

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN AKTİNOBAKTERİLERİN İZOLASYONU VE
BİYOAKTİVİTE PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

HİLAL ATEŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN

ARALIK 2019

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Hilal ATEŞ tarafından hazırlanan “Çevresel Örneklerden Aktinobakterilerin İzolasyonu ve Biyoaktivite Profillerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 23/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Hilal AY
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı



.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hilal AY
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Halil İbrahim GÜLER
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım./.../...

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.



23.12.2019

Hilal ATEŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN AKTİNOBAKTERİLERİN İZOLASYONU VE BİYOAKTİVİTE PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Hilal ATEŞ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hilal AY

Aktinobakteriler topraktaki mikrobiyal kütlede önemli bir bölümünü oluşturan ve antibiyotikler başta olmak üzere immüno-supresif ajanlar, antitümör ajanlar ve enzimler gibi çeşitli sekonder metabolitleri üretme potansiyeline sahip, ticari değeri olan bakterilerdir. Artan antibiyotik direnci ve tedavideki yetersizlikler nedeniyle yeni biyoaktif bileşiklerin keşfinin gerekliliği her geçen gün önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında daha önce izolasyon çalışması yapılmamış olan Erzurum-Oltu ve Antalya-Kumluca bölgelerinden farklı fizikokimyasal özelliğe sahip toprak örnekleri alınarak 340 aktinobakteri izole edilmiştir. İzole edilen aktinobakterilerin bir kısmı cins düzeyinde tanımlanmış ve bu suşların *Arthrobacter*, *Leifsonia*, *Nocardia*, *Nocardioidea*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix* ve *Streptomyces* cinslerine ait oldukları belirlenmiştir. İzole edilen aktinobakteriler hava miseli spor rengine, substrat misel rengine ve çözünür pigment rengine göre 41 renk grubuna ayrılarak her gruptan en az bir izolat olacak şekilde 60 aktinobakteri suşu seçilerek antimikrobiyal aktivite ve sitotoksikite testleri yapılmıştır. Testlerde kullanılmak üzere metanol ham özütleri elde edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi disk difüzyon yöntemiyle yapılmış ve 30 aktinobakteri özütünün antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. En iyi antimikrobiyal aktivite gösteren MK37H, BK2H ve AS18H özütleri için mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerleri belirlenmiştir. 60 özütün kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlenmiş ve 16 özütün AR42J pankreas kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca *Streptomyces* sp. BG9H suşunun tüm genom analizi yapılarak CRISPR/Cas dizilerinin ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı *in silico* olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, 16S rRNA gen dizi benzerlik oranına göre yeni tür olarak değerlendirilen izolatların ileride yapılması planlanan polifazik taksonomik analizler sonucunda literatüre kazandırılması ve antimikrobiyal ve/veya sitotoksik aktivite gösteren suşların biyoaktif metabolitlerinin tanımlanması hedeflenmektedir.

Aralık, 2019

Anahtar kelimeler: Aktinobakteri, Antimikrobiyal aktivite, Genom, Sitotoksik aktivite

ABSTRACT

Master's Thesis

ISOLATION AND BIOACTIVITY PROFILING OF ACTINOBACTERIA FROM ENVIRONMENTAL SAMPLES

Hilal ATEŞ

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Science
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Hilal AY

Actinobacteria are commercially important bacteria that accounts for a significant portion of the microbial mass in the soil and have the potential to produce a wide variety of secondary metabolites such as antibiotics, immunosuppressive agents, antitumor agents and enzymes. The need for the discovery of new bioactive compounds is becoming increasingly important due to increased antibiotic resistance and treatment inadequacies.

In this thesis, 340 actinobacteria were isolated from soil samples having different physicochemical properties from Erzurum-Oltu and Antalya-Kumluca regions, which had not been previously studied. Some of the isolated actinobacteria were identified at the genus level and these strains were found to belong to the genera *Arthrobacter*, *Leifsonia*, *Nocardia*, *Nocardioïdes*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix* and *Streptomyces*. Isolated actinobacteria were divided into 41 colour groups according to air mycelium spore colour, substrate mycelium colour and soluble pigment colour, and at least one isolate was selected from each group and antimicrobial activity and cytotoxicity tests were performed for 60 strains. Methanol crude extracts were obtained for use in the tests. Antimicrobial activity test was performed by disk diffusion method and 30 actinobacterial extracts were found to have antimicrobial activity. MICs were determined by microdilution technique for MK37H, BK2H and AS18H extracts which showed the best antimicrobial activity. Cytotoxic effect of 60 extracts on cancer cells was determined by MTT analysis and 16 extracts had cytotoxic effect on AR42J pancreatic cancer cells. In addition, whole genome analysis of BG9H strain was performed and CRISPR / Cas sequences and antibiotic resistance genes were identified *in silico*.

In conclusion, the strains which are considered as novel species according to the 16S rRNA gene sequence similarity ratios are planned to be published after polyphasic taxonomic analyses and also the bioactive metabolites from the strains with antimicrobial and/or cytotoxic activities will be identified in the foreseeable future.

Aralık, 2019

Key words: *Actinobacteria*, Antimicrobial activity, Genome, Cytotoxic activity

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hilal AY'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan sayın Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN'e, sayın Arş. Gör Hayrettin SAYGIN'a ve Arş. Gör Cengiz Nigiz'e teşekkürlerimi sunarım. Karadeniz Teknik Üniversitesinde hücre kültürü çalışmalarımı yapmam konusunda imkan sunan sayın Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a ve desteklerinden dolayı Arş. Gör. Merve CORA'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok kıymetli annem Perihan ATEŞ'e ve sevgili babam Turan ATEŞ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte her an bana destek olan, sabrını ve hoşgörüsünü biran olsun eksik etmeyen kıymetli nişanlım Okan AK'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, PYO.FEN.1904.18.029 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Aralık 2019, Samsun

Hilal ATEŞ

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Aktinobakterilerin Taksonomisi	3
2.2. Aktinobakterilerin Morfolojik Özellikleri.....	3
2.3. Aktinobakterilerin Biyoaktif Madde Üretim Potansiyelleri.....	5
2.4. İzole Edilen Aktinobakteri Cinslerinin Özellikleri	10
2.4.1. <i>Arthrobacter</i> cinsi.....	10
2.4.2. <i>Leifsonia</i> cinsi.....	12
2.4.3. <i>Nocardia</i> cinsi	13
2.4.4. <i>Nocardioides</i> cinsi	15
2.4.5. <i>Nonomuraea</i> cinsi.....	16
2.4.6. <i>Pseudonocardia</i> cinsi	18
2.4.7. <i>Saccharothrix</i> cinsi.....	19
2.4.8. <i>Streptomyces</i> cinsi	20
3. MATARYEL ve METOD	23
3.1. İzolasyonda Kullanılan Toprak Örnekleri	23
3.2. Dilüsyon Plak Tekniği ile Aktinobakterilerin İzolasyonu.....	23
3.3. İzolatların Saflaştırılması ve Stoklanması	25
3.4. İzolatların Renk Gruplarının Belirlenmesi	25
3.5. Moleküler Taksonomik Yöntemler	26
3.5.1. Genomik DNA izolasyonu	26
3.5.2. DNA izolasyon kontrolü	27
3.5.3. 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonu ve analizi	28
3.5.4. 16S rRNA gen dizi verilerinin analizi ve filogenetik dendogramların oluşturulması	29
3.5.5. Tüm genom analizi ve biyosentetik gen kümelerinin belirlenmesi.....	29
3.6. Antimikrobiyal Aktivite Testi	30

3.6.1. Ekstraktların hazırlanması	30
3.6.2. Test patojenlerinin hazırlanması	30
3.6.3. Disk Difüzyon Metodu	31
3.7. Ekstraktların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	31
3.8. Sitotoksik Aktivite Testi.....	32
3.8.1. AR42J kanser hücrelerinin stoktan alınarak çoğaltılması	32
3.8.2. AR42J kanser hücrelerinin pasajlanması	32
3.8.3. Mikroplakalara hücre ekimi yapılması.....	33
3.8.4. MTT analizi.....	33
4. BULGULAR	35
4.1. İzole Edilen Aktinobakteri Suşları	35
4.2. DNA İzolasyonu ve Jel Elektroforezi ile DNA'ların Görüntülenmesi	41
4.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu ve 16S rRNA Gen Dizi Analizi.....	42
4.4. Filogenetik Karakterizasyon.....	42
4.4.1. <i>Arthrobacter</i> cinsi.....	42
4.4.2. <i>Leifsonia</i> cinsi.....	45
4.4.3. <i>Nocardia</i> cinsi	47
4.4.4. <i>Nocardioides</i> cinsi.....	49
4.4.5. <i>Nonomuraea</i> cinsi.....	50
4.4.6. <i>Pseudonocardia</i> cinsi	52
4.4.7. <i>Saccharothrix</i> cinsi.....	55
4.4.8. <i>Streptomyces</i> cinsi	57
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Testi	70
4.6. Özütlere Ait MİK Değerlerinin Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi	83
4.7. Sitotoksik Aktivite Testi.....	84
4.8 Tüm Genom Analizi.....	92
5. TARTIŞMA	99
5.1. Sonuç ve Öneriler.....	103
KAYNAKÇA	106
EKLER.....	120
EK 1: Seçici İzolasyon Besiyerleri ve Kültür Ortamı	120
EK 2: Kullanılan Çözeltiler	124
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGE VE KISALTMALAR

SİMGELER

%	Yüzde
C	Santigrat
g	Gram
L	Litre
M	Molarite
Mb	Megabaz
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Mm	Milimolar
ng	Nanogram
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µg	Mikrogram

KISALTMALAR

Bç	Baz çifti (base pair)
Cas	CRISPR-İlişkili
CRISPR	Clustered Regularly Inter Spaced Palindromic Repeats
ddH ₂ O	Çift damıtılmış su
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSMZ	Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu
EDTA	Etilendiamintetrasetik asit
EtBr	Etidyumbromür
FBS	Fetal bovine serum
GC	Guanin/Sitozin Bazları
GGDC	Genome-to-Genome Distance Calculator
MH	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MK	Menakinon

MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
NK	Negatif kontrol
Nt	Nükleotit
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK	Pozitif kontrol
PKS	Poliketid sentaz
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDA	Sabouraud dekstroza agar
NRPS	Ribozomal olmayan peptid sentetaz
v/v	Hacim/hacim (volume/volume)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir aktinobakteri izolatının oluşturduğu miselyum yapıları	4
Şekil 2.2. Aktinobakterilerin tarafından üretilen çeşitli bileşiklerin kullanım alanları	6
Şekil 2.3. Antibiyotik keşfinin yıllara göre dağılımı	22
Şekil 3.1. Seçici izolasyon besiyerlerinde gelişen kolonilerin seçilimi	25
Şekil 4.1. İzolatlara ait petri görüntüleri	41
Şekil 4.2. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünlerinin % 0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsü	42
Şekil 4.3. <i>Arthrobacter</i> cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini dendrogram	44
Şekil 4.4. <i>Leifsonia</i> cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram	46
Şekil 4.5. <i>Nocardia</i> cinsine ait izolatların 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram	48
Şekil 4.6. <i>Nocardioides</i> cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram	50
Şekil 4.7. <i>Nonomuraea</i> cinsine ait izolatların 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram	52
Şekil 4.8. <i>Pseudonocardia</i> cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram	54
Şekil 4.9. <i>Saccharothrix</i> cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram	56
Şekil 4.10. <i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram	61
Şekil 4.11. 1. Grup <i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram	62
Şekil 4.12. 2. Grupta bulunan AK12H suşunun tip türleriyle filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram	65
Şekil 4.13. 3. Grup <i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram	66
Şekil 4.14. 4. Grup <i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram	68
Şekil 4.15. Antimikrobiyal aktivite testi	70
Şekil 4.16. <i>E. coli</i> ATCC 25922 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları	78
Şekil 4.17. <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları	79

Şekil 4.18. <i>S. aureus</i> ATCC 25923 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	79
Şekil 4.19. <i>S. enterica</i> patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	80
Şekil 4.20. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	80
Şekil 4.21. <i>L. monocytogenes</i> patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	81
Şekil 4.22. <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	81
Şekil 4.23. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	82
Şekil 4.24. <i>C. albicans</i> ATCC 10231 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	82
Şekil 4.25. <i>A. niger</i> ATCC 16404 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	83
Şekil 4.26. <i>Streptomyces</i> sp. MK37H özütünün MTT testi sonucu.....	85
Şekil 4.27. <i>Streptomyces</i> sp. MK12H özütünün MTT testi sonucu.....	85
Şekil 4.28. <i>Streptomyces</i> sp. XS4H özütünün MTT testi sonucu.....	86
Şekil 4.29. <i>Streptomyces</i> sp. RS11H özütünün MTT testi sonucu.....	86
Şekil 4.30. <i>Pseudonocardia</i> sp. KG21H özütünün MTT testi sonucu.....	87
Şekil 4.31. <i>Streptomyces</i> sp. XS8H özütünün MTT testi sonucu.....	87
Şekil 4.32. <i>Nonomuraea</i> sp. FG8H özütünün MTT testi sonucu.....	88
Şekil 4.33. TG1H özütünün MTT testi sonucu.....	88
Şekil 4.34. <i>Streptomyces</i> AS14H özütünün MTT testi sonucu.....	89
Şekil 4.35. <i>Streptomyces</i> sp. FG7H özütünün MTT testi sonucu.....	89
Şekil 4.36. <i>Streptomyces</i> sp. CS23H özütünün MTT testi sonucu.....	90
Şekil 4.37. BK2H özütünün MTT testi sonucu.....	90
Şekil 4.38. <i>Streptomyces</i> sp. AS18H özütünün MTT testi sonucu.....	91
Şekil 4.39. TS9H özütünün MTT testi sonucu.....	91
Şekil 4.40. <i>Streptomyces</i> sp. RG6-2H özütünün MTT testi sonucu.....	92
Şekil 4.41. CG2H özütünün MTT testi sonucu.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Aktinobakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler ve kullanım alanları	7
Çizelge 3.1.	İzolasyonda kullanılan örneklerin lokaliteleri.....	23
Çizelge 3.2.	Toprak örneklerinin pH ve elektriksel iletkenlik değerleri.....	23
Çizelge 3.3.	Seçici izolasyonunda kullanılan besiyerleri	24
Çizelge 3.4.	16S rRNA geninin PCR amplifikasyonunda ve dizilemede kullanılan primerler	28
Çizelge 3.5.	16S rRNA gen bölgesi PCR reaksiyonu şartları.....	28
Çizelge 3.6.	Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan patojen mikroorganizmalar.....	31
Çizelge 4.1.	Erzurum-Oltu bölgesinden alınan 1.toprak örneğinden izole edilen suşlar.....	35
Çizelge 4.2.	Erzurum-Oltu bölgesinden alınan 2. toprak örneğinden izole edilen suşlar.....	36
Çizelge 4.3.	Antalya-Kumluca bölgesinden alınan 3. toprak örneğinden izole edilen suşlar.....	37
Çizelge 4.4.	İzolatların renk gruplandırması.....	38
Çizelge 4.5.	<i>Arthrobacter</i> cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları.....	43
Çizelge 4.6.	<i>Leifsonia</i> cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları.....	45
Çizelge 4.7.	<i>Nocardia</i> cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları.....	47
Çizelge 4.8.	<i>Nocardioides</i> cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları.....	49
Çizelge 4.9.	<i>Nonomuraea</i> cinsine ait izolatların GenBank numaraları, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları.....	51
Çizelge 4.10.	<i>Pseudonocardia</i> cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	53
Çizelge 4.11.	<i>Saccharothrix</i> cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	55

Çizelge 4.12.	<i>Streptomyces</i> cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları	57
Çizelge 4.13.	Ekstraktların ve kontrol gruplarının patojenlere karşı oluşturdukları zon çapları (mm)	71
Çizelge 4.14.	<i>Streptomyces</i> spp. MK37H, AS18H özütlerinin ve BK2H özütünün MİK değerleri	83
Çizelge 4.15.	<i>Streptomyces</i> sp. BG9H genomunda CRISPR/Cas dizileri	94
Çizelge 4.16.	<i>Streptomyces</i> sp. BG9H genomunda CRISPR/Cas dizileri	95
Çizelge 4.17.	<i>Streptomyces</i> sp. BG9H genomunda CRISPR/Cas dizileri	96
Çizelge 4.18.	<i>Streptomyces</i> sp. BG9H genomunda bulunan biyosentetik gen bölgeleri.....	97

1. GİRİŞ

Aktinobakteriler Gram-pozitif, G+C içeriği yüksek DNA'ya sahip olan bakterilerdir (Sivarajan vd, 2019; Embley ve Stackebrandt, 1994). Toprak başta olmak üzere çeşitli habitatlarda bulunurlar ve doğada yaygın bir dağılım gösterirler (Oskay vd, 2004). Bu bakteriler antibiyotik (Berdy, 2005), herbisit, pestisit ve kemoterapötik ajanlar (Cragg ve Newman, 2005) gibi farmakolojik ve endüstriyel açıdan değerli olan pek çok molekülün doğal üreticileridir (Rai vd, 2018). Yapılan çalışmalar sonucu antibiyotiklerin de dâhil olduğu mevcut doğal biyoaktif bileşiklerin üçte ikisinin aktinobakteriler tarafından üretildiği belirlenmiştir. Özellikle günümüzde kullanılan antibiyotiklerin %80'i *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi aktinobakteriler tarafından üretilmektedir (Kumar vd, 2010).

Antibiyotikler, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve klinik açıdan önemli olan moleküllerdir. Antibiyotiklerin keşfedilmesi ile pek çok enfeksiyon hastalığının mortalite ve morbidite oranları önemli ölçüde azalmıştır. Ancak günümüzde küresel bir sorun haline alan antibiyotik direnci ciddi bir tehdittir (Alanis, 2005). Aşırı ve yanlış antibiyotik kullanımına bağlı olarak patojen mikroorganizmaların birçoğu klinikte kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmış durumdadır. Bu durum, hastalıkların tedavi edilmesini zora sokmaktadır. Ayrıca ilaca dirençli patojen suşların ortaya çıkması yeni ilaç ve antibiyotik keşfine oranla daha hızlıdır. Bu sebeplerden dolayı araştırmacılar sorunun çözümü için yeni antibiyotiklerin hızlı bir şekilde keşfedilmesi gerektiği konusunda ortak görüşe sahiptirler (Kumar vd, 2010; Oskay vd, 2004; Fischbach ve Walsh, 2009). Bu görüş doğrultusunda, günümüzde antibiyotikler başta olmak üzere yeni biyoaktif bileşiklerin keşfedilmesine yönelik çalışmalar giderek ilgi odağı haline gelmektedir (Okami ve Hotta, 1988).

Son yıllarda yapılan antibiyotik araştırmaları, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ve özellikle aktinobakteriler içerisindeki yeni bakteriyel taksonların karakterizasyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır. Genel olarak yeni sekonder metabolitlerin tespit edilme ihtimalinin, çalışılan mikroorganizmanın bilinen türlerle olan filogenetik uzaklığıyla pozitif ve doğrudan bir ilişkiye sahip olduğu sonucu çıkarılabilir (Müller ve Wink, 2014).

Bu anlamda daha önce çalışılmamış olan habitatlardan yeni aktinobakterilerin keşfi yeni biyoaktif bileşiklerin de elde edilmesi açısından önemlidir (Magarvey vd, 2004; Goodfellow ve Fiedler, 2010).

Aktinobakteriler, hem karasal hem akuatik habitatlarda bulunurlar (Macagnan vd, 2006; Barka vd, 2016). Her ne kadar çeşitli yaşam alanlarına sahip olsalar da toprak yoğun olarak buldukları birinci yaşam alanıdır (Goodfellow ve Williams, 1983). Bu nedenle aktinobakterilerin izolasyonu için toprak önemli bir kaynaktır (George vd, 2010). Daha önce izolasyon programlarına dâhil edilmemiş ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olan toprak örneklerinden izole edilecek olan yeni aktinobakteriler, keşfedilmemiş biyoaktif metabolitlerin de elde edilmesi açısından umut vericidir (Ningthoujam vd, 2009; Meklat vd, 2011).

Bu tez çalışmasında daha önce çalışılmamış bölgelerden toprak örnekleri alınarak yeni aktinobakterilerin izole edilmesi ve elde edilen aktinobakterilerin antimikrobiyal, antikanser özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

İzolasyon amacıyla kullanılan toprak örneklerinden ikisi Erzurum-Oltu'da Gökkuşluğu Tepeleri olarak bilinen ve içerdiği farklı mineraller nedeniyle kırmızı ve yeşil renklerde görülen iki farklı bölgeden alınmıştır. İzolasyon kaynağı olarak kullanılan üçüncü toprak örneği ise içerdiği yüksek demir oksit sebebiyle kırmızı renkli olup Antalya-Kumluca'dan alınmıştır. İzole edilen mikroorganizmalar koloni morfolojisi, spor rengi ve yapısı, miselyum rengi, çözünür pigment üretip üretmeme gibi özelliklerine göre gruplandırılmıştır. Her gruptan en az bir tane olmak üzere 60 izolat seçilerek antimikrobiyal ve sitotoksik aktivite bakımından analiz edilmiştir. Ayrıca, biyoaktivite testlerinde pozitif sonuç veren izolatlardan birinin tüm genomu dizilenecek biyosentetik gen kümeleri, CRISPR/Cas ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı *in silico* olarak analiz edilmiştir. Biyoaktivite testlerinde pozitif sonuç veren 43 izolat, 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanarak izolatların filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Aktinobakterilerin Taksonomisi

Aktinobakteriler morfolojik, fizyolojik, metabolik yetenekler bakımından son derece farklı mikroorganizmaları bulunduran ve bakteri üst alemi içindeki 24 alem arasında tanımlanmış olan en büyük taksonomik birimdir (Ludwig vd, 2012; Garrity vd, 2015). Bu mikroorganizmaların genomlarına bakıldığında çeşitli organizmalarla ilişkili olan nükleotit dizilerinin bulunduğu görülmektedir. Aktinobakteri genomlarındaki bu heterojenite, aslında sahip oldukları çeşitliliği yansıtmaktadır (Ventura vd, 2007).

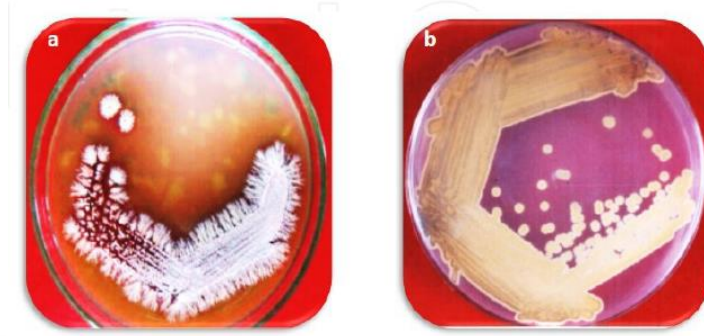
16S rRNA gen dizi analizi ve DNA:DNA hibridizasyonu mikrobiyal taksonomide kullanılan önemli tekniklerdendir (Konstantinidis ve Tiedje, 2005). *Actinobacteria* şubesinin taksonomik yapısı 16S rRNA gen bölgesine göre son zamanlarda güncellenmiştir. 16S rRNA gen ağaçlarındaki dallanma pozisyonlarına göre *Actinobacteria* şubesindeki tek sınıf olan *Actinobacteria* sınıfı *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* ve *Actinobacteridae* olmak üzere 5 alt sınıfa, 6 takıma (*Acidimicrobiales*, *Rubrobacterales*, *Coriobacteriales*, *Sphaerobacterales*, *Actinomycetales* ve *Bifidobacteriales*) ve 14 alt takıma ayrılmaktadır (Garrity vd, 2015; Ludwig vd, 2012).

2.2. Aktinobakterilerin Morfolojik Özellikleri

Taksonomik açıdan son derece kalabalık ve yüksek biyoçeşitliliğe sahip olan bu bakterilerin morfolojik özelliklerine bakıldığında funguslara ait özellikleri de taşıdıkları görülür. Birçok aktinobakteri, filamentli funguslar gibi hava ve substrat miseli olmak üzere iki tip misel üretme yeteneğine sahip olup karmaşık bir morfolojik farklılaşma göstermektedir (Barka vd, 2016).

Substrat miselyumu çimlenme sürecindeki spordan gelişir ve hem katı hem sıvı kültür ortamlarında oluşabilmektedir. Katı kültür ortamlarında oluşan substrat misellerinin büyük bir kısmı spor üreten hava misellerini oluşturmak üzere farklılaşmaktadır. Substrat miselyumu genellikle monopodial dallanma gösterir. Ancak *Thermoactinomyces* gibi çatallı dallanma gösteren miselyum oluşturan cinsler de bulunmaktadır.

Hava miselleri ise çoğunlukla substrat misellerinden kalındır ve pamuksu, kadife veya toz halinde olup olmaması gibi farklı yapısal özellikleri *Streptomyces* cinsinin sınıflandırılmasında çok önemli bir kriterdir (Anandan vd, 2016). Ayrıca hava miselleri besin yetersizliği gibi stres koşullarında spor zincirleri oluşturmaktadır (Flärdh ve Buttner, 2009).



Şekil 2.1. Bir aktinobakteri izolatının oluşturduğu miselyum yapıları: a) hava miselyumu b) substrat miselyumu (Anandan vd, 2016)

Misel oluşturan aktinobakterilerin çoğu sporla çoğalmaktadır. Oluşan sporların yüzeyi siğilli, dikensi veya buruşuk yapıda olabilmektedir. *Micromonospora*, *Micropolyspora* ve *Thermoactinomyces* gibi bazı cinslerde sporlar substrat miselyumundan gelişir. Ancak *Streptomyces* cinsinde ise hava miselyumundan gelişmektedir. Ayrıca, sporlar *Salinispora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora*, *Promicromonospora* ve *Micromonospora* gibi cinslerde tek hücre olarak bulunurken bazen de *Frankia* cinsinde olduğu gibi özel keseler içinde bulunmakta veya farklı uzunlukta spor zincirleri oluşturmaktadır. Özellikle *Streptomyces*, *Nocardioidea*, *Kitasatospora* gibi cinsler çok uzun spor zincirleri üretmektedir (Dietz ve Mathews, 1971).

Aktinobakterilerin genel morfolojik görünümü kompakt, derimsi ve katı yüzeyde konik bir görüntü halindedir ve çoğunlukla hava miselyumu ile kaplıdır (Anandan vd, 2016). Ayrıca aktinobakteriler, küre (*Micrococcus*), çubuk-küre (*Arthrobacter*), parçalı hif (*Nocardia*) ve farklılaşmış dallı misel yapısı (*Streptomyces*, *Frankia*) gibi farklı morfolojik yapılar da gösterebilir. Bu morfolojik farklılıklar mikroorganizmaların karakterizasyonu için önemlidir (Gao ve Gupta, 2005).

İstisnalar olmakla birlikte aktinobakteriler aerobik canlılardır. Ayrıca, pek çoğu kemoorganotrof olup polisakkaritlerin de içinde bulunduğu çeşitli besin maddelerini kullanabilmektedir (Lechevalier ve Lechevalier, 1965).

Aktinobakteriler, çeşitli habitatlarda yaşayabilme yeteneğine sahip olmakla birlikte özellikle toprakta (*Micromonospora* ve *Streptomyces*) yoğun olarak bulunurlar. Toprak dışında tatlı ve tuzlu sularında, havada, bitkilerde (*Frankia* spp.), gastrointestinal ortamlarda da (*Bifidobacterium* spp.) bulunabilirler ve buldukları ortamdaki yoğunlukları ortamın tipine, yapısına ve iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Örnek olarak toprak aktinobakterileri genellikle nötral pH'da (pH 6-8) ve 25-30°C sıcaklıkta iyi gelişim gösterirler. Ancak bu koşulların dışında da gelişebilen türler vardır. Bazı türler termofilik olup 50-60°C'de iyi gelişirken bazı *Streptomyces* türleri de asidik pH'larda daha iyi gelişmektedir (Kim vd, 2003).

Ayrıca *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* ve *Tropheryma* cinslerinin insanlarda enfeksiyona neden olan türleri de bulunmaktadır. Ancak aktinobakterilerin büyük çoğunluğu sağlıktan tarıma kadar pek çok alanda kullanılan ve ticari değeri olan bileşikleri üreten mükemmel mikroorganizmalardır (Barka vd, 2016).

2.3. Aktinobakterilerin Biyoaktif Madde Üretim Potansiyelleri

Farklı habitatlarda gelişim gösterebilen aktinobakteriler aynı zamanda tıp, endüstri ve tarım gibi alanlarda kullanılan çok sayıda değerli bileşiğin eşsiz üreticileridir. Özellikle de sağlık alanında kullanılan antibiyotiklerin, kemoterapötik ilaçların ve immün sistem üzerine etki eden bileşiklerin üretimi açısından önemli bir rol üstlenirler.



Şekil 2.2. Aktinobakteriler tarafından üretilen çeşitli bileşiklerin kullanım alanları

Son yıllarda keşfedilen 12.000 antibiyotığın %70'i aktinobakteriler tarafından üretilmektedir (Anandan vd, 2016). Aminoglikozitler (örneğin; streptomisin ve kanamisin), ansamisinler (örneğin; rifampin, geldanamisin), antrasiklinler (genel olarak anti-tümör bileşikler, örneğin, doksorubisin), beta-laktamlar (sefalosporinler), makrolidler (örneğin, eritromisin) ve tetrasiklinler aktinobakteriler tarafından üretilen temel antibiyotik çeşitlerindedir. Aktinobakteriyel kaynaklı olan bu antibiyotiklerin bazıları ham halde iken bazıları kristalize edilmiştir ve lizozim, aktinomisin, mikromonosporin, streptotrisin, streptomisin ve miketin gibi çok sayıda antibiyotığın yapısı çeşitli kromatografik tekniklerin de kullanılmasıyla aydınlatılmıştır (Laskaris vd, 2010).

Çizelge 2.1. Aktinobakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler ve kullanım alanları

Antibiyotik	Üretici organizma	Aktivitesi	Kaynak
Antrasiklinler	<i>Micromonospora sp.</i>	Antitümör	(Grein vd, 1980)
Arenimycin	<i>S. arenicola</i>	Antibakteriyel; antikanser	(Asolkar vd, 2010)
Benzanthrins A ve B	<i>Nocardia lurida</i>	Anti-bakteriyel	(Therault vd, 1986)
Bisanthraquinone	<i>Streptomyces sp.</i>	Anti-bakteriyel	(Kanzaki vd, 1993)
Carboxamycin	<i>Streptomyces sp.</i>	Anti-bakteriyel; antikanser	(Hohmann vd, 2009)
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Anti-bakteriyel, protein sentez inhibitörü	(Takahashi vd, 1986)
Daryamides	<i>Streptomyces sp.</i>	Antifungal; antikanser	(Asolkar vd, 2006)
Erythromycin	<i>Saccharopolyspora erythrae</i>	Anti-bakteriyel	(Powell vd, 1952)
FK520 Ascomycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>Ascomyceticus</i>	Antifungal, immünosupresif	(Wu vd, 2000)
Fosfomysin	<i>Streptomyces fradiae</i>	Anti-bakteriyel	(Kahan vd, 1974)
Hygromycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Antimicrobial, immünosupresif	(Gonzalez vd, 1978)
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> 12-6	Anti-bakteriyel	(Umezawa, 1957)
Kanglemycin C (K-C)	<i>Nocardia mediterranei</i> var. <i>kanglensis</i> 1747-64	İmmünosupresif	(Zhou vd, 2006)
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Anti-bakteriyel	(Manam vd, 2005)
Leptomycin	<i>Streptomyces lividans</i>	Anti-fungal, Anti tümöral	(Hu vd, 2005)
Medecamycin	<i>Streptomyces mycarofaciens</i>	Anti-bakteriyel	(Xia vd, 1994; Schlegel vd, 2001)
Mitomycin C	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Antikanser	(Verweij ve Pinedo, 1990)
Oxytetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	Anti-bakteriyel	(Petković vd, 2006)
Pandavir (nigericin)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	İyon taşınımı ve ATPaz aktivitesi	(Steinrauf vd, 1968)
Piericidins	<i>Streptomyces sp.</i>	Antitumoral	(Tamura vd, 1963)
Rapamycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Anti-fungal	(Lomovskaya vd, 1997)
Saliniketal	<i>S. arenicola</i>	Anti-kanser	(Fenical ve Jensen, 2006)

Çizelge 2.1. Aktinobakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler ve kullanım alanları (devam)

Antibiyotik	Üretici organizma	Aktivitesi	Kaynak
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anti-kanser, antimalaryal	(Feling vd, 2003)
Spiramycin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Anti-bakteriyel	(Ikeda vd, 1982)
Valinomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Anti-bakteriyel	(Perkins vd, 1990)
Verucopeptin	<i>Actinomadura verrucosospora</i>	Anti-tümöral	(Nishiyama vd, 1993)
Streptomycin	<i>Streptomyces griseus</i>	Anti-bakteriyel	(Nomi, 1963)
Zorbamycin	<i>Streptomyces flavovirdis</i>	Anti-tümöral	(Wang vd, 2007)

Ayrıca antibiyotik üretme potansiyeli bu denli yüksek olan aktinobakterilerin bazı üyeleri birden fazla antibiyotik (örneğin, *S. griseus*) üretebilirken bazen de aynı antibiyotik (örneğin; aktinomisin, streptothrisin) farklı aktinobakteri türleri tarafından da üretilmektedir (Anandan vd, 2016).

Aktinobakteriler aynı zamanda endüstriyel ölçekte üretilen bir dizi enzimin doğal üreticileri olmaları açısından da umut vericidir. *Actinobacteria* sınıfının bazı üyeleri nişastayı parçalayabilme özelliği nedeniyle gıda endüstrisi, fermantasyon, kağıt endüstrisi ve tekstil gibi alanlarda büyük öneme sahip olan amilaz enzimini üretmektedir (Pandey vd, 2000).

Proteaz, fitaz, lipaz, selülaz, katalaz, kitinaz ve üreaz gibi enzimler de aktinobakteriler tarafından üretilen ve endüstriyel kullanımı olan enzimlerdir (Schmid ve Verger 1998; Latha ve Dhanasekaran, 2013).

Çizelge 2.2. Aktinobakterilerin ürettikleri enzimler ve kullanım alanları

Enzim	Aktinobakteri	Kullanım alanı
Proteaz	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Deterjan
	<i>Nocardiopsis</i> sp.	Peynir yapımı
	<i>Streptomyces pactum</i>	Kan pıhtısının tedavisi
	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Deri temizleme
	<i>Streptomyces</i> sp.	
Sellülaz	<i>Streptomyces</i> sp.	Deterjan
	<i>Thermobifida halotolerans</i>	Pamuk işlenmesi
	<i>Streptomyces</i> sp.	Kağıt endüstrisi
	<i>Thermomonospora</i> sp.	
	<i>Streptomyces ruber</i>	
Lipaz		Deterjan
	<i>Streptomyces griseus</i>	Peynir endüstrisi Tekstilde temizleme
Keratinase	<i>Nocardiopsis</i> sp. SD5	Tüy degradasyonu
Pektinaz	<i>Streptomyces lydicus</i>	İçecek endüstrisi
		Tekstil

Günümüzde kimyasal bileşiklerin ve petrol kullanımının artmasına bağlı olarak toprak kirliliği önemli bir çevresel sorun haline almıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda bazı aktinobakteri türlerinin ürettikleri biyoaktif bileşikler vasıtasıyla çeşitli alifatik ve aromatik bileşikleri, herbisitleri, pestisitleri ve hidrokarbon bileşiklerini parçalayabildikleri ve böylece hem karbon döngüsünde önemli rol oynadıkları hem de tarımsal ya da kentsel atıkların mikrobiyal dönüşümünü sağlayarak bu atık maddeleri değerli birer ticari ürüne dönüştürebildikleri görülmüştür (Anandan vd, 2016; Johnsen vd, 2002; Sanscartier vd, 2009).

Ayrıca bazı aktinobakteri türleri besin, kozmetik, tekstil, vernik, ilaç, madencilik ve petrol geri kazanımı gibi çeşitli alanlarda kullanılan ve kimyasal sürfaktanlara göre daha kolay bozunabilen biyosürfaktanları da üretebilmektedir (Henkel vd, 2012; Anandan vd, 2016).

Son yıllarda nanopartiküllerin sentezi için biyolojik yaklaşımlar, sağladıkları avantajlardan dolayı araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Biyolojik olarak nanopartiküllerin üretilmesi açısından aktinobakteriler potansiyel mikroorganizmalardır.

Özellikle de *Streptomyces* ve *Arthrobacter* cinsleri altın ve gümüş nanopartiküllerini üretebilmeleri açısından umut vericidirler. Değerli madenler dışında antibakteriyel, antifungal, antikanser, antimalaryal, antiparazitik ve antioksidan özelliklere sahip olan nanopartiküller de aktinobakteri cinsleri tarafından üretilmektedir (Anandan vd, 2016).

Gopinath vd (2015) tarafından yapılan çalışmada bir *Streptomyces* cinsinin gümüş nanopartikülleri üretebildiği görülmüştür (Gopinath vd, 2015). Ranjani vd (2016) tarafından yapılan çalışmada ise *Streptomyces* sp., *Nocardiosis* sp., *Kitasatospora* sp., *Actinopolyspora* sp., *Thermoactinomyces* sp., *Actinomadura* sp., *Saccharopolyspora* sp.ve *Thermomonospora* sp. cinslerine ait izolatların gümüş nanopartikülünü sentezlediği görülmüştür (Ranjani vd, 2016).

Bitki biyoteknolojisi açısından da önemli olan aktinobakteriler ürettikleri biyoaktif bileşiklerle bitki patojenlerine ve böceklerle karşı antagonistik etki göstererek tarım ürünlerinin biyolojik kontrolünde de rol oynamaktadır (Anandan vd, 2016).

Sonuç olarak, aktinobakteriler sağlık, tarım, endüstri, biyoteknoloji ve farmakoloji gibi pek çok alanda kullanılan değerli metabolitleri üretme yeteneğine sahip mikroorganizmalardır. Sahip oldukları üretim potansiyelinden dolayı bu bakteri grubunun yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi amacıyla çalışılması, mevcut antibiyotiklere direnç gösteren patojenlerle mücadele için büyük önem taşımaktadır.

2.4. İzole Edilen Aktinobakteri Cinslerinin Özellikleri

2.4.1. *Arthrobacter* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Micrococcales*

Aile: *Micrococcaceae*

Cins: *Arthrobacter*

Arthrobacter cinsi Conn ve Dimmick tarafından 1947 yılında önerilmiştir (Conn ve Dimmick, 1947). *Micrococcaceae* ailesinin bir üyesi olup bu aile içindeki diğer cinslere oranla daha fazla sayıda tür içerir. Genomlarındaki G+C içeriği % 55-72'dir.

Bu cinsin üyeleri genellikle zorunlu aerob mikroorganizmalardır. Pek çok tür çoğunlukla toprak ve sedimentlerden izole edilmiş heterotrofik organizmalardır. Gelişimleri için spesifik gereksinimleri olmayıp çoğu mezofilik canlılardır. *Arthrobacter* cinsinin üyeleri 30°C altında optimum büyüme gösterirler ancak Antarktika ve kuzey kutbundan izole edilen psikotolerant veya psikrofil olan türler de mevcuttur. Bu türlerden bazıları soğuk adaptif enzim üreticisi olarak bilinirler (Busse ve Wieser, 2014).

Bu cinsin pek çok üyesi büyüme evresinde çubuk-kok morfolojisine sahipken durgun faza geçildiğinde 0.6-1 mm çapında kokoid hali alırlar (Busse ve Wieser, 2014).

Arthrobacter türleri peptidoglikan ve kinon yapısı açısından iki gruba ayrılabilir. Bazı türler MK-8(H₂) ya da MK-9(H₂) kinonlarını ve tip A3a peptidoglikana sahipken bazı türler ise doymamış MK-8, MK-9 veya MK-10 kinonlarını ve tip A4a peptidoglikan içerirler (Schleifer ve Kandler, 1972).

Bazı *Arthrobacter* türleri patojenik mikroorganizmalar olup insanda bakteriyemi, postoperatif endoftalmi, Whipple'in hastalık benzeri sendromu ve flebit (Bernasconi) gibi hastalıklara sebep olurlar (Bernasconi vd, 2004; Shin vd, 2006; Park vd, 2012).

Arthrobacter cinsinin üyeleri toprakta yoğun olarak bulunurlar ve herbisit ve pestisit gibi çeşitli zararlı sentetik organik bileşikleri parçalayabilme kapasitesine sahiptirler (Pohlenz vd, 1992).

Ürettikleri çeşitli enzimlerle kirlenmiş toprağın temizlenmesinde iş görürler. Örneğin; Pohlenz vd (1992) tarafından yapılan çalışmada, *Arthrobacter oxydans* türünün fenilkarbamad hidroloz enzimini ürettiği ve fenilkarbamad herbisitini parçaladığı saptanmıştır (Pohlenz vd, 1992). Cullington ve Walker (1999) tarafından yapılan bir çalışmada ise toprak örneğinden izole ettikleri bir *Arthrobacter* türünün fenilüre herbisitini parçalayabildiği bildirilmiştir (Cullington ve Walker, 1999). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu *Arthrobacter* türlerinin antimikrobiyal özellikte biyoaktif bileşikler üretme potansiyellerinin olduğu da belirlenmiştir.

Velázquez vd (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *Arthrobacter agilis* türünün dimetilheksadesilamin bileşimini ürettiği ve bu bileşiğin *Botrytis cinerea* fungusunun büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Velázquez-Becerra vd, 2013).

Kamigiri vd (1996) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise bir *Arthrobacter* türünün çoklu ilaç direnci gösteren *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis* patojenlerine karşı yüksek antimikrobiyal özellik gösterdiği bulunmuştur (Kamigiri vd, 1996).

2.4.2. *Leifsonia* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Micrococcales*

Aile: *Microbacteriaceae*

Cins: *Leifsonia*

Evtushenko vd (2000) tarafından tanımlanmış olan bu cinsin tip türü *Leifsonia aquatica*'dir. *Leifsonia* cinsi Gram-pozitif ve zorunlu aerob mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Bu cinsin üyeleri spor üretmezler ve morfolojik olarak düzensiz çubuk ya da filametli hücrelerdir. Koloni rengi genellikle beyaz ya da sarı renktedir. Ancak *Leifsonia rubra* türü kırmızı renklidir. Hareketli ya da hareketsiz üyeleri bulunmaktadır ve katalaz pozitif mikroorganizmalardır. Genellikle mezofilik bakterilerdir; fakat *L. rubra* ve *L. aurea* gibi bazı türler psikrofilidir. Genomlarının G+C içeriği % 66-73 arasındadır (Evtushenko vd, 2000; Barka vd, 2016).

Leifsonia türlerinin peptidoglikan yapısını ramnoz, glukoz, galaktoz ve mannoz şekerleriyle 2,4-diaminobütirik asit oluşturur. Baskın olarak bulunan izoprenoid kinon tipi MK-11'dir (Reddy vd, 2008; Barka vd, 2016).

Leifsonia türleri çeşitli habitatlardan izole edilmiştir. *Leifsonia naganoensis* (Suzuki vd, 1999) ve *L. shinshuensis* (Davis vd, 1984) türleri topraktan izole edilen türlerdir. Toprak dışında ginseng kökünden (Qiu vd, 2007), hastalıklı bitkilerden (Davis vd, 1984), *Poa annua* köklerinde nematod safralarından da (Evtushenko vd, 2000) *Leifsonia* türleri izole edilmiştir. *Leifsonia aquatica* (Evtushenko vd, 2000) ise distile sudan izole edilmiştir.

Leifsonia rubra ve *L. aurea* (Reddy vd, 2003) türleri ise himalaya buzulları ve Antarktika göletlerinden saflaştırılmıştır (Janssen vd, 2002; Barka vd, 2016).

Bu cinsin patojenik üyeleri de mevcuttur. *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* türü bermuda çimlerinde bodurluğa sebep olurken *L. xyli* subsp. *xyli* ise dünya çapında şeker kamışı hastalığına sebep olur (Davis vd, 1984; Evtushenko vd, 2000) .

Actinobacteria sınıfında bulunan *Leifsonia* türlerinin bazılarının biyoaktif sekonder metabolit üretme yetenekleri vardır. Örnek olarak Wiese vd (2009) tarafından yapılan bir çalışmada baltık denizinden *Laminaria saccharina* alg türünden bakteri izolasyonu yapılmıştır ve bir *Leifsonia* türünün *Escherichia coli*, *Staphylococcus lentus*, *Candida glabrata* patojenlerine karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği belirlenmiştir (Wiese vd, 2009).

Kang vd (2014) tarafından yapılan çalışmada ise topraktan izole edilen *Leifsonia soli* SE134 suşunun bitki büyümesini teşvik eden gibberellin bileşiğini üreterek salatalık tohumlarının biyokütlelerini, hipokotillerini ve kök uzunluklarını kontrol gruplarına oranla önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir (Kang vd, 2014).

2.4.3. *Nocardia* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Corynebacteriales*

Aile: *Nocardiaceae*

Cins: *Nocardia*

16S rRNA gen dizi analizine göre *Nocardia* cinsi *Corynebacteriales* takımı içerisinde yer almaktadır. *Nocardia* cinsi, immün yanıtı baskılanmış konakçılarda enfeksiyon oluşumunun bir nedeni olarak bilinen mikroorganizma grubudur. Bu cinsin üyeleri tatlı ve tuzlu sularda, toprakta, çürüyen bitki örtüsünde, hayvan dışkısında olmak üzere hemen hemen her yerde bulunabilmektedir. Büyümeleri için özel koşullara gerek olmayıp birçok tür aminoasit ve nitrat içeren basit azot kaynaklarının olduğu her ortamda gelişebilmektedir (Wilson, 2012).

Nocardia türleri heterotrofik mikroorganizmalar olup oksidatif metabolizmaya sahiptirler ve azot kaynaklarının kullanımı dışında birçok *Nocardia* türü glikoz, asetat, propiyonat bileşiklerini kullanabilme ve ayrıca kompleks polisakkaritleri parçalama yeteneğine sahiptirler (Golinska vd, 2013; Luo vd, 2013).

Bu cinse ait pek çok tür 20-40°C arasında gelişebilmektedir; ancak bazı türler (*N. acidivorans*, *N. harenae* ve *N. jejuensis*) 10°C gibi düşük bir sıcaklıkta gelişebilirken *N. brasiliensis*, *N. ignorata*, *N. jinanensis*, *N. kruczakiae* ve *N. otitidiscaviarum* gibi bazı türler ise 45°C'de gelişim gösterirler. Ancak genel olarak bu cinsin üyeleri için optimum sıcaklık 28°C'dir. Gelişim gösterebildikleri pH aralığı ise 5-10 arası olup en uygun pH 7.0 civarındadır (Goodfellow, 2014).

Bu cinsin bazı üyeleri genellikle 3 ila 7 gün arasında sabit faza ulaşırken bazı türler daha yavaş gelişirler (Goodfellow, 2014). Bu cinsin üyeleri Gram-pozitiftir; ancak diğer Gram-pozitif bakterilerin aksine düzensiz, küre ve çubuk biçimli elementlere parçalanan, dallanmış filamentli mikroorganizmalardır (Brown-Elliott vd, 2006). Hava ve substrat misel oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Ayrıca birçok *Nocardia* türü katı kültür ortamında kahverengi, turuncu, sarı renkli pigmentler üretebilmektedir (Williams vd, 1976). Bu bakterilerin hücre duvarının en karakteristik özelliği mikolik asit bulundurması olup bu da tür tanımlamada kullanılan önemli bir kriterdir (Goodfellow vd, 1982).

Nocardia amikacinitolerans, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. niwae*, *N. otitidiscaviarum* gibi bazı *Nocardia* türlerinde hücre duvarında mikolik asitler tespit edilmiştir (Lan lle ve Asselineau, 1970; Kudo vd, 1988; Yano vd, 1990). Hücre duvarında bulunan mikolik asitten dolayı da bu bakteriler asit dayanıklılığı gösterirler.

Ayrıca bazı türlerin (*Nocardia asteroides*) hücre duvarındaki mikolik asit bileşimini değiştirerek sıcaklık koşullarındaki değişikliklere uyum sağlayabildiği saptanmıştır (Tomiyasu, 1982).

Bu cinsin 80'den fazla türü tanımlanmış olup en az 33 tanesi patojendir (Brown-Elliott vd, 2006). Bu cinsin bazı üyeleri beyin, böbrek, eklem, kemik, yumuşak doku ve göz gibi organlarda çoğalarak insan ve hayvanlarda ölümcül enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Simpson ve Read, 2014).

Patojen türlerinin yanı sıra *Nocardia* cinsi biyoaktif bileşikler üretebilen üyeler de sahiptir. Schneider vd (2007) tarafından yapılan bir çalışmada topraktan *Nocardia* cinsine ait olan bir tür izole edilmiştir. Bu türün nocardichelin A ve nocardichelin B olmak üzere iki siderofor bileşiği ürettiği belirlenmiştir.

Bu iki bileşimin gastrik adenokarsinoma, göğüs karsinoması ve hepatosellüler karsinomada kanser hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Schneider vd, 2007).

El-Gendy vd (2008) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Kızıldeniz'in Ras-Gharib kıyılarından toplanan kırmızı bir alg olan *Laurenica spectabilis*'ten *Nocardia* türü izole edilmiştir. Bu türün ürettiği dört metabolitin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bir metabolitin ise yeni bir antibiyotik olduğu (ayamycin) belirlenmiştir (El-Gendy vd, 2008). Warneke vd (2007) tarafından yapılan bir çalışmada ise bazı *Nocardia* türlerinin biyolojik bozunmaya dayanıklı bir polimer olan sumatra zamkını (gutta-percha) parçaladığı görülmüştür (Warneke vd, 2007).

Nocardia transvalensis IFM 10065 türü ise çinko içeren, anti-fungal bir antibiyotik olan Transvalensis A'yı sentezlemektedir (Hoshino vd, 2004).

2.4.4. *Nocardioides* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Propionibacteriales*

Aile: *Nocardioideaceae*

Cins: *Nocardioides*

Nocardioideaceae ailesi, *Propionibacteriales* takımının bir ailesi olup Nesterenko vd (1985) tarafından tanımlanmıştır (Nesterenko vd, 1985). *Marmoricola*, *Aeromicrobium*, *Kribbella*, *Actinopolymorpha*, *Thermasporomyces* ve *Flindersiella* cinslerinin yanı sıra *Nocardioides* cinsi de bu aile içerisinde bulunur (Tóth ve Borsodi, 2014). Toprakta izole edilmiş olan *Nocardioides albus* 895-50^T bu cinsin tip türüdür (Prauser, 1976).

Bu cinsin üyeleri Gram-pozitif, aerobik ve katalaz-pozitif organizmalardır. Genomik DNA G+C içeriği % 66,6–74.8 civarındadır (Tóth ve Borsodi, 2014).

Cinsin farklı türlerinde genellikle morfolojik olarak çubuk-kok döngüsü görülür. Genelde hücreler ilk önce kok şeklinde olup daha sonra kısa filament veya çubuk halini almaktadır. Çubuk şeklindeki bakteriler hareketli olabilir.

Koloniler genelde beyazımsı, kremi veya sarı renklidir; nadiren turuncu kolonilere de rastlanır. *Nocardioides* türleri kemoorganotrofik mikroorganizmalar olup çok çeşitli karbon ve azot kaynaklarını kullanabilirler. Oligotrofik koşullara adapte olabilen türler de vardır. Mattes ve meslektaşları tarafından izole edilen *Nocardioides* sp. JS614 izolatu, kemolitotrofik olarak da çoğalma özelliğine sahiptir (Tóth ve Borsodi, 2014).

Nocardioides türleri genellikle 25-30°C sıcaklıkta iyi gelişim gösteren mezofilik canlılardır; ancak 4°C gibi düşük sıcaklıklarda gelişen psikrofil türler de vardır. Bu cinsin üyelerinin çoğu nötrofilik olup ancak bazı türler pH:5 ve pH:12 gibi ortamlarda da gelişebilmektedir. Ayrıca bu cinsin üyelerinin pek çoğu gelişimleri için % 0,5-6 NaCl'e ihtiyaç duymaktadır (Tóth ve Borsodi, 2014).

Hücre duvar yapılarında teikoik asitler mevcuttur. Baskın menakinon olarak MK-8 (H₄) bulundurlar. Ayrıca *Nocardioides* türlerinin önemli bir özelliği de çevre için toksik olabilecek pek çok kompleks bileşiği ve kimyasalı parçalayabilmesidir (Tóth ve Borsodi, 2014).

Bu cinsin bazı üyeleri biyoaktif bileşikleri üretme yeteneğine sahiptirler. Sanglier vd (1993), tarafından yapılan bir çalışmada yeni bir *Nocardioides* türünün antifungal bir bileşik ürettiği saptanmıştır (Sanglier vd, 1993). Dellweg vd (1988) tarafından yapılan bir çalışmada izole ettikleri *Nocardioides* türlerinden ikisinin, 5'-hidroksi-metil-lösil-blasticidin bileşiğini diğer adıyla rodaplutin antibiyotiğini ürettiğini belirlemişlerdir (Dellweg vd, 1988).

Matson ve Bush (1989) tarafından yapılan çalışmada ise Meksida'dan alınan toprak örneğinden izole edilen *Nocardioides* sp. ATCC 39419 izolatının antitümör bir molekül olan Sandramycin ürettiği belirlenmiştir (Matson ve Bush, 1989).

2.4.5. *Nonomuraea* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Streptosporangiales*

Aile: *Streptosporangiaceae*

Cins: *Nonomuraea*

Nonomuraea cinsi ilk olarak Zhang ve arkadaşları tarafından önerilmiş olup (Zhang, vd, 1998) *Streptosporangiaceae* familyasına dâhildir. *Nonomuraea* cinsi Gram-pozitif, aerobik, asit ve alkole dirençli olmayan mikroorganizmaları içermektedir (Kämpfer vd, 2005).

Bu cinsin üyeleri dallanmış substrat ve hava miselleri oluşturmaktadır. Optimum büyüme sıcaklığı 25-45°C olup 55°C’de gelişen türler de mevcuttur (Zhang vd, 1998). Bu cinsin üyelerinin DNA’larındaki G+C oranı % 64-74 olarak belirlenmiştir (Nakaew vd, 2012).

Nonomureae türleri deniz sedimentlerinde (Maldonado vd, 2009), karasal ve sucul ortamlarda, denizel bitki dokularında olmak üzere çeşitli habitatlarda bulunabilmektedir. Bu cinsin üyelerinin % 83’ü karasal kaynaklardan (toprak, bitki) ve %17’si sucul kaynaklardan (sediment, denizel bitkiler, süngerler) izole edilmiştir (Sungthong ve Nakaew, 2015).

Nonomureae cinsine ait bazı türlerin değerli biyoaktif bileşikleri üretme potansiyelleri mevcuttur. Bu biyoaktif bileşiklerin bazıları klinik değerlendirme sürecindeyken bazıları endüstriyel ve ticari olarak üretilmekte olup tıp ve tarım alanında kullanılmaktadır. Bu cinsin ürettiği biyoaktif bileşiklerin çoğu antimikrobiyal özellik göstermektedir. Bunun ilk kanıtı aktinotiyosinin antibiyotiğinin *N. pusilla* IFO 14684^T tarafından üretilmesidir (Tamura vd, 1973).

Daha sonra Fleck vd (1978) tarafından yapılan çalışma ile *N. rubra* DSM 43768^T tarafından Gram-pozitif patojenlere etki eden maduramisin antibiyotiğinin üretildiği keşfedilmiştir (Fleck vd, 1978).

N. spiralis MI178-34F18 türü ise antibakteriyel bir antibiyotik olan pyralomisini üretmektedir (Kawamura vd, 1995).

Ayrıca *Nonomureae* türleri antikanser özellikte bileşikler de üretebilmektedir. Örnek olarak *N. roseoviolacea* subsp. *carminata* IFO 15903^T tarafından antitümör ajan olan karminomisin sentezlenmektedir (Gauze vd, 1973). Ayrıca *N. pusilla* TP-A0861 tarafından myxochelin ve *Nonomuraea* sp. TP-A0870 tarafından ise antitümör ajan olan brartemisin sentezlenmektedir (Miyanaga vd, 2006; Igarashi vd, 2009).

Nonomuraea longicatena NRRL 15532 türü ise dünya çapında ticari olarak kullanılan bir protein kinaz inhibitörünü üretmektedir (Kase vd, 1986).

2.4.6. *Pseudonocardia* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Pseudonocardiales*

Aile: *Pseudonocardiaceae*

Cins: *Pseudonocardia*

Pseudonocardia cinsi 1957 yılında Henssen tarafından hif ve spor zincirlerinin kendine özgü akropetal yapısıyla karakterize edilmiştir (Henssen, 1957). Bu cinsin üyeleri aerobik olup, Gram-pozitif, asit-fast olmayan, hareketsiz mikroorganizmalardır. Bazı türleri mezofilik olup bazı türler ise termofilik özelliktedir. *Pseudonocardia compacta* (Henssen vd, 1983), *Pseudonocardia spinosa* (Henssen ve Schäfer, 1971) ve *Pseudonocardia thermophila* termofilik olan türlerdendir (Henssen, 1957). DNA'larındaki G+C içeriği % 69-78'dir (Lee vd, 2001).

Kemotaksonomik analizler sonucunda bu cinse ait üyelerin hücre duvarının yapısında mezo-diaminopimelik asit, arabinoz ve galaktoz bulunurken mikolik asit bulunmadığı belirlenmiştir. Baskın menakinon olarak MK-8(H₄) bulundururken baskın yağ asidi izo-dallanmış heksadekanoik asittir (Park vd, 2008; Huang vd, 2002).

Pseudonocardia cinsine ait olan bazı türler biyoaktif sekonder metabolit üretmektedir. Li vd (2011), tarafından yapılan çalışmada Güney Çin denizinden SCSIO 01299 ismiyle bir mikroorganizma izole edilmiştir. 16S rRNA gen dizi analizi sonucunda bu mikroorganizmanın *Pseudonocardia* cinsine ait olduğu bildirilmiştir. *Pseudonocardia* türü tarafından üretilen pseudonocardian A ve pseudonocardian B bileşiklerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Bacillus thuringensis* SCSIO BT01 patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca üç kanser hücre hattına (MCF-7-insan meme kanseri hücre hattı, NCI-H460-karaciğer kanser hücre hattı ve SF-268-insan glioma kanser hücre hattı) karşı da sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Li vd, 2011).

Mangamuri vd (2015) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Pseudonocardia endophytica* türünün ürettiği bazı sekonder metabolitlerin Gram-pozitif ve Gram-negatif patojenlere ve funguslara karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği aynı zamanda da bazı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Mangamuri vd, 2015). Ayrıca bazı *Pseudonocardia* türleri ürettikleri enzimlerle yeraltı suları için kirletici ajan olabilecek eter içeren bazı organik bileşikleri parçalayabilme özelliğine sahiptir (Vainberg vd, 2006).

2.4.7. *Saccharothrix* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Pseudonocardiales*

Aile: *Pseudonocardiaceae*

Cins: *Saccharothrix*

Saccharothrix cinsi morfolojik ve fizyolojik olarak birbirleriyle son derece farklılık gösteren ve geliştikleri kültür ortamı üzerinde 0.5-0.7 mm çapında vejetatif hif ve hava misellerini oluşturabilen üyelerden oluşur. Bu cinsin üyeleri aerobik mikroorganizmalardır (Franco ve Labeda, 2014).

Gram-pozitif olup lizozime karşı dirençlidirler ve katalaz pozitifler. DNA'larındaki G+C içeriği % 67-74 oranında olup (Franco ve Labeda, 2014) bu cinsin tip türü *Saccharothrix australiensis* DSM 43800^T türüdür (Labeda vd, 1984).

Saccharothrix türlerinin hücre duvarında mezo-diaminopimelik asit, galaktoz, ramnoz ve iz miktarda mannoz şekeri bulunur. Bu cinsin tanımlanmasında fosfatidiletanolamin molekülünün varlığı önemli bir kriterdir. Çoğunlukla MK-9 (H₄) menakinonu bulundurlar ancak bazı türlerde MK-9 (H₆), MK-9 (H₈) ve MK-10 (H₄) kinonları da bulunabilir (Franco ve Labeda, 2014).

Diğer aktinobakteri cinslerinde olduğu gibi bu cinsin bazı üyeleri de antimikrobiyal özellik gösteren metabolitler üretebilmektedir. Kim vd (1991) tarafından yapılan çalışmada *Saccharothrix* cinsine ait bir mikroorganizmanın kolşisine dirençli KB insan epidermoid kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite gösteren *Sekothrixide* adında bir makrolid ürettiği belirlenmiştir (Kim vd, 1991).

Zitouni vd (2005), tarafından yapılan çalışmada Kuzey Afrika topraklarından *Saccharothrix* türleri izole edilmiş ve bu türlerin ürettiği sekonder metabolitlerin özellikleri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda izole edilen *Saccharothrix* türlerinin *M. ramannianus* fungusuna karşı güçlü bir antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca bir *Saccharothrix* türünün izobütropirrotin ve tiyolutin antibiyotiklerinin yanı sıra patojenik bakteri, fungus ve mayalara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren üç yeni ditiyopirrolon türü antibiyotiği ürettiği tespit edilmiştir (Zitouni vd, 2005).

Murakami vd (2001), yaptıkları çalışmada *Saccharothrix* cinsine ait olan bir türün Ras-bağımlı Ba/F3-V12 hücrelerinde apoptozu indükleyen ammocidin adında bileşik ürettiğini bildirilmiştir (Murakami vd, 2001).

2.4.8. *Streptomyces* cinsi

Şube: *Actinobacteria*

Sınıf: *Actinobacteria*

Takım: *Streptomycetales*

Aile: *Streptomyetaceae*

Cins: *Streptomyces*

Streptomyces cinsi *Streptomyetaceae* ailesi içinde bulunan, ilk olarak 1943 yılında Waksman ve Henrici adlı bilim adamları tarafından tanımlanmış bir cinstir. Bu cins Gram-pozitif, aerobik, saprofit ve genomik DNA G+C oranı % 69-78 olan 800'den fazla türden oluşmaktadır (Anderson ve Wellington, 2001; Stackebrandt vd, 1997; Korn-Wendish, 1992).

Bu cinsin üyeleri genellikle nötral pH (6,5-8)'larda ve 25-35°C arasında iyi gelişim göstermektedir. Daha yüksek ya da daha düşük sıcaklıklarda veya daha asidik ya da bazik ortamlarda yaşayan üyeleri de mevcuttur (Goodfellow vd, 1987; Kim vd, 1996).

Bu türün üyelerinin karmaşık bir yaşam döngüsü olup üremeleri sırasında yoğun miselyum oluştururlar. *Streptomyces* cinslerinin hava ve subsrat miselyumu çok yoğun dallanma gösterir. Subsrat hifleri 0.5-1 µm çapındadır ve vejetatif fazda çapraz duvarlardan yoksundur.

Büyüme hif uçlarında meydana gelir ve buna dallanma eşlik eder. Hücreler yaşlandıkça spor zincirlerinden hava miselyumu da gelişir. Hava miselyumunun morfolojisi (spor zincirinin yapısı, spor yüzeyi, dallanma şekli v.s.) *Streptomyces* türlerinin sınıflandırılması için önemlidir. Ayrıca sporları radyasyon, sonikasyon, enzimatik parçalanma ve yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklıdır (Mcbride ve Ensign, 1987).

Bu bakteriler besiyerinde çoğalarak koloni oluştururlar. Oluşan koloniler başlangıçta düz, yumuşak ve dairemsi olurken sonraları sert, pamuksu, granüllü, pudramsı veya kadifemsi görülebilir. Aynı zamanda bu bakteriler pigment üretme yeteneğine sahip olup substrat ve hava miseline de rengini verirler. Ayrıca çözünebilir pigment üreten üyeleri de vardır (Korn-Wendish, 1992).

Genom yapılarına bakıldığında ise *Streptomyces* cinsi bakteriler yaklaşık 8 Mb uzunluğunda büyük bir genom içerirler ve kromozomları lineer yapıdadır (Paradkar vd, 2003). Cinsin genom özellikleri ilk kez *Streptomyces lividans* (Huang vd, 1998) ve *Streptomyces coelicolor* (Kieser vd, 1992) türlerinin genom analizinin yapılmasıyla belirlenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla diğer türlerde de bu özellikler doğrulanmıştır. *Streptomyces* genomunda genlerin yerleşimine bakıldığında hayati olaylardan sorumlu genler lineer kromozomun merkezi kısmında bulunurken sekonder metabolit üretiminden sorumlu genler uç kısımlarda konumlanmıştır (Hopwood, 1999).

Streptomyces genomları antibiyotik, anti-tümör, antiparazitik ve anti-fungal özellikte sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu olan çok sayıda biyosentetik gen kümesi içerir ve bu yüzden *Streptomyces* türleri tıp, endüstri, tarım, farmakoloji alanlarında oldukça değerli olan bakterilerdir (de Lima Procópio vd, 2012).

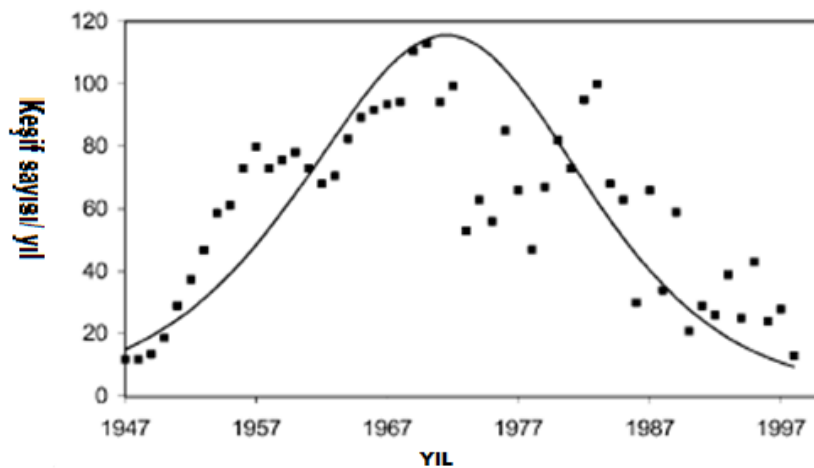
Streptomyces türleri tarımda yabancı otlarla mücadelede kullanılan herbisitleri de üretebilmektedirler. Örneğin; *Streptomyces saganonensis* türü yabancı otlarla mücadelede kullanılan herbisidin ve herbimisin adında iki herbisit üretmektedir. Anisomisin de *Streptomyces* sp. tarafından üretilen bir herbisit olup bitkilerin klorofil sentezleme yeteneğini yok ederek yengeç otu ve geniş yapraklı yabancı otların büyümesini engeller. Bialaphos ise *Streptomyces viridochromogenes*'in bir metaboliti olup yabancı otları kontrol etmek için kullanılan bir glutamin sentez inhibitörüdür (Xiliang, 1994).

Streptomyces hygroscopicus ise adenozin 5-fosfat deaminaz enziminin aktivitesini engellemek suretiyle yabancı otlara etki eden karbosiklik koformisin ve hidantocidin bileşiklerini üretmektedir (Pillmoor, 1998). Ftoksazolin, hidantosidin ve homoalanosin de *Streptomyces* türlerinden izole edilen, yabancı ot büyümesini kontrol edebilen diğer metabolitlerdir (Yan Chu, 1993).

Streptomyces cinsi bakteriler doğada çeşitli bölgelerde bulunabilirler. Fakat en yoğun buldukları habitat topraktır (Lee vd, 2005; Hodgson, 2000).

Bu bakteriler selülaz, kitinaz gibi çeşitli hidrolitik enzimler üreterek karbon döngüsünde ve topraktaki organik madde kompozisyonun oluşmasında önemli rol oynarlar. Ayrıca topraktaki humus oluşumundan da sorumludurlar (Anandan vd, 2016).

Aktinobakteriler 10.000 üzerinde biyoaktif sekonder metabolit üretirler ve bunun yaklaşık 7600 tanesini *Streptomyces* türleri üretmektedir. *Streptomyces* cinsi tarafından üretilen ilk antibiyotik streptothricin olup 1942 yılında keşfedilmiştir (Waksman ve Woodruff, 1942). Daha sonraki yıllarda hızla yeni antibiyotikler (streptomisin, kloramfenikol, kanamisin v.s.) keşfedilmiştir. 1970'lerde ise antibiyotik keşfi zirveye ulaşmıştır (Watve vd, 2001; Berdy, 2005). Ancak 1980 ve 1990'larda ise aynı metabolitlerin bulunmasından dolayı antibiyotik keşfinde düşüş yaşanmıştır. Bu yüzden çalışmalar yeni türlerin ve yeni bileşiklerin elde edilmesi yönüne kaymıştır (Watve vd, 2001).



Şekil 2.3. Antibiyotik keşfinin yıllara göre dağılımı

3. MATARYEL ve METOD

3.1. İzolasyonda Kullanılan Toprak Örnekleri

Aktinobakterilerin izolasyonu için kullanılan toprak örneklerinden ikisi Erzurum-Oltu bölgesinde bulunan, kırmızı ve yeşil renkli topraklardan oluşan gökkuşağı tepeleri olarak bilinen bölgeden alındı. Diğer toprak örneği ise kırmızı toprak olup Antalya-Kumluca bölgesinden alındı. İzolasyonda kullanılan örneklerin alındığı lokaliteler Çizelge 3.1’ de verilmiştir. Örnekleme bölgelerinden alınan toprak örnekleri, steril plastik poşetler içerisinde laboratuvara getirildikten sonra izolasyon işlemine kadar +4°C’de saklandı.

Çizelge 3.1. İzolasyonda kullanılan örneklerin lokaliteleri

No	Kaynak	Coğrafik Koordinatları
1	Erzurum-Oltu	40°29'26.7"N 41°48'44.9"E
2	Erzurum-Oltu	40°31'46.5"N 41°52'55.8"E
3	Antalya-Kumluca	36°17'37.4"N 30°28'0.39"E

Toprak örneklerinin pH değerleri saturasyon çamurunda cam elektrotlu pH-metre kullanılarak ölçülmüştür (Reed ve Cummings, 1945). Ayrıca toprak örneklerinin elektriksel iletkenlik değerleri de belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Toprak örneklerinin pH ve elektriksel iletkenlik değerleri

No	Kaynak	pH (Ortalama)	Elektriksel İletkenlik
1	Erzurum-Oltu	7.77	122,3 μ s
2	Erzurum-Oltu	7.91	96.73 μ s
3	Antalya-Kumluca	6.81	42.65 μ s

3.2. Dilüsyon Plak Tekniği ile Aktinobakterilerin İzolasyonu

Oda sıcaklığında kurutulan toprak örnekleri havanda ezildikten sonra 1 g tartılarak içerisinde cam boncuk ve steril 9 ml Ringer çözeltisi bulunan tüplere eklendi. Böylelikle toprak örnekleri için 10⁻¹'lik solüsyonlar hazırlanmış oldu.

Daha sonra 10^{-1} 'lik solüsyonlar toprak kolloidlerine tutunmuş olan mikroorganizmaların ayrılması için 30 dk boyunca yavaşça çalkalandıktan sonra istenmeyen organizmaların vejetatif formlarının neden olabileceği kontaminasyonları azaltmak amacıyla 55°C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dk bekletildi.

Daha sonra 10^{-1} 'lik tüplerden seri sulandırma yapılarak toprak örneklerinin 10^{-2} 'lik ve 10^{-3} 'lük dilüsyonları hazırlandı. Toprak örneklerinin her birinin 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} lük dilüsyonlarından 200 µl alınarak aktinobakteriler için seçici olan 10 farklı besiyerine ekim yapıldı (Çizelge 3.3). Ekim yapılan petriyeler 28°C 'de 40 gün inkübasyona bırakılarak gelişen kolonilerin tespiti için her gün kontrol edildi.

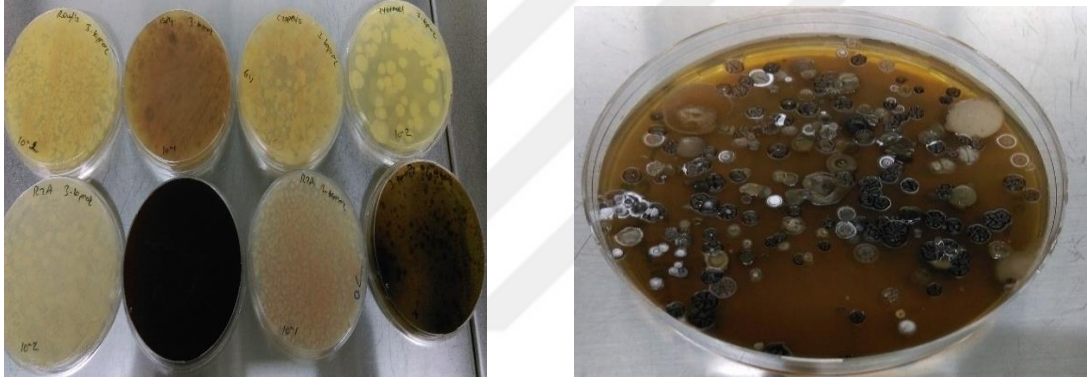
Çizelge 3.3. Seçici izolasyonunda kullanılan besiyerleri

No	Besiyeri	Antibiyotik	Referans
1	Özel besiyeri	Cycloheximide (50 µg/ml) Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Shukor vd, 2009)
2	Humik asit vitamin agar	Cycloheximide (50 µg/ml) Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Hayakawa ve Nonomura, 1987)
3	Kusters agar	Cycloheximide (50 µg/ml) Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Lakshmanaperumalsamy, 1986)
4	Rouf's agar	Cycloheximide (50 µg/ml) Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Rouf ve Stokes, 1962)
5	R2A medium	Cycloheximide (50 µg/ml) Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Reasoner ve Geldreich, 1985)
6	ISP3	Nystatin (50 µg/ml), Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Shirling ve Gottlieb, 1966)
7	ISP4	Nystatin (50 µg/ml) Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Shirling ve Gottlieb, 1966)
8	SM3 Medium	Cycloheximide (50 µg/ml), Nalidixic acid (10 µg/ml), Nystatin (50 µg/ml), Rifampicin (5 µg/ml)	(Tan vd, 2006)
9	Czapek-Dox (CD)	Cycloheximide (50 µg/ml), Nalidixic acid (10 µg/ml)	(Weyland, 1969)
10	Tripton Yeast Ekstrakt agar (TYG) + %5 NaCl	Nalidixic acid (10 µg/ml), Nystatin (50 µg/ml)	DSMZ Besiyeri No. 680

3.3. İzolatların Saflaştırılması ve Stoklanması

İzolasyon petrilerinde gelişen aktinobakteri kolonileri derimsi, sert, sporlu, yayılmayan koloni gibi özellikleri dikkate alınarak seçildi ve izolatlara birer etiket ismi verildi. 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) besiyeri hazırlandı. Saflaştırılan izolatlar TYG agar veya N-Z-Amin agar ortamında yoğun olarak geliştirildi ve steril %30'luk gliserol (v/v) çözeltisi içerisinde stoklandı. Stoklanan izolatlar -20°C'de uzun süre muhafaza edilebilmektedir.



Şekil 3.1. Seçici izolasyon besiyerlerinde gelişen kolonilerin seçilimi

3.4. İzolatların Renk Gruplarının Belirlenmesi

Elde edilen tüm izolatlar TYG agar üzerinde 28°C'de 14 gün süreyle geliştirildi. Daha sonra Inter-Society Colour Council National Bureau of Standards (ISCC-NBS) colour Name Charts (United States Department of Commerce, Gaithersberg, Maryland, U.S.A. 1985) renk kataloğu kullanılarak izolatlar hava miseli spor rengine, substrat misel rengine ve çözünür pigment rengine göre 41 renk grubuna ayrıldı.

3.5. Moleküler Taksonomik Yöntemler

Moleküler taksonomik çalışmalarda kullanılacak test organizmaları TYG agar (DSMZ Besiyeri No. 680) besiyerine ekildi ve 28°C’ de 7 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında, aseptik koşullarda izolatlardan bir miktar alınarak öze yardımı ile 50 ml’lik erlenlerdeki 30 ml Glukoz-Yeast-Malt Extract sıvı besiyerine transfer edildi. İzolatlar çalkalamalı inkübatörde (Excella, New Brunswick Scientific Co, Inc, NJ) 28°C’de 7 gün 180 rpm’de geliştirildi. İzolatlar geliştikten sonra genomik DNA izolasyonu için gerekli olan hücre pelleti elde edildi. Sıvı besiyerindeki kültürlerden 1 ml alınarak steril 1.5 ml’lik ependorflara transfer edildi ve 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek hücre pelleti çöktürüldü. Çöken hücre pelletinin üstünde kalan sıvı uzaklaştırıldı ve yeterli hücre pelleti elde edilinceye kadar bu işlem tekrar edildi. Daha sonra hücre pelleti 500 µl steril ddH₂O ile 3 kez yıkandı. Hücre pelletleri DNA izolasyonu yapılıncaya kadar -20°C’de tutuldu. Organizmaların saflığını kontrol etmek için, sıvı kültürden ~50-100 µl alınarak antibiyotik ilavesi olmayan Glukoz Yeast-Malt Extract Agar ortamına transfer edildi ve inkübasyona bırakıldı.

3.5.1. Genomik DNA izolasyonu

Renk gruplandırması sonucu her renk grubundan en az bir tane temsilci olmak üzere toplam 60 izolat seçildi ve bunların 43 tanesinin genomik DNA’sı PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) kullanılarak ekstrakte edildi.

Protokol:

1. Hücre pelleti, 180 µl lizozim sindirim tamponunda süspansiyon edildi ve kısa vortekslemeyle iyice karıştırıldıktan sonra 37°C 'de bir gece bekletildi.
2. İki ayrı su banyosu (veya ısıtıcı bloku) 37°C ve 55°C sıcaklığa ayarlandı.
3. 2 µl Triton-X ilave edilip pipetaj yapıldı ve 30 dk 37°C 'de bekletildi.
4. 20 µl RNaz eklendi ve kısa vortekslemeyle iyice karıştırıldı.
5. 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra kısa vortekslemeyle iyice karıştırıldı.
6. 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer (Parçalama/Bağlama Tamponu) eklendi ve kısa vortekslemeyle iyice karıştırıldı.

7. 55°C'de 30 dakika bekletildi.
8. Lizata 200 µl % 96-100'lük etanol eklendikten sonra homojen bir çözelti elde etmek amacıyla 5 sn vorteksleyerek iyice karıştırıldı.
9. PureLink genomik parçalama/bağlama tamponu ve etanolla hazırlanan lizat (yaklaşık 640 µl) PureLink spin kolona aktarıldı.
10. Kolon oda sıcaklığında 10000 x g'de 1 dk santrifüjlendi.
11. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir PureLink toplama tüpüne yerleştirildi.
12. Kolona, daha önceden etanolla hazırladığımız yıkama tamponu 1'den 500 µl eklendi.
13. Kolon oda sıcaklığında 10000 x g'de 1 dk santrifüjlendi.
14. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
15. Kolona, daha önceden etanolla hazırladığınız yıkama tamponu 2'den 500 µl eklendi.
16. Kolon, oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı.
17. Spin kolon temiz bir 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
18. Kolona 25-200 µl PureLink genomik ayırma tamponu (Genomic Elution Buffer) eklendi.
19. Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 1.5 dk santrifüjlendi ve böylece saf hücre DNA'sı elde edildi.
20. Saflaştırılan DNA -20°C 'de saklandı.

3.5.2. DNA izolasyon kontrolü

Yapılan DNA izolasyonunun kontrolünü yapmak amacıyla geleneksel bir metot olan agaroz jel elektroforezi kullanıldı. DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde (% 0,8 agaroz (w/v), 1XTBE, 40 dk, 90 V akım) kontrol edildikten sonra 16S rRNA gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Agaroz jel elektroforez için gerekli solüsyonların hazırlanışı ve saklama koşulları Ekler kısmında verilmiştir.

3.5.3. 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonu ve analizi

Genomik DNA izolasyonu yapılan örneklerin 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu için 27F ve 800R evrensel primerleri kullanıldı (Çizelge 3.4). 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 800R primeri (10 µM), 1 µl kalıp DNA (~100 ng) ve 22 µl nükleaz içermeyen su kullanıldı. Reaksiyon koşulları 94°C’de 2 dk (ön denatürasyon), 95°C’de 1 dk, 55°C’de 1.5 dk, 72°C’de 3 dk (30 döngü) ve 72°C’de 10 dk olarak gerçekleştirildi. PCR amplifikasyon ürünlerinin dizileme işlemi hizmet alımı kapsamında MacroGen Inc. firmasına yaptırıldı.

Çizelge 3. 4. 16S rRNA geninin PCR amplifikasyonunda ve dizilemede kullanılan primerler

Primer	Dizi (5' 3')	Bağlanma bölgesi		Kullanım amacı		Referans
		5'	3'	DİZİLEME	PCR	
27F	AGAGTTTGATCTG GCTCAG	8	27	X	X	Lane, 1991
MG5F	AAACTCAAAGGAA TTGACGG	907	926	X		Chun, 1995
800R	TACCAGGGTATCT AATCC	800	782	X		Chun, 1995

Çizelge 3. 5. 16S rRNA gen bölgesi PCR reaksiyonu şartları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	95	1	30
Bağlanma	55	1.5	30
Uzama	72	3	30
Son uzama	72	10	1
Reaksiyon sonrası saklama	4	∞	-

3.5.4. 16S rRNA gen dizi verilerinin analizi ve filogenetik dendrogramların oluşturulması

Elde edilen 16S rDNA dizi verileri ChromasPro Version 1.7.6 (Technelysium Pty Ltd) programı kullanılarak hizalandı ve EzBioCloud (https://www.ezbiocloud.net/resources/16s_download) sunucusunda bulunan global hizalama algoritmaları kullanılarak, izolatların en yakın akraba organizmalarla olan 16S rRNA dizi benzerliği belirlendi. Filogenetik analizler için MEGA 7.0 paket programı, hizalama için CLUSTAL_W yöntemi (Thompson vd, 1994) kullanıldı.

Filogenetik ağaçların çizilmesinde Neighbour-Joining (Saitou ve Nei, 1987) algoritması 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.

3.5.5. Tüm genom analizi ve biyosentetik gen kümelerinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan bir izolat tüm genom analizi için seçildi ve genomik DNA'sı ekstrakte edildi. Genom dizilemenin yapılması için hizmet alımı kapsamında MicrobesNG firmasına gönderildi. Firma protokolüne göre; DNA miktarı AF2200 plaka okuyucu ile Quantit dsDNA HS deneyi ile ölçüldü. Genomik DNA kütüphaneleri Nextera XT kütüphane hazırlama kiti (Illumina, San Diego, USA) kullanılarak hazırlandı. DNA ölçümü ve kütüphane hazırlığı Hamilton Microlab STAR otomatik sıvı taşıma sistemi üzerinde gerçekleştirildi. DNA kütüphanelerinin ölçümü Kapa Biosystems Kütüphane Miktar Belirleme Kiti kullanılarak yapıldı ve kütüphaneler Illumina HiSeq protokolü kullanılarak dizilendi.

Tüm genomu dizilenen organizmanın biyoaktif sekonder metabolit kodlayan gen kümeleri AntiSmash sunucusunda (Weber vd, 2015) belirlendi. Ayrıca CRISPR/Cas dizileri CRISPRFinder sunucusunda (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>) (Grissa vd, 2007); antibiyotik direnç genleri ResFinder sunucusunda (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Zankari vd, 2012) tespit edildi.

3.6. Antimikrobiyal Aktivite Testi

3.6.1. Ekstraktların hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite testi için her renk grubundan en az bir tane olmak üzere toplam 60 izolat seçildi ve seçilen izolatlar GYM agar besiyerinde 28°C’de bir hafta süreyle geliştirildi. Daha sonra steril kürdan yardımıyla petrilerden bir miktar alınıp 100 ml GYM sıvı besiyerine transfer edilerek 28°C’de 180 rpm’de 15 gün süreyle çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Ardından gelişen kültüre mikroorganizma tarafından üretilen sekonder metabolitlerin çözünebilir hale gelmesi için 100 ml metanol eklendi ve 1 gece aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Kontrol ekim amacıyla 100 µl kültür alınıp GYM agar yüzeyine yayıldı. Temiz kültürler 250 ml’lik ayırma hunisine aktarıldı ve faz ayırımı oluşuncaya kadar beklendi. Üst fazdan 100 ml alınıp balon jodelere aktararak 50°C’de evaporatörde uçuruldu. Balon jode içerisindeki kalıntı 5 ml DMSO’da çözüldü ve steril ependorflara alınarak -20°C’de saklandı.

3.6.2. Test patojenlerinin hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite testi için kullanılan patojen mikroorganizmalar (Çizelge 3.6) ilk olarak Nutrient (Merck) agar besiyerinde 37°C’de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün agar yüzeyinden bir miktar organizma alınarak 30 ml Nutrient sıvı besiyerine (Merck) transfer edildi ve aynı inkübasyon koşullarında geliştirildi. Gelişen kültürden 1 ml alındı ve steril ringer çözeltileri kullanılarak patojen mikroorganizmaların yoğunluğu 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml) olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 0.5 McFarland bulanıklığındaki patojen süspansiyonundan 200 µl alındı. Mueller Hilton agar-MHA (Oxoid) ve Sabouraud % 4 Dekstroz Agar-SDA (Merck) besiyeri yüzeyine yayma ekim tekniği ile ekildi.

Çizelge 3.6. Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan patojen mikroorganizmalar

No	Patojen adı	Gelişim sıcaklığı	Gelişim besiyeri
1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
4	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
7	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
8	<i>Listeria Monocytogenes</i>	37°C	Mueller Hilton Agar (MHA)
9	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	25°C	Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)
10	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	25°C	Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

3.6.3. Disk Difüzyon Metodu

Antimikrobiyal aktivite testi için disk difüzyon yöntemi (Bauer vd, 1966) kullanıldı. Elde edilen ekstraktlar aseptik koşullar altında steril disklere 40 µl emdirildi. Ardından diskler patojen inoküle edilmiş petriye bir petride kontrol diskleri ile beraber 6 disk olacak şekilde yerleştirildi ve patojen bakteriler 37°C'de bir gece, maya ve fungus patojenleri ise 25°C'de iki gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün kumpas yardımıyla zon çapları ölçüldü.

Aspergillus niger ATCC 16404 için pozitif kontrol olarak Amfoterisin B (5 mg/ml) kullanılırken diğer test patojenleri için kloramfenikol (50 µg/ml) antibiyotik diski kullanılmıştır. Negatif kontrol içinse 40 µl DMSO emdirilmiş disk kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite testi sonuçları Microsoft Excel programında grafiklerle şematize edildi.

3.7. Ekstraktların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Mikrobiyal üremeyi inhibe etmek için gerekli minimum madde miktarına Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) denir. MİK değerlerinin belirlenmesi için 96'lık mikrotiplakalarda sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak kuyucuklara Nutrient sıvı besiyerinden (Merck) 100 µl eklendi. Daha sonra ham özütler % 2 oranında olacak şekilde seyreltildi ve ilk kuyucuğa 100 µl özüt koyuldu.

Ardından besiyeri + özüt karışımından 100 µl alınarak diğer kuyucuğa aktarıldı. Son kuyucuğa kadar tekrarlandı ve böylece seri dilüsyonlar yapıldı.

Ardından, besiyeri-özüt karışımına her bir kuyucukta $1-5 \times 10^5$ yoğunluğundaki mikroorganizma olacak şekilde 100 µL mikroorganizma süspansiyonundan eklendi. Bu işlem her özüt için ayrı ayrı yapıldı.

Mikroplakalar 37°C sıcaklıkta 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda sonuçlar kuyucuklardaki bulanıklık gözlemi ile değerlendirildi. Bulanıklığın oluşmadığı ilk kuyucuktaki özütün derişimi MİK değeri olarak kaydedildi.

Deneyde pozitif kontrol ve negatif kontrol grupları da kullanılmış olup iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.8. Sitotoksik Aktivite Testi

Sitotoksik aktivite testi için MTT yöntemi (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) (Mosmann, 1983) kullanıldı. Ekstraktların AR42J pankreas kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi tespit edildi.

3.8.1. AR42J kanser hücrelerinin stoktan alınarak çoğaltılması

Dondurulmuş hücrelerin bulunduğu kriyojenik vialler -80°C'den alınarak 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözüldü. Çözünen hücreler 15 ml'lik falkona alınarak üzerine 10-12 mL %10 fetal sığır serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri (DMEM) eklendi ve 1200 rpm'de 5 dk santifürüj yapıldı.

Süpernatant dökülerek pelletin üzerine bir miktar besiyeri eklendi ve pastör pipeti ile al-ver yapılarak pelletin çözülmesi sağlandı.

Falkondaki tüm hücreler T25 flask içerisine alınarak üzerine %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, flukanazol ve yüksek şekerli DMEM içeren üretme besiyerinden 6 ml eklendi ve 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.8.2. AR42J kanser hücrelerinin pasajlanması

Hücreler konfluent hale geldikten sonra flasttaki besiyeri döküldü. 1X'lik PBS'den (PAN-Biotech), 3-5 ml alınarak flaska eklendi, ters yüz edildi, flask boşaltıldı.

1-1.5 ml tripsin-EDTA alınarak flaskın hücrelerin olduğu yüzeyine döküldü. Hücrenin bulunduğu tüm yüzeye yayılması sağlandı. Flask kapatılarak 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı ve 5 dk inkübe edildi.

Daha sonra flask içerisindeki tüm tripsin-hücre karışımı alınarak 15 ml'lik steril falkona koyuldu. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü. Hücre peletinin üzerine 3 ml üretim besiyeri eklendi ve al-ver yapılarak pellet çözüldü.

Çözünmüş hücre süspansiyonundan 0.5-1 ml alınarak yeni flaska koyuldu ve üzerine 5 mL üretim besiyeri eklendi. Flask kapatılarak 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde hücrelerin çoğalması için inkübasyona bırakıldı.

3.8.3. Mikroplakalara hücre ekimi yapılması

Konfluent olmuş AR42J hücrelerini toplamak amacıyla flask içindeki besiyeri boşaltıldı. Flaska 3-5 ml PBS eklenerek yıkama yapıldıktan sonra hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için 1-1.5 ml tripsin- EDTA eklenerek 2-3 dk 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüm hücreler 15 ml'lik falkona alınarak 1200 rpm'de 5 dk santifürüj yapılarak çöktürüldü. Pellet 2-3 ml besiyerinde çözüldü. Daha sonra hücre sayımı yapmak için 1:1 oranında hücre-tripan mavisi (Sigma Aldrich) karışımı hazırlandı ve Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Ardından mikroplakada her bir kuyucukta ne kadar hücre olması isteniyorsa üretim besiyeri kullanılarak pelletten seyreltme yapıldı. Uygun hücre yoğunluğu ayarlandıktan sonra her kuyucuğa 100 µl hücre eklendi. Hücrelerin flask yüzeyine yapışması için 4-5 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından test edilecek ekstraktlar kuyucuklara eklendi.

3.8.4. MTT analizi

MTT heterosiklik yapıda organik bir tetrazolyum tuzudur. Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri sonucu formazan molekülleri oluşur ve bu da renk değişikliğini beraberinde getirir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilir. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine neden olmaz (Gerlier ve Thomasset, 1986).

Bu değişimin *in vitro* ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır. MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir. Ancak indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir ve dolayısıyla hücre içinde kristal şeklinde çökmektedir. Canlı hücreler MTT bileşimini indirgeyip formazana dönüştürürler ve renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir (Gerlier ve Thomasset, 1986).

MTT analizinde AR42J hücreleri 4-5 saatlik inkübasyon süresinin sonunda flask yüzeyine tutunduktan sonra ekstraktların % 4'lük dilüsyonları üretme besiyeri kullanılarak hazırlandı. Her kuyucuğa 100 µl % 4'lük ekstrakt ilave edildi ve seri dilüsyonlar yapıldı. 72 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikropalakalar alınarak her kuyucuğa 10 µl MTT ilave edildi. Mikroplaka 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 3.5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak kuyucuklara 100 µL steril DMSO eklendi. Mikroplakalar ışık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılarak, oda ısısında, çalkalayıcıda düşük hızda 30 dk çalkalandı. Mikroplakalardaki her bir kuyucuğun spektrofotometrede 570 nm dalga boyundaki absorbansı ölçüldü. Sonuçlar kontrol kuyucukları referans alınarak Microsoft Excel programında değerlendirildi. MTT sitotoksisite deneyi her ekstrakt için üçer kez tekrar edildi.

4. BULGULAR

4.1. İzole Edilen Aktinobakteri Suşları

Erzurum ve Antalya illerinden alınan toprak örneklerinden, çizelge 3.3'te gösterilen 10 farklı seçici besiyeri kullanılarak toplam 340 izolat elde edildi. Bu izolatlardan 121 tanesi Erzurum-Oltu bölgesindeki gökkuşağı tepelerinden alınan kırmızı toprak (1. Toprak) örneğinden, 98 tanesi ise yeşil toprak (2. Toprak) örneğinden izole edilmiştir. Antalya-Kumluca bölgesinden alınan toprak örneğinden (3. Toprak) ise 121 aktinobakteri izole edilmiştir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3).

Çizelge 4.1. Erzurum-Oltu bölgesinden alınan 1. toprak örneğinden izole edilen suşlar

İZOLAT	BESİYERİ	TOPRAK ÖRNEĞİ	LOKALİTE
AS1H, AS11H, AS13H, AS14H, AS16-1H, AS18H, AS2H, AS20H, AS21H, AS22H, AS23H, AS24H, AS4H, AS5H, AS6H, AS9H	ISP4 (A)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
BS2H, BS3H, BS4H, BS5H, BS7H, BS8H	ISP3 (B)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
CS10H, CS11H, CS14H, CS15H, CS16H, CS17H, CS18H, CS19H, CS2H, CS20H, CS21H, CS22H, CS23H, CS24H, CS25H, CS25-AH, CS3H, CS4H, CS5H, CS6H, CS7H, CS8H, CS9H	Czapek Dox (C)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
FS1H, FS10H, FS2H, FS3H, FS4H, FS5H, FS6H, FS7H, FS8H, FS9H	Rouf's Medium (F)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
HS3H	Humik Asit Vitamin Agar (H)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
KS10H, KS11H, KS12H, KS13H, KS14H, KS16H, KS17H, KS18H, KS20H, KS21H, KS3H, KS4H, KS5H, KS6H, KS7H, KS8H, KS9H	Kuster's Agar (K)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
MS1H, MS10H, MS11H, MS12H, MS2H, MS3H, MS7H, MS8H, MS9H	SM3 Medium (M)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
RS1H, RS10H, RS11H, RS12H, RS13H, RS14H, RS15H, RS17H, RS2H, RS20H, RS21H, RS3H, RS5H, RS6H, RS8H, RS9H	R2A Medium (R)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
TS1H, TS11H, TS13H, TS14H, TS2H, TS3H, TS4H, TS6H, TS9H	TYG + % 5 NaCl (T)	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri
XS10H, XS11H, XS12H, XS13H, XS14H, XS15H, XS3H, XS4H, XS6H, XS7H, XS8H, XS9H	Modifiye Besiyeri	1. Toprak (S)	Erzurum-Oltu, Gökkuşağı tepeleri

Çizelge 4.2. Erzurum-Oltu bölgesinden alınan 2. toprak örneğinden izole edilen suşlar

İZOLAT	BESİYERİ	TOPRAK ÖRNEĞİ	LOKALİTE
AG1H, AG10H, AG11H, AG12H, AG13H, AG14H, AG16H, AG17H, AG18H, AG19H, AG20H, AG21H, AG23H, AG3H, AG5H, AG7H, AG8H, AG9H	ISP4 (A)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
BG1H, BG10H, BG11H, BG12H, BG3H, BG4H, BG7H, BG8H, BG9H	ISP3 (B)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
CG2H, CG4H, CG5H, CG6H, CG7H, CG8H, CG9H	Czapek Dox (C)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
FG1H, FG3H, FG4H, FG5H, FG6H, FG7H, FG8H	Rouf's Medium (F)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
HG1H, HG15H, HG5H, HG6H	Humik Asit Vitamin Agar (H)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
KG1H, KG10H, KG13H, KG14H, KG15H, KG16H, KG17H, KG18H, KG19H, KG2H, KG20H, KG21H, KG3H, KG5H, KG6H, KG7H, KG8H, KG9H	Kuster's Agar (K)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
MG1H, MG2H, MG3H, MG4H, MG5H, MG6H, MG7H, MG8H, MG9H	SM3 (M)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
RG1H, RG10H, RG11H, RG12H, RG13H, RG14H, RG15H, RG16H, RG17H, RG2H, RG4H, RG5H, RG6-1H, RG6-2H, RG7H, RG8H	R2A Medium (R)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
TG1H, TG4H	TYG + % 5 NaCl (T)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri
XG1H, XG2H, XG3H, XG4H, XG6H, XG7H, XG8H	Modifiye Besiyeri (X)	2. Toprak (G)	Erzurum-Oltu, Gökkuşacağı tepeleri

Çizelge 4.3. Antalya-Kumluca bölgesinden alınan 3. toprak örneğinden izole edilen suşlar

İZOLAT	BESİYERİ	TOPRAK ÖRNEĞİ	LOKALİTE
AK10H, AK11H, AK12H, AK13H, AK14H, AK16H, AK17H, AK19H, AK20H, AK21H, AK23H, AK24H, AK25H, AK26H, AK3H, AK4H, AK5H, AK9H	ISP4 (A)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
BK11H, BK17H, BK18H, BK2H, BK4H, BK5H, BK6H, BK7H, , BK9H	ISP3 (B)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
CK1H, CK10H, CK2H, CK4H CK6H, CK7H, CK8H, CK9H	Czapek Dox (C)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
FK1H	Rouf's Medium (F)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
HK13H, HK14H, HK15H, HK18H, HK19H, HK2H, HK20H, HK22H, HK3H, HK5H, HK6H, HK7H, HK8H, HK9H	Humik Asit Vitamin Agar (H)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
KK1H, KK10H, KK13H, KK15H, KK17H, KK18H, KK2H, KK20H, KK21H, KK22H, KK24H, KK3H, KK4H, KK8H	Kuster's Agar (K)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
MK1H, MK10H, MK11H, MK12H, MK13H, MK15H, MK16H, MK17H, MK18H, MK2H, MK20H, MK25H, MK27H, MK29H, MK3H, MK30H, MK31H, MK32H, , MK33H, MK34H, MK35H, MK36H, MK37H, MK38H, MK39H, MK4H, MK40H, MK40-AH, MK41H, MK42H, MK43H, MK44H, MK5H, MK7H, MK8H, MK9H	SM3 (M)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
RK4H	R2A Medium (R)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
TK1H, TK2H, TK3H	TYG + % 5 NaCl (T)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca
XK1H, XK10H, XK11H, XK12H, XK14H, XK16H, XK17H, XK18H, XK19H, XK2H, XK20H, XK21H, XK22H, XK4H, XK5H, XK7H, XK9H	Modifiye Besiyeri (X)	3. Toprak (K)	Antalya-Kumluca

Her bir lokaliteden elde edilen tüm izolatlar TYG besi ortamında yoğun bir şekilde geliştirildi ve morfolojik özellikler, substrat miselyum rengi, spor rengi ve çözünebilir pigment üretimi gibi özellikler göz önüne alınarak 41 renk grubuna ayrıldı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İzolatların renk gruplandırması

Renk Grubu	İzolatlar	Gelişimi	Spor Rengi	Substrat Miselyum Rengi	Çözünür Pigment Rengi
1.	KS12H, XG3H, CS10H, RG11H, MS10H, KG20H, MK31H, KG6H, XG4H, FS3H, BS8H, AG13H, RS5H, FS2H, RG14H, XS11H, XG2H, AG11H, KG2H, MS2H, TK2H, AG12H, BS3H, RG6-1H, AG18H	+++	Beyaz	Krem	-
2.	CK6H, MK9H, KK17H, XS8H, MK16H, KK24H, HK6H, KK18H, BK6H, KK10H, MK32H, MK40H, MK17H, MS9H, KK15H	+++	-	Açık krem	-
3.	CK9H, MK11H, XG6H, AK13H, AK9H, MK44H, MG3H, AK26H, KG1H, MG1H, BG1H, AG9H, MK27H, BK4H, TK3H, XK2H, AG1H, HK19H, BK18H, MK1H, MK18H, RG8H, KK8H, AK5H, KK21H, XG8H, MK41H, HK18H, RG10H, MK8H, RS8H, XK22H, FG1H, KK22H	+++	-	Açık kahverengi	Kahverengi
4.	MG5H, XK19H, BG8H, BG10H, AG16H, RS21H, MG4H, XK12H, BK17H, BG12H, MK40-aH, HK7H, FG6H, BK9H, AG8H, AG10H	+++	-	Açık sarı	-
5.	HG1H, RG12H, KS17H, TK1H, KK2H, AS16-1H, AK16H, CG4H, AS11H, AG7H, KS8H, AK25H, HK5H, KK1H, KK13H, AK17H	+++	-	Açık sarı	-
6.	RG4H, AK3H, XK21H, KG16H	+++	-	Açık krem	Açık turuncumsu
7.	KG10H, FG5H, RG15H, KK20H	++	-	Çok açık sarı	-
8.	CS4H, AS14H, CG5H, HG15H, CS12H	+++	-	Koyu sarı	Kahverengi
9.	CS3H, RS1H, MS12H	+++	-	Açık krem	-
10.	CK7H, BG3H	+++	-	Sarı	-
11.	CG8H, HK22H, HK20H, CG6H, MK12H, KG17H	+++	-	Açık sarı	-
12.	XG1H, CK10H, XS15H, RK4H	+++	-	Açık krem	-
13.	AS23H, CK1H, KG15H, KS5H, AG17H	+++	-	Açık krem	-

Çizelge 4.4. İzolatların renk gruplandırması (devam)

Renk Grubu	İzolatlar	Gelişimi	Spor Rengi	Substrat Miselyum Rengi	Çözünür Pigment Rengi
14.	AK12H, BK11H	+++	-	Koyu sarı	Sarımsı kahverengi
15.	CS24H, AG20H, BS7H, CG9H, FS10H, HK2H, RS13H, CS22H, AS22H, CS25-aH, CS25H, RG17H	++	-	Turuncu-siyah	-
16.	AS24H, KS21H	+++	-	Açık turuncu	-
17.	KS6H, XS9H, TS3H, CS15H, CS19H, CS17H, HG5H, CS20H, AS5H, XS7H, AS13H	+++	-	Açık sarı	-
18.	MK37H, MK42H, AK19H, FK1H, AK10H, XK7H, CK8H, MK25H, CK4H	+++	Beyaz	Yeşilimsi	Açık yeşil
19.	RG6-2H, BG9H, AG5H, MK5H, MK34H, XK4H, XK16H, BK2H, CS1H, XK17H, MG2H, XG7H, BK5H, XK20H, BG11H	+++	-	Turuncumsu	Açık turuncu
20.	RS11H, RS10H	+++	-	Kahverengi	Açık kahverengi
21.	AK21H, CG2H, CS8H, AG3H	+	-	Açık kahverengi	Açık kahverengi
22.	FG7H	+++	Gri-Beyaz	Koyu kahverengi	Koyu bej
23.	AS21H	++	-	Pembe	-
24.	CS23H	+++	-	Koyu kahverengi	-
25.	HK9H	+++	-	Bej	-
26.	TS6H, TS11H, RS17H	+++	Gri	Kahverengi	Açık kahverengi
27.	KS18H, KS4H, CS9H, XS4H	+++	Gri-Beyaz	Kahverengi	Kahverengi
28.	TG1H, TG4 H	+++	Gri	Kahverengi	Açık kahverengi
29.	AK11H	+++	-	Mor	Mor
30.	MG6H, AG19H, KG18H, AG23H, MG7H, AG21H, FG8H, MG9H, MG8H	+++	-	Koyu kahverengi	Kahverengi
31.	XS12H, KG19H, AS20H, XS14H, CS11H, KS20H	+++	Beyaz	Açık turuncu	Turuncumsu Sarı
32.	RS3H, RG7H, RS14H, AG14H, RG2H, RG16H, KG21H, RG13H, KG13H, FS1H	+++	-	Açık sarı	-
33.	KG3H, AK20H, FG3H	++	-	Krem	-

Çizelge 4.4. İzolatların renk gruplandırması (devam)

Renk Grubu	İzolatlar	Gelişimi	Spor Rengi	Substrat Miselyum Rengi	Çözünür Pigment Rengi
34.	MK36H, MK29H, MK30H, MK35H, MK4H, XK11H, XS10H, MK13H, MK3H, XK1H, MK39H, BG7H, RG5H, HK3H, AK14H, MK2H, XK14H, MK33H, KK3H, BK7H, MK10H, HK15H, XK18H, HK13H, AS9H	+++	-	Koyu kahverengi	Sarımsı kahverengi
35.	MK15H, MK38H, MK43H, XK5H, CK2H, MK7H, HK14H, HK8H, MK20H, AK4H, XK10H, XK9H	+++	-	Siyahımsı kahverengi	Kahverengi
36.	KG9H, KG14H, AS18H, KG7H, AG6H	++	-	Açık krem	-
37.	TS4H, MS1H, FS4H, KS14H, CS16H, CS21H, KS9H, FS7H, CS14H, CS5H, MS11H, BS5H, FS8H, TS14H, XS3H, AS2H, FS9H, CS2H, RS6H, FS5H, RS9H, RS20H, XS13H, KS3H, AS1H, CS18H, KS13H, BS4H, KS11H, KS7H, HS3H, MS7H, MS3H, MS8H, RS2H, XS6H, CG7H, TS1H	+++	Gri	Krem	-
38.	TS9H, RS12H, AS6H, RS15H	+++	Gri-Beyaz	Açık krem	-
39.	KS10H, BS2H	+++	Gri	Kahverengi	Sarımsı kahverengi
40.	FG4H	+++	Beyaz	Koyu sarı	Sarı
41.	CS7H, KG5H, HG6H, BG4H, TS2H, KS16H, AS4H, AK23H, FS6H, AK24H, TS13H, RG1H, CS6H, KG8H, KK4H	+++	-	Krem	-



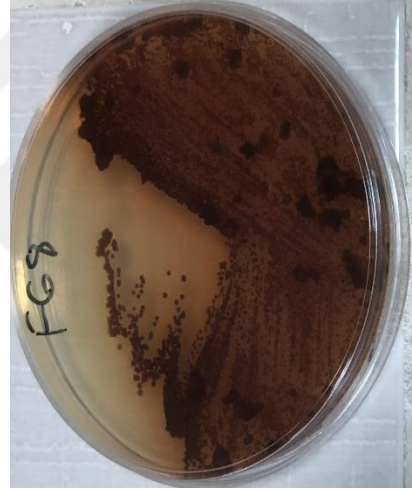
Streptomyces sp. AK11H



Nonomuraea sp. HK9H



Pseudonocardia sp. KG21H



Nonomuraea sp. FG8H

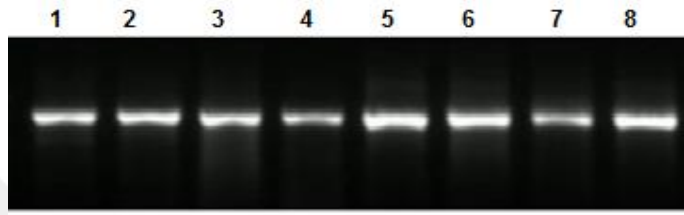
Şekil 4.1. İzolatlara ait petri görüntüleri

4.2. DNA İzolasyonu ve Jel Elektrofrezisi ile DNA'ların Görüntülenmesi

İzolatların tanımlanması amacıyla her renk grubundan bir tane izolat seçildi ve 43 izolatın genomik DNA'sı PureLink® Genomic DNA Mini Kiti (Invitrogen) kullanılarak ekstrakte edildi. Genomik DNA örnekleri agaroz jelde (% 0,8 agaroz (w/v), 1XTBE, 40 dk, 90 V akım) yürütüldü ve UV altında görüntülenerek (Chemidox) DNA izolasyonunun kontrolü sağlandı.

4.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin PCR ile Amplifikasyonu ve 16S rRNA Gen Dizi Analizi

Seçilen 43 organizmanın 16S rRNA kodlayan gen bölgeleri 800R ve 27F (Lane, 1991) evrensel primerleri kullanılarak MyGenie96 (Bioneer, MyGenie96 Thermal Block, Korea) cihazında çoğaltıldı. PCR ürünlerinin baz dizilimi, üç primer (800R, 27F ve MG5F) kullanılarak Macrogen Inc. firmasında hizmet alımı ile belirlendi. Elde edilen 16S rRNA gen dizileri, EzBioCloud sunucusu kullanılarak veritabanlarındaki en yakın akraba türlerin dizi verileri ile karşılaştırıldı ve % benzerlikleri belirlendi.



Şekil 4. 2. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PCR ürünlerinin % 0,8'lik agaroz jeldeki görüntüsü 1: FG8H, 2:XS8H, 3:XS4H, 4:XS13H, 5:RG8H, 6:CG5H, 7:FG5H, 8: HK15H

4.4. Filogenetik Karakterizasyon

Filogenetik analizler için MEGA 7.0 paket programı kullanıldı. Neighbour-joining algoritması kullanılarak test izolatlarının 16S rRNA gen dizisine dayalı filogenetik ağaçları çizildi (Saitou ve Nei, 1987).

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.

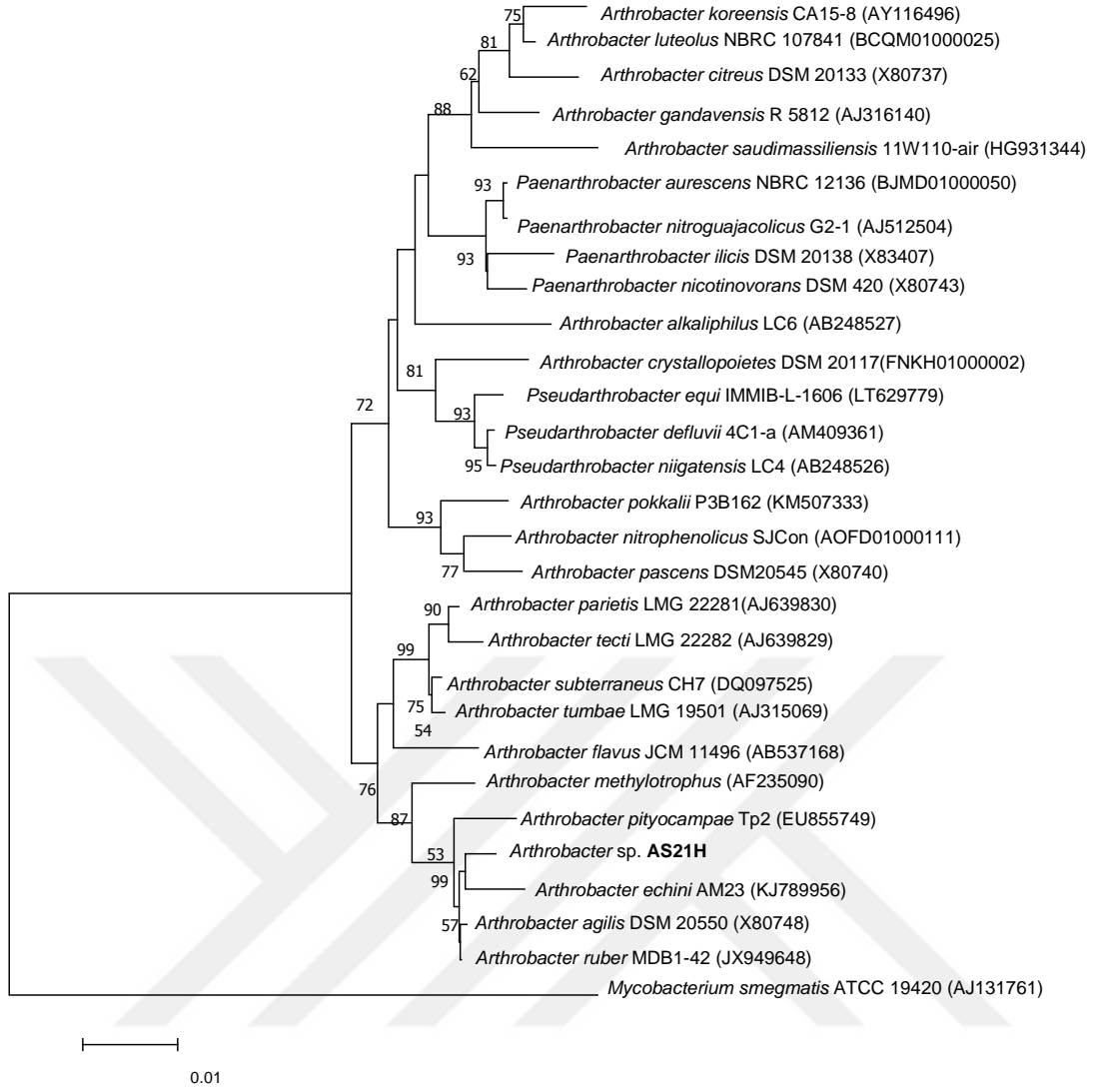
4.4.1. *Arthrobacter* cinsi

16S rRNA gen bölgesinin dizi analizine göre; Erzurum-Oltu bölgesindeki Gökkuşluğu tepeleri olarak bilinen bölgeden alınan kırmızı toprak örneğinden izole edilen AS21H izolatu *Arthrobacter* cinsinin bir üyesidir. Bu izolatın 16S rRNA NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle dizi benzerlik oranı Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. *Arthrobacter* cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
AS21H	MN239847	<i>Arthrobacter ruber</i> MDB1-42 ^T	99.43	8/1398
		<i>Arthrobacter agilis</i> DSM 20550 ^T	99.37	9/1426
		<i>Arthrobacter echini</i> AM23 ^T	99.02	14/1426
		<i>Arthrobacter pityocampae</i> Tp2 ^T	98.65	18/1337
		SMTK_s SLN-3	97.95	29/1416

Neighbour-joining yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Arthrobacter echini* AM23^T tip türü ile yakın kümelenen *Arthrobacter* sp. AS21H izolatı en yakın tip türü olan *Arthrobacter ruber* MDB1-42^T ile % 99,43 dizi benzerliği ve 1398 pozisyonda 8 nükleotit farklılığı göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. *Arthrobacter* cinsine ait izolatin 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'tir.

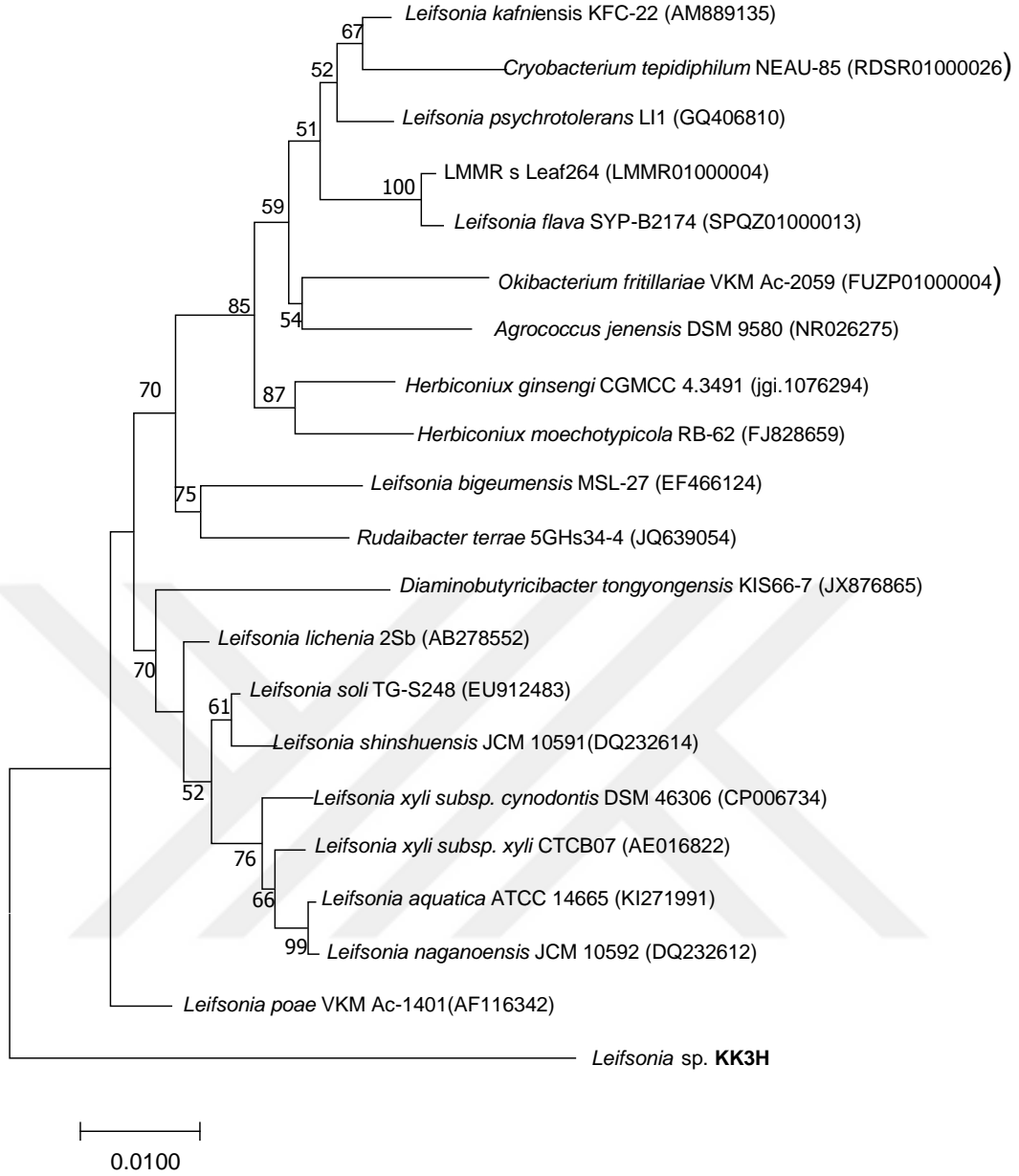
4.4.2. *Leifsonia* cinsi

Antalya-Kumluca bölgesinden alınan toprak örneğinden izole edilen KK3H suşu *Leifsonia* cinsine aittir. Bu izolatın 16S rRNA geni için NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleri ile olan benzerliği Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. *Leifsonia* cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark/ Toplam (nt)
KK3H	MN239865	<i>Leifsonia poae</i> VKM Ac-1401 ^T	93.80	87/1404
		<i>Leifsonia lichenia</i> 2Sb ^T	93.73	88/1404
		<i>Leifsonia soli</i> TG-S248 ^T	93.59	86/1341
		<i>Leifsonia shinshuensis</i> JCM 10591 ^T	92.81	101/1404
		<i>Leifsonia aquatica</i> ATCC 14665 ^T	92.45	106/1404

Leifsonia cinsine ait olan KK3H suşu *Leifsonia poae* VKM Ac-1401^T tip türü ile % 93,80 dizi benzerliği ve 1404 pozisyonda 87 nükleotit farklılığı göstermektedir. Neighbour-joining yöntemine göre oluşturulan filogenetik ağaçta en yakın tip türleriyle ayrı bir küme oluşturmaktadır (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. *Leifsonia* cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir

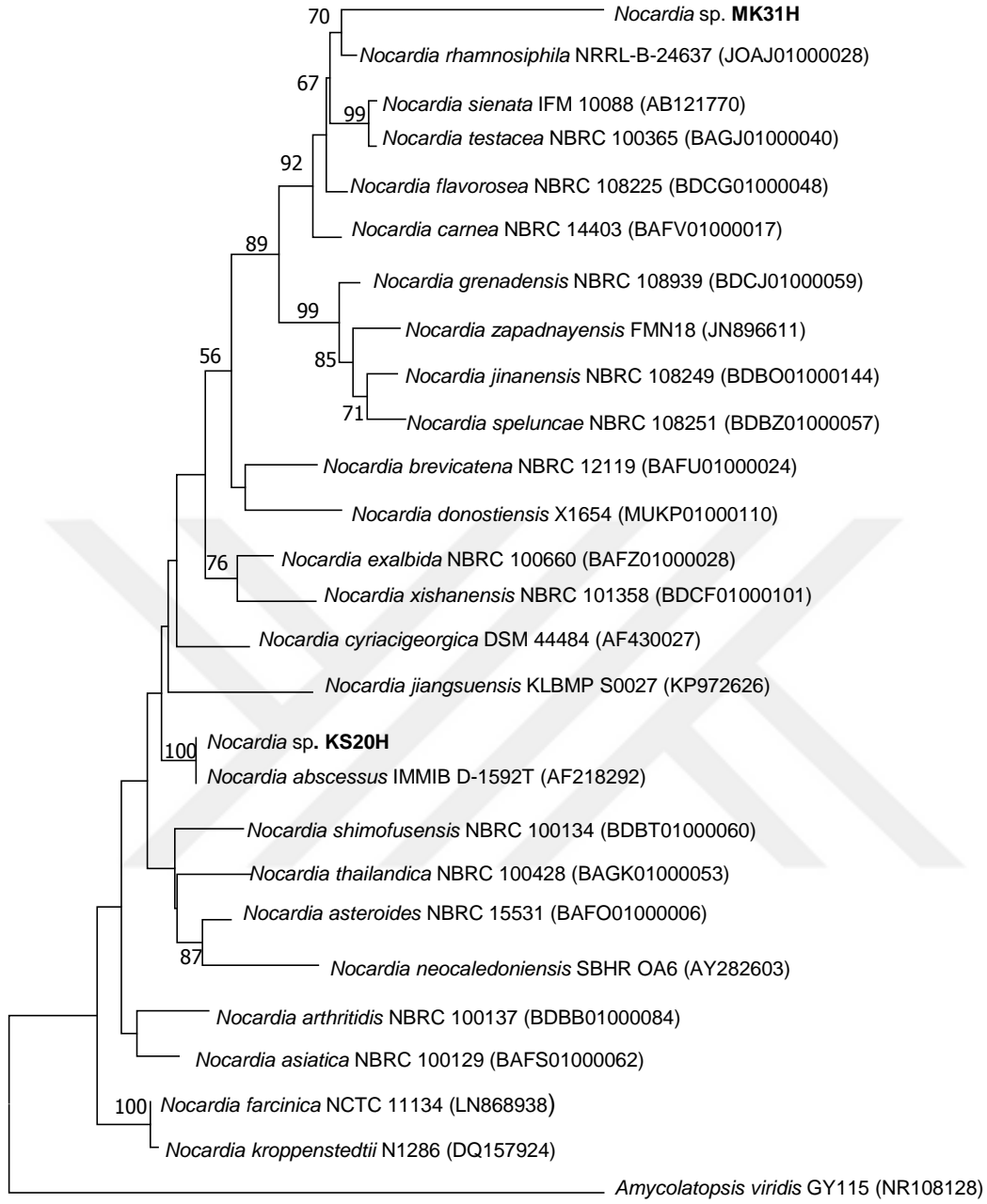
4.4.3. *Nocardia* cinsi

Sırasıyla Erzurum ve Antalya toprağından izole edilen KS20H ve MK31H izolatları *Nocardia* cinsine aittir. Bu izolatların 16S rRNA geni NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle olan benzerliğı Çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Nocardia* cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
KS20H	MN239867	<i>Nocardia abscessus</i> IMMIB D-1592T ^T	100.00	0/1431
		<i>Nocardia asiatica</i> NBRC 100129 ^T	99.03	14/1441
		<i>Nocardia exalbida</i> NBRC 100660 ^T	99.03	14/1441
MK31H	MN239872	<i>Nocardia rhamnosiphila</i> NRRL B 24637 ^T	97.35	38/1432
		<i>Nocardia carnea</i> NBRC 14403 ^T	97.07	42/1432
		<i>Nocardia flavorosea</i> NBRC 108225 ^T	97.07	42/1432

Nocardia cinsine ait olan KS20H izolatı *Nocardia abscessus* IMMIB D-1592T^T tip türü ile %100 dizi benzerliğine sahiptir. *Nocardia* sp. MK31H izolatı ise neighbour-joining algoritmasına göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Nocardia rhamnosiphila* NRRL B 24637^T tip türü ile yakın kümelenmekte ve tip türü ile % 97,35 dizi benzerliğine sahip olup 1432 pozisyonda 38 nükleotit farklılık göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. *Nocardia* cinsine ait izolatların 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'tir.

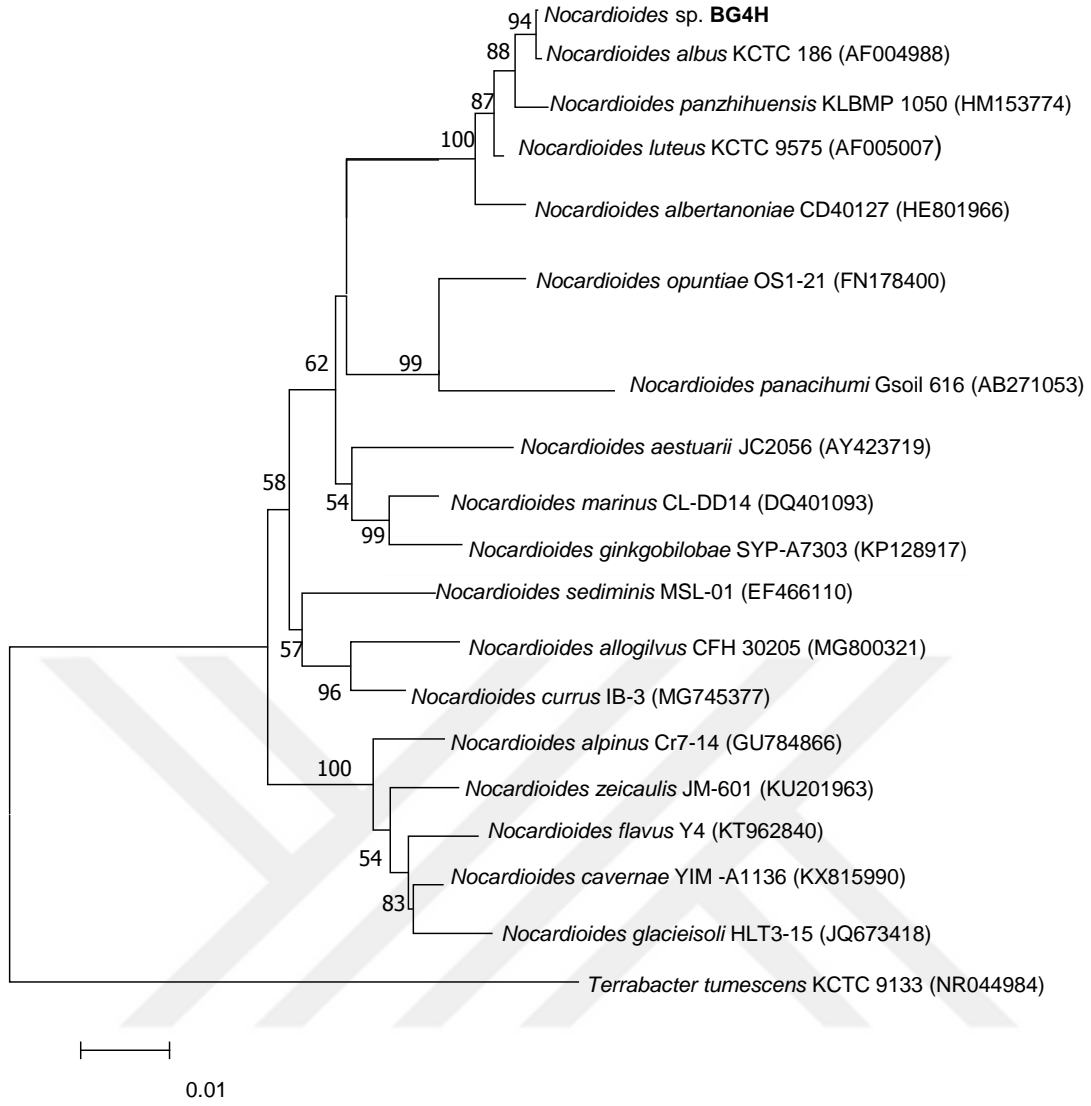
4.4.4. *Nocardioides* cinsi

Erzurum-Oltu bölgesinden alınan yeşil toprak örneğinden BG4H izolatu elde edilmiştir. Bu organizma *Nocardioides* cinsinin bir üyesi olup organizmaya ait 16S rRNA geni NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle dizi benzerlik oranı Çizelge 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4.8. *Nocardioides* cinsine ait izolatu GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
BG4H	MN239848	<i>Nocardioides albus</i> KCTC 9186 ^T	99.93	1/1437
		<i>Nocardioides panzhihuensis</i> KLBMP 1050 ^T	99.30	10/1437
		<i>Nocardioides luteus</i> KCTC 9575 ^T	99.03	14/1436
		<i>Nocardioides albertanoniae</i> CD40127 ^T	97.72	32/1405
		<i>Nocardioides marinus</i> CL-DD14 ^T	96.30	53/1434

Nocardioides sp. BG4H suşu Neighbour-joining algoritmasına göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Nocardioides albus* KCTC 9186^T tip türü ile yakın kümelenir ve tip türü ile % 99,93 dizi benzerliğine ve 1437 pozisyonda 1 nükleotit farklılığa sahiptir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. *Nocardiooides* cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir.

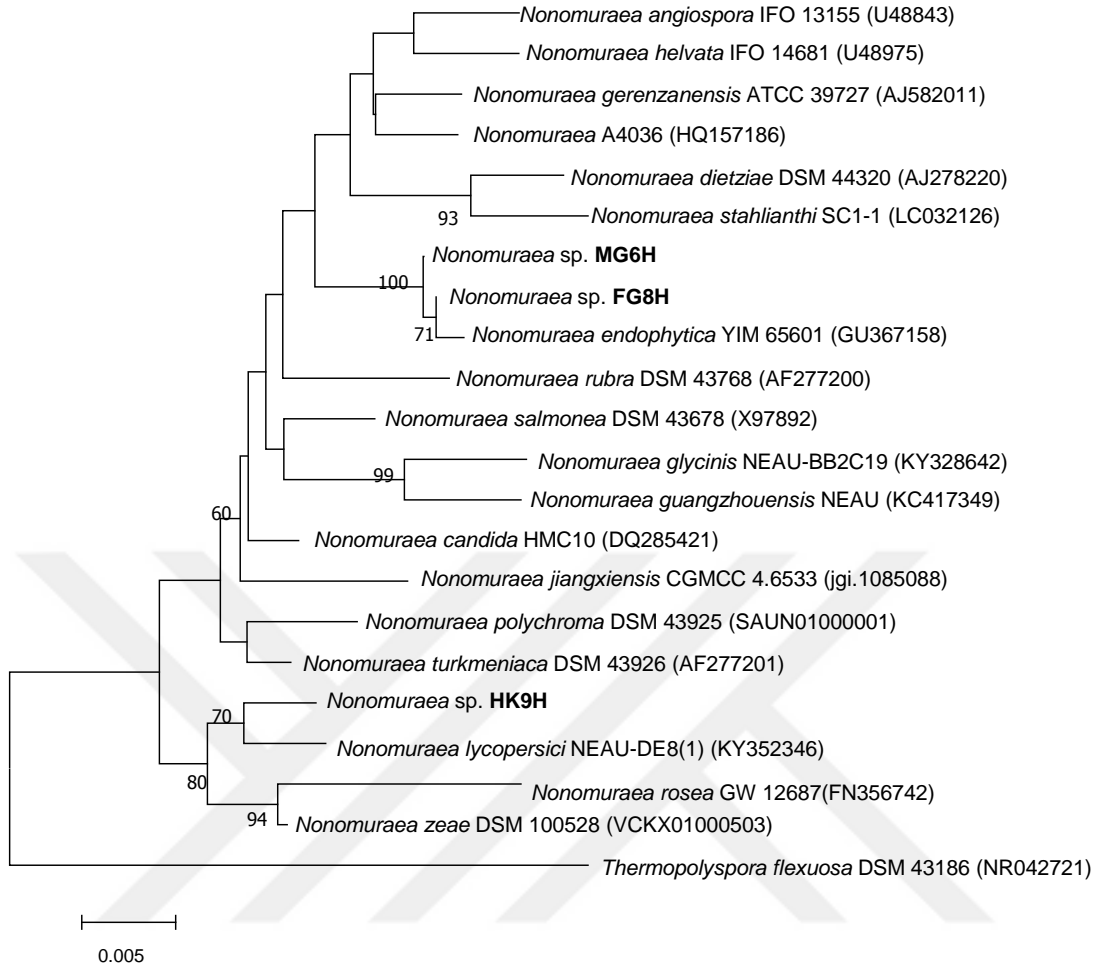
4.4.5. *Nonomuraea* cinsi

Erzurum ve Antalya bölgelerinden alınan toprak örneklerinden *Nonomuraea* cinsine ait üç izolat elde edilmiştir. HK9H, MG6H ve FG8H izolatlarının 16S rRNA geni NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle dizi benzerlik oranı Çizelge 4.9' da verilmiştir.

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

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
HK9H	MN239861	<i>Nonomuraea lycopersici</i> NEAU-DE8(1) ^T	99.10	13/1441
		<i>Nonomuraea zea</i> DSM 100528 ^T	98.89	16/1442
		<i>Nonomuraea polychroma</i> DSM 43925 ^T	98.61	20/1441
FG8H	MN239860	<i>Nonomuraea endophytica</i> YIM 65601 ^T	99.79	3/1445
		<i>Nonomuraea candida</i> HMC10 ^T	98.71	18/1398
		<i>Nonomuraea salmonea</i> DSM 43678 ^T	98.54	21/1437
MG6H	MN239869	<i>Nonomuraea endophytica</i> YIM 65601 ^T	99.72	4/1445
		<i>Nonomuraea candida</i> HMC10 ^T	98.78	18/1398
		<i>Nonomuraea turkmeniaca</i> DSM 43926 ^T	98.66	19/1416

Neighbour-joining algoritmasına göre çizilen filogenetik ağaçta *Nonomuraea* cinsine ait olan HK9H izolatı *Nonomuraea lycopersici* NEAU-DE8(1)^T tip türü ile yakın kümelenir. İzolatın *Nonomuraea lycopersici* NEAU-DE8(1)^T tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerliği % 99,10 olup 1441 pozisyonda 13 nükleotit farklılığa sahiptir. FG8H ve MG6H suşları ise filogenetik ağaçta *Nonomuraea endophytica* YIM 65601^T tip türü ile yakın kümelenirler (Şekil 4.7). Bu suşların *Nonomuraea endophytica* YIM 65601^T tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları sırasıyla % 99,79 ve % 99,72' dir. Kendi aralarındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği ise % 99,86' dır.



Şekil 4. 7. *Nonomuraea* cinsine ait izolatların 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.005'tir.

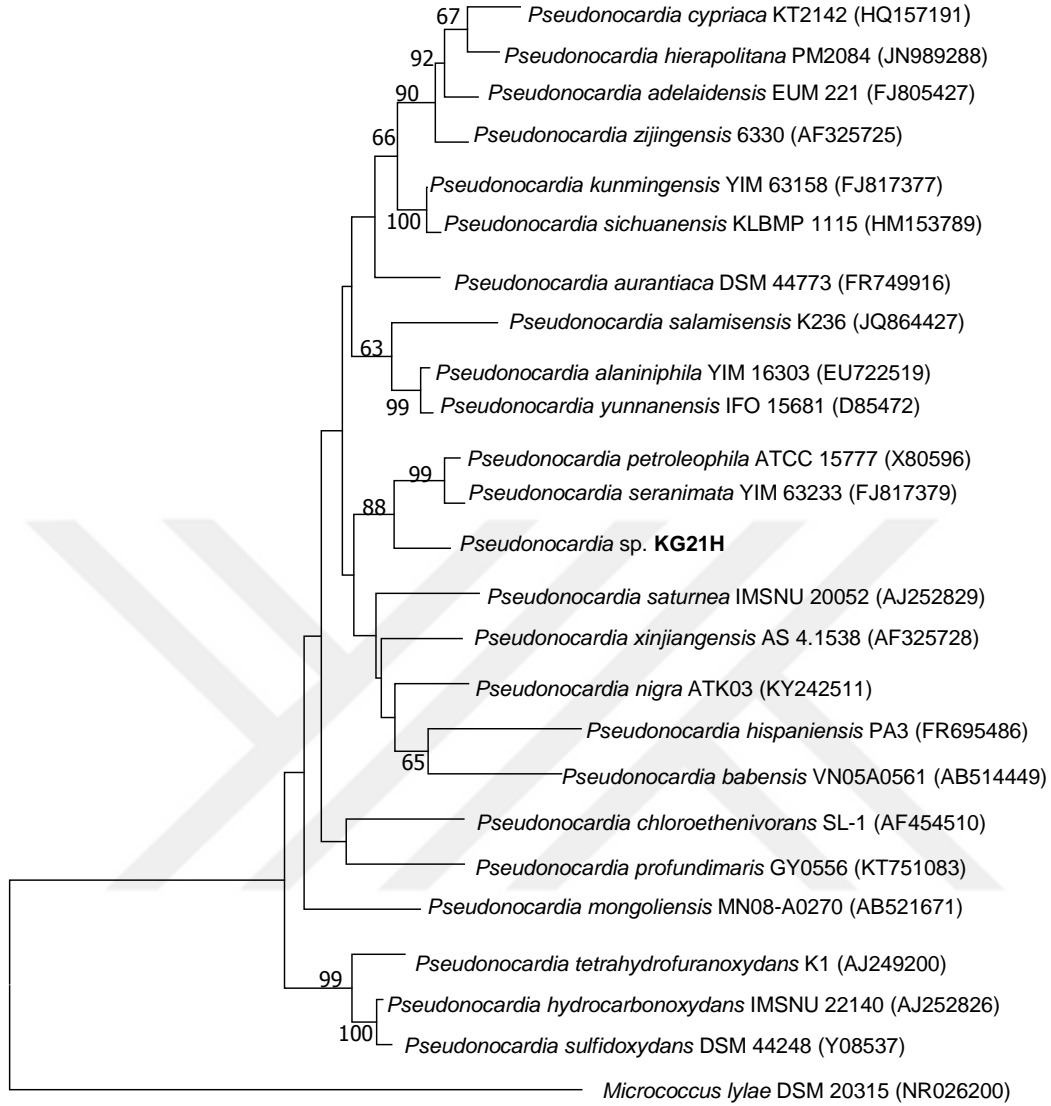
4.4.6. *Pseudonocardia* cinsi

Erzurum-Oltu bölgesinden alınan 2. Toprak örneğinden izole edilen KG21H izolatu bu cinsin bir üyesi olup 16S rRNA geni NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle dizi benzerlik oranı Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. *Pseudonocardia* cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
KG21H	MN239864	<i>Pseudonocardia petroleophila</i> ATCC 15777 ^T	98.83	16/1366
		<i>Pseudonocardia seranimata</i> YIM 63233 ^T	98.59	20/1422
		<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> YIM 16303 ^T	98.20	26/1442
		<i>Pseudonocardia yunnanensis</i> IFO 15681 ^T	97.99	29/1441
		<i>Pseudonocardia nigra</i> ATK03 ^T	97.91	30/1436

Pseudonocardia sp. KG21H suşu neighbour-joining algoritmasına göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Pseudonocardia petroleophila* ATCC 15777^T ve *Pseudonocardia seranimata* YIM 63233^T tip türleri ile yakın kümelenmektedir (Şekil 4.8). *Pseudonocardia* sp. KG21H suşu *Pseudonocardia petroleophila* ATCC 15777^T tip türü ile % 98,83 dizi benzerliği ve 1366 pozisyonda 16 nükleotit farklılık gösterirken *Pseudonocardia seranimata* YIM 63233^T tip türü ile % 98,59 dizi benzerliği ve 1422 pozisyonda 20 nükleotit farklılık göstermektedir.



Şekil 4. 8. *Pseudonocardia* cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir.

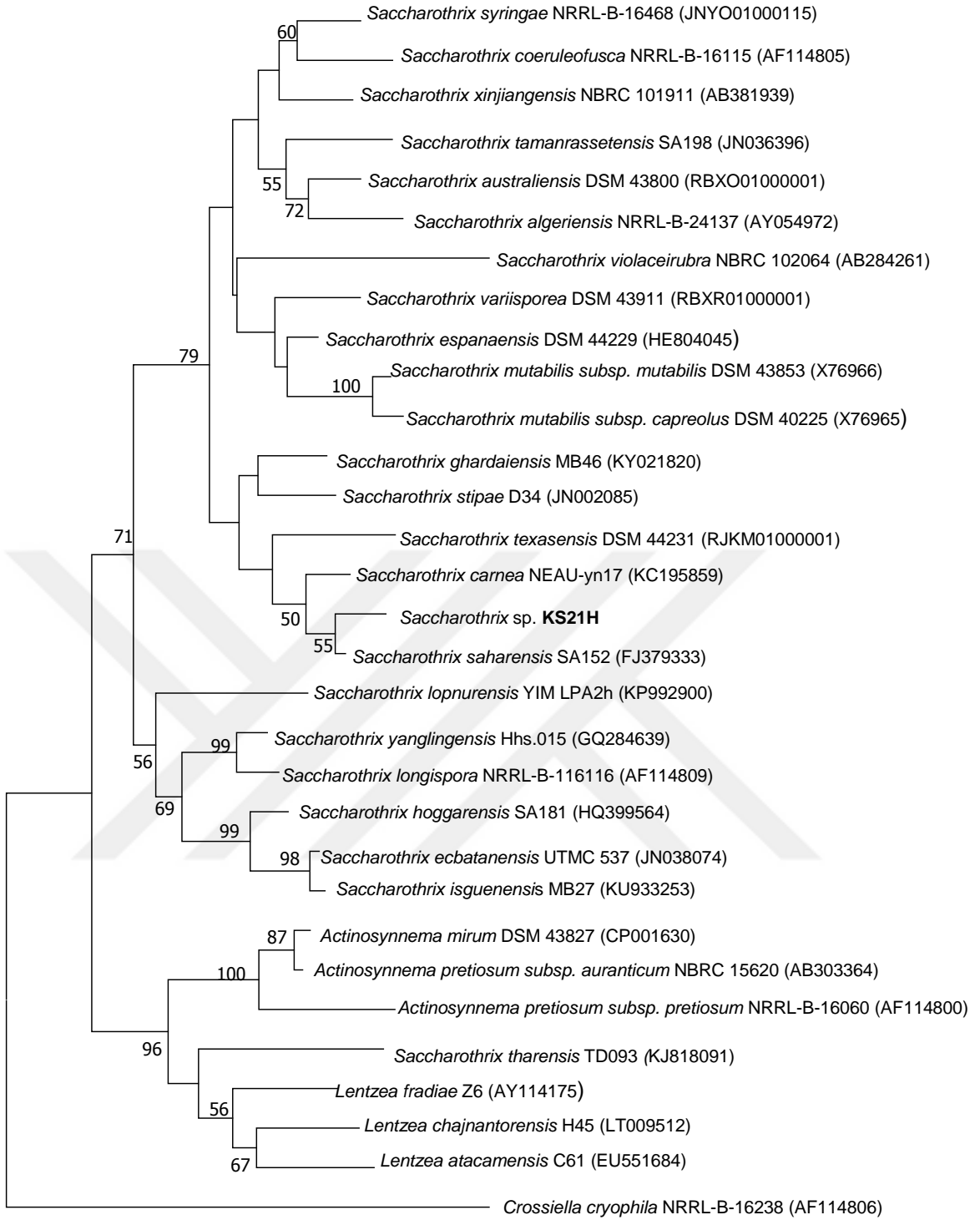
4.4.7. *Saccharothrix* cinsi

Erzurum-Oltu bölgesindeki gökkuşağı tepelerinden alınan toprak örneğinden *Saccharothrix* cinsine ait bir izolat elde edilmiştir. *Saccharothrix* sp. KS21H izolatının 16S rRNA geni NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle dizi benzerlik oranı Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. *Saccharothrix* cinsine ait izolatın GenBank numarası, 16S rRNA gen benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	Genbank No	En yakın tip türü	Benzerlik (%)	Fark / Toplam (nt)
KS21H	MN239868	<i>Saccharothrix saharensis</i> SA152 ^T	99.58	6/1440
		<i>Saccharothrix carnea</i> NEAU-yn17 ^T	99.24	11/1440
		<i>Saccharothrix texasensis</i> DSM 44231 ^T	99.17	12/1440
		<i>Saccharothrix xinjiangensis</i> NBRC 101911 ^T	98.96	15/1437
		<i>Saccharothrix hoggarensis</i> SA181 ^T	98.82	17/1438

Saccharothrix cinsine ait olan KS21H izolatı *Saccharothrix saharensis* SA152^T tip türü ile % 99,58 dizi benzerliğine ve 1440 pozisyonda 6 nükleotit farklılığa sahip olup filogenetik ağaçta tip türü ile aynı kümede bulunur. *Saccharothrix carnea* NEAU-yn17^T ve *Saccharothrix texasensis* DSM 44231^T tip türleriyle de yakın ilişkilidir (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9. *Saccharothrix* cinsine ait izolatın 16S rRNA gen dizi analizine dayalı filogenetik ilişkilerini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.005'tir.

4.4.8. *Streptomyces* cinsi

Erzurum ve Antalya illerinden alınan 3 toprak örneğinden *Streptomyces* cinsine ait 33 izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 16S rRNA geni NCBI GenBank numarası ve en yakın tip türleriyle dizi benzerlik oranı Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4. 12. *Streptomyces* cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları

İzolat No	GenBank No	En Yakın Tip Tür	Benzerlik (%)	Nt farkı
AG7H	MN239840	<i>Streptomyces mauvecolor</i> LMG 20100 ^T	99.03	14/1447
		<i>Streptomyces sannanensis</i> NBRC 14239 ^T	99.02	14/1429
AG9H	MN239841	<i>Streptomyces lunaelactis</i> MM109 ^T	99.23	11/1420
		<i>Streptomyces maoxianensis</i> NEAU-Spg16 ^T	99.10	13/1448
AK11H	MN239842	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 ^T	98.96	15/1447
		<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T	98.83	17/1447
AK12H	MN239843	<i>Streptomyces durhamensis</i> NRRL B-3309 ^T	98.55	21/1447
		<i>Streptomyces filipinensis</i> NBRC 12860 ^T	98.41	23/1445
AS14H	MN239845	<i>Streptomyces fragilis</i> NRRL 2424 ^T	99.72	4/1447
		<i>Streptomyces chilikensis</i> RC 1830 ^T	99.59	6/1447
AS18H	MN239846	<i>Streptomyces xantholiticus</i> NBRC 13354 ^T	99.23	11/1435
		<i>Streptomyces peucetius</i> JCM 9920 ^T	99.17	12/1449
AS5H	MN239844	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ^T	99.72	4/1444
		<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	99.65	5/1449
BG10H	MN239850	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> ATCC 700248 ^T	99.09	13/1449
		<i>Streptomyces reticuliscabiei</i> NRRL B-24446 ^T	99.03	14/1449

Çizelge 4.12. *Streptomyces* cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları (devam)

İzolat No	GenBank No	En Yakın Tip Tür	Benzerlik (%)	Nt farkı
BG9H	MN239849	<i>Streptomyces huasconensis</i> HST28 ^T	99.79	3/1448
		<i>Streptomyces kanamyceticus</i> NBRC 13414 ^T	98.96	15/1446
CG5H	MN239851	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414 ^T	99.72	4/1447
		<i>Streptomycesnojiriensis</i> LMG 20094 ^T	99.72	4/1447
CS11H	MN239854	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	99.86	2/1450
		<i>Streptomyces sindenensis</i> NBRC 3399 ^T	99.86	2/1448
CS17H	MN239855	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ^T	99.72	4/1444
		<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	99.65	5/1449
CS20H	MN239856	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ^T	99.72	4/1444
		<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	99.65	5/1449
CS23H	MN239857	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ^T	99.38	9/1443
		<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	99.31	10/1445
CS6H	MN239853	<i>Streptomyces galilaeus</i> JCM 4757 ^T	100.00	0/1448
		<i>Streptomyces bobili</i> NRRL B-1338 ^T	99.93	1/1448
FG5H	MN239858	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 13077 ^T	99.65	5/1447
		<i>Streptomyces luteogriseus</i> NBRC 13402 ^T	99.65	5/1425
FG7H	MN239859	<i>Streptomyces netropsis</i> NBRC 3723 ^T	99.93	1/1445
		<i>Streptomyces stramineus</i> NBRC 16131 ^T	99.24	11/1445
HK15H	MN239862	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 ^T	98.76	18/1447
		<i>Streptomyces glomeratus</i> LMG 19903 ^T	98.69	19/1447

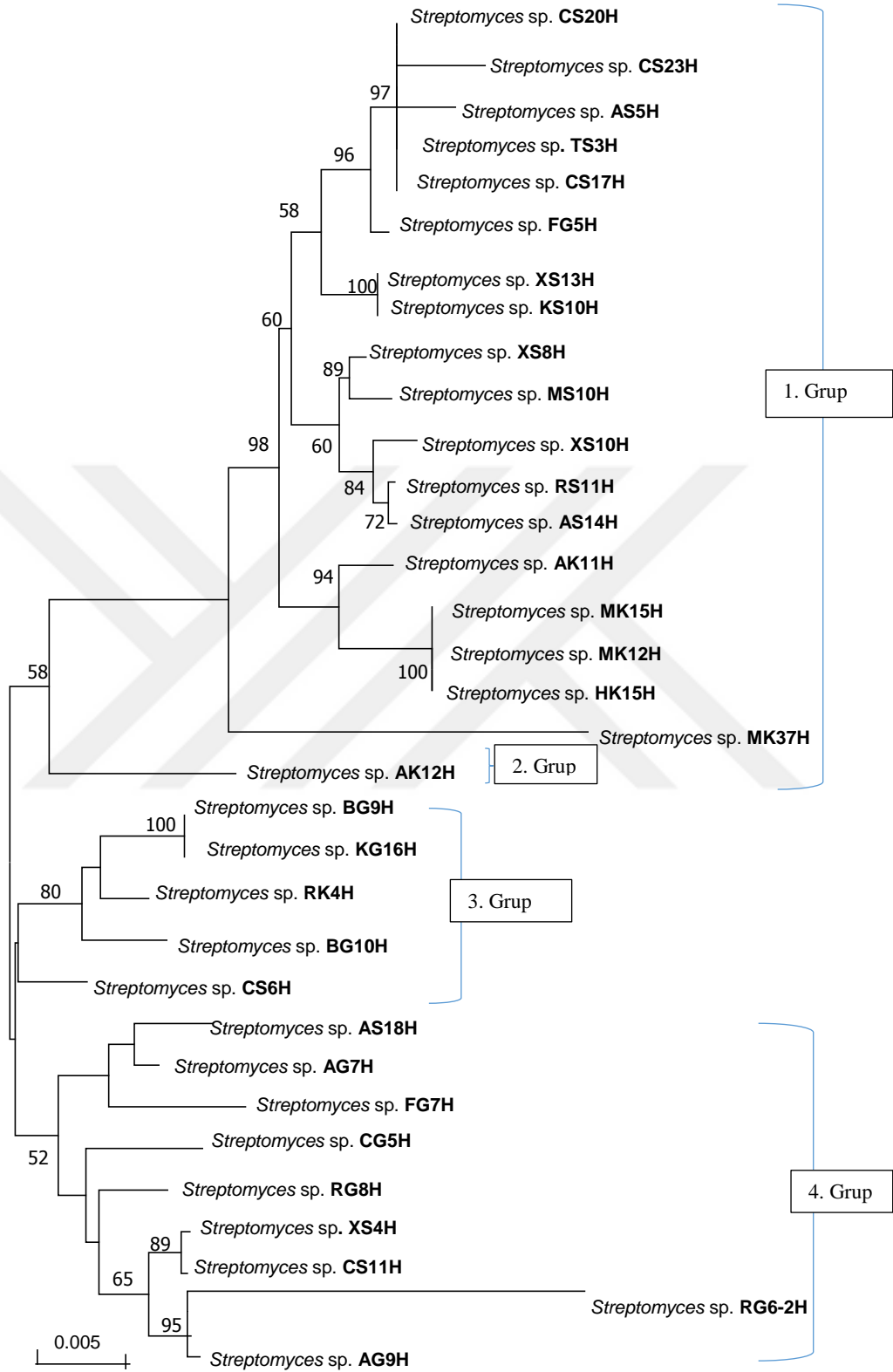
Çizelge 4.12. *Streptomyces* cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları (devam)

İzolat No	GenBank No	En Yakın Tip Tür	Benzerlik (%)	Nt farkı
KG16H	MN239863	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> ATCC 700248 ^T	99.03	14/1448
		<i>Streptomyces reticuliscabiei</i> NRRL B-24446 ^T	98.96	15/1448
KS10H	MN239866	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T	100.00	0/1448
		<i>Streptomyces enissocaesilis</i> NRRL B-16365 ^T	100.00	0/1448
MK12H	MN239870	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 ^T	98.76	18/1447
		<i>Streptomyces glomeratus</i> LMG 19903 ^T	98.69	19/1447
MK15H	MN239871	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34 ^T	98.75	18/1436
		<i>Streptomyces glomeratus</i> LMG 19903 ^T	98.69	19/1436
MK37H	MN239873	<i>Streptomyces yogyakartensis</i> NBRC 100779 ^T	99.37	9/1431
		<i>Streptomyces javensis</i> NBRC 100777 ^T	99.37	9/1431
MS10H	MN239874	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	99.58	6/1438
		<i>Streptomyces rubrogriseus</i> LMG 20318 ^T	99.31	10/1438
RG6-2H	MN239875	<i>Streptomyces lunaelactis</i> MM109 ^T	97.32	38/1419
		<i>Streptomyces maoxianensis</i> NEAU-Spg16 ^T	97.21	40/1436
RG8H	MN239876	<i>Streptomyces narbonensis</i> NBRC 12801 ^T	99.86	2/1447
		<i>Streptomyces gardneri</i> NBRC 12865 ^T	99.79	3/1448
RK4H	MN239877	<i>Streptomyces arcticus</i> ZLN234 ^T	98.90	16/1450
		<i>Streptomyces aureus</i> NBRC 100912 ^T	98.69	19/1450
RS11H	MN239878	<i>Streptomyces fragilis</i> NRRL 2424 ^T	99.65	5/1447
		<i>Streptomyces chilikensis</i> RC 1830 ^T	99.52	7/1447

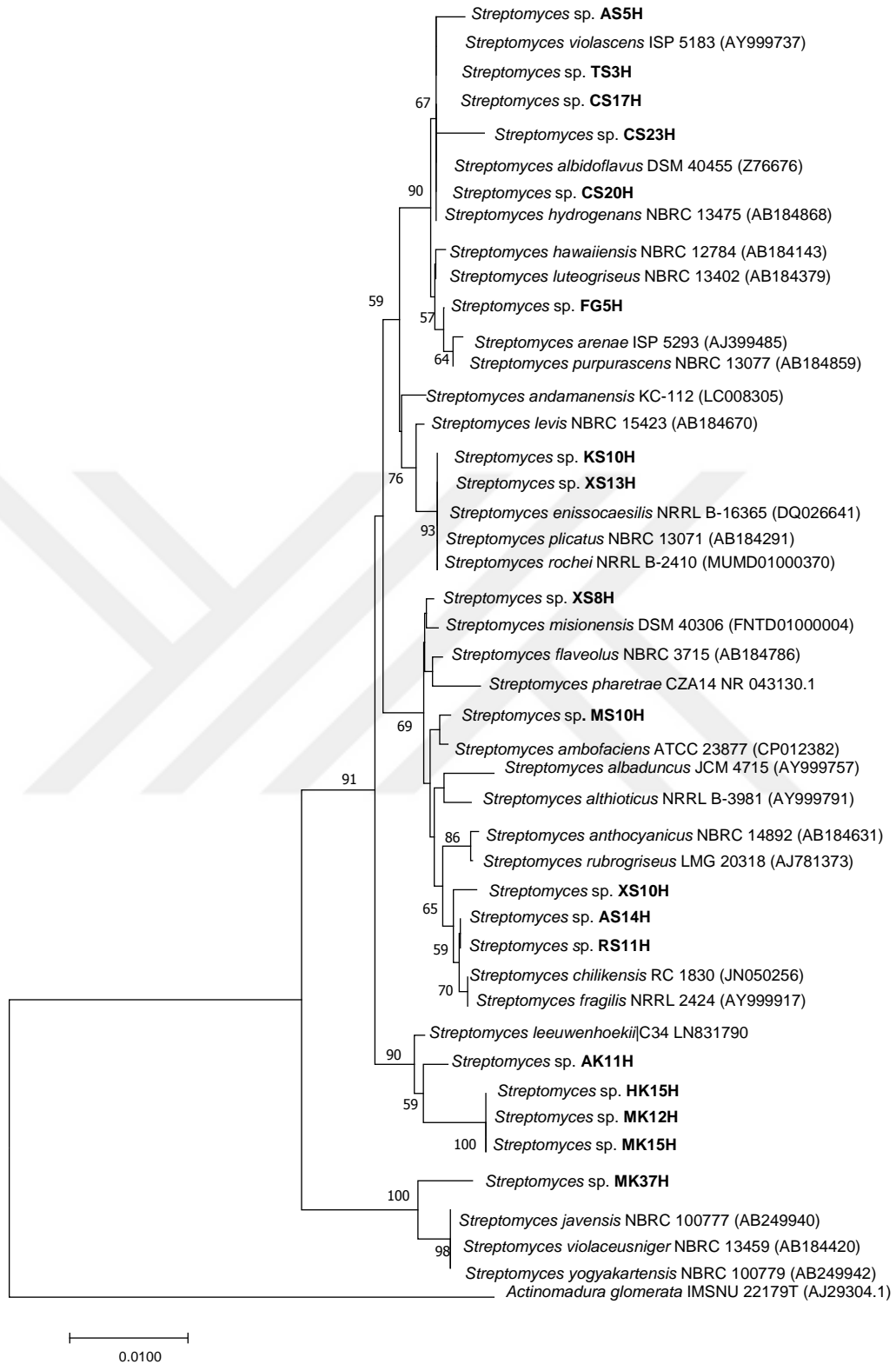
Çizelge 4.12. *Streptomyces* cinsine ait izolatların GenBank numarası, 16S rRNA gen dizi benzerliğine göre en yakın tip türleri ve benzerlik oranları (devam)

İzolat No	GenBank No	En Yakın Tip Tür	Benzerlik (%)	Nt farkı
TS3H	MN239879	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455 ^T	99.72	4/1444
		<i>Streptomyces hydrogenans</i> NBRC 13475 ^T	99.65	5/1449
XS10H	MN239882	<i>Streptomyces pharetrae</i> CZA14 ^T	99.52	7/1448
		<i>Streptomyces glaucescens</i> NBRC 12774 ^T	99.52	7/1447
XS13H	MN239883	<i>Streptomyces rochei</i> NRRL B-2410 ^T	100.00	0/1448
		<i>Streptomyces enissocaesilis</i> NRRL B-16365 ^T	100.00	0/1448
XS4H	MN239880	<i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593 ^T	99.93	1/1448
		<i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000 ^T	99.93	1/1448
XS8H	MN239881	<i>Streptomyces misionensis</i> DSM 40306 ^T	99.52	7/1447
		<i>Streptomyces levis</i> NBRC 15423 ^T	99.51	7/1432

Bu cinse ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişki, neighbour-joining algoritmasına göre belirlendi ve izolatlar dört grup halinde incelendi (Şekil 4.10). Bu cinse ait izolatlar arasındaki 16S rRNA geni dizi benzerlik oranları GGDC sunucusunda (<https://ggdc.dsmz.de/>) belirlendi.



Şekil 4. 10. *Streptomyces* cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi.



Şekil 4. 11. 1. Grup *Streptomyces* cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir.

Streptomyces sp. AS5H, CS17H, CS20H, TS3H ve CS23H suşları *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T ve *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T tip türleri ile yakın ilişkili olup filogenetik ağaçta aynı kümede yer alırlar (Şekil 4.11). AS5H, CS17H, CS20H ve TS3H suşlarının *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T tip türü ile dizi benzerliği % 99,72 olup 1444 pozisyonda 4 nükleotit farklılık göstermektedirler. Bu suşların *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T tip türü ile dizi benzerliği ise % 99,65 olup 1449 pozisyonda 5 nükleotit farklılığa sahiptirler.

Streptomyces sp. CS23H izolatu ise *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455^T tip türü ile % 99,38 (1443 pozisyonda 9 nükleotit) dizi benzerliği gösterirken *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475^T tip türüyle % 99,31 dizi benzerliğine (1445 pozisyonda 10 nükleotit) sahiptir (Şekil 4.11). CS23H suşu ile AS5H, CS17H, CS20H, TS3H suşları arasındaki dizi benzerliği ise % 99,65'tir.

Streptomyces sp. FG5H suşu *Streptomyces purpurascens* NBRC 13077^T ve *Streptomyces luteogriseus* NBRC 13402^T tip türleri ile yakın ilişkilidir (Şekil 4.11). Bu suş *Streptomyces purpurascens* NBRC 13077^T tip türü ile % 99,65 (1447 pozisyonda 5 nükleotit) dizi benzerliğine sahipken *Streptomyces luteogriseus* NBRC 13402^T tip türü ile 1425 pozisyonda 5 nükleotit farklılık göstererek % 99,65 dizi benzerliğine sahiptir.

Streptomyces rochei NRRL B-2410^T ve *Streptomyces enissocaesilis* NRRL B-16365^T tip türleriyle aynı kümede bulunan KS10H ve XS13H izolatları arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği oranı %100 olup *Streptomyces rochei* NRRL B-2410^T tip türü ile de % 100 dizi benzerliğine sahiptirler (Şekil 4.11).

Streptomyces cinsinin üyesi olan XS8H suşu ise *Streptomyces misionensis* DSM 40306^T tip türü 1447 pozisyonda 7 nükleotit farklılık gösterir ve tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerliği oranı % 99,52'dir (Şekil 4.11).

Streptomyces sp. MS10H suşu, *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877^T tip türü yakın ilişkili olup filogenetik ağaçta aynı kümeye yerleşirler (Şekil 4.11). MS10H suşu ile tip türü arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı % 99,59'dur (1449 pozisyonda 6 nükleotit).

Streptomyces sp. RS11H ve AS14H suşları *Streptomyces fragilis* NRRL 2424^T ve *Streptomyces chilikensis* RC 1830^T tip türleri ile yakınlık gösterirler (Şekil 4.11).

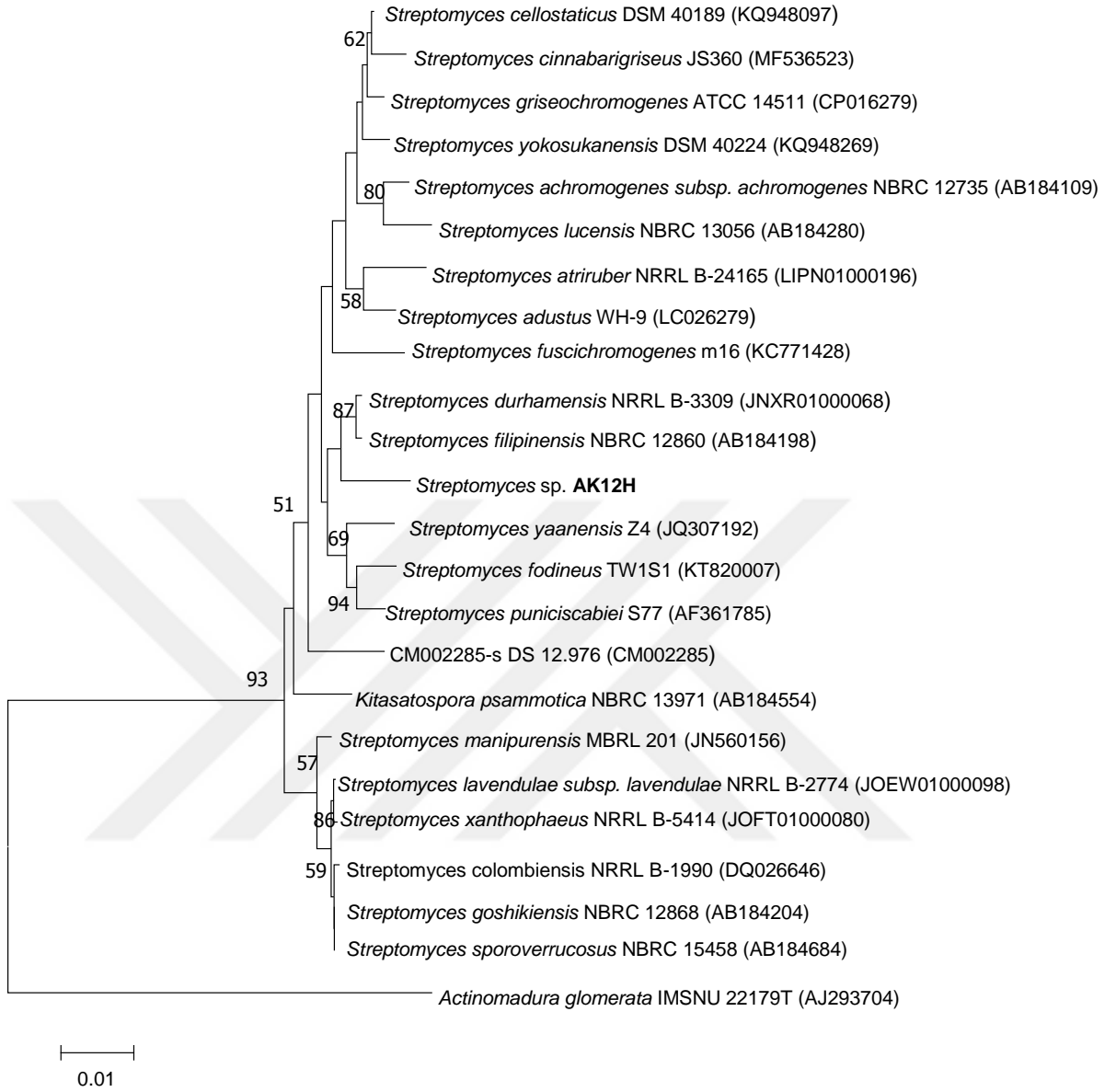
Streptomyces sp. RS11H suşu *Streptomyces fragilis* NRRL 2424^T tip türü ile % 99,65 dizi benzerliğine ve 1447 pozisyonda 5 nükleotit farklılığa sahiptir. *Streptomyces* sp. AS14H suşunun *Streptomyces fragilis* NRRL 2424^T tip türü ile dizi benzerlik oranı ise % 99,72 olup 1447 pozisyonda 4 nükleotit farklılığa sahiptir. RS11H ve AS14H suşları arasındaki 16S rRNA gen benzerlik oranı ise % 99,93'tür (Şekil 4.11).

Streptomyces cinsinin bir üyesi olan XS10H suşu ise *Streptomyces pharetrae* CZA14^T tip türüne yakınlık gösterir. Tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı % 99,52 olup 1448 pozisyonda 7 nükleotit farklılık göstermektedir (Şekil 4.11).

Streptomyces sp. AK11H, MK12H, MK15H ve HK15H suşları *Streptomyces leeuwenhoekii* C34^T tip türüyle yakın ilişkilidir (Şekil 4.11). MK12H, MK15H ve HK15H suşlarının *Streptomyces leeuwenhoekii* C34^T tip türüyle dizi benzerliği % 99,76 olup 1447 pozisyonda 18 nükleotit farklılığa sahiptirler. *Streptomyces* sp. MK12H, MK15H ve HK15H suşlarının kendi aralarındaki benzerlik oranı ise % 100'dür.

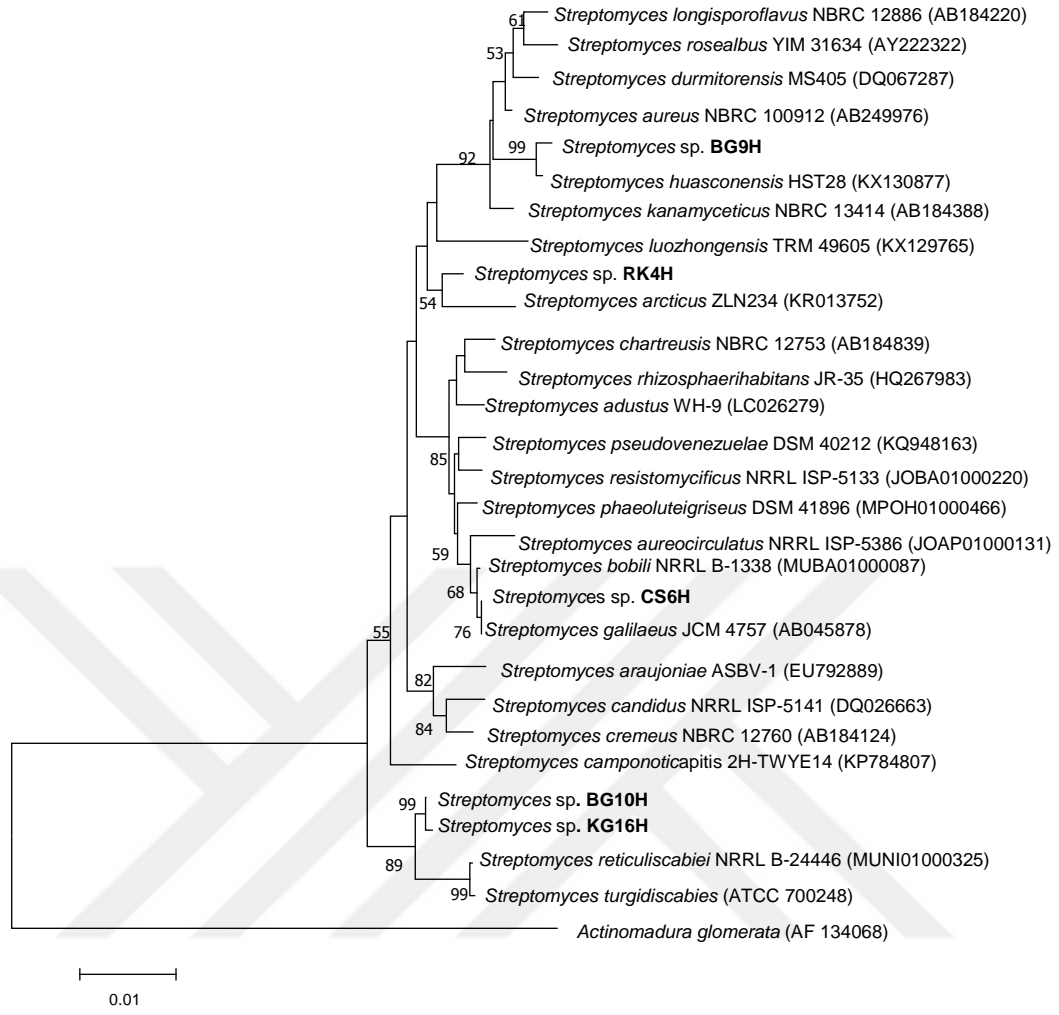
Streptomyces sp. AK11H suşu ise *Streptomyces leeuwenhoekii* C34^T tip türü ile % 98,96 dizi benzerliğine ve 1447 pozisyonda 15 nükleotit farklılığa sahiptir (Şekil 4.11). AK11H suşunun MK12H, MK15H ve HK15H suşları ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı ise % 99,25'tir.

Streptomyces yogyakartensis NBRC 100779^T tip türü ile *Streptomyces* sp. MK37H suşu yakın ilişkilidir (Şekil 4.11). MK37H suşu ile *Streptomyces yogyakartensis* NBRC 100779^T tip türü arasındaki 16S rRNA gen dizi benzerliği %99,38 olup 1442 pozisyonda 9 nükleotit farklılık görülür.



Şekil 4. 12. 2. Grupta bulunan AK12H suşunun tip türleriyle filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde olan dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir

Streptomyces sp. AK12H suşu, *Streptomyces durhamensis* NRRL B-3309^T ve *Streptomyces filipinensis* NBRC 12860^T tip türleriyle yakın ilişkili olup filogenetik ağaçta tip türleriyle aynı kümede bulunur (Şekil 4.12). AK12H suşunun *Streptomyces durhamensis* NRRL B-3309^T tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerliği % 98,55'iken (1447 pozisyonda 21 nükleotit) *Streptomyces filipinensis* NBRC 12860^T tip türleriyle dizi benzerlik oranı ise % 98,41'dir (1445 pozisyonda 23 nükleotit).



Şekil 4. 13. 3. Grup *Streptomyces* cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir

Streptomyces cinsine ait olan BG9H suşu *Streptomyces huasconensis* HST28^T ve *Streptomyces kanamyceticus* NBRC 13414^T ve tip türleri ile yakınlık göstermektedirler (Şekil 4.13).

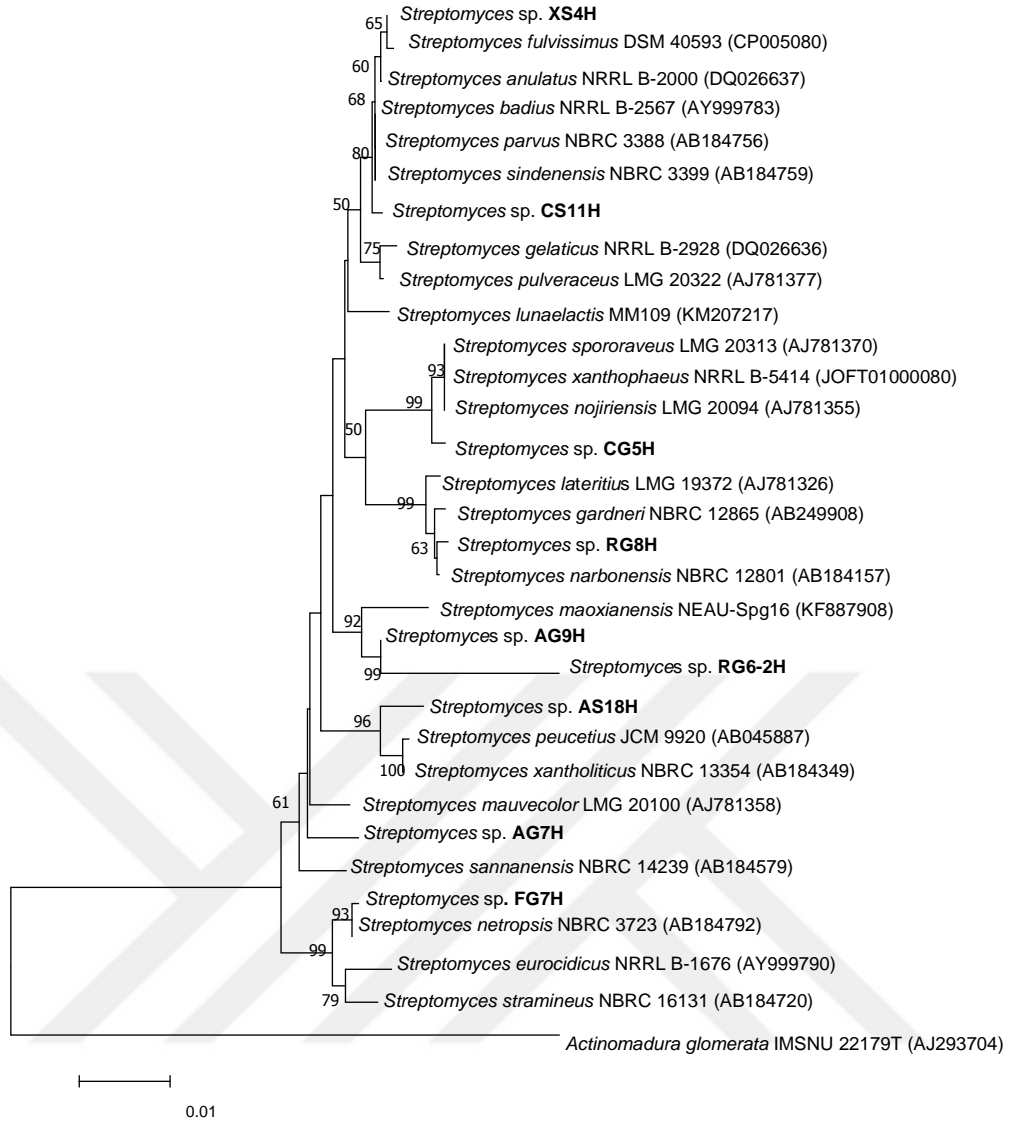
BG9H suşunun *Streptomyces huasconensis* HST28^T ve *Streptomyces kanamyceticus* NBRC 13414^T tip türleri ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları sırasıyla % 99,79 (1448 pozisyonda 3) ve % 98,96 (1446 pozisyonda 15 nükleotit)'dir.

Streptomyces sp. KG16H suşu ise *Streptomyces turgidiscabies* ATCC 700248^T ve *Streptomyces reticuliscabiei* NRRL B-24446^T tip türleri ile yakın akraba olup 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları sırasıyla %99,03 (1448 pozisyonda 14 nükleotit) ve % 98,96'dır (1448 pozisyonda 15 nükleotit)(Şekil 4.13).

Streptomyces sp. RK4H suşu, *Streptomyces arcticus* ZLN234^T tip türü ile yakın ilişkili olup 1450 pozisyonda 16 nükleotit farklılık gösterir ve tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı % 98,90'dır (Şekil 4.13).

Filogenetik ağaçta *Streptomyces galilaeus* JCM 4757^T tip türü ile aynı kümede bulunan CS6H suşunun *Streptomyces galilaeus* JCM 4757^T tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerliği % 100'dür (1448 pozisyonda 0 nükleotit) (Şekil 4.13).

Streptomyces sp. BG10H suşu *Streptomyces turgidiscabies* ATCC 700248^T ve *Streptomyces reticuliscabiei* NRRL B-24446^T tip türleri ile yakınlık göstermektedir (Şekil 4.13). BG10H suşu, *Streptomyces turgidiscabies* ATCC 700248^T tip türü ile 1449 pozisyonda 13 nükleotit farklılığa sahip olup dizi benzerliği % 99,09'dur. Bu suşun *Streptomyces reticuliscabiei* NRRL B-24446^T tip türü ile dizi benzerlik oranı ise % 99,03'tür (1449 pozisyonda 14 nükleotit).



Şekil 4. 14. 4. Grup *Streptomyces* cinsine ait izolatlar arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram neighbour-joining algoritmasına göre çizildi. Ağaçta, % 50'nin üzerinde desteklenen dallanma noktaları için bootstrap değerleri verildi ve bootstrap analizi 1000 kez tekrar edildi. Nükleotit pozisyon değişimi 0.01'dir

Streptomyces sp. XS4H izolatı filogenetik ağaçta *Streptomyces fulvissimus* DSM 40593^T tip türü ile birlikte kümelenir (Şekil 4.14). XS4H suşunun *Streptomyces fulvissimus* DSM 40593^T tip türü ile dizi benzerlik oranı % 99,93 olup 1448 pozisyonda 1 nükleotit farklılık görülür. XS4H suşu yine % 99,93 dizi benzerlik oranıyla *Streptomyces anulatus* NRRL B-2000^T tip türü ile de yakın akrabadır.

Streptomyces badius NRRL B-2567^T ve *Streptomyces sindenensis* NBRC 3399^T tip türleri ile yakınlık gösteren CS11H suşu, *Streptomyces badius* NRRL B-2567^T tip türü ile % 99,86 (1450 pozisyonda 2 nükleotit) dizi benzerliğine sahiptir (Şekil 4.14).

Streptomyces sp. CS11H suşunun *Streptomyces sindenensis* NBRC 3399^T tip türü ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranı ise % 99,86'dır ve 1448 pozisyonda 2 nükleotit farklılık gösterir (Şekil 4.14).

Streptomyces sp. CG5H suşunun en yakın akrabaları 1447 pozisyonda 4 nükleotit farklılık ve % 99,72 benzerlik oranı ile *Streptomyces xanthophaeus* NRRL B-5414^T ve *Streptomyces nojiriensis* LMG 20094^T tip türleridir (Şekil 4.14).

Streptomyces sp. RG8H izolatu filogenetik ağaçta birlikte kümelendiği *Streptomyces narbonensis* NBRC 12801^T tip türü ile % 99,86 dizi benzerliğine ve 1447 pozisyonda 2 nükleotit farklılığa sahiptir (Şekil 4.14).

Streptomyces spp. AG9H ve RG6-2H suşları filogenetik ağaçta birlikte kümelendişlerdir (Şekil 4.14). *Streptomyces* sp. AG9H suşu, % 99,23 dizi benzerliği (1420 pozisyonda 11 nükleotit) ile *Streptomyces lunaelactis* MM109^T tip türü ile yakın akrabadır. RG6-2H suşu ise aynı tip türü ile % 97,32 dizi benzerliğine (1419 pozisyonda 38 nükleotit) sahiptir. AG9H suşunun *Streptomyces maoxianensis* NEAU-Spg16^T tip türleri ile dizi benzerliği ise % 99,10 (1448 pozisyonda 13 nükleotit) iken RG6-2H suşu aynı tip türü ile % 97,21 dizi benzerliğine (1436 pozisyonda 40 nükleotit) sahiptir. Bu iki suş arasındaki benzerlik oranı ise % 98,16'dır.

Filogenetik ağaçta *Streptomyces xantholiticus* NBRC 13354^T ve *Streptomyces peucetius* JCM 9920^T tip türleri ile birlikte kümelenen *Streptomyces* sp. AS18H suşunun % 99,23 dizi benzerliği ve 1435 pozisyonda 11 nükleotit farklılığıyla *Streptomyces xantholiticus* NBRC 13354^T tip türü ile yakın akraba olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14). Bu izolatu diğer yakın akrabası ise % 99,17 dizi benzerliğiyle (1449 pozisyonda 12 nükleotit) *Streptomyces peucetius* JCM 9920^T tip türüdür.

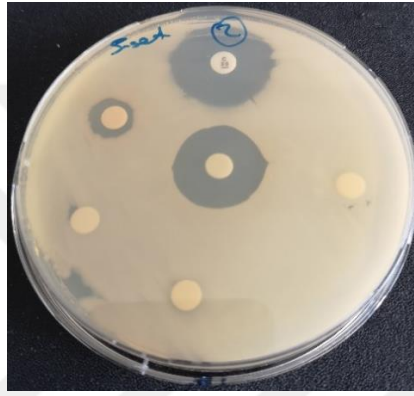
Streptomyces sp. AG7H suşu % 99,03 dizi benzerlik oranı (1447 pozisyonda 14 nükleotit) ile *Streptomyces mauvecolor* LMG 20100^T tip türüne; % 99,02 dizi benzerliğiyle de *Streptomyces sannanensis* NBRC 14239^T tip türüne yakınlık gösterir (Şekil 4.14).

Filogenetik ağaçta *Streptomyces netropsis* NBRC 3723^T tip türü ile birlikte kümelendiş olan *Streptomyces* sp. FG7H suşunun bu tip türüne benzerliği % 99,93 olup 1445 pozisyonda 1 nükleotit farklılığa sahiptir (Şekil 4.14).

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Testi

Aktinobakterilerden elde edilen metanol özütlerinin antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite testinde Gram-pozitif, Gram-negatif, maya ve filamentli fungus olmak üzere 10 patojen organizma kullanılmıştır. Ölçümler iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Bazı özütlere ait petri görüntüleri (Şekil 4.15) ve oluşan inhibisyon zon çapları (Çizelge 4.13) verilmiştir.

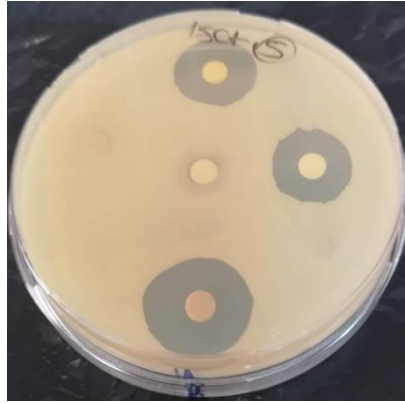
Şekil 4. 15. Antimikrobiyal aktivite testi. (a) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; (b) *Bacillus subtilis* ATCC 6633; (c) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; (d) *Escherichia coli* ATCC 25922



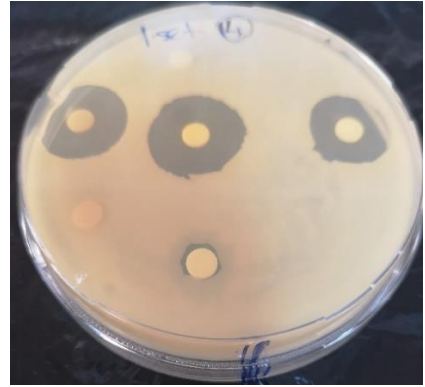
(a) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



(b) *Bacillus subtilis* ATCC 6633



(c) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



(d) *Escherichia coli* ATCC 25922

Çizelge 4. 13. Ekstraktların ve kontrol gruplarının patojenlere karşı oluşturdukları zon çapları (mm)

İzolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MK31H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
RK4H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MK15H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
HK22H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MK12H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MG6H	15±0	14±2,8	17±1,4	20±2,8	---	10,5±0,7	---	14±2,8	---	---
BG9H	---	10±0	11,5±3,5	---	9±0	---	---	---	---	---
XS4H	---	8,5±0,7	11±2,8	10,5±2,1	8,5±0,7	10±2,8	---	---	10,5±3,5	---
RS11H	---	11±2,8	---	---	---	---	---	---	---	---
CK7H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KG21H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
XS8H	---	---	13,5±2,1	---	---	---	---	---	---	---
FG8H	---	12±1,4	16,5±2,1	10±0	16±5,6	---	---	14,5±0,7	10±1,4	---
TG1H	---	9±1,4	16,5±0,7	11±2,8	10,5±0,7	9,5±0,7	---	---	8±0	---
RS15H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PK	20±1,4	24±0	33,5±2,1	15,5±2,1	16±1,4	10±1,4	22,5±3,5	22,5±2,1	15±2,1	34±1,4
NK	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

---: Zon gözlenmedi, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol1. *Escherichia coli* ATCC 25922, 2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 4. *Salmonella enterica* ATCC 13311, 5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 6. *Listeria monocytogenes*, 7. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 8. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 9. *Candida albicans* ATCC 10231, 10. *Aspergillus niger* ATCC 16404

Çizelge 4.13. Ekstraktların ve kontrol gruplarının patojenlere karşı oluşturdukları zon çapları (mm)(devam)

İzolot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AS5H	---	---	---	---	---	---	---	---	16±1,4	11±1,4
KS20H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BG10H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AS14H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CG5H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MK37H	27,5±2,1	20±0	24±0	20,5±0,7	23,5±3,5	25±7	24,5±0,7	27,5±10,6	11±2,8	25,5±13,4
FG7H	17,5±0,7	---	---	---	---	---	15,5±0,7	---	16,5±0,7	16,5±4,9
CS23H	15±2,8	10±0	11,5±0,7	8,5±0,7	7,5±0,7	---	---	11±1,4	---	---
KS10H	---	---	---	---	---	---	---	19,5±0,7	---	---
AG9H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
RG8H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KS21H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KG16H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AG7H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CS6H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PK	20±1,4	24±0	33,5±2,1	15,5±2,1	16±1,4	10±1,4	22,5±3,5	22,5±2,1	15±2,1	34±1,4
NK	---	--	---	---	---	---	---	---	---	---

---: Zon gözlenmedi, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol1. *Escherichia coli* ATCC 25922, 2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 4. *Salmonella enterica* ATCC 13311, 5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 6. *Listeria monocytogenes*, 7. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 8. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 9. *Candida albicans* ATCC 10231, 10. *Aspergillus niger* ATCC 16404

Çizelge 4.13. Ekstraktların ve kontrol gruplarının patojenlere karşı oluşturdukları zon çapları (mm)(devam)

İzolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BK2H	23±4,2	24±2,8	26±1,4	24,5±2,1	23,5±3,5	26±5,6	30±1,4	30±2,8	---	9,5±2,1
RS1H	---	11±0	10±7	10,5±0,7	11,5±0,7	10,5±0,7	12,5±2,5	---	---	---
AS18H	---	23±2,8	26±2,8	22±1,4	21±0	25±1,4	25±5,6	21,5±6,3	---	---
XS13H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AK12H	---	---	---	---	11±1,4	---	---	---	---	---
TS9H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FG4H	---	---	---	---	11,5±2,1	---	---	---	---	---
AK11H	---	10±0	---	---	---	---	---	---	---	---
HK9H	---	5,5±0,7	---	---	9±0	---	---	---	---	---
TS3H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CS20H	---	---	---	---	---	---	---	---	12±0	11,5±2,1
CS17H	---	---	---	---	---	---	---	---	10±1,4	---
KK3H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
RG62H	---	24,5±6,3	24,5±4,9	24±5,6	20±0	20±1,4	23,5±2,1	22,5±3,5	---	---
MS10H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PK	20±1,4	24±0	33,5±2,1	15,5±2,1	16±1,4	10±1,4	22,5±3,5	22,5±2,1	15±2,1	34±1,4
NK	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

---: Zon gözlenmedi, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol1. *Escherichia coli* ATCC 25922, 2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 4. *Salmonella enterica* ATCC 13311, 5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 6. *Listeria monocytogenes*, 7. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 8. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 9. *Candida albicans* ATCC 10231, 10. *Aspergillus niger* ATCC 16404

Çizelge 4.13. Ekstraktların ve kontrol gruplarının patojenlere karşı oluşturdukları zon çapları (mm)(devam)

İzolat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KG20H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
RS17H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FG5H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CK1H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KS5H	---	9±1,4	---	---	---	---	---	---	---	10±2,8
CS14H	---	9,5±2,1	---	---	---	---	---	19,5±13,4	---	---
KS17H	---	9±2,8	---	---	---	---	12±4,2	13,5±2,1	---	---
AK20H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
XS10H	---	11±1,4	---	---	---	---	---	14±1,4	---	---
HK15H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CS25H	---	---	---	---	---	---	---	---	9,5±0,7	---
CG2H	10,5±0,7	9±0	9,5±0,7	9±0	---	7,5±0,7	10,5±0,7	10,5±0,7	10±1,4	8,5±0,7
AS21H	---	---	---	---	---	---	13±1,4	---	---	---
BG4H	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CS11H	---	---	14±1,4	---	---	---	---	11,5±0,7	9,5±2,1	---
PK	20±1,4	24±0	33,5±2,1	15,5±2,1	16±1,4	10±1,4	22,5±3,5	22,5±2,1	15±2,1	34±1,4
NK	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

---: Zon gözlenmedi, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol1. *Escherichia coli* ATCC 25922, 2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 4. *Salmonella enterica* ATCC 13311, 5. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 6. *Listeria monocytogenes*, 7. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 8. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 9. *Candida albicans* ATCC 10231, 10. *Aspergillus niger* ATCC 16

Arthrobacter sp. AS21H özütü *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 patojenine karşı 13 mm çapında inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Leifsonia sp. KK3H, *Nocardia* spp. MK31H ve KS20H, *Pseudonocardia* sp. KG21H, *Nocardioides* sp. BG4H ve *Saccharothrix* sp. KS21H özütlerinin patojenler üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi bulunmamaktadır.

Nonomuraea sp. MG6H özütü; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı 8-17 mm çapında inhibisyon zonları oluştururken *Nonomuraea* sp. FG8H özütü ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Candida albicans* ATCC 10231 patojenlerine karşı 10-16 mm çapında inhibisyon zonları oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Nonomuraea* sp. HK9H suşuna ait özüt ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Streptomyces spp. RK4H, RG8H, KG16H, AG7H, CS6H, MK15H, MK12H, AS14H, CG5H, AG9H, TS3H, FG5H, XS13H, MS10H, HK15H ve BG10H suşlarına ait özütler hiçbir patojene karşı antimikrobiyal özellik göstermemiştir.

Streptomyces cinsi BG9H izolatına ait özüt ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 patojenlerine karşı 9-11 mm çapında inhibisyon zonları oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 patojenine karşı *Streptomyces* spp. XS4H ve RS11H özütleri 8-13 mm çapında inhibisyon zonları oluşturmuştur. *Streptomyces* sp. XS4H şusuna ait olan özüt ayrıca *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ve *Candida albicans* ATCC 10231 patojenlerine karşı da antimikrobiyal özellik sergilemiştir.

Streptomyces sp. XS8H özütü *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojenine karşı kloramfenikol antibiyotiğine kıyasla daha düşük inhibisyon zon çapı (13,5 mm) oluşturmuştur.

Streptomyces sp. MK37H suşuna ait özüt 10 patojene karşı zon oluşturmakla birlikte en iyi antimikrobiyal aktiviteyi 20-35 mm çapında zonlar oluşturarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı göstermiştir.

Streptomyces sp. FG7H özütü ise *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Streptomyces sp. CS23H özütü ise *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir.

Streptomyces sp. AS18H özütü ise, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 patojenleri dışında diğer mikroorganizmalara karşı iyi seviyede aktivite göstermiştir.

Streptomyces sp. AK12H özütü *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı 10-12 mm çapında inhibisyon zonları oluşturmuştur.

Streptomyces sp. AK11 özütü ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633 patojenine karşı 10 mm çapında zonlar oluşturmuştur.

Streptomyces sp. XS10H özütü ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir.

Streptomyces sp. CS11H özütü *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Candida albicans* ATCC 10231 patojenleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir.

Streptomyces sp. CS20H ve CS17H özütleri ise *Candida albicans* ATCC 10231 patojenine karşı 9-12 mm çapında zonlar oluşturmaktadırlar. *Streptomyces* sp. CS20H özütü ayrıca *Aspergillus niger* ATCC 16404 patojenine karşı da 10-13 mm çapında inhibisyon zonları oluşturmuştur.

Streptomyces sp. RG6-2H izolatına ait özüt ise *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 patojenleri dışında diğer patojenlere karşı iyi seviyede antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Streptomyces sp. KS10H suşuna ait özüt ise *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı ortalama 19,5 mm çapında inhibisyon zonu oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

AK20H, HK22H, TS9H, RS15H, KG20H, CK1H ve RS17H özütlerinin patojenler üzerinde antimikrobiyal etkisi bulunmamaktadır.

AS5H özütü ise *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 patojenlerine karşı 10-17 mm çapında inhibisyon zonları oluşturmuştur.

TG1H özütü *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ve *Candida albicans* ATCC 10231 patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

FG4H suşuna ait olan özüt ise *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı 10-13 mm çapında inhibisyon zonları oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

BK2H suşuna ait özüt *Candida albicans* ATCC 10231 dışında diğer patojenler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. BK2H özütü; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojenlerine karşı kloramfenikol (50µg/ml) antibiyotiği kadar antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı ise kloramfenikol antibiyotiğinden daha fazla zon oluşturmuştur.

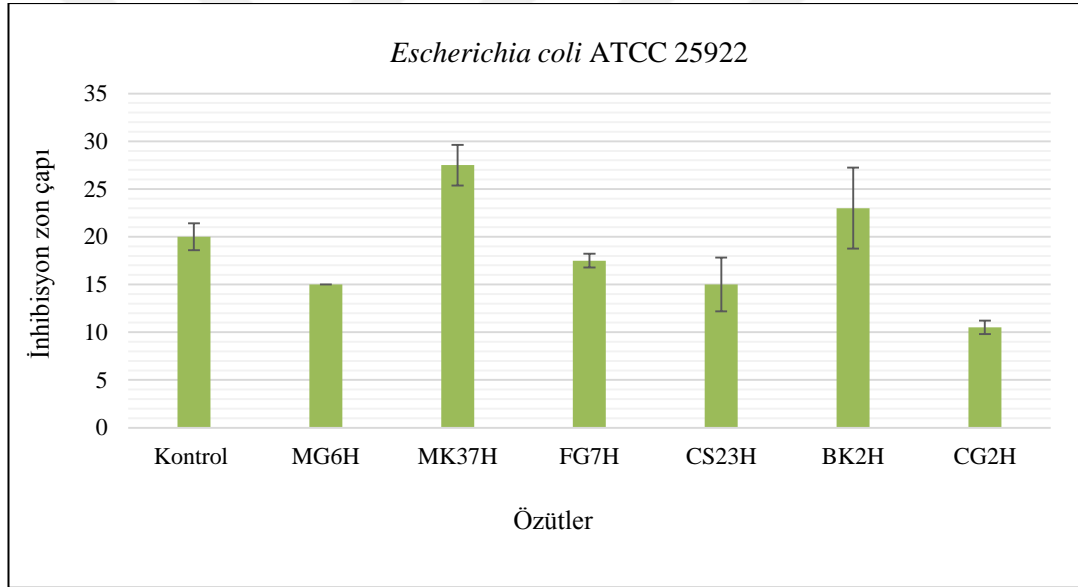
RS1H özütü ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria monocytogenes* ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 patojenlerine karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir.

KS5H ekstraktı ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 patojenleri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptirler.

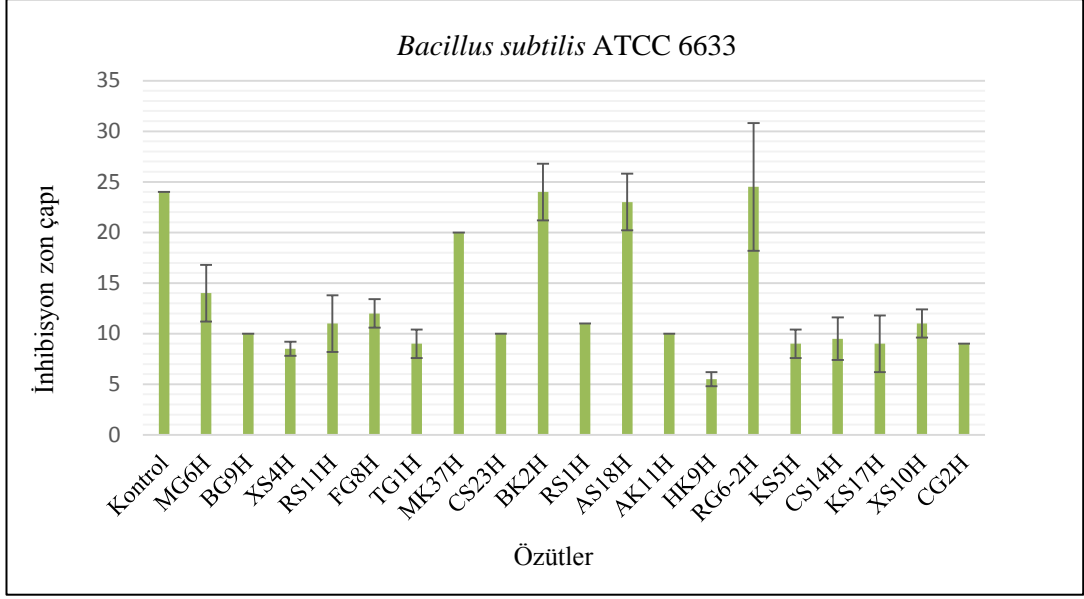
KS17H ve CS14H özütleri ise *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. KS17H özütü ayrıca *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 patojenine karşı da antimikrobiyal özellik göstermektedir.

CG2H özütü ise *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dışındaki test patojenleri üzerinde kloramfenikol antibiyotiğine kıyasla daha düşük inhibisyon zonları oluşturmuştur.

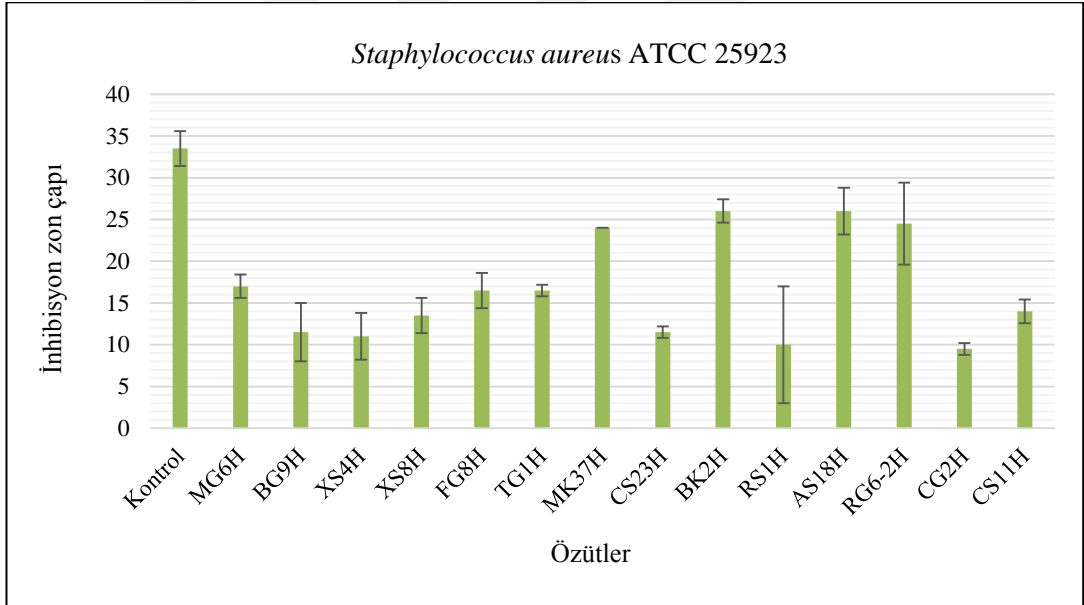
CS25H özütü ise *Candida albicans* ATCC 10231 patojenine karşı 9-11 mm çapında inhibisyon zonları oluşturarak antimikrobiyal özellik sergilemiştir.



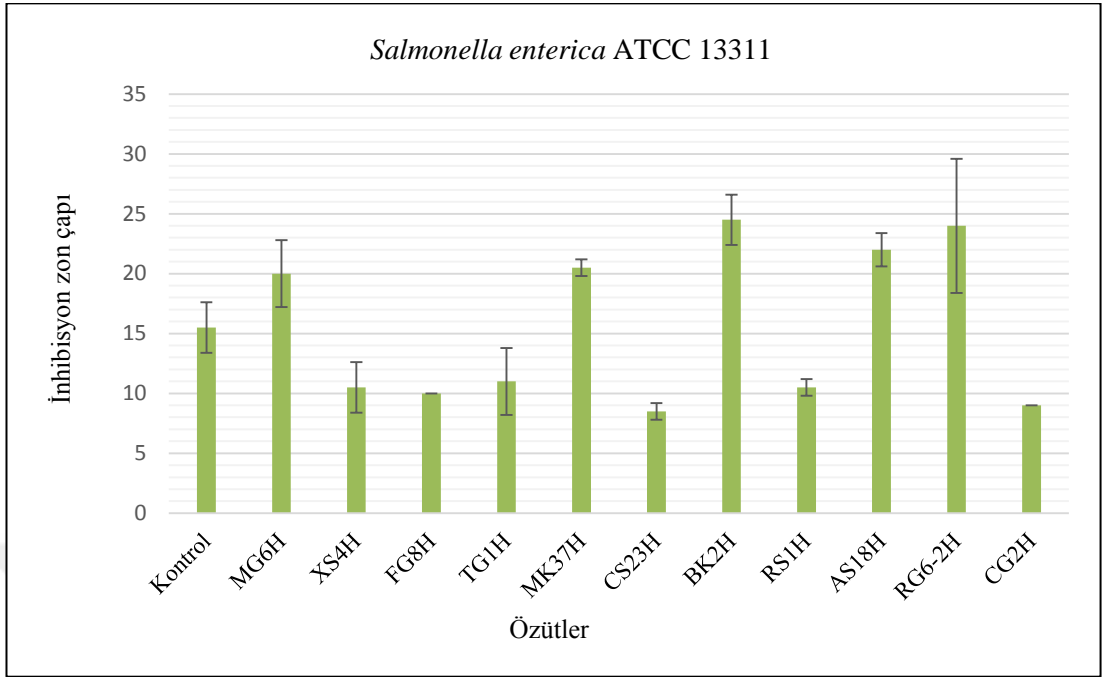
Şekil 4.16. *E. coli* ATCC 25922 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



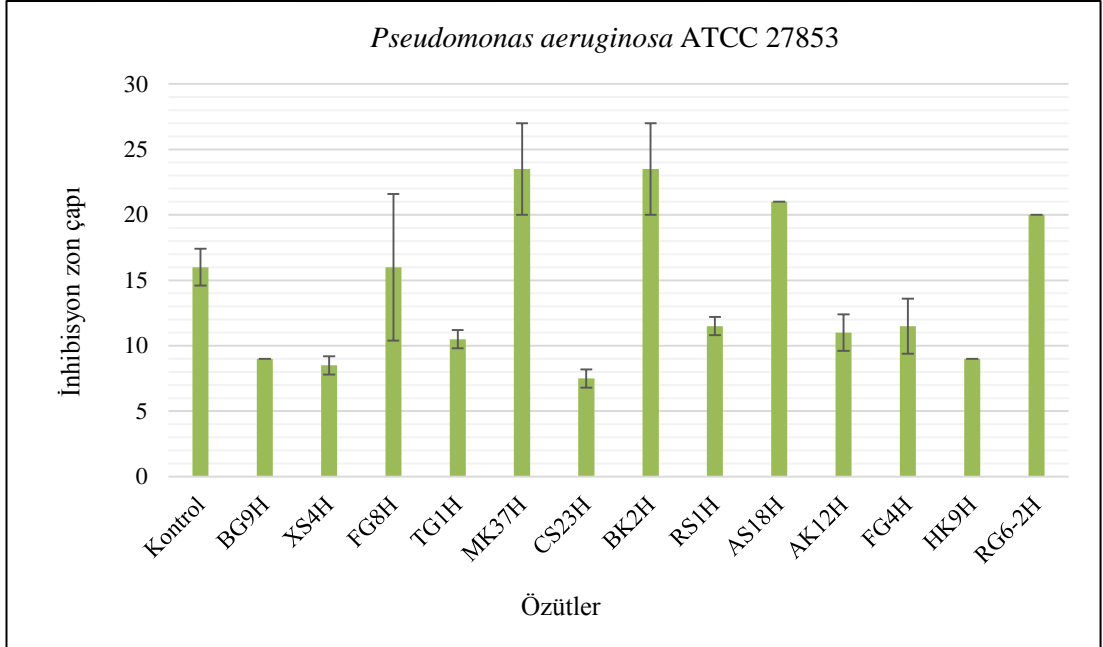
Şekil 4.17. *B. subtilis* ATCC 6633 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



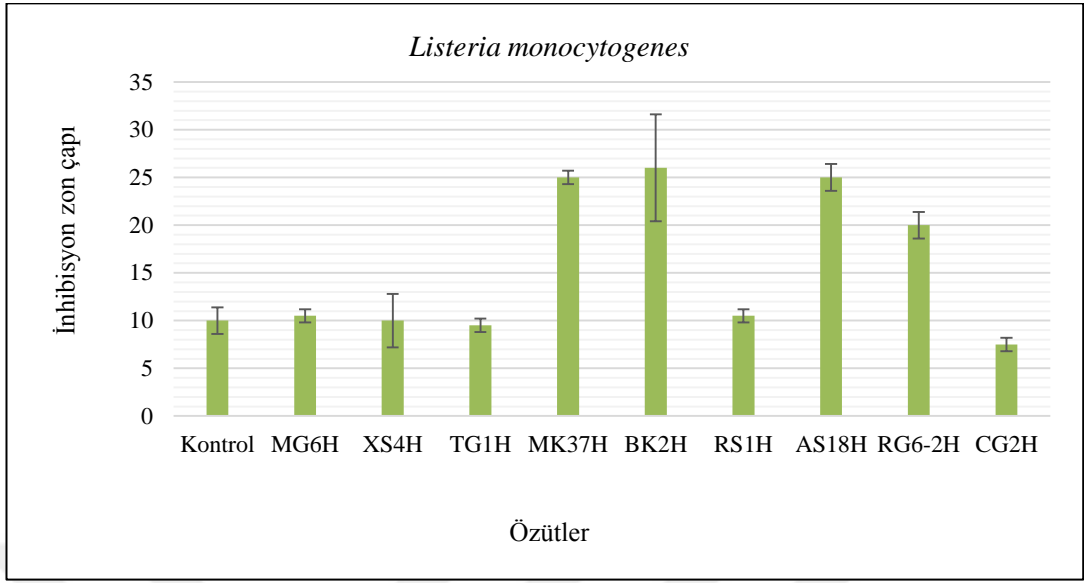
Şekil 4.18. *S. aureus* ATCC 25923 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



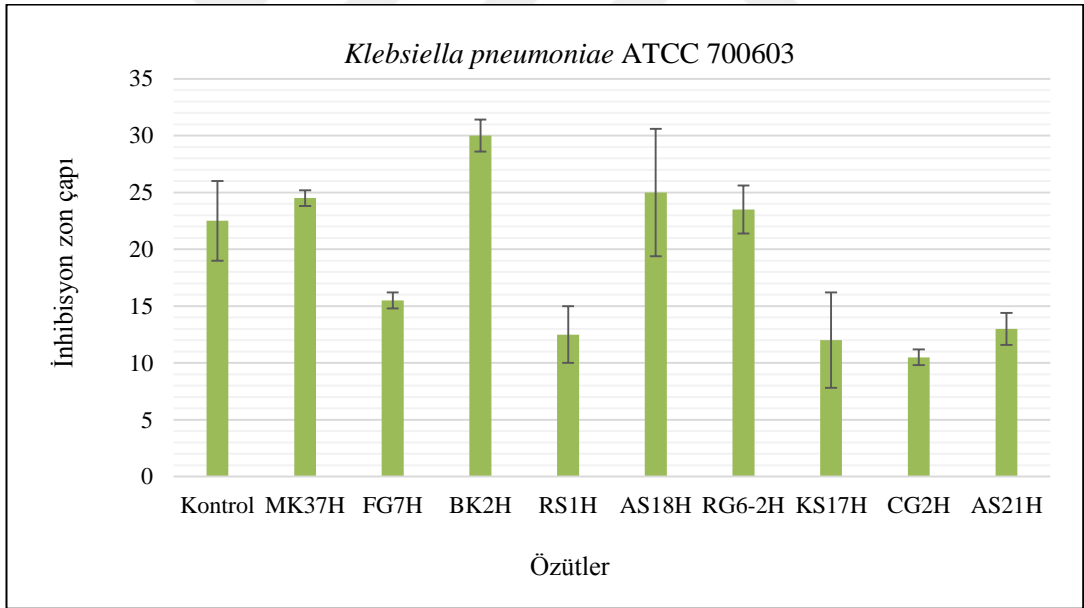
Şekil 4.19. *S. enterica* ATCC 13311 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



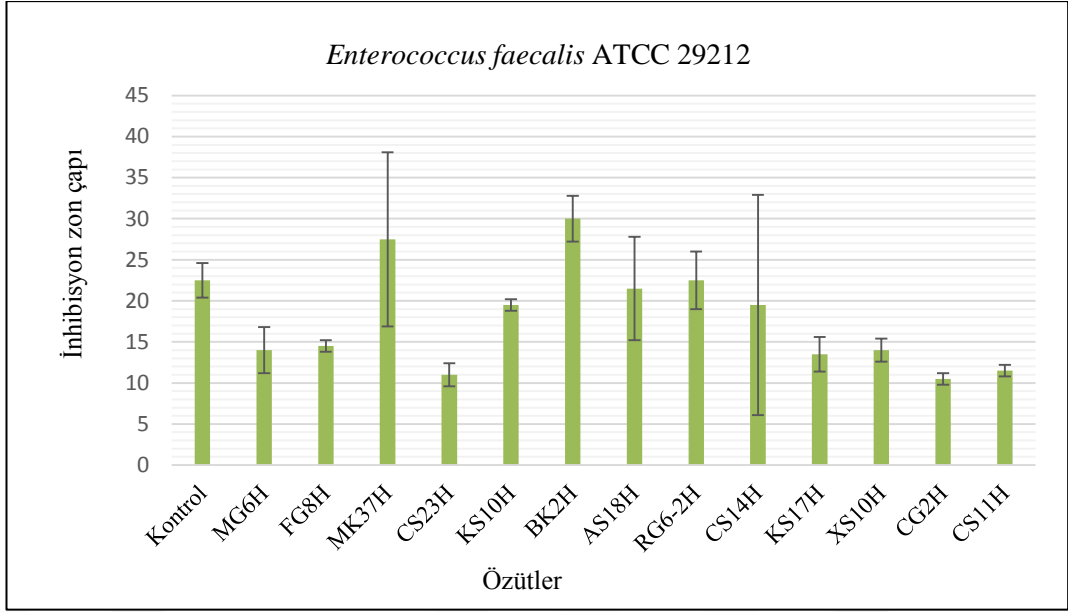
Şekil 4.20. *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



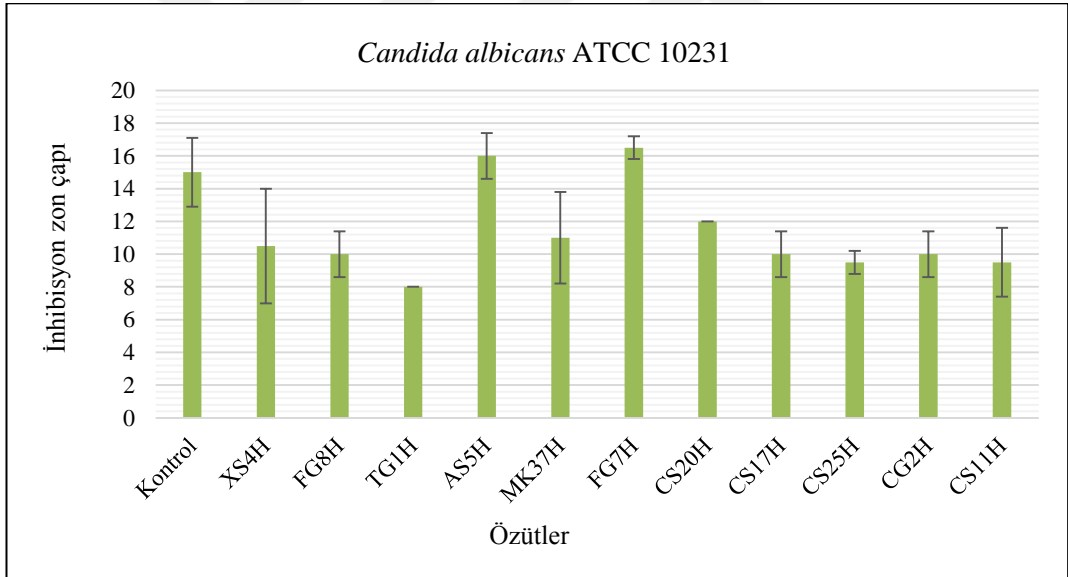
Şekil 4.21. *L. monocytogenes* patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



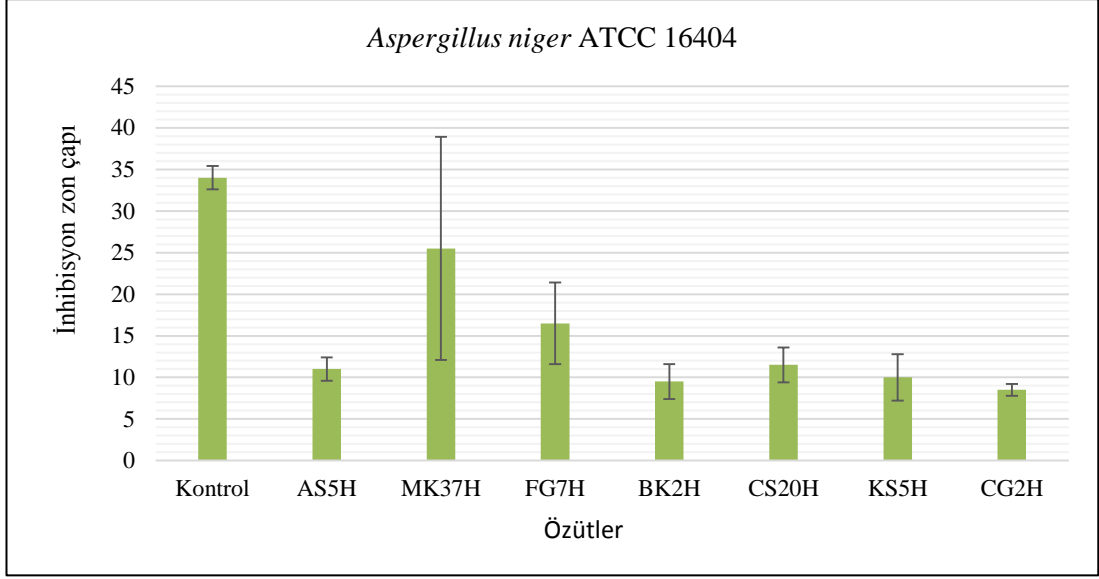
Şekil 4. 22. *K. pneumoniae* ATCC 700603 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



Şekil 4.23. *E. faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



Şekil 4.24. *C. albicans* ATCC 10231 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları



Şekil 4.25. *A. niger* ATCC 16404 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları

4.6. Özütlere Ait MİK Değerlerinin Mikrodilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Disk difüzyon testi sonucu en iyi zon oluşturan *Streptomyces* spp. MK37H ve AS18H özütlerinin ve BK2H özütünün test patojenlerine karşı MİK değerleri Çizelge 4.14 'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. *Streptomyces* spp. MK37H, AS18H özütlerinin ve BK2H özütünün MİK değerleri

Patojenler	MK37H özütü (µg/ml)	BK2H özütü (µg/ml)	AS18H özütü (µg/ml)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8800-4400	5400-3600	---
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	240-220	45-40	3,75-1,87
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	220-210	100-90	15-7,5
<i>S. enterica</i> ATCC 13311	240-220	100-90	1,87-0,93
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	120-110	22,5-11,25	55-50
<i>L. monocytogenes</i>	220-210	30-22,5	7,5-3,75
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	8800-4400	10800-7200	7200-4800
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4400-2200	110-100	45-40
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	260-240	---	---

Streptomyces sp. MK37H özütü en iyi antimikrobiyal aktiviteyi 120-110 µg/ml değeri ile *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı gösterirken en düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise 8.8-4.4 mg/ml değeri ile *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 patojenlerine karşı göstermiştir (Çizelge 4.14).

Streptomyces sp. AS18H özütü ise *K. pneumoniae* ATCC 700603 patojeni dışında diğer patojenik organizmalara karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. En iyi antimikrobiyal aktiviteyi 1,87-0,93 µg/ml değeri ile *S. enterica* patojenine karşı göstermiştir (Çizelge 4.14).

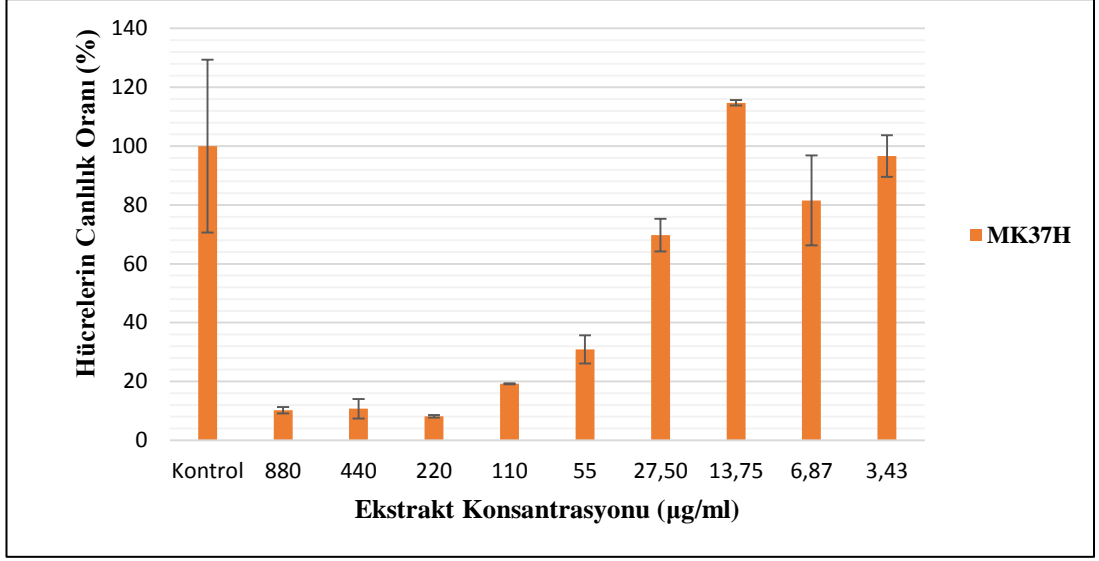
BK2H özütü ise 22,5-11,25 µg/ml arasında bir MİK değeri ile *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı yüksek oranda antimikrobiyal aktivite göstermektedir. En düşük antimikrobiyal aktiviteyi ise *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 patojenlerine karşı göstermiştir (Çizelge 4.14).

4.7. Sitotoksik Aktivite Testi

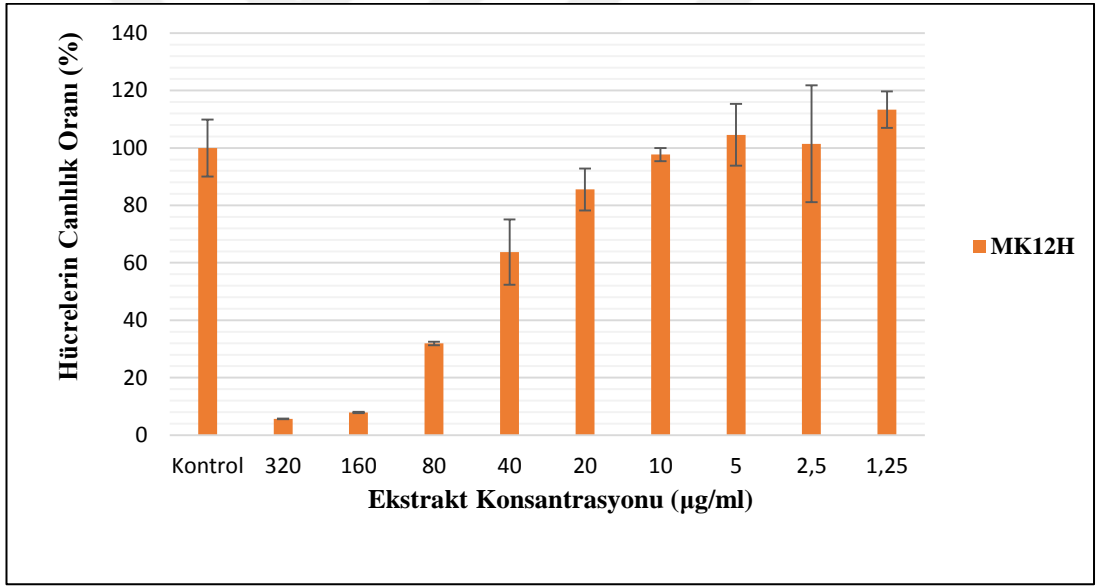
Erzurum ve Antalya topraklarından izole edilen 60 aktinobakteri suşuna ait özütlerin AR42J pankreas kanser hücreleri üzerinde sitotoksik aktivitesi değerlendirildi. Her dilüsyondan ve kontrolden üçer kuyucuk bulunduğu kuyucukların spektrofotometrede verdikleri optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması alındı. Kontrol kuyucuklarındaki hücrelerin canlılık oranı % 100 kabul edilerek özütleri içeren kuyucuklardaki hücre canlılığı kontrole göre değerlendirildi.

İlk olarak tüm özütler 3 dilüsyon olacak şekilde kontrol grubuyla beraber test edildi ve 16 ekstraktın kanser hücreleri üzerinde hücrelerin % 50'sinden fazlasını öldürerek sitotoksik etkisinin olduğu belirlendi. Daha sonra sitotoksik etkiye sahip olan bu özütler 9 dilüsyon yapılarak tekrar test edildi.

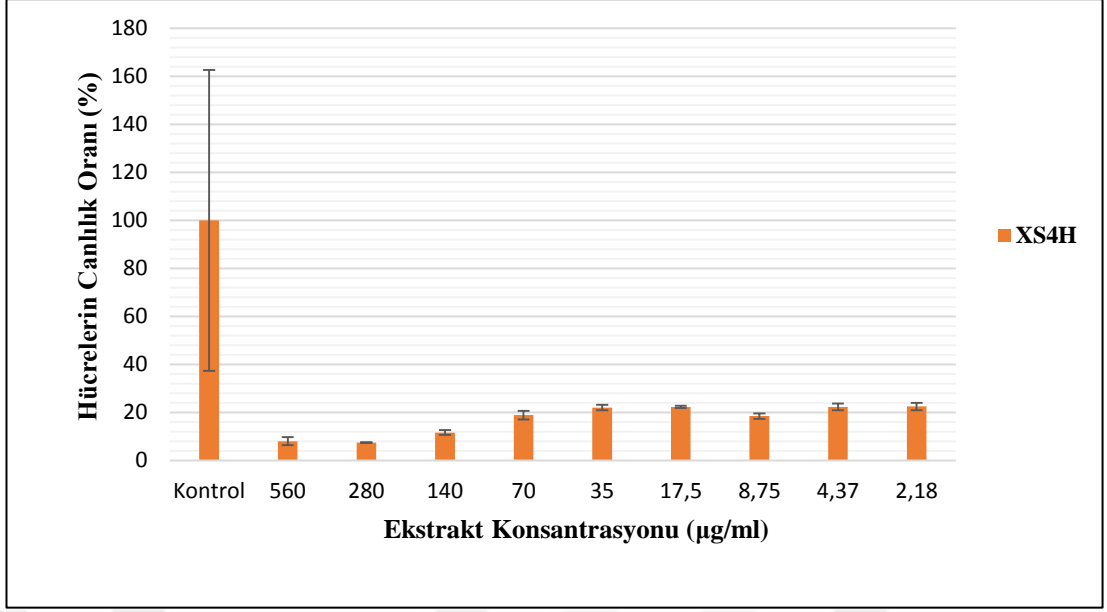
Sonuçlar Microsoft Excel programında değerlendirilerek grafik halinde özetlendi (Şekil 4. 26-41).



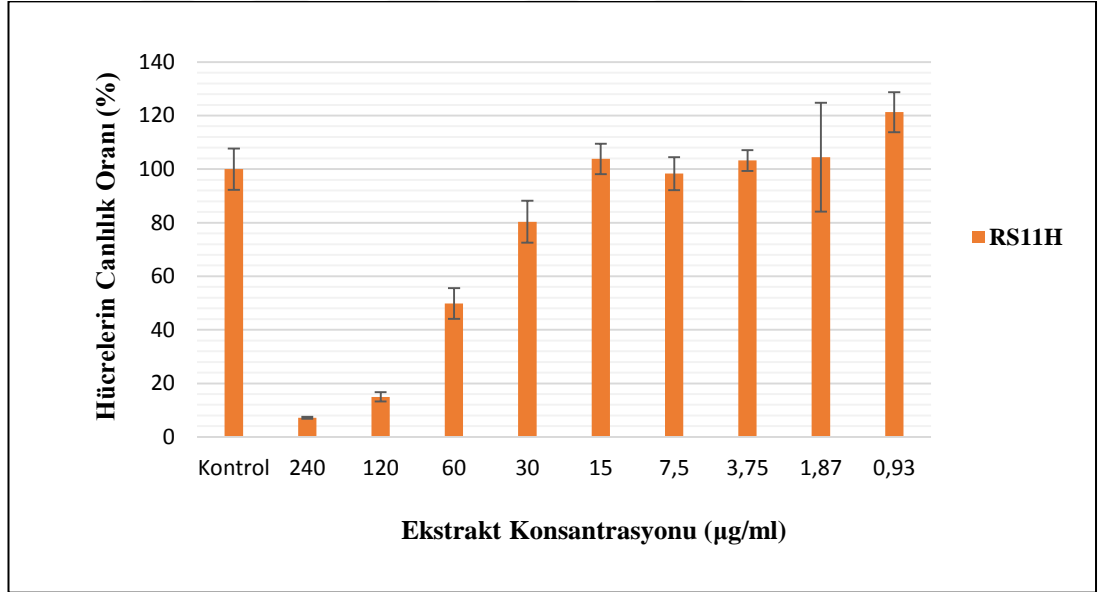
Şekil 4.26. *Streptomyces* sp. MK37H özütünün MTT testi sonucu



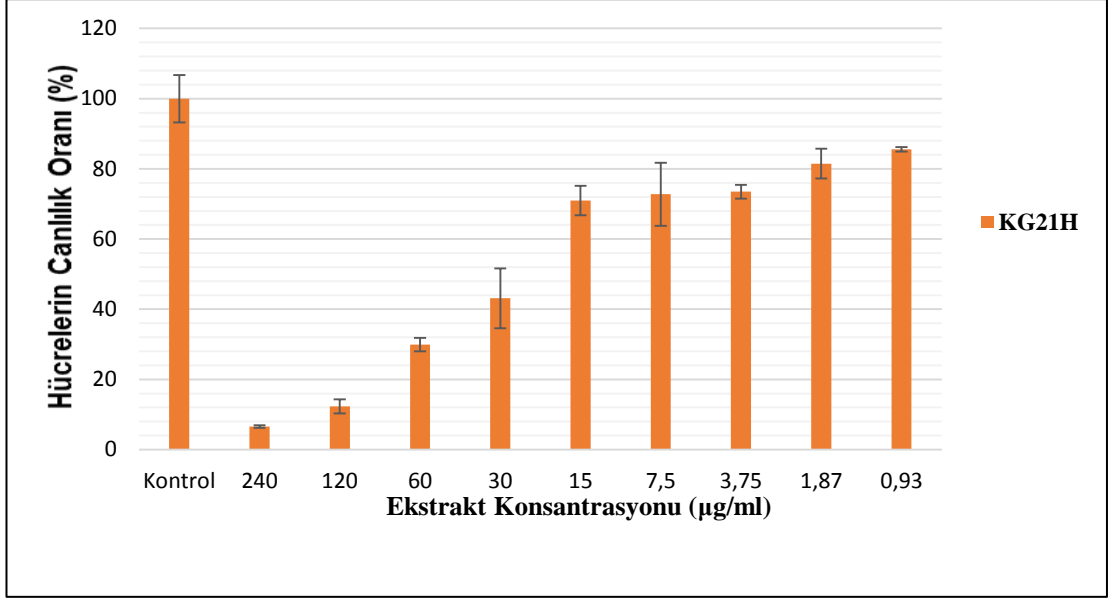
Şekil 4.27. *Streptomyces* sp. MK12H özütünün MTT testi sonucu



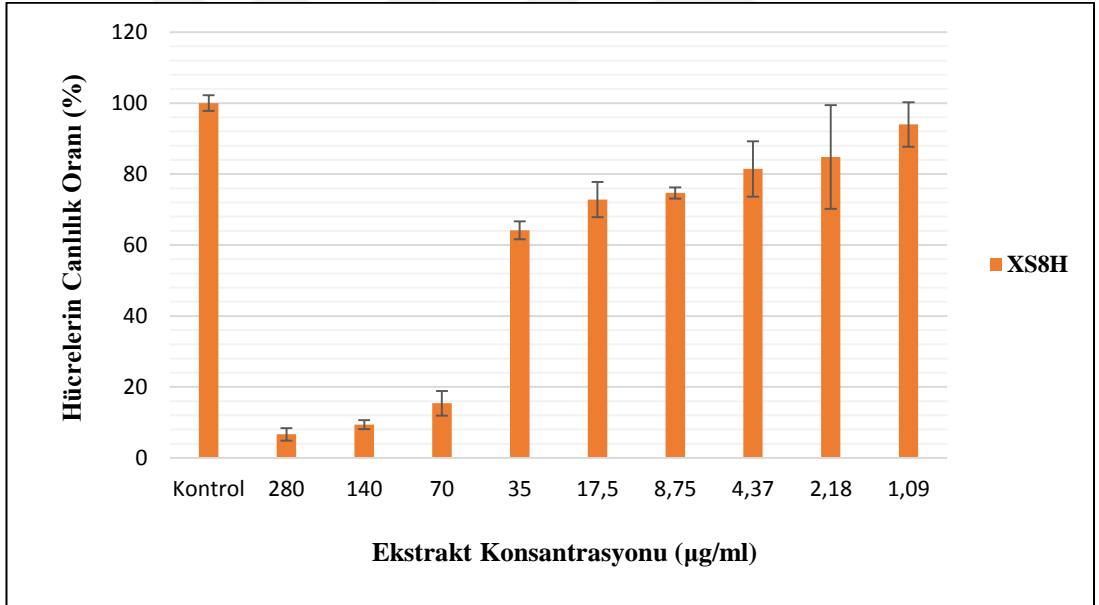
Şekil 4.28. *Streptomyces* sp. XS4H özütünün MTT testi sonucu



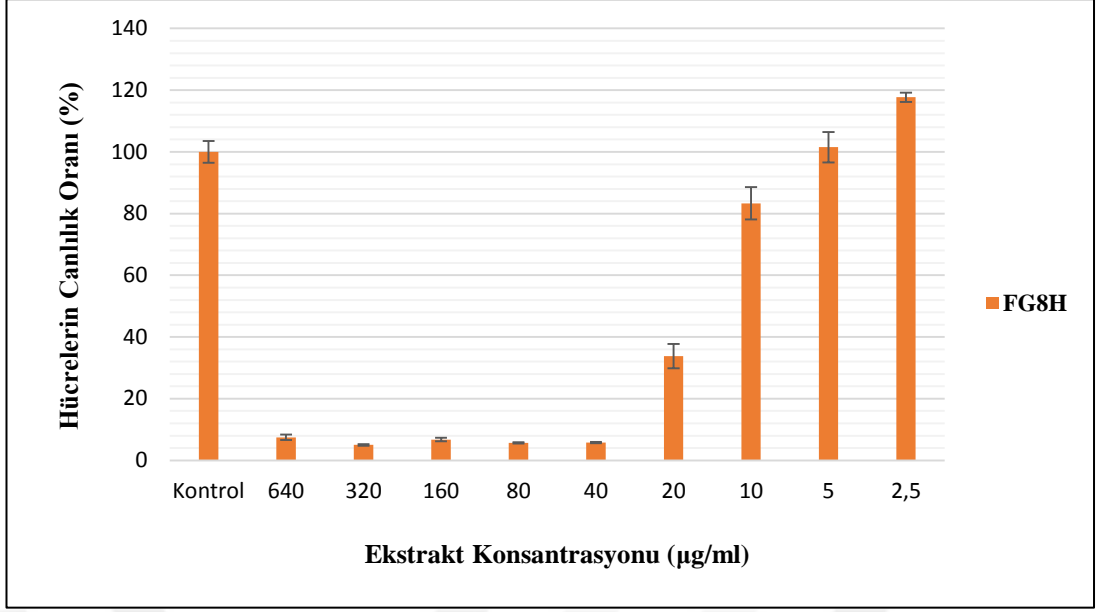
Şekil 4.29. *Streptomyces* sp. RS11H özütünün MTT testi sonucu



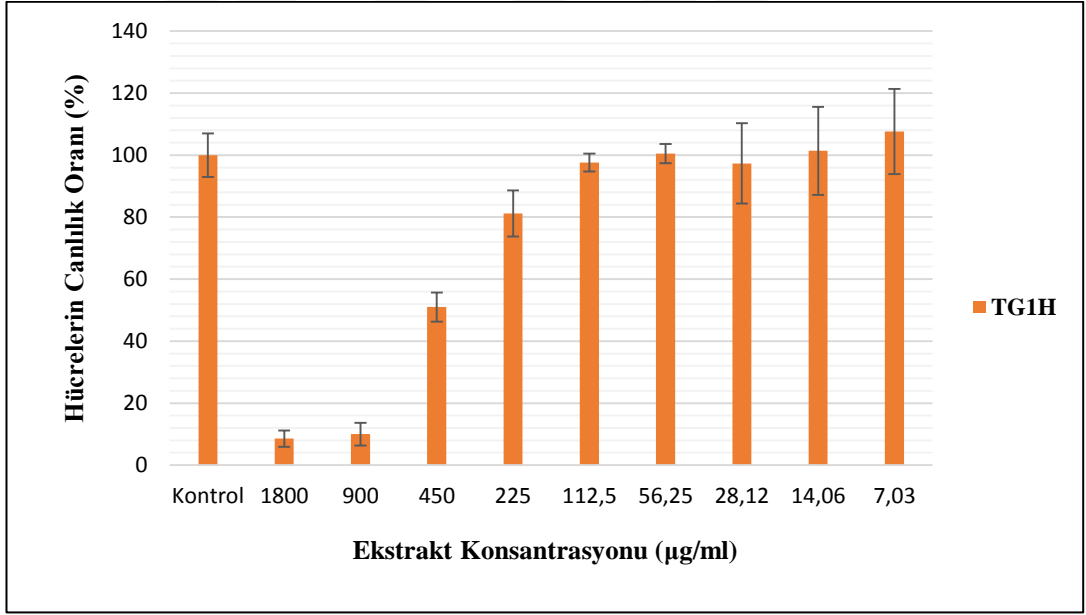
Şekil 4.30. *Pseudonocardia* sp. KG21H özütünün MTT testi sonucu



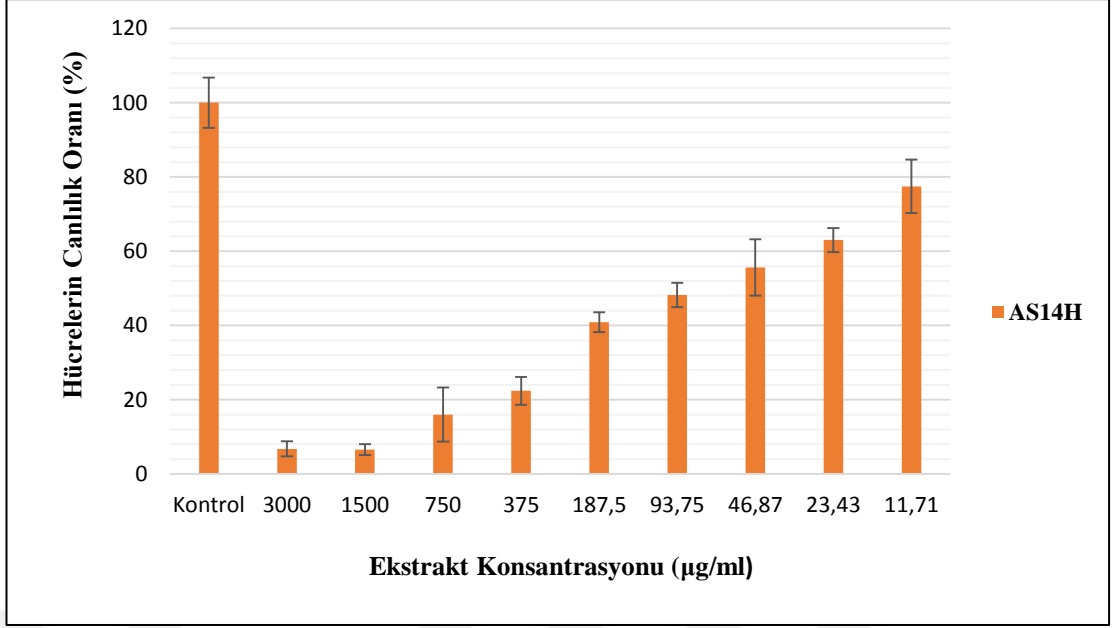
Şekil 4.31. *Streptomyces* sp. XS8H özütünün MTT testi sonucu



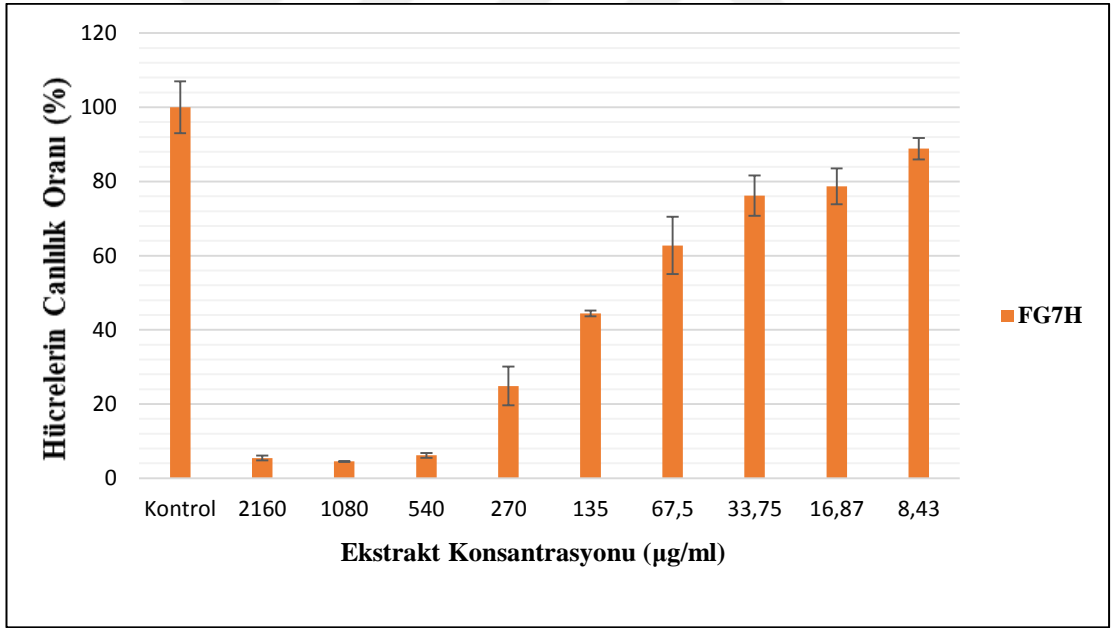
Şekil 4.32. *Nonomuraea* sp. FG8H özütünün MTT testi sonucu



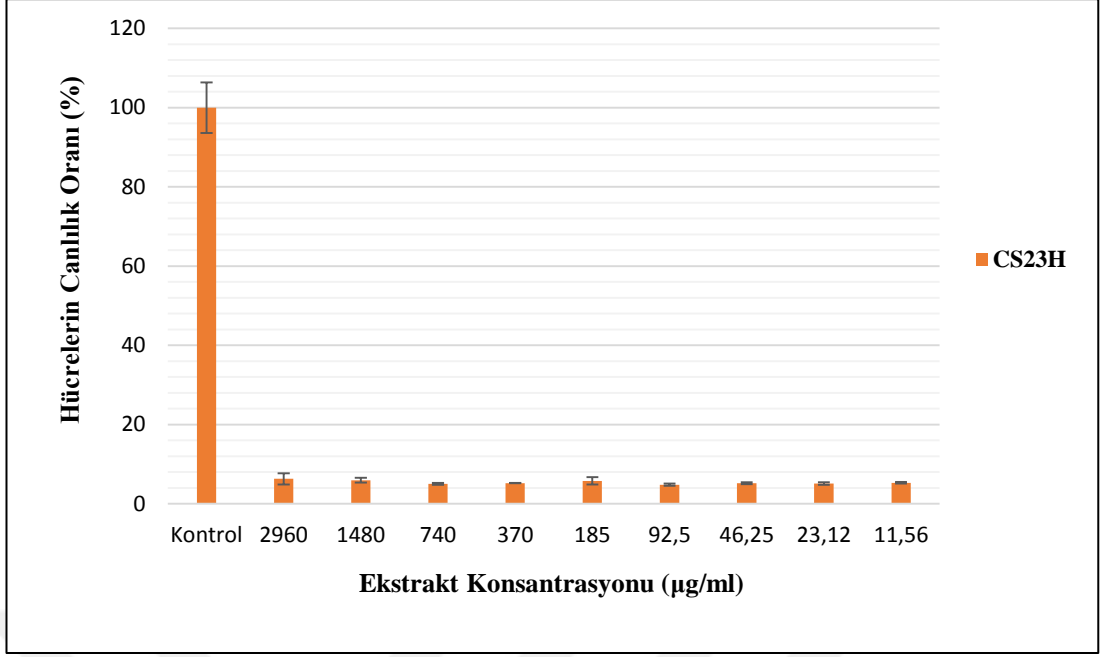
Şekil 4.33. TG1H özütünün MTT testi sonucu



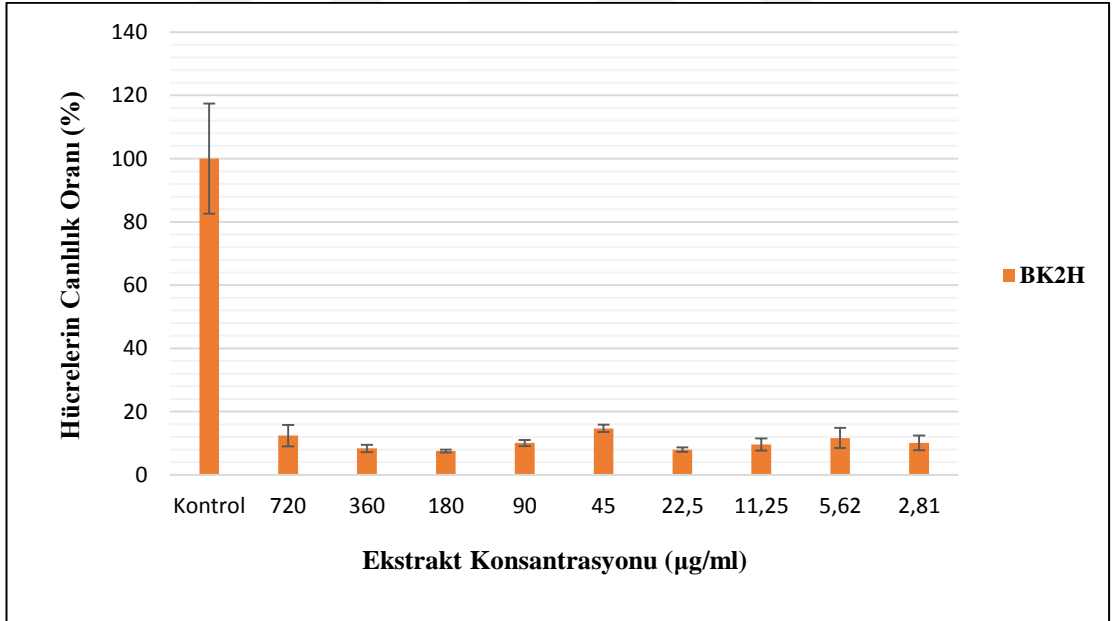
Şekil 4.34. *Streptomyces* sp. AS14H özütünün MTT testi sonucu



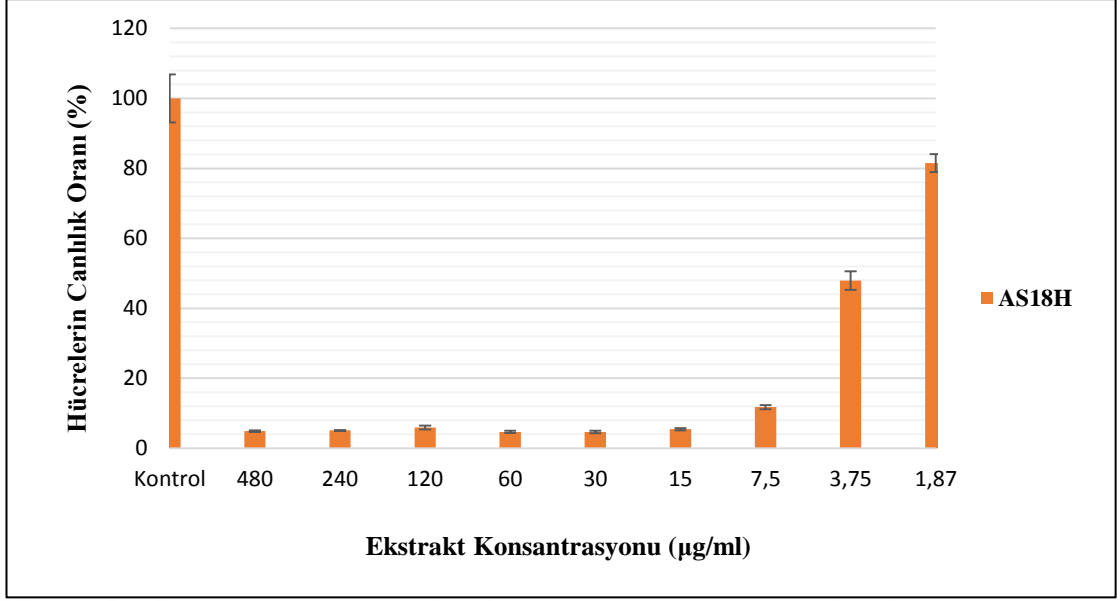
Şekil 4.35. *Streptomyces* sp. FG7H özütünün MTT testi sonucu



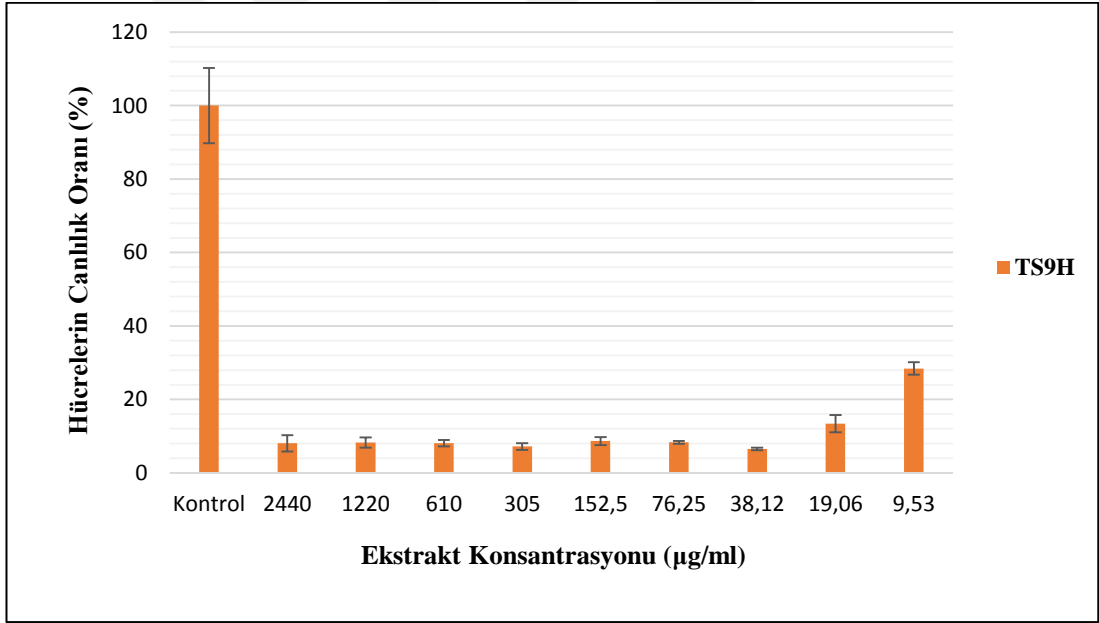
Şekil 4.36. *Streptomyces* sp. CS23H özütünün MTT testi sonucu



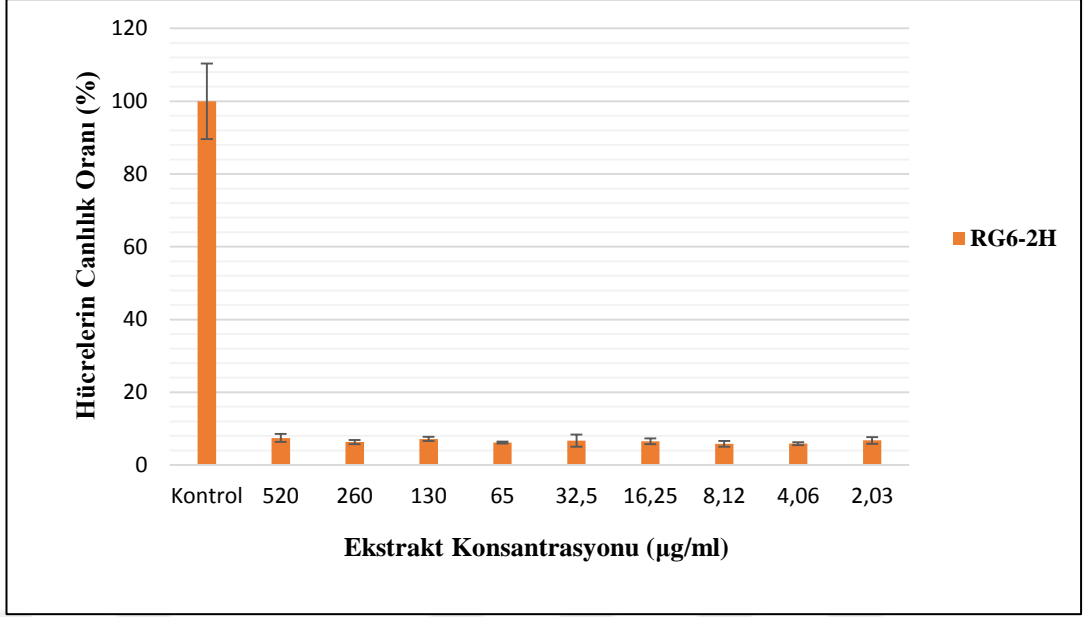
Şekil 4.37. BK2H özütünün MTT testi sonucu



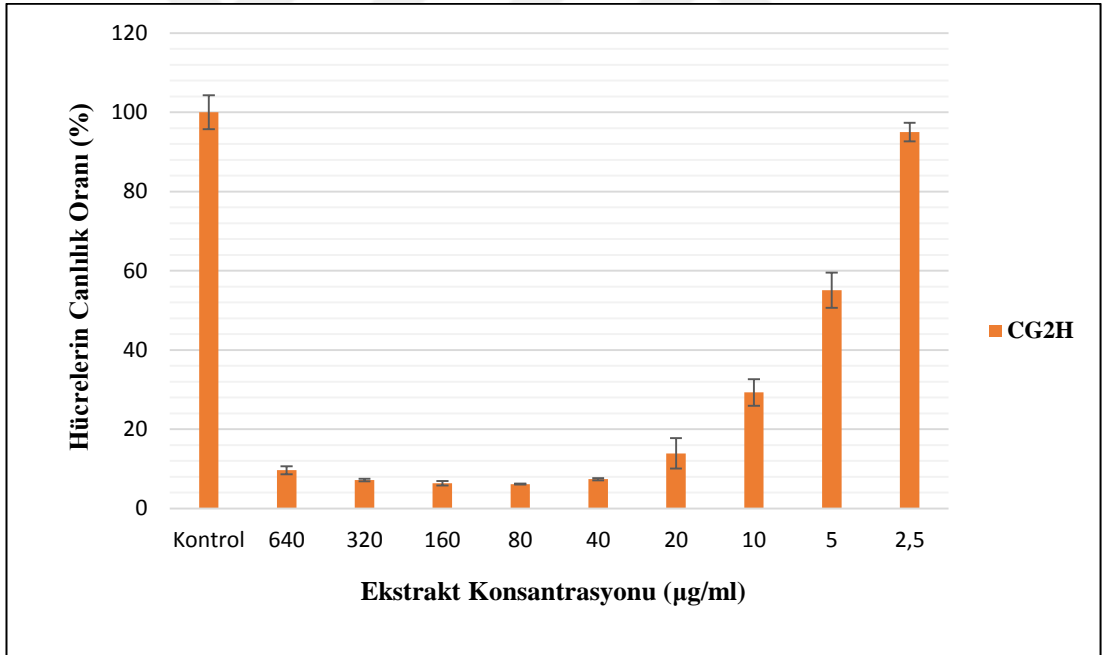
Şekil 4.38. *Streptomyces* sp. AS18H özütünün MTT testi sonucu



Şekil 4.39. TS9H özütünün MTT testi sonucu



Şekil 4.40. *Streptomyces* sp. RG6-2H özütünün MTT testi sonucu



Şekil 4.41. CG2H özütünün MTT testi sonucu

4.8 Tüm Genom Analizi

Biyoaktivite testlerinde pozitif sonuç veren suşlardan birinin (*Streptomyces* sp. BG9H) tüm genom dizilemesi MicrobesNG (Birmingham, İngiltere) firmasına yaptırılmıştır.

Streptomyces sp. BG9H'nin GenBank'a WMBF00000000 erişim numarası ile depolanan ve 881 kontigten oluşan tüm genom dizisinin büyüklüğü 7.259.623 bp olup GC içeriği %71.2' dir. Genomda 6835 adet protein kodlayan dizi ve 66 adet RNA kodlayan gen bulunmaktadır. Ayrıca, tüm genomu dizilenen *Streptomyces* sp. BG9H şununun CRISPR/Cas dizileri CRISPRFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>) sunucusunda belirlenmiştir.

Temel olarak CRISPR-Cas sistemi düzenli tekrar dizileri, spacer diziler, bir lider dizi ve Cas gen setinden oluşmaktadır. CRISPR dizileri, 23 bç ila 47 bç uzunluğundaki palindromik tekrar dizileridir. Ara diziler (spacer) ise yabancı DNA dizisinden köken alan, CRISPR tekrarları arasına yerleştirilen son derece değişkenlik gösteren genellikle 32-35 bç uzunluğundaki dizilerdir. Lider dizi ise CRISPR lokusunun gerisinde bulunur ve transkripsiyon için promotör işlevi görür. CRISPR-ilişkili (Cas) genler ise, CRISPR-Cas sisteminin önemli bileşenlerinden biridir. Protein kodlayan genler olup helikaz, nükleaz, polimeraz ve RNA bağlanma proteinleri gibi fonksiyonel domainleri içeren bir gen setidir (Tong vd, 2015). Yapılan analizler sonucunda *Streptomyces* sp. BG9H genomunda 16 bölgede CRISPR dizilerine rastlanmıştır ve bu 16 bölge içerisinde 187. ve 764. Kontig bölgelerinde 2 Cas gen kümesi ve toplam 4 cas geninin varlığı saptanmıştır (Şekil 4.15-16).

187. kontigte tespit edilen CRISPR dizisi 21 ara dizi içermekte ve buna bağlı olarak güvenilirliği diğer bölgelere kıyasla daha yüksektir (güvenilirlik seviyesi: 4). Ayrıca, bu bölgede Cas 1_0_IE, Cas 2_0_IE ve Cas 6_0_IE olmak üzere üç adet CRISP-ilişkili (cas) gen bulunmaktadır. 723. Kontigte tespit edilen CRISPR dizisinin de güvenilirliği yüksek olup (güvenilirlik seviyesi: 4) 27 ara dizi içermektedir (Şekil 4.17). 764. Kontig ise Cas 4 genini ihtiva etmektedir. Ancak güvenilirlik derecesi 1 olduğundan dolayı bu sonuç yanıltıcı olabilir (Şekil 4.15-16)

Çizelge 4. 15. *Streptomyces* sp. BG9H genomunda CRISPR/Cas dizileri

Kontig no	CRISPR	CAS	Tekrar dizisi	Ara dizi (spacer)
6	1	0	TTTCAAGATCGGGACGAGGTCGG TTTCATGATCGGGACGAGGTCGG	CGGGCCCTGACCTGCG CTTTCCCGTTTCGACGTC CGCGCG
25	1	0	GGCGCGCAGTTCCCCGCGCCCCT GGCGCGCCGTTCCCCGCGCCCCT	GACGGGGCGCCCACGGC CCGGTTTCTTTCCTGCGG GATCGTCGTGGCTT
68	1	0	GGAAGTGC GCGACCAGCCACAAC GGAACGGCGCGACCAGCCACAAC	CCACCCGACCCAAAGA CAACCGGGCAAGCCCA TCAGGGGCGCGG
94	1	0	CCTGTGCCGTTTCTCCAGCTCGGC CCGGTGCCGTTTCTCCAGCTCGGC	TGGCCCGTGCCCGTCTC CAGCTGGGCGCAACCCG TGTCCGTCCTCCAGCTCA GCCGAC
141	1	0	GCTGTGGCTGCTCTTACGCCAGCG AGCGG GCTGTGGCTGCTCTTACGCCAGCG GGCGG	CGCCTTCGAAGTCGTAA GCGACCTCGACGCATTC ACCGCTGTCTCCGCC
178	1	0	GACGACAACCGTGCGGTGGCTCC GG GACGACAACCGTGCGGTGGCTCC GG	TACCGGTTCCGTCGTGA TGACCGCCCTCGGGTG GTTCAACCGCGACCGT CGC
186	1	0	GTGGTTGCTCGCGCCGTTCCTCGCG CCCCTGCGGGGGCCC GTGGTTGCTCGTGCCGTTCCTCGCG CCCCTGCGGGGGCCC	ACCTGCCCCTCCAGCT GCGGGTTGCTC
263	1	0	GTTCCCCGCGCCCCTTCGGGCGCTC AGC GTTCCCCGCGCCCCTTCGGGCGCT CAG	TGCGGGTTGGGTGTGGT TGCTCGCGCC
271	1	0	GCCAAGAAGGCGGTGGCCAAGAA G GCCAAGAAGGCGGTGGCCAAGAA G	GCCGTTATGGGGGAGCC GGCGAAGGCCCGGCGA AGAAGGCTCCGGCGAAG AAAGCCCGG
321	1	0	GTGGGTGTCCTGCGGGGCGTGGG GTGGGTGTCCTGCGGGGCGTGGG	CGCCCGGTGGGGCGTGA GTGTCCTGCGAGGCGAG GGCGCCCGGGCAGC
474	1	0	AGGGGCGCGGGGAACTGCGCGAGC AA AGGGGCGCGAGGAACTGCGCGAGC AA	CCCCACCAACCCGCGC GATACGAACCGGCCCG TA
484	1	0	GGCTGCGGCTTGGGGGCTGCTGC GGCTGCGGCTTGGGGGCTGCTGC	GTCTGCTGCGGGGCGGC CTGCTGCTGCGTCTGCTG CGGCTTC
496	1	0	GGGGCGCTCCTCCCGGCGTGGCA GGGGCGCTCCTCCCGGCGTGGCA	ATTGCGGGGCTTTTGG GGGCGGTGCGGTGGCTC CCTTA
764	1	1 (Cas4)	GGGTCTCCGCCGAGTCGCGGCAG GGGTCTCCGCCGAGTCGCGGCAG	GGTGATACGGATGTGCC CTCGGCGCAGGCGCGGC AAGGTGTACGGGTGAT ACGGAT

Çizelge 4. 16. *Streptomyces* sp. BG9H genomunda CRISPR/Cas dizileri (devam)

Kontig no	CRISPR	CAS	Tekrar dizileri	Ara dizi (spacer)
187	1	3 (Cas1_0_IE Cas2_0_IE Cas6_0_IE)	GTGGTCCCC GCGCATGCG GGGGTGGTC CC	TGTCCACCCGCTGCCAGCTGTG AGTGGTGAG
				ACAGGGATCACCGCTGCATGGC TGTGCCAG
				TTCGTCTAGTCAGGAGGCCTCTCT GGGTCCCG
				AGGGTCGAGGGCGGGTGCTTGA GTAGTCAG
				CTGCCCGGGGTCGGCGACGAGGT CCAGGTCCA
				TACAACCAGATCGCCAAGGTGCT GAACTCGGA
				GCTGATCCCCAGAGCAATGGCCC GTGCCTGAA
				GCCCACTTACCACTACAGGAGTT ACACCTCCG
				GTCACCATGACGTCCCCCTCCCTG TTCCGGTGC
				ACGGCCGCCACGGCCCGGATCAC ATGACCTCG
				GGCGCGGGGCGGACCGCGGTCTC GATCTGACG
				TTCTGCTGTCCGGGCCGGGGGA CACGATGTC
				GCTGGGGTTCGGCGACGGCCTTGA AGGCAGGTG
				ACATTGTA CT CAGCTTCCGCAAG GAGATCCCG
				GAAGCTCTCAAGGCGACGGGCTT CTGCAAGGT
				GTGCAGACGGTGAACAACATGCA GCGGCTCCT
				CTGTGGCCTCCCGGCACGACCGA CTGCGTACTGGCGACCTG
				TTCGCGATCAGCTGCGGAAGCTG GAGCACCTG
				CGAGAGTCCGACCGGGACAGCAC TTGGTCTGG
				TTCTCGTCTTCCCAGGACCCCCG CGCCCGCC
CTCCGTGGTACATCGCGCACACG CAGCGGCAG				

Çizelge 4. 17. *Streptomyces* sp. BG9H genomunda CRISPR/Cas dizileri (devam)

Kontig	CRISPR	CAS	Tekrar dizileri	Ara dizi (spacer)
723	1	0	GGGACCA CCCCGC ATGCGCG GGGACCA C	GAGATGCCGCAGGGCGGCGTCGTCCAGGGCTG
				TTGATGGAGCTGTCGTATCCGAAGCGCGGCGC
				GCACGTGCCTGCCCCAACAGGAGGTTGAAGCG
				GCATGCTGCAGGTCGTTGATGCCCTGGCGAAG
				GAACACGAAAAAGGAGATCTGACCATGCCCAA
				GAGATGCCGCAGGGCGGCGTCGTCCAGGGCTG
				CTCAGGAAGGAGCGGGCTCGGGCGGCCGGGCC
				GCTGTAGTGACATTACGTGGGCGGCCGGGG
				CGGTGCCGCCCGATCCGCTGGTCCCCGGGTA
				GTCCAGACTGATGCGCGGAAGTACAGCCCCGGG
				AGGTCGCCTGTCGGTGCCCCGGGGATCGCCCA
				CCGCTCAGCGAGGACGAGGAAGAACGCTGGGA
				GGTTTGCTGGCGCCAGCTCAGCGCACATCTC
				TACCGGAACGTGGGCACTGCGCGGAAATGGGA
				AGGAGCTCGTTCGTGAACGCTTCACTCAAGTC
				GAGGCCGCGCTCGCGCTCGTCCGCGGCCGTCC
				CTCGTCGTCGAAGTCGTCTCGTCGACGCCCA
				GCGCGGCTTCTCGCGGTCGGCTTCCGTATCGC
				AAATCCCAGAACTCAAGAACGCTGCCGTTCT
				CCCTCGTCTGCTCGTCCCACCAGTTGACCTC
				ACCTTGAGGCGAAGAACGGCTCCTCCACACG
				ACCGGCACCCGGGAGATGAAGCAGCTCGCCGC
				GATCCACGACCTGCGTCACACTCATGTGTCGTG
				TCGACCTGTACGACCTGGGAGCCGACCCCGAC
AGTCGGCACGGACTTGGCCAGACCACGGAACC				
GAGGCGGCCAAGATCATCACCTCGGACCATGA				

Streptomyces sp. BG9H genomunun antibiyotik direnç genlerine sahip olup olmadığını analiz etmek amacıyla ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) sunucusu (Zankari vd, 2012) kullanılmıştır. Buna göre *Streptomyces* sp. BG9H suşunun aminoglikozit, beta-laktam, kolistin, florokinolon, fosfomisin, fusidik asit, glikopeptid, makrolid, linkozamid, nitroimidazol, okzazolidinon, fenikol, rifampisin, sulfonamid, tetrasiklin ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı dirence neden olan herhangi bir geninin veya mutasyonunun bulunmadığı tespit edilmiştir.

Ayrıca sekonder metabolit üretiminden sorumlu olan genler AntiSMASH sunucusunda belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. BG9H genomu; poliketid sentaz (PKS), ribozomal olmayan peptidler (NRP), siderofor, terpen ve melanin gibi çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminde görev alan genleri barındırmaktadır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. *Streptomyces* sp. BG9H genomunda bulunan biyosentetik gen bölgeleri

GEN BÖLGESİ	BİLİNER EN YAKIN BİLEŞİK	BENZERLİK ORANI
TİP I PKS, BUTİROLAKTON	frankiamicin	% 21
LASSOPEPTİT	anantin	% 50
NRPS	kistamicin	% 20
SİDEROFOR	ficellomycin	% 5
SİDEROFOR	desferrioxamin	% 83
NRPS	JBIR-78/JBIR-95	% 22
ARİLPOLEN, LADDERAN	RP-1776	%32
FOSFONAT	rhizocticin	% 19
TERPEN	albaflavenone	% 100
TERPEN	geosmin	% 100
NRPS	pentalenolactone	% 11
NRPS	polyoxyeptin	% 13
NRPS	feglymycin	% 57
TİP III PKS	violapyrone B	% 28
NRPS	tyrobetaine	% 13
NRPS	aurantimycin A	% 21
TİP I PKS	azalomycin F3a	% 34
TİP II PKS	aranciamycin	% 21
MELANİN	istamycin	% 4
NRPS	rhizomide A, B, C	% 100



5. TARTIŞMA

Aktinobakteriler; ticari değeri yüksek olan birçok biyoaktif bileşiğin doğal üreticileri olup doğadaki eşsiz organizmalardır. Bu bakteri grubu tarafından üretilen biyoaktif bileşikler antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör ve immünosüpresif karakterde olabilirler. Aktinobakteriler tarafından üretilen sekonder metabolitlerin başında antibiyotikler yer almaktadır ve antibiyotiklerin %70'i *Streptomyces* cinsleri tarafından üretilmektedir (Okami, 1988; de Lima Procópio vd, 2012). Tıp ve ilaç endüstrisi alanında oldukça kıymetli olan antibiyotikleri ve diğer terapötik etkili maddeleri üretmeleri açısından aktinobakteriler araştırmacılar için dikkat çekici bir bakteri grubudur.

Tüm dünyada sağlık sorunlarının artması, patojen organizmaların mevcut antibiyotiklere karşı direnç oluşturması ve tedavide yetersiz kalınması gibi sebeplerden dolayı araştırmacılar daha etkili ve daha güvenli yeni bileşiklerin keşfine odaklanmışlardır (Sharma ve Gupta, 2015). Yapılan araştırmalar yeni biyoaktif maddelerin keşfi ile yeni aktinobakteri türlerinin keşfi arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermektedir (Müller ve Wink, 2014). Bu anlamda yeni biyoaktif bileşiklerin keşfedilmesi amacıyla daha önce izolasyon çalışmalarına dahil edilmemiş habitatlardan yeni aktinobakteri suşlarının izole edilmesi önemli bir çalışma konusudur.

Aktinobakteriler toprak, sediment, deniz, göl ve bitkisel dokular gibi çeşitli ekolojik çevrelerde bulunmakla birlikte en baskın buldukları habitat türü topraktır. Yapılan pek çok çalışmada toprak örneklerinden çok sayıda aktinobakteri türü özellikle de *Streptomyces* türleri izole edilmiş ve izole edilen aktinobakteri suşlarının antimikrobiyal ve antikanser özellikteki sekonder metabolitleri ürettikleri belirlenmiştir (Barka vd, 2016). Bu güne kadar yapılan araştırmalar göz önüne alındığında daha önce çalışılmamış toprak örneklerinden yeni aktinobakteri suşlarının elde edilme ihtimali ve bu suşların da yeni biyoaktif bileşikleri üretebilme potansiyelleri oldukça yüksektir.

Bu tez çalışmasında aktinobakteri kaynağı olarak Erzurum-Oltu ve Antalya-Kumluca bölgelerinden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. İzole edilen aktinobakteri suşlarından bazıları 16S rRNA gen dizi analizi ile cins düzeyinde tanımlanmış ve bu suşların *Arthrobacter*, *Leifsonia*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nonomuraea*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix* ve *Streptomyces* cinslerine ait oldukları belirlenmiştir.

Çalışmada seçilen 60 aktinobakteri suşuna ait metanol ham özütleri elde edilmiş ve elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle 10 farklı patojen organizmaya karşı test edilmiştir. Deney sonucunda antimikrobiyal aktivite testine tabi tutulan 60 izolattan 30'unun (% 50) en az bir patojenik organizmaya karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca en iyi inhibisyon zonlarını oluşturan 3 özüt seçilerek antimikrobiyal aktiviteleri mikrodilüsyon yöntemiyle de belirlenmiştir.

Duraipandiyar vd (2010) tarafından yapılan çalışmada Himalaya topraklarından ERIH-44 etiketli aktinobakteri üyesi izole edilmiştir. ERIH-44 suşuna ait özütün antimikrobiyal aktivitesi mikrodilüsyon tekniği ile belirlenmiştir. Sonuçlar ERIH-44 suşuna ait özütün *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenlerine karşı antibakteriyal etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Duraipandiyar vd, 2010). Bizuye vd (2013) tarafından yapılan çalışmada ise Etiyopya-Gondar şehrinden 15 bölgeden toprak örnekleri toplanmış ve aktinobakteri türleri izole edilmiştir. Türleri ait özütlerin antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Sonuçlar Ab18, Ab28 ve Ab43 etiketli aktinobakteri suşlarına ait özütlerin antimikrobiyal aktivitesini olduğunu göstermektedir. Ab18 özütü *S. aureus* patojenine karşı 30 mm, *E. coli* patojenine karşı 35 mm, *K. pneumoniae* patojenine karşı 14 mm ve *C. albicans* patojenine karşı ise 15 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Ab28 suşuna ait özüt ise *C. albicans* patojenine karşı 12 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Ab43 suşuna ait özüt ise *S. aureus* ve *E. coli* patojenlerine karşı sırasıyla 34 ve 25 mm inhibisyon zonları oluşturmuştur (Bizuye vd, 2013). Kumar vd (2012) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Hindistan topraklarından 35 aktinobakteri suşu izole edilmiş ve suşlara ait özütler metanol, etil asetat, bütanol gibi çeşitli organik çözücüler kullanılarak hazırlanmıştır. Özütlerin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon metodu kullanılarak test edilmiştir. VAS 10 kodlu aktinobakteri suşuna ait özütün antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

SuŒa ait metanol özütü *S. aureus*, *E. coli* ve *B. subtilis* patojenlerine karŒı sırasıyla 15, 21 ve 10 mm apında inhibisyon zonları oluŒturmuŒtur (Kumar vd, 2012). Trabelsi vd (2016) tarafından yapılan bir diğer alıŒmada ise toprak örneklerinden izole edilen *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Actinomadura* ve *Nocardia* cinslerine ait olan 54 aktinobakteri üyesinin ham özütleri elde edilmiŒ ve disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteleri deđerlendirilmiŒtir. Sonular 27 özütün kullanılan test patojenlerine karŒı antimikrobiyal etkisi olduğunu göstermiŒtir. Ayrıca 54 aktinobakteri üyesinin 42'sinin *Streptomyces* cinsine ait olması da bizim alıŒmamızla paralellik göstermektedir (Trabelsi vd, 2016). Kapur vd (2018) tarafından yapılan baŒka bir alıŒmada ise eŒitli toprak örneklerinden aktinobakteri üyeleri izole edilmiŒ ve suŒlara ait ham özütler metanol ve etil asetat özücülerini ile hazırlanmıŒtır. Özütlerin antimikrobiyal aktivitesi test edilmiŒ ve hem etil asetat özütlerinin hem metanol özütlerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuŒtur (Kapur vd, 2018). Chaudhary vd (2013) yaptıkları bir baŒka alıŒmada Hindistan- Sheopur bölgesindeki toprak örneklerinden 31 aktinobakteri üyesi izole etmiŒ ve bu türlere ait ham özütlerin 12 patojen organizmaya karŒı antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemiyle deđerlendirilmiŒtir. AS14, AS27 ve AS28 suŒlarına ait özütlerin yüksek oranda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiŒtir (Chaudhary vd, 2013). Sriprechasak ve Athipornchai (2019) tarafından yapılan alıŒmada ise Tayland bölgesindeki Samruk dağından toprak örnekleri alınmıŒ ve aktinobakteri izolasyonu yapılmıŒtır. İzole edilen 50 aktinobakteri üyesinden 13 tanesinin yapılan antimikrobiyal aktivite testi sonucunda *Bacillus subtilis*, *S. aureus* ve *C. albicans* patojenlerine karŒı aktivite gösterdiği belirlenmiŒtir (Sriprechasak ve Athipornchai, 2019). Bu tez alıŒmasında da farklı fizikokimyasal özelliklere sahip üç toprak örneğinin aktinobakteri biyoeŒitliliđi 16S rRNA gen dizi analizi ile belirlenerek izolatların biyoaktivite profillerini farklı patojen mikroorganizmalara karŒı gösterilen antimikrobiyal aktivite ve pankreas kanser hücre hattına karŒı gösterilen sitotoksik aktivite aısından ortaya konmuŒtur. Literatürde bildirilen alıŒmalarla karŒılaŒtırıldıđında bu tez alıŒmasından elde edilen bulgularla muhtemel yeni biyoaktif sekonder metabolit üreticisi yeni aktinobakteri türlerinin ortaya ıkarıldığı düşünölmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen ham özütlerin AR42J pankreatik kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar 16 aktinobakteri özütünün AR42J kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu doğrulamaktadır.

Azman vd (2017) tarafından yapılan bir çalışmada Malezya bölgesinden alınan toprak örneğinden *Microbacterium mangrovi* MUSC 115^T, *Sinomonas humi* MUSC 117^T ve *Monashia flava* MUSC 78^T olmak üzere üç yeni nadir aktinobakteri türü izole edilmiştir. Bu türlere ait metanol özütlerinin mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyal etkisi, MTT analizi ile de HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı ve insan servikal kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisi değerlendirilmiştir. Tüm özütler *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* ve *E. coli* patojenlerine karşı 1.25–2.5 mg/ml MİK değerlerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. MTT analizi sonucunda ise tüm özütlerin farklı düzeylerde her iki kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Azman vd, 2017). Ahmad vd (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Mısır topraklarından 52 aktinobakteri suşu izole edilmiş ve tüm suşların antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar 20 aktinobakteri türünün *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* ve *S. lutea* patojenlerinden en az birine karşı aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca yapılan sitotoksitesite testi sonucu *Streptomyces* cinsi üyesi olan AGM12-1 suşuna ait olan özütün sırasıyla IC₅₀ 3.3 ve 1.1 mg/ml değerlerinde HCT-116 ve HepG-2 kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Ahmad vd, 2017).

Law vd (2017) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise Malezya topraklarından yeni bir tür olan *Streptomyces colonosanans* MUSC 93J^T izole edilmiş ve bu türe ait özütün HCT-116, HT-29, Caco-2 ve SW480 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisi MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ekstraktın dört kanser hücre hattı üzerinde de farklı düzeylerde sitotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir. 400 µg/ml konsantrasyonda en yüksek sitotoksik etki SW480 hücre hattında görülürken en düşük sitotoksik etki HT-29 hücre hattında görülmüştür (Law vd, 2017). Law vd (2019) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise doğu Malezya bölgesinden alınan orman toprağından *Streptomyces monashensis* sp. nov. MUSC 1J^T yeni türü izole edilmiştir. Bu türün HCT-116 ve SW480 kolon kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT analizi yapılarak değerlendirilmiştir.

Streptomyces monashensis sp. nov. MUSC 1J^T ekstraktının HCT-116 ve SW480 kanser hücre hatları üzerinde 400 µg/ml konsantrasyonda önemli bir sitotoksosite gösterdiği bulunmuştur (Law vd, 2019).

Abdel-Aziz vd (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise Mısır topraklarından sekiz aktinobakteri türü izole edilmiştir ve bu sekiz aktinobakteriden *Streptomyces* cinsine ait olan üç tanesinin ham özütlerinin *S. aureus*, *C. albicans*, *F. oxysporum*, *P. aeruginosa* ve *A. niger* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu saptanmıştır. Ayrıca ekstraktların insan hepatosellüler kanser hücre hattı (HepG2) üzerindeki etkisi incelenmiş ve antimikrobiyal aktivite gösteren üç izolattan birinin antikanser özelliğe de sahip olduğu belirlenmiştir (Abdel-Aziz vd, 2019).

Yapılan pek çok çalışma aktinobakterilerin antimikrobiyal aktivite dışında antikanser özellikte metabolitler ürettiğini doğrular niteliktedir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular literatürdeki ilgili çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Ayrıca *Streptomyces* sp. BG9H suşunun tüm genom analizi yapılmış ve CRISPR-Cas dizileri belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. BG9H genomunda CRISPR-Cas dizilerinin olması nükleik asit temelli bir savunma sisteminin varlığına işaret eder ki bu da mikroorganizmayı virüs ve diğer hareketli genetik elementler gibi stres faktörlerine karşı korur.

5.1. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışması sonucunda Erzurum ve Antalya bölgelerinden alınmış üç toprak örneğinden aktinobakteri olduğu düşünülen toplam 340 izolat elde edilmiştir. Erzurum-Oltu bölgesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen *Streptomyces* spp. AG7H, AG9H, BG10H ve KG16H suşlarının ve *Pseudonocardia* sp. KG21H suşunun en yakın tip türleri ile 16S rRNA dizi benzerlik oranları %98.83-99.23 arasındadır. Bu suşların yeni tür olup olmadıklarının doğrulanması için polifazik taksonomik analizlerinin tamamlanması gerekmektedir.

Antalya-Kumluca bölgesinden alınan toprak örneğinden izole edilen *Streptomyces* spp. AK11H, AK12H, RK4H, MK15H, MK12H ve HK15H suşlarının en yakın tip türleri ile 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları da %99'un altındadır. *Streptomyces* spp. MK15H, MK12H ve HK15H suşlarının birbirleriyle 16S rRNA gen dizi benzerlik oranları % 100'dür.

En yakın tip türleriyle 16S rRNA dizi benzerlik oranlarının %99'un altında olması bu suşların yeni tür statülerinin doğrulanması için polifazik taksonomik analizlerinin tamamlanması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca Antalya-Kumluca toprağından izole edilen *Nonomuraea* sp. HK9H suşu ise en yakın tip türü ile % 99.10 (1441 pozisyonda 13 nt) dizi benzerliğine sahiptir. Genom dizi analizi, fenotipik ve kemotaksonomik karakterizasyon yapılarak bu suşun taksonomik statüsü belirlenmelidir.

Bu tez çalışmasında seçilen 60 aktinobakteri özütünün antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Yapılan disk difüzyon testi sonucunda *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *A. niger* ATCC 16404 patojenlerine karşı en iyi antimikrobiyal aktiviteyi *Streptomyces* sp. MK37H özütü gösterirken, *B. subtilis* ATCC 6633 patojenine karşı en iyi antimikrobiyal aktiviteyi ise *Streptomyces* sp. RG6-2H özütü göstermiştir. *S. aureus* ATCC 25923, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı ise en iyi antimikrobiyal aktiviteyi BK2H suşuna ait özüt göstermiştir. *C. albicans* ATCC 10231 patojenine karşı ise en iyi antimikrobiyal aktiviteyi *Streptomyces* sp. FG7H özütü sergilemiştir. Genel olarak tüm test patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivite düzeyine bakılacak olursa en iyi sonuç veren özütler *Streptomyces* spp. MK37H, AS18H özütleri ve BK2H özütüdür. *Streptomyces* sp. MK37H özütü 10 patojenik organizmaya karşı da inhibisyon zonu oluşturmaktadır. BK2H suşuna ait özüt ise *C. albicans* dışındaki patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Streptomyces* sp. AS18H suşuna ait özüt ise *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enterica*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı aktivite göstermiştir. Mikrodilüsyon testi sonucunda ise bu özütlere ait MİK değerleri belirlenmiş ve AS18H özütünün diğer iki özüte göre daha düşük miktarlarda aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Çalışma kapsamında yapılan sitotoksikite deneylerinde 60 özütten (% 26. 6) 16 tanesinin farklı konsantrasyonlarda AR42J pankreas kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca *Streptomyces* sp. BG9H genomunun sekonder metabolit üretiminden sorumlu genleri ve CRISPR/Cas dizileri içerdiği tespit edilmiş olup ileride yapılabilecek çalışmalarla bu genlerin biyoteknolojik amaçlar için kullanılabilirliği ortaya çıkarılmalıdır.

Sonuç olarak; bu tez çalışması ile Erzurum-Oltu ve Antalya-Kumluca bölgelerinden alınan toprak örneklerinin aktinobakteri çeşitliliği belirlenmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarla 16S rRNA gen dizi benzerlik oranlarına ve filogenetik dendrogramdaki yerlerine göre yeni olduğu düşünülen türler polifazik taksomik yaklaşımlar ile kesin bir şekilde tanımlanıp, literatüre kazandırılacaktır. Ayrıca, ileride yapılması planlanan çalışmalarla antimikrobiyal ve antikanser özelliğe sahip olan *Streptomyces* spp. MK37H, AS18H özütleri ve BK2H özütü saflaştırma ve moleküler tanımlama yöntemleri ile detaylı olarak tanımlanacak ve olası yeni bir biyoaktif bileşik keşfi durumunda bu bileşik mikrobiyal bir metabolit olarak literatüre kazandırılacaktır.

KAYNAKÇA

- Abdel-Aziz, M. S., Hathout, A. S., El-Neleety, A. A., Hamed, A. A., Sabry, B. A., Aly, S. E. and Abdel-Wahhab, M. A. 2019. Molecular identification of actinomycetes with antimicrobial, antioxidant and anticancer properties. *Comunicata Scientiae*, 10(2), 218-231.
- Ahmad, M. S., El-Gendy, A. O., Ahmed, R. R., Hassan, H. M., El-Kabbany, H. M. and Merdash, A. G. 2017. Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 isolated from Egyptian soil. *Frontiers in microbiology*, 8, 438.
- Alanis, A. J. 2005. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of medical research*, 36(6), 697-705.
- Anandan, R., Dharumadurai, D. and Manogaran, G. P. 2016. An introduction to actinobacteria *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*: IntechOpen.
- Anderson, A. S. and Wellington, E. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 797-814.
- Asolkar, R. N., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. and Fenical, W. 2006. Daryamides A–C, weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085. *Journal of natural products*, 69(12), 1756-1759.
- Asolkar, R. N., Kirkland, T. N., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2010. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin-and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of antibiotics*, 63(1), 37.
- Azman, A.-S., Othman, I., Fang, C.-M., Chan, K.-G., Goh, B.-H. and Lee, L.-H. 2017. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare Actinobacteria from mangrove forest soils. *Indian journal of microbiology*, 57(2), 177-187.
- 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. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(1), 1-43.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4-ts), 493-496.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1.
- Bernasconi, E., Valsangiacomo, C., Peduzzi, R., Carota, A., Moccetti, T. and Funke, G. 2004. *Arthrobacter woluwensis* subacute infective endocarditis: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 38(4), e27-e31.
- Bizuye, A., Moges, F. and Andualem, B. 2013. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia. *Asian Pacific journal of tropical disease*, 3(5), 375-381.

- Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S. and Wallace, R. J. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 259-282.
- Buchanan, R. 1917. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria: II. The primary subdivisions of the schizomycetes. *Journal of bacteriology*, 2(2), 155.
- Busse, H.-J. and Wieser, M. 2014. The Genus *Arthrobacter*. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 105-132.
- Chaudhary, H. S., Yadav, J., Shrivastava, A. R., Singh, S., Singh, A. K. and Gopalan, N. 2013. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4(2), 118.
- Conn, H. and Dimmick, I. 1947. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *Journal of bacteriology*, 54(3), 291.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 72-79.
- Cullington, J. E. and Walker, A. 1999. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(5), 677-686.
- Davis, M. J., Gillaspie Jr, A. G., Vidaver, A. K. and Harris, R. W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2), 107-117.
- de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L. and de Araújo, J. M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 16(5), 466-471.
- Dellweg, H., Kurz, J., Pflüger, W., Schedel, M., Vobis, G. and Wünsche, C. 1988. Rodaplutin, a new peptidyl nucleoside from *Nocardioides albus*. *The Journal of antibiotics*, 41(8), 1145-1147.
- Dietz, A. and Mathews, J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl. Environ. Microbiol.*, 21(3), 527-533.
- Duraipandiyan, V., Sasi, A., Islam, V., Valanarasu, M. and Ignacimuthu, S. 2010. Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(1), 15-20.
- El-Gendy, M. M., Hawas, U. W. and Jaspars, M. 2008. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *The Journal of antibiotics*, 61(6), 379.
- Embley, T. and Stackebrandt, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 48(1), 257-289.

- Evtushenko, L. I., Dorofeeva, L. V., Subbotin, S. A., Cole, J. R. and Tiedje, J. M. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(1), 371-380.
- Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(3), 355-357.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fenical, W. and Jensen, P. R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12), 666.
- Fischbach, M. A and Walsh, C. T. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), 1089-1093.
- Flårdh, K. and Buttner, M. J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36.
- Fleck, W., Strauss, D., Meyer, J. and Porstendorfer, G. 1978. Fermentation, isolation, and biological activity of maduramycin: a new antibiotic from *Actinomadura rubra*. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 18(6), 389-398.
- Franco, C. M. and Labeda, D. P. 2014. The order Pseudonocardiales. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 743-860.
- Gao, B and Gupta, R. S. 2005. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), 2401-2412.
- Gauze, G., Sveshnikova, M., Ukholina, R., Gavrilina, G. and Filicheva, V. 1973. Production of antineoplastic antibiotic carminomycin by *Actinomadura carminata* sp. nov. *Antibiotiki*, 18(8), 675.
- George, M., George, G. and Hatha, A. M. 2010. Diversity and antibacterial activity of actinomycetes from wetland soil. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28(1), 52-57.
- Gerlier, D. and Thomasset, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, 94(1-2), 57-63.
- Golinska, P., Wang, D. and Goodfellow, M. 2013. *Nocardia aciditolerans* sp. nov., isolated from a spruce forest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(5), 1079-1088.
- Gonzalez, A., Jimenez, A., Vazquez, D., Davies, J. and Schindler, D. 1978. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 521(2), 459-469.

- Goodfellow, M. 2014. The family Nocardiaceae. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 595-650.
- Goodfellow, M. and Fiedler, H.-P. 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(2), 119-142.
- Goodfellow, M., Lacey, J. and Todd, C. 1987. Numerical classification of thermophilic streptomycetes. *Microbiology*, 133(11), 3135-3149.
- Goodfellow, M., Minnikin, D., Todd, C., Alderson, G., Minnikin, S. and Collins, M. 1982. Numerical and chemical classification of *Nocardia amarae*. *Microbiology*, 128(6), 1283-1297.
- Goodfellow, M. and Williams, S. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*, 37(1), 189-216.
- Gopinath, P. M., Dhanasekaran, D., Ranjani, A., Thajuddin, N., Akbarsha, M. A., Velmurugan, M. and Panneerselvam, A. 2015. Optimization of sporicidal activity and environmental *Bacillus* endospores decontamination by biogenic silver nanoparticle. *Future microbiology*, 10(5), 725-741.
- Grein, A., Merli, S. and Spalla, C. 1980. NEW anthracycline glycosides from micromonospora. *The Journal of antibiotics*, 33(12), 1462-1467.
- Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W52-W57.
- Hayakawa, M. and 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.
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C. and Hausmann, R. 2012. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, 47(8), 1207-1219.
- Henssen, A. 1957. Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten. *Archiv für Mikrobiologie*, 26(4), 373-414.
- Henssen, A., Happach-Kasan, C., Renner, B. and Vobis, G. 1983. *Pseudonocardia compacta* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(4), 829-836.
- Henssen, A. and Schäfer, D. 1971. Emended description of the genus *Pseudonocardia* Henssen and description of a new species *Pseudonocardia spinosa* Schäfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 21(1), 29-34.
- Hodgson, D. A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria.
- Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C., Irran, E., Nicholson, G., Bull, A. T and Goodfellow, M. 2009. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *The Journal of antibiotics*, 62(2), 99.

- Hopwood, D. A. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology*, 145(9), 2183-2202.
- Hoshino, Y., Mukai, A., Yazawa, K., Uno, J., Ishikawa, J., Ando, A. and Mikami, Y. 2004. Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis*. *The Journal of antibiotics*, 57(12), 797-802.
- Hu, Z., Reid, R. and Gramajo, H. 2005. The leptomycin gene cluster and its heterologous expression in *Streptomyces lividans*. *The Journal of antibiotics*, 58(10), 625.
- Huang, C. H., Lin, Y. S., Yang, Y. L., Huang, S. w. and Chen, C. W. 1998. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular microbiology*, 28(5), 905-916.
- Huang, Y., Wang, L., Lu, Z., Hong, L., Liu, Z., Tan, G. Y. A. and Goodfellow, M. 2002. Proposal to combine the genera *Actinobispora* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*, and description of *Pseudonocardia zijingensis* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 977-982.
- Igarashi, Y., Mogi, T., Yanase, S., Miyanaga, S., Fujita, T., Sakurai, H and Ohsaki, A. 2009. Brartemicin, an inhibitor of tumor cell invasion from the actinomycete *Nonomuraea* sp. *Journal of natural products*, 72(5), 980-982.
- Ikeda, H., Tanaka, H. and Omura, S. 1982. Genetic and biochemical features of spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *The Journal of antibiotics*, 35(4), 507-516.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M. and Sait, M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2391-2396.
- Johnsen, A. R., Winding, A., Karlson, U. and Roslev, P. 2002. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labeled cell lipids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(12), 6106-6113.
- Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. and Kropp, H. 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235(1), 364-386.
- Kamigiri, K., Tokunaga, T., Shibazaki, M., Setiawan, B., Morioka, M., Suzuki, K.-I. and Rantiatmodjo, R. M. 1996. YM-30059, a novel quinolone antibiotic produced by *Arthrobacter* sp. *The Journal of antibiotics*, 49(8), 823-825.
- Kämpfer, P., Kroppenstedt, R. M. and Grün-Wollny, I. 2005. *Nonomuraea kuesteri* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(2), 847-851.
- Kang, S.-M., Khan, A. L., You, Y.-H., Kim, J.-G., Kamran, M. and Lee, I.-J. 2014. Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(1), 106-112.

- Kanzaki, H., Kawabata, G., Kobayashi, A. and Kawazu, K. 1993. Bisanthraquinones, inhibitors of plant transformation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(12), 2104-2106.
- Kapur, M. K., Solanki, R., Das, P., Kumar, M. and Kumar, P. 2018. Antimicrobial Activity Analysis of Bioactive Compounds from Soil Actinomycetes. *J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 6(3), 178-187.
- Kase, H., Iwahashi, K. and Matsuda, Y. 1986. K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *The Journal of antibiotics*, 39(8), 1059-1065.
- Kawamura, N., Sawa, R., Takahashi, Y., Issiki, K., Sawa, T., Kinoshita, N. and Takeuchi, T. 1995. Pyralomicins, new antibiotics from *Actinomyces spiralis*. *The Journal of antibiotics*, 48(5), 435-437.
- Kieser, H. M., Kieser, T. and Hopwood, D. A. 1992. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Journal of bacteriology*, 174(17), 5496-5507.
- Kim, D., Chun, J., Sahin, N., Hah, Y. C. and Goodfellow, M. 1996. Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(2), 581-587.
- Kim, S. B., Lonsdale, J., Seong, C.-N. and 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, Y. J., Furihata, K., Shimazu, A., Furihata, K. and Seto, H. 1991. Isolation and structural elucidation of sekothrixide, a new macrolide effective to overcome drug-resistance of cancer cell. *The Journal of antibiotics*, 44(11), 1280-1282.
- Konstantinidis, K. T. and Tiedje, J. M. 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of bacteriology*, 187(18), 6258-6264.
- Korn-Wendish, F. 1992. The family streptomycetaceae. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Identification, Applications*.
- Kudo, T., Hatai, K. and Seino, A. 1988. *Nocardia seriola* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(2), 173-178.
- Kumar, N., Singh, R. K., Mishra, S., Singh, A. and Pachouri, U. 2010. Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*, 2(2), 12.
- Kumar, P. S., Raj, J. P. P., Durairandiyan, V. and Ignacimuthu, S. 2012. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(12), 936-943.
- Labeda, D., Testa, R., Lechevalier, M. and Lechevalier, H. 1984. *Saccharothrix*: a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 426-431.
- Lakshmanaperumalsamy, P. 1986. *Seasonal variation of microbial population from sediments of Vellar estuary, South India*. Paper presented at the Deuxieme Colloque International de Bacteriologie marine, Acti de Colloques.

- Lan lle, M. and Asselineau, J. 1970. Caracterisation de glycolipides dans une souche de *Nocardia brasiliensis*. *FEBS letters*, 7(1), 64-67.
- Laskaris, P., Tolba, S., Calvo-Bado, L. and Wellington, L. 2010. Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environmental microbiology*, 12(3), 783-796.
- Latha, S. and Dhanasekaran, D. 2013. Antibacterial and extracellular enzyme activities of gut actinobacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* and *Capra hircus*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(11), 379-385.
- Law, J. W.-F., Ser, H.-L., Ab Mutalib, N.-S., Saokaew, S., Duangjai, A., Khan, T. M. and Lee, L.-H. 2019. *Streptomyces monashensis* sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium from East Malaysia with antioxidative potential. *Scientific reports*, 9(1), 3056.
- Law, J. W.-F., Ser, H.-L., Duangjai, A., Saokaew, S., Bukhari, S. I., Khan, T. M. and Lee, L.-H. 2017. *Streptomyces colonosanans* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Malaysia mangrove soil exhibiting antioxidative activity and cytotoxic potential against human colon cancer cell lines. *Frontiers in microbiology*, 8, 877.
- Lechevalier, H. and Lechevalier, M. P. 1965. *Classification des actinomyc tes a robie bas e sur leur morphologie et leur composition chimique*. Paper presented at the annales de l institut pasteur.
- Lee, J. Y., Lee, J. Y., Jung, H. W. and Hwang, B. K. 2005. *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 257-262.
- Lee, S. D., Kim, E. S., Min, K.-L., Lee, W. Y., Kang, S.-O. and Hah, Y. C. 2001. *Pseudonocardia kongjuensis* sp. nov., isolated from a gold mine cave. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(4), 1505-1510.
- Li, S., Tian, X., Niu, S., Zhang, W., Chen, Y., Zhang, H. and Zhang, S. 2011. Pseudonocardians A–C, new diazaanthraquinone derivatives from a deep-sea actinomycete *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299. *Marine drugs*, 9(8), 1428-1439.
- Lomovskaya, N., Fonstein, L., Ruan, X., Stassi, D., Katz, L. and Hutchinson, C. R. 1997. Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygrosopicus* strain ATCC 29253. *Microbiology*, 143(3), 875-883.
- Ludwig, W., Euz by, J., Schumann, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., K mpfer, P. and Whitman, W. B. 2012. Road map of the phylum Actinobacteria *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (pp. 1-28): Springer.
- Luo, Q., Hiessl, S., Poehlein, A. and Steinb chel, A. 2013. Microbial gutta-percha degradation shares common steps with rubber degradation by *Nocardia nova* SH22a. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(4), 1140-1149.

- Macagnan, D., Romeiro, R. d. S., de Souza, J. T. and Pomella, A. W. 2006. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica*, 34(2), 122-132.
- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M. and Sherman, D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12), 7520-7529.
- Maldonado, L. A., Fragoso-Yáñez, D., Pérez-García, A., Rosellón-Druker, J. and Quintana, E. T. 2009. Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95(2), 111-120.
- Manam, R. R., Teisan, S., White, D. J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S. T. and Potts, B. C. 2005. Lajollamycin, a Nitro-tetraene Spiro- β -lactone- γ -lactam Antibiotic from the Marine Actinomycete *Streptomyces nodosus*. *Journal of natural products*, 68(2), 240-243.
- Mangamuri, U. K., Vijayalakshmi, M., Poda, S., Manavathi, B., Bhujangarao, C. and Venkateswarlu, Y. 2015. Bioactive metabolites produced by *Pseudonocardia endophytica* VUK-10 from mangrove sediments: isolation, chemical structure determination and bioactivity. *J Microbiol Biotechnol*, 25(5), 629-636.
- Matson, J. A. and Bush, J. A. 1989. Sandramycin, a novel antitumor antibiotic produced by a nocardioide sp. *The Journal of antibiotics*, 42(12), 1763-1767.
- McBRIDE, M. J. and Ensign, J. 1987. Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of bacteriology*, 169(11), 4995-5001.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F. and Lebrihi, A. 2011. Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(18), 6710-6714.
- Miyanaga, S., Obata, T., Onaka, H., Fujita, T., Saito, N., Sakurai, H. and Igarashi, Y. 2006. Absolute configuration and antitumor activity of myxochelin A produced by *Nonomuraea pusilla* TP-A0861. *The Journal of antibiotics*, 59(11), 698.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T. and Hayakawa, Y. 2001. Ammocidin, a new apoptosis inducer in Ras-dependent cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity. *The Journal of antibiotics*, 54(9), 710-713.
- Müller, R and Wink, J. 2014. Future potential for anti-infectives from bacteria—how to exploit biodiversity and genomic potential. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 3-13.
- Nakaew, N., Sungthong, R., Yokota, A. and 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.
- Nesterenko, O., Kvasnikov, E. and Nogina, T. 1985. Nocardioideaceae fam. nov., a new family of the order Actinomycetales Buchanan 1917. *Mikrobiol Zh*, 47, 3-12.

- Ningthoujam, D. S., Sanasam, S. and Nimaichand, S. 2009. Screening of actinomycete isolates from niche habitats in Manipur for antibiotic activity. *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 5(4), 221-225.
- Nishiyama, Y., Sugawara, K., Tomita, K., Yamamoto, H., Kamei, H. and Oki, T. 1993. Verucopeptin, a new antitumor antibiotic active against b16 melanoma. *The Journal of antibiotics*, 46(6), 921-927.
- Nomi, R. 1963. Streptomycin formation by intact mycelium of *Streptomyces griseus*. *Journal of bacteriology*, 86(6), 1220-1230.
- Okami, Y. 1988. Search and discovery of new antibiotics. *Actinomycetes in biotechnology.*, 33-67.
- Okami, Y. and Hotta, K. 1988. Search and discovery of new antibiotics, in "Actinomycetes in Biotechnology"(Goodfellow, M., Williams, ST and Mordarski, M., eds.): Academic Press, Inc., New York, NY.
- Oskay, A. M., Üsame, T. and Cem, A. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African journal of Biotechnology*, 3(9), 441-446.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31, 135-152.
- Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty, R. and Stassi, D. 2003. *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical reviews in biotechnology*, 23(1), 1-27.
- Park, C. H., Han, M. S., Kim, J. K., Jeong, S. J., Ku, N. S., Kim, H. and Choi, J. Y. 2012. Development of *Arthrobacter woluwensis* bacteremia in a patient with multiple myeloma: a case report and comprehensive literature review. *Infection & Chemotherapy*, 44(3), 205-209.
- Park, S. W., Park, S. T., Lee, J. E. and Kim, Y. M. 2008. *Pseudonocardia carboxydivorans* sp. nov., a carbon monoxide-oxidizing actinomycete, and an emended description of the genus *Pseudonocardia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(11), 2475-2478.
- Perkins, J., Guterman, S., Howitt, C., Williams, V. and Pero, J. 1990. *Streptomyces* genes involved in biosynthesis of the peptide antibiotic valinomycin. *Journal of bacteriology*, 172(6), 3108-3116.
- Petković, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Perić-Concha, N., Pigac, J. and Long, P. F. 2006. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70(3), 704-728.
- Pillmoor, J. B. 1998. Carbocyclic coformycin: a case study of the opportunities and pitfalls in the industrial search for new agrochemicals from nature. *Pesticide science*, 52(1), 75-80.
- Pohlenz, H.-D., Boidol, W., Schüttke, I and Streber, W. R. 1992. Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of bacteriology*, 174(20), 6600-6607.

- Powell, H., Culbertson, C., McGuire, J., Hoehn, M. and Baker, L. 1952. A Filtrate with Chemoprophylactic and Chemo-therapeutic Action against MM and Semliki Forest Viruses in Mice. *Antibiotics & Chemotherapy*, 2(8), 432-434.
- Prauser, H. 1976. Nocardioides, a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(1), 58-65.
- Qiu, F., Huang, Y., Sun, L., Zhang, X., Liu, Z. and Song, W. 2007. *Leifsonia ginsengi* sp. nov., isolated from ginseng root. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(2), 405-408.
- Rai, K., Khadka, S. and Shrestha, B. 2018. Actinomycetes: Isolation, Characterization and Screening for Antimicrobial Activity from Different Sites of Chitwan, Nepal. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(1), 25-30.
- Ranjani, A., Gopinath, P., Rajesh, K., Dhanasekaran, D. and Priyadharsini, P. 2016. Diversity of silver nanoparticle synthesizing actinobacteria isolated from marine soil, Tamil Nadu, India. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41(1), 25-32.
- Reasoner, D. J. and Geldreich, E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49(1), 1-7.
- Reddy, G., Prabakaran, S. and Shivaji, S. 2008. *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the Pindari glacier of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(9), 2229-2234.
- Reddy, G., Prakash, J., Srinivas, R., Matsumoto, G. and Shivaji, S. 2003. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov., psychrophiles from a pond in Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(4), 977-984.
- Reed, J. F. and Cummings, R. W. 1945. Soil reaction—glass electrode and colorimetric methods for determining pH values of soils. *Soil science*, 59(1), 97-105.
- Rouf, M. and Stokes, J. 1962. Isolation and identification of the sudanophilic granules of *Sphaerotilus natans*. *Journal of bacteriology*, 83(2), 343-347.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sanglier, J., Wellington, E., Behal, V., Fiedler, H., Ghorbel, R. E., Finance, C. and Mercer, D. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in microbiology*, 144(8), 661-663.
- Sanscartier, D., Zeeb, B., Koch, I. and Reimer, K. 2009. Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. *Cold Regions Science and Technology*, 55(1), 167-173.
- Schleifer, K. H. and Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, 36(4), 407.

- Schmid, R. D. and Verger, R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608-1633.
- Schneider, K., Rose, I., Vikineswary, S., Jones, A. L., Goodfellow, M., Nicholson, G. and Fiedler, H.-P. 2007. Nocardichelins A and B, siderophores from *Nocardia strain acta 3026*. *Journal of natural products*, 70(6), 932-935.
- Sharma, S. and Gupta, R. 2015. Drug development from natural resource: a systematic approach. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(1), 52-57.
- Shin, K. S., Hong, S. B. and Son, B. R. 2006. A case of catheter-related bacteremia by *Arthrobacter woluwensis*. *The Korean journal of laboratory medicine*, 26(2), 103-106.
- Shirling, E. T. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*, 16(3), 313-340.
- Shukor, M., Hassan, N., Jusoh, A., Perumal, N., Shamaan, N., MacCormack, W. and Syed, M. 2009. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica. *J. Environ. Biol*, 30(1), 1-6.
- Simpson, R. S. and Read, R. C. 2014. Nocardiosis and actinomycosis. *Medicine*, 42(1), 23-25.
- Sivarajan, A., Shanmugasundaram, T., Sangeetha, M., Radhakrishnan, M. and Balagurunathan, R. 2019. Screening, production, and characterization of biologically active secondary metabolite (s) from marine *Streptomyces* sp. PA9 for antimicrobial, antioxidant, and mosquito larvicidal activity.
- Sripreechusak, P. and Athipornchai, A. 2019. Potential antimicrobial properties of streptomyces isolated from Samruk Mountain soil, Chonburi Province, Thailand. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 10(4), 195.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and 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.
- Steinrauf, L., Pinkerton, M. and Chamberlin, J. 1968. The structure of nigericin. *Biochemical and biophysical research communications*, 33(1), 29-31.
- Sungthong, R. and Nakaew, N. 2015. The genus *Nonomuraea*: a review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. *Journal of basic microbiology*, 55(5), 554-565.
- Suzuki, K.-i., Suzuki, M., Sasaki, J., Park, Y.-H. and Komagata, K. 1999. *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2, 4-diaminobutyric acid-containing actinomycetes to accommodate “*Corynebacterium aquaticum*” Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Davis et al. 1984. *The Journal of general and applied microbiology*, 45(5), 253-262.
- Takahashi, Y., Iwai, Y. and Omura, S. 1986. Clostomicins, New antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. nov. *The Journal of antibiotics*, 39(10), 1413-1418.
- Tamura, A., Furuta, R., Naruto, S. and Ishii, H. 1973. Actinotiocin, a new sulfur-containing peptide antibiotic from *Actinomadura pusilla*. *The Journal of Antibiotics*, 26(6), 343-350.

- Tamura, S., Takahashi, N., Miyamoto, S., Mori, R., Suzuki, S. and Nagatsu, J. 1963. Isolation and physiological activities of piericidin A, a natural insecticide produced by *Streptomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 27(8), 576-582.
- Tan, G. Y. A., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2006. Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media. *Systematic and applied microbiology*, 29(7), 557-569.
- Theriault, R. J., Rasmussen, R. R., Kohl, W. L., Prokop, J. F., Hutch, T. B. and Barlow, G. J. 1986. Benzanthrins a and b, a new class of quinone antibiotics. *The Journal of antibiotics*, 39(11), 1509-1514.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and 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.
- Tomiyasu, I. 1982. Mycolic acid composition and thermally adaptative changes in *Nocardia asteroides*. *Journal of bacteriology*, 151(2), 828-837.
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T. and Lee, S. Y. 2015. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS synthetic biology*, 4(9), 1020-1029.
- Tóth, E. M. and Borsodi, A. K. 2014. The Family Nocardioidaceae. *The Prokaryotes: Actinobacteria*, 651-694.
- Trabelsi, I., Oves, D., Manteca, A., Genilloud, O., Altalhi, A. and Nour, M. 2016. Antimicrobial activities of some actinomycetes isolated from different rhizospheric soils in Tunisia. *Current microbiology*, 73(2), 220-227.
- Umezawa, H. 1957. Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *J Antibiot*, 10, 181-189.
- Vainberg, S., McClay, K., Masuda, H., Root, D., Condee, C., Zylstra, G. J. and Steffan, R. J. 2006. Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia* sp. strain ENV478. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(8), 5218-5224.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L. I., López-Bucio, J., Flores-Cortez, I., Santoyo, G., Hernández-Soberano, C. and Valencia-Cantero, E. 2013. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma*, 250(6), 1251-1262.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G. F., Gupta, R. S. and van Sinderen, D. 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 351-372.
- Verweij, J. and Pinedo, H. M. 1990. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs*, 1(1), 5-13.
- Waksman, S. A. and Woodruff, H. B. 1942. Streptothricin, a New Selective Bacteriostatic and Bactericidal Agent, Particularly Active Against Gram-Negative Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 49(2), 207-210.

- Wang, L., Yun, B.-S., George, N. P., Wendt-Pienkowski, E., Galm, U., Oh, T.-J. and Shen, B. 2007. Glycopeptide antitumor antibiotic zorbamycin from *Streptomyces flavoviridis* ATCC 21892: strain improvement and structure elucidation. *Journal of natural products*, 70(3), 402-406.
- Warneke, S., Arenskötter, M., Tenberge, K. B. and Steinbüchel, A. 2007. Bacterial degradation of poly (trans-1, 4-isoprene)(gutta percha). *Microbiology*, 153(2), 347-356.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. and Bhole, B. D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of microbiology*, 176(5), 386-390.
- Wellington, E. 1979. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios. Lett.*, 6, 151-157.
- Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic ocean sediments. *Nature*, 223(5208), 858.
- Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberger, T. and Imhoff, J. F. 2009. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Marine Biotechnology*, 11(2), 287-300.
- Williams, S., Sharples, G., Serrano, J., Serrano, A. and Lacey, J. 1976. The micromorphology and fine structure of nocardioform organisms. *The biology of the Nocardiae*. Academic Press, London, 103-140.
- Wilson, J. W. 2012. *Nocardiosis: updates and clinical overview*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Wu, K., Chung, L., Revill, W. P., Katz, L. and Reeves, C. D. 2000. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene*, 251(1), 81-90.
- Xiliang, J. 1994. The mechanism of agricultural antibiotic. *Biol Control Aviso*, 10(2), 76-81.
- Yan Chu, S. 1993. New developments of agricultural antibiotic pesticide. *Trans.(China)*, 15(6), 5-12.
- Yano, I., Imaeda, T. and Tsukamura, M. 1990. Characterization of *Nocardia nova*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(2), 170-174.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O. and Larsen, M. V. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(11), 2640-2644.
- Zhang, Z., Wang, Y. and Ruan, J. 1998. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 411-422.
- Zhou, J., Sun, C., Wang, N., Gao, R., Bai, S., Zheng, H. and Li, R. 2006. Preliminary report on the biological effects of space flight on the producing strain of a new immunosuppressant, Kanglemycin C. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(8), 707-712.

Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. 2005. Nocardiosis and Saccharothrix genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in microbiology*, 156(10), 984-993.



EKLER

EK 1: Seçici İzolasyon Besiyerleri ve Kültür Ortamı

1. Modifiye Besiyeri (Shukor vd, 2009)

Modifiye besiyeri		Antibiyotikler
Gliserol	10 ml	Cycloheximide (50µg/ml) Nalidixic asit (10 µg/ml)
KH ₂ PO ₄	1,36 g	
Na ₂ HPO ₄	1,38 g	
KNO ₃	0,5 g	
MgSO ₄	0,01 g	
CaCl ₂	0,01 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,7 g	
İz element solüsyonu	1 ml	
Agar	18 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

2. Humik Asit Vitamin Agar (HV Medium) (Hayakawa ve Nonomura, 1987)

HV Medium		Antibiyotikler
Hümik asit	1 g	Humik asit 10 ml 0.2 N NaOH içerisinde çözülerek hazırlandı. Cycloheximide (50µg/ml) Nalidixic asit (10 µg/ml)
Na ₂ HPO ₄	0,5 g	
KCl	1,71 g	
CaCO ₃	0,05 g	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g	
Vitamin çözeltisi	1 ml	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

- **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
- Biotin 1 mg
- İnozitol 1 mg
- Nikotinamid 1 mg
- Pantotenik asit (B5) 1 mg
- Piridoksin (B6) 1 mg
- Riboflavin Na-kolin (B2) 1 mg
- Tiyamin (B1) 1 mg
- Siyanokobalamin (B12) 0.05 mg
- Folik asit 0.05 mg

3. Kuster's Agar (Lakshmanaperumalsamy, 1986)

Kuster's Agar		Antibiyotikler
Gliserol	10 g	Cycloheximide (50µg/ml) Nalidixic asit (10 µg/ml)
Kazein	0,3 g	
KNO ₃	2 g	
K ₂ HPO ₄	2 g	
MgSO ₄	0,08 g	
CaCO ₃	0,02 g	
FeSO ₄	0,01 g	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

4. Rouf's Medium (Rouf ve Stokes, 1962)

Rouf's Medium		Antibiyotikler
Yeast	5 g	Cycloheximide (50µg/ml) Nalidixic asit (10 µg/ml)
Pepton	5 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,05 g	
Fe(NH ₃)sitrat	0,015 g	
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05 g	
FeCl ₃ .4H ₂ O	0,01	
İz element solüsyonu	1 ml	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

5. R2A Medium (Reasoner ve Geldreich, 1985)

R2A Medium		Antibiyotikler
Yeast	0,5 g	Cycloheximide (50µg/ml) Nalidixic asit (10 µg/ml)
Pepton	0,5 g	
Casamino asit	0,5 g	
Glikoz	0,5 g	
Nişasta	0,5 g	
Sodyum-pirüvat	0,3 g	
K ₂ HPO ₄	0,3 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

6. Oatmeal Agar (ISP3) (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Oatmeal Agar (ISP3)		Antibiyotikler
Oatmeal	20 g	Nalidixic asit (10 µg/ml) Nystatin (50µg/ml)
İz tuz çözeltisi	1 ml	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

7. İnorganik Tuz- Nişasta Agar (ISP4) (Shirling ve Gottlieb, 1966)

İnorganik Tuz- Nişasta Agar (ISP4)		Antibiyotikler
Çözünür nişasta	10 g	Nalidixic asit (10 µg/ml) Nystatin (50µg/ml)
K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g	
NaCl	1 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	
CaCO ₃	3 g	
İz tuz çözeltisi	1 ml	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

8. SM3 Medium–Gauze’s Medium (Tan vd, 2006)

SM3 Medium		Antibiyotikler
Glikoz	10 g	Nalidixic asit (10 µg/ml) Nystatin (50µg/ml) Cycloheximide (50µg/ml) Rifampicin (5µg/ml)
Pepton	5 g	
Tripton	3 g	
Agar	15 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

9. Czapek – Dox Agar (Weyland, 1969)

Czapek – Dox Agar		Antibiyotikler
Sükroz	30 g	Cycloheximide (50µg/ml) Nalidixic asit (10 µg/ml)
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	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7.2 ± 0.2	

10. Tripton – Maya Özütü – Glukoz Agar (DSMZ Medium-680) + % 5 NaCl

Tripton – Maya Özütü – Glukoz Agar		Antibiyotikler
Tripton	3 g	Nalidixic asit (10 µg/ml) Nystatin (50µg/ml)
Maya özütü	5 g	
Glukoz	5 g	
NaCl	50 g	
Agar	20 g	
ddH ₂ O	1000 ml	
pH	7	

Kültür Ortamı

▪ Glukoz Yeast-Malt Extract Agar (Shirling ve Gottlieb, 1966)

Glukoz	4 g
Bacto-Yeast-Extract (Merck)	4g
Bacto-Malt-Extract (Merck)	10 g
Agar	15 g
DdH ₂ O	1000 ml
pH	7.2

EK 2: Kullanılan Çözeltiler

1. % 20'lik Gliserol (Wellington, 1979) (Wellington ve Williams, 1978)

Gliserol süspansiyonu, *Streptomyces* veya miselyumlarının –20°C’de uzun süreli stoklanması için hazırlanmıştır.

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

%20 v/v gliserol süspansiyonu yaklaşık 1.5 ml miktarında vidalı kapaklı küçük tüplere konularak 121 °C’de 15 dk otoklav edildi.

2. TE tamponu, pH 8

0.5M EDTA, pH 8 (Merck) 2 ml

1M Tris, pH 8 10 ml

ddH₂O 1000 ml

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

3. Lizozim (50 mg/ml)

Lizozim (Sigma) 500 mg

TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) 10 ml

500 mg lizozim 10 ml TE tampon içerisinde çözülerek hazırlandı. 1.5 ml'lik steril eppendorf tüplere 1'er ml bölünerek -20°C'de kullanım zamanına kadar saklandı.

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

Tris 121.10 g

Borik asit (Merck) 61.83 g

EDTA (susuz) 5.84 g

ddH₂O 1000 ml

Solüsyon içerikleri tartıldı ve 1000 ml'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 ml DDH₂O ilave edilerek solüsyon manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşmaya kadar tutuldu. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. pH 8'e ayarlanarak +4 °C'de saklandı.

5. 1xTBE, pH 8

10xTBE tamponu 50 ml

ddH₂O 450 ml

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

6. Brom fenol mavisi (Yükleme Tamponu)

Brom fenol mavisi (AppliChem) 40 mg

Gliserol 5 ml

0.5 M EDTA 1.5 ml

ddH₂O 3.5 ml

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

7. MTT

5 mg/mL konsantrasyonunda çözücü olarak steril distile su kullanılarak hazırlandı. Kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtre kullanılarak steril edildi. Küçük miktarlarda bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

8. Tripan Mavisi

10 mg/mL konsantrasyonunda, çözücü olarak steril distile su kullanılarak hazırlandı. Kullanılmadan önce 0,22 µm'lik filtre kullanılarak steril edildi.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hilal ATEŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: ERZURUM/ 1994

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Atakum/SAMSUN

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

Lisans: Atatürk Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü/ 2016

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / 2019

Mesleki Deneyim ve Ödüller :

Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Araştırma Görevlisi (2017- devam ediyor)

2210/A – Tübitak Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu

TEZDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

1- Ateş H., Ay H. (2019). Promising *Actinobacteria* with Antimicrobial Activity from Soil Samples. Eurasian Congress of Molecular Biotechnology 19-21 September 2019, Trabzon, TURKEY

2. Ateş H., Ay H. (2019). Novel *Streptomyces* spp. Isolated from Soil Samples. Eurasian Congress of Molecular Biotechnology 19-21 September 2019, Trabzon, TURKEY