



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



BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI KRATER GÖLLERİ SEDİMENT VE KIYI TOPRAKLARINDAN
AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU VE POLİFAZİK TAKSONOMİSİ**

DOKTORA TEZİ

**Hilal AY
11210545**

Tezin Savuma Tarihi : 15 Temmuz 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kamil IŞIK

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi ÖYP-1919-022'nolu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Hilal Ay Tarafından Hazırlanan

**FARKLI KRATER GÖLLERİ SEDİMENT VE KIYI
TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU VE
POLİFAZİK TAKSONOMİSİ**

başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 15/07/2016 tarihinde yapılan sınav ile

DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
Anadolu Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
Karadeniz Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Prof. Dr. Kamil IŞIK
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Doç. Dr. İkbâl Agah İNCE
Acıbadem Üniversitesi

....../....../2016

Prof. Dr. Hüseyin DEMİR

Enstitü Müdürü



ÖNSÖZ

Bu çalışmanın tez konusu olarak belirlenmesinden bitimine kadar bilgi ve görüşlerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Kamil IŞIK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardım ve önerilerinden faydalandığım Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN'e teşekkür ederim. Tez izleme sürecindeki öneri ve katkılarından dolayı Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Doç. Dr. İkbâl Ağah İNCE'ye teşekkür ederim. Ayrıca Atatürk Üniversitesi'ndeki öğrenimim süresince danışmanlığından ve manevi desteğinden faydalandığım Prof. Dr. Güleray AĞAR'a minnettarım.

Newcastle Üniversitesi'ndeki çalışmalarım süresince danışmanlığından faydalandığım Prof. Dr. Hans-Peter KLENK'e; kemotaksonomik analizlerde bilgi ve yardımlarından faydalandığım Dr. Maria MONTERO-CALASANZ'a, Dr. İmen NOUIOUI'ye, Dr. Lorena CARRO-GARCIA'ya ve Ros BROWN'a teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi'nden Doç. Dr. Meryem ŞEKER ve Mustafa ÇELİK'e; Orman ve Su İşleri Bitlis Şube Müdürlüğü'ne; elektron mikroskobu görüntüleri için Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nden Doç. Dr. Demet ÇETİN'e; toprak örneklerinin analizi için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden Prof. Dr. Orhan DENGİZ'e; laboratuvar çalışmalarındaki yardımları için Öğr. Gör. Salih SARICAOĞLU'na ve Ahmet Rıdvan TOPKARA'ya; manevi desteği için arkadaşım Arş. Gör. Şenay SÜNGÜ ŞEKER'e teşekkür ederim.

Hem arazi çalışmalarındaki yardımları hem de maddi ve manevi desteğinden dolayı kardeşim ve en eski arkadaşım Ali AY'a; zorlu Nemrut Gölü arazisindeki yardımından dolayı babama ve hayır duaları için anneme minnettarım.

Doktora öğrenimim süresince 2211 – Yurt İçi Doktora Bursu ve 2214-A – Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Temmuz 2016

Hilal AY
Araştırma Görevlisi



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xv
FARKLI KRATER GÖLLERİ SEDİMENT VE KIYI TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU VE POLİFAZİK TAKSONOMİSİ.....	xvii
ÖZET.....	xvii
ISOLATION AND POLYPHASIC TAXONOMY OF ACTINOMYCETES FROM COASTAL SEDIMENT AND SOIL SAMPLES OF DIFFERENT CRATER LAKES	xix
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	6
1.2 Literatür Araştırması	7
1.2.1 Polifazik Taksonomi.....	7
1.2.2 Genotipik Karakterizasyon	8
1.2.3 Fenotipik Karakterizasyon.....	15
1.2.4 Kemotaksonomik karakterizasyon	18
2. ACTINOBACTERIA TAKSONOMİSİ	25
2.1 Aktinobakterilerin Morfolojik Özellikleri.....	26
2.2 Aktinobakterilerin Kemotaksonomik Özellikleri.....	28
2.3 Seçilen Aktinobakteri Cinslerinin Genel Özellikleri.....	31
2.3.1 <i>Actinomadura</i> cinsi.....	31
2.3.2 <i>Glycomyces</i> cinsi	34
2.3.3 <i>Jiangella</i> cinsi.....	36
2.3.4 <i>Jishengella</i> cinsi	37
2.3.5 <i>Micromonospora</i> cinsi.....	38
2.3.6 <i>Nocardia</i> cinsi	42
2.3.7 <i>Nonomuraea</i> cinsi.....	46
2.3.8 <i>Promicromonospora</i> cinsi	49
2.3.9 <i>Saccharomonospora</i> cinsi	51
2.3.10 <i>Streptomyces</i> cinsi	53
2.3.11 <i>Verrucosipora</i> cinsi	58
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	61
3.1 İzolasyonda Kullanılan Toprak ve Sediment Örnekleri	61
3.2 Aktinobakterilerin İzolasyonu.....	62
3.3 İzolatların Saflaştırılması ve Stoklanması.....	63
3.4 Moleküler Taksonomik Yöntemler	63
3.4.1 Genomik DNA izolasyonu	63
3.4.2 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonu ve analizi	63
3.5 Fenotipik Karakterizasyon	64

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5.1 Kültürel ve morfolojik özellikler	65
3.5.2 Nümerik analiz.....	66
3.5.2.1 Test suşları ve test ortamlarının inokülasyonu	66
3.5.2.2 Biyokimyasal testler	67
3.5.2.3 Besinsel testler	70
3.5.2.4 Tolerans testleri	71
3.6 Kemotaksonomik Karakterizasyon	71
3.6.1 Diaminopimelik Asit Analizi.....	72
3.6.2 Tüm-hücre şeker analizi	73
3.6.3 Menakinon analizi	73
3.6.4 Polar lipit analizi.....	74
3.6.5 Yağ asidi analizi	75
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	77
4.1 Bulgular	77
4.1.1 İzolasyonda kullanılan sediment ve toprak örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	77
4.1.2 İzole edilen aktinobakteri suşları	78
4.1.3 Filogenetik karakterizasyon.....	85
4.1.3.1 <i>Streptomyces</i> cinsi	85
4.1.3.2 <i>Micromonospora</i> cinsi.....	97
4.1.3.3 <i>Actinomadura</i> cinsi.....	101
4.1.3.4 <i>Nonomuraea</i> cinsi.....	104
4.1.3.5 <i>Nocardia</i> cinsi.....	106
4.1.3.6 <i>Verrucosipora</i> cinsi.....	109
4.1.3.7 <i>Saccharomonospora</i> cinsi.....	111
4.1.3.8 <i>Jiangella</i> cinsi.....	112
4.1.3.9 <i>Jishengella</i> cinsi	114
4.1.3.10 <i>Promicromonospora</i> cinsi	116
4.1.3.11 <i>Glycomyces</i> cinsi	117
4.1.4 Fenotipik Karakterizasyon.....	118
4.1.4.1 Nümerik analiz	118
4.1.4.2 Spor morfolojisi.....	123
4.1.5 Kemotaksonomik karakterizasyon.....	126
4.1.5.1 Diaminopimelik asit analizi.....	126
4.1.5.2 Şeker analizi	127
4.1.5.3 Polar lipit analizi.....	131
4.1.5.4 Yağ asidi analizi	145
4.1.5.5 Menakinon analizi	147
4.2 Tartışma.....	156
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	169
KAYNAKLAR.....	173
EKLER.....	199
ÖZGEÇMİŞ.....	213

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Bakterilerde yaygın olarak görülen polar lipitler.....	20
Çizelge 2.1. Aktinobakterilerde hücre duvar bileşenlerinin farklı tipleri	30
Çizelge 3.1. İzolasyonda kullanılan örneklerin lokaliteleri	61
Çizelge 3.2. Aktinobakterilerin seçici olarak izolasyonunda kullanılan besi ortamları	62
Çizelge 3.3. 16S rDNA'nın PCR amplifikasyonunda ve dizilemede kullanılan primerler.....	64
Çizelge 3.4. Fenotipik testlerde kullanılan izolatlar ve referans suşları	65
Çizelge 3.5. Taramalı elektron mikroskopunda spor morfolojisi analiz edilen izolatlar.....	66
Çizelge 3.6. İzolatların nümerik analizi için uygulanan testler	67
Çizelge 3.7. Kemotaksonomik karakterizasyonu yapılan izolatlar.....	72
Çizelge 4.1. İzolasyonda kullanılan toprak ve sediment örneklerinin fizikokimyasal özellikleri	77
Çizelge 4.2. Acıgöl kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler	79
Çizelge 4.3. Meke Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler	80
Çizelge 4.4. Nemrut Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler	81
Çizelge 4.5. Gölcük Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler	82
Çizelge 4.6. Nevşehir – Acıgöl taban toprak örneğinden izole edilen aktinobakteriler.....	84
Çizelge 4.7. <i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	85
Çizelge 4.8. 4. Grupta yer alan <i>Streptomyces</i> spp. izolatları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerlikleri ve nükleotid farklılıkları	97
Çizelge 4.9. <i>Micromonospora</i> cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	98
Çizelge 4.10. <i>Actinomadura</i> cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	101
Çizelge 4.11. <i>Nonomuraea</i> cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	104
Çizelge 4.12. <i>Nocardia</i> cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	106

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4.13. <i>Verrucosipora</i> cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	109
Çizelge 4.14. <i>Saccharomonospora</i> cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları.....	111
Çizelge 4.15. <i>Jiangella</i> cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları.....	112
Çizelge 4.16. <i>Jishengella</i> cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları.....	114
Çizelge 4.17. <i>Promicromonospora</i> cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları	116
Çizelge 4.18. <i>Glycomyces</i> cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türü ile benzerlik oranı	117
Çizelge 4.19. <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12 ve <i>Jishengella</i> sp. NA12 izolatlarının en yakın tip türleri ile fenotipik karakterizasyonu.....	118
Çizelge 4.20. <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12 suşunun en yakın tip türleri ile on farklı besi ortamındaki gelişim özellikleri	120
Çizelge 4.21. <i>Jishengella</i> sp. NA12 suşunun cinsin tip türü ile on farklı besi ortamındaki gelişim özellikleri	121
Çizelge 4.22. <i>Nonomuraea</i> sp. MTSC22, <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12 ve <i>Jishengella</i> sp. NA12 suşlarının en yakın tip türleri ile yağ asidi profilleri	146
Çizelge 4.23. Yeni tür olma ihtimali yüksek olan izolatların kemotaksonomik özellikleri	155
Çizelge B.1. <i>Actinomadura</i> , <i>Saccharomonospora</i> ve <i>Nocardia</i> cinslerine ait yeni tür olma potansiyeli yüksek izolatların fenotipik karakterizasyonu.....	205

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Mikrobiyal süreçlerin analizinde genom dizilerinin rolü	14
Şekil 3.1. Allantoin hidrolizi.....	68
Şekil 3.2. Nitrat redüksiyonu	68
Şekil 3.3. Üre hidrolizi.....	69
Şekil 4.1. <i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Maximum Likelihood ağacı	87
Şekil 4.2. 16S rRNA gen dizisine göre 1. Grup <i>Streptomyces</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	88
Şekil 4.3. 1A Grubundaki <i>Streptomyces</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	89
Şekil 4.4. 1B Grubundaki <i>Streptomyces</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	91
Şekil 4.5. 16S rRNA gen dizisine göre 2. Grup <i>Streptomyces</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	93
Şekil 4.6. 16S rRNA gen dizisine 3. Grup <i>Streptomyces</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	95
Şekil 4.7. 16S rRNA gen dizisine göre 4. Grup <i>Streptomyces</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	96
Şekil 4.8. 16S rRNA gen dizi analizine göre <i>Micromonospora</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	99
Şekil 4.9. <i>Actinomadura</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	103
Şekil 4.10. <i>Nonomuraea</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	105
Şekil 4.11. <i>Nocardia</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	108
Şekil 4.12. <i>Verrucosipora</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.	110
Şekil 4.13. <i>Saccharomonospora</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı	111
Şekil 4.14. <i>Jiangella</i> spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.....	113
Şekil 4.15. <i>Jishengella</i> sp. NA12 suşunun 16S rRNA gen dizisine göre en yakın tip türleriyle filogenetik ilişkilerini gösteren Maximum Likelihood ağacı.....	115
Şekil 4.16. <i>Promicromonospora</i> sp. ED37 suşunun 16S rRNA gen dizisine göre cinsin diğer türleriyle olan filogenetik ilişkisini gösteren Maximum Likelihood ağacı.....	116
Şekil 4.17. <i>Glycomyces</i> sp. EC33 suşunun 16S rRNA gen dizisine göre cinsin diğer türleriyle olan filogenetik ilişkisini gösteren Maximum Likelihood ağacı.....	117

ŞEKİLLER LİSTESİ (Devam)

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.18. <i>Nonomuraea</i> sp. ATR24 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.	123
Şekil 4.19. <i>Nonomuraea</i> sp. MTC26 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.	124
Şekil 4.20. <i>Nonomuraea</i> sp. MTCD27 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.	124
Şekil 4.21. <i>Nonomuraea</i> sp. MTSC22 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.	125
Şekil 4.22. <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.	125
Şekil 4.23. <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12, <i>Jishengella</i> sp. NA12, <i>Saccharomonospora</i> sp. NB11, <i>Nocardia</i> sp. GTS18 ve <i>Nonomuraea</i> spp. ATR24, MTSC22, ATC11, GTA35 suşlarının DAP izomerlerini gösteren ince tabaka kromatogramı.	126
Şekil 4.24. <i>Streptomyces</i> spp. NTH33, NRH12, ATSP14, <i>Actinomadura</i> spp. 21ATH, SPNT21, NTSP31 ve <i>Jiangella</i> sp. GTF31 suşlarının DAP izomerlerini gösteren ince tabaka kromatogramı.	127
Şekil 4.25. <i>Nonomuraea</i> spp. MTC26, MTCD27, ATC11, GTA35 suşlarının şeker profilleri.	128
Şekil 4.26. <i>Nocardia</i> sp. GTS18, <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12, <i>Nonomuraea</i> spp. MTSC22 suşlarının şeker profilleri.	129
Şekil 4.27. <i>Streptomyces</i> spp. NTH33, NRH12, ATSP14 ve <i>Jiangella</i> sp. GTF31 suşlarının şeker profilleri.	129
Şekil 4.28. <i>Actinomadura</i> spp. NTSP31, SPNT21, 21ATH ve <i>Nonomuraea</i> sp. ATR24 suşlarının şeker profilleri.	130
Şekil 4.29. <i>Saccharomonospora</i> sp. NB11 ve <i>Jishengella</i> sp. NA12 suşlarının şeker profilleri.	131
Şekil 4.30. <i>Actinomadura</i> sp. 21ATH suşunun polar lipit profili.	132
Şekil 4.31. <i>Actinomadura</i> sp. NTSP31 suşunun polar lipit profili.	133
Şekil 4.32. <i>Actinomadura</i> sp. SPNT21 suşunun polar lipit profili.	134
Şekil 4.33. <i>Jiangella</i> sp. GTF31 suşunun polar lipit profili.	135
Şekil 4.34. <i>Jishengella</i> sp. NA12 suşunun polar lipit profili.	136
Şekil 4.35. <i>Nocardia</i> sp. GTS18 suşunun polar lipit profili.	137
Şekil 4.36. <i>Nonomuraea</i> sp. ATC11 suşunun polar lipit profili.	138
Şekil 4.37. <i>Nonomuraea</i> sp. ATR24 suşunun polar lipit profili.	139
Şekil 4.38. <i>Nonomuraea</i> sp. GTA35 suşunun polar lipit profili.	140
Şekil 4.39. <i>Nonomuraea</i> sp. MTC26 suşunun polar lipit profili.	141
Şekil 4.40. <i>Nonomuraea</i> sp. MTCD27 suşunun polar lipit profili.	142
Şekil 4.41. <i>Nonomuraea</i> sp. MTSC22 suşunun polar lipit profili.	143
Şekil 4.42. <i>Saccharomonospora</i> sp. NB11 suşunun polar lipit profili.	144
Şekil 4.43. <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12 suşunun polar lipit profili.	144
Şekil 4.44. <i>Saccharomonospora</i> sp. NB11 suşunun menakinon profili.	148

ŞEKİLLER LİSTESİ (Devam)

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.45. <i>Jiangella</i> sp. GTF31 suşunun menakinon profili.....	148
Şekil 4.46. <i>Nonomuraea</i> sp. ATR24 suşunun menakinon kromatogramı.	149
Şekil 4.47. <i>Nonomuraea</i> sp. MTSC22 suşunun menakinon kromatogramı.	149
Şekil 4.48. <i>Nonomuraea</i> sp. MTCD27 suşunun menakinon kromatogramı.....	150
Şekil 4.49. <i>Nonomuraea</i> sp. ATC11 suşunun menakinon kromatogramı.	150
Şekil 4.50. <i>Nonomuraea</i> sp. GTA35 suşunun menakinon kromatogramı.	151
Şekil 4.51. <i>Nonomuraea</i> sp. MTC26 suşunun menakinon profili.	151
Şekil 4.52. <i>Actinomadura</i> sp. NTSP31 suşunun menakinon kromatogramı.....	152
Şekil 4.53. <i>Actinomadura</i> sp. 21ATH suşunun menakinon kromatogramı.	152
Şekil 4.54. <i>Actinomadura</i> sp. SPNT21 suşunun menakinon kromatogramı.....	153
Şekil 4.55. <i>Nocardia</i> sp. GTS18 suşunun menakinon profili.	153
Şekil 4.56. Krater göllerinden izole edilen aktinobakterilerin cinslere göre dağılımı.....	158



KISALTMALAR

bp	: Baz çifti (base pair)
DAP	: Diaminopimelik asit
DSMZ	: Alman Mikroorganizma ve Hücre Kùltürleri Koleksiyonu
DPG	: Difosfatidilgliserol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FAME	: Yağ asidi metil esteri (Fatty Acid Methyl Ester)
ISP	: Uluslararası <i>Streptomyces</i> Projesi
KCTC	: Kore Tip Kùltürleri Koleksiyonu
µl	: Mikrolitre
MK	: Menakinon
M	: Molar
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
nt	: Nùkleotid
v/v	: Hacim/hacim (volume/volume)
w/v	: Ağırlık/hacim (weight/volume)
rRNA	: Ribozomal RNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	: Fofsatidiletanolamin
PI	: Fosfatidilinozitol
PG	: Fosfatidilgliserol
PGL	: Fosfoglikolipit
PIM	: Fosfatidilinozitol mannozit
OH-PE	: Hidroksi-fosfatidiletanolamin
PME	: Fosfometiletanolamin



FARKLI KRATER GÖLLERİ SEDİMENT VE KIYI TOPRAKLARINDAN AKTİNOMİSETLERİN İZOLASYONU VE POLİFAZİK TAKSONOMİSİ

ÖZET

Mikrobiyal topluluklar ve bu topluluklardaki türlerin spesifik habitatlardaki dağılışı büyük ölçüde çevresel koşullarla belirlenmektedir. Antibiyotik üreten aktinobakteriler toprakta bol bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve aktinobakteriler içerisindeki yeni bakteriyel taksonların karakterizasyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır.

Bu tez çalışmasında, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden yeni aktinobakteri suşları izole edilerek, polifazik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Aktinobakteriler için seçici olan besi ortamları kullanılarak 469 izolat elde edilmiş; bu izolatlardan 123'ü 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır. Dizi analizi yapılan suşların *Actinomadura*, *Glycomyces*, *Jiangella*, *Jishengella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* ve *Verrucosipora* cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Yeni tür olma potansiyeli yüksek olan *Actinomadura*, *Jiangella*, *Jishengella*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora*, *Saccharomonospora* ve *Streptomyces* suşları Almanya ve Güney Kore'deki mikroorganizma kültür koleksiyonlarında depozit edilmiştir. Bu suşların yeni türler olarak literatüre kazandırılması amacıyla filogenetik, fenotipik ve kemotaksonomik analizleri yapılmıştır.

Filogenetik ilişkileri gösteren ağaçlar Maximum Likelihood, Neighbour Joining ve Maximum Parsimony algoritmalarına göre MEGA6 programında oluşturulmuştur. Kemotaksonomik analizler için suşların polar lipit, menakinon, şeker, diaminopimelik asit ve yağ asidi profilleri belirlenmiştir.

Bu çalışma ile daha önce aktinobakteri çeşitliliği çalışılmamış olan Meke Gölü, Acıgöl, Gölcük Gölü, Nemrut Gölü ve Nevşehir – Acıgöl'den yeni aktinobakteri suşları izole edilmiştir. Polifazik yaklaşımla analizleri tamamlanan suşlar yeni türler olarak literatüre kazandırılacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Actinobacteria*; Polifazik Taksonomi; Meke Gölü; Acıgöl; Gölcük Gölü; Nemrut Gölü.



ISOLATION AND POLYPHASIC TAXONOMY OF ACTINOMYCETES FROM COASTAL SEDIMENT AND SOIL SAMPLES OF DIFFERENT CRATER LAKES

ABSTRACT

Microbial communities and distribution of the species within these communities are determined mainly by environmental conditions. Antibiotic producing actinobacteria are common in soil habitats. Recent studies have shown that there is a close relationship between developing new antibiotics and characterisation of novel actinobacterial taxa.

In this thesis, novel actinobacteria strains were isolated from coastal sediment and soil samples of crater lakes with different physicochemical features and characterized by polyphasic approach. A total of 469 actinobacteria strains were isolated using selective isolation media and 123 of which identified on genus level by 16S rRNA gene sequence analysis. Sequenced strains were found to belong to the genera *Actinomadura*, *Glycomyces*, *Jiangella*, *Jishengella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* and *Verrucosipora*. Putative novel strains were deposited in German and Korean culture collections. In order to publish these strains as novel species, phylogenetic, chemotaxonomic and phenotypic analyses were conducted.

Phylogenetic trees were constructed in MEGA6 programme with Maximum Likelihood, Neighbour Joining and Maximum Parsimony algorithms. Polar lipid, menaquinone, diaminopimelic acid, sugar and fatty acid profiles of novel strains were identified for chemotaxonomic characterisation.

In this study, novel actinobacterial strains from Meke Lake, Acigol, Golcuk Lake, Nemrut Lake and Nevsehir – Acigol, of which actinobacterial diversity have never been explored before, were isolated for the first time. The novel strains characterized by a polyphasic approach will be published as novel species.

Key Words: *Actinobacteria*; Polyphasic Taxonomy; Meke Lake; Acigol; Golcuk Lake; Nemrut Lake.



1. GİRİŞ

Sistematik, organizmaları tanımlamak ve belirli kurallar dâhilinde düzenlemek amacıyla yapılan bilimsel çalışma olarak tanımlanabilir. Organizmaların çeşitliliğinin ve birbirleri arasındaki etkileşimlerin çalışılması da sistematik olarak tanımlanabilmektedir. Cowan (1968) tarafından belirtildiği gibi sistematik, taksonomi, ekoloji, biyokimya, patoloji, genetik ve moleküler biyoloji bilimlerinden faydalanmaktadır (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Taksonomi ve sistematik sıklıkla sinonim olarak kullanılmaktadır; ancak taksonomiyi sistematığın bir parçası olarak ele almak daha uygundur (Tindall ve diğ., 2007). Taksonomi, temel prensipleri ve kurallarıyla birlikte teorik sınıflandırma çalışması olmasının yanı sıra, “biyolojik sınıflandırma sanatı” olarak da tanımlanmıştır (Stanier ve diğ., 1986). Taksonomi, klasik olarak üçe ayrılmaktadır:

1. Sınıflandırma (birimlerin kurallar dâhilinde taksonomik gruplar olarak düzenlenmesi)
2. İsimlendirme (sınıflandırma ile belirlenen birimlerin etiketlenmesi)
3. Tanımlama (sınıflandırma ile belirlenen ve isimlendirme ile etiketlenen bilinmeyen birimlerin tanımlanması)

Tanımlama, sınıflandırma ve isimlendirme temelinin pratik uygulamasıdır. Sınıflandırma ve tanımlama bazen birbiriyle karıştırılmakla birlikte, sınıflandırma daha ziyade tanımlama için bir önceliktir. Tanımlama, geçişli olarak (sınıflandırma ile belirlenen birimlerin tanımlanması) ya da geçişsiz olarak (bir türün kimliğini tanımlamak ve sınıflandırma için bir temel olarak kullanmak) ele alınabilir (Trüper ve Schleifer, 2006). Stanier ve diğ. (1986), taksonominin iki işlevi bulunduğunu belirtmişlerdir: temel taksonomik birimlerin veya türlerin tarif edilerek tanımlanması ve bu birimlerin düzenlenerek listelenmesi için yöntemler geliştirilmesi.

Taksonominin birincil amacı, çeşitli alanlarda kullanılabilen ve bütün mikrobiyolojik disiplinlere hizmet eden bir sınıflandırma sağlamak olmalıdır. Mikrobiyolojide sınıflandırılacak temel fiziksel obje, organizmadır. Organizma, hücre temel birim olmak üzere, genotipik olarak aynı hücrelerin oluşturduğu bir

popölasyonu temsil eden, saf, bakteriyel veya arkeal költür olarak belirtilmektedir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

İsimlendirme ve tanımlama süreçlerinde tip kavramı büyük öneme sahiptir. Taksonomik hiyerarşide bir takson, sınıf düzeyine kadar bir dizi element içerebilmektedir. Tür elementlerini suşlar, cins elementlerini türler oluşturmaktadır. Bir taksonun tipi, o taksonun isminin daima ilişkili olduğu elementtir. Örneğin, bir cins içerisindeki diğer bütün türler taşınsa bile, cinsin tip türü o cins içerisinde kalmalıdır. Böylece bir tip, isim taşıyıcısı olarak kabul edilmekte ve söz konusu isim için referans noktası olma özelliği taşımaktadır. Tür düzeyinin üzerindeki bir taksonun tipi, fiziksel bir varlığa sahip olmayıp sadece bir isimden ibarettir. Diğer taraftan, tür ve alttür düzeylerinde tip, fiziksel bir varlığa sahip olan belirli bir suş (tip suşu) ile temsil edilmektedir. Tip suşları, yeni tür tanımlayan taksonomistler tarafından tasarlanmaktadır. Tip suşları, geçerli olarak tanımlanmış türlerin yaşayan devamlı temsilcileri olup, bu suşların, iki farklı ülkedeki költür koleksiyon servislerinde depolanmaları gerekmektedir. Bu suşlar, bilinmeyen mikroorganizmaların tanımlanmasında referans noktaları olmaları nedeniyle, taksonomik çalışmalarda büyük öneme sahiptir (Goodfellow ve Fiedler, 2010).

Yeni ve ileri taksonomik yöntemlerin uygulanabilir olmasıyla, prokaryotik organizmaların sınıflandırılması sadece verilere bağımlı değil, aynı zamanda sürekli bir gelişim halindedir. Organizmaları sınıflandırmanın birçok yolu vardır ve bu konuda devam eden tartışmalar bulunmaktadır. Ancak, herhangi bir durumda ortaya çıkan bir sınıflandırma sistemi, soyut bir gösterim olarak kalmaktadır. Wayne ve diğ. (1987), ideal taksonominin hiyerarşik olması gereken bir sistemi içerdiğini ve mikrobiyolojide temel amacın, doğadaki düzen olarak, taksonomik ilişkileri yansıtan bir sistemin kuruluşu olması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu amaç doğrultusunda atılan önemli bir adım, prokaryotik taksonomik çalışmalarda köklü bir değişiklik yapan, küçük alt birim ribozomal RNA (16S rRNA) geninin analizidir. Bu sayede, moleküler bir belirteci temel alan hiyerarşik bir taksonomik sistemin kuruluşu mümkün olmuştur (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Prokaryotların sağlam bir şekilde sınıflandırılması, kararlı bir isimlendirme ve güvenilir tanımlama süreçleri için bir önceliktir (Goodfellow ve Fiedler 2010). Mikroorganizmalarla yapılan bilimsel çalışmalarda güvenilir bir sınıflandırma sistemi, bu organizmaların izlenebilirliği açısından önemlidir. Mevcut durumda

uygulanan sınıflandırma, az ya da çok veri-temelli analizlere bağlı, birleştirici bir teoriye dayanmayan operasyon-temelli bir yaklaşımdır (Kämpfer ve Glaeser 2013).

Prokaryotların sınıflandırılması konusu, 19. yüzyılın başlarından günümüze kadar yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle büyük değişiklikler göstermiştir. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında, Ferdinand Cohn farklı hücre biçimleri (küre, küçük veya uzun çubuk, spiral) gibi morfolojik özellikleri, o zamanlar bitkiler aleminin üyeleri olarak düşünülen bakterileri altı cins halinde sınıflandırmak amacıyla kullanmıştır. Cohn (1875), morfolojik benzerliklere dayanarak yaygın olarak bulunan bakterileri ve siyanobakterileri *Schizophyta* içerisinde gruplandırmıştır. İyi bilinen birçok patojenik bakterinin 19. yüzyıl sonlarında tanımlanmış olması, bu bakterilerin, birçok araştırmacının ilgi odağında olduğunu göstermektedir. Bakterilerin sınıflandırılmasında morfolojik özelliklerin yanı sıra patojenik potansiyelleri ve genel gelişim gereksinimleri de önemli taksonomik belirteçler olarak kullanılmıştır (Tindall ve diğ., 2007).

Yirminci yüzyılın ilk yarısında, morfoloji ile birçok biyokimyasal ve fizyolojik özellikler de bakterileri sınıflandırmak ve tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Daha sonraları enzimler ve metabolik yollar ortaya çıkarılmıştır (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Yirminci yüzyılın ikinci yarısında, nümerik çalışmalar kullanılarak bakterileri sınıflandırmak amacıyla kapsamlı fenotipik veriler kullanılmıştır. Nümerik taksonomi, kullanılan testlerin sayısını ve suşlarla türler arasındaki benzerlik katsayılarının hesaplanmasını geliştirerek, fenotipik tanımlamanın güvenilirliğini artırmıştır (Sneath ve Sokal, 1973). Nümerik taksonomide karşılaştırılan karakterler morfoloji, fizyoloji veya biyokimya gibi farklı özellik kategorilerinden gelmektedir. Ayrıca bu karakterlere analizlerde eşit olarak ağırlık verilmiştir. Kullanılan ortak karakterlerin sayısı, taksonomik ilişkinin kantitatif bir ölçümü olarak kabul edilmiş olmakla birlikte bu durum, karşılaştırılan organizmaların filogenetik olarak ilişkili olduğu anlamına gelmemektedir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Son 50 yılda, mikroorganizmaların tanımlanması için DNA-temelli analizlerin gelişiminde büyük ilerlemeler gerçekleştirilmiştir. Genotipik yöntemlere dayanan sınıflandırma, prokaryotlar arasındaki filogenetik ilişkilerin daha fazla araştırılabilmesini sağlamıştır. Toplam genomik DNA'daki guanin ve sitozin oranının hesaplanmasıyla başlayan DNA-temelli analizi, prokaryotik türlerin sınırlarının çizilmesinde hala “genotipik standart” olarak kabul edilen genomik

DNA-DNA hibridizasyon yönteminin kullanımı izlemiştir (Wayne ve diğ., 1987; Stackebrandt ve diğ., 2002; Stackebrandt ve Ebers, 2006; Tindall ve diğ., 2010). PCR-temelli dizileme teknolojisinin gelişimi ve 16S rRNA geninin taksonomide moleküler belirteç olarak kullanımı önemli bir adım olmuştur. Prokaryotik taksonomide diğer bazı genler (örn. RNA polimerazın β -altünitesini kodlayan *rpoB* geni, DNA girazı kodlayan *gyrA* geni, homolog DNA rekombinasyonundan ve DNA onarımından sorumlu *recA* geni, ısı-şok proteinini kodlayan *hsp60* geni, ATP sentazı kodlayan *atpD* geni) alternatif veya destekleyici moleküler belirteçler olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek verimli dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi, genoma dayalı daha fazla genotipik analizin yapılmasına imkân vermektedir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin gelişimi ve prokaryotlara uygulanması, tüm genomun ve suşlar arasındaki gen dizi benzerliklerinin ölçümüne imkân tanımıştır. DNA-DNA ve DNA-mRNA arasındaki tamamlayıcı etkileşimleri kullanan jel yapıları veya membran filtreler ve radyoaktif ölçümler, bazı türler arasındaki genetik benzerlikle ilgili nicel veriler sağlamıştır. DNA-DNA hibridizasyon tekniği 1970'lerden beri nükleotid dizilerini karşılaştırmak ve bakteri taksonlarının sınırlarını çizmek amacıyla kullanılmaktadır (Colwell, 1970; Johnson, 1973). Uluslararası Sistematik Bakteriyoloji Komitesi, standart tür sınırının kriteri olarak DNA-DNA hibridizasyon değerini $\geq 70\%$ olması gerektiğini önermiştir (Wayne ve diğ., 1987). 16S rRNA gen dizisine dayanan yöntemler, filogenetik analiz yoluyla mikroorganizmalar arasındaki ilişkilerin ortaya çıkarılmasında önemli bir araç olarak kullanılmaktadır (Collins ve diğ., 1990). 16S rRNA geni bütün prokaryotların genomunda bulunmaktadır. Ayrıca birincil yapısı, aynı cinsin organizmaları arasında oldukça korunmuştur. Ancak, 16S rRNA gen analizi, özellikle 98% 'in üzerinde 16S rRNA dizi benzerliği gösteren, genetik olarak yakın birçok türün ayırt edilmesinde yetersiz kalmaktadır (Almeida ve Araujo, 2013).

Stackebrandt ve Goebel (1994), bakteriyel taksonların sınırlandırılmasında 16S rRNA geninin öneminin artması ve bütün taksonlar için kullanılacak dizilerin çoğalmasıyla, yayınlanmış birçok DDH verisini, 16S rRNA gen dizi benzerliği ile ilişkilendirmeye çalışmışlar ve iki parametre arasındaki korelasyon eğrisinin doğrusal olmadığı sonucuna varmışlardır. Ayrıca, DNA-DNA hibridizasyon yönteminin oldukça yakın organizmalar arasındaki ilişkinin ölçümünde kullanılmaya devam etmesi gerektiğini ve 16S rRNA gen dizi benzerliği $97,5\%$ 'in altında olan iki

organizmanın DNA hibridizasyon değerinin %60-70 oranının üzerinde çıkmadığını bildirmişlerdir. Genel olarak, 16S rRNA gen dizi analizlerinin, türlerin sınırlandırılmasında ve tür içi ilişkilerin ölçümünde DNA-DNA hibridizasyon yönteminin yerini alması uygun bulunmamaktadır. Ayrıca, 16S rRNA gen dizisinin korunmuş yapısı nedeniyle cins düzeyinin altındaki filogenetik ilişkileri çözebilme gücü önemli bir kritik noktadır. Bu durum, filogenetik ağaçların uçlara doğru olan dallanma kalıplarının (bazen cins, ancak genellikle tür düzeyinde), ağaç oluştururken kullanılan algoritmadan bağımsız olarak, ortak atasal köken bakımından güvenilir bir filogeniyi yansıtmayabileceği anlamına gelmektedir. Oldukça benzer, hatta tamamen aynı 16S rRNA gen dizisine sahip organizmaların bütün-genom düzeyindeki benzerlik oranı, 16S rRNA gen dizi benzerliği daha düşük olan organizmaların genom benzerlik düzeyinden daha düşük olabilmektedir (Stackebrandt ve Goebel, 1994).

Yeni dizileme teknolojilerinin geliştirilmesiyle gen ve genom dizilerinin nispeten kısa zamanda üretilebilmesi, bu dizilerin ayrıntılı olarak analiz edilmesini kolaylaştırmaktadır. Böylece birçok verinin, taksonomik sistemin eleştirel bir yaklaşımla değerlendirilmesinde kullanılacağı öngörülebilmektedir. Bütün-genom veya seçilen bazı genlerden elde edilen dizilerin birleştirilmesiyle oluşan diziler gibi, kısmi genom karşılaştırmalarına dayanan bazı yeni genomik yaklaşımlar, 16S rRNA gen dizisine dayanan hiyerarşik sistemin en az cins ve cins üstü düzeyde etkinliğini doğrulamıştır. Ayrıca diğer ribozomal RNA genleri (5S ve 23S rRNA) veya uzama faktörü Tu, ATP-sentazın β -alt ünitesi gibi diğer makromolekülleri kodlayan genler de 16S rRNA gen dizisine dayanan yaklaşımdan elde edilen filogenetik ilişkileri doğrulamıştır. Sonuç olarak, 16S rRNA gen dizisine dayandırılan hiyerarşik yapı, bir süre daha prokaryotik sistematığın en önemli parçası olmaya devam edecektir (Gürtler ve Mayall, 2001; Coenye ve Vandamme, 2003; Konstantinidis ve Tiedje, 2006; Ludwig ve diğ., 2009; Cole ve diğ., 2010; Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Farklı organizma gruplarındaki evrimsel oran farklılıkları, taksonların sınırlandırılmasında sadece gen dizisinin kullanılmasını engelleyerek zorluk oluşturabilmektedir. Bu nedenle, fenotipik ve genotipik karakterlerin birlikte kullanımına dayanan polifazik taksonomi, her düzeyden taksonun sınırlandırılmasında gereklidir. Birçok durumda, belirli bir kimyasal belirtecin taksonlar arasındaki dağılımı ile türlerin filogenetik ağaçlardaki nispi pozisyonları arasında bir uyum bulunmaktadır. Böylece kemotaksonomik belirteçler, yeni

taksonların ilişkili oldukları taksonlara atanmasında yardımcı olmalarının yanı sıra, yakın ilişkili grupların sınırlandırılmasında da kullanışlı olabilmektedir (Murray ve diğ., 1990; Tindall ve diğ., 2010). Çeşitli genotipik ve fenotipik özelliklere dayandırılan sınıflandırmalar fenetik olarak adlandırılmaktadır. Bu yaklaşım prokaryotların genetik ilişkilerinin (örn. DNA:DNA homoloji değerleri) yanı sıra ölçülebilir özelliklerini (örn. biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik) kapsamaktadır. Fenetik sınıflandırmalar, organizmalar arasındaki ilişkileri, evrimsel gelişim yollarına veya atasal kökenlerine değinmeksizin, mevcut durumlarına göre gösterir. Diğer taraftan, filogenetik sınıflandırmalar ise organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi vurgulayarak, zamanla meydana gelen değişimin boyutunu yansıtmaktadır. Aslında, filogenetik sınıflandırmaların genellikle fenetik olarak uyumlu olduğu görülmektedir. 16S rRNA gen dizilerine dayanan mevcut prokaryotik sınıflandırma yaklaşımlarının filogenetik olduğu iddia edilmekle birlikte, aslında bu sınıflandırma biçimi, karakter olarak homolog nükleotid dizi benzerliğinin fenetik ölçümüdür (Goodfellow ve Fiedler, 2010).

1.1 Tezin Amacı

Mikrobiyal topluluklar ve bu topluluklardaki türlerin spesifik habitatlardaki dağılışı büyük ölçüde çevresel koşullarla belirlenmektedir. Antibiyotik üreten aktinobakteriler toprakta bol bulunmaktadır. Aktinobakteriler, yüksek GC içeriğine sahip DNA ile karakterize edilen, gram-pozitif bir bakteri grubudur. Son yıllarda yapılan antibiyotik araştırmaları, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve özellikle aktinobakteriler içerisindeki yeni bakteriyel taksonların karakterizasyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır. Genel olarak bilinmeyen bir kimyasal yapıya sahip yeni sekonder metabolitlerin tespit edilme ihtimalinin, çalışılan yeni mikroorganizmanın bilinen türlerle olan filogenetik uzaklığıyla pozitif ve doğrudan bir ilişkiye sahip olduğu sonucu çıkarılabilir (Müller ve Wink, 2014).

Son yıllarda yeni bileşikler için normal habitatlardan aktinobakterilerin izolasyonu ve araştırılması, bilinen bileşiklerin yeniden keşfedilmesine yol açmıştır. Ancak, daha az çalışılmış olan farklı ortamlardan izole edilen çeşitli aktinobakteriler, ilaç keşfi için geliştirilebilecek önemli aktivitelere sahip yeni bileşiklerin ortaya çıkarılması ihtimalini artırmaktadır. Bu nedenle mevcut aktinobakteri izolasyon programları aşırı tuzlu denizel ortamlar, ekstrem tuzlu bölgeler, volkanik bölgeler,

aşırı kurak veya buzul alanlar gibi büyük ölçüde araştırılmamış, alışılmadık ve ekstrem habitatlara yönlendirilmiştir (Jose ve Jebakumar, 2014).

Mikrobiyal doğal ürünler, yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde kullanılacak kimyasalların keşfi için önemli bir hedeftir. Biyolojik olarak aktif bileşiklerin büyük bölümü mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Aktinobakteriler, terapötik kullanımı olan birçok bileşiği üretmelerinden dolayı dünya genelinde insan sağlığına önemli katkıda bulunmaktadır. Ancak, çeşitli bakteriyel patojenlerde gelişen antibiyotik dirençliliğinin ortaya çıkışı ve yeni hastalıkların ve patojenlerin sayısındaki artış, ilaç keşfi amacıyla biyolojik olarak aktif yeni bileşiklere yeniden ilgi duyulmasına neden olmuştur. Bu nedenle yeni antibiyotiklerin ve diğer terapötik ajanların kaynakları olarak keşfedilmemiş habitatlardan yeni mikroorganizma gruplarının takip edilmesi gerekmektedir (Bull ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasında, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden yeni aktinobakteri suşlarının izole edilerek, polifazik yöntemlerle karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Örneklem alanı olarak seçilen Meke Gölü ve Acıgöl, Orta Anadolu’da bulunan ekstrem habitat özelliklerine sahip krater gölleridir. Gölcük Gölü, Akdeniz Bölgesi’nde bulunan ve suyu içilebilir özellikte olan bir krater gölüdür. Doğu Anadolu Bölgesi’nde bulunan Nemrut Gölü ise dünyanın en büyük ikinci krater gölü olma özelliğine sahip, suyu içilebilir özellikte olan bir göldür. Ayrıca Kapadokya bölgesinde bulunan Nevşehir – Acıgöl’ün göl tabanından alınan toprak örneği de izolasyon çalışmasına dahil edilmiştir. Bu tez çalışması ile yeni aktinobakteri suşlarının izolasyonunun yanı sıra, Anadolu’nun farklı bölgelerinde bulunan krater göllerinin aktinobakteri çeşitliliğinin de ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Farklı fizikokimyasal özelliklere sahip bu habitatların, daha önce yapılan aktinobakteri izolasyon çalışmalarına dahil edilmemiş olması nedeniyle, terapötik kullanım potansiyeli yüksek metabolitlerin üreticileri olan yeni suşlar için büyük potansiyel taşıdığı düşünülmektedir.

1.2 Literatür araştırması

1.2.1 Polifazik taksonomi

Günümüzde prokaryot taksonomisi fenotipik, kemotaksonomik ve genotipik özelliklerin polifazik kombinasyonuna dayanmaktadır (Vandamme ve diğ., 1996;

Stackebrandt ve diğ., 2002; Tindall ve diğ., 2010). Prokaryot taksonomisinde kullanılan fenotipik yöntemler, mikroorganizmaların morfoloji, boyanma ve antijenik özellikleri, hücre duvarının ve hücre zarının kimyasal bileşimi, metabolik potansiyeli, protein bileşimi, hastalık oluşturma potansiyeli ve habitatı gibi temel fiziksel özelliklerini tanımlamayı amaçlayan yöntemleri kapsamaktadır (Sneath ve Sokal, 1973; Palleroni 2010; Welker ve Moore, 2011). Genotipik kriterler arasında DNA-DNA hibridizasyonu, DNA'nın G+C içeriği ve 16S rRNA gen dizi analizi bakteriyel taksonomide yaygın olarak kullanılmaktadır (Stackebrandt ve Ebers, 2006; Tindall ve diğ., 2010).

Farklı veri tiplerini entegre etmeyi amaçlayan polifazik taksonomi yaklaşımı, ilk olarak Colwell (1970) tarafından önerilmiştir. Bu yaklaşımla, herhangi bir izolatin bir dizi kriterine göre sınıflandırılması önerilmektedir (Colwell, 1970). Prensip olarak bütün genotipik, fenotipik ve filogenetik veriler polifazik taksonomide kullanılabilir. Genotipik veriler hücrede bulunan nükleik asitlerden elde edilmektedir. Fenotipik veriler ise proteinler, farklı kimyasal belirteçler ve ekspresyonu yapılan birçok farklı özellikten türetilmektedir. Taksonomik çalışmalarda farklı moleküllerin belirteçler olarak kullanımı yaygındır. Bazı yöntemler, hemen hemen bütün bakterilerin taksonomik analizinde uygulanmaktadır. Aminoasit dizileme gibi diğer bazı yöntemler ise zahmetli, zaman alıcı veya teknik olarak zor olması nedeniyle sınırlı sayıda taksona uygulanabilmektedir. Restriksiyon enzim kalıpları gibi tipleme yöntemleri, multilokus enzim elektroforezi ve serolojik analizler filogenetik çalışmalar için kullanışlı değildir. Diğer taraftan genel olarak rRNA veya protein dizileme, çok sayıda suşun analizi için yeterli değildir. Kısa süre içerisinde çok sayıda suşun karşılaştırılmasına ve gruplandırılmasına imkan tanıyan yağ asidi analizi gibi kemotaksonomik yöntemler ise daha hızlıdır (Vandamme ve diğ., 1996).

1.2.2 Genotipik karakterizasyon

Birçok durumda 16S rRNA gen dizisine dayanan ayrıntılı filogenetik analizler, bilinmeyen bir taksonun cinsinin tayin edilmesinde kullanılan en pratik yöntemdir. Bu analizleri, yeni suşun yakın ilişkili olduğu taksonlarla olan filogenetik ilişkisini tanımlamak amacıyla, 16S rRNA gen dizilerinin ikili benzerlik oranlarının hesaplanması ve filogenetik ağaçların oluşturulması izlemektedir. Genel olarak 16S rRNA gen dizi benzerliği sonuçları, izole edilen bir suşun yeni bir türü veya yeni bir cinsi temsil edip etmediğini belirlemede kullanılmaktadır. Böylece, bu analiz,

sonraki ayrıntılı taksonomik araştırmaların da yönünü tayin etmektedir. Gen dizi benzerlik oranının %97'nin altında olması, yeni suşun, yeni bir türü hatta yeni bir cinsi temsil edebileceğini göstermektedir. Gen dizi benzerliğinin %97'nin üzerinde çıkması durumunda da suşun yeni bir tür olarak veya mevcut türlerden biri olarak tayin edilebilmesi için daha sonraki genotipik yöntemler uygulanmalıdır. Mevcut tür kavramına göre, DNA-DNA hibridizasyon değeri %70'in üzerinde olan iki organizma aynı türü temsil etmektedir (Wayne ve diğ., 1987; Stackebrandt ve diğ., 2002). 16S rRNA gen dizi benzerliği %95'in altında olan bir suş, yeni bir cins olarak tanımlanmaktadır. Yeni taksonun, yakın ilişkili olduğu taksonlardan fenotipik ve kemotaksonomik karakteristikler açısından farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmak amacıyla, yeni takson en yakın tip türleriyle ayrıntılı olarak çalışılmalıdır. Yeni bir türün tanımlanması için fenotipik farklılıkların ortaya konması gerekmektedir. Eğer bu tür farklılıklar bulunmuyorsa, genotipik olarak farklılık gösteren benzer bakteri grupları diğeri terimlerle (örn. *genospecies/genomovar*) tanımlanmalıdır (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Tür düzeyinde 16S rRNA dizisinin ayırım gücüne yoğun bir ilgi gösterilirken, 16S rRNA gen dizi benzerliğinin farklı cinsleri ayırt etmede kullanılabilecek sınırı açık değildir. Bazı cinsler içerisinde yüksek 16S rRNA gen dizi benzerlikleri görülmektedir (örn. *Enterobacteriaceae* veya *Actinobacteria* içerisindeki cinsler). Diğeri taraftan, *Flavobacterium* gibi bazı cinsler de düşük dizi benzerlik oranına sahip türler içermektedir. Son zamanlarda, sınır değerlerinin değiştirilmesi için bazı öneriler yapılmıştır (Stackebrandt ve Ebers, 2006; Yarza ve diğ., 2008; Tindall ve diğ., 2010). Ancak, bir türün sınırlandırılması sadece 16S rRNA gen dizi benzerliğine dayandırılmamalı; diğeri yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar da ele alınmalıdır (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Prokaryotların tanımlanması ve sınıflandırılması için moleküler belirteç olarak 16S rRNA gen dizisine dayanan filogenetik analizin önemi nedeniyle, 16S rRNA gen dizi analizi mümkün olduğu kadar standardize edilmelidir. Dizi kalitesi, dizi hizalama ve ikili dizi benzerlikleri ile filogenetik ağaçların hesaplanması gibi bazı önemli aşamalar 16S rRNA gen dizilerinin analizinde göz önünde bulundurulmalıdır. Analiz için sadece genin tamamına yakın uzunluktaki (en az 1300 nükleotid) yüksek kaliteli diziler kullanılmalıdır (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Filogenetik ilişkilerin yorumlanmasında ilk aşama olan rRNA gen dizilerinin hizalanması kritik öneme sahiptir. Hizalama işleminden sonra atasal kökeni

yorumlayabilmek için çeşitli ağaç-oluşturma yöntemleri kullanılabilir. Genel olarak kullanılan ağaç-oluşturma yöntemleri iki grupta toplanabilir: mesafe verilerini kullanan kümelenme yöntemleri ve seçimlik kriterleri kullanan ayırık karakter yöntemleri. Mesafelerin hesaplanmasında en sık kullanılan yöntem Jukes ve Cantor (1969) tarafından önerilen tek-parametre yöntemidir. Bu yöntem, 16S rRNA dizilerinin bütün nükleotid pozisyonlarının birbirinden bağımsız olarak değiştiği varsayımına dayanır. Mesafe verilerinden ağaçların oluşturulması için genellikle neighbour-joining (Saitou ve Nei, 1987) ve ağırlıklı en küçük-kareler (Fitch ve Margoliash, 1967) algoritmaları kullanılmaktadır. Neighbour-joining yöntemi teorik olarak kümelenme yöntemleri ile ilişkilidir. Ancak, verilerin ölçülebilir olduğu ve bütün soyların eşit olarak farklılaştığı varsayımına dayanmaz. Kümelenme analizinden farklı olarak neighbour-joining yöntemi ağaç oluşumu sırasında, taksonlar veya takson kümeleri yerine nodları izler. En küçük-kareler yöntemi ise verilen ikili evrimsel mesafe tahminlerini bir ağaca uyarlar (Cavalli-Sforza ve Edwards, 1967).

Seçimlik kriterleri kullanan ayırık karakter yöntemlerinin en sık kullanılanları maximum-likelihood (Fitch, 1971) ve maximum-parsimony (Felsenstein, 1981) yöntemleridir. Maximum-likelihood yöntemi, gözlenen dizilerin en büyük olasılıkla elde edilebileceği ağacı oluşturur. Maximum-likelihood yöntemleri, evrimsel bir modelin gözlenen dizileri verebileceği net olasılığı değerlendirmek için kullanılmaktadır. Maximum-parsimony yöntemi ise mümkün olan bütün ağaç topolojileri içerisinde evrimsel süreç içerisinde gözlenen dizilerde en az nükleotid değişikliği gerektiren ağacı seçmek için kullanılır (Felsenstein, 1981).

Filogenetik bir ağaçta yerleşim gösteren alt-ağaçların sırasının istatistiksel anlamlılığı, önyükleme (bootstrapping) prosedürleri gibi tekrar örnekleme yöntemleriyle denenebilmektedir (Felsenstein, 1985). Bu yaklaşım, hizalanma pozisyonlarının sonuç ile rastgele tekrar örneklenmesine dayanmaktadır. Tekrar örnekleme yöntemi için en sık kullanılan prosedür olan önyüklemeye, bu işlem 100-1000 defa tekrarlanmaktadır.

16S rRNA geninin çözünürlük gücü genellikle cins düzeyinde ayırım yapmaya imkân vermektedir. Tür düzeyinde ayırım için DDH ve tek gen veya gen seti olarak diğer moleküler belirteçlerin analizi de uygulanmalıdır (Kämpfer ve Glaeser, 2013). Taksonomik çalışmaların birçoğunda, alt taksonomik düzeylerde daha yüksek çözünürlük elde etmek amacıyla 16S rRNA gen dizisine dayanan filogenetik

analizlerin yanı sıra alternatif genetik belirteçler de kullanılmaktadır. Organizmanın birincil metabolizması için gerekli proteinleri kodlayan genlerin kısmi dizilerinin analizine dayanan multilokus dizi analizi (MLSA), bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Son zamanlarda, multilokus dizi analizinin DNA-DNA hibridizasyon yönteminin yerini alabileceğinden bahsedilmektedir. Multilokus dizi analizi için seçilen genlerin yatay gen transferinden etkilenme ihtimali bulunması ve analiz için seçilecek genlerle ilgili bir konsensüs olmamasına rağmen, MLSA yakın olarak ilişkili türlerin ayırt edilmesinde, zahmetli ve zaman alıcı bir yöntem olan DNA-DNA hibridizasyon tekniğine göre önemli bir avantaja sahiptir. Multilokus dizi analizi, tür düzeyinde ayırt edici olmasının yanı sıra, veri tabanı oluşumuna ve paylaşımına olanak tanınması açısından da DNA-DNA hibridizasyon yöntemlerine göre daha avantajlıdır (Curtis ve Meyers, 2012). Ayrıca, genomik parmak izi gibi diğer genotipik yöntemler de suşların tür düzeyi gibi daha alt taksonomik kategorilere yerleştirilmesinde kullanılmaktadır (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Bakteriyel filogeni ve tanımlamada, organizmanın primer metabolizması için gerekli proteinleri kodlayan bazı genler (housekeeping genler) kullanılmaktadır. Bu genlerin optimum seçimi için bir konsensüs bulunmamakla birlikte, karşılaştırmalı genom dizi analizi, tanımlanmış özelliklere sahip aday genlerin seçiminde yardımcı olabilmektedir. Multilokus dizi analizi için uygun genlerin sahip olması gereken bazı özellikler olduğu bildirilmiştir: (i) genler ortolog dizileriyle birlikte 16S rRNA geni gibi bütün organizmalarda bulunmalıdır; (ii) genler yakın paralogları bulunmaksızın genomlar içerisinde tek kopya olarak bulunmalıdır; (iii) her bir gen yeterli veri içerecek uzunlukta (>900 baz) olmalıdır; (iv) genler yatay gen transferine veya rekombinasyona eğilimli olmamalıdır; (v) yakın olarak bağlantılı genlerden kaçınılmalıdır; (vi) genler uygun amplifikasyon ve dizileme primerlerinin tasarlanmasına imkan tanıyan, oldukça korunmuş, en az iki bölge içermelidir; (vii) diziler kabul edilebilir bir kesinlik ile bütün-genom ilişkisini tahmin etmelidir (Adekambi ve diğ., 2011).

Prokaryotik taksonomide korunmuş makromoleküllerin dizi karşılaştırmaları yaygın kullanılan bir uygulama olmasına rağmen bazı çalışmalar, muhtemel yatay gen transferi, değişken mutasyon oranları ve rekombinasyon oranları nedeniyle tek bir gene dayanan ağaçların filogenetik ilişkileri yeteri kadar yansıtmayabileceğini göstermiştir. Korunmuş ortolog proteinlerin birleştirilmiş hizalamalarına dayanan ağaçlar (süper-ağaçlar) son derece güçlüdür. Philippe ve Douady (2003)'e göre

sadece çekirdek-genler tarafından kodlanan proteinler (tespit edilebilir yatay gen transferine maruz kalmamış ve yaygın olarak yatay gen transferinden etkilenmemiş) süper-ağaç oluşturmak için kullanılmalıdır. Ayrıca bu genlerin seçiminde başka kriterler de göz önüne alınmalıdır: genomlar arasında evrensel dağılışı göstermeli, verilen bir genom için eşsiz olmalı, her bir gen dizisi yeterli veri içerecek uzunlukta ve uygun bir biçimde dizilemeye imkân verecek kısalıkta olmalıdır. 16S rRNA geni, *hsp65* (ısı-şok proteini kodlayan gen), *rpoB* ve *sod* (süperoksit dismutaz) genlerini kapsayan dört gen fragmentinin sıralanması, *Mycobacterium* cinsinin üyeleri arasındaki filogeniyi yorumlayan bir süper-ağaç oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Bu genlerin birleştirilmesi, ağacın güvenilirliğini ve keskinliğini büyük ölçüde artırmıştır. Aslında *Mycobacterium fortuitum* ve *M. avium* gibi türler tek bir gene (örn. 16S rRNA geni) dayanan ağaçlar kullanıldığında zayıf bir şekilde ayrılırken bu taksonlar süper-ağaç yaklaşımı ile belirgin bir biçimde ayrılmışlardır (Devulder ve diğ., 2005). Aktinobakteriyel süper-ağaç örneklerinden biri de Ventura ve diğ. (2007) tarafından önerilmiştir. Yedi farklı korunmuş gen fragmentinin (stres proteinini kodlayan *clpC*, DNA helikazı kodlayan *dnaB*, DNA primazı kodlayan *dnaG*, şaperon kodlayan *dnaJ1*, fosforibozilpirofosfat amidotransferazı kodlayan *purF*, RNA polimerazın β -altünitesini kodlayan *rpoC*, fosfoketolaz geni *xfp*) sıralanması, *Bifidobacterium* cinsi içerisindeki filogeniyi yorumlamak amacıyla kullanılan güçlü ve oldukça ayırt edici bir süper-ağaç üretmiştir. Bu filogenetik araştırma, bir böceğin bağırsağından izole edilen *Bifidobacterium asteroides* ve *B. coryneforme* suşlarının *Bifidobacterium* cinsinin atasının en yakın akrabaları olduğunu ortaya çıkarmıştır (Ventura ve diğ., 2007).

DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon verilerinin prokaryotik sistematiğe kullanımı 1960'lı yıllarda başlamıştır (Brenner ve diğ., 1967; De Lay, 1968; Johnson ve Ordal 1968, McCarthy ve Bolton 1964). Daha sonra 16S rRNA gen dizi analizi ile DNA-RNA hibridizasyon verileri arasında güvenilir bir korelasyon elde edilmesiyle, 16S rRNA gen dizi analizi DNA-RNA hibridizasyon analizinin yerini almıştır. Günümüzde DNA-DNA hibridizasyon analizi 16S rRNA gen dizi benzerliği %97'den yüksek olan suşların aynı veya farklı türlere ait olduklarını doğrulamak için kullanılmaktadır (Kämpfer ve Glaeser, 2013). DNA-DNA hibridizasyon değerlerini belirlemek için bazı yöntemler geliştirilmiştir. DNA-DNA hibridizasyonu genel prensip olarak (i) yeni suşun ve tip suşlarının genomik DNA'sının 600-800 bp uzunluktaki kısa fragmentlere kesilmesi, (ii) her iki suşun DNA fragmentlerini içeren

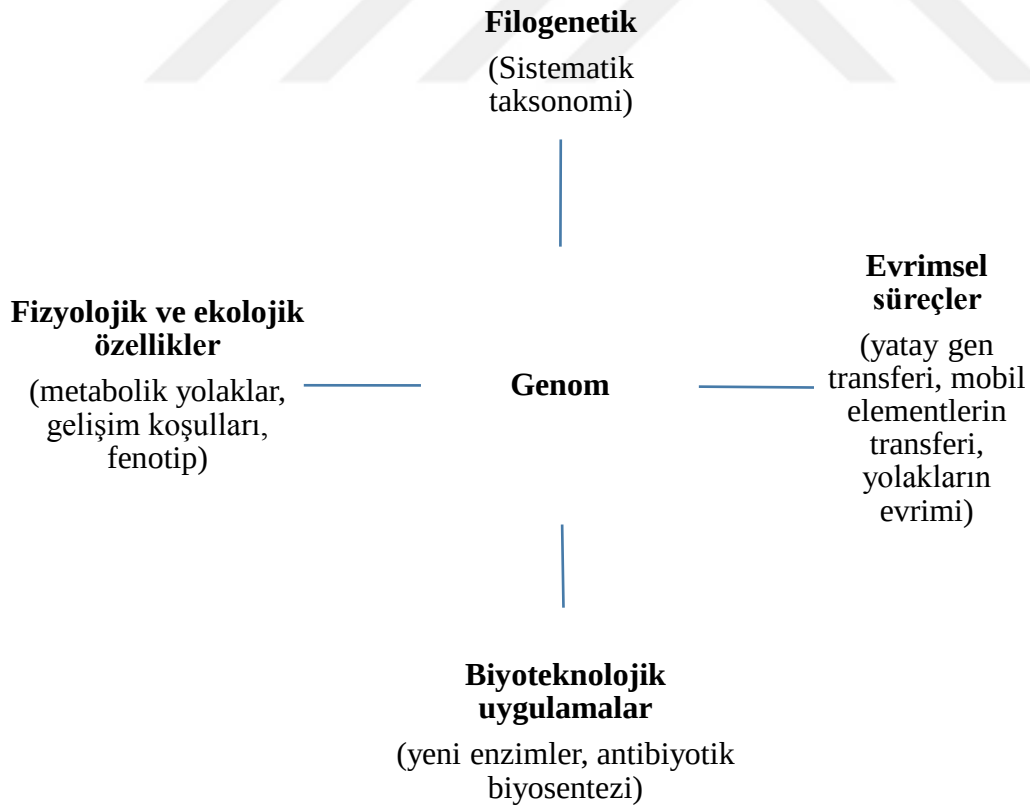
karişımın tek iplik DNA zincirleri elde etmek amacıyla ısıtılması, (iii) fragmentler tekrar birleşene kadar sıcaklığın düşürülmesi aşamalarına gerek duymaktadır. Çift zincirli DNA'nın erime sıcaklığının, her iki zincir arasında eşleşen baz çiftlerinin oranına bağlı olması nedeniyle, genomik benzerlik, erime sıcaklığı verisi ile yorumlanabilir. DDH değerin $<70\%$ olması durumunda test edilen suşun referans olarak kullanılan tip suşlarından farklı bir türe ait olduğu düşünülmektedir (Auch ve diğ., 2010).

Bütün DDH analizleri, teknik olarak zor olmasının yanı sıra fazla iş gücü ve zaman gerektiren prosedürlerden oluşmaktadır. Bu nedenle DDH analizleri, sadece çok az sayıda laboratuvar tarafından yapılabilmekte ve mikrobiyal taksonomistler DDH analizine sadece 16S rRNA dizi benzerliği çok yakın olan mikroorganizmaları ayırt etmek için başvurumaktadırlar. Uygulamada farklı DDH analiz yöntemleri aynı prensibe dayanmasına rağmen, sıklıkla farklı sonuçlar elde edilmesine yol açmaktadır. Bu nedenle, DDH analizinin, referans suşların her analizde tekrar tekrar kullanımına gereksinim duymayan daha güvenilir ve kesin bir yöntemle değiştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Genom dizilemenin, dizileme teknolojisindeki hızlı teknik ilerlemeler sayesinde mikrobiyal tanımlama için rutin bir analitik yöntem olabileceği düşünülmektedir (Auch ve diğ., 2010).

Tüm genom dizilerinin karşılaştırılmasına dayanan bazı *in silico* yöntemlerin DDH analizine alternatif olarak kullanılabileceği önerilmiştir. Goris ve diğ. (2007), genom dizileri arasında yüksek-skorlama segment çiftlerini (high-scoring segment pair – HSP) tanımlamak amacıyla, genom dizilerini DDH prosedürüne benzer şekilde 1000 bp uzunluktaki kısa parçalara ayırdıktan sonra BLAST işlemini uyguladılar. Daha sonra yüksek-skorlama segment çiftleri setleri kullanılarak “Ortalama Nükleotid Özdeşliği” (Average Nucleotide Identity – ANI) ve “Korunmuş DNA Yüzdesi” (Percentage Conserved DNA) değerleri hesaplandı. Verilerin regresyon analizleri, *in silico* genomik benzerlik değerlerinin, aynı suş çiftlerinin *in vitro* koşullarda elde edilen DDH verileri ile uyumlu olduğunu göstermiştir (Goris ve diğ., 2007). Auch ve diğ. (2010) de filogenetik ilişkileri yorumlamak için “genomdan genoma uzaklık” (genome-to-genome distance – GGD) değerlerini hesaplamada kullanılabilecek farklı algoritmaların yanı sıra, HSP analizinde kullanılan BLAST'a ek olarak çeşitli benzerlik arama yöntemlerini geliştirmişlerdir. Meier-Kolthoff ve diğ. (2013), tamamen veya kısmen dizilenmiş genom çiftleri arasında genomdan genoma uzaklık (GGD) değerlerini hesaplayan GBDP (Genome Blast Distance

Phylogeny) aracının, bütün taksonomik düzeylerde genom-temelli altın standartlara geçiş sürecinde güçlü bir araç olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca GBDP'nin *in silico* DDH değerlerinin belirlenmesinde ortalama nükleotid özdeşliği (ANI) yöntemine göre daha güvenilir sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Auch ve diğ., 2010).

Prokaryotik mikroorganizmaların genom dizileri oldukça önemli kullanım alanlarına sahiptir. İlk olarak, genom verisi organizmanın fizyolojik ve ekolojik özelliklerinin büyük ölçüde anlaşılmasını sağlamaktadır (Şekil 1.1). Önemli yollarla görev alan genlerin tanımlanmasıyla, belirli özellikleri söz konusu organizma ile ilişkilendirmek mümkün olmaktadır. Birbiriyle yakın ilişkili olan organizma gruplarının genom dizileri, bir grup içerisindeki evrimsel süreçlerin seyri konusunda da bilgi vermektedir. Ayrıca, genom dizileri biyoteknolojik önemi olan enzimlerin ve biyosentez yollarının tanımlanmasında da kullanılmaktadır. Tıbbi kullanım potansiyeline sahip antibiyotikler gibi yeni doğal ürünlerin biyosentez yollarını kodlayan genlerin ortaya çıkarılması için birçok yöntem geliştirilmiştir (Challis, 2008).



Şekil 1.1. Mikrobiyal süreçlerin analizinde genom dizilerinin rolü (Whitman, 2014).

Biyokütlenin biyoyakıta dönüştürülmesinde kullanılabilir olmaları nedeniyle, bitkisel dokuların yapısal polimerlerini basit şekerlere dönüştürebilen selülaazlar gibi enzimlerin ortaya çıkarılmasında genom dizilerinin analizi önemlidir. Prokaryotik çeşitliliğin boyutları göz önüne alındığında, laboratuvarı tasarlanan enzimlerden daha fazlasını, genomik dizilerin biyoinformatik analizi ve genetik mühendisliği teknikleriyle ticarileştirmenin mümkün olduğu kabul edilmektedir. Son olarak genom dizisi, prokaryotik filogeninin büyük ölçüde kavranmasını sağlamakta ve prokaryotik sistematik anlaşılmamasını kolaylaştırmaktadır. Filogenetik analizlerde kullanılacak genom dizilerinin sayısının artmasıyla, daha güvenilir filogenetik ağaçların elde edilmesi ve herhangi bir organizmanın soy ağacı ile ilgili daha fazla verinin analizi mümkün olmaktadır. Yatay gen transferi gibi evrimsel süreçler de filogenetik grupların tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında kullanılabilir. Genom dayalı sistematik uygulamalar, belirli gruplar için daha fazla genom dizisinin kullanılabilir hale gelmesiyle prokaryotların sınıflandırılmasında köklü değişikliklere neden olacaktır (Klenk ve Göker, 2010). Bu sayede, tür sınırlarının belirlenmesi için laboratuvar koşullarında yapılan ve hata oranı yüksek DNA-DNA hibridizasyon analizleri yerine Ortalama Nükleotid Özdeşliği (ANI) veya Genomdan-Genom-Uzaklık değerlerinin kullanımı yaygınlaşacaktır. Ayrıca genom dizileri, güvenilir ve tekrar kullanılabilir bir veri tabanı oluşumuna olanak tanımasının yanı sıra, yüksek taksonlar için daha güvenilir bir gruplandırma yapılmasına imkân vermektedir. Yakın ilişkili taksonların tüm genom dizileri, tanımlama sürecini büyük ölçüde kolaylaştıran araçlar sağlamaktadır (Whitman 2014).

1.2.3 Fenotipik karakterizasyon

Morfolojik ve fizyolojik özellikleri kapsayan fenotipik karakterizasyon, prokaryotik sistematikte kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Ancak bu yöntemler, herhangi bir suşun ilk tanımında hala önem taşımaktadır. Fenotipik özellikler, organizmadaki genlerin ifadesinin sonucu olarak gözlemlenebilir karakterlerdir (Moore ve diğ., 2010). Ancak bu özellikler, çevresel veya diğer koşullardan (sıcaklık, pH vb. gelişim koşulları) büyük oranda etkilenebilmektedir. Fenotipik analiz için karşılaştırılacak organizmaların aynı koşullarda geliştirilmesi ve hücrelerin/kültürlerin aynı gelişim aşamasındayken karşılaştırılması oldukça önemlidir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Katı besli ortamlarında geliştirilen suşlar biçim, boyut, renk ve yapı bakımından farklı koloni özellikleri gösterir. Sıcaklık, pH, atmosfer ve gelişim ortamına bağlı olarak her bir suş büyük oranda morfolojik değişim gösterebildiği için, koloni morfolojisi standardize edilmiş besli ortamı ve gelişim koşullarında gözlenmelidir. Hücre biçimi ve hücre boyutu, *Bacteria* ve *Archaea* türleri arasında büyük oranda değişmektedir. En yaygın hücre morfolojileri çubuk ve koklardır. Çubuklar aynı boyutta ve yuvarlak uçlu veya karakteristik uçlara sahip olabilir. Koklar da genellikle düzenli küre biçimli olmasına rağmen farklı biçimlere sahip koklar da bulunmaktadır. Spiraller, spiroketler ve vibriyolar da diğer morfolojik biçimler arasında sayılabilir. Ayrıca hücreler saplı, kınlı, bölünmüş veya tomurcuklanmış özellikte de olabilir. Hücre biçimi, önemli bir taksonomik özellik olmasının yanı sıra, tıbbi mikrobiyolojide patojenik mikroorganizmaların tanımlanmasında da önemli bir işleve sahiptir. Ayrıca hücrelerin dallanmış hif, miselyum veya sporangium oluşturması gibi özellikler aktinobakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan önemli karakterlerdir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Hücreleri boyanma özelliklerine göre ayırt etmede kullanılan en eski prosedürlerden biri Gram boyamadır (Gram, 1884). Mikroorganizmalar, hücre duvarlarının yapısal farklılıklarına bağlı olarak Gram-negatif veya Gram-pozitif olarak boyanmaktadır. Asit-fast boyama ise mikolik asit içeren bakterileri ayırt etmek için kullanılan bir boyama yöntemidir. Bu boyama yöntemi özellikle *Mycobacterium* cinsi için kullanılmaktadır (Beveridge ve diğ., 2007).

Bakteriler tarafından oluşturulan sporlar, endosporlar ve ekzosporlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Endospor oluşturan bakteriler, endosporun konumu ve vejetatif hücre boyutuna kıyasla endospor boyutu açısından incelenmelidir. Endosporlar genellikle kısıtlı besin koşullarında oluşturulmakta; tanımlama ve sınıflandırma için önemli bir kriter özelliği taşımaktadır. Ekzosporlar da biçim ve spor kesesi oluşumu gibi diğer özellikleri göz önüne alınarak tanımlanmalıdır. Ekzosporların biçimi ve rengi özellikle aktinobakterilerin tanımlanmasında önemlidir. Sporlar haricinde polihidroksibütirat granülleri, gaz vakuolleri, fosfor ve kükürt granülleri gibi hücre içi yapılar, hücresel inklüzyonlar olarak adlandırılmaktadır. Bakteriler arasında farklı hücresel inklüzyonlar yaygın olarak bulunmaktadır. Polifosfat granülleri çeşitli bakterilerde bulunabilmektedir. Ancak bu granüller aynı zamanda *Corynebacterium diphtheriae* gibi klinik öneme sahip

bakterilerin tanımlanmasında önemli bir işleve sahiptir (Beveridge ve diğ., 2007; Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Yeni bir suşun fizyolojik özelliklerinin ilgili olduğu taksonlarla karşılaştırılması, enzim aktivitelerinin, belirli substratlarda gelişimlerinin ve metabolik aktivitelerinin tanımlanmasını kapsamaktadır (Tindall ve diğ., 2010). Yeni suşun fototrofik, kemoototrofik veya kemoheterotrofik olduğu tanımlanmalıdır. Ayrıca yeni taksonlar moleküler oksijene gereksinimleri ve moleküler oksijen varlığında gelişimleri açısından da karakterize edilmelidir. Oksidaz ve katalaz testleri, solunum enzimlerinin varlığını ve aktivitesini araştırmak için uygulanan önemli testlerdir. Oksidazlar, elektronları verici molekülden, moleküler oksijene taşırlar ve moleküler oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanan aerobik ve/veya mikroaerofilik mikroorganizmalarda bulunurlar. Katalazlar ise hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif zararı, bu molekülü su ve oksijene ayırarak engelleyen enzimlerdir. Katalaz varlığı, agar besi ortamında gelişen kültür üzerine birkaç damla hidrojen peroksit çözeltisi damlatılmasıyla kolaylıkla ölçülebilmektedir (Tindall ve diğ., 2007).

Yeni taksonlar karakterize edilirken gelişim için ihtiyaç duyulan optimum sıcaklık, pH ve tuzluluk oranları rutin olarak belirlenmektedir. Mikroorganizmaların optimum gelişim koşulları genellikle izole edildikleri habitatteki çevresel koşullara bağlıdır. Böylece farklı çevresel özelliklere sahip habitatlardan izole edilen, yakın olarak ilişkili taksonların optimum gelişim koşulları da farklılık gösterebilmektedir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

Karbon kaynağı kullanımı ve asimilasyon biçimi de yeni bir suşu, yakın taksonlarla karşılaştırmak amacıyla rutin olarak uygulanmaktadır. Nitrat indirgenmesi veya denitrifikasyon, gelişim için CO₂ veya hidrojene gereksinim veya bazı ototrofik bakteriler tarafından H₂'nin enerji ve elektron kaynağı olarak kullanımı, belirli taksonlar için test edilmesi gereken metabolik özelliklerdir. Karbon kaynağı kullanım özelliğinin yanı sıra farklı bileşiklerin (genellikle şekerlerin) oksidasyonunun ve fermantasyonunun araştırılması da yeni taksonların karakterizasyonu için zorunludur (Tindall ve diğ., 2007).

Nümerik taksonomi, fenotipik verilerin değerlendirilmesi için kullanılan köklü bir yöntemdir (Sneath, 1971; Sneath ve Sokal, 1973; Goodfellow ve diğ., 1979). Nümerik çalışmalarda kullanılan karakterler birbirinden bağımsız olmalı ve farklı kategorilerden (morfoloji, fizyoloji, biyokimya vs.) eşit oranda gelmelidir. Ayrıca

çalışmaya dâhil edilen karakterlerin sayısı 60'ın üzerinde olmalıdır. Nümerik çalışmaya dâhil edilen organizmaların ortak karakterlerinin sayısı, taksonomik ilişkinin kantitatif bir ölçümü olarak kabul edilmektedir. Benzerlikler, Sokal ve Michener'in (Skerman 1960) eşleşme katsayısı ile kantitatif olarak ifade edilmektedir.

1.2.4 Kemotaksonomik karakterizasyon

Kemotaksonomik karakterizasyon, prokaryotların çeşitli hücresel bileşiklerinin araştırılmasına dayanmaktadır. Kemotaksonomide kullanılan en önemli yapısal bileşikler yağ asitleri, polar lipidler ve solunum kinonlarıdır. Ayrıca dış zar pigmentleri, sitoplazmik poliaminler, peptidoglikan, teikoik asitler, mikolik asitler ve lipopolisakkaritler (LPS) de kemotaksonomide kullanılmaktadır (Daniels ve diğ., 2007).

Peptidoglikan hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarında bulunduğu için bütün prokaryotik hücrelerin ortak bileşenidir. Peptidoglikan içermeyen çok az sayıda halofilik bakteri vardır, örn. *Halobacterium halobium* ve *Micrococcus morrhuae*. Peptidoglikanın yapı ve bileşimi, Gram-negatif bakteriler arasında oldukça benzerdir. Ancak Gram-pozitif bakteriler arasında peptidoglikan büyük oranda çeşitlilik göstermektedir (Schleifer ve Kandler, 1972). Gram-pozitif bakterilerin sınıflandırılmasında hücre duvarı bileşiminin tanımlanması önemlidir (Vandamme ve diğ., 1996). Gram-negatif bakterilerin peptidoglikan tipi birbirine benzer ve taksonomik açıdan çok az veri sağlar. Buna karşılık Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı, cins veya türe özgü olabilen çeşitli peptidoglikan tipleri içermektedir (Vandamme ve diğ., 1996).

Bakterilerde yapısal lipidlerin analizi, sınıflandırma ve tanımlama için kullanılan yararlı fenotipik yaklaşımlardan biridir. Bakteri sitoplazmik zarının lipid tabakasını oluşturan yağ asitleri ve polar lipidler bu amaçla kullanılan moleküller arasındadır. Dikkatli bir şekilde analiz edildiğinde, oldukça iyi düzeyde ayırt edici değere sahip olan bu bileşiklerin tanımlanması nispeten kolaydır. Ancak bu bileşikler, önemli ölçüde kalitatif ve kantitatif varyasyon sergilemektedir. Bakteri polar lipidleri, hidrofilik bir bileşene kovalent olarak bağlı olduğu için amfipatik özellikler gösteren heterojen bir molekül grubudur. Bakteri membranlarında yaygın olarak bulunan polar lipidler gliserofosfolipitlerdir. Gliserofosfolipitler normal olarak fosfatidik asit türevleridir. Fosfata bağlı olan grup, bir amino alkol (örn. etanolamin),

aminoasit (örn. L-serin), polyol (örn. gliserol), polyol türevi (örn. difosfatidilgliserol veya fosfatidil-O-aminoasit gliserol) veya bir inozitol türevi olabilir. Gliserolün 1. ve 2. pozisyonundaki yağ asitleri oldukça heterojendir; ancak doymamış yağ asitleri genellikle 2. pozisyonunda bulunmaktadır. Birçok bakteri, nispeten düşük oranda farklı tipte fosfolipit içerirken, yağ asitlerinin heterojenitesi farklı moleküler tiplerin ortaya çıkmasını sağlar (Embley ve Wait, 1994).

Fosfatidilgliserol (PG) ve difosfatidilgliseroller (kardiyolipin) (DPG) bakteriler arasında oldukça yaygındır ve düşük taksonomik kullanıma sahiptir. Fosfatidiletanolamin daha sınırlı bulunmaktadır (birçok Gram-negatif tür, *Bacillus* spp. ve aktinobakteriler gibi Gram-pozitif türler). Mono- ve dimetilfosfatidil etanolamin, fosfatidilkolinler (PC) prokaryotlarda nispeten nadir görülmektedir. Fosfatidilkolinler *Legionellaceae* üyelerinin hücre zarlarının önemli bileşenlerinden biridir ve bazı aktinobakterilerde de bulunmaktadır. Fosfatidilinozitol (PI) de nadir olarak görülmektedir. Genellikle lizin, ornitin, arjinin veya alanin gibi bir aminoasit içeren fosfatidil-O-aminoasit gliseroller, bazı Gram-pozitif organizmalarda bulunmaktadır. Sfingolipitlere sık olmamakla birlikte, bazı *Bacteroides* ve *Porphyromonas* türlerinde rastlanmaktadır (Embley ve Wait, 1994).

Bakteriyel polar lipit gruplarından biri de glikolipitlerdir. Bunların en basiti mono- veya oligosakkaridin uzun-zincirli bir yağ asidi ile esterleştiği açilglukozlardır. *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* ve diğer aktinobakterilerde bulunan açillenmiş trehalozlar glikolipitlere örnektir. Gliserolün sn-3 pozisyonuna mono-, di- veya oligosakkaritlerin bağlı olduğu glikozil diaçil gliseroller, özellikle Gram-pozitif organizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Galaktoz, glukoz ve mannoz sık rastlanan monosakkaritlerdir (Embley ve Wait, 1994).

Fosfolipitler, temel olarak zarlarla ilişkilidir ve zar yapısı ve işleviyle ilgili olarak önemli rollere sahiptir. Fosfolipitler genellikle polar lipitler olarak ifade edilirler, çünkü organik çözücülerde çözünmekle birlikte, her bir molekülün bir ucu polar özellikte olmasını sağlayan hidrofilik gruplara sahiptir. Fosfolipitin diğer ucunda ise organik çözücülerde çözünebilen yağ asitleri (diaçil fosfolipitler), lipit aldehytleri (plazmalojenler) veya alkoller (dieter fosfolipitler) gibi lipit bileşenleri bulunur (Lechevalier ve Moss, 1977).

Fosfolipitlerin biyosentezinde bir ara bileşik olan fosfatidikasit (PA), yaygın olarak görülmekle birlikte düşük miktarlarda bulunmaktadır. Fosfatidiletanolamin

(PE) birçok bakteride yüksek konsantrasyonlarda bulunur; ancak özellikle Gram-negatiflerde ve aktinobakterilerde yaygındır. Bunun yanı sıra, fosfatidiletanolamin muhtemelen metabolik olarak en kararlı fosfolipittir, çünkü hücrelerde büyüme döngüsünün herhangi bir noktasında görülebilir. Fosfatidiletanolaminin N-metillenmiş türevleri olan fosfatidilmetiletanolamin (PME) ve fosfatidildimetiletanolamin (PDME) yaygın olarak bulunan bileşikler değildir; ancak nadiren Gram-negatif bakteriler veya aktinobakterilerde bulunabilmektedir. Fosfatidilmetiletanolamin ve fosfatidildimetiletanolamin gibi fosfatidilkolin de belirli Gram-negatif formlarda taksonomik olarak önemli olabilir; fosfatidilkolinin nadir olarak sadece Gram-pozitif bakteriler ve aktinobakterilerde bulunduğu bildirilmiştir. Fosfatidilserin (PS) ise sadece Gram-negatif bakterilerde görülmektedir. Birçok bakteride lipoamino asitler olarak da bilinen aminoasit fosfatidil gliseroller (AAPG) bulunmaktadır veya gelişimin düşük pH'ta gerçekleştirilmesiyle bunların üretimi önemli derecede artırılabilir (Çizelge 1.1) (Lechevalier ve Moss, 1977).

Çizelge 1.1. Bakterilerde yaygın olarak görülen polar lipitler

Polar lipit	Kısaltma	Bakterilerde oluşumu (%)		
		Gram(-)	Gram(+)	Aktinobakteriler
Fosfatidikasit	PA	0.1-10	0.1-10	0.1-10
Fosfatidilgliserol	PG	>50	>50	>50
Fosfatidil-3'-O-aminoasitgliserol (lipoaminoasit)	AAPG	0.1-10	0.1-10	0.1-10
Difosfatidilgliserol (kardiyolipin)	DPG	>50	>50	>50
Fosfatidiletanolamin	PE	>50	0.1-10	>50
Fosfatidil-N-metiletanolamin	PME	0.1-10	0	0.1-10
Fosfatidil-N-dimetiletanolamin	PDME	0.1-10	0	0.1-10
Fosfatidilkolin	PC	10-50	0.1-10	0.1-10
Fosfatidilserin	PS	0.1-10	0	0
Fosfatidilinozitol	PI	0.1-10	10-50	>50
Fosfatidilinozitolmannozitler (mono-, di-, tri-, tetra- ve penta-)	PIM	0	0	>50

Taksonomik çalışmalarda, polar lipitler genellikle bir veya iki-boyutlu ince-tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edilmektedir. Bu yaklaşım özellikle her bir cinsin karakteristik özellikler sergilediği, DNA'larında yüksek GC içeriğine sahip

Gram-pozitif taksonlar için yararlıdır. Ayırımı yapılan bileşikler, standartlarla karşılaştırılarak ve farklı fonksiyonel gruplar için spesifik olan sprey ajanlar kullanılarak tanımlanabilmektedir. Polar lipidlerin yüksek-performans sıvı kromatografi analizi taksonomik araştırmalar için potansiyele sahiptir. Polar lipidlerin analizi için en gelişmiş ve güçlü yöntem ise hızlı atom bombardıman-kütle spektrometrisidir (FAB-MS) (Embley ve Wait, 1994).

Polar lipidler, bakteri membranının önemli bileşenleridir ve bakterilerin sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Sfingofosfolipitler gibi diğer lipid tipleri sadece sınırlı sayıda taksonda görülür ve sadece bu taksonlar içerisinde taksonomik öneme sahiptir. Gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan lipopolisakkaritler jel elektroforeziyle analiz edilebilir. Yağ asitleri, lipidlerin ve lipopolisakkaritlerin önemli bileşenleridir ve taksonomik amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Yağ asitleri için 300'den fazla farklı kimyasal yapı tanımlanmıştır. Zincir uzunluğu, çift-bağ pozisyonu ve yer değiştiren gruplar gibi karakterlerdeki çeşitliliğin, bakteri taksonlarının karakterize edilmesinde oldukça kullanışlı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak, toplam hücresel yağ asitleri izole edilmektedir; ancak polar lipidler gibi belirli fraksiyonlar da analiz edilebilmektedir. Yüksek düzeyde standardize edilmiş kültür koşullarının kullanılması durumunda, hücresel yağ asidi metil ester içeriği kararlı bir parametredir (Vandamme ve diğ., 1996).

Bakterilerde yaygın olarak bulunan yağ asitleri 12-20 karbon atomuna ve nispeten basit bir yapıya sahiptir. Bakterilerde genellikle düz-zincirli doymuş, tekli-doymamış ve tekli-metil dallı yağ asitlerine rastlanmaktadır. Her bir bileşiğin bulunup bulunmayışı ve nispi miktarı, mikroorganizmanın biyosentetik kapasitesini ve geliştiği koşulları yansıtmaktadır. Karbon zincir uzunluğu, metil gruplarının yerleşimi (örn. *izo-* veya *anteizo-*) ve çift bağların konumu (örn. vaksenik veya oleik) taksonomik öneme sahiptir (Embley ve Wait, 1994).

Temel olarak bir bakteri türünün hücresel yağ asidi bileşenleri kültür koşullarından etkilenmemektedir. Ancak, hücresel yağ asitlerinin bileşimi inkübasyon süresi, sıcaklık, besi ortamı gibi kültür koşullarından etkilenmektedir. Bu nedenle analizi yapılacak olan bakteri suşlarının kültür koşulları bütün suşlar için standardize edilmelidir (Komagata ve Suzuki, 1987). Farklı bakteriler tamamen farklı yağ asitleri içerebilir. Bazı yağ asitleri sınırlı düzeyde yayılım gösterir ve belirli gruplar için tanımlayıcı olabilir. Hidroksi yağ asitleri Gram-negatif bakterilerdeki lipid A'nın önemli bileşenleridir. Ancak hidroksi yağ asitleri aynı zamanda

sflngolipitlerin yapısında da bulunur ve bazı Gram-pozitif bakterilerde (örn. aktinobakteriler) küçük bileşenler olarak bulunabilir. Birçok aktinobakteri türü, 10-metiloktadekanoik asit (tüberkülostearik asit) ve homologları gibi 10-metil dallı yağ asitleri içermektedir. Ayrıca *Campylobacter* ve *Lactobacillus* gibi bakteriler, siklopropan yağ asitleri içermektedir. Sikloheksil ve sikloheptil yağ asitleri, asidotermofilik basillerin karakteristik bileşenleridir (Embley ve Wait, 1994). Bakterilerde bulunan yağ asitleri genellikle gaz-sıvı kromatografi tekniğiyle analiz edilmektedir. Ayrıca nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, infrared spektroskopisi, kütle spektroskopisi ve ince-tabaka kromatografisi gibi diğer teknikler de yağ asitlerinin tanımlanmasında gaz-sıvı kromatografisine yardımcı olarak kullanılmaktadır (Kaneda, 1991).

Aktinobakterilerden *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* ve *Tsukamurella* cinslerinin üyeleri, basit uzun-zincirli yağ asitlerinin yanı sıra mikolik asitleri de içermektedirler. Mikolik asitler, yüksek moleküler ağırlıklı (20-90 karbon atomu), uzun-zincirli ve alkil grubu içeren 3-hidroksi yağ asitleridir. Mikolik asitlerin çoğu, arabinogalaktana esterleşir. Genellikle bir cins içerisindeki türler aynı tip yağ asitlerine sahiptir; ancak her bir bileşenin nispi miktarlarında önemli farklılıklar olabilir (Embley ve Wait, 1994). Mikolik asit üreten bakteriler için, 16S rRNA gen dizi analizine dayanan filogenetik ilişkiler ile mikolat yan zincir uzunluğuna göre yapılan gruplandırma arasında bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca karakterizasyonu yapılan bir suşun mikolik asit içermemesi de taksonomik olarak önemlidir. Mikolik asitlerin varlığı karbol fuksin ile boyama (asit-fast boyama) yaparak belirlenebilmektedir. Ayrıca mikolik asitlerin ayrıntılı olarak tanımlanabilmesi için ince-tabaka kromatografisi, HPLC, gaz kromatografisi veya kütle spektrometrisi yöntemlerinden de faydalanılabilir (Kämpfer ve Glaeser, 2013).

İzoprenoid kinonlar birçok prokaryotun sitoplazmik membranında bulunmaktadır. Farklı bakteriler, farklı kinon sınıflarına ait molekülleri (örn. menakinonlar, ubikinonlar) sentezledikleri gibi, multiprenil yan-zincirdeki izopren birimlerinin sayısı da taksonlar arasında çeşitlilik göstermektedir. Bu yapısal çeşitlilik, prokaryot sistematğinde önemli olabilmektedir (Alderson ve diğ., 1985; Collins, 1994).

İzoprenoid kinonların yan zincirlerinde görülen büyük varyasyonlar (uzunluk, doymuşluk ve hidrojenlenmedeki farklılıklar) bakterileri farklı taksonomik düzeylerde karakterize etmek için kullanılabilir (Vandamme ve diğ., 1996).

Yapısal farklılıklarına dayanarak iki büyük bakteriyel izoprenoid kinon grubu tanımlanabilir: benzokinonlar ve naftokinonlar. Naftokinonlar da kendi içerisinde iki tipe ayrılır: bakterilerde daha az sıklıkta görülen fillokinonlar ile bakterilerde yaygın olarak görülen menakinonlar (vitamin K). 2-metil-3-poliprenil-1,4-naftokinonlar olan menakinonlar, poliprenil yan zincirlerin uzunluğunda, hidrojenlenme derecesinde ve hidroksilasyonunda yapısal değişiklikler göstermektedir. 2,3-dimetoksi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzokinonlar olan ubikinonlar (koenzim Q) da yan zincirin uzunluğu ve doymuşluk düzeyi bakımından çeşitlilik göstermektedir (Collins ve diğ., 1977, Collins ve Goodfellow, 1979; Athalye ve diğ., 1984). Benzo-tiyopen-4,7-kinon yapısında, sülfür içeren üçüncü bir kinon grubu daha ayırt edilebilir. Ancak sadece belirli asidofilik termofilik arkelerde bulunan bu lipokinonlar oldukça sınırlı bir yayılışa sahiptir (Collins ve Jones, 1981; Collins, 1994).



2. ACTINOBACTERIA TAKSONOMİSİ

Actinobacteria üyelerinin çoğu yaşam döngülerinin önemli bir bölümünü yarı dormant sporlar olarak geçiren saprofitik, toprakta yaşayan organizmalardır. Ancak *Actinobacteria* şubesinin üyeleri çeşitli ekolojik ortamlara uyum sağlayarak, farklı fiziksel özelliklere sahip karasal habitatların yanı sıra, sucul ortamlarda ve havada da bulunmaktadır. Aktinobakteriler, mikrobiyal popülasyonun önemli bir bölümünü meydana getirdikleri toprak habitatlarında (özellikle alkali veya organik madde içeriği yüksek topraklar) daha fazla bulunmaktadır. *Actinobacteria* üyeleri toprak yüzeyinde ve yüzeyden 2 m derinliğe kadar bulunabilmektedir (Mayfield ve diğ., 1972; Goodfellow ve Williams, 1983).

Actinobacteria üyelerinin popülasyon yoğunluğu, bulundukları habitata ve mevcut iklim koşullarına bağlıdır. Genellikle 1 gr toprakta 10^6 - 10^9 aktinobakteri hücresi bulunmaktadır. Topraktan izole edilen *Actinobacteria* üyelerinin %95'ten fazlasını oluşturan *Streptomyces* cinsi, toprak popülasyonlarının en baskın cinsidir. Sıcaklık, pH ve su gibi diğer faktörler de *Actinobacteria*'nın gelişimini etkilemektedir. Diğer toprak bakterileri gibi *Actinobacteria* üyeleri de genel olarak optimum gelişim sıcaklığı 25°-30°C arasında olan mezofilik organizmalardır. Ancak, 50°-60°C arasında gelişebilen termofilik aktinobakteriler de vardır. Aktinobakterilerin topraktaki vejetatif gelişimi, özellikle sporlar su ile kaplı olduğunda, düşük nem oranı ile kolaylaşmaktadır. Su oranının düşük olduğu kuru topraklarda gelişim çok sınırlı olup durma noktasına gelebilmektedir. Birçok aktinobakteri, nötr pH değerine sahip topraklarda gelişmektedir. En iyi gelişim pH 6-9 arasında nötre yakın değerlerde görülmektedir. Ancak, *Streptomyces* cinsine ait bazı suşlar asidik topraklardan (pH 3.5) izole edilmiştir (Williams ve Vickers, 1988; Kim ve diğ., 2003).

Aktinobakteri cinsleri, morfolojik, fizyolojik ve metabolik özellikleri açısından büyük çeşitlilik sergilemektedir. *Actinobacteria* şubesinin sınırları, 16S rRNA gen ağaçlarındaki dallanma konumu esas alınarak çizilmektedir. Ancak, rRNA dizileri, yakın ilişkili türleri, hatta cinsleri ayırmakta yetersiz kalmaktadır. Örneğin, son

zamanlarda yapılan ayrıntılı genetik analizler, *Kitasatospora* taksonunun ayrı bir cins olarak ele alınması gerektiğini doğrulamasına rağmen, *Streptomycetaceae* familyası içerisindeki bu cinsin taksonomik durumu uzun yıllar tartışılmıştır. Benzer bir yakın ilişki *Micromonospora*, *Verrucosipora* ve *Salinispora* cinsleri arasında da bulunmaktadır. Bu nedenle yakın ilişkili cinsleri ayırt etmek için *rpoB* ve son zamanlarda *ssgB* (streptomiset sporulasyon geni) gibi başka genetik belirteçler de kullanılmaktadır. Ayrıca, kullanılabilir genom dizi verilerinin yoğun bir biçimde artışı, genom gelişiminin ayrıntılı olarak kavranmasını sağlamakta; cins ve familya düzeyindeki organizmalara özgü genlerin tanımlanmasını olanaklı hale getirmektedir (Barka ve diğ., 2016).

Actinobacteria şubesinin 16S rRNA ağaçlarına dayandırılan taksonomisi güncellenmiştir (Ludwig ve diğ., 2012). Bu güncellemeyle alt sınıf ve alt takım düzeyindeki taksonomik gruplar sınıf ve takım düzeylerine yükseltilerek alt sınıf ve alt takım düzeyleri kaldırılmıştır (Gao ve Gupta, 2012). Buna göre *Actinobacteria* şubesi altı sınıfa ayrılmıştır: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* ve *Thermoleophila*. *Actinobacteria* sınıfı daha önce önerilmiş olan *Actinomycetales* ve *Bifidobacteriales* ile 16 takım içermektedir. Mevcut durumda *Actinomycetales* takımı *Actinomycetaceae* familyasının üyeleriyle sınırlandırılmış olup daha önce bu takım içerisinde kabul edilmiş olan alt takımlar ise ayrı takımlar olarak düzenlenmiştir (Gao ve Gupta, 2012). Sonuç olarak, *Actinobacteria* şubesi içerisindeki 53 familyanın 43'ü *Actinobacteria* sınıfı içerisinde değerlendirilirken kalan 10 familya diğer beş sınıf içerisinde dağılmaktadır (Goodfellow, 2012).

2.1 Aktinobakterilerin Morfolojik Özellikleri

Miseller halinde gelişim, vejetatif çoğalmanın özel bir biçimi olarak kabul edilebilmektedir. Ancak, temel olarak miselli yaşam döngüsüne sahip *Actinobacteria* üyeleri genellikle eşeysiz sporlar oluşturarak çoğalmaktadır. *Actinobacteria* üyeleri, substrat veya hava miselyumunun varlığı, miselyum rengi, çözünebilir melanoid pigment üretimi, sporların yapısı ve görünümü gibi çeşitli morfolojik özellikler sergilemektedir (Barka ve diğ., 2016).

Actinobacteria üyeleri hem sıvı hem de katı kültür ortamlarında substrat miselyumu oluşturmaktadır. Ancak, katı kültür ortamlarında substrat misellerinin

büyük bölümü, temel amacı üretken sporlar oluşturmak olan hava misellerini meydana getirmek üzere farklılaşmaktadır. Substrat miselyumu, çimlenmekte olan bir spordan gelişmektedir. Substrat miselyumunun dallanması genellikle monopodialdir. Ancak *Thermoactinomyces* gibi bazı aktinobakterilerde çatallı dallanma görülmektedir. Ayrıca, *Micromonosporaceae* familyası üyeleri hava miselyumundan yoksun veya basit yapılı hava miselyumu bulunan geniş substrat miselyumu oluşturmaktadır (Flardh ve Buttner, 2009; van Dissel ve diğ., 2014).

Aktinobakteriler, küre (*Micrococcus*), çubuk-küre (*Arthrobacter*), parçalı hif (*Nocardia*) ve oldukça farklılaşmış dallı misel yapısı (*Streptomyces*, *Frankia*) gibi çeşitli morfolojik özellikler sergilemektedir. Rodokoklar, substrat miselyumu olarak uzamış filamentler oluşturmakta ve gerçek miselyum farklılaşması göstermemektedir. Ancak, diğer aktinobakterilerde olduğu gibi, filamentler duvarların yana doğru genişlemesiyle değil, uçtan büyümektedir. *Oerskovia* cinsi üyeleri, kamçılı ve hareketli elementlere ayrılan dallanmış substrat miselyumu oluşumuyla karakterize edilmektedir. Ayrıca, bazı istisnaları olmakla birlikte, *Mycobacterium* ve *Rhodococcus* üyeleri çoğunlukla hava hifleri oluşturmamaktadır (Barka ve diğ., 2016).

Actinobacteria taksonomisinde sporlar oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Sporlar, substrat ve/veya hava miselyumunda tek tek hücreler olarak veya farklı uzunluklarda zincirler olarak gelişebilmektedir. Diğer bazı durumlarda, sporlar özel veziküller (sporangium) içerisinde bulunmakta ve kamçı taşımaktadır (Cross ve Goodfellow, 1973).

Micromonospora, *Micropolyspora* ve *Thermoactinomyces* cinslerinde spor oluşumu doğrudan substrat miselleri üzerinde gerçekleşirken, *Streptomyces* üyelerinde sporlar hava misellerinden gelişmektedir. *Actinoplanes* ve *Actinosynnema* cinsleri hareketli sporlarla, *Thermoactinomyces* cinsi ise ısıya dirençli sporlarla karakterizedir. *Actinoplanes*, *Ampulariella*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Dactylosporangium* ve *Streptosporangium* gibi bazı cinsler sporangium morfolojisine göre sınıflandırılmaktadır. Spor morfolojisi, türlerin karakterizasyonunda da kullanılabilir: spor yüzeyi pürüzsüz, siğilli, dikensi, tüylü veya buruşuk olabilmektedir. Ayrıca her bir spor zincirindeki spor sayısı, cinsler arasında büyük farklılık göstermektedir. *Micromonospora*, *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* ve *Promicromonospora* cinsleri tek tek sporlar üretirken; *Microbispora* cinsi uzunlamasına çiftler halinde sporlar

üretmektedir. *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporicthya* ve bazı *Nocardia* türleri kısa spor zincirlerine sahiptir. Ancak, *Streptomyces*, *Nocardioides*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* ve diğer bazı *Nocardia* türleri 100 kadar spor içerebilen çok uzun spor zincirleri üretmektedir. Diğer taraftan, *Frankia* türleri spor kesesi olarak tanımlanabilen sporangiumları üretmektedir. *Streptomyces* türlerinin spor zincirleri, düz-kıvrımlı (rectus-flexibilis), açık halka (retinaculum-apertum), açık veya kapalı sarmallar (spira) veya halka biçiminde olmalarına göre sınıflandırılabilir (Dietz ve Mathews, 1971).

Melaninler, genellikle siyah veya kahverenginde, fenolik veya indolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşan farklı moleküler yapılara sahip polimerlerdir. Bakterilerden insanlara kadar çeşitli organizmalar melaninleri üretmektedir. Aktinobakterilerin suşu, kullanılan besi ortamına ve kültürün yaşına bağlı olarak kırmızı, sarı, turuncu, pembe, kahverengi, yeşilimsi kahverengi, mavi veya siyah renkte pigmentler üretebildiği uzun zamandır bilinmektedir. Kahverengi-siyah renkte metabolik polimerler, taksonomik çalışmalarda kullanımlarının yanı sıra, topraktaki humik maddelere benzerlikleri nedeniyle de önemlidir. Melaninler, organizmanın büyümesi ve gelişimi için gerekli değildir; ancak, hayatta kalma ve rekabet becerisinin artırılması açısından önemli bir rol oynamaktadır (Dastager ve diğ., 2006).

2.2 Aktinobakterilerin Kemotaksonomik Özellikleri

Kemotaksonomi, organizmaları hücre kimyalarının benzerliğine göre sınıflandırmak için kimyasal bileşenlerin dağılımının kullanılması olarak ifade edilebilir. Sistemik çalışmalarda en sık kullanılan kimyasal bileşenler; hücre duvarı aminoasitleri, lipitler, proteinler, menakinonlar, muramik asit tipleri, şekerler ve DNA baz bileşimidir. Kemotaksonomik sınıflandırma ve tanımlama, tüm-hücre kimyasal parmak izi tekniklerinden elde edilen veriler temelinde de gerçekleştirilebilmektedir. Aktinobakterilerin hücre duvar bileşenlerinin analizi, takımlar arasında farklılık göstermesi nedeniyle taksonomik açıdan önemlidir (Goodfellow ve Minnikin, 1985; Barka ve diğ., 2016).

Özellikle, hücre duvarındaki peptidoglikanın kimyasal yapısı, *Actinobacteria*'nın grupları arasında cins üzeri düzeyde ayırım yapmayı kolaylaştırması bakımından önemlidir. Peptidoglikanın yapısı ve bileşimi ile ilgili

ayırt edici birçok karakter tanımlanmıştır. Tetrapeptid yan zincirinin 3. pozisyonundaki aminoasidin tipi, peptidler arası köprüde glisin varlığı ve peptidoglikanın şeker bileşimi bu karakteristiklerdendir. Proteinlerin yapısına katılmayan kiral aminoasit 2,6-diaminopimelik asidin spesifik optik izomerlerinin varlığı da Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarının kemotaksonomik olarak önemli bir karakteristiğidir. *Actinobacteria* cinsleri, LL-DAP veya DL-(mezo)-DAP içermektedir (Goodfellow ve diğ., 1985).

Lechevalier ve Lechevalier (1970) DAP izomerizmi, diğer aminoasitlerin ve aminoşekerlerin var olup olmamalarına göre dokuz farklı aktinobakteriyel hücre duvar kemotipi tanımlamışlardır (Çizelge 2.1). Ancak, DAP analizi ve diğer kemotaksonomik yöntemler *Actinobacteria* taksonomisinde oldukça önemli olmakla birlikte, çeşitli gruplar aynı DAP profiline sahiptir. Örneğin, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Arachnia* ve *Nocardioides* aynı kemotipe (kemotip I) sahip olmalarına rağmen, farklı morfolojik özellikleri bile bu cinslerin farklı familyalara ait olduklarını göstermektedir. Bu nedenle, *Actinobacteria*'nın fenotipik çeşitliliği değerlendirilirken, DAP profillemesi diğer fenotipik ve genotipik kriterlerle birlikte kullanılmalıdır (Barka ve diğ, 2016).

Çizelge 2.1. Aktinobakterilerde hücre duvar bileşenlerinin farklı tipleri

Hücre duvarı tipi	Önemli duvar bileşenleri	Cinsler
I	LL-DAP, glisin, şeker yok	<i>Arachnia, Nocardioides, Pimelobacter, Streptomyces</i>
II	mezo-DAP, glisin, arabinoz, ksiloz	<i>Actinomyces, Actinoplanes, Ampulariella, Catellatosporia, Dactylosporangium, Glycomyces, Micromonospora, Pilimelia</i>
III	mezo-DAP, maduroz (3-O-metil-D-galaktoz)	<i>Actinocorallia, Actinomadura, Dermatophylus, Frankia, Geodermatophilus, Kitasatospora, Maduromyces, Microbispora, Microtetraspora, Nonomuraea, Planobispora, Planomonospora, Planotetraspora, bazı Frankia türleri, Spirillosporina, Streptosporangium, Thermoactinomyces, Thermomonospora</i>
IV	mezo-DAP, arabinoz, galaktoz	<i>Micropolyspora, Nocardioforms</i>
V	DAP yok, lizin ve ornitin	<i>Actinomyces</i>
VI	DAP yok, aspartik asit var ya da yok, galaktoz	<i>Arcanobacterium, Actinomyces, Microbacterium, Oerskovia, Promicromonospora</i>
VII	DAP yok, diaminobutirik asit, glisin, lizin var ya da yok	<i>Agromyces, Clavibacter</i>
VIII	DAP yok, ornitin	<i>Aureobacterium, Curtobacterium, Cellulomonas</i>
IX	mezo-DAP, çeşitli aminoasitler	-

Hücresel yağ asidi bileşimi de spesifik *Actinobacteria* cinslerinin tanımlanmasında kullanılan önemli taksonomik belirteçlerden biridir. Bakteriyel yağ asitlerinin uzunluğu, 2-90 karbon atomu ($C_2 - C_{90}$) arasında değişmekle birlikte, sadece 10-24 ($C_{10} - C_{24}$) karbon atomu uzunluğunda olan yağ asitleri taksonomik açıdan önemlidir. *Actinobacteria* için üç önemli yağ asidi profili tanımlanmıştır (Lechevalier, 1980).

Bakterilerde bazı izoprenoid kinonlar tanımlanmıştır. Aktinobakteri hücre duvarlarında en fazla rastlanılan menakinonlardır. Menakinon analizi, *Actinomadura*, *Microtetraspora* ve *Streptomyces* suşlarının tanımlanmasında önemli veriler sağlamaktadır. Ayrıca, halkasal menakinonlar *Nocardia* cinsi üyeleri için

karakteristiktir. *Pyrobaculum organotrophum*'da tamamen doymuş halkasal menakinonlar bulunmaktadır (Kroppenstedt, 1985; Collins, 1994).

Aktinobakterilerin hücre zarında kesintili olarak dağılan farklı fosfolipit tipleri, cinslerin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında kullanışlı veriler sunmaktadır. *Actinobacteria*, bütün-hücre özütlerinde bulunan büyük fosfolipit belirteçlerinin yarı-kantitatif analizine göre beş farklı fosfolipit grubuna ayrılmıştır. Bu sınıflandırma sistemi *Aeromicrobium* ve *Dietzia* cinslerinin tanımlanmasında kullanılmıştır. Ayrıca, *Actinobacteria* içerisindeki aynı cinsin üyelerinin aynı fosfolipit tipine sahip olduğu bilinmektedir (Lechevalier ve diğ., 1977).

Son olarak şeker bileşimi de kemotaksonomik açıdan önemlidir. Aktinobakteri hücre duvarlarının önemli bir bileşeni olan nötral şekerler, cins üstü düzeyde oldukça önemli taksonomik belirteçlerdir. Kesintili olarak dağılım gösteren önemli tanımlayıcı şekerler temel alınarak, aktinobakteriler beş farklı gruba ayrılmıştır. Grup A, hücre duvarında arabinoz ve galaktoz; Grup B, maduroz (3-O-metil-D-galaktoz); Grup C, tanımlayıcı şeker içermeyen; Grup D, arabinoz ve ksiloz; Grup E, galaktoz ve ramnoz içeren türlerden oluşmaktadır. Ayrıca, *Catellatospora*'da 3'-O-metil-ramnoz bulunması ve *Agromyces*'te tyveloz varlığı, bazı taksonların sınıflandırılmasında değerli veriler sunmaktadır (Lechevalier ve Lechevalier, 1970; Maltsev ve diğ., 1992; Barka ve diğ., 2016).

2.3 Seçilen Aktinobakteri Cinslerinin Genel Özellikleri

2.3.1 *Actinomadura* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Streptosporangiales*

Aile: *Thermomonosporaceae*

Cins: *Actinomadura*

Actinomadura cinsi, *Actinocorallina*, *Spirillospora* ve *Thermomonospora* cinsleriyle birlikte *Thermomonosporaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. Bu cinslerin üyeleri 16S rRNA gen dizisine dayalı filogenetik ağaçlarda ayrı bir filetik yol

oluşturmakta ve morfolojik, fizyolojik ve kimyasal özelliklerin birlikte kullanılmasıyla birbirinden ayrılabilir (Trujillo, 2012).

Actinomadura cinsi mevcut durumda geçerli olarak tanımlanmış 79 tür ve iki alttür içermektedir (URL-1: <http://www.bacterio.net/actinomadura.html> - Mayıs 2016). Cins üyeleri karakteristik olarak parçalanmayan, büyük ölçüde dallanmış substrat miselyumu ve 1 – 50 artrospor taşıyan hava hifleri oluşturmaktadır. Spor zincirleri düz, çengelli (açık halkalar) veya düzensiz spiraller biçiminde olabilmekte; spor yüzeyleri ise katlanmış, düzensiz, pürüzsüz, dikensi veya yumru biçimindedir. Gelişim için sıcaklık aralığı 10° – 60°C'dir. *Actinomadura* türleri büyük oranda 9 izopren birimi taşıyan, II., III. ve VII. pozisyonlarda doymuş hekzahidrojenli menakinonlar ve hekzadekanoik, 14-metilpentadekanoik (izo-16:0) ve 10-metiloktadekanoik asit (tuberkulostearik asit) yağ asitlerini (yağ asidi tipi 3a, Kroppenstedt, 1985) içermektedir. Termofilik türler olan *A. rubrobrunea* ve *A. viridilutea*, mezofilik türlerden yağ asidi bileşimlerinin farklı olmasıyla ayrılabilir. Bu türler nispeten yüksek oranda izo-dallanmış yağ asitleri (yüksek erime sıcaklığı) ve düşük miktarda 10-metil-dallanmış yağ asitleri (düşük erime sıcaklığı) içermekte olup, bu farklılıkların bu suşların termofilik karakterlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer bir durum, bütün-hücre hidrolizatında galaktoz, glukoz, mannoz, riboz ve eser miktarda maduroz içeren bu suşların şeker bileşimlerinde de söz konusudur (Trujillo, 2012).

Actinomadura türleri, muhtemelen organik maddenin dönüşümünde rol oynadıkları toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. *Actinomadura latina*, *A. madurae* ve *A. pelletieri* türleri aktinomisetomaya neden olmaktadır. *Actinomadura latina* ve *A. pelletieri* türleri sadece klinik materyalden izole edilmesine rağmen *A. madurae* türü toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak *A. madurae*'nin topraktan izole edilen suşları klinik izolatlardan farklı olarak kırmızı endopigment taşımamakta ve daha hızlı sporlanmaktadır. Bir tripirol iskeleti ile karakterize olan kırmızı pigmentler, siklononilprodiginin, nonilprodiginin ve undesilprodiginin olarak tanımlanmıştır (Gerber 1971, 1973; Lechevalier ve diğ., 1971).

Actinomadura üyeleri, filamentli görünüm, derimsi koloniler ve kırmızı renkli prodiginin ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Besi ortamlarına aktidion ve siklohekzimid gibi antifungal antibiyotiklerin eklenmesiyle çevresel örneklerden *Actinomadura* üyeleri izole edilebilmektedir. Cins üyeleri genel olarak modifiye Bennett's agar (Jones 1949), glukoz-maya özütü (Athalye ve diğ., 1981) ve ISP besi

ortamlarında (Shirling ve Gottlieb, 1966) iyi gelişmektedir. Birçok suş, ISP3 besi ortamında ve 30°C sıcaklıkta yoğun olarak gelişirken *A. kijaniata* ve *A. macra* türleri en iyi maya-malt özütü (ISP2) besi ortamında iyi gelişmektedir. *Actinomadura spadix* türü iyi gelişim için B₁₂ vitaminine gereksinim duymaktadır (Nonomura ve Ohara, 1971).

Thermomonosporaceae familyasının üyeleri olan *Actinomadura*, *Actinocorallina*, *Spirillospora* ve *Thermomonospora* cinsleri, kimyasal ve morfolojik özelliklerin birlikte kullanılmasıyla diğer aktinobakterilerden ayırt edilebilmektedir. Birincil düzeyde tanımlayıcı veriler belirteç olarak kullanılan aminoasitlerin, yağ asitlerinin, menakinonların, şekerlerin ve polar lipidlerin ortaya çıkarılmasıyla elde edilebilmektedir (Kroppenstedt ve Goodfellow, 2006).

Tek-boyutlu ince-tabaka kromatografisi ile bir organizmanın diaminopimelik asit içerip içermediği; içerdiği diaminopimelik asidin LL- veya mezo- formunda olduğunu belirlemek için kullanılmaktadır. *Streptomyces* ve yakın cinsler LL-A₂pm içermektedir. Çeşitli oranlarda mezo-A₂pm, düz ve dallanmış yağ asidi zincirlerinin karışımı, farklı oranlarda hekzahidrojenli ve dokuz izopren birimi içeren menakinonlar, büyük miktarda DPG, PG ve PI (Tip I fosfolipit) bileşiklerinin ortaya çıkarılması, *Thermomonospora*, *Actinomadura* ve *Spirillospora* türlerini, özellikle *Actinoplanaceae*, *Nocardiaceae*, *Pseudonocardiaceae* ve *Streptosporangiaceae* familyası üyelerinden ayırt etmekte kullanılmaktadır (Kroppenstedt ve Goodfellow, 2006).

Actinomadura cinsi, kimyasal ve morfolojik özelliklerin dikkatli bir biçimde seçilmesiyle diğer sporlanan aktinobakterilerden ayırt edilebilmektedir (Meyer 1989; Kroppenstedt ve diğ., 1990). Yağ asidi bileşiminin kantitatif analizleri, *Actinomadura* cinsinin mezofilik üyelerinin *Microtetraspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix* ve *Thermomonospora* üyelerinden ayırt edilmesine imkan tanımaktadır (Kroppenstedt 1987). *Actinomadura* ve *Microtetraspora* üyeleri menakinon ve polar lipid profillerinde de farklılık göstermektedir (Kroppenstedt ve Goodfellow, 2006).

Actinomadura cinsinin genetiği ile ilgili olarak yapılan çalışmalar genel olarak 16S, 23S ve ITS bölgelerine dayalı filogenetik verilerle sınırlıdır (Wang ve diğ., 1996; Zhang ve diğ., 1998, 2001). *Actinomadura* tip türlerinin 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları %93.5 – 99.6 arasında değişmektedir. Bu durum, cinsin orta düzeyde heterojenliğe sahip olduğunu göstermektedir. Cins üyeleri,

Thermomonosporaceae familyası için karakteristik olan 16S rRNA sinyal moleküllerini içermektedir (Stackebrandt ve diğ., 1997). Fischer ve diğ. (1983), *Actinomadura* türleri arasında DNA-DNA hibridizasyon analizleri yaparak türler arasındaki homoloji değerlerinin %18-100 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. En yüksek homoloji değerleri *A. madurae* türünün suşları arasında (%96) ve *A. pelletieri* (%85-100) arasında görülmüştür. Ayrıca, *A. citrea*, *A. madurae*, *A. pelletieri* ve *A. verrucospora* türleri arasındaki homoloji değerinin %25-44 arasında olduğu bildirilmiştir (Trujillo, 2012).

Actinomadura cinsi içerisinde son zamanlarda tanımlanan türlerle yapılan DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, bu taksonun üyeleri arasında karmaşık genetik ilişkiler bulunduğunu göstermektedir. Örneğin, *A. kijaniata* ve *A. namibiensis* türlerinin tip suşları arasındaki DNA-DNA hibridizasyon değeri %72 olarak tespit edilmekle birlikte her iki tür, özellikle tanımlayıcı karbon kullanımı ve enzim profili temelinde, fenotipik verilerin kullanılmasıyla ayırt edilebilmektedir (Wink ve diğ., 2003). Lee ve Jeong (2006), *A. hallensis* türünün 453 – 479 nükleotidleri arasında (*Escherichia coli* nükleotid pozisyonlarına göre) farklı nükleotid bileşimine sahip ek bir sarmal içerdiğini ve bu bölgedeki dizilerin tür tanımlanmasında kullanışlı olabileceğini bildirmişlerdir.

2.3.2 *Glycomyces* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Glycomycetales*

Aile: *Glycomycetaceae*

Cins: *Glycomyces*

Glycomyces cinsi ilk olarak Labeda ve diğ. (1985) tarafından tanımlanmış ve daha sonra Labeda ve Kroppenstedt (2004) tarafından revize edilmiştir. Cinsin geçerli olarak tanımlanmış 16 türü bulunmaktadır (URL-2: <http://www.bacterio.net/glycomyces.html> - Mayıs 2016).

Glycomyces üyeleri aerobik, Gram-pozitif özelliktedir. Cins üyelerinin substrat miselyumu dallanmış olup, hava miselyumu ise bazı besi ortamlarında üretilmektedir. Hücre duvarları mezo-A₂pm ve glisin içermektedir (hücre duvar tipi

II). Tüm-hücre şeker profili ise ksiloz ve arabinoz ile karakterizedir (tip D). Fosfolipit profili, büyük oranda PIM içermektedir (tip PI). Baskın menakinonları MK-10(H₂) ve MK-10(H₆) bileşikleridir. Cinsin tip türü ise *Glycomyces harbinensis* türüdür (Labeda ve diğ., 1985).

Glycomyces cinsini oluşturan türler Gram-pozitif, aerobik, ve filamentli yapıdadır. Türlerin tamamı L-arabinoz, maltoz, D-ksiloz bileşiklerini kullanarak asit üretebilmekte ve kazeini parçalayabilmektedir. *Glycomyces* türlerinin gelişim sıcaklığı 10°C ile 42°C arasında değişmekle birlikte, suşların birçoğu 15°-20°C arasında ve 37°C sıcaklıkta da gelişebilmektedir (Stackebrandt, 2014).

Glycomyces üyelerinin birçoğu farklı coğrafik bölgelerden toplanan toprak örneklerinden izole edilmiş olmasına rağmen cins üyelerinin bitkisel dokularla ilişkili olduğu görülmektedir. *Glycomyces endophyticus*, *Carex baccans* kökünden (Qin ve diğ., 2008); *G. sambucus*, *Sambucus adnata* kökünden (Gu ve diğ., 2007); *G. scopariae*, *Scoparia dulcis* kökünden; *G. mayteni* ise *Maytenus austroyunnanensis* kökünden izole edilmiştir (Qin ve diğ., 2009a). Cinsin geri kalan diğer türleri ise topraktan izole edilmiştir. İzolasyonda kullanılan toprak tipleri sera veya çiftlik örnekleri gibi farklı özelliklere sahip bölgelerden alınmıştır. Ayrıca *Glycomyces* türlerinin izolasyonunda kullanılan toprak ve bitki örneklerinin Çin, Kuzey Afrika ve Amerika gibi farklı bölgelerden alınmış olması, cinsin geniş bir coğrafi dağılışa sahip olduğunu göstermektedir (Stackebrandt, 2014).

Trondheim Körfezi'nden izole edilen iki farklı *Glycomyces* izolatının antimikrobiyal aktivitesi ve PKS ve NRPS genlerini içerip içermediği analiz edilmiş; sadece bir izolatın PKS genlerinin varlığı için pozitif sinyal verirken, her iki izolatın da antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı gösterilmiştir (Bredholdt ve diğ., 2007).

Glycomyces harbinensis'in antitümör bir antibiyotik olan LL-DO5139β bileşiğini ürettiği bildirilmiştir (Lee ve diğ., 1987). Bu bileşik LL-DO5139 kompleksinin bir parçası olup LL-DO5139β ve azaserin içermektedir. Kimyasal analizler LL-DO5139β bileşiğinin N-L-alanil-L-serin diazoasetat ile benzer olduğunu; ancak azaserinden daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Dipeptid yapıdaki bu antibiyotik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ile tümörlere karşı aktiftir (Stackebrandt, 2014).

2.3.3 *Jiangella* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Jiangellales*

Aile: *Jiangellaceae*

Cins: *Jiangella*

Jiangella cinsi ilk olarak Song ve diğ. (2005) tarafından tanımlanmış ve *Nocardioideaceae* familyasının *Propionibacterineae* alttakımı içerisinde değerlendirilmiştir. *Actinobacteria* şubesi üyelerinin 16S rRNA gen dizi analizine dayanan filogenetik analizler, *Jiangella* ve *Haloactinopolyspora* cinslerinin şubenin diğer alttakımlarından açıkça ayrılarak ayrı bir kol oluşturduğunu göstermiştir. *Actinobacteria* şubesinin üyeleri *Jiangella* ve *Haloactinopolyspora* cinslerine %93.1'in altında 16S rRNA gen dizi benzerliği göstermektedir. *Jiangella* ve *Haloactinopolyspora* cinsleri ilk olarak *Actinomycetales* takımına ait olmasına rağmen bu takım içerisinde tanımlanmış alttakımlardan herhangi birine yakın değildir. Bu cinsler, filogenetik olarak yakın ilişkili olmalarına rağmen diğer alttakımlardan farklıdır. Ancak, son değişikliklerle *Jiangella* ve *Haloactinopolyspora* cinsleri için *Jiangellaceae* familyası ve *Jiangellales* takımı önerilmiştir (Tang ve diğ., 2014).

Jiangella cinsinin tip suşları arasında yapılan DNA-DNA hibridizasyon (DDH) analizleri, türler arasında yüksek 16S rRNA dizi benzerliği olmasına rağmen düşük DNA-DNA hibridizasyon oranları bulunduğunu göstermiştir. DDH analizleri özellikle *J. muralis* 15-Je-017^T ile cinsin diğer üyeleri arasında yapılmıştır. Filogenetik olarak komşu türler olan *J. muralis* 15-Je-017^T ile *J. alba* YIM 61503^T, %99.7 16S rRNA dizi benzerliğine sahip olmasına rağmen %48.1 DDH oranı göstermektedir. Cinsin diğer türleriyle olan DDH oranları ise %40'ın altındadır (Kämpfer ve diğ., 2011).

Jiangella cinsi üyeleri Gram-pozitif, aerobik, katalaz pozitif filamentli aktinomisetlerdir. Substrat miselyumu kısa ve uzun çubuklar halinde parçalanmaktadır. Hücre duvarı diamin asit olarak LL-A₂pm içermektedir. Baskın

menakinon MK-9(H₄)'dur. Genomik DNA G+C oranı %70-71.9'dur. Cinsin tip türü *Jiangella gansuensis* YIM 002^T türüdür (Tang ve diğ., 2014).

Jiangella gansuensis YIM 002^T Çin'de toplanan bir çöl toprağı örneğinden izole edilmiş ve ilk olarak *Nocardioideaceae* familyasına bağı yeni bir cins olan *Jiangella* cinsinin türü olarak tanımlanmıştır (Song ve diğ., 2005). Daha sonra bir mağaradan *Jiangella alkaliphila* (Lee, 2008), tıbbi bir bitkiden *Jiangella alba* (Qin ve diğ., 2009), bir kiler duvarından *Jiangella muralis* (Kämpfer ve diğ., 2011) ve tropik bitki toprağından *Jiangella mangrovi* (Suksaard ve diğ., 2015) türleri izole edilerek tanımlanmıştır. *Jiangella gansuensis* YIM 002^T türünün tüm genomu dizilenmiş ve entegre mikrobiyal genom veri tabanında yayınlanmıştır. Genom dizi analizine göre *Jiangella* cinsinin tip türü olan *J. gansuensis* YIM 002^T toplam 5250 gen içermekte olup, bunlardan 4036'sı protein kodlamaktadır (Han ve diğ., 2014).

Jiangella gansuensis türünün fermentasyon sıvısından beş farklı aldehit türevi (jiangrine A-E), bir indolizin türevi (jiangrine F), bir glikolipit (jiangolide) ve daha önce bilinen bir bileşik olan pirolezantin elde edilmiştir (Han ve diğ. 2014).

2.3.4 *Jishengella* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Micromonosporales*

Aile: *Micromonosporaceae*

Cins: *Jishengella*

Xie ve diğ. (2011) tarafından önerilen *Jishengella* cinsi *Micromonosporaceae* familyası içerisindeki monospesifik aktinobakteri cinslerinden biridir. Günümüzde cins, *Jishengella endophytica* 202201^T olarak tanımlanan bir tür içermektedir (Azman ve diğ., 2015).

Jishengella endophytica 161111 suşu 2-(furan-2yl)-6-(2S,3S,4-trihydroxybutyl) pirazin olarak tanımlanan yeni bir alkaloidi üretebilmektedir (Wang ve diğ., 2014). Bu suşun fermentasyon sıvısından yapılan özütleme ile üç pirazin türevi, dört pirolakton, üç β-karbolin, 1H-indol-3-karboksaldehit, 2-hidroksi-1-(1H-indol-3-yl) etanon ve 5-(metoksimetil)-1H-pirol-2-karbaldehit tanımlanmıştır (Wang ve diğ., 2014).

Jishengella endophytica 161111 suşundan elde edilen bütün bileşiklerin antivirüs etkileri influenza A (H1N1) virüsü üzerinde test edilmiştir. Suştan elde edilen bileşiklerden dördünün H1N1 virüsüne karşı orta derecede antiviral etki gösterdiği; ayrıca aynı bileşiklerin Madin-Dady böbrek (MDCK) normal hücrelerine karşı zayıf derecede sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2014).

2.3.5 *Micromonospora* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Micromonosporales*

Aile: *Micromonosporaceae*

Cins: *Micromonospora*

Micromonosporaceae familyası, *Actinobacteria* şubesinin *Micromonosporales* takımının bir üyesidir. *Micromonospora* cinsi, kemotaksonomik, morfolojik ve filogenetik karakterlerin birlikte kullanılmasıyla kolaylıkla ayırt edilebilen, filogenetik olarak yakın ilişkili 27 cins içeren *Micromonosporaceae* familyasının tip cinsidir (Trujillo ve diğ., 2014).

Micromonosporaceae familyasının üyeleri Gram-pozitif olup parçalanmayan, dallanmış ve bölmeli substrat miselyumu oluşturmaktadır. Hava miselyumu ise bulunmaz veya çok az oluşmaktadır. Familya üyeleri üç tip spor yapısı ile karakterizedir; bunlar tek olarak bulunan sporlar, spor zincirleri ve doğrudan substrat miselyumu üzerinde taşınan spor keseleridir. Sporlar hareketsiz veya bir demet kamçı ile hareket edebilen yapıdadır. *Micromonosporaceae* üyeleri aerobik, asit-fast boyanmayan, mezofilik mikroorganizmalardır. Agar besi ortamı üzerinde gelişen koloniler düz, pürüzsüz veya kıvrımlı yüzeyleri ile hafif yükselmiş olup çeşitli renklere sahiptir. Birçok suş, kolonilere turuncu-kırmızı görünüm veren karotenoid misel pigmentleri üretmektedir. Ancak mavi-yeşil, kahverengi veya mor pigment üreten suşlar da bulunmaktadır. Hücre duvarı peptidoglikanı mezo- ve/veya 3-hidroksidiaminopimelik asit içermekte ve hücre duvarı tipi A1a kategorisine girmektedir. Tanımlayıcı aminoasit olarak L-lizin de bulunabilir. *Pilimelia* cinsi dışındaki diğer bütün cinslerde peptid zincirinin ilk aminoasidi glisindir. Tüm-hücre hidrolizatları arabinoz, ksiloz, galaktoz ve değişen oranlarda diğer şekerleri

içermektedir. Familya üyeleri farklı oranlarda doymuş, *izo-* ve *anteizo-* yağ asitleri üretmektedir. Fosfatidiletanolamin, tanımlayıcı fosfolipittir (fosfolipit tipi II); ancak difosfatidilgliserol, fosfatidilgliserol ve fosfatidilinozitol de önemli bileşenler olarak bulunabilmektedir. Mikolik asitler bulunmaz. Menakinon profilleri değişken olup MK-9 ve MK-10 serilerinin bütün tipleri bulunabilmektedir (Trujillo ve diğ., 2014).

Micromonosporaceae familyası içerisinde sınıflandırılan mikroorganizmalar toprak, sediment, tatlı su, deniz suyu, rizosfer ve bitki dokuları gibi çeşitli habitatlardan izole edilmektedir (Rheims ve diğ., 1998; Trujillo ve diğ., 2006; Liao ve diğ., 2009; Dai ve diğ., 2010; Garcia ve diğ., 2010; Trujillo ve diğ., 2010; Li ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2011; Xie ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2013; Sahin ve diğ., 2015).

Micromonospora cinsinin üyeleri nötr ve alkali topraklardan yaygın olarak izole edilebilmektedir. Ancak cins üyelerinin tatlı su ve denizel habitatlar gibi sucul ekosistemlerden izole edilme sıklığı daha yüksektir. *Micromonospora* üyelerinin göl sedimentlerindeki kitin, selüloz ve lignini parçalayabilmeleri, bu mikroorganizmaların göl ekosisteminde önemli bir işleve sahip olduğunu göstermektedir. Göl sistemlerinde *Micromonospora* türlerinin varlığı birçok ülkede gösterilmiştir. İngiltere’de bir dağ gölünün dip sedimentlerinde *Streptomyces* ve *Nocardia* cinslerinin yanı sıra *Micromonospora* türlerinin de baskın olarak bulunduğu ve cins üyelerinin kıydan derine doğru gittikçe arttığı bildirilmiştir (Willoughby, 1969). *Micromonospora* cinsinin bu baskınlığı, diğer göllerde yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi, daha derindeki sediment tabakalarında daha belirgin olarak gözlenmiştir (Johnston ve Cross, 1976). Macaristan’daki bir termal gölde de benzer özellikler gözlemlenmiştir (Szabo ve Fernandez, 1984). Sediment yüzeyine kıyasla 20 cm derinde *Micromonospora* üyelerinin sayısı iki katına çıkarken aynı tabakada *Streptomyces* üyelerinin sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Bu koşullar altında *Micromonospora* sporlarının *Streptomyces* ve *Nocardia* sporlarına kıyasla daha dirençli olduğu görülmektedir. Derin sediment tabakalarındaki aktinobakteri sporlarının dayanıklılığı üzerine yapılan çalışmalarla da bu durum doğrulanabilmektedir. Yüz yıl önce saklanan sediment örneklerinde *Micromonospora* cinsine ait canlı sporlar bulunduğu bildirilmiştir (Cross ve Attwell, 1974). Diğer aktinobakterilerle birlikte *Micromonospora* türlerine, dere ve nehir ekosistemlerinde de sıklıkla rastlanmaktadır. *Micromonospora* sporları, hidrofilik özellikte olup suyun akışıyla topraktan kolaylıkla taşınabilmektedir (Ruddick ve

Williams, 1972). Cins sporları ultrasonikasyona, nemli sıcak uygulamasına (60°C’de 20 dk), 75°C’ye kadar kuru sıcaklığa ve çeşitli kimyasal çözeltilere karşı dirençlidir. Ancak asidik pH değerine orta düzeyde duyarlı olduğu bildirilmiştir (Kawamoto, 1989).

Micromonospora türleri, kıyısız bölgelerden derin deniz sedimentlerine kadar birçok farklı denizel habitatlardan da izole edilmektedir. Hunter ve diğ. (1984), tuzlu bataklık ekosistemlerinden mevsimsel dalgalanmalarla değişen miktarlarda *Micromonospora* türleri izole etmişlerdir. Ayrıca kıyı bitkilerinin rizosfer toprağında cins üyelerinin bulunma sıklığının, bitki bulunmayan çamur örneklerindeki kadar fazla olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Hunter ve diğ., 1984). Watson ve Williams (1974), Lancashire (İngiltere) kıyı şeridi kumullarında aktinobakteri çeşitliliğini çalışmışlardır. Deniz suyunda ve kıyı şeridinde *Micromonospora* türlerinin baskın olarak bulunduğunu bildirilmiştir. *Micromonospora* türleri tatlı su ile hazırlanan besi ortamlarında iyi gelişmekte ve birçoğu deniz suyu tuzluluğunu tolere edebilmektedir. Weyland (1984), derin deniz sedimentlerinde *Micromonospora* türlerinin baskın olarak bulunduğunu bildirmiştir. *Micromonospora* suşlarının azalan oksijen basıncını tolere edebilmeleri, sporlar denizde battıktan sonra kıyısız veya denizel sedimentlerde yıllarca kalabilmelerini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Goodfellow ve Williams, 1983). Bazı araştırmacılar, aktinobakterilerin deniz suyunda ve sedimentlerde gelişebilen denizel mikrofloranın bir parçası olduğunu kabul etmektedirler (Okami ve Okazaki, 1976; Weyland, 1984).

Micromonospora türlerinin saman ve ot gibi karasal habitatlar ile tahıl ambarları gibi karasal habitatlarda veya evlerde hava kirleticileri olarak bulundukları bildirilmiştir. Cins üyeleri yapısal kerestelerden de izole edilebilmektedir. Ayrıca *Picea* ve *Pinus* cinslerine ait ağaçların odunlarından ve kâğıt hamurundan da izole edilmektedir (Lacey, 1988). *Micromonospora* türleri, nemli topraklarda olduğu gibi mikroaerofilik şartlarda da gelişebilmektedir (Goodfellow ve Williams, 1983).

Birçok *Micromonospora* türü, biyopolimerleri parçalayabilmektedir. Hunter ve diğ. (1984)’nin tuzlu bataklıklardan izole ettikleri birçok izolatin bozunmuş kitin ve selüloz içerisinde aktif olduğu görülmüştür. Substrat olarak özellikle selüloz sıklıkla kullanılmaktadır. *Micromonospora melanosporea*’dan izole edilen selülazın *Trichoderma* küfünden elde edilen enzime kıyasla sıcaklığa daha dayanıklı olduğu; ancak termofilik aktinomisetlerden elde edilen enzimlere göre daha az kararlı olduğu görülmüştür (Vobis, 2006).

Micromonosporaceae familyası içerisinde tanımlanan birçok yeni takson için DNA-DNA hibridizasyon analizi yapılmıştır. Genel olarak, DNA-DNA hibridizasyon oranlarının 16S rRNA gen dizi benzerliği değerleri ile karşılaştırıldığında oldukça düşük oldukları görülmektedir (Trujillo ve diğ., 2014).

16S rRNA gen dizi benzerliği %99.4 olan *M. inyonensis* ve *M. sagamiensis* tip türleri arasındaki DNA-DNA hibridizasyon oranının (%61.3), cins içerisindeki en yüksek DDH oranı olduğu bildirilmiştir (Kroppenstedt ve diğ., 2005). Benzer sonuçlar, 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.1'in üzerinde olan *M. chersina* ve *M. endolithica* (%33.5) (Hirsch ve diğ., 2004), *M. aurantiaca* ve *M. chalcea* (%44) (Kasai ve diğ., 2000), *M. echinosporea* ve *M. sagamiensis* (%52), *M. citrea* ve *M. echinofusca* (%53), *M. echinoaurantiaca* ve *M. viridifaciens* (%53) (Kroppenstedt ve diğ., 2005) tip türleri arasında da gözlenmiştir (Trujillo ve diğ., 2014).

Carro ve diğ. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, DDH ve MLSA analizleri arasında bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir. Carro ve diğ. (2012), *Micromonospora* cinsi içerisindeki genomik türlerin *gyrB*, *recA*, *atpD*, *rpoB* ve 16S rRNA genlerinin birleştirilmesiyle oluşan nükleotid dizi benzerliği %98.5'ten yüksek olan suşların oluşturduğu grup olarak tanımlanabileceğini önermişlerdir (Trujillo ve diğ., 2014).

Micromonosporaceae familyasının kromozom topolojisi ilk olarak *Actinoplanes philippinensis* DSM 43019^T ve *Micromonospora chalcea* DSM 43026^T suşları için Atımlı Alan Jel Elektroföresi (PFGE) kullanılarak belirlenmiştir. Her iki suşun sırasıyla 8.8 Mb ve 7.7 Mb büyüklükte kromozoma sahip olduğu ve her iki kromozomun da doğrusal yapıda olduğu öne sürülmüştür (Redenbach ve diğ., 2000). Bu veriler, familya üyelerinin bütün genom dizilerinin tamamlanmasıyla kademeli olarak zenginleştirilmiştir. Mevcut durumda *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Salinispora* ve *Verrucosipora* cinslerinin bazı suşları için genom karşılaştırması yapmak mümkündür. Bu genom dizileri, *Micromonosporaceae* üyelerinin 5.1 – 9.2 Mb uzunlukta büyük halkasal bir kromozoma sahip olduğunu göstermiştir. Bu genomlar üzerine yapılan ilk analizler, genomların büyük bölümünün sekonder metabolizma, habitata uyum ve kolonileşmeden sorumlu olduğunu göstermiştir. Açıklanan ilk *Micromonospora* genomu 7.03 Mb uzunlukta, %72.8 GC içeren, halkasal bir kromozoma sahip *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029^T suşuna aittir. Genomun 6361 protein kodlayan gen, 9 rRNA geni, 52 tRNA geni içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca sekonder metabolizma ve bazı hidrolitik enzimler ile ilişkili

olan proteinlerle birlikte 6222 protein öngörülmüştür. Ksilanazlar ve amilazlar gibi hidrolitik enzimlerin yaşam döngüsünde ve habitatta kolonileşmede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Yayınlanan ikinci *Micromonospora* tüm genomu, *Lupinus angustifolius* bitkisinin kök nodüllerinden izole edilen *Micromonospora lupini* Lupac 08 suşuna aittir. Bu suşun genomu 7.32 Mb uzunlukta ve %71.96 GC içeriğine sahiptir (Alonso-Vega ve diğ., 2012). *Micromonospora lupini* Lupac 08 genomunun 7054 protein kodlayan gen, 10 rRNA geni ve 77 tRNA geni içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu suşun da *M. aurantiaca* suşunda olduğu gibi sellülazlar, amilazlar, ksilanazlar ve pektinazlar gibi hidrolitik enzimleri kodlayan genlerin yanı sıra, sekonder metabolizmaya katılan çok sayıda gen içerdiği gösterilmiştir. *Micromonospora* cinsine ait üçüncü tüm genom analizi *Casuarina equisetifolia* köklerinden izole edilen *Micromonospora* sp. L5 suşu için yapılmıştır. Halkasal genomun 6.69 Mb uzunlukta, %72.8 GC içeriğine sahip olduğu ve toplam 6326 gen içerdiği gösterilmiştir (Hirsch ve diğ., 2013).

Mevcut genom analizleri az sayıda suş ile sınırlı olmasına rağmen familya üyelerinin metabolik çeşitliliğinin, adaptasyon kapasitesinin ve biyosentetik potansiyelinin büyük ölçüde keşfedilmediğini gösteren ilk kanıtları sağlamıştır. Yeni genom dizilerinin yayınlanması *Micromonosporaceae* familyasının farklı üyelerine ait bu genomların topolojisinin ve organizasyonunun keşfedilmesi için yeni kapılar açacaktır (Trujillo ve diğ., 2014).

2.3.6 *Nocardia* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Corynebacteriales*

Aile: *Nocardiaceae*

Cins: *Nocardia*

Nocardia cinsi, 16SrRNA dizi analizine göre *Corynebacteriales* takımı içerisinde sınıflandırılmakta ve takımın diğer cinsleriyle mikolik asitler başta olmak üzere, birçok kemotaksonomik karakteristikleri paylaşmaktadır. *Nocardia* cinsi 107 tür içermektedir (URL-3: <http://www.bacterio.net/nocardia.html> - Mayıs 2016). Bu türlerden birçoğunun sınırı, genotipik ve fenotipik kriterlerin birlikte kullanılmasıyla

son 10 yıl içerisinde çizilmiştir. Son yıllarda tanımlanan yeni *Nocardia* türlerinden birçoğu insan enfeksiyonları ile ilişkili iken (Conville ve diğ., 2008; Kageyama ve diğ., 2004; Rodriguez-Nava ve diğ., 2004); geri kalan türler ise farklı coğrafik bölgelerden toplanan toprak örneklerinden izole edilmiştir (Kämpfer ve diğ., 2007; Maldonado ve diğ., 2000; Saintpierre-Bonaccio ve diğ., 2004).

Nocardia üyeleri, beyin – kalp infüzyon (Difco), gliserol – asparajin (ISP5; Shirling ve Gottlieb, 1966), glukoz – maya özütü (Gordon ve Mihm, 1962), modifiye Bennet's (Jones 1949), modifiye Sauton's (Mordarska ve diğ., 1972), maya özütü – malt özütü (ISP2; Shirling ve Gottlieb, 1966) gibi birçok standart besi ortamında iyi gelişmektedir. Gelişim için besi ortamı 25° – 37°C sıcaklıkta üç hafta boyunca inkübe edilmelidir. *Nocardia aciditolerans*, *N. jiangxiensis* ve *N. miyunensis* gibi asidi tolere edebilen cins üyeleri, pH 5.5 olan besi ortamlarında iyi gelişmektedir (Cui ve diğ., 2005; Golinska ve diğ., 2013). Koloniler düz, granüllü, kıvrımlı veya düzensiz olabilmektedir. Birçok tür, katı kültür ortamında kolonilere kahverengi, turuncu, pembe, kırmızı veya sarı renk veren karotenoid benzeri renk maddeleri sentezlemektedir. Ayrıca kahverengi veya sarımsı renkte yayılabilir pigmentler de üretilmektedir (Goodfellow, 2014).

Nocardia türlerinin en belirgin morfolojik karakteristiklerinden biri, düzensiz küre ve çubuk biçimli elementlere parçalanan, filamentli, dallanmış hücreler üretebilmeleridir. Hava ve substrat miselyumunun gelişimi ve stabilizasyonu kültür koşullarından etkilenmektedir (Goodfellow, 2014).

Bazen hava hiflerinde, nadiren hava ve substrat miselyumu üzerinde, az çok farklılaşmış sporlardan oluşan, kısa veya uzun spor zincirleri tespit edilebilmektedir. *Nocardia aobensis* (Kageyama ve diğ., 2004), *N. artemisiae* (Zhao ve diğ., 2011), *N. asiatica* (Kageyama ve diğ., 2004), *N. callitridis* (Kaewkla ve Franco, 2010), *N. inohanensis* (Kageyama ve diğ., 2004), *N. niigatensis* (Kageyama ve diğ., 2004) ve *N. takedensis* (Yamamura ve diğ., 2005) türleri hava miselyumu üzerinde kısa spor zincirleri üretmektedir. *Nocardia beijingensis* ve *N. brevicatena* türleri ise substrat ve hava miselleri üzerinde spor oluşturmaktadır (Lechevalier ve diğ., 1961; Wang ve diğ., 2001).

Cins üyeleri Gram-pozitif veya Gram-değişken olup, gelişim döngüsünün bazı aşamalarında asit-alkol-fast pozitifdir. Birçok suş, 20° - 40°C sıcaklıkta (optimum 28°C) ve pH 5 – 10 arasında (optimum pH 7) gelişmektedir. Ancak *N. acidivorans*, *N. harenae* ve *N. jejuensis* gibi bazı türler 10°C sıcaklıkta gelişim gösterirken; *N.*

arthritidis, *N. brasiliensis*, *N. ignorata*, *N. jinanensis*, *N. kruczakiae* ve *N. otitidiscaviarum* gibi bazı türler ise 45°C sıcaklıkta iyi gelişmektedir. *Nocardia* türleri heterotrofik olup, oksidatif metabolizmaya sahiptir. Bazı türler, durağan faza 3-7 gün arasında ulaşırken, diğer türler ise daha yavaş gelişmektedir (Goodfellow, 2014).

Nocardia türleri spesifik gelişim gereksinimleri göstermemektedir. Birçok suş kazein, et veya maya özütü içeren besi ortamları ile aminoasitler ve nitrat gibi basit azot kaynaklarını içeren besi ortamlarında gelişebilmektedir. Cins üyeleri kompleks polisakkaritleri parçalayabilmekte; glukoz, asetat ve propiyonat gibi çeşitli karbon bileşiklerini kullanabilmektedir (Golinska ve diğ., 2013; Luo ve diğ., 2013).

Nocardia üyelerinin hücre duvarı belirgin bir peptidoglikan tabakası, şeker, lipit ve özellikle mikolik asit içermektedir (Goodfellow ve diğ., 1982). Ester bağları, mikolik asitleri peptidoglikana bağlı olan arabinogalakattan tabakasına bağlamaktadır. Dış mikolik asit tabakası, Gram-negatif bakterilerin dış zarı ile analogdur. Gram-negatif bakterilerin dış zarı, çözünmüş maddelerin dış zar boyunca geçişine izin veren, porinler olarak adlandırılan kanal-oluşturan proteinleri içermektedir. *Nocardia asteroides* ve *N. farcinica* türlerinin mikolik asit tabakalarında porinlerin bulunduğu tespit edilmesine rağmen, *Nocardia* hücre duvarı geçirgenliğinin moleküler temeli ile ilgili olarak çok az veri bulunmaktadır (Rieb ve diğ., 1998).

Nocardia türlerinin hücre duvarları büyük oranda mezo-A₂pm, arabinoz ve galaktoz içermektedir (hücre duvar tipi IV). Ayrıca peptidoglikan tipi A1γ olup N-glikolil muramik asit içermektedir (Schleifer ve Kandler, 1972; Uchida ve Seino, 1997). Tip II fosfolipit profili ile uyumlu olarak polar lipitleri büyük oranda DPG, PE (taksonomik olarak önemli fosfolipit), PI, PIM ve türler arasında değişken oranda dağılım gösteren PG olarak tespit edilmiştir (Lechevalier ve diğ., 1977; Minnikin ve diğ., 1977). Baskın olarak bulunan solunum kinonu, sekiz izopren birimine sahip (uçtaki iki tanesi halkasal) hekzahidrojenli menakinonlardır (Collins ve diğ., 1987; Howarth ve diğ., 1986). Ayrıca düşük oranda MK-8(H₂), MK-8(H₄) ve MK-9 menakinonlarının bulunduğu da bildirilmiştir (Rodriguez-Nava ve diğ., 2007; Sazak ve diğ., 2012).

Nocardia üyeleri karakteristik olarak yağda çözünebilir, demir bağlayan bileşikler olan nokobaktinleri içermektedir (Ratledge ve Patel, 1976). Cins üyelerinin genomik DNA G+C oranı %63 – 73 arasındadır. *Nocardia* türleri tipik olarak, büyük

oranda düz-zincir doymuş, doymamış ve tüberkülostearik yağ asitlerini içermektedir (yağ asidi profili tip II). Bazı yakın ilişkili türler yağ asidi bileşimlerindeki niteliksel farklılıklara göre ayırt edilmesine rağmen, birçok suş niteliksel olarak benzer yağ asidi profiline sahiptir (Kageyama ve diğ., 2004; Kämpfer ve diğ., 2007; Kaewkla ve Franco, 2010).

Mikolik asitler *Nocardia* hücre duvarlarının en karakteristik bileşenleridir (Goodfellow ve diğ., 1976). *Nocardia amikacinitolerans*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. niwae*, *N. otitidiscaviarum* türlerinin de dâhil olduğu bazı *Nocardia* türlerinde 44 – 64 karbon atomu uzunlukta ve en fazla 4 çift bağ içeren mikolik asitler tespit edilmiştir (Laneelle ve Asselineau, 1970; Alshamaony ve diğ., 1976; Kudo ve diğ., 1988; Yano ve diğ., 1990; Moser ve diğ., 2011). *Nocardia asteroides* türü, hücre duvarı mikolik asit bileşimini değiştirerek sıcaklık koşullarındaki değişikliklere uyum sağlayabilmektedir (Tomiyasu 1982). Mikolik asit metil esterlerinin pirolizis gaz kromatografisinde açığa çıkan yağ asidi esterleri 12 – 18 karbon içermektedir (Alshamaony ve diğ., 1976).

Nocardia cinsi, insan sağlığına olan zararlı etkilerinden dolayı yıllardır ilgi çekmektedir. Birçok tür, bazı durumlarda insanlarda ve hayvanlarda yüksek ölüm oranına sahip ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Roberts ve diğ., 2000, Mari ve diğ., 2001, Husain ve diğ., 2002, Pereira ve diğ., 2003, Queipo-Zaragoza ve diğ., 2004).

Son zamanlarda farklı toprak ve sucul habitatlardan izole edilen *Nocardia* suşlarının yeni biyoaktif bileşikleri üretebildiklerini (Schneider ve diğ., 2007, El-Gendy ve diğ., 2008) ve petrol veya endüstriyel atıklarla kirlenmiş ortamlarda kompleks organik bileşikleri parçalayabildiklerini bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu durum, *Nocardia* cinsinin farklı metabolik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, *Nocardia* cinsinin bazı türleri, önemli bir doğal polimer olan sumatra zamkını (gutta-percha) parçalayabilen tek organizma grubu olma özelliğindedir (Warneke ve diğ., 2007). Ayrıca, bazı suşlardan endüstriyel süreçlerde önemli kimyasalların üretimi için başarılı bir biçimde yararlanılmaktadır (Schulze ve Wubbolts, 1999; Wang ve diğ., 2006).

2.3.7 *Nonomuraea* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Streptosporangiales*

Aile: *Streptosporangiaceae*

Cins: *Nonomuraea*

Nonomuraea cinsi, aerobik, Gram-pozitif, asit-alkol-fast boyanmayan, oldukça dallanmış substrat ve hava hifleri oluşturan türlerden oluşmaktadır. Hava hifleri kancalı, sarmal, düz veya yalancı veziküller içerisinde ağımsı yapıda olabilen spor zincirlerini taşımaktadır. Spor yüzeyleri katlanmış, düzensiz, pürüzsüz veya çıkıntılı yapıda olabilmektedir. Cins üyelerinin gelişim sıcaklığı 20 – 45 °C arasında değişmekle birlikte, bazı türler 55°C sıcaklıkta da gelişebilmektedir. Hücre duvarları mezo-A₂pm ve maduroz içermektedir (hücre duvar tipi III/B). Baskın menakinon tipi MK-9 (H₀, H₂, H₄) olup; fosfolipit profili glukozamin-içeren lipitler, PME, DPG, PI ve değişken olarak PE ile karakterizedir (fosfolipit tipi IV). Baskın yağ asitleri ise 10- metil-17- ve izo-16-dallı bileşenlerden oluşmaktadır (yağ asidi profili 3c). Cins üyelerinin genomik DNA G+C oranı %64-69 olarak bildirilmiştir. Cinsin tip türü ise *Nonomuraea pusilla* 419^T (ATCC 27296^T=DSM 43357^T) türüdür (Zhang ve diğ., 1998). *Nonomuraea* cinsi geçerli olarak yayınlanmış 37 tür ve 2 alttür içermektedir (URL-4: <http://www.bacterio.net/nonomuraea.html> - Mayıs 2016).

Nonomuraea cinsi *Actinobacteria* şubesinin *Streptosporangiaceae* familyasına aittir. Kemotaksonomik analizler cins üyelerinin hücre duvarının kemotip IIIB ve IIIC olduğunu göstermiştir (Sungthong ve Nakaew, 2015).

Nonomuraea cinsi üyelerinin genomik DNA G+C içeriği %64-74 arasındadır. Ancak cinsler arasında veya *Nonomuraea* cinsinin türleri arasında yapılan sınıflandırma için optimum 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı konusunda belirsizlik söz konusudur. Örneğin, Goodfellow ve diğ. (2005), *Streptosporangiaceae* familyasındaki diğer cinslerle 16S rRNA gen dizi benzerliğinin nispeten düşük olması (%92.7-94.7) nedeniyle *Thermopolyspora* cinsini *T. flexuosa* DSM 41386^T tip türü ile yeni bir cins olarak önermişlerdir. Diğer taraftan, *Nonomuraea* cinsi üyeleri arasında 16S rRNA gen dizisi açısından nispeten yüksek benzerlik oranlarına

(%98.9-99.8) karşın düşük DNA-DNA homoloji oranları (maksimum %45-48) gözlenmektedir. Son zamanlarda tanımlanan tür ve alttürlerin %93.9-99.8 arasında değişen gen dizi benzerlikleri de göz önüne alınarak *Nonomuraea* cinsi için genotipik bir sınıflandırma yapılabilir. Eğer 16S rRNA gen dizi benzerliği %95'in üzerinde olan bir izolat aynı kümedeki diğer türlerle benzer fenotipik özelliklere sahipse *Nonomuraea* cinsine ait olabilir. Ancak gen dizi benzerliğinin %95'in altında olması ve fenotipik özelliklerin de farklılık göstermesi durumunda yeni bir cins olarak değerlendirilebilir. Bu durumda, bütün taksonomik kriterler kullanılarak aynı familya içerisindeki filogenetik olarak yakın cinslerle karşılaştırmalar yapılmalıdır. Gen dizi benzerliği %98.5'in altında olan ve fenotipik verilerde en yakın tip türleri ile açıkça farklılık gösteren izolatlar yeni tür olarak değerlendirilebilir. Ancak gen dizi benzerliği %98.5'in üzerinde olan izolatlar fenotipik verilerde bazı farklılıklara sahip olsalar da bu izolatların yeni tür olup olmadıklarını belirlemek amacıyla aynı filogenetik kümedeki diğer türlerle DNA-DNA benzerlik analizi yapılmalıdır (Sungthong ve Nakaew, 2015).

Nonomuraea tür tanımlarının yaklaşık yarısı DDH verilerini içermektedir. *Nonomuraea wenchangensis* ile *N. coxensis* (% 56.5), *N. coxensis* ile *N. bangladeshensis* (%57.7 – 58.2) yakın olarak ilişkili olan tür çiftlerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan *N. endophytica* ile *N. candida* (%41.4), *N. kuesteri* ile *N. turkmeniaca* (%40.5), *N. maheshkhaliensis* ile *N. kuesteri* (%39.9 – 45.7) daha az yakınlık gösteren tür çiftlerini temsil etmektedir. *Nonomuraea rhizophila* ve *N. rosea* (%38.5), *N. jiangxiensis* ve diğer türler (%16.0 – 22.4) arasındaki DNA-DNA hibridizasyon oranları ise %40'ın altındadır. *Nonomuraea* türlerinin yüksek 16S rRNA dizi benzerliğine (%97.6 – 99.4) rağmen düşük DDH değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir (Fischer ve diğ., 1983; Tamura ve diğ., 2000; Kämpfer ve diğ., 2005). Örneğin, *N. africana*, *N. dietziae* ve *N. recticatena* türleri %98.9 – 99.8 oranında 16S rRNA gen dizi benzerliğine sahip olmasına rağmen bu türler arasındaki DDH değerlerinin %45 – 48 arasında olduğu gösterilmiştir (Otoguro ve diğ., 2014).

Nonomuraea cinsinin birçok üyesi sucul ve karasal ortamlardaki sediment ve toprak örneklerinden elde edilmiştir. Çeşitli metagenomik çalışmalar da *Nonomuraea* cinsinin bu tür habitatlarda yoğun olarak bulunduğunu göstermektedir. Van Hop ve diğ. (2011), *Nonomuraea* cinsinin Vietnam'dan toplanan bazı toprak örneklerinde baskın olarak bulunan aktinobakteri üyelerinden olduğunu göstermişlerdir. İzole edilen *Nonomuraea* üyelerinin %19'unun 16S rRNA gen dizi benzerliğinin %98'in

altında olması nedeniyle bu izolatlar yeni tür olarak değerlendirilmiştir (Van Hop ve diğ., 2011). Ayrıca, cinsin sıklıkla izole edildiği habitatların coğrafik konumla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Daha düşük enlemlerde (2° K) bulunan Singapur'daki yağmur ormanlarından cins üyeleri daha yüksek düzeyde (390 izolat) izole edilirken yüksek enlemde (34° K) bulunan Japonya'daki Mikurajim Adası'ndan sadece üç izolat elde edilmiştir (Van Hop ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2011). *Nonomuraea* türlerinin %83'ü karasal kaynaklardan, kalan %17'lik kısım ise sucül habitatlardan izole edilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar *Nonomuraea* cinsi üyelerinin deniz sedimentlerinde de bulunduğunu göstermiştir (Bredholdt ve diğ., 2007; Maldonado ve diğ., 2009; Becerril-Espinosa ve diğ., 2013). Ayrıca sünger ve denizel bitkiler (*Thalassia hemprichii*) gibi organizmalarla simbiyotik olarak yaşayan *Nonomuraea* türleri de bildirilmiştir (Xi ve diğ., 2012a; Wu ve diğ., 2012). *Nonomuraea* üyeleri denizel ortamlarda diğer cinslere kıyasla daha düşük oranda bulunmalarına rağmen bu mikroorganizmalardan bazıları, poliketid sentaz (PKS) ve ribozomal olmayan peptid sentetaz (NRPS) genlerine sahiptir (Becerril-Espinosa ve diğ., 2013; Xi ve diğ., 2012a). Bu genler, çeşitli sekonder metabolitlerin biyosentez yollarına katılan genetik düzenleyiciler olarak kabul edilmektedir (Sungthong ve Nakaew, 2015).

Karasal habitatlardan izole edilen *Nonomuraea* türlerinin yaklaşık %10'u bitkisel dokulardan elde edilmiştir. Bunlardan *N. antimicrobica* YIM 61105^T *Maytenus austroyunnanensis*'in yaprak dokusundan (Qin ve diğ., 2009b), *N. endophytica* YIM 65601^T yüzey sterilizasyonu yapılmış olan *Artemisia annua* L. dokusundan ve *N. solani* NEAU-Z6^T patlıcan kök dokusundan izole edilmiştir (Wang ve diğ., 2013). *Nonomuraea jiangxiensis* FXJ1.102^T asidik topraktan (Li ve diğ., 2012) ve *N. fastidiosa* IFO 14680^T ise kaplıca toprağından (Soina ve diğ., 1974) izole edilen ekstrem habitat kaynaklı türlerdir. Son zamanlarda Jose ve Jebakumar (2012) Hindistan'da bulunan aşırı tuzlu bir habitatтан *Nonomuraea* türlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. *Nonomuraea* cinsinin üyeleri kuru toprak, tuzlu kum toprağı ve kumsal sedimenti gibi düşük organik içeriğe sahip topraklarda veya tarım ve rizosfer toprağı gibi yüksek organik içeriğe sahip topraklarda bulunabilmektedir. Nadiren izole edilen aktinomisetleri keşfetmek amacıyla farklı izolasyon kaynakları kullanılmaktadır. Örneğin *N. monospora* PT708^T türü Tayland'da bir mağaradan alınan toprak örneğinden izole edilmiştir. Bu mağara habitatından *N. monospora* türü ile farmasötik potansiyele sahip başka *Nonomuraea* türleri de izole edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar mağara habitatlarının nadiren izole edilebilen

aktinobakteri taksonlarının keşfi için alternatif bir kaynak olabileceğini göstermektedir (Nakaew ve diğ., 2012). Yeni aktinomisetlerin izolasyonunda humik asit-vitamin agar gibi seçici besi ortamlarının *Nonomuraea* türlerinin izolasyonu için ideal olduğu gösterilmiştir. Ayrıca besi ortamına eklenen antibiyotik karışımları, istenmeyen mikroorganizmalardan kaynaklanan kontaminasyonu engelleyerek, yavaş gelişen nadir aktinobakterilerin izolasyonunu kolaylaştırmaktadır (Sungthong ve Nakaew, 2015).

Nonomuraea cinsinin bazı üyeleri değerli biyoaktif bileşiklerin üretimi konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. Bu biyoaktif bileşiklerin birçoğu tıbbi ve tarımsal kullanım alanına sahip olup, bir kısmı endüstriyel ve ticari olarak üretilirken bir kısmı da klinik olarak değerlendirme aşamasındadır (Sungthong ve Nakaew, 2015).

2.3.8 *Promicromonospora* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Micrococcales*

Aile: *Micrococcaceae*

Cins: *Promicromonospora*

Promicromonosporaceae familyası, *Promicromonospora* cinsinin *Micrococcineae* alttakımı içerisinde farklı bir filogenetik pozisyona ve takson-spesifik 16S rRNA sinyal moleküllerine sahip olması nedeniyle monogenerik bir familya olarak oluşturulmuştur (Stackebrandt ve diğ., 1997). Daha sonraki yıllarda yanlış sınıflandırılan bazı türlerin yeniden sınıflandırılmasıyla (örn. *Cellulomonas cellulans* türünün *Cellulosimicrobium cellulans* olarak, *Promicromonospora pachnodae* türünün *Xylanimicrobium pachnodae* olarak düzenlenmesi) veya yeni tanımlanan taksonlarla (örn. *Myceligenans* (Cui ve diğ., 2004), *Xylanimonas* (Rivas ve diğ., 2003)) başka cinsler de eklenmiştir. Familyanın tip cinsi *Promicromonospora* cinsidir.

Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji Kılavuzunun (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) ikinci basımıyla *Actinobacteria* sınıfı şube olarak, *Micrococcineae* alttakımı *Micrococcales* takımı olarak düzenlenmiştir (Goodfellow

2012). *Promicromonosporaceae* familyası, *Microcacciales* takımı içerisindeki 15 familyadan biridir (Schumann ve Stackebrandt, 2014).

Promicromonosporaceae familyasının üyeleri, peptidoglikan diaminosidi (L-lizin), fosfolipit kompozisyonu (fosfatidilgliserol, difosfatidilgliserol), baskın menakinon tipi (MK-9[H]₄), baskın yağ asitleri (*izo-* ve *anteizo-* dallanmış), DNA %G+C oranı (%70-75 mol) gibi kemotaksonomik özellikleri açısından benzerlik taşımaktadır. Peptidoglikan-peptidlerarası köprüde monokarboksilik bir aminoasidin bulunması durumunda ve dikarboksilik D-aminoasidin doğasında farklılıklar görülmektedir. Ancak genel olarak birden fazla tür içeren cinslerin her biri peptidoglikan yapısı bakımından oldukça homojen özellik göstermektedir. Morfolojik olarak bu cinslerin tamamı iyi gelişmiş substrat miselyumuna sahiptir. Bu özellik, tek tür içeren diğer üç cinsten bulunmamaktadır. Familyanın birçok üyesi selüloz, kitin, mannan ve ksilan gibi polisakkaritleri yıkabilme özelliğindedir (Schumann ve Stackebrandt, 2014).

Promicromonospora cins ismi, parçalanmış miselyum oluşturan ve substrat miselyumu üzerinde tek tek bulunan sporlar oluşturan mikroorganizmalar için düzenlenmiştir. *Promicromonospora* cinsini oluşturan organizmalar Gram-pozitif olup dallanan, bölme hifleri oluşturmaktadır. Agar içerisine nüfuz olabilen substrat miselyumu iyi gelişmiştir ve hareketsiz, küre biçimli, Y-biçimli, V-biçimli veya kıvrımlı çubuksu elemanlar halinde parçalanmaktadır. Besi ortamına dağılan renk maddeleri üretilmemektedir. Kolonileri soluk yeşil-sarı renkte olan *Promicromonospora thailandica* türü dışındaki diğer tip suşlarının tamamı krem renginden soluk sarıya, beyazdan sarımsı-beyaza veya turuncuya değişen renklerde kolonilere sahiptir. Bazı tip suşları ksilan ve sellobiyozu parçalayabilmektedir (Schumann ve Stackebrandt, 2014).

Cinsin tip türü *Promicromonospora citrea* Krasil'nikov, Kalakoutskii, Kirillova 1961, 107^{AL} suşudur. *Promicromonospora* suşlarının farklı habitatlardan izole edildikleri bilinmektedir. *Promicromonospora* suşlarının tıbbi veya tropik bitkilerden endofitik mikroorganizmalar olarak (Zhao ve diğ., 2011; Qin ve diğ., 2012); kurşun-çinko madeninden (Mendez ve diğ., 2008) ve küflü bir duvardan alınan örnekten (Martin ve diğ., 2010) izole edildiği bildirilmiştir.

2.3.9 *Saccharomonospora* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Pseudonocardiales*

Aile: *Pseudonocardiaceae*

Cins: *Saccharomonospora*

Pseudonocardiaceae familyası içerisindeki *Saccharomonospora* cinsi diğer taksonlara kıyasla klasik izolasyon yöntemleriyle daha düşük oranda elde edilmekte ve daha az dağılış göstermektedir. *Saccharomonospora* cinsi ilk olarak tek spor taşıyan, gri-yeşil renkte hava miselyumu oluşturan termofilik aktinomisetleri tanımlamak için kullanılmıştır (Nonomura ve Ohara, 1971). Cins üyeleri *Pseudonocardiaceae* familyasının diğer üyeleri gibi tip IV hücre duvarına (*mezo*-diaminopimelik asit, arabinoz ve galaktoz) sahip olup mikolik asit içermemektedir. Termofilik izolatlar genellikle sıcak habitatlardan (gübre, çürümekte olan bitki materyali vb.) izole edilmekle birlikte mezofilik suşlar da farklı toprak, dere ve göl sedimentlerinden elde edilmektedir (Embley ve Stackebrandt, 1994).

Saccharomonospora üyeleri çeşitli renklere sahip, nadiren parçalanmış substrat miselyumu oluşturmaktadır. Hava miselyumu beyaz, sarı-beyaz, yeşil ve koyu-açık mavi renklere sahiptir. Hem substrat miselyumu hem de hava miselyumu düzensiz olarak dallanmıştır. Sporlar tek, çift veya nadiren spor zincirleri halinde bulunur ve oval, elips veya küre (0.7-1.1 x 1.0-1.8 µm) biçimlidir. Spor yüzeyi pürüzsüz, çıkıntılı veya kırışıklıdır. *Saccharomonospora* türleri Gram-pozitif, aerobik, kemoorganotrofik, termotolerant veya mezofiliktir. Hücre duvarı *mezo*-diaminopimelik asit, arabinoz ve galaktoz içermektedir. Tanımlayıcı fosfolipit olarak fosfatidilinozitol içerir; ancak bazı türlerde difosfatidilgliserol de bulunabilir. Baskın menakinonu MK-9(H₄) olmakla birlikte MK-8(H₄), MK-9(H₂) ve MK-7(H₄) kinonları da değişen oranlarda bulunmaktadır. Gelişim için sıcaklık aralığı 24° – 60°C'dir ve bazı türler gelişim için sodyum klorüre gereksinim duymaktadır (Franco ve Labeda, 2014).

Cins üyelerinin DNA G+C oranının %68.1-71.8 mol olduğu belirlenmiştir. *Saccharomonospora* cinsinin tip türü *S. viridis* ATCC 15386^T suşudur (Nonomura ve Ohara 1971).

Saccharomonospora viridis ilk olarak “*Thermoactinomyces viridis*” (Schuermans ve diğ., 1956) olarak yayınlanmış ve daha sonra “*Thermomonospora viridis*” olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Küster ve Locci, 1963). Nonomura ve Ohara (1971) morfolojik ve kemotaksonomik kriterlere dayanarak *Saccharomonospora* cinsini önermişlerdir. Nonomura ve Ohara (1971)’nın bulguları daha sonra fenetik verilerle de desteklenmiştir (Goodfellow ve Pirouz, 1982; McCarthy ve Cross, 1984).

Saccharomonospora cinsi dokuz tür içermektedir. Yakın zamanda, *Saccharomonospora azurea* NA-128^T suşunun genom dizisi yayınlanmış ve genomun 4472 protein kodlayan ve 58 RNA geni içerdiği bildirilmiştir (Klenk ve diğ., 2015).

Saccharomonospora cinsine en yakın cinsler *Prauserella* ve *Thermocrispum* cinsleridir. Tip türlerinin 16S rRNA gen dizi benzerliği %95.2-98.5 arasındadır. *Saccharomonospora saliphila* türünün ve *S. azurea*, *S. halophila* ve *S. paurometabolica* türleri ile DNA-DNA hibridizasyon oranı sırasıyla %46.0, %41.0 ve %42.5 olarak bildirilmiştir (Syed ve diğ., 2008). *Saccharomonospora paurometabolica* türünün *Saccharomonospora halophila* ile DNA-DNA hibridizasyon oranı %53.8 iken (Li ve diğ., 2003), *S. amisosensis* ile *S. marina* arasındaki DNA-DNA hibridizasyon oranı %56.1 olarak bildirilmiştir (Veyisoglu ve diğ., 2013).

Saccharomonospora cinsi hava hiflerinin uç kısımlarında tek spor üretmeleriyle, *Pseudonocardiaceae* familyasının diğer üyelerinden ayrılmaktadır. Substrat miselyumunun parçalanmaması özelliği, *Saccharomonospora* cinsini *Prauserella*, *Saccharopolyspora* ve *Thermocrispum* cinslerinden farklılaştırmaktadır. *Saccharomonospora* cinsi, spor kesesi benzeri yapılar bulundurmamasıyla da *Crossiella*, *Kibdelosporangium*, *Kutzneria*, *Streptoalloteichus* ve *Thermocrispum* cinslerinden ayrılmaktadır. Ayrıca fosfolipit tipi olarak PII ve PIV özellikte olan *Saccharomonospora*, PIII tipteki *Saccharopolyspora* cinsinden kemotaksonomik olarak da farklılık göstermektedir (Franco ve Labeda, 2014).

Saccharomonospora izolatlarının PCR-temelli yöntemlerle veya floresan *in situ* hibridizasyon yöntemiyle (FISH) ortaya çıkarılabileceği bildirilmiştir (Salazar ve diğ., 2000; Neef ve diğ., 2003).

Saccharomonospora üyeleri toprak, sediment, küflü saman, çamur, gübre, bitkisel materyal gibi çeşitli doğal veya sentetik habitatlardan izole edilebilmektedir

(Jin ve diğ., 1998; Song ve diğ., 2001; Al-Zarban ve diğ., 2002; Li ve diğ., 2003; Steger ve diğ., 2007; Maldonado ve diğ., 2009; Liu ve diğ., 2010). Termofilik *Saccharomonospora* türlerinin gübreden izole edilme olasılığı daha yüksektir (Khan ve diğ., 1995; Dees ve Ghiorse, 2001).

Saccharomonospora viridis türünün zatürreye yüksek duyarlılığa neden olan ajanlardan biri olabileceği düşünülmektedir (Greene ve diğ., 1981; Harvey ve diğ., 2001). Cinsin bazı türlerinin Gram-pozitif bakterilere karşı etkili olan antibiyotikler ürettiği bildirilmiştir. Thermoviridin antibiyotiğini üreten *S. viridis* ile *S. glauca*, “*Saccharomonospora caesia*” ve “*Saccharomonospora internatus*” bu türlerden bazılarıdır (Schuurmans ve diğ., 1956; Greiner-Mai ve diğ., 1988). Ayrıca birçok *Saccharomonospora* suşunun polyster, pirinç samanı, mantar gübresi, sentetik atık besin gübresi, proteinler ve nişasta gibi doğal veya insan kaynaklı bileşikleri parçalayabilen enzimleri üretebildiği bilinmektedir (Collins ve diğ., 1992; Abdulla ve El-Shatoury, 2007; Tseng ve diğ., 2007).

2.3.10 *Streptomyces* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Streptomycetales*

Aile: *Streptomycetaceae*

Cins: *Streptomyces*

Streptomycetaceae familyası, *Actinobacteria* sınıfının *Streptomycetales* takımına aittir. Familyanın tip cinsi *Streptomyces* Waksman ve Henrici, 1943, 107^{AL} cinsidir. Familyayı oluşturan organizmalar Gram-pozitif, aerobik, asit-alkol-fast olmayan, nadiren parçalanmış oldukça dallanmış substrat miselyumu oluşturan aktinomisetlerdir. Hava miselyumu olgunlaştığı zaman üç veya daha fazla spor taşıyan spor zincirlerini oluşturmaktadır. Substrat ve hava miselyumuna rengini veren çeşitli pigmentler üretilmektedir. Oksidatif metabolizmaya sahip olan organizmalar, kemoorganotroftir ve farklı pH aralıklarında gelişmektedir. Substrat miselyumunu oluşturan hücrelerin hücre duvarı baskın diamoasit olarak LL- veya mezo-diaminopimelik asit içerirken hava miselyumunu oluşturan sporlar LL-diaminopimelik asit (peptidoglikan tipi A3γ) içermektedir. *Streptomycetaceae*

familyasının kemotaksonomik profili genellikle doymuş izo- ve anteizo-yağ asitlerinin karışımını, dokuz izopren birimi içeren hekza- ve okta-hidrojenli menakinonları, difosfatidilgliserol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinozitol ve fosfatidilinozitol mannozitleri içermektedir. Mikolik asitler bulunmamaktadır. Şeker profilleri büyük oranda galaktoz ve ramnoz içermektedir. Genomik DNA'nın G+C oranı %66 – 74 mol arasında değişmektedir (Kämpfer ve diğ., 2014).

Streptomycetaceae familyası ilk olarak Waksman ve Henrici (1943) tarafından nadiren bölmelere ayrılan, dallanmış ince miseller ve hava hifleri üzerinde sporlar taşıyan aktinobakteriler için oluşturulmuştur. Familyanın tanımlanması temel olarak morfolojik karakterlere dayanılarak yapılmıştır. Pridham ve Tresner (1974), Bergey'in Tanımlayıcı Bakteriyoloji Kılavuzu'nun (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) sekizinci basımında *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Sporichthya* ve *Microellobospora* cinslerini *Streptomycetaceae* familyasının üyeleri olarak sıralamışlardır. *Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* ve *Microellobispora* gibi diğer bazı cinsler morfolojik kriterler temel alınarak *Streptomyces* cinsinden ayırt edilmiştir. Ancak bu cinsler, *Streptomyces* cinsi ile birçok ortak fenotipik ve genotipik özelliğe sahip olmaları nedeniyle *Streptomyces* cinsinin sinonimleri olarak önerilmişlerdir (Goodfellow ve diğ., 1986). Mevcut durumda *Sporichthya* cinsi, *Frankiales* takımındaki *Sporichthyaceae* familyası içerisinde sınıflandırılmaktadır (Kämpfer ve diğ., 2014).

Streptoverticillium cinsi de *Streptomyces* cinsi ile birçok ortak özelliğe sahip olmakla birlikte halka biçimli sporoforları ile *Streptomyces* cinsi üyelerinden ayırt edilebilmektedir. *Streptoverticillium* cinsinin *Streptomyces* ile sinonim olması için verilen öneri, nümerik fenetik ve rRNA/DNA benzerlik özellikleriyle de desteklenmiştir (Williams ve diğ., 1983; Gladek ve diğ., 1985; Witt ve Stackebrandt, 1990; Kämpfer ve diğ., 1991). *Kitasatospora* cinsinin *Streptomyces* ile birleştirilmesi önerisi ise Wellington ve diğ. (1992) tarafından önerilmiştir. Ancak, Zhang ve diğ. (1997) bu cinsleri, temel olarak tüm-hücre hidrolizatlarındaki mezo-A₂pm ile LL-DAP oranına göre yeniden değerlendirmişlerdir. *Kitasatospora* üyelerinin mezo-A₂pm içeriği %49-89 arasında bulunurken, *Streptomyces* üyelerinde bu oranın %1-16 arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca, *Kitasatospora* üyelerinin tüm-hücre hidrolizatlarında galaktoz bulunurken, *Streptomyces* üyelerinde bulunmamaktadır. *Streptacidiphilus* cinsi, Kim ve diğ. (2003) tarafından *Streptomycetaceae* familyası içerisinde tanımlanmıştır. Asidik topraklardan ve atıklardan izole edilen bu asidofilik

aktinomisetler pH 3.5-6.5 (optimum 4.5 – 5.5) arasında gelişmektedir (Kämpfer ve diğ., 2014).

Streptomyces, *Kitasatospora* ve *Streptacidiphilus* cinslerini fenotipik özellikleri temelinde ayırt etmek oldukça zordur. Prokaryotik sistematik için 16S rRNA gen dizi analizleri bir çerçeve oluşturmuş olmasına rağmen, bu moleküle dayanan mevcut sınıflandırma sistemi *Streptomycetaceae* familyası içerisindeki problemleri çözmek için yeterli değildir (Kämpfer, 2006). *Kitasatospora* ve *Streptacidiphilus* cinsleri 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik analizlerde *Streptomycetaceae* familyası içerisinde kararlı, ayrı alt dallar oluşturmaktadır. Ancak, bütün *Streptomyces* türlerinin yer aldığı ağaçta birlikte grup oluşturmakta ve 16S rRNA gen dizi benzerliği birçok *Streptomyces* tür grubuna eşit olarak yüksektir. Multilokus dizi analizi de *Kitasatospora* ve *Streptacidiphilus* cinslerinin türlerinin ayrı kümeler oluşturduğunu göstermiştir. Ancak analize sadece belirli bir grup tür dâhil edilmiş ve her bir genin ayrı analizine dayalı filogenetik analizlerde bu türlerin açık bir biçimde ayrıldığı desteklenmemiştir (Han ve diğ., 2012).

DNA-DNA mikroarray hibridizasyonuna dayanan analizlerde *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* ve *Kitasatospora aureofaciens* türlerinin genom içeriği *Streptomyces coelicolor* A3(2) ile karşılaştırıldığında, *Streptomyces* ve *Kitasatospora* cinslerinin genom dizilerinin yüksek uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Bütün bu nedenlerden dolayı *Kitasatospora* ve *Streptacidiphilus* için ayrı cins statülerinin uygun olup olmadığı tam olarak doğrulanmamıştır (Kämpfer ve diğ., 2014).

Toprakta organik maddenin dönüşümünde görev alan önemli bileşenlerden biri olan *Streptomyces* üyelerinin genom yapısı ile ilgili her geçen gün daha fazla veri elde edilmektedir. *Streptomyces* üyeleri selülozlar ve kitinazlar gibi çeşitli hidrolitik enzimleri de üretebilme özelliği taşımaktadır (Kämpfer ve diğ., 2014).

Streptomyces cinsi, kompleks yaşam döngüsü ve biyoaktif sekonder metabolit üreticisi olması nedeniyle önem taşımaktadır. Ticari olarak kullanılan antibiyotiklerin üçte birinden fazlası *Streptomyces* cinsinden elde edilmektedir. Antibakteriyal, antifungal, antiparazitik ve bağışıklık sistemini baskılayıcı bileşikler, *Streptomyces* türlerinin sekonder metabolizma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Agarı sıvılaştırabilen bir suş olan *Streptomyces coelicolor* A3(2), model organizma olarak kabul edilmektedir. Bu suş, cinsin genel özelliklerini taşımakla birlikte, özellikle misellere bağlanan kırmızı renkli undesilprodigiosin ve mavi renkli çözünabilir

aktinorodin üretimi gibi bazı özellikleriyle farklılık göstermektedir (Kämpfer ve diğ., 2014).

Bazı *Streptomyces* suşlarının tüm-genom analizi yapılmıştır: *S. coelicolor* A3(2) (Bentley ve diğ., 2002), *S. avermitilis* MA-4680 (Ikeda ve diğ., 2003), *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 (Ohnishi ve diğ., 2008) ve *S. cattleya* NRRL 8057 (Barbe ve diğ., 2011).

Günümüze kadar incelenen bütün *Streptomyces* suşlarının, tipik olarak linear topolojiye sahip büyük bir genoma sahip olduğu görülmüştür. *Streptomyces coelicolor* A3(2) genomunun, ilk olarak *Escherichia coli* gibi diğer bakterilerle analogi yapılmasıyla halkasal yapıda olduğu düşünülmüştür. Ancak, kozmid kütüphanelerinin yabanıl tip ve mutant *S. coelicolor* A3(2) ve *S. lividans* suşlarının fiziksel haritalarıyla karşılaştırılması sonucu, yabanıl tip suşlarda kromozomun linear yapıda bulunduğu tespit edilmiştir (Lin ve diğ., 1993; Redenbach ve diğ., 1996). *Streptomyces ambofaciens*, *S. antibioticus*, *S. lipmanii*, *S. moderatus*, *S. parvulus*, *S. rochei*, *S. griseus* ve *S. hygroscopicus* türlerinde de linear kromozom varlığı atımlı-alan jel elektroforezi (PFGE) çalışmalarıyla gösterilmiştir (Lin ve diğ., 1993; Pang ve diğ., 2002).

Streptomyces coelicolor A3(2) suşunun genom uzunluğu 8667 Mbp'dir ve genom 7825 gen içermektedir. Yirmi altı gen kümesi, bilinen veya tahmini sekonder metabolitleri kodlamaktadır (Bentley ve diğ., 2002). *Streptomyces avermitilis* MA-4680 suşu yaklaşık 9025 Mbp uzunlukta genoma sahiptir ve 7574 potansiyel açık okuma dizisi içermektedir (Omura ve diğ., 2001; Ventura ve diğ., 2007). Toplam olarak 30 gen kümesi sekonder metabolizma için gerekli olan genleri kodlamaktadır. Gen sırası bakımından *S. coelicolor* A3(2) ve *S. avermitilis* MA-4680 genomlarında 6500 Mbp uzunluktaki büyük bir bölgenin oldukça korunmuş olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu korunmuş bölgenin canlılık için gerekli genleri içerdiği düşünülmektedir. Kromozomun uç bölgeleri ise değişken yapıdadır ve bu bölgelerin canlılık için gerekli olmayan genleri taşıdığı düşünülmektedir (Ikeda ve diğ., 2003).

Metabolik genlerin *Streptomyces* genomlarının büyük bölümünü oluşturduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Genomun bu özelliğinin *Streptomyces* üyelerinin kompleks morfolojik ve fizyolojik farklılaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Metabolik genler, karbonun depolanmasında işlev gören genleri, pentoz-fosfat yolunda görev alan enzimleri kodlayan genleri, farklı hif hücre tipleri için spesifik olan genleri, yağ asidi biyosentezinde ilk aşama için gerekli olan bazı *fabH* benzeri

genleri kapsamaktadır. Buna karşılık bazı genler *Streptomyces* genomlarında bulunmamaktadır. Örneğin, ekzonukleaz V'in üç alt ünitesinden ikisi olan *recB* ve *recC* genleri *Mycobacterium* gibi diğer aktinobakterilerde bulunduğu halde *Streptomyces* cinsinde bulunmaz. Halkasal kromozomun replikasyondan sonra çözülmesinden sorumlu olan XerCD yolu *Streptomyces* üyelerinde bulunmaz. Bu durum, *Streptomyces* kromozomunun linear olmasıyla da ilişkilidir. *Bacteria* üst aleminde yaygın olarak bulunan ve kompleks hücre bölünmesi sürecine katılan korunmuş *ftsZ* geni de genel olarak *Actinobacteria* üyelerinde bulunmaz. Ayrıca, birçok bakteride bölünme bölgesinin seçiminde görevli *minC* ve *minE* genleri de *Streptomyces* türlerinde bulunmamaktadır (Ventura ve diğ., 2007).

Streptomyces kolonileri genellikle renklenme, sporlanma ve antibiyotik biyosentezinde yüksek düzeyde doğal bir değişkenlik sergilemektedir. Çeşitli antibiyotiklere dirençlilik, A-faktör oluşumu, tirozinaz veya arjinosuksinat sentezi kararsız genlerle kodlanmaktadır. Bu genetik kararsızlık etidyum bromid, mitomisin ve ultraviyole ışık gibi mutajenlerle veya giraz enzimlerini inhibe eden antibiyotiklerle uyarılabilmektedir. Genellikle bu varyasyonlar, büyük kromozomal bölgelerin, öncelikle telomerik ve subtelomerik bölgelerde 2 Mbp uzunluğa kadar DNA'nın silinmesinden kaynaklanmaktadır. Kromozomal DNA'nın değişkenliği, kromozomun linear ve halkasal plazmitlerle, fajlarla, transpozonlarla ve insersiyon elemanlarıyla etkileşime girmesiyle artmaktadır. *Streptomyces* üyeleri çabuk değişen habitatlarda yaşadıkları için yüksek esnekliğe sahip bir genom çabuk adaptasyon için önceliklidir (Kämpfer ve diğ., 2014).

Streptomyces cinsi üyeleri, en fazla çalışılan miselli aktinobakterilerdir. *Streptomyces* üyeleri, sahip oldukları dikkate değer ölçüdeki morfolojik karmaşıklığın, çeşitli sekonder metabolitleri üretebilme yetenekleriyle ilişkili olduğu sporlu organizmalardır (Chater, 2011; Liu ve diğ., 2013). Bir sporun agar ortamında çimlenmesinden 2-3 gün sonra koloninin biyokütlesini oluşturan vejetatif (substrat) miselyum, yoğun beyaz renkli hava miselyumu ile kaplanmaya başlar. Her bir hava hifi, sıklıkla genomun 50'den fazla kopyasını içeren uzun, dallanmamış uç hücrelerini oluşturmak üzere gelişir. Uç hücreleri daha sonra sporulasyon bölmeleriyle çoklu spor öncülleri bölümlerine ayrılır. Bu süreç boyunca eş zamanlı olarak toplanan ve düzenli aralıklarla yerleşen FtsZ halkası septal büyümeye öncülük eder. Spor bölmelerinin oluşumu sırasında yoğunlaşmamış kromozomlar nükleoidler halinde bölünerek, her bir spor öncülü bölmesinde genomun tek kopyasının

bulunması sağlanır. Silindirik öncü spor bölmelerinin oval biçimli sporlara dönüşümü, hücre duvarının değişerek kalınlaşmasının yanı sıra hücre içerisinde kromozom yoğunlaşması gibi dormansiye başlatan değişiklikleri kapsamaktadır (Chandra ve Chater, 2014).

Streptomisetlerin morfolojik gelişimlerinin moleküler temeline ait deneysel verilerin tamamına yakını, üç model organizma üzerine yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bunlardan *Streptomyces coelicolor* A3(2), yoğun olarak genetik çalışmalarda kullanılmaktadır (Hopwood, 2007). Önemli bir antibiyotik olan streptomisin kaynağı olarak kullanılan *S. griseus* türü ise özellikle hormon-benzeri gelişimsel sinyal molekülü A-faktörün üreticisi olması nedeniyle yoğun olarak çalışılmaktadır (Horinouchi ve Beppu, 2007). Üçüncü model organizma *S. venezuelae* ise kloramfenikolün ilk endüstriyel üreticilerinden olup sıvı kültürde spor oluşturmayan ve kademeli olarak sporlanan diğer streptomisetlerin aksine sıvı kültürde hızlı ve eşzamanlı olarak sporlanması nedeniyle gelişimsel model olarak kullanılmaktadır (Bibb ve diğ., 2012). Bu özellikler *S. venezuelae* türünü özellikle birbirini izleyen biyokimyasal, sitolojik ve moleküler gelişimsel aşamaların çalışılması için uygun bir organizma yapmaktadır. *Streptomyces* cinsine ait birçok organizmayla birlikte bu üç model organizmanın da tüm genomu dizilenmiştir (Bentley ve diğ., 2002; Ohnishi ve diğ., 2008).

2.3.11 *Verrucosispora* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Micromonosporales*

Aile: *Micromonosporaceae*

Cins: *Verrucosispora*

Verrucosispora cinsi *Micromonosporaceae* familyasının 16S rRNA gen ağacında ayrı bir kol oluşturmakta olup, familyadaki diğer cinslerden kemotaksonomik ve morfolojik özellikler ile cinse özgü primerler kullanılarak ayırt edilebilmektedir (Goodfellow ve diğ., 2013). Bu cins, genotipik ve fenotipik prosedürlerin birlikte kullanımıyla birbirinden ayırt edilebilen sekiz tür içermektedir: tip tür *Verrucosispora giffhornensis* (Rheims ve diğ., 1998), *Verrucosispora lutea* (Liao ve

diğ., 2009), *Verrucospora maris* (Goodfellow ve diğ., 2012), *V. qiui* (Xi ve diğ., 2012b), *V. sediminis* (Dai ve diğ., 2010), *V. wenchangensis* (Xie ve diğ., 2012), *V. fiedleri* (Goodfellow ve diğ., 2013) ve *V. andamanensis* (Supong ve diğ., 2013). *Verrucospora* türlerinin tip suşları turbalık bataklıktan (*V. gifhornensis*), mangrov toprağından (*V. lutea*, *V. qiui* ve *V. wenchangensis*), deniz sedimentlerinden (*V. maris*, *V. sediminis* ve *V. fiedleri*) ve deniz süngerinden (*V. andamanensis*) izole edilmiştir.

Micromonosporaceae familyasına ait olan *Verrucospora* cinsi Rheims ve diğ. (1998) tarafından oluşturulmuştur. *Verrucospora* türleri Gram-pozitif, asit-fast boyanmayan ve hareketsiz hücrelere sahiptir. Cins üyeleri morfolojik olarak iyi gelişmiş bir substrat miselyumu oluşturan dallanmış hifler, hava miselyumunun bulunmaması veya çok az üretilmesi ve tek, çift veya demetler halinde bulunan, düz, çıkıntılı veya tüylü yüzeylere sahip sporlarla karakterize edilmektedir. Bütün *Verrucospora* suşları ISP1, ISP2, ISP3 ve ISP4 agar ortamında iyi gelişirken ISP5 ve ISP6 agar ortamlarında orta düzeyde gelişim göstermektedir. *Verrucospora* suşlarının koloni rengi açık turuncu, turuncu veya kahverengi-turuncu renkte olabilmektedir. *Verrucospora gifhornensis* türü bazı ISP besi ortamlarında turuncu renkli çözünabilir bir pigment üretmektedir (Rheims ve diğ., 1998).

Verrucospora üyeleri, 20° – 45°C sıcaklıkta ve pH 3.5 – 10 arasında gelişebilen, oksidatif metabolizmaya sahip, aerobik mikroorganizmalardır. Nitratı indirgeyebilme, hidrojen sülfid üretebilme ve aeskulin, arbutin, elastin gibi çeşitli polimerleri parçalayabilme özellikleri değişiklik göstermektedir. Ayrıca *V. lutea* ve *V. sediminis* türlerinin %5 oranında NaCl (w/v) içeren besi ortamlarında gelişebildiği bildirilmiştir (Trujillo ve diğ., 2014).

Karbon ve enerji kaynağı olarak çeşitli karbohidratlar test edilmiş ve bütün *Verrucospora* türlerinin glukozu kullanabildiği görülmüştür. *Verrucospora maris* türünün karbon kaynağı olarak organik asitleri ve alkollerini kullanabildiği bildirilmiştir (Goodfellow ve diğ., 2012). Ayrıca, *V. lutea* dışındaki bütün türlerde L-histidin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Trujillo ve diğ., 2014).

Verrucospora cinsinin kemotaksonomik özellikleri, *Micromonosporaceae* familyasının diğer cinsleriyle aynıdır. Peptidoglikanda diaminoasit olarak mezo-diaminopimelik asit bulunmaktadır. *Verrucospora gifhornensis* ve *V. maris* türlerinin bütün-hücre hidrolizatları şeker olarak mannoz ve ksiloz; *V. lutea*, ksiloz ve glukoz; *V. sediminis* ise glukoz, mannoz ve glikozamin içermektedir. Tanımlayıcı

fosfolipit, fosfatidiletanolamindir. Ancak bütün suşlarda difosfatidilgliserol ve fosfatidilinozitol mannozit de bulunmaktadır. Baskın menakinon tipi MK-9(H₄) olmakla birlikte az miktarda MK-9(H₆), MK-10(H₄), MK-9(H₂) ve MK-9(H₁₀) bulunabilmektedir. *Verrucosipora gifhornensis*, *V. lutea* ve *V. sediminis* türlerinin yağ asidi bileşimi i-C_{16:0}, i-C_{15:0} ve ai-C_{17:0} bileşiklerinden oluşmaktadır. *Verrucosipora maris* türünün yağ asidi profili ise belirlenmemiştir (Trujillo ve diğ., 2014).

Verrucosipora suşları yeni biyoaktif bileşiklerin kaynağı olması nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir. *Verrucosipora gifhornensis*'in diterpen gifhornenolon A ve B bileşiklerini (Shirai ve diğ., 2010), *V. maris*'in polisiklik poliketid abissomisin A-H bileşiklerini (Riedlinger ve diğ., 2004; Keller ve diğ., 2007), *Verrucosipora fiedleri*'nin aminofuran proksimisin A-C bileşiklerini (Fiedler ve diğ., 2008) ürettiği gösterilmiştir. Proksimisin A, *V. maris* türünde de tespit edilmiştir (Schneider ve diğ., 2008). Proksimisinlerin karakteristik yapısal elementi daha önce bilinmeyen bir γ -aminoasit olan 4-amino-furan-2 karboksilik asittir. Proksimisinler zayıf antibakteriyel aktivite göstermekle birlikte, çeşitli insan tümör hücre hatları üzerinde güçlü sitostatik etkiye sahiptir (Fiedler ve diğ., 2008).

Verrucosipora maris AB-18-032^T suşu, Japon Denizi'nden toplanan derin denizel sediment örneğinden izole edilmiştir. Abissomisin bileşikleri, para-aminobenzoik asit yolu için doğal-ürün inhibitörleri ve netropsinin furan analogu olan antitümoral promiksin A üreten bu suş, *Verrucosipora* cinsinin tüm genomu dizilenen ilk üyesidir. Genomun 6.67 Mb uzunlukta ve %70.9 GC içeriğine sahip halkasal bir kromozom ile 0.58 Mb uzunlukta %70.3 GC içeriğine sahip halkasal bir plazmitten oluştuğu gösterilmiştir. Plazmitin 55 gen, kromozomun ise 5947 protein kodlayan gen, 51 tRNA geni ve 9 rRNA geni içerdiği tespit edilmiştir. *Verrucosipora maris* AB-18-032^T suşunun bütün genom dizisi, bilinen veya tahmini sekonder metabolitlerin üretimini kodlayan 23 biyosentetik gen kümesi içermektedir (Roh ve diğ., 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 İzolasyonda Kullanılan Toprak ve Sediment Örnekleri

Aktinobakterilerin izolasyonu için Meke Gölü (Konya), Acıgöl (Konya), Gölcük Gölü (Isparta) ve Nemrut Gölü (Bitlis) kıyı sediment ve toprak örnekleri ile Nevşehir – Acıgöl göl tabanından alınan toprak örneği kullanıldı. İzolasyonda kullanılan örneklerin alındığı lokaliteler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Örnekleme bölgelerinden alınan toprak ve sediment örnekleri, steril plastik poşetler içerisinde laboratuvara getirildikten sonra izolasyon işlemine kadar +4°C’de saklandı.

Çizelge 3.1. İzolasyonda kullanılan örneklerin lokaliteleri

Lokalite	Örnek cinsi	Kısaltma	Lokalite
Acıgöl (Konya)	Toprak	AT	37° 42’ 40’’ K
	Sediment	A	33° 40’ 26’’ D Yükseklik:1019 m
Gölcük Gölü (Isparta)	Toprak	GT (GLT)	37° 44’ 03’’ K
	Sediment	G	30° 29’ 39’’ D Yükseklik:1420 m
Meke Gölü (Konya)	Toprak	MT (MKT)	37° 41’ 23’’ K
	Sediment	M	33° 37’ 30’’ D Yükseklik:1022 m
Nemrut Gölü (Bitlis)	Toprak	NT (NMT)	38° 15’ 34’’ K
	Sediment	N	42° 48’ 39’’ D Yükseklik:2259 m
Acıgöl (Nevşehir)	Toprak	NEV (E)	38° 33’ 5,14’’ K 34° 32’ 38,59’’ D Yükseklik:1314 m

Toprak ve sediment örneklerinin pH değerleri saturasyon çamurunda cam elektrotlu pH-metre kullanılarak ölçülmüştür (Reed ve Cummings, 1945). Ayrıca

toprak örneklerinin organik madde (Jackson, 1958), kalsiyum karbonat (Çağlar, 1958) ve nem içerikleri de belirlenmiştir.

3.2 Aktinobakterilerin İzolasyonu

Oda sıcaklığında kurutulan toprak örnekleri havanda ezildikten sonra 1 gr tartılarak steril 9 ml Ringer çözeltisine eklendi. 10^{-1} 'lik tüpler 30 dk boyunca yavaşça çalkalandıktan sonra 55°C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dk bekletildi. Daha sonra 10^{-1} 'lik tüplerden seri sulandırma yapılarak 10^{-2} 'lik ve 10^{-3} 'lük konsantrasyondaki tüpler hazırlandı. Sediment örneklerinden de 1 gr tartılarak 9 ml Ringer çözeltisine eklendikten sonra seri sulandırma yapılarak 10^{-2} ve 10^{-3} konsantrasyondaki tüpler hazırlandı. Her bir tüpten 200 μl alınarak aktinobakteriler için seçici olan 10 farklı besiyerine ekim yapıldı (Çizelge 3.2). Ekim yapılan petriler 28°C 'de 40 gün inkübasyona bırakılarak gelişen kolonilerin tespiti için her gün kontrol edildi.

Çizelge 3.2. Aktinobakterilerin seçici olarak izolasyonunda kullanılan besi ortamları

Besiyeri (Kısaltma)	Antibiyotik	Referans
Czapek-Dox (CD)	Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$)	Weyland (1969)
ISP2 (SP, F)	Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$)	Shirling ve Gottlieb (1966)
Bazal mineral tuz (B, BM)	Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$)	Duangmal ve diğ. (2005)
Rafinoz-Histidin (R, RH)	Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$)	Vicker ve diğ. (1984)
Nişasta-Kazein (SC, D)	Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$) + Nalidixic acid (10 $\mu\text{g/ml}$)	Küster ve Williams (1964)
Humik-Asit Vitamin (H, HV)	Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$) + Rifampicin (5 $\mu\text{g/ml}$)	Hayakawa ve Nonomura (1987)
Aktinomiset İzolasyon Agarı (A)	Cycloheximide (50 $\mu\text{g/ml}$) + Nalidixic acid (10 $\mu\text{g/ml}$)	Kumar ve diğ. (2012)
SM1 (T)	Cycloheximide (50 $\mu\text{g/ml}$) + Neomycin sulphate (4 $\mu\text{g/ml}$) + Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$)	Tan ve diğ. (2006)
SM2 (V)	Cycloheximide (50 $\mu\text{g/ml}$) + Neomycin sulphate (4 $\mu\text{g/ml}$) + Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$)	Tan ve diğ. (2006)
SM3 (S)	Cycloheximide (50 $\mu\text{g/ml}$) + Nalidixic acid (10 $\mu\text{g/ml}$) + Novobiocin (10 $\mu\text{g/ml}$) + Nystatin (50 $\mu\text{g/ml}$)	Tan ve diğ. (2006)

3.3 İzolatların Saflaştırılması ve Stoklanması

İzolasyon petrilerinde gelişen aktinobakteri kolonileri derimsi, sert, sporlu, yayılmayan koloni gibi özellikleri dikkate alınarak seçildikten sonra TYG agar (DSMZ Besiyeri No. 680) besiyerine çizgi ekim yapılarak saflaştırıldı. TYG agarda iyi gelişmeyen izolatlar için N-Z-Amin agar (DSMZ Besiyeri no. 554) kullanıldı. Saflaştırılan izolatlar TYG agar veya N-Z-Amin agar ortamında yoğun olarak geliştirilerek %25'lik gliserol (v/v) çözeltisi içerisinde stoklandı. Stoklanan izolatlar -20°C'de muhafaza edilmektedir.

3.4 Moleküler Taksonomik Yöntemler

3.4.1 Genomik DNA izolasyonu

Krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen test organizmaları cycloheximide (50 µg/ml) içeren TYG agar (DSMZ Besiyeri No. 680) ortamında geliştirildi. Agar ortamından alınan bir öze dolusu organizma TYG sıvı besi ortamına inoküle edilerek çalkalamalı inkübatörde 28°C sıcaklık ve 180 rpm devirde 14 gün süresince geliştirildi. Antibiyotiksiz TYG agar besi ortamında saflık kontrolü yapılan örnekler, DNA izolasyonunda kullanılmak üzere pellet olarak elde edildi. İzolatlardan genomik DNA ekstraksiyonu için PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) kullanıldı. DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde (%0.8 agaroz (w/v), 1XTBE, 30 dk, 110 V akım) kontrol edildikten sonra 16S rDNA PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

3.4.2 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonu ve analizi

Genomik DNA izolasyonu tamamlanan örneklerin 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu 27F ve 1525R evrensel primerleri kullanılarak gerçekleştirildi (Çizelge 3.3). PCR için GoTaq Hot Start Master Mix (Promega, USA) kullanıldı. Hazırlık aşamasında 50 µl çözelti için 25 µl Hot Start Master Mix, 1 µl 27F primeri (10 µM), 1 µl 1525R primeri (10 µM), 2 µl kalıp DNA (~100 ng) ve 21 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı. Reaksiyon koşulları 94°C'de 2 dk (ön denatürasyon), 94°C'de 1 dk, 55°C'de 2 dk, 72°C'de 3 dk (35 döngü) ve 72°C'de 8 dk olarak gerçekleştirildi. PCR amplifikasyon ürünlerinin dizileme işlemi hizmet alımı kapsamında MacroGen Inc. firmasına yaptırıldı.

Çizelge 3.3. 16S rDNA'nın PCR amplifikasyonunda ve dizilemede kullanılan primerler

Primer	Dizi (5' 3')	Bağlanma bölgesi		Kullanım amacı		Referans
		5'	3'	PCR	Dizileme	
27F	AGAGTTTGATCTGGCT CAG	8	27	X	X	Lane, 1991
MG3F	CAGCAGCCGCGGTAAT AC	520	536		X	Chun, 1995
MG5F	AAACTCAAAGGAATTG ACGG	907	926		X	Chun, 1995
800R	TACCAGGGTATCTAAT CC	800	782		X	Chun, 1995
1525R	AAGGAGGTGWTCCAR CC	1544	1525	X		Lane, 1991

Elde edilen 16S rDNA dizi verileri ChromasPro Version 1.7.6 (Technelysium Pty Ltd) programı kullanılarak hizalandı ve EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Kim ve diğ., 2012) sunucusunda bulunan global hizalama algoritmaları kullanılarak, izolatların en yakın akraba organizmalarla olan 16S rDNA dizi benzerliği belirlendi. Filogenetik analizler için MEGA6, hizalama için CLUSTAL_W yöntemi (Thompson ve diğ., 1994) kullanıldı. Filogenetik ağaçların çizilmesinde Neighbour-Joining (Saitou ve Nei, 1987), Minimum-Evolution (Rzhetsky ve Nei, 1992), Maximum-Parsimony (Fitch 1971) ve Maximum-Likelihood (Felsenstein 1981) algoritmaları kullanıldı. Neighbour-Joining analizinde evrimsel uzaklık matrisi oluşturmak için Jukes & Cantor (1969) modeli kullanıldı. Oluşturulan ağaçların topolojileri veri setlerinin 1000 kez tekrar edildiği bootstrap analizi (Felsenstein, 1985) ile değerlendirildi.

3.5 Fenotipik Karakterizasyon

Yeni tür olma potansiyeli yüksek olan bazı suşların fenotipik karakterizasyonu farklı besiy ortamlarındaki gelişim, temel karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme, belirli bileşikler hidroliz edebilme, sodyum klorür varlığında gelişebilme ve farklı sıcaklık ve pH değerlerine tolerans gibi özellikleri test edilerek yapıldı. Ayrıca bazı suşların farklı karbon kaynaklarını kullanabilme ve inhibitör maddeler varlığında gelişebilme özellikleri Biolog GenIII MicroPlate™ kullanılarak belirlendi.

3.5.1 Kültürel ve morfolojik özellikler

Test suşlarının (Çizelge 3.4) tripton-maya özütü, maya özütü-malt özütü, yulaf ezmesi, inorganik tuzlar-nişasta, gliserol-asparajin, pepton-maya özütü-demir ve tirozin agar (sırasıyla ISP 1-7 besi ortamları; Shirling ve Gottlieb, 1966) ile Czapek's (Weyland, 1969), modifiye Bennett's (Jones, 1949) ve triptik soy agar (TSA, Difco) besi ortamlarındaki gelişim özellikleri 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyondan sonra incelendi. Substrat ve hava miselyum renkleri ile çözünür pigment renginin tanımlanmasında RAL (Reichsausschuß für Lieferbedingungen – Deutsches Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung e.V. – Alman Kalite Güvence ve Sertifikasyon Enstitüsü) renk kodları kullanıldı.

Çizelge 3.4. Fenotipik testlerde kullanılan izolatlar ve referans suşları

Test suşu	Kaynak
<i>Actinomadura</i> sp. 21ATH	Kıyı toprak örneği, Acıgöl, Konya
<i>Actinomadura</i> sp. D310AT	Kıyı toprak örneği, Acıgöl, Konya
<i>Actinomadura</i> sp. NTSP31	Kıyı toprak örneği, Nemrut Gölü, Bitlis
<i>Actinomadura</i> sp. SPNT21	Kıyı toprak örneği, Nemrut Gölü, Bitlis
<i>A. darangshiensis</i>	DSM 45941 ^T , toprak örneği, Kore
<i>A. napierensis</i>	JCM 13850 ^T , toprak örneği, Güney Afrika
<i>A. rugatobispora</i>	JCM 3366 ^T , toprak örneği, Japonya
<i>Jishengella</i> sp. NA12	Kıyı sediment örneği, Nemrut Gölü, Bitlis
<i>J. endophytica</i>	DSM 45430 ^T , <i>Acanthus ilicifolius</i> kök dokusu, Çin
<i>Nocardia</i> sp. GTS18	Kıyı toprak örneği, Gölcük Gölü, Isparta
<i>Saccharomonospora</i> sp. NB11	Kıyı sediment örneği, Nemrut Gölü, Bitlis
<i>S. azurea</i>	JCM 7551 ^T , toprak örneği, Çin
<i>S. glauca</i>	JCM 7444 ^T , gübre örneği
<i>Streptomyces</i> sp. MKSP12	Kıyı sediment örneği, Meke Gölü, Konya
<i>S. specialis</i>	DSM 41924 ^T , toprak örneği, Almanya
<i>S. hainanensis</i>	DSM 41900 ^T , toprak örneği, Çin
<i>S. avicenniae</i>	DSM 41943 ^T , <i>Avicennia mariana</i> rizosfer örneği, Çin
<i>S. zhaozhouensis</i>	DSM 42101 ^T , <i>Aloe arborescens</i> yaprak yüzeyi örneği, Çin
<i>S. sedi</i>	DSM 41942 ^T , <i>Sedum</i> sp. kök dokusu, Çin
<i>S. mayteni</i>	YIM 60475 ^T , <i>Maytenus austroyunnanensis</i> kök dokusu, Çin

Test suşlarının (Çizelge 3.5) spor zincir morfolojisi Pridham ve diğ. (1958)'ne göre taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM 6060, JEOL Ltd. Tokyo, Japan) kullanılarak incelendi. İnkübasyon sonrasında organizmaların yoğun olarak sporlandığı kısımlardan 5 mm çapında agar bloklar alınarak %2'lik gluteraldehit

içerisinde +4°C’de 24 saat bekletilerek fiks edildi. Fiksasyondan sonra her bir agar blok dehidrasyon işlemi için 10 dk süre ile etanol serilerinden (%10 – 100) geçirildi. Daha sonra örnekler sıvı CO₂ ile Critical Point Dryer (Polaron, CPD 7501) cihazında kurutuldu. Kurumuş agar bloklar Gold Sputter ile altın kaplanarak elektron mikroskopunda spor yüzey morfolojilerinin araştırılması için hazır hale getirildi. Taramalı elektron mikroskobu ile spor yüzey morfolojileri görüntülendi.

Çizelge 3.5. Taramalı elektron mikroskopunda spor morfolojisi analiz edilen izolatlar

Test suşu	Kaynak
<i>Streptomyces</i> sp. MKSP12 DSM 100692	Kıyı sediment örneği, Meke Gölü, Konya
<i>Nonomuraea</i> sp. ATR24 DSM 100983	Kıyı toprak örneği, Acıgöl, Konya
<i>Nonomuraea</i> sp. MTC26 DSM 101020	Kıyı toprak örneği, Meke Gölü, Konya
<i>Nonomuraea</i> sp. MTCD27 DSM 101024	Kıyı toprak örneği, Meke Gölü, Konya
<i>Nonomuraea</i> sp. MTSC22 DSM 101019	Kıyı toprak örneği, Meke Gölü, Konya

3.5.2 Nümerik analiz

3.5.2.1 Test suşları ve test ortamlarının inokülasyonu

Streptomyces sp. MKSP12 ve *Jishengella* sp. NA12 suşları en yakın tip türleri ile 68 birim karakter için incelendi (Çizelge 3.6). Test suşlarının inokülasyonu biyokimyasal testler için 5 ml’lik cam tüplere; degradasyon, besinsel ve tolerans testleri için 90 mm çapındaki petrilere yapıldı. İnokülasyon için kullanılan test suşları N-Z-Amin besi ortamında (DSMZ medium no: 554) 28°C sıcaklıkta 21 gün süresince geliştirildi. Steril kürdanlarla agar üzerinden alınan spor örnekleri 5 ml Ringer çözeltisi içeren küçük vidalı tüplere alındı. Her bir suş için hazırlanan spor çözeltisinden 3 µl alınarak test ortamına nokta ekim yöntemiyle inoküle edildi. Gelişim özellikleri inkübasyonun 7. ve 14. günlerinde kontrol edilerek kaydedildi.

Actinomadura spp. 21ATH, D310AT, NTSP31, SPNT21, *Saccharomonospora* sp. NB11 ve *Nocardia* sp. GTS18 suşlarının farklı karbon kaynaklarında ve inhibitör maddeler varlığında gelişebilme özellikleri Biolog GenIII MicroPlate™ kullanılarak belirlendi. Test suşları ve en yakın tip türleri GYM agar ortamında 7 gün geliştirildikten sonra %80-85 (*Nocardia* sp. GTS18 için %92) transmittans değerine sahip inokülasyon tüpleri hazırlandı. İnokülasyon sıvısı mikropilaka kuyucuklarına 100 µl inoküle edildikten sonra 28°C’de 7 gün inkübasyona bırakıldı. Gelişime bağlı

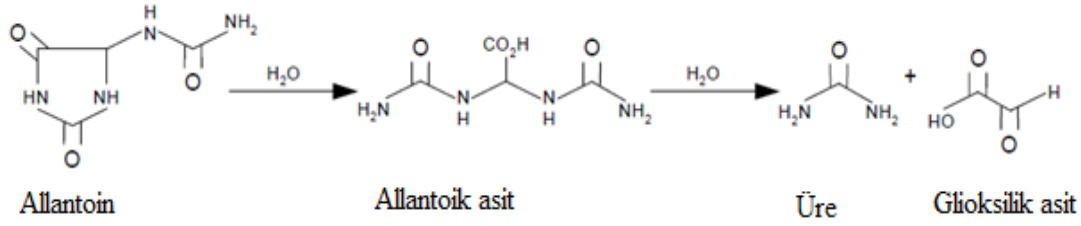
olarak kuyucuklardaki renk değişimi Omnilog cihazı (BIOLOG Inc., Hayward, CA, USA) ile kaydedildi. Veriler R v.1.0.6 programında opm paket programı kullanılarak analiz edildi (Vaas ve diğ. 2012; 2013).

Çizelge 3.6. İzolatların nümerik analizi için uygulanan testler

	A. Biyokimyasal Testler		Karbon kaynakları (%1, w/v)		pH
1	Allantoin hidrolizi	25	Alfa-L-Ramnoz	49	4
2	Arbutin hidrolizi	26	D(+) Galaktoz	50	5
3	Üreaz üretimi	27	D(+) Glukoz	51	6
4	Nitrat indirgenmesi	28	D-Mannitol	52	7
		29	D(+) Mannoz	53	8
	B. Degradasyon Testleri (% w/v)	30	D(+) Melezitoz	54	9
5	DNA (0.2)	31	D(+) Raffinoz	55	10
6	Hipoksantin (0.4)	32	D(+) Sellobiyoz	56	11
7	Jelatin (0.4)	33	D-Sorbitol	57	12
8	Kazein (1)	34	D(+) Trehaloz		
9	Ksantin (0.4)	35	Gliserol		NaCl
10	Ksilan (0.4)	36	İnulin	58	%0
11	L-Tirozin (0.5)	37	Myo-İnozitol	59	%1
12	Nişasta (1)	38	Ksilitol	60	%2
13	Tween 40 (%1, v/v)	39	Sükroz	61	%3
14	Tween 80 (%1, v/v)	40	Palatinoz	62	%4
		41	L(+) Tartarik asit (%0.1, w/v)	63	%5
	C. Besinsel Testler	42	Üre (%0.1, w/v)	64	%6
	Azot kaynakları (%0.1, w/v)			65	%7
15	L-Alanin		D. Tolerans Testleri	66	%8
16	L-Arjinin		Sıcaklık	67	%9
17	L-Asparajin	43	4°C	68	%10
18	L-İzolösin	44	10°C		
19	L-Histidin	45	20°C		
20	L-Metionin	46	28°C		
21	L-Prolin	47	37°C		
22	L-Serin	48	45°C		
23	L-Tirozin				
24	L-Valin				

3.5.2.2 Biyokimyasal testler

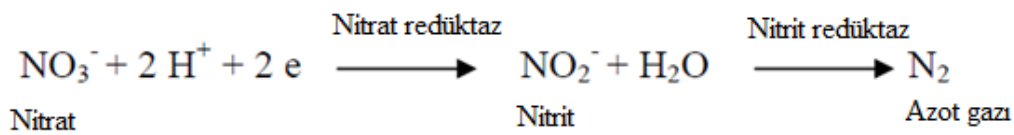
Allantoin hidrolizi (%1, w/v) Gordon ve diğ. (1974) tarafından tanımlanan fenol red ilaveli bazal ortam kullanılarak tespit edildi. Allantoin hidrolizi için pozitif sonuç koyu pembe renk oluşumuyla karakterize olup, iki hidrolitik enzimin varlığını göstermektedir (Şekil 3.1). Test suşları ile inoküle edilen 5 ml’lik tüpler 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyondan sonra incelendi. Negatif kontrol olarak allantoin içermeyen tüpler kullanıldı.



Şekil 3.1. Allantoin hidrolizi

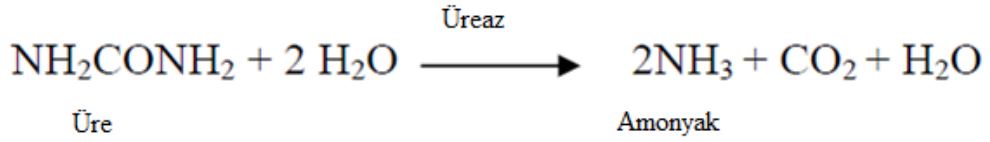
Test suşlarının bir hidrokinon- α -glukopiranozid olan arbutini hidroliz (%0.1, w/v) edebilme özellikleri Williams ve diğ. (1983) tarafından tanımlanan bazal ortam kullanılarak tespit edildi. Arbutin hidrolizi β -glukozidaz enzimiyle katalizlenmekte olup glukoz ve bir hidrokinon oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Hidroliz sonucu oluşan hidrokinonun bazal ortamdaki demir ile reaksiyona girmesi sonucu siyah-kahve renkli melanin benzeri bir polimer oluşmaktadır. Pozitif sonuç, test suşları ile inoküle edilen 5 ml'lik tüplerin 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübe edilmesinden sonra siyah-kahve renk oluşumuyla tespit edildi. Negatif kontrol olarak arbutin içermeyen bazal ortam kullanıldı.

Test suşlarında nitrat ve nitrit redüktaz enzimlerinin varlığını tespit etmek amacıyla yapılan bu test için Goodfellow (1971) tarafından tanımlanan ve nitrat (%0.1, w/v) içeren bazal ortam kullanıldı. Test suşları ile inoküle edilen tüplere 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübe edildikten sonra nitrat redüksiyonu ayıraçları olan solüsyon A ve B eklendi. Solüsyon A içerisindeki sulfanilik asit, nitrit ile reaksiyona girerek solüsyon B içerisindeki α -naftilamin varlığında stabil kırmızı boya oluşturan diazonyum tuzu meydana getirir. Solüsyon B eklenmesiyle gözlenen kırmızı renk nitrit varlığını göstermekte olup nitrat redüktaz aktivitesi için pozitif olarak kaydedildi. Renk değişimi olmaması durumunda tüplere çinko tozu eklendi. Çinko iyonları nitrat redüktaz ile aynı reaksiyonu katalizlediği için çinko tozunun eklenmesiyle kırmızı renk oluşumu ortamda nitrat bulunduğunu göstermekte olup negatif sonuç olarak kaydedildi. Çinko tozu eklenmesiyle renk değişiminin olmaması durumunda nitratın atmosferik nitrojene kadar indirgendiği; suşların nitrat ve nitrit redüktaz enzimleri için pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Nitrat redüksiyonu

Test suşlarının üreyi hidroliz edebilme özellikleri Korn-Wendisch ve Kutzner (1992) tarafından tanımlanan bazal ortama üre (%1, w/v) eklenmesiyle belirlendi. İnoküle edilen tüplerde 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyondan sonra pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedildi. Negatif kontrol olarak üre içermeyen tüpler kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Üre hidrolizi

Kazein (%1, w/v), hipoksantin (%0.4, w/v), nişasta (%1, w/v), ksantin (%0.4, w/v), ksilan (%0.4, w/v), jelatin (%0.4, w/v), DNA (%0.2, w/v), L-Tirozin (%0.5, w/v), Tween 40 (%1, v/v) ve Tween 80 (%1, v/v) tinalizasyonla steril edildikten sonra besi ortamına eklendi. Test organizmaları ile inoküle edilen petriler 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyondan sonra kontrol edildi. Gelişim bölgesinin altında ve etrafında substrat yokluğu pozitif sonuç olarak kaydedildi. Degradasyon testinde kullanılan adenin, guanin, hipoksantin ve ksantin nükleik asitlerin biyosentezine katılan azotlu pürin bazlarıdır. Elastin, hayvansal bağ dokuda bulunan bir proteindir. Ksilanın degradasyonu ise organizmada ksilanaz enziminin varlığını göstermektedir.

Kazein degradasyonu ISP 2 agar besi ortamında (Shirling ve Gottlieb, 1966) incelendi. Test suşları ile inoküle edilen petrilerde 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyondan sonra gelişim bölgelerinin etrafında açık alan bulunması pozitif sonuç olarak kaydedildi.

Jelatin degradasyonu için bazal ortam olarak ISP 2 agar besi ortamı (Shirling ve Gottlieb, 1966) kullanıldı. Test suşları ile inoküle edilen petrilerin üzerine 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyondan sonra ince bir tabaka halinde asidik civa korür çözeltisi döküldü. Asidik çözelti jelatini denatüre ederek çöktürür. Böylece gelişim bölgeleri etrafında açık alan oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedildi.

Nişasta, bitkilerdeki temel polisakkarit olup amiloz ve amilopektin adı verilen iki farklı yapısal konfigürasyona sahip α -D-glukopiranoz alt birimlerinden oluşmaktadır. Nişasta degradasyon testi, hücre dışı α -amilaz enzimlerinin varlığını tespit etmek amacıyla yapıldı. Bu test için çözünebilir nişasta ilaveli ISP 2 agar besi ortamı (Shirling ve Gottlieb, 1966) kullanıldı. Test suşları ile inoküle edilen petrilerin

üzerine 28°C sıcaklıkta 14 gün inkübasyon sonrasında Lügol çözeltisi ilave edildi. Lügol çözeltisi besi ortamındaki nişasta ile lacivert renkli bir kompleks oluşturur. Hücre dışı α -amilaz enzimleri endo-glikozidaz aktivite göstererek nişasta moleküllerini kısa polisakkarit zincirlerine (dekstrinler) ve basit şekerlere hidroliz ederler. Dekstrinler ve basit şekerler ise Lügol çözeltisi ile lacivert renkli bir kompleks oluşturamadıklarından dolayı nişasta hidrolizi yapabilen organizmaların gelişim bölgelerinin etrafında gözlenen açık alan pozitif sonuç olarak kaydedildi.

Tween 40 ve Tween 80 bileşikler sorbitanın sadece yağ asidi bileşenlerinde farklılık gösteren, yüksek moleküler ağırlıklı, suda çözünabilir yağ asidi esterlerinin homolog serileridir. Tween 40 palmitik ve Tween 80 oleik asit içermekte olup spesifik esterazların üretimini ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Test suşları tarafından üretilen esterazlar besi ortamına yayılır ve ester bağlarının hidroliz olmasıyla serbest yağ asitleri besi ortamına salınarak ortamdaki Ca^{2+} iyonlarıyla birleşir. Yağ asitlerinin Ca^{2+} iyonlarıyla birleşmesiyle oluşan çözünmez kalsiyum tuzları çökerek her bir Tween için karakteristik olan beyaz kristalleri oluşturur. Tindalizasyonla steril edilen Tween 40 ve Tween 80 bileşikler bazal besi ortamına (Sierra, 1957) eklendi. İnkübasyon sonunda gelişim bölgelerinin etrafında gözlenen beyaz kristallerden oluşan opak alan pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.5.2.3 Besinsel testler

Test suşlarının enerji ve gelişim için farklı karbon bileşiklerini kullanabilme özellikleri bazal ortam olarak ISP 9 agar (Shirling ve Gottlieb, 1966) kullanılarak belirlendi. Her bir karbon bileşimini içeren çözeltiler tindalizasyon yöntemiyle steril edilerek bazal ortama eklendi. Test suşları, farklı karbon kaynaklarını içeren ISP 9 agar ortamına 3 µl hacimde inoküle edildi. Negatif kontrol olarak karbon kaynağı içermeyen bazal ortam ve pozitif kontrol olarak %1 oranında glukoz içeren bazal ortam kullanıldı. Test suşlarının gelişim özellikleri 14 gün inkübasyondan sonra incelendi. Test ortamındaki gelişim düzeyi pozitif kontrole eşit veya daha fazla olduğunda pozitif olarak, negatif kontrole eşit veya daha az oranda olduğunda negatif olarak kaydedildi.

Test suşlarının farklı azot kaynaklarında gelişebilme özellikleri bazal ortam olarak azot kaynağı kullanım ortamı (Williams ve diğ., 1983) kullanılarak belirlendi. Farklı azot kaynaklarını içeren çözeltiler filtrasyon yöntemiyle steril edildikten sonra bazal ortama eklendi. Test suşları, azot kaynağını içeren agar ortamına 3 µl hacimde

inoküle edildi. Test suşlarının gelişim özellikleri 14 gün inkübasyondan sonra incelendi. Negatif kontrol olarak azot kaynağı içermeyen bazal ortam, pozitif kontrol olarak L-Asparajin içeren ortam kullanıldı. Gelişim düzeyi pozitif kontrole eşit veya daha fazla olduğunda pozitif, negatif kontrole eşit veya daha düşük olduğunda negatif olarak kaydedildi.

3.5.2.4 Tolerans testleri

Test suşlarının farklı sıcaklıklarda (4°C, 10°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C) gelişebilme özellikleri bazal ortam olarak ISP 2 agar (Shirling ve Gottlieb, 1966) kullanılarak belirlendi. Test suşları besi ortamına 3 µl olarak inoküle edildikten sonra 14 gün inkübasyona bırakıldı.

Test suşlarının farklı pH değerine sahip ortamlardaki gelişim özellikleri ISP 2 agar (Shirling ve Gottlieb, 1966) kullanılarak belirlendi. Besi ortamlarının pH ayarlaması 0.1 M potasyum dihidrojen fosfat ve 0.1 M dipotasyum hidrojen fosfat kullanılarak yapıldı. Test suşları besi ortamına 3 µl olarak inoküle edildikten sonra 14 gün inkübasyona bırakıldı.

Test suşlarının NaCl toleransını belirlemek için %1-10 NaCl içeren ISP 2 agar besi ortamları hazırlandı. Besi ortamına 3 µl inoküle edilen suşların gelişim özellikleri 14 gün inkübasyondan sonra kaydedildi.

3.6 Kemotaksonomik Karakterizasyon

Filogenetik analiz sonucu yeni tür olma potansiyeli yüksek olan izolatların kemotaksonomik karakterizasyonları yapıldı (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Kemotaksonomik karakterizasyonu yapılan izolatlar

Cins	İzolat	Kültür Koleksiyon Numarası		Kaynak
		DSMZ	KCTC	
<i>Actinomadura</i>	21ATH	101021	39659	Acıgöl – toprak
	D310AT	101185	39657	Acıgöl – toprak
	NTSP31	101183	39656	Nemrut Gölü – toprak
	SPNT21	101184	39660	Nemrut Gölü – toprak
<i>Jiangella</i>	GTF31	100984	-	Gölcük Gölü – toprak
<i>Jishengella</i>	NA12	100982	39647	Nemrut Gölü – sediment
<i>Nocardia</i>	GTS18	102202	-	Gölcük Gölü – toprak
<i>Nonomuraea</i>	ATC11	101018	39654	Acıgöl – toprak
	ATR24	100983	39655	Acıgöl – toprak
	GTA35	101023	39649	Gölcük Gölü – toprak
	MTCD27	101024	39651	Meke Gölü – toprak
	MTSC22	101019	39653	Meke Gölü – toprak
<i>Saccharomonospora</i>	NB11	101524	39645	Nemrut Gölü – sediment
<i>Streptomyces</i>	ATSP14	100986	39663	Acıgöl – toprak
	MKSP12	100692	39613	Meke Gölü – sediment
	NRH12	102201	-	Nemrut Gölü – sediment
	NTH33	100987	39661	Nemrut Gölü – toprak

3.6.1 Diaminopimelik asit analizi

Suşların diaminopimelik asit izomerlerinin tespiti için Staneck ve Roberts (1974) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. Kapaklı tüp içerisine alınan liyofilize örnek (5 – 10 mg) üzerine 200 µl 6 N HCl eklenerek 100°C sıcaklıkta 12-16 saat boyunca hidroliz edildi. Çözünmeyen materyal santrifüj ile (2000 rpm, 5 dk) ayrıldıktan sonra sıvı kısım Fiolax Schott tüp içerisine alındı. Tüp içerisindeki sıvı materyal evaporatörde 40°C sıcaklıkta buharlaştırıldıktan sonra kalan kısım 0.1 ml distile suda çözündü. Diaminopimelik asit izomerlerinin tespiti için ince-tabaka kromatografisi tekniği kullanıldı. Kromatografi tankı içerisine bir gün öncesinden metanol:distile su:6N HCl:piridin (80:26:4:10, v/v/v/v) bileşiklerinden oluşan çözücü sistem eklendi. Kromatografi plakasının (20x20 cm, No.5716, Merck, Darmstadt, Almanya) tabanından 1 cm yukarısına kurşun kalem ile çizilen hat üzerine her bir örnekten ve 0.01 M LL- ve mezo-A₂pm (Sigma) izomerlerini içeren standart çözelti 3 µl hacimde uygulandı. Kromatografi plakası tamamen kuruduktan sonra tank içerisindeki çözücü sistem içerisine yerleştirildi. Çözücü sistem plakanın üst kısmına yaklaştığında plaka tanktan çıkarılarak kurumaya bırakıldı. Kromatografi plakası aseton içerisinde

Çözünmüş %2'lik ninhidrin ile spreylenecek 100°C sıcaklıktaki etüde 5 dk bekletildikten sonra diaminopimelik asit izomerleri tespit edildi.

3.6.2 Tüm-hücre eker analizi

İzolatların eker hidrolizatları Lechevalier ve Lechevalier (1970) tarafından tanımlanan prosedüre göre gerçekleştirildi. Kapaklı tüpler içerisindeki 25 mg liyofilize örnek üzerine 1 ml 1N H₂SO₄ eklendikten sonra 95°C sıcaklıktaki su banyosunda 2 saat bekletildi. Oda sıcaklığında soğutulan örnekler üzerine pastör pipeti ile Ba(OH)₂ eklenerek 10 ml hacmindeki beherlere aktarıldı. Örnekler, doymuş Ba(OH)₂ ve 1N H₂SO₄ çözeltileri kullanılarak pH 5.0 – 5.5 olacak şekilde ayarlandı ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk) edildikten sonra sıvı kısım hidroliz tüpüne aktarıldı. Tp ağızı sünger ile kapatıldıktan sonra -20°C'de 45°'lik açı ile 2 – 3 saat bekletildi. Örnekler liyofilize edildikten sonra 0.5 ml distile su içerisinde znd ve santrifüj (13500 rpm, 1 dk) edilerek sıvı kısım ependorf tüpler içerisine aktarıldı. Kromatografi tankı içerisine bir gün öncesinden etilasetat:piridin:distile su (100:35:25, v/v/v) bileşiklerinden oluşan çözücü sistem eklendi. Kromatografi plakasının (10x20 cm, No.5552, Merck, Almanya) 1 cm yukarısına kurşun kalem ile çizilen hat üzerine örneklerin eker hidrolizatları ve standartlar (%1 Ramnoz, %1 Riboz, %1 Ksiloz, %1 Arabinoz, %1 Mannoz, %1 Glukoz, %1 Galaktoz) 5 µl hacimde uygulandı. Kromatografi plakası tamamen kuruduktan sonra tank içerisindeki çözücü sistem içerisine yerleştirilerek yaklaşık 2 saat yürütüldü. Plaka tamamen kurutulduktan sonra ikinci kez tank içerisine yerleştirilerek tekrar yürütüldü ve tamamen kuruduktan sonra anilin fitalat ile spreylenecek 105°C sıcaklıktaki etüde 5 dk bekletildi. Örneklerin eker içerikleri standartlar ile karılatırılarak tespit edildi.

3.6.3 Menakinon analizi

İzolatların menakinon analizi için Collins ve diğ. (1985) tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı. Kapaklı tüpler içerisindeki 200 – 500 mg liyofilize örnek üzerine 25 ml kloroform:metanol (2:1, v/v) eklenerek 16 – 18 saat boyunca döner çalkalayıcı ile karıştırıldı. Ardından hücre kalıntılarının tamamen çökmesi beklendikten sonra sıvı kısım filtre kağıdı (Sartorius 388) ile süzülerek 40°C sıcaklıktaki evaporatörde tamamen buharlatırıldı. Kalıntı 400 µl aseton içerisinde çözündükten sonra pastör pipeti ile kromatografi plakasına (Ref 818135) yüklendi. Kromatografi plakası,

çözücü sistem olarak petroleum eter:dietileter (85:15, v/v) bileşiklerini içeren tank içerisine yerleştirilerek yaklaşık 2 saat boyunca yürütüldü. Plaka tamamen kurutulduktan sonra ultraviyole ışık altında tespit edilen menakinon bantları kazınarak filtreli cam şırınga içerisine alındı. Şırınga içerisindeki silika üzerine eklenen dietileterin buharlaşması için şırınga 40°C sıcaklıktaki evaporatöre yerleştirildi. Şırıngadan tüpe süzülen kalıntı evaporatörde tamamen kuruduktan sonra üzerine 300 µl izopropanol eklenerek küçük vial içerisine aktarıldı. İzolatların menakinon içerikleri HPLC (LC-10AS, Shimadzu 63 Co., C18 kolon: 150x4.60 mm, 5 µm partikül boyutu; RP-18 Lichrosorb kolon; Penomenex UK) ile belirlendi. İzokratik mobil faz olarak, oda sıcaklığında 1ml/dk akış hızı ile metanol:izopropanol (3:2, v/v) çözeltisi kullanılarak her bir örnek 20 µl hacimde enjekte edildi. Menakinon bileşikleri UV dedektörde (SPD-10A, Shimadzu Co.) 270 nm dalgaboyunda tespit edilerek kromatogramda (C-R6A Chromatopac, Shimadzu Co.) görüntülendi. Test izolatlarının menakinon içerikleri, standart bileşiklerin tutulma zamanları ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.6.4 Polar lipit analizi

İzolatların polar lipit analizi için Minnikin ve diğ. (1984) tarafından tanımlanan ve Kroppenstedt ve Goodfellow (2006) tarafından modifiye edilen yöntem kullanıldı. Hidroliz için kapalı tüpler içerisine alınan 100 mg liyofilize örnek üzerine 2 ml metanol (90 ml metanol + 10 ml %0.3'lük NaCl) ve 2 ml petroleum eter (b.p. 60°-80°) eklenerek 15 dk boyunca döner çalkalayıcıda karıştırıldı. Ardından santrifüj (1800 rpm, 5 dk) ile ayrılan üst faz uzaklaştırıldıktan sonra tüpler üzerine 1 ml petroleum eter (b.p. 60°-80°) eklendi ve döner çalkalayıcıda 15 dk karıştırıldı. Santrifüjden (1800 rpm, 5 dk) sonra üst faz uzaklaştırıldı ve kalan alt faz vortekslenerek 99°C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk bekletildi. Tüpler 37°C sıcaklıkta 5 dk bekletildikten sonra 2.3 ml CHCl₃ : CH₃OH : %0.3 NaCl (90:100:30, v/v/v) çözeltisi eklenerek 1 saat boyunca döner çalkalayıcıda karıştırıldı. Santrifüjden (1800 rpm, 5 dk) sonra sıvı kısım yeni vidalı tüpler içerisine alınarak üzerine 1.3 ml CHCl₃ ve 1.3 ml %0.3'lük NaCl eklendi ve vortekslenerek iyice karıştırıldı. Santrifüjden (1800 rpm, 5 dk) sonra üst faz uzaklaştırılarak alt faz evaporatör tüpüne aktarıldı ve 40°C sıcaklıktaki evaporatörde 20 – 30 dk boyunca buharlaştırıldı. Kalıntı 0.4 ml CHCl₃ : CH₃OH (2:1, v/v) ile çözünerek küçük vial içerisine alındı.

İzolatların polar lipit profilleri 2-boyutlu ince-tabaka kromatografisi ile belirlendi. Her bir izolat için dört kromatografi plakası (10x10 cm silika-jel, No.1.05721, Merck) kullanıldı. Plakaların köşelerine 20 µl hacimde uygulanan lipit özütleri tamamen kuruduktan sonra kromatografi tankı içerisine yerleştirildi. İlk yürütme için kloroform:metanol:distile su (65:65:4, v/v/v) bileşiklerinden oluşan çözücü sistem; ikinci yürütme için ise kloroform:asetik asit:metanol:distile su (80:15:12:4, v/v/v/v) bileşiklerinden oluşan çözücü sistem kullanıldı. Kromatografi plakaları üzerinde polar lipit profillerinin belirlenmesi için Komagata ve Suzuki (1987) tarafından tanımlanan kimyasal ajanlar kullanıldı. Bütün lipitlerin tespiti için ilk plaka etanol içerisinde çözünmüş %5'lik fosfomolibdik asit (w/v) (Sigma P-1518) ile spreylenecek 120°C sıcaklıkta 10 dk bekletildi. İkinci plaka ilk olarak amino-lipitlerin tespiti için ninhidrin (Sigma N-0507) ile spreylenecek 100°C sıcaklıkta 10 dk bekletildi. Pembe renkli lekeler kurşun kalem ile işaretlendikten sonra aynı plaka fosfo-lipitlerin tespiti için molibdenum mavisi (Sigma M-3389) ile spreylendi. Üçüncü plaka gliko-lipitlerin tespiti için α -naftosülfürik asit ile spreylenecek 100°C sıcaklıkta 10 dk bekletildi. Dördüncü plaka ise kolin içeren lipitlerin tespiti için Dragendorff ajanı (Sigma D-7518) ile spreylenecek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Test suşlarının polar lipit profilleri, standart lipitlerle karşılaştırılarak tespit edildi.

3.6.5 Yağ asidi analizi

Bakteriyel yağ asidi bileşimi gelişim sıcaklığından ve besi ortamı bileşiminden etkilendiği için, yağ asidi analizi yapılacak izolatlar referans suşlarla aynı koşullarda geliştirildikten sonra agar kültür ortamından 40 mg kültür alınarak kapaklı tüpler içerisinde -20°C'de saklandı. Test suşlarının yağ asidi metil esterleri Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (MIDI; Sasser 1990) kullanılarak gaz-sıvı kromatografisi ile analiz edildi. Kromatografi için hücresel yağ asitleri saponifikasyon, metilasyon ve ekstraksiyon aşamalarından sonra saflaştırıldı. Saponifikasyon için kapaklı tüpler içerisindeki örneklerin üzerine Reaktif 1 eklendi ve vortekslendikten sonra 99°C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk bekletildi. Ardından tüpler tekrar vortekslendikten sonra tekrar su banyosuna alınarak 30 dk bekletildi ve buzlu suda soğutuldu. Metilasyon için buzlu suda soğutulan tüplere Reaktif 2 eklendi ve tüpler vortekslendikten sonra 80°C su banyosuna alındı. Su banyosunda 10 dk bekletilen tüpler buzlu suda soğutuldu. Yağ asidi metil esterlerinin ekstraksiyonu için tüplere

Reaktif 3 eklenerek 10 dk boyunca döner çalkalayıcıda karıştırıldı. Santrifüjden (1800 rpm, 5 dk) sonra alt faz uzaklaştırıldı. Tüplerde kalan organik faz üzerine Reaktif 4 eklenerek 5 dk boyunca döner çalkalayıcıda karıştırıldı. Ardından tüplere pastör pipeti hacmi kadar %40'lık NaCl eklendi. Organik fazın 2/3'si kadarı GC tüplerine alınarak kromatografi analizi için hazırlandı. İzolatların yağ asidi içeriği Bilimsel Araştırma Yüksek Kurulu, Doğal Kaynaklar ve Agrobiyoloji Enstitüsü (Salamanca, İspanya) tarafından Mikrobiyal Tanımlama Sistemi (MIDI; Sherlock 6.1) kullanılarak belirlendi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 İzolasyonda kullanılan sediment ve toprak örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Krater göllerinden alınan sediment ve toprak örneklerinin pH değerleri saturasyon çamurunda pH-metre kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca toprak örneklerinin organik madde içeriği Walkley-Black yönteminin (Walkley ve Black, 1934) modifiye edilmiş şekli (Jackson, 1958) kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre Gölcük ve Acıgöl toprak örnekleri az miktarda, Meke ve Nemrut toprak örneklerinin orta düzeyde organik madde içerdiği; Nevşehir – Acıgöl toprak örneğinin ise organik madde içeriğinin çok fazla olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. İzolasyonda kullanılan toprak ve sediment örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

Örnek kaynağı	pH	% Organik madde	% CaCO ₃	% Nem	Tekstür
Meke – toprak	8.19	2.87	0.59	0.80	Kum
Meke – sediment	7.64	-	-	-	-
Gölcük – toprak	8.20	1.73	0.70	0.40	Kum
Gölcük – sediment	7.78	-	-	-	-
Acıgöl – toprak	9.07	1.64	0.59	0.70	Kumlu tın
Acıgöl – sediment	7.66	-	-	-	-
Nemrut – toprak	7.95	2.81	2.62	1.10	Kum
Nemrut – sediment	7.61	-	-	-	-
Nevşehir (Acıgöl) – toprak	8.00	10.10	4.32	3.55	Tınlı kum

Toprak örneklerinin kalsiyum karbonat içeriği Scheibler kalsimetre yöntemi (Jackson, 1958) kullanılarak tayin edilmiştir. Buna göre Meke Gölü, Gölcük Gölü ve Acıgöl toprak örnekleri kireçsiz, Nemrut Gölü toprak örneği az kireçli, Nevşehir – Acıgöl örneği ise kireçli özelliktedir. Nevşehir – Acıgöl örneğinin nem içeriğinin de diğer örneklerle göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Toprak örneklerinin tekstürel yapısı ise hidrometre yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Bouyoucous, 1951).

4.1.2 İzole edilen aktinobakteri suşları

Krater göllerinin kıyısal sediment ve toprak örneklerinden aktinobakteriler için seçici olan 10 farklı besi ortamı kullanılarak 469 izolat elde edildi. Her bir lokaliteden elde edilen izolatlar ISP3 ve ISP6 besi ortamlarındaki substrat ve hava miselyumu rengi, çözünebilir pigment üretimi ve melanin üretimi özellikleri göz önüne alınarak renk gruplarına ayrıldı.

Acıgöl kıyı sediment örneğinden sekiz izolat, toprak örneğinden ise 116 izolat elde edilmiştir. ISP3 ve ISP6 besi ortamlarındaki morfolojik özelliklerine göre bu izolatlar 17 renk grubuna ayrılmıştır (Çizelge 4.2). Her bir renk grubundan en az bir izolat seçilerek (Çizelge 4.2’de koyu renkli ve altı çizili izolatlar) 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. Acıgöl kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler

Renk grup no	ISP3 Agarda gelişim			Melanin üretimi	İzolatlar
	Hava miselyumu rengi	Substrat miselyumu rengi	Çözünebilir pigment rengi		
1	Açık sarı	Açık sarı	-	-	ATSC210, R32AT, <u>S32AT</u>
2	Krem-beyaz	Krem	-	-	<u>D310AT</u> , SC38AT, C32AT, C310AT
3	Çakıl grisi	Bej	-	-	ATS210, ATR23, SC39AT, <u>S39AT</u> , ATS27, <u>R38AT</u> , ATC24, B21AT, HAT33, ATS215, SPAT22, C35AT
4	Açık fildişi	Çakıl grisi	-	-	<u>R34AT</u> , <u>B24AT</u> , C31AT, ATS18, SPAT24, S33AT, SC32AT, SPAT27, SC34AT, , <u>ATS21</u>
5	Beyaz	Gri	-	-	<u>21ATH</u> , SPAT23, <u>ATB16</u> , ATSP24, ATS112, ATS19, ATSC27, <u>HAT23</u> , ATR18, ATS28, <u>AA13</u>
6	Yeşil – Bej	Bej	-	-	HAT32, ATR112, SC35AT, ATS23, ATSC217, HAT24, <u>ATS25</u> , S31AT
7	Turuncu – Kahverengi	Turuncu	-	-	<u>ACIS11</u> , SC33AT, <u>ASM21</u> , <u>ASM11</u> , R36AT, <u>ATD2</u> , R33AT, <u>ASM23</u>
8	Krem	Krem	-	-	<u>11ACIRH</u> , 21ACISC
9	Platin grisi	Kahverengi	Bej – kahverengi	-	ATSC14, ATA32, ATS111, ATC12, ATS11, ATSC18, ATSP22, ATA34, ATSP21, ATSP12, <u>ATB18</u>
10	Kaya grisi	Gri	-	-	SPAT21, R26AT, HAT35, SC36AT, A33AC, <u>ATS212</u>
11	Koyu kahverengi	Siyah – Kahverengi	Kahverengi	+	<u>ATD211</u>
12	Bazaltik gri	Zeytin yeşili	Haki gri	+	S34AT, SPAT28, <u>S37AT</u> , SC37AT, S38AT, SC31AT, ATS211, SC311AT, SPAT26, <u>ATC26</u> , SPAT29, ATC210, SPAT31, HAT34, ATS16, ATSC214
13	Fildişi	Bej	-	+	R27AT, ATS24, ATS17, <u>ATC11</u> , R35AT
14	Beyaz alüminyum	Haki gri	Bej – Kahverengi	-	<u>ATC27</u> , ATR110
15	İstiridye beyazı	Bej	-	+	ATC212, R24AT, <u>C39AT</u> , SPAT25, <u>ATR24</u> , ATS29, R37AT
16	Limon sarısı	Bej – Kahverengi	Haki gri	-	ATSC19, ATC22, C312AT, ATA21, ATS15, ATSC22, <u>S311AT</u> , <u>ATB15</u>
17	Açık gri	Haki gri	Kahverengi	-	ATB111, <u>ATSC13</u> , R31AT, ATR17, ATSP23, <u>ATSP14</u> , ATSP11, B22AT, ATSC111, ATS12

Meke Gölü kıyı sediment örneğinden yedi, toprak örneğinden 56 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar substrat ve hava miselyumu rengi, çözünebilir pigment ve melanin üretimi özellikleri göz önüne alınarak 13 gruba ayrılmıştır (Çizelge 4.3). Her bir renk grubundan en az bir izolat seçilerek (Çizelge 4.3'te koyu renkli ve altı çizili izolatlar) 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Çizelge 4.3. Meke Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler

Renk grup no	ISP3 Agarda gelişim			Melanin üretimi	İzolatlar
	Hava miselyumu rengi	Substrat miselyumu rengi	Çözünebilir pigment rengi		
1	Turuncu	Turuncu	-	-	<u>MTSM23</u> , MSM13, <u>MTSM27</u> , MTSM31, <u>MTSM24</u> , MTSM25, <u>MSM14</u> , MTSC34, MTSM21, MKTS12, <u>MSM11</u> , MSM12
2	Siyah	Siyah	-	-	<u>MKTS11</u> , <u>22MKTSM</u> , 11MKSC
3	Platin grisi	Gri	-	-	23MTH, 25MTH, 31MKTSC, HMT33, <u>MKSP12</u> , MKTC11, MKTC12, MTCD15, MTSC23, MTSC24,
4	Kahverengi	Koyu kahverengi	-	-	<u>MTCD29</u> , <u>MTSC21</u> , <u>MTSC26</u> , MKTC13, MTCD24, MTCD28, MTCD32, MTRH21, MTRH22, MTSC25, MTSC28, MTSC31, MTSC310, MTSM22
5	Gri – Beyaz	Kırmızı – Kahverengi	-	+	<u>MKTC16</u> , MKTC14, MTCD182, MTSC36
6	Mor	Mor	Açık mor	+	<u>MTCD26</u> , <u>MTRH31</u> , MTA13
7	Sarı	Safran sarısı	-	-	<u>MTCD27</u> , <u>MTCD31</u> , MTCD22
8	Gri	Çakıl grisi	-	-	<u>MKTC17</u> , MKTC15, MTSC27, MTCD25
9	Yeşil – Bej	Gri	-	-	<u>MTRH24</u> , <u>MTRH32</u> , MTCD12
10	Fildişi	Fildişi	-	-	<u>MTCD181</u> , MTA14
11	Beyaz	Koyu kahverengi	Turuncu – kahverengi	+	<u>MTSC22</u> , MTRH23
12	Krem	Krem	-	-	<u>SPMT21</u> , 21MKSM
13	Beyaz – Turuncu	Açık turuncu	-	-	<u>MTSM26</u>

Nemrut Gölü kıyı sediment örneğinden izole edilen 12 izolat ve toprak örneğinden izole edilen 39 izolat, ISP3 ve ISP6 besi ortamlarındaki morfolojik özelliklerine göre 11 renk grubuna ayrılmıştır (Çizelge 4.4). Her bir renk grubundan

en az bir izolat seçilerek (Çizelge 4.4'te koyu renkli ve altı çizili izolatlar) 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Çizelge 4.4. Nemrut Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler

Renk grup no	ISP3 Agarda gelişim				İzolatlar
	Hava miselyumu rengi	Substrat miselyumu rengi	Çözünabilir pigment rengi	Melanin üretimi	
1	Gri – Kahverengi	Kahverengi	-	+	NMTC33, NMTC23, NTH32, NMTC12, <u>SPNT21</u> , <u>31NTSP</u>
2	Fildişi	Bej	-	-	<u>NSP312</u> , <u>NTSP21</u> , <u>SPNT22</u> , NMTR33, NMTC21, NMTR21
3	Gri	Gri	-	+	<u>NCD21</u>
4	Turuncu – kahverengi	Bej	-	-	<u>NTSM21</u> , <u>NTSM23</u> , NTSM32
5	Pastel sarı	Turuncu	-	-	<u>NA12</u> , <u>NRH11</u> , <u>NMTS22</u> , NSP31, <u>NSM21</u> , <u>NA14</u> , <u>A31N</u>
6	Çakıl grisi	Haki gri	-	-	<u>NMTC31</u> , NMTC22, NTH31, NMTR31, <u>NMTC13</u> , NMTR22
7	Gri	Platin gri	-	-	<u>NSP111</u> , <u>NSP112</u> , <u>NTSM34</u>
8	Pastel sarı	Platin gri	-	-	<u>NRH12</u> , <u>NTH33</u> , NMTSC31, NTSP32, NMTSC22, <u>NTD23</u> , NMTC32, NMTSC32, NMTSC25, NMTR23, NTH34, NMTR32
9	Krem	Granit gri	-	-	<u>NTSP31</u> , NTSM31, NTSM33, NCD11, NMTS21
10	Krem	Krem	-	-	<u>NB11</u> , NTSP22
11	Siyah	Siyah	-	-	<u>32NTS</u>

Gölcük Gölü sediment örneğinden 27, toprak örneğinden ise 104 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar, morfolojik karakteristiklerine göre 17 renk grubuna ayrılmıştır (Çizelge 4.5). Her bir renk grubundan en az bir izolat seçilerek (Çizelge 4.5'te koyu renkli ve altı çizili izolatlar) 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Çizelge 4.5. Gölcük Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler

Renk grup no	ISP3 Agarda gelişim			Melanin üretimi	İzolatlar
	Hava miselyumu rengi	Substrat miselyumu rengi	Çözünebilir pigment rengi		
1	Krem	Krem	-	-	GF37 , GÖLSP11, GÖLSP16
2	Koyu kahverengi	Koyu kahverengi	Mor menekşe	-	GF32
3	Yeşil bej	Bej	-	-	GTRH24, GB11 , GTSC38, 32GLTCD, GÖLSP23, GLSP34
4	Kaya grisi	Mor	Açık kahverengi	-	GLTC22, GTF14
5	Mor	Mor	Açık mor	+	GTCD21, GTA35 , GTCD28
6	Fildişi	Krem	-	-	GTCD31, GLTR31, GLSP35, GTSM14, BMGLT31, GTF31 , SPGLT31, GLTSC31, GÖLSP13, GÖLSP21
7	Bej	Haki	Turuncu – kahverengi	-	GLSP39, GÖLSP21, GLTR21, GLTSC24, GLSP33, GLTC24, GLSP312, GLTSC22, GLTR24, GLTSP14, GLTSP17, GLTR22, GLTSC21, GF171 , GF315 , GLSP314, GLTSC25, GTSC36
8	Grafit gri	Koyu kahverengi	Bej – Kahverengi	+	GLTR25, GTA23, GLTSC23, GTA36 , GTCD23, GLTC25, GTSC34, GTC23 , GTRH26, GLTSP12, GTCD25
9	Sincap grisi	Bej	Bej – Kahverengi	+	GTA33
10	Bej	Pastel sarı	Bej	+	GTSC35, GTCD24, GTRH31, GTSC21, GTC32 , GRH11 , GTRH25, GTSM31, GTRH32
11	Kahverengi	Koyu kahverengi	Mor – kırmızı	+	FGT32 , GÖLSP172, GTSM12, GTCD22, GÖLSP14, GTSM13, GF36 , GÖLSP17
12	Çakıl grisi	Haki gri	Bej	+	GTD37
13	Beyaz – Krem	Krem	-	-	FGT33 , GLTS13, GLTSP32, SPGT12, GLTS15, SPGT14, GTS11 , GLSP310, GTSC31, GTS18 , GLTBM22, 21GLTSM, GTB31, 21GLTBM, GF22 , GLTSP13, BMGLT32, GTS17

Çizelge 4.5 (devam). Gölcük Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilen aktinobakteriler

Renk grup no	ISP3 Agarda gelişim			Melanin üretimi	İzolatlar
	Hava miselyumu rengi	Substrat miselyumu rengi	Çözünebilir pigment rengi		
14	Gri	Bej	Turuncu – Kahverengi	-	GLTR23, GLTSC28, GLTSP11, GLTBM21, GLSP313, GLTC21, GLTBM31, GTSM15, GLBM22, GTA12 , GLTR26, SPGT11, GTRH22, GLSP31
15	Beyaz – Gri	Turuncu – Kahverengi	Açık kahverengi	-	31GTB , GTSC32, GTSC27, GTD29 , GLTBM33, GLTSP16
16	Turuncu	Turuncu	-	-	GTA34, T11G, SPGT13, GTSM32, GTSM11, GLTS16, GSM24, GSM23 , GLTS12, GSM21, V21G , GTSM33, GÖLSP24, GTSM16, GÖLSP18
17	İpek gri	Krem	-	-	31GTE , GTSC23, GÖLSP12, GTCD27, 31GLTRH, GTCD26, GLTSC27, GLSP38, GTRH21, GÖLSP15, GTRH23, GTSC25

Kapadokya bölgesindeki Nevşehir – Acıgöl tabanından alınan toprak örneğinden 100 izolat elde edilmiş; morfolojik karakteristiklerine göre bu izolatlar 11 renk grubuna ayrılmıştır (Çizelge 4.6). Her bir renk grubundan en az bir izolat seçilerek (Çizelge 4.6’da koyu renkli ve altı çizili izolatlar) 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır.

Çizelge 4.6. Nevşehir – Acıgöl taban toprak örneğinden izole edilen aktinobakteriler

Renk grup no	ISP3 Agarda gelişim			Melanin üretimi	İzolatlar
	Hava miselyumu rengi	Substrat miselyumu rengi	Çözünabilir pigment rengi		
1	Gri - Beyaz	Kahverengi	-	-	ED34 , SCNEV35, NVRH28, DE36
2	Krem	Bej	-	-	EA11 , NEVA23, NVCD34, NVCD38, NVRH24, NVRH25, RNEV22, RNEV31, DE21
3	Kaya grisi	Safir mavisi	Lacivert	-	B11E , CNEV23, EC21 , NVRH35
4	Açık gri	Haki gri	-	-	CNEV24, EB110 , EB111 , NEVB25, NVCD24, NVCD32, NVSC31, RNEV24, RNEV38, SCNEV31, SCNEV32, SCNEV34
5	İstiridye beyazı	Bej	Haki	-	RE34 , CNEV32, SCNEV37, NEVB14, NVSC36, NEVB19
6	Zeytin grisi	Sepya	Siyah – Yeşil	-	ER33
7	Turuncu	Pastel sarı	-	-	EB13 , NEVB28, NVSC32, NVSM32, SCNEV33, SNEV22, SNEV23, SNEV24, SNEV31, SNEV32, SNEV35, SNEV36, SE38 , SPNEV22, 31NEVSM, HNEV33, SNEV37
8	Çinko sarısı	Safran sarısı	-	-	CNEV34, NVRH32, ED37 , RNEV21, RNEV32
9	Çakıl grisi	Bej	-	-	CE31 , NEVA12, NEVA24, NEVC11, NVRH22, RNEV36, RNEV37, DE38 , CNEV22
10	Fildişi rengi	Kahverengi – Bej	-	-	RE35 , CNEV33, NEVA21, NEVB21, NEVB27, NVCD31, NVCD35, NVRH23, NVRH26, NVRH31, NVRH34, NVSC33, NVSC35, NVSC38, RNEV23, SPNEV21
11	İstiridye beyazı	Fildişi rengi	-	-	EC33 , NVRH27, RNEV39, NVRH21, RNEV33

İzolatların tanımlanması amacıyla her bir renk grubundan en az bir temsilci örnek seçilerek 16S rRNA gen dizi analizi yapıldı. Buna göre, 16S rRNA gen dizi analizi yapılan 123 izolatın *Actinomadura*, *Glycomyces*, *Jiangella*, *Jishengella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* ve *Verrucosispora* cinslerinin üyeleri olduğu tespit edildi.

4.1.3 Filogenetik karakterizasyon

4.1.3.1 *Streptomyces* cinsi

16S rRNA gen dizi analizi yapılan 123 izolatın 58'inin *Streptomyces* cinsi üyesi olduğu tespit edildi. Bu izolatların kaynak lokaliteleri, 16S rRNA NCBI GenBank numaraları, en yakın tip türü ve benzerlik oranları ile ilgili bilgiler Çizelge 4.7'de verilmiştir.

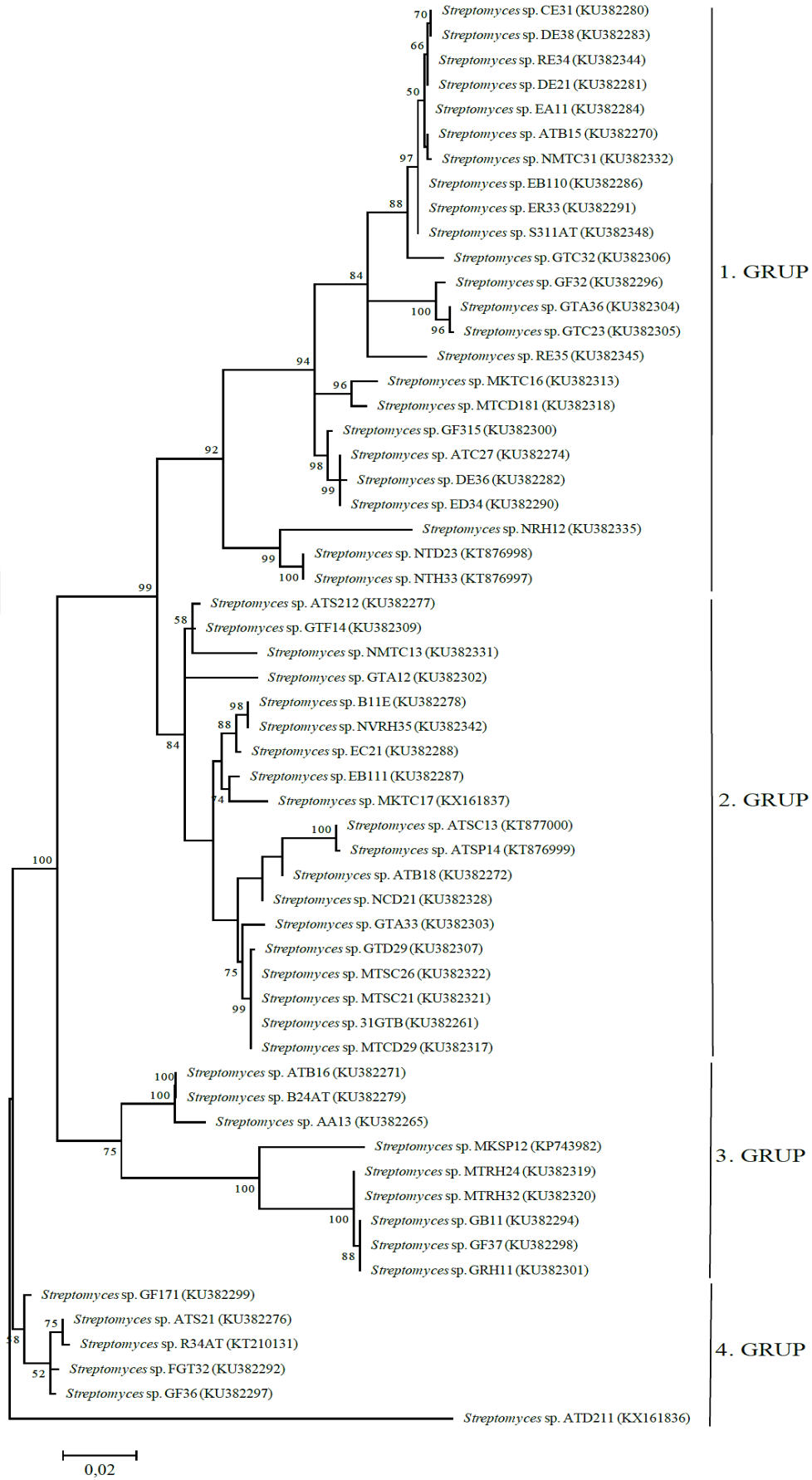
Çizelge 4.7. *Streptomyces* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
31GTB	Gölcük-toprak	KU382261	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	100.00
AA13	Acıgöl-sediment	KU382265	<i>S. smyrnaeus</i> SM3501 ^T	99.59
ATB15	Acıgöl-toprak	KU382270	<i>S. cinereorectus</i> NBRC 15395 ^T	100.00
ATB16	Acıgöl-toprak	KU382271	<i>S. smyrnaeus</i> SM3501 ^T	99.66
ATB18	Acıgöl-toprak	KU382272	<i>S. griseoincarnatus</i> LMG 19316 ^T	99.86
ATC27	Acıgöl-toprak	KU382274	<i>S. galilaeus</i> JCM 4757 ^T	100.00
ATD211	Acıgöl-toprak	KX161836	<i>S. aculeolatus</i> NBRC 14824 ^T	94.58
ATS21	Acıgöl-toprak	KU382276	<i>S. aculeolatus</i> NBRC 14824 ^T	99.31
ATS212	Acıgöl-toprak	KU382277	<i>S. mutabilis</i> NBRC 12800 ^T	99.93
ATSC13	Acıgöl-toprak	KT877000	<i>S. glomeratus</i> LMG 19903 ^T	98.98
ATSP14	Acıgöl-toprak	KT876999	<i>S. glomeratus</i> LMG 19903 ^T	98.91
B11E	Nevşehir	KU382278	<i>S. violaceolatus</i> DSM 40438 ^T	100.00
B24AT	Acıgöl-toprak	KU382279	<i>S. smyrnaeus</i> SM3501 ^T	99.73
CE31	Nevşehir	KU382280	<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593 ^T	99.93
DE21	Nevşehir	KU382281	<i>S. griseorubiginosus</i> NBRC 13047 ^T	100.00
DE36	Nevşehir	KU382282	<i>S. galilaeus</i> JCM 4757 ^T	99.79
DE38	Nevşehir	KU382283	<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593 ^T	99.93
EA11	Nevşehir	KU382284	<i>S. cyaneofuscatus</i> JCM 4364 ^T	100.00
EB110	Nevşehir	KU382286	<i>S. anulatus</i> NRRL B-2000 ^T	99.93
EB111	Nevşehir	KU382287	<i>S. marokkonensis</i> Ap1 ^T	99.39
EC21	Nevşehir	KU382288	<i>S. lienomycini</i> LMG 20091 ^T	99.79
ED34	Nevşehir	KU382290	<i>S. galilaeus</i> JCM 4757 ^T	99.93
ER33	Nevşehir	KU382291	<i>S. anulatus</i> NRRL B-2000 ^T	99.93
FGT32	Gölcük-toprak	KU382292	<i>S. aculeolatus</i> NBRC 14824 ^T	99.52
GB11	Gölcük-sediment	KU382294	<i>S. mayteni</i> YIM 60475 ^T	99.49
GF171	Gölcük-sediment	KU382299	<i>S. aculeolatus</i> NBRC 14824 ^T	99.72
GF315	Gölcük-sediment	KU382300	<i>S. phaeoluteigriseus</i> NRRL ISP5182 ^T	99.72

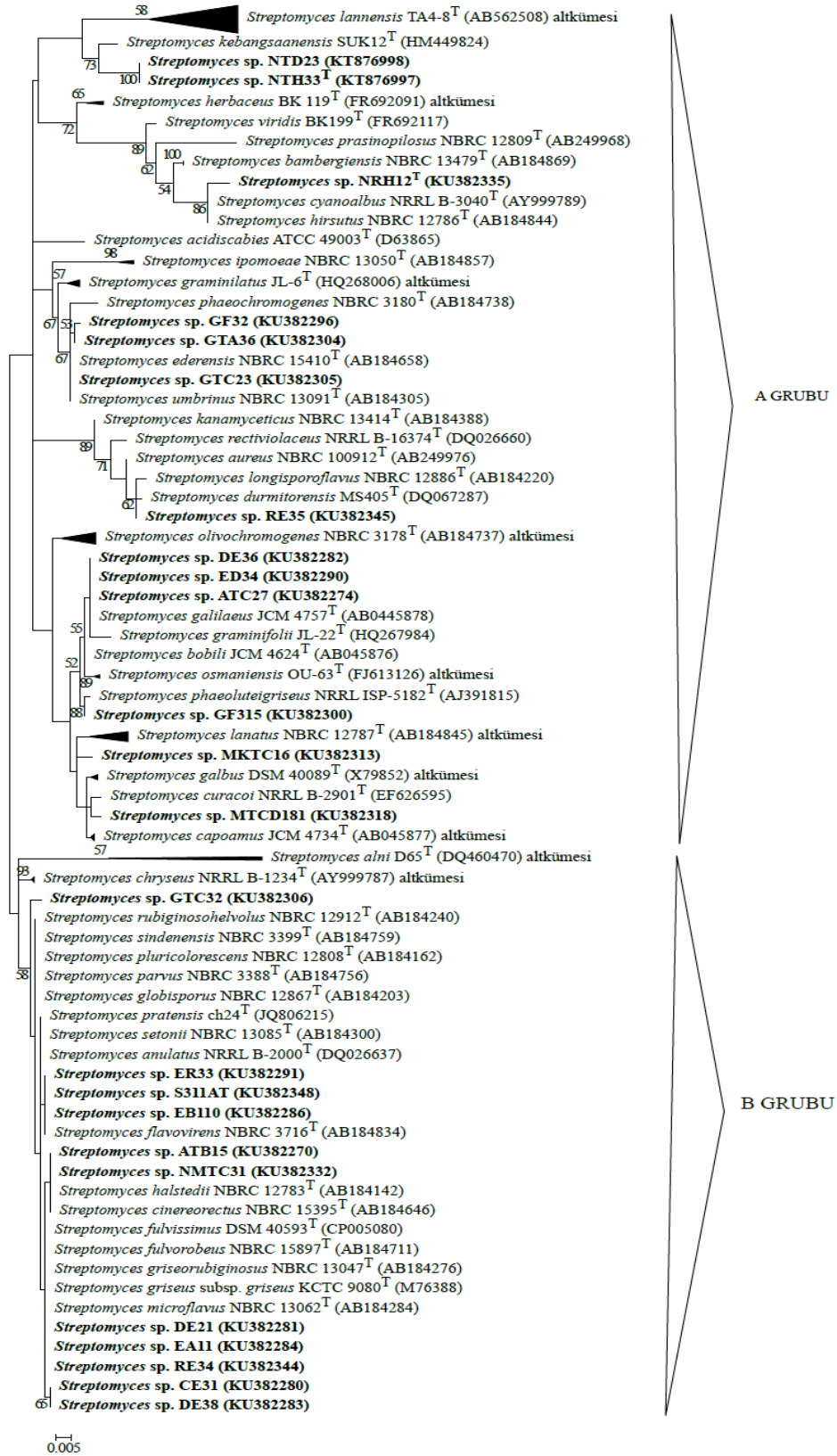
Çizelge 4.7 (devam). *Streptomyces* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
GF32	Gölcük-sediment	KU382296	<i>S. edersensis</i> NBRC 15410 ^T	99.65
GF36	Gölcük-sediment	KU382297	<i>S. aculeolatus</i> NBRC 14824 ^T	99.38
GF37	Gölcük-sediment	KU382298	<i>S. mayteni</i> YIM 60475 ^T	99.49
GRH11	Gölcük-sediment	KU382301	<i>S. mayteni</i> YIM 60475 ^T	99.49
GTA12	Gölcük-toprak	KU382302	<i>S. werraensis</i> NBRC 13404 ^T	99.93
GTA33	Gölcük-toprak	KU382303	<i>S. collinus</i> NBRC 12759 ^T	99.79
GTA36	Gölcük-toprak	KU382304	<i>S. edersensis</i> NBRC 15410 ^T	99.93
GTC23	Gölcük-toprak	KU382305	<i>S. edersensis</i> NBRC 15410 ^T	99.93
GTC32	Gölcük-toprak	KU382306	<i>S. sindenensis</i> NBRC 3399 ^T	99.11
GTD29	Gölcük-toprak	KU382307	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	99.86
GTF14	Gölcük-toprak	KU382309	<i>S. enissocaesilis</i> NRRL B-16365 ^T	100.00
MKSP12	Meke-sediment	KP743982	<i>S. specialis</i> GW 41-1564 ^T	97.21
MKTC16	Meke-toprak	KU382313	<i>S. caeruleatus</i> GIMN4 ^T	99.14
MKTC17	Meke-toprak	KX161837	<i>S. marokkonensis</i> Ap1 ^T	99.04
MTCD181	Meke-toprak	KU382318	<i>S. curacoi</i> NRRL B-2901 ^T	99.32
MTCD29	Meke-toprak	KU382317	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	99.86
MTRH24	Meke-toprak	KU382319	<i>S. mayteni</i> YIM 60475 ^T	99.35
MTRH32	Meke-toprak	KU382320	<i>S. mayteni</i> YIM 60475 ^T	99.35
MTSC21	Meke-toprak	KU382321	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	99.86
MTSC26	Meke-toprak	KU382322	<i>S. ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	100.00
NCD21	Nemrut-sediment	KU382328	<i>S. griseorubens</i> NBRC 12780 ^T	100.00
NMTC13	Nemrut-toprak	KU382331	<i>S. aurantiogriseus</i> NBRC 12842 ^T	99.04
NMTC31	Nemrut-toprak	KU382332	<i>S. cinereorectus</i> NBRC 15395 ^T	99.93
NRH12	Nemrut-sediment	KU382335	<i>S. hirsutus</i> NBRC 12786 ^T	99.18
NTD23	Nemrut-toprak	KT876998	<i>S. kebangsaanensis</i> SUK12 ^T	98.94
NTH33	Nemrut-toprak	KT876997	<i>S. kebangsaanensis</i> SUK12 ^T	98.94
NVRH35	Nevşehir	KU382342	<i>S. violaceolatus</i> DSM 40438 ^T	100.00
R34AT	Acıgöl-toprak	KT210131	<i>S. aculeolatus</i> NBRC 14824 ^T	99.24
RE34	Nevşehir	KU382344	<i>S. griseorubiginosus</i> NBRC 13047 ^T	100.00
RE35	Nevşehir	KU382345	<i>S. durmitorensis</i> MS405 ^T	99.79
S311AT	Acıgöl-toprak	KU382348	<i>S. cinereorectus</i> NBRC 15395 ^T	99.93

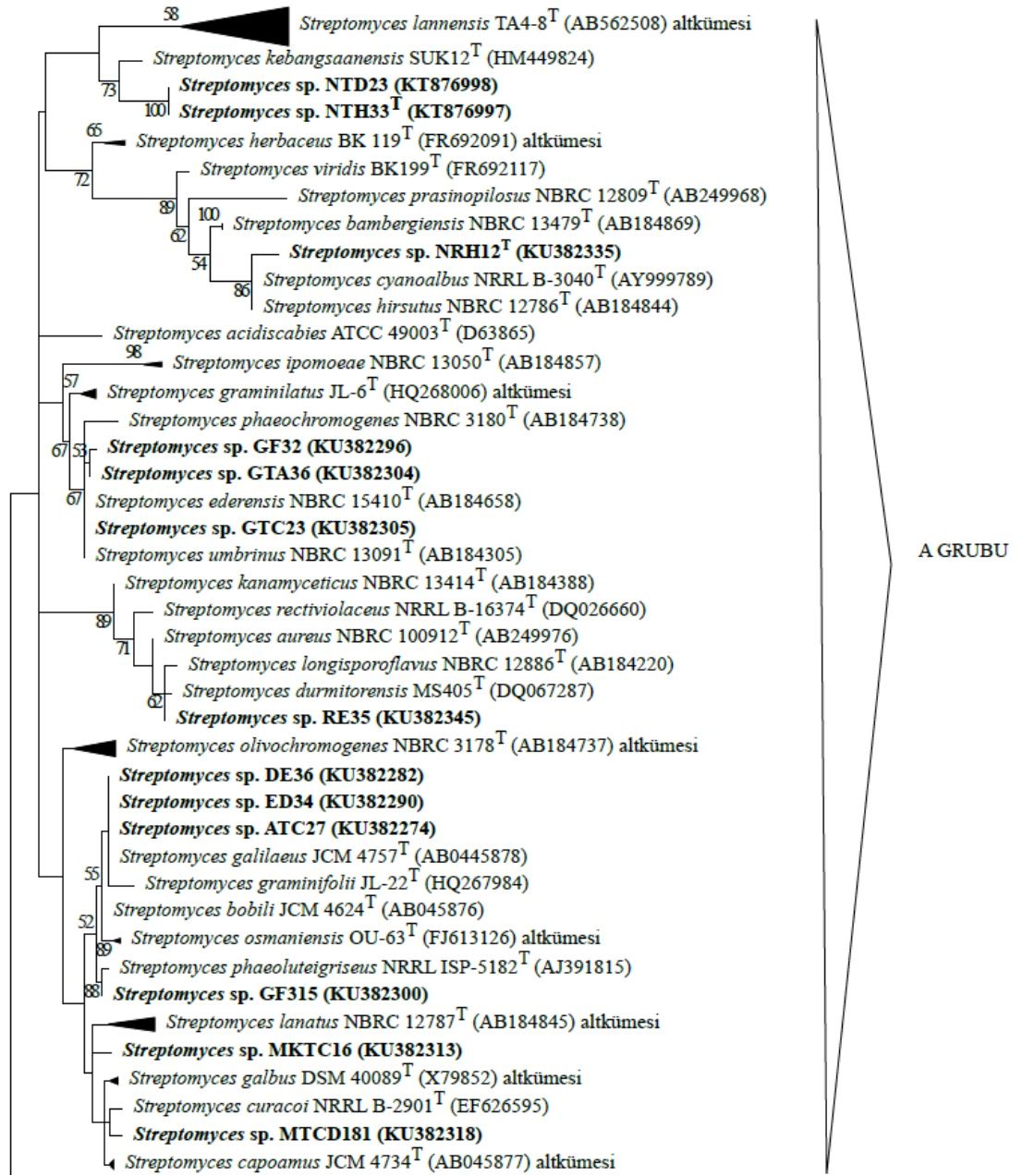
Streptomyces cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişki, Maximum Likelihood ve Neighbour Joining algoritmalarına göre belirlenerek cinse ait izolatlar dört grup halinde incelenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7).



Şekil 4.1. *Streptomyces* cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura – Nei (Tamura ve Nei, 1993) modeline göre oluşturuldu.



Şekil 4.2. 16S rRNA gen dizisine göre 1. Grup *Streptomyces* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı HKY+G+I modeline göre oluşturuldu (Hasegawa ve diğ., 1985). Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi ($\geq 50\%$). Skala 0.005 nükleotid değişimini temsil etmektedir.



Şekil 4.3. 1A Grubundaki *Streptomyces* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.

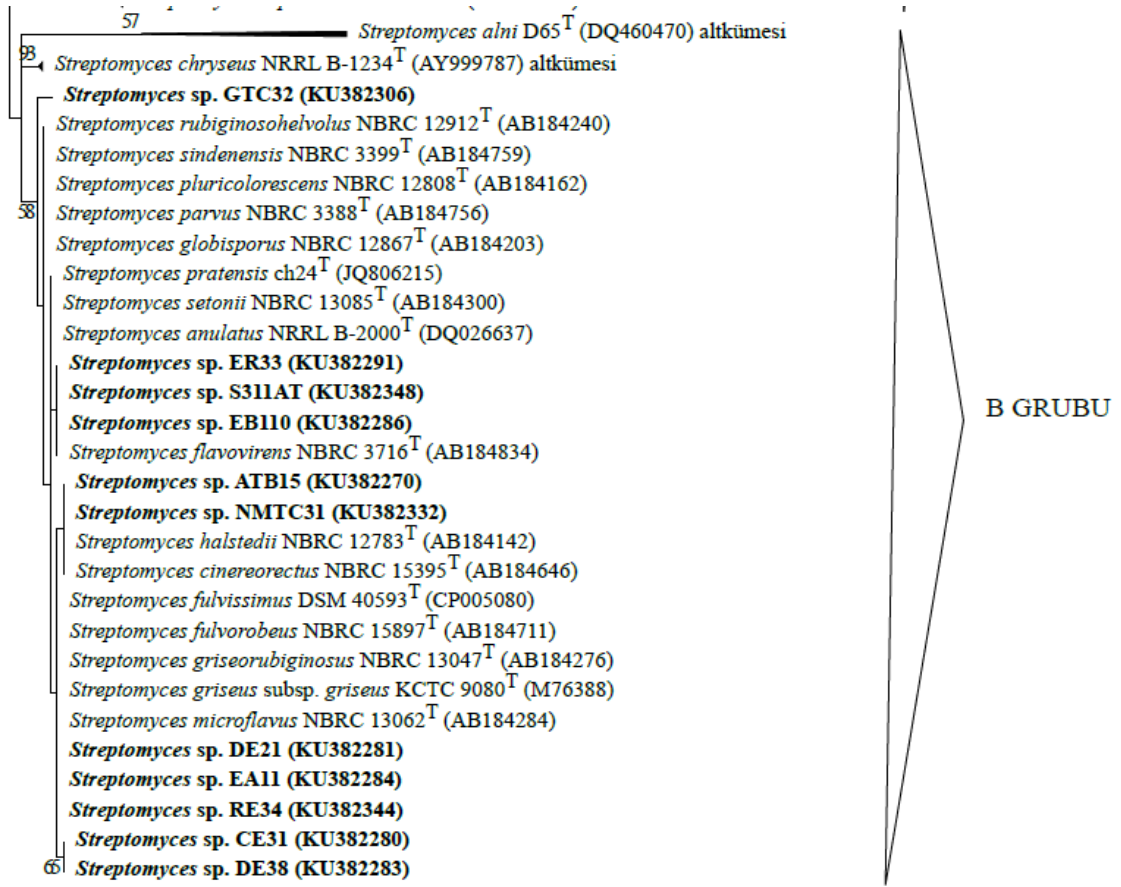
Streptomyces cinsine ait NTH33 ve NTD23 suşları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği %100 olup, her iki izolat *S. kebangsaanensis* SUK12^T tip türü ile %98.94 dizi benzerliği ve 1416 pozisyonda 15 nükleotid farklılığı göstermektedir. *Streptomyces* sp. NRH12 suşu, *S. hirsutus* NBRC 12786^T tip türü ile %99.18 dizi benzerliği ve 1467 pozisyonda 12 nükleotid farklılığı göstermektedir (Şekil 4.3).

Streptomyces spp. GF32, GTA36, GTC23 suşları, filogenetik olarak *S. edderensis* NBRC 15410^T tip türü yakın ilişkilidir. GF32 suşu, GTA36 ile %99.53 dizi benzerliğine (1479 pozisyonda 7 nt farklılığı); GTC23 ile %99.46 dizi benzerliğine (1480 pozisyonda 8 nt farklılığı) sahiptir. *Streptomyces edderensis* NBRC 15410^T tip türü ile GF32 suşu %99.65 dizi benzerliği (1433 pozisyonda 5 nt farklılığı), GTA36 suşu %99.93 dizi benzerliği (1432 pozisyonda 1 nt farklılığı) ve GTC23 suşu %100 dizi benzerliği göstermektedir (Şekil 4.3).

Streptomyces longisporoflavus NBRC 12886^T ve *S. durmitorensis* MS405^T tip türleriyle aynı kümede yerleşen *Streptomyces* sp. RE35 suşu %99.79 dizi benzerliği ve 1463 pozisyonda 3 nükleotid farklılığı ile *S. durmitorensis* MS405^T tip türüne daha yakındır (Şekil 4.3).

Streptomyces galilaeus JCM 4757^T tip türü ile yakın ilişkili olan DE36, ED34 ve ATC27 suşlarının bu tip türü ile olan 16S rRNA gen dizi benzerlikleri sırasıyla %99.79 (1461 pozisyonda 3 nt farklılığı), %99.93 (1462 pozisyonda 1 nt farklılığı) ve %100'dür. *Streptomyces* sp. DE36 suşu ED34 ile %99.86; ATC27 ile %99.80 dizi benzerliğine sahiptir (Şekil 4.3).

Streptomyces sp. GF315 suşunun *S. phaeoluteigriseus* NRRL ISP-5182^T tip türü ile %99.79 16S rRNA gen dizi benzerliği ve 1443 pozisyonda 3 nükleotid farklılığı göstermektedir. *Streptomyces* sp. MKTC16 suşu *S. caeruleatus* GIMN4^T tip türü ile %99.14 gen dizi benzerliği ve 1397 pozisyonda 12 nükleotid farklılığı taşımaktadır. *Streptomyces* sp. MTCD181 suşunun en yakın tip türü *S. curacoi* NRRL B-2901^T suşuna olan 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.32 ve nükleotid farklılığı ise 1470 pozisyonda 10 nükleotiddir (Şekil 4.3).



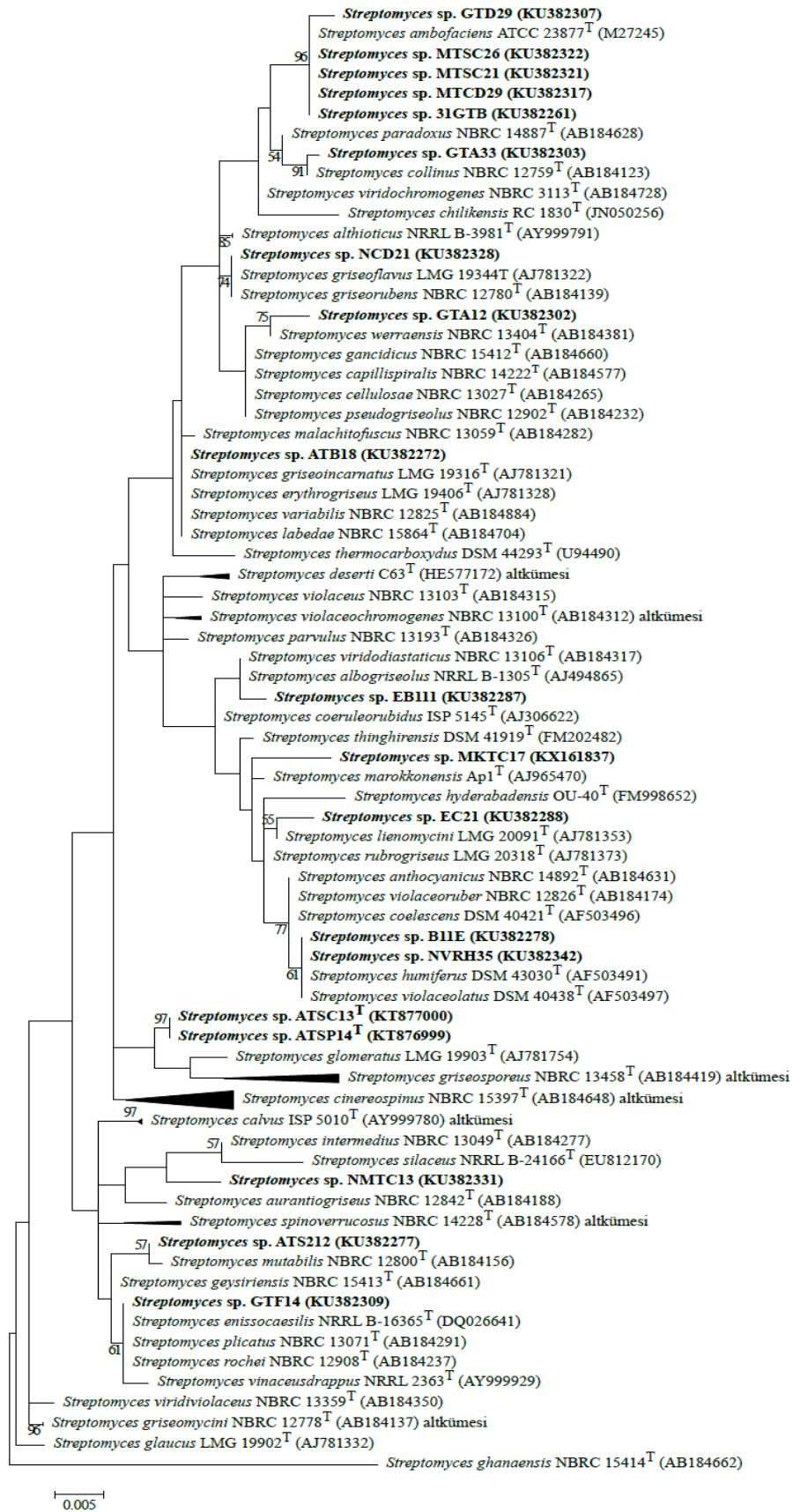
Şekil 4.4. 1B Grubundaki *Streptomyces* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı.

Streptomyces cinsine ait izolatlardan 1B grubunda kümelenen GTC32 suşu %99.11 dizi benzerliği ve 1462 pozisyonda 13 nükleotid farklılığı ile *S. sindenensis* NBRC 3399^T tip türü ile yakınlık göstermektedir. Filogenetik ağaçta *Streptomyces flavovirens* NBRC 3716^T tip türü ile kümelenen ER33 ve EB110 suşları %99.93 ile en yüksek dizi benzerliğini *S. anulatus* NRRL B-2000^T tip türüne göstermektedir. Her iki suşun birbirleri ile olan 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %100'dür. *Streptomyces* sp. S311AT suşunun 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın tip türü %99.93 benzerlik oranı ile *S. cinereorectus* NBRC 15395^T tip türüdür. Yakın olarak kümelenen ATB15 ve NMTC31 suşlarının da en yakın tip türü *S. cinereorectus* NBRC 15395^T olup, 16S rRNA gen dizi benzerlikleri sırasıyla %100 ve %99.93'tür. *Streptomyces* sp. ATB15 suşu, NMTC31 suşu ile %99.73; S311AT suşu ile %99.93 dizi benzerliği göstermektedir (Şekil 4.4).

Streptomyces spp. CE31 ve DE38 suşları %99.93 dizi benzerliği ve 1465 pozisyonda 1 nükleotid farklılığı ile *S. fulvissimus* DSM 40593^T tip türü ile yakınlık

göstermektedir. İki suş arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %100'dür. Yakın olarak kümelenen DE21 ve RE34 suşları *S. griseorubiginosus* NBRC 13047^T tip türüne; EA11 suşu ise *S. cyaneofuscatus* JCM 4364^T tip türüne %100 gen dizi benzerliği göstermektedir (Şekil 4.4).





Şekil 4.5. 16S rRNA gen dizisine göre 2. Grup *Streptomyces* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura 3-parametre (Tamura, 1992) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.005 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

Filogenetik ağaçta *Streptomyces* spp. GTD29, MTSC26, MTSC21, MTCD29, 31GTB izolatları *S. ambofaciens* ATCC 23877^T tip türü ile kümelenmiştir. *Streptomyces* spp. 31GTB ve MTSC26 suşlarının aynı tip türüne 16S rRNA gen dizi benzerliği %100; GTD29, MTCD29 ve MTSC21 izolatlarının dizi benzerliği ise %99.86'dır. *Streptomyces* sp. MTSC26 izolatı, MTSC21 ve MTCD29 ile %100; 31GTB ile %99.93 ve GTD29 ile %99.87 dizi benzerliğine sahiptir (Şekil 4.5).

Streptomyces collinus NBRC 12759^T tip türü ile aynı kümede yer alan GTA33 izolatının aynı tip türüne gen dizi benzerliği %99.79, nükleotid farklılığı ise 1453 pozisyonda 3 nükleotiddir. *Streptomyces* sp. NCD21 izolatının en yakın tip türü *S. griseorubens* NBRC 12780^T suşu olup, 16S rRNA gen dizi benzerliği %100'dür. *Streptomyces* sp. GTA12 izolatı, *S. werraensis* NBRC 13404^T tip türü ile %99.79 dizi benzerliği ve 1463 pozisyonda 3 nükleotid farklılığı göstermektedir. *Streptomyces* sp. ATB18 izolatı *S. griseoincarnatus* LMG 19316^T tip türü ile %99.86 dizi benzerliğine ve 1466 pozisyonda 2 nükleotid farklılığına sahiptir (Şekil 4.5).

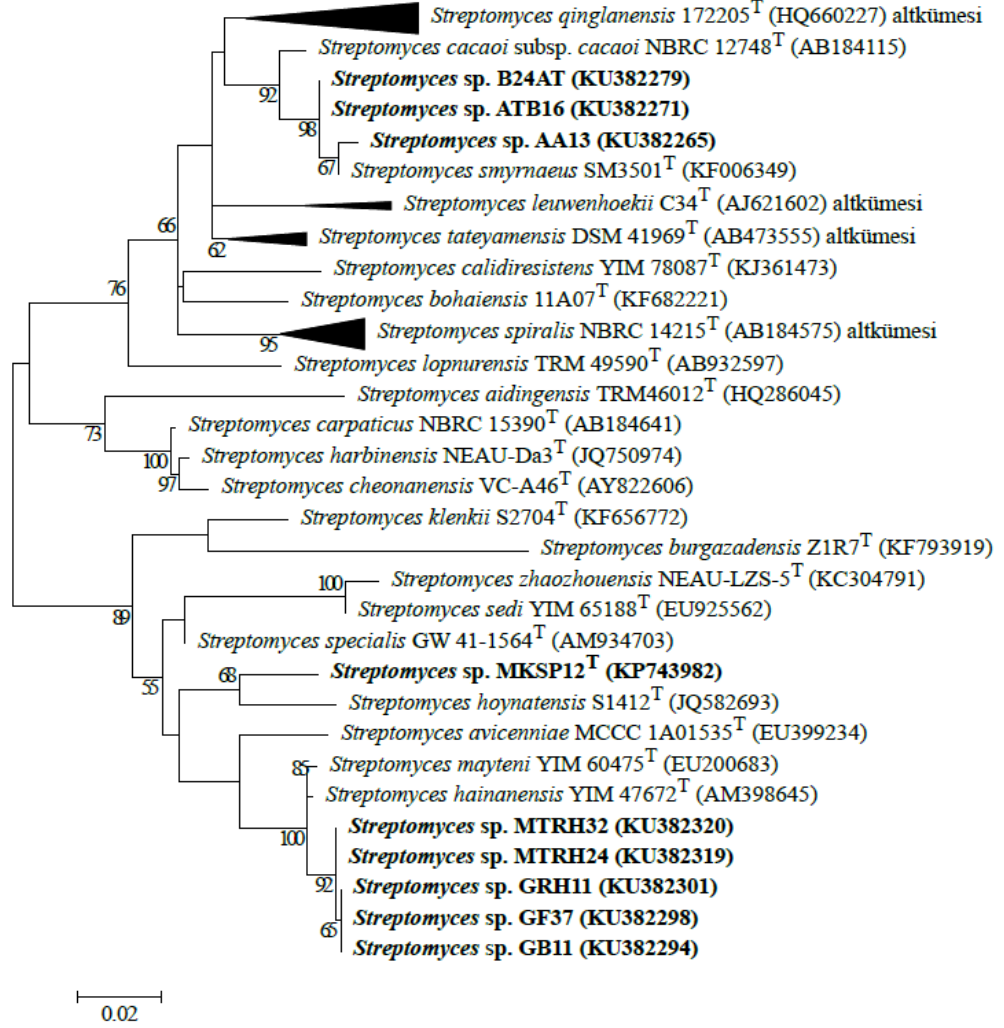
Filogenetik ağaçta *S. viridodiataticus* NBRC 13106^T ve *S. albogriseolus* NRRL B-1305^T türleri ile yakın ilişki gösteren *Streptomyces* sp. EB111 izolatının 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın akrabası, %99.39 benzerlik oranı ve 1465 pozisyonda 9 nükleotid farklılığı ile *S. marokkonensis* Ap1^T tip türüdür. *Streptomyces* sp. MKTC17 izolatının ise aynı tip türü ile gen dizi benzerliği %99.04 ve nükleotid farklılığı 1464 pozisyonda 14 nükleotiddir. *Streptomyces* spp. EB111 ve MKTC17 izolatları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %98.98'dir (Şekil 4.5).

Streptomyces humiferus DSM 43030^T ve *S. violaceolatus* DSM 40438^T tip türleriyle kümelenen *Streptomyces* spp. B11E ve NVRH35 izolatları, en yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliğini %100 ile *S. violaceolatus* DSM 40438^T tip türüne göstermektedir. İki izolatın birbirleri arasındaki dizi benzerlik oranı da %100'dür (Şekil 4.5).

Streptomyces glomeratus LMG 19903^T tip türü ile yakın ilişkili olan *Streptomyces* sp. ATSC13 izolatının aynı tip türüne 16S rRNA gen dizi benzerliği %98.98 (1465 pozisyonda 15 nt farklılığı); *Streptomyces* sp. ATSP14 izolatının ise %98.91'dir (1465 pozisyonda 16 nt farklılığı). İki izolatın birbirleri arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %99.73'tür (Şekil 4.5).

Streptomyces sp. NMTC13 izolatının en yakın akrabası %99.04 gen dizi benzerliği ve 1463 pozisyonda 14 nükleotid farklılığı ile *S. aurantiogriseus* NBRC

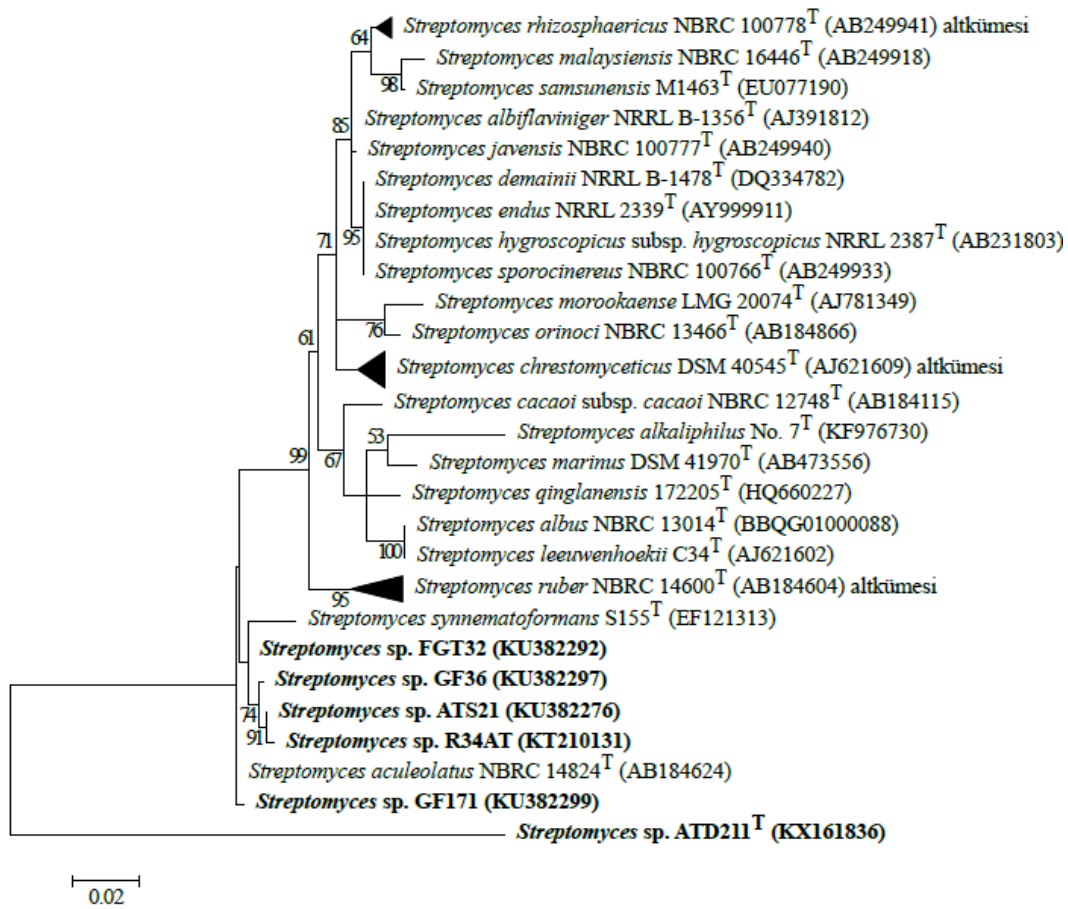
12842^T tip türüdür. *Streptomyces* sp. ATS212 izolatu %99.93 dizi benzerliği ve 1460 pozisyonda 1 nükleotid farklılığı ile *S. mutabilis* NBRC 12800^T tip türüne yakınlık göstermektedir. *Streptomyces* sp. GTF14 izolatının en yakın tip türü olan *S. enissocaesilis* NRRL B-16365^T ile dizi benzerliği ise %100'dür (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. 16S rRNA gen dizisine 3. Grup *Streptomyces* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura 3-parametre (Tamura, 1992) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi ($\geq$ %50). Skala 0.02 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

Filogenetik ağaçta birlikte kümelenen *Streptomyces* sp. AA13, ATB16 ve B24AT izolatlarının en yakın tip türü olan *S. smyrnaeus* SM3501^T tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerliği sırasıyla %99.59 (1472 pozisyonda 6 nt farklılığı), %99.66 (1473 pozisyonda 5 nt farklılığı) ve %99.73 (1472 pozisyonda 4 nt farklılığı) olarak

tespit edilmiştir. *Streptomyces* spp. ATB16 ve B24AT izolatları arasındaki gen dizi benzerliği %100; ATB16 ve AA13 arasındaki benzerlik oranı ise %99.40'tır. *Streptomyces hoynatensis* S1412^T tip türü ile kümelenen *Streptomyces* sp. MKSP12 izolatı 16S rRNA gen dizi analizine göre %97.21 benzerlik oranı ve 1467 pozisyonda 41 nükleotid farklılığı ile *S. specialis* GW 41-1564^T tip türü ile yakınlık göstermektedir. Aynı kümede yer alan *Streptomyces* spp. MTRH24 ve MTRH32 izolatları *S. mayteni* YIM 60475^T tip türü ile %99.35 dizi benzerliği gösterirken; *Streptomyces* spp. GB11, GF37 ve GRH11 izolatlarının aynı tip türüyle 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.49'dur (Şekil 4.6).



Şekil 4.7. 16S rRNA gen dizisine göre 4. Grup *Streptomyces* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura 3-parametre (Tamura, 1992) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.02 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

16S rRNA gen dizi analizine göre dördüncü grupta yer alan izolatlar *Streptomyces aculeolatus* NBRC 14824^T tip türü ile yakın ilişkilidir (Şekil 4.7). *Streptomyces aculeolatus* NBRC 14824^T tip türü ile *Streptomyces* sp. ATD211 arasındaki dizi benzerliği %94.58 (1439 pozisyonda 78 nt) olarak tespit edilmiştir. Aynı tip türü, ATS21 ile %99.31 (1455 pozisyonda 10 nt), FGT32 ile %99.52 (1453 pozisyonda 7 nt), GF171 ile %99.72 (1453 pozisyonda 4 nt), GF36 ile %99.38 (1453 pozisyonda 9 nt) ve R34AT ile %99.24 (1455 pozisyonda 11 nt) gen dizi benzerliği göstermektedir. İzolatların kendi aralarındaki benzerlik oranları ise Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. 4. Grupta yer alan *Streptomyces* spp. izolatları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerlikleri ve nükleotid farklılıkları

	GF171	ATS21	R34AT	FGT32	GF36	ATD211
GF171	---	17/1494	16/1481	8/1495	9/1490	92/1492
ATS21	98.86	---	2/1483	9/1495	7/1489	97/1494
R34AT	98.92	99.87	---	9/1481	7/1480	95/1483
FGT32	99.46	99.40	99.39	---	4/1490	95/1492
GF36	99.40	99.53	99.53	99.73	---	95/1489
ATD211	93.83	93.51	93.59	93.63	93.62	---

4.1.3.2 *Micromonospora* cinsi

Krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden *Micromonospora* cinsine ait 22 izolat elde edilmiştir. Cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, 16S rRNA gen dizilerinin NCBI GenBank numaraları ve EzTaxon sunucusuna göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. *Micromonospora* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
22MKTSM	Meke-toprak	KU382260	<i>M. chalybaphumensis</i> MC5-1 ^T	99.72
32NTS	Nemrut-toprak	KU382263	<i>M. eburnea</i> LK2-10 ^T	99.17
A31N	Nemrut-sediment	KU382264	<i>M. zae</i> NEAU-gq9 ^T	99.66
ACIS11	Acıgöl-sediment	KU382266	<i>M. zae</i> NEAU-gq9 ^T	99.79
ASM11	Acıgöl-sediment	KU382267	<i>M. zae</i> NEAU-gq9 ^T	99.79
ASM21	Acıgöl-sediment	KU382268	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.72
ASM23	Acıgöl-sediment	KU382269	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.79
ATD2	Acıgöl-toprak	KU382275	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.59
MKTS11	Meke-toprak	KU382314	<i>M. chalybaphumensis</i> MC5-1 ^T	99.58
MSM11	Meke-sediment	KU382315	<i>M. echinospora</i> ATCC 15837 ^T	99.64
MSM14	Meke-sediment	KU382316	<i>M. crenea</i> CR30 ^T	99.72
MTSM23	Meke-toprak	KU382323	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.73
MTSM24	Meke-toprak	KU382324	<i>M. zae</i> NEAU-gq9 ^T	99.66
MTSM27	Meke-toprak	KU382326	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.73
NA14	Nemrut-sediment	KU382327	<i>M. echinospora</i> ATCC 15837 ^T	99.86
NMTS22	Nemrut-toprak	KU382333	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.79
NRH11	Nemrut-sediment	KU382334	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.59
NSM21	Nemrut-sediment	KU382336	<i>M. zae</i> NEAU-gq9 ^T	99.66
NTSM21	Nemrut-toprak	KU382338	<i>M. equina</i> Y22 ^T	99.42
NTSM23	Nemrut-toprak	KU382339	<i>M. equina</i> Y22 ^T	99.71
S32AT	Acıgöl-toprak	KU382346	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	99.38
V21G	Gölcük-sediment	KU382352	<i>M. pisi</i> GUI 15 ^T	99.93



Şekil 4.8. 16S rRNA gen dizi analizine göre *Micromonospora* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı GTR (Nei ve Kumar, 2000) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.05 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

Filogenetik ağaçta *Micromonospora* spp. A31N, ACIS11, ASM11, MTSM24, NSM21 izolatları *Micromonospora zamorensis* CR38^T, *M. zae* NEAU-gq^T ve *M. jinlongensis* NEAU-GRX11^T tip türleri ile kümelenmiştir. 16S rRNA gen dizi analizine göre *Micromonospora* spp. A31N, MTSM24 ve NSM21 izolatları %99.66 benzerlik oranı ve 5 nt farklılığı ile *M. zae* NEAU-gq^T tip türüne yakınlık göstermektedir. *Micromonospora* spp. ACIS11 ve ASM11 izolatları ise aynı tip türüne %99.79 dizi benzerliği ve 3 nükleotid farklılığı göstermektedir. A31N izolatı MTSM24 ve NSM21 izolatlarına %99.73 dizi benzerliği göstermektedir. ACIS11 ve ASM11 izolatlarının birbirleri arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %100'dür (Şekil 4.8).

Micromonospora spp. ASM21, ASM23, ATD2, MTSM23, MTSM27, NMST22, NRH11, S32AT izolatları filogenetik olarak *Micromonospora saelicesensis* Lupac 09^T tip türü ile yakın ilişkilidir. ATD2 ile ASM23 izolatları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ve MTSM23 ile MTSM27 izolatları arasındaki dizi benzerliği %100'dür.

Micromonospora citrea DSM 43903^T tip türü ile kümelenen *Micromonospora* spp. 22MKTSM ve MKTS11 izolatlarının 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın tip türü olan *M. chaiyaphumensis* MC5-1^T ile dizi benzerlikleri sırasıyla %99.72 (1436 pozisyonda 4 nt) ve %99.58 (1436 pozisyonda 6 nt) olarak tespit edilmiştir.

Filogenetik ağaçta *M. tulbaghia* TVU1^T ve *M. echinospora* ATCC 15837^T tip türleri ile kümelenen *Micromonospora* spp. MSM11 ve NA14 izolatları *M. echinospora* ATCC 15837^T ile sırasıyla %99.64 (1408 pozisyonda 5 nt) ve %99.86 (1408 pozisyonda 2 nt) dizi benzerliği göstermektedir. MSM11 ve NA14 izolatlarının birbirleri arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %99.73'tür.

Micromonospora sp. MSM14 izolatının en yakın tip türü *M. crenea* CR30^T ile dizi benzerliği %99.72, nükleotid farklılığı ise 1432 pozisyonda 4 nükleotiddir.

Micromonospora viridifaciens DSM 43909^T ile kümelenen *Micromonospora* sp. 32NTS izolatı, 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın tip türü olan *M. eburnea* LK2-10^T ile %99.17 dizi benzerliği ve 1438 pozisyonda 12 nükleotid farklılığı taşımaktadır. *Micromonospora* sp. NTSM21 izolatı ise %99.42 dizi benzerliği ve 1375 pozisyonda 8 nükleotid farklılığı ile *M. equina* Y22^T ile yakınlık göstermektedir. *Micromonospora* sp. NTSM23 izolatının *M. equina* Y22^T tip türü ile dizi benzerliği %99.71, nükleotid farklılığı ise 1375 pozisyonda 4 nükleotiddir.

Micromonospora spp. NTSM21 ve NTSM23 izolatlarının birbirleri arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise %98.99'dur. 16S rRNA gen dizi analizine göre *Micromonospora* sp. V21G izolatının en yakın tip türü olan *M. pisi* GUI15^T ile dizi benzerlik oranı %99.93, nükleotid farklılığı ise 1426 pozisyonda 1 nükleotiddir.

4.1.3.3 *Actinomadura* cinsi

Krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden *Actinomadura* cinsine ait 14 izolat elde edilmiştir. İzolatların kaynak lokaliteleri, 16S rRNA NCBI GenBank numaraları ve en yakın tip türleri ile benzerlik oranları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. *Actinomadura* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
21ATH	Acıgöl-toprak	KT876994	<i>A. rugatobispora</i> IFO 14382 ^T	98.86
31NTSP	Nemrut-toprak	KT876992	<i>A. madurae</i> DSM 43067 ^T	98.82
ATC26	Acıgöl-toprak	KU382273	<i>A. sediminis</i> YIM M 10931 ^T	99.12
D310AT	Acıgöl-toprak	KT876993	<i>A. darangshiensis</i> DSL5-70 ^T	97.11
GTD37	Gölcük-toprak	KU382308	<i>A. bangladeshensis</i> 3-46-b3 ^T	99.38
HAT23	Acıgöl-toprak	KT210129	<i>A. rugatobispora</i> IFO 14382 ^T	98.93
NSP111	Nemrut-sediment	KU382329	<i>A. nitritigenes</i> DSM 44137 ^T	99.86
NSP112	Nemrut-sediment	KU382330	<i>A. nitritigenes</i> DSM 44137 ^T	99.79
NTSM34	Nemrut-toprak	KU382340	<i>A. nitritigenes</i> DSM 44137 ^T	99.79
NTSP31	Nemrut-toprak	KT876996	<i>A. napierensis</i> B60 ^T	99.18
R38AT	Acıgöl-toprak	KU382343	<i>A. apis</i> IM17-1 ^T	99.19
S37AT	Acıgöl-toprak	KT210130	<i>A. sediminis</i> YIM M 10931 ^T	99.18
S39AT	Acıgöl-toprak	KU382347	<i>A. apis</i> IM17-1 ^T	99.12
SPNT21	Nemrut-toprak	KT876995	<i>A. madurae</i> DSM 43067 ^T	98.82

Filogenetik olarak *Actinomadura nitritigenes* DSM 44137^T tip türü ile yakın ilişkili olan *Actinomadura* sp. NSP111 izolatının 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.86 (1436 pozisyonda 2 nt) iken, *Actinomadura* spp. NSP112 ve NTSM34 izolatlarının dizi benzerlik oranı %99.79, nükleotid farklılığı ise 1436 pozisyonda 3 nükleotiddir. NSP111 izolatının NSP112 ve NTSM34 ile dizi benzerliği %99.93'tür (Şekil 4.9).

Actinomadura sp. ATC26 ve S37AT izolatlarının 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın akrabası *Actinomadura sediminis* YIM M 10931^T tip türü olup,

izolatların dizi benzerlik oranları sırasıyla %99.12 (1470 pozisyonda 13 nt) ve %99.18 (1467 pozisyonda 12 nt) olarak tespit edilmiştir. *Actinomadura* spp. ATC26 ve S37AT izolatlarının birbirleri arasındaki benzerlik oranı ise %99.73'tür (Şekil 4.9).

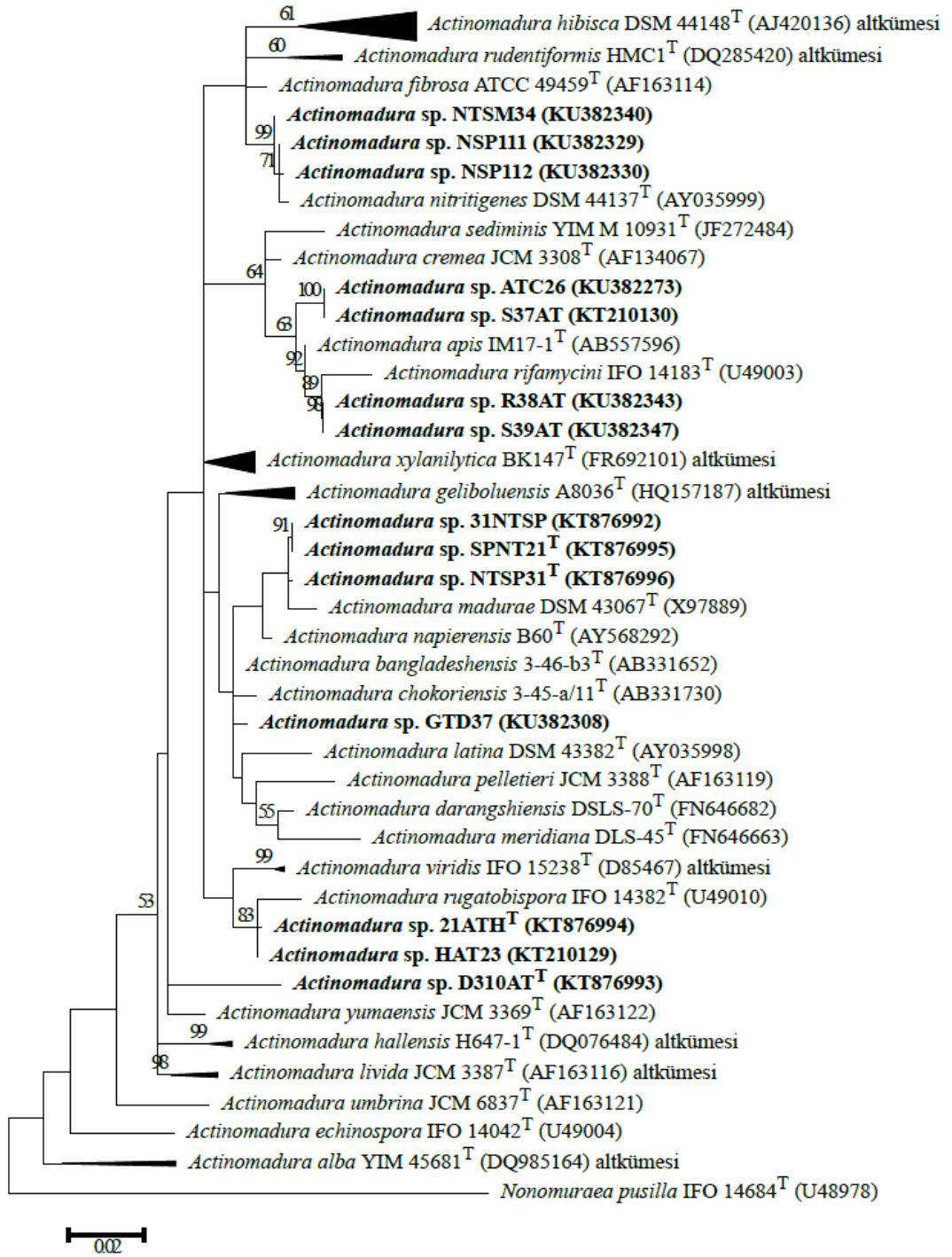
Actinomadura apis IM17-1^T ve *A. rifamycini* IFO 14183^T tip türleri ile kümelenen *Actinomadura* spp. R38AT ve S39AT izolatlarının 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın akrabası olan *A. apis* IM17-1^T tip türü ile benzerlik oranları sırasıyla %99.19 (1476 pozisyonda 12 nt) ve %99.12 (1480 pozisyonda 13 nt) olarak tespit edilmiştir. İzolatların birbirleri arasındaki dizi benzerlik oranı ise %100'dür (Şekil 4.9).

Actinomadura spp. 31NTSP, SPNT21 ve NTSP31 izolatları *A. madurae* DSM 43067^T ve *A. napierensis* B60^T tip türleriyle kümelenmiştir. *Actinomadura* spp. 31NTSP ve SPNT21 izolatları *A. madurae* DSM 43067^T tip türüyle %98.82 dizi benzerlik oranı ve 1445 pozisyonda 17 nükleotid farklılığı göstermektedir. SPNT21 ve 31NTSP izolatlarının birbirleri arasındaki dizi benzerlik oranı ise %100'dür. *Actinomadura* sp. NTSP31 izolatının en yakın tip türü *A. napierensis* B60^T ile olan dizi benzerlik oranı %99.18 ve nükleotid farklılığı ise 1344 pozisyonda 11 nükleotiddir (Şekil 4.9).

Actinomadura sp. GTD37 izolatı en yakın tip türü *A. bangladeshensis* 3-46-b3^T ile %99.38 dizi benzerlik oranı ve 1458 pozisyonda 9 nükleotid farklılığı göstermektedir (Şekil 4.9).

Actinomadura rugatobispora IFO 15238^T tip türü ile kümelenen *Actinomadura* spp. 21ATH ve HAT23 izolatlarının aynı tip türüne benzerlik oranları sırasıyla %98.86 (1405 pozisyonda 16 nt) ve %98.93 (1405 pozisyonda 15 nt) olarak tespit edilmiştir. 21ATH ve HAT23 izolatlarının birbirleri arasındaki dizi benzerlik oranı ise %99.66'dır (Şekil 4.9).

Actinomadura sp. D310AT izolatı, 16 rRNA gen dizi analizine göre en yakın akrabası olan *A. darangshiensis* DSLS-70 ile %97.11 dizi benzerliği ve 1420 pozisyonda 41 nükleotid farklılığı göstermektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Actinomadura* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.02 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

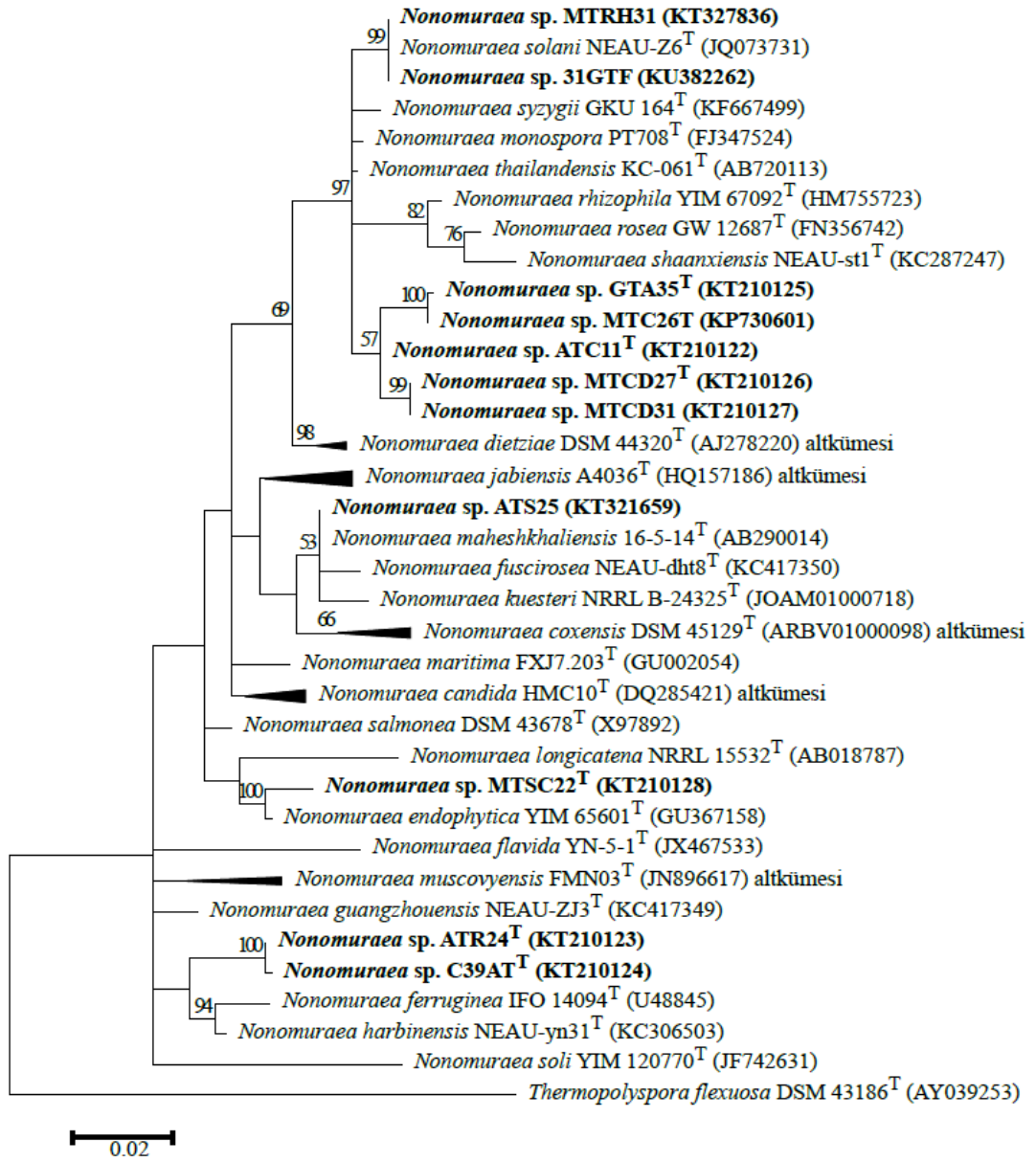
4.1.3.4 *Nonomuraea* cinsi

Krater göllerinin kıyı toprak örneklerinden *Nonomuraea* cinsine ait 11 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların kaynak lokaliteleri, 16S rRNA NCBI GenBank numaraları ve en yakın tip türleri ile olan benzerlik oranları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. *Nonomuraea* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
31GTF	Gölcük-toprak	KU382261	<i>N. solani</i> NEAU-Z6 ^T	99.73
ATC11	Acıgöl-toprak	KT210122	<i>N. monospora</i> PT708 ^T	98.80
ATR24	Acıgöl-toprak	KT210123	<i>N. harbinensis</i> NEAU-yn31 ^T	98.16
ATS25	Acıgöl-toprak	KT321659	<i>N. maheshkhaliensis</i> 16-5-14 ^T	99.86
C39AT	Acıgöl-toprak	KT210124	<i>N. harbinensis</i> NEAU-yn31 ^T	98.16
GTA35	Gölcük-toprak	KT210125	<i>N. solani</i> NEAU-Z6 ^T	98.49
MTC26	Meke-toprak	KP730601	<i>N. monospora</i> PT708 ^T	98.30
MTCD27	Meke-toprak	KT210126	<i>N. rhizophila</i> YIM 67092 ^T	98.91
MTCD31	Meke-toprak	KT210127	<i>N. rhizophila</i> YIM 67092 ^T	98.84
MTRH31	Meke-toprak	KT327836	<i>N. solani</i> NEAU-Z6 ^T	99.73
MTSC22	Meke-toprak	KT210128	<i>N. endophytica</i> YIM 65601 ^T	98.68

Maximum Likelihood yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Nonomuraea* cinsine ait izolatlar beş ayrı kümede toplanmıştır. *Nonomuraea* sp. 31GTF ve MTRH31 izolatlarının *N. solani* NEAU-Z6^T tip türü ile olan 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı %99.73’tür. Her iki izolatın birbirleri arasındaki dizi benzerlik oranı ise %99.93 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *Nonomuraea* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura 3-parametre (Tamura, 1992) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.02 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

Nonomuraea spp. ATC11, GTA35, MTC26, MTCD27, MTCD31 izolatları filogenetik ağaçta ayrı bir küme oluşturmaktadır. *Nonomuraea* sp. ATC11 ve MTC26 izolatları 16S rRNA gen dizi analizine göre *N. monospora* PT708^T tip türü ile sırasıyla %98.80 (1415 pozisyonda 17 nt) ve %98.30 (1415 pozisyonda 24 nt) benzerlik göstermektedir. ATC11 ve MTC26 izolatları arasındaki dizi benzerlik oranı ise %99.52'dir. Filogenetik ağaçta MTC26 izolatu ile yakın kümelenen GTA35 izolatının en yakın tip türü olan *N. solani* NEAU-Z6^T ile %98.49 dizi benzerliği ve

1461 pozisyonda 22 nükleotid farklılığı göstermektedir. MTC26 ve GTA35 arasındaki dizi benzerlik oranı ise %99.79'dur. *Nonomuraea* spp. MTCD27 ve MTCD31 izolatları, *N. rhizophila* YIM 67092^T tip türü ile sırasıyla %98.91 (1466 pozisyonda 16 nt farklılığı) ve %98.84 (1462 pozisyonda 17 nt farklılığı) dizi benzerliği göstermektedir (Şekil 4.10).

Nonomuraea sp. ATS25 izolatu, 16S rRNA gen dizi analizine göre *N. maheshkhaliensis* 16-5-14^T tip türü ile %99.86 dizi benzerliği ve 1445 pozisyonda 2 nükleotid farklılığı taşımaktadır.

Nonomuraea endophytica YIM 65601^T ve *N. longicatena* NRRL 15532^T tip türleri ile kümelenen *Nonomuraea* sp. MTSC22 izolatu, 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın akrabası *N. endophytica* YIM 65601^T ile %98.68 dizi benzerliği ve 1441 pozisyonda 19 nükleotid farklılığı göstermektedir (Şekil 4.10).

Nonomuraea spp. ATR24 ve C39AT izolatları *N. harbinensis* NEAU-yn31^T tip türü ile %98.16 dizi benzerliği ve 1469 pozisyonda 27 nükleotid farklılığı taşımaktadır. İki izolatın birbirleri arasındaki gen dizi benzerlik oranı ise %100'dür.

4.1.3.5 *Nocardia* cinsi

Krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden *Nocardia* cinsine ait 11 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların kaynak lokaliteleri, 16S rRNA NCBI GenBank numaraları ve en yakın tip türleriyle olan benzerlik oranları Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. *Nocardia* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

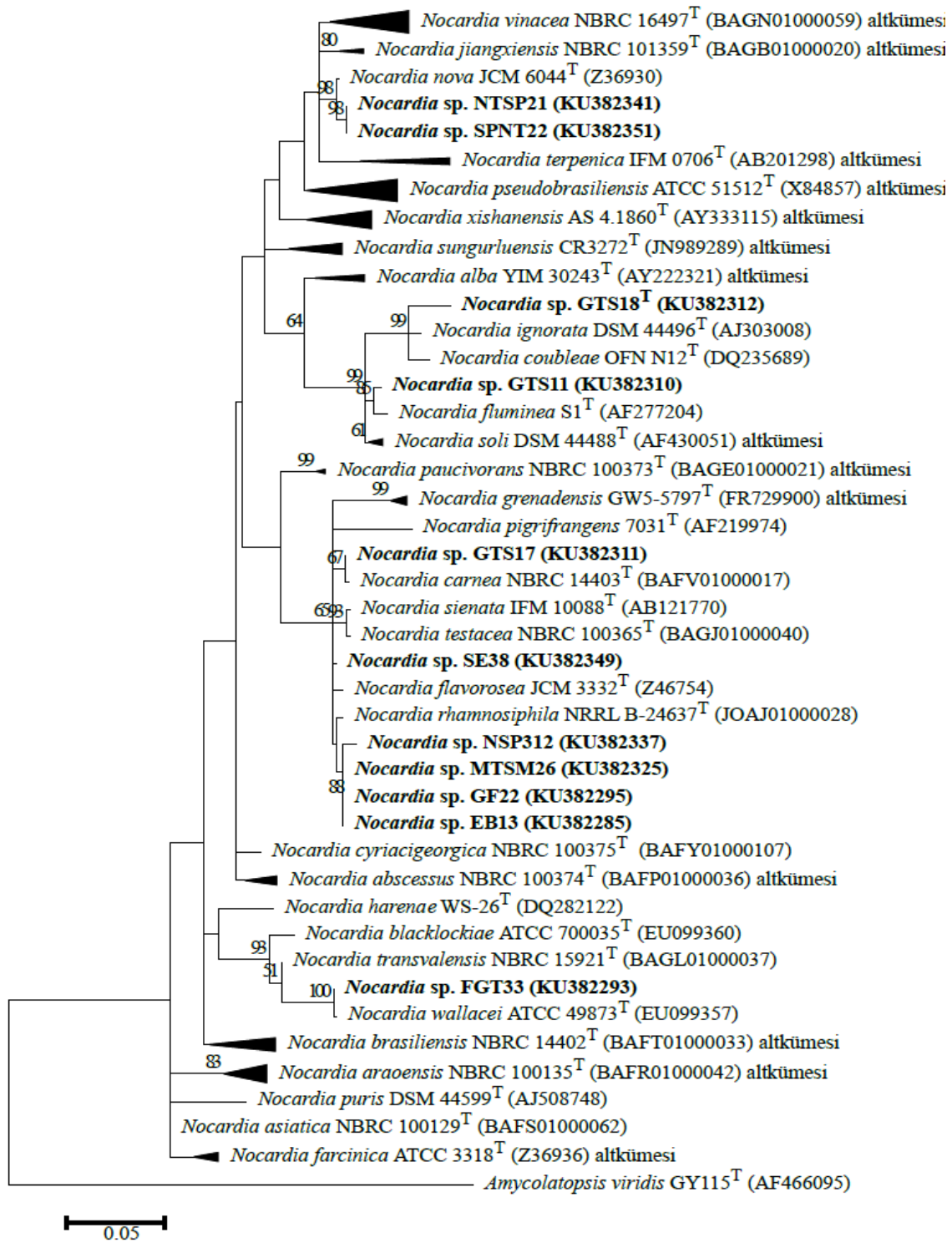
İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
EB13	Nevşehir	KU382285	<i>N. carnea</i> NBRC 14403 ^T	99.59
FGT33	Gölcük-toprak	KU382293	<i>N. wallacei</i> ATCC 49873 ^T	99.78
GF22	Gölcük-sediment	KU382295	<i>N. rhamnosphila</i> 202GMO ^T	99.66
GTS11	Gölcük-toprak	KU382310	<i>N. fluminea</i> S1 ^T	99.51
GTS17	Gölcük-toprak	KU382311	<i>N. carnea</i> NBRC 14403 ^T	99.93
GTS18	Gölcük-toprak	KU382312	<i>N. ignorata</i> DSM 44496 ^T	99.04
MTSM26	Meke-toprak	KU382325	<i>N. rhamnosphila</i> 202GMO ^T	99.59
NSP312	Nemrut-sediment	KU382337	<i>N. carnea</i> NBRC 14403 ^T	99.38
NTSP21	Nemrut-toprak	KU382341	<i>N. nova</i> JCM 6044 ^T	99.59
SE38	Nevşehir	KU382349	<i>N. carnea</i> NBRC 14403 ^T	99.52
SPNT22	Nemrut-toprak	KU382351	<i>N. nova</i> JCM 6044 ^T	99.59

Nocardia spp. NTSP21 ve SPNT22 izoaltları, Maximum Likelihood yöntemine göre oluşturulan ağaçta *N. nova* JCM 6044^T tip türü ile kümelenmiş olup, her iki izolat da *N. nova* ile %99.59 dizi benzerlik oranına ve 1455 pozisyonda 6 farklı nükleotide sahiptir. NTSP21 ve SPNT22 izolatları arasındaki dizi benzerlik oranı ise %99.80 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

Nocardia sp. GTS18 izolatı, *N. ignorata* DSM 44496^T ve *N. coubleae* OFN N12^T tip türleri ile kümelenmiştir. *Nocardia* sp. GTS18 izolatının 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın akrabası olan *N. ignorata* DSM 44496^T ile dizi benzerlik oranı %99.18 ve nükleotid farklılığı ise 1457 pozisyonda 12 nükleotiddir (Şekil 4.11).

Nocardia sp. GTS11 izolatı, *N. fluminea* S1^T tip türü ile %99.38 dizi benzerliği ve 1442 pozisyonda 9 nükleotid farklılığı göstermektedir. *Nocardia* spp. EB13, GF22, GTS17, NSP312, MTSM26 ve NSP312 izolatları filogenetik ağaçta birlikte kümelenmiştir. Bu izolatlardan EB13 izolatı %99.59 (1466 pozisyonda 6 nt), GTS17 izolatı %99.93 (1455 pozisyonda 1 nt), NSP312 izolatı %99.38 (1456 pozisyonda 9 nt) ve SE38 izolatı %99.52 (1456 pozisyonda 7 nt) dizi benzerlik oranı ile *N. carnea* NBRC 14403 tip türüne yakındır. Aynı kümede yer alan *Nocardia* spp. GF22 ve MTSM26 izolatlarının en yakın tip türü olan *N. rhamnosiphila* 202GMO^T ile dizi benzerlik oranları sırasıyla %99.66 (1455 pozisyonda 5 nt) ve %99.59 (1460 pozisyonda 6 nt) olarak tespit edilmiştir. GF22 ve MTSM26 izolatları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı ise %99.86'dır (Şekil 4.11).

Nocardia sp. FGT33 izolatının en yakın tipi türü *N. wallacei* ATCC 49873^T ile 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.78, nükleotid farklılığı ise 1388 pozisyonda 3 nükleotid olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. *Nocardia* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi ($\geq 50\%$). Skala 0.05 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

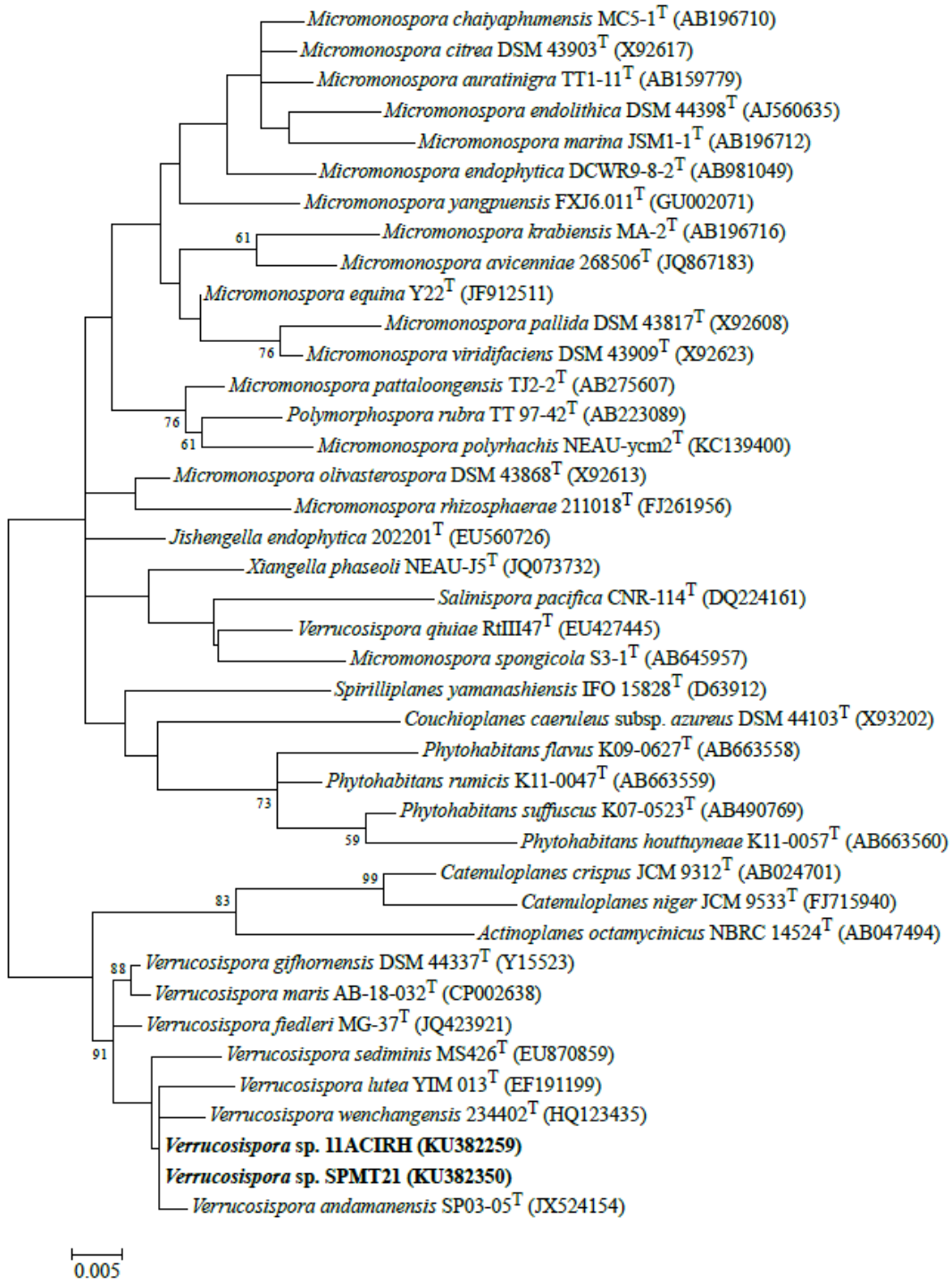
4.1.3.6 *Verrucosispora* cinsi

Meke Gölü kıyı toprak örneğinden ve Acıgöl kıyı sediment örneğinden *Verrucosispora* cinsi üyesi iki izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 16S rRNA NCBI GenBank numaraları ve en yakın tip türleri ile olan benzerlik oranları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. *Verrucosispora* cinsine ait izolatların kaynak lokaliteleri, GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)
SPMT21	Meke-toprak	KU382350	<i>V. andamanensis</i> SP03-05 ^T	99.79
11ACIRH	Acıgöl-sediment	KU382259	<i>V. andamanensis</i> SP03-05 ^T	99.57

Verrucosispora spp. 11ACIRH ve SPMT21 izolatları filogenetik ağaçta cinsin diğer üyeleri ile kümelemektedir. 16S rRNA gen dizi analizine göre her iki izolat da *V. andamanensis* SP03-05^T tip türü ile yakın ilişkilidir. *Verrucosispora andamanensis* SP03-05^T ile 11ACIRH izolatı %99.57 dizi benzerliği ve 1400 pozisyonda 6 nükleotid farklılığı gösterirken, SPMT21 ile %99.79 dizi benzerliği ve 1401 pozisyonda 3 nükleotid farklılığı taşımaktadır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Verrucospora* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi ($\geq 50\%$). Skala 0.005 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

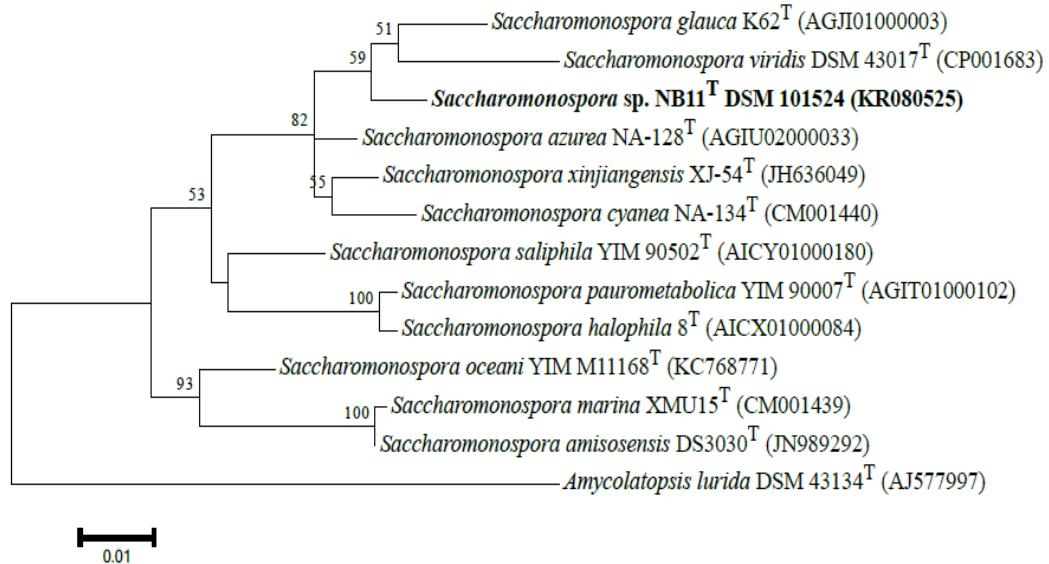
4.1.3.7 *Saccharomonospora* cinsi

Nemrut Gölü kıyı sediment örneğinden *Saccharomonospora* cinsine ait bir izolat elde edilmiştir. Bu izolatin 16S rRNA NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türü ile olan benzerlik oranı Çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14. *Saccharomonospora* cinsine ait izolatin kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)	Fark/Toplam(nt)
NB11	Nemrut-sediment	KR080525	<i>S. azurea</i> NA-128 ^T	98.50	22/1462
			<i>S. glauca</i> K62 ^T	98.15	27/1462
			<i>S. xinjiangensis</i> XJ-54 ^T	98.15	27/1461
			<i>S. cyanea</i> NA-134 ^T	97.81	32/1461
			<i>S. viridis</i> DSM 43017 ^T	97.13	42/1461

Maximum Likelihood yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Saccharomonospora glauca* K62^T ve *S. viridis* DSM 43017^T tip türleri ile ayrı bir küme oluşturan *Saccharomonospora* sp. NB11 izolatu, 16S rRNA gen dizi analizine göre *S. azurea* NA-128^T tip türü ile %98.50 dizi benzerliği ve 1462 pozisyonda 22 nükleotid farklılığı göstermektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Saccharomonospora* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.01 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

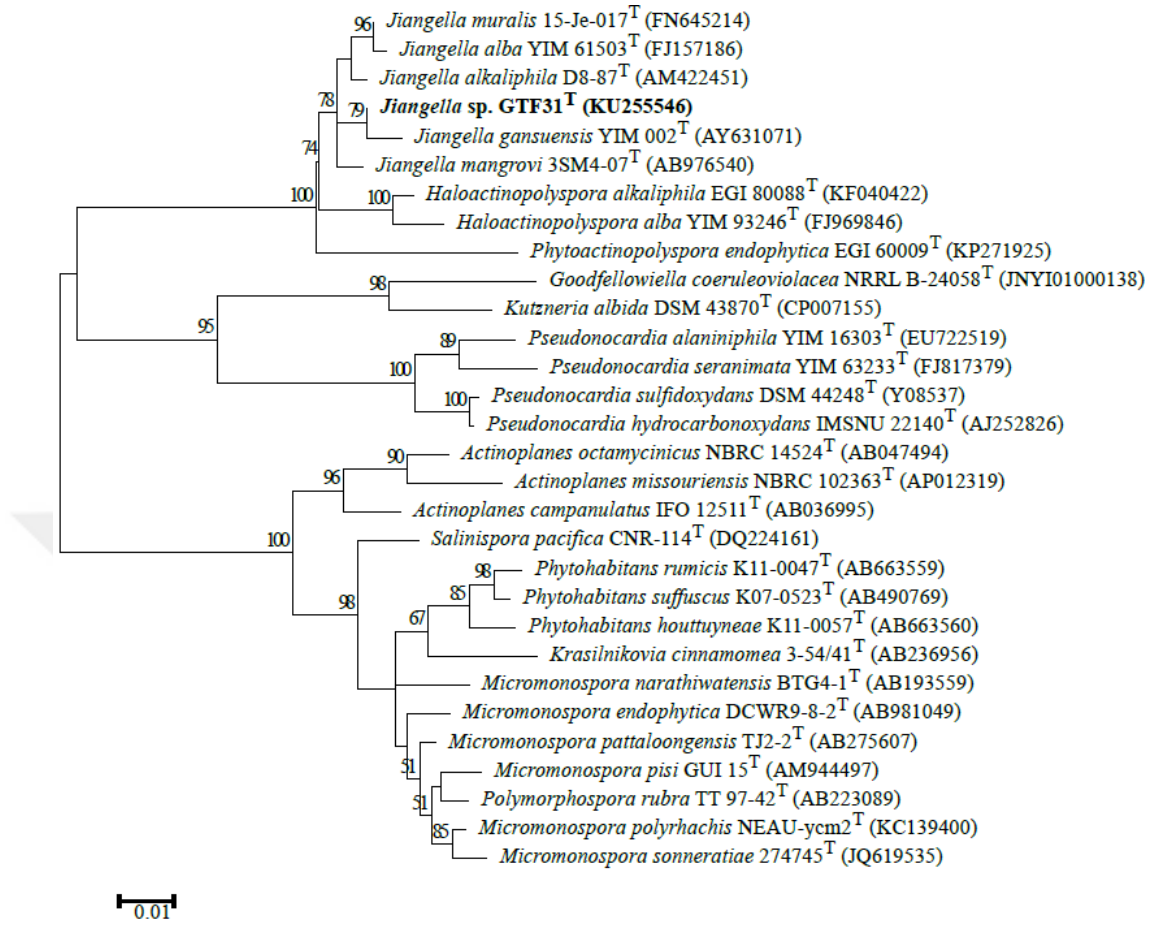
4.1.3.8 *Jiangella* cinsi

Gölcük Gölü kıyı toprak örneğinden *Jiangella* cinsi üyesi bir izolat elde edilmiştir. Bu izolatın 16S rRNA NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türü ile olan dizi benzerlik oranı Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. *Jiangella* cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
GTF31	Gölcük-toprak	KU255546	<i>J. gansuensis</i> YIM 002 ^T	99.45	8/1453
			<i>J. muralis</i> 15-Je-017 ^T	99.41	8/1361
			<i>J. alba</i> YIM 61503 ^T	99.25	11/1471
			<i>J. mangrovi</i> 3SM4-07 ^T	99.11	13/1462
			<i>J. alkaliphila</i> D8-87 ^T	98.21	25/1398

Jiangella sp. GTF31 izolatı, en yakın tip türü *J. gansuensis* YIM 002^T ile %99.45 dizi benzerliği ve 1453 pozisyonda 8 nükleotid farklılığı taşımaktadır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Jiangella* spp. arasındaki filogenetik ilişkileri gösteren Maximum Likelihood ağacı GTR (Nei ve Kumar, 2000) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.01 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

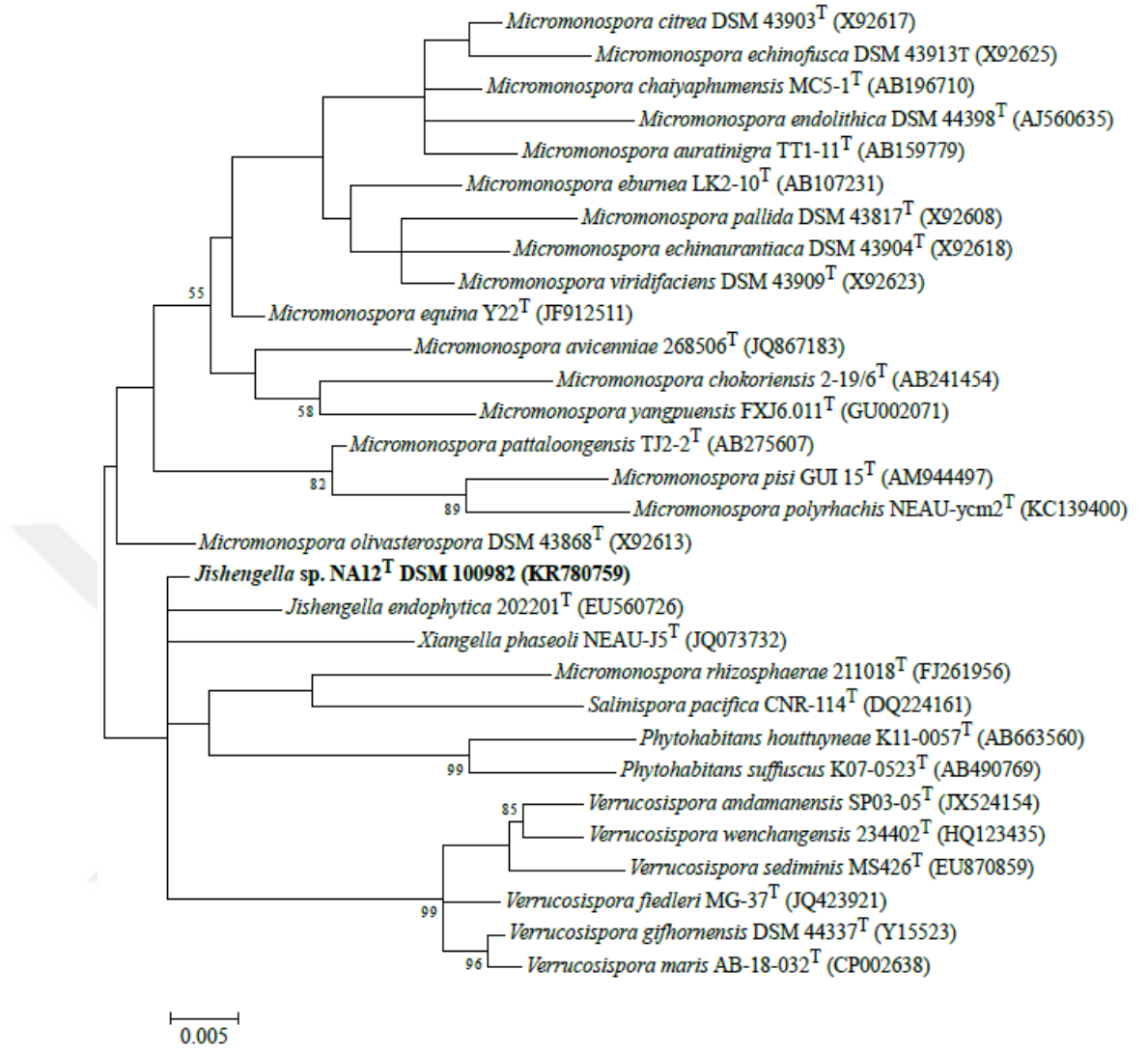
4.1.3.9 *Jishengella* cinsi

Nemrut Gölü kıyı sediment örneğinden *Jishengella* cinsine ait bir izolat elde edilmiştir. Bu izolatın 16S rRNA NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türü ile olan benzerlik oranı Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16. *Jishengella* cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)	Fark/Toplam(nt)
NA12	Nemrut-sediment	KR780759	<i>Jishengella endophytica</i> 202201 ^T	99.32	10/1462
			<i>Micromonospora olivasterospora</i> DSM 43868 ^T	99.11	13/1462
			<i>Xiangella phaseoli</i> NEAU-J5 ^T	98.84	17/1463
			<i>Micromonospora pattaloongensis</i> TJ2-2 ^T	98.84	17/1462
			<i>Verrucosipora gifhornensis</i> DSM 44337 ^T	98.76	18/1453

Jishengella sp. NA12 izolatı Maximum Likelihood yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Jishengella endophytica* 202201^T tip türüyle yakın olarak kümelenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Jishengella* sp. NA12 suşunun 16S rRNA gen dizisine göre en yakın tip türleriyle filogenetik ilişkilerini gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura 3-parametre (Tamura, 1992) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.005 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

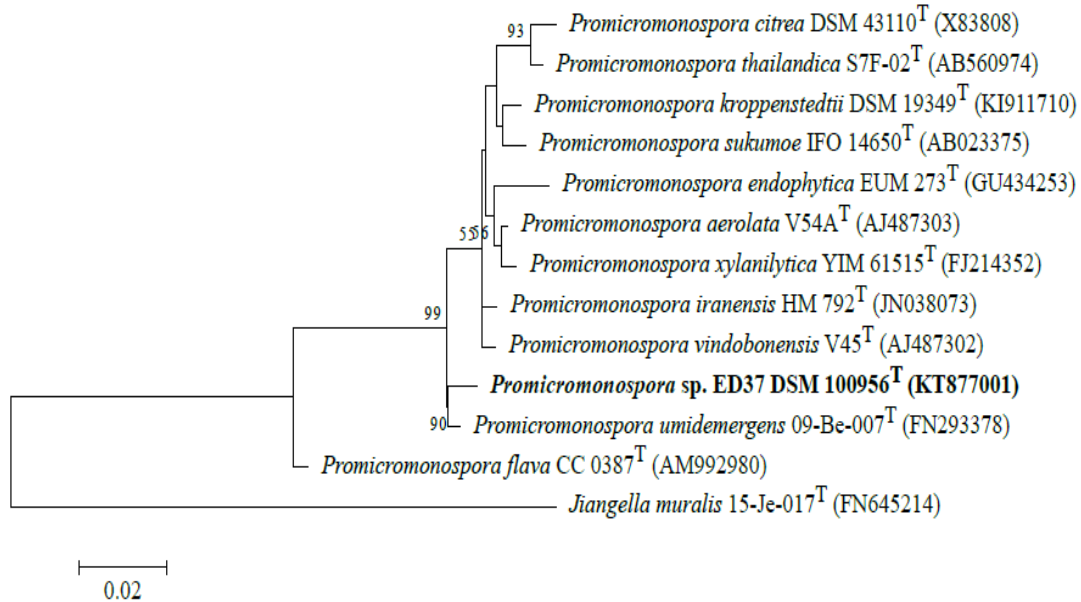
4.1.3.10 *Promicromonospora* cinsi

Nevşehir – Acıgöl taban toprağından *Promicromonospora* cinsine ait bir izolat elde edilmiştir. Bu izolatın 16S rRNA NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türü ile benzerlik oranı Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. *Promicromonospora* cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ile benzerlik oranları

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)	Fark/Toplam(nt)
ED37	Nevşehir	KT877001	<i>P. umidemergens</i> 09-Be-007 ^T	99.02	13/1327
			<i>P. vindobonensis</i> V45 ^T	98.65	18/1336
			<i>P. iranensis</i> HM 792 ^T	98.43	23/1461
			<i>P. aerolata</i> V54A ^T	98.33	23/1380
			<i>P. kroppenstedtii</i> DSM 19349 ^T	98.15	27/1461

Maximum Likelihood yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Promicromonospora* sp. ED37 suşu, 16S rRNA gen dizi analizine göre en yakın tip türü olan *P. umidemergens* 09-Be-007^T ile yakın kümelenmiştir (Şekil 4.16).



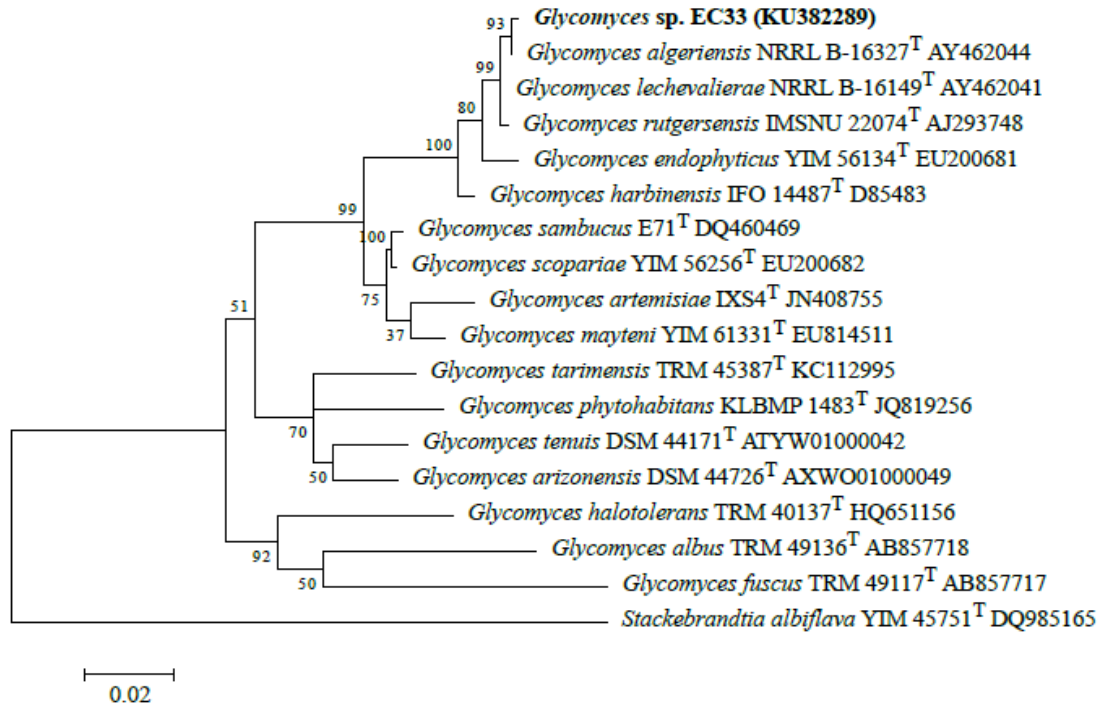
Şekil 4.16. *Promicromonospora* sp. ED37 suşunun 16S rRNA gen dizisine göre cinsin diğer türleriyle olan filogenetik ilişkisini gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥ 50). Skala 0.02 nükleotid değişimini temsil

4.1.3.11 *Glycomyces* cinsi

Nevşehir – Acıgöl taban toprağından *Glycomyces* cinsine ait bir izolat elde edilmiştir (Şekil 4.17). Bu izolatın 16S rRNA NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türü ile dizi benzerlik oranı Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. *Glycomyces* cinsine ait izolatın kaynak lokalitesi, GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türü ile benzerlik oranı

İzolat no	Kaynak	GenBank no	En yakın tip tür	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
EC33	Nevşehir	KU382289	<i>G. algeriensis</i> NRRL B-16327 ^T	99.86	2/1471
			<i>G. lechevalierae</i> NRRL B-16149 ^T	99.46	8/1471
			<i>G. rutgersensis</i> IMSNU 22074 ^T	99.32	10/1469
			<i>G. endophyticus</i> YIM 56134 ^T	98.76	18/1456
			<i>G. harbinensis</i> IFO 14487 ^T	98.44	23/1470



Şekil 4.17. *Glycomyces* sp. EC33 suşunun 16S rRNA gen dizisine göre cinsin diğer türleriyle olan filogenetik ilişkisini gösteren Maximum Likelihood ağacı Tamura-Nei (Tamura ve Nei, 1993) (G+I) modeline göre oluşturuldu. Bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi ve nodlar üzerinde gösterildi (≥%50). Skala 0.02 nükleotid değişimini temsil etmektedir.

4.1.4 Fenotipik karakterizasyon

4.1.4.1 Nümerik analiz

Yeni tür olma ihtimali yüksek olan izolatlardan *Streptomyces* sp. MKSP12 ve *Jishengella* sp. NA12 suşları en yakın tip türleri ile fenotipik olarak karakterize edildi. Test suşları farklı karbon ve azot kaynaklarında gelişim, farklı polimerleri parçalayabilme, farklı sıcaklık ve pH aralığında gelişebilme, NaCl'ü tolere edebilme ve biyokimyasal özellikleri açısından (68 birim karakter) analiz edildi (Çizelge 4.19). Ayrıca test suşlarının 10 farklı besi ortamındaki (ISP 1 – 7 besi ortamları (Shirling ve Gottlieb, 1966), Bennett's besi ortamı (Jones, 1949), Czapek's besi ortamı (Weyland, 1969) Triptik Soya Agar (TSA, Difco)) gelişim özellikleri de kaydedildi (Çizelge 4.20, 4.21).

Çizelge 4.19. *Streptomyces* sp. MKSP12 ve *Jishengella* sp. NA12 izolatlarının en yakın tip türleri ile fenotipik karakterizasyonu

	1	2	3	4	5	6
Azot kaynakları						
L-Alanin	+	+	+	+	+	+
L-Arjinin	+	+	+	+	-	+
L-Asparajin	+	+	+	+	+	+
L-Histidin	-	+	+	+	-	+
L-Izolösin	+	+	+	+	-	+
L-Metiyonin	+	+	+	+	-	+
L-Prolin	+	+	+	+	-	+
L-Serin	+	+	+	+	+	+
L-Tirozin	+	+	+	+	-	-
L-Valin	-	+	+	+	-	+
Karbon kaynakları						
D(+)Galaktoz	+	+	+	+	-	-
D(+)Glukoz	+	+	+	+	+	+
D(+)Mannoz	-	+	+	+	+	+
D(+)Melezitoz	-	-	-	-	-	+
D(+)Rafinoz	+	-	-	-	*	*
D(+)Sellobiyoz	+	+	+	+	+	+
D(+)Trehaloz	-	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	-
D-Sorbitol	-	+	-	-	-	-
Gliserol	+	+	+	+	-	-
İnulin	+	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	+	-	-	-	-
L(+) Tartarik asit	-	-	-	-	-	-
myo-İnozit	-	-	+	+	-	-
Palatinoz	-	-	-	-	-	-
Sükroz	+	-	+	+	+	+
Üre	-	-	-	-	-	-
α-L-Ramnoz	+	+	+	+	+	-

Çizelge 4.19 (devam). *Streptomyces* sp. MKSP12 ve *Jishengella* sp. NA12 izolatlarının en yakın tip türleri ile fenotipik karakterizasyonu

	1	2	3	4	5	6
Degradasyon testleri						
DNA	+	+	+	+	-	-
Hipoksantin	-	-	-	-	-	-
Jelatin	+	-	+	+	+	+
Kazein	+	-	+	+	+	+
Ksantin	-	-	-	-	-	-
Ksilan	-	-	-	-	-	-
L-Tirozin	-	-	-	-	-	-
Nişasta	+	-	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+	+
Tolerans testleri						
Sıcaklık (°C)						
4	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+
45	-	-	-	-	-	-
pH						
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	-	+	+	+
12	-	-	-	+	+	+
NaCl (% w/v)						
0	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
Biyokimyasal testler						
Allantoin	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	-	-
Nitrat	-	+	+	-	+	-
Üre	+	+	+	-	-	-
1 <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12, 2 <i>S. specialis</i> DSM 41924 ^T , 3 <i>S. hainanensis</i> DSM 41900 ^T , 4 <i>S. zhaozhouensis</i> DSM 42101 ^T , 5 <i>Jishengella</i> sp. NA12, 6 <i>J. endophytica</i> DSM 45430 ^T						

Çizelge 4.20. *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunun en yakın tip türleri ile on farklı besi ortamındaki gelişim özellikleri

	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	ISP6	ISP7	BEN.	CZA.	TSA
1	G:+++ R: çakıl A: çakıl S:-	G:+ R: bej A: çakıl S:-	G:++++ R: gri A: platin S: gri	G:+++ R: çakıl A: çakıl S: çakıl	G:- R:- A:- S:-	G:- R:- A:- S:-	G:+++ R: gri A: çakıl S:-	G:- R:- A:- S:-	G:+++ R: çakıl A: çakıl S:-	G:- R:- A:- S:-
2	G:+++ R: gri A: gri S: platin	G:+++ R: zeytin A: zeytin S: kahve-gri	G:+++ R: cam yeşili A: kahve gri S: zeytin	G:- R:- A:- S:-	G:+++ R: kahve A: kahve S: bazalt	G:+ R: mor A: mor S: kırmızı	G:+++ R: siyah A: beton S: siyah	G:+++ R: kahve A: kahve S: bazalt	G:- R:- A:- S:-	G:- R:- A:- S:-
3	G:+ R: krem A: krem S:-	G:+++ R: mısır A: bej S:-	G:++++ R: haki gri A: kestane S: koyu sarı	G:+++ R: haki gri A: platin S:-	G:+++ R: bej A: kahve S:-	G:+ R: gri A: gri S:-	G:++++ R: kestane A: haki gri S: gri	G:+++ R: mısır A: safran S:-	G:++++ R: çakıl A: çakıl S:-	G:+++ R: mısır A: bej S:-
4	G:++ R: kaya A: kaya S:-	G:+ R: kahve A: zeytin S:-	G:++++ R: kahve A: yeşil gri S: haki gri	G:++++ R: çikolata A: çikolata S: kil rengi	G:++ R: beton A: gri S: gri	G:- R:- A:- S:-	G:++++ R: kahve A: fındık S: kuvars	G:- R:- A:- S:-	G:++ R: krem A: krem S:-	G:- R:- A:- S:-
5	G:++ R: krem A: krem S:-	G:- R:- A:- S:-	G:++++ R: gri A: kum sarı S:-	G:++ R: çakıl A: çakıl S:-	G:+++ R: krem A: krem S:-	G:+ R: kestane A: kahve S:-	G:+++ R: çakıl A: çakıl S:-	G:+++ R: krem A: krem S:-	G:- R:- A:- S:-	G:+++ R: bej A: bej/gri S:-
6	G:+ R: istiridye A: istiridye S:-	G:+++ R: çakıl A: çakıl S:-	G:+++ R:- A: çakıl S:-	G:++ R: gri A: kahve S:-	G:++ R: krem A: krem S:-	G:+ R: gri A: gri S:-	G:+++ R: gri A: çakıl S:-	G:++ R: krem A: krem S:-	G:- R:- A:- S:-	G:++ R: fildişi A: fildişi S:-
7	G:++ R: krem A: krem S:-	G:+ R: sarı A: krem S:-	G:++++ R: gri A: yeşil bej S:-	G:+++ R: krem A: çakıl S:-	G:++ R: krem A: krem S:-	G:+ R: bej A: krem S:-	G:++ R: toz gri A: toz gri S: toz gri	G:++ R: krem A: krem S:-	G:++ R: krem A: krem S:-	G:++ R: mısır A: gri S:-
1 <i>Streptomyces</i> sp. MKSP12, 2 <i>S. specialis</i> DSM 41924 ^T , 3 <i>S. hainanensis</i> DSM 41900 ^T , 4 <i>S. avicenniae</i> DSM 41943 ^T , 5 <i>S. zhaozhouensis</i> DSM 42101 ^T , 6 <i>S. sedi</i> DSM 41942 ^T , 7 <i>S. mayteni</i> YIM 60475 ^T ; G: gelişim, R: substrat miselyumu rengi, A: hava miselyumu rengi, S: çözünebilir pigment										

Çizelge 4.21. *Jishengella* sp. NA12 suşunun cinsin tip türü ile on farklı besi ortamındaki gelişim özellikleri

	ISP1	ISP2	ISP3	ISP4	ISP5	ISP6	ISP7	BEN.	CZA.	TSA
NA12	G:+++ R: sarı A:turuncu S:-	G:+++ R: sarı A: turuncu S:-	G:+++ R: sarı A: sarı S:-	G:++ R: kavun A:turuncu S:-	G:- R:- A:- S:-	G:+++ R: platin A: bej S:-	G:+ R: sarı A: turuncu S: turuncu	G:+++ R: sarı A: kavun S:-	G:- R:- A:- S:-	G:+++ R: sarı A: turuncu S:-
<i>J.endophytica</i>	G:+++ R:turuncu A:turuncu S:-	G:+++ R: somon A:turuncu S:-	G:++ R: kavun A: sarı S:-	G:+++ R:turuncu A:turuncu S:-	G:+/- R:turuncu A:turuncu S:-	G:+++ R: turuncu A: turuncu S:-	G:+++ R: turuncu A: turuncu S: turuncu	G:+++ R: turuncu A: turuncu S:-	G:+ R: kavun A: kavun S:-	G:+++ R: somon A: somon S:-
1 <i>Jishengella</i> sp. NA12, 2 <i>J. endophytica</i> DSM 45430 ^T G: gelişim, R: substrat miselyumu rengi, A: hava miselyumu rengi, S: çözünebilir pigment										

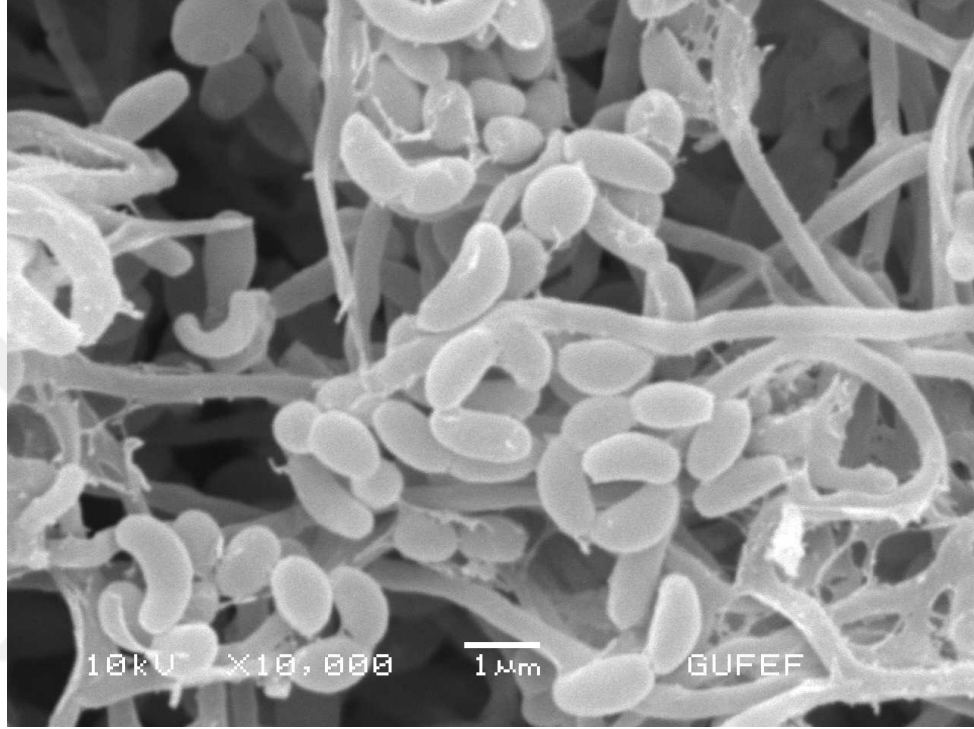
Actinomadura spp. 21ATH, D310AT, NTSP31, SPNT21, *Saccharomonospora* sp. NB11 ve *Nocardia* sp. GTS18 izolatlarının fenotipik karakterizasyonu GenIII MicroPlate (Biolog Inc., Hayward, CA, USA) kullanılarak yapıldı. *Actinomadura* sp. 21ATH izolatu en yakın tip türü *A. rugatobispora* JCM 3366^T suşundan D-mannitol, α -D-laktoz, L-laktik asit ve D-laktik asit metil esteri gibi bazı karbon kaynaklarının kullanımı ve %4 NaCl, %1 sodyum laktat, linkomisin, lityum klorit ve sodyum bromat gibi inhibitör maddeler varlığında gelişim konusunda farklılık göstermektedir. *Actinomadura* sp. D310AT en yakın tip türü *A.arangshiensis* DSM 45941^T suşundan dekstrin, D-maltoz, süktroz, D-rafinoz, D-sorbitol, D-mannitol gibi bazı karbon kaynaklarının kullanımı ve %4 NaCl, %1 sodyum laktat ve linkomisin varlığında gelişim konusunda farklılaşmaktadır. *Actinomadura* sp. NTSP31 izolatu en yakın tip türünden kuinik asit, D-sakkarik asit, metil piruvat gibi bazı karbon kaynaklarının kullanımı ve minosiklin, tetrazolium violet aztreonam varlığında gelişim konusunda farklılık göstermektedir (Çizelge B.1).

Saccharomonospora sp. NB11 izolatının en yakın tip türleri *S.azurea* JCM 7551^T ve *S. glauca* JCM 7444^T suşlarından D-rafinoz, D-melibiyoz, L-ramnoz, inozin, L-aspartik asit, L-histidin, L-malik asit gibi bazı karbon kaynaklarının kullanımı ve %4 NaCl, troleandomisin, linkomisin, guanidin hidroklorit, niaproof, lityum klorit ve sodyum bromat gibi inhibitör maddeler varlığında gelişim konusunda farklılık göstermektedir (Çizelge B.1).

Nocardia sp. GTS18 izolatu %8 NaCl, %1 sodyum laktat, rifamisin, linkomisin, guanidin hidroklorit, nalidiksik asit, lityum klorit, potasyum tellurit, aztreonam ve sodyum bromat gibi birçok inhibitör madde varlığında gelişebilmektedir. Ayrıca vankomisin varlığında da gelişebilen bu izolatın vankomisine dirençli bir *Nocardia* izolatu olduğu görülmektedir. Tez çalışması sürecinde *Nocardia* sp. GTS18 izolatının en yakın tip türleri elde edilemediğinden dolayı, bu izolatın fenotipik özellikleri için karşılaştırma yapılamadı (Çizelge B.1).

4.1.4.2 Spor morfolojisi

Nonomuraea spp. ATR24, MTC26, MTCD27, MTSC22 ve *Streptomyces* sp. MKSP12 suşlarının spor zinciri ve spor yüzeyi özellikleri taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendi. *Nonomuraea* sp. ATR24 suşu kıvrımlı spor zincirlerinde pürüzsüz sporlar taşımaktadır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. *Nonomuraea* sp. ATR24 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

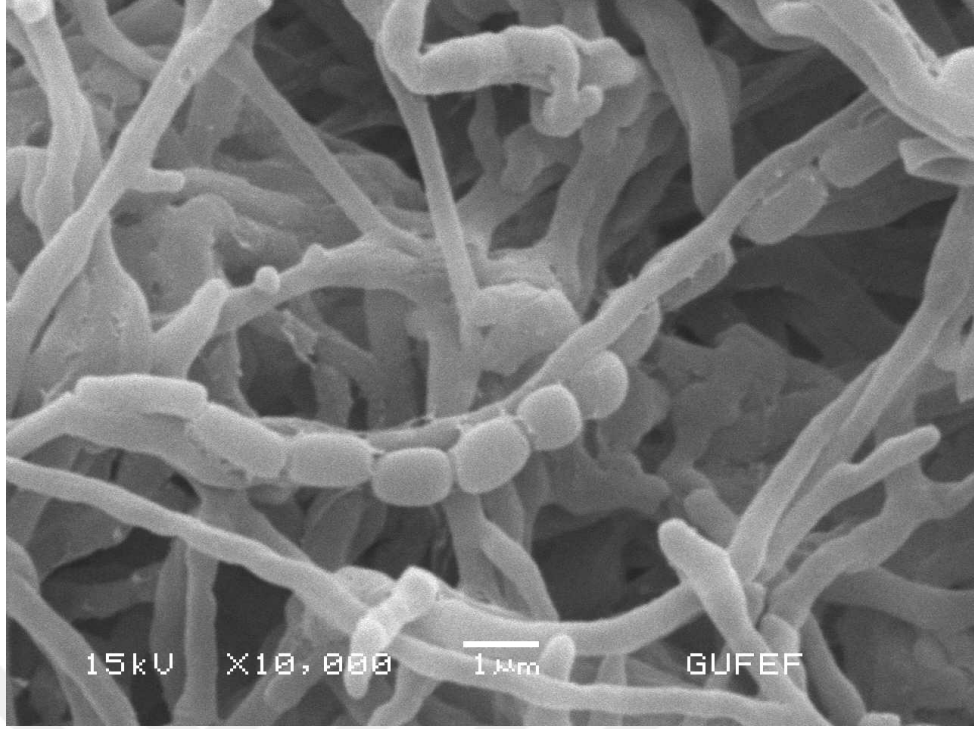
Nonomuraea spp. MTC26, MTCD27 ve MTSC22 suşları düz spor zincirlerinde pürüzsüz sporlar taşımaktadır (Şekil 4.19, 4.20, 4.21).



Şekil 4.19. *Nonomuraea* sp. MTC26 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

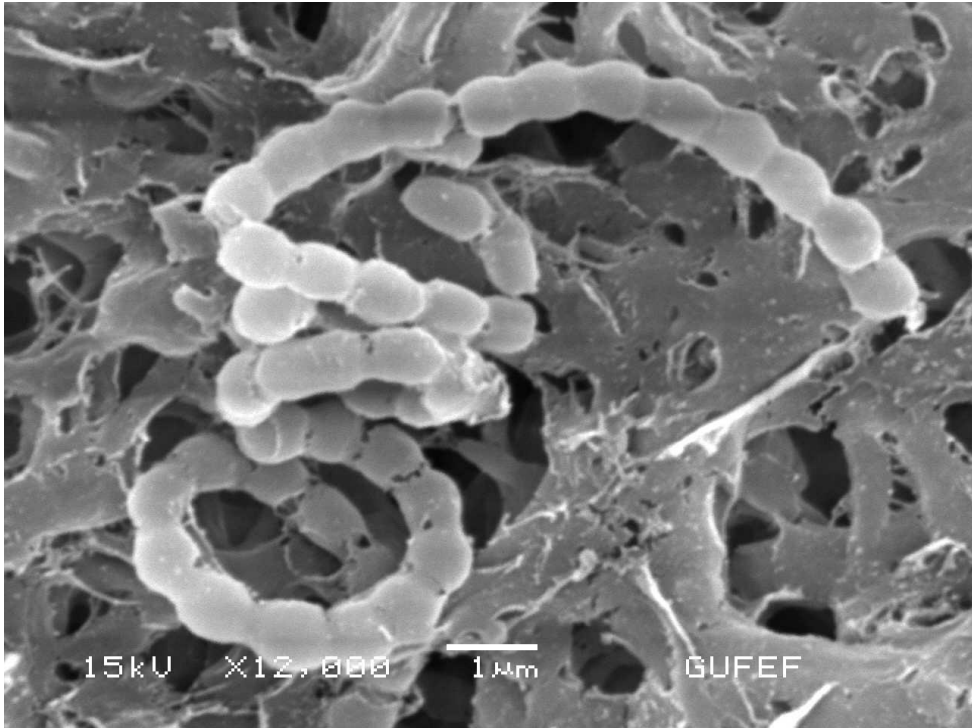


Şekil 4.20. *Nonomuraea* sp. MTCD27 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.



Şekil 4.21. *Nonomuraea* sp. MTSC22 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

Streptomyces sp. MKSP12 suşu ise spiral spor zincirlerinde yüzeyi pürüzsüz sporlar taşımaktadır (Şekil 4.22).



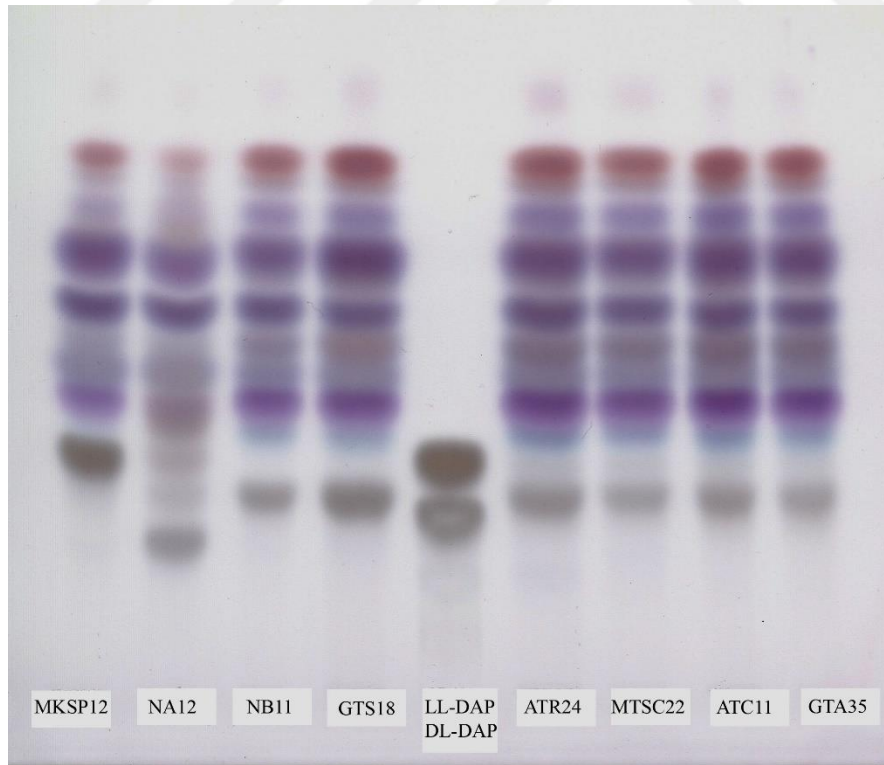
Şekil 4.22. *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunun spor yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.

4.1.5 Kemotaksonomik karakterizasyon

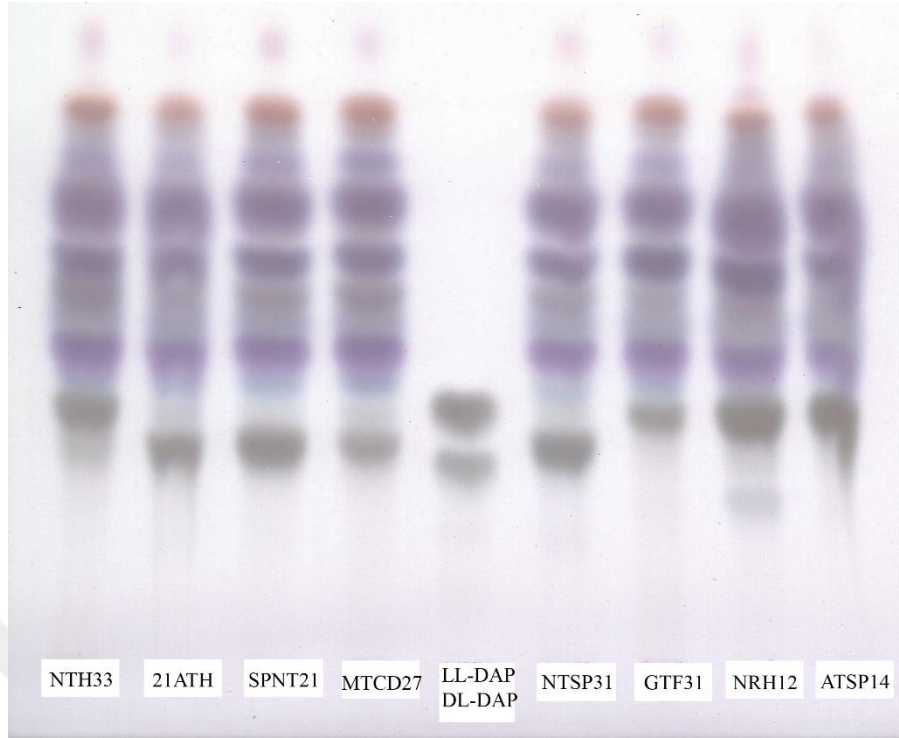
Filogenetik analizler sonucunda yeni tür olma potansiyeli yüksek olan izolatların diaminopimelik asit, şeker, polar lipid, menakinon ve yağ asidi analizleri yapılarak kemotaksonomik olarak karakterize edildi. Diaminopimelik asit, şeker, polar lipid ve menakinon analizleri için liyofilize örnekler, yağ asidi analizi için katı besi ortamında gelişen aktif kültür örnekleri kullanıldı.

4.1.5.1 Diaminopimelik asit analizi

İzolatların hücre duvarı DAP içeriği tek boyutlu ince tabaka kromatografisi yöntemi ile belirlendi. Kromatografi plakası üzerinde DAP standartları ile karşılaştırılan örneklerden *Streptomyces* cinsine ait ATSP14, MKSP12, NTH33 suşları ile *Jiangella* sp. GTF31 suşunun hücre duvarı diaminopimelik asit izomerinin LL-DAP; *Streptomyces* sp. NRH12 suşunun LL- ve düşük oranda OH-DAP içerdiği; *Jishengella* sp. NA12 suşunun OH-DAP, LL- ve DL-(mezo)-DAP, diğer suşların ise DL-(mezo)-DAP içerdiği tespit edildi (Şekil 4.23, 4.24).



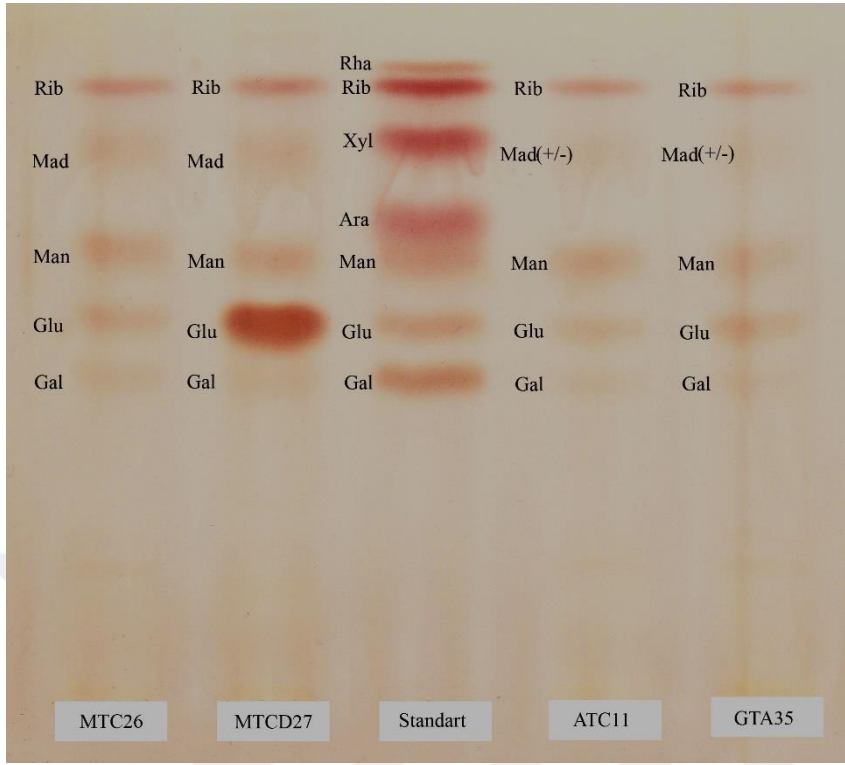
Şekil 4.23. *Streptomyces* sp. MKSP12, *Jishengella* sp. NA12, *Saccharomonospora* sp. NB11, *Nocardia* sp. GTS18 ve *Nonomuraea* spp. ATR24, MTSC22, ATC11, GTA35 suşlarının DAP izomerlerini gösteren ince tabaka kromatogramı.



Şekil 4.24. *Streptomyces* spp. NTH33, NRH12, ATSP14, *Actinomadura* spp. 21ATH, SPNT21, NTSP31 ve *Jiangella* sp. GTF31 suşlarının DAP izomerlerini gösteren ince tabaka kromatogramı.

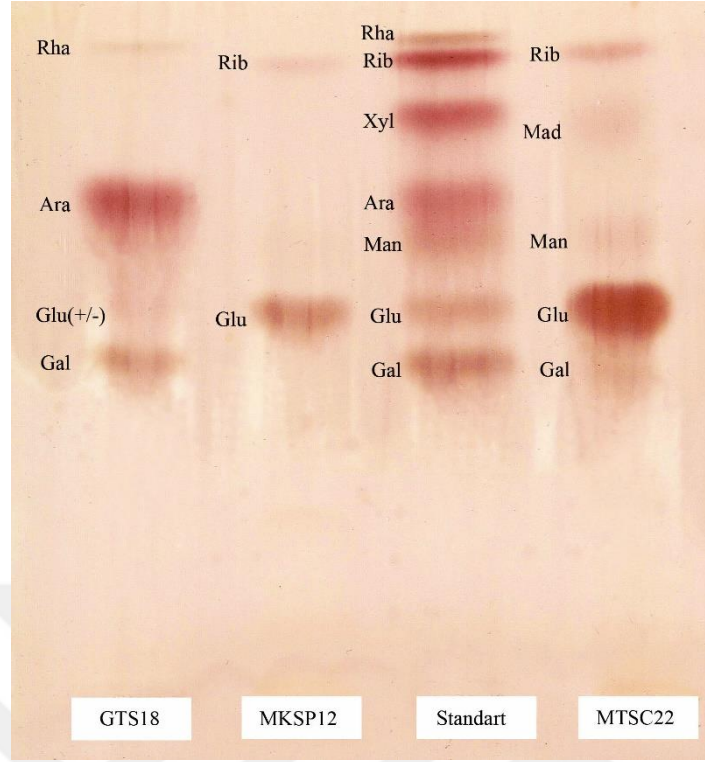
4.1.5.2 Şeker analizi

Yeni tür olma ihtimali yüksek olan izolatların tüm-hücre şeker hidrolizatları tek boyutlu ince tabaka kromatografisi ile analiz edildi. Standart olarak glukoz (%1, w/v), galaktoz (%1, w/v), arabinoz (%1, w/v), mannoz (%1, w/v), ksiloz (%1, w/v), riboz (%1, w/v) ve ramnoz (%1, w/v) şekerlerini içeren çözelti kullanıldı. İzolatların şeker profili, tüm-hücre şeker hidrolizatlarının kromatografisi plakası üzerindeki hareketlerinin ve renk profillerinin standart şekerler ile karşılaştırılmasıyla belirlendi.



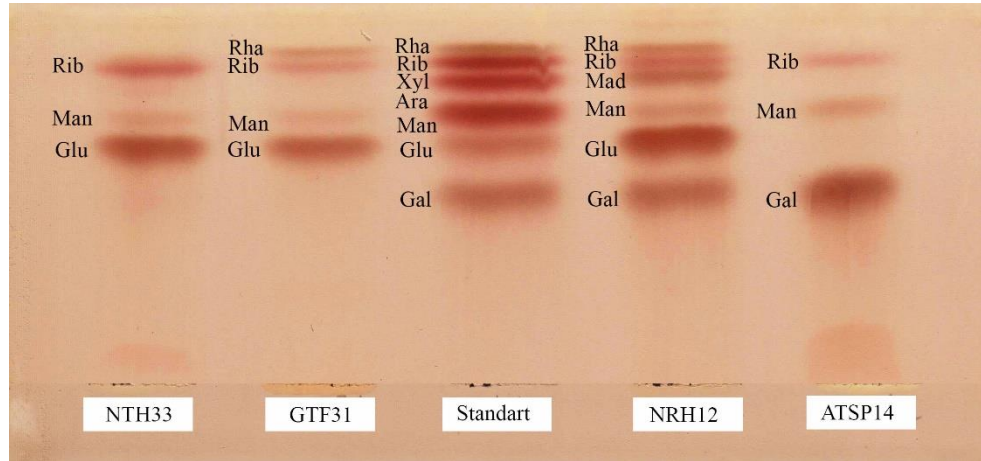
Şekil 4.25. *Nonomuraea* spp. MTC26, MTCD27, ATC11, GTA35 suşlarının şeker profilleri.

Nonomuraea cinsine ait MTC26, MTCD27, ATC11, GTA35 ve MTSC22 suşlarının tüm-hücre şeker hidrolizatlari galaktoz, glukoz, mannoz, maduroz ve riboz içermektedir (Şekil 4.25).



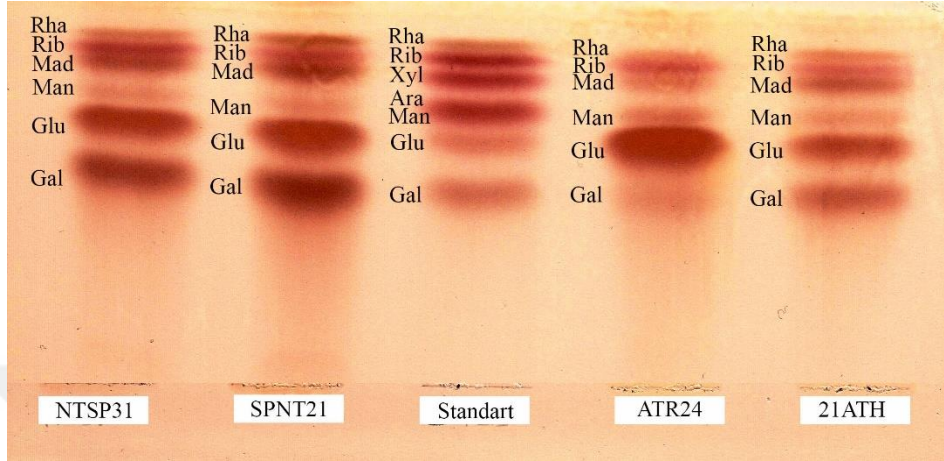
Şekil 4.26. *Nocardia* sp. GTS18, *Streptomyces* sp. MKSP12, *Nonomuraea* spp. MTSC22 suşlarının şeker profilleri.

Nocardia sp. GTS18 suşu galaktoz, arabinoz, ramnoz ve iz miktarda glukoz içermektedir. *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunun ise glukoz ve riboz içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26)



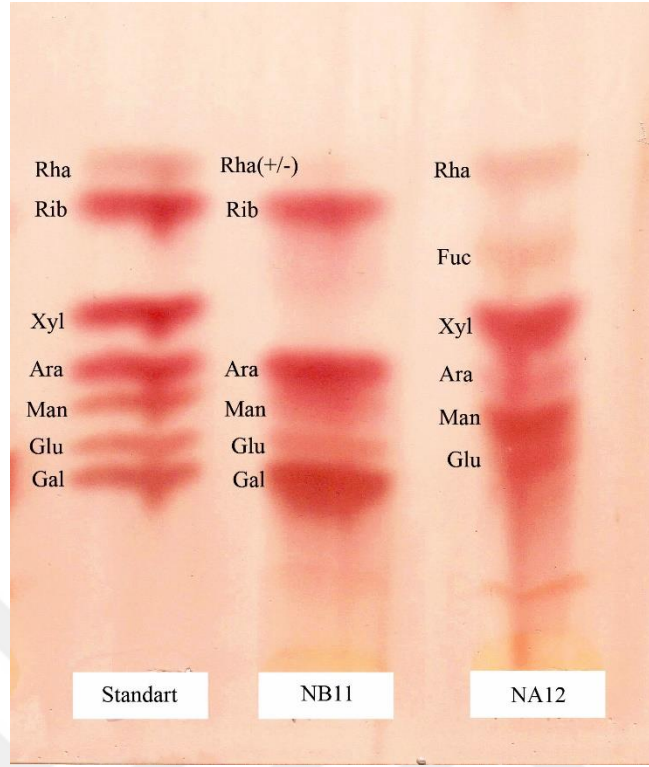
Şekil 4.27. *Streptomyces* spp. NTH33, NRH12, ATSP14 ve *Jiangella* sp. GTF31 suşlarının şeker profilleri.

Streptomyces cinsine ait NTH33 suşu tüm-hücre şeker hidrolizatında glukoz, mannoz ve riboz içerirken; ATSP14 suşu galaktoz, mannoz ve riboz; NRH12 ise galaktoz, glukoz, mannoz, maduroz, riboz ve ramnoz içermektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.28. *Actinomadura* spp. NTSP31, SPNT21, 21ATH ve *Nonomuraea* sp. ATR24 suşlarının şeker profilleri.

Actinomadura cinsine ait 21ATH, NTSP31 ve SPNT21 suşlarının galaktoz, glukoz, mannoz, maduroz, riboz ve ramnoz içerdiği tespit edilmiştir. *Nonomuraea* sp. ATR24 ise baskın olarak glukoz ve daha az oranda galaktoz, mannoz, maduroz, riboz ve ramnoz içermektedir (Şekil 4.28).



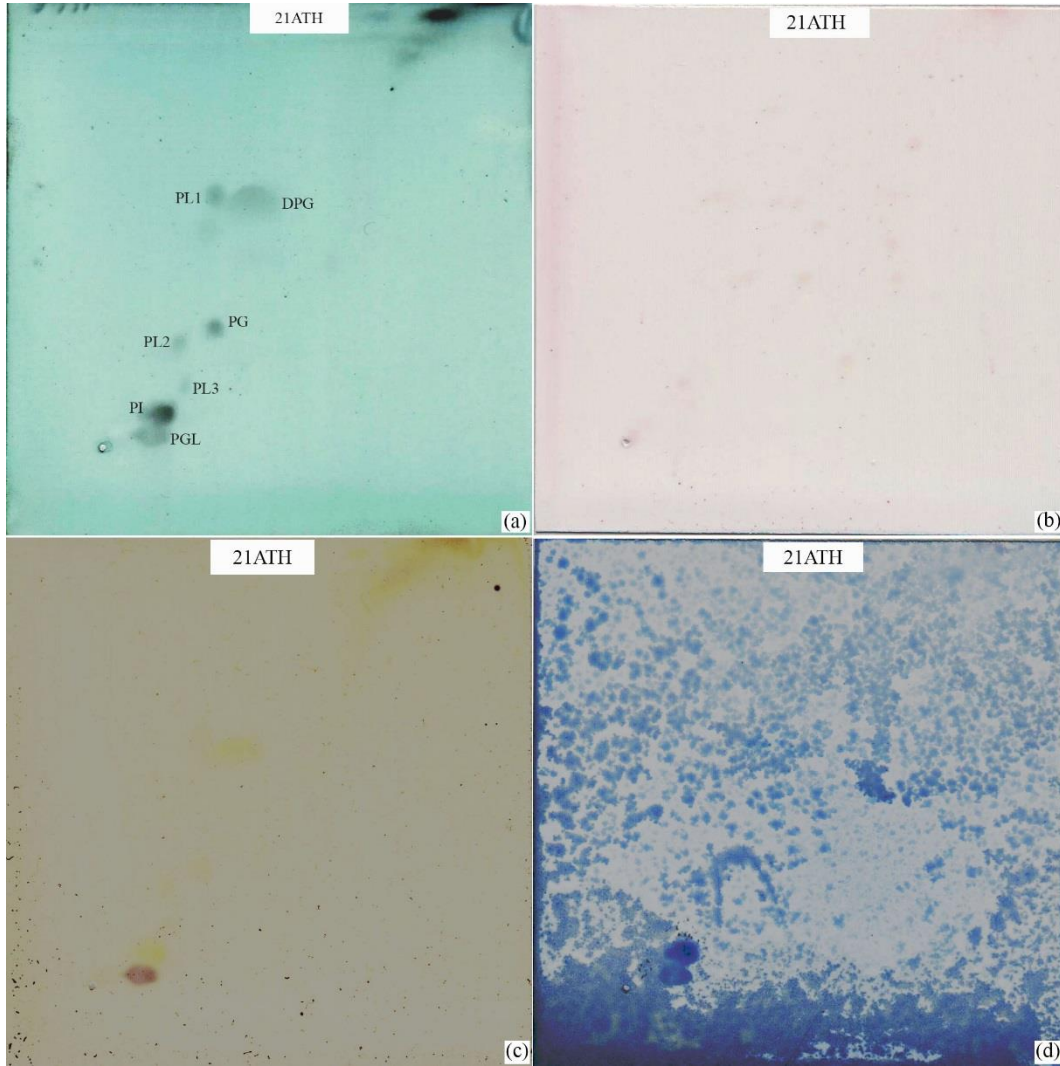
Şekil 4.29. *Saccharomonospora* sp. NB11 ve *Jishengella* sp. NA12 suşlarının şeker profilleri.

Saccharomonospora sp. NB11 suşu galaktoz, glukoz, mannoz, arabinoz, riboz ve iz miktarda ramnoz içermektedir. *Jishengella* sp. NA12 suşunun ise glukoz, mannoz, arabinoz, ksiloz, fukoz ve ramnoz içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.29).

4.1.5.3 Polar lipit analizi

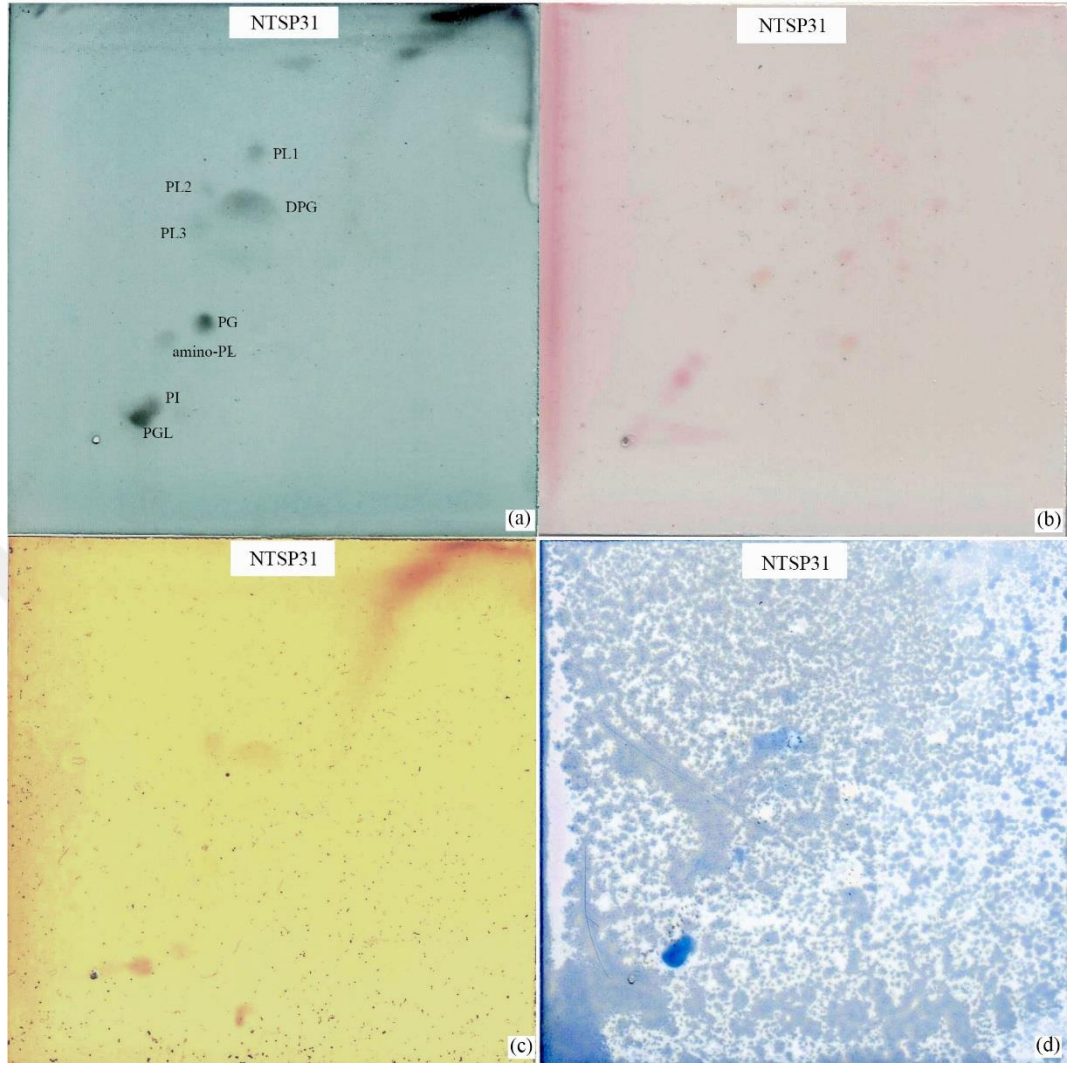
Kemotaksonomik karakterizasyonu yapılan test suşlarının polar lipit içerikleri ince-tabaka kromatografisi ile tespit edilmiştir. Örneklerin kromatografi plakası üzerindeki hareketleri, standart bileşiklerin hareketleri ile karşılaştırılarak polar lipit profilleri belirlenmiştir.

Actinomadura sp. 21ATH suşu baskın olarak fosfatidilinozitol (PI), fosfatidilgliserol (PG) ve difosfatidilgliserol (DPG) içermektedir. Ayrıca daha düşük oranda fosfo- grubu taşıyan lipitler ile fosfo- ve gliko- grubu taşıyan lipitler de bulunmaktadır (Şekil 4.30).



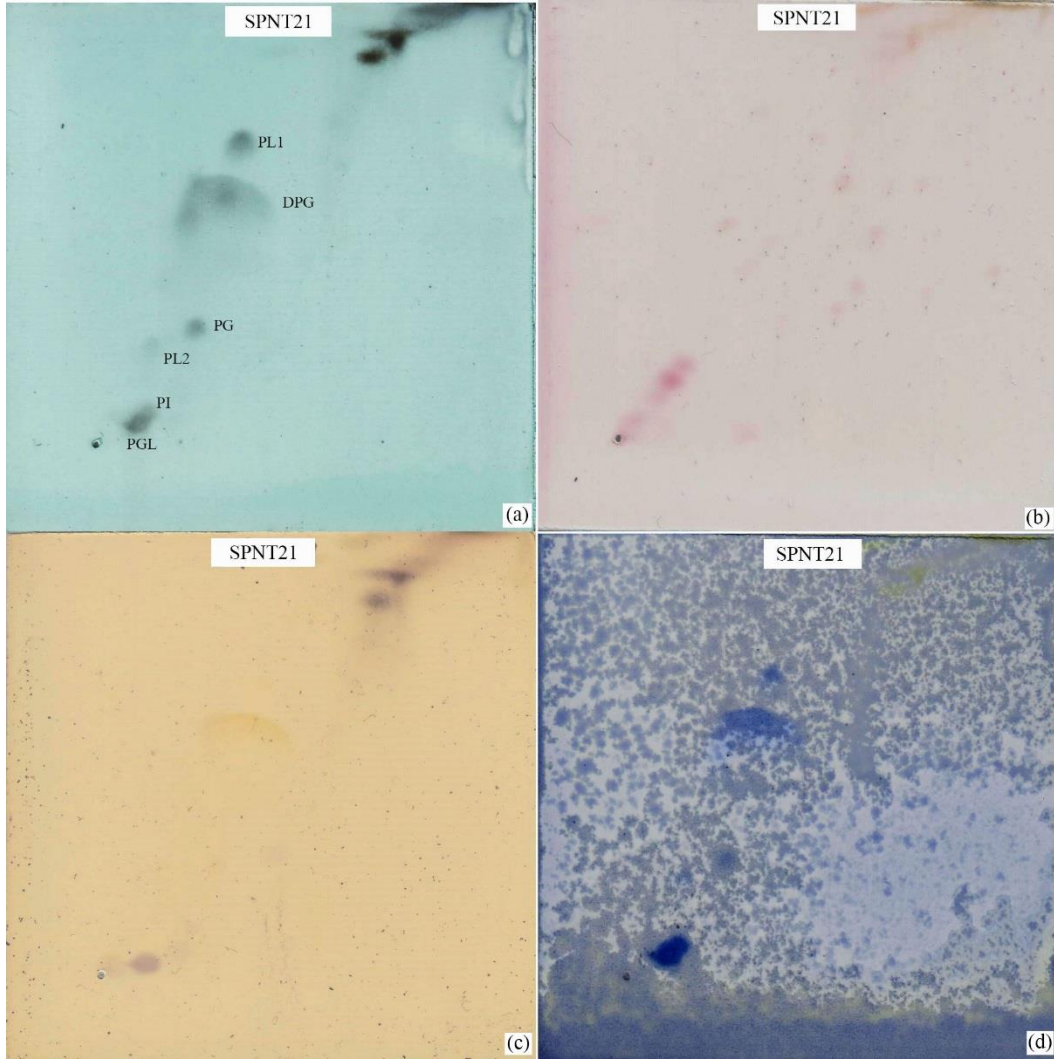
Şekil 4.30. *Actinomadura* sp. 21ATH suşunun polar lipid profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipidler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipidler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipidler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipidler.

Actinomadura sp. NTSP31 suşu fosfatidilinozitol (PI), fosfatidilgliserol (PG), difosfatidilgliserol (DPG), fosfoglikolipit (PGL), amino-fosfolipit ve fosfo-grubu taşıyan lipidleri içermektedir (Şekil 4.31).



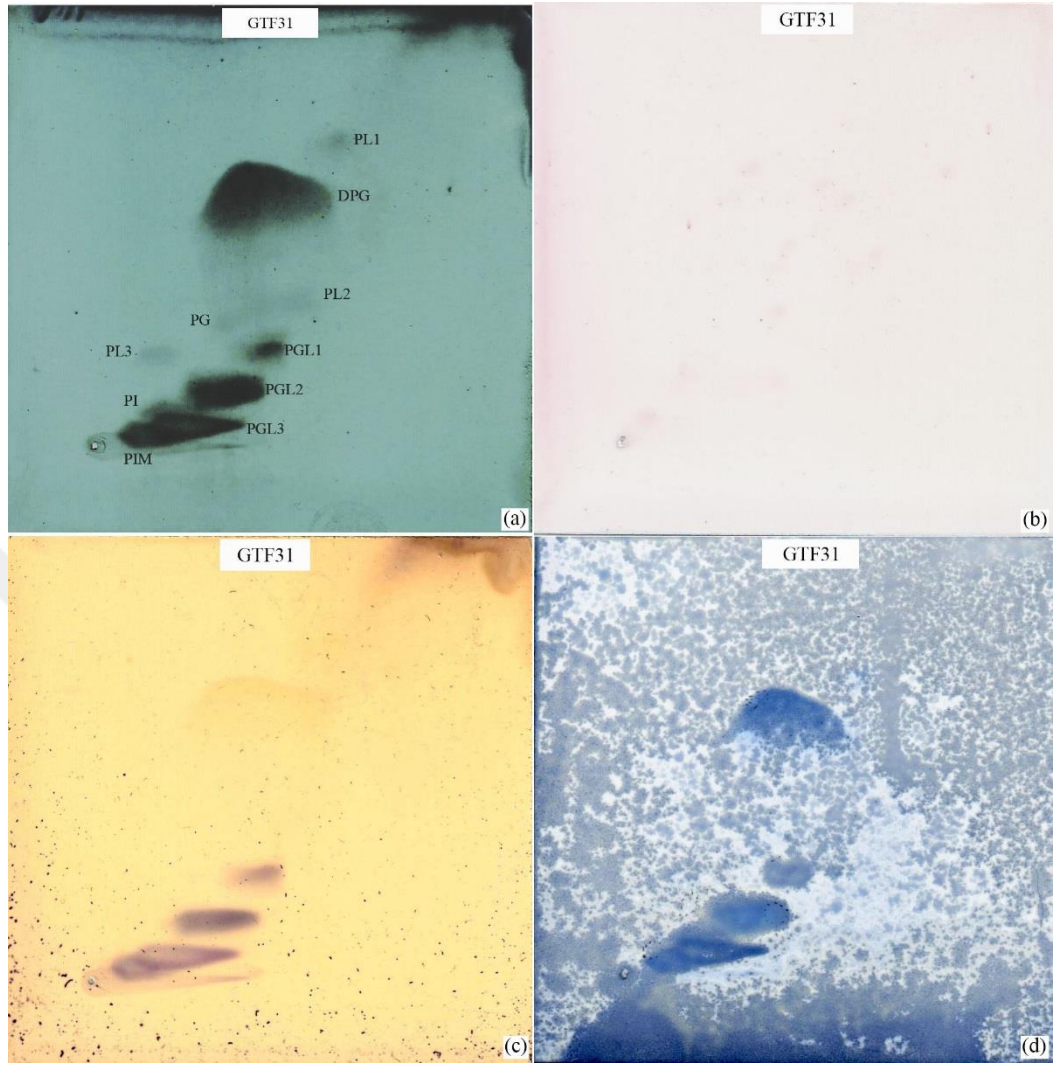
Şekil 4.31. *Actinomadura* sp. NTSP31 suşunun polar lipid profili (a) fosfomolibdrik asit ile spreylene plakada polar lipidler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipidler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipidler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipidler.

Actinomadura sp. SPNT21 suşunun polar lipid profili fosfatidilinozitol (PI), fosfatidilgliserol (PG), difosfatidilgliserol (DPG), fosfoglikolipitler ve fosfo- grubu taşıyan lipidlerden oluşmaktadır (Şekil 4.32).



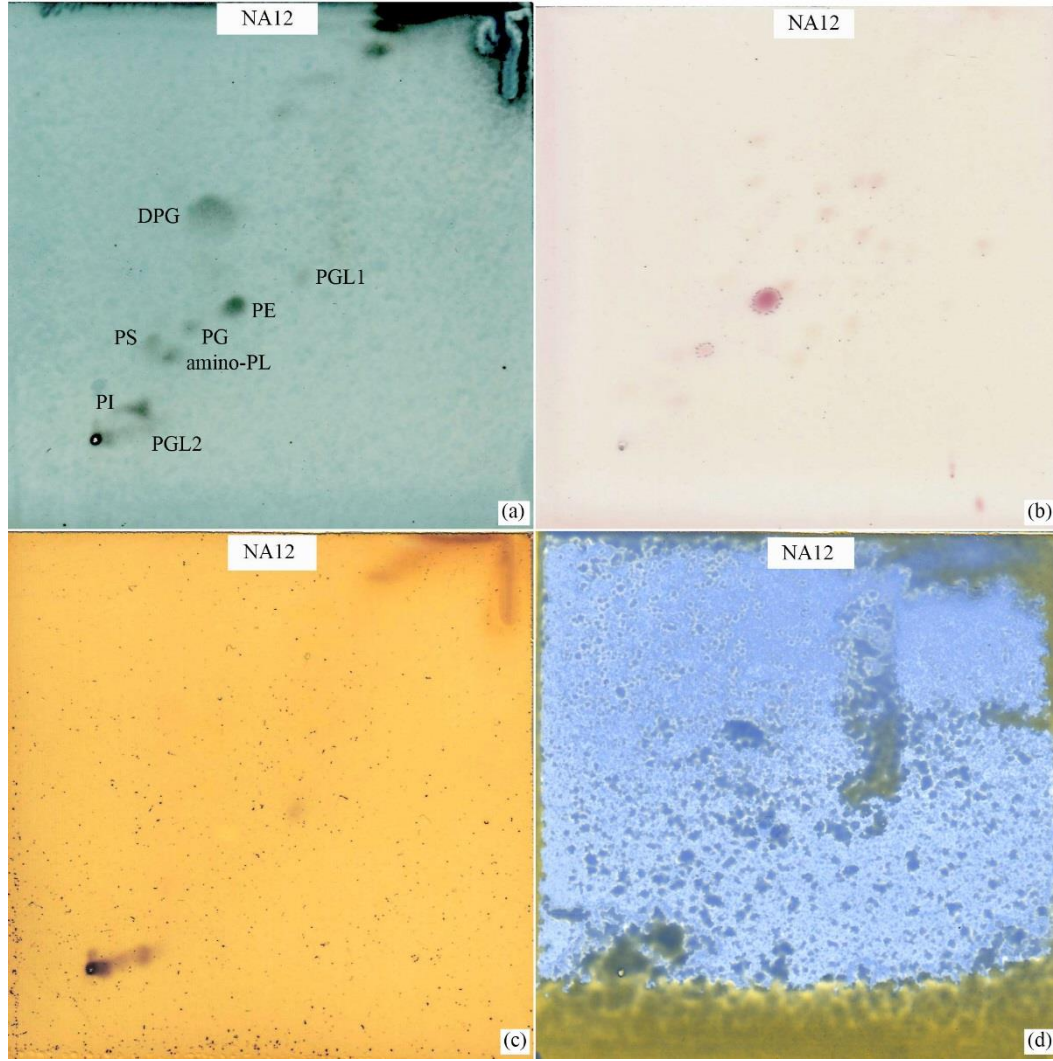
Şekil 4.32. *Actinomadura* sp. SPNT21 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdrik asit ile spreylene plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Jiangella sp. GTF31 suşu baskın olarak difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilinozitol (PI), fosfoglikolipitler (PGL) ve fosfatidilinozitolmannozitler (PIM) içermektedir. Ayrıca daha düşük oranda fosfo- grubu taşıyan diğer lipitler de bulunmaktadır (Şekil 4.33).



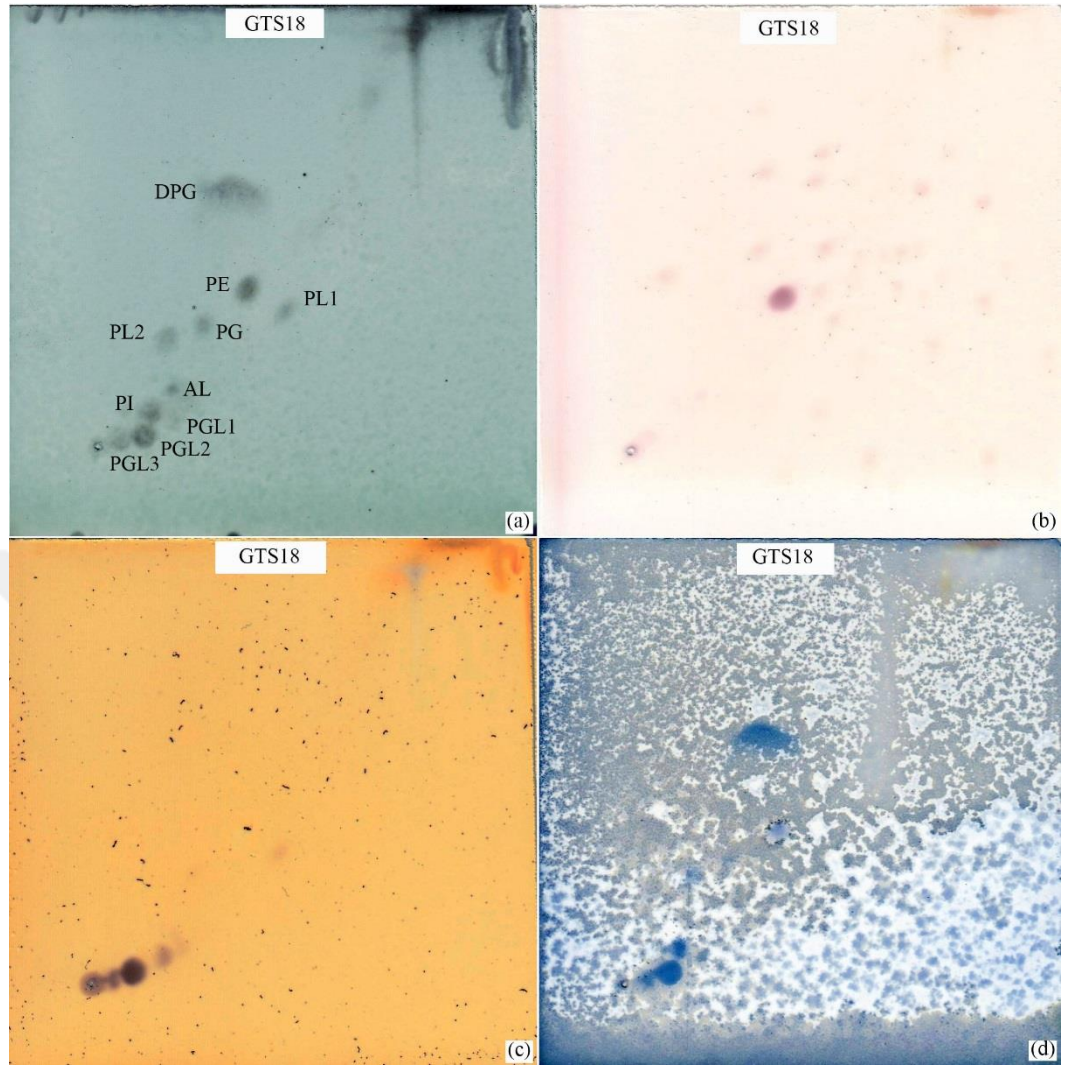
Şekil 4.33. *Jiangella* sp. GTF31 suşunun polar lipid profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipidler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipidler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipidler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipidler.

Jishengella sp. NA12 suşu fosfatidilinozitol (PI), fosfatidiletanolamin (PE), difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilserin (PS), fosfoglikolipitler (PGL) ve amino-grubu taşıyan bir fosfolipit içermektedir (Şekil 4.34).



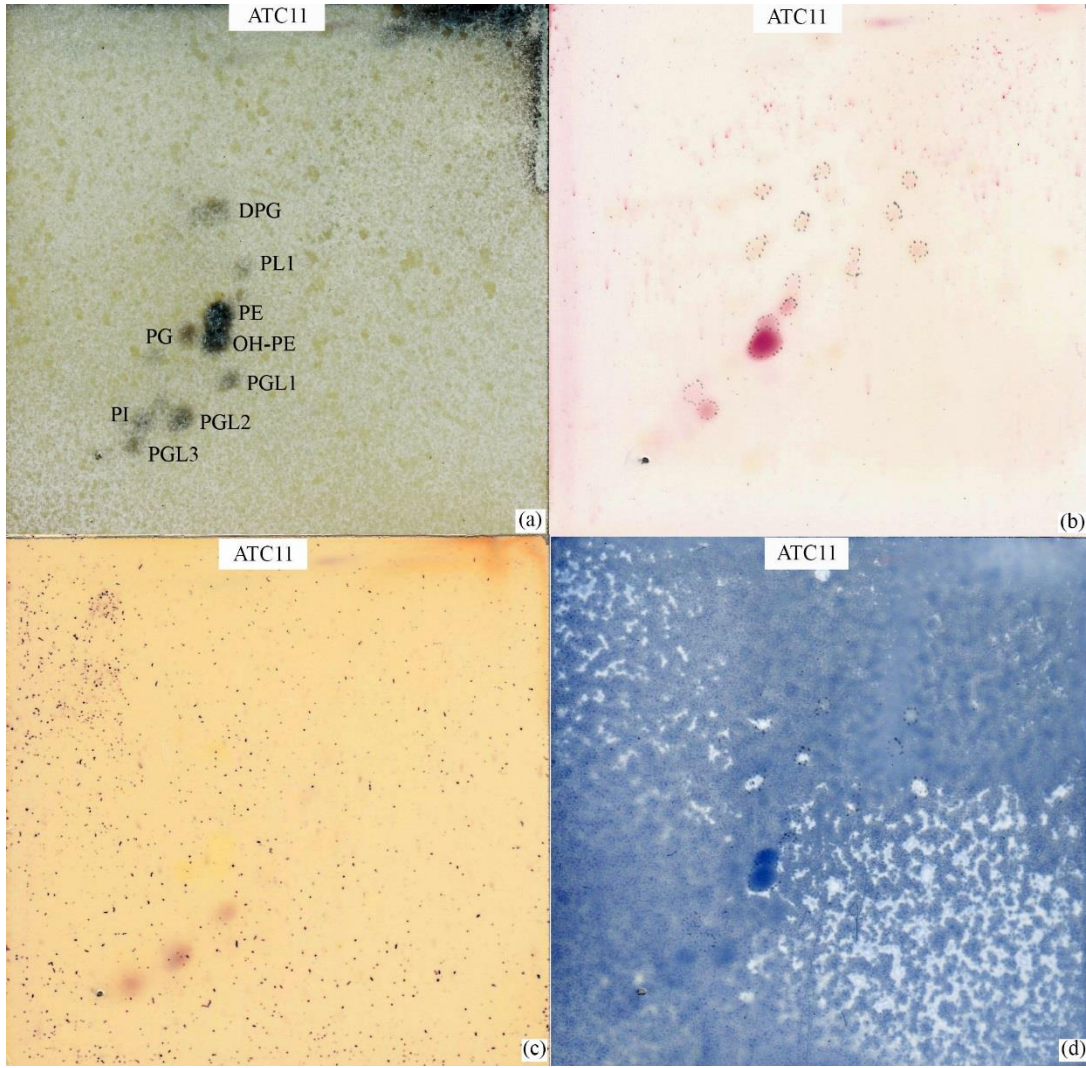
Şekil 4.34. *Jishengella* sp. NA12 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Nocardia sp. GTS18 suşunun polar lipit profili fosfatidilinozitol (PI), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilgliserol (PG), difosfatidilgliserol (DPG), fosfoglikolipitler (PGL), fosfo- grubu taşıyan diğer lipitler ile amino- grubu taşıyan bir lipit içermektedir (Şekil 4.35).



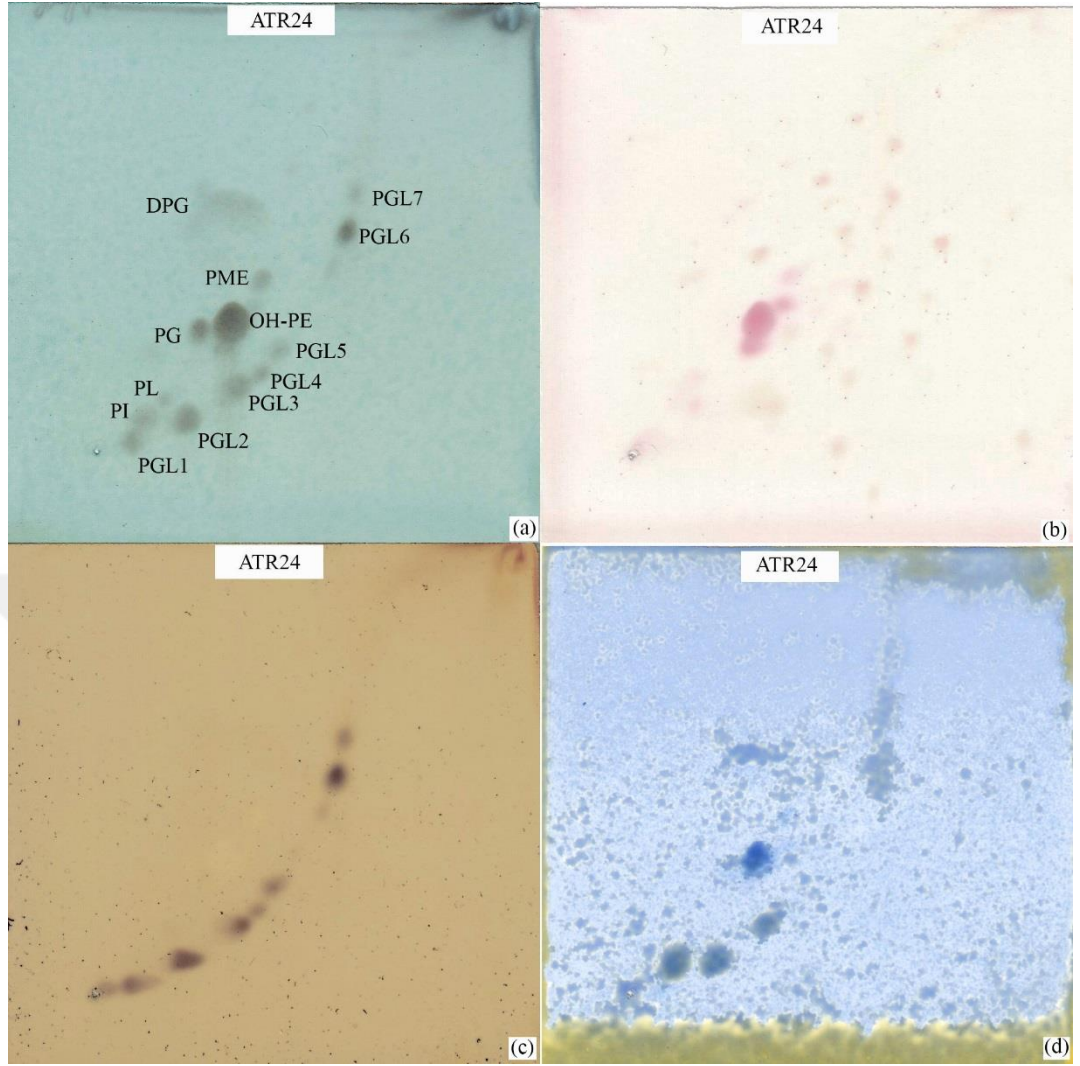
Şekil 4.35. *Nocardia* sp. GTS18 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylenen plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylenen plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylenen plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylenen plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Nonomuraea sp. ATC11 suşu difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidiletanolamin (PE), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE), fosfatidilinozitol (PI), fosfoglikolipitler (PGL) ve fosfo- grubu taşıyan diğer lipitleri içermektedir (Şekil 4.36).



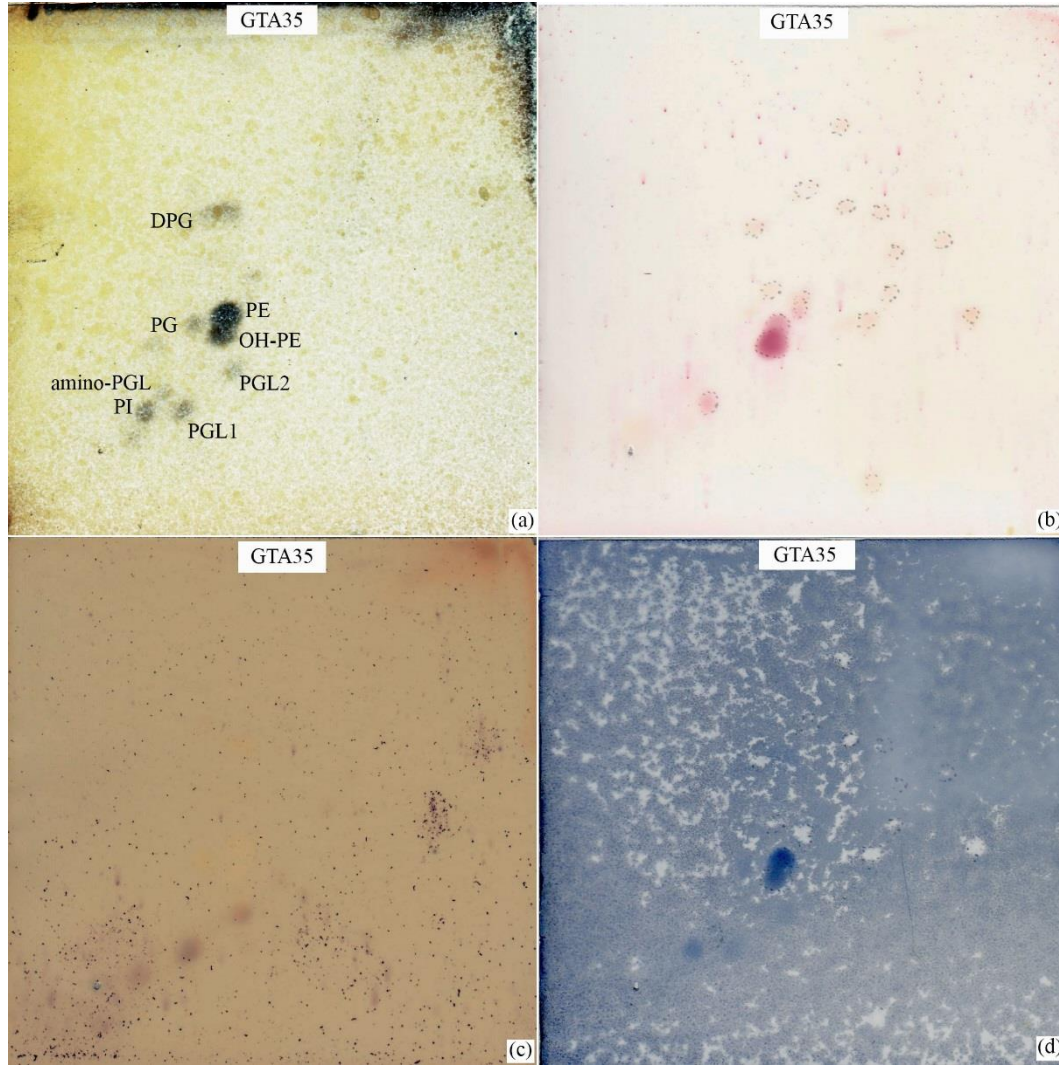
Şekil 4.36. *Nonomuraea* sp. ATC11 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdrik asit ile spreylene plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Nonomuraea sp. ATR24 suşu difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilgliserol (PG), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE), fosfometiletanolamin (PME), fosfatidilinozitol (PI), fosfoglikolipitler (PGL) ve fosfo- grubu taşıyan diğer lipitleri içermektedir (Şekil 4.37).



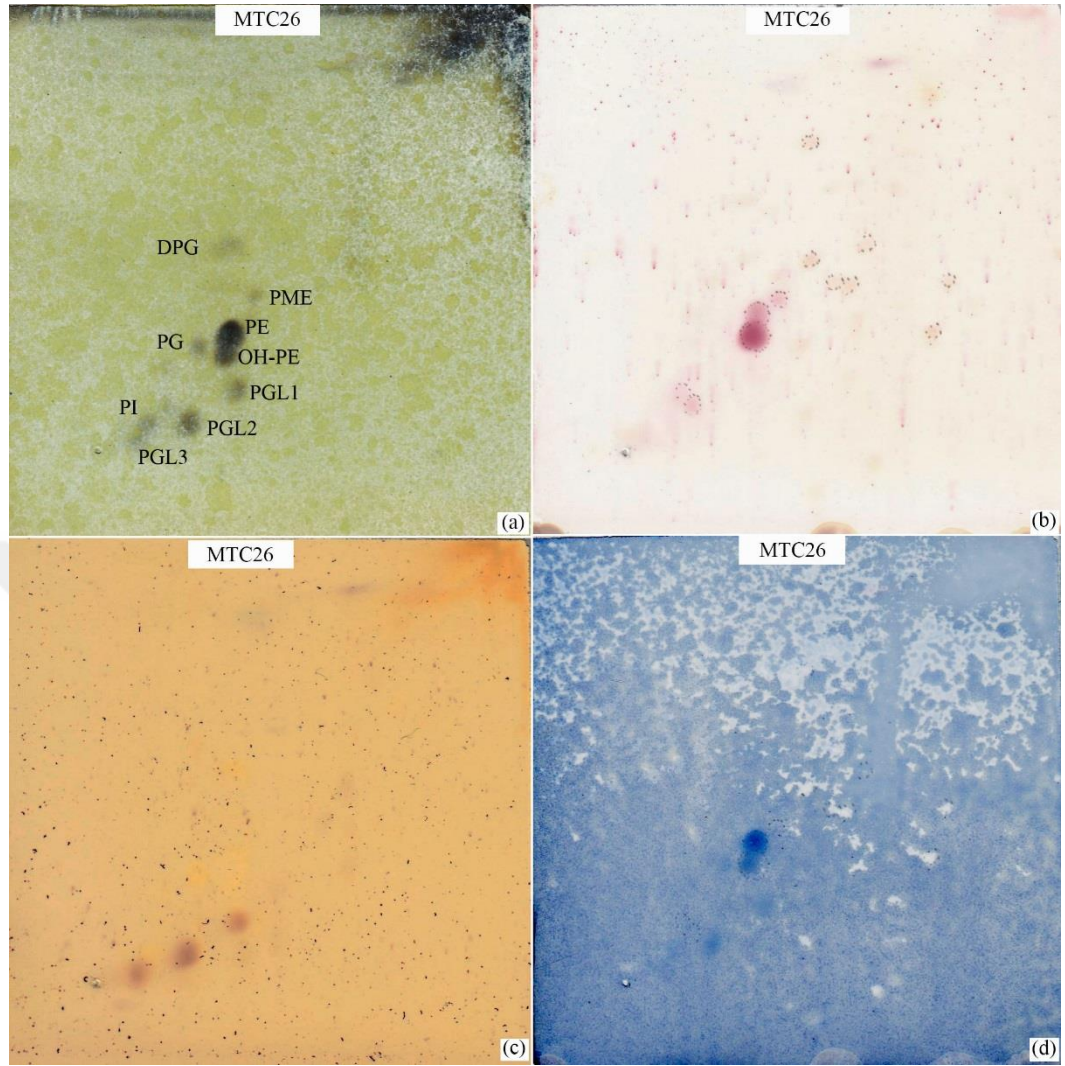
Şekil 4.37. *Nonomuraea* sp. ATR24 suşunun polar lipid profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipidler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipidler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipidler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipidler.

Nonomuraea sp. GTA35 suşunun polar lipid profili difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidiletanolamin (PE), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE), fosfatidilinozitol (PI) ve fosfoglikolipitleri içermektedir (Şekil 4.38).



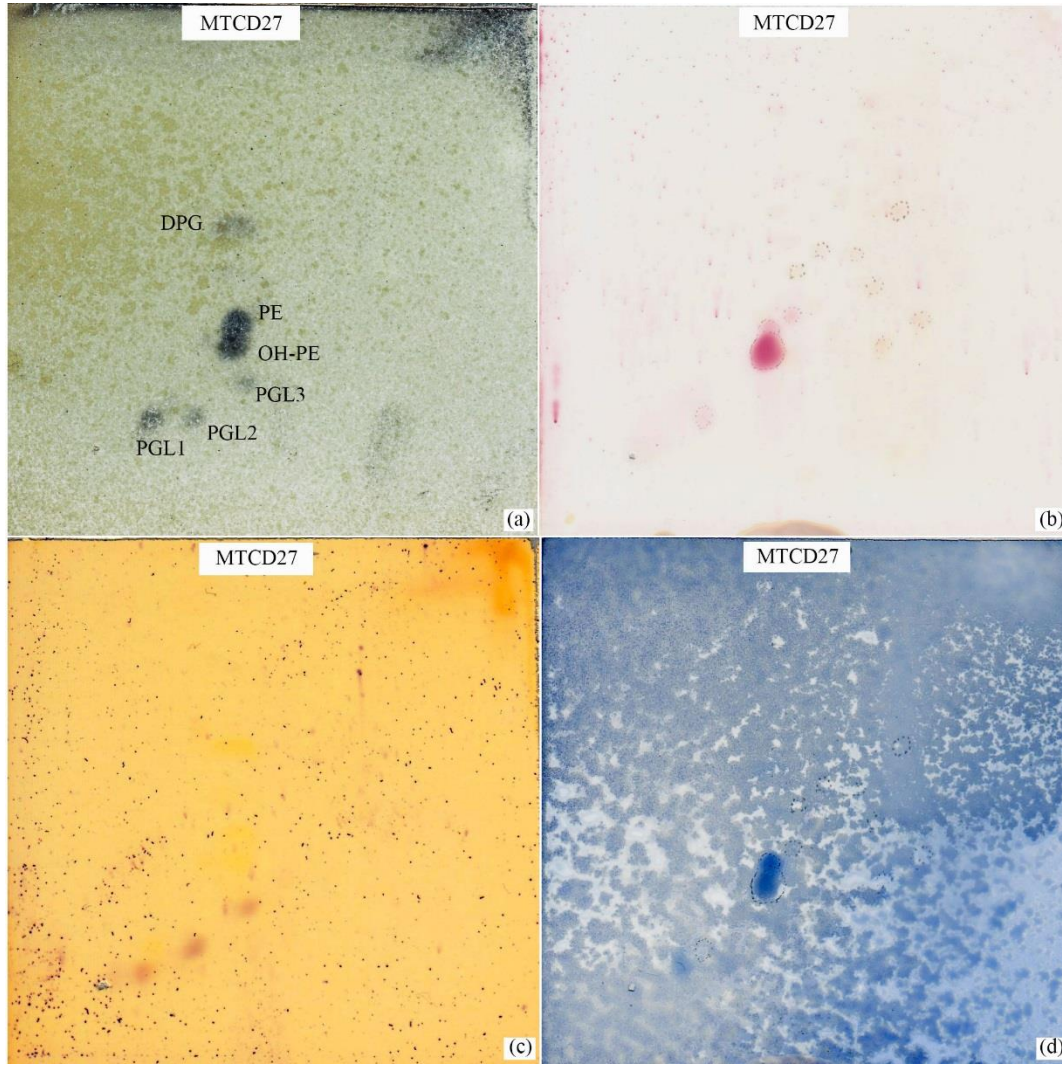
Şekil 4.38. *Nonomuraea* sp. GTA35 suşunun polar lipid profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipidler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipidler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipidler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipidler.

Nonomuraea sp. MTC26 suşu difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidiletanolamin (PE), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE), fosfometiletanolamin (PME) ve fosfoglikolipitleri içermektedir (Şekil 4.39).



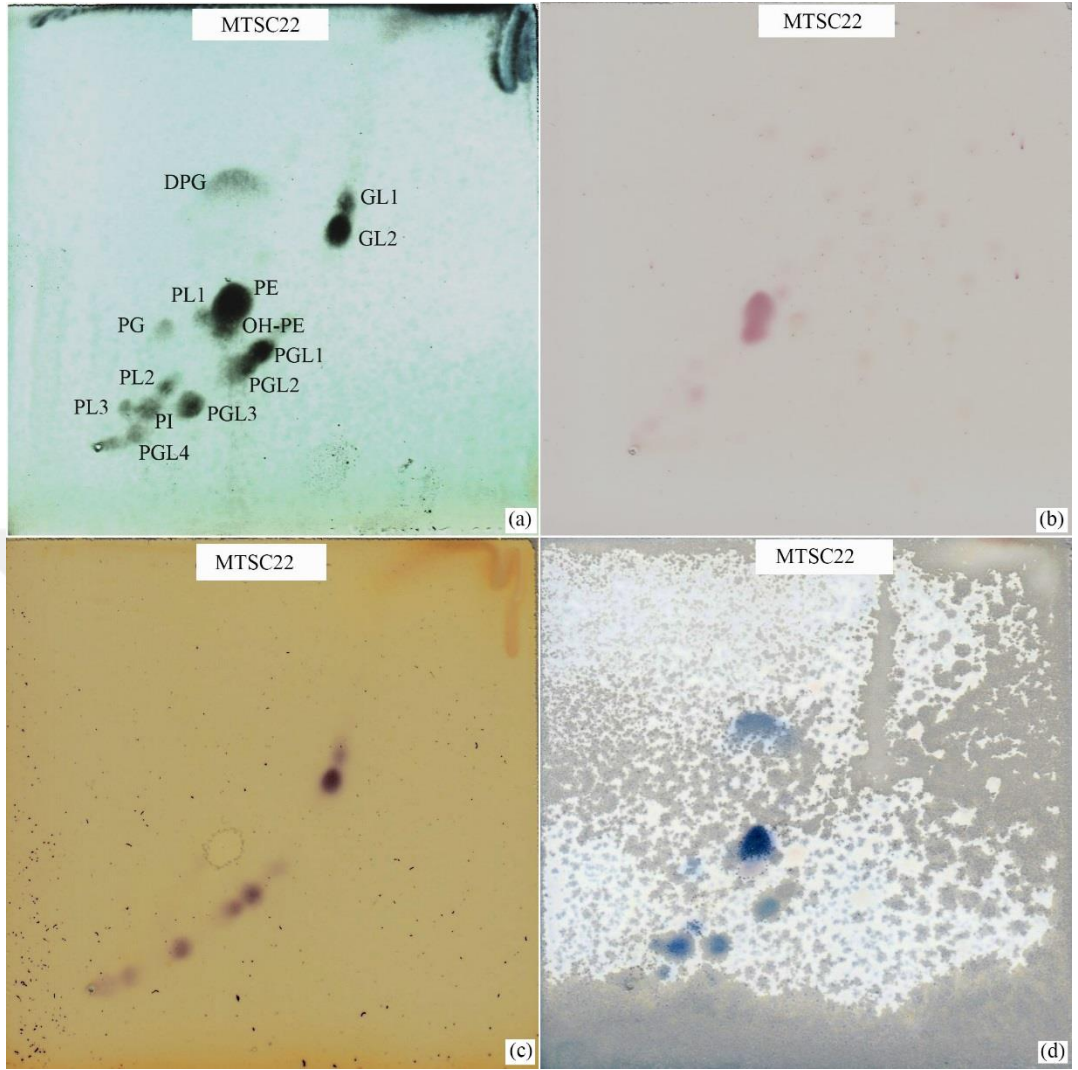
Şekil 4.39. *Nonomuraea* sp. MTC26 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Nonomuraea sp. MTCD27 suşunun polar lipit profili difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidiletanolamin (PE), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE) ve fosfoglikolipitlerden (PGL) oluşmaktadır (Şekil 4.40).



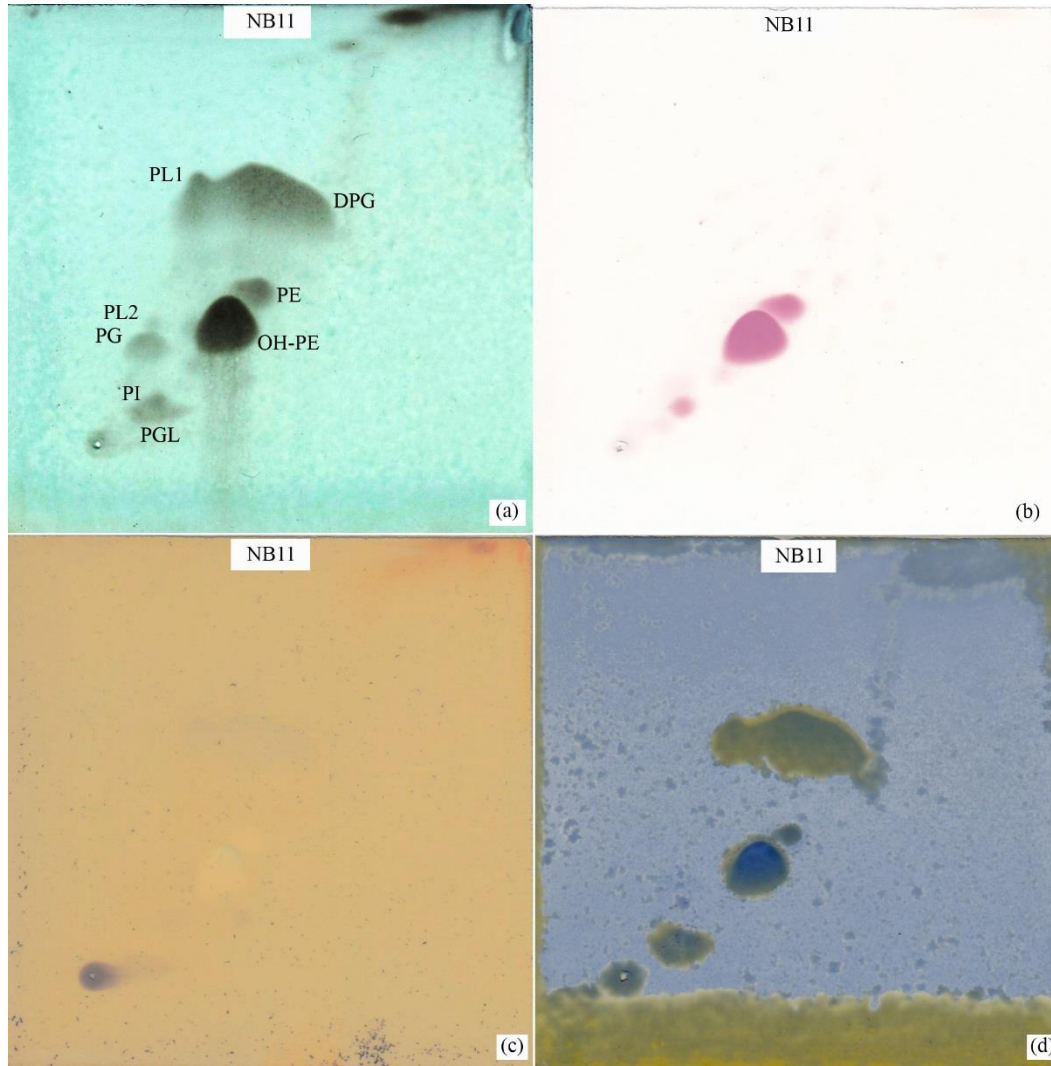
Şekil 4.40. *Nonomuraea* sp. MTCD27 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Nonomuraea sp. MTSC22 suşunun polar lipit profili difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidiletanolamin (PE), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE), fosfatidilinozitol (PI), fosfoglikolipitler (PGL), glikolipitler (GL) ve fosfo- grubu taşıyan diğer lipitlerden oluşmaktadır (Şekil 4.41).



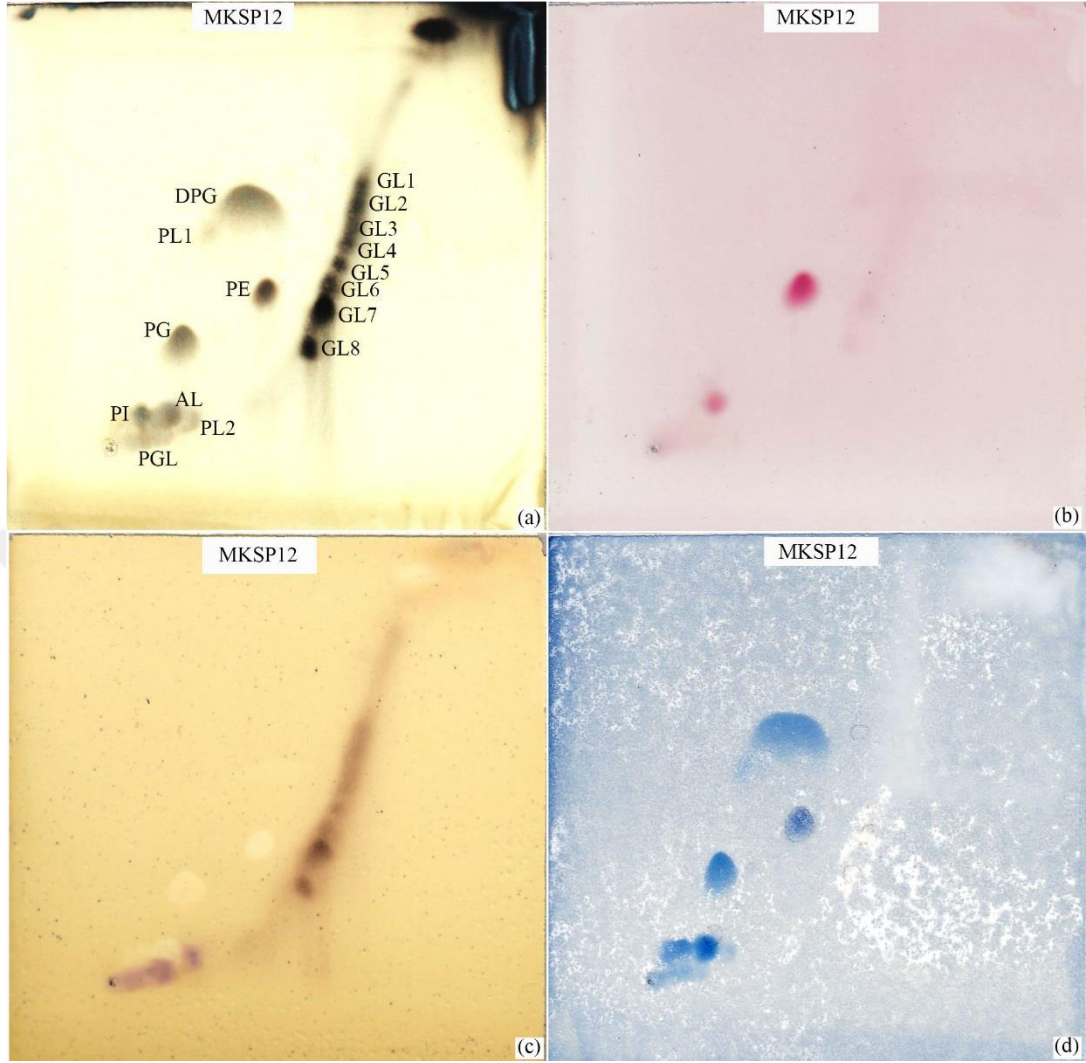
Şekil 4.41. *Nonomuraea* sp. MTSC22 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdrik asit ile spreylene plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

Saccharomonospora sp. NB11 suşu difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidiletanolamin (PE), hidroksi-fosfatidiletanolamin (OH-PE), fosfatidilinozitol (PI), fosfoglikolipit (PGL) ve fosfo- grubu taşıyan diğer lipitleri içermektedir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. *Saccharomonospora* sp. NB11 suşunun polar lipid profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylene plakada polar lipidler, (b) ninhidrin ile spreylene plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipidler, (c) α-naftosülfirik asit ile spreylene plakada gliko- grubu taşıyan polar lipidler, (d) molibdenum mavisi ile spreylene plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipidler.

Streptomyces sp. MKSP12 suşu, difosfatidilgliserol (DPG), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilinozitol (PI), gliko- grubu taşıyan lipidler (GL), bir amino-lipit (AL) ve fosfo- grubu taşıyan diğer lipidleri içermektedir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunun polar lipit profili (a) fosfomolibdik asit ile spreylenen plakada polar lipitler, (b) ninhidrin ile spreylenen plakada -NH₂ grubu taşıyan polar lipitler, (c) α -naftosülfirik asit ile spreylenen plakada gliko- grubu taşıyan polar lipitler, (d) molibdenum mavisi ile spreylenen plakada fosfo-grubu taşıyan polar lipitler.

4.1.5.4 Yağ asidi analizi

Jishengella sp. NA12, *Nonomuraea* sp. MTSC22 ve *Streptomyces* sp. MKSP12 suşlarının yağ asidi analizi, test suşları en yakın tip türleri ile aynı kültür koşullarında geliştirildikten sonra gerçekleştirildi. *Jishengella* sp. NA12 ve *J. endophytica* tip türü ISP2 besi ortamında, *Nonomuraea* sp. MTSC22 ve tip türleri *N. endophytica*, *N. salmonea*, *N. candida*, *N. turkmeniaca* GYM besi ortamında, *Streptomyces* sp. MKSP12 ve *S. specialis* TYG besi ortamında 14 gün 28°C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra aktif kültür örnekleri yağ asidi analizi için kullanıldı. Analiz

sonuçlarına göre *Nonomuraea* sp. MTSC22 suşu %37.14 izo-C_{16:0}, %27.42 C_{17:0} 10-metil; *Streptomyces* sp. MKSP12 %32.43 izo-C_{16:0}, %20.44 izo-C_{16:1} G, %13.30 anteizo-C_{17:1} ω9c; *Jishengella* sp. NA12 ise %44.89 izo-C_{16:0}, %14.85 C_{17:1} ω8c yağ asitlerini içermektedir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. *Nonomuraea* sp. MTSC22, *Streptomyces* sp. MKSP12 ve *Jishengella* sp. NA12 suşlarının en yakın tip türleri ile yağ asidi profilleri

Yağ asitleri	<i>Nonomuraea</i>					<i>Streptomyces</i>		<i>Jishengella</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C _{11:0}	-	-	0.11	-	0.04	-	-	-	-
C _{11:0} 3OH	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-
izo-C _{12:0}	-	0.06	-	-	-	0.07	-	0.02	0.05
C _{12:0}	-	0.07	0.07	0.08	0.14	-	0.10	-	0.05
izo-C _{11:0} 3OH	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-
C _{12:1}	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-
C _{13:0}	0.61	0.58	1.21	0.24	0.46	-	-	0.09	0.17
izo-C _{13:0}	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18
anteizo-C _{13:0}	-	-	-	-	-	0.09	0.05	-	0.04
izo-C _{14:0}	1.54	1.68	0.98	0.79	0.70	0.34	0.24	1.51	0.76
C _{14:0}	1.64	2.73	1.93	2.09	4.08	0.05	0.11	0.27	0.30
C _{13:0} 3OH/izo-C _{15:1} H	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03
izo-C _{15:1} F	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-
izo-C _{15:1} G	-	-	0.15	0.08	0.09	0.22	-	-	-
anteizo-C _{15:1} A	-	-	-	-	-	0.42	0.06	-	-
izo-C _{15:0}	4.37	2.77	5.37	4.50	2.83	0.49	1.77	7.23	26.13
anteizo-C _{15:0}	0.23	0.23	0.82	1.39	1.00	2.01	4.27	4.00	1.75
C _{15:1} ω8c	-	-	-	-	-	-	-	0.08	0.20
C _{15:1} ω6c	-	-	-	-	-	-	-	0.12	0.13
C _{15:0}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{14:0} 2OH	-	-	-	0.05	0.12	-	-	-	-
C _{16:1} ω7c alkol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.17
izo-C _{16:1} H	-	-	-	-	-	-	6.78	1.40	0.18
izo-C _{16:1} G	6.63	1.99	6.73	1.52	1.87	20.44	-	-	-
izo-C _{16:0}	37.14	36.08	22.36	31.09	13.96	32.43	28.33	44.89	18.36
anteizo-C _{16:0}	0.13	0.07	0.23	0.26	0.10	0.08	0.29	-	0.04
C _{16:1} ω7c/C _{16:1} ω6c	1.04	1.74	1.93	2.33	4.97	1.27	2.40	0.95	0.90
C _{16:1} ω5c	-	-	-	-	-	1.09	0.53	0.21	-
C _{16:0}	2.62	7.68	5.25	10.75	17.44	0.93	1.87	1.38	2.26
izo-C _{15:0} 3OH	-	-	-	-	0.05	-	-	-	0.03
C _{15:0} 2OH	0.89	1.07	1.55	0.59	1.27	0.06	-	-	-
izo-C _{17:1} ω9c	-	-	-	-	-	1.58	2.68	1.85	1.68
C _{16:0} 10-metil	1.24	1.94	2.11	3.61	4.48	-	-	-	-
anteizo-C _{17:1} ω9c	-	-	0.26	0.15	0.09	13.71	13.30	0.27	0.09
izo-C _{17:0}	0.16	0.31	0.96	1.98	0.72	1.20	1.78	1.31	2.76
anteizo-C _{17:0}	-	0.29	1.35	2.53	0.92	19.30	29.80	4.09	1.98
C _{17:1} ω8c	2.59	4.80	7.93	2.06	5.59	0.20	0.36	14.85	20.08
C _{17:0}	5.06	10.54	12.68	7.69	6.67	-	-	4.09	10.28
C _{17:0} cyclo	-	-	-	-	-	0.64	0.81	-	-
C _{16:0} 2OH	1.00	1.59	1.70	1.92	6.87	-	-	-	-

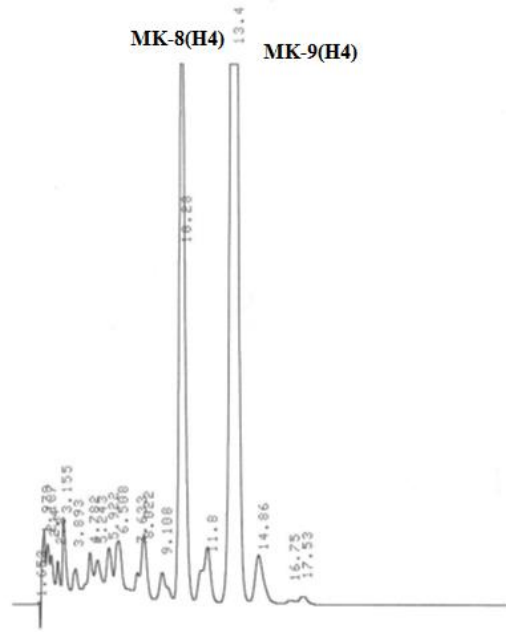
Çizelge 4.22 (devam). *Nonomuraea* sp. MTSC22, *Streptomyces* sp. MKSP12 ve *Jishengella* sp. NA12 suşlarının en yakın tip türleri ile yağ asidi profilleri

Yağ asitleri	<i>Nonomuraea</i>					<i>Streptomyces</i>		<i>Jishengella</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C _{16:1} 2OH	-	-	-	-	-	-	-	-	0.30
C _{17:0} 10-metil	27.42	16.30	17.17	13.14	11.69	-	-	4.55	4.94
C _{16:0} 3OH	-	-	-	0.07	0.12	-	-	-	-
izo-C _{16:0} 3OH	-	-	-	-	-	0.06	0.07	-	-
C _{18:3} ω6c (6,9,12)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.45
izo-C _{18:1} H	-	-	-	-	-	1.23	0.53	-	-
izo-C _{18:0}	1.74	1.79	0.62	1.56	0.54	1.33	2.59	1.42	-
ante-C _{18:0} /C _{18:2} ω6,9c	-	0.27	-	0.27	0.47	-	0.15	-	-
C _{18:1} ω9c	0.53	0.78	1.14	1.33	3.80	0.31	0.30	2.96	2.96
C _{18:1} ω6c	0.28	0.18	0.45	0.63	0.41	0.04	0.04	-	-
C _{18:0}	-	1.78	1.47	3.62	2.13	-	0.13	0.80	0.95
C _{18:1} ω7c 11-metil	-	0.08	0.17	-	-	-	0.19	-	-
C _{17:0} 2OH	0.86	0.59	1.16	0.46	1.11	0.09	0.20	-	-
C _{18:0} 10-metil	2.12	1.64	1.64	2.87	4.94	-	-	0.54	0.58
C _{17:0} 3OH	-	0.12	0.13	0.10	0.15	0.23	-	0.04	0.09
izo-C _{19:0}	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-
C _{19:1} ω11c/C _{19:1} ω9c	-	-	-	-	-	-	-	0.53	0.47
C _{19:0}	-	0.12	0.10	0.11	0.05	-	-	0.36	0.40
C _{18:1} 2OH	0.16	0.08	0.08	-	0.07	0.08	-	-	0.22
C _{18:0} 3OH	-	-	-	0.07	0.06	-	-	-	-
C _{20:4} ω6,9,12,15c	-	-	-	-	-	-	0.04	0.05	-
C _{20:1} ω9c	-	0.06	-	0.07	-	-	0.05	0.05	0.04

1 *Nonomuraea* sp. MTSC22, 2 *Nonomuraea endophytica* DSM 45385^T, 3 *N. salmonea* DSM 43678^T, 4 *N. candida* DSM 45086^T, 5 *N. turkmeniaca* DSM 43926^T, 6 *Streptomyces* sp. MKSP12, 7 *S. specialis* DSM 41924^T, 8 *Jishengella* sp. NA12, 9 *J. endophytica* DSM 45430^T

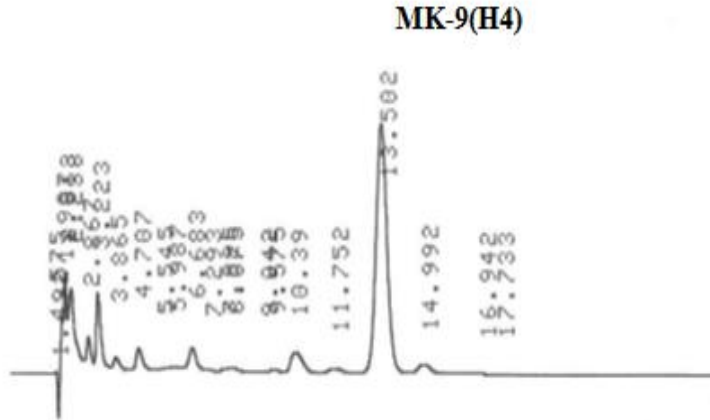
4.1.5.5 Menakinon analizi

Test suşlarının menakinon profilleri, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlendi. Buna göre *Saccharomonospora* sp. NB11 suşu baskın menakinon olarak MK-8(H₄) ve MK-9(H₄) bileşiklerini içermektedir (Şekil 4.44).



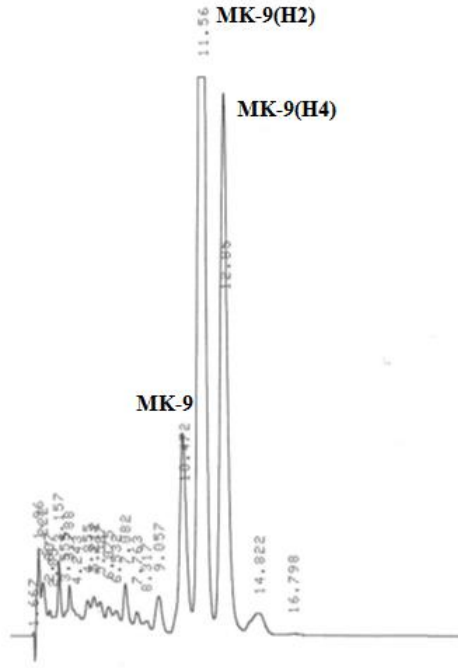
Şekil 4.44. *Saccharomonospora* sp. NB11 suşunun menakinon profili.

Jiangella sp. GTF31 suşu baskın menakinon olarak MK-9(H₄) bileşiğini içermektedir (Şekil 4.45).



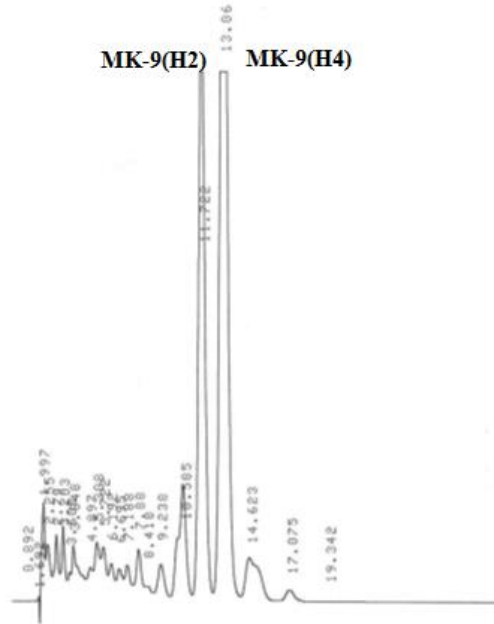
Şekil 4.45. *Jiangella* sp. GTF31 suşunun menakinon profili.

Nonomuraea sp. ATR24 suşu, büyük oranda MK-9(H₂) ve MK-9(H₄) bileşiklerini ve daha düşük oranda MK-9 menakinon bileşiğini içermektedir (Şekil 4.46).



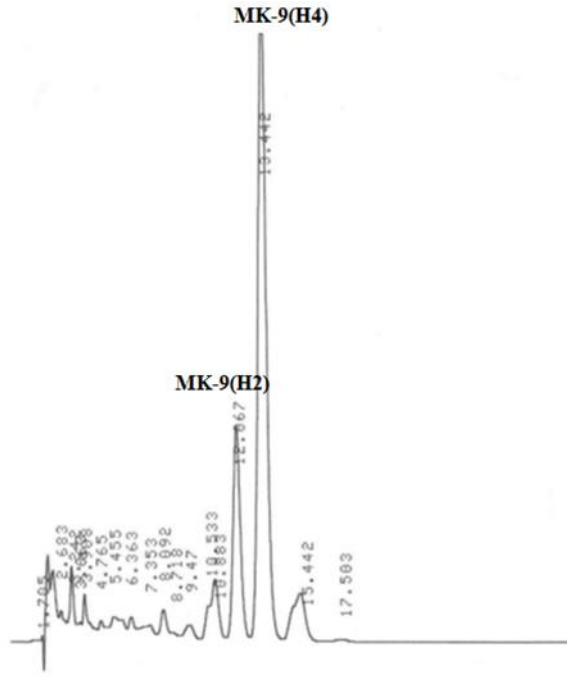
Şekil 4.46. *Nonomuraea* sp. ATR24 suşunun menakinon kromatogramı.

Nonomuraea sp. MTSC22 suşu baskın olarak MK-9(H₂) ve MK-9(H₄) bileşiklerini içermektedir (Şekil 4.47).



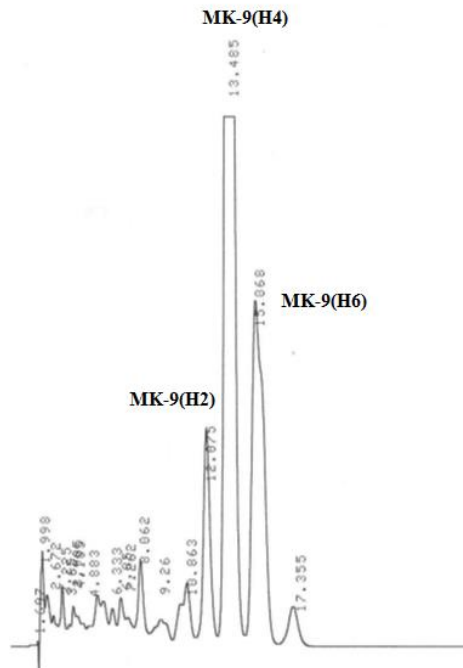
Şekil 4.47. *Nonomuraea* sp. MTSC22 suşunun menakinon kromatogramı.

Nonomuraea sp. MTCD27 suşu baskın olarak MK-9(H₄) ve daha düşük oranda MK-9(H₂) bileşiklerini içermektedir (Şekil 4.48).

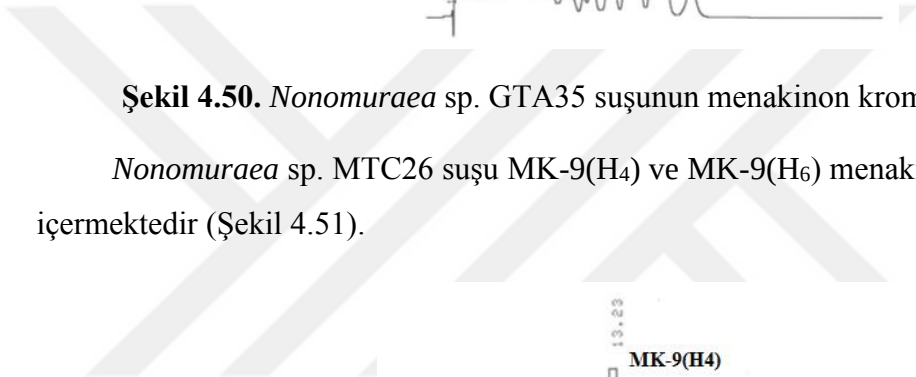


Şekil 4.48. *Nonomuraea* sp. MTCD27 suşunun menakinon kromatogramı.

Nonomuraea spp. ATC11 ve GTA35 suşları baskın menakinon olarak MK-9(H₄), MK-9(H₆) ve daha düşük oranda MK-9(H₂) bileşiklerini içermektedir (Şekil 4.49, Şekil 4.50).

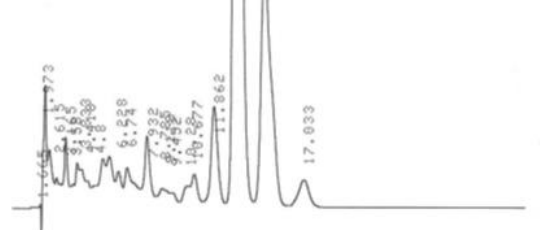


Şekil 4.49. *Nonomuraea* sp. ATC11 suşunun menakinon kromatogramı.



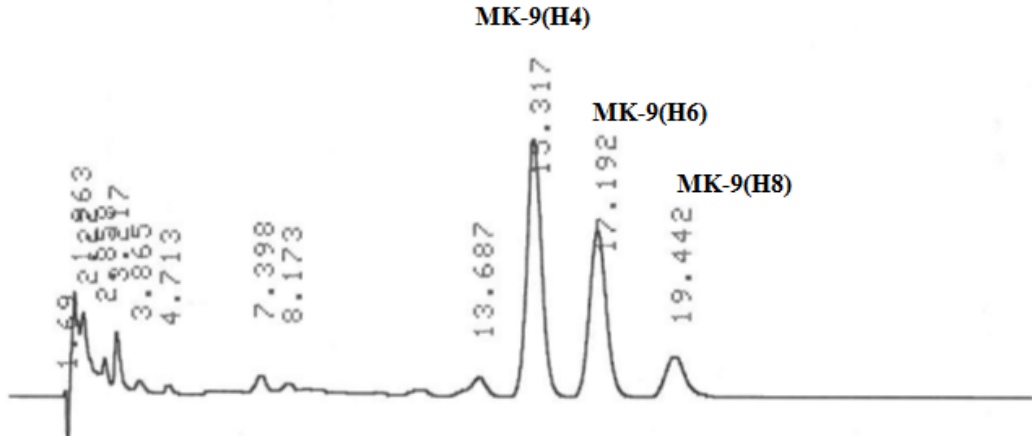
suşu MK-9(P

MK-9(H4)



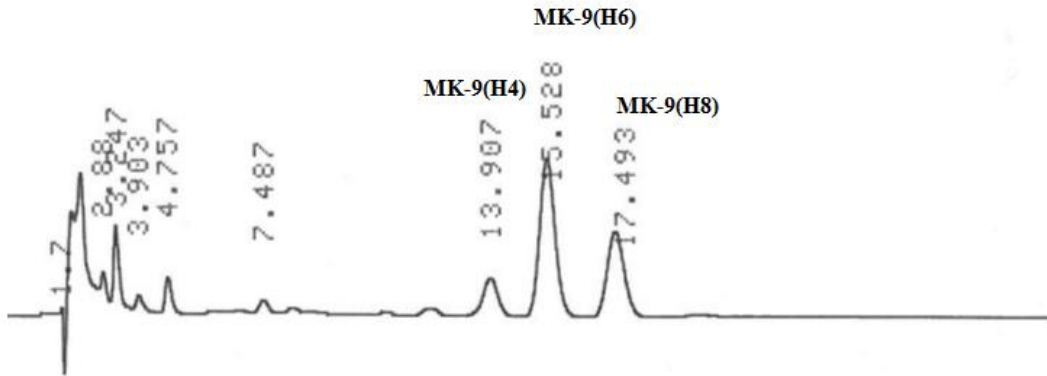
nomadura sp. NTSP31 suşu baskın menakinon olarak MK-9(H₄)

içermektedir (Şekil 4.52).

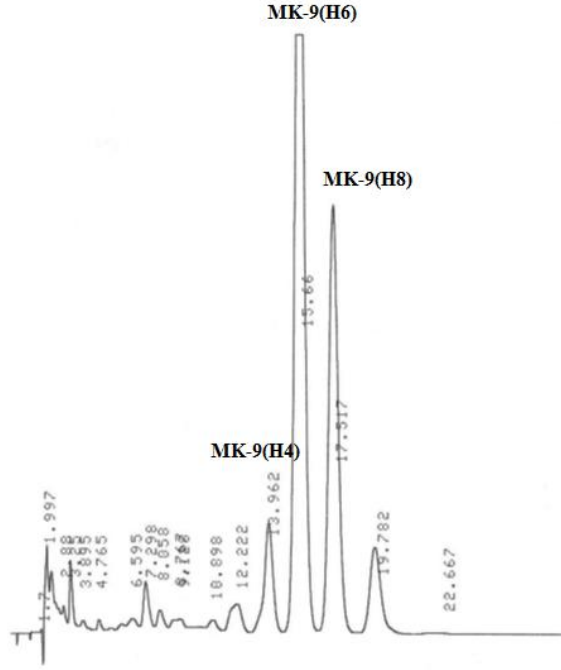


Şekil 4.52. *Actinomadura* sp. NTSP31 suşunun menakinon kromatogramı.

Actinomadura spp. 21ATH ve SPNT21 suşları baskın olarak MK-9(H₄) bileşiklerini içermektedir. Ayrıca daha düşük oranlarda MK-9(H₄) ve MK-9(H₈) bileşikleri de bulunmaktadır (Şekil 4.53, 4.54).



Şekil 4.53. *Actinomadura* sp. 21ATH suşunun menakinon kromatogramı.



Kemotaksonomik analiz için yeni tür olma potansiyeli yüksek olan 17 izolat seçilmiş ve bu izolatların diaminopimelik asit, şeker, polar lipit ve menakinon profilleri belirlenmiştir (Çizelge 4.23). Ayrıca *Jishengella* sp. NA12, *Nonomuraea* sp. MTSC22 ve *Streptomyces* sp. MKSP12 izolatlarının en yakın tip türleriyle birlikte yağ asidi profilleri de belirlenmiştir.



Çizelge 4.23. Yeni tür olma ihtimali yüksek olan izolatların kemotaksonomik özellikleri

Cins	İzolat	DAP	Şeker	Menakinon	Polar lipit
<i>Actinomadura</i>	D310AT	mezo-DAP	Glu, Man, Mad, Rib, Rha	MK-10(H2), MK-9(H6), MK-10(H6)	DPG, PI, PGL
	21ATH	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib, Rha	MK-9(H4), MK-9(H6), MK-10(H2)	DPG, PG, PI, PL, PGL
	SPNT21	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib, Rha	MK-9(H6), MK-10(H2), MK-9(H4), MK-10(H6)	DPG, PG, PI, PL, PGL
	NTSP31	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib, Rha	MK-9(H6), MK-10(H2)	DPG, PG, PI, APL, PGL, PL
<i>Jiangella</i>	GTF31	LL-DAP	Glu, Man, Rib, Rha	MK-9(H4)	DPG, PG, PI, PGL, PL
<i>Jishengella</i>	NA12	OH-DAP	Glu, Man, Ara, Xyl, Fuc, Rha	-	DPG, PE, PG, APL, PGL
<i>Nocardia</i>	GTS18	mezo-DAP	Gal, Glu, Ara, Rha	MK-8(H4)	DPG, PE, PG, PI, PGL, PL
<i>Nonomuraea</i>	MTSC22	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib	MK-8(H4), MK-9(H4), MK-9(H6)	DPG, PE, OH-PE, PG, PI, GL, PGL, PL
	ATR24	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib	MK-8(H4), MK-9(H0)	DPG, PME, OH-PE, PG, PI, PGL, PL
	ATC11	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib	MK-9(H4), MK-9(H6), MK-9(H2)	DPG, PE, OH-PE, PG, PI, PGL, PL
	GTA35	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib	MK-9(H4), MK-9(H6), MK-9(H2)	DPG, PE, OH-PE, PG, APGL, PGL
	MTC26	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib	MK-9(H4), MK-9(H6)	DPG, PE, PME, OH-PE, PG, PI, PGL
	MTCD27	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib	MK-9(H4), MK-9(H6)	DPG, PE, OH-PE, PGL
<i>Saccharomonospora</i>	NB11	mezo-DAP	Gal, Glu, Man, Ara, Rib, Rha	MK-9(H2), MK-9(H4)	DPG, PE, OH-PE, PG, PI, APL, PL
<i>Streptomyces</i>	MKSP12	LL-DAP	Glu, Rib	-	DPG, PE, PG, PI, GL, PGL
	NTH33	LL-DAP	Glu, Rib	MK-10(H2), MK-9(H6)	DPG, PE, PI, PL, AL
	NRH12	LL-DAP	Gal, Glu, Man, Mad, Rib, Rha	MK-10(H2), MK-9(H6)	DPG, PE, PI, PL

4.2 Tartışma

Aktinobakteriler toprak, tatlı su, göl, gübre ve denizel ortamlar gibi çeşitli ekolojik habitatlardan izole edilebilmektedir (Goodfellow & Williams, 1983). Bu organizmalar, çeşitli antibiyotikleri ve farklı biyolojik aktivitelere sahip terapötik kullanımı olan diğer bileşikler üretilmelerinden dolayı oldukça değerli kabul edilmektedir. Bu tür metabolitlerin büyük bölümü aktinobakteriler tarafından üretilirken, geri kalanın %20'si mantarlardan, %7'si *Bacillus* cinsinden ve %1-2'si *Pseudomonas* cinsinden elde edilmektedir. Bu nedenle aktinobakteriler, yeni ilaçların ve diğer biyoaktif metabolitlerin keşfi için yoğun olarak çalışılan en önemli organizma gruplarından biridir (Ramesh & Mathivanan, 2009). Özellikle *Streptomyces* cinsinin üyelerinin ticari önemi olan bileşikler üretebilme kapasitesi iyi bilinmektedir. Mikrobiyal biyoaktif sekonder metabolitlerin yaklaşık %45'i aktinobakterilerden ve bunun %80'ini teşkil eden 7600 metabolit *Streptomyces* türlerinden elde edilmektedir (Berdy 2005; Goodfellow 2010). Ancak, yıllarca toprak kaynaklı aktinobakteriler üzerine yapılan yoğun çalışmalar sonucu, yapısal olarak yeni bileşiklerin keşfedilme sıklığı azalmıştır. Bu nedenle faydalı biyoaktif bileşikler üreten mikrobiyal kaynaklar için daha önce araştırılmamış yeni mikrobiyal habitatların incelenmesi gerekmektedir (Qin ve diğ. 2011).

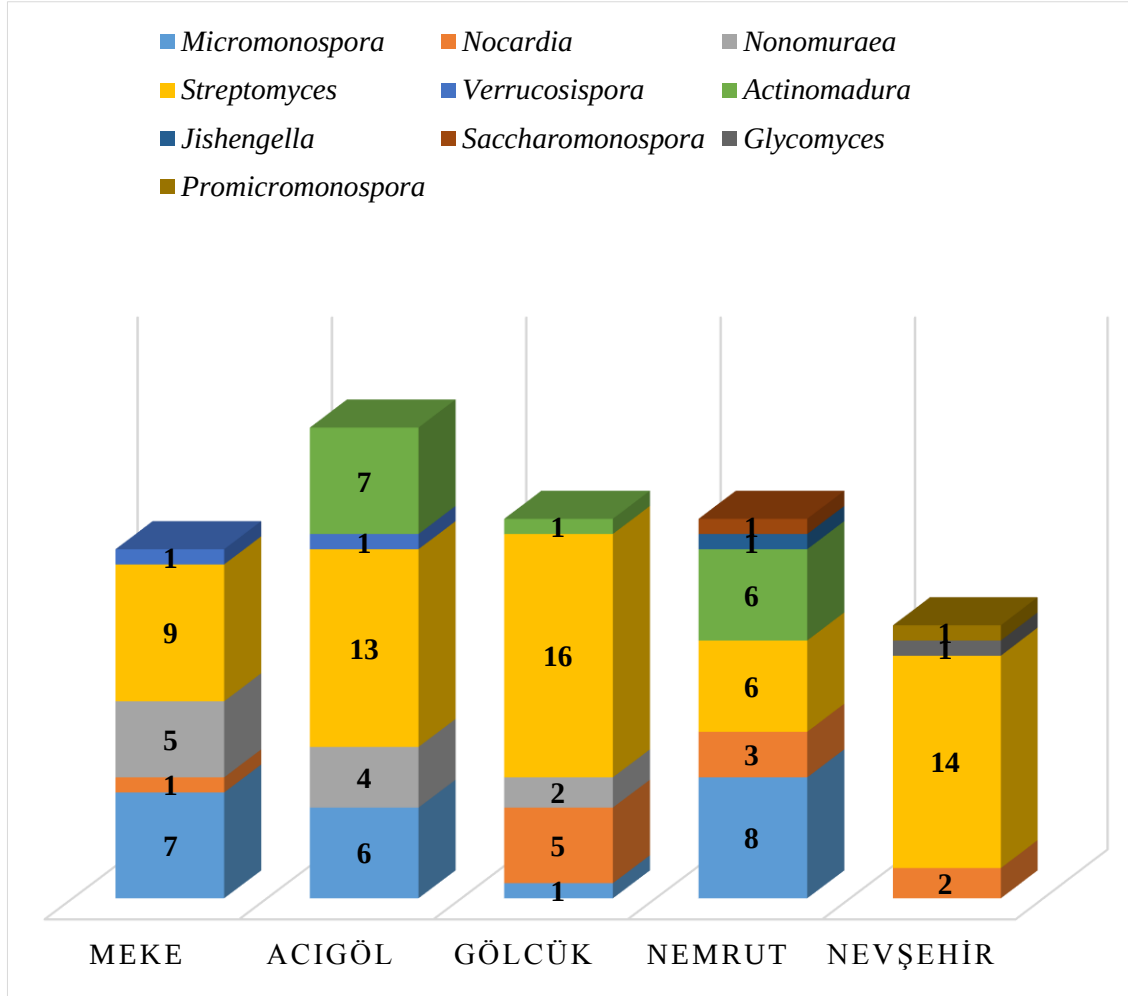
Bu tez çalışmasında, daha önce aktinobakteri izolasyon çalışmalarına dahil edilmemiş olan krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden *Actinobacteria* sınıfının 11 farklı cinsine ait mikroorganizmalar izole edilmiştir (Şekil 4.56). Örneklem alanı olarak seçilen krater gölleri fizikokimyasal bakımdan sahip oldukları çeşitlilik nedeniyle, farklı metabolik potansiyele sahip mikroorganizmaları barındırabilmektedir.

Mevcut durumda prokaryotik sınıflandırma, genotipik ve fenotipik verilerin entegre edildiği polifazik taksonomi yaklaşımına dayanmaktadır. Özellikle yeni bir izolatın daha önce tanımlanmış olan türlerden farklı bir türü temsil edip etmediğinin ortaya konmasında, 16S rRNA gen dizi benzerliği için %97 sınır değeri, tür tanımı için yapılması gereken analizlerin seyrini belirlemektedir. Buna göre 16S rRNA gen dizi benzerliği %97'nin üzerinde olan izolatların tür statülerinin doğrulanabilmesi için DNA-DNA hibridizasyon analizinin yapılması yaygın bir uygulamadır. Ancak son zamanlarda 16S rRNA gen dizi benzerliği ve DNA-DNA hibridizasyon verileri

arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarla, sadece 16S rRNA gen dizi benzerliği %98.7 – 99 olan izolatların tür statülerinin belirlenebilmesi için DNA-DNA hibridizasyon analizinin yapılması gerektiği gösterilmiştir (Stackebrandt ve Ebers, 2006; Meier-Kolthoff ve diğ., 2013). Bu çalışmada da en yakın tip türüne 16S rRNA gen dizi benzerliği %99'un altında olan izolatlar, filogenetik ağaçtaki topolojileri de dikkate alınarak, yeni tür olma potansiyeli yüksek olan izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Ancak, 16S rRNA gen dizi benzerliği için önerilen %98.7 – 99 sınır değerlerinin halihazırda yaygın kullanımının olmaması nedeniyle, polifazik karakterizasyon için seçilen izolatların yeni tür statülerinin doğrulanabilmesi için genom dizilerinin karşılaştırılmasına dayanan in silico DDH analizleri yapılacaktır.

Orta Anadolu'da yerleşim gösteren Meke Gölü, aynı zamanda Meke Tuzlası olarak adlandırılmakta ve ekstrem tuzlu habitat olma özelliğindedir. Ayrıca Meke Gölü'nün yakınında bulunan Acıgöl de suyunun alkali olmasından dolayı ekstrem alkali habitat özelliğindedir. Fizikokimyasal analizlere göre, Meke Gölü kıyı toprak örneği hafif alkali özellikte (pH 8.19) ve organik madde içeriği orta düzeydedir. Meke Gölü kıyı sediment ve toprak örneğinden izole edilen 63 aktinobakteri izolatından 23'ü 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmıştır. Buna göre Meke Gölü'nden *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Streptomyces* ve *Verrucospora* cinslerinin üyeleri izole edilmiştir. Özellikle sediment örneğinden izole edilen *Streptomyces* sp. MKSP12, literatürde 16S rRNA gen dizi benzerlikleri ve DDH değerleri ile ilgili olarak yapılan karşılaştırmalar (Stackebrandt ve Ebers, 2006; Meier-Kolthoff ve diğ. 2013) göz önüne alındığında, en yakın tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranının %98'in altında (%97.21) olması nedeniyle yeni tür olma potansiyeli yüksek olan izolatlardan biridir. Ayrıca Meke Gölü toprak örneğinden izole edilen *Nonomuraea* spp. MTC26, MTCD27, MTCD31, MTSC22 suşlarının da en yakın tip türüne olan 16S rRNA gen dizi benzerlikleri %99'un altındadır. Almanya Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu'nda (DSMZ – Almanya) ve Kore Tip Kültürleri Koleksiyonu'nda (KCTC – Güney Kore) depolanan bu izolatların kemotaksonomik karakterizasyonları tamamlanmıştır. *Streptomyces* sp. MKSP12 suşu, diaminopimelik asit izomeri olarak LL-DAP içermektedir. Polar lipid profilinde ise DPG, PI, PE ve gliko- grubu taşıyan lipidler bulunmaktadır. *Streptomyces* cinsinin genel özellikleri ile karşılaştırıldığında (Kämpfer ve diğ. 2014), *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunun kemotaksonomik

özelliklerinin cins ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunu, en yakın tip türlerinden ayırt eden özellikler de fenotipik olarak karakterize edilmiştir. Özellikle pH 7 – 11 aralığında gelişebilmesi ve jelatin, kazein, nişasta ve Tween bileşiklerini parçalayabilmesi, bu suşun alkali koşullarda kullanılabilecek endüstriyel enzimler için potansiyel taşıdığını göstermektedir. *Streptomyces* sp. MKSP12 suşu, ekstrem halofil bir habitat olan Meke Gölü sediment örneğinden izole edilmiş olmasına rağmen NaCl toleransı %3 ile sınırlıdır.



Şekil 4.56. Krater göllerinden izole edilen aktinobakterilerin cinslere göre dağılımı.

Bilinen bileşiklerin tekrar izole edilmesinden dolayı, halofiller gibi yeni aktinobakteri gruplarının terapötik olarak uygun yeni kimyasal yapıların kaynakları olarak takip edilmesi oldukça önemlidir (Bull ve diğ., 2005). Halofilik aktinobakterilerin antimikrobiyal, sitotoksik, nörotoksik, antimitotik, antiviral ve antineoplastik aktivitelere sahip birçok endüstriyel ürün için değerli kaynaklar sağlayacağı kabul edilmektedir (Cragg & Newman, 2005; Singh ve diğ., 2006). Ayrıca halofilik ve halotolerant mikroorganizmaların organik kirleticilerin

parçalanmasında; biyopolimerlerin, biyosurfaktanların ve uyumlu çözünenlerin üretiminde kullanılabileceği öngörülmektedir. Bu nedenle, ülkemizde bu tür ekstrem habitatlardaki yeni aktinobakteri türlerinin ortaya çıkarılması önem kazanmaktadır (Tatar ve diğ. 2013; 2014; 2016).

Nonomuraea cinsinden köken alan biyoaktif bileşiklerin büyük bölümü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Cinsin tip türü *N. pusilla* IFO 14684^T tarafından antibakteriyal bir bileşik olan aktinotiyosinin üretildiği tespit edilmiştir. Fleck ve diğ. (1978) *N. rubra* DSM 43768^T türünün etkili bir anti-Gram-pozitif antibiyotik olan maduramisini ürettiğini bildirmişlerdir. Sebek ve Dolak (1984), *N. dietziae* DSM 44320^T türünün anti-stafilokokkal bir ajan olan novobiosini hidroksilleyebildiğini göstermişlerdir. Bu modifikasyonun, novobiosinin etkinliğini azaltmakla birlikte, ana bileşiğin kullanımından kaynaklanan yan etkileri azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu durum *Nonomuraea* cinsinin hem biyoaktif bileşiklerin üreticisi olarak hem de daha önceden keşfedilmiş olan antibiyotikleri biyolojik olarak dönüştürerek fayda sağladığını göstermektedir (Otoguro ve diğ. 2014). Bu çalışmada, Meke Gölü kıyı toprak örneklerinden *Nonomuraea* cinsi üyesi olan beş mikroorganizma izole edilmiştir. Bunlardan *Nonomuraea* spp. MTC26, MTCD27, MTCD31 ve MTSC22 izolatlarının 16S rRNA dizi benzerlik oranlarının %99'un altında olması, bu suşların yeni tür statülerinin doğrulanması için polifazik taksonomik yaklaşımla tanımlanmalarını gerektirmektedir. *Nonomuraea* spp. MTCD27 ve MTCD31 suşlarının birbirleri olan 16S rRNA gen dizi benzerliklerinin yüksek olması (%99.93; 1483 pozisyonunda 1 nt fark) ve filogenetik ağaçtaki konumlarının da yakın olması nedeniyle karakterizasyon için *Nonomuraea* sp. MTCD27 suşu seçilmiştir. Kemotaksonomik karakterizasyonu yapılan *Nonomuraea* spp. MTC26, MTCD27 ve MTSC22 suşlarının polar lipid profillerinin, cinsin diğer üyeleriyle uyumlu olarak, DPG, PE ve OH-PE; menakinon profillerinin ise değişen oranlarda MK-9(H₂), MK-9(H₄) ve MK-9(H₆) bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *Nonomuraea* sp. MTSC22 suşunun en yakın tip türleri ile yağ asidi profili de belirlenmiş ve yağ asidi içeriklerinin benzer olmakla birlikte yağ asidi bileşiklerinde oransal farklılıklar bulunduğu görülmüştür.

Orta Anadolu'da Meke Gölü yakınında bulunan Acıgöl de suyunun alkali olması nedeniyle ekstrem bir habitat olma özelliğindedir. Fizikokimyasal analizlere göre Acıgöl toprak örneği alkali özellikte (pH 9.07) olup organik madde içeriği düşüktür. Acıgöl kıyı sediment ve toprak örneklerinden toplam 124 aktinobakteri

izole edilmiştir. Bu izolatlar *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Streptomyces* ve *Verrucosipora* cinslerinin üyeleridir. *Actinomadura* spp. 21ATH, HAT23 ve D310AT izolatlarının en yakın tip türleri ile 16S rRNA gen dizi benzerliklerinin %99'un altında olması nedeniyle bu izolatlar polifazik karakterizasyona dâhil edilmiştir. *Actinomadura* spp. 21ATH ve HAT23 izolatlarının birbirleri arasındaki gen dizi benzerliğinin yüksek olması (%99.66; 1483 pozisyonda 5 nt fark) ve filogenetik ağaçtaki yakın pozisyonları nedeniyle karakterizasyon için 21ATH izolatu seçilmiştir. *Actinomadura* sp. 21ATH izolatının polar lipid profili cinsin diğer türleriyle uyumlu olarak amino- grubu taşıyan lipidler içermemekte; baskın olarak DPG, PG ve PI bileşiklerinden oluşmaktadır. Diaminopimelik asit izomeri olarak mezo-DAP içeren *Actinomadura* sp. 21ATH suşunun şeker hidrolizatında, cins için karakteristik olan maduroz bulunmaktadır. *Actinomadura* sp. D310AT izolatının diaminopimelik asit izomerinin cinsin diğer üyeleri ile uyumlu olarak mezo-DAP olduğu belirlenmiştir. En yakın tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerliği %97.11 olan bu suşun diğer kemotaksonomik ve fenotipik analizlerinin yapılarak polifazik karakterizasyonunun tamamlanması gerekmektedir. Acıgöl toprak örneğinden *Streptomyces* cinsine ait izolatlar arasından ATD211, ATSC13 ve ATSP14 izolatlarının 16S rRNA gen dizi benzerlikleri %99'un altında olduğu için polifazik karakterizasyon için seçilmiştir. En yakın tip türü *Streptomyces aculeolatus* NBRC 14824^T ile dizi benzerliği %94.58 olan ATD211 izolatu DSMZ kültür koleksiyonunda depolanmış olup bu suşun kemotaksonomik ve fenotipik karakterizasyonu tamamlandıktan sonra taksonomik statüsünün belirlenmesi gerekmektedir. Acıgöl toprak örneğinden izole edilen *Nonomuraea* sp. ATC11 izolatu da yeni tür potansiyeli taşımaktadır. *Nonomuraea* sp. ATC11 izolatının kemotaksonomik olarak polar lipid, menakinon, şeker ve DAP analizleri yapılmıştır. Polar lipid profilinde DPG, PG, PE, OH-PE ve PI; menakinon profilinde MK-9(H₂), MK-9(H₄) ve MK-9(H₆); şeker profilinde galaktoz, gluktoz, mannoz ve riboz içeren *Nonomuraea* sp. ATC11 izolatının diaminopimelikasit asit izomerinin mezo-formunda olduğu belirlenmiş olup, kemotaksonomik olarak cinsin genel özellikleri ile uyumludur. *Nonomuraea* sp. ATC11 izolatu, filogenetik ağaçta MTC26, GTA35, MTCD27 ve MTCD31 izolatları ile kümelenmiştir. Ancak bu izolatların birbirleri arasındaki 16SrRNA dizi benzerlikleri %99'un üzerindedir. Bu izolatların her birinin yeni tür statülerinin belirlenmesi amacıyla DNA-DNA hibridizasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir. Klasik *in vitro* DNA-DNA hibridizasyon analizi 1960'lı

yıllarda yapılmaya başlanmış ve günümüzde sadece çok az sayıda laboratuvar tarafından yapılabilmektedir. Klasik DDH analizinin zahmetli, pahalı ve hata oranının yüksek olması nedeniyle, son zamanlarda genom dizilerinin karşılaştırılmasına dayanan *in silico* DNA-DNA hibridizasyon analiz yöntemleri geliştirilmiştir (Auch ve diğ. 2010; Meier-Kolthoff ve diğ. 2013; Chun ve Rainey, 2014). Buna göre, aynı kümede yer alan *Nonomuraea* suşlarının her birinin taksonomik statülerinin belirlenebilmesi için genom dizilerinin karşılaştırılması gerekmektedir. Acıgöl toprak örneğinden izole edilen *Nonomuraea* sp. ATR24 ve C39AT suşlarının en yakın tip türü *N. harbinensis* NEAU-yn31^T ile olan 16S rRNA gen dizi benzerlikleri %98.16 olup; Stackebrandt ve Ebers'e (2006) göre bu iki suş ile referans türü arasındaki DDH değeri %70'in altında çıkmalıdır. Ayrıca *in silico* DDH analizlerine dayalı karşılaştırmalar da 16S rRNA gen dizi benzerliği %99'un altında olan suşlar için DDH analizinin gereksiz olduğunu savunmaktadır (Meier-Kolthoff ve diğ. 2013). *Nonomuraea* sp. ATR24 ve C39AT arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı ise %100 olup, iki suşun filogenetik ağaçtaki yerleşimleri de her iki izolatin aynı türün üyeleri olduğunu kanıtlamaktadır. Bu nedenle polifazik karakterizasyon için *Nonomuraea* sp. ATR24 suşu seçilmiştir. Polar lipid analizine göre *Nonomuraea* sp. ATR24 suşu DPG, OH-PE, PME, PI ve çok sayıda gliko-grubu taşıyan lipidler içermektedir. Menakinon analizi ise *Nonomuraea* sp. ATR24 suşunun menakinon profilinin MK-9, MK-9(H₂) ve MK-9(H₄) bileşiklerinden oluştuğunu göstermiştir. Ayrıca şeker ve DAP analizlerinden elde edilen veriler de cinsin genel özellikleri ile uyum içerisindedir.

Yeni ve farklı izolasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla biyolojik örneklerden *Actinobacteria* grubuna ait yeni türler izole edilebilmektedir. Genomikten kaynaklanan büyük gelişmelere karşın, yeni cinslerin izolasyonu ve sonrasında yeni metabolit üretimi için taranması, farklı aktivite biçimi sergileyen antibiyotik yapılarını ortaya çıkarmanın en etkili yoludur. *Actinoallomurus* ve *Verrucosipora* örnek olarak verilebilecek aktinobakteri cinsleridir (Rheims ve diğ. 1998; Bister ve diğ. 2004). İzole edilme sıklığı nispeten düşük olan aktinobakteriler, genellikle düşük toksisiteye ve mükemmel antibakteriyel etkiye sahip çeşitli bileşikler üretebilmektedir (Berdy 2005). Bu tip aktinobakterilere ait 50'den fazla türün, 2.500 biyoaktif bileşiği ürettiği bildirilmiştir. Deniz süngerlerinden izole edilen *Salinispora* suşları genetik rekombinasyon yoluyla yeni rifamisinlerin üretimi için çeşitli enzimlerin kaynağı olarak kullanılmıştır (Kim ve diğ. 2006). *Verrucosipora maris*

AB-18-032^T suşundan çeşitli insan tümör hücrelerine karşı sitostatik aktivite gösteren proksimisiner izole edilmiştir (Fiedler ve diğ. 2008; Goodfellow ve Fiedler 2010). Bu tez çalışmasında da Meke Gölü kıyı toprak örneğinden ve Acıgöl sediment örneğinden iki *Verrucosipora* üyesi izole edilmiştir. *Verrucosipora* spp. 11ACIRH ve SPMT21 izolatlarının her ikisinin de *V. andamanensis* SP03-05^T izolatı ile yakın olduğu ve referans suşa %99.5'in üzerinde 16S rRNA gen dizi benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir. *Verrucosipora* türleri arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerlik oranlarının %98.7 - %99.7 arasında değiştiği (Trujillo ve diğ. 2014) göz önüne alınırsa, en yakın tip türü ile benzerlik oranı %99.79 olan SPMT21 ile %99.57 olan 11ACIRH izolatları düşük olmakla birlikte yeni tür potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir. Bu izolatların taksonomik statüleri, genoma dayalı DDH analizleri yapılarak belirlenebilir.

Biyoaktif sekonder metabolit üretebilme kapasitesine sahip yeni aktinobakteri türlerinin izolasyonunda daha önce çalışılmamış bölgelerin izolasyon çalışmalarına dahil edilmesi önemlidir. Isparta ili sınırları içerisinde bulunan Gölcük Gölü kıyı sediment ve toprak örneklerinden ilk kez bu tez çalışması ile *Actinobacteria* üyeleri izole edilmiştir. Fizikokimyasal analizler, Gölcük Gölü toprak örneğinin hafif alkali özellikte (pH 8.20) ve organik madde içeriğinin düşük olduğunu göstermiştir. Gölcük Gölü sediment ve toprak örneklerinden izole edilerek 16S rRNA gen dizi analizine dâhil edilen izolatların *Actinomadura*, *Jiangella*, *Nonomuraea*, *Nocardia* ve *Streptomyces* cinslerinin üyeleri oldukları belirlenmiştir. En yakın tip türleri ile olan 16S rRNA gen dizi benzerliklerine bakıldığında sadece *Nonomuraea* sp. GTA35 suşunun %99'un altında benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir. Meke Gölü ve Acıgöl'den izole edilen *Nonomuraea* izolatları ile birlikte kümelenen GTA35 izolatının yeni tür statüsünün belirlenebilmesi için bu izolatlarla birlikte genom analizinin yapılarak *in silico* DDH analizine tabi tutulması gerekmektedir. Kemotaksonomik analizler *Nonomuraea* sp. GTA35 izolatının da cinsin diğer üyeleriyle benzer özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. *Nocardia* sp. GTS18 suşunun en yakın tip türüne 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı %99.04 (1456 pozisyonda 14 nt fark) olarak tespit edilmiştir. Ancak cins içerisinde yüksek dizi benzerlik oranlarına rağmen düşük DDH değerlerinin elde edildiği (Ezeoke ve diğ. 2013; Jones ve diğ. 2014; Lasker ve diğ. 2014; Vaddavalli ve diğ. 2014) göz önüne alınırsa, bu izolatın da yeni tür potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Kemotaksonomik analizlere göre GTS18 izolatı baskın menakinon olarak MK-8(4-

cyclo); polar lipid olarak DPG, PG, PE, PI ve gliko- grubu taşıyan lipidler içermektedir. Şeker profili *Nocardia* sp. GTS18 izolatının galaktoz, arabinoz ve ramnoz içerdiğini göstermiştir. Diaminopimelik asit izomeri *mezo*- formunda olan *Nocardia* sp. GTS18 izolatı, kemotaksonomik olarak cinsin genel özellikleri ile uyumludur.

Jiangella sp. GTF31 izolatı Gölcük Gölü toprak örneğinden izole edilmiştir. Bu izolatın en yakın tip türü olan *J. gansuensis* YIM 002^T ile dizi benzerlik oranı %99.45 (1453 pozisyonda 8 nt fark) olarak tespit edilmiştir. Cins içerisindeki 16S rRNA gen dizi benzerliklerine bakıldığında *J. muralis* ile *J. alba* arasında %99.7 ve *J. muralis* ile *J. alkaliphila* arasında %99.0 (Kämpfer ve diğ. 2011); *J. mangrovi* ile *J. alkaliphila* arasında %99.0 (Suksaard ve diğ. 2015) 16S rRNA gen dizi benzerliği bulunmaktadır. Buna göre *Jiangella* sp. GTF31 izolatının tür düzeyinde taksonomik statüsünün belirlenebilmesi amacıyla genom dizisinin elde edilerek en yakın tip türleriyle *in silico* DDH analizinin yapılması gerekmektedir. Polar lipid analizi *Jiangella* sp. GTF31 suşunun büyük oranda DPG, PI ve gliko- grubu taşıyan lipidler içerdiğini göstermiştir. Ayrıca menakinon analizi de GTF31 suşunun, cinsin diğer üyeleriyle uyumlu olarak MK-9(H₄) içerdiğini doğrulamıştır. *Jiangella* sp. GTF31 izolatı diaminopimelik asit izomeri olarak LL-DAP içermektedir. Kemotaksonomik olarak *Jiangella* cinsinin genel özellikleri ile uyumlu olan bu suşun taksonomik statüsü, genom analizine dayalı DDH ve en yakın tip türleriyle fenotipik olarak karşılaştırılması sonucunda kesinleşebilecektir.

Bu çalışmada örneklem alanı olarak seçilen krater göllerinden Nemrut Gölü, Doğu Anadolu'da Bitlis ili sınırları içerisinde bulunmaktadır. Fizikokimyasal habitat özellikleri açısından ekstrem olmamakla birlikte, Nemrut Gölü dünyanın ikinci en büyük krater gölü olma özelliğine sahip olup, ilk kez bu tez çalışması ile aktinobakteri çeşitliliği araştırılmıştır. Kıyı sediment ve toprak örneklerinden izole edilerek 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanan izolatların *Actinomadura*, *Jishengella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharomonospora* ve *Streptomyces* cinslerinin üyeleri olduğu tespit edilmiştir. En yakın tip türleri ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları %99'un altında olan *Actinomadura* spp. 31NTSP ve SPNT21, *Saccharomonospora* sp. NB11 ve *Streptomyces* spp. NTD23 ve NTH33 suşlarının yeni tür olma potansiyellerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *Jishengella* sp. NA12, *Actinomadura* sp. NTSP31 ve *Streptomyces* sp. NRH12 suşlarının filogenetik ağaçlardaki pozisyonları göz önüne alındığında nispeten

yüksek gen dizi benzerlik oranlarına rağmen yeni tür olma potansiyeli taşıdıkları düşünülmektedir. Bu nedenle kemotaksonomik analizlere *Actinomadura* spp. 31NTSP, NTSP31, SPNT21; *Saccharomonospora* sp. NB11; *Streptomyces* sp. NTH33 ve *Jishengella* sp. NA12 suşları dâhil edilmiştir.

Pseudonocardiaceae familyası içerisindeki *Saccharomonospora* cinsi, diğer taksonlara kıyasla klasik izolasyon yöntemleriyle daha düşük sıklıkta elde edilen aktinobakteri gruplarından biridir. *Saccharomonospora* cinsi üyelerinin klasik izolasyon ve tanımlama yöntemlerine alternatif olabilecek bir yaklaşım, cins üyelerinin çevresel koşullara bağlı olarak dağılışının anlaşılmasının yanı sıra, kültür koşullarından etkilenmeyen genotipik verilere dayanan yeni tanımlama yöntemlerinin geliştirilmesini de gerektirmektedir. Genel olarak klasik yöntemler, sadece kültüre edilebilir mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak tanıdığı için belirli mikrobiyal komünitelerin doğal bileşiminin tam olarak belirlenmesinde bu yöntemler yetersiz kalmaktadır (Salazar ve diğ. 2000). Bu tez çalışmasında 16S rRNA gen dizi analizi yapılan 123 izolattan sadece Nemrut Gölü sediment örneğinden izole edilen NB11 suşunun *Saccharomonospora* üyesi olduğu tespit edilmiştir. En yakın tip türü *Saccharomonospora azurea* NA-128^T ile gen dizi benzerliği %98.50 (1462 pozisyonda 22 nt fark) olan NB11 suşunun polar lipid, menakinon, DAP ve şeker profilleri belirlenmiştir. *Saccharomonospora* sp. NB11 suşu, şeker hidrolizatında galaktoz ve arabinozun yanı sıra riboz, glukoz ve mannoz içermesiyle yakın ilişkili olduğu *S. azurea* NA-128^T ve *S. glauca* K62^T ve *S. viridis* DSM 43017^T tip türlerinden farklılık göstermektedir. *Saccharomonospora* sp. NB11 suşu polar lipid profilinde büyük oranda DPG, PE, OH-PE, PG, PI ve daha düşük oranda fosfoglikolipitler içermektedir. Suşun diaminopimelik asit izomerinin *mezo*-formunda olduğu tespit edilmiş; menakinon profilinin ise cinsin diğer üyeleri ile uyumlu olarak MK-8(H₄) ve MK-9(H₄) içerdiği görülmüştür. Literatürde *S. azurea* NA-128^T, *S. viridis* DSM 43017^T suşlarının genom dizileriyle ilgili veriler mevcuttur (Pati ve diğ., 2009; Klenk ve diğ., 2015). *Saccharomonospora* sp. NB11 suşunun da genom dizisinin elde edilerek en yakın tip türleriyle karşılaştırılması gerekmektedir.

Nemrut Gölü sediment örneğinden izole edilen NA12 suşunun monospesifik bir cins olan *Jishengella* üyesi olduğu tespit edilmiştir. *Jishengella* sp. NA12 suşunun cinsin tip türü olan *Jishengella endophytica* 202201^T ile 16S rRNA dizi benzerliğinin %99.32 (1462 pozisyonda 10 nt fark) olduğu tespit edilmiştir. Kemotaksonomik analizler sonucunda *Jishengella* sp. NA12 suşunun,

diaminopimelik asit izomerinin büyük oranda OH-DAP ve daha düşük oranda *mezo*-DAP olduğu tespit edilmiştir. Cinsin tip türü ise baskın diaminopimelik asit izomeri olarak *mezo*-DAP içermektedir. *Jishengella* sp. NA12, şeker hidrolizatında ksiloz, mannoz, arabinoz, riboz ve glukozun yanı sıra fukoz ve ramnoz da içermektedir. Polar lipid profilinde ise DPG, PE, PS, fosfoglikolipitler ve *J. endophytica* tip türünden farklı olarak PI bulunmaktadır. Ayrıca *Jishengella* sp. NA12 suşu ile cinsin tip türü fenotipik olarak da karakterize edilmiştir. Buna göre her iki suş azot ve karbon kaynaklarının kullanım profili açısından farklılık göstermektedir. Ayrıca *Jishengella* sp. NA12 suşunun pH 6 – 12 aralığında gelişebilmesi, bu suşun endüstriyel kullanım alanı bulunan alkali enzimler için potansiyel taşıdığını göstermektedir. *Jishengella* sp. NA12 ve cinsin tip türünün genom dizileri elde edildikten sonra *in silico* DDH analizinin yapılarak taksonomik statüsünün belirlenmesi gerekmektedir.

Nemrut Gölü kıyı toprak örneğinden izole edilen *Actinomadura* spp. 31SPNT ve SPNT21 suşlarının birbirleri olan 16S rRNA gen dizi benzerlikleri %100'dür. Bu nedenle aynı türün üyeleri olduğu düşünülen bu suşlardan SPNT21 suşu kemotaksonomik analizlere dâhil edilmiştir. Filogenetik ağaçta *Actinomadura* spp. 31SPNT, SPNT21 ve NTSP31 suşları yakın olarak kümelenmiştir. Kemotaksonomik karakterizasyonu yapılan SPNT21 ve NTSP31 suşlarının cinsin diğer üyeleri ile uyumlu olarak *mezo*-DAP ve karakteristik şeker olarak maduroz içerdiği tespit edilmiştir. Ayrıca her iki suş da baskın menakinonlar olarak MK-9(H₄), MK-9(H₆) ve MK-9(H₈) bulundurmaktadır. *Actinomadura* spp. NTSP31 ve SPNT21 suşlarının birbirleri arasındaki 16S rRNA dizi benzerlik oranının %99'un üzerinde olması nedeniyle her iki suşun taksonomik statülerinin belirlenebilmesi için genom dizilerinin karşılaştırılması gerekmektedir.

Streptomyces türlerinin birçok antibiyotik ve hücre dışı hidrolitik enzimlerin sentezinde büyük bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Abramic ve diğ. 1999). Sharma ve Gill (2007), *Streptomyces* sp. ALKC 4 suşunun hücre dışı ekstraktından sıcaklığa dayanıklı yeni bir inulinaz enzimini izole ederek saflaştırmışlardır. Alkali bir toprak örneğinden izole edilen halofilik ve alkalifilik *Streptomyces sannanensis* RJT-1^T suşunun Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü bir antibiyotik üreticisi olduğu bildirilmiştir (Singh ve diğ., 2006). Ramesh ve diğ. (2009), denizel habitattan izole ettikleri *Streptomyces fungicidicus* MML1614^T suşunun termostabil alkali proteaz ürettiğini bildirmişlerdir. Denizel *Streptomyces* türlerinde çinikomisin ve lajollamisin

gibi bazı yeni antibiyotiklerin üretimi tespit edilmiştir (Li ve diğ. 2005; Manam ve diğ. 2005). Porsuk ve diğ. (2013), toprak örneğinden izole ettikleri *Streptomyces* sp. CA24 suşunun termoaktif ve alkali özellikte bir ksilanaz enzimi ürettiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında Nemrut Gölü toprak örneğinden izole edilen *Streptomyces* sp. NTD23, NTH33 ve NRH12 izolatlarının yeni tür olma potansiyellerinin yüksek olduğu düşünülmektedir. *Streptomyces* sp. NTD23 ve NTH33 izolatları filogenetik ağaçta birlikte kümelenmiş ve ağaçta gözlenen yakın topoloji yüksek 16S rRNA gen dizi benzerliğinin (%100) göstergesi niteliğindedir. Bu nedenle polifazik karakterizasyon çalışmaları için *Streptomyces* sp. NTH33 suşu seçilmiştir. *Streptomyces* sp. NTH33 suşunun diaminopimelik izomerinin LL-DAP olduğu; şeker hidrolizatının ise glukoz, mannoz ve riboz içerdiği tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. NRH12 suşunun en yakın tip türü *S. hirsutus* NBRC 12786^T ile 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.18'dir. Ancak literatürde *Streptomyces* cinsinin türleri arasında yüksek 16S rRNA gen dizi benzerlikleri bulunduğu görülmektedir. Örneğin; Take ve diğ. (2015), izole ettikleri *Streptomyces* cinsi üyeleri OM-6519^T ve K04-0144^T suşlarının biyoaktif laktasistin ve sislabdan bileşiklerini ürettiğini tespit etmişler ve bu suşlardan OM-6519^T'un en yakın tip türü *S. xanthocidicus* NBRC 13469^T ile 16S rRNA gen dizi benzerliğinin %99.7, K04-0144^T suşunun en yakın tip türü *S. corchorusii* NBRC 13032^T ile dizi benzerliğinin %99.4 olduğunu bildirmişlerdir. DNA-DNA hibridizasyon analizine göre en yakın tip türleriyle DDH değerleri %70'in altında bulunan her iki suş *Streptomyces lactacystinicus* OM-6519^T ve *Streptomyces cylabdacicus* K04-0144^T olarak isimlendirilmiştir (Take ve diğ. 2015). Harunari ve diğ. (2015) Tokyo Körfezi'nde omurgasız bir canlıdan izole ettikleri MB-PO13 suşunun en yakın tip türü *Streptomyces graminisoli* JR-12^T ile 16S rRNA gen dizi benzerliğinin %99.72 olduğunu bildirmiş ve yaptıkları DDH analizinden sonra bu suşu *S. hyaluromycini* MB-PO13^T olarak yayınlamışlardır. 16S rRNA gen dizisi büyük taksonomik gruplar arasındaki filogenetik ilişkilerin yorumlanmasında oldukça kullanışlı olmakla birlikte, *Streptomyces* türlerinin sınırlarının çizilmesinde yeterli değildir (Kämpfer, 2012). Bu nedenle Nemrut Gölü toprak örneğinden izole edilen *Streptomyces* sp. NRH12 suşunun da yeni tür olma potansiyelinin yüksek olduğu görülmektedir. *Streptomyces* sp. NRH12 suşunun diaminopimelik asit izomerinin LL- formunda olduğu; şeker profilinin galaktoz, glukoz, mannoz, maduroz, riboz ve ramnoz içerdiği tespit edilmiştir. Bu suşun yeni tür statüsünün doğrulanması için öncelikle genom dizisinin elde edilerek *in silico*

DDH analizinin yapılması ve ardından fenotipik ve kemotaksonomik karakterizasyonunun tamamlanması gerekmektedir.

Micromonospora cinsi karasal, sucul ve denizel habitatlarda bulunan, yavaş gelişen aktinobakterilerden oluşmaktadır. Cins üyelerinin hava hiflerinin bulunmaması ve hidrofilik sporlar üretmeleri nedeniyle özellikle sucul yaşam koşullarına uyum sağladıkları düşünülmektedir. Ayrıca *Micromonospora* türlerinin göl sedimentlerinden en fazla izole edilen aktinobakteriler oldukları gösterilmiştir (Jiang ve Xu, 1996). *Micromonospora* türlerinin selüloz ve kitin gibi kompleks bileşikleri parçalayabilmelerinden dolayı tatlı su habitatlarında organik maddenin geri dönüşümünde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. İngiltere Göller Bölgesindeki iki gölde *Micromonospora* cinsine ait türlerin bulunduğu ve selülitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (De Menezes ve diğ. 2008). Cinse ait türlerin selüloz tuzaklar (mumu alınmış pamuk iplikler) üzerinde geliştiği ve göl suyunda selülozu parçalayabildiği gösterilmiştir. Ancak, göl sedimentlerindeki *Micromonospora* türlerinin ekolojik önemi tam olarak açığa çıkarılmış değildir. Bu durum, özellikle yaz aylarında biyolojik aktivitenin büyük bölümünün meydana geldiği sedimentlerde, oksijen basıncının düşmesine neden olan göl tabakalaşmasından kaynaklanmaktadır. Ancak, *Micromonospora* türlerinin mikroaerofilik koşullarda gelişebildiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Goodfellow ve Williams, 1983; Vobis, 2006). De Menezes ve diğ. (2012), iki tatlı su gölünde selüloz tuzaklar, su kolonu ve sedimentler üzerinde gelişen bakteri topluluklarında *Micromonospora* türlerinin nispeten yüksek oranda bulunduğunu, 16S rRNA'yı ters transkribe ederek kantitatif PCR yöntemiyle tanımlamışlardır. Cinse ait türlerin göl sedimentlerindeki selülozik substratlar üzerinde yerleşmiş aktif bakteri popülasyonlarının önemli üyeleri olduğu ve derinliğe bağlı olarak *Micromonospora* türlerinin gittikçe artış gösterdiği, koloni oluşturan birimlerin (CFU) hesaplanmasıyla da doğrulanmıştır. Bu tez çalışmasında krater göllerinin sediment ve kıyı toprak örneklerinden izole edilerek 16S rRNA gen dizi analizi yapılan suşlardan 22'sinin *Micromonospora* cinsi üyesi olduğu tespit edilmiştir. Renk gruplarına bakıldığında bu suşların Acıgöl – 1, Acıgöl – 7, Meke – 1, Meke – 2, Nemrut – 4, Nemrut – 5, Nemrut – 11 ve Gölcük – 16 gruplarının temsilci izolatları olduğu görülmektedir. Bu gruplarda toplam 52 izolat bulunduğu göz önüne alınırsa krater göllerinden izole edilen 469 izolatın 52'sinin *Micromonospora* cinsi üyesi veya en azından morfolojik olarak oldukça

homojen bir grup olan *Micromonosporaceae* familyası üyesi olduğu çıkarımı yapılabilir.

Örneklem alanı olarak seçilen bir diğer krater gölü ise İç Anadolu'da Kapadokya olarak adlandırılan bölgede, Nevşehir ili sınırları içerisinde bulunan Acıgöl'dür. Ancak Nevşehir – Acıgöl'ün suyu, aşırı sivrisinek ürettiği gerekçesiyle, 1972 yılında 3 m derinliğinde bir drenaj kanalı açılarak boşaltılmıştır (Kazancı ve Gevrek, 1996). Bu nedenle aktinobakteri izolasyon çalışmasına bu gölün tabanından alınan toprak örneği dahil edilmiştir. Fizikokimyasal analizlere göre Nevşehir – Acıgöl toprak örneği, diğer örneklerle kıyasla, organik madde, kalsiyum karbonat ve nem içeriği en yüksek olan örnektir. Nevşehir – Acıgöl'den *Glycomyces*, *Nocardia*, *Promicromonospora* ve *Streptomyces* cinslerinin üyeleri izole edilmiştir. Bu izolatlardan özellikle *Promicromonospora* cinsine ait ED37 suşunun yeni tür olma potansiyeli oldukça yüksektir. *Promicromonospora* sp. ED37 suşunun en yakın tip türü *P. umidemergens* 09-Be-007^T ile 16S rRNA gen dizi benzerliği %99.02 (1327 pozisyonda 13 nt fark) olarak tespit edilmiştir. Bu suşun taksonomik statüsünün belirlenebilmesi için genom dizi analizinin, fenotipik ve kemotaksonomik karakterizasyonunun yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibiyotik keşfi üzerine yapılan araştırmalar, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve özellikle aktinobakteriler içerisindeki yeni bakteriyel taksonların karakterizasyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir. Genel olarak bilinmeyen bir kimyasal yapıya sahip yeni sekonder metabolitlerin tespit edilme ihtimalinin, çalışılan yeni mikroorganizmanın bilinen türlerle olan filogenetik uzaklığıyla pozitif ve doğrudan bir ilişkiye sahip olduğu sonucu çıkarılabilmektedir (Müller ve Wink, 2014).

Bakteriyel patojenlerde antibiyotik direncinin ortaya çıkışı ve AIDS, SARS ve H1N1 grip virüsü gibi yeni hastalık patojenlerinin sayısındaki artış, ilaç keşfi için biyolojik olarak aktif yeni bileşiklere olan ilginin yeniden canlanmasına neden olmuştur (Magarvey ve diğ., 2004). Yeni biyoaktif metabolit üretebilme kapasitesine sahip yeni aktinobakteri suşlarının izolasyonu amacıyla, ekstrem fizikokimyasal özelliklere sahip habitatlar ile daha önce izolasyon çalışmalarına dahil edilmemiş habitatların araştırılması önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında örneklem alanı olarak seçilen krater göllerinin aktinobakteri çeşitliliği ilk kez çalışılmıştır. Krater göllerinin kıyı sediment ve toprak örneklerinden *Actinomadura*, *Glycomyces*, *Jiangella*, *Jishengella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces* ve *Verrucosispora* cinslerinin üyeleri izole edilmiştir. Bu cinslerden *Jishengella* monospesifik bir cins olup sadece bir tür içermektedir. Ayrıca *Glycomyces*, *Jiangella*, *Jishengella*, *Promicromonospora* ve *Verrucosispora* klasik izolasyon çalışmalarında izole edilme sıklığı düşük olan aktinobakteri cinsleridir. Bu çalışmada, aktinobakteriler için seçici özellikte olan 10 farklı besi ortamı kullanılarak, izole edilme sıklığı düşük olan aktinobakteri cinslerinin yanı sıra, hem bu cinslere hem de sıklıkla izole edilebilen diğer cinslere ait yeni tür olma potansiyelleri yüksek izolatlar elde edilmiştir. Bu durum, aynı izolasyon materyalinin, farklı besi ortamlarına inoküle edilmesi durumunda, yüksek çeşitliliğe sahip farklı cinslerin elde edilebileceğini göstermektedir.

16S rRNA gen dizi analizi yapılan 123 izolattan 20'sinin en yakın tip türü ile benzerlik oranının %94.58 – 98.93 aralığında olduğu tespit edilmiş olup, bu izolatlardan ilk olarak, benzerlik oranı %98'in altında olan *Actinomadura* sp. D310AT, *Streptomyces* sp. ATD211 ve *Streptomyces* sp. MKSP12 suşları polifazik karakterizasyonları tamamlandıktan sonra yeni aktinobakteri türleri olarak yayınlanabilecektir. Ayrıca *Streptomyces* sp. ATD211 suşunun 16S rRNA gen dizi benzerlik oranının %95'in altında olması, bu suşun yeni bir cinsi temsil etme ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Ancak, Macrogen Inc. firmasına yaptırılan dizileme sonucuna göre, 16S rRNA dizisinin son 400 nt'lik kısmı güvenilir kalitede değildir. Mevcut durumda DSMZ kültür koleksiyonunda depolanan bu suşun, 16S rRNA gen dizi analizi tekrarlandıktan sonra fenotipik ve kemotaksonomik karakterizasyonunun yapılarak, *Streptomyces* cinsinden farklılaştığı noktalar belirlenmelidir. Meke Gölü sedimentinden izole edilen *Streptomyces* sp. MKSP12 suşunun kemotaksonomik olarak polar lipid, yağ asidi, diaminopimelik asit ve şeker profilleri belirlenmiş; en yakın tip türü ile fenotipik karakterizasyonu yapılmıştır. DSMZ (Almanya) ve KCTC (Güney Kore) kültür koleksiyonlarında depolanan bu suş, menakinon analizi de yapıldıktan sonra yeni tür olarak yayınlanacaktır. Konya – Acıgöl toprak örneğinden izole edilen *Actinomadura* sp. D310AT suşunun diaminopimelik asit, şeker, polar lipid ve menakinon analizleri yapılmıştır. DSMZ (Almanya) ve KCTC (Güney Kore) kültür koleksiyonlarında depolanan bu suş, yağ asidi analizi ve fenotipik karakterizasyonu tamamlandıktan sonra yeni tür olarak literatüre kazandırılacaktır.

Kemotaksonomik analiz için seçilen yeni tür olma ihtimali yüksek olan 17 izolattan *Jishengella* sp. NA12, *Nonomuraea* sp. MTSC22 ve *Streptomyces* sp. MKSP12 izolatlarının yağ asidi profili belirlenmiştir. *Actinomadura* spp. 21ATH, D310AT, NTSP31, SPNT21, *Jiangella* sp. GTF31, *Nonomuraea* spp. ATC11, ATR24, GTA35, MTC26, MTC27 ve *Saccharomonospora* sp. NB11 izolatlarının yağ asidi analizleri yapılmaktadır. Ayrıca *Jishengella* sp. NA12 ve *Streptomyces* sp. MKSP12 izolatlarının menakinon içerikleri, ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlanmasına rağmen belirlenememiştir. Bu izolatların için menakinon ekstraksiyonu daha yüksek miktarda (>500 mg) taze liyofilize örnek kullanılarak ve hava, ışık vb. faktörlerden kaçınarak tekrar edilecektir.

Yüksek düzeydeki taksonomik grupların ayırımında oldukça yararlı olan 16S rRNA gen dizi analizi *Streptomyces*, *Micromonospora* ve *Nocardia* gibi aktinobakteri cinsleri için tür düzeyinde ayırım için yeterli değildir. Özellikle bu

cinslere ait bir izolatın yeni bir taksonu temsil edip etmediğinin kesin olarak belirlenebilmesi için multilokus dizi analizi ve DNA-DNA hibridizasyon analizi gibi ekstra çalışmalar gerekmektedir. Son zamanlarda, oldukça zahmetli, pahalı ve hata oranı yüksek klasik DNA-DNA hibridizasyon analizleri yerine, genom dizilerinin karşılaştırılmasına dayanan *in silico* DNA-DNA hibridizasyon analizleri yeni tür tanımlarında daha fazla kullanılmaktadır. Yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak, bir mikroorganizmaya ait genomik DNA kısa sürede, düşük maliyet ve yüksek dizi güvenilirliği ile elde edilebilmektedir. Bu çalışmada izole edilen aktinobakteri suşlarından yeni tür olma potansiyeli yüksek olan suşların, hem taksonomik statülerinin kesin olarak belirlenebilmesi hem de biyoaktif sekonder metabolit üretebilme kapasitelerinin genom düzeyinde ortaya çıkarılabilmesi için, Newcastle Üniversitesi'nden Prof. Hans-Peter Klenk'in işbirliği ile tüm genom analizleri yapılacaktır. İzolatların genom dizilerine ait veriler de yeni tür yayınlarından ayrı olarak yayınlanabilecektir. Ayrıca, genom analizinden sonra sekonder metabolit üretiminde rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin tespit edilmesi durumunda, ilgili suşların sekonder metabolit ekstraksiyonları yapılarak karakterize edilmesi planlanmaktadır.

Krater göllerinin sediment ve toprak örneklerinden toplam 469 aktinobakteri izole edilmiş olmasına rağmen, mevcut kaynaklar nedeniyle, sadece seçilen 123 izolat 16S rRNA gen dizi analizi yapılarak cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bu çalışma ile Meke Gölü, Acıgöl, Gölcük Gölü, Nemrut Gölü ve Nevşehir – Acıgöl habitatlarının aktinobakteri çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır. Polifazik taksonomik bir çalışma olması nedeniyle bu tezde aktinobakterilerin biyoteknolojik potansiyelleri araştırılmamıştır. Ancak, ileride yapılması planlanan çalışmalarla bütün izolatların biyoaktif sekonder metabolit, endüstriyel alanlarda kullanılabilecek enzimler ve bitki gelişimini destekleyici moleküller üretebilme kapasitesinin ortaya çıkarılması düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdulla, H. M., & El-Shatoury, S. A. (2007). Actinomycetes in rice straw decomposition. *Waste Management*, 27(6), 850-853.
- Abramić, M., Lešćić, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, W., & Pigac, J. (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(6), 522-529.
- Adekambi, T., Butler, R. W., Hanrahan, F., Delcher, A. L., Drancourt, M., & Shinnick, T. M. (2011). Core gene set as the basis of multilocus sequence analysis of the subclass Actinobacteridae. *PLoS One*, 6(3), e14792. doi:10.1371/journal.pone.0014792
- Al-Zarban, S. S., Al-Musallam, A. A., Abbas, I., Stackebrandt, E., & Kroppenstedt, R. M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 555-558.
- Alderson, G., Goodfellow, M., & Minnikin, D. (1985). Menaquinone composition in the classification of *Streptomyces* and other sporoactinomycetes. *Microbiology*, 131(7), 1671-1679.
- Almeida, L. A., & Araujo, R. (2013). Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect Genet Evol*, 13, 67-75. doi:10.1016/j.meegid.2012.08.011
- Alonso-Vega, P., Normand, P., Bacigalupe, R., Pujic, P., Lajus, A., Vallenet, D., . . . Trujillo, M. E. (2012). Genome sequence of *Micromonospora lupini* Lupac 08, isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Journal of Bacteriology*, 194(15), 4135-4135.
- Alshamaony, L., Goodfellow, M., & Minnikin, D. (1976). Free mycolic acids as criteria in the classification of *Nocardia* and the 'rhodochrous' complex. *Microbiology*, 92(1), 188-199.
- Athalye, M., Goodfellow, M., & Minnikin, D. (1984). Menaquinone composition in the classification of *Actinomadura* and related taxa. *Microbiology*, 130(4), 817-823.
- Athalye, M., Lacey, J., & Goodfellow, M. (1981). Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Journal of applied bacteriology*, 51(2), 289-297.
- Auch, A. F., von Jan, M., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2010). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Standards in genomic sciences*, 2(1), 117-134.
- Azman, A.-S., Othman, I., Velu, S. S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, 6.

- Barbe, V., Bouzon, M., Mangenot, S., Badet, B., Poulain, J., Segurens, B., . . . Weissenbach, J. (2011). Complete genome sequence of *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, a producer of antibiotics and fluorometabolites. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 5055-5056.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., . . . van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Becerril-Espinosa, A., Freel, K. C., Jensen, P. R., & Soria-Mercado, I. E. (2013). Marine actinobacteria from the Gulf of California: diversity, abundance and secondary metabolite biosynthetic potential. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(4), 809-819.
- Bentley, S., Chater, K., Cerdeno-Tarraga, A.-M., Challis, G., Thomson, N., James, K., . . . Harper, D. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417(6885), 141-147.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Beveridge, T. J., Lawrence, J. R., & Murray, R. G. (2007). Sampling and staining for light microscopy.
- Bibb, M. J., Domonkos, Á., Chandra, G., & Buttner, M. J. (2012). Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by σ BldN and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Molecular Microbiology*, 84(6), 1033-1049.
- Bister, B., Bischoff, D., Ströbele, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., . . . Süßmuth, R. D. (2004). Abyssomicin C—A Polycyclic Antibiotic from a Marine Verrucosipora Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(19), 2574-2576.
- Bouyoucos, G. J. (1951). A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. *Agronomy journal*, 43(9), 434-438.
- Bredholdt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L. P., & Zotchev, S. B. (2007). Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environmental microbiology*, 9(11), 2756-2764.
- Brenner, D., Martin, M., & Hoyer, B. H. (1967). Deoxyribonucleic acid homologies among some bacteria. *Journal of Bacteriology*, 94(2), 486.
- Bull, A. T., Stach, J. E. M., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2005). Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions (vol 87, pg 65, 2005). *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 87(3), 259-+. doi:10.1007/s10482-005-3678-4
- Carro, L., Spröer, C., Alonso, P., & Trujillo, M. E. (2012). Diversity of Micromonospora strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of Pisum sativum analyzed by multilocus sequence analysis. *Systematic and applied microbiology*, 35(2), 73-80.
- Challis, G. L. (2008). Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, 154(6), 1555-1569.

- Chandra, G., & Chater, K. F. (2014). Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS microbiology reviews*, 38(3), 345-379.
- Chater, K. F. (2011). Differentiation in *Streptomyces*: the properties and programming of diverse cell-types. *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*, 3, 43-86.
- Chun, J., & Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2), 316-324.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *Fems Microbiology Letters*, 228(1), 45-49.
- Cohn, F. (1875). *Untersuchungen über Bakterien: I*: JU Kern.
- Cole, J. R., Konstantinidis, K., Farris, R. J., & Tiedje, J. M. (2010). Microbial Diversity and Phylogeny. *Environmental molecular microbiology*, 1.
- Collins, B. S., Kelly, C. T., & Fogarty, W. M. (1992). Maltogenic α -amylase of *Saccharomonospora viridia*. *Biochemical Society Transactions*, 20(1), 81S-81S.
- Collins, M., Goodfellow, M., & Minnikin, D. (1979). Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. *Microbiology*, 110(1), 127-136.
- Collins, M., Goodfellow, M., Minnikin, D., & Alderson, G. (1985). Menaquinone composition of mycolic acid-containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. *Journal of applied bacteriology*, 58(1), 77-86.
- Collins, M., Howarth, O., Grund, E., & Kroppenstedt, R. (1987). Isolation and structural determination of new members of the vitamin K2 series in *Nocardia brasiliensis*. *Fems Microbiology Letters*, 41(1), 35-39.
- Collins, M., & Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiological reviews*, 45(2), 316.
- Collins, M., Pirouz, T., Goodfellow, M., & Minnikin, D. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Microbiology*, 100(2), 221-230.
- Collins, M., Williams, A., & Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *Fems Microbiology Letters*, 70(3), 255-262.
- Collins, M. D. (1994). Isoprenoid quinones. *Chemical methods in prokaryotic systematics*, 265-309.
- Colwell, R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 410-433.

- Conville, P. S., Brown, J. M., Steigerwalt, A. G., Brown-Elliott, B. A., & Witebsky, F. G. (2008). *Nocardia wallacei* sp. nov. and *Nocardia blacklockiae* sp. nov., human pathogens and members of the “*Nocardia transvalensis* Complex”. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1178-1184.
- Cowan, S. T. (1968). A dictionary of microbial taxonomic usage. *A dictionary of microbial taxonomic usage*.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 7-24.
- Cross, T., Attwell, R., Barker, A., Gould, G., & Wolf, J. (1974). *Spore Research 1973*: Academic Press, London.
- Cross, T., & Goodfellow, M. (1973). *Taxonomy and classification of the actinomycetes*. Paper presented at the Society for Applied Bacteriology symposium series.
- Cui, Q., Wang, L., Huang, Y., Liu, Z., & Goodfellow, M. (2005). *Nocardia jiangxiensis* sp. nov. and *Nocardia miyunensis* sp. nov., isolated from acidic soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1921-1925.
- Cui, X., Schumann, P., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R. M., Pukall, R., Xu, L., . . . Jiang, C. (2004). *Myceligenans xiligouense* gen. nov., sp. nov., a novel hyphae-forming member of the family Promicromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1287-1293.
- Curtis, S. M., & Meyers, P. R. (2012). Multilocus sequence analysis of the actinobacterial genus *Kribbella*. *Syst Appl Microbiol*, 35(7), 441-446. doi:10.1016/j.syapm.2012.08.001
- Çağlar, K. (1958). Soil Science. *Publication of Agriculture Faculty, Ankara Üniversitesi*.
- Dai, H.-Q., Wang, J., Xin, Y.-H., Pei, G., Tang, S.-K., Ren, B., . . . Zhang, L.-X. (2010). *Verrucosipora sediminis* sp. nov., a cyclodipeptide-producing actinomycete from deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(8), 1807-1812.
- Daniels, L., Hanson, R. S., & Phillips, J. A. (2007). Chemical analysis.
- Dastager, S., Li, W.-J., Dayanand, A., Tang, S.-K., Tian, X.-P., Zhi, X.-y., . . . Jiang, C.-L. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, 5(11).
- De Ley, J. (1968). DNA base composition and hybridization in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 6(1), 63-90.
- de Menezes, A. B., Lockhart, R. J., Cox, M. J., Allison, H. E., & McCarthy, A. J. (2008). Cellulose degradation by micromonosporas recovered from freshwater lakes and classification of these actinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 7080-7084.

- Dees, P. M., & Ghiorse, W. C. (2001). Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS microbiology ecology*, 35(2), 207-216.
- Devulder, G., De Montclos, M. P., & Flandrois, J. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 293-302.
- Dietz, A., & Mathews, J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Applied microbiology*, 21(3), 527-533.
- Duangmal, K., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2005). Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. *Fems Microbiology Letters*, 245(2), 321-327.
- El-Gendy, M. M., Hawas, U. W., & Jaspars, M. (2008). Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *The Journal of antibiotics*, 61(6), 379-386.
- Embley, T., & Stackebrandt, E. (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1), 257-289.
- Embley, T. M., & Wait, R. (1994). Structural lipids of eubacteria. *Chemical methods in prokaryotic systematics*, 121-161.
- Ezeoke, I., Klenk, H.-P., Pötter, G., Schumann, P., Moser, B. D., Lasker, B. A., . . . Brown, J. M. (2013). *Nocardia amikacinitorans* sp. nov., an amikacin-resistant human pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(3), 1056-1061.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Riedlinger, J., Bull, A. T., Knutsen, G., Goodfellow, M., . . . Beil, W. (2008). Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucospora*. *Journal of Antibiotics*, 61(3), 158-163.
- Fischer, A., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E. (1983). Molecular-genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadura* and *Nocardiopsis*. *Microbiology*, 129(11), 3433-3446.
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology*, 20(4), 406-416.
- Fitch, W. M., & Margoliash, E. (1967). A method for estimating the number of invariant amino acid coding positions in a gene using cytochrome c as a model case. *Biochemical genetics*, 1(1), 65-71.
- Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.
- Franco, C. M., & Labeda, D. P. (2014). The Order Pseudonocardiales *The Prokaryotes* (pp. 743-860): Springer.

- Gao, B., & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(1), 66-112. doi:10.1128/MMBR.05011-11
- Garcia, L. C., Martínez-Molina, E., & Trujillo, M. E. (2010). *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(2), 331-337.
- Gerber, N. N. (1971). Prodigiosin-like pigments from *Actinomadurea* (*Nocardia*) *pelletieri*. *The Journal of antibiotics*, 24(9), 636-640.
- Gerber, N. N. (1973). Minor prodiginine pigments from *Actinomadurea madurae* and *Actinomadurea pelletieri*. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 10(6), 925-929.
- Gladek, A., Mordarski, M., Goodfellow, M., & Williams, S. (1985). Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of. *Fems Microbiology Letters*, 26, 175-180.
- Golinska, P., Wang, D., & Goodfellow, M. (2013). *Nocardia aciditolerans* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), 1079-1088.
- Goodfellow, M. (1971). Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Microbiology*, 69(1), 33-80.
- Goodfellow, M. (2012). *Actinobacteria phyl. nov*: Wiley Online Library.
- Goodfellow, M. (2014). The Family Nocardiaceae. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 595-650.
- Goodfellow, M., Alderson, G., & Lacey, J. (1979). Numerical taxonomy of *Actinomadurea* and related actinomycetes. *Microbiology*, 112(1), 95-111.
- Goodfellow, M., Brown, R., Ahmed, L., Pathom-Aree, W., Bull, A. T., Jones, A. L., . . . Wang, J. (2013). *Verrucosipora fiedleri* sp. nov., an actinomycete isolated from a fjord sediment which synthesizes proximicins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(3), 493-502.
- Goodfellow, M., Collins, M., & Minnikin, D. (1976). Thin-layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organism methanolsates of coryneform and related taxa. *Microbiology*, 96(2), 351-358.
- Goodfellow, M., & Fiedler, H.-P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(2), 119-142.
- Goodfellow, M., Maldonado, L. A., & Quintana, E. T. (2005). Reclassification of *Nonomurea flexuosa* (Meyer 1989) Zhang et al. 1998 as *Thermopolyspora flexuosa* gen. nov., comb. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1979-1983.
- Goodfellow, M., Minnikin, D., Todd, C., Alderson, G., Minnikin, S., & Collins, M. (1982). Numerical and chemical classification of *Nocardia amarae*. *Microbiology*, 128(6), 1283-1297.
- Goodfellow, M., Minnikin, D. E., & bacteriology, S. f. a. (1985). *Chemical methods in bacterial systematics*: Academic Press London.

- Goodfellow, M., & Pirouz, T. (1982). Numerical classification of sporoactinomycetes containing meso-diaminopimelic acid in the cell wall. *Microbiology*, 128(3), 503-527.
- Goodfellow, M., Stach, J. E., Brown, R., Bonda, A. N. V., Jones, A. L., Mexson, J., . . . Bull, A. T. (2012). *Verrucospora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), 185-193.
- Goodfellow, M., & Williams, S. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Reviews in Microbiology*, 37(1), 189-216.
- Goodfellow, M., Williams, S. T., & Alderson, G. (1986). Transfer of *Chainia* species to the genus *Streptomyces* with emended description of species. *Systematic and applied microbiology*, 8(1), 55-60.
- Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E., & Pang, C. H.-N. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(1), 54-63.
- Gordon, R. E., & Mihm, J. M. (1962). The type species of the genus *Nocardia*. *Microbiology*, 27(1), 1-10.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(1), 81-91.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-189.2185.
- Greene, J., Treuhaft, M., & Arusell, R. (1981). Hypersensitivity pneumonitis due to *Saccharomonospora viridis* diagnosed by inhalation challenge. *Annals of allergy*, 47(6), 449.
- Greiner-Mai, E., Korn-Wendisch, F., & Kutzner, H. J. (1988). Taxonomic Revision of the Genus *Saccharomonospora* and Description of *Saccharomonospora glauca* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 398-405.
- Gu, Q., Zheng, W., & Huang, Y. (2007). *Glycomyces sambucus* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Sambucus adnata* Wall. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 1995-1998.
- Gürtler, V., & Mayall, B. C. (2001). Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 3-16.
- Han, J.-H., Cho, M.-H., & Kim, S. B. (2012). Ribosomal and protein coding gene based multigene phylogeny on the family Streptomycetaceae. *Systematic and applied microbiology*, 35(1), 1-6.
- Han, L., Gao, C., Jiang, Y., Guan, P., Liu, J., Li, L., . . . Huang, X. (2014). Jiangrines A–F and Jiangolide from an Actinobacterium, *Jiangella gansuensis*. *Journal of natural products*, 77(12), 2605-2610.

- Harunari, E., Hamada, M., Shibata, C., Tamura, T., Komaki, H., Imada, C., & Igarashi, Y. (2015). *Streptomyces hyaluromycini* sp. nov., isolated from a tunicate (*Molgula manhattensis*). *The Journal of antibiotics*.
- Harvey, I., Cormier, Y., Beaulieu, C., Akimov, V. N., Mériaux, A., & Duchaine, C. (2001). Random amplified ribosomal DNA restriction analysis for rapid identification of thermophilic actinomycete-like bacteria involved in hypersensitivity pneumonitis. *Systematic and applied microbiology*, 24(2), 277-284.
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T.-a. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160-174.
- Hayakawa, M., & Nonomura, H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 65(5), 501-509.
- Hirsch, A. M., Alvarado, J., Bruce, D., Chertkov, O., De Hoff, P. L., Detter, J. C., . . . Han, S. (2013). Complete genome sequence of *Micromonospora* strain L5, a potential plant-growth-regulating actinomycete, originally isolated from *Casuarina equisetifolia* root nodules. *Genome announcements*, 1(5), e00759-00713.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2004). Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Systematic and applied microbiology*, 27(2), 166.
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*: Oxford University Press.
- Horinouchi, S., & Beppu, T. (2007). Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 83(9/10), 277-295.
- Howarth, O., Grund, E., Kroppenstedt, R., & Collins, M. (1986). Structural determination of a new naturally occurring cyclic vitamin K. *Biochemical and biophysical research communications*, 140(3), 916-923.
- Hunter, J., Fonda, M., Sotos, L., Toso, B., & Belt, A. (1984). Ecological approaches to isolation. *Developments in industrial microbiology*, 25, 247-266.
- Husain, S., McCurry, K., Dauber, J., Singh, N., & Kusne, S. (2002). *Nocardia* infection in lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation*, 21(3), 354-359.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., . . . Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology*, 21(5), 526-531.
- Jackson, M. (1958). Organic matter determination for soils. *Soil chemical analysis*, 219-222.

- Jiang, C.-L., & Xu, L.-H. (1996). Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, yunnan, china. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 249-253.
- Jin, X., Xu, L.-H., Mao, P.-H., Hseu, T.-H., & Jiang, C.-L. (1998). Description of *Saccharomonospora xinjiangensis* sp. nov. based on chemical and molecular classification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1095-1099.
- Johnson, J. L. (1973). Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(4), 308-315.
- Johnson, J. L., & Ordal, E. J. (1968). Deoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *Journal of Bacteriology*, 95(3), 893-900.
- Johnston, D., & Cross, T. (1976). Actinomycetes in lake muds: dormant spores or metabolically active mycelium? *Freshwater Biology*, 6(5), 465-470.
- Jones, K. L. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology*, 57(2), 141.
- Jose, P. A., & Jebakumar, S. R. D. (2014). Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3(21), 132.
- Kaewkla, O., & Franco, C. M. (2010). *Nocardia callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized root of an Australian native pine tree. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(7), 1532-1536.
- Kageyama, A., Poonwan, N., Yazawa, K., Mikami, Y., & Nishimura, K. (2004). *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 125-130.
- Kämpfer, P. (2012). Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(1), 3-11. doi:10.1007/s10482-011-9660-4
- Kämpfer, P. (2006). The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy *The prokaryotes* (pp. 538-604): Springer.
- Kämpfer, P., Buczolits, S., Jäckel, U., Grün-Wollny, I., & Busse, H.-J. (2004). *Nocardia tenerifensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 381-383.
- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2013). Prokaryote characterization and identification *The Prokaryotes* (pp. 123-147): Springer.
- Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Parkes, L., van Keulen, G., & Dyson, P. (2014). The Family Streptomycetaceae *The Prokaryotes* (pp. 889-1010): Springer.

- Kämpfer, P., Huber, B., Buczolits, S., Thummes, K., Grün-Wollny, I., & Busse, H.-J. (2007). *Nocardia acidivorans* sp. nov., isolated from soil of the island of Stromboli. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(6), 1183-1187.
- Kämpfer, P., Kroppenstedt, R. M., & Dott, W. (1991). A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *Microbiology*, 137(8), 1831-1891.
- Kämpfer, P., Kroppenstedt, R. M., & Grün-Wollny, I. (2005). *Nonomuraea kuesteri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 847-851.
- Kämpfer, P., Schäfer, J., Lodders, N., & Martin, K. (2011). *Jiangella muralis* sp. nov., from an indoor environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 128-131.
- Kaneda, T. (1991). Iso-and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological reviews*, 55(2), 288-302.
- Kasai, H., Tamura, T., & Harayama, S. (2000). Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 127-134.
- Kawamoto, I. (1989). Genus *Micromonospora*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4, 2442-2450.
- Kazancı, N., & Gevrek, A. (1996). Nevşehir-Acıgöl maarının tortul dolgusundaki (Kuvaterner) fasiyeslerin gelişimine jeotermal süreçlerin etkileri. *Türkiye Jeoloji Bülteni*, 39(1), 55-67.
- Keller, S., Nicholson, G., Drahl, C., Sorensen, E., Fiedler, H., & Sussmuth, R. (2007). Abyssomicins G and H and atrop-abyssomicin C from the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *Journal of Antibiotics*, 60(6), 391.
- Khan, Z., Gangwar, M., Gaur, S., & Randhawa, H. (1995). Thermophilic actinomycetes in cane sugar mills: an aeromicrobiologic and seroepidemiologic study. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 67(4), 339-344.
- Kim, K.-J., Yang, Y.-J., & Kim, J.-G. (2003). Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 36(2), 185-189.
- Kim, S. B., Lonsdale, J., Seong, C.-N., & Goodfellow, M. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943) AL) emend. Rainey et al. 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83(2), 107-116.
- Kim, T. K., Hewavitharana, A. K., Shaw, P. N., & Fuerst, J. A. (2006). Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2118-2125.
- Klenk, H.-P., Held, B., Lucas, S., Lapidus, A., Copeland, A., Hammon, N., . . . Tapia, R. (2015). Genome sequence of the soil bacterium *Saccharomonospora azurea* type strain (NA-128 T). *Standards in genomic sciences*, 6(2), 220.

- Klenk, H. P., & Goker, M. (2010). En route to a genome-based classification of Archaea and Bacteria? *Syst Appl Microbiol*, 33(4), 175-182. doi:10.1016/j.syapm.2010.03.003
- Komagata, K., & Suzuki, K.-I. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods Microbiol*, 19(161207), 0.057083-057080.
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A., & Tiedje, J. M. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1475), 1929-1940.
- Kroppenstedt, R. (1985). Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. *Chemical methods in bacterial systematics. No. 20 SAB Technical Series*, 173-199.
- Kroppenstedt, R. M. (1987). *Chemische Untersuchungen an Actinomycetales und verwandten Taxa, Korrelation von Chemosystematik und Phylogenie*.
- Kroppenstedt, R. M., & Goodfellow, M. (2006). The family Thermomonosporaceae: Actinocorallia, Actinomadura, Spirillospora and Thermomonospora *The prokaryotes* (pp. 682-724): Springer.
- Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C., & Stackebrandt, E. (2005). Eight new species of the genus Micromonospora, Micromonospora citrea sp. nov., Micromonospora echinaurantiaca sp. nov., Micromonospora echinofusca sp. nov., Micromonospora fulviviridis sp. nov., Micromonospora inyonensis sp. nov., Micromonospora peucetia sp. nov., Micromonospora sagamiensis sp. nov., and Micromonospora viridifaciens sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 28(4), 328-339.
- Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., & Goodfellow, M. (1990). Taxonomic revision of the actinomycete genera Actinomadura and Microtetraspora. *Systematic and applied microbiology*, 13(2), 148-160.
- Kudo, T., Hatai, K., & Seino, A. (1988). Nocardia seriola sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(2), 173-178.
- Kumar, A., Gupta, R., Shrivastava, B., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2012). Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate Streptomyces sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(3), 170-177.
- Küster, E., & Locci, R. (1963). Transfer of Thermoactinomyces viridis Schuurmans et al. 1956 to the genus Thermomonospora as Thermomonospora viridis (Schuurmans, Olson and San Clemente) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 13(4), 213-216.
- Küster, E., & Williams, S. (1964). Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, 202, 928-929.
- Labeda, D., Testa, R., Lechevalier, M., & Lechevalier, H. (1985). Glycomyces, a new genus of the Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(4), 417-421.

- Labeda, D. P., & Kroppenstedt, R. M. (2004). Emended description of the genus *Glycomyces* and description of *Glycomyces algeriensis* sp. nov., *Glycomyces arizonensis* sp. nov. and *Glycomyces lechevalierae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2343-2346.
- Lacey, J. (1988). Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment. *Actinomycetes in biotechnology*, 359-432.
- Lan  lle, M., & Asselineau, J. (1970). Caracterisation de glycolipides dans une souche de *Nocardia brasiliensis*. *Febs Letters*, 7(1), 64-67.
- Lechevalier, H., Solotorovsky, M., & Mcdurmont, C. I. (1961). A new genus of the Actinomycetales: *Micropolyspora* gen. nov. *Microbiology*, 26(1), 11-18.
- Lechevalier, M. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. *Actinomycete taxonomy*, 227-291.
- Lechevalier, M. P., De Bievre, C., & Lechevalier, H. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochemical systematics and ecology*, 5(4), 249-260.
- Lechevalier, M. P., Horan, A. C., & Lechevalier, H. (1971). Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 105(1), 313-318.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(4), 435-443.
- Lechevalier, M. P., & Moss, C. W. (1977). Lipids in bacterial taxonomy-a taxonomist's view. *CRC critical reviews in microbiology*, 5(2), 109-210.
- Lee, M. D., Fantini, A. A., Kuck, N. A., Greenstein, M., Testa, R. T., & Borders, D. B. (1987). New antitumor antibiotic, LL-D05139. BETA.. Fermentation. isolation, structure determination and biological activities. *The Journal of antibiotics*, 40(12), 1657-1663.
- Lee, S. D. (2008). *Jiangella alkaliphila* sp. nov., an actinobacterium isolated from a cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1176-1179.
- Lee, S. D., & Jeong, H. S. (2006). *Actinomadura hallensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Mt. Halla in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 259-264.
- Li, F., Maskey, R. P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H. H., Maier, A., . . . Laatsch, H. (2005). Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045#, 1. *Journal of natural products*, 68(3), 349-353.
- Li, J., Zhao, G.-Z., Huang, H.-Y., Zhu, W.-Y., Lee, J.-C., Xu, L.-H., . . . Li, W.-J. (2011). *Nonomuraea endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 757-761.

- Li, J., Zhao, G.-Z., Zhu, W.-Y., Huang, H.-Y., Xu, L.-H., Zhang, S., & Li, W.-J. (2011). *Phytomonospora endophytica* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12), 2967-2973.
- Li, W.-J., Tang, S.-K., Stackebrandt, E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Xu, L.-H., & Jiang, C.-L. (2003). *Saccharomonospora paurometabolica* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1591-1594.
- Li, X., Zhang, L., Ding, Y., Gao, Y., Ruan, J., & Huang, Y. (2012). *Nonomuraejiangxiensis* sp. nov., isolated from acidic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(6), 1409-1413.
- Liao, Z.-L., Tang, S.-K., Guo, L., Zhang, Y.-Q., Tian, X.-P., Jiang, C.-L., . . . Li, W.-J. (2009). *Verrucosispora lutea* sp. nov., isolated from a mangrove sediment sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(9), 2269-2273.
- Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A., & Chen, C. W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Molecular Microbiology*, 10(5), 923-933.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112-143.
- Liu, Z., Li, Y., Zheng, L.-Q., Huang, Y.-J., & Li, W.-J. (2010). *Saccharomonospora marina* sp. nov., isolated from an ocean sediment of the East China Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(8), 1854-1857.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Kämpfer, P., & Whitman, W. B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-28): Springer.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). Revised road map to the phylum Firmicutes *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 1-13): Springer.
- Luo, Q., Hiessl, S., Poehlein, A., & Steinbüchel, A. (2013). Microbial gutta-percha degradation shares common steps with rubber degradation by *Nocardia nova* SH22a. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4), 1140-1149.
- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M., & Sherman, D. H. (2004). Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7520-7529.
- Maldonado, L., Hookey, J. V., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2000). The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78(3-4), 367-377.
- Maldonado, L. A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J., & Quintana, E. T. (2009). Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95(2), 111-120.

- Maltsev, I., Kalinovskiy, A., Zgurskaya, H. I., & Evtushenko, L. I. (1992). Tyvelose in *Agromyces* cell walls. *Systematic and applied microbiology*, 15(2), 187-190.
- Manam, R. R., Teisan, S., White, D. J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S. T., . . . Potts, B. C. (2005). Lajollamycin, a Nitro-tetraene Spiro- β -lactone- γ -lactam Antibiotic from the Marine Actinomycete *Streptomyces n. odosus*. *Journal of natural products*, 68(2), 240-243.
- Mari, B., a, n., Montón, C., Mariscal, D., Luján, M., Sala, M., & Domingo, C. (2001). Pulmonary nocardiosis: clinical experience in ten cases. *Respiration*, 68(4), 382-388.
- Martin, K., Schäfer, J., & Kämpfer, P. (2010). *Promicromonospora umidemergens* sp. nov., isolated from moisture from indoor wall material. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3), 537-541.
- Mayfield, C., Williams, S., Ruddick, S., & Hatfield, H. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1), 79IN387-386IN691.
- McCarthy, A., & Cross, T. (1984). A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes. *Microbiology*, 130(1), 5-25.
- McCarthy, B., & Bolton, E. (1964). Interaction of complementary RNA and DNA. *Journal of molecular biology*, 8(2), 184-200.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1.
- Mendez, M. O., Neilson, J. W., & Maier, R. M. (2008). Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3899-3907.
- Meyer, J. (1989). Genus *Actinomadura* Lechevalier and Lechevalier 1970. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 4, 2511-2526.
- Minnikin, D., Patel, P., Alshamaony, L., & Goodfellow, M. (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 27(2), 104-117.
- Moore, J. E., Rao, J. R., Moore, P. J., Millar, B. C., Goldsmith, C. E., Loughrey, A., & Rooney, P. J. (2010). Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in rivers and streams in Northern Ireland: can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change? *Aquatic ecology*, 44(2), 349-358.
- Mordarska, H., Mordarski, M., & Goodfellow, M. (1972). Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *Microbiology*, 71(1), 77-86.
- Moser, B. D., Klenk, H.-P., Schumann, P., Pötter, G., Lasker, B. A., Steigerwalt, A. G., . . . Brown, J. M. (2011). *Nocardia niwae* sp. nov., isolated from human pulmonary sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 438-442.

- Muller, R., & Wink, J. (2014). Future potential for anti-infectives from bacteria - how to exploit biodiversity and genomic potential. *Int J Med Microbiol*, 304(1), 3-13. doi:10.1016/j.ijmm.2013.09.004
- Murray, B., Singh, K., Heath, J. D., Sharma, B., & Weinstock, G. (1990). Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(9), 2059-2063.
- Nakaew, N., Sungthong, R., Yokota, A., & Lumyong, S. (2012). *Nonomuraea monospora* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil in Thailand, and emended description of the genus *Nonomuraea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), 3007-3012.
- Neef, A., Schäfer, R., Beimfohr, C., & Kämpfer, P. (2003). Fluorescence based rRNA sensor systems for detection of whole cells of *Saccharomonospora* spp. and *Thermoactinomyces* spp. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5), 565-569.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford university press.
- Nonomura, H., & Ohara, Y. (1971). Distribution of actinomycetes in soil. X. New genus and species of monosporic actinomycetes. *J Ferment Technol*.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., . . . Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4050-4060.
- Okazaki, T., & Okami, Y. (1976). Studies on actinomycetes isolated from shallow sea and their antibiotic substances. *Actinomycetes: The boundary microorganisms*, 123-162.
- Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., . . . Osonoe, T. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12215-12220.
- Otoguro, M., Yamamura, H., & Quintana, E. T. (2014). The Family Streptosporangiaceae *The Prokaryotes* (pp. 1011-1045): Springer.
- Palleroni, N. J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental microbiology*, 12(6), 1377-1383.
- Pang, X., Zhou, X., Sun, Y., & Deng, Z. (2002). Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces hygroscopicus* 10-22 deduced by analysis of overlapping large chromosomal deletions. *Journal of Bacteriology*, 184(7), 1958-1965.
- Pati, A., Sikorski, J., Nolan, M., Lapidus, A., Copeland, A., Del Rio, T. G., . . . Pitluck, S. (2009). Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101T). *Standards in genomic sciences*, 1(2), 141-149.
- Peraira, J., Segovia, J., Fuentes, R., Jimenez-Mazuecos, J., Arroyo, R., Fuertes, B., . . . Pulpon, L. (2003). *Pulmonary nocardiosis in heart transplant recipients: treatment and outcome*. Paper presented at the Transplantation proceedings.

- Philippe, H., & Douady, C. J. (2003). Horizontal gene transfer and phylogenetics. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 498-505.
- Pridham, T., Hesseltine, C., & Benedict, R. (1958). A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Applied microbiology*, 6(1), 52.
- Pridham, T., & Tresner, H. (1974). Streptomycetaceae. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, 748-829.
- Qin, S., Chen, H.-H., Klenk, H.-P., Zhao, G.-Z., Li, J., Xu, L.-H., & Li, W.-J. (2009). *Glycomyces scopariae* sp. nov. and *Glycomyces mayteni* sp. nov., isolated from medicinal plants in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(5), 1023-1027.
- Qin, S., Jiang, J.-H., Klenk, H.-P., Zhu, W.-Y., Zhao, G.-Z., Zhao, L.-X., . . . Li, W.-J. (2012). *Promicromonospora xylanilytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from surface-sterilized leaves of the medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(1), 84-89.
- Qin, S., Wang, H.-B., Chen, H.-H., Zhang, Y.-Q., Jiang, C.-L., Xu, L.-H., & Li, W.-J. (2008). *Glycomyces endophyticus* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Carex baccans* Nees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2525-2528.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J. H., Xu, L. H., & Li, W. J. (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 457-473. doi:10.1007/s00253-010-2923-6
- Qin, S., Zhao, G.-Z., Klenk, H.-P., Li, J., Zhu, W.-Y., Xu, L.-H., & Li, W.-J. (2009). *Nonomuraea antimicrobica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a leaf of *Maytenus austroyunnanensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(11), 2747-2751.
- Queipo-Zaragozá, J., Broseta-Rico, E., Alapont-Alacreu, J., Santos-Durantez, M., Sánchez-Plumed, J., & Jiménez-Cruz, J. (2004). Nocardial infection in immunosuppressed kidney transplant recipients. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 38(2), 168-173.
- Ramesh, S., & Mathivanan, N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2103-2111.
- Ratledge, C., & Patel, P. (1976). The isolation, properties and taxonomic relevance of lipid-soluble, iron-binding compounds (the nocobactins) from *Nocardia*. *Microbiology*, 93(1), 141-152.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., & Hopwood, D. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Molecular Microbiology*, 21(1), 77-96.

- Redenbach, M., Scheel, J., & Schmidt, U. (2000). Chromosome topology and genome size of selected actinomycetes species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78(3-4), 227-235.
- Reed, J. F., & Cummings, R. W. (1945). Soil reaction-glass electrode and colorimetric methods for determining ph values of soils. *Soil science*, 59(1), 97-105.
- Rheims, H., Schumann, P., Rohde, M., & Stackebrandt, E. (1998). *Verrucosispora gifhornensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the actinobacterial family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1119-1127.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zähler, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., . . . Bischoff, D. (2004). Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *The Journal of antibiotics*, 57(4), 271-279.
- Rieß, F. G., Lichtinger, T., Cseh, R., Yassin, A. F., Schaal, K. P., & Benz, R. (1998). The cell wall porin of *Nocardia farcinica*: biochemical identification of the channel-forming protein and biophysical characterization of the channel properties. *Molecular Microbiology*, 29(1), 139-150.
- Rivas, R., Sánchez, M., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñero, J. L., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2003). *Xylanimonas cellulositytica* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 99-103.
- Roberts, S., Franklin, J., Mijch, A., & Spelman, D. (2000). *Nocardia* infection in heart-lung transplant recipients at Alfred Hospital, Melbourne, Australia, 1989–1998. *Clinical infectious diseases*, 31(4), 968-972.
- Rodríguez-Nava, V., Couble, A., Molinard, C., Sandoval, H., Boiron, P., & Laurent, F. (2004). *Nocardia mexicana* sp. nov., a new pathogen isolated from human mycetomas. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4530-4535.
- Rodríguez-Nava, V., Khan, Z., Pötter, G., Kroppenstedt, R. M., Boiron, P., & Laurent, F. (2007). *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1482-1486.
- Roh, H., Uguru, G. C., Ko, H.-J., Kim, S., Kim, B.-Y., Goodfellow, M., . . . Choi, I.-G. (2011). Genome Sequence of the Abyssomicin and Proximicin-Producing Marine Actinomycete *Verrucosispora maris* AB-18-032. *Journal of Bacteriology*, JB. 05041-05011.
- Ruddick, S., & Williams, S. (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(1), 93-103.
- Rzhetsky, A., & Nei, M. (1992). A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol. Biol. Evol*, 9(5), 945-967.
- Sahin, N., Veyisoglu, A., Tatar, D., Saygin, H., Cetin, D., Guven, K., . . . Goodfellow, M. (2015). *Phytomonospora cypria* sp. nov., isolated from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(6), 1425-1432.

- Saintpierre-Bonaccio, D., Maldonado, L. A., Amir, H., Pineau, R., & Goodfellow, M. (2004). *Nocardia neocaledoniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 599-603.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Salazar, O., Morón, R., & Genilloud, O. (2000). New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genus *Saccharomonospora* and evaluation of the microbial diversity of wild-type isolates of *Saccharomonospora* detected from soil DNAs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2043-2055.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria through fatty acid analysis. *Methods in phytobacteriology*, 199-204.
- Sazak, A., Sahin, N., & Camas, M. (2012). *Nocardia goodfellowii* sp. nov. and *Nocardia thraciensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(6), 1228-1234.
- Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, 36(4), 407.
- Schneider, K., Keller, S., Wolter, F. E., Röglin, L., Beil, W., Seitz, O., . . . Fiedler, H. P. (2008). Proximicins A, B, and C—antitumor furan analogues of netropsin from the marine actinomycete *Verrucosisspora* induce upregulation of p53 and the cyclin kinase inhibitor p21. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(17), 3258-3261.
- Schneider, K., Rose, I., Vikineswary, S., Jones, A. L., Goodfellow, M., Nicholson, G., . . . Fiedler, H.-P. (2007). Nocardichelins A and B, Siderophores from *Nocardia* Strain Acta 3026#. *Journal of natural products*, 70(6), 932-935.
- Schulze, B., & Wubbolts, M. G. (1999). Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(6), 609-615.
- Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2014). The Family Promicromonosporaceae *The Prokaryotes* (pp. 701-724): Springer.
- Schuermans, D. M., Olson, B. H., & San Clemente, C. L. (1956). Production and isolation of thermoviridin, an antibiotic produced by *Thermoactinomyces viridis* n. sp. *Applied microbiology*, 4(2), 61.
- Sebek, O., & Dolak, L. (1984). Microbial hydroxylation of novobiocin and related compounds. *The Journal of antibiotics*, 37(2), 136-142.
- Sharma, A. D., & Gill, P. K. (2007). Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1172-1178.
- Shirai, M., Okuda, M., Motohashi, K., Imoto, M., Furihata, K., Matsuo, Y., . . . Seto, H. (2010). Terpenoids produced by actinomycetes: isolation, structural elucidation and biosynthesis of new diterpenes, giphornenolones A and B from *Verrucosisspora giphornensis* YM28-088. *The Journal of antibiotics*, 63(5), 245-250.

- Shirling, E. t., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313-340.
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23(1), 15-22.
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 428-471.
- Skerman, V. (1960). A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria. *Academic Medicine*, 35(1), 92.
- Sneath, P. (1971). Numerical taxonomy: criticisms and critiques: Presidential address to the Systematics Association, November 1970. *Biological Journal of the Linnean Society*, 3(2), 147-157.
- Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- Soina, V., Sokolov, A., & Agre, N. (1974). [Ultrastructure of the mycelium and spores of *Actinomadura fastidiosa* sp. nov.]. *Mikrobiologiya*, 44(5), 883-887.
- Song, J., Weon, H.-Y., Yoon, S.-H., Park, D.-S., Go, S.-J., & Suh, J.-W. (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Fems Microbiology Letters*, 202(1), 97-102.
- Song, L., Li, W.-J., Wang, Q.-L., Chen, G.-Z., Zhang, Y.-S., & Xu, L.-H. (2005). *Jiangella gansuensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete from a desert soil in north-west China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 881-884.
- Stackebrandt, E. (2014). The Order Glycomycetales and the Genus *Actinocatenispora* *The Prokaryotes* (pp. 381-390): Springer.
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today*, 33(4), 152.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., . . . Trüper, H. G. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1043-1047.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. (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(4), 846-849.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 479-491.
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1986). The Microbial World. Prentice Hall. *Englewood Cliffs, New Jersey*, 439-452.

- Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., & Sundh, I. (2007). Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology*, 158(7), 617-624.
- Suksaard, P., Duangmal, K., Srivibool, R., Xie, Q., Hong, K., & Pathom-aree, W. (2015). *Jiangella mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8), 2569-2573.
- Sungthong, R., & Nakaew, N. (2015). The genus *Nonomuraea*: a review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. *Journal of Basic Microbiology*, 55(5), 554-565.
- Supong, K., Suriyachadkun, C., Suwanborirux, K., Pittayakhajonwut, P., & Thawai, C. (2013). *Verrucosipora andamanensis* sp. nov., isolated from a marine sponge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(11), 3970-3974.
- Syed, D. G., Tang, S.-K., Cai, M., Zhi, X.-Y., Agasar, D., Lee, J.-C., . . . Li, W.-J. (2008). *Saccharomonospora saliphila* sp. nov., a halophilic actinomycete from an Indian soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 570-573.
- Szabó, Z., & Fernandez, C. (1984). *Micromonospora brunnea* Sveshnikova, Maksimova, and Kudrina 1969 is a junior subjective synonym of *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis 1916) Luedemann 1971. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 463-464.
- Také, A., Matsumoto, A., Ōmura, S., & Takahashi, Y. (2015). *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cylabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cylabdan, respectively. *The Journal of antibiotics*, 68(5), 322-327.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526.
- Tamura, T., Suzuki, S.-i., & Hatano, K. (2000). *Acrocarpospora* gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1163-1171.
- Tan, G. Y., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2006). Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. *Syst Appl Microbiol*, 29(7), 557-569. doi:10.1016/j.syapm.2006.01.007
- Tang, S.-K., Zhi, X.-Y., & Li, W.-J. (2014). The Order Jiangellales *The Prokaryotes* (pp. 425-430): Springer.
- Tatar, D., Guven, K., Inan, K., Cetin, D., Belduz, A. O., & Sahin, N. (2016). *Streptomonospora tuzyakensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from saline soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(1), 35-41.
- Tatar, D., Guven, K., Spröer, C., Klenk, H.-P., & Sahin, N. (2014). *Streptomyces iconiensis* sp. nov. and *Streptomyces smyrnaeus* sp. nov., two halotolerant actinomycetes isolated from a salt lake and saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(9), 3126-3133.

- Tatar, D., Sazak, A., Guven, K., Cetin, D., & Sahin, N. (2013). *Amycolatopsis cihanbeyliensis* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a salt mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(10), 3739-3743.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kampfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 1), 249-266. doi:10.1099/ijs.0.016949-0
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A., & Krieg, N. R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics.
- Tomiyasu, I. (1982). Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in *Nocardia asteroides*. *Journal of Bacteriology*, 151(2), 828-837.
- Trujillo, M. (2012). Genus III. *Actinomadura* Lechevalier and Lechevalier 1970, 400AL emend. Kroppenstedt, Stackebrandt and Goodfellow 1990, 156. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Actinobacteria*, 5, 1940-1959.
- Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., Alonso, P., & Martínez-Molina, E. (2010). The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *The ISME journal*, 4(10), 1265-1281.
- Trujillo, M. E., Hong, K., & Genilloud, O. (2014). The Family *Micromonosporaceae*. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 499-569.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L., & Martínez-Molina, E. (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(10), 2381-2385.
- Trüper, H. G., & Schleifer, K. H. (2006). Prokaryote characterization and identification *The prokaryotes* (pp. 58-79): Springer.
- Tseng, M., Hoang, K.-C., Yang, M.-K., Yang, S.-F., & Chu, W. S. (2007). Polyester-degrading thermophilic actinomycetes isolated from different environment in Taiwan. *Biodegradation*, 18(5), 579-583.
- Uchida, K., & Seino, A. (1997). Intra-and intergeneric relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(1), 182-190.
- Vaas, L. A., Sikorski, J., Hofner, B., Fiebig, A., Buddruhs, N., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2013). opm: an R package for analysing OmniLog® phenotype microarray data. *Bioinformatics*, 29(14), 1823-1824.
- Vaas, L. A., Sikorski, J., Michael, V., Göker, M., & Klenk, H.-P. (2012). Visualization and curve-parameter estimation strategies for efficient exploration of phenotype microarray kinetics. *PLoS One*, 7(4), e34846.

- van Dissel, D., Claessen, D., & van Wezel, G. P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 61, 89, 1-45.
- Van Hop, D., Sakiyama, Y., Binh, C. T. T., Ootoguro, M., Hang, D. T., Miyadoh, S., . . . Ando, K. (2011). Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-level diversity. *The Journal of antibiotics*, 64(9), 599-606.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(3), 495-548. doi:10.1128/MMBR.00005-07
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2007). Molecular characterization of hsp20, encoding a small heat shock protein of *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4695-4703.
- Veyisoglu, A., Sazak, A., Cetin, D., Guven, K., & Sahin, N. (2013). *Saccharomonospora amisosensis* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(10), 3782-3786.
- Vickers, J., Williams, S., & Ross, G. (1984). A taxonomic approach to selective isolation of streptomycetes from soil. *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, 553-561.
- Vobis, G. (2006). The genus *Actinoplanes* and related genera *The Prokaryotes* (pp. 623-653): Springer.
- Waksman, S., & Henrici, A. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 46, 337-341.
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1), 29-38.
- Wang, C., Xu, X.-X., Qu, Z., Wang, H.-L., Lin, H.-P., Xie, Q.-Y., . . . Hong, K. (2011). *Micromonospora rhizosphaerae* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 320-324.
- Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y., Liu, Z., Maldonado, L., & Goodfellow, M. (2001). *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1783-1788.
- Wang, W., Qiu, Z., Tan, H., & Cao, L. (2014). Siderophore production by actinobacteria. *Biometals*, 27(4), 623-631. doi:10.1007/s10534-014-9739-2
- Wang, X., Jia, F., Liu, C., Zhao, J., Wang, L., Shen, Y., . . . Xiang, W. (2013). *Xiangella phaseoli* gen. nov., sp. nov., a member of the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(6), 2138-2145.

- Wang, X., Zhao, J., Liu, C., Wang, J., Shen, Y., Jia, F., . . . Xiang, W. (2013). *Nonomuraea solani* sp. nov., an actinomycete isolated from eggplant root (*Solanum melongena* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(7), 2418-2423.
- Wang, Y., Zhang, Z., & Ruan, J. (1996). A Proposal To Transfer *Microbispora bispora* (Lechevalier 1965) to a New Genus, *Thermobispora* gen. nov., as *Thermobispora bispora* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 933-938.
- Wang, Y., Zheng, Y., Zheng, R., & Shen, Y. (2006). Stability study on the nitrile hydratase of *Nocardia* sp. 108: From resting cells to crude enzyme preparation. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(4), 384-387.
- Warneke, S., Arenskötter, M., Tenberge, K. B., & Steinbuechel, A. (2007). Bacterial degradation of poly (trans-1, 4-isoprene)(gutta percha). *Microbiology*, 153(2), 347-356.
- Watson, E., & Williams, S. (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil—VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biology and Biochemistry*, 6(1), 43-52.
- Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P., Kandler, O., Krichevsky, M., . . . Stackebrandt, E. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- Welker, M., & Moore, E. R. (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), 2-11.
- Wellington, E., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J., & Jorgensen, N. (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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 156-160.
- Weyland, H. (1969). Actinomycetes in North sea and Atlantic ocean sediments. *Nature*, 223, 858.
- Weyland, H. (1984). *Actinomycetes of the bottom sediments of various seas*. Paper presented at the 2. Colloque International de Bacteriologie Marine, Brest (France), 1-5.
- Whitman, W. B. (2014). The Need for Change: Embracing the Genome. *Methods in Microbiology*, 41, 1-12.
- Williams, S., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E., Sneath, P., & Sackin, M. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*, 129(6), 1743-1813.
- Williams, S., & Vickers, J. (1988). Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes*, 88, 265-270.
- Willoughby, L. (1969). A study of the aquatic actinomycetes of Blelham Tarn. *Hydrobiologia*, 34(3-4), 465-483.

- Wink, J., Kroppenstedt, R. M., Seibert, G., & Stackebrandt, E. (2003). *Actinomadura namibiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 721-724.
- Witt, D., & Stackebrandt, E. (1990). Unification of the genera *Streptovercillum* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339 AL. *Systematic and applied microbiology*, 13(4), 361-371.
- Wu, H., Chen, W., Wang, G., Dai, S., Zhou, D., Zhao, H., . . . Li, X. (2012). Culture-dependent diversity of Actinobacteria associated with seagrass (*Thalassia hemprichii*). *African Journal of Microbiology Research*, 6(1), 87-94.
- Xi, L., Ruan, J., & Huang, Y. (2012). Diversity and biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the china seas. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 5917-5932.
- Xi, L., Zhang, L., Ruan, J., & Huang, Y. (2012). Description of *Verrucosispora qiuiae* sp. nov., isolated from mangrove swamp sediment, and emended description of the genus *Verrucosispora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1564-1569.
- Xie, Q.-y., Lin, H.-p., Li, L., Brown, R., Goodfellow, M., Deng, Z., & Hong, K. (2012). *Verrucosispora wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(1), 1-7.
- Xie, Q.-Y., Wang, C., Wang, R., Qu, Z., Lin, H.-P., Goodfellow, M., & Hong, K. (2011). *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(5), 1153-1159.
- Yamamura, H., Hayakawa, M., Nakagawa, Y., Tamura, T., Kohno, T., Komatsu, F., & Iimura, Y. (2005). *Nocardia takedensis* sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 433-436.
- Yano, I., Imaeda, T., & Tsukamura, M. (1990). Characterization of *Nocardia nova*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(2), 170-174.
- Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., . . . Rosselló-Móra, R. (2008). The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and applied microbiology*, 31(4), 241-250.
- Zhang, Z., Kudo, T., Nakajima, Y., & Wang, Y. (2001). Clarification of the relationship between the members of the family Thermomonosporaceae on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 373-383.
- Zhang, Z., Wang, Y., & Ruan, J. (1997). A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1048-1054.
- Zhang, Z., Wang, Y., & Ruan, J. (1998). Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 411-422.

- Zhao, G.-Z., Li, J., Zhu, W.-Y., Klenk, H.-P., Xu, L.-H., & Li, W.-J. (2011). *Nocardia artemisiae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized stem of *Artemisia annua* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12), 2933-2937.
- Zhao, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., . . . Strobel, G. A. (2011). The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Current microbiology*, 62(1), 182-190.
- URL-1: <http://www.bacterio.net/actinomadura.html> (Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2016).
- URL-2: <http://www.bacterio.net/glycomyces.html> (Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2016).
- URL-3: <http://www.bacterio.net/nocardia.html> (Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2016).
- URL-4: <http://www.bacterio.net/nonomuraea.html> (Ziyaret tarihi: 19 Mayıs 2016).





EKLER

EK A: Besi ortamları ve Çözeltiler

Humik Asit – Vitamin Agar (Hayakawa ve Nonomura, 1987)

Humik asit*	1 g
Vitamin çözeltisi**	1 ml
CaCO ₃	0.02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
KCl	1.7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2 ± 0.2

*Humik asit 10 ml 0.2 N NaOH içerisinde çözülerek hazırlandı.

**Vitamin Stok Çözeltisi

Aşağıdaki vitaminler 100 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 0.1 M HCl ile çözeltinin pH (3.0±0.2) ayarı yapıldı ve sterilizasyonu için filtre kullanıldı.

p-aminobenzoik asit	1 mg
Biyotin	1 mg
İnozitol	1 mg
Nikotinamid	1 mg
Pantotenik asit (B ₅)	1 mg
Piridoksin (B ₆)	1 mg
Riboflavin Na-kolin (B ₂)	1 mg
Tiyamin (B ₁)	1 mg
Siyanokobalamin (B ₁₂)	0.05 mg
Folik asit	0.05 mg
Antibiyotikler	
Nistatin	50 µg/ml
Rifampisin	5 µg/ml

Nişasta Kazein – Vitamin Agar (Küster ve Williams, 1964)

Kazein	0.3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
CaCO ₃	0.02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
Çözünebilir nişasta	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2
Antibiyotikler	
Nistatin	50 µg/ml
Rifampisin	5 µg/ml
Nalidiksik asit	10 µg/ml

Czapek – Dox Agar (Weyland, 1969)

Sükroz	30 g
NaNO ₃	3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	13 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2
Antibiyotikler	
Nistatin	50 µg/ml
Rifampisin	5 µg/ml

Rafinoz – Histidin Agar (Vicker ve diğ. 1984)

Rafinoz	10 g
L-histidin	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2
Antibiyotikler	
Nistatin	50 µg/ml
Rifampisin	5 µg/ml

Bazal Mineral Tuz Agar (Duangmal ve diğ. (2005)'den modifiye edildi)

Glukoz	10 g
L-histidin	1 g
KNO ₃	2 g
NaCl	35 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
CaCO ₃	0.02 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2
Antibiyotikler	
Nistatin	50 µg/ml
Rifampisin	5 µg/ml

SM1 Agar (Tan ve diğ. 2006)

Bazal ortam*	100 ml
Steril agar (%15, w/v)	900 ml
*Bazal ortam	
Maya nitrojen baz (Difco)	67 g
Kazamino asit (Difco)	100 mg
Distile su	1000 ml
Bazal ortam filtre ile steril edildikten sonra steril K ₂ HPO ₄ (%10, w/v) ve aşağıdaki maddeler eklendi.	
D(-)-Sorbitol	%1, w/v
Antibiyotikler	
Sikloheksimid	50 µg/ml
Neomisin sülfat	4 µg/ml
Nistatin	50 µg/ml

SM2 Agar (Tan ve diğ. 2006)

Bazal ortam*	100 ml
Steril agar (%15, w/v)	900 ml
*Bazal ortam	
Maya nitrojen baz (Difco)	67 g
Kazamino asit (Difco)	100 mg
Distile su	1000 ml
Bazal ortam filtre ile (0.2 µm) steril edildikten sonra steril K ₂ HPO ₄ (%10, w/v) ve aşağıdaki maddeler eklendi.	
D(+) Melezitoz	%1, w/v
Antibiyotikler	
Sikloheksimid	50 µg/ml
Neomisin sülfat	4 µg/ml
Nistatin	50 µg/ml

SM3 Agar (Tan ve diğ. 2006)

Glukoz	10 g
Pepton	5 g
Tripton	3 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2
Antibiyotikler	
Sikloheksimid	50 µg/ml
Nalidiksik asit	10 µg/ml
Novobiyosin	10 µg/ml
Nistatin	50 µg/ml

N-Z-Amin Agar (DSMZ Medium-554)

Glukoz	10 g
Çözünabilir nişasta	20 g
Maya özütü	5 g
N-Z-Amin	5 g
CaCO ₃	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Glukoz – Maya Özütü – Malt Özütü (ISP2; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Glukoz	4 g
Maya Özütü	4 g
Malt Özütü	10 g
CaCO ₃	2 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2 ± 0.2
Antibiyotikler	
Nistatin	50 µg/ml
Rifampisin	5 µg/ml

Tripton – Maya Özütü – Glukoz Agar (DSMZ Medium-680)

Tripton	3 g
Maya özütü	5 g
Glukoz	5 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml
pH	7

Aktinomiset İzolasyon Agar (Kumar ve diğ. 2012)

Sodyum kazeinat	2 g
L-asparajin	0.1 g
Sodyum propiyonat	4 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄	0.5 g
FeSO ₄	0.001 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	8
Antibiyotikler	
Sikloheksimid	50 µg/ml
Nalidiksik asit	10 µg/ml

Glukoz – Maya Özütü – Malt Özütü (ISP2; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Glukoz	4 g
Maya Özütü	4 g
Malt Özütü	10 g
CaCO ₃	2 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2 ± 0.2

Gliserol – Asparajin Agar (ISP5; Shirling ve Gottlieb, 1966)

L-asparajin	1 g
Gliserol	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
İz element çözeltisi	1 ml
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	6.8 ± 0.2

İnorganik Tuz Nişasta Agar (ISP4; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Distile su	500 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
NaCl	1 g
CaCO ₃	2 g
Çözünebilir nişasta çözeltisi	500 ml
Agar	15 g
pH	7.2 ± 0.2

Çözünebilir nişasta çözeltisinin hazırlanması: 10 g çözünebilir nişasta 500 ml distile su içerisine eklenerek topaklanmayı engellemek için iyice karıştırıldı.

Modifiye Bennett's Agar (Jones, 1949)

Maya özütü	1 g
Lab-LEMCO	0.8 g
Bacto-Kaziton	2 g
Gliserol	10 g
Agar	15 g
pH	7.2 ± 0.2

Yulaf Agar (ISP3; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Yulaş ezmesi karışımı	1000 ml
İz element tuz çözeltisi	1 ml
Agar	15 g
pH	7.2 ± 0.2

Yulaf ezmesi karışımı: 20 g yulaf ezmesi 1000 ml distile su içerisine eklendikten sonra 30 dk kaynatıldı. Karışım süzgeçten geçirildikten sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

İz element tuz çözeltisi

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₄ .4H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Distile su	100 ml

Çözelti selüloz-asetat membran filtresi (0.45 µm) ile steril edildikten sonra 4°C'de depolandı.

Pepton – Maya Özütü – Demir Agar (ISP6; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bacto – pepton demir agar	36 g
Bacto – Maya özütü	1 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2

Trypton – Maya Özütü Agar (ISP1; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bacto – tripton	5 g
Bacto – maya özütü	3 ml
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2

Tirozin Agar (ISP7; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Gliserol	15 g
L – Tirozin	0.5 g
L – Asparajin	1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
Distile su	1000 ml
İz element çözeltisi	1 ml
Agar	20 g
pH	7.2 – 7.4

Eskulin / Arbutin degradasyonu (Kutzner 1976)

Bazal ortam

Maya özütü	3 g
Ferrik amonyum sülfat	0.5 g
Agar	7.5 g
pH	7.2

Bazal ortam 121⁰C’de 20 dakika otoklav sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Tindalizasyon ile steril edilen eskulin/arbutin son konsantrasyonu %0.1 (w/v) olacak şekilde bazal ortama eklendi.

Allantoin degradasyonu (Gordon ve diğ. 1974)

Bazal ortam

KH ₂ PO ₄	9.1 g
Na ₂ HPO ₄	9.5 g
Maya özütü	0.1 g
Fenol red	0.01 g
Distile su	1000 ml
pH	6.8

Bazal ortam 121⁰C’de 20 dakika otoklav sterilizasyonuna tabi tutuldu.

Tindalizasyonla steril edilen allantoin son konsantrasyonu %0.33 (w/v) olacak şekilde bazal ortama eklendi.

Azot Kaynağı Kullanım Ortamı (Williams ve diğ. 1983)

Bazal ortam

Glukoz	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	12 g
pH	7.4

Azot kaynakları 10 ml distile suda çözüldükten sonra filtre ile (0.45 µm) steril edildi ve bazal ortama eklendi.

DNaz Test Agar (DNA degradasyonu için) (Difco)

Triptoz	20 g
DNA	2 g
NaCl	5 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml
pH	7.2

Nitrat Redüksiyon Ortamı (Gordon ve Mihm, 1962)

KNO ₃	1 g
Lab LEMCO	2.4 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0

Otoklavda (121⁰C 20 dakika) steril edildi.

Sierra Ortamı (Tween degradasyonu için) (Sierra, 1957)

Bazal ortam	
Bacto-pepton	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0.1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	7.4

Üre Degradasyonu

Bazal ortam	
KH ₂ PO ₄	9.1 g
Na ₂ HPO ₄	9.5 g
Maya özütü	0.1 g
Fenol kırmızısı	0.01 g
Distile su	1000 ml
pH	6.8
Üre filtre ile (0.45 µm) steril edildikten sonra son konsantrasyonu %2 olacak şekilde bazal ortama eklendi.	

Karbon Kaynağı Kullanım Ortamı (ISP9; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bazal mineral tuz agar	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 g
KH ₂ PO ₄	2.38 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	5.65
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Pridham & Gottlieb* iz element çözeltisi	1 ml
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	6.8 – 7.0

***Pridham & Gottlieb iz element çözeltisi**

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.64 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.11 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.15 g
Distile su	100 ml

Karbohidrat çözeltileri tinalizasyon yöntemiyle steril edildikten sonra steril bazal tuz agar ortamına eklendi.

Asidik Civa Klorür (Jelatin degradasyonu için)

Civa klorür	12 g
Distile su	80 ml
Konsantre hidroklorik asit	16 ml

EDTA Tampon Çözeltisi (0.5 M, pH 8.0)

Disodyum etilendiamintetraasetik asit 18.612 g
(EDTA)

Distile su 80 ml

Çözelti NaOH pelleti ile pH=8 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Lugol Çözeltisi (nişasta degradasyonu için)

İyodin 5 g

Potasyum iyodit 10 g

Distile su 100 ml

İyodin ve potasyum iyodit 10 ml distile su içerisinde çözündükten sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Ayıraç 1/5 oranında seyreltildikten sonra kullanıldı.

Nitrat Redüksiyon Ayıraçları**Ayıraç A:**

Sülfanilik asit 0.8 g

Asetik asit (5N) 100 ml

Ayıraç B:

α -Naftilamin 0.8 g

Asetik asit (5N) 100 ml

Tris – Borat – EDTA Tampon Çözeltisi (TBE; 10X stok çözelti, pH 8.0)

Trizma baz 108 g

Borik asit 55 g

EDTA 7.44

NaOH 1 g

Distile su (son hacim) 1000 ml

Otoklavda (121°C, 20 dk) steril edildikten sonra oda sıcaklığında 1/10 oranında seyreltilerek (1X TBE) kullanıldı.

Tris – EDTA Tampon Çözeltisi, pH 8.0 (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)

0.5 M EDTA, pH 8.0 2 ml

1 M Tris – HCl, pH 8.0 10 ml

ddH₂O (son hacim) 1000 ml

Otoklavda (121°C, 20 dk) steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

Reaktif 1 (Yağ asidi ekstraksiyonu için)

NaOH	45 g
Metanol (HPLC)	150 ml
Distile su	150 ml

Reaktif 2 (Yağ asidi ekstraksiyonu için)

HCl 6N	325 ml
Metanol (HPLC)	275 ml

Reaktif 3 (Yağ asidi ekstraksiyonu için)

Hekzan (HPLC)	200 ml
Metil tert-butil eter	200 ml

Reaktif 4 (Yağ asidi ekstraksiyonu için)

NaOH	10.8 g
Distile su	900 ml

Reaktif 5 (Yağ asidi ekstraksiyonu için)

NaCl	40 g
Distile su	100 ml

EK B

Çizelge B.1. *Actinomadura*, *Saccharomonospora* ve *Nocardia* cinslerine ait yeni tür olma potansiyeli yüksek izolatların fenotipik karakterizasyonu

	DSM101183	DSM101184	JCM13850	DSM101021	DSM101185	DSM45941	JCM3366	DSM101524	JCM7444	JCM7551	DSM102202
Dekstrin	+	+	+	W	-	+	+	-	+	+	+
D-Maltoz	W	W	+	+	+	-	W	+	W	+	+
D-Trehaloza	W	+	W	+	+	+	+	+	W	+	-
D-Sellobiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+
β-Gentiobyoz	+	+	+	W	W	+	+	-	-	+	-
Sükroz	W	W	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Turanoz	W	W	+	W	W	-	W	+	-	+	-
Stakiyoz	W	-	W	W	W	-	W	+	W	W	-
pH 6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
pH 5	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
D-Rafinoz	+	W	W	-	+	-	W	-	+	W	-
α-D-Laktoz	W	-	W	-	+	-	+	+	W	W	-
D-Melibiyoz	+	-	W	-	W	-	W	+	-	-	-
β-Metil-D-Glukozit	+	+	+	W	+	-	W	+	-	+	-
D-Salisin	+	+	+	W	W	+	W	-	W	+	-
N-Asetil-D-Glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
N-Asetil-β-D-Mannozamin	+	W	+	W	+	-	+	+	-	+	+
N-Asetil-D-Galaktozamin	+	+	+	+	-	+	W	+	-	+	-
N-Asetil-Nöraminik asit	-	+	-	-	-	+	W	-	-	-	-
%1 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%4 NaCl	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
%8 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannoz	+	+	+	-	W	+	-	+	-	+	-
D-Fruktoz	W	+	+	W	W	+	+	+	-	+	+
D-Galaktoz	-	W	W	W	W	W	W	+	-	+	-
3-O-Metil-D-Glukoz	W	W	-	+	+	-	W	+	-	W	-
D-Fukoz	+	+	+	+	+	W	W	+	-	+	-
L-Fukoz	W	-	-	+	W	+	W	+	-	+	-
L-Ramnoz	+	+	+	+	W	+	+	+	-	-	-
İnozin	W	W	-	-	-	-	W	-	+	+	-
%1 Sodyum Laktat	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Fusidik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Serin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D-Sorbitol	W	W	W	W	+	-	W	-	W	W	-
D-Mannitol	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
myo-İnozitol	+	+	+	+	+	W	W	-	-	W	-
Gliserol	+	+	+	+	W	+	+	W	W	+	+

Çizelge B.1. (devam). *Actinomadura*, *Saccharomonospora* ve *Nocardia* cinslerine ait yeni tür olma potansiyeli yüksek izolatların fenotipik karakterizasyonu

	DSM101183	DSM101184	JCM13850	DSM101021	DSM101185	DSM45941	JCM3366	DSM101524	JCM7444	JCM7551	DSM102202
D-Glukoz-6-Fosfat	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	-
D-Fruktoz-6-Fosfat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Aspartik Asit	-	-	-	-	+	-	w	w	-	-	-
D-Serin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-
Troleandomisin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Rifamisin SV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+
Minosiklin	+	-	w	-	-	-	-	-	+	-	-
Jelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glisin-Prolin	+	+	+	+	+	+	+	w	-	+	+
L-Alanin	-	-	w	-	w	+	w	-	-	-	-
L-Arjinin	-	-	-	-	-	-	-	w	-	w	-
L-Aspartik Asit	-	-	-	+	w	+	w	+	-	-	-
L-Glutamik Asit	-	+	-	+	+	-	+	+	-	w	+
L-Histidin	-	-	-	-	w	+	w	+	-	-	+
L-Piroglutamik Asit	+	+	+	+	w	+	+	+	-	w	-
L-Serin	-	-	-	-	w	+	w	-	-	+	-
Linkomisin	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Guanidin Hidroklorit	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Niaproof	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Pektin	+	w	+	-	-	-	w	-	+	w	-
D-Galakturonik Asit	w	w	w	-	w	+	-	-	w	w	-
L-Galaktonik Asit- γ -Lakton	w	+	w	-	w	+	-	+	-	w	-
D-Glukonik Asit	+	+	+	+	w	+	+	+	-	+	+
D-Glukuronik Asit	w	-	+	-	w	+	-	w	-	+	+
Glukuronamid	-	-	-	-	-	-	-	w	+	w	-
Musik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuinik Asit	+	w	-	w	w	w	+	-	-	w	-
D-Sakkarik Asit	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Vankomisin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Tetrazolium Violet	w	w	-	-	w	-	-	-	+	-	-
Tetrazolium Blue	-	w	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>p</i> -Hidroksi-Fenilasetik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Metil Piruvat	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Laktik Asit Metil Ester	+	+	+	-	w	-	+	w	-	+	+
L-Laktik Asit	-	w	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Sitrik Asit	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
α -Keto-Glutarik Asit	-	-	w	w	w	-	+	+	-	+	+
D-Malik Asit	-	-	w	w	w	+	+	-	-	+	+
L-Malik Asit	-	-	w	w	-	+	-	-	+	+	+

Çizelge B.1. (devam). *Actinomadura*, *Saccharomonospora* ve *Nocardia* cinslerine ait yeni tür olma potansiyeli yüksek izolatların fenotipik karakterizasyonu

	DSM101183	DSM101184	JCM13850	DSM101021	DSM101185	DSM45941	JCM3366	DSM101524	JCM7444	JCM7551	DSM102202
Bromo-Süksinik Asit	-	+	-	-	-	+	-	-	w	-	-
Nalidiksik Asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lityum Klorit	-	-	-	+	w	+	-	-	+	-	+
Potasyum Tellurit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
γ-Amino-n-Butirik Asit	+	+	+	-	+	-	+	-	w	+	-
α-Hidroksi-Butirik Asit	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
β-Hidroksi-Butirik Asit	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
α-Keto-Butirik Asit	-	-	-	-	-	-	w	w	w	+	+
Asetoasetik Asit	w	-	-	+	+	w	+	+	+	+	+
Propiyonik Asit	w	w	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Asetik Asit	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sodyum Format	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	+
Aztreonam	w	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Butirik Asit	w	-	-	+	w	+	-	+	+	+	+
Sodyum Bromat	-	-	-	+	w	-	-	-	+	-	+
+: pozitif, -: negatif, w: zayıf gelişim, DSM101183: <i>Actinomadura</i> sp. NTSP31, DSM101184: <i>Actinomadura</i> sp. SPNT21, JCM13850: <i>Actinomadura napierensis</i> , DSM101021: <i>Actinomadura</i> sp. 21ATH, DSM101185: <i>Actinomadura</i> sp. D310AT, DSM45941: <i>Actinomaduraarangshiensis</i> , JCM3366: <i>Actinomadura rugatobispora</i> , DSM101524: <i>Saccharomonospora</i> sp. NB11, JCM7444: <i>Saccharomonospora glauca</i> , JCM7551: <i>Saccharomonospora azurea</i> , DSM102202: <i>Nocardia</i> sp. GTS18.											



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilal AY

Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya / 1982

Adres : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Atakum/SAMSUN

E-Posta : hilal.ay@omu.edu.tr

Lisans : Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği / 2005

Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / 2008

Mesleki Deneyim ve Ödüller :

Emniyet Genel Müdürlüğü – Polis Memuru (2006-2010)

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi – Araştırma Görevlisi (2010-2011)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Araştırma Görevlisi (2011- devam ediyor)

2210 – Tübitak Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu

2211 – Tübitak Yurt İçi Doktora Bursu

2214A – Tübitak Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- 1- **Ay H.**, Sarıcaoglu S., Topkara A.R., Gencbay T., Isik K. (2014). Promising actinomycetes from Meke Lake, a saltern in Turkey. XVII. International Symposium on the Biology of Actinomycetes, October 8-12, 2014, Aydın-Turkey.
- 2- **Ay H.**, Sarıcaoğlu S., Topkara AR, Işık K. (2015). Determination of Actinobacteria Diversity of Nemrut Lake by 16S rRNA Gene Sequence Analysis, Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos, 2015, Afyon.
- 3- Işık K., **Ay H.**, Sarıcaoğlu S., Topkara AR. (2015). Phylogenetic Analysis of *Nonomuraea* spp. Isolated from Crater Lakes, Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos, 2015, Afyon.