

*Alhagi pseudoalhagi* ve *Colutea arborescens*  
RİZOSFERİNDEN *Streptomyces*' LERİN  
İZOLASYONU ve  
POLİFAZİK TEKNİKLERLE  
TANIMLANMASI

AYSEL VEYİSOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Alhagi pseudoalhagi* ve *Colutea arborescens* RİZOSFERİNDEN *Streptomyces*'  
LERİN İZOLASYONU ve POLİFAZİK TEKNİKLERLE TANIMLANMASI**

**AYSEL VEYİSOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN**

**SAMSUN-2010**

**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Bu çalışma jürimiz tarafından 25/01/2010 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji  
Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Başkan: Prof. Dr. Yunus BEKDEMİR**

**Üye: Prof. Dr. Cafer EROĞLU**

**Üye: Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN**

**Onay:**

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.**

...../...../.....

**Prof. Dr. Hasan GÜMÜŞ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRÜ**

## ***Alhagi pseudoalhagi* ve *Colutea arborescens* RİZOSFERİNDEN *Streptomyces*' LERİN İZOLASYONU VE POLİFAZİK TEKNİKLERLE TANIMLANMASI**

### **ÖZET**

Bu çalışmada, *Alhagi pseudoalhagi* ve *Colutea arborescens* rizosferinden *Streptomyces* cinsi üyelerinin izolasyonu ve polifazik taksonomileri yapılmıştır.

Dilüsyon plak tekniği uygulanan izolasyonda cycloheximide (50µg ml), nystatin (50µg ml) ve rifampicin (0.5µg ml) ilaveli nişasta kazein agar üzerinde 0.1ml toprak dilüsyonu ilave edilen izolasyon plakları 28°C'de 14 gün inkübe edildi. İzolasyon plaklarından saflaştırılan 17 izolat farklı besi ortamlarındaki morfolojik, kültürel ve pigmentasyon özelliklerine göre karakterize edildi.

Test organizmalarına nümerik analizler için toplam 48 birim karakterden oluşan besinsel, biyokimyasal ve degradasyon testleri uygulanmış, sonuçlar NTSys-pc programında Jaccard-UPGMA algoritmasına göre analiz edilmiştir.

PCR amplifikasyonları yapılan test organizmalarının 16S rRNA gen bölgeleri *EcoR* I, *Pst* I ve *Sau3* AI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi gerçekleştirilmiştir. *Pst* I, test organizmalarında iki ya da üç fragment oluşturarak farklılaşma sağlarken *EcoR* I ve *Sau3* AI tüm test organizmalarında aynı sayı ve büyüklükte fragmentler verdiğiinden farklılaşma sağlamamıştır.

RAPD-PCR fragmentleri bakımından M13f universal primeri ile PCR amplifikasyonları gerçekleştirilen test organizmalarında filogenetik ve nümerik analizlerle uyumlu farklılaşma görülmüştür.

Test izolatlarının 16S rRNA gen bölgeleri nükleotid dizileri ile NCBI, RDP-II RDP, DDBJ ve EMBL gibi databanklardan elde edilen *Streptomyces* tip türleri 16S rRNA nükleotid dizileri PHYDIT programında karşılaştırmalı olarak dizilenmiştir. 16S rRNA nükleotid dizi analizi filogenetik dendogramı, last-squares, maximum-parsimony ve neighbour-joining algoritmeleri phylip programı kullanılarak oluşturulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Streptomyces*, 16S rRNA, polifazik taksonomi, moleküler sistematik.

**THE ISOLATION OF *Streptomyces* FROM *Alhagi pseudoalhagi* and *Colutea arborescens* LEGUMENS RHIZOSPHERE and THE CHARACTERIZATION with POLYPHASIC TECHNIQUES**

**ABSTRACT**

In this study, the isolation and polyphasic taxonomy of *Streptomyces* from *Alhagi pseudoalhagi* and *Colutea arborescens* rhizosphere were made.

In dilution plate technique-applied isolations, isolation plates to which 1ml of soil dilution was added on cycloheximide (50 µg ml), nystatin (50 µg ml) and rifampicin (0.5 µg ml) supplemented starch casein agar were incubated at 28°C for 14 days. Seventeen isolates subcultured from isolation plates were characterized according to cultural, morphological and pigmentation features in different nourishment agars.

For numerical analyses, total 48 tests containing of nutritional, biochemical and degradation tests on organisms and the results analysed according to Jaccard-UPGMA algorithms using NTSys-pc programme.

PCR amplification 16S rRNA genes from the strains were digested by *EcoR* I, *Pst* I, *Sau3* AI. While *Pst* I created differentiation in test organisms constituting two or three fragments, *EcoR* I and *Sau3* AI created no differentiation in all tests organisms as they provided fragment with the same number and size.

RAPD-PCR fingerprints of the test organisms were carried out by PCR amplification using the universal primer M13f and straining differentiated from each other accord with phenotypic and phylogenetic analysis.

16S rRNA nucleotide base sequence of *Streptomyces* type strains obtained from databank such as NCBI, RDP-II, RDP, DDBJ, EMBL and base sequences of isolates were aligned comparatively by using PHYDIT program. Phylogenetic dendogram of 16S rRNA sequence analysis were made using the last-squares, maximum parsimony and neighbour-joining algorithms.

**Keywords:** *Streptomyces*, 16S rRNA, polyphasic taxonomy, molecular systematic.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince fikir ve tecrübeleriyle çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, her türlü fedakârlığı hiç düşünmeden yapan çok değerli danışman hocam **Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse sonuçların analizinde her türlü yardımı yapan, her daim yanımda olup bana güven veren **Yrd. Doç. Dr. Anıl SAZAK** hocama özel olarak çok teşekkür ederim.

Tezimin düzenlenmesinde yardımcı olan çalışma arkadaşlarım **Mustafa ÇAMAŞ, Fatih ERCİ** ve **İlem TETİK**'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü fedakârlığı yapan, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem **Süveyla VEYİSOĞLU**, babam **Adnan VEYİSOĞLU**' na ablam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                      | <u>Sayfa No:</u> |
|----------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                 | <b>1</b>         |
| <b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>                                       | <b>4</b>         |
| 2. 1. Genel Bilgiler.....                                            | 4                |
| 2. 1. 1. <i>Streptomyces</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....         | 4                |
| 2. 1. 2. <i>Streptomyces</i> Cinsinin Ekolojisi.....                 | 6                |
| 2. 2. Polifazik Taksonomi.....                                       | 9                |
| 2. 2. 1. Nümerik Taksonomi.....                                      | 10               |
| 2. 2. 2. Kemotaksonomi.....                                          | 14               |
| 2. 2. 3. Moleküler Taksonomi.....                                    | 15               |
| 2. 2. 3. 1. Ribozomal RNA (rRNA) Analizi.....                        | 15               |
| 2. 2. 3. 2. DNA-Bazlı Tipleme Metotları (DNA fingerprintings). ..    | 17               |
| <b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>                                     | <b>20</b>        |
| 3.1. <i>Streptomyces</i> ' lerin Seçimi ve Kaynağı.....              | 20               |
| 3. 1. 1. Mikroorganizmaların İzolasyonu.....                         | 20               |
| 3. 1. 1. 1. Dilüsyon Plak Tekniği.....                               | 20               |
| 3. 1. 2. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması.....                  | 21               |
| 3. 1. 3. İzolatların Renk Gruplarının Belirlenmesi.....              | 21               |
| 3. 1. 4. İzolatların Stoklanması.....                                | 21               |
| 3. 1. 5. Test Organizmalarının Tuz Toleranslarının Belirlenmesi..... | 23               |
| 3.2. Nümerik Taksonomi.....                                          | 24               |
| 3. 2. 1. Kùltürler.....                                              | 24               |
| 3. 2. 2. Test Seçimi.....                                            | 24               |
| 3. 2. 3. Verilerin Toplanması.....                                   | 24               |
| 3. 2. 4. Degredasyon Testleri.....                                   | 27               |
| 3. 2. 5. Besinsel Testler.....                                       | 29               |
| 3. 2. 5. 1. Temel Karbon Kaynaklarında Gelişme.....                  | 29               |
| 3. 2. 5. 2. Temel Azot Kaynaklarında Gelişme.....                    | 29               |
| 3. 2. 6. Verilerin Kodlanması.....                                   | 30               |
| 3. 2. 7. İstatiksel Analiz.....                                      | 30               |

|                                                                                                  | <b><u>Sayfa No:</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 3.3. Antimikrobiyal Aktivite Testi.....                                                          | 31                      |
| 3.4. Test Organizmalarının Karakterizasyonu.....                                                 | 33                      |
| 3. 4. 1. Morfolojik ve Kültürel Karakterizasyon.....                                             | 33                      |
| 3.5. DNA İzolasyonu.....                                                                         | 34                      |
| (a) Küçük Miktar Genomik DNA İzolasyonu.....                                                     | 34                      |
| (b) DNA İzolasyonu İçin Hücre Pelletinin Elde Edilmesi.....                                      | 34                      |
| (c) DNA İzolasyon Kontrolü.....                                                                  | 36                      |
| 3.6. 16S rRNA' nın PCR Amplifikasyonu.....                                                       | 37                      |
| 3.7. Amplifiye Edilmiş rDNA Restriksiyon Analizi (ARDRA).....                                    | 39                      |
| 3.8. Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD-PCR; Random Amplified Polymorphic DNA)..... | 40                      |
| 3.9. 16S rRNA Sekans Çalışması.....                                                              | 42                      |
| (a)16S rRNA Sekans Verilerinin Analizi.....                                                      | 42                      |
| (b)Filogenetik Dendogramın Oluşması.....                                                         | 43                      |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                          | <b>44</b>               |
| 4.1. <i>Streptomyces</i> Üyelerinin Rizosferden İzolasyonu ve Karakterizasyonu                   | 44                      |
| 4. 1. 1. Toprak Örneklerinin Kaynağı ve <i>Streptomyces</i> ' lerin Seçimi.....                  | 44                      |
| 4.2. Test Organizmalarının Renk Gruplarının Belirlenmesi.....                                    | 45                      |
| 4.3. Test Organizmalarının Tuz Toleranslarının Belirlenmesi.....                                 | 46                      |
| 4.4. Nümerik Taksonomi.....                                                                      | 47                      |
| 4.5. Test Organizmalarının Karakterizasyonu.....                                                 | 53                      |
| 4. 5. 1. Morfolojik ve Kültürel Özellikler.....                                                  | 53                      |
| 4.6. Antimikrobiyal Aktivite Testi.....                                                          | 58                      |
| 4.7. 16S rRNA' nın PCR Amplifikasyonu.....                                                       | 60                      |
| 4.8. Amplifiye Edilmiş rDNA Restriksiyon Analizi (ARDRA).....                                    | 61                      |
| 4.9. Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD-PCR; Random Amplified Polymorphic DNA)..... | 64                      |
| 4.10. 16S rRNA Sekans Analizi.....                                                               | 69                      |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>                                                                 | <b>76</b>               |
| <b>6. KAYNAKLAR.....</b>                                                                         | <b>81</b>               |
| <b>EK A. Kültür Ortamlarının Bileşimi, Hazırlanışı ve Sterilizasyonu.....</b>                    | <b>93</b>               |

|                                                                                                  | <b><u>Sayfa No:</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>EK B.</b> Tindalizasyon Tekniği ile Sterilizasyon.....                                        | 113                     |
| <b>EK C.</b> Test İzolatlarının Farklı Besiyerlerinde Morfolojik ve Kültürel<br>Özellikleri..... | 114                     |
| <b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....                                                                         | <b>137</b>              |

## SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

|                         |                                                                                                             |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AMS</b>              | : <i>International Association of Microbiological Societies</i>                                             |
| <b>ARDRA</b>            | : Amplified ribosomal DNA restriction analysis                                                              |
| <b>ASM</b>              | : <i>Subcommitee on Actinomycetes of the Committee on Taxsonomy of The American Society of Microbiology</i> |
| <b>ATCC</b>             | : American Type Culture Collection                                                                          |
| <b>bp</b>               | : Baz çifti                                                                                                 |
| <b>DDH<sub>2</sub>O</b> | : Deiyonize distile su                                                                                      |
| <b>DSMZ</b>             | : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen                                                    |
| <b>EDTA</b>             | : Etilendiamintetraasetat                                                                                   |
| <b>ISP</b>              | : International <i>Streptomyces</i> Project                                                                 |
| <b>ITS</b>              | : Internally transcribed spacer                                                                             |
| <b>NCIB</b>             | : National Collection of Industrial Bacteria                                                                |
| <b>OTU's</b>            | : Operational Taxonomy Units                                                                                |
| <b>PCR</b>              | : Polymerase chain reaction                                                                                 |
| <b>PFGE</b>             | : Pulsed-field gel electrophoresis                                                                          |
| <b>RAPD</b>             | : Random amplified polymorphic DNA                                                                          |
| <b>RFLP</b>             | : Restriction fragment lenght polymorphism                                                                  |
| <b>S<sub>J</sub></b>    | : Jaccard coefficient                                                                                       |
| <b>S<sub>SM</sub></b>   | : Simple matching coefficient                                                                               |
| <b>UPGMA</b>            | : Unweighted pair group method with arithmetic averages                                                     |

## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                                        | <u>Sayfa No.</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>Tablo 3.1.</b> İzolasyon çalışmasının yapıldığı rizosfer örneklerinin alındığı bitki türleri ve lokaliteleri.....                                                   | 20               |
| <b>Tablo 3.2.</b> Test organizmaları ve kaynakları .....                                                                                                               | 22               |
| <b>Tablo 3.3.</b> Nümerik taksonomik çalışmada kullanılan birim karakterler.....                                                                                       | 26               |
| <b>Tablo 3.4.</b> Antimikrobiyal aktivite testi için seçilen patojen organizmalar.....                                                                                 | 32               |
| <b>Tablo 3.5.</b> Sekans çalışmalarında kullanılan primerlerin nükleotit dizileri ve bağlanma bölgeleri.....                                                           | 42               |
| <b>Tablo 4.1.</b> Rizosfer örneklerinin alındığı bitki türleri, lokaliteleri .....                                                                                     | 44               |
| <b>Tablo 4.2.</b> Test organizmalarının oatmeal agarda (ISP 3 agar; Shirling ve Gottlieb, 1966) renk grupları tayini .....                                             | 45               |
| <b>Tablo 4.3.</b> Test organizmalarının %10, %15 ve %20'lik tuz konsantrasyonunda gelişimi.....                                                                        | 46               |
| <b>Tablo 4.4.</b> Test organizmalarına uygulanan nümerik testlerin sonuçları .....                                                                                     | 48               |
| <b>Tablo 4.5.</b> Test organizmalarının farklı besiyerlerinde morfolojik ve kültürel özellikleri.....                                                                  | 54               |
| <b>Tablo 4.6.</b> Test organizmalarının patojenlere karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm).....                                                              | 58               |
| <b>Tablo 4.7.</b> Organizmalarının <i>EcoR</i> I, <i>Pst</i> I ve <i>Sau3</i> AI ile PCR-RFLP yaklaşık fragment büyüklükleri .....                                     | 62               |
| <b>Tablo 4.8.</b> Test organizmalarının RAPD-PCR baz çifti büyüklüğü .....                                                                                             | 66               |
| <b>Tablo 4.9.</b> Test organizmaları ve bazı tanımlanmış <i>Streptomyces</i> türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı benzerlik değerleri ve nükleotit sayısı ..... | 71               |
| <b>Tablo 4.10.</b> Test organizmaları ve bazı tanımlanmış <i>Streptomyces</i> türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı benzerlik değerleri ve nükleotid sayısı..... | 72               |
| <b>Tablo 4.11.</b> Test organizmaları ve bazı tanımlanmış <i>Streptomyces</i> türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı benzerlik değerleri ve nükleotid sayısı..... | 73               |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                               | <b><u>Sayfa No.</u></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Şekil 4.1.</b> S <sub>SM</sub> -UPGMA analizine göre test izolatları arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram.....                                                                                                                           | 52                      |
| <b>Şekil 4.2.</b> Test organizmalarının 16S rRNA' yı kodlayan gen bölgesinin amplifikasyon ürünleri. M, PCR DNA marker (2000-50 bp). ....                                                                                                     | 60                      |
| <b>Şekil 4.3.</b> Test organizmalarının <i>EcoR</i> I restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR-RFLP parmak izi. M, PCR DNA marker <sup>TM</sup> (2000-50bp) .....                                                                              | 63                      |
| <b>Şekil 4.4.</b> Test organizmalarının <i>Pst</i> I restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR-RFLP parmak izi. M, PCR DNA marker <sup>TM</sup> (2000-50bp) .....                                                                               | 63                      |
| <b>Şekil 4.5.</b> Test organizmalarının <i>Sau3</i> AI restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR-RFLP parmak izi. M, PCR DNA marker <sup>TM</sup> (2000-50bp) .....                                                                             | 64                      |
| <b>Şekil 4.6.</b> Test organizmalarının %2' lik agaroz jel üzerinde RAPD-PCR parmak izi. M, PCR DNA marker <sup>TM</sup> (2000-50bp) .....                                                                                                    | 65                      |
| <b>Şekil 4.7.</b> RAPD-PCR verilerinin Jaccard-UPGMA analizine göre test izolatları arasındaki ilişkiyi gösteren dendogram.....                                                                                                               | 67                      |
| <b>Şekil 4.8.</b> Test organizmaları ve bazı <i>Streptomyces</i> ait tip türlerinin 16S rRNA sekansına dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı (Nodlarda %50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir) ..... | 70                      |

## 1.GİRİŞ

*Streptomyces* cinsi Walksman ve Henrici (1943) tarafından morfolojisi ve hücre duvar kemotipleri temel alınarak *Streptomycetaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmıştır. Fenotipik özelliklerin kullanıldığı nümerik taksonomik sistemlerin gelişimi, *Streptomycetaceae* familyası içerisindeki intergenerik ilişkilerin çözümüne yardımcı olmuştur ve yeniden bir sınıflandırma yapılarak *Streptomyces* cinsine *Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* ve *Microellobosporia* olmak üzere altı cins daha eklenmiştir (Williams ve ark., 1983; Goodfellow ve ark., 1986a-d). Fenotipik karakterlerin kullanıldığı bu ilk nümerik sistemlerle birlikte moleküler biyolojik karakterlerin birleştirilmesi ile Actinobacteria sınıfı içerisindeki cinslerin tanımlamasında önemli değişiklikler olmuştur (Stackebrandt ve ark., 1997). Bu değişikliklere paralel olarak bazı organizma gruplarının taksonomik statüleri de değişmiştir. *Streptomyces* ve *Streptoverticillium* hem aynı hücre-duvar tip 1 (Lechevalier ve Lechevalier, 1970) yapısına hem de aynı fajlarla lizize (Wellington ve Williams, 1981) olup filogenetik olarak yakından ilişkili olmalarına rağmen iki ayrı cins olarak sınıflandırılmışlardır (Stackebrandt ve Woese, 1981). Immunodiffzyon çalışmaları (Ridell ve ark., 1986) *Streptomyces lavendulae* türü ile *Streptoverticillium* cinsinin üyelerinin yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Kämpfer ve ark. (1991) bu iki organizma grubuna bazı fizyolojik testler uygulayarak benzer özellikler gösterdiklerini belirlemiştir. Witt ve Stackebrandt (1990) 16S ve 23S rRNA sonuçlarını kıyaslayarak *Streptoverticillium* cinsinin *Streptomyces* cinsi ile sinonim olduğu sonucuna varmıştır.

Taksonomik konumunda değişiklik yapılan diğer bir cins ise *Kitasatosporia*'dır. Wellington ve ark. (1992) tarafından hücre duvar yapısı ve 16S rRNA sekans farklılığına rağmen *Streptomyces* cinsi içerisine dahil edilen *Kitasatosporia* cinsi üyelerinin 16S rRNA gen dizi analizleri ile *Streptomyces* cinsi üyelerinin 16S rRNA gen dizi analizleri karşılaştırıldığında (Zhang ve ark., 1997) *Kitasatosporia* cinsinin *Streptomyces*'lerden ayrı bir monofiletik klad olduğunu göstererek Wellington ve ark. (1992) 'ın yaptığı tanımlamanın geçerliliğini ortadan kaldırmışlardır.

Pek çok kemotaksonomik özelliklerdeki benzerlikten dolayı *Kineosporia* ve *Sporichthya*, *Streptomyces* cinsi ile birlikte gruplandırılmıştır (Logan, 1994). Bu iki cins

ribozomal RNA gen dizisi sekanslama çalışmalarının sonucunda birbirinden bağımsız cinsler olarak bulunmuşlardır. *Sporichthya*, *Frankineae* subordosunun *Sporichthyaceae* familyasının bir cinsi olarak (Stackebrandt ve ark., 1997), *Kineosporia* ise *Kineococcus* cinsi ile gruplandırılmıştır (Kudo ve ark., 1998).

1940' lar da *Streptomyces*' ler tarafından üretilen antibiyotiklerin keşfi ile yeni biyoaktif bileşikler elde etmek için cins üzerinde kapsamlı tarama çalışmaları yapılmıştır. Bu ilk çalışmalar, daha çok morfolojik ve pigmentasyon özelliklerine dayalı olduğundan, bir çoğu birbirinin sinonimi olan 3000'den fazla *Streptomyces* türü tanımlanmış ve böylece *Streptomyces* tür sayısında büyük bir artış sağlanmıştır (Williams ve ark., 1989). 1958-1962 yılları arasında iki araştırma grubu *Streptomyces* sistematigindeki bu problemlerin giderilmesi için işbirliği halinde çalışmaya başlamıştır. Çalışmalardan biri, *Subcommittee on Actinomycetes of the Committee on Taxonomy of the American Society of Microbiology* (ASM; Gottlieb, 1961), diğeri ise *Subcommittee on Taxonomy of Actinomycetes of the International Committee on Bacteriological Nomenclature of the International Association of Microbiological Societies* (AMS; Küster, 1959) tarafından sürdürülmüştür. Bu çalışmaların amacı önceden *Streptomyces*'lerin sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılan karakterleri tekrar ele alıp değerlendirmesini yapmaktır. ASM çalışmalarında, araştırmacılar standart metotlar kullanarak 21 streptomycetesini temsil eden 25 suşu araştırmış ve sonuçları yayımlamışlardır (Küster, 1961; Szabo ve Marton, 1964). Diğer bir grup olan AMS grubu ise *Streptomyces* sistematigi için, güvenilir fizyolojik testleri tavsiye etmeden önce, bunlarla ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiğini rapor etmiştir (Gottlieb, 1961).

Bu çalışmaları takiben, 1964'te *Streptomyces* cinsinin tip ve neotip suşlarının karakterizasyonunun doğru bir şekilde yapılması amacıyla, International *Streptomyces* on Bacteriological Project (ISP) planlanmıştır (Shirling ve Gottlieb, 1968a, b, 1969, 1972) . Bu projenin araştırmacıları suşların, spor zincir morfolojisi, spor yüzeyi, spor rengi, substrat miselyumu, çözünür pigment ve melanin pigment üretimi, karbon kaynaklarını kullanımını kapsayan standart kriterler belirlemişlerdir. 450' den fazla tür yeniden tanımlanmıştır ve tip suşları seçilip uluslararası geçerliliği kabul edilmiş kültür koleksiyonuna deposit edilmiştir. Williams ve ark., (1983a) fenetik karakterlere dayanan nümerik taksonomi kullanmışlardır ve tanımlanan *Streptomyces* sayısında bir

azalma olmuştur. Tanımlanan 463 türün aksine (Pridham ve Tresner, 1974b), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'* nin 8. baskısında 142 tür olarak sayısı azaltılmıştır (Williams ve ark., 1989).

Günümüzde *Streptomyces* cinsi içerisindeki türler arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi ve yeni tür tanımının yapılabilmesi için, polifazik taksonomi adı altında, nümerik taksonomi ile birlikte kemotaksonomik ve molüküler hücre duvar kompozisyonu ( Lechevalier ve Lechevalier, 1970), faj tipleri (Wellington ve Williams, 1981), DNA-DNA hibridizasyonu (Labeda, 1992), ELISA (Kirby ve Rybicki, 1986), MLEE analizi, restriksiyon analizi, PCR primerleri ya da farklı problemlerle DNA parmak izleri, 23S rRNA ve 16S rRNA dizi benzerliği (Stackebrandt ve ark., 1991 a, b) gibi metotlar da kullanılmaktadır (Manfio ve ark., 1995; Anderson ve Wellington, 2001). Bu güne kadar 550'den fazla tür tanımlanmıştır (Kumar, 2007).

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Genel Bilgiler

#### 2.1.1. *Streptomyces* Cinsinin Genel Özellikleri

*Streptomyces*' ler hem fenotipik hem de kemotaksonomik karakterler kullanılarak (Williams ve ark., 1989; Wellington ve ark., 1992) gram pozitif, aerobik ve spor oluşturan aktinomisetler olarak tanımlanmıştır (Anderson ve Wellington, 2001). Son derece oksidatif olan bu cinsin üyeleri substrat yüzeyinde yaygın dallanma gösterir ve havasal misel oluştururlar. Bu cinsin üyeleri tarafından oluşturulan filamentlerin (hiflerin) çapı 0,5-1 µm arasında olup, uzunlukları ise belirsizdir ve vejetatif fazda çoğunlukla bölme çeper içermezler. Büyüme, filamentlerin ucundan gerçekleşir ve çoğunlukla dallanma görüldüğünden vejetatif faz, kompleks, sıkı bir şekilde örülmüş matriksten oluşmakta ve bunun sonucu olarak kompakt, kıvrımlı misellerin oluşturduğu koloniler meydana gelmektedir. Koloniler yaşlandıkça sporofor olarak adlandırılan karakteristik havasal miseller oluşur. Havasal miseller ise koloni yüzeyinin üzerine doğru yükselirler ve bu misellerden sporlar meydana gelir. Havasal misellerin ve spor taşıyan yapıların şekilleri ve düzenlenmelerindeki farklılıklar *Streptomyces* cinsinde yer alan organizmaların sınıflandırılmasında temel role sahiptir (Brock ve ark., 2006).

Oluşturduğu koloniler dairemsi, likensi veya derimsi şekillerde olabilir. Başlangıçta düz olan koloniler daha sonra pamuksu veya yünsü, tozsuz veya kadifemsi görünümlü hava misellerine dönüşür (Korn-Wendisch ve Kutzner, 1992). *Streptomyces*' ler çeşitli renklerde pigment üretme yeteneğine sahiptir. Oluşturdukları pigmentlerle substrat ve hava miselyumlarına renk verirler. Ayrıca ürettikleri çözünebilir pigment, bulunduğu ortamın renk değişimine neden olur (Goodfellow ve Simpson, 1987).

*Streptomyces* cinsi, tip I *sensu* (Lechevalier ve Lechevalier, 1970) olarak karakterize edilmiş hücre duvar yapılarıyla, diğer actinomycetlerden ayrılmaktadır. Hücre duvarlarında LL-diaminopimelik asit (LL-DAP) ve glisin içerirler fakat karakteristik şekerleri yoktur (Anderson ve Wellington, 2001). *Streptomyces*'lerin sahip olduğu hücre duvarı A3γ tipinde peptidoglikan yapısındadır (Schleifer ve Kandler, 1972). Büyük oranda doymuş *iso*- ve *anteiso*- yağ asitleri, dokuz izopren ünitesi içeren altı veya sekiz hidrojenli vitaminleri ve fosfolipitlerden tipik difosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol, fosfatidilinositol ve fosfatidilinositol mannozidleri, teikoik asitleri ihtiva ederler fakat

mikolik asit içermezler (Goodfellow, 1989). DNA baz dizisinde %71-75 oranında (G+C) bulunur (Brock ve ark., 2006).

*Streptomyces* türlerin çoğu, 25-35 °C sıcaklık ve pH 6.5-8 aralığında optimum gelişme gösterirler. Buna karşılık, +4 °C'de gelişebilen psikrofilik ( Williams ve ark., 1989) ve 45-55 °C'de gelişebilen termofilik ( Goodfellow ve ark., 1987; Kim, D. ve ark., 1996; Kim ve ark., 1998) türlere de rastlanmıştır.

*Streptomyces* türleri topraktaki özellikle kitin, nişasta, lignosellüloz gibi organik maddeleri ayrıştırabilen saprofitik actinomyceteslerin iyi incelenmiş bir cinsidir. Ayrıca bitki ve hayvanlardan kalan kompleks artıkları da ayrıştırabilirler. Bu cins ekstraselüler enzimler üreterek çeşitli polimerlerin biyolojik bozunmasını sağlar. Buna ek olarak, *Streptomyces* türleri insanlar tarafından kullanılan diğer organik materyallerin (pamuk, bitki lifleri, yün, kauçuk ve plastik) yıkımında da önemli rol oynarlar ( Kämpfer, 2006).

*Streptomyces* cinsi üyeleri ticari olarak önemli ve farmakolojik olarak aktif antibiyotik, enzim, enzim inhibitörü gibi sekonder metabolit üretme yetenekleri ile diğer prokaryotlar arasında eşsizdirler ( Berdy, 1995; Saintpierre ve ark., 2003; Lee ve ark., 2005). *Streptomyces griseus*' un ürettiği streptomisin antibiyotiği ile antibiyotiklerin modern çağı başlamıştır ( Schatz ve ark., 1944). Son zamanlar da *Streptomyces*' ler doğal antifungal metabolit üretme yeteneklerine göre değerlendirilmiştir. Nohut rizosferinden elde edilen *S. rochei* ve *S. rimosus*' un *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*' ye karşı güçlü bir antagonistik etkisinin olduğu bulunmuştur (Bashar ve Rai., 1994). *S. hygroscopicus* var. *geldanus*' un ürettiği geldanamisin antibiyotiği ile nohut kök fungusu olan *Rhizoctonia solani*' ye antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur ( Rothrock ve Gottlieb., 1984). *S. griseoviridis*' in inoküle edildiği ortamlar HPLC ile incelendiğinde antifungal polien antibiyotikler belirlenmiştir ( Raatikainen ve ark., 1994).

*Streptomyces* türlerinin daha çok antibiyotik üretimi gibi yararlı özellikleri bilinmesine rağmen çok az türünün hayvanlar (insanları da içerir) ve bitkilerde hastalık yapıcı olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces somaliensis* patojenik bir tür olup insan patojenidir ve actinomycetoma adı verilen hastalığa neden olur. Bu hastalık deride zararlı enfeksiyonlar oluşturur ve ilerledikçe deri altındaki dokuya hatta kemiğe de zarar verebilir. Diğer mikroorganizmalarla birlikte streptomyceslerin alerjik akciğer hastalığına da sebep olduğu belirlenmiştir. Solunum yoluyla bulaşan mikroorganizmalar bronşit ve pneumonia gibi akciğer enfeksiyonuna neden olur ( Kämpfer, 2006). *S. albus* ve *S. anulatus* türlerinin klinik materyallerden izole edildiğine dair raporlar mevcuttur

(Trujillo ve Goodfellow, 2003). Ayrıca toprak mikrobiotasının bir üyesi olan streptomyceteslerden bitki patojeni olan ve sebzelerin toprak altı yapılarına zarar veren türlerde bulunur. *Streptomyces* türleri arasında en iyi bilinen bitki patojeni *Streptomyces scabies*' tir ve patates bitkisinin yumrularında scab lezyonuna neden olurlar (Lambert ve Loria, 1989b; Doumbou ve ark., 2001).

### 2.1.2. *Streptomyces* Cinsinin Ekolojisi

*Streptomyces*' ler doğada hemen hemen yer yerde bulunurlar. Karasal habitatta geniş dağılım göstermekle birlikte tatlı su ve denizel habitatlarda hatta içme suyunda bile bulunabilirler ( Kämpfer, 2006). Ayrıca, çürümüş bitki atıklarında, hayvan ve bitkilerde parazitik ve mutualist olarak yaşayanları da mevcuttur (McNeil ve Brown, 1994).

Streptomycetesin yüksek sayıda izole edilebildikleri ve yaşam döngüsünü gerçekleştirebildikleri doğal habitatı toprak (gübre içeren) olup, toprağın karakteristik kokusu, *Streptomyces*' lerin metabolik faaliyetleri sonucunda üretmiş oldukları ve geosminler olarak adlandırılan bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bu maddeler ise sesquiterpenoid bileşikler olup, karbon, oksijen ve hidrojenin doymamış halka bileşikleridirler. Geosminler aynı zamanda bazı siyanobakteriler tarafından da üretilirler (Brock ve ark., 2006). Çoğunlukla doğal habitat olarak nötral veya zayıf alkalın koşullarda optimum gelişme gösterirler ancak bazı türlerin asidofilik topraklarda bile geliştiği görülmüştür. Asiditesi yüksek bu tip ortamlara adapte olmuş türler kitinaz (Williams ve Robinson, 1981) ve diastaz (Williams ve Flowers, 1978) enzimleri üretirler. *Streptomyces* cinsi üyeleri diğer bakterilerden daha az su gerilimine ihtiyaç duyarlar ve bu türler iyi kurumuş topraklardaki gibi kumlu, killi ya da kalkerle kaplı topraklarda çok sayıda bulunurlar. Otsu vejetasyonun yoğun olduğu bahçe toprağında ya da organik maddece zengin olan topraklarda *Streptomyces* sayısının en yüksek olduğu görülmüştür. Diğer toprak bakterileri gibi *Streptomyces* türleri de solucanların bağırsağında, eklem bacaklıların sindirim sistemlerinde ya da kırkayak ve tahtabiteri tarafından üretilen pelletlerin içerisinde bulunabilirler (Kämpfer, 2006).

Toprağın yanında, streptomycetes üyeleri tatlı su ve denizel çevrelerde olduğu gibi içilebilir su sistemlerinde de bulunabilirler. Streptomycetes ile kontamine olan içme suyu, metabolit ürünlerinden dolayı kötü bir tada ve kokuya sahiptir. Çoğunlukla, göller ve nehirler gibi tatlı su habitatları şiddetli sağanak yağışından sonra toprak

*Streptomyces*'i ile kontamine olabilir. Bu organizmalar su kütlesinin yanı sıra sedimentlerden de izole edilebilir. Doğal habitatları olmamasına rağmen bu çevrelerde, zamanlarının büyük kısmında dormant spor olarak hayatta kalabilirler (Kämpfer, 2006).

Denizel habitatlarda, *Streptomycetaceae* familyasının üyeleri su kütlesi ve sedimentlerin littoral (kıyı bölgesi) veya inshore (kıyıya yakın) bölgelerinden her ikisiyle birlikte denizin dip sedimentlerinden de izole edilebilirler (Kämpfer, 2006)

*Streptomyces* cinsinin üyeleri toprak içerisinde çeşitli fiziksel şartlara pH değişimlerine, kuraklık periyotlarına, donmaya, hidrostatik basınca, anaerobik şartlara spor oluşturmaları ile adapte olurlar. Bu cinsin sporları toprak içerisinde uzun zaman periyotlarında hayatta kalabilir ve bu yaşam döngüsü içerisinde yarı dormant aşama olarak kabul edilir. Sporlar, toprak yüzeyinde rüzgar veya yağmur vasıtasıyla (Llyod, 1969), su hareketleriyle veya artropotlar vasıtasıyla dağılırlar (Ruddick ve Williams, 1972).

Streptomyceteslerin çoğu üyeleri kemoorganotrofik olup, oksadatif metabolizmaya sahiptir. Enerjilerini organik bileşiklerin oksidasyonundan sağlarlar. Enerji ve gelişme için karbon kaynağı olarak çok çeşitli organik bileşikleri kullanabilirler. Beslenme konusunda seçici değildirler. Nitrojen kaynağı veya vitamin gibi büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar. Bu özellikleri ile habitatlarda başarılı bir biçimde koloni oluşturabilirler ve toprağın besin bakımından fakir olan ortamlarında miselyumlarını geliştirebilirler (Lodders ve Kämpfer, 2007).

*Streptomyces* cinsi üzerinde yapılan incelemeler sonucunda, bu cinse ait üyelerin streptomycin, neomycin, tetracycline, chloramphenicol gibi çok sayıda antibiyotikğin kaynağı olduğu bildirilmiştir (Hossain ve ark., 2004). Doğal habitatta yani ekolojik açıdan bakterilerin neden antibiyotik ürettiklerine ilişkin hipotezlerden birisi antibiyotik üretiminin sporulasyon ile ilgili olmasıdır. Sporulasyon ortamdaki besin açlığı ile tetiklenen bir süreçtir. *Streptomyces*'ler sporulasyon esnasında antibiyotik oluşturarak, belki de ortamda sınırlı olan besin kaynakları için diğer organizmaları inhibe ederek avantaj kazanmaktadırlar. Böylece ortamda sınırlı olan besin kaynaklarını kullanma avantajını yakalayan *Streptomyces* üyeleri sporulasyonu tamamlayabilecekler ve dormant olan sporları vasıtasıyla hayatta kalma şanslarını yükselteceklerdir. Örneğin verimli bahçe toprağı gibi yoğun rekabet ortamının bulunduğu ortamlarda mikroorganizmalar yüksek miktarda antibiyotik üretmiştir (Brock ve ark., 2006).

Diğer bir hipotez, *Streptomyces* tarafından üretilen antibiyotiklerin biyokontrol potansiyelinden sorumlu olduğudur. Amino glikozitler, makrolid benzoquinonlar, nükleozidler ve polienler böyle metabolitler arasındadır (Godfrey, 1995).

## 2.2. Polifazik Taksonomi

Taksonomi organizmaları sınıflandırma bilimidir. Prokaryotik taksonomisi, birbiri ile bağlantılı üç bölümden oluşur:

1. Sınıflandırma; benzerlik ve ilişki temeliyle oluşan organizma gruplarının düzenlenmesidir.
2. Nomenclature (adlandırma), uluslararası kurallara göre taksonomi gruplarının isimlendirilmesidir (*International Code of Nomenclature of Bacteria* (Sneath, 1992)).
3. Tanımlama ise, taksonomide yer alan önceden tanımlanmış türlerin bulunduğu tanımlama tablosunu kullanmanın pratik bir yoludur.

Prokaryotlar için geçerli bir sınıflandırma olmamasına rağmen sınıflandırma sistemi, mikrobiyoloji komitesi tarafından *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* kabul edilmekte ve halen geçerli sınıflandırmaya en yakın olduğu düşünülmektedir. Bergey' in sınıflandırma sistemi rRNA genlerinin küçük alt birimlerinin filogenetik analizine dayanır (16S rRNA). Bunun yanı sıra organizmaların akrabalıklarını içeren klasik mikroskopik ve biyokimyasal analizler (DNA-DNA hibridizasyon oranı ve G+C içeriğindeki farklılıklar gibi) sınıflandırmada kullanılır. Bu sistem taksonlar arasındaki ilişkilerin incelenmesinde ve prokaryotik çeşitliliğin genişliğinin kavranması ve tanımlanmasında faydalı olmuştur. Buna ilaveten yeni yaklaşımlardan elde edilen sonuçlar tüm genom sekansının değerlendirilmesine izin vermiştir (Bergey ve ark., 2005).

Polifazik taksonominin amacı, farklı türlerin veri ve bilgilerini (bu bilgiler fenotipik, genotipik ve filogenetik bilgileri içerir) birleştirip biyolojik varlıkları sınıflandırmaktır (Vandamme ve ark., 1996). Fenotip, genotipin gözlenebilir ifadesidir. Diğer bir ifadeyle, genotip ve çevrenin etkileşimi sonucu bir organizmanın ölçülebilir fiziksel ve kimyasal özellikleridir. Genotip ise bir organizmanın genomundaki genetik bilgidir (Rosselló-Mora ve ark., 2001).

1970' lerden beri, fizikokimyasal DNA-DNA hibridizasyon metodu prokaryotik türleri tanımlamada kullanılmıştır. Bir bakteriyel türün tanımlanmasında; yüksek derecede benzerlikleri karşılaştırılmalı olarak test edilmiştir ve bireyler bunlara göre kategorilere yerleştirilmiştir (Stackebrandt ve ark., 2002). %70 ve üzeri DNA-DNA hibridizasyonu ve %97' nin üzerinde 16S rRNA gen dizisi özdeşliği olan bakteri

türlerinin kesin derecede fenotipik tutarlılıklarının olduğu düşünülmektedir (Vandamme ve ark., 1996; Ursing ve ark., 1995). Ad-hoc komitesi tarafından türlerin tanımlanmasında önemli gelişmeler sağlanmıştır (Stackebrandt ve ark., 2002). Bu önemli gelişmelerden biri genom dizisinin tamamında yapılan ilerlemedir. Son on yılda sekans teknolojisindeki ilerlemeler ve biyoinformatikte elde edilen bulgulardaki artış bir çok prokaryotik genom sekansının tamamlanabilmesine olanak vermiştir (Overbeek, 2000; Janssen ve ark., 2003). Son zamanlarda prokaryotik türlerin evrimsel ilişkilerinin ortaya konması için türlerin genom dizilerinin kullanımına ilgi artmıştır. Prokaryotik türlerin tanımlanmasında 16S rRNA ve DNA-DNA hibridizasyon metodu kullanılmasına rağmen daha fazla bilginin tüm genom sekanslarından elde edileceği düşünülmektedir (Coenye ve ark., 2005).

### 2.2.1. Nümerik Taksonomi

1950' lerin sonlarına kadar, bakteriyel taksonlar hala birkaç “anahtar” özellik esasına göre tanınmaktaydı ve heterojen hatalı tanımlanmış cinsler sıradan hale gelmişti. Mukayeseli birkaç önemli tıbbi tür hariç, bilinmeyen izolatların tanımlanması hemen hemen imkânsızdı. Bilgisayar çağının gelmesiyle, bilginin büyük miktarda kullanımı hızlanmış, böylece bakteriyel taksonomiye olan yaklaşımı kökünden değiştiren bir devrim olmuştur. Sneath 1957' de nümerik taksonomi konseptini takdim etmiş ve o tarihten bu yana da bu konuya yüzlerce yayın tahsis edilmiştir (Sneath, 1957a, 1957b).

Nümerik taksonomi; Adansonion taksonomi (18. yy sonrasındaki Fransız botanikçi Michael Adanson), bilgisayar taksonomisi, nümerik fenetik analizler, taxometriler ve taxonometrileri kapsar. Nümerik taksonomi Sneath ve Sokal tarafından “Taksonomik ünitelerin karakteristik özellikleri temel alınarak taksonlar içindeki taksonomik ünitelerin nümerik metodlar ile gruplandırılması” olarak tanımlanmıştır.

Nümerik taksonomik metodların esas amacı, fenotipik verilerin geniş kullanımı ile bireysel suşları homojen gruplara ya da kümelere (taxospecies) yerleştirmektir. Nümerikte tanımlanan kümeler hakkında elde edilen son verilere göre bu kümeler tanımlama sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilir (Priest ve Williams, 1993). Nümerik taksonomik metodların uygulanması actinomycetesin sınıflandırılmasında önemli gelişmeler sağlamıştır. Nümerik taksonomik araştırmalar, cins gibi kompleks actinomycetes taksonlarını içeren kümeleri sınırlandırmada kullanılmıştır. *Actinomadura* (Athalye ve ark., 1985; Trujillo & Goodfellow, 2003), *Actinomyces*

(Schofield & Schaal, 1981), *Actinoplanes* (Goodfellow ve ark., 1990), *Corynebacterium* (Goodfellow ve ark., 1982), *Gordonia* (Goodfellow ve ark., 1999), *Nocardia* (Goodfellow ve ark., 1999), *Mycobacterium* (Wayne ve ark., 1996), *Rhodococcus* (Goodfellow ve ark., 1998), *Streptomyces* (Williams ve ark., 1983; Kämpfer ve ark., 1991; Manfio ve ark., 1995), *Streptosporangium* (Whitham ve ark., 1993) ve *Thermomonospora* (McCarthy ve Cross, 1984).

Nümerik taksonomik araştırmalarda sınıflandırılan organizmalar operational taxonomic units (OTU) olarak belirtilmiştir. Nümerik taksonomi çalışmasında bütün testlere tabi tutulacak suş seti, belirlenen habitattan izole edilen suşlar, uluslararası olarak kabul edilen tip örnekleri, kodlanmış referans suşlar ve duplike suşlar oluşturur (Priest ve Austin, 1993; Logan, 1994; Goodfellow, 1995). Araştırmalarda testlerin güvenilirliğini sağlamak için test suşlarının (OTU) yaklaşık % 10' u duplike olarak incelenmeli ve OTU' lerin ayırımı için kullanılmalıdır (Sneath & Johnson, 1972). Nümerik taksonomi çalışmasında test seçimi oldukça önemlidir. Çevresel değişikliklerden etkilenmeyen, genetik olarak sabit fenotipik karakterler kullanılmalıdır. Klasik olarak kullanılan metotta morfolojik, kültürel, biyokimyasal testler, inhibitör ajanların etkisi, enerji ve gelişme için tek karbon kaynağı bileşikleri, serolojik ve kemotaksonomik özellikleri test edilir. Taksonlar arasındaki farklılıkları belirleyecek yeterli bilgiyi elde etmek önemlidir ve en az 50 olmak üzere ideal olarak 100-200 OTU ile çalışılmalıdır (Sneath ve Sokal, 1973; Stackebrandt ve ark., 1999). Nümerik taksonomik çalışmada elde edilen veriler bilgisayar analizine uygun bir şekilde kodlanır. Genel olarak pozitif sonuçlar için (1) veya (+), negatif sonuçlar için (0) veya (-) şeklinde kodlanır.

Çok sayıda farklı benzerlik katsayısı, suşlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin tespit edilmesinde kullanılmıştır (Sneath ve Sokal, 1973; Sackin ve Jones, 1993). Özellikle Jaccard ( $S_J$ ; Jaccard, 1908) ve simple matching coefficients ( $S_{SM}$ ; Sokal ve Michener, 1958) mikrobiyal sistemikte en yaygın kullanılan katsayılardır.  $S_{SM}$ , hem pozitif hem de negatif benzerliği hesaplama da kullanılmıştır ve OTU' lerin tümü benzerliklerine göre analiz edilmiştir.  $S_J$ , sadece negatif sonuçları değerlendirir. Oysa, negatif sonuçlar nümerik taksonomide tek başına benzerlik ölçüsü vermez.  $S_J$  katsayısı özellikle hızlı ya da yavaş gelişen organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır (Whitham ve ark., 1993; Trujillo ve Goodfellow, 2003).

Nümerik taksonomi ilk olarak yaklaşık 200 organizmayı 100 birim karakteri kullanarak araştıran Silvestri ve ark. (Gilardi ve ark., 1960; Hill ve ark., 1961; Silvestri ve ark., 1962) tarafından *Streptomyces* cinsi ve bu cins ile akraba üyeler üzerine uygulanmıştır. Bu çalışmada identifikasyon için, birkaç fizyolojik ve biyokimyasal karakter kullanılmıştır (Hill ve silvestri, 1962). Diğer birkaç araştırmacı, oldukça sınırlı verilerle nümerik taksonomi tekniklerini uygulamalarına rağmen önceden yapılan çalışmalar *Streptomyces* sistematığının gelişmesinde etkili olmuştur.

Sneath (1970), nümerik fenetik grupları belirlemede, seçilmiş birkaç testin güvenilirliğinin az olması nedeniyle cinsin 600 türünü nümerik taksonomik çalışmalarla yeniden sınıflandırmıştır.

Williams ve ark., (1983a) *Streptomyces* cinsi üzerine ayrıntılı olarak ilk nümerik fenetik çalışmayı yapmıştır. Bu çalışmada, International *Streptomyces* Project (Shirling ve Gottlieb, 1967; 1968; 1969; 1972) içerisinde 394 *Streptomyces* tip örneğinin dahil olduğu 475 suş, 139 birim karaktere göre test edilmiştir. Veriler,  $S_{SM}$  ve  $S_J$  benzerlik katsayısı kullanılarak analiz edilmiş ve suşlar arasındaki akrabalık ilişkileri, UPGMA analizi sonucu elde edilen dendogramlar ile şekillendirilmiştir. Çalışma, daha önceki geleneksel çalışmalarda kullanılan testleri ve bununla birlikte biyokimyasal, degridasyon, besinsel ve tolerans testlerini de içermektedir. Analizler sonucunda, *Actinopycnidium* (Krassilnikov, 1962), *Actinosporangium* (Krassilnikov ve Yuan, 1961), *Chainia* (Thirumalachar, 1955), *Elytrosporangium* (Falcão de Moraes ve ark., 1966), *Kitasatospora* (Matsumae ve ark., 1968), *Microellobosporia* (Cross ve ark., 1963) ve *Streptoverticillium* (Baldacci, 1958) cinslerinin *Streptomyces* cinsinin sinonimleri olduğunu göstermiştir (Goodfellow ve ark., 1986a, 1986b, 1986c, 1986d; Witt ve Stackebrandt, 1990). *Streptomyces* tip suşları, 19 büyük (6-71 suş), 40 küçük (2-5 suş) ve 18 tek üyeli kümeye ayrılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda birçok *Streptomyces* türü *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* içinde kaydedilmiştir (Williams ve ark., 1989). Yapılan bu nümerik taksonomi çalışması, daha sonra yapılacak çalışmalara bir temel oluşturmuştur.

Kämpfer ve ark. (1991), Williams'ın çalışmasında yer almayan organizmaların da dahil olduğu toplam 821 organizmaya 329 test uygulayarak Williams ve ark. (1983)' in nümerik sınıflandırmasını yeniden ele almıştır. Test organizmaları  $S_{SM}$  ve UPGMA kümeleme ile % 81.5 benzerlik düzeyinde 15 majör ( $\geq 6$  organizma), 34 minör ( $< 6$  organizma) ve 40 tek üyeli küme oluşturmuştur.

Şahin (1995), kurak ve tropikal toprak örneklerinden termofilik *Streptomyces* izole etmiştir. İzolasyon için cycloheximide ve rifampicin ilaveli pH 7-10.5'e ayarlı nişasta-kazein agar plaklarını 55 ° C'de 5 gün inkübe etmiştir. İzolatları hava spor rengi, substrat miselyum rengi, çözünür pigment rengi ve melanin pigment rengine göre gruplandırılmış ve bu gruplardan 45 alkalitolerant-termofilik ve 85 nütrofilik-termofilik *Streptomyces* izolatını test izolatı olarak belirlemiştir. Bu organizmalara, 32 nütrofilik termofilik ve 3 alkalitolerant mezofilik *Streptomyces* tip örneği ile birlikte test hatasını belirlemek için bunlardan rastgele seçilen 18 duplike test organizmasını çalışmaya dahil etmiştir. Tüm test organizmalarına besinsel, degradasyon, enzimatik, fizyolojik ve morfolojik testlerden oluşan 339 birim karakter uygulanmış olup bunlardan 56 birim karakter organizmaların tümünde (+) veya (-) sonuç, 23 test ise yüksek test hatası verdiği için veri matrisinden çıkarılmıştır. Bu nedenle, son veri matrisi 159 test organizmasını ve 260 birim karakterden oluşmaktadır. Test organizmaları S<sub>SM</sub> , UPGMA analizi sonucunda % 87.67 benzerlik seviyesi göstermiş ve 12 büyük (5-15 suş), 14 küçük (2-4 suş) ve 13 tek üyeli küme oluşturmuştur.

Nümerik fenetik analizler, özellikle doğal habitatlardaki *Streptomyces* çeşitliliğinin belirlenmesinde ve *Streptomyces* sistematikteki gelişmelere alt yapı oluşturmaktadır. Elbette ki bu nümerik sınıflandırmalar test ve suş seçimi, test hatası ve test organizmalarının genetik değişkenliğinden etkilenir. Bu nedenle nümerik sınıflandırmalar moleküler sistematik metotlardan elde edilen verilerle birlikte değerlendirilmelidir ( Goodfellow ve O'Donnell, 1993).

### 2.2.2. Kemotaksonomi

Kemotaksonomi hücre duvar amino asitleri, izoprenoid quinone'lar, lipitler, proteinler ve şekerler gibi kimyasal bileşiklerin mikrobiyal takson üyeleri arasında dağılımı ve bu bilgilerin sınıflandırmada ve identifikasyonda kullanımıdır.

Amino asitler, lipitler, proteinler ve şekerler bakteriyel hücre duvarlarının önemli yapısal bileşenleridir. Hücre bileşenlerinden elde edilen kimyasal veriler, farklı taksonların üyeleri içinde ve arasında farklı bileşenlerin dağılımına göre farklı taksonomik kategorilere bakterileri sınıflamak için kullanılabilir.

*Streptomycetaceae* familyası için kemotaksonomi, suşların cins seviyelerinin tanımlanması için önemli bir araçtır. Hücre duvar kompozisyonu, yağ asitleri örnekleri, menaquinon tipleri ve lipid örnekleri *Streptomycetaceae* familyasının üyelerinin gruplandırılması için kullanılan kemotaksonomik özellikler arasında yer alır (Lodders ve Kämpfer, 2007) .

*Streptomycetaceae* familyası, gram pozitif bakterilerin üyesi olup, bu familyanın suşlarının peptidoglikandan oluşan bir hücre duvarı vardır. Peptidoglikan hücre duvarının dayanıklılığından sorumludur. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramicasit adı verilen 2 şeker derivatından oluşmasının yanı sıra küçük bir grup aminoasit (L-alanin, D-glutamik asit ve D-alanin) ve streptomycetesde diaminopimelik asit (DAP) vardır. Hücre duvarının dayanıklılığının nedeni heteropolisakkarit zincirler arasındaki cross peptid bağlantıdır. Streptomycetesde peptidoglikan tipi onlar için tanısal özelliktir. *Streptomycetaceae* familyasının üyelerinin hücre duvarı yapısındaki diaminopimelik asit, onların çeşitlenmesinin nedenidir. *Streptomyces* ve *Streptacidiphilus* cinslerinin baskın aminoasit substrat miselyumlarının hücre duvarında LL-diaminopimelik asitken (LL-A<sub>2</sub>pm), Kitasatospora cinsinin üyelerinin hücre duvarı meso-diaminopimelik asit (meso-A<sub>2</sub>pm) içerir. *Streptomycetaceae* familyasının türlerinde mevcut olan yağ asitleri, doymuş izo- ve anteizo-yağ asitlerinin karışımıdır. Bu familyada mikolik asit bulunmamaktadır. Yağ asitleri örnekleri, suşların tür seviyelerini ayırt edememesine rağmen çevresel streptomycetesin karakterizasyonu için değerlidir. Quinonlar, protein yapısında olmayan elektron taşıyıcılarıdır. Streptomycetes, yüksek derecede hidrojenlenmiş izoprenoid zinciri olan menaquinone içermektedir. Tipik menaquinonlar, 6 veya 7 kere hidrojenlenmiş ve 9 izoprene birimlerinden oluşur. Oldukça değişken menaquinonların kompozisyonu, izopren birimlerinin numaraları, hidrojenlenmenin

derecesi ve hidrojenlenmiş izopren birimlerinin konumuyla ilgili olup, bu nedenle Actinomycetales ordosu içindeki taksaların farklılaşması için kullanılan araçtır. *Streptomyces*' in polar lipidlerinin başlıcalarını difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilethanolamin (PE), fosfatidilinositol (PI) ve fosfatidilinosidolmannoside (PIMs) oluşturmaktadır. Lipit kompozisyonu, streptomycesesi diğer Actinomycetales ordosu üyelerinden ayırt etmek için kullanılabilir (Lodders ve Kämpfer, 2007) .

### 2.2.3. Moleküler Taksonomi

#### 2.2.3.1. Ribozomal RNA (rRNA) Analizi

Ribozomal RNA (5S, 16S ve 23S) mikrobiyal evrim ve akrabalık çalışmalarının ayrıntılı olarak incelenmesi için ideal bir organeldir. İşlevsel rolü tüm ribozomlarda aynıdır. Ayrıca içerikleri ve kritik rollerinden dolayı yapıları zaman içerisinde çok yavaş değişmektedir. rRNA yakın ve çok uzak ilişkili mikroorganizmaları kıyaslayabilen, değişken ve sabit dizileri içerir.

rRNA genlerinin sekans analizi streptomyceses taksonomisinde tür ve suş seviyesinde cins içinde ilişkileri araştırmak için kullanılan güçlü bir metottur. 16S rRNA geni içinde üç bölge, streptomyceses cinsi içinde cinse özgü ( $\alpha$  ve  $\beta$  bölgesi ) ve türe özgü ( $\gamma$  bölgesi) problemler için sekans varyasyonunda yeterli olduğu gözlenmiştir (Stackebrandt ve ark., 1992).

rRNA' lar ultrasentrifügasyon ile 23S, 16S ve 5S olarak sedimentasyon oranlarına göre sınıflandırılırlar. rRNA genleri streptomyceseslerinde dahil olduğu çoğu bakterilerde birbirine çok yakın bağlıdırlar. 16S, 23S ve 5S sırasında organize olurlar ve kısa ara bölge (intergenic) dizileri ile birbirinden ayrılırlar (Rosselló-Mora ve ark., 2001).

Prokaryotik 5S rRNA gen bölgesi Gram (-) bakterilerde 120, gram (+) bakterilerde 116-117 nükleotit uzunluğuna sahiptir. Direkt dizi analizleri için Maxam-Gilbert işlemine benzer metodlar kullanılır. Molekülün bir ucu radyoaktif olarak işaretlendikten sonra baz spesifik enzimler veya ajanlarla kısmen parçalanır ve ürünler poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile 4 baz spesifik yolu ile ayrılır. Okunabilen baz dizisinden bir merdiven üretilir. Karşılaştırmaların yapılabilmesi için dizilerin sırasına konulması gerekir. 116 nükleotit molekülünün 5' ve 3' uçlarındaki iki iz aralığa yerleştirilmesi ile dizilebilirler. Akrabalığın bir göstergesi olarak 5S rRNA molekülünün 16S rRNA molekülüne göre küçük olması ve sınırlı filogenetik bilgi içermesinden

dolayı günümüzde tercih edilmemektedir. Filogenetik analizlerde bu molekülün kullanımı yakın akraba organizmaların karşılaştırılmasında, molekülün sınırlı bilgi kapasitesinden dolayı yetersiz kalmaktadır (Manfio, 1995). Daha büyük moleküllerde bulunan korunmuş dizilerin büyük parçaları sayesinde gözden kaçabilecek dikkate değer mutasyonel değişikliklere dikkat edilebildiğinden beri organizmalar arasındaki akrabalığı ölçmede 5S rRNA molekülünün küçük olduğu tartışılmaktadır.

1985' ten önce 16S rRNA moleküllerinin tam sekanslama çalışmalarını yapmak günümüzdeki kadar rutin değildi. Sekans verileri oligonükleotit kataloglama ile elde edilirdi (Goodfellow ve O'Donnell, 1993). Bu işlem saflaştırılmış 16S rRNA' nın T1 ribonükleazlarla oligonükleotitlere parçalanmasını gerektirir. Bu moleküllerin 5' ucu invitroda  $^{32}\text{P}$  ile işaretlenir ve TLC (thin layer chromatography) ile ayrılır. Bu rRNA' nın bir oligonükleotit fingerprintinginin çıkarılması sağlanır ve her bir oligonükleotit bir dizi katologu üretmek üzere okunur. Kataloglar birbirleriyle karşılaştırılarak taksonomik yapı organizma kataloglarından elde edilir. 16S rRNA kataloglama pahalı, zaman alıcı ve son derece emek verici bir tekniktir. Bu teknik actinomycetes dışında çok az sayıda bakteride uygulanmıştır (Embley ve Stackebrandt, 1994). 16S rRNA günümüzde çeşitli yollar kullanılarak dizilenebilmektedir. Kataloglama, 16S rRNA' nın revers transkriptaz dizilenmesine yerini bırakmıştır.

Filogenetiğin yeniden oluşturulmasında küçük alt üniteli moleküllerin temel alındığı ağaçların şekillendirilmesinde, uyumsuzlukların ve problemlerin çözülmesinde yüksek bilgi içeriğine sahip olan rRNA' nın büyük alt üniteleri kullanılır. 23S rRNA molekülünün dizilerinin oluşturulması için direkt olarak revers transkriptaz metodu uygulanabilir fakat 23S rRNA molekülünün büyük boyutlarda olması, yüksek seviyede modifiye bazların bulunması ve korunmuş primer komplike bölgelerinin yokluğu bu metodun uygulanmasını zorlaştırır ve literatürlerde 23S rRNA çalışmasına çok az rastlanır (Ludwig ve Schleifer, 1994; Rosselló-Mora ve ark., 2001).

16S rRNA molekülü mikrobiyal taksonomide en geniş çapta kullanılan standart tekniklerden biridir. Bu teknik, canlıları Archaea, Bacteria ve Eucarya olarak üç büyük domain'e ayırmıştır (Woese, 1987). 16S rRNA sekans analizleri iki organizma arasındaki akrabalığı tür düzeyi ve yukarıdaki kategorilerde ortaya koymaktadır. Ancak aynı türe ait organizmalar arasındaki ayırt ediciliği ortaya koymak için yeterli bir teknik değildir (O'Donnell ve ark., 1993). 16S rRNA sekans analizleri ile organizmalar arasında yüksek derecede yakın ilişki varsa diğer taksonomik metotlar özellikle de

DNA-DNA homolojisi çalışmaları kullanılarak değerlendirmek gereklidir (Stackebrandt ve Goebel, 1994). % 97'den daha az 16S rRNA gen dizisi benzerliği gösteren organizmalar genellikle % 60'dan daha az DNA hibridizasyon değeri verirler fakat yüksek 16S rRNA dizi benzerliği gösteren iki organizmanın düşük DNA-DNA hibridizasyon değeri verdiği durumlar da bildirilmiştir. Her ne kadar 16S rRNA korunmuş olsa da DNA-DNA homolojisi ile lineer bir korelasyon yoktur. Bu nedenle tür tanımı sadece 16S rRNA sekans benzerliği dikkate alınarak yapılamaz. Bugünkü taksonomik kabullere göre bakteriyel tür; belirli derecede fenotipik uyum gösteren, en az %70 DNA-DNA hibridizasyonu ve % 97'den daha fazla 16S rRNA gen dizi benzerliği gösteren organizma grubu olarak kabul edilmektedir (Coenye ve ark., 2005)

16S rRNA gen dizileme ve DNA-DNA hibridizasyonu her ne kadar tür tanımlanması için moleküler kriter olarak düşünülse de tüm genom dizilenmesiyle daha fazla taksonomik veri elde edileceği şüphesizdir (Coenye ve ark., 2005).

#### **2.2.3.2. DNA-bazlı tiplendirme metotları (DNA fingerprintings)**

DNA-bazlı tiplendirme metotları genellikle türler arasında intraspesifik ve türler içinde interspesifik çeşitliliğin ortaya konulmasını sağlar. Bu metotlar özellikle yakın akraba organizmalar arasında farklılaşmayı gösteren ve fenotipik analizleri destekleyici niteliktedir (Rosselló-Mora ve ark., 2001). DNA fingerprinting tekniği genomik DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi sonucu orjinlenen DNA fragmentlerinin pulsed-field jel elektroforez (PFGE) ile genomik DNA'nın amplifikasyonuna bağlı rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD; Random Amplified Polymorphic DNA), amplifiye edilmiş fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) gibi PCR-bazlı tiplendirme metotlarını kapsar (Coenye ve ark., 2005).

DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi sonucu elde edilen fragmentler etidyum bromür veya gümüş boyaları kullanılarak agaroz veya poliakrilamid jel elektroforez sonucu görünür duruma getirilir (Sambrook ve ark., 1989). Bununla birlikte, hedef gen sekansına karşılık gelen fragment Southern blotlama'yı takiben gen problemleri ile hibridizasyon sonucu gözlemlenebilir (Southern, 1975). Genomik fingerprinting yakın akraba organizmaların kromozomu boyunca restriksiyon profillerinin araştırılması organizmalar arasındaki benzerliği ortaya koymanın en pratik yoludur (Krawiec ve Riley, 1990). Yakın akrabalık gösteren organizmaların DNA'

larındaki restriksiyon endonükleaz kesim sonucu elde edilen fragmentler aynı ve ya son derece benzerlik göstermektedir.

RFLP metodu, mikrobiyal sistematiğe kullanılan güçlü bir metottur. Bu metot fenotipik varyasyondan etkilenmeyen ve cins düzeyinde türler arasındaki benzerlikleri tespit etmek için kullanılmaktadır. Restriksiyon endonükleaz analizi (REA) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizi (RFLP) yaygın olarak kullanılan iki DNA fingerprinting metodudur. Bu iki metot arasındaki fark açık değildir. Pratikte REA, sık kesen restriksiyon endonükleazlarla genomik DNA'nın kesiminden elde edilen kompleks fingerprintlerin analizini vermektedir. RFLP tekniği, DNA'nın yapısında yüksek oranda % G+C içeren ve DNA'yı az sıklıkla kesen endonükleazlarla oldukça az sayıda bantlar oluşturduğu için daha kolay yorumlanabilir fingerprintler oluşturur. Sonuçlanan büyük moleküler ağırlıklı fragmentler genellikle PFGE ile ayrılabilir (Cantor ve ark., 1988). Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm aynı zamanda genom haritalama için kullanılmaktadır (Leblond ve ark., 1993).

RAPD-PCR metodu, DNA yapısındaki polimorfizmi tespit etmek için düşük bağlanma sıcaklığında 9 veya 10 baz uzunluğunda bir veya daha fazla kısa primerler kullanarak DNA'daki birçok bölgeyi amplifiye etmeye yönelik bir çalışmadır (Williams ve ark., 1990). Primerlerin farklı bağlanma bölgelerine uzaklıkları agaroz jelde tespit edilebilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur (Alves ve ark., 2002). PCR sonucu oluşan bantlar kromozomal sekans bilgisi olmaksızın organizmalar arasındaki kromozomal farklılıkların gösterilmesini sağlayan karakteristik fingerprintler oluşturur (Anderson ve Willington, 2001). Agaroz jelde fingerprintler şeklinde gözlenmesiyle sonuçlanan primer alanının lokasyonu ve sayısı bakteriyel türlerin farklı suşları arasında çeşitlilik göstermektedir (Webster ve ark., 1996; Olive ve Bean, 1999).

RADP-PCR diğer tiplleme metotları ile karşılaştırıldığında, 16S RNA genlerinin veya 16S-23S rRNA ara bölgesinin RFLP analizinden daha ayırt edici fakat DNA içinde değişken sayıda tekrarlayan REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindrome) metodundan daha az ayırt edici bulunmuştur (Vila ve ark., 1996). Ayrıca bu metotla ilgili birkaç problem rapor edilmiştir. Özellikle RAPD-PCR metodunun güvenilirliği ve standardizasyonunun azlığı ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Primerler özel genetik lokusa karşı yönlenmediği için primer ve hedef alan arasındaki hibridizasyon kusurlu sonuçlanabilir. Böylece, amplifikasyon süreci bant patternlerinde farklılığa yol

açabilecek annealing sıcaklığındaki küçük değişmelere son derece duyarlıdır. Deneysel olarak oluşturulan her bir primerin optimal reaksiyon şartlarının sağlanması ve reaksiyon içerikleri, metodun standardizasyonunu zor kılan parametrelerdir (Arbeit ve ark., 1993). Son zamanlarda M13 DNA sekanslama primeri, standardizasyona izin veren RAPD fingerprinting için kullanılmıştır (Webster ve ark., 1996; Olive ve Bean, 1999).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. *Streptomyces*' lerin Seçimi ve Kaynağı

Bu çalışma için, *Alhagi pseudoalhagi* (Deve diken) ve *Colutea arborescens* L. (Yalancı sinameki) bitkilerinin rizosferlerinden alınan toprak örnekleri, steril torbalara konulmuş ve laboratuvar numarası verilerek etiketlenmiştir. Toprak örneklerinin izolasyondan önce steril petrilere konularak oda sıcaklığında kurumaları sağlanmıştır. İzolasyon çalışmasının yapıldığı toprak örneklerinin alındığı bitki türleri ve lokaliteleri Tablo 3.1' de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** İzolasyon çalışmasının yapıldığı rizosfer örneklerinin alındığı bitki türleri ve lokaliteleri

| Bitki türü                    | Lokaliteleri                   |
|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Alhagi pseudoalhagi</i>    | Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| <i>Colutea arborescens</i> L. | OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |

#### 3.1.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

##### 3.1.1.1. Dilüsyon Plak Tekniği

Bu çalışmada, *Streptomyces*'lerin izolasyonu için dilüsyon plak tekniği kullanılmıştır. Toprak örneklerinden yaklaşık 20 gr alınarak etiketli petrilere konularak kuruması için 15 gün bekletilmiştir. Daha sonra her bir toprak örneğinden 1 gr tartılarak içerisinde 9 ml ringer çözeltisi bulunan steril cam şişelere eklenmiştir. Bu şekilde, her bir toprak örneği için hazırlanmış olan  $10^{-1}$  solüsyonlar, toprak kolloidlerine tutunmuş olan mikroorganizma sporlarını ve misellerini ayırmak için hafif şekilde alt-üst edilerek 30 dakika çalkalandı. Daha sonra bu  $10^{-1}$  solüsyonlar vejetatif formların neden olabileceği kontaminasyonları azaltmak için, 55 °C' ye ayarlanmış su banyosunda 20 dakika bekletildi. Her bir toprak örneği, vortex karıştırıcı (Fisons Scientific Apparatus Ltd., Loughborough, Leicestershire, England, UK) ile karıştırılarak homojen hale getirildi ve otomatik pipet (P1000: Nichipet EX, Nichiryo Co.,Ltd, Tokyo 101-0038, Japan) ile aseptik şartlarda 1ml alınarak içerisinde 9 ml ringer çözeltisi bulunan steril cam tüplere konuldu. Bu şekilde  $10^{-2}$  lik toprak solüsyonu elde edildi ve tekrar aynı işlem yapıp  $10^{-3}$  lük toprak solüsyonu elde edildi.

$10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  dilüsyonlarının her birinden otomatik pipet ile 0.2 ml alınan toprak solüsyonları, cycloheximide (50 µg/ml), nystatin (50 µg/ml) ve rifampicin (0.5 µg/ml) ilaveli nişasta-kazein agar (pH: 7.2; Küster ve Williams, 1964) yüzeyine steril öze ile yayma plak yöntemi ile inoküle edildi. Her bir dilüsyon için 3 plak hazırlandı ve 28 °C’de 14 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

### 3.1.2. İzolatların Seçimi ve Saflaştırılması

Nişasta-kazein agarda 28 °C’de 14 gün inkübasyona bırakılan izolasyon plaklarındaki *Streptomyces* suşları, koloni morfolojileri dikkate alınarak seçildi. Seçilen koloniler, steril kürdanlarla cycloheximide (50 µg/ml) ilaveli Bennett’s Agar (Jones, 1949) yüzeyine çizgi plak yöntemiyle transfer edilerek tek koloni düşürülmeye çalışıldı.

### 3.1.3. İzolatların Renk Gruplarının Belirlenmesi

Koloni morfolojisi dikkate alınarak seçilen rizosfer izolatlarının renk gruplaması, oatmeal agar (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966) üzerinde belirlendi. Bennett’s agar (Jones, 1949) ortamında saflaştırılan rizosfer izolatları, cycloheximide (50 µg/ml) ilaveli oatmeal agar (ISP 3) üzerine steril öze yardımıyla çizgi ekim metodu ile inoküle edildi ve 28 °C’de 14 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, ISP 3 agar plaklarında büyüyen kolonilerin hava miseli spor rengine, substrat misel rengine ve çözünür pigment rengine göre renk gruplaması yapıldı. Göz ile belirlenen izolatların pigment renkleri, *Inter-Society Colour Council National Bureau of Standards (ISCC-NBS) Colour Name Charts (United States Department of Commerce, Gaithersburg, Maryland, U.S.A. 1985)* katoloğu kullanılarak kaydedildi.

### 3.1.4. İzolatların Stoklanması

Bennett’s Agar (Jones, 1949) yüzeyine çizgi ekim yöntemiyle inokule edilerek tek koloni düşürülen izolatlar stok için cycloheximide (50 µg/ml) ilaveli glukoz-malt-yeast-extract agar üzerine steril öze ile transfer edildi ve 28 °C’de 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, elde edilen izolatların sporları ve miselyumları aseptik koşullarda % 25’ lik gliserol içeren otoklavlanmış vidalı kapaklı tüplere steril kürdan yardımı ile transfer edildi ve izolatlara numaralar verildi. İzolatlara verilen numaralar ve kaynakları Tablo 3.2’ de verilmiştir. Daha sonra -20 °C’de stoklandı.

**Tablo 3.2.** Test Organizmaları ve Kaynakları

| Suş No | Suşun Adı               | Kaynaklar                                                                           |
|--------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| NS005  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| NS017  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| NS026  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| NS035  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| NS038  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| NS071  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| NS082  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Colutea arborescens</i> rizosferi<br>OMÜ/Botanik bahçesi-SAMSUN     |
| TC003  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC004  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC005  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC008  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC011  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC017  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC019  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC020  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC021  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC022  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC023  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC024  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC025  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC026  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi<br>Kuşadası (Pamucak mevki)-İZMİR |

**Tablo 3.2.** (Devamı)

| SuŖ No | SuŖun Adı               | Kaynaklar                                                                        |
|--------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| TC027  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi KuŖadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC028  | <i>Streptomyces</i> sp. | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi KuŖadası (Pamucak mevki)-İZMİR |
| TC030  | <i>Streptomyces</i> sp  | A.Veyisoğlu; <i>Alhagi pseudoalhagi</i> rizosferi KuŖadası (Pamucak mevki)-İZMİR |

### 3.1.5. Test Organizmalarının Tuz Toleranslarının Belirlenmesi

Test organizmaları % 10, % 15 ve % 20 NaCl içeren cycloheximide (50μg/ml) ilaveli glukoz-malt-yeast extract agar ortamına steril ze yardımıyla çizgi ekim metodu ile inoküle edildi ve 28  C’de 10 gün inkasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, test organizmalarının belirlenen tuz konsantrasyonlarında geliŖip geliŖmedikleri kontrol edildi.

## 3.2. NÜMERİK TAKSONOMİ

### 3.2.1. Kùltürler

Gliserol stoklarında (%25 v/v) -20 °C'de depolanmış 17 test izolatı, cycloheximide (50µg ml<sup>-1</sup>) ilaveli glukoz-malt-yeast extract agar üzerine transfer edildi ve 28 °C 'de 14 gün süreyle inkübe edilerek nùmerik sınıflandırmada uygulanacak testler için hazır hale getirildi.

### 3.2.2. Test Seçimi

Nùmerik taksonomi çalışmasının değerdendirilmesinde test seçimi, önemli bir faktördür. Test seçiminde kesin bir kural bulunmamakla birlikte, çevre faktörlerine karşı hassas olmayan, genetiksel olarak değışkenlik göstermeyen, tek genin veya operonun ekspresyonunu gösteren karakterlerin kullanılması gereklidir. Böyle karakterler değışikliğe uğramadığı için, güvenilir doğal sınıflandırmalar elde edilebilir. Uygulamada, mümkün olduğu kadar organizmaların birçok yönünü gösteren bir dizi test kullanmak yeterlidir. İdeal bir listede; koloni ve mikromorfolojik veriler, gelişme karakterleri, biyokimyasal testler, inhibitör ajanların etkisi, enerji ve gelişme için kullanılan karbon kaynakları, serolojik, kemotaksonomik ve moleküler genetik bilgiler bulunabilir. Önemli olan taksonlar arasındaki akrabalık ilişkilerini gösterecek veya farklılıklarını belirleyecek yeterli bilginin sağlanmasıdır (Priest ve Austin, 1993).

### 3.2.3. Verilerin Toplanması

17 test izolatı, nùmerik taksonomik çalışmalar dikkate alınarak 48 birim karaktere göre araştırıldı. Test izolatları arasındaki farklılıkları en iyi şekilde gösterecek besinsel testler ve degradasyon testleri seçildi. Nùmerik taksonomik çalışmada kullanılan birim karakterler Tablo 3.3' de verilmiştir.

Test suşlarının inokülasyonu, kùltür ortamına aynı anda 19 organizma inoküle edebilen Multipoint Inokùlatör (Order Code SCAN 400, Mast Group Ltd., Merseyside, UK) kullanılarak yapıldı. İnokülasyon öncesi uygulanacak testler için bazal kùltür ortamları hazırlandı. Her bir test suşu için, ağzı kapaklı küçük cam şişelere 1.5 ml Ringer çözeltisi ilave edildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Glukoz-malt-yeast extract agar (ISP 2; Shirling ve Gottlieb, 1966) plaklarında gelişen test

suşlarının spor ve substrat miselleri, steril öze yardımı ile etiketlenmiş içerisinde ringer bulunan küçük cam şişelere aseptik koşullarda transfer edildi. Daha sonra vorteksle karıştırılarak homojenize edilen bakteri solüsyonları, steril kabin (Pbi, Miniflo International, Milano-Italy) içerisinde multipoint inokülatörün tablasına otomatik pipet ile transfer edildi ve test plağına ilk grup 10, ikinci grup 7 olacak şekilde otomatik inokülasyon yapıldı.

**Tablo 3.3.** Nümerik Taksonomik Çalışmada Kullanılan Birim Karakterler

| <b>A.BESİNSEL TESTLER</b>                | <b>(%,w/v)</b> |                                        | <b>(%,w/v)</b> |
|------------------------------------------|----------------|----------------------------------------|----------------|
| <b>Temel Karbon ve Enerji Kaynakları</b> |                | <b>Temel Azot ve Enerji Kaynakları</b> |                |
| <b>Karbonhidratlar:</b>                  |                | <b>Aminoasitler</b>                    |                |
| <b>Monosakkaritler:</b>                  |                | L-Arginine                             | 0.1            |
| <b>Pentoz-aldoz</b>                      |                | L-Cysteine                             | 0.1            |
| L(+)-Arabinose                           | 1.0            | L-Histidin                             | 0.1            |
| D(+)-Xylose                              | 1.0            | L- <i>iso</i> -Leucine                 | 0.1            |
| <b>Heksoz-aldoz</b>                      |                | L-Threonine                            | 0.1            |
| D(+)-Galactose                           | 1.0            | S(+)-Leucine                           | 0.1            |
| D(+)-Mannose                             | 1.0            | L-Valine                               | 0.1            |
| <b>Heksoz-ketoz</b>                      |                | L-Methionine                           | 0.1            |
| D(-)-Fructose                            | 1.0            | L-Serine                               | 0.1            |
| L-Sorbose                                | 1.0            | L-Alanine                              | 0.1            |
| <b>Deoksi-heksoz</b>                     |                | L-Hydroxyproline                       | 0.1            |
| L(+)-Rhamnose                            | 1.0            | Glycine                                | 0.1            |
| <b>Disakkaritler</b>                     |                | L-Phenylalanin                         | 0.1            |
| D-Cellobiose                             | 1.0            | L-Proline                              | 0.1            |
| Maltose                                  | 1.0            | <b>B.Degredasyon Testi</b>             |                |
| Lactose                                  | 1.0            | Adenin                                 | 0.5            |
| D(+)-Trehalose                           | 1.0            | Elastin                                | 0.3            |
| <b>Oligosakkaritler</b>                  |                | Casein                                 | 1.0            |
| Raffinose                                | 1.0            | Hypoxhantin                            | 0.4            |
| D(+)-Melezitose                          | 1.0            | Starch                                 | 1.0            |
| <b>Polisakkaritler</b>                   |                | Guanin                                 | 0.005          |
| <b>Glikozitler</b>                       |                | L-Tyrosine                             | 0.5            |
| D(-)-Salicin                             | 1.0            | Xhantin                                | 0.4            |
| <b>Poliglikozitler</b>                   |                | Xylan                                  | 0.4            |
| Dextrin                                  | 1.0            | Gelatin                                | 0.4            |
| Inulin                                   | 1.0            | RNA                                    | 0.5            |
| <b>Şeker Alkoller</b>                    |                | DNA                                    | 0.5            |
| <i>Meso</i> -Inositol                    | 1.0            | Tween-20                               | 1.0            |
| D(-)-Mannitol                            | 1.0            | Tween-80                               | 1.0            |
|                                          |                | Üric acid                              | 0.5            |

### 3.2.4. Degredasyon Testleri

Adenin, elastin, casein, hypoxhantin, guanin, starch, L-tyrosine, xhantin, xylan, gelatin, ürik asit için bazal ortam olarak Modified Bennett's agar kullanıldı (Jones, 1949). Starch hariç her bir bileşik tındalizasyon ile steril edildikten sonra bazal ortama eklendi ve petrilere döküldü. Test suşlarının inokülosyonu, kültür ortamına Multipoint İnokülator (Order Code SCAN 400, Mast Group Ltd., Merseyside, UK ) kullanılarak yapıldı. Test suşlarının inokülasyonu, 12'şerli olmak üzere iki set halinde yapıldı. 28 °C' de inkübasyona bırakılıp 7. 14. ve 21. günlerde petriler değerlendirildi.

Adenin, guanin, hypoxhantin ve xhantin azot temelli pürinler olup nükleik asit biyosentezinde rol alırlar. L-tyrosine aromatik amino asittir. Elastin hayvanların bağ dokusunda bulunan bir proteindir. Ürik asit ve xylan degradasyonu sırasıyla üricase ve xylanase enzimlerinin üretimini göstermektedir.

Adenin, elastin, hypoxhantin, L-tyrosine, xylan, guanin, xhantin ve casein degradasyonu için inokülasyonlu petriler 28 °C'de inkübe edildi. İnküasyonun 7. 14. ve 21. günlerinde petriler kontrol edilerek okundu ve her bir test suşunun besiyeri ortamında oluşturduğu koloniler etrafında veya petri plağının alt kısmından bakıldığında açık bir zon oluşmuşsa pozitif (+), oluşmamışsa negatif (-) olarak değerlendirildi. Koloni etrafında veya altında açık zonun oluşması, o test suşunun o maddeyi degrede edebilme özelliğini gösterir. Adenin degradasyonunun değerlendirilmesi inkübasyonun 7. gününde, guanin ve xhantine degradasyonunun değerlendirilmesi inkübasyonun 30. gününde yapıldı.

DNA degradasyonu için DNase test agar bazal ortamı kullanıldı. RNA degradasyonu için ise Tryptose agar ( Goodfellow ve ark., 1979) bazal ortamı kullanıldı. % 0.5 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanan RNA ve DNA tındalizasyon ile steril edildikten sonra aseptik koşullarda steril bazal ortam içeriğine katıldı ve petrilere döküldü. İnokülasyon sonrası 28 °C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı. Değerlendirme öncesi petrilere petri yüzeyini kaplayacak şekilde 1M HCl döküldü. 1M HCl ilavesi nükleik asitlerin fibröz bir kütle olarak çökmelerine sebep olur. Bu nedenle, test suşlarının büyüdüğü alanın altında ve çevresinde oluşan açık zon pozitif (+) olarak değerlendirilir.

*Jelatin* degradasyonunda bazal ortam olarak modifiye Bennett's agar kullanılmıştır (Jones, 1949). % 0.4 (w/v) konsantrasyonunda hazırlanan jelatin tinalizasyon ile steril edildikten sonra steril bazal ortam içeriğine katıldı ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü. İnokülasyon sonrası petriler 28 °C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı. Değerlendirme öncesi, besiyeri ortam yüzeyine ince bir tabaka oluşacak şekilde trikloroasetik asit solüsyonu (TCA, %3 v/v) döküldü. TCA güçlü bir asit olduğundan ortamda bulunan hayvansal protein olan jelatinin çökmesi ile sonuçlanan dönüşümsüz denatürasyona neden olur. Koloniler etrafında açık zon oluşumu pozitif (+) olarak değerlendirilir.

*Nişasta*,  $\alpha$ -1,4 bağlı düz zincirli amiloz ve hem  $\alpha$ -1,4 hem de  $\alpha$ -1,6 bağlı dallanmış amilopektin olmak üzere iki farklı yapısal şekli olan  $\alpha$ -D-glucopyronose alt ünitelerinden meydana gelmiş, bitkilerde bulunan temel polisakkarittir. Nişasta degradasyon testi nişastayı degrede edebilen estrasellüler  $\alpha$ -amilaz enziminin üretimini saptamak amacıyla yapılmıştır.  $\alpha$ - ve  $\beta$ -amilaz enzimlerinin her ikisi de nişastayı degrede edebilmektedir. Nişasta degradasyon testinde bazal ortam olarak Modified Bennett's agar kullanıldı (Jones, 1949). Nişasta 50 ml saf su içerisinde çözöldükten sonra besiyerine ilave edildi (10 gr/lt). İnokülasyon sonrası 28 °C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübyasyon sonunda Lugol's iodin eriyiği petri yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde dökülerek değerlendirme yapıldı. (Cowen ve Steel, 1965) Nişasta degradasyonu değerlendirilmesinde ortama dökülen iodin ortamda nişasta varsa nişastayla birleşip koyu mavi bir kompleks oluşturur. Nişasta molekülleri amilaz enzimleri ile oligosakkarit ve diğer basit şekerlere parçalandığında ise meydana gelen bu küçük moleküller iodinle kompleks oluşturamaz. Bu nedenle, oligosakkarit ve diğer basit şekerlerin ortamda varlıkları büyüme alanı etrafındaki açık zon olarak belirlenmekte ve değerlendirme sırasında bu durum pozitif (+) olarak kaydedildi.

*Tween* 20, 80 degradasyonu, Nash ve Krent (1991) tarafından tanımlanan pepton agar bazal ortamı kullanılarak değerlendirildi. Tween' ler tinalizasyon ile steril edildikten sonra steril bazal ortama katıldı ve petrilere döküldü. İnokülasyonlu plaklar, 28 °C'de inkübe edildi ve değerlendirme inkübasyonun 3. 7. ve 14. gününde yapıldı. Tween sorbitolün polioksialkilen türevinin suda çözünebilir, yüksek moleküler ağılığa sahip yağ asidi esterlerinin homolog serilerindendir ve spesifik esterazların tespitinde kullanılabilir. Test suşları tarafından üretilen esterazlar Tween' deki ester

bağlarını hidroliz ederek serbest yağ asitlerinin açığa çıkmasına neden olur. Yağ asitleri de ortamda bulunan kalsiyum iyonları ( $\text{Ca}^{+2}$ ) ile birleşerek karakteristik beyaz kristaller olarak çökerek, çözünmeyen kalsiyum tuzlarını oluşturur. Çözünemeyen kalsiyum tuzu kristalleri koloniler etrafında opak bir halka oluşturduğunda pozitif (+) sonuç olarak değerlendirildi.

### **3.2.5. Besinsel Testler**

#### **3.2.5.1. Temel Karbon Kaynaklarında Gelişme**

Test suşları, gelişme ve enerji gereksinimleri için 18 farklı karbon kaynağını (Tablo 3.3, sayfa: 26) kullanabilme yetenekleri üzerine test edildi. Karbon kaynaklarında gelişme testi için, bazal ortam olarak ISP 9 besiyeri kullanıldı. (ISP medium 9; Shirling ve Gottlieb, 1966) Her bir karbon kaynağı üç gün ardışık olarak 100 °C’de 30 dakika kaynatılıp steril edildi ve istenen konsantrasyonda bazal ortama ilave edildi. Negatif kontrol olarak sadece bazal ortam, pozitif kontrol olarak % 1(w/v) glikoz ilave edilmiş bazal ortamlar kullanıldı. İnokülasyon iki kontrol ortamına da yapıldı. Bütün plaklara inokülasyon, multipoint inokülatör vasıtasıyla yapıldı. İnokülasyonlu plaklar, 28 °C’de inkübasyona bırakıldı ve değerlendirme, inkübasyonun 7. 14. ve 21. günlerinde pozitif ve negatif kontrol plaklarının her ikisi ile karşılaştırılarak yapıldı. Test suşlarının gelişmesi, negatif kontrol plağındaki gelişmelerden daha geniş veya pozitif kontrol plağındaki gelişmelere daha yakın ise pozitif (+); negatif kontrol plağındaki gelişmelere eşit veya gelişme daha az ise negatif (-) olarak kaydedildi.

#### **3.2.5.2. Temel Azot Kaynaklarında Gelişme**

Test suşları, gelişme ve enerji gereksinimleri için 15 farklı azot kaynağını (Tablo 3.3, sayfa: 26) kullanabilme yetenekleri üzerine test edildi. Azot kaynaklarında gelişme testi için, bazal ortam olarak Williams ve ark. (1983) tarafından tanımlanan azot kaynağı kullanım ortamı kullanıldı. Her bir azot kaynağı üç gün ardışık olarak 100 °C’de 30 dakika kaynatılıp steril edildi ve istenen konsantrasyonda bazal ortama ilave edildi. Negatif kontrol olarak sadece bazal ortam, pozitif kontrol olarak da % 0.1 (w/v) konsantrasyonunda L-Asparagine ilave edilmiş bazal ortamlar kullanıldı. İnokülasyon iki kontrol ortamına da yapıldı. Bütün plaklara test inokülasyonu, multipoint inokülatör vasıtasıyla yapıldı. İnokülasyonlu plaklar, 28 °C’de inkübasyona bırakıldı ve değerlendirme, inkübasyonun 7. 14. ve 21. günlerinde pozitif ve negatif kontrol

plaklarının her ikisi ile karşılaştırılarak yapıldı. Test suşlarının gelişmesi, negatif kontrol plağındaki gelişmelerden daha geniş veya pozitif kontrol plağındaki gelişmelere daha yakın ise pozitif (+); negatif kontrol plağındaki gelişmelere eşit veya gelişme daha az ise negatif (-) olarak kaydedildi.

### 3.2.6. Verilerin Kodlanması

17 test izolatına 48 birim karakterin uygulanması sonucu, bütün test sonuçları ikili formata uygun olarak pozitif sonuçlar için “+” ve negatif sonuçlar için “-” kullanılarak kodlandı. Temel karbon ve enerji kaynağı kullanım testi ile temel azot ve enerji kaynağı kullanım testi Sneath ve Sokal (1973) tarafından tanımlanan metot kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar, pozitif ve negatif kontrol plağındaki gelişmeler dikkate alınarak değerlendirildi. Test plağındaki gelişme, pozitif kontrol plağındaki gelişmeye eşit veya daha yakın ise pozitif (+), negatif kontrol plağındaki gelişmeye eşit veya daha zayıf ise negatif (-) olarak kaydedildi.

### 3.2.7. İstatiksel Analiz

Test verileri, X-Taxon programını kullanmak suretiyle +/- olarak kaydedildi. Duplike suşlarının da dahil olduğu veri tabanındaki +/- sonuçlar, 1/0 formatına dönüştürüldükten sonra, NTSys-pc istatiksel paket programı (Wishart, 1978) kullanılarak analizler yapıldı. Test hatasının tespit edilmesi için de test varyansı hesaplandı ( $S_i^2$ : Sneath ve Johnson, 1972).

17 test izolatının veri analizleri için benzerlik hesaplanmasında hem pozitif hem de negatif verileri değerlendiren  $S_{SM}$  (Simple matching coefficients; Sokal ve Michener, 1958) katsayısı kullanılırken, kümeleme için Average-linkage (UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages; Sneath ve Sokal, 1973) analizleri kullanıldı.

### 3.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TESTİ

Test izolatları, gram pozitif (+) bakteriler ve gram negatif (-) bakteriler, maya ve filamentli fungus olmak üzere 18 patojen ve *Streptomyces murinus* türünden oluşan toplam 19 organizmanın (Tablo 3.4) gelişmelerini inhibe etme kabiliyetlerine göre incelendi (Williams ve ark., 1983a). Test izolatlarının kültür ortamına inokülasyonu, otomatik pipet (P1000: Nichipet EX, Nichiryo Co.,Ltd, Tokyo 101-0038, Japan) vasıtasıyla nokta ekim yöntemi kullanılarak yapıldı. Her bir izolat için, ağzı kapaklı küçük şişşere 1.5ml ringer çözeltisi ilave edilip 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Glikoz-yeast extract-malt extract agar ortamında gelişen izolatların spor ve substrat miselleri, steril öze yardımı ile etiketlenmiş içerisinde ringer bulunan küçük cam şişşelere aseptik koşullarda transfer edildi. Daha sonra vorteksle karıştırılarak homojenize edilen bakteri solüsyonlarından otomatik pipet vasıtasıyla 7µl alınarak antibiyotik ilavesiz modifiye edilmiş Bennett’s Agar (Jones, 1949) yüzeyine 5’ li gruplar halinde nokta ekim yoluyla inoküle edildi. İnokülasyonlu plaklar, 25 °C’ de 3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı ve 3. günün sonunda gelişen koloniler üzerine, steril enjektör yardımıyla 3-5 ml kloroform döküldü ve kloroformun buharlaşması için petri plaklarının kapağı, 40 dakika boyunca yarı açık bir şekilde tutuldu. Bu şekilde öldürülen koloniler üzerine, her biri % 5’ lik nutrient agar içerisinde 2 gün süreyle gelişen patojen test organizmaları yayma plak yöntemi ile inoküle edildi. İnokülasyonlu plaklar, 25 °C’ de 48 saatlik inkübasyon sonrasında koloniler etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçüldü.

**Tablo 3.4.** Antimikrobiyal Aktivite Testi İçin Seçilen Patojen Organizmalar

|    |                                                   |
|----|---------------------------------------------------|
| 1  | <i>Aspergillus flavus</i> NRRL-1957               |
| 2  | <i>Aspergillus niger</i> -izolat                  |
| 3  | <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL-465           |
| 4  | <i>Bacillus cereus</i> NRRL-B 3711                |
| 5  | <i>Bacillus licheniformis</i> NRRL-B 1001         |
| 6  | <i>Bacillus pumilis</i> NRRL-BD 142               |
| 7  | <i>Bacillus subtilis</i> NRRL-B 209               |
| 8  | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231                |
| 9  | <i>Citrobacter freundii</i> NRRL-B 2643           |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922                |
| 11 | <i>Escherichia coli</i> MC-4100                   |
| 12 | <i>Lysteria monocytogenes</i> -medikal izolat     |
| 13 | <i>Micrococcus luteus</i> NRRL-B 1013             |
| 14 | <i>Proteus vulgaris</i> NRRL-B 123                |
| 15 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NRRL-B 2679         |
| 16 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763         |
| 17 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923           |
| 18 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862           |
| 19 | <i>Streptomyces murinus</i> ISP 5091 <sup>T</sup> |

**T**, Tip örneği.

**ATTC**, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md., USA;

**NRRL**, Northern Regional Research Laboratory (National Center For Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA

**ISP**, International *Streptomyces* Project, Ohio Wesleyan University, Delaware, Ohio, 43015, U.S.A.;

### 3.4. TEST ORGANİZMALARININ KARAKTERİZASYONU

#### 3.4.1. Morfolojik ve Kültürel Karakterizasyon

Test organizmaları, oatmeal agar (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966) kültür ortamında 28° C’de 14 gün inkübe edilerek hava miselyum spor rengi, substrat miselyum rengi, çözünebilir pigment rengi ve gelişimi belirlendi. Tüm test organizmalarının, melanin pigmenti üretilip üretilmedikleri ise Pepton-Yeast Extract Iron Agar (ISP 6; Shirling ve Gottlieb, 1966) ve Tyrosine Agar (ISP 7; Shirling ve Gottlieb, 1966) kültür ortamlarında 28 °C’de 4 günlük inkübasyondan sonra belirlendi. İnkübasyona sonra, kültür ortamında siyahımsı renk oluşumu melanin pigmenti üretiminin olduğunu, değişiklik olmaması ise melanin pigment üretiminin olmadığını gösterir. Ayrıca tüm test izolatlarının gelişme ve morfolojik özellikleri modifiye Bennett’s agar (Jones, 1949), yeast extract-malt extract agar (ISP 2; Shirling ve Gottlieb, 1966) glucose-yeast extract-malt extract agar (Shirling ve Gottlieb, 1966), inorganic salts-starch agar (ISP 4; Shirling ve Gottlieb, 1966), glycerol asparagine agar (ISP 5; Shirling ve Gottlieb, 1966) (Ek A) üzerine inoküle edilip 28° C’de 14 gün süre ile inkübe edilerek belirlenmiştir.

### 3.5. DNA İZOLASYONU

#### (a) Küçük Miktar Genomik DNA İzolasyonu

Pitcher ve ark. (1989) tarafından tanımlanan “Guanidin thiosiyonat DNA izolasyon” metodu test organizmalarının DNA izolasyonu için kullanıldı. DNA izolasyonu için gerekli tüm stok çözeltilerin hazırlanışı ve saklama koşulları Ek A’ da verilmiştir.

#### DNA izolasyonu için hücre pelletinin elde edilmesi

Test organizmaları cycloheximide ( $50\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ilaveli glukoz malt-yeast extract agar ortamında  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’ de 7 gün süre ile geliştirildikten sonra her bir izolattan aseptik şartlarda bir öze dolusu organizma alınarak içerisinde cycloheximide ( $50\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ilaveli 20 ml glukoz malt-yeast extract broth’un bulunduğu 50 ml’lik erlenlere transfer edildi. Çalkalamalı inkübatörde (Excella, New Brunswick Scientific Co, Inc, NJ) isolatlar  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de 7 gün 180 devirde geliştirildi. Saflık kontrolü için, broth kültürden  $\sim 10\mu\text{l}$  antibiyotiksiz glukoz malt-yeast extract agar ortamına transfer edildikten sonra her bir broth kültürden steril otomatik pipet ile 1 ml alınarak steril 1.5 ml’ lik eppendorflara transfer edildi ve 13 000 rpm’ de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelleti çöktürüldü. Çöken hücre pelletinin üstünde kalan sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem yeterli hücre pelleti elde edilinceye kadar tekrarlandı. Daha sonra steril  $\text{DDH}_2\text{O}$  su ile 3 kez yıkandı ve hücre pelletleri DNA izolasyonuna kadar  $-20^{\circ}$ ’de tutuldu.

#### Uygulama:

1.  $-20^{\circ}$ ’de tutulan hücre pelletleri buzlar eriyinceye kadar oda sıcaklığında bekletildi. Steril  $\text{DDH}_2\text{O}$  ile yıkanmış hücre pelletleri üzerine 100  $\mu\text{l}$  TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) ilave edildi. Kültür 13 000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek bir kez yıkandı. Daha sonra tampon eppendorf tüpten otomatik pipet ile uzaklaştırıldı.
2. 50  $\text{mg ml}^{-1}$  lizozim (Sigma) içeren TE tamponu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’den alınarak 100  $\mu\text{l}$  lizozim, kültür içeren eppendorf tüpe transfer edildi. Otomatik pipet yardımı ile homojenize edilerek  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de bir gece boyunca inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonrası, 500 µl guanidin thiosiyonat karışımı ilave edildi ve 37 °C' de 10 dk inkübe edilerek liziz işlemi gerçekleştirildi ve 5 dk buzda soğutuldu.
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-izo-amil alkol (24:1 v/v) ilave edildi ve birkaç defa tüp alt üst edilerek 13 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant otomatik pipet yardımı ile steril yeni bir eppendorf tüpe transfer edildi ve 0.54 ml soğuk izo-propanol ilavesi ile DNA'nın çökmesini takiben 13 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
7. Izo-propanol dikkatli bir şekilde otomatik pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. 100-150 µl soğuk %70'lik etanol ilave edilerek 13 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem 2 defa gerçekleştirildi. İki kez alkol yıkamasından sonra alkol uzaklaştırıldı ve eppendorfların kapakları açık bırakılarak yaklaşık 20 dk kurumaya bırakıldı.
8. 90 µl TE tamponu DNA pelletine ilave edilerek 5 dk bekletildi.
9. 10 µl RNAaz ilave edilerek 37 °C' de 1 saat inkübasyon sonrası 20 µl proteinaz K eklendi ve 37 °C' de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı.
10. 10 µl 8 M LiCl<sub>2</sub> takiben üzerine 130 µl fenol-kloroform-izo-amil alkol ilave edildi ve 13 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz steril yeni eppendorf tüplere aktarıldı.
11. Ayrıca, 130 µl kloroform-izo-amil alkol (24:1 v/v) ilave edildi ve 13 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz steril yeni eppendorf tüplere aktarıldı.
12. Toplam hacmin 2.5 katı olacak şekilde izo-propanol ilave edildi ve tüpler altüst edilerek 13 000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Alkol otomatik pipet ile uzaklaştırıldı.
13. 100 µl % 70'lik etanol ilave edilerek 13 000 rpm' de 5 dk santrifüj edildi ve alkol uzaklaştırıldı. Bu işlem bir defa daha tekrarlandı.
14. DNA pelleti oda sıcaklığında 20 dk beklenecek şekilde kurutuldu ve 30-50 µl DDH<sub>2</sub>O ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk süspansiyon edildi ve -20 °C' de gereksinim duyulana kadar stoklandı.

### (b) 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 (florofor) 254 veya 312 nm dalga boyunda UV transillüminatör' de kırmızı floresans yayma özelliği gösterir. Bu özellik, şayet DNA izole edilmiş ise UV transillüminatör üzerinde agaroz jelde kırmızı bantların oluşumunu sağlayacaktır.

#### Uygulama:

1. 30 ml 1xTBE içerisine % 0.8' lik, 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilaveli agaroz jel hazırlandı:

Agaroz jel hazırlanışı (% 0.8'lik):

|                |       |
|----------------|-------|
| Agaroz (Serva) | 0.24  |
| 1xTBE tamponu  | 30 ml |

0.24 g agaroz 30 ml 1xTBE tamponu bulunan 50 ml'lik erlene ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde tamamen berraklaşınca kadar eritildi. Sıcaklık ~ 60 °C olunca içerisine 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi. Erlen hava kabarcığı olmayacak şekilde hafifçe kendi eksenini etrafında döndürülerek karıştırıldı. Elektroforez küveti çalışma alanında zemini düz olan bir yere yerleştirildikten sonra küvette hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Agaroz donduktan sonra taraklar çıkarıldı (15-20 dk) ve içinde 1xTBE, pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

2. Tarağın oluşturduğu hollere her bir DNA örneğinden 2-3 µl alınarak jel yükleme tamponu (brom fenol mavisini) ile birlikte yüklendi.

3. Agaroz jel 75 voltta 20 dakika elektroforez edildi ve UV transillüminatör' de (Vilber Lourmat, UV) kırmızı bantlar şeklinde gözlemlendi.

### 3.6. 16S rRNA' NIN PCR AMPLİFİKASYONU

16S rRNA' nın polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0.5 ml' lik PCR tüplerinde Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27f ve 1525r; Lane, 1991) kullanıldı. PCR reaksiyonu için hazırlanan bütün stok solüsyonlar otoklav edilmiş DDH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Ayrıca, tüm bu hazırlıklar otoklav edilmiş pipet uçları ve eppendorf tüpler kullanılarak yapıldı. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 µl) steril eppendorflara bölünerek kullanıma kadar tüm stok solüsyonlarla birlikte -20 °C' de saklandı.

#### **Hazırlık:**

1. Primer stoklar (20 µM, BioTech)
  - 27f (forwad primer: 16S rRNA' nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
  - 1525r (reverse primer: 16S rRNA' nın son bölgesine bağlanan evrensel primer 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC)
2. dNTP mix stok (100 µl'lik stok solüsyonda her biri 25 mM olacak şekilde dATP, dCTP, dGTP, dTTP karışımı; Promega)
3. *Taq* DNA polimeraz (HotStarTaq®, QIAGEN)
4. 10 x *Taq* DNA polimeraz tampon (HotStarTaq®)
5. 5-10 µl DDH<sub>2</sub>O içinde çözülmüş, yüksek oranda saf genomik DNA (50-300ng)

#### **Uygulama:**

1. dNTP mix, primer solüsyonları, MgCl<sub>2</sub> ve 10 x *Taq* tampon buz üzerinde çözüldü ve buzda tutulmaya devam edildi. *Taq* DNA polimeraz gereksinim duyuluncaya kadar -20 °C' de tutuldu.

2. PCR amplifikasyonu için kullanılan bir örnek için 50 µl ölçüdeki bir reaksiyon karışımı:

|                                                 |             |
|-------------------------------------------------|-------------|
| 10x <i>Taq</i> tampon                           | 5 µl        |
| MgCl <sub>2</sub>                               | 1 µl        |
| dNTP (25mM)                                     | 1 µl        |
| 27f (20 µM)                                     | 2.5 µl      |
| 1525r (20 µM)                                   | 2.5 µl      |
| <i>Taq</i> DNA polimeraz (HotStar <i>Taq</i> ®) | 0.25 µl     |
| DDH <sub>2</sub> O                              | x µl        |
| DNA                                             | (50-300 ng) |
|                                                 | 50 µl       |

- 50 µl ölçüdeki reaksiyon karışımı örnek sayısınınca artırılarak *Taq* DNA polimeraz ve DNA örnekleri hariç 1.5 ml steril eppendorf tüpleri içerisine buz üzerinde transfer edildi.
- Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DDH<sub>2</sub>O ve DNA örnekleri toplam 10 µl olacak şekilde steril PCR tüpü içerisine transfer edildi ve Thermal Cycler' da 98 °C' de 3 dk ön denatürasyona tabi tutuldu.
- Ön denatürasyonu takiben tüpler buz ortamına alınıp 5 dk bekletildi.
- 20 °C' den *Taq* DNA polimeraz alınarak buzda bekletilen reaksiyon karışımına derhal ilave edildi.
- Reaksiyon karışımı her bir örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde tüplere buz üzerinde transfer edildi.
- Transfer işleminden hemen sonra PCR reaksiyonu (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) aşağıdaki şartlarda başlatıldı.

| Denatürasyon | Amplifikasyon |          |       | Bitiş   | Soğuma |
|--------------|---------------|----------|-------|---------|--------|
|              | Denatürasyon  | Bağlanma | Uzama | Uzama   |        |
| 95 °C        | 95 °C         | 55 °C    | 72 °C | 72°C    | 25 °C  |
| 15 dk        | 1 dk          | 1dk      | 3 dk  | 10 dk   | 1 dk   |
| 1 döngü      | 35 döngü      |          |       | 1 döngü |        |

9. 3µl PCR ürünü, %1' lik agaroz jelde kontrol edildi.
10. PCR ürünleri QIAquick PCR Pürifikasyon Kiti (Qiagen, Valencia, USA ) ile pürifiye edildi.

### 3.7. AMPLİFİYE EDİLMİŞ rDNA RESTRİKSİYON ANALİZİ (ARDRA)

PCR-RFLP metodu, test organizmalarından genomik DNA örnekleri saf bir şekilde izole edildikten sonra 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgesi amplifikasyonunu takiben PCR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi esasına dayanır. Test organizmalarının 16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra **EcoR I** (G↓AATTC; *Escherichia coli*), **Pst I** (CTGCA↓G; *Providencia stuartii*), **Sau3 AI** (↓GATC; *Staphylococcus aureus* 3A) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Örneklerin reaksiyon karışımları üretici firmanın önerdiği şekilde son volume 20 µl olarak hazırlandı ve 37 °C'de en az 1 saat (veya gece boyunca) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyonun durması için 65 °C' de sıcak su banyosunda 20 dk bekletildi. 7.5 µl PCR-RFLP örnekleri 2 µl etidyum bromür ilaveli %2' lik agaroz jelde PCR DNA marker ile birlikte 100 voltta 1.5 saat elektroforez edildi. Reaksiyon profili UV transillüminatör'de (Vilber Lourmat, UV) gözlemlendi ve görüntüleme sisteminde (GeneGenius, SyneGene, Bio Imaging Systems, UK) fotoğraflandı ve kaydedildi. PCR-RFLP fragmentlerinin baz çifti büyüklüğü RFLPscan 2.01 software (MWG, Ebersberg Germany) programı kullanılarak hesaplandı.

### 3.8. RASTGELE AMPLİFİYE EDİLMİŞ POLİMORFİK DNA (RAPD-PCR; Random Amplified Polymorphic DNA)

Temsilci test organizmalarının PCR-RAPD metodu; 0.5 ml'lik PCR tüplerinde, M13f evrensel primeri (BioTech) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da gerçekleştirildi.

#### **Hazırlık:**

1. M13f primer stok (100 pmol; 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'; BioTech)
2. dNTP mix stok (100 µl'lik stok solüsyonda her biri 25 mM olacak şekilde dATP, dCTP, dGTP ve dTTP karışımı; Promega)
3. *Taq* DNA polimeraz (HotStarTaq®, QIAGEN)
4. 10 x *Taq* DNA polimeraz tampon (HotStarTaq®)
5. DDH<sub>2</sub>O içinde çözülmüş, yüksek oranda saf genomik DNA (100 ng)

#### **Uygulama:**

1. dNTP mix, M13f primer solüsyon, MgCl<sub>2</sub> ve 10 x *Taq* tampon buz üzerinde çözüldü ve buzda bekletildi. *Taq* DNA polimeraz gereksinim duyuluncaya kadar -18 °C'de tutuldu.
2. RAPD-PCR amplifikasyonu için kullanılan bir örnek için toplam hacim 25 µl olan bir reaksiyon karışımına:

|                                           |                        |
|-------------------------------------------|------------------------|
| 10 x <i>Taq</i> tampon                    | 2.5 µl                 |
| MgCl <sub>2</sub>                         | 0.5 µl                 |
| dNTP (25 mM)                              | 0.5 µl                 |
| M13f (100 pmol)                           | 1.25 µl                |
| <i>Taq</i> DNA polimeraz<br>(HotStarTaq®) | 0.25 µl                |
| DDH <sub>2</sub> O                        | 25 µl                  |
| DNA                                       | (100 ng) x µl eklendi. |

3. 25 µl ölçüdeki reaksiyon karışımı örnek sayısınca artırılarak *Taq* DNA polimeraz ve DNA örnekleri hariç 1.5 ml steril eppendorf tüpü içerisine buz üzerinde transfer edildi.
4. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DDH<sub>2</sub>O ve DNA örnekleri (100 ng) toplam 10 µl olacak şekilde steril PCR tüpü içerisine transfer edildi ve ön denatürasyon için PCR'a tabi tutuldu ve tüpler 98 °C'de 3 dk ısıtılarak Thermal Cycler'da ön denetatürasyona tabi tutuldu.
5. Ön denatürasyonu takiben tüpler 5 dk buzda bekletildi.
6. -20°C'den *Taq* DNA polimeraz alınarak buzda bekletilen reaksiyon karışımına ilave edildi.
7. Reaksiyon karışımı her bir örnek için toplam hacim 25 µl olacak şekilde tüplere buz üzerinde transfer edildi.
8. Transfer işleminden hemen sonra PCR reaksiyonu (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK) aşağıdaki şartlarda başlatıldı.

| Denatürasyon | Amplifikasyon |          |       | Bitiş   | Soğuma |
|--------------|---------------|----------|-------|---------|--------|
|              | Denatürasyon  | Bağlanma | Uzama | Uzama   |        |
| 95 °C        | 95 °C         | 65 °C    | 72 °C | 72°C    | 25 °C  |
| 15 dk        | 1 dk          | 30 sn    | 2 dk  | 5 dk    | 5 dk   |
| 1 döngü      | 35 döngü      |          |       | 1 döngü |        |

9. RAPD-PCR sonrası her bir örnekten 7.5 µl ürün yükleme tamponu ile birlikte, %2'lik agaroz jele yüklendi. PCR DNA marker ile 100 voltta 1.5 saat yürütüldü ve RAPD parmak izleri UV transillüminatör'de (Vilber Lourmat, UV) gözlemlendi. Görüntüleme sisteminde (GeneGenius, Syngene, Bio Imaging Systems, UK) fotoğraflandı ve kaydedildi.
10. RAPD-PCR fragmentlerinin baz çifti büyüklüklerinin hesaplanmasında ve dendogramın oluşturulmasında BioNumerics software version 4 (Bio-Maths, Kortrijk, Belgium) kullanılmıştır. Benzerliklerin hesaplanmasında Jaccard benzerlik katsayısı (Jaccard 1908) ve kümeleme için UPGMA (UPGMA- Unweighted pair group method using arithmetic means) kullanılmıştır.

### 3.9. 16S rRNA SEKANS ÇALIŞMASI

Test organizmalarının 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgeleri 27f ve 1525r iki evrensel primer (Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da amplifiye edildi. Amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jelde PCR DNA marker ile birlikte 100 voltta 30 dakika yürütülerek UV-transillüminatör (Vilber Lourmat, UV) üzerinde kontrol edildikten sonra saflaştırıldı. 16S rRNA geninin yaklaşık tüm uzunluğunun sekanslanması için aşağıdaki tabloda verilen oligonükleotit primeri kullanıldı.

**Tablo 3.5.** Sekans çalışmalarında kullanılan primerlerin nükleotit dizileri ve bağlanma bölgeleri

| Primer Kodu | Sequence (5' - 3')   | Nükleotit Sayısı | Bağlanma bölgesi <sup>a</sup> |     | Kaynak      |
|-------------|----------------------|------------------|-------------------------------|-----|-------------|
|             |                      |                  | 5'                            | 3'  |             |
| 27f         | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG | 20               | 8                             | 27  | Lane (1991) |
| MG3f        | CTACGGGRRSGCAGCAG    | 16               | 342                           | 357 | Chun (1995) |
| 800r        | TACCAGGGTATCTAATCC   | 18               | 800                           | 782 | Chun (1995) |
| MG5f        | AAACTCAAAGGAATTGACGG | 20               | 907                           | 926 | Chun (1995) |

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

<sup>a</sup> Sayılar *Escherichia coli* *rrnB* suşunun (GenBank JO1695; Brosius ve ark., 1978) 16S rRNA'nin gen dizisine karşılık gelir

#### (a) 16S rRNA Sekans Verilerinin Analizi

ABI formatındaki kromotogram dosyaları Chromas versiyon 1.45 (C. McCarthy, School of Health Sciences, Griffith University, Queensland, Australia) programı kullanılarak okundu ve veriler FASTA formatına dönüştürüldü. Her bir suşun en yakın komşu dizisi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul ve ark., 1997) kullanılarak National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA, RDP-II RDP (Ribosomal Database Project; Maidak ve ark., 2001), DDBJ (DNA Data Bank of Japan; Tateno ve ark., 1998), EMBL (European Molecular Biology Lab., Kanz ve ark., 2005) gibi databanklardan elde edilen *Streptomyces* tip örneği 16S rRNA

nükleotit baz dizileri ile test örneklerinin baz dizileri, PHYDIT (Chun, 2001) programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak dizilendi.

#### **(b) Filogenetik Dendogramın Oluşması**

16S rRNA sekans analizi filogenetik dendogramları, least-squares (Fitch ve Margoliash, 1967), maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) ve neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritmaları kullanılarak oluşturuldu. Neighbour-joining, least-squares ve maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) metotları için evrimsel uzaklık matrisi olarak Jukes ve Cantor (1969) metodu izlenerek gerçekleştirildi. Filogenetik analizler için PHYLIP paket programı kullanıldı (Felsenstein, 1993). Oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri (Felsenstein, 1985) 100 tekrarlı olarak PHYLIP programında SEQBOOT ve CONSENSE seçenekleri kullanılarak yapıldı. Filogenetik ağaçların oluşturulmasında TREECON (Van de Peer ve ark., 1994) ve TREEVIEW (Page ve ark., 1996) programları kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Streptomyces* ÜYELERİNİN RİZOSFERDEN İZOLASYONU ve KARAKTERİZASYONU

#### 4.1.1. Toprak Örneklerinin Kaynağı ve *Streptomyces*'lerin Seçimi

Cycloheximide (50 µg/ml), nystatin (50 µg/ml) ve rifampicin (0.5 µg/ml) ilaveli nişasta-kazein agar (pH 7.2; Küster ve Williams, 1964) kullanılarak izole edilen rizosfer izolatlarının laboratuvar numarası, alındığı bitki türleri ve lokaliteleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Rizosfer örneklerinin alındığı bitki türleri, lokaliteleri.

|    | Laboratuvar No. | Alındığı Bitki Türü        | Lokalite                 |
|----|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| 1  | NS005           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesi      |
| 2  | NS017           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesi      |
| 3  | NS026           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesi      |
| 4  | NS035           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesi      |
| 5  | NS038           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesi      |
| 6  | NS071           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesi      |
| 7  | NS082           | <i>Colutea arborescens</i> | OMÜ/Botanik bahçesicc    |
| 8  | TC003           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 9  | TC004           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 10 | TC005           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 11 | TC008           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 12 | TC011           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 13 | TC017           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 14 | TC019           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 15 | TC020           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 16 | TC021           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 17 | TC022           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 18 | TC023           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 19 | TC024           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 20 | TC025           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 21 | TC026           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 22 | TC027           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 23 | TC028           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |
| 24 | TC030           | <i>Alhagi pseudoalhagi</i> | Kuşadası (Pamucak mevki) |

#### 4.2. TEST ORGANİZMALARININ RENK GRUPLARININ BELİRLENMESİ

24 organizmanın renk grupları, oatmeal agar (ISP; 3 Shirling ve Gottlieb, 1966) ortamı üzerine 28 °C’de 14 gün inkübasyondan sonra belirlendi. Hava miseli spor rengi, substrat misel rengi ve çözünür pigment rengi göz ile *Inter-Society Colour Council National Bureau of Standards (ISCC-NBS) Colour Name Charts (United States Department of Commerce, Gaithersburg, Maryland, U.S.A. 1985)* kataloğu kullanılarak belirlendi. 24 organizma, 4 küçük (2-4 suş) ve 12 tek üyeli olmak üzere 15 renk grubuna ayrıldı (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Test organizmalarının oatmeal agarda (ISP 3 agar; Shirling ve Gottlieb, 1966) renk grupları tayini

| Renk grupları | Hava miseli spor rengi | Substrat misel rengi | Çözünür pigment rengi | Suş numaraları                    |
|---------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 1             | Gri                    | Yeşil                | Yok                   | TC003, TC017, TC020, TC025, TC028 |
| 2             | Gri                    | Gri-kırmızı          | Yok                   | NS005, NS035, NS038               |
| 3             | Gri                    | Yok                  | Yok                   | TC021, TC024, NS071               |
| 4             | Gri-sarı               | Turuncu              | Yok                   | TC005, TC030                      |
| 5             | Beyaz                  | Sarı                 | Yok                   | TC004                             |
| 6             | Gri                    | Turuncu              | Gri-sarı              | NS082                             |
| 7             | Gri                    | Yeşil-kahverengi     | Yeşil                 | TC022                             |
| 8             | Gri                    | Yeşil-kahverengi     | Yok                   | TC008                             |
| 9             | Gri-sarı               | Yeşil                | Yok                   | TC011                             |
| 10            | Gri                    | Sarı                 | Yok                   | TC019                             |
| 11            | Gri                    | Gri-sarı             | Yeşil                 | TC023                             |
| 12            | Gri-sarı               | Yok                  | Yok                   | TC026                             |
| 13            | Yeşil                  | Yeşil                | Yeşil-kahverengi      | TC027                             |
| 14            | Gri                    | Turuncu              | Turuncu               | NS017                             |
| 15            | Gri-sarı               | Siyah                | Yok                   | NS026                             |

### 4.3. TEST ORGANİZMALARININ TUZ TOLERANSLARININ BELİRLENMESİ

Test organizmaları %10, %15 ve %20 NaCl içeren cycloheximide (50µg/ml) ilaveli glukoz malt-yeast extract agar ortamına steril öze yardımıyla çizgi ekim metodu ile inoküle edildi ve 28 °C’de 10 gün inkasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, belirlenen tuz konsantrasyonlarında gelişim sonuçları Tablo 4.3’de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Test Organizmalarının %10, %15 ve %20’lik Tuz Konsantrasyonunda Gelişimi

|    | İzolatlar | %10’ luk NaCl | %15’ lik NaCl | %20’ lik NaCl |
|----|-----------|---------------|---------------|---------------|
| 1  | TC003     | +             | -             | -             |
| 2  | TC004     | +             | -             | -             |
| 3  | TC005     | -             | -             | -             |
| 4  | TC008     | +             | -             | -             |
| 5  | TC011     | +             | -             | -             |
| 6  | TC017     | +             | -             | -             |
| 7  | TC019     | +             | -             | -             |
| 8  | TC020     | -             | -             | -             |
| 9  | TC021     | +             | -             | -             |
| 10 | TC022     | +             | -             | -             |
| 11 | TC023     | -             | -             | -             |
| 12 | TC024     | +             | -             | -             |
| 13 | TC025     | +             | -             | -             |
| 14 | TC026     | ±             | -             | -             |
| 15 | TC027     | +             | -             | -             |
| 16 | TC028     | +             | -             | -             |
| 17 | TC030     | -             | -             | -             |
| 18 | NS005     | +             | -             | -             |
| 19 | NS017     | -             | -             | -             |
| 20 | NS026     | -             | -             | -             |
| 21 | NS035     | +             | -             | -             |
| 22 | NS038     | +             | -             | -             |
| 23 | NS071     | -             | -             | -             |
| 24 | NS082     | +             | -             | -             |

+, gelişim iyi

±, gelişim orta düzeyde

-, gelişim yok

#### 4.4. NÜMERİK TAKSONOMİ

17 test izolatı 48 birim karakter bakımından test edilmiştir. Testlerin sonuçları Tablo 4.4’ de verilmiştir. Bazı birim karakterler, izolatların hepsi için pozitif (+) veya negatif (-) olarak sonuçlanmıştır. Karbon kaynaklarından D(+) galactose (%1, w/v) ve raffinose (%1, w/v), degradasyon testlerinden casein (%1, w/v), guanine (% 0.005, w/v) ve xhantin (% 0.4, w/v) bütün izolatlar için negatif (-) sonuç veren testlerdir.

Her bir test için test hatası oranı ( $P_i$ , Sneath ve Johnson, 1972) hesaplandı. Son veri matrisi, tüm suşlar için pozitif veya negatif sonuç veren testlerin çıkarılmasıyla yapılan hesaplamada % 1.2 test hatası hesaplanmıştır. Test izolatlarının  $S_{SM}$ -UPGMA analizine göre dağılımı Şekil 4.1’ de verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Test organizmalarına Uygulanan Nümerik Testlerin Sonuçları

| Karakteristik                                | TC003 | TC017 | TC028 | TC025 | TC008 | TC019 | TC021 | TC024 | TC022 |
|----------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Oatmeal agarda spor rengi</b>             | Gri   | Gri   | Gri   | Gri   | Gri   | Gri   | Gri   | Gri   | Gri   |
| <b>Çözünür pigment rengi</b>                 | Yok   | Yok   | Yok   | Yok   | Yok   | Yok   | Yok   | Yok   | Yeşil |
| <b>Melanin pigmenti</b>                      | Yok   | Yok   | Yok   | Yok   | Siyah | Yok   | Yok   | Yok   | Mavi  |
| <b>Degradasyon Testleri</b>                  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Adenin                                       | +     | +     | +     | +     | +     | +     | -     | +     | +     |
| Elastin                                      | -     | +     | +     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| Casein                                       | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Hypoxhantin                                  | -     | -     | +     | +     | +     | -     | +     | -     | +     |
| Starch                                       | -     | +     | -     | +     | -     | +     | +     | +     | +     |
| Guanine                                      | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| L-tyrosine                                   | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | +     |
| Xhantin                                      | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Xylan                                        | -     | -     | -     | -     | +     | -     | +     | +     | +     |
| Gelatin                                      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| RNA                                          | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| DNA                                          | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     |
| Tween20                                      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | -     | +     |
| Tween80                                      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | -     | -     | +     |
| Üric acid                                    | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | -     | -     |
| <b>Karbon ve azot kaynaklarında gelişimi</b> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| D-Cellobiose                                 | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-Sorbose                                    | -     | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     |
| D(+)-Galactose                               | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| D(+)-Xylose                                  | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| D(-)-Fructose                                | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L(+)-Arabinose                               | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| D(+)-Mannose                                 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     |
| D(-)-Mannitol                                | -     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | -     |
| İnositol                                     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-Phenylalanin                               | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-Proline                                    | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | +     |
| D(-)-Salicin                                 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| L(+)-Rhamnose                                | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Glycine                                      | -     | -     | -     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |

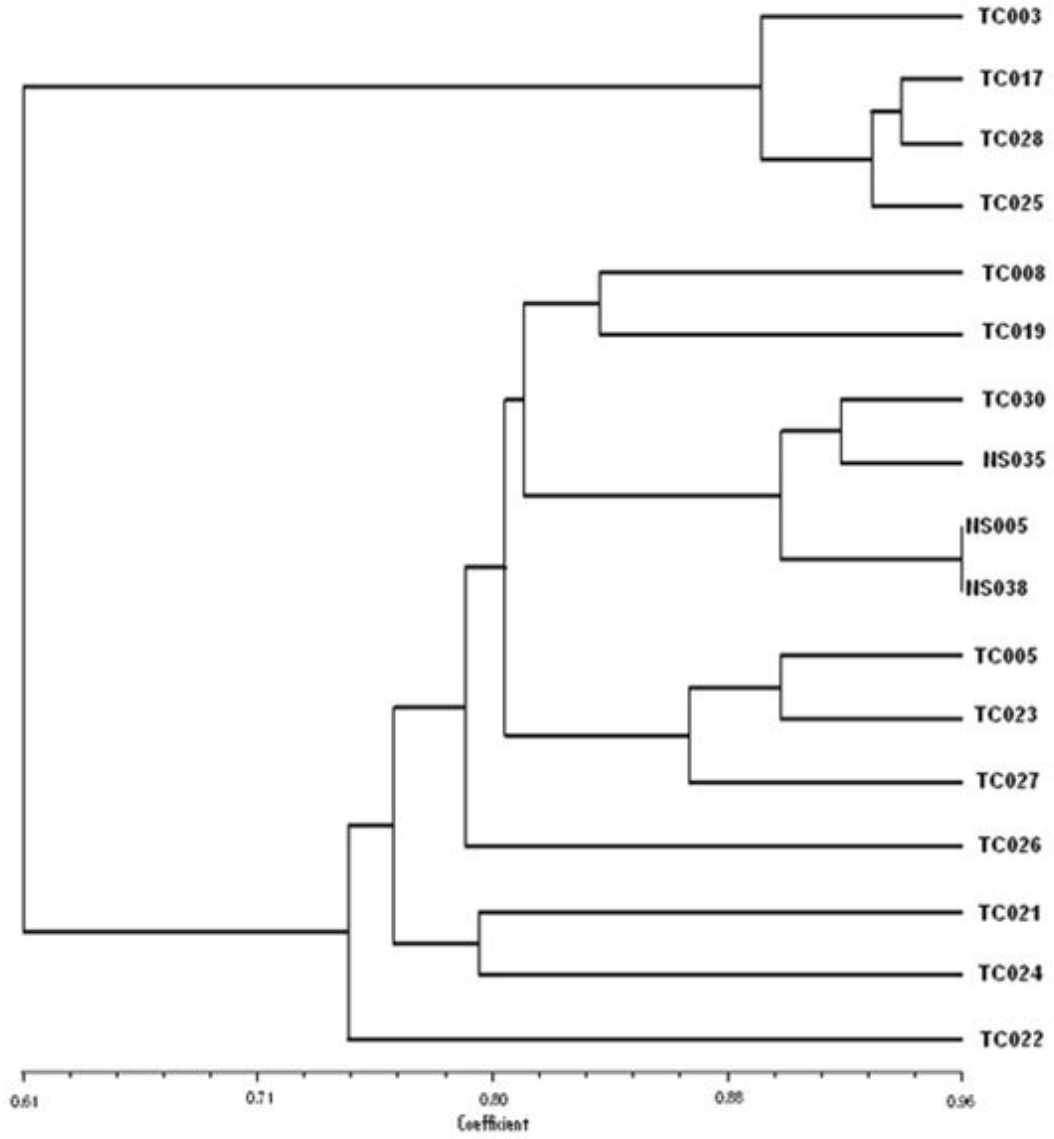


Tablo 4.4. (Devamı)

| Karakteristik                                | TC005    | TC023      | TC026    | TC027            | TC030    | NS005 | NS035 | NS038 |
|----------------------------------------------|----------|------------|----------|------------------|----------|-------|-------|-------|
| <b>Oatmeal agarda spor rengi</b>             | Gri-Sarı | Gri        | Gri-Sarı | Yeşil            | Gri-Sarı | Gri   | Gri   | Gri   |
| <b>Çözünür pigment rengi</b>                 | Yok      | Yeşil      | Yok      | Yeşil-Kahverengi | Yok      | Yok   | Yok   | Yok   |
| <b>Melanin pigmenti</b>                      | Siyah    | Kahverengi | Yok      | Yok              | Siyah    | Yok   | Yok   | Yok   |
| <b>Degredasyon Testleri</b>                  |          |            |          |                  |          |       |       |       |
| Adenin                                       | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| Elastin                                      | +        | +          | +        | +                | +        | -     | -     | +     |
| Casein                                       | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| Hypoxhantin                                  | -        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| Starch                                       | -        | -          | +        | +                | -        | +     | +     | +     |
| Guanine                                      | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| L-tyrosine                                   | -        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| Xhantin                                      | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| Xylan                                        | -        | -          | -        | +                | -        | -     | -     | -     |
| Gelatin                                      | -        | -          | +        | +                | -        | +     | +     | +     |
| RNA                                          | +        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| DNA                                          | -        | -          | -        | +                | -        | -     | -     | -     |
| Tween20                                      | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| Tween80                                      | -        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| Üric acid                                    | -        | +          | +        | +                | -        | -     | -     | -     |
| <b>Karbon ve azot kaynaklarında gelişimi</b> |          |            |          |                  |          |       |       |       |
| D-Cellobiose                                 | +        | +          | -        | -                | +        | +     | +     | +     |
| L-Sorbose                                    | +        | -          | +        | -                | +        | +     | +     | +     |
| D(+)Galactose                                | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| D(+)Xylose                                   | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| D(-)Fructose                                 | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| L(+)Arabinose                                | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| D(+)Mannose                                  | -        | -          | -        | -                | +        | +     | +     | +     |
| D(-)Mannitol                                 | +        | +          | -        | +                | +        | +     | +     | +     |
| İnositol                                     | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| L-Phenylalanin                               | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |
| L-Proline                                    | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | +     |
| D(-)Salicin                                  | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| L(+)Rhamnose                                 | -        | -          | -        | -                | -        | -     | -     | -     |
| Glycine                                      | +        | +          | +        | +                | +        | +     | +     | +     |

**Tablo 4.4.** (Devamı)

| Karakteristik   | TC005 | TC023 | TC026 | TC027 | TC030 | NS005 | NS035 | NS038 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| D(+)-Trehalose  | +     | +     | -     | -     | +     | +     | +     | +     |
| D(+)-Melezitose | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| S(+)-Leucin     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| Dextrin         | +     | +     | -     | +     | +     | +     | +     | +     |
| Raffinose       | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| İnulin          | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| L-isolösin      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| Lactose         | -     | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     |
| Maltose         | +     | +     | -     | +     | -     | +     | -     | -     |
| L-Threonine     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| L-Histidine     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-iso-leucine   | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-Hydroxyprolin | +     | -     | +     | -     | +     | +     | +     | -     |
| L-Valin         | +     | -     | +     | -     | +     | -     | +     | +     |
| L-Methionine    | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-Arginine      | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |
| L-Alanine       | -     | -     | -     | -     | -     | +     | +     | -     |
| L-Cysteine      | -     | +     | -     | -     | -     | -     | -     | -     |
| L-Serine        | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     | +     |



**Şekil 4.1.** S<sub>SM</sub>-UPGMA analizine göre test izolatları arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram

## 4.5. TEST ORGANİZMALARININ KARAKTERİZASYONU

### 4.5.1. Morfolojik ve Kültürel Özellikler

Morfolojik ve kültürel karakterizasyon çalışması için, oatmeal agar (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966) kültür ortamında 28° C’de 14 gün inkübe edilen test organizmalarının hava miselyum spor, substrat miselyum ve çözünebilir pigment rengi belirlendi. Tüm test organizmalarının, melanin pigmenti üretilip üretilmedikleri ise Pepton-Yeast Extract Iron Agar (ISP 6; Shirling ve Gottlieb, 1966) ve Tyrosine Agar (ISP 7; Shirling ve Gottlieb, 1966) kültür ortamlarında 28° C’de 7 günlük inkübasyondan sonra belirlendi. Ayrıca tüm test organizmalarının gelişme ve morfolojik özellikleri modifiye Bennett’s agar (Jones, 1949), yeast extract-malt extract agar (ISP 2; Shirling ve Gottlieb, 1966) glucose-yeast extract-malt extract agar (Shirling ve Gottlieb, 1966), inorganic salts-starch agar (ISP 4; Shirling ve Gottlieb, 1966), glycerol asparagine agar (ISP 5; Shirling ve Gottlieb, 1966) üzerine inoküle edilip 28° C’de 14 gün süre ile inkübasyondan sonra belirlenmiştir. Test organizmalarının gelişme ve morfolojik özellikleri Tablo 4.5’ te resimlerde Ek C’ de verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Test Organizmalarının Farklı Besiyerlerinde Morfolojik ve Kültürel Özellikleri

| <b>İzolatlar</b> | <b>Büyüme ve Kültürel Karakteristikler</b>                       | <b>Yeast extract-malt extract agar (ISP2)</b> | <b>Oatmeal agar (ISP3)</b>            | <b>Inorganic salts starch agar (ISP4)</b>    | <b>Glycerol asparagine agar (ISP5)</b> | <b>Pepton-yeast extract iron agar (ISP6)</b> | <b>Tyrosine agar (ISP7)</b>       | <b>Modified Bennett's agar</b>        | <b>Glucose-yeast extract-malt extract agar (GYMA)</b> |
|------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>TC003</b>     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | ++<br>Gri (seyrek)<br>Kahverengi<br>Yok       | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok            | +++<br>Gri<br>Gri-yeşil<br>Yok               | ++<br>Beyaz (seyrek)<br>Sarı<br>Yok    | Pigment Yok                                  | +++<br>Beyaz<br>Kahverengi<br>Yok | ++<br>Beyaz<br>Sarı-yeşil<br>Yok      | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                              |
| <b>TC004</b>     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok                      | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok           | +++<br>Kirli Beyaz<br>Sarı-Kahverengi<br>Yok | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok               | Pigment Yok                                  | +++<br>Beyaz<br>Yeşil<br>Yok      | +++<br>Beyaz<br>Sarı-yeşil<br>Yok     | ++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok                            |
| <b>TC005</b>     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Sarı<br>Kahverengi<br>Kahverengi       | +++<br>Gri-sarı<br>Turuncu<br>Yok     | +++<br>Gri-sarı<br>Gri-yeşil<br>Yok          | +++<br>Gri<br>Pembe<br>Yok             | Siyah                                        | +++<br>Sarı<br>Kahverengi<br>Yok  | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok              | +++<br>Yeşil<br>Kahverengi<br>Sarı                    |
| <b>TC008</b>     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Sarı<br>Kahverengi<br>Yok              | +++<br>Gri<br>Yeşil-kahverengi<br>Yok | +++<br>Gri-sarı<br>Gri-yeşil<br>Yok          | ++<br>Beyaz (seyrek)<br>Sarı<br>Yok    | Siyah                                        | +++<br>Beyaz<br>Kahverengi<br>Yok | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok           | +++<br>Yeşil<br>Kahverengi<br>Sarı                    |
| <b>TC011</b>     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | ++<br>Gri (seyrek)<br>Sarı<br>Yok             | +++<br>Gri-sarı<br>Yeşil<br>Yok       | ++<br>Gri-sarı<br>Gri-yeşil<br>Yok           | ++<br>Gri (seyrek)<br>Sarı<br>Yok      | Pigment Yok                                  | +++<br>Kahverengi<br>Yeşil<br>Yok | ++<br>Yok<br>Sarı-yeşil<br>Yok        | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                              |
| <b>TC017</b>     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | ++<br>Gri (seyrek)<br>Sarı<br>Yok             | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok            | ++<br>Gri<br>Gri-yeşil<br>Yok                | +<br>Beyaz (seyrek)<br>Sarı<br>Yok     | Pigment Yok                                  | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok   | ++<br>Beyaz<br>Açık kahverengi<br>Yok | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                              |

Tablo 4.5. (Devamı)

| İzolatlar | Büyüme ve Kültürel Karakteristikler                              | Yeast extract-malt extract agar (ISP2)     | Oatmeal agar (ISP3)                     | Inorganic salts starch agar (ISP4)             | Glycerol asparagine agar (ISP5) | Pepton-yeast extract iron agar (ISP6) | Tyrosine agar (ISP7)        | Modified Bennett's agar           | Glucose-yeast extract-malt extract agar (GYMA) |
|-----------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| TC019     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | ++<br>Gri (seyrek)<br>Sarı<br>Yok          | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok               | ++<br>Gri-sarı<br>Gri-yeşil<br>Yok             | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok        | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok  | +++<br>Beyaz<br>Sarı-yeşil<br>Yok | ++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok                 |
| TC020     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri-siyah<br>Sarı-kahverengi<br>Yok | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok              | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Sarı                      | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok        | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Sarı | ++<br>Yok<br>Kırlı beyaz<br>Yok   | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                       |
| TC021     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                  | +++<br>Gri<br>Yok<br>Yok                | +++<br>Gri<br>Gri-yeşil<br>Yok                 | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok     | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok  | +++<br>Gri<br>Sarı-yeşil<br>Yok   | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                      |
| TC022     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Mavi                | +++<br>Gri<br>Yeşil-kahverengi<br>Yeşil | +++<br>Gri-yeşil<br>Siyah<br>Mavi              | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Mor      | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Mavi | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Mavi       | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Mavi                    |
| TC023     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Sarı<br>Turuncu<br>Yok              | +++<br>Gri<br>Gri-sarı<br>Yeşil         | +++<br>Gri-sarı<br>Yeşil-<br>kahverengi<br>Yok | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok        | Siyah                                 | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok | ++<br>Yok<br>Beyaz<br>Yok         | +++<br>Yeşil<br>Turuncu<br>Sarı                |
| TC024     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok            | +++<br>Gri<br>Yok<br>Yok                | +++<br>Gri<br>Gri-yeşil<br>Yok                 | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok     | Pigment Yok                           | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok | +++<br>Gri<br>Sarı-yeşil<br>Yok   | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                      |

Tablo 4.5. (Devamı)

| İzolatlar | Büyüme ve Kültürel Karakteristikler                              | Yeast extract-malt extract agar (ISP2)  | Oatmeal agar (ISP3)                       | Inorganic salts starch agar (ISP4)        | Glycerol asparagine agar (ISP5)     | Pepton-yeast extract iron agar (ISP6) | Tyrosine agar (ISP7)              | Modified Bennett's agar                     | Glucose-yeast extract-malt extract agar (GYMA) |
|-----------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| TC025     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok         | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok                | +++<br>Gri<br>Gri-yeşil<br>Yok            | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok            | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok   | ++<br>Beyaz<br>Sarı-yeşil<br>Yok            | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok                |
| TC026     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Sarı<br>Sarı<br>Yok              | +++<br>Gri-sarı<br>Yok<br>Yok             | +++<br>Gri-sarı<br>Gri-yeşil<br>Yok       | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok         | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok         | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok                 | +++<br>Yeşil<br>Kahverengi<br>Yok              |
| TC027     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Sarı (+ - ) | +++<br>Yeşil<br>Yeşil<br>Yeşil-kahverengi | +++<br>Gri<br>Gri<br>Yok                  | ++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok      | Pigment Yok                           | +++<br>Yeşil<br>Kahverengi<br>Yok | +++<br>Gri<br>Yeşil-<br>kahverengi<br>Yeşil | ++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok                 |
| TC028     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yok                | +++<br>Gri<br>Gri-yeşil<br>Yok            | ++<br>Beyaz (seyrek)<br>Sarı<br>Yok | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok   | ++<br>Beyaz<br>Sarı-yeşil<br>Yok            | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                       |
| TC030     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Sarı<br>Kahverengi<br>Sarı       | +++<br>Gri-sarı<br>Turuncu<br>Yok         | +++<br>Gri<br>Yeşil-<br>kahverengi<br>Yok | +<br>Yok<br>Sarı<br>Yok             | Siyah                                 | +++<br>Sarı<br>Sarı<br>Yok        | ++<br>Yok<br>Sarı<br>Yok                    | +++<br>Sarı<br>Kahverengi<br>Sarı              |
| NS005     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok            | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok              | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok              | ++<br>Yok<br>Kırmızı<br>Yok         | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok      | +++<br>Gri<br>Turuncu<br>Yok                | +++<br>Gri<br>Turuncu<br>Yok                   |

Tablo 4.5. (Devamı)

| İzolatlar | Büyüme ve Kültürel Karakteristikler                              | Yeast extract-malt extract agar (ISP2)             | Oatmeal agar (ISP3)               | Inorganic salts starch agar (ISP4)       | Glycerol asparagine agar (ISP5)                     | Pepton-yeast extract iron agar (ISP6) | Tyrosine agar (ISP7)                     | Modified Bennett's agar                                 | Glucose-yeast extract-malt extract agar (GYMA) |
|-----------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| NS017     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Sarı                   | +++<br>Gri<br>Turuncu<br>Turuncu  | +++<br>Yeşil-kahve<br>Yeşil-kahve<br>Yok | ++<br>Yok<br>Siyah<br>Kahverengi                    | Siyah                                 | +++<br>Kahverengi<br>Siyah<br>Kahverengi | +++<br>Siyah<br>Siyah<br>Kahverengi                     | +++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok                |
| NS026     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Yeşil<br>Siyah<br>Yeşil                     | +++<br>Gri-sarı<br>Siyah<br>Yok   | +++<br>Gri<br>Yeşil-gri<br>Yok           | +++<br>Gri<br>Yeşil<br>Yeşil                        | Siyah                                 | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Kahverengi        | +++<br>Mavi<br>Yeşil<br>Yok                             | +++<br>Gri<br>Siyah<br>Yeşil                   |
| NS035     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Sarı                      | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok      | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok             | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok                        | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok             | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok                            | +++<br>Gri<br>Turuncu<br>Yok                   |
| NS038     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok                       | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok      | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok             | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok                        | Pigment Yok                           | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok             | +++<br>Gri<br>Kırmızı<br>Yok                            | +++<br>Gri<br>Turuncu<br>Yok                   |
| NS071     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri-siyah<br>Siyah-kahverengi<br>Kahverengi | +<br>Gri (seyrek)<br>Yok<br>Yok   | +++<br>Yeşil-gri<br>Yeşil-gri<br>Yok     | ++<br>Gri (zayıf)<br>Yeşil-kahve<br>Açık kahverengi | Siyah                                 | ++<br>Gri-siyah<br>Gri<br>Yok            | ++<br>Gri (zayıf)<br>Açık kahverengi<br>Açık kahverengi | ++<br>Gri<br>Kahverengi<br>Yok                 |
| NS082     | Büyüme:<br>Spor rengi:<br>Substrat miselyum:<br>Çözünür pigment: | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                          | +++<br>Gri<br>Turuncu<br>Gri-sarı | +++<br>Gri<br>Yeşil-kahve<br>Yeşil-kahve | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                            | Pigment Yok                           | +++<br>Beyaz<br>Sarı<br>Yok              | +++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                               | ++<br>Gri<br>Sarı<br>Yok                       |

#### 4.6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TESTİ

Test izolatları, gram pozitif (+) bakteriler ve gram negatif (-) bakteriler, maya ve filamentli fungus olmak üzere 18 patojen ve *Streptomyces murinus* türünden oluşan toplam 19 organizmanın gelişmelerini inhibe etme kabiliyetlerine göre incelendi (Williams ve ark., 1983a). Test sonuçları, oluşan zon çapları Tablo 4.6'da verilmiştir. Test organizmalarının hepsi iki patojene karşı (*A.niger*-izolat, *S.aureus* ATCC 25923) hiç bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır.

**Tablo 4.6.**Test Organizmalarının Patojenlere Karşı Oluşturdıkları İnhibisyon Zon Çapları (mm)

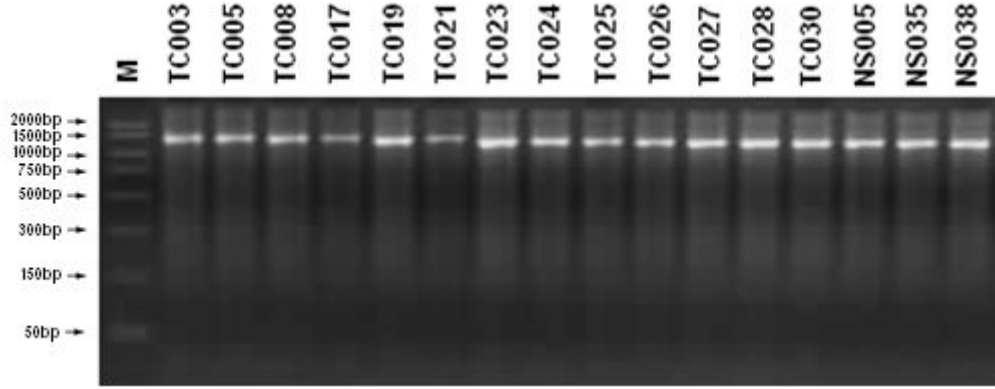
| İzolat | <i>A.flavus</i><br>NRRL-1957 | <i>A.niger</i> -<br>izolat | <i>A.parasiticus</i><br>NRRL-465 | <i>B.cereus</i><br>NRRL-B 3711 | <i>B.licheniformis</i><br>NRRL-B1001 | <i>B.pumilis</i><br>NRRL-BD142 | <i>B.subtilis</i><br>NRRL-B209 | <i>C.albicans</i><br>ATCC 10231 | <i>C.freundii</i><br>NRRL-B2643 | <i>E.coli</i><br>ATCC 25922 |
|--------|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| TC003  | -                            | -                          | -                                | -                              | 15                                   | -                              | 54                             | 46                              | -                               | -                           |
| TC005  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| TC008  | -                            | -                          | -                                | -                              | 14                                   | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| TC011  | -                            | -                          | -                                | -                              | 14                                   | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| TC017  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | 12                             | 40                             | -                               | -                               | -                           |
| TC019  | -                            | -                          | -                                | -                              | 20                                   | -                              | 17                             | -                               | 13                              | -                           |
| TC020  | 15                           | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | 11                             | -                               | -                               | -                           |
| TC021  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | 15                             | -                              | -                               | 13                              | -                           |
| TC022  | 20                           | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| TC023  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| TC024  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | 14                             | -                               | -                               | -                           |
| TC025  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | 54                             | -                               | -                               | -                           |
| TC026  | -                            | -                          | -                                | -                              | 18                                   | 22                             | 14                             | -                               | -                               | 22                          |
| TC027  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | 16                             | -                               | -                               | -                           |
| TC028  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | 40                             | -                               | -                               | -                           |
| TC030  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| NS005  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| NS017  | -                            | -                          | -                                | 20                             | -                                    | 38                             | 37                             | -                               | -                               | -                           |
| NS026  | -                            | -                          | -                                | -                              | -                                    | -                              | 28                             | -                               | -                               | -                           |
| NS035  | -                            | -                          | 12                               | 16                             | 12                                   | -                              | 17                             | -                               | -                               | -                           |
| NS038  | -                            | -                          | -                                | 12                             | 20                                   | -                              | -                              | -                               | -                               | -                           |
| NS071  | 24                           | -                          | 26                               | 14                             | 34                                   | 40                             | 24                             | -                               | -                               | -                           |
| NS082  | -                            | -                          | -                                | -                              | 17                                   | 20                             | 15                             | -                               | -                               | -                           |

**Tablo 4. 6. (Devamı)**

[illegible]

#### 4.7. 16S rRNA' NIN PCR AMPLİFİKASYONU

Test organizmalarının 16S rRNA gen bölgesi 27f ve 1525r primerleri (27f:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1525r: AAGGAGGTGWTCCARCC-3; Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da amplifiye edildi. Amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde PCR DNA marker ile 100 voltta 30 dakika yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde (Gene Genius, SyneGene, Bio Imaging Systems, UK) fotoğraflandı ve kaydedildi(Şekil 4.2). Daha sonra PCR ürünleri QIAquick PCR pürifikasyon kiti (Qiagen, Valencia, USA ) ile pürifiye edildi.



**Şekil 4.2.** Test organizmalarının 16S rRNA' yı kodlayan gen bölgesinin amplifikasyon ürünleri. M, PCR DNA marker (2000-50 bp).

#### 4.8. AMPLİFİYE EDİLMİŞ rDNA RESTRİKSİYON ANALİZİ (ARDRA)

Test organizmalarının PCR ile amplifiye edilmiş 16S rRNA amplifikasyon ürününü *EcoR* I, *Pst* I ve *Sau3* AI restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesildi. Örnekler %2'lik agaroz jelde PCR DNA marker ile birlikte 100 voltta 1.5 saat yürütüldü.

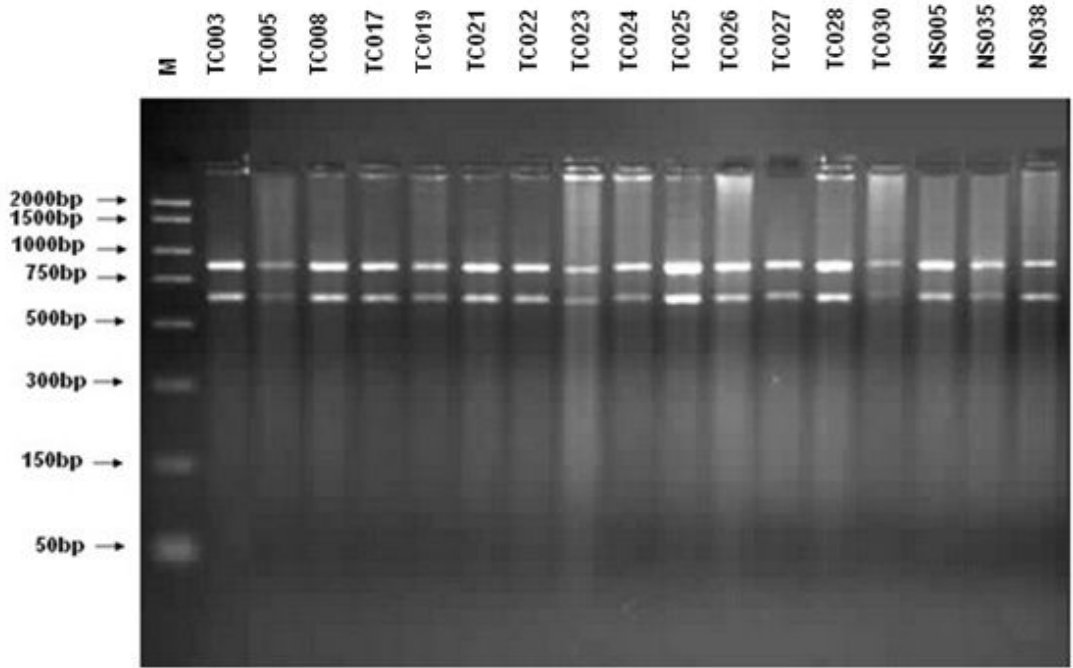
*EcoR* I restriksiyon endonükleaz enzimi, tüm test organizmalarının 16S rRNA amplifikasyon ürününü bir bölgeden keserek biri 888 diğeri 650 baz çifti büyüklüğünde ve toplamda 1538bp olan PCR-RFLP parmak izi oluşturmuştur (Şekil 4.3).

*Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimi tüm test organizmalarının 16S rRNA amplifikasyon ürünü 1041 ve 141 baz çifti aralığında 4 farklı bölgeden kesmiştir. 1041, 1000, 900, 457 ve 141 baz çifti büyüklüğünde her bir organizmada en fazla 3 en az 2 PCR-RFLP bant oluşturmuştur ve oluşan bantların büyüklükleri her iki farklı kesim bölgesi için toplam 1498bp'dir.(Şekil 4.4).

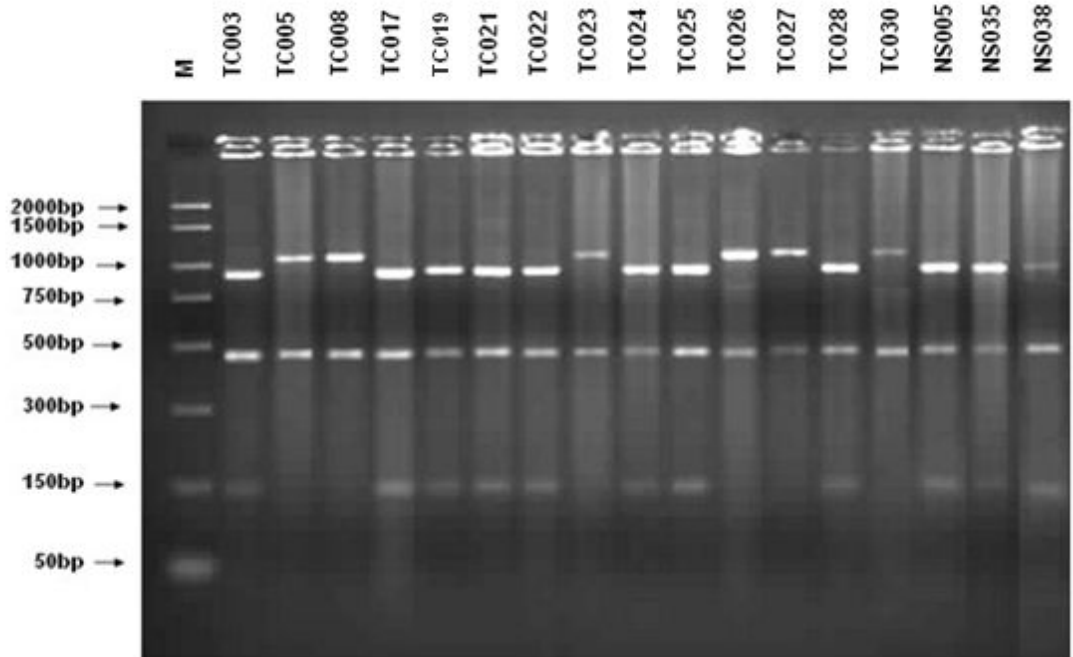
*Sau3* AI restriksiyon endonükleaz enzimi, tüm test organizmalarının 16S rRNA amplifikasyon ürününü 640-40 baz çifti aralığında 3 farklı bölgeden kesmiştir. 640, 638, 238 ve 40 baz çifti büyüklüğünde ve toplamı 1556bp olup her bir organizmada 4 PCR-RFLP parmak izi oluşturmuştur (Şekil 4.5).

**Tablo 4.7.** Test Organizmalarının *EcoR* I, *Pst* I ve *Sau3* AI ile PCR-RFLP Yaklaşık Fragment Büyüklükleri

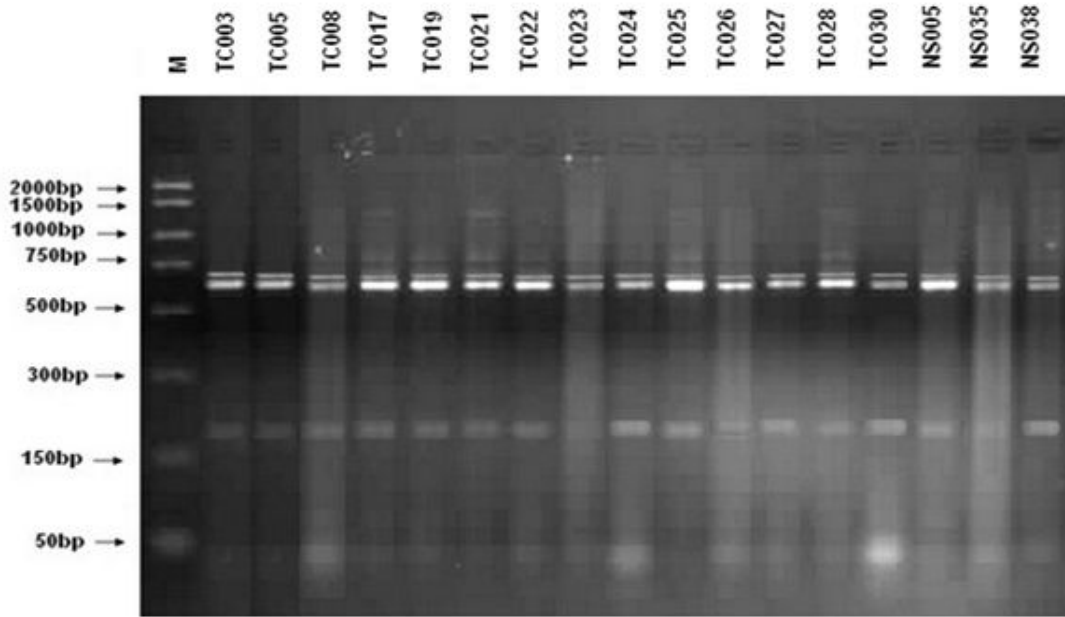
| Test Organizma No. | <i>Pst</i> I |     |     | <i>EcoR</i> I |     | <i>Sau3</i> AI |     |     |    |
|--------------------|--------------|-----|-----|---------------|-----|----------------|-----|-----|----|
| TC003              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC005              | 1041         | 457 |     | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC008              | 1041         | 457 |     | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC017              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC019              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC021              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC022              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC023              | 1041         | 457 |     | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC024              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC025              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC026              | 1041         | 457 |     | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC027              | 1041         | 457 |     | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC028              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| TC030              | 1041         | 457 |     | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| NS005              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| NS035              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |
| NS038              | 900          | 457 | 141 | 888           | 650 | 640            | 638 | 238 | 40 |



**Şekil 4. 3.** Test organizmalarının *EcoR* I restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR-RFLP parmak izi. M, PCR DNA marker<sup>TM</sup> (2000-50bp)



**Şekil 4. 4.** Test organizmalarının *Pst* I restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR-RFLP parmak izi. M, PCR DNA marker<sup>TM</sup> (2000-50bp).

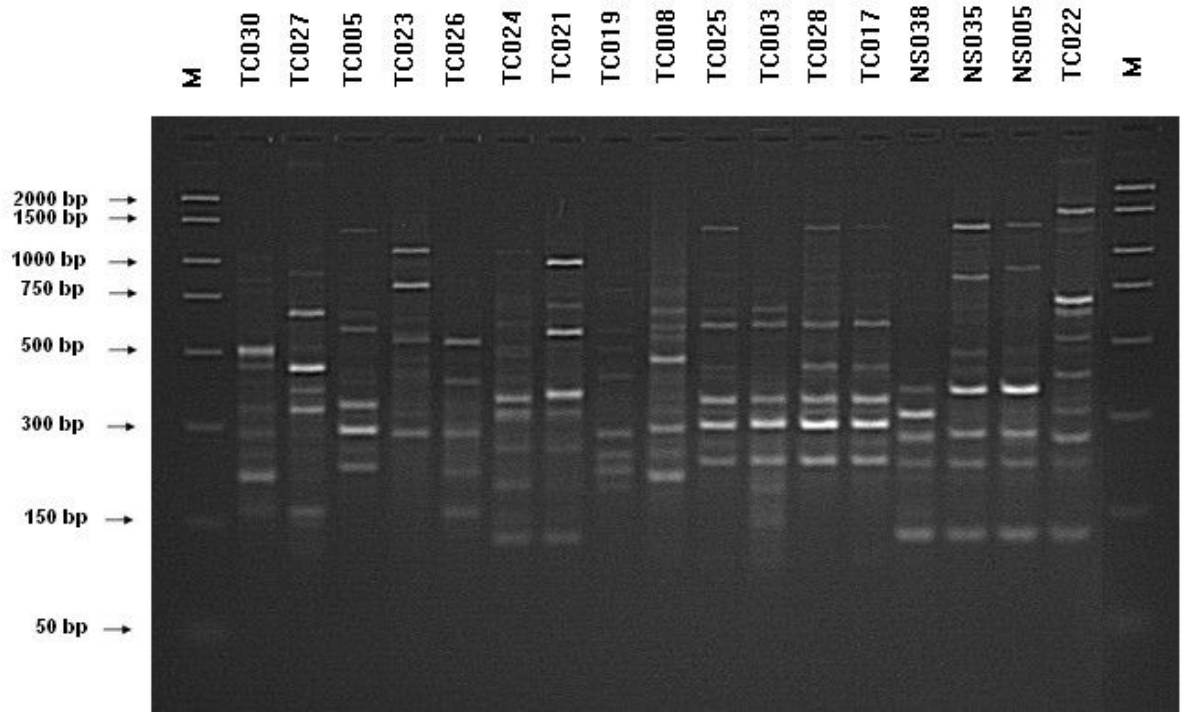


**Şekil 4. 5.** Test organizmalarının *Sau3* AI restriksiyon endonükleaz enzimi ile PCR-RFLP parmak izi. M, PCR DNA marker<sup>TM</sup> (2000-50bp).

#### **4. 9. RASTGELE AMPLİFİYE EDİLMİŞ POLİMORFİK DNA (RAPD-PCR; RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)**

Test organizmalarının DNA örnekleri, PCR-RAPD metodu ile M13f (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3', BioTech) evrensel primeri kullanılarak Thermal Cycler (PCR Express, ThermoHybaid, Middlesex, UK)'da amplifiye edildi. Amplifiye edilen örnekler, % 2'lik agaroz jelde PCR DNA marker ile birlikte 100 voltta 2 saat elektroforezde yürütüldükten sonra her bir örneğin RAPD parmak izi birbirleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.6).

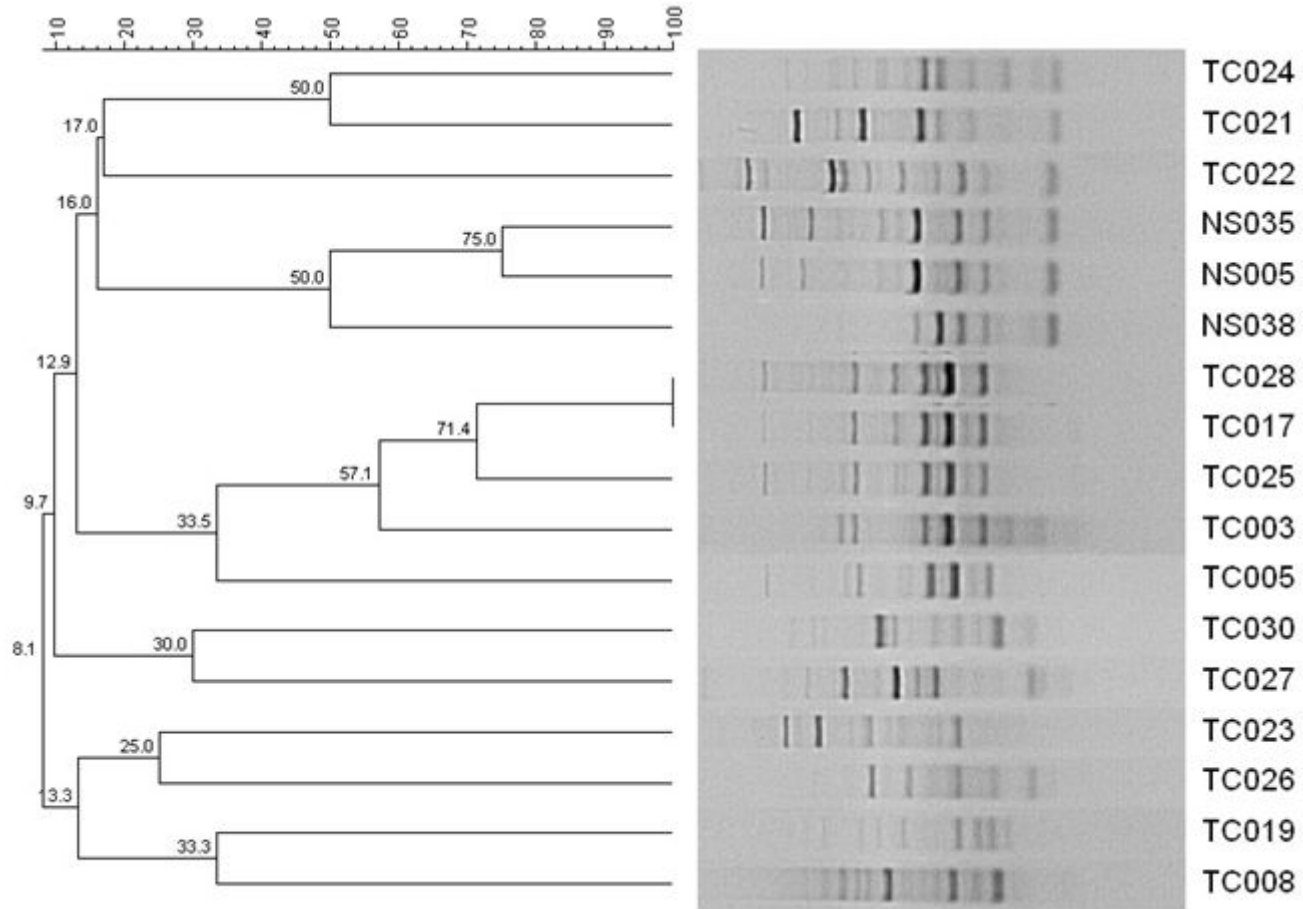
RAPD-PCR fragmentlerinin baz çifti büyüklüklerinin hesaplanmasında ve dendogramın oluşturulmasında BioNumerics software version 4 (Bio-Maths, Bithoven, Belgium) kullanılmıştır. Benzerliklerin hesaplanmasında Jaccard ve kümeleme için ise UPGMA (UPGMA-Unweighted pair group method using arithmetic means) kullanılmıştır.



**Şekil 4. 6.** Test organizmalarının %2' lik agaroz jel üzerinde RAPD-PCR parmak izi. M, PCR DNA marker<sup>TM</sup> (2000-50bp).

**Tablo 4. 8.** Test Organizmalarının RAPD-PCR Baz Çifti Büyüklüğü

| Suş No: | 1700 | 1390 | 1278 | 1110 | 906 | 875 | 812 | 781 | 750 | 730 | 692 | 673 | 635 | 598 | 576 | 558 | 519 | 500 | 488 | 464 | 440 | 417 | 405 | 383 | 370 | 347 | 335 | 300 | 293 | 270 | 255 | 240 | 225 | 202 | 157 | 130 |   |
|---------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| TC030   | -    | -    | -    | +    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | +   | -   |     |   |
| TC027   | -    | -    | -    | -    | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   |     |   |
| TC005   | -    | +    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |     |   |
| TC023   | -    | -    | -    | +    | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |   |
| TC026   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   |   |
| TC024   | -    | -    | -    | +    | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | +   |   |
| TC021   | -    | -    | +    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   |   |
| TC019   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | +   | -   |   |
| TC008   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   |   |
| TC025   | -    | +    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |   |
| TC003   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   |   |
| TC028   | -    | +    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |   |
| TC017   | -    | +    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   |   |
| NS038   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   |   |
| NS035   | -    | +    | -    | -    | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | +   |   |
| NS005   | -    | +    | -    | -    | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | + |
| TC022   | +    | +    | -    | -    | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | +   | -   | -   | +   | -   | -   | -   | + |



Şekil 4. 7. RAPD-PCR verilerinin Jaccard-UPGMA analizine göre test izolatları arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram

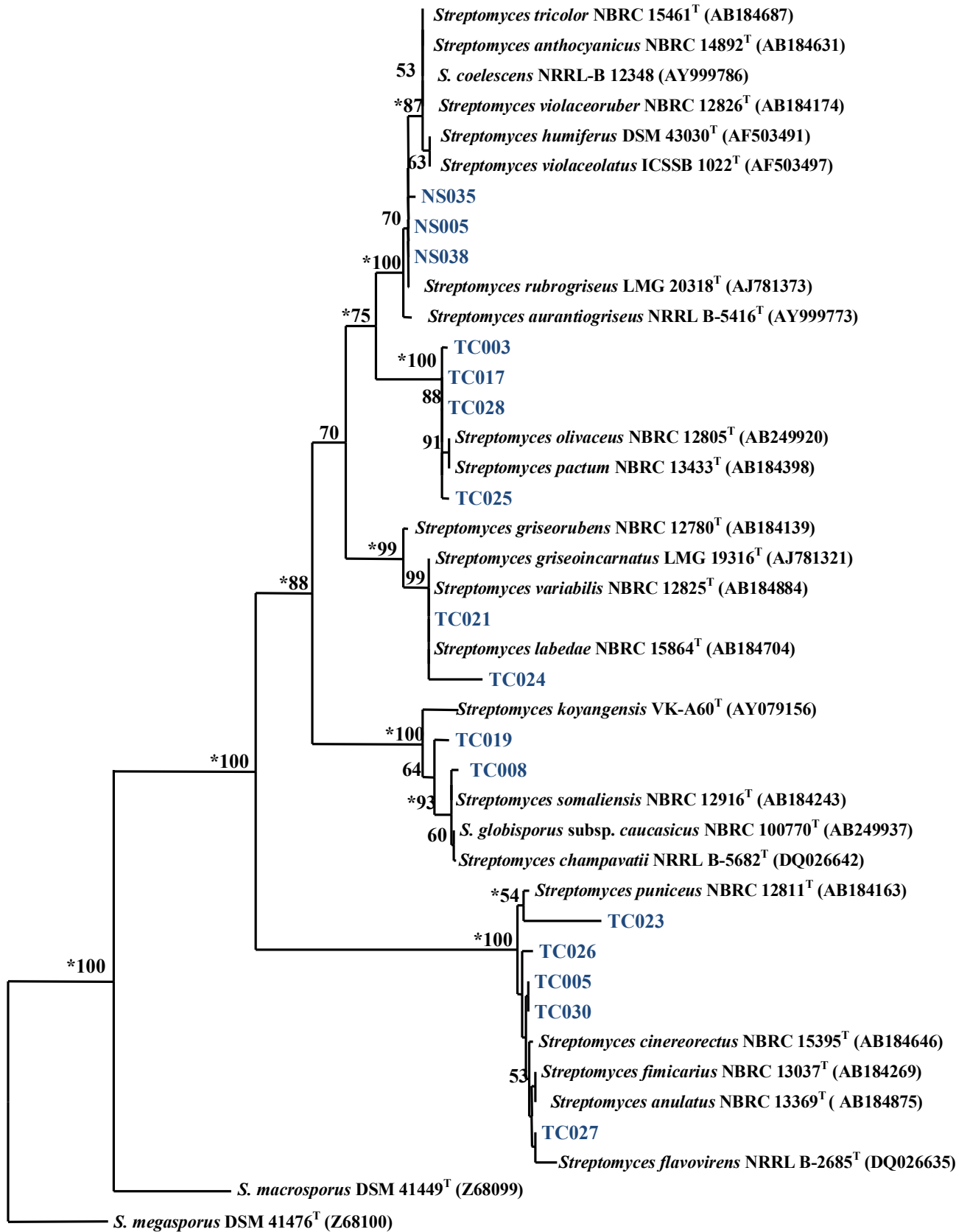
Toplam 17 organizmada RAPD-PCR parmak iz'leri en az 5 (TC023, TC026, NS038) en fazla 10 (TC022) fragment sayısında ve 1700-130 baz çifti aralığında oluşmuştur (Tablo 4.8).

#### 4.10. 16S rRNA SEKANS ANALİZİ

PCR amplifikasyon ürünleri saflaştırıldıktan sonra temsilci test izolatlarının 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi, birbirinden farklı 4 oligonükleotit primeri (27f, 800r, MG3 ve MG5) kullanılarak Macrogen Inc. (Güney Korea)'de gerçekleştirildi.

NCBI/GenBank (Benson ve ark., 2004), RDP-II RDP (Ribosomal Database Project; Maidak ve ark., 2001), DDBJ (DNA Data Bank of Japon; Tateno ve ark., 2005), EMBL (European Molecular Biology Lab., Kanz ve ark., 2005) gibi databanklardan elde edilen *Streptomyces* tip örneği 16S rRNA nükleotit baz dizileri ile test örneklerinin baz dizileri PHYDIT (Chun, 2001) programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak dizilendi. 16S rRNA üzerinde değişken bölgelerin yoğun olarak bulunduğu yaklaşık 800 nükleotitlik bölge hem **27f** hem de **800r** primerleri ile çalışılarak ikili kontrol yapılmıştır ve MG3 ve MG5 primerleride kullanılarak elde edilen baz dizi verileri yan yana getirilerek yaklaşık 1500 bp'den oluşan 16S rRNA bölgesinin tüm baz dizisi oluşturuldu. Tek dizi haline dönüştürülen 16S rRNA nükleotit baz dizileri filogenetik dendogramın oluşması için kullanıldı.

Test organizmaları ve *Streptomyces* tip türlerinin 16S rRNA sekans analizine bağlı filogenetik dendogramı least-squares (Fitch ve Margoliash, 1967), maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) ve neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritmaları kullanılarak oluşturuldu. Neighbour-joining, least-squares ve maximum-parsimony metotları için evrimsel uzaklık matrisi Jukes ve Cantor (1969)'un işlemleri takip edilerek yapıldı. Dış grup olarak *Streptomyces megasporus* ve *Streptomyces macrosporus* türleri kullanıldı. Test izolatlarının 16S rRNA nükleotit dizisine dayalı oluşturulan Neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987; Jukes ve Cantor, 1969)'un evrimsel uzaklık modeline göre filogenetik soy ağacı Şekil 4.8'de verilmiştir.



**Şekil 4. 8.** Test organizmaları ve bazı *Streptomyces* ait tip türlerinin 16S rRNA sekansına dayalı neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) filogenetik soy ağacı (Nodlarda %50'nin üzerinde bootstrap değerleri verilmiştir).

Asteriksler maximum-parsimony (Kluge ve Farris, 1969) ve least-squares (Fitch ve Margoliash, 1967) algoritmaları kullanılarak oluşturulan ağaçlarda meydana gelen dalları göstermektedir.

**Tablo 4.9.** Test organizmaları ve bazı tanımlanmış *Streptomyces* türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı benzerlik değerleri ve nükleotit sayısı

|                           | NS005 | NS035 | NS038 | <i>S. tricolor</i> | <i>S. anthocyanicus</i> | <i>S. coelestis</i> | <i>S. violaceoruber</i> | <i>S. humiferus</i> | <i>S. violaceolatus</i> | <i>S. rubrogriseus</i> | <i>S. aurantiogriseus</i> |
|---------------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| NS005                     | ---   | 1     | 0     | 2                  | 2                       | 2                   | 2                       | 3                   | 3                       | 0                      | 2                         |
| NS035                     | 99.93 | ---   | 1     | 3                  | 3                       | 3                   | 3                       | 4                   | 4                       | 1                      | 3                         |
| NS038                     | 100   | 99.93 | ---   | 2                  | 2                       | 2                   | 2                       | 3                   | 3                       | 0                      | 2                         |
| <i>S. tricolor</i>        | 99.86 | 99.79 | 99.86 | ---                | 0                       | 0                   | 0                       | 1                   | 1                       | 2                      | 4                         |
| <i>S. anthocyanicus</i>   | 99.86 | 99.79 | 99.86 | 100                | ---                     | 0                   | 0                       | 1                   | 1                       | 2                      | 4                         |
| <i>S. coelestis</i>       | 99.86 | 99.79 | 99.86 | 100                | 100                     | ---                 | 0                       | 1                   | 1                       | 2                      | 4                         |
| <i>S. violaceoruber</i>   | 99.86 | 99.79 | 99.86 | 100                | 100                     | 100                 | ---                     | 1                   | 1                       | 2                      | 4                         |
| <i>S. humiferus</i>       | 99.79 | 99.72 | 99.79 | 99.93              | 99.93                   | 99.93               | 99.93                   | ---                 | 0                       | 3                      | 5                         |
| <i>S. violaceolatus</i>   | 99.79 | 99.72 | 99.79 | 99.93              | 99.93                   | 99.93               | 99.93                   | 100                 | ---                     | 3                      | 5                         |
| <i>S. rubrogriseus</i>    | 100   | 99.93 | 100   | 99.86              | 99.86                   | 99.86               | 99.86                   | 99.79               | 99.79                   | ---                    | 2                         |
| <i>S. aurantiogriseus</i> | 99.86 | 99.79 | 99.86 | 99.72              | 99.72                   | 99.72               | 99.72                   | 99.66               | 99.66                   | 99.86                  | ---                       |

**Tablo 4.10.** Test organizmaları ve bazı tanımlanmış *Streptomyces* türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı benzerlik değerleri ve nükleotid sayısı

|                                   | TC003 | TC017 | TC028 | TC025 | TC021 | TC024 | <i>S. olivaceus</i> | <i>S. pactum</i> | <i>S. griseorubens</i> | <i>S. griseoincarnatus</i> | <i>S. variabilis</i> | <i>S. labedae</i> |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------|
| <b>TC003</b>                      | ---   | 1     | 1     | 2     | 24    | 31    | 2                   | 2                | 23                     | 24                         | 24                   | 24                |
| <b>TC017</b>                      | 99.93 | ---   | 0     | 1     | 24    | 31    | 1                   | 1                | 23                     | 24                         | 24                   | 24                |
| <b>TC028</b>                      | 99.93 | 100   | ---   | 1     | 24    | 31    | 1                   | 1                | 23                     | 24                         | 24                   | 24                |
| <b>TC025</b>                      | 99.86 | 99.93 | 99.93 | ---   | 25    | 32    | 2                   | 2                | 24                     | 25                         | 25                   | 25                |
| <b>TC021</b>                      | 98.35 | 98.35 | 98.35 | 98.28 | ---   | 7     | 24                  | 24               | 1                      | 0                          | 0                    | 0                 |
| <b>TC024</b>                      | 97.86 | 97.87 | 97.87 | 97.80 | 99.52 | ---   | 31                  | 31               | 8                      | 7                          | 7                    | 7                 |
| <b><i>S. olivaceus</i></b>        | 99.86 | 99.93 | 99.93 | 99.86 | 98.33 | 97.84 | ---                 | 0                | 23                     | 24                         | 24                   | 24                |
| <b><i>S. pactum</i></b>           | 99.86 | 99.93 | 99.93 | 99.86 | 98.34 | 97.86 | 100                 | ---              | 23                     | 24                         | 24                   | 24                |
| <b><i>S. griseorubens</i></b>     | 98.41 | 98.41 | 98.41 | 98.35 | 99.93 | 99.45 | 98.39               | 98.41            | ---                    | 1                          | 1                    | 1                 |
| <b><i>S. griseoincarnatus</i></b> | 98.35 | 98.35 | 98.35 | 98.28 | 100   | 99.52 | 98.33               | 98.34            | 99.93                  | ---                        | 0                    | 0                 |
| <b><i>S. variabilis</i></b>       | 98.35 | 98.35 | 98.35 | 98.28 | 100   | 99.52 | 98.33               | 98.34            | 99.93                  | 100                        | ---                  | 0                 |
| <b><i>S. labedae</i></b>          | 98.34 | 98.34 | 98.34 | 98.28 | 100   | 99.52 | 98.33               | 98.34            | 99.93                  | 100                        | 100                  | ---               |

**Tablo 4. 11.** Test organizmaları ve bazı tanımlanmış *Streptomyces* türleri arasındaki 16S rRNA sekansına bağlı benzerlik değerleri ve nükleotid sayısı

|                                                | TC005 | TC008 | TC019 | TC023 | TC026 | TC030 | TC027 | <i>S. koyangensis</i> | <i>S. champavatii</i> | <i>S. somaliensis</i> | <i>S. globisporus</i> subsp.<br><i>caucasicus</i> | <i>S. puniceus</i> | <i>S. cinereorectus</i> | <i>S. fimicarius</i> | <i>S. anulatus</i> | <i>S. flavovirens</i> |
|------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| <b>TC005</b>                                   | ---   | 66    | 65    | 14    | 3     | 0     | 2     | 58                    | 66                    | 65                    | 65                                                | 3                  | 3                       | 1                    | 1                  | 5                     |
| <b>TC008</b>                                   | 95.45 | ---   | 6     | 74    | 66    | 65    | 66    | 6                     | 2                     | 1                     | 1                                                 | 66                 | 65                      | 67                   | 65                 | 69                    |
| <b>TC019</b>                                   | 95.52 | 99.59 | ---   | 71    | 65    | 64    | 65    | 8                     | 4                     | 5                     | 4                                                 | 65                 | 64                      | 66                   | 64                 | 66                    |
| <b>TC023</b>                                   | 99.04 | 94.90 | 95.10 | ---   | 13    | 13    | 14    | 67                    | 72                    | 73                    | 72                                                | 11                 | 13                      | 13                   | 13                 | 15                    |
| <b>TC026</b>                                   | 99.79 | 95.45 | 95.52 | 99.10 | ---   | 2     | 3     | 58                    | 66                    | 65                    | 65                                                | 4                  | 4                       | 2                    | 2                  | 6                     |
| <b>TC030</b>                                   | 100   | 95.52 | 95.59 | 99.10 | 99.86 | ---   | 1     | 57                    | 65                    | 64                    | 64                                                | 3                  | 2                       | 0                    | 0                  | 4                     |
| <b>TC027</b>                                   | 99.86 | 95.45 | 95.52 | 99.04 | 99.79 | 99.93 | ---   | 58                    | 66                    | 65                    | 65                                                | 5                  | 1                       | 1                    | 1                  | 3                     |
| <i>S. koyangensis</i>                          | 96.00 | 99.59 | 99.45 | 95.37 | 96.00 | 96.06 | 96.00 | ---                   | 6                     | 5                     | 5                                                 | 59                 | 58                      | 59                   | 57                 | 61                    |
| <i>S. champavatii</i>                          | 95.45 | 99.86 | 99.72 | 95.03 | 95.45 | 95.52 | 95.45 | 99.59                 | ---                   | 1                     | 0                                                 | 66                 | 65                      | 67                   | 65                 | 67                    |
| <i>S. somaliensis</i>                          | 95.52 | 99.93 | 99.66 | 94.97 | 95.52 | 95.59 | 95.52 | 99.66                 | 99.93                 | ---                   | 0                                                 | 65                 | 64                      | 66                   | 64                 | 68                    |
| <i>S. globisporus</i> subsp. <i>caucasicus</i> | 95.52 | 99.93 | 99.72 | 95.03 | 95.52 | 95.58 | 95.52 | 99.66                 | 100                   | 100                   | ---                                               | 65                 | 64                      | 66                   | 64                 | 67                    |
| <i>S. puniceus</i>                             | 99.79 | 95.45 | 95.52 | 99.24 | 99.72 | 99.79 | 99.66 | 95.93                 | 95.45                 | 95.52                 | 95.52                                             | ---                | 4                       | 4                    | 4                  | 8                     |
| <i>S. cinereorectus</i>                        | 99.79 | 95.51 | 95.58 | 99.10 | 99.72 | 99.86 | 99.93 | 95.99                 | 95.51                 | 95.58                 | 95.58                                             | 99.72              | ---                     | 2                    | 2                  | 4                     |
| <i>S. fimicarius</i>                           | 99.93 | 95.39 | 95.46 | 99.10 | 99.86 | 100   | 99.93 | 95.93                 | 95.39                 | 95.46                 | 95.45                                             | 99.72              | 99.86                   | ---                  | 0                  | 4                     |
| <i>S. anulatus</i>                             | 99.93 | 95.52 | 95.59 | 99.10 | 99.86 | 100   | 99.93 | 96.07                 | 95.52                 | 95.59                 | 95.59                                             | 99.72              | 99.86                   | 100                  | ---                | 4                     |
| <i>S. flavovirens</i>                          | 99.66 | 95.24 | 95.45 | 98.97 | 99.59 | 99.72 | 99.79 | 95.79                 | 95.38                 | 95.31                 | 95.38                                             | 99.45              | 99.72                   | 99.72                | 99.72              | ---                   |

16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizileri bakımından %100 benzerlik gösteren **NS005** ile **NS038** kodlu test izolatları, **NS035** izolatı ile 1 nt farklılığı (% 99.93 benzerlik) göstermiştir. 16S rRNA gen dizisi analizine göre oluşturulan filogenetik dendogramda NS005 ile NS038 kodlu test izolatları tip türlerinden *Streptomyces rubrogriseus* LMG 20318<sup>T</sup> ile % 100, *Streptomyces violaceoruber* NBRC 12826<sup>T</sup>, *Streptomyces aurantiogriseus* NRRL B-5416<sup>T</sup>, *Streptomyces coelestis* NRRL B-12348<sup>T</sup>, *Streptomyces anthocyanicus* NBRC 14892<sup>T</sup>, *Streptomyces tricolor* NBRC 15461<sup>T</sup> ile % 99.86 (2 nt farklılığı), *Streptomyces violaceolatus* ICSSB 1022<sup>T</sup> ve *Streptomyces humiferus* DSM 43030<sup>T</sup> ile % 99.79 (3 nt farklılığı) benzerlik göstermiştir. **NS035** kodlu test izolatı tip türlerinden en yüksek benzerliği *Streptomyces rubrogriseus* LMG 20318<sup>T</sup> ile % 99.93 (1 nt farklılığı) göstermiştir. *Streptomyces violaceoruber* NBRC 12826<sup>T</sup>, *Streptomyces aurantiogriseus* NRRL B-5416<sup>T</sup>, *Streptomyces coelestis* NRRL B-12348<sup>T</sup>, *Streptomyces anthocyanicus* NBRC 14892<sup>T</sup>, *Streptomyces tricolor* NBRC 15461<sup>T</sup> ile % 99.79 (3 nt farklılığı), *Streptomyces violaceolatus* ICSSB 1022<sup>T</sup> ve *Streptomyces humiferus* DSM 43030<sup>T</sup> ile % 99.72 (4 nt farklılığı) benzerliği göstermiştir (Şekil 4.8, Tablo 4.9).

16S rRNA sekans analizine göre oluşturulan filogenetik dendogramda **TC003**, **TC017**, **TC028**, **TC025** izolatları *Streptomyces olivaceus* NBRC 12805<sup>T</sup> ve *Streptomyces pactum* NBRC 13433<sup>T</sup> tip örnekleri ile birlikte kümelenmişlerdir. 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizisi bakımında %100 benzerlik gösteren TC017 ve TC028 izolatları bu tip türlerinden 1nt farklılığı (%99.93 benzerlik) ile ayrılmıştır. TC017 ile TC028 izolatlarının TC003 ve TC025 izolatları ile % 99.93 (1 nt farklılığı) benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. TC003 ve TC025 izolatları *Streptomyces olivaceus* NBRC 1280<sup>T</sup> ve *Streptomyces pactum* NBRC 13433<sup>T</sup> ile 2 nt farklılığı (% 99.86 benzerlik) ile ayrılmıştır.(Şekil 4.8, Tablo 4.10).

16S rRNA gen bölgesi dizi analizine göre **TC021** kodlu test izolatı tip türlerinden *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316<sup>T</sup>, *Streptomyces variabilis* NBRC 12825<sup>T</sup>, *Streptomyces labedae* NBRC 15864<sup>T</sup> ile % 100 benzerlik göstermektedir. TC021 ile 7 nükleotit farklılığı olan **TC024** kodlu test izolatı bu tip türlerinden tip türleri ile % 99.52 (7 nt farklılığı) ile göstermiştir (Şekil 4.8, Tablo 4.10).

16S rRNA sekans analizine göre oluşturulan filogenetik dendogramda **TC005**, **TC023**, **TC026**, **TC027**, **TC030** izolatları *Streptomyces cinereorectus* NBRC 15395<sup>T</sup>, *Streptomyces fimicarius* NBRC 13037<sup>T</sup>, *Streptomyces anulatus* NBRC 13369<sup>T</sup>, *Streptomyces flavovirens* NRRL B-2685<sup>T</sup> ve *Streptomyces puniceus* NBRC 12811<sup>T</sup> tip türleri ile birlikte kümelenmişlerdir. 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizisi bakımından % 100 benzerlik gösteren TC005 ile TC030 izolatları TC005 ve TC026 izolatları ile % 99.79 (3 nt farklılığı) , TC027 ile % 99.86 (2 nt farklılığı) benzerlik göstermiştir. 16S rRNA sekans analizine göre TC005 ve TC026 kodlu test izolatları *Streptomyces fimicarius* NBRC 13037<sup>T</sup> ve *Streptomyces anulatus* NBRC 13369<sup>T</sup> tip türleri ile sırasıyla % 99.93 (1 nt farklılığı) ve % 99.86 (2 nt farklılığı) benzerlik göstermiştir. TC023 kodlu test izolatu tip türlerinden en yüksek benzerliği *Streptomyces puniceus* NBRC 12811<sup>T</sup> ile % 99.24 (11 nt farklılığı) göstermiştir. TC027 kodlu test izolatu tip türlerinden en yüksek benzerliği *Streptomyces anulatus* NBRC 13369<sup>T</sup>, *Streptomyces fimicarius* NBRC 13037<sup>T</sup> ve *Streptomyces cinereorectus* NBRC 15395<sup>T</sup> ile % 99.93 (1 nt farklılığı) göstermiştir (Şekil 4.8, Tablo 4.11).

16S rRNA gen bölgesi dizisi bakımından 6 nükleotid farklılık (99.59 benzerlik) gösteren **TC008** ile **TC019** test izolatları 16S rRNA sekans analizine göre oluşturulan filogenetik dendogramda *Streptomyces koyangensis* VK-A60<sup>T</sup>, *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup>, *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* NBRC 100770<sup>T</sup> ve *Streptomyces champavatii* NRRL B-5682<sup>T</sup> birlikte kümelenmiştir. TC008 kodlu test izolatu tip türlerinden en yüksek benzerliği *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> ve *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* NBRC 100770<sup>T</sup> ile % 99.93 (1 nt farklılığı), *Streptomyces champavatii* NRRL B-5682<sup>T</sup> ile % 99.86 (2 nt farklılığı) ve *Streptomyces koyangensis* VK-A60<sup>T</sup> ile % 99.59 (6 nt farklılığı) göstermiştir. TC019 kodlu test izolatu tip türlerinden en yüksek benzerliği *Streptomyces champavatii* NRRL B-5682<sup>T</sup>, *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* NBRC 100770<sup>T</sup> ve *Streptomyces koyangensis* VK-A60 ile % 99.72 (4 nt farklılığı), *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> ile % 99.66 (5 nt farklılığı) göstermiştir (Şekil 4.8, Tablo 4.11).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bakteriyel taksonomide nümerik fenotipik testler ile birlikte moleküler tekniklerin gelişmesine bağlı olarak taksonlar arasındaki ilişkiler daha objektif olarak tanımlanabilmiştir. Prokaryotik türler arasındaki evrimsel ilişkileri değerlendirmede tüm genom sekans verilerinin değerlendirilmesine eğilim olmasına rağmen bu verilerin nasıl değerlendirileceği ile ilgili öngöründe bulunmak için çok erken olduğu söylenebilir (Coenye ve ark., 2005). Bununla birlikte, tüm genomun nükleotid dizisinin belirlenmesi ile kültürü yapılamayan türlerle birlikte tüm mikroorganizmalar için evrensel taksonomik bir sistemin gerçekleştirilmesini mümkün kılacağı da açıktır. Ancak, şu anda tüm genom sekansının bakteriyel taksonomi ve prokaryotik tür kavramı üzerine etkisini değerlendirmek yeni metodolojileri ve uzun uğraşları gerektirmektedir. (Rosselló-Mora ve ark., 2001; Stackebrandt ve ark., 2002; Coenye ve ark., 2005).

Türler arasındaki evrimsel ilişkilerin değerlendirilmesinde tüm genom sekans analizine doğru bir artış olsa da bugün actinomyceteslerin taksonomik kompozisyonları genomik ve fenotipik bilgilerin bir arada kullanıldığı polifazik yaklaşım ile değerlendirilmektedir (Kim ve ark., 2000; Petrosyan ve ark., 2003; Lee ve ark., 2005). Polifazik taksonomi kimyasal, moleküler ve nümerik fenetik analizler sonucu elde edilen bilgilerin bir arada değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (Coenye ve ark., 2005). Polifazik taksonomi, sistematğin erken yıllarında birkaç fenotipik özelliğe göre subjektif olarak değerlendirilen *Streptomyces* sistematğine objektif bir yaklaşım getirmiştir (Anderson ve Wellington, 2001).

Subjektif olarak seçilmiş birkaç karaktere dayanan geleneksel *Streptomyces* sistematğinden daha fazla karakterin karşılaştırıldığı nümerik taksonomik prensiplerin sistematikte kullanılması polifazik taksonomiye geçişte objektif bir basamak oluşturması açısından önemlidir. (Hill ve Silvestri, 1962; Shirling ve Gottlieb, 1972; Sneath, 1970; Williams ve ark., 1983). Nümerik taksonomide, farklı alanlardan çok fazla sayıda karakter kullanılması bu taksonlar hakkında geniş bilgi içeriğine sahip olunmasını sağlar. Her karakter eşit ağırlıkta alınır ve tüm benzerlik bilgisayar analizleri sonucu mevcut özelliklerin oranlamasının bir sonucunu gösterir (Sneath, 1972; Sneath ve Sokal, 1973; Sackin ve Jones, 1993; Goodfellow, 1995). Bu nedenle, nümerik taksonomik metotlar ile tanımlanan taksonlar geleneksel sınıflandırmaya göre daha objektif, stabil ve gerçekçidir (Goodfellow ve Diclinson, 1985). Günümüzdeki

taksonomik kabullere göre bir organizmanın yeni bir tür olarak tanımlanması için fenotipik özelliklerinin belirlenmiş olması zorunlu fakat yeterli sayılmamaktadır. Yeni bir türün tanımlanması için son yıllarda nümerik fenetik analizler, kemotaksonomik ve moleküler özelliklerin bir arada değerlendirildiği polifazik taksonomi kriterlerinin sağlanmış olması ve aynı zamanda bu kriterler arasında iyi bir korelasyonun bulunması gerekmektedir (Colwell, 1970; Goodfellow ve O'Donnell, 1993; Sembring, 2000).

Bu çalışmada *Alhagi pseudoalhagi* ve *Colutea arborescens* rizosferinden izole edilen 17 izolatın polifazik metotlar kullanılarak araştırılması hedeflenmiştir. Taksonomi çalışmasında temel karbon ve azot kaynaklarında gelişimi, degradasyon testleri olmak üzere 48 farklı karakterde test edilmiş ve 8 farklı besiyerinde morfolojik ve kültürel özellikler belirlenmiştir. Elde edilen 17 izolatın PCR-RFLP ve RAPD moleküler tiplendirmesi yapılmış ve 16 izolatın da 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizi analizleri yapılarak filogenetik dendogramlar oluşturularak akrabalık ilişkileri belirlenmiştir.

Morfolojik ve kültürel karakterizasyon çalışması için, test suşlarının Oatmeal Agar (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966) kültür ortamında 28° C'de 14 gün inkübe edilerek hava miselyum spor, substrat miselyum ve çözünabilir pigment rengi belirlendi. Tüm test suşlarının, melanin pigmenti üretilip üretilmedikleri ise Pepton-Yeast Extract Iron (ISP 6; Shirling ve Gottlieb, 1966) ve Tyrosine Agar (ISP 7; Shirling ve Gottlieb, 1966) kültür ortamlarında 28°C'de 7 günlük inkübasyondan sonra belirlenmiştir. Test izolatlarından TC005, TC008, TC023, TC030, NS017, NS026 ve NS071 izolatları melanin pigment üretmiştir. Melanin pigment üreten bu suşların oatmeal agar üzerinde hava miseli sporları gri renkte fakat çözünür pigment üretmemişlerdir. Oatmeal agar üzerinde çözünür pigment üretmeyen bu 7 izolat benzer şekilde gri spor rengine sahiptirler.

Moleküler çalışmalarda PCR-destekli metotlar, bakterilerin teşhis edilmesinde hızlı ve doğru bir yol olarak gösterilmiştir (Wilson ve ark., 1998; Laurent ve ark., 1999). Özellikle de, amplifiye edilmiş rDNA restriksiyon analizi (ARDRA) metodunun cins seviyesinde ve bir cinsin türleri arasındaki ilişkileri göstermede önemli olduğu bildirilmiştir (Harvey ve ark., 2001; Alves ve ark., 2002; Cook ve Meyers, 2003). Bu çalışmada, 17 test organizmasının amplifiye edilmiş 16S rRNA ürünleri 3 farklı restriksiyon endonükleaz enzimi (*EcoR* I, *Pst* I, *Sau3* AI) ile kesilmiştir.

*EcoR* I ve *Sau3* A I restriksiyon endonükleaz enzimleri tüm izolatlarda benzer sayıda ve aynı büyüktükte PCR-RFLP fragmentleri verirken *Pst* I endonükleaz enzimi TC005, TC008, TC023, TC026, TC027, TC030 izolat suşlarının 16S rDNA gen bölgesini tek bir noktadan keserek iki farklı büyüklükte PCR-RFLP fragmentleri oluşturarak diğer izolat suşlardan farklılaştırmıştır. Benzer şekilde, bu farklılaşan 6 izolat suş filogenetik dendogramda diğer izolatlardan farklılaşarak konumlanmıştır.

Cook ve Meyers (2003), çalışmalarında actinomycetes cinslerinin 16S rRNA gen bölgelerine farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri uygulamıştır. Kullandıkları farklı restriksiyon enzimleri içinde *Asn* I, *Kpn* I, *Sau3* A I ve *Sph* I olmak üzere 4 restriksiyon endonükleaz enzimi *Streptomyces* cinsini bütün diğer actinomycetes cinslerinden farklılaştırmıştır. Bu identifikasyon metodu, bilinmeyen *Streptomyces* toprak izolatlarının bir cinse veya cinsin alt gruplarına ayrılmasını sağlamıştır.

Organizmalar arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde kullanılan diğer PCR-temelli tiplendirme metodu RAPD (Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA)'dir. Bu metod, bakterilerin tür içi ve türler arası benzerliklerinin tanımlanmasını kolaylaştıran DNA tipleme metodu olarak gösterilmiştir (Roberts ve Crawford, 2000; Martin ve ark., 2000; Coenye ve ark., 2005). Bu çalışmada 17 organizmanın benzerlikleri M13f evrensel primeri kullanılarak RAPD-PCR ile araştırılmıştır. Toplam 17 organizmada RAPD parmak izleri en az 5 (TC023, TC026, NS038) en fazla 10 (TC022) fragment sayısında ve 1700-130 baz çifti aralığında oluşmuştur (Tablo 4.6).

Oatmeal agarda gerçekleştirilen renk gruplamasında 1. Renk grubunun ve nümerik analizlerde aynı kümenin üyesi olan TC003, TC025, TC028 ve TC017 izolat suşları, RAPD-PCR analizlerinde de aynı kümede yer alarak diğer izolatlardan farklılaşmışlardır. Aynı şekilde 2. renk grubu üyesi ve nümerik analizlerde de aynı kümenin üyesi olan NS005, NS035 ve NS038 izolatları RAPD-PCR analizlerinde aynı kümede konumlanarak diğer izolatlardan farklılaşmışlardır. Nümerik analizlerde aynı kümede yer alan TC021, TC022 ve TC024 izolatları RAPD-PCR analizlerinde birlikte kümelenirken, TC008 ve TC019 izolat suşları da tam bir uyum göstererek diğer izolatlardan farklılaşmışlardır.

16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizisi %100 benzer olan NS005, NS038 ve NS035 izolatları ile *Streptomyces rubrogriseus* LMG 20318<sup>T</sup> tip türünün 16S rRNA gen bölgesi benzerliği %100 olarak belirlenmiştir. Morfolojik ve fenotipik özellikleri

bakımından da çok yüksek benzerlik gösterdiğinden NS005, NS035 ve NS038 izolatları *Streptomyces rubrogriseus* LMG 20318<sup>T</sup> türü üyeleridir.

Aynı şekilde, 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizi bakımından %99.93 benzerlik gösteren TC003, TC017, TC028 ve TC025 ile *Streptomyces olivaceus* NBRC 12805<sup>T</sup> morfolojik ve fenotipik özellikler bakımından karşılaştırıldığında bu izolatların *Streptomyces olivaceus* NBRC 12805<sup>T</sup> dahil oldukları görülmektedir.

Kendi aralarında çok yüksek 16S rRNA gen bölgesi nükleotid benzerliği (2-3 nt. farklılığı) gösteren TC005, TC026, TC027 ve TC030 izolatları % 99.91 16S rRNA gen bölgesi nükleotid benzerliği bulunan *Streptomyces cinereorectus* NBRC 15395<sup>T</sup> ile morfolojik ve fenotip benzerliklerinden dolayı bu türün birer üyeleri olarak belirmektedir.

*Streptomyces puniceus* NBRC 12811<sup>T</sup> ile 16S rRNA gen dizisi bakımından 11 nt farklılığı (% 99.24 benzerlik) bulunan TC023 izolatının, bu tip türü ile olan morfolojik ve fenotipik farklılıklarından dolayı, taksonomik statüsü DNA-DNA hibridizasyonu ile kesinleşecektir.

% 99.59 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizisi benzerliği (6 nt farklılığı) gösteren TC008 ve TC019 izolat suşları *Streptomyces globisporus subsp. caucasicus* NBRC 100770<sup>T</sup>, *Streptomyces somaliensis* NBRC 12916<sup>T</sup> ve *Streptomyces champavatii* NRRL B-5682<sup>T</sup> ile yüksek 16S rRNA gen bölgesi nükleotid benzerliği ile birlikte (% 99.93-99.72; 1-4 nt farklılığı) kümelenmiştir. *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316<sup>T</sup>, *Streptomyces variabilis* NBRC 12825<sup>T</sup>, *Streptomyces labedae* NBRC 15864<sup>T</sup> tip türleri ile 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizi benzerliği % 100 olan TC021 izolatı morfolojik ve fenotipik benzerliğinden dolayı *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316<sup>T</sup> tip türünün üyesi olduğu düşünülmüştür. Taksonomik statüsü bu tip türleriyle yapılacak DNA-DNA hibridizasyonu ile kesinleşecektir.

TC024 izolatı ise 7 nt farklılığı (% 99.52 nt benzerliği) ile *Streptomyces griseoincarnatus* LMG 19316<sup>T</sup>, *Streptomyces variabilis* NBRC 12825<sup>T</sup> ve *Streptomyces labedae* NBRC 15864<sup>T</sup> ile filogenetik dendogramda birlikte kümelenmiştir. TC024 izolatının taksonomik statüsü ilgili tip türleri ile DNA-DNA hibridizasyonu ile açığa kavuşturulacaktır.

Mikrobiyal sistematiğe uygulanan metodlar içerisinde, hiç bir metod tek başına bir suşun taksonomik statüsünün belirlenmesi için yeterli olmadığı gibi bir metodun diğerinden daha önemli olmadığı da kabul edilmektedir. Şüphesiz, bakteriyal

sistematikte 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizileme bilim çevrelerince kabul edilen iki altın kriterden bir tanesidir ve günümüzde prokaryotik organizmaların filogenetik analizleri bu gen bölgesi temeline dayanmaktadır. İzolat suşlara uygulanan fenotipik, morfolojik ve moleküler testler arasında ve bu testler ile 16S rRNA gen bölgesi baz dizisine göre oluşturulmuş filogenetik sonuçlar arasında yüksek oranda korelasyon belirlenmiştir. Bu araştırmada çalışılan tüm izolatlar içerisinde, önemli sayılabilecek oranda nükleotid farklılığı gösteren TC023 ve TC024 izolatlarının 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizileri bakımından benzerlik gösterdiği ilgili tip türleri ile DNA:DNA hibridizasyon testlerinin gelecekte yapılması düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402
- Alves, A., Santos, O., Henriques, I. and Correia, A., 2002.** Evaluation of methods for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *FEMS Microbiol Lett* 213, 205–211.
- Anderson, A.S. and Wellington, E.M.H., 2001.** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbial.*, 51, 797-814.
- Arbeit, R. D., Slutsky, A., Barber, T. W., Maslow, J. N., Niemezyk, S., Falkinham, J. O., O'Connor, G. T. and Reyn, C. F., 1993.** Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 167, 1384–1390.
- Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J. and White, R.P., 1985.** Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35, 86-98.
- Baldacci, E., 1958.** Development in the classification of Actinomycetes. *Giornale di Microbiologia* 6, 10-27.
- Bashar, MA. and Rai, B., 1994.** Antagonistic potential of root region microflora of chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Bangladesh J. Bot.*, 23, 13-19
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. and Wheeler, D.L. 2004.** GenBank. *Nucleic Acids Research* 32: D23-D26.
- Bérdy, J., 1995.** Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolit *Biotechnologia*, 7-8, 13-14.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J., 2006.** Biology of Microorganisms. Tenth Edition. Prentice-Hall International, London
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. and Noller, H.F., 1978.** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichi coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75: 4801-4805.
- Cantor, C.R., Smith, C. L. and Mathew, M. K., 1988.** Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Annual Review of Biochemical and Biophysical Chemistry*, 17, 287-304.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P. and Swings, J., 2005.** Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 147-167.

- Colwell, R.R., 1970.** Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 104, 410–433
- Cook, A.E. and Meyers, P.R., 2003.** Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus – specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1907-1915.
- Cowan S. T., and Steel K. J., 1965.** Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.
- Cross, T., Lechevalier M.P., and Lechevalier, H., 1963.** A new genus of the Actinomycetales: *Microellobosporia* gen. nov. *J. Gen. Microbiol.* 31 : 421-429,
- Doumbou, C.-L., Akimov, V., Côté, M., Charest, P.-M. and Beaulieu, C., 2001.** Taxonomic study on nonpathogenic streptomyces isolated from common scab lesions on potato tubers. *System. Appl. Microbiol.*, 24, 451-456.
- Embley, T.M. and Stackebrandt, E., 1994.** The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 48: 257-289.
- Falcaõ De Morais, J.O., Batista, A.C. and Masa, D.M.G., 1966.** Elytrosporangium: a new genus of the *Actinomycetales*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 30, 161-171.
- Felsenstein, J., 1985.** Confidence limits on phylogeny: an appropriate use of the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J., 1993.** PHYLIP- Phylogenetic Inference Package version 3.5.1 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/>).
- Fitch, W.M., and Margoliash, E., 1967.** Construction of phylogenetic trees: a method based on mutation distances as estimated from cytochrome C sequences is of general applicability. *Science* 155: 279-284.
- Garrity, G.M., M. Winters, and D. Searles. 2005.** Bergey's manual of systematic bacteriology. 3rd ed. Springer-Verlag. New York.
- Gilardi, E., Hill L.R., Turri, M., and Silvestri L.G., 1960.** Quantitative methods in the systematics of Actinomycetales. I. *Giorn. Microbiol.* 8:203-218.
- Gladek, A., Mordaski, M., Goodfellow, M. and Williams, S.T., 1985.** Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* 26, 175±180.
- Godfrey, C.R.A., 1995.** Bactericides and fungicides. In *Agrochemicals from Natural Products*, Edited by C. R. A. Godfrey. Marcel Dekker, USA.
- Goodfellow, M., 1989.** The actinomycetes I. Suprageneric classification of actinomycetes. In Bergey's manual of systematic bacteriology, pp. 2333-2339. Edited by Williams, S.T.; Sharpe, M.E. & Holt, J. G., vol. 4. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

- Goodfellow, M., 1995.** Numerical taxonomy. In *Biology of the prokaryotes*. Edited by Schlegel, H. G. & Lengeler, J. W. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Goodfellow, M., Alderson, G. and Lacey, J., 1979.** Numerical taxonomy of *Actinomadura* and related actinomycetes. *Journal of General Microbiology* **112**: 95-111
- Goodfellow, M., Minnikin, D.E., Todd, C., Alderson, G., Minnikin, S.M. and Collins, M.D., 1982.** Numerical and chemical classification of *Nocardia amarae*. *Journal of General Microbiology*, **128**, 1283-1297.
- Goodfellow, M., and Dickinson, C.H., 1985.** Delineation and description of microbial populations using numerical methods. In *Computer-Assisted Bacterial Systematics*, pp. 164-226. Edited by M. Goodfellow, D. Jones & F. G. Priest. Orlando & London: Academic Press.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Alderson, G., 1986a.** Transfer of *Elytrosporangium brasiliense* Falcao de Moraes *et al.*, *Elytrosporangium carpinense* Falcao de Moraes *et al.*, *Elytrosporangium spirale* Falcao de Moraes *et al.*, *Microellobosporia cinerea* Cross *et al.*, *Microellobosporia avea* Cross *et al.*, *Microellobosporia grisea* (Konev *et al.*) Pridham and *Microellobosporia violacea* (Tsyganov *et al.*) Pridham to the genus *Streptomyces*, with emended descriptions of the species. *Syst Appl Microbiol* **8**, 48±54.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Alderson, G., 1986b.** Transfer of *Chainia* species to the genus *Streptomyces* with emended description of species. *Syst Appl Microbiol* **8**, 55±60.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Alderson, G., 1986c.** Transfer of *Actinosporangium violaceum* Krasil'nikov and Yuan, *Actinosporangium vitaminophilum* Shomura *et al.* and *Actinopycnidium caeruleum* Krasil'nikov to the genus *Streptomyces*, with amended descriptions of the species. *Syst Appl Microbiol* **8**, 61±64.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. and Alderson, G., 1986d.** Transfer of *Kitasatoa purpurea* Matsumae and Hata to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces purpureus* comb. nov. *Syst Appl Microbiol* **8**, 65±66.
- Goodfellow, M. and Simpson, K.E., 1987a.** Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology*, **2**, 97-125.
- Goodfellow, M., Lonsdale, C., James, A. L. and Macnamara, O. C., 1987b.** Rapid biochemical tests for the characterisation of streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, **43**, 39-44.
- Goodfellow, M., Stanton, L.J., Simpson, K.E. and Minnikin, D.E., 1990.** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *Journal of General Microbiology*, **136**, 19-36.
- Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., 1993.** Roots of bacterial sistematics. In *Handbook of New Bacterial Sistematics*, pp. 3-56. Edited by M. Goodfellow and A. G. O'Donell. Academic Press, London.

- Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Davenport, R., Chun, J. and Curtis, T.P., 1998.** Activated sludge foaming: The true extent of actinomycete diversity. *Water Science and Technology* **37**, 511-519.
- Goodfellow, M., Isik, K. and Yates, E., 1999.** Actinomycete systematics: an unfinished synthesis. *Nova Acta Leopoldina NF* **80**: 47-82.
- Gottlieb, D., 1961.** An evaluation of criteria and procedures used in the description and characterization of the streptomycetes. *Appl. Microbiol.* **9**, 55-65.
- Harvey, I., Cormier, Y., Beaulieu, C., Akimov, V.N., Mériaux, A. and Duchaine, C., 2001.** Random amplified ribosomal DNA restriction analysis for rapid identification of thermophilic actinomycete-like bacteria involved in hypersensitivity pneumonitis. *Syst Appl Microbiol* **24**, 277-284.
- Hill, L.R., Turri, M., Gilardi, E., and Silvestri, L.G., 1961.** Quantitative methods in the systematics of Actinomycetales. II. *Giorn. Microbiol.* **9**:56-72.
- Hill, L.R. and Silvestri, L.G., 1962.** Quantitative methods in the systematics of *Actinomycetales*. III. The taxonomic significance of physiological-biochemical characters and the construction of a diagnostic key. *Giornale di Microbiologia*, **10**, 1-28.
- Hossain, M.S., Hossain, M.A., Rahman, M.M., Mondol, M.A., Bhuiyan M.S.A., Gray, A.I., Flores, M.E. and Rashid, M.A., 2004.** Amides from the fungus *Streptomyces hygroscopicus* and their antimicrobial activity. *Pytochemistry*, **65**, 2147-2151.
- Jaccard, P., 1908.** Nouvelle recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Science Naturelle*, **44**, 223-270.
- Janssen, P., Audit, B., Cases, I., Darzentas, N., Goldovsky, L., Kunin, V., Lopez-Bigas, N., Peregrin-Alvarez, J.M., Pereira-Leal, J.B., Tsoka, S. and Ouzounis, C.A., 2003.** Beyond 100 Genomes. *Genome Biol.* **4**, 402.
- Jones, K.L., 1949.** Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology* **57**: 141-145.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R., 1969.** Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. Academic Press, New York.
- Kanz, C., Aldebert, P., Althorpe, N., Baker, W., Baldwin, A., Bates, K., Browne, P., Van den Broek, A., Castro, M., Cochrane, G., 2005.** The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* **33**, D29-D33
- Kämpfer, P., 2006.** The family Streptomycetaceae- Part 1 : taxonomy. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H and Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*, vol. 3. pp. 538-604. New York: Springer
- Kämpfer, P., Kroppenstedt, R.M. and Dott, W., 1991.** A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *J Gen Microbiol* **137**, 1831-1891

- Kim, D., Chun, J., Sahin, N., Hah, Y-C. and Goodfellow, M., 1996.** Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *International Journal of systematic Bacteriology*, **46**, 581-587.
- Kim, S.B., Falconer, C., Williams, E. and Goodfellow, M., 1998.** *Streptomyces thermocarboxydivorans* sp. nov. and *Streptomyces thermocarxydus* sp. nov., two moderately thermophilic carboxydophilic species from soil. *International Journal of systematic Bacteriology*, **49**, 1845-1851.
- Kim, B., Al-Tai, A.M., Kim, S.B., Somasundaram, P., and Goodfellow, M., 2000.** *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 505–509.
- Kirby, R. and Rybicki, E.P., 1986.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a means of taxonomic analysis of *Streptomyces* and related organisms. *J.Gen.Microbiol.* **132**, 1891-1894.
- Kluge, A. and Farris, J.S., 1969.** Quatitative phylogenetics and evolution of the annurans. *Systematic Zoology* **18**:1-32.
- Korn-Wendisch, F., and Kutzner, H.J., 1992.** The family *Streptomycetaceae*. In *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, pp. 921-995. Edited by Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W. & Schleifer, K.-H., 2nd ed., vol. 1. Springer-Verlag, New York.
- Krasilnikov, N.A., 1962.** A new *actinomyces* genus *Actinopycnidium* n. gen. of the *Actinomycetaceae* family. *Mikrobiologiya (moscow)* **31**, 250-253 (in Russian).
- Krasilnikov, N.A., and Yuan, T., 1961.** Actinosporangium – a new genus in the family *Actinoplanaceae*. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Biologicheskaya* **8**, 113-116
- Krawiec, S. and Riley, M., 1990.** Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.* **54**:502-539
- Kudo, T., Matsushima, K., Itoh, T., Sasaki, J. and Suzuki, K., 1998.** Description of four new species of the genus *Kineosporia*: *Kineosporia succinea* sp. nov., *Kineosporia rhizophila* sp. nov., *Kineosporia mikuniensis* sp. nov. and *Kineosporia rhamnosa* sp. nov., isolated from plant samples, and amended description of the genus *Kineosporia*. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 1245±1255.
- Kumar, Y., 2007.** Mapping metabolites to the phylogeny of strains belonging to the *Streptomyces violaceusniger* 16SrRNA Gene Clade PhD. Thesis. Newcastle Univeristy, Medical School, Newcastle upon Tyne, U.K.
- Küster, E. 1959.** Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* **9**, 97–104.

- Küster, E. 1961.** Results of a comparative study of criteria used in the classification of the actinomycetes. *Intern. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.* 2:91-98
- Küster, E., and Williams, S.T., 1964.** Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 202: 928-929.
- Labeda, D.P., 1992.** DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene* 115, 249±253.
- Lambert, D.H., and Loria, R., 1989b.** *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. Rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 387-392.
- Lane, D.J., 1991.** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175. Edited by Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. John Wiley & Sons, New York.
- Laurent, F.J., Provost, F. and Boiron, P., 1999.** Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 99–102.
- Leblond, P., Redenbach, M. and Cullum, J., 1993.** Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* **175**, 3422-3429.
- Lechevalier, M.P., and Lechevalier, H., 1970.** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* **20**, 435±443.
- Lee, J.Y., Jung, H.W. and Hwang, B.K., 2005.** *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenic acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 257-262.
- Logan, N.A., 1994.** *Bacterial systematics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lodders, N., and Kämpfer, P., 2007.** Streptomycetaceae : Phylogeny , Ecology and Pathogenicity. *Encyclopedia of Life Science*.
- Lloyd, A.B., 1969.** Dispersal of *Streptomyces* in air. *Journal of General Microbiology*, **57**, 5-40.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., Fischer, U. and Schleifer, K. H. 1994.** Phylogenetic relationships of Bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase -subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**:3-4, 285-305
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M. and Tiedje, J.M., 2001.** The RDP-II (Ribosomal Database Project), *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 1 173-174.
- Manfio, G.P., 1995.** Toward Minimal Standards for the Description of *Streptomyces* species. Ph.D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne, England, U. K.

- Manfio, G.P., Zakrzewska-Czerwinska, J., Atalan, E. and Goodfellow, M., 1995.** Towards minimal standards for the description of *Streptomyces* species. *Biotechnologia*, **7-8**, 242-253.
- Matsumae, A.M., Ohtani, M., Takeshima, H. and Hata, T., 1968.** A new genus of the *Actinomycetales*: *Kitasatoa* gen. nov. *Journal of Antibiotics* (Tokyo), **21**, 616-625.
- McCarthy, A.J. and Cross, T., 1984.** A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes. *Journal of General Microbiology* **130**: 5-25.
- McNeil, M. and Brown, J.M., 1994.** The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiological Reviews* **7**, 357-417.
- O'Donnell, A.G., Falconer, C., Goodfellow, M., Ward, A.C. and Williams, E., 1993.** Biosystematics and diversity amongst novel carboxydophilic actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 325-340
- Olive, M. and Bean, P., 1999.** Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* . **37**, 1661-9
- Overbeek, R., 2000.** Genomics: what is realistically achievable. *Genome Biol.* **1**, 2.
- Page, R.D.M., 1996.** TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- Petrosyan, P., Garcí'a-Varela, M., Luz-Madrigal, A., Huitro' n, C. and Flores, M.E., 2003.** *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 269-273.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A. and Owen, R.J., 1989.** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* **8**, 151-156.
- Pridham, T.G. and Tresner, H.G., 1974b.** Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn, pp. 748-829. Edited by R. E. Buchanan & N. E. Gibbons. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Priest, F.G., and S.T. Williams., 1993a.** Computer-assisted classification, p. 361-381. In M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (ed.), *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press, London.
- Priest, F., and Austin, B., 1993b.** *Modern bacterial taxonomy*. 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Raatikainen, OJ., Raivinen, TH., Tahvonen, RT., 1994.** HPLC separation and subsequent detection of aromatic heptaene polyenes in peal after treatment with *Streptomyces triseoviridis*. *Pesticide Sci.*, **41**, 149-154.
- Ridell, M., Wallerstro\$ M.G., and Williams, S.T., 1986.** Immunodiffusion analysis of phenetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptoverticillum* and *Nocardiopsis*. *Syst Appl Microbiol* **8**, 24-27.

- Rosselló-Mora, R., and Amann, R., 2001.** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology reviews*, **25**, 39-67.
- Rothrock, CS. and Gottlieb D., 1984.** Role of antibiosis of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1440-1447
- Ruddick, S.M. and Williams, S.T., 1972.** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. V. Some factors influencing the dispersal and adsorption of spores in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **4**, 93-103.
- Sackin, M.J. and Jones, D., 1993.** Computer-assisted classification. In *Handbook of new bacterial systematics*, pp. 281-313. Edited by Goodfellow, M. & O'Donnell, A. G. Academic Press, London.
- Saintpierre, D., Amir, H., Pineau, R., Sembiring, L. and Goodfellow, M., 2003.** *Streptomyces yatensis* sp. nov., a novel bioactive streptomycetes isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, **83**, 21-26.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987.** The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular and Biological Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schatz, A., Bugie, E. and Waksman, S.A., 1944.** Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc.Soc.Exptl.Biol. & Med.*, **55**: 66-69
- Schofield, G.M. and Schaal, K.P., 1981.** A numerical study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *Journal of General Microbiology*, **127**, 237-259.
- Schleifer, K.H. and Kandler, O., 1972.** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, **36**, 407-477
- Sembiring, L., 2000.** Selective Isolation and Characterisation of Streptomycetes Associated with the Rhizosphere of the Tropical Legume *Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen. Ph. D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne, UK.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1966.** Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **16**, 313-340.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1967.** Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. I. The International *Streptomyces* Project. *International of Systematic Bacteriology*, **17**, 315-322.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1968a.** Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. *Int J Syst Bacteriol* **18**, 69±189.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1968b.** Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int J Syst Bacteriol* **18**, 279±392.

- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1969a.** Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int J Syst Bacteriol* **19**, 391±512.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1969b.** Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species description from first and second studies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **19**, 391-512.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1972.** Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. *Int J Syst Bacteriol* **22**, 265±394.
- Silvestri, L.G., Turri, M., Hill, L.R., and Gilardi, E., 1962.** A quantitative approach to the systematics of actinomycetes based on overall similarity. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **12**:333-360.
- Sneath, P., 1957.** The applications of computers to taxonomy, *Journal of General Microbiology* **17** (1), pp. 201–226.
- Sneath, P.H.A., 1970.** Application of numerical taxonomy to actinomycetes: Problems and Perspectives. In the *Actinomycetales*, pp. 371-378. Edited by H. Prauser. Gustaw Fischer Verlag: Jena.
- Sneath, P.H.A. and Johnson, R. 1972.** The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *Journal of General Microbiology*, **72**, 377-392.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973.** *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman, Baltimore.
- Sokal, R.R. and Michener, C.D., 1958.** A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *Kansas University Science Bulletin*, **38**, 1409-1438.
- Southern, E.M., 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol.*, **98**:503-517.
- Stackebrandt, E. and Woese, C.R., 1981.** Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Curr Microbiol* **5**, 197±202
- Stackebrandt, E., Liesack, W., Webb, R. and Witt, D. 1991a.** Towards a molecular identification of *Streptomyces* species in pure culture and in environmental samples. *Actinomycetologia* **5**, 38±44.
- Stackebrandt, E., Witt, D., Kemmerling, C., Kroppenstedt, R. and Liesack, W., 1991b.** Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1468±1477.
- Stackebrandt, E., Liesack, W., Witt, D., 1992.** Ribosomal RNA and rRNA sequence analyses. *Gene*, **115**, 255-260.

- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994.** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **44**: 846-849.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L., 1997.** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 479±491.
- Stackebrandt, E., Tindall, B., Ludwig, W. and Goodfellow, M., 1999.** Prokaryotic diversity and systematics. In *Biology of the Prokaryotes*, pp. 674-720. Edited by J. W. Lengeler, G. Drews and H. G. Schlegel. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, Germany.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. and Whitman, W.B., 2002.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1043-1047.
- Szabo, I. and Marton, M., 1994.** Comments on the first results of the international cooperative work on criteria used in characterization of streptomyces. *Intern. Bull. Bac. Nomen. and Taxon.* **14**:17-38
- Şahin, N., 1995.** Selective Isolation, Characterisation and Classification of Novel Thermotolerant Streptomyces, Ph.D Thesis, Newcastle Uni. England, 366 pp.
- Tateno, Y., Fukami-Kobayashi, K., Miyazaki, S., Sugawara, H. and Gojobori, T., 1998.** DNA Data Bank of Japan at work on genome sequence data. *Nucleic Acids Research* **26**: 16-20.
- Tateno, Y., Saitou, N., Okubo, K., 2005.** DDBJ in collaboration with mass-sequencing teams on annotation. *Nucleic Acids Res* **33**, D25–D28.
- Thirumalachar, M.J., 1955.** Chainia, a new genus of the *Actinomycetales*. *Nature*, **176**, 934-935.
- Trujillo, M.H. and Goodfellow, M., 2003.** Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**, 39-68.
- Ursing, J.B., Rossellomora, R.A., Garciavaldes, E. and Lalucat, J., 1995.** Taxonomic note – a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 604.
- Van de Peer, Y. and De Wachter, R., 1994.** TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications for Biological Sciences* **10**: 569-570
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Devos, P., Kersters, K. and Swings, J., 1996.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438.

- Vila, J., Marcos, M.A. and Jimenez de Anta, M.T., 1996.** A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* **44**, 482-489.
- Waksman, S.A. and Henrici, A.T., 1943.** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol* **46**, 337±341.
- Wayne, L.G., Good, R.C., Böttger, E.C., Butter, R., Dorsch, M., Ezaki, T., Gross, W., Jonas, V. and 14 Other Co-authors., 1996.** Semantide- and chemotaxonomy- based analysis of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **46**: 280-297.
- Webster, C. A., Towner, K. J., Humphreys, H., Ehrenstein, B., Hartung, D and Grundmann, H., 1996.** Comparison of rapid automated laser fluorescence analysis of DNA fingerprints with four other computer-assisted approaches for studying relationships between *Acinetobacter baumannii* isolates. *The Journal of Medical Microbiology*, Vol 44, Issue 3, 185-194
- Wellington, E.M.H. and Williams, S.T., 1981.** Host ranges of phages isolated to *Streptomyces* and other genera. *Zentbl Bakteriол Hyg I Abt Suppl* **11**, 93±98
- Wellington, E.M.H., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J. and Jorgensen, N. O.G., 1992.** Taxonomic status of *Kitasatosporia*, and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 156±160
- Whitham, T.S., Athalye, M., Minnikin, D.E. and Goodfellow, M., 1993.** Numerical and chemical classification of streptosporangium and some related actinomycetes. *Antonie van leeuwenhoek*, **64**, 387-429.
- Williams, S.T. and Flowers, T.H., 1978.** The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomyces. *Microbios*, **20**, 99-106.
- Williams, S.T. and Robinson, C.S., 1981.** The role of streptomyces in the decomposition of chitin in acidic soils. *Journal of General Microbiology*, **127**, 55-63
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A. and Sackin, M. J., 1983a.** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* **129**, 1743±1813.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G., 1989.** Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol. 4, pp. 2453±2492. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, R.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids. Res.*, **18**, 6531-6535.
- Wilson et al., 1998.** C.A. Wilson, S. Wong, J. Muller, C.E. Davidson, T.M. Rose and P. Burd , Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72 4 (1998), pp. 3082–3087.
- Witt, D. and Stackebrandt, E., 1990.** Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339 AL. *Syst Appl Microbiol* **13**, 361±371.
- Woese, C.R., 1987.** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- Zhang, Z., Wang, Y. and Ruan, J., 1997.** A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1048±1054

## EK-A: Kùltür Ortamlarının Bileşimi, Hazırlanışı ve Sterilizasyonu

### 1. Kùltür Ortamları

#### 1.1. Nişasta-kazein Agar (Kùster ve Williams, 1964)

*Streptomyces*'lerin topraktan izolasyonunda seçici izolasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

|                                          |         |
|------------------------------------------|---------|
| Nişasta (Soluble Starch, BDH)            | 10 g    |
| Kazein (Casein)                          | 0.3 g   |
| KNO <sub>3</sub>                         | 2 g     |
| NaCl                                     | 2.g     |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O    | 0.05 g  |
| CaCO <sub>3</sub>                        | 0.02 g  |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O    | 0.01 g  |
| % 20'lik K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 10 ml   |
| Agar (Difco)                             | 12 g    |
| Saf su                                   | 1000 ml |
| pH                                       | 7.0-7.2 |

% 20'lik K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, nişasta ve agar hariç diğer ortam içerikleri 900 ml saf su içerisinde çözöldü. 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile pH 7.0-7.2'ye ayarlandı. Karışım ısıtılırken agar eklendi. Öölü miktardaki nişasta 100 ml soğuk saf su içerisinde ayrı olarak çözöldü ve hazırlanmış sıcak besiyerine karıştıarak ilave edildi. Hazırlanan besiyeri 500 ml'lik otoklav şişelerine 400 ml'ler halinde konularak 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlandı. % 20'lik K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solüsyonu, besiyerlerinden ayrı olarak başka bir şişede otoklavlanarak sterilizasyonu sağlandı. Otoklav sonrası 45-50°C'ye kadar su banyosunda soğutulan besiyerlerine aseptik koşullarda % 20'lik K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>'tan 10 ml /Lt olacak şekilde ilave edildi. Besiyeri petrilere dökölmeden önce, *Streptomyces* dışında bazı istenmeyen mikroorganizmaların izolasyon ortamında üremesini engellemek için besiyerine aseptik koşullarda steril 50 µg/ml Cycloheximide, 0.5 µg/ml Rifampicin ve 50 µg/ml Nystatin antibiyotiklerinden uygun miktarlarda katıldı.

### 1.2. Oatmeal Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Oatmeal Agar (ISP 3) ortamı, *Streptomyces*' lerin renk gruplarını belirlemek için kullanılmıştır.

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| Oatmeal                                         | 20 g    |
| Agar                                            | 18 g    |
| Trace salt solution (Shirling ve Gottlieb,1966) | 1ml     |
| Saf su                                          | 1000 ml |
| pH                                              | 7.2     |

Oatmeal (Ticari organik ürün), 1000 ml saf su içerisinde 20 dakika kaynatılarak çözüldü ve süzgeç vasıtasıyla süzüldü. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldıktan sonra eksilen su miktarı tamamlanarak pH, 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl ile ayarlandı ve agar ilave edilerek kaynatıldı. Hazırlanan besiyeri 500 ml' lik şişelerde 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavdan sonra su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyerlerine aseptik koşullarda Trace Salt Solution'dan 1 ml /Lt olacak şekilde ilave edildi ve besiyeri petrilere döküldü.

### 1.3. Pepton-Yeast Extract Iron Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Pepton-Yeast Extract Iron Agar (ISP 6) ortamı, izolatların melanin pigmenti üretme yeteneklerini belirlemek için kullanılmıştır.

|                  |         |
|------------------|---------|
| Pepton-Iron Agar | 36 g    |
| Yeast Extract    | 1 g     |
| Saf su           | 1000 ml |

Uygun oranlarda hazırlanan besiyeri karışımı ısıtılarak eritildi ve 500 ml' lik otoklav şişelerine 400 ml' ler halinde transfer edilerek 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Otoklav sonrası su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri aseptik koşullarda petrilere döküldü.

#### 1.4. Tyrosine Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Pepton-Yeast Extract Iron Agar gibi Tyrosine Agar (ISP 7) ortamı da, izolatların melanin pigmenti üretme yeteneklerini belirlemek için kullanılmıştır.

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Gliserol                              | 15 g    |
| L-tyrosine (Difco)                    | 0.5 g   |
| L-asparagine (Difco)                  | 1 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0.5 g   |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.5 g   |
| NaCl                                  | 0.5 g   |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.01 g  |
| Trace salts solution                  | 1 ml    |
| Agar (Difco)                          | 20 g    |
| Saf su                                | 1000 ml |

Uygun oranlarda hazırlanan besiyeri karışımı ısıtılarak eritildi ve 500 ml' lik otoklav şişelerine 400 ml' ler halinde transfer edilerek 121°C'de 15 dk. otoklavlandı. Otoklav sonrası su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri aseptik koşullarda petrilere döküldü.

### 1.5. İnorganik Tuz-Nişasta Agar (Inorganic Salts-Starch Agar: Shirling ve Gottlieb, 1966)

İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP4) ortamı, Streptomyces'lerin spor morfolojilerinin ve pigmentasyonlarının tespiti için kullanılmıştır.

|                                                  |         |
|--------------------------------------------------|---------|
| Çözünür Nişasta (Soluble Starch, BDH)            | 10 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | 1 g     |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O            | 1 g     |
| NaCl                                             | 1 g     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 2 g     |
| CaCO <sub>3</sub>                                | 3 g     |
| Trace Salt Solution (Shirling ve Gottlieb, 1966) | 1 ml    |
| Agar (Difco)                                     | 20 g    |
| Saf su                                           | 1000 ml |
| pH                                               | 7.0-7.4 |

Nişasta, Trace Salt Solution ve agar hariç diğerk ortam içerikleri 800 ml saf su içerisinde çözüldü ve pH, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile ayarlandı. Agar ilave edilerek sürekli karıştırmak suretiyle kaynamaya bırakıldı. Nişasta, 200 ml saf su içerisinde ayrı olarak çözüldü ve sıcak besiyerine eklendi. Otoklav şişelerine dökülen kùltür ortamı, 121°C'de 15 dakika otoklav edilerek steril edildi. Otoklavdan sonra su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyerine, aseptik koşullarda Trace Salt Solution'dan 1 ml /Lt olacak şekilde ilave edildi ve besiyeri petrilere döküldü.

### 1.6. Yeast Extract-Malt Extract Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP 2) ortamı, *Streptomyces*'lerin stok kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Bacto-Yeast Extract (Difco) | 4 g     |
| Bacto-Malt Extract (Difco)  | 10 g    |
| Glukoz (Glucose)            | 4 g     |
| Agar                        | 20 g    |
| Saf su                      | 1000 ml |
| pH                          | 7.3     |

Agar hariç diğer ortam içerikleri saf su içerisinde çözüldü. pH, 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile 7.3'e ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı. Otoklav şişelerine dökülerek 121°C'de 15 dakika otoklav edilen besiyeri, su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutuldu ve aseptik koşullarda petrilere döküldü.

### 1.7. Bennett's Agar (Jones, 1949)

Bennett's Agar (MBA: Modified Bennett's Agar) büyüme, degradasyon, kimyasal inhibitörlere ve antibiyotiklere direnç testinde bazal ortam olarak kullanılmıştır.

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Yeast Eextract (Lab M) | 1 g     |
| Lab-lemco (Merck)      | 0.8 g   |
| Bacto-casitone (Difco) | 2 g     |
| Gliserol               | 10 ml   |
| Agar (Difco)           | 12 g    |
| Saf su                 | 1000 ml |
| pH                     | 7.2-7.3 |

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. pH (0.1 M) NaOH veya HCl ile ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı.

Otoklav şişelerine dökülerek 121°C’de 15 dk otoklav edilen besiyeri, su banyosunda 45-50°C’ye kadar soğutuldu ve aseptik koşullarda petrilere döküldü. Degredasyon testi maddeleri tindalizasyonla steril edildikten sonra steril besiyerine katıldı ve petrilere döküldü. Antibiyotikler filtrasyon tekniği ile steril edildikten sonra steril besiyerine katıldı. Kimyasal inhibitör maddeleri ise, otoklav öncesi şişelere dökülmüş besiyerine ölçülü miktarda katıldı ve besiyeri karışımı kimyasal inhibitör madde ile birlikte steril edildi.

### 1.8. Karbon Kaynağı Kullanım Ortamı (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Karbon kaynağı kullanım ortamı (ISP 9), *Streptomyces*’lerin karbon kaynağı kullanım testlerinde bazal ortam olarak kullanıldı. Test, bazal ortamın hazırlanması ve karbon kaynaklarının hazırlanıp sterilizasyonu şeklinde birbirinden ayrı iki işlemle gerçekleşmiştir.

#### Bazal Ortam:

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2.64 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 2.38 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 5.65 g  |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O           | 1 g     |
| Pridham ve Gottlieb’s Trace Salts Solution      | 1 ml    |
| Agar                                            | 18 g    |
| Saf su                                          | 1000 ml |
| pH                                              | 6.8-7.0 |

Agar ve Pridham & Gottlieb’s Trace Salts Solüsyonu hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. pH (0.1 M) NaOH ve HCl ile ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı. Otoklav şişelerine dökülerek 121°C’de 15 dk. otoklav edilen besiyeri, su banyosunda 45-50°C’ye kadar soğutuldu ve soğutulan besiyerine, tindalizasyonla sterilizasyonu sağlanmış her bir karbon kaynağı ayrı olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra besiyerine 1 ml/Lt konsantrasyonunda Pridham & Gottlieb’s Trace Salts Solüsyonundan ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

### 1.9. Azot Kaynağı Kullanım Ortamı ( Williams ve ark., 1983 )

Azot kaynağı kullanım ortamı, *Streptomyces*'lerin azot kaynağı kullanım testlerinde bazal ortam olarak kullanıldı. Test, bazal ortamın hazırlanması ve azot kaynaklarının hazırlanıp sterilizasyonu şeklinde birbirinden ayrı iki işlemle gerçekleşmiştir.

#### Bazal Ortam:

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Glukoz (Glucose)                      | 10 g    |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.5 g   |
| NaCl                                  | 0.5 g   |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.01 g  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 1 g     |
| Agar (Difco)                          | 10 g    |
| Saf su                                | 1000 ml |
| pH                                    | 7.4     |

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. pH (0.1 M) NaOH ve HCl ile ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı. Otoklav şişelerine dökülerek 121°C'de 15 dk. otoklav edilen besiyeri, su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutuldu ve soğutulan besiyerine tinalizasyonla sterilizasyonu sağlanmış her bir azot kaynağı ayrı olacak şekilde aseptik olarak ilave edildi ve aseptik olarak petrilere döküldü.

### 1.10. Degredasyon Testi Ortamları

Adenin (0.5%, w/v), elastin (0.3%, w/v), casein (1.0%, w/v), hypoxhantin (0.4%, w/v), guanin (0.05%, w/v), L-tyrosine (0.5%, w/v), xhantin (0.4%, w/v), xylan (0.4%, w/v) ve gelatin (0.4%, w/v) degradasyonu için bazal ortam olarak Bennett's Agar (Jones, 1949) kullanıldı. Tinalizasyon ile steril edilen her bir madde, otoklavla 121°C'de 15 dk. steril edilmiş Bennett's Agar ortamına aseptik olarak ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

Tween 80 (Polysorbate-80; 1%, w/v) degradasyonu için Nash ve Krent (1991) pepton agar bazal ortamı kullanıldı. Tindalizasyon ile steril edilmiş Tween 80 maddesi, otoklavla steril edilmiş bazal ortama (Nash ve Krent, 1991) aseptik olarak ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

RNA (0.5%, w/v) ve DNA(0.5%, w/v) degradasyonu için Goodfellow ve ark. (1979) tarafından tanımlanan bazal ortam kullanıldı. RNA ve DNA tindalizasyonla steril edildikten sonra otoklavla steril edilmiş bazal ortama (Goodfellow ve ark., 1979) aseptik olarak ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

#### **1.10.1. Tween-20, Tween-80 (Polysorbote-20, Polysorbote-80) degradasyonu (Nash ve Krent, 1991)**

Tween-20, Tween-80 degradasyonunda bazal ortam olarak kullanılmıştır.

##### **Pepton Agar:**

|               |         |
|---------------|---------|
| Pepton        | 10 g    |
| Yeast Extract | 5 g     |
| NaCl          | 5 g     |
| Glukoz        | 1 g     |
| Agar          | 15 g    |
| Saf su        | 1000 ml |
| pH            | 7.5     |

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. pH (0.1 M) NaOH ve HCl ile ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı. Otoklav şişelerine dökülerek 121°C'de 15 dk. otoklavlanan besiyeri, su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra tindalizasyonla sterilizasyonu sağlanmış Tween-20, Tween- 60, Tween- 80 (1%, w/v), steril edilmiş bazal ortama aseptik olarak ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

### 1.10.2. RNA Degredasyonu (Goodfellow ve ark., 1979)

RNA degradasyonunda bazal ortam olarak kullanılmıştır.

#### Bazal ortam:

|                  |         |
|------------------|---------|
| Tryptone (Difco) | 20 g    |
| NaCl             | 5 g     |
| Agar             | 12 g    |
| Saf su           | 1000 ml |
| pH               | 7.3     |

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. pH 0.1 M NaOH ve HCl ile ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı. Otoklav şişelerine dökülerek 121°C'de 15 dk. otoklav edilen besiyeri, su banyosunda 45-50°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra tinalizasyonla steril edilmiş RNA (%0.5, w/v), steril bazal ortama aseptik olarak ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

### 1.10.3. DNase Test Agar

DNA degradasyonunda bazal ortam olarak kullanılmıştır.

#### Bazal ortam:

|                  |         |
|------------------|---------|
| Tryptone (Difco) | 20 g    |
| DNA              | 2 g     |
| NaCl             | 5 g     |
| Agar             | 12 g    |
| Saf su           | 1000 ml |
| pH               | 7.2     |

Agar hariç diğer ortam içerikleri 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. pH 0.1 M NaOH ve HCl ile ayarlandı ve karışıma agar ilave edilerek kaynamaya bırakıldı. Otoklav şişelerine dökülerek 121°C'de 15 dk. otoklav edilen besiyeri, su banyosunda

45-50 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra tinalizasyonla steril edilmiş DNA (0.5%, w/v), steril bazal ortama aseptik olarak ilave edildi ve besiyeri aseptik olarak petrilere döküldü.

#### 1.11. % 0.5' lik Nutrient Agar (Williams ve ark, 1983a)

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

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Nutrient agar (Oxoid) | 5g     |
| Saf su                | 1000ml |

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

#### 1.12. Glukoz Malt-Yeast Extract Broth

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

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Glukoz (Merck)           | 4 g     |
| Yeast-extract (Acumedia) | 4 g     |
| Malt-extract (LabM)      | 10 g    |
| Distile su               | 1000 ml |
| pH:                      | 7.2-7.4 |

Tüm ortam içerikleri 1000 ml distile su içerisinde çözöldü ve pH (0.1 M) NaOH veya HCl ile ayarlandı. Sürekli karıştırmak suretiyle kaynamaya bırakıldı ve hazırlanan kültür ortamları 250 ml'lik erlenlere 100 ml olacak şekilde transfer edildi ve ağızları pamukla kapatılarak 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

## 2. ÇÖZELTİLER

### 2.1. Ringer Çözeltisi:

Ringer çözeltisi izolasyon çalışmasına başlamadan önce tüp dilüsyon yönteminde toprak süspansiyonunun ve testlerin uygulama aşamasından önce spor süspansiyonunun hazırlanması için kullanılmıştır.

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| Ringer çözeltisi (Oxoid) | 1 tablet |
| Saf su                   | 500 ml   |

1 tane Ringer tableti 500 ml saf su içerisinde çözüldü ve izolasyon için ağzı kapaklı veya pamukla kapalı cam tüplere uygun miktarlarda konularak 121°C’de 15 dk. otoklav edildi.

### 2.2. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Çözeltisi:

Bu çözelti, nişasta-kazein agar (Küster ve Williams, 1964) besiyeri hazırlanırken kullanılmıştır.

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 20 g   |
| Saf su                          | 100 ml |

Hazırlanan çözelti 200 ml’lik ağzı kapaklı şişelere konuldu ve 121°C’de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi. Otoklavdan sonra çözelti 4°C’de saklandı. Besiyer hazırlanırken bu çözelti steril edilmiş besiyeri karışımına aseptik olarak ilave edildi.

### 2.3. Kùltür Stoklaması İçin Gliserol özeltisi (Wellington ve Williams, 1978)

Gliserol süspansiyonu, *Streptomyces* sporlarının ve misellerinin uzun süre -25°C’de stok olarak saklanması için hazırlanmıştır

|          |       |
|----------|-------|
| Gliserol | 20 ml |
| Saf su   | 80 ml |

% 20’lik gliserol çözeltisi yaklaşık 1.5 ml miktarında vidalı kapağı olan küçük tüplere konularak 121°C’de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi.

### 2.4. 50 µg/ml Konsantrasyonunda Cycloheximide Stok Solüsyonu:

Cycloheximide (50 µg/ml), nişasta-kazein agar (Küster ve Williams, 1964) izolasyon ortamına, istenmeyen bazı mikroorganizmalarının üremesini engellemek için katılmıştır. Cycloheximide (50 µg/ml), antibiyotik ve kimyasal inhibitör testleri hariç diğer kùltür ortamlarına da aynı amaçla katılmıştır.

Öncelikle 100 ml’lik otoklava dayanıklı boş bir şişe 121°C’de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi. Daha sonra ayrı olarak 100 ml saf su içerisinde 2 g cycloheximide çözüldü. Cycloheximide özeltisi steril bir enjektöre çekildi ve önceden otoklav edilmiş boş şişeye aseptik koşullarda membran filtreden geçirilerek aktarıldı. Şişenin kapağı sıkıca kapatılıp ve gerekirse parafinlenip 4°C’de saklandı. Besiyer hazırlanırken, aseptik koşullarda bu stok solüsyonundan 1 ml çekilerek steril edilmiş besiyerine katıldı. Ardından besiyerinin petrilere döküm işlemi yapıldı.

### 2.5. 50 µg/ml Konsantrasyonunda Nystatin Stok Solüsyonu:

Nystatin (50 µg/ml), nişasta-kazein agar (Küster ve Williams, 1964) izolasyon ortamına istenmeyen bazı mikroorganizmalarının üremesini engellemek için katılmıştır.

Öncelikle 100 ml’lik otoklava dayanıklı boş bir şişe 121°C’de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi. Ardından ayrı olarak 100 ml saf su içerisinde 2 g nystatin çözüldü. Nystatin özeltisi, steril bir enjektöre çekildi ve önceden otoklav edilmiş boş şişeye aseptik koşullarda membran filtreden geçirilerek aktarıldı. Şişenin kapağı sıkıca

kapatılıp ve gerekirse parafinlenip 4°C’de saklandı. Besiyer hazırlanırken, aseptik koşullarda bu stok solüsyonundan 1 ml çekilerek steril edilmiş besiyerine katıldı. Ardından besiyerinin petrilere döküm işlemi yapıldı.

## **2.6. 0.5 µg/ml Konsantrasyonunda Rifampicin Stok Solüsyonu:**

Rifampicin (0.5 µg/ml), nişasta-kazein agar (Küster ve Williams, 1964) izolasyon ortamına istenmeyen bazı mikroorganizmalarının üremesini engellemek için konulmuştur.

Öncelikle 100 ml’lik otoklava dayanıklı boş bir şişe 121°C’de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi. Ardından ayrı olarak 100 ml saf su içerisinde 0.02 g rifampicin çözüldü. Rifampicin çözeltisi, steril bir enjektöre çekildi ve önceden otoklav edilmiş boş şişeye aseptik koşullarda membran filtreden geçirilerek aktarıldı. Şişenin kapağı sıkıca kapatılıp ve gerekirse parafinlenip 4°C’de saklandı. Besiyer hazırlanırken, aseptik koşullarda bu stok solüsyonundan 1 ml çekilerek steril edilmiş besiyerine katıldı. Ardından besiyerinin petrilere döküm işlemi yapıldı.

## **2.7. Trace Salt Solution (Shirling ve Gottlieb, 1966)**

Bu çözelti, İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) ve Oatmeal Agar (ISP 3) ortamlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.1 g  |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O | 0.1 g  |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.1 g  |
| Saf su                                | 100 ml |

Ortam içerikleri 100 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra 121°C’de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi. Otoklav sonrası +4°C’de saklandı.

## 2.8. Pridham ve Gottlieb's Trace Salts Solution ( Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bu çözelti, karbon kaynağı kullanım testi ortamlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O | 0.64 g |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.11 g |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O | 0.79 g |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.15 g |
| Saf su                                | 100 ml |

Ortam içerikleri 100 ml saf su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 15 dk. otoklav edilerek steril edildi. Otoklav sonrası +4°C'de saklandı.

## 2.9. Lugol's İodine Ayracı (Cowan ve Steel, 1974)

Nişasta (Starch) degradasyon testinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Iodine                | 5 g     |
| KI (Potassium iodine) | 10 g    |
| Saf su                | 1000 ml |

Maddeler öncelikle 10 ml saf su içerisinde çözüldü. Daha sonra 100 ml'ye tamamlandı. 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

**0.5 M EDTA, pH 8**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| EDTA (Merck)       | 186.1 g |
| DDH <sub>2</sub> O | 1000 ml |

800 ml DDH<sub>2</sub>O içerisine 186.1 g EDTA ve ~ 20 g NaOH pelleti ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşınca kadar çözöldü. Son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 ml'lik ağzlı kapaklı cam şişelere bölünerek 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

**1 M Tris, pH 8**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Tris (Merck)       | 121.1 g |
| DDH <sub>2</sub> O | 1000 ml |

800 ml DDH<sub>2</sub>O içerisine 121.1 g tris ilave edildi ve manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C sıcaklık muamelesi ile berraklaşınca kadar çözölerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. pH 8'de 1 M Tris elde etmek için solüsyon içerisine 42 ml %38'lik HCl ilave edildi. Son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100 ml'lik ağzlı kapaklı cam şişelere bölünerek 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

**TE tamponu, pH 8**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 0.5M EDTA, pH 8 (Merck) | 2 ml    |
| 1M Tris, pH 8           | 10 ml   |
| DDH <sub>2</sub> O      | 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 -20 °C'de kullanım zamanına kadar saklandı.

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

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Proteinaz K (AppliChem) | 2 mg  |
| TE tamponu              | 10 ml |

2 mg proteinaz K 10 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 1.5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18 °C'de kullanım zamanına kadar saklandı.

**7.5 M Amonyum asetat**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Amonyum asetat (AppliChem) | 57.81 g |
| DDH <sub>2</sub> O         | 100 ml  |

57.81 g amonyum asetat 100 ml' lik ağzı kapaklı cam şişeye konularak üzerine yaklaşık 40 ml DDH<sub>2</sub>O ilave edildi. Son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C sıcaklık muamelesi ile berraklaşmaya kadar çözüldü. Solüsyon 121 °C'de 15 dk otoklav edilerek +4 °C'de saklandı.

**%10'luk Sarkosil**

N-laurylsarcosine (Sigma) 1 g

DDH<sub>2</sub>O 10 ml

1 g N-laurylsarcosine 8 ml DDH<sub>2</sub>O içeren 100 ml' lik ağzı kapaklı cam şişeye konularak manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C sıcaklık muamelesi ile berraklaşmaya kadar çözüldü ve son hacim DDH<sub>2</sub>O ile 10 ml' ye tamamlandı. Solüsyon otoklav ile steril edildi ve şişenin etrafı alüminyum folyo kapatılarak oda sıcaklığında saklandı.

**Guanidin thiosiyanat solüsyonu** (5 M guanidin thiosiyanat, 100 mM EDTA, % 0.5 sarkosil)

Guanidine thiosiyanat (AppliChem) 60 g

DDH<sub>2</sub>O (otoklav edilmiş) 20 ml

0.5 M EDTA, pH 8 20 ml

60 g guanidine thiosiyanat steril 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişeye konuldu ve üzerine steril 20 ml DDH<sub>2</sub>O ve 0.5 M EDTA (pH 8) ilave edildi. Solüsyon manyetik karıştırıcıda 65 °C sıcaklık muamelesi ile berraklaşmaya kadar çözüldü ve oda sıcaklığında soğuduktan sonra,

**N-Laurylsarcosine %10 v/v (otoklav edilmiş) 5 ml**

Son hacim steril DDH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlanarak 0.45 µm çapındaki membran filtreden geçirildi. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

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

|                        |       |
|------------------------|-------|
| Kloroform (Merck)      | 24 ml |
| Izo-amil alkol (Merck) | 1 ml  |

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

**Izo-propanol**

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

**%70'lik etanol**

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| %100'lük alkol                       | 70 ml |
| DDH <sub>2</sub> 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 (10 mg/ml)**

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

10 mg RNA az 10 ml TE tamponu içerisinde çözüldü. 1.5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -18 °C'de saklandı.

**8M LiCl<sub>2</sub>**

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| LiCl <sub>2</sub> (Merck) | 33.912 g |
| DDH <sub>2</sub> O        | 100 ml   |

33.912 g LiCl<sub>2</sub> tartılarak bir beher içerisine konuldu ve üzerine 60 ml DDH<sub>2</sub>O ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde 50 °C sıcaklık muamelesi ile berraklaşınca kadar çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlanarak 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişeye konuldu. Solüsyon 121 °C'de 15 dk otoklav edilerek oda sıcaklığında saklandı.

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

Fenol-kloroform-izo-amil alkol (25:24:1 v/v; AppliChem) istenilen oranlarda hazır olarak alındı. Bu kimyasal madde, moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılabilir nitelikte olmalıdır. 100 ml'lik streil 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               | 121.10 g |
| Borik asit (Merck) | 61.83 g  |
| EDTA (susuz)       | 5.84 g   |
| DDH <sub>2</sub> O | 1000 ml  |

Solüsyon içerikleri tartıldı ve 1000 ml'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 ml DDH<sub>2</sub>O ilave edilerek solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşınca kadar tutuldu. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH 8'e ayarlanarak +4 °C'de saklandı.

**1xTBE, pH 8**

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

Ağız kapaklı 400 ml'lik cam şişe içine konularak oda sıcaklığında tutuldu.

**Etidyum Bromür (10 mg/ml stok)**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Etidyum bromür (Sigma) | 100 mg |
| DDH <sub>2</sub> O     | 10 ml  |

100 ml'lik ağız kapaklı cam şişe içerisine 100 mg etidyum bromür ve 10 ml DDH<sub>2</sub>O su ilave edildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde birkaç saat karıştırılarak hazırlandı. Şişenin etrafı alüminyum folyo kapatılarak +4 °C'de saklandı. Hazırlanan bu solüsyondan her 100 ml agarozu 5 µl olacak şekilde ilave edilmektedir.

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

Etidyum bromür son derece mutajenik bir maddedir. Çalışırken mutlaka eldiven giyilmeli ve maske takılmalıdır.

**Brom fenol mavisi (Yükleme Tamponu)**

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Brom fenol mavisi (AppliChem) | 40 mg  |
| Gliserol                      | 5 ml   |
| 0.5 M EDTA                    | 1.5 ml |
| DDH <sub>2</sub> O            | 3.5 ml |

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

### **EK-B: Tindalizasyon Tekniği ile Sterilizasyon**

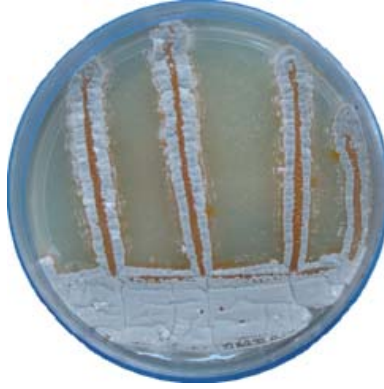
Azot ve karbon kaynakları ile değredasyon testlerinde kullanılan bazı kaynakların sterilizasyonunu sağlamak için kullanılan bir tekniktir ve sıvı maddelerin 100°C sıcaklıkta 3 gün aynı saatte 30 dakika boyunca kaynayan suda bekletilmesine dayanır. Ölçülü miktardaki azot ve karbon kaynakları ile değredasyon testlerinde kullanılan bazı maddeler, daha önceden otoklav ile steril edilmiş, içinde 50 ml saf su bulunan ağzı kapaklı 100 ml' lik cam şişeler içine konmuştur. Kapağı hafifçe gevşetilmiş cam şişeler, içinde 100°C' ye kadar ısıtılmış az miktarda su bulunan ağzı kapaklı, geniş tabanlı kaplarda 30 dakika süreyle ısıtılmıştır. Bu süre sonunda, cam şişelerin kapakları sıkıca kapatılarak oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Bu işlem, 2. ve 3. gün ardışık olarak aynı saatte tekrarlanmıştır.

1. gün 100°C 30 dk. aynı saatte
2. gün 100°C 30 dk. aynı saatte
3. gün 100°C 30 dk. aynı saatte

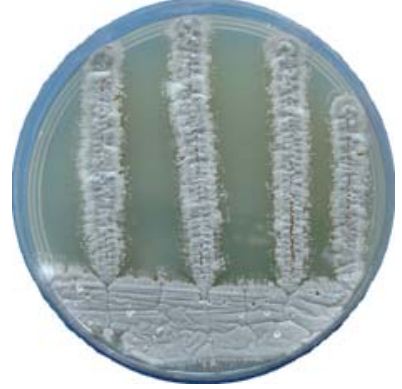
Kapakları kapalı bir şekilde oda sıcaklığında korunan şişeler, tindalizasyon bittiğı gün aseptik koşullarda besiyerlere eklenerek yine aseptik koşullarda petrilere dökülmüştür.

**Ek- C. İzolatlarının Farklı Besiyerlerinde Morfolojik ve Kültürel Özellikleri**

NS005 BENNETT'S AGAR



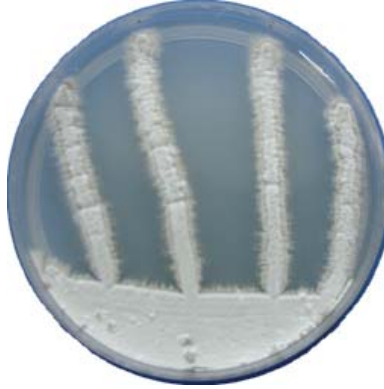
NS005 GYME AGAR



NS005 ISP2 AGAR



NS005 ISP4 AGAR



NS005 ISP5 AGAR



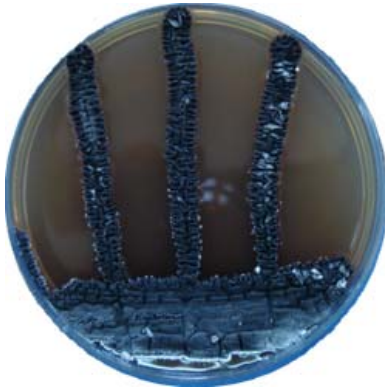
NS005 ISP6 AGAR



NS005 OATMEAL AGAR



NS005 TYROSINE AGAR



NS017 BENNETT'S AGAR



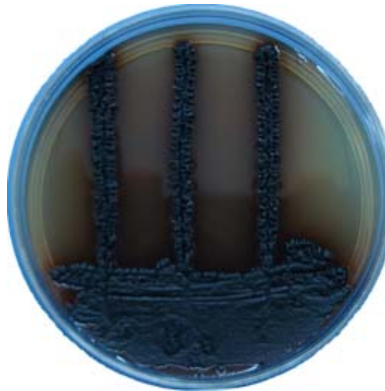
NS017 GYME AGAR



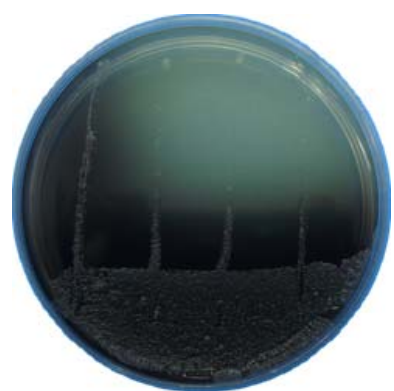
NS017 ISP2 AGAR



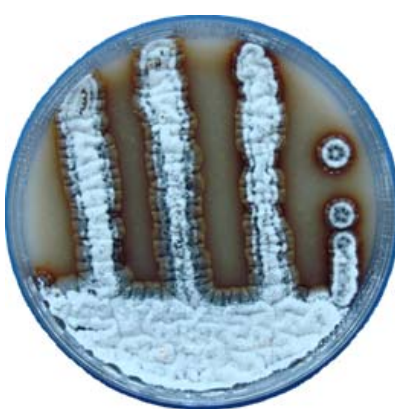
NS017 ISP4 AGAR



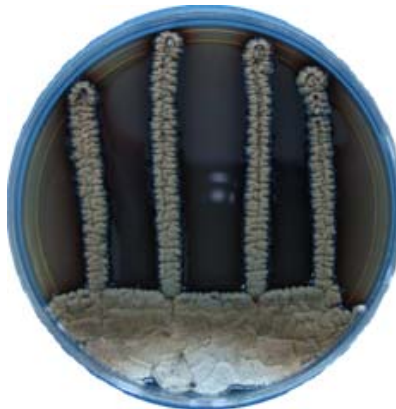
NS017 ISP5 AGAR



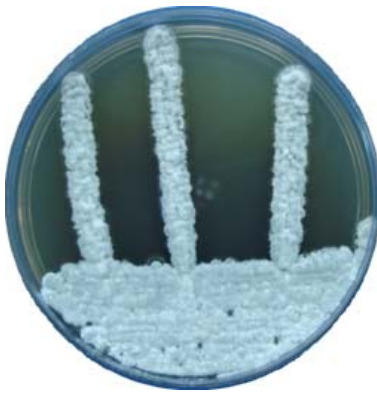
NS017 ISP6 AGAR



NS017 OATMEAL AGAR



NS017 TYROSINE AGAR



NS026 BENNETT'S AGAR



NS026 GYME AGAR



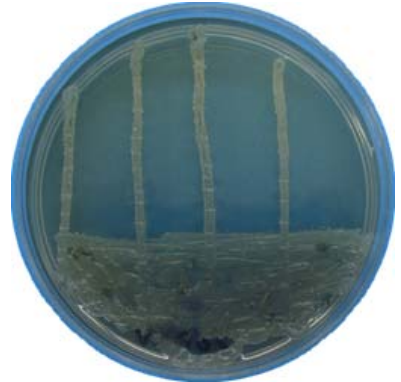
NS026 ISP2 AGAR



NS026 ISP4 AGAR



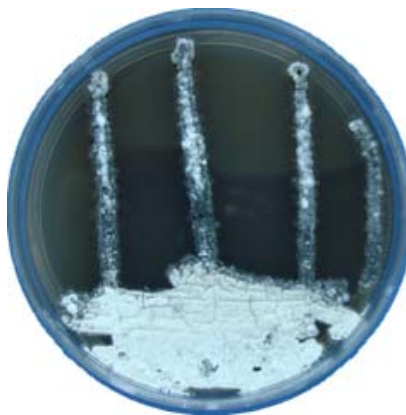
NS026 ISP5 AGAR



NS026 ISP6 AGAR



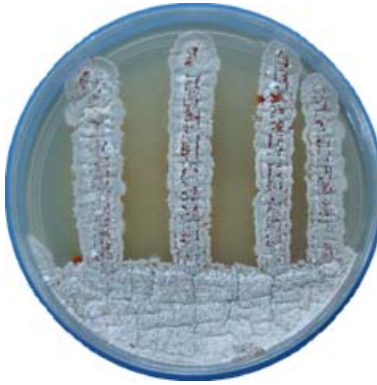
NS026 OATMEAL AGAR



NS026 TYROSINE AGAR



NS035 BENNETT'S AGAR



NS035 GYME AGAR



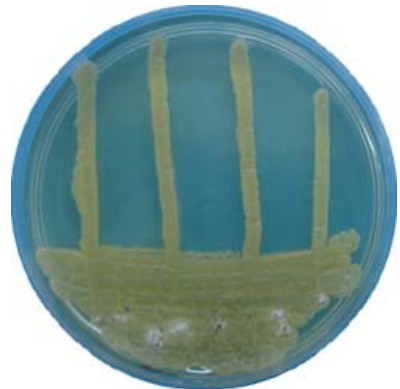
NS035 ISP2 AGAR



NS035 ISP4 AGAR



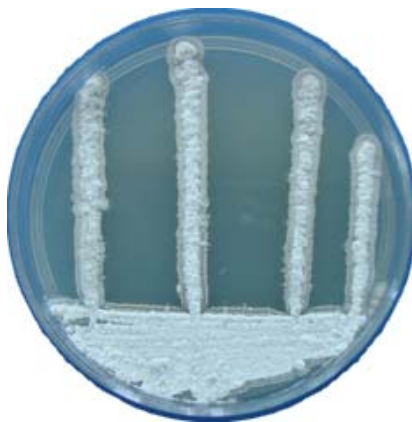
NS035 ISP5 AGAR



NS035 ISP6 AGAR



NS035 OATMEAL AGAR



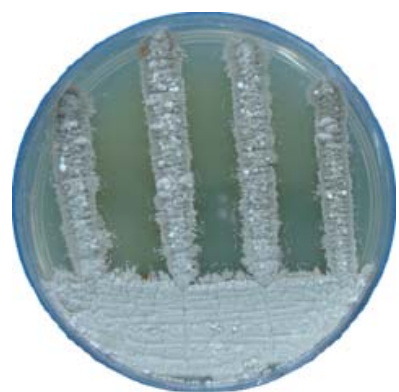
NS035 TYROSINE AGAR



NS038 BENNETT'S AGAR



NS038 GYME AGAR



NS038 ISP2 AGAR



NS038 ISP4 AGAR



NS038 ISP5 AGAR



NS038 ISP6 AGAR



NS038 OATMEAL AGAR



NS038 TYROSINE AGAR



NS082 BENNETT'S AGAR



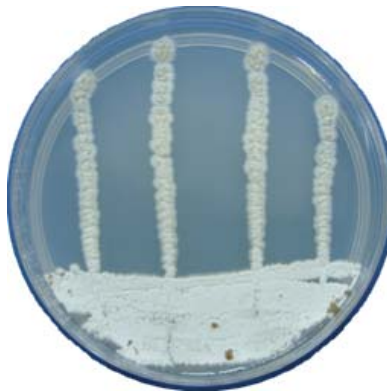
NS082 GYME AGAR



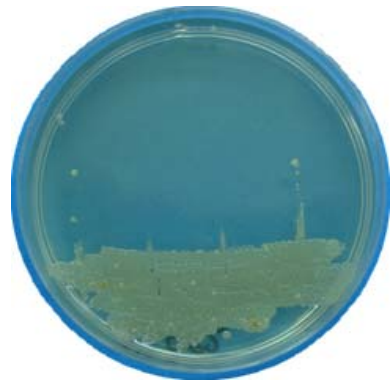
NS082 ISP2 AGAR



NS082 ISP4 AGAR



NS082 ISP5 AGAR



NS082 ISP6 AGAR



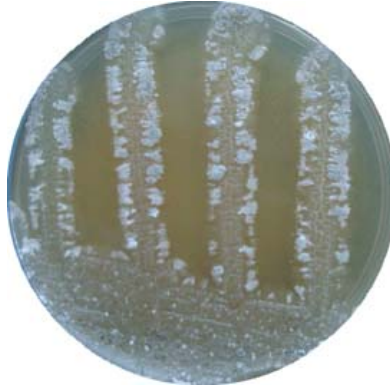
NS082 OATMEAL AGAR



NS082 TYROSINE AGAR



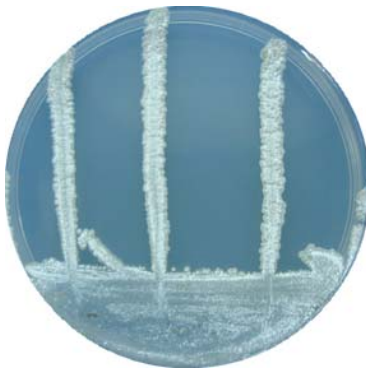
TC003 BENNETT'S AGAR



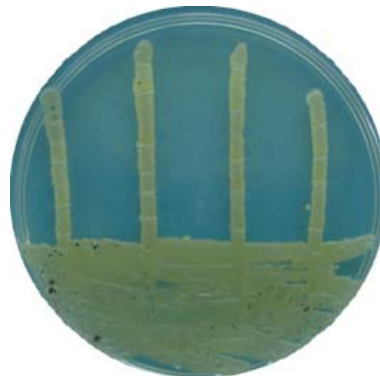
TC003 GYME AGAR



TC003 ISP4 AGAR



TC003 ISP5 AGAR



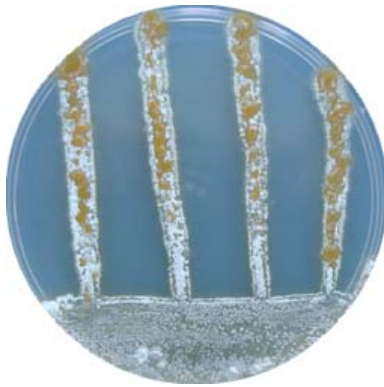
TC003 ISP6 AGAR



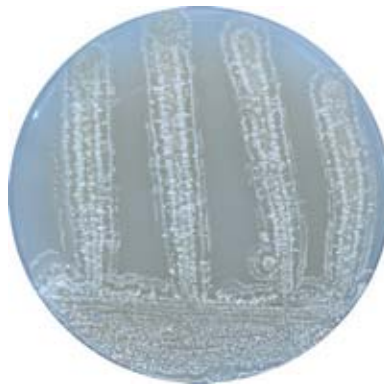
TC003 OATMEAL AGAR



TC003 TYROSINE AGAR



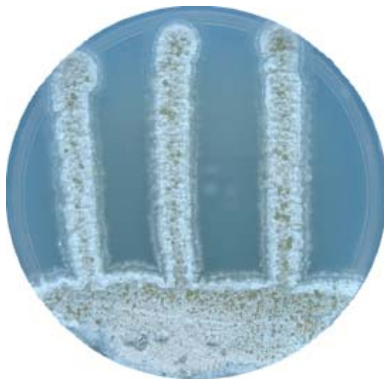
TC004 BENNETT'S AGAR



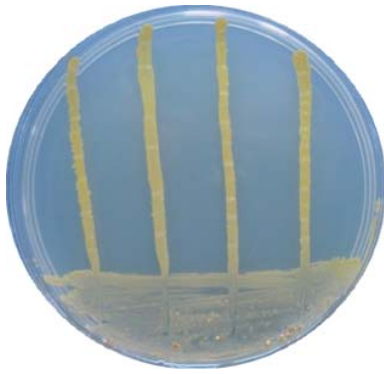
TC004 ISP4 AGAR



TC004 ISP5 AGAR



TC004 TYROSINE AGAR



TC005 BENNETT'S AGAR



TC005 GYME AGAR



TC005 ISP4 AGAR



TC005 ISP5 AGAR



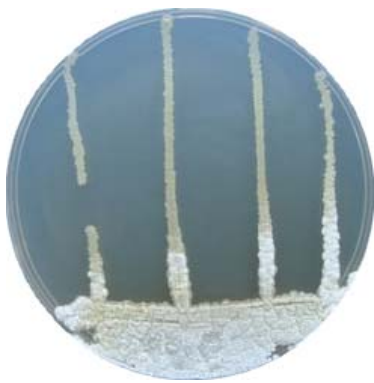
TC005 ISP6 AGAR



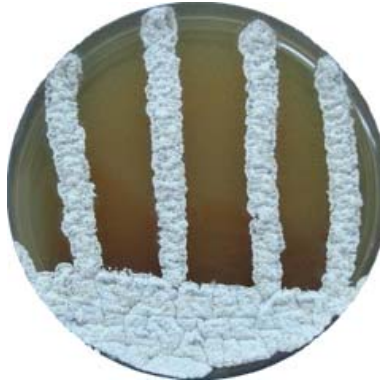
TC005 OATMEAL AGAR



TC005 TYROSINE AGAR



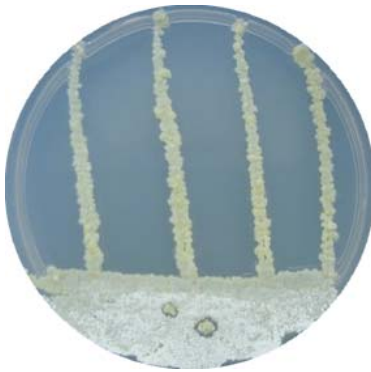
TC008 BENNETT'S AGAR



TC008 GYME AGAR



TC008 ISP4 AGAR



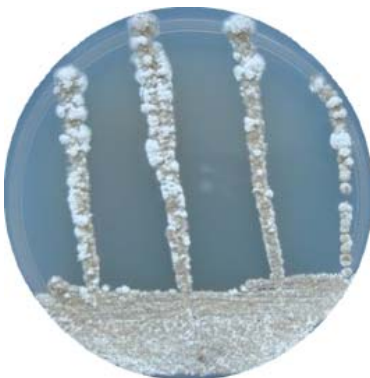
TC008 ISP5 AGAR



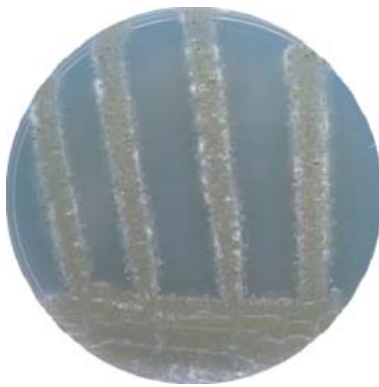
TC008 ISP6 AGAR



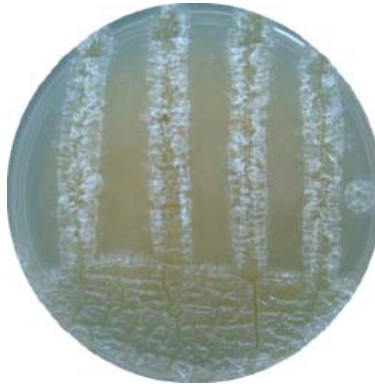
TC008 OATMEAL AGAR



TC008 TYROSINE AGAR



TC011 BENNETT'S AGAR



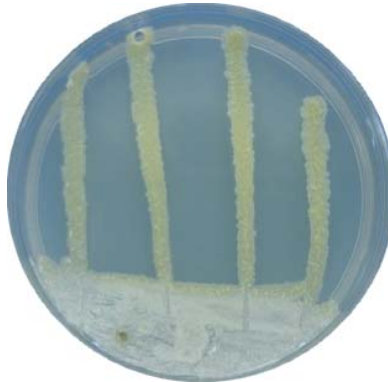
TC011 GYME AGAR



TC011 ISP2 AGAR



TC011 ISP4 AGAR



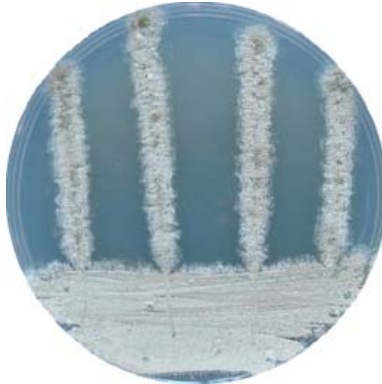
TC011 ISP5 AGAR



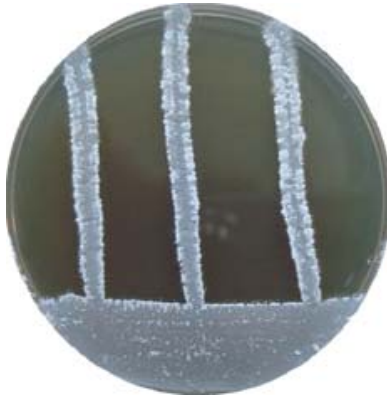
TC011 ISP6 AGAR



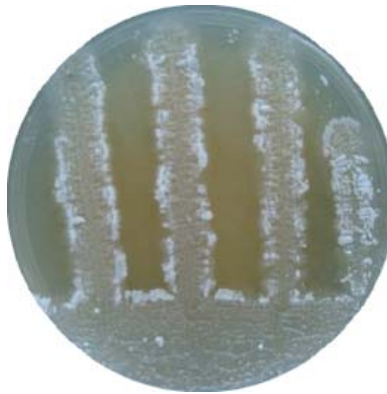
TC011 OATMEAL AGAR



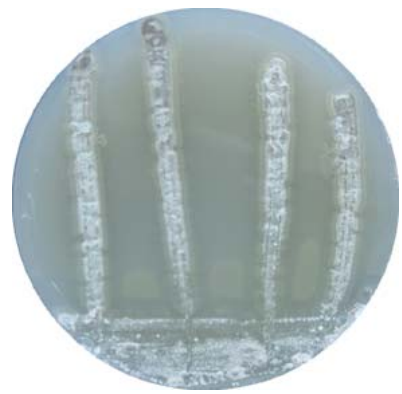
TC011 TYROSINE AGAR



TC017 BENNETT'S AGAR



TC017 GYME AGAR



TC017 ISP4 AGAR



TC017 ISP5 AGAR



TC017 ISP6 AGAR



TC017 OATMEAL AGAR



TC017 TYROSINE AGAR



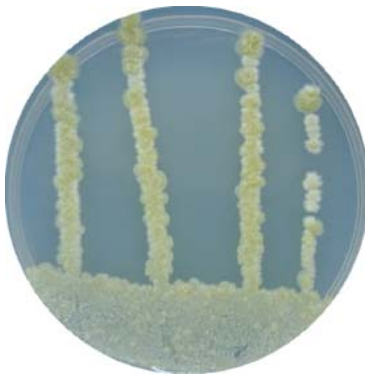
TC019 BENNETT'S AGAR



TC019 GYME AGAR



TC019 ISP4 AGAR



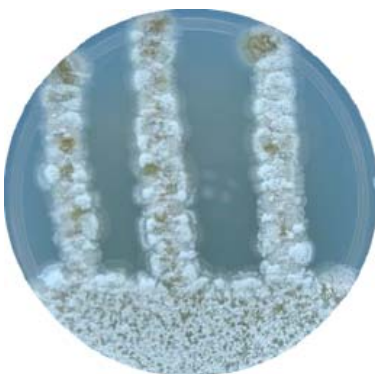
TC019 ISP5 AGAR



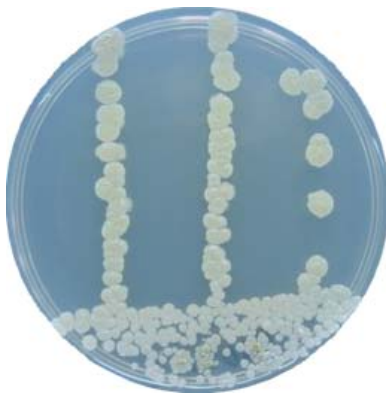
TC019 ISP6 AGAR



TC019 OATMEAL AGAR



TC019 TYROSINE AGAR



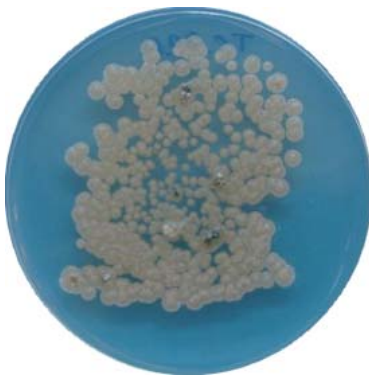
TC020 BENNETT'S AGAR



TC020 ISP4 AGAR



TC020 ISP5 AGAR



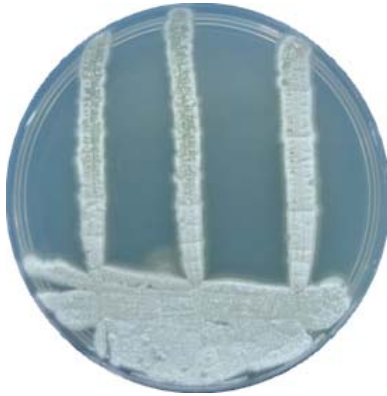
TC020 ISP6 AGAR



TC020 OATMEAL AGAR



TC020 TYROSINE AGAR



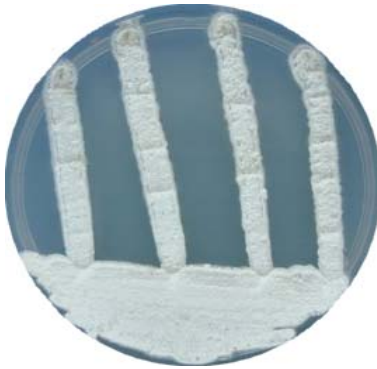
TC021 BENNETT'S AGAR



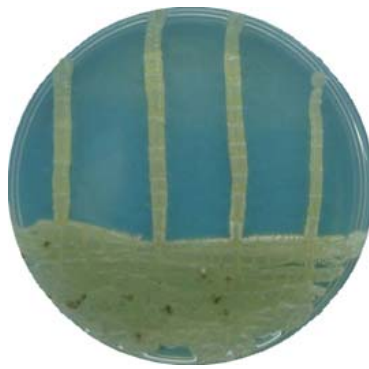
TC021 GYME AGAR



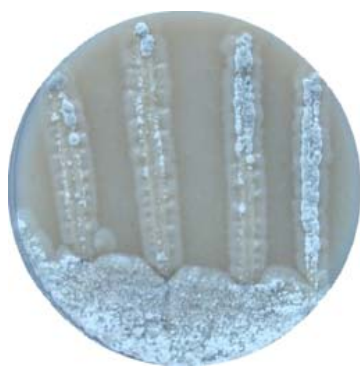
TC021 ISP4 AGAR



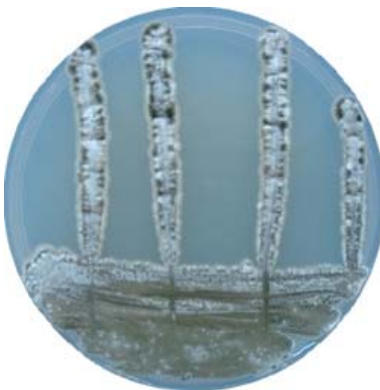
TC021 ISP5 AGAR



TC021 ISP6 AGAR



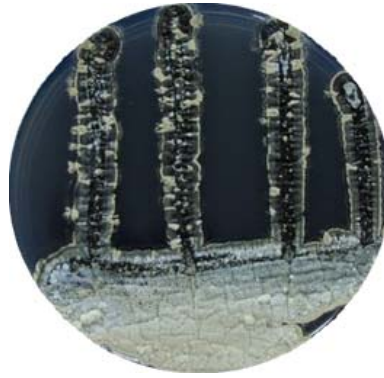
TC021 OATMEAL AGAR



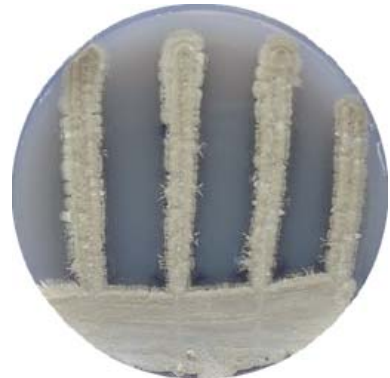
TC021 TYROSINE AGAR



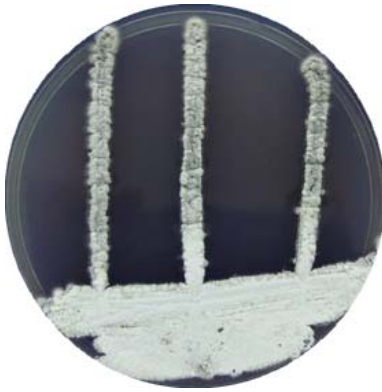
TC022 BENNETT'S AGAR



TC022 GYME AGAR



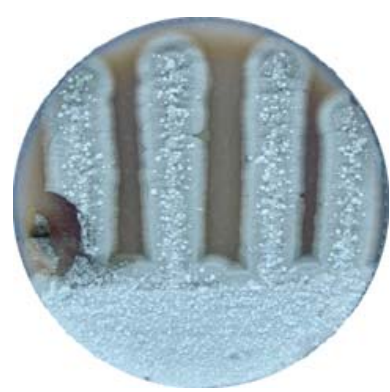
TC022 ISP4 AGAR



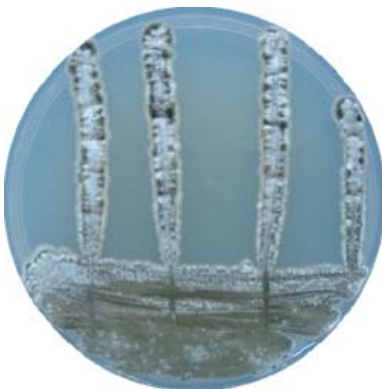
TC022 ISP5 AGAR



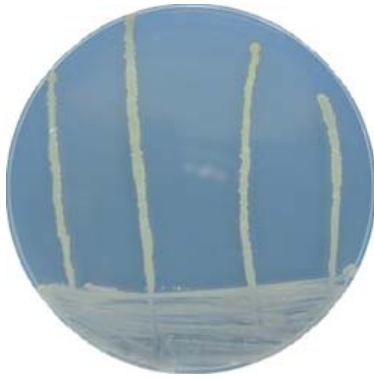
TC022 ISP6 AGAR



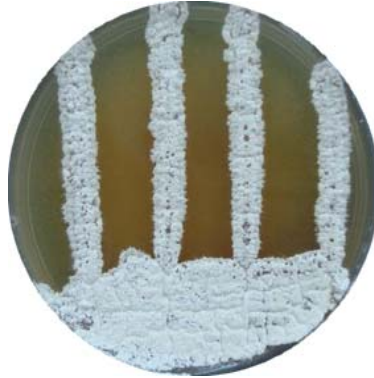
TC022 OATMEAL AGAR



TC022 TYROSINE AGAR



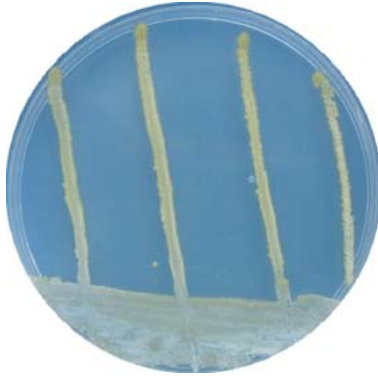
TC023 BENNETT'S AGAR



TC023 GYME AGAR



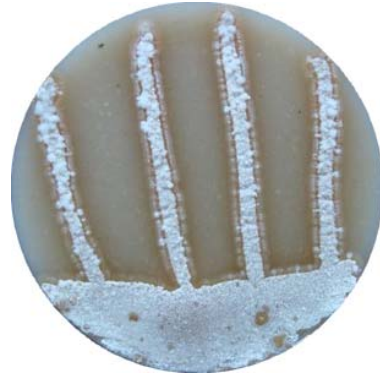
TC023 ISP4 AGAR



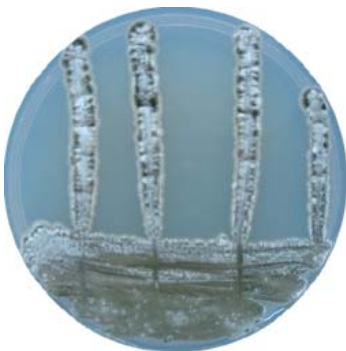
TC023 ISP5 AGAR



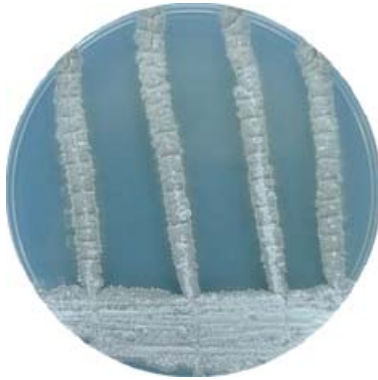
TC023 ISP6 AGAR



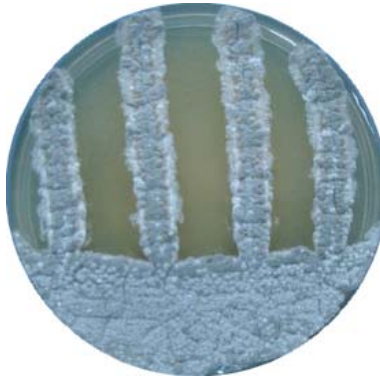
TC023 OATMEAL AGAR



TC023 TYROSINE AGAR



TC024 BENNETT'S AGAR



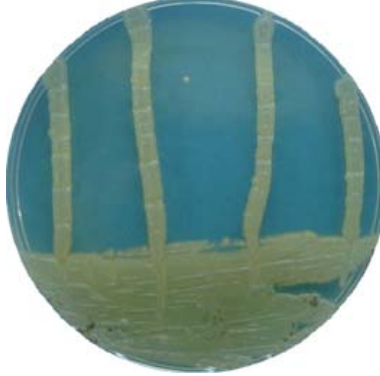
TC024 GYME AGAR



TC024 ISP4 AGAR



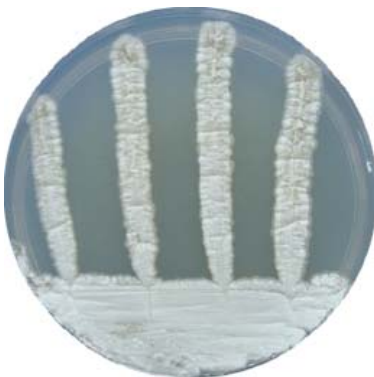
TC024 ISP5 AGAR



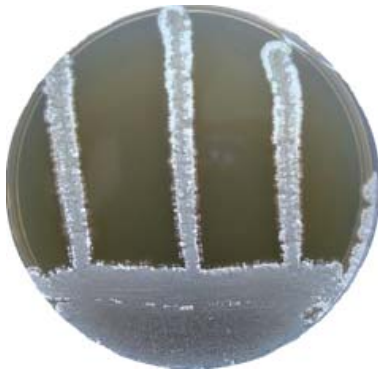
TC024 ISP6 AGAR



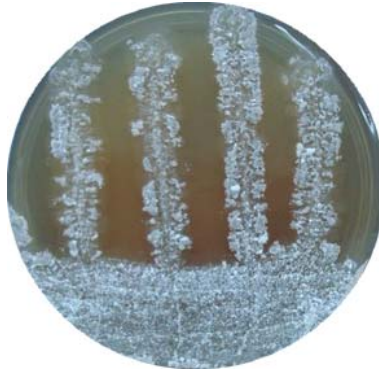
TC024 OATMEAL AGAR



TC024 TYROSINE AGAR



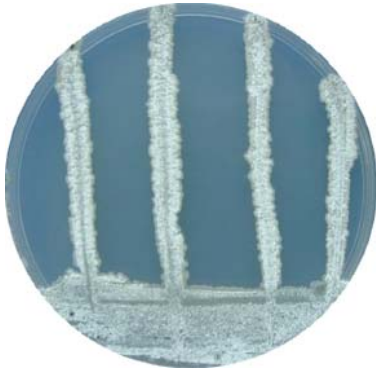
TC025 BENNETT'S AGAR



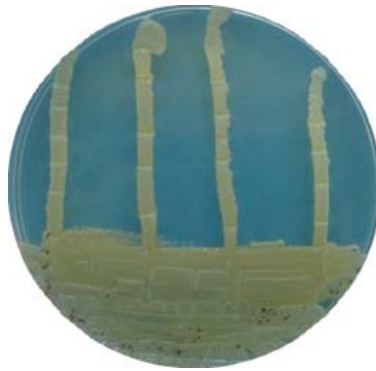
TC025 GYME AGAR



TC025 ISP4 AGAR



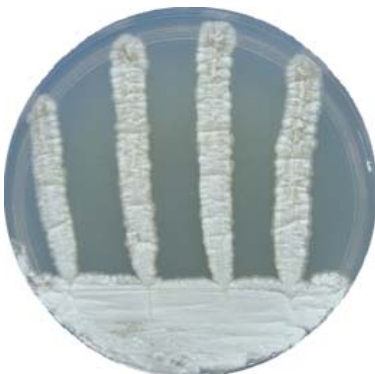
TC025 ISP5 AGAR



TC025 ISP6 AGAR



TC025 OATMEAL AGAR



TC025 TYROSINE AGAR



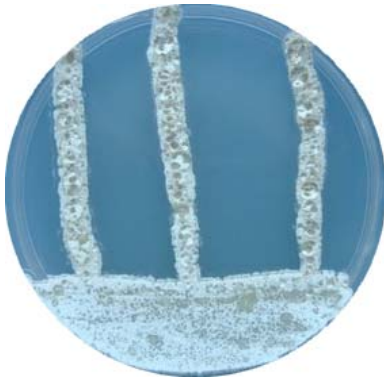
TC026 BENNETT'S AGAR



TC026 GYME AGAR



TC026 ISP4 AGAR



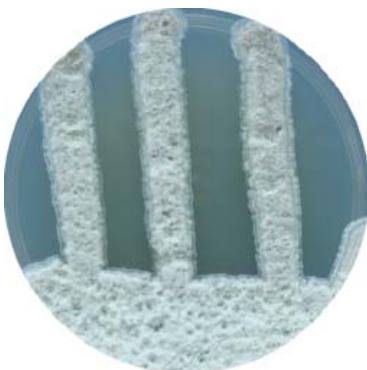
TC026 ISP5 AGAR



TC026 ISP6 AGAR



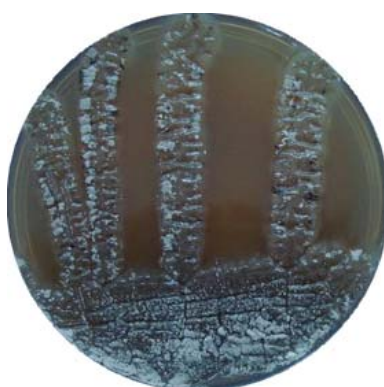
TC026 OATMEAL AGAR



TC026 TYROSINE AGAR



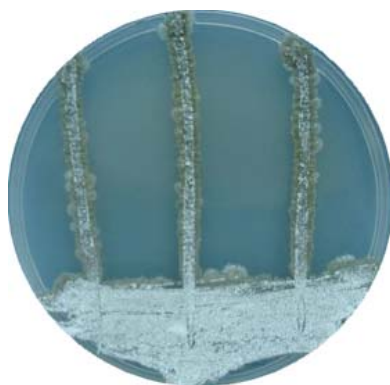
TC027 BENNETT'S AGAR



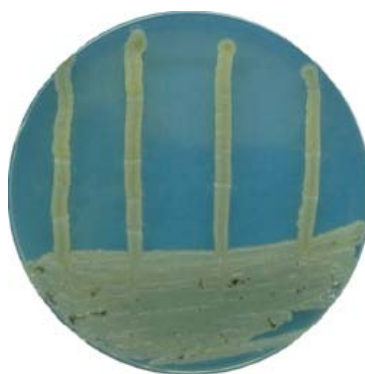
TC027 GYME AGAR



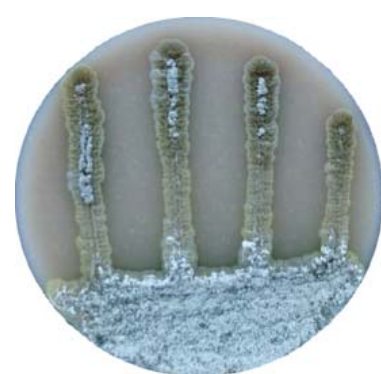
TC027 ISP4 AGAR



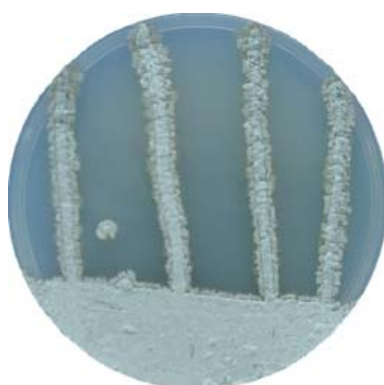
TC027 ISP5 AGAR



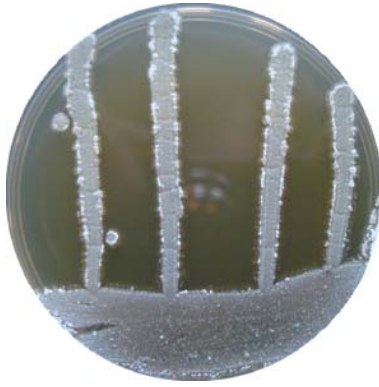
TC027 ISP6 AGAR



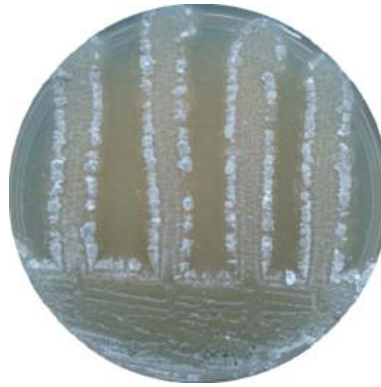
TC027 OATMEAL AGAR



TC027 TYROSINE AGAR



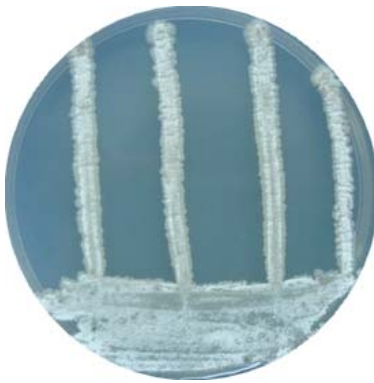
TC028 BENNETT'S AGAR



TC028 GYME AGAR



TC028 ISP4 AGAR



TC028 ISP5 AGAR



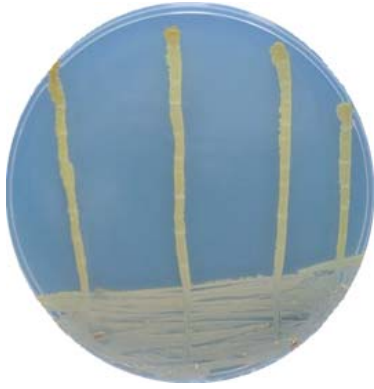
TC028 ISP6 AGAR



TC028 OATMEAL AGAR



TC028 TYROSINE AGAR



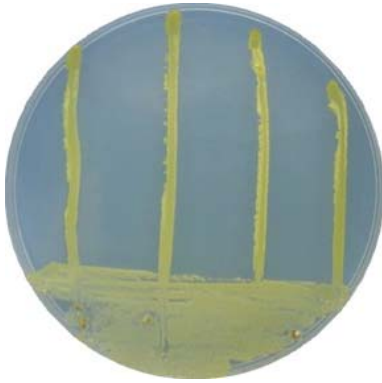
TC030 BENNETT'S AGAR



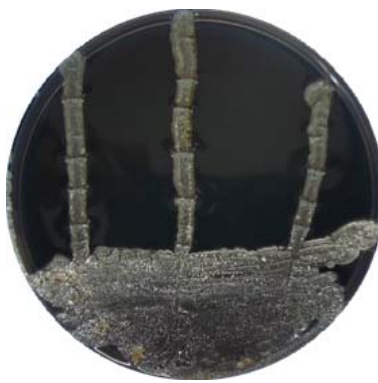
TC030 GYME AGAR



TC030 ISP4 AGAR



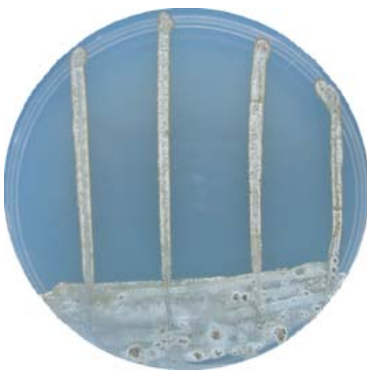
TC030 ISP5 AGAR



TC030 ISP6 AGAR



TC030 OATMEAL AGAR



TC030 TYROSINE AGAR

## 7. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ordu' nun Ünye ilçesinde doğdum. İlkokulu Anafarta İlköğretim Okulu' nda, orta ve lise öğrenimimi Ünye İmam Hatip Lisesi'nde tamamladım. 2001-2002 yılında İstanbul Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Bölümü'nde önlisans eğitimime başladım. 2002-2003' te mezun oldum. 2003-2004' te Konya Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü dikey geçiş sınavı ile kazandım. 2006 yılında mezun oldum. 2007 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nde yüksek lisans yapmaya hak kazandım. Şu anda yüksek lisans tez aşamasındayım.

**Aysel Veyisoğlu**