2	96,2	94,7	95,9	95,3	95,7		52	53	11	50	55	44	53	61	46	42	52	53
	98,7	98,5	97,2	97,5	97,3	97,3	96	96,1	98,1	98,9	97,2	96	96,5	99,1	95,7	96,9	98,2	96,1	97,2	98	97,2	95,8		35	48	39	35	15	35	39	37	24	32	33
	97,6	97,6	95,8	96,5	97,7	99,2	95,1	95,7	98,3	96,5	99,2	95,5	97,3	96,3	95,1	98	96,9	95,6	97,7	96,9	99,2	95,7	97,2		53	27	2	36	41	48	23	22	7	9
	96,6	97,1	95,3	96,3	96	95,8	98,4	100	96,6	95,5	95,7	99,3	95,4	95,3	98,8	96,6	96,3	95,1	96,1	95,3	95,6	99,1	96,1		45	55	40	47	56	41	43	53	55	
	97,4	97,2	96,1	96,2	97,1	98,1	95,7	96,4	97,2	96,1	98,1	96,4	97,1	96	95,9	99,3	96,6	95,6	96,8	96,2	98	96	96,8	96,4		27	44	43	54	7	35	22	24	
	97,6	97,6	95,8	96,5	97,7	99,3	95,1	95,6	98,3	96,5	99,3	95,3	97,3	96,3	95,1	97,9	96,9	95,6	97,9	96,9	99,3	95,6	97,2	99,8	95,6	36	41	48	25	22	5	7		
	98,4	98,9	97,1	97,6	97,4	97,1	96,4	96,8	98,4	98,4	97	96,7	96,6	97,9	96,3	96,5	98	96,8	97,4	97,4	96,9	96,4	98,8	97,1	96,8	96,4	97,1		31	32	42	21	36	35
	98	97,6	97	97,5	97,2	96,9	95,6	96,2	97,9	97,8	96,8	96	97,8	97,2	95,8	96,6	96,8	97,1	97,4	97,6	96,7	96,8	95,7	97,2	96,7	96,2	96,5	96,7	97,5	37	41	27	38	40
	96,8	96,9	97,1	95,7	97,6	96,2	95,8	95,5	97	96,5	96,1	95,2	95,8	96	96	95,7	96,2	97,8	97,7	96,7	96,3	95,1	96,8	96,1	95,5	95,7	96,1	97,4	97	52	38	45	48	
	G13	97,6	97,3	96,1	96,4	97,1	98,3	95,9	96,7	97,4	96,3	98,3	96,7	97,2	96,1	99,9	96,8	95,6	96,9	96,4	96,7	98,1	96,3	97	98,1	96,7	99,4	98	96,6	96,7	95,8	33	20	22
	GRS29	98,7	98,5	96,6	98	98,4	96,3	96,5	99,9	97,8	98,3	96,5	97,4	97,2	96	97,2	97,7	96,4	98,4	97,7	98,2	98,6	98	98,2	96,5	97,2	98,2	98,3	97,8	96,9	97,3	20	19	
	G821	97,9	97,8	96,2	96,8	98,1	99,6	95,3	95,7	98,4	96,7	99,6	95,7	97,6	96,5	95,4	98,3	97,2	95,7	98,1	97,3	99,7	95,8	97,4	99,4	95,7	98,2	99,6	97,1	96,9	96,4	98,4	98,4	3
	G596	97,9	97,6	96,1	96,8	98	99,6	95,4	95,6	98,5	96,8	99,7	95,7	97,4	96,4	95,3	98,1	97,2	95,8	98	97,2	99,5	95,7	99,2	95,6	98	99,4	97,2	96,8	96,1	98,2	98,4	99,7	.

Cizelge 4.5. (devamı)

	<i>N. abscessus</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. beijingensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brevicatena</i>	<i>N. carneae</i>	<i>N. coublae</i>	<i>N. cunimideiens</i>	<i>N. cyrtaciğerorgica</i>	<i>N. flavorosea</i>	<i>N. fluminea</i>	<i>N. harenae</i>	<i>N. higoensis</i>	<i>N. ignoralta</i>	<i>N. jinanensis</i>	<i>N. neocaledonica</i>	<i>N. otitidiscaviarum</i>	<i>N. paucivorans</i>	<i>N. puris</i>	<i>N. rhamnosphila</i>	<i>N. salmonitida</i>	<i>N. shimofuensis</i>	<i>N. stenata</i>	<i>N. soli</i>	<i>N. splunciae</i>	<i>N. testacea</i>	<i>N. thailandica</i>	<i>N. transvalensis</i>	<i>N. vaccini</i>	KA35	KA138	ME03	ME23		
<i>N. abscessus</i>	-	15	33	24	23	23	46	42	15	25	28	42	32	27	47	31	25	44	25	31	29	43	16	30	42	32	30	19	25	40	47	3	24	24	
<i>N. asteroides</i>	98,8	-	40	27	28	28	40	36	17	29	30	38	36	29	40	34	16	50	30	36	30	39	18	29	36	35	29	13	29	38	42	13	28	28	
<i>N. beijingensis</i>	97,3	96,8	-	29	26	48	66	58	41	29	48	57	36	32	62	49	51	31	30	29	48	61	35	52	58	48	52	36	37	36	67	32	28	28	
<i>N. brasiliensis</i>	98	97,8	97,6	-	39	39	47	46	24	24	41	44	27	28	51	46	38	45	41	32	41	49	31	43	46	47	43	30	31	53	47	23	23	23	
<i>N. brevicatena</i>	98,1	97,7	97,9	96,8	-	24	58	50	19	41	24	50	40	44	54	37	39	41	4	30	24	50	33	28	50	36	28	32	34	30	59	22	40	40	
<i>N. carneae</i>	98,1	97,7	96,1	96,8	98	-	57	52	18	42	6	52	31	44	58	22	36	52	24	36	7	51	33	10	52	23	8	36	38	47	58	23	41	41	
<i>N. coublae</i>	96,3	96,8	94,7	96,2	95,3	95,4	-	20	45	59	58	20	69	61	7	52	49	61	60	67	61	24	50	61	20	53	61	45	55	52	8	44	58	58	
<i>N. cunimideiens</i>	96,6	97,1	95,3	96,3	96	95,8	98,4	-	42	56	54	8	57	59	14	42	46	61	48	59	55	11	48	53	0	45	55	40	47	56	18	40	55	55	
<i>N. cyrtaciğerorgica</i>	98,6	96,7	98	98,4	98,5	96,4	96,6	97,9	-	26	20	42	31	34	49	33	27	44	19	27	21	41	23	21	42	34	21	20	26	37	44	14	25	25	
<i>N. farcinica</i>	98	97,6	97,6	97,6	98	96,7	96,6	95,3	95,5	96,6	-	52	31	46	57	22	37	55	24	34	6	54	35	10	54	23	8	37	39	48	60	28	41	41	
<i>N. flavorosea</i>	97,7	97,6	96,1	96,7	98	99,5	95,3	95,7	98,4	96,6	-	52	31	46	57	22	37	55	24	34	6	54	35	10	54	23	8	37	39	48	60	28	41	41	
<i>N. fluminea</i>	96,6	96,9	95,4	96,4	96	95,8	98,4	99,3	96,6	95,6	95,8	-	60	60	16	42	44	64	52	58	55	14	50	56	8	45	58	41	50	60	19	40	54	54	
<i>N. harenae</i>	97,4	97,1	97,1	97,8	96,8	97,5	94,5	95,4	97,5	97,2	97,5	95,2	-	40	65	35	47	48	38	33	31	63	43	33	57	36	33	42	27	52	68	32	34	34	
<i>N. higoensis</i>	97,8	97,6	97,4	97,7	96,4	96,4	95,1	95,3	97,2	99	96,3	95,2	96,8	-	64	49	33	47	46	16	46	63	11	46	59	50	46	26	34	50	63	26	11	11	
<i>N. ignoralta</i>	96,2	96,8	95	95,9	95,7	95,3	99,4	98,8	96,1	94,9	95,4	98,7	94,8	94,9	-	50	50	59	56	63	59	20	53	61	14	51	61	46	52	50	11	45	62	62	
<i>N. jinanensis</i>	97,5	97,2	96,1	96,3	97	98,2	95,8	96,6	97,3	96,2	98,2	96,6	97,2	96,1	96	-	41	56	39	46	24	47	38	24	42	8	26	43	42	53	53	31	46	46	
<i>N. neocaledonica</i>	98	98,7	95,9	96,9	96,8	97,1	96,1	96,3	97,8	97,5	97	96,4	96,2	97,3	96	96,7	-	60	41	39	37	47	22	38	46	42	38	24	40	47	50	23	30	30	
<i>N. otitidiscaviarum</i>	96,4	96	97,5	96,4	96,7	95,8	95,1	95,1	96,4	96,8	95,6	94,9	96,1	96,2	95,3	95,5	95,2	-	39	40	55	66	48	55	61	55	55	40	36	27	56	45	39	39	
<i>N. paucivorans</i>	98	97,6	97,6	96,7	99,6	98	95,2	96,1	98,4	96,7	98	95,8	96,9	96,3	95,5	96,8	96,7	96,8	-	32	24	51	35	28	48	40	26	32	32	28	59	24	40	40	
<i>N. puris</i>	97,5	97,1	97,6	97,4	97,6	97,1	94,6	95,3	97,8	98,4	97,2	95,3	97,3	98,7	94,9	98,3	96,8	96,8	97,4	-	34	59	25	38	59	47	38	32	29	41	68	30	19	19	
<i>N. rhamnosphila</i>	97,6	97,6	96,1	96,7	98	99,4	95,1	95,6	98,3	96,5	99,5	95,6	97,5	96,3	95,3	98	97	95,6	98	97,2	-	54	35	10	55	25	8	38	40	46	62	29	42	42	
<i>N. salmonitida</i>	96,5	96,8	95,1	96,1	96	95,9	98	99,1	96,7	95,3	95,7	98,8	94,9	94,9	98,4	96,2	96,2	94,7	95,9	95,3	95,7	-	52	53	11	50	55	44	53	61	22	41	57	57	
<i>N. shimofuensis</i>	98,7	98,5	97,2	97,5	97,3	97,3	96	96,1	98,1	98,9	97,2	96	96,5	99,1	95,7	96,9	98,2	96,1	97,2	98	97,2	95,8	-	35	48	39	35	15	35	39	52	15	12	12	
<i>N. stenata</i>	97,6	97,6	95,8	96,5	97,7	99,2	95,1	95,7	98,3	96,5	99,2	95,5	97,3	96,3	95,1	98	96,9	95,6	97,7	96,9	99,2	95,7	97,2	-	53	27	2	36	41	48	60	30	42	42	
<i>N. soli</i>	96,6	97,1	95,3	96,3	96	95,8	98,4	100	96,6	95,5	95,7	99,3	95,4	95,3	98,8	96,6	96,3	95,1	96,1	95,3	95,6	99,1	96,1	95,7	-	45	55	40	47	56	18	40	55		
<i>N. splunciae</i>	97,4	97,2	96,1	96,2	97,1	98,1	95,7	96,4	97,2	96,1	98,1	96,4	97,1	96	95,9	99,3	96,6	95,6	96,8	96,2	98	96	96,8	97,8	96,4	-	27	44	43	54	54	32	47	47	
<i>N. testacea</i>	97,6	97,6	95,8	96,5	97,7	99,3	95,1	95,6	98,3	96,5	99,3	95,3	97,3	96,3	95,1	97,9	96,9	95,6	97,9	96,9	99,3	95,6	97,2	99,8	95,6	97,8	-	36	41	48	60	30	42	42	
<i>N. thailandica</i>	98,4	98,9	97,1	97,6	97,4	97,1	96,4	96,8	98,4	98,4	97	96,7	96,6	97,9	96,3	96,5	98	96,8	97,4	97,4	96,9	96,4	98,8	97,1	96,8	96,4	97,1	-	31	32	44	17	19	19	
<i>N. transvalensis</i>	98	97,6	97	97,5	97,2	96,9	95,6	96,2	97,9	97,8	96,8	96	97,8	97,2	95,8	96,6	96,8	97,1	97,4	96,8	95,7	96,2	96,5	96,7	96,2	96,5	96,7	97,5	-	37	50	25	26	26	
<i>N. vaccini</i>	96,8	96,9	97,1	95,7	97,6	96,2	95,8	95,5	97	96,5	96,1	95,2	95,8	96	95,7	96,2	96,2	97,8	97,7	96,7	96,3	95,1	96,8	96,1	95,5	95,7	96,1	97,4	97	-	47	38	42	42	
KA35	96,2	96,6	94,6	96,2	95,3	95,3	99,3	98,5	96,4	95,3	96,1	98,4	94,5	94,9	99,1	95,7	96	95,5	95,3	94,5	95	98,2	95,8	95,2	98,5	95,7	95,2	96,4	96	96,2	-	45	57	57	
KA138	99,7	98,9	97,4	98,1	98,2	98,1	96,4	96,8	98,8	98	97,7	96,8	97,4	97,9	96,4	97,5	98,1	96,4	98	97,6	97,6	96,7	97,6	96,6	95,6	96,2	96,6	98,4	97,9	96,9	96,4	-	23	23	23
ME03	98	97,7	97,7	98,1	96,8	96,7	95,3	95,6	98	99,9	96,7	95,7	97,2	99,1	95	96,3	97,6	96,8	96,8	96,4	96,6	95,4	99	96,6	95,6	96,2	96,6	98,4	97,9	96,6	95,4	98,1	-	0	0
ME23	98	97,7	97,7	98,1	96,8	96,7	95,3	95,6	98	99,9	96,7	95,7	97,2	99,1	95	96,3	97,6	96,8	96,8	96,4	96,6	95,4	99	96,6	95,6	96,2	96,6	98,4	97,9	96,6	95,4	98,1	100	-	-

	<i>N. abcessus</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. beijeringensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brevicatena</i>	<i>N. carnea</i>	<i>N. coublae</i>	<i>N. cummidei</i>	<i>N. cyrtogastergica</i>	<i>N. farcinica</i>	<i>N. flavovirens</i>	<i>N. fluminea</i>	<i>N. harenae</i>	<i>N. hiogasteris</i>	<i>N. ignorata</i>	<i>N. jinnensis</i>	<i>N. neocaledonica</i>	<i>N. oltidiscavarium</i>	<i>N. paucivorans</i>	<i>N. puris</i>	<i>N. rhamnosiphila</i>	<i>N. salmonicida</i>	<i>N. shimoferiensis</i>	<i>N. stenata</i>	<i>N. soli</i>	<i>N. spelunciae</i>	<i>N. testacea</i>	<i>N. thailandica</i>	<i>N. transvalensis</i>	<i>N. vaccini</i>	<i>MK14</i>	<i>MK22</i>	<i>MK26</i>		
		15	33	24	23	23	46	42	15	25	28	42	32	27	47	31	25	44	25	31	29	43	16	30	42	32	30	19	25	40	28	15	15		
			40	27	28	28	40	36	17	30	38	36	36	29	40	34	16	50	30	36	30	39	18	29	36	35	29	13	29	38	32	17	17		
		96.8		29	26	48	60	58	41	29	48	57	36	32	62	49	51	31	30	29	48	61	35	52	58	48	52	36	37	36	48	41	41		
		98	97.8	97.6	39	39	47	46	24	24	41	44	27	28	51	46	38	45	41	32	41	49	31	43	46	47	43	30	31	53	41	24	24		
		98.1	97.7	97.9	24	50	19	41	24	50	40	44	54	44	54	37	39	41	4	30	24	50	33	28	50	36	28	32	34	30	24	19	19		
		98.1	97.7	96.1	96.8	98		57	52	18	42	6	52	31	44	58	22	36	52	24	36	7	51	33	10	52	23	8	36	38	47	9	18	18	
		96.3	96.8	94.7	96.2	95.3	96	95.8	98.4		20	45	59	58	20	69	61	7	52	49	61	60	67	61	24	50	63	61	45	55	52	61	45	45	
		96.6	97.1	95.3	96.3	96	95.8	98.4		42	56	54	8	57	59	14	42	46	61	48	59	55	11	48	53	0	45	55	40	47	56	50	42	42	42
		98.6	96.7	98	98.4	98.5	96.6	97.9		26	20	42	31	34	49	33	27	44	19	27	21	41	23	42	34	21	20	26	37	19	0	0	0	0	
		98	97.6	97.6	98	96.7	96.6	95.3	95.5	97.9		42	55	35	12	63	47	31	40	41	20	43	58	13	43	56	48	43	20	27	43	41	26	26	
		97.7	97.6	96.1	96.7	98	99.5	95.3	95.7	98.4	96.6		52	31	46	57	22	37	55	24	34	6	54	35	10	54	23	8	37	39	48	7	20	20	
		96.6	96.9	95.4	96.4	96	95.8	98.4	99.3	96.6	95.6	95.8		60	60	16	42	44	64	52	58	33	63	43	57	36	33	42	27	52	27	31	31	31	
		97.4	97.1	97.1	97.8	96.8	97.5	94.5	95.4	97.5	97.2	97.5	95.2		40	65	35	47	48	38	33	31	63	43	33	57	36	33	42	27	52	27	31	31	
		97.8	97.6	97.4	97.7	96.4	96.4	95.1	95.3	97.2	99	96.3	95.2	96.8		64	49	33	47	46	16	46	63	11	46	59	50	46	26	34	50	47	34	34	
		96.2	96.8	95	95.9	95.7	95.3	99.4	98.8	96.1	94.9	95.4	98.7	94.8	94.9		50	59	56	63	59	20	53	61	14	51	61	46	26	34	50	49	49	49	
		97.5	97.2	96.1	96.3	97	98.2	95.8	96.6	97.3	96.2	98.2	96.6	97.2	96.1	96		41	56	39	46	24	47	38	24	42	8	26	43	42	53	23	33	33	
		98	98.7	95.9	96.9	96.8	97.1	96.1	96.3	97.8	97.5	97	96.4	96.2	97.3	96	96.7	60	41	39	37	47	22	38	46	42	38	24	40	47	39	27	27	27	
		96.4	96	97.5	96.4	96.7	95.8	95.1	95.1	96.4	96.8	95.6	94.9	96.1	96.2	95.3	95.2	96.8	96.8	97.4		55	66	48	55	61	40	36	27	52	44	44	44	44	
		98	97.6	97.6	96.7	96.6	98	95.2	96.1	98.4	96.7	98	95.8	96.9	96.3	95.5	96.8	96.8	96.8	97.4	32	24	51	35	28	48	40	26	32	28	22	19	19	19	
		97.5	97.1	97.6	97.4	97.6	97.1	94.6	95.3	97.8	98.4	97.2	95.3	97.3	98.7	94.9	98.4	96.2	94.7	95.9	95.3	95.7		54	35	10	55	25	8	38	40	46	8	21	21
		97.6	97.6	96.1	96.7	98	99.4	95.1	95.6	98.3	96.5	99.5	95.6	97.5	96.3	95.3	98	97	95.6	98	97.2	98	35	10	55	25	8	38	40	46	8	21	21	21	
		96.5	96.8	95.1	96.1	96	95.9	98	99.1	96.7	95.3	95.7	98.8	94.9	98.4	96.2	96.2	94.7	97.2	96.9	96.9	99.3	95.6	97.2	99.8	95.6	44	53	61	54	41	41	41	41	
		98.7	98.5	97.2	97.5	97.3	96	96.1	98.1	98.9	97.2	96	96.5	99.1	95.7	96.9	98.2	96.1	97.2	98	97.2	95.8		52	53	11	50	55	44	33	39	36	23	23	23
		97.6	97.6	95.8	96.5	96.7	99.2	95.1	95.7	98.3	96.5	99.2	95.5	97.3	95.1	98	96.9	95.6	97.2	96.9	99.2	95.7	97.2	95.7	35	48	39	35	15	35	39	36	23	23	
		98	97.6	97.1	95.3	96.3	96	95.8	98.4	100	96.6	95.5	95.7	97.3	95.3	98.8	96.6	96.3	95.1	96.1	95.3	95.6	99.1	96.1	95.7		45	55	40	47	56	50	42	42	
		96.6	97.1	95.3	96.3	96	95.8	98.4		100	96.6	95.5	95.7	97.3	95.3	98.8	96.6	96.3	95.1	96.1	95.3	95.6	99.1	96.1	95.7		45	55	40	47	56	50	42	42	
		97.4	97.2	96.1	96.2	97.1	98.1	95.7	96.4	97.2	96.1	98.1	96.4	97.1	96	95.9	99.3	96.6	95.6	96.8	96.2	98	96	96.8	97.8	96.4	27	44	43	54	24	34	34	34	
		97.6	97.6	95.8	96.5	97.1	99.3	95.1	95.6	98.3	96.5	99.3	95.3	97.3	96.3	95.1	97.9	96.9	95.6	97.9	96.9	99.3	95.6	97.2	99.8	95.6	97.8	36	41	48	10	21	21	21	
		98.4	98.9	97.1	97.6	97.1	97.1	96.4	98.4	98.4	97	96.7	96.6	97.9	96.3	96.5	98	96.8	97.1	97.4	97.4	96.9	96.4	98.8	97.1	96.8	96.4	97.1	31	32	37	20	20	20	
		98	97.6	97	97.5	97.4	96.9	95.6	96.2	97.9	97.8	96.8	96	97.8	97.2	95.8	96.6	96.8	97.1	97.4	97.6	96.8	95.7	97.2	96.7	96.5	96.7	97.5	97.5	97	34	26	26	26	
		96.8	96.9	97.1	95.7	97.6	96.2	95.8	95.5	97	96.5	96.1	95.2	95.8	96	96	95.7	96.2	97.8	97.7	96.7	96.3	95.1	96.8	96.1	95.5	95.7	96.1	97.4	97	44	37	37	37	
		97.7	97.4	96.1	96.7	98	99.2	95.1	96	98.4	96.7	99.4	95.7	97.8	96.2	95.3	98.1	96.8	95.8	98.2	97.2	99.3	95.7	97.1	99.2	96	98	99.2	97	97.2	96.4	19	19	19	
		98.8	98.6	96.7	98	98.4	98.5	96.4	96.6	100	97.9	98.4	96.6	97.5	97.2	96.1	97.3	97.8	96.4	98.4	97.8	98.3	96.7	98.1	98.3	96.6	97.2	98.3	98.4	97.9	97	98.4	0	0	
		98.8	98.6	96.7	98	98.4	98.5	96.4	96.6	100	97.9	98.4	96.6	97.5	97.2	96.1	97.3	97.8	96.4	98.4	97.8	98.3	96.7	98.1	98.3	96.6	97.2	98.3	98.4	97.9	97	98.4	100	100	
		98.8	98.6	96.7	98	98.4	98.5	96.4	96.6	100	97.9	98.4	96.6	97.5	97.2	96.1	97.3	97.8	96.4	98.4	97.8	98.3	96.7	98.1	98.3	96.6	97.2	98.3	98.4	97.9	97	98.4	100	100	

Çizelge 4.5. (devamı)

	<i>N. abcessus</i>	<i>N. asteroides</i>	<i>N. beijingensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brevicatena</i>	<i>N. carneae</i>	<i>N. coublae</i>	<i>N. cummideiensis</i>	<i>N. cyathigeorgica</i>	<i>N. flavorosea</i>	<i>N. fluminea</i>	<i>N. harenae</i>	<i>N. higoensis</i>	<i>N. ignorata</i>	<i>N. jinanensis</i>	<i>N. neocaledonica</i>	<i>N. nitidiscaviarum</i>	<i>N. paucivorans</i>	<i>N. puris</i>	<i>N. rhamnosiphila</i>	<i>N. salmonicida</i>	<i>N. shimojuensis</i>	<i>N. stenoata</i>	<i>N. soli</i>	<i>N. speluncae</i>	<i>N. testacea</i>	<i>N. thailandica</i>	<i>N. transvalensis</i>	<i>N. vaccini</i>	MK28	MK32	NEA61	NEA76		
	15	33	24	23	23	23	46	42	15	25	28	42	32	27	47	31	25	44	25	31	29	43	30	42	32	30	19	25	40	27	27	25	25		
	98,8		27	28	28	28	40	36	17	29	30	38	36	29	40	34	16	50	30	36	30	39	18	29	36	35	29	13	29	38	29	28	28	28	
	97,3	96,8		29	26	48	66	58	41	29	48	57	36	32	62	49	51	31	30	29	48	61	35	52	58	48	52	36	37	36	48	48	48	48	
	98	97,8	97,6		39	39	47	46	24	41	44	27	28	51	46	38	45	41	32	41	49	31	43	46	47	43	30	31	53	39	39	38	38	38	
	98,1	97,7	97,9	96,8		24	58	50	19	41	24	50	40	44	54	37	39	41	4	30	24	50	33	28	50	36	28	32	34	30	24	24	24	24	
	98,1	97,7	96,1	96,8	98		57	52	18	42	6	52	31	44	58	22	36	52	24	36	7	51	33	10	52	23	8	36	38	47	6	6	5	5	
	96,3	96,8	94,7	96,2	95,3	95,4		20	45	59	58	20	69	61	7	52	49	61	60	67	61	24	50	61	20	53	61	45	55	52	57	57	56	56	
	96,6	97,1	95,3	96,3	96	95,8	98,4	-	42	56	54	8	57	59	14	42	46	61	48	59	55	11	48	53	0	45	55	40	47	56	51	51	54	54	
	98,6	96,7	98	98,4	98,5	96,4	96,6	97,9		26	20	42	31	34	49	33	27	44	19	27	21	41	23	21	42	34	21	20	26	37	19	19	17	17	
	98	97,6	97,6	98	96,7	96,6	95,3	95,5	97,9		42	55	35	12	63	47	31	40	41	20	43	58	13	43	56	48	43	20	27	43	41	41	39	39	
	97,7	97,6	96,1	96,7	98	99,5	95,3	95,7	98,4	96,6		52	31	46	57	22	37	55	24	34	6	54	35	10	54	23	8	37	39	48	4	4	4	4	
	96,6	96,9	95,4	96,4	96	95,8	98,4	99,3	96,6	95,8		60	60	16	42	44	64	52	58	55	14	50	56	8	45	58	41	50	60	50	50	52	52	52	
	97,4	97,1	97,8	96,8	97,5	94,5	94,5	95,4	97,5	97,2	97,5	95,2		40	65	35	47	48	38	33	31	63	43	33	57	36	33	42	27	52	31	31	31	31	
	97,8	97,6	97,4	97,7	96,4	96,4	95,1	95,3	97,2	99	96,3	95,2	96,8		64	49	33	47	46	16	46	63	11	46	59	50	46	26	34	50	44	44	43	43	43
	96,2	96,8	95	95,9	95,7	95,3	99,4	98,8	96,1	94,9	95,4	98,7	94,8	94,9		50	50	59	56	63	59	20	53	61	14	51	61	46	52	50	57	57	58	58	
	97,5	97,2	96,1	96,3	97	98,2	95,8	96,6	97,3	96,2	98,2	96,6	97,2	96,1	96		41	56	39	46	24	47	38	24	42	8	26	43	42	53	20	20	22	22	
	98	98,7	95,9	96,9	96,8	97,1	96,1	96,3	97,8	97,5	97	96,4	96,2	97,3	96	96,7		60	41	39	37	47	22	38	46	42	38	24	40	47	37	37	34	34	
	96,4	96	97,5	96,4	96,7	95,8	95,1	95,1	96,4	96,8	95,6	94,9	96,1	96,2	95,3	95,5	95,2		39	40	55	66	48	55	61	55	55	40	36	27	55	55	51	51	
	98	97,6	97,6	96,7	99,6	98	95,2	96,1	98,4	96,7	98	95,8	96,9	96,3	95,5	96,8	96,7	96,8		32	24	51	35	28	48	40	26	32	32	28	26	26	26	26	
	97,5	97,1	97,6	97,4	97,6	97,1	94,6	95,3	97,8	98,4	97,2	95,3	97,3	98,7	94,9	96,3	96,8	97,4		34	59	25	38	59	47	38	32	29	41	34	34	34	34	34	
	97,6	97,6	96,1	96,7	98	99,4	95,1	95,6	98,3	96,5	99,5	95,6	97,5	96,3	95,3	98	97	95,6	98		54	35	10	55	25	8	38	40	46	8	8	8	7	7	
	96,5	96,8	95,1	96,1	96	95,9	98	99,1	96,7	95,3	95,7	98,8	94,9	94,9	98,4	96,2	96,2	94,7	95,9	95,3	95,7		52	53	11	50	55	44	53	61	54	54	52	52	
	98,7	98,5	97,2	97,5	97,3	97,3	96	96,1	98,1	98,9	97,2	96	96,5	99,1	95,7	96,9	98,2	96,1	97,2	98		95,8		35	48	39	35	15	35	39	33	33	32	32	
	97,6	97,6	95,8	96,5	97,7	99,2	95,1	95,7	98,3	96,5	99,2	95,5	95,7	95,3	98,8	96,6	96,3	95,1	96,1	95,3	95,6	99,1	96,1	95,7	53	27	2	36	41	48	8	8	8	8	
	96,6	97,1	95,3	96,3	96	95,8	98,4	100	96,6	95,5	95,7	99,3	95,4	95,3	98,8	96,6	96,3	95,1	96,1	95,3	95,6	99,1	96,1	95,7	45	55	40	47	56	51	51	54	54	54	
	97,4	97,2	96,1	96,2	97,1	98,1	95,7	96,4	97,2	96,1	98,1	96,4	97,1	96	95,9	99,3	96,6	95,6	96,8	96,2	98	96	96,8	96,4		27	44	43	54	21	21	23	23	23	
	97,6	97,6	95,8	96,5	97,7	99,3	95,1	95,6	98,3	96,5	99,3	95,3	97,3	96,3	95,1	97,9	96,9	95,6	97,9	96,9	99,3	95,6	97,2	99,8	95,6	97,8		36	41	48	8	8	8	8	
	97,6	98,9	97,1	97,6	97,4	97,1	96,4	96,8	98,4	98,4	97	96,7	96,6	97,9	96,3	96,5	98	96,8	97,4	97,4	96,9	96,4	98,8	97,1	96,8	96,4	97,1		31	32	35	35	34	34	
	98	97,6	97	97,5	97,2	96,9	95,6	96,2	97,9	97,8	96,8	96	97,8	97,2	95,8	96,6	96,8	97,1	97,4	97,6	96,8	95,7	96,7	96,2	96,5	96,7	97,5		37	38	38	39	39	39	
	96,8	96,9	97,1	95,7	97,6	96,2	95,8	95,5	97	96,5	96,1	95,2	95,8	96	96	95,7	96,2	97,8	97,7	96,7	96,3	95,1	96,8	96,1	95,5	95,7	96,1	97,4	97	48	48	47	47	47	
	97,8	97,6	96,1	96,8	98	99,5	95,4	95,9	98,4	96,7	99,6	96	97,5	96,4	95,4	98,4	97	95,6	97,9	97,2	99,3	95,7	97,3	99,3	95,9	98,3	99,3	97,2	96,9	96,1	100	100	100	100	
	97,8	97,6	96,1	96,8	98	99,5	95,4	95,9	98,4	96,7	99,6	96	97,5	96,4	95,4	98,4	97	95,6	97,9	97,2	99,3	95,7	97,3	99,3	95,9	98,3	99,3	97,2	96,8	96,2	99,6	99,6	99,6	99,6	
	98	97,7	96,1	96,9	98	99,6	95,5	95,7	98,6	96,8	99,6	95,8	97,5	96,5	95,3	98,2	97,2	95,9	97,9	97,2	99,4	95,8	97,4	99,3	95,7	98,1	99,3	97,2	96,8	96,2	99,6	99,6	99,6	99,6	
	98	97,7	96,1	96,9	98	99,6	95,5	95,7	98,6	96,8	99,6	95,8	97,5	96,5	95,3	98,2	97,2	95,9	97,9	97,2	99,4	95,8	97,4	99,3	95,7	98,1	99,3	97,2	96,8	96,2	99,6	99,6	99,6	99,6	

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mikolik asit içerikli aktinomisetlerin hücre duvar özellikleri ve fonksiyonları dikkate alındığında, bu bakterilerin klinik açıdan önemi oldukça büyüktür. Özellikle *Nocardia* ve daha çok günümüzde dikkat çeken *Dietzia* cinsinin patojenik tarafı düşünüldüğünde bu önem daha da artmaktadır. Mikolik asit içerikli aktinomiset grubu organizmalar içerisinde yeni tür tanımlamaları yapmak adına tez çalışmasında, bu gruba ağırlık verilmiştir. Bunun içinse izolasyon prosedüründe, yeni seçici izolasyon ortamları ve farklı habitatlar denenmiştir.

İzolasyon çalışmalarının çeşitliliğini yedi farklı habitatdan alınan toprak örnekleri oluşturmaktadır. Ayrıca bunlara ek olarak, iki farklı habitat ise Aymen- Peker'in yüksek lisans tez çalışmasında (2003), izolasyon prosedürü için kullandığı toprak örnekleridir. Bu habitatlardan altısı ülkemiz sınırları içerisinde, üçü ise Arabistan sınırları içerisinde. İzolasyon çalışmamızda ise Hayakawa ve Nonomura tarafından 1987 yılında geliştirilen, humik asit vitamin agar (HV) kullanılmıştır. Yamamura ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada hem HV agar hem de süktroz gradient santrifigasyon yönteminin kullanılmasıyla oluşturulan izolasyon ortamının *Nocardia* cinsleri için seçici olduğunu ortaya koymuşlardır. Süktroz gradient santrifigasyon yönteminde ise %20 süktroz içerikli tabaka kullanılması, *Nocardia* cinslerinin başarılı izolasyonu için bir avantaj sağlamıştır. Bu çalışmada da bu agar ve santrifigasyon yöntemi sayesinde toprakta *Streptomiset*'lere oranla daha az yoğunlukta bulunan mikolik asit içerikli aktinomiset grubu bakteriler izole edilebilinmiştir. Ayrıca izolasyon çalışmalarında HV agara ek olarak, Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA), Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA) vitaminli, Glucose Yeast Extract Malt Agar (GYME) ve Glucose Yeast Extract Malt Agar (GYME) vitaminli olmak üzere dört ayrı agar daha kullanılması, ilgili organizmaların bulunma olasılığını arttırmıştır.

İzolasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra mikolik asit içerikli tip ve referans aktinomisetlerin morfolojik görünimleri esas alınarak bazı organizmaların kemotaksonomik açıdan mikolik asit testi uygulanmasına öncelik verilmiştir. Kageyama ve arkadaşları (2004), topraktan ve klinik örneklerden izolasyon çalışmaları gerçekleştirmiş ve mikolik asit testi olarakta ince kağıt kromatografisi yönteminin

kullanılmasının diğer kemotaksonomik özelliklerin analizlerine nazaran daha basit ve daha kolay bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada da mikolik asit testi uygulandıktan sonra, ince kağıt kromatografi yöntemiyle pozitif sonuç veren organizmalar belirlenerek, çalışmanın antimikrobiyal aktivite ve moleküler identifikasyon aşamasına tabi tutulmak amacıyla seçilmişlerdir.

Nocardia cinsi taksonomisinde en büyük rol oynayan etken, hiç tartışmasız moleküler metodlardır. Gen sekans analizleri, *Nocardia* ve onunla akraba diğer organizmaların filogenetik ilişkilerini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Gen sekans analizleri sonucunda çok sayıda yeni cins tanımlanabilmektedir. Moleküler tekniklerle *Nocardia* cinsinin birçok türünün tanımlanması, fenotipik tekniklere nazaran daha hızlı ve daha kesin olmaktadır (Elliott ve ark., 2006). Zhi ve arkadaşlarının 2009 yılında makalesine göre 16S rDNA gen sekans analizleri temel alınarak yapılan çalışmalara göre *Actinobacteria* sınıfında iki yeni alt takım, dört yeni familya ve bu sınıf içerisinde var olan bazı taksonların tanımlamaları düzeltilerek yerleri tekrardan belirtilmiştir. Son yıllarda 16S rDNA gen sekans analizi ile yapılan çalışmalar taksonomide büyük değişikliklere neden olmuştur. Bu çalışmada mikolik asit içeren 18 test organizma belirlendikten sonra, moleküler çalışmalarda olası yeni türlere ulaşabilme umuduyla, test izolatlarına en yakın türler, 16S rDNA gen bölgesi nükleotit dizi analiz yöntemi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Analizlerin sonuçlarına göre 18 organizmanın 16'sının *Nocardia* cinsine ait, 2'sinin ise *Dietzia* cinsine ait olduğu görülmekte ve daha sonra yapılan filogenetik ağaçlarda *Nocardia* cinsi içerisinde konumlanan test organizmalarının altı ayrı kümede farklılaştıkları anlaşılmıştır (Şekil 4.6).

Nocardia cinsine ait test organizmaları ve tip türlerinin 16S rDNA nükleotit dizi analizine dayalı neighbour-joining filogenetik soyağacı incelendiğinde ilk kümede yedi test organizmayı görmekteyiz. *Nocardia* sp. GS21 %99,70 benzerlik oranı ve 3 nt farklılığı ile *Nocardia rhamnosiphila* türü ile filogenetik ağaçta en yakın izolat olmuştur. Benzer bir yüzdelik oran ve nükleotit farklılığıyla *Nocardia flavorosea* türüne en yakın izolat *Nocardia* sp. GS96'dır. *Nocardia* sp. NEA61, *Nocardia* sp. NEA76, *Nocardia* sp. MK32, *Nocardia* sp. MK28 izolatları ise 4 nt farklılığı ve % 99,60 benzerlik oranıyla *Nocardia flavorosea* türüne en yakın izolatlar olmuşlardır. MD37 ise 7 nt farklılığı ile bu izolatlardan farklılaşmıştır. İlk kümeye baktığımızda organizmaların beş farklı habitattan alındığı (Gümüşhane-Şiran, Muğla, Balıkesir- Altınoluk, Mekke-

Hira dağı, Medine- Uhud dağı) ve filogenetik ağaçta yedi test izolattan altı tanesinin *Nocardia flavorosea* türüne diğer bir tanesinin ise *Nocardia rhamnosiphila* türü ile yakın oldukları görülmektedir. Everest ve arkadaşlarının 2011 mayıs ayında kabul edilen ancak yayın aşamasında olan makalelerine göre, Güney Afrika'dan alınan toprak örnekleri ile gerçekleştirdikleri izolasyon çalışmasından sonra yapılan moleküler analizlerde iki çalışma suşunun da bilinen *Nocardia* türlerinden ayrıldığı vurgulanarak, yeni bir tür olan *Nocardia rhamnosiphila*'nın tanımlaması yapılmıştır. Bu çalışmada ise ilgili türün, *Nocardia* sp. GS21 numaralı izolata en yakın olduğu ve izolatanın Gümüşhane-Şiran'dan alınan yayla toprağından izole edildiğı görülmektedir.

Nocardia jinanensis türü 2009 yılında Sun ve arkadaşları tarafından Çin'in Jinan kentinden izole edilerek tanımlanan yeni bir türdür. Bu çalışmada ikinci kümeye bakıldığında *Nocardia* sp. G13 numaralı çalışma izolatının, 1nt farklılığı ve %99,90 benzerlik oranı ile *Nocardia jinanensis* türüne en yakın izolat olduğu görülmektedir. Habitatı Kütahya-Simav-Gölcük krater gölü olan bu izolata en yakın ikinci tür ise 7 nt farklılığı ile *Nocardia speluncae* türüdür.

Üçüncü kümeye baktığımızda dört çalışma izolatının olduğu görülmektedir. *Nocardia* sp. MK14, *Nocardia* sp. MK22 ve *Nocardia* sp. MK26 numaralı çalışma izolatları *Nocardia cyriacigeorgica* ile 16S rDNA gen bölgesi bakımından %100 benzerlik göstererek filogenetik soy ağacında ayrı bir küme oluşturmuşlardır. *Nocardia* sp. GRS29 numaralı çalışma izolatı ise 1 nt farklılığı ile bu izolatlardan ayrılmaktadır. Üçüncü kümede organizmaların iki farklı habitatdan (Mekke- Arafat dağı ve Giresun-Çomoluk) izole edildiğı görülmektedir.

Kageyama ve arkadaşlarının 2004 yılında Japonya'da gerçekleştirdikleri çalışmada hem insan enfeksiyonundan, hem de topraktan elde edilen 121 *Nocardia* izolatından beşinin hastalardan, birinin topraktan izole edildiğı ve bu izolatların Japonya'da hem topraktan hem de klinik örneklerinden izole edilen ilgili türe ait olan ilk izolasyon çalışması olduğu vurgulanmaktadır. Bu çalışmada dördüncü kümeyi incelediğimizde, sadece tek bir çalışma izolatının olduğu görülmektedir. *Nocardia* sp. KA138 numaralı izolat 3 nt farklılığı ve %99,70 benzerlik oranı ile *Nocardia abscessus* türüne en yakın izolat olmuştur. Bunu 13 nt farklılığı ile *Nocardia asteroides* türü takip etmektedir.

N.coupleae 2007 yılında tanımlanan yeni bir türdür. İlk tanımlanması Nava ve arkadaşları tarafından ham petrolle kirletilmiş topraktan izole edilmiştir. Bu çalışmada beşinci kümede tek bir çalışma izolatu olarak konumlanan *Nocardia sp.* KA35 numaralı izolat 8 nt farklılığı ve %99.30 benzerlikle *N. coupleae* ile birlikte farklı bir dal oluşturarak ayrılmıştır. *Nocardia ignorata* türü de 11 nt farklılığı göstermekte ve aynı kümede yer almaktadırlar. Sonuç olarak, Samsun-Ondokuz Mayıs ilçesinden alınan ve kanal toprağından izole edilen *Nocardia sp.* KA138 numaralı izolat *Nocardia abscessus* türüne, *Nocardia sp.* KA35 numaralı izolat ise *N. coupleae* türüne yakın olduğu ve iki izolatin farklı kümelerde yer aldıkları görülmektedir.

Altıncı kümede *Nocardia sp.* ME03 ve *Nocardia sp.* ME23 numaralı isolatlar %99,90 benzerlik oranı ve 1 nt farklılığı ile *Nocardia farcinica* türüne filogenetik soy ağacında yakın konumlanmışlardır. Her iki izolat da *Nocardia higoensis* türü ile 11 nt farklılığı göstermekte ve aynı kümede yer almaktadırlar.

Conville ve arkadaşlarının 2010 yılındaki makalelerinde belirtildiğine göre insan enfeksiyonlarından izole edilen *Nocardia* türlerinin başında *N. abscessus*, *N. farcinica*, *N.brasiliensis*, *N. cyriacigeorgica* gibi türler gelmektedir. Ayrıca Türkiye’de son yıllarda *Nocardia* cinsi ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, Perçin ve arkadaşlarının 2011 yılında *Nocardia* klinik isolatlarıyla yaptıkları çalışmada beyin, akciğer ve deri örneklerinden izole edilen 21 *Nocardia* suşundan beşinin *N. cyriacigeorgica*, altısının *N. farcinica* olduğunu belirtmektedirler. 2008 yılında Dervişoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları akciğer nokardiyozis tedavisi ile ilgili çalışmada Türkiye’de o yıla kadar *N. cyriacigeorgica* türünün neden olduğu akciğer nokardiyozisi vakasının rapor edilen dördüncü vaka olduğunu vurgulamışlardır. Babayiğit ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlamış oldukları makalede ise *N. farcinica* türünün klinik önemi belirtilmiştir. Ayrıca Uhde ve arkadaşları aynı yıl, Amerika’da 1995-2004 yılları arasında rapor edilen antimikrobiyal özellikte olan *Nocardia* isolatlarının %14’ünün *N. farcinica* türü olduğunu ortaya koymuşlardır.

Türkiye’de ve dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, bu türlerin izole edilme sıklığının arttığı vurgulanmaktadır. Bu çalışmada altıncı ve üçüncü kümelere bakıldığında 16 izolatin dördünün *N. cyriacigeorgica* türüne, ikisinin *N. farcinica* türüne ait olduğu ve topraktan izole edildikleri görülmektedir. Çalışma sonuçlarının bulguları desteklemekte ve literatüre uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Aynı zamanda

çalışmada izole edilen *Nocardia* türlerini genel olarak ele alırsak son yıllarda yeni tanımlanan 3 türün bulunduğu, bunların *N. coubleae* (2007), *N. jinanensis* (2009), *N. rhamnosiphila* (2011) türlerine yakın çalışma izolatları oldukları, Türkiye'nin farklı habitatlarından izole edilerek farklı kümeleri oluşturdukları ve sistematik uyumluluk içerisinde oldukları görülmektedir.

Geçerli olarak tanımlanmış *Dietzia* türleri içerisinde özellikle 3 üye ağır enfeksiyonlu hastalardan alınan numunelerden izole edilmiştir. Bunlardan biride *D.cinnamea* 'dır (Koerner ve ark., 2009). 2007 yılında Weid ve arkadaşları Brezilya'dan alınan ve petrol ile kirletilmiş toprak örneklerinden yaptıkları izolasyon çalışmasında *D.cinnamea* türünü izole etmişler ve bu türün biyodegradatif özellikte olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada *Dietzia sp.* MD01 ve *Dietzia sp.* MD70 numaralı çalışma izolatları Arabistan-Medine- Uhud dağı, dağlık alan toprağından izole edilmiştir. Bu habitat da tıpkı Weid'in araştırmasında olduğu gibi petrol içerikli olabilmekte ve klinik bir örnek olmadığından, Weid'in çalışmasıyla uyum içerisinde. Toprakten izole edilen *Dietzia* cinsi içerisinde konumlanan filogenetik ağaca baktığımızda *Dietzia sp.* MD01 ve *Dietzia sp.* MD70 numaralı izolatlar %99,80 ve 2 nt farklılığı ile *Dietzia cinnamea* türü ile en yakın benzerlik göstermektedirler. Bu çalışma, son yıllarda bu türün toprak örneklerinden alınarak yapılan izolasyon çalışmalarına verilen örneklerden biri olabilecek niteliktedir.

Günümüze kadar birçok antibiyotiğın keşfedilmesiyle, bugün bilinen aktinomiset gruplarından yeni antimikrobiyal bileşiklerin elde edilebilme şansı gün geçtikçe azalmaktadır (Lazzarani ve ark., 2000). Bu sebeple nadir sayılabilecek aktinomisetlerden antibiyotik keşfi önem arz etmektedir. Mikami'nin 2007 yılı makalesine göre, *Nocardia* cinsinin klinik izolatlarının antimikrobiyal aktivite özelliklerini çalıştıkları ve cins tarafından üretilen yirmiden fazla yeni, özgün biyoaktif bileşik bulduklarını ortaya koymaktadır. Ayrıca Yamamura ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları toprak izolasyon çalışmaları sonucu, elde ettikleri *Nocardia* izolatlarının %71'inin antimikrobiyal aktivitesi olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, yeni antimikrobiyal bileşiklere ulaşabilmek adına başta *Nocardia* olmak üzere mikolik asit içerikli aktinomiset grubunun izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Burada amaç, *Streptomyces* türlerinden elde edilen çok sayıda antibiyotiğın yanında diğer farklı aktinomisetlerin de antibiyotik üretebilme kabiliyetlerini araştırmaktır. Fakat test

sonuçlarında çalışma izolatlarımızın antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. *Streptomyces* türlerine nazaran diğer mikolik asit içerikli aktinomisetlerde çok daha nadir görünen antimikrobiyal metabolit üretimi araştırılmış ancak çalışma izolatlarında bulunamamıştır. İleriki çalışmalarımızda hem nadir hem de mikolik asit içerikli aktinomisetlerde antimikrobiyal özellik araştırılmaya devam edilerek, aktinomistlerin biyoteknolojik önemine dikkat çekmek amaçlanmaktadır.

Farklı habitatlardan izole edilen mikolik asit içerikli aktinomisetlerin moleküler özellikleri çalışılarak yeni tür bulabilme ihtimalleri ve bu grup aktinomisetlerin antimikrobiyal özellikleri biyoteknolojik önemlerini desteklemek amacıyla değerlendirilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda çalışma izolatlarının daha önceden tanımlanmış bir *Dietzia* ve yedi farklı *Nocardia* türüne yakın oldukları bulunmuştur. İleriki çalışmalarda daha çok günümüzde tanımlanmasına önem verilen ve klinik açıdan önemi yeni anlaşılan *Dietzia* cinsine ve yeni türlere ulaşabilme umuduyla *Nocardia* cinsine ağırlık verilmesi planlanmaktadır. Ayrıca mikolik asit içerikli *Corynebacterineae* alt ordosunun diğer üyelerinin izolasyonunda HV agar izolasyon yönteminin uygulanmasının yeterli olacağı sonucuna varılmıştır. Sistematik anlamdaki rekabet göz önüne alınarak çalışmalara daha fazla hız ve önem verilmesi de önerilmektedir.

6. 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.
- Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1976a. Free mycolic acids as criteria in the classification of *Nocardia* and the 'rhodochrous' complex. *J. Gen. Microbiol.* 92, 188-199.
- Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Mordarska, H., 1976b. Free mycolic acids as criteria in the classification of *Gordonia* and the 'rhodochrous' complex. *J. Gen. Microbiol.* 92, 183-187.
- 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(3), 203-5.
- Barry, III, 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.
- Blackall, L., Parlett, J.H., Hayward, A.C., Minnikin, D.E., Greenfield, P.F., Harbers, A.E., 1989. *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. *Journal of General Microbiology*, 135, 1547-1558.
- Bower, C.S., Hucker, G.J. 1930. Tech. Bull. 228. New York State Agr. Exp. Sta., Geneva, N.Y.
- Brosius, J., Palmer, J.L., Kennedy, J.P. Noller, H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 4801-4805.

- Buchanan, R.E., 1917. Studies in the nomenclature and classification of bacteria II. The primary subdivisions of the Schizomycetes. *Journal of Bacteriology*, 2, 155-164.
- 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*, University Udine, Mycology Department. Vol. 6, Part 3.
- Castellani, A., Chalmers, A.J., 1919. *Manual of tropical medicine*, 3rd ed., Williams Wood & Co., New York. 959-960.
- 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., 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.
<http://chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html> (15.06.2011).
- Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., 1977. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 100, 221-230.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., 1979. Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 110, 127-136.
- Collins, M. D., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., 1982. Fatty acid composition of some mycolic acid containing coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2503-2509.

- Conville, S.P., Witebsky, F.G., 2010. The Complexity of *Nocardia* Taxonomy: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology newsletter*, 32 (16), 119-125.
- Corti, M. E., Fioti Villafane, M. F., 2003. Nocardiosis: a review, *International Journal of Infectious Diseases*. 7, 243-250.
- Cross, T., Goodfellow, M., 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. In: Sykes, G. and Skinner, F.A. (eds.): *Actinomycetales*, Academic Press, London, 11-112.
- 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.
- Cummins, C. S., Harris, H., 1956. The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.*, 14, 583-600.
- Cummins, C. S., Harris, H., 1958. Studies on the cell wall composition and taxonomy of *Actinomycetales* and related groups. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 173-189.
- 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(3), 489-96.
- Elliott-Brown, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S., Wallace, R.J., 2006. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Moleküler Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (2), 259-282.
- Ericsson, H. M., Sherris, J.C., 1971. Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta.path. Microbiol. Scand.*, Sec. B, Suppl. No.217.
- Everest, G.J., Cook, A. E., Roes-Hill, M.L., Meyers, P.Y., 2011. *Nocardia rhamnosiphila* sp. nov., isolated from soil. *Systematic and Applied Microbiology*. Article in Press.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogeny: an appropriate use of the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Freeman, S., Herron, J.C., 2007. *Evolutionary analysis*, 4th edition. Pearson Education.

- Gevers, D., Dawyndt, P., Vandamme, P., Willems, A., Vancanneyt, M., Swings, J., De Vos, P., 2010. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361, 1911-1916.
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1977. Nocardioform Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 159-180.
- Goodfellow, M., Orlean, P.A.B., Collins, M.D., Alshamaony, L., Minnikin, D.E., 1978. Chemical and numerical taxonomy of strains received as *Gordonia aurantiaca*. *J. Gen. Microbiol.* 109, 57-68.
- Goodfellow, M., Minnikin, D. E., 1981a. The genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. *The Prokaryotes: A handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows and H.G.Schlegel, eds), Springer Verlag, Berlin, II, 2016-2027.
- Goodfellow, M., Minnikin, D. E., 1981b. Classification of nocardioform bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektion skrankheiten und Hygiene. I. Abteilung, Supplement*, 11, 7-16.
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Todd, C., Alderson, G., Minnikin, S. M., Collins M.D., 1982. Numerical and chemical classification of *Nocardia amarae*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1283-1297.
- Goodfellow, M., Minnikin, D. E., 1984. Circumscription of the genus. In: Kubica, G.P. and Wayne, L.G. (eds.): *The Mycobacteria*, New York, Marcel Dekker, 1-24.
- Goodfellow, M., 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., Maldonado, L.A., 2006. The families *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Nocardiaceae* and *Tsukamurellaceae*. *The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria*. Edited by Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., 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.

- Gordon, R.E., Mihm, J.M., 1962. The type species of the genus *Nocardia*. J. Gen. Microbiol., 27, 1-10.
- Hassan, A. Ul., Wellington, E.M., 2009. *Actinobacteria. Encyclopedia of Microbiology* 3th edition by Moselio Schaechter. 26-44.
- 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.
- Hayakawa, M., 2008. Studies on the Isolation and Distribution of Rare Actinomycetes in Soil. Actinomycetologica 22, 12-19.
- Işık, K., Kariptaş, E., Şahin, N., 2001. Identification and Evaluation of Clinically Significant *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia farcinica* and *Nocardia otitidiscaviarum* Strains Using Pyrolysis Mass Spectrometry (PyMS). Turk J Biol, Tübitak. 25, 103-111.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R., 1969. Evolution of protein molecules. *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.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Kudo, T., Taniguchi, H., Nishimura, K., Mikami, Y. 2004. First Isolates of *Nocardia abscessus* from Humans and Soil in Japan. Jpn. J. Med. Mycol., 45, 17-21.
- 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.
- Keddie, R. M., Bousfield, I. J., 1980. Cell wall composition and identification of coryneform bacteria. In: Goodfellow, M., Board, R.G. (eds.): *Microbiological Classification and Identification*. London: Academic Press, 167-188.
- Koerner R.J., Goodfellow, M., Jones, A.L., 2009. The genus *Dietzia* : a new home for some known and emerging opportunist pathogens. Fems Immunol Med Microbiol 55, 296-305.

- Kolbert, C.P., Rys, P.N., Hopkins, M., Lynch, D.T., Germer, J.J., O'Sullivan, C.E., Trampuz, A., Patel, R., 2004. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis for Identification of Bacteria in a Clinical Microbiology Laboratory. *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, Washington D.C., Chapter 29, 361-377.
- Konstantinidis, K. T., Tiedje J. M., 2005. Towards a Genome-Based Taxonomy for Prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6258–6264.
- Köksal F., Yaman A., 2003. Farklı Bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvar Yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun.
- Kroppenstedt, R. M., 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, (ed. Goodfellow, M. and Minnikin, D. E.) Academic Press, London. 173–199.
- 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.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175. Edited by Stackebrandt, E and Goodfellow, M. John Wiley and Sons, New York.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F., 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producer of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 399–405.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P., 1970a. A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In: H.Prauser (Ed.) *The Actinomycetales*, Gustav Fischer Verlag. Jena, Germany. 393-405.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P., 1970b. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J. Syst. Bacteriol.*, 20, 435-443.
- Lechevalier, M.P., De Bievre, 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. *Zbl. Bakteriol. 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.
- Lepp, P.W., Relman, D.A., 2004. Molecular Phylogenetic Analysis. *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, Washington D.C., Chapter 13, 161-180.
- Li, J., Zhao,G.Z., Zhang, Y.Q., Klenk, H.P., Pukall, R., Qin,S., Xu L.H., Li W.J. 2008. *Dietzia schimae* sp. nov. and *Dietzia cercidiphylli* sp. nov., from surface- sterilized plant tissues. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2549–2554.
- Mikami, Y., 2007. Biological work on medically important *Nocardia* Species. *Actinomycetologica*, 21, 46-51.
- 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. In: Bousfield, I.J. and Callely, A.G. (eds.): *Coryneform Bacteria*, London, Academic Press., 85-160.
- Minnikin, D. E., Goodfellow, M., 1980. Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. In: *Microbiological Classification and Identification* (M. Goodfellow and R.G. Board, eds). Academic Press, London, 189-256.
- Minnikin, D. E., Minnikin, S. M., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., 1984. Extraction of mycobacterial mycolic acids and other long-chain compounds by an alkaline methanolysis procedure. *J.Microbiol. Meth.* 2, 243-249.

- Nava, V.R., Couble, A., Molinard, C., Sandoval, H., Borion, P., Laurent F., 2004. *Nocardia mexicana* sp.nov., a New Pathogen Isolated from Human Mycetomas. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10), 4530-4535.
- Nava, V.R., Khan, Z. U., Pötter G., Kroppenstedt, R.M., Boiron, P., Laurent, F., 2007. *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1482–1486.
- Pagilla, K. R., Jenkins, D., Kido, W., 1998. *Nocardia* effects in waste activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 38 (2), 49-54.
- Peker, E. A., 2003. Klinik Öneme Sahip *Nocardia* Suşlarının Nümerik Taksonomisi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 111 s.
- 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(2): 274-279.
- 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.
- Rainey, F.A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S., Stackebrandt, E., 1995a. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origins of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiology* 141, 523-528.
- Rainey, F. A., Klatte, S., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., 1995b. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *Int J Syst Bacteriol* 45, 32–36.
- Rapp, M., 1974. Indikatorzusätze zur Keimdifferenzierung auf Würze- und Malzextrakt-Agar. - *Milchwiss.*, 29, 341-344.
- 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.
- 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 Clinical Microbiology* 41 (10), 4497-4501.
- Schleifer, K. H., Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 36, 407-477.
- 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., Yun, Y.W., Lee, S.D., 2007. *Nocardia speluncae* sp. nov., isolated from a cave. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2932-2935.
- Sivakumar, K., 2008. Actinomycetes. Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Stackebrandt, E., 1997. Proposal for a new hierarchical classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 479-491.
- Stackebrandt, E., 2006. *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. (Stackebrandt, E., Ed.) Springer. 320s.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 417-420.
- 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.
- Trevisan, V., 1889. I. Generi e le Specie delle Batteriacee. Milan i Zanaboni and Gabuzzi
- Uchida, K., Aida, K., 1977. Acyl type of bacterial cell wall: its simple identification by colorimetric method. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 23, 249-260.

- Uchida, K., Aida, K., 1979. Taksonomic significance of cell-wall acyl type in *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* group by a glycolate test. J. Gen. Appl. Microbiol. 25, 169-189.
- Uchida, K., Aida, K., 1997. Intra-and intergen relation-ships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:182-90.
- Uhde, K.B., Pathak, S., McCullum, I. Jr, Jannat-Khah D.P., Shadomy, S.V., Dykewicz, C.A., Clark, T.A., Smith, T.L., Brown, J.M., 2010. Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. Clin Infect Dis.51(12), 1445-8.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., 9 other authors, 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int J Syst Bacteriol 37, 463–464.
- Weid, I.V.D., Marques, J.M., Cunha, C.D., Lippi, R.K., dos Santos, S.C.C., Rosado, A.S., Lins, U., Seldin, L., 2007. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamomea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. Systematic and Applied Microbiology. 30, 331-339.
- 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., Wellington, E.M. H., Sneath, P.H.A., Sackin, M. J., 1983. Numerical classification of Streptomyces and related genera. Journal of General Microbiology, 129, 1743-1813.
- Yamamura H., Hayakawa M., Limura 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., Limura, Y., 2005. *Nocardia takedensis* sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. Int J Syst Evol Microbiol 55, 433–436.

- Yassin, A. F., Young, C.C., Lai, W.A., Hupfer, H., Arun, A.B., Shen, F.T., Rekha, P.D., Ho, M.J. 2007. *Williamsia serinedens* sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 558–561.
- 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.
- J.P.Euzéby; List of Procaryotic names with standing in Nomenclature. www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html (15.06.2011).
- J.P.Euzéby; List of Procaryotic names with standing in Nomenclature, www.bacterio.cict.fr/d/dietzia.html (15.06.2011).
- Mycolic Acids, <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0006.htm> (15.06.2011).
- NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (15.06.2011).
- Silva; <http://www.arb-silva.de> (15.06.2011).
- EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk> (15.06.2011).

EKLER

EK-A: Kùltür Ortamlarının Bileşimi ve Hazırlanışı

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

Humik Asit Vitamin Agar (HV agar), *Nocardia* ve nadir aktinomiset izolasyonunda seçici besiyeri olarak kullanıldı.

Humik asit	1 g
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 (Acumedia)	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,2

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

Vitamin Stok Solusyonu

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

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

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

Organizmaların geliştirilmesinde genel besiyeri olarak kullanılmıştır.

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

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

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

Tryptone Yeast Glucose Extract Agar ortamı, topraktan bakteri izolasyonu ve mikolik asit analizlerinde kullanılacak organizmaların geliştirilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

Tripton (Oxoid)	3 g
Maya özütü (Acumedia)	5 g
Glukoz (Merck)	5 g
Agar (Acumedia)	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7,0

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

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

Glukoz Yeast Malt Ekstrakt (GYME, Rapp, 1974)

Glukoz Yeast Malt Ekstrakt (GYME) *Nocardia* izolasyonunda ayırt edici besiyeri olarak kullanıldı.

Glukoz (Merck)	4 g
Maya özütü (Acumedia)	4 g
Malt özütü (Merck)	10 g
CaCO ₃	2 gr
Agar (Acumedia)	12 gr
Saf su	1 litre
pH	7,2-7,4

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.

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

Glucose Yeast-Extract Broth

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

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

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

Glucose-Malt-Yeast Extract Broth

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

Glukoz (Merck)	4 g
Maya özütü (Acumedia)	4 g
Malt özütü (Merck)	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 100 ml'lik erlenlere 40 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve ağızları önce pamukla kapatılıp ardından alüminyum folyoyla sarıldıktan sonra 121°C' de 20 dk otoklavla steril edildi.

Tryptone Yeast Glucose Extract Broth

Tryptone Yeast Glucose Extract Agar ortamı, topraktan bakteri izolasyonu ve mikolik asit analizlerinde kullanılacak organizmaların geliştirilmesinde kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

Tripton (Oxoid)	3 g
Maya özütü (Acumedia)	5 g
Glukoz (Merck)	5 g
Distile su	1000 ml
Ph	7,0

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

Sensitest Agar (Ericsson ve Sherris, 1971)

Antimikrobiyal aktivite testinde test organizmalarını gelişmesi amacıyla kullanılmıştır.

Sensitest agar (Oxoid)	40 gr
Distile su	1 lt

40 gr Sensitest agar 1lt distile suda eritilerek otoklavda 121°C' de 20 dk otoklavla steril edildi.

% 0,5'lik Nütrient Agar (Williams ve ark., 1983)

Antimikrobiyal aktivite testinde, test patojeni olarak kullanılan organizmaların gelişmeleri için kullanılan kültür ortamıdır.

Nütrient Agar (Oxoid)	5 gr
Saf su	1000 ml

Ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü ve oluşan karışım, her bir organizma için erlenlere transfer edildikten sonra, 121°C' de 15 dk otoklavla steril edildi.

EK-B: Çözeltilerin Bileşimi ve Hazırlanışı

Mikroorganizmaların İzolasyonu Aşamasında kullanılan Çözeltiler

Ringer çözeltisi

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

Ringer	1 tablet
Distile su	500 ml

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

Sükroz çözeltisi (Yamamura ve ark., 2003)

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

Sükroz	20 gr
Distile Su	80 ml

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

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

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

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

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

Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

0.5 M EDTA, pH 8

EDTA(Merck)	186,1 g
DDH 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 (Amresco)	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 berraklaşınca kadar çözümlenerek 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)	20 mg
TE tamponu (Otoklav edilmiş)	10 ml

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

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 berraklaşınca 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 (Corning, Germany) 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.

İzo-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 (Merck)	70 ml
DDH ₂ O (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 (1 mg/ml)

RNAaz (AppliChem)	10 mg
TE tamponu	10 ml

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

8M LiCl

LiCl (Merck)	33,912 g
DDH ₂ O	100 ml

33,912 g LiCl tartılarak bir beher içerisinde konuldu ve üzerine 60 ml DDH₂O ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde 50°C'de berraklaşınca kadar çözöldü 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.

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

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

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

1xTBE, pH 8

10xTBE tamponu	50 ml
DDH ₂ O	450 ml

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

Brom fenol mavisi (Yükleme Tamponu)

Brom fenol mavisi (AppliChem)	40 mg
Gliserol (Merck)	5 ml
0.5 M EDTA	1.5 ml
DDH ₂ O	3,5 ml

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

Agaroz jel hazırlanışı (% 1'lik)

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

Agaroz (Serva)	0.35 g
1xTBE tamponu	35 ml

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

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

Toplam hacim 200 ml olacak şekilde hazırlanan fosfat tamponu 121°C’de 20 dk otoklavlandı ve oda sıcaklığına düştükten sonra +4°C’de saklandı.

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

Metanol (Merck)	90 ml
Toluen (Merck)	45 ml
Konsantre Sülfürik Asit (Merck)	3 ml

Asit metanolizis yöntemiyle biyomasların parçalanması için yukarıda belirtilen oranlarda cam pipetlerle çekilerek hazırlanan kimyasallar ışık geçirmeyen cam çözelti şişelerine aktarıldıktan sonra +4°C’de saklandı.

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

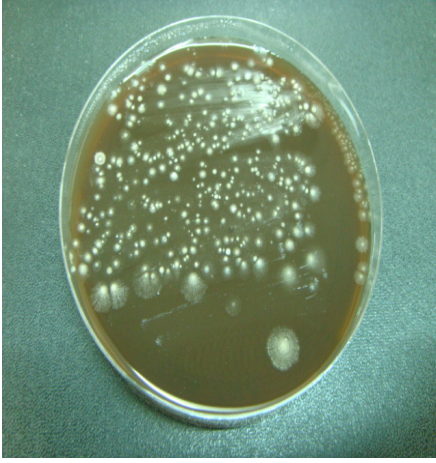
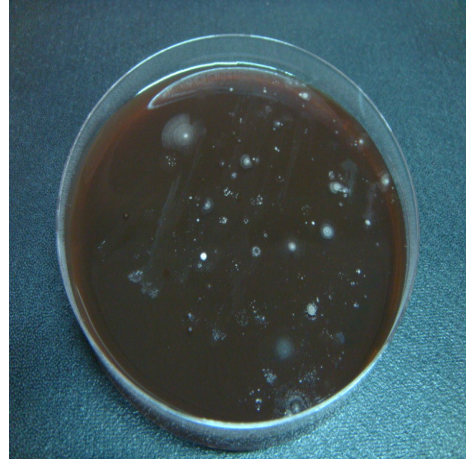
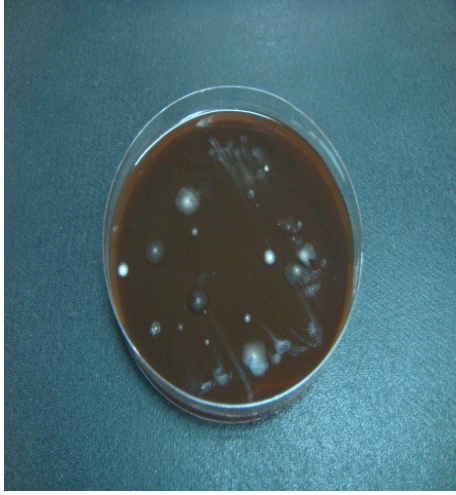
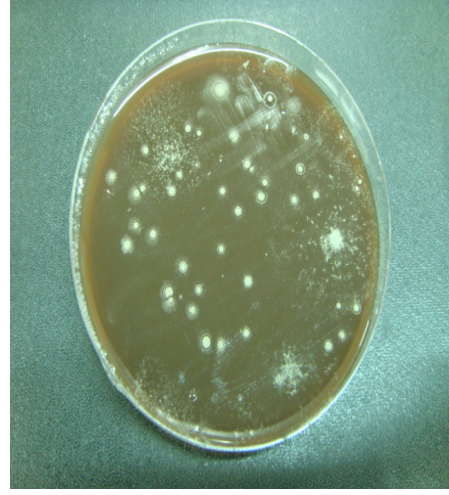
Petrol Eter (Merck)	95 ml
Aseton (Merck)	5 ml

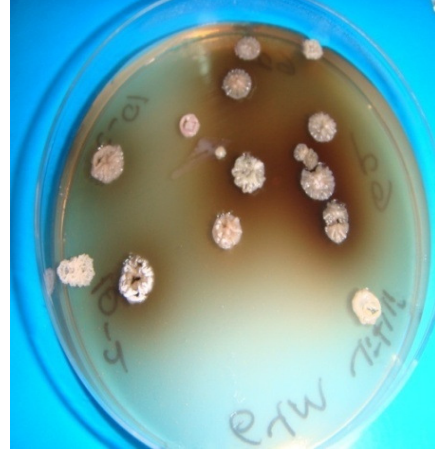
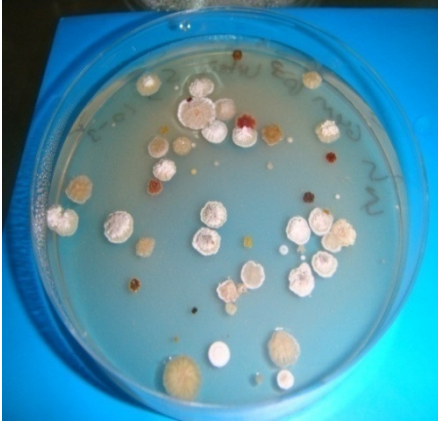
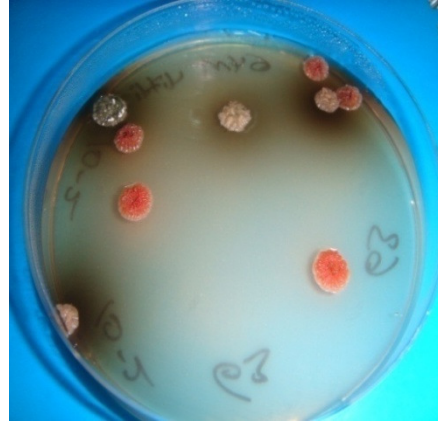
Petrol eter ve aseton belirtilen miktarda steril cam pipetlerle çekilip, alüminyum folyoyla kaplı 100 ml’lik cam şişeye tranfer edildi. Mikolik asit testinde yürütücü solüsyon olarak kullanılan bu çözelti yürütme sonunda atılıp her yeni yürütmede taze olarak hazırlandı.

Etanolde Molibde Fosforik Asit Solusyonu (50 g/ l)

Molibde fosforik asit (Merck)	5 g
Etanol (Merck)	100 ml

Mikolik asit testinde mikolik asit esterlerini görünür hale getirmek için her spreylemeden önce taze olarak 50 ml hazırlandı. Her bir plaka için 50 ml'lik etanolde molibde fosforik asit solusyonu yeterli geldiği için bu orana göre spreyleme solusyonu hazırlandı.

EK-C: Farklı Besiyerleri ile Yapılan Toprak İzolasyonun Petri Görüntüleri**a) 10^{-1} dilüsyon plağı****b) 10^{-2} dilüsyon plağı****c) 10^{-3} dilüsyon plağı****d) 10^{-1} dilüsyon plağı****Şekil 1. a-d.** HV agar ortamında, farklı habitatlardan alınan toprak örneklerinin dilüsyon plakları

a) TYGA vitaminli 10^{-3} dilüsyon plağıb) TYGA 10^{-3} dilüsyon plağıc) GYME vitaminli 10^{-3} dilüsyon plağıd) GYME 10^{-3} dilüsyon plağı

Şekil 2. a-d. Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA), Tryptone Yeast Glucose Extract Agar (TYGA) vitaminli, Glucose Yeast Extract Malt Agar (GYME), Glucose Yeast Extract Malt Agar (GYME) vitaminli agar ortamlarında, farklı habitatlardan alınan toprak örneklerinin dilüsyon plakları

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Tuğba KESKİN

Doğum Yeri: Konya

Doğum Tarihi: 11.10.1984

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu;

Lise: Samsun Anadolu Lisesi (1999-2002)

Lisans: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü (2003-2007).

Yüksek Lisans: Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Bölümü (2008-2011).

İletişim Bilgileri: bylgtugba@hotmail.com.