

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLASI PSEUDONOCARDIA İZOLATININ TÜM GENOM
SEKANSI VE KARAKTERİZASYONU**

**KEVSER SANHUEZA GÜREŞEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2023**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLASI PSEUDONOCARDIA İZOLATININ
TÜM GENOM SEKANSI VE
KARAKTERİZASYONU

KEVSER SANHUEZA GÜREŞEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE
2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**WHOLE GENOME SEQUENCING AND
CHARACTERIZATION OF PUTATIVE
PSEUDONOCARDIA ISOLATE**

KEVSER SANHUEZA GÜREŞEN
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. SEDEF TUNCA GEDİK

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/07/2023 tarih ve 2023/40 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/07/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan KEVSER SANHUEZA GÜREŞEN'in tez çalışması MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: Doç. Dr. Sezer OKAY

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Pseudonocardia, filamentöz Gram-pozitif bakteriler sınıfına ait bir cins olup, toprakta ve sucul ortamlarda yaygın olarak bulunur. Bu bakterilerin endofitik olarak bitkilerin içinde veya çevresinde yaşadığı, bazı türlerinin ise böceklerin vücutlarında simbiyotik olarak yaşam sürdüğü bilinmektedir. *Pseudonocardia* türleri pek çok endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamada kullanılan doğal ürünlerin üretiminde önemli bir rol oynarlar.

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sırasında morfolojik özelliklerine bakarak *Pseudonocardia* grubuna dahil bir bakteri olabileceği düşünülen kahverengi pigment üreten bir suş tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında bu bakterinin tanımlanması, karakterize edilmesi ve biyoteknolojik potansiyelinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bunun için, bazı biyokimyasal identifikasyon testlerinin ardından bakterinin tüm genomu dizilenmiş, biyoinformatik analizler yapılmış ve bu izolatın *Pseudonocardia* cinsine ait olduğu doğrulanmıştır. Bakteriye özgü ikincil metabolitlerin antimikrobiyal ve antitümör özelliklere sahip olduğu belirlenmiş ve sentezlediği enzimler tespit edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında kültür sıvılarının ve özütlerinin test edilen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi tespit edilememiştir. İzolatın α -amilaz enzim aktivitesine sahip olduğu ancak lipaz ve proteaz aktivitesinin olmadığı gözlenmiştir. *Pseudonocardia* izolatının çeşitli ağır metallere ve UV ışığına karşı oldukça dirençli olduğu, farklı pH ve sıcaklıklarda büyüebildiği gözlenmiştir. Apramisin, nalidiksik asit ve kloramfenikole karşı duyarlı olduğu bulunan bakterinin, penisiline ve ampisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin, polietilen glikol (PEG) içerikli minimal besiyerinde zorlanmadan büyüebilmesi, plastik türevlerini de parçalayabilme potansiyelinin olabileceğine işaret etmiştir.

Bu tez çalışması, *Pseudonocardia* izolatının karakterizasyonu ve biyoteknolojik potansiyelinin belirlenmesi açısından bir ön çalışma olup ileride yapılacak daha kapsamlı araştırmalar ve uygulamalar için temel oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudonocardiaceae*, tüm genom sekansı, pigment, filogenetik ağaç, karakterizasyon.

SUMMARY

Pseudonocardia is a genus of filamentous Gram-positive bacteria, commonly found in soil and aquatic environments. Some species of these bacteria are known to live endophytically within or around plants, while certain species maintain a symbiotic relationship within insect bodies. *Pseudonocardia* species play a significant role in the production of natural products used in various industrial and biotechnological applications.

During our laboratory studies, a strain producing a brown pigment was identified based on its morphological characteristics, indicating potential affiliation with the *Pseudonocardia* genus. This thesis aims to identify, characterize, and uncover the biotechnological potential of this pigment-producing bacterium. To achieve this, following specific biochemical identification tests, the bacterium's entire genome was sequenced, and bioinformatics analyses confirmed its classification within the *Pseudonocardia* genus. Unique secondary metabolites with antimicrobial and antitumor properties were identified in the bacterium, along with the enzymes responsible for their synthesis. As part of characterization studies, the antimicrobial effects of the bacterial culture fluids and extracts were tested against microorganisms including *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. However, no antimicrobial effects were observed. The isolate exhibited α -amylase enzyme activity while lacking lipase and protease activities. The *Pseudonocardia* isolate displayed robust resistance to various heavy metals and UV light, demonstrating its adaptability to different pH levels and temperatures. The bacterium showed sensitivity to apramycin, nalidixic acid, and chloramphenicol, while it exhibited resistance to penicillin and ampicillin. The bacterium's ability to thrive in minimal media containing polyethylene glycol (PEG) suggests a potential to degrade plastic derivatives.

This thesis work serves as a preliminary investigation into the characterization of the *Pseudonocardia* isolate and the determination of its biotechnological potential. It will provide a foundational basis for more comprehensive future research and applications.

Keywords: *Pseudanocardiaceae*, whole genome sequence, pigment, phylogenetic tree, characterization.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e,

Aynı laboratuvarı paylaştığımız değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma İnci ÖZDEMİR'e

Bütün çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli Çağdaş Yaşamı Destekleme Derneği Edremit Şubesi ve Gebze Şubesi üyelerine,

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca yaşadığım yerde beni koruyup kollayan, her türlü destekten kaçınmayan, üyesi de olduğum ve ikinci ailem olarak gördüğüm, çok kıymetli Darıca Yaşlılarla Dayanışma ve Yardımlaşma Derneği üyelerine,

Varlıklarıyla hayatıma değer katan, güven veren ve her türlü konuda bana destek olan sevgili İbrahim ÖĞÜT ve saygı değer eşi Belgüzar ÖĞÜT'e,

Kendisini amcam gibi gördüğüm, çok saygı duyduğum ve eğitim hayatım boyunca bana destek olan sevgili Erdal ÖKTEN'e,

Her daim yüzümü güldüren, beni motive eden ve her zaman beni şanslı hissettiren candan öte arkadaşlarım Onur KARTAL'a, Jamal GHAZALİ'ye, Uğur SOYDAN'a ve Şüheda Ebrar YILMAZ'a,

Beni hayata hazırlamış, beni ben yapan, örnek aldığım ve bu zamana kadar desteklerini sunmuş rahmetli babam Yalçın GÜREŞEN'e,

Hayatımın her anında bana sevgilerini, inançlarını ve desteklerini eksik etmeyen canım annem Susanna Ester JARA ve canım kardeşim Heyzel GÜREŞEN'e,

Buraya yazamadığım daha nice değerli insanlara tüm kalbimle teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2021/2 dönemi bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. AKTİNOBAKTERİLER	2
2.1. Aktinobakterilerin Pigment Üreticileri: <i>Pseudonocardia</i> 'lar	2
2.1.1. <i>Pseudonocardia</i> 'nın Biyoteknolojideki Yeri ve Önemi	7
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	11
3.1. Gereçler	11
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar	11
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	11
3.1.3. Kullanılan Enzimler	12
3.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirtecisi	12
3.1.5. Mikroorganizmalar ve Besiyerleri	13
3.1.5.1. Mikroorganizmalar	13
3.1.5.2. Besiyerleri	13
3.1.6. Kullanılan Solüsyonlar ve Çözeltiler	16
3.1.7. Kullanılan Biyoinformatik Uygulamaları/Programları	17
3.2. Yöntemler	18
3.2.1. <i>Pseudonocardia</i> İzolatına İdentifikasyon Testlerinin Uygulanması	18
3.2.2. <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Morfolojik Yapısının İncelenmesi ve Gram Boyama ile Boyanması	18

3.2.3. Olası <i>Pseudonocardia</i> İzolatından Genomik DNA İzolasyonu	19
3.2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi	20
3.2.4. Olası <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Tüm Genom	20
DNA'sının Dizilenmesi	
3.2.5. <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Büyüme Profilinin İncelenmesi	21
3.2.6. <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Antimikrobiyal Etkisinin	21
İncelenmesi	
3.2.6.1. <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Sonikasyon Yöntemi ile	22
Parçalanması ve Ekim Aşaması	
3.2.7. α -Amilaz Enzim Aktivitesinin İncelenmesi	23
3.2.8. Proteaz Enzim Aktivitesi	25
3.2.9. Lipaz Enzim Aktivitesi	25
3.2.10. Ağır Metal Dirençliliği	25
3.2.11. UV Toleransı	26
3.2.12. Farklı Besiyerlerinde Sporlandırma ve Spor Sayımı	26
3.2.13. Farklı pH ve Sıcaklıkların <i>Pseudonocardia</i> İzolatının	27
Büyüme Profiline Etkisi	
3.2.14. Antibiyotik Direnci	27
3.2.15. Polietilen Glikol (PEG) Degradasyonu	28
4. SONUÇLAR	29
4.1. Olası <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Büyüme Eğrisi, Morfolojik ve	29
Biyokimyasal Özellikleri	
4.2. Olası <i>Pseudonocardia</i> İzolatından Genomik DNA İzolasyonu	31
4.3. <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Antimikrobiyal Etkisi	41
4.4. α -Amilaz Enzim Aktivitesi	42
4.5. Proteaz Enzim Aktivitesi	43
4.6. Lipaz Enzim Aktivitesi	44
4.7. Ağır Metal Dirençliliği	45
4.8. UV Toleransı	46
4.9. <i>Pseudonocardia</i> 'nın Farklı Besiyerlerinde Sporlanması	47
4.10. Farklı pH ve Sıcaklıkların <i>Pseudonocardia</i> İzolatının Büyüme	48
Profiline Etkisi	
4.11. Antibiyotik Direnci	50

4.12. Polietilen Glikol (PEG) Degradasyonu	51
5. TARTIŞMA VE ÖNERİ	52
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	71
EKLER	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Kısaltmalar</u>
<u>Açıklamalar</u>	
α	: Alfa
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
$\sim$	: Yaklaşık
%	: Yüzde
dk	: Dakika
L	: Litre
M	: Molar
Mb	: Megabaz Çifti
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
rpm	: Dakikada devir sayısı
U	: Ünite
V	: Volt
CTAB	: Cetyl Trimethylammonium Bromide
dH ₂ O	: Distile su
MEGA	: Moleküler Evrimsel Genetik Analizi
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TE	: Tris-EDTA Tamponu
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: <i>Acromyrmex</i> türü yaprak kesen karıncaların ortakyaşarları ile yuvalarında yaşayan mikroorganizmalar arasındaki etkileşimlerin özeti.	4
2.2: Mantar yetiştiren karınca <i>Cyphomyrmex longiscapus</i> 'un vücudunun çoğunu kaplayan dış iskeletindeki foveae açıklıklarını gösteren fotoğrafları.	5
3.1: 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Fermantas, SMO311).	12
3.2: Antimikrobiyal etki düzeni.	22
3.3: Enzim aktivitesi formülü.	24
4.1: <i>Pseudonocardia</i> izolatının zamana bağlı büyüme eğrisi.	29
4.2: İzolatın ışık mikroskobu altındaki morfoloji ve Gram boyama sonucu görüntüsü (20x).	30
4.3: Biyokimyasal identifikasyon test sonuçlarının görselleri.	32
4.4: Olası <i>Pseudonocardia</i> izolatından izole edilen genomik DNA.	
4.5: İzolatın 16S rRNA dizisi.	32
4.6: 16S rRNA dizisi ile oluşturulan filogenetik ağaç.	34
4.7: <i>Pseudonocardia</i> izolatının α -amilaz üretimi.	42
4.8: <i>Pseudonocardia</i> izolatının α -amilaz enzim aktivitesi (U/ml).	42
4.9: <i>Pseudonocardia</i> izolatına ait proteaz aktivitelerinin farklı besiyerinde gösterilmesi.	43
4.10: <i>Pseudonocardia</i> izolatına ait lipaz aktivitelerinin farklı besiyerlerinde gösterilmesi.	44
4.11: <i>Pseudonocardia</i> 'nın UV direnci ölçüm grafiği.	46
4.12: <i>Pseudonocardia</i> izolatının farklı besiyerlerinde sporlandırılması.	47
4.13: <i>Pseudonocardia</i> izolatının farklı besiyerlerindeki spor sayımları.	47
4.14: <i>Pseudonocardia</i> izolatının farklı pH'lara sahip TSB besiyerindeki büyüme grafiği.	49
4.15: <i>Pseudonocardia</i> izolatının farklı sıcaklıklardaki büyüme grafiği.	49
4.16: <i>Pseudonocardia</i> izolatının antibiyotik direnci.	50
4.17: <i>Pseudonocardia</i> izolatının PEG degradasyonuna ilişkin sonuçları.	51

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Günümüze kadar tanımlanmış <i>Pseudonocardia</i> suşları.	6
2.2: Çeşitli <i>Pseudonocardia</i> türleri tarafından sentezlenen ikincil metabolitler.	8
3.1: Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve türleri.	13
3.2: Kullanılan besiyerleri ve amaçları.	14
3.3: Hill-Käfer Besiyerine eklenen bileşenler.	15
3.4: Kullanılan çözelti ve solüsyonların kimyasal içerikleri.	16
3.5: Kullanılan biyoinformatik uygulamaları ve programları.	17
3.6: İzolata uygulanan identifikasyon testleri.	18
3.7: Kullanılan ağır metaller ve konsantrasyonları.	25
4.1: Biyokimyasal Test Sonuçları.	29
4.2: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası ikincil metabolitler ve türleri.	33
4.3: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası vitaminler.	35
4.4: <i>Pseudonocardia</i> izolatının dirençli olabileceği bileşikler ve elementler.	36
4.5: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından degrade edilen olası bileşikler.	37
4.6: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası lipazlar.	37
4.7: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası proteazlar.	38
4.8: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası peptidazlar.	38
4.9: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası hidrolazlar.	39
4.10: <i>Pseudonocardia</i> izolatı tarafından sentezlenen olası transferazlar.	40
4.11: Farklı ağır metal ve konsantrasyonlarının <i>Pseudonocardia</i> izolatı üzerindeki büyüme etkisi.	45

1. GİRİŞ

Pseudonocardia cinsi, *Actinomycetes* grubuna ait olup *Pseudonocardia* ailesinin bir üyesidir. Bu cinsin üyeleri toprakta, bitkide ve çevrede yaygın olarak bulunan aerobik, mezofilik, hareketsiz, katalaz ve Gram pozitif bakterilerdir. *Pseudonocardia*'lar genel olarak G+C içeriği yüksek DNA'ya sahip olup ilk olarak *Acromyrmex* türü yaprak kesen karıncalardan izole edilmiştir ve bazı üyelerinin bu karıncaların kütikülünde simbiyotik olarak yaşadığı bulunmuştur. *Pseudonocardia*'lar, bu karıncaların yuvasına zarar veren *Escovopsis* türü parazit mantarlardan koruyan antimikotik özellikte bileşikler sentezlemektedir. *Pseudonocardia* türleri, antibiyotik, herbisit, pestisit ve kemoterapötik ajanlar gibi farmakolojik ve endüstriyel açıdan değerli olan pek çok ikincil metabolizma bileşiklerinin doğal üreticileridir. Bu bakteriler, farklı organik maddelerin parçalanması için enzimatik aktiviteler gösterebilmekte ve çevresel kirliliklerle ilişkili organik bileşiklerin parçalanması ve ayrıştırılması gibi degradasyon süreçlerinde önemli işlevleri yerine getirebilmektedirler [1]-[5].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sırasında büyüme profiline bakarak *Pseudonocardia* grubuna dahil bir bakteri olabileceğini düşündüğümüz kahverengi pigment üreten bir suş izole edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, kahverengi pigment üreten bu bakterinin tanımlanması, tüm genomunun dizilenerek biyoinformatik analizler yardımıyla biyoteknolojik potansiyelinin ortaya çıkarılması ve ön karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Elde edilen ön bilgiler, ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacak ve farklı bilimsel çalışmalara konu olacaktır. Özellikle ürettiği pigment/pigmentler ve potansiyel diğer ikincil metabolitler açısından dikkat çeken bu bakterinin; biyoteknoloji, farmakoloji ve kozmetik endüstrisi gibi alanlarda kullanım potansiyeli için ön veriler toplanacaktır.

2. AKTİNOBAKTERİLER

Aktinobakteriler, bazı bilim insanları tarafından bakteri ile mantar arasında bir yaşam formu kabul edilen ve genomik DNA'larında yüksek oranda guanin+sitozin içeriğine sahip, Gram-pozitif ve filamentli bakteri grubudur. Toprakta, tatlı suda ve deniz habitatında yaşayan aktinomisetlerin hem termofilik hem de mezofilik türleri mevcuttur. Gerek klinik gerekse biyoteknolojik alanlarda çok yaygın kullanılan antibakteriyel, antifungal ve antitümör özelliklere sahip ikincil metabolit ürünlerini sentezleyebilmektedirler [6].

Aktinomisetlerin hücre dışına salgıladıkları amilaz, lipaz ve proteaz gibi enzimler gıda, tekstil ve kâğıt, hijyen (deterjan, sabun vb.) endüstrilerinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır [7], [8].

Saprofit özelliğine sahip olan aktinobakteriler, organik madde degradasyonlarında ve dönüşümlerinde, bitki gelişimi ve ürün verimi için toprağın işlenmesinde ve besin değerinin artırılmasında ve karbon çevriminde son derece önemli bir yere sahiptir [9].

2.1. Aktinobakterilerin Pigment Üreticileri: *Pseudonocardia*'lar

Pseudonocardia cinsi ilk olarak 1957 yılında Henssen tarafından hif ve spor zincirlerinin kendine özgü akropetal yapısıyla karakterize edilmiştir [10]. *Pseudonocardiaceae* familyası, *Actinobacteria* şubesine ve *Pseudonocardiales* takımına aittir [11]. *Pseudonocardia* cinsinin üyeleri aerobik, mezofilik veya termofildir. Katalaz pozitif, Gram pozitif ve lizozime dirençli aktinomisetler olarak tanımlanırlar [12]. Pek çok spesifik *Pseudonocardia* türü, Çin ve Avustralya topraklarından, ağaçlarından ve bitki köklerinden izole edilmiş olup su ekosistemlerinde de bulunabilirler. *Pseudonocardia* "serbest yaşayan" olarak bilinmektedir.

Pseudonocardia cinsinin üyeleri hareketsizdir ve hava miselyumları düz veya zikzak spor zincirleri oluştururlar. *Pseudonocardia* türlerinin hifleri, suda çözünmelerini sağlayan daha yüksek bir polariteye sahiptir [13]. Bu bakterilerde ana menakinon (K2 vitamini) menakinon-8'dir (MK-8) (%H), ana yağ asidi izo-dallı heksadekanoik asittir. Türler arasında farklılık gösteren polar lipid profili,

fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin içerebilir; fosfolipidlerin tipi ya fosfolipid-II ya da fosfolipid-III'tür. *Pseudonocardia* suşlarının G+C içeriğinin %68-79 olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca hücre duvarında mezodiaminopimelik asit, arabinoz ve galaktoz tespit edilmiştir [11]. Son zamanlarda, bu aktinomisetler, antibiyotikler, antimikotikler, antitümör ve bağışıklık modüle edici faktörler gibi biyoaktif ikincil metabolitleri üretmeleri, çevresel iyileştirme konusunda benzersiz ekolojik etkileri sayesinde biyoteknoloji, eczacılık, tarım vb. alanlarda büyük ilgi görmüştür. Mikrobiyal ikincil metabolitler, geç büyüme fazında üretilen düşük moleküler kütleli bileşenler olup, mikrobiyal büyüme için doğrudan gerekli olmasa da çevresel koşullara uyum sağlama, hayatta kalma ve popülasyon dinamiği açısından önem arz etmektedir. İkincil metabolitler genellikle toksinler veya antimikrobiyal ajanlar gibi güçlü biyolojik aktiviteler sergiler. *Pseudonocardia* türleri de bu ikincil metabolitlerin önemli kaynaklarından.

Bazı *Pseudonocardia* türleri, yaprak kesici Attine (*Atta* ve *Acromyrmex* türü) karıncalarıyla simbiyotik bir ilişki içinde yaşarlar (Şekil 2.1) [14], [21]. *Atta* ve *Acromyrmex* karınca cinsleri attine karıncaları olarak bilinse de aralarında bazı farklılıklar bulunur ve genellikle farklı habitatlarda bulunurlar [15]. Attine karıncaları, uçtan uca uzanan bir coğrafi aralıkta yaşayan 17 cinsten 250'den fazla tanımlanmış türü kapsayan [14], [16] en iyi çalışılan böcek-mikrop ortak yaşamlarından biridir. Karıncalar, antimikrobiyal bileşenleri üreten metaplevral bezlere sahiptir (Şekil 2.2). Bakteriler, böcek üzerinde kript adı verilen yapılarda da bulunabilir. *Pseudonocardia*'ların, yaprak kesen karınca zararlısı siyah bir maya olan *Escovopsis*'in büyümesini engelleyen antibiyotik özelliklere sahip bileşikler üreterek karıncayı korumaktadır [17], [18].

Tüm genom dizileme tekniklerinin hızlı gelişmeleri ile, veri tabanında giderek daha fazla *Pseudonocardia* genomik verisi birikmiştir. Günümüze kadar 75 *Pseudonocardia* türünün kayıtlara geçildiği bilinmektedir ve bazıları Tablo 2.1'de listelenmiştir. Pek çok *Pseudonocardia*'ya özgü gen kümesi ve bunların, örneğin birçok doğal biyoaktif ürünün sentezi ile ilgili işlevleri artık mevcuttur, büyük miktarlarda endüstriyel olarak boşaltılan çevresel kirleticilerin biyolojik bozunması, istilacı genetik elementlere karşı savunma [19], insan tıbbında, hayvan sağlığında ve bitki korumada büyük uygulama potansiyelleri gösterilmeye devam edilmektedir [20]. Bu yararlı potansiyeller, *Pseudonocardia* cinsine büyük ilgi çekmiştir. Bununla birlikte, *Pseudonocardia* için genetik manipülasyon araçlarının eksikliği, bu cinsin

Antimikrobiyal gen kümeleri

Değlik yapı
Korunmuş yapı

Gerumin A

Dentigerumisin

Gerumin B

Gerumin C

Pseudonocardia

Acromyrmex

Escovopsis

Leucoagaricus

Antagonizm

Mutualizm

Antagonizm

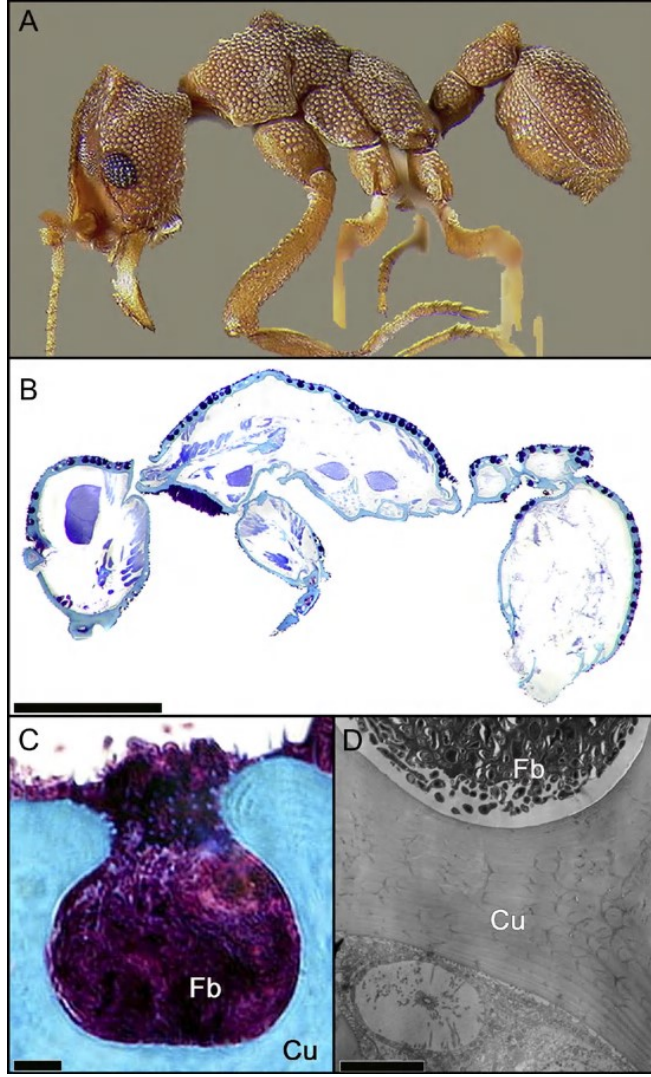
Mutualizm

Antagonizm

Antimikrobiyallerin karşılıklı seçimi

Trends in Ecology & Evolution

4



Şekil 2.2: A) ve B) Karıncanın (*Cyphomyrmex longiscapus*) vücudunun çoğunu kaplayan dış iskeletindeki foveae açıklıklarını gösteren fotoğrafları. Bu fovealar, antibiyotik üreten *Pseudonocardia* bakterilerini içerir. C) Işıklı mikroskop görüntüsü, birçok bakterinin mevcut olduğunu gösteren tek bir foveayı göstermektedir. D) Transmisyon elektron mikroskopi görüntüsü kript içinde *Pseudonocardia* bakterisi bulunan tek bir glandüler hücreyi göstermektedir.

Tablo 2.1: Günümüze kadar tanımlanmış *Pseudonocardia* suşları.

Türler	Kaynak	Türler	Kaynak	Türler	Kaynak	Türler	Kaynak
<i>P. abyssalis</i>	[21]	<i>P. bannensis</i>	[38]	<i>P. khuvsgulensis</i>	[53]	<i>P. salamisensis</i>	[44]
<i>P. acaciae</i>	[22]	<i>P. benzenivorans</i>	[39]	<i>P. kongjuensis</i>	[54]	<i>P. saturnea</i>	[29],[65]
<i>P. acidicola</i>	[23]	<i>P. broussonetiae</i>	[40]	<i>P. kujensis</i>	[44]	<i>P. sediminis</i>	[66]
<i>P. adelaidensis</i>	[24]	<i>P. carboxydivorans</i>	[41]	<i>P. kunmingensis</i>	[34]	<i>P. seranimata</i>	[35]
<i>P. ailaonensis</i>	[25]	<i>P. chloroethenivorans</i>	[42]	<i>P. lutea</i>	[55]	<i>P. sichuanensis</i>	[67]
<i>P. alaniniphila</i>	[26],[27]	<i>P. compacta</i>	[43]	<i>P. mangrovi</i>	[56]	<i>P. soli</i>	[68]
<i>P.alni</i>	[28],[29]	<i>P. cypriaca</i>	[44]	<i>P. mongoliensis</i>	[53]	<i>P. spinosa</i>	[69]
<i>P. ammonioxydans</i>	[30]	<i>P. cytotoxica</i>	[45]	<i>P. nantongensis</i>	[57]	<i>P. spinosipora</i>	[70]
<i>P. antarctica</i>	[31]	<i>P. dioxanivorans</i>	[46]	<i>P. nematodicida</i>	[58]	<i>P. sulfidoxydans</i>	[35]
<i>P. antimicrobica</i>	[32]	<i>P. endophytica</i>	[47]	<i>P. nigra</i>	[59]	<i>P. terrae</i>	[71]
<i>P. antitumoralis</i>	[33]	<i>P. eucalypti</i>	[48]	<i>P. nitrificans</i>	[29],[60]	<i>P. tetrahydrofuranoxxydans</i>	[72]
<i>P. artemisiae</i>	[34]	<i>P. halophobica</i>	[49]	<i>P. oceani</i>	[21]	<i>P. thailandensis</i>	[73]
<i>P. asaccharolytica</i>	[35]	<i>P. hierapolitana</i>	[44]	<i>P. oroxyli</i>	[61]	<i>P. thermophila</i>	[74]
<i>P. aurantiaca</i>	[26],[27]	<i>P. hispaniensis</i>	[50]	<i>P. parietis</i>	[62]	<i>P. tritici</i>	[75]
<i>P. autotrophica</i>	[29],[36]	<i>P. humida</i>	[51]	<i>P. petroleophila</i>	[29],[63]	<i>P. tropica</i>	[76]
<i>P. babensis</i>	[37]	<i>P. hydrocarbonoxxydans</i>	[29],[52]	<i>P. pini</i>	[64]	<i>P. xinjiangensis</i>	[26],[27]

2.1.1. *Pseudonocardia*'nın Biyoteknolojideki Yeri ve Önemi

Yeni izole edilen *Pseudonocardia* türlerinin sayısının gün geçtikçe artmasına rağmen, bu bakteriler tarafından sentezlenen biyoaktif doğal ürünlerin çeşitliliği ve bunların tıp ve biyoteknolojideki uygulamaları hakkında oldukça az çalışma mevcuttur.

Yapılan bazı biyoteknolojik çalışmalarda, *Pseudonocardia* türlerinin sentezlemiş olduğu ikincil metabolitler belirlenmiş, yüzey ve yeraltı kirleticilerine sebebiyet veren zararlı bileşenleri parçalayıp daha az zararlı formlara dönüştürdükleri görülmüştür. Daye ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir çalışmada, bazı *Pseudonocardia* suşlarının, insan sağlığı için oldukça zararlı bileşikler olan alkilpiroditinleri (azot içeren aromatik bir bileşik) ve tetrahidrofuran (THF)'i, parçalayabildiklerini göstermiştir [77]. THF'yi parçalayabilen türler arasında *Pseudonocardia* 1190 ve *Pseudonocardia* K1 suşları mevcuttur [78], [79]. Dieldrin, yüksek toksisitesi ve çevredeki kalıcılığı nedeniyle kullanımı yasaklanmış olsa da tarım alanlarında zararlıları kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan bir organoklorin insektisittir. Toprakta izole edilen *Pseudonocardia* KSF27 suşu dieldrini parçalama özelliğine sahiptir ve dieldrin ile kirlenmiş çevrenin remediasyonu için kullanılmıştır [80].

Günümüzde plastik atıklar önemli bir çevresel sorun olarak kabul edilmektedir. Polilaktik asit (PLA), ambalaj malzemeleri, filmler, elyaf ve dokunmamış kumaşlar gibi endüstrilerde kullanılan alifatik bir polyester ve biyo-uyumlu bir termoplastiktir. *Bacillus smithii*, *Bacillus brevis* ve *Paenibacillus amylolyticus* gibi birçok toprak mikroorganizmasının yanı sıra *Pseudonocardia* RM423 türü de PLA'yı parçalayabilmektedir [81]. Yapılan başka bir çalışmada, *Pseudonocardia alni* AS4.1531'in yüksek tuz konsantrasyonunda PLA'yı parçalayabildiği gösterilmiştir [82].

Klorlu çözücülerde bir stabilizatör olarak görev alan, solunum yollarında ve gözlerde tahrişe neden olan 1,4-dioksan, önemli bir su kirleticisi ve oldukça karsinogenik etkiye sahip bir bileşiktir [83], [84]. Bir çalışmada, *Pseudonocardia* CB1190 suşunun 1,4-dioksan'ın varlığında büyümeye devam ettiği ve bileşiğin mineralizasyonunu sağladığı görülmüştür. Özellikle *Pseudonocardia* N23 suşunun

genomunda, 1,4-dioksanın parçalanması ile ilişkili olan THF monooksijenaz genleri bulunmuştur [83], [84], [85].

Pseudonocardia türleri tarafından üretilen ikincil metabolitler hakkında çok az çalışma bulunmaktadır [86]. *Pseudonocardiaceae* familyasındaki bazı cinsler, vancomycin [87], eritromisin [88] ve rifamisin [89] gibi antibiyotikleri üretebilmektedirler. Bunlara ek olarak, *Pseudonocardia* türleri tarafından sentezlenen bu zamana kadar belirlenen ikincil metabolitler Tablo 2.2’de listelenmiştir. *Pseudonocardia* B6273 suşundan izole edilen fenazostatin D, nöro-koruyucu etkilere sahip yeni bir fenazin türevidir. Bu ikincil metabolit ürünü *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Streptomyces viridochromogenes*, *Mucor miehei*, *C. albicans*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* ve *Scenedesmus subspicatus*'a karşı etkisizdir [90].

Tablo 2.2. Çeşitli *Pseudonocardia* türleri tarafından sentezlenen ikincil metabolitler.

İkincil Metabolit	Kaynak	İkincil Metabolit	Kaynak	İkincil Metabolit	Kaynak
Branimisin B-C	[91]	NPP A1	[97]	Diazaantrakinonlar	[103]
4-(2-asetamidoetil) fenil asetat	[92]	Phenazostatin D	[98]	Fenazostatin D	[101]
4-((1,4-diokso-oktahidro-pirol[1,2-a] pirazin-3-il)metil) fenil asetat	[92]	Vitamin D3 hidroksilaz	[99]	Nistatin P1	[104]
Pseudonocardian A-C	[93]	Diketopiperazinler	[100]	Gerumisin	[105]
Dentigerumisin	[94]	3-(4-hidroksibenzil) heksahidropirol[1,2a] pirazin-1,4-dion[siklo(L-Pro-L-Tyr)]	[101]	NPP B1	[106]
Nistatin-benzeri <i>Pseudonocardia</i> Polien (NPP)	[95]	3-benzil heksahidro pirol[1,2-a] pirazin-1,4-dion[siklo(L-Pro-L-Phe)]	[101]	Ginsenosit	[107]
Selvamisin	[96]	Pseudonocardid A-G	[102]	Pseudonocardonlar A-C	[108]

Pseudonocardia carboxydivorans M-227 tarafından sentezlenen branimisin ailesine ait branimisin B ve C adlı iki yeni antibiyotik, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir [91]. *Pseudonocardia endophytica* JN087501 ise 4-2-(asetamidoetil) fenil asetat ve 4-((1,4-dioks-o-oktahidro-pirrolo[1,2-a] pirazin-3-il)metil) fenil asetat sentezler ve bu bileşikler, fırsatçı ve patojenik mantar ve bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olup MDA-MB-231, HeLa, MCF-7 ve OAW-42 hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik etki göstermektedir [92].

Pseudonocardia'dan izole edilen kültür ortamı kaynaklı iki bileşik olan 3-(4-hidroksibenzoil) heksahidropirrolo[1,2-a] pirazin-1,4-dion [siklo(l-Pro-l-Tyr)] ve 3-benzil heksahidropirrolo[1,2-a] pirazin-1,4-dion [siklo(l-Pro-l-Phe)], fakültatif ve patojenik bakterilere, mantarlara ve kanser hücre hatlarına karşı etkili olan antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör ve anti-hiperglisemik etkilere sahiptir [101], [141], [142]. *Pseudonocardia*'dan izole edilen yeni kinolon bileşikleri selektif ve güçlü bir anti-*Helicobacter pylori* etkisine sahiptir. *Pseudonocardia* A-C, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelere sahip diazaantrakinon türevleri olarak *Pseudonocardia* SCSIO 01299 suşundan izole edilmiştir [107]. Çalışmalar, *Pseudonocardia* YIM M13669 tarafından üretilen pseudonocardidler A-G'nin *Mycobacterium smegmatis* MC2 155'e karşı antimikrobiyal ve sitotoksik etkileri olduğunu göstermiştir [102].

Bunun yanı sıra, dentigerumisin [94], nistatin-benzeri *Pseudonocardia* polieni (NPP) [96] ve diğer bazı türler antimikrobiyal ve sitotoksik etkilere sahip biyolojik aktif bileşiklere sahiptir. Diazaantrakinonlar, *Pseudonocardia* SCSIO 01299 suşundan izole edilmiştir ve üç farklı tümör hücre hattına karşı sitotoksikite göstermenin yanında *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Bacillus thuringiensis* SCSIO BT01'e karşı antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [103]. Ayrıca, *Pseudonocardia* CL38489 suşu Hint toprak örneğinden izole edilmiş ve doğal kinolon ürünlerinin bir grubunu üretmektedir. Bu nedenle, kronik gastrit, peptik ülser ve mide kanseri hastalarında *H. pylori*'ye karşı aday antibiyotikler haline gelmiştir [109].

Bir çalışmada, Hindistan'da on farklı epifit orkide türünde bulunan endofitik aktinobakteriler arasında üç *Pseudonocardia* suşunun da yer aldığı görülmüştür. Bu suşların *in vitro* ekstraselüler enzim üretimi, bitki büyüme teşvik edici (PGP; plant growth-promoting) etkileri ve fungal fitopatogenlere karşı biyokontrol aktivitesi

gösterdiği anlaşılmıştır ve bu sayede sürdürülebilir tarım üretimi için umut verici adaylardır [110].

Antibiyotik direncinin gün geçtikçe artması, kanser vakalarına her gün yenilerinin eklenmesi ve çevresel kirleticilerin yaşamı tehdit etmesi gibi acil çözüm bekleyen sorunların giderilmesi için yeni bileşiklerin keşfi elzemdir. *Pseudonocardia* suşları yeni biyoaktif bileşikler için önemli potansiyel bir kaynaktır. Biyokimyasal ve fenotipik testlerin sınırlamaları göz önüne alındığında, yeni izole edilecek suşların tüm genomlarının dizilenerek biyoinformatik yazılımlar yardımıyla analizleri ile metabolik yolların belirlenmesi ve suşların biyoteknolojik potansiyellerinin ortaya çıkarılması önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Pepton (BactoTM, Merck), NaCl (Sigma-Aldrich), % 99.5 Etanol (Riedel de Haen), Triptik soya besiyeri (Merck), K₂HPO₄ (Merck), K₂SO₄ (Merck), TES Buffer (Appllichem), Maya özütü (BactoTM), Et özütü (CondaLab), Agar (Merck ve Titan Biotech), NaOH (Merck), SDS (Merck), Bacto kazamino asit (BD), Fenol (Sigma Aldrich), Kloroform (Sigma Aldrich), İzomil alkol (Sigma Aldrich), %99 Gliserol (Sigma Aldrich), Süktroz (Merck), CaCl₂ (Merck), MgCl₂ (Merck), KCl (Riedel de Haen), Metanol (Sigma Aldrich), CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) (Merck), Nişasta (Merck), Skimmilk Tozu (LabM), Süt Tozu (LabM), Dekstroz (Bacton Dickinson), TES Buffer (Appllichem), Potato Dextrose (Sigma-Aldrich), Kazein Peptone (CondaLab), Tribütirin (Sigma-Aldrich), Glisin (Merck), Brain Heart Infusion (BHI) (Sigma-Aldrich), D-Glikoz (IsoLab), Gliserol (IsoLab), Tween 80 (Sigma-Aldrich), Polietilen glikol (PEG) (Sigma-Aldrich).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

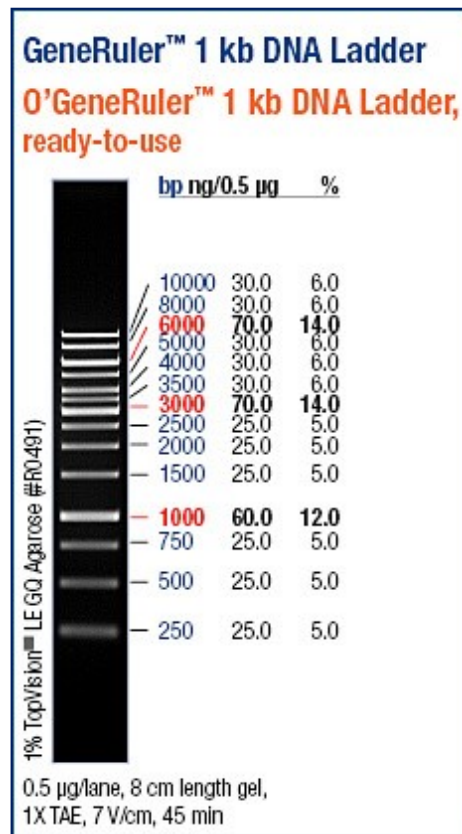
-80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer), Steril Kabin (Heraeus, HP48), +4 °C ve -20 °C Buzdolabı (Arçelik), Masa Üstü Santrifüj (VWR, Microsent 17R), Çalkalamalı inkübatör (Innova 40), Ultrasantrifüj (Beckman CoulterTM AvantiTM J-30I Centrifuge), Agaroz Jel Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystem, c600), Yatay Elektforez Sistemi (Biorad, Mini-Sab Cell CT), Güç kaynağı (Biorad, PowerPac Basic), Otoklav (Hirayama, Hicla HVE-50, HVE-110), BioSpec-nano (UV1800 Shimadzu/Biotech), pH Metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), Spektrofotometre (Biorad, Smartspec 3000), Su banyosu (Techne, TE-10A Tempette), Buz makinesi (Bar-Line BF85), UV Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 530), İnkübatör (Wisecube), Mikrodalga Fırın (Samsung), Sonikasyon cihazı (Branson), ‘NanoDrop Lite’ Spektrofotometre Cihazı (Thermo Scientific).

3.1.3. Kullanılan Enzimler

Bu tez çalışmasında RNaz (BioFroxx) ve Lizozim (Sigma-Aldrich) enzimleri kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan DNA Moleküler Belirteci

İzole edilen genomik DNA'nın, agaroz jel yürütülmesi deneyinde kullanılan DNA moleküler belirteç Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 1 kb Moleküler DNA Belirteci (Fermantas, SMO311).

3.1.5. Mikroorganizmalar ve Besiyerleri

3.1.5.1. Mikroorganizmalar

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan mikroorganizmalar Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve türleri.

Mikroorganizma Adı	Türü
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 8739	Gram (+) Bakteri
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gram (-) Bakteri
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29122	Gram (+) Bakteri
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram (+) Bakteri
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Gram (-) Bakteri
<i>Pseudonocardia</i> izolatu	Gram (+) Bakteri
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Fungus

3.1.5.2. Kullanılan Besiyerleri

Sunulan çalışmada istenilen hacimde dH₂O ile hazırlanan besiyerleri 121 °C’ta 20-25 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. 121 °C’ta steril edilemeyen ek çözelti veya kimyasallar 0,45’lik filtrelerden geçirildikten sonra steril besiyerine gereği kadar eklenmiştir. Kullanılan besiyerlerinin içeriği ve amaçları aşağıda Tablo 3.2’de, KM besiyerinin hazırlanışı ve ek karışımları Tablo 3.3’te listelenmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan besiyerleri ve amaçları.

KULLANILAN BESİYERLERİ VE AMAÇLARI				
<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>P. aeruginosa</i> hücrelerinin büyütülmesi		<i>C. albicans</i> hücrelerinin büyütülmesi		
Luria Bertani (LB) Besiyeri (pH 7.0) (1L) ✓ 5 g Maya özütü ✓ 10 g Pepton ✓ 5 g NaCl ✓ +15 g Agar (LB agar için) [28]		Maya Özütü-Pepton-Dekstroz Besiyeri (YEPD) (1L) ✓ 10 g Maya özütü ✓ 20 g Pepton ✓ 20 g Dekstroz ya da Glikoz ✓ 20 g Agar [27]	Hill-Käfer Besiyeri (KM) (pH 6.5) (1L) ✓ 20 g D-glikoz ✓ 2 g Pepton/Tripton ✓ 1 g Maya özütü ✓ 1 g Kazein Hidrolizat ✓ 50 ml Makronutrient Karışımı(20X) ^{1*} ✓ 10 ml Mikronutrient Karışımı (100X) ^{2*} [115]	
<i>Pseudonocardia</i> izolatının büyütülmesi		<i>Pseudonocardia</i> Sporlandırma		
Trypton Soya (TSB) Besiyeri (1L) ✓ 30 g %3 Oxoid Trypton Soya besiyeri ✓ +15 g Agar (TSA için) [14]	Maya Özütü-Malt Özütü Besiyeri (YEME) (1L) ✓ 3 g Maya özütü ✓ 3 g Malt özütü ✓ 5 g Pepton ✓ 10 g Glikoz ✓ 340 g Sükroz	TBO Agar (100 ml) ✓ 2 g Domates Salçası ✓ 2 g Yulaf Ezmesi ✓ 2.5 g Agar	MS Agar (100 ml) ✓ 2 g Mannitol ✓ 2 g Soya Unu ✓ 2 g Agar	ISP2 Agar (100 ml) ✓ 1 g Malt ekstratı ✓ 0.4 g Maya ekstratı ✓ 0.4 g Glikoz ✓ 1.5 g Agar
Antimikrobiyal Etki		Proteaz Enzim Aktivitesi		
Brain Heart Infusion (BHI) Agar Besiyeri (1L) ✓ 37 g BHI ✓ 15 g Agar	TSA Skimmilk Agar Besiyeri (pH 7.0) (100 ml) ✓ 28 g Skimmilk tozu ✓ 5 g TSB ✓ 15 g Agar [149]	Nutrient Skimmilk Agar Besiyeri (pH 7.0) (50 ml) ✓ 0.4 g Nutrient Broth ✓ 0.5 Skimmilk ✓ 0.75 g Agar [145]	Skimmilk Agar Besiyeri (%) (pH 7.0) (50 ml) ✓ 0.25 Pepton ✓ 0.15 g Et özütü ✓ 0.5 g Skimmilk ✓ 0.75 g Agar	ISP9 + %1 Kazein Agar Besiyeri (pH 7.0) (50 ml) ✓ 0.5 g Nişasta ✓ 0.2 g Maya özütü ✓ 0.2 g Malt özütü ✓ 0.1 g CaCO ₃ .2H ₂ O ✓ 0.5 g Kazein ✓ 0.8 g Agar [146]
α-Amilaz Enzim Aktivitesi		Lipaz Enzim Aktivitesi		
%1 Nişasta'lı Trypton Soya Besiyeri (1L) ✓ 30 g %3 Oxoid Trypton Soya besiyeri ✓ 10 g Nişasta ✓ +15 g Agar (TSA için)		Tribütirin Agar Besiyeri (1L) ✓ 2.5 g Et özütü ✓ 2.5 g Kazein Pepton ✓ 3 g Maya özütü ✓ 10 ml Tribütirin ✓ 12 g Agar		Tween 80 Agar (50 ml) ✓ 0.4 g Nutrient Broth ✓ 0.005 g CaCl ₂ .2H ₂ O ✓ 0.5 ml Tween 80 ✓ 0.8 g Agar [147]
PEG Degradasyonu				
M9 Besiyeri (1L) ✓ 100 ml 5X Tuz Solüsyonu ✓ 1 ml 1M MgSO ₄ ✓ 0,3 ml 1M CaCl ₂ ✓ 20 ml %20'lik Glikoz ✓ 15 g Agar		M9 Besiyeri için Tuz Solüsyonu (10X) (1L) ✓ 75,2 g Na2HPO4.2H2O ✓ 30 g KH2PO4 ✓ 5 g NaCl ✓ 5 g NH4Cl		

Vitamin karışımı (100X) hariç diğer tüm bileşenler 800 ml dH₂O'da çözünür ve 10N KOH ile pH=6.5'e ayarlanır. Hacim 999 ml'ye kadar tamamlanır. Ardından 121 °C'ta 20 dk boyunca steril edilir. 45-50 °C'a kadar soğutulan besiyerine önceden 0.45'lik filtreden geçirilmiş vitamin karışımı (100X) eklenir ve karıştırılır.

Tablo 3.3: Hill-Käfer Besiyerine eklenen bileşenler.

Makronutrient Karışımı (20X) (1L) ^{1*}	Mikronutrient Karışımı (100X) (1L) ^{2*}	
★ 12 g NaNO ₃ ★ 10.4 g KCl ★ 10.4 g MgSO ₄ .7H ₂ O ★ 30.4 g KH ₂ PO ₄	★ 2.2 g ZnSO ₄ .7H ₂ O ★ 1.1 g H ₃ BO ₃ ★ 0.5 g MnSO ₄ .4H ₂ O	★ 0.16 g CoCl ₂ .5H ₂ O ★ 0.16 g CuSO ₄ .5H ₂ O ★ 0.11 g (NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O
1L dH ₂ O ile çözünür ve +4 °C’de saklanır.		
Fe-EDTA (100X) (1L) (50 ml) ^{3*}		
★ 0.77 g Na ₂ EDTA ★ 0.55 g FeSO ₄ .7H ₂ O	50 ml dH ₂ O ile çözünür ve kaynayana kadar ısıtılır. Soğuyana kadar ~30 dk boyunca karıştırılır. Ardından +4 °C’ye kaldırılır.	
Vitamin Karışımı (100X) (100 ml) ^{4*}		
★ 10 g Tiamin ★ 0.04 g Glisin ★ 0.01 g Nikotik asit ★ 0.01 g Piridoksin	100 ml dH ₂ O ile çözünür ve 0,45’lik filtreden geçirilir. Her birinde 1 ml olacak şekilde steril eppendorflara paylaştırılır. Ardından -20 °C’ye kaldırılır.	

3.1.6. Kullanılan Solüsyonlar ve Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında deneysel yöntemlerde kullanılan solüsyonların ve çözeltilerin kimyasal içerikleri Tablo 3.4'te sunulmuştur. Tüm sterilizasyon işlemleri 121°C'ta 20-25 dakika süreyle otoklavlayarak hazırlanılmıştır. Otoklavlanan çözeltiler “*” işareti ile işaretlenmiştir.

Tablo 3.4: Kullanılan çözelti ve solüsyonların kimyasal içerikleri.

Çözelti	Kimyasal İçeriği
CTAB/NaCl Solüsyonu	* %10 CTAB * 0.7 M NaCl
Fenol:CIA	* 25:24:1 Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol
TE Tamponu (1X)*	* 10 mM Tris (pH 8.0) * 1 mM EDTA (pH 8.0)
%20 SDS (10 mL)	* 2 g SDS
5M NaCl (10mL)*	* 2,92 g NaCl
Fosfat Salin Tamponu (PBS) (pH 7.4) (250 mL)*	* 2,015 g NaCl * 0,055 g KCl * 0,2875 g Na ₂ HPO ₄ * 0,05 g KH ₂ PO ₄
Sodyum Fosfat Tamponu (20 mM)	* 0,185 g Na ₂ HPO ₄ * 0,427 g NaH ₂ PO ₄
Sonikasyon Lizis Tamponu (pH 7.4)*	* 20 mM Sodyum Fosfat Tamponu * 50 mM NaCl * 5 mM İmidazol
%10'luk Lügol Çözeltisi	* RTA A.Ş. tarafından temin edilmiştir.
Commase Blue	* % 50 Metanol * % 0.05 Commase * % 10 Asetik asit * % 40 dH ₂ O
Destaining Solüsyonu	* % 50 Metanol * % 10 Asetik asit * % 40 dH ₂ O

3.1.7. Kullanılan Biyoinformatik Uygulamaları/Programları

Bu tez çalışmasında kullandığımız *Pseudonocardia* türü bakterinin gen düzeyinde analizlerini gerçekleştirmek için kullanılan biyoinformatik uygulamaları ve programları Tablo 3.5'te listelenmiştir.

Tablo 3.5: Kullanılan biyoinformatik uygulamaları ve programları.

Uygulama/Program Adı	Amacı
antiSMASH	Bakteri, mantar ve bitki genomlarında ikincil metabolit biyosenteziyle ilişkili gen kümelerinin genom çapında hızlıca tanımlanmasına, açıklanmasına ve analizine olanak tanır [29].
MEGA11	Moleküler Evrimsel Genetik Analizi (MEGA) yazılımı, organizma ve genom evrimsel modellerini ve süreçlerini keşfetmeye yönelik gelişmiş evrimsel analizler yapmak ve filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılmaktadır [110].
EzBioCloud	Bakteriler ve Arkea türlerinin 16S rRNA genlerinin belirlenmesinde, biyoinformatik olarak karşılaştırmasında ve belirli bir suşu tanımlanmasında kullanılmaktadır [111].
ExPasy	İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü grubu tarafından geliştirilen ve 160'tan fazla veri tabanı ve yazılım aracına erişim imkânı sunmaktadır. Bu araçlar, genomik, proteomik, yapısal biyoloji, evrim ve filogeni, sistem biyolojisi ve tıbbi kimya gibi birçok araştırma alanında kullanılan çeşitli analizler ve hesaplamalar için kullanılmaktadır [122].
KEGG	KEGG (Kyoto Genler ve Genler Ansiklopedisi), genomik bilgileri daha yüksek düzeyli işlevsel bilgilerle ilişkilendiren, gen işlevlerinin sistematik analizi için bir bilgi tabanıdır [123].

3.2. Yöntemler

3.2.1. *Pseudonocardia* İzolatına İdentifikasyon Testlerinin Uygulanması

Bakterilerin sistematik sınıflandırılması ve tanımlanması için kullanılan ve oldukça kapsamlı bir referans kaynağı olan Bergey'nin Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı baz alınarak, bazı identifikasyon testleri uygulanmıştır [124].

İdentifikasyon testler Tablo 3.6'da listelenmiştir. Besiyerleri ve ayraçlar RTA ve GBL A.Ş tarafından sağlanmıştır.

Tablo 3.6: İzolata uygulanan identifikasyon testleri.

İdentifikasyon Testleri		
Sitrat Testi	Metil Kırmızısı (MR) Testi	SIM Testi
Nitrat Testi	Voges-Proskauer (VP) Testi	Katalaz Testi
Jelatinaz Testi	Glikoz Testi	Tuz-Mannitol Testi
Üreaz Testi	Sükroz Testi	Hemoliz Testi
	Laktoz Testi	

3.2.2. *Pseudonocardia* İzolatının Morfolojik Yapısının İncelenmesi ve Gram Boyama ile Boyanması

Morfolojik yapısının görüntülenmesi amacıyla, 50 ml TSB besiyerinde 30 °C'ta 72 saat boyunca büyütülen kültürden ~15-20 µL alınıp lama aktarılmıştır. 20X 'de görüntüsü alınmıştır.

Geleneksel Gram boyama işlemi uygulanmıştır ve 20X 'de görüntüsü alınmıştır.

3.2.3. Olası *Pseudonocardia* İzolatından Genomik DNA İzolasyonu

Pseudonocardia izolatının genomik DNA'sı, Hopwood ve arkadaşları'nın (1985) metodunun basamakları *Pseudonocardia* izolatına uygun şekilde değiştirilip izole edilmiştir. 50 ml LB ve YEME besiyerlerine -80 °C %40'lık gliserollü stok solüsyonundan 250'şer µl inoküle edilerek, 30 °C'ta 180 rpm'de 72 saat boyunca büyütülmüştür. 100 ml LB ve YEME besiyerine ön kültürden 1:10 oranında ekim yapılarak hücreler tekrar 72 saat 30 °C'ta 180 rpm'de inkübe edilmiştir. Hücreler 50 mL'lik falkonlara alınarak oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiş ve ardından 17 ml TE tamponu eklenerek vorteks yardımıyla çözülen pelletlerin üzerine lizozim (2 mg/ml) eklenmiştir. Karışım ~1 saat 37 °C'ta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 500 µl %20 SDS ve 500 µl (10 mg/ml) RNaz eklenen örnekler 37°C'ta ~1 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnek üzerine 1500 µl 5 M NaCl ve 1200 µl CTAB/NaCl solüsyonu eklenerek 65 °C'a ayarlanmış su banyosunda 10-15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (fenol:CIA) (25:24:1) solüsyonu ile muamele edildikten sonra oda sıcaklığında 4500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlemten sonra fenolü uzaklaştırmak için örnekler aynı hacimde CIA (24:1) ile muamele edildikten sonra oda sıcaklığında 4500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Yeni bir falkona alınan üst fazların üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenerek yaklaşık 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında oda sıcaklığında, 4500 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılarak pelletler oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan pelletler 2 ml TE tamponunda çözülerek 500'er µl olacak şekilde eppendorflara paylaştırılmıştır. Örneklerin üzerine eşit hacimde fenol:CIA (25:24:1) solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir eppendorfa alınmış ve aynı hacimde fenol:CIA (25:24:1) eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlemten sonra fenolü uzaklaştırmak için örnekler aynı hacimde CIA (24:1) ile muamele edildikten sonra oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından yeni eppendorflara bölüştürülerek üst faz üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenerek ~1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kurutmaya bırakılmış olan pelletlerin üzerine 3 kat hacim soğuk %70'lik etanol ilavesi

yapılmış ve gece boyu -20°C’de bekletilmiştir. Bu işlemin ardından 4°C’ta 13000 rpm’ de 30 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet kurutulmuş ve dH₂O’ da çözülmüştür. Hem LB hem YEME besiyerinde büyütülmüş hücrelerinden izole edilmiş genomik DNA’lar NanoDrop’ta ölçülmüştür ve çalışmalar YEME besiyerinde büyütülmüş olan hücrelerden izole edilen genomik DNA’dan devam edilmiştir.

3.2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Genomik DNA izolasyonun başarılı olup olmadığını göstermek için agaroz jel elektroforezi yöntemine başvurulmuştur. % 0.8’lik (w/v) agaroz jel, 50 ml 1X TAE tamponuna 0,4 g toz agarozun eklenmesi ile hazırlanmış ve ardından agarozun çözünmesi için mikrodalgada ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan 50 ml agaroz jel çözeltisine RedSafe® (5 µl/100 ml) (20.000X) kimyasalı ilave edilmiştir. Kasete dökülen çözelti oda sıcaklığında bekletilerek polimerize olduktan sonra izole edilmiş DNA örneklerine 1/10 hacminde 6X DNA yükleme boyası eklenip karıştırılarak jele yüklenmiştir. GeneRuler™ 1 kb’lik moleküler DNA belirteci de jele yüklenmiştir. Daha sonra örnekler, içinde 1X TAE yürütme tamponu bulunan elektroforez tankında 110 V 45-50 dk yürütülmüştür. Ardından UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.4. Olası *Pseudonocardia* İzolatının Tüm Genom DNA’sının Dizilenmesi

Pseudonocardia türüne ait olduğundan şüphelendiğimiz izolatın tüm genomu GenEra Diagnostik A.Ş. tarafından dizilenmiştir.

3.2.5. *Pseudonocardia* İzolatının Büyüme Profiline İncelenmesi

Pseudonocardia izolatının zamana bağlı büyüme profiline oluşturulması için ilk önce 50 ml TSB besiyerinde 72 saat büyütülmüş olan ön kültürün ıslak ağırlığı hesaplanmış ve hücreden 500 µl alınıp 100 ml TSB besiyerine ekilmiştir. Toplamda

hücrelerin 384 saat (16 gün) boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Bu çalışma üçer replikadan oluşmaktadır. Her 24 saatte 5'er ml örnek alınıp falkonlara aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dakika santrifüjlenip süpernatant atılmıştır. Besiyerinden kurtulmak için iki kez 5 ml dH₂O ile yıkanan hücreler (4500 rpm, 20 dk, 25°C) -20 °C'a kaldırılmıştır. 16. gün sonunda -20°C'tan alınan hücreler yoğunluğuna göre 3-5 ml dH₂O eklenip çözünmeleri sağlandıktan sonra daha önceden hassas terazide tartılmış olan tartım kaplarına aktarılmıştır. Hücreler 70 °C'a ayarlanmış etüvde 3-4 gün boyunca kurutulmuştur. İşlem sonunda tartım kapları hassas terazide tartılmış ve hücrelerin mg/ml cinsinden değerleri hesaplanmıştır.

3.2.6. *Pseudonocardia* İzolatının Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi

Bu deney sürecinde *Pseudonocardia* izolatının süpernatantı, sonikasyon işlemi sonucu elde edilen pellet ve süpernatantların ve metanollü ekstraksiyonlarının, antimikrobiyal etkisinin *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde etkileri incelenmiştir. *C. albicans* hariç diğer tüm bakteriler 20 ml LB besiyerine ekimi yapılmış ve 37 °C'ta ~24 saat büyütülmeye bırakılmıştır. 0,5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonları gereği kadar alınıp BHI agara yayılarak ekilmiştir. *C. albicans* hücreleri 20 ml YEPD besiyerine katı kültürden bir miktar alınıp ekilmiş ve 1 saat boyunca çalkalanmadan 37 °C'ta büyütülmüştür. 30 µl alınıp KM agara yayılarak ekimi yapılmıştır.

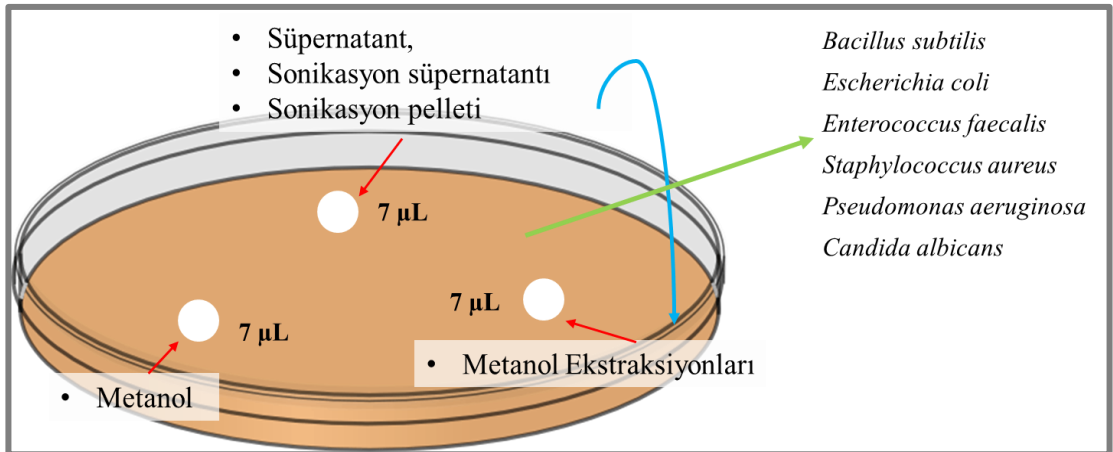
100 ml TSB besiyerinde 72 saat 30 °C'ta büyütülen *Pseudonocardia* izolatları steril 50 ml'lik falkonlara alınarak oda sıcaklığında 4500 rpm'de 20 dk boyunca santrifüjlenip çöktürülmüştür. Süpernatanttan 1.5 ml alınıp steril eppendorfa aktarılmıştır. Ardından sonikasyon işlemi ile pellet ve süpernatantlar elde edilmiştir.

3.2.6.1. *Pseudonocardia* İzolatının Sonikasyon Yöntemi ile Parçalanması ve Ekim Aşaması

Elde edilen pelletlerin üzerine 2'şer ml soğuk PBS (pH 7.4) eklenip vorteks yardımıyla çözüldükten sonra 4000 rpm, +4 °C'ta 30 dakika santrifüjlenir. Süpernatantı dökülen örnekler bu işlem bir kez daha yapılır. İşlem sonrası süpernatant atılır ve 2'şer ml soğuk PBS (pH 7.4) eklenip karıştırıldıktan sonra hemen -80 °C'a kaldırılır. Gece boyu inkübasyondan sonra oda sıcaklığında 4500 rpm'de, 25 dakika santrifüj edildikten sonra pelletlerin üzerine 1'er ml soğuk sonikasyon liziz tamponu eklenir.

Hücreler mekanik yollarla parçalanmak üzere ilk etapta 30 sn süreyle ve %50 genlikte (amplitüde) sonikasyona maruz bırakılmıştır. Sonikasyon zamanı 30 saniyede sabit bırakılarak aynı işlem 3 kez daha tekrarlanmıştır. Toplam 3-5 dakika boyunca sonikasyon devam edilmiştir. Bu süreçte ısınmayı engellemek amacıyla buz üzerinde içinde çalışılmıştır. Sonikasyonda parçalanmış örnekler +4 °C'ta 4000 rpm'de 45 dakika çöktürülmüştür.

Uygun katı besiyerlerine ekilen hücrelerin üzerine, sıvı kültürden elde edilen süpernatant, sonikasyon sonucu parçalanmış hücrelerden elde edilen süpernatant ve pelletler ile ilaveten bu üç örneğin metanollü ekstraksiyonları, disk difüzyon yöntemi şeklinde her bir kâğıda 7 µL örnek alınıp damlatılmıştır (Şekil 3.2). Ardından bütün hücreler 24 saat 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Disklerin etrafında zon oluşması durumunda, izolatımıza ait örneklerin antimikrobiyal etkisinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.2: Antimikrobiyal etki düzeni.

3.2.7. α -Amilaz Enzim Aktivitesinin İncelenmesi

Ham nişastayı sindiren amilazlar; mantarlar, mayalar ve bakteriler dahil mikroorganizmalardan bitkilere ve insanlara kadar çeşitli canlı organizmalar tarafından üretilir. Ekstraselüler hidrolitik enzimler arasında, amilazlar, yüksek endüstriyel değerlerinden dolayı özel bir statüye ve enzim biyoteknolojisinde çok önemli yere sahiptir. Bu deneyin amacı, izolatomuzun hücre dışı α -amilaz enzim aktivitesi yoluyla ortamdaki nişastayı parçalama yeteneğine sahip olup olmadığını belirlemektir. Bunun için, ön sıvı kültüre kürdan yardımıyla bandırılan hücreler %1 nişasta içeren TSA besiyerinin tam ortasına ekilmiştir. İnkübasyon süreleri 72, 144 ve 216 saat (3, 6 ve 9 gün) olarak belirlenmiş olup bu süreler sonunda hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde %10'luk iyot solüsyonu (lügol çözeltisi) damlatılıp ~30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

Pseudonocardia izolatının zamana bağlı α -amilaz enzim aktivitesinin hesaplanması için Miller ve arkadaşlarının geliştirdikleri spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir [117]. İlk önce 50 ml TSB besiyerinde 72 saat büyütülmüş olan ön kültürün ıslak ağırlığı hesaplanmış ve hücreden 500 μ l alınıp 120 ml TSB besiyerine ekilmiştir. Bu çalışma üçer replikadan oluşmaktadır. İnkübasyon süreleri 24, 48, 72, 96 ve 120 saat olarak belirlenmiş ve 24 saatte bir ~1.5'er ml örnek alınıp eppendorflara aktarılmıştır. 13.300 rpm'de 5 dk çöktürüldükten sonra dikkatli bir şekilde süpernatanttan 1'er ml alınıp falkona aktarılır. Daha önce hazırlanmış olan %1'lik nişasta solüsyonundan 1'er ml alınıp süpernatanta eklenir ve 10 dk boyunca 35 °C'de inkübasyona bırakılır. Daha sonra reaksiyonu durdurmak amacıyla 2'er ml 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) eklenerek 10 dk 95-100 °C'ta tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 3,5 Dinitrosalisilik asit yüksek sıcaklıkta indirgen şekerlerin uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonun durmasını ve renk oluşumunu da sağlamaktadır. Ardından buzda oda sıcaklığına soğutulmuş ve hacmi 10 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır. 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen verileri kullanarak

Şekil 3.3'teki formülle α -amilaz enzim aktivitesinin değeri Enzim Ünitesi (U/ml) şeklinde hesaplanmıştır. 1 dakikada 1 μ mol substratı (çözünür nişasta) ürüne dönüştüren amilaz enzim miktarı 1 ünite olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta C \times V_T \times SF}{T(\text{dk}) \times V_E}$$

ΔC:	Absorbans (540 nm)
V_T:	Toplam Reaksiyon Hacmi (ml)
SF:	Seyreltme Faktörü
T:	Reaksiyon Zamanı (dk)
V_E:	Enzim Hacmi (ml)

Şekil 3.3: Enzim aktivitesi formülü.

3.2.8. Proteaz Enzim Aktivitesi

Proteazlar; bitki, hayvan ve diğer mikroorganizma kalıntılarını ayrıştırarak besin döngüsünün devamlılığının sağlanmasına katkıda bulunur. Buna ek olarak gen ifadesi, protein mobilasyonu ve enzim modifikasyon çalışmaları gibi önemli biyolojik süreçlerde rol almaktadır. İzolatımızda proteaz enzim aktivitesinin olup olmadığını göstermek amacıyla iki farklı besiyerinde büyütülmüştür. Bu çalışmada Skimmilk Agar, Nutrient Skimmilk Agar, TSB Skimmilk Agar ve %1'lik Kazein ISP9 Agar besiyerleri kullanılmıştır ve sıvı ön kültüre steril kürdan ucuyla bandırılıp agarın ortasına nokta ekim yapılmıştır ve 72 saat 30 °C'ta büyütülmüştür.

3.2.9. Lipaz Enzim Aktivitesi

Lipazlar; bakteri, maya, mantar, bitki ve hayvanlardan izole edilebildikleri halde bunların arasında bakteriyel lipazlar yüksek verimle elde edilmeleri, mikroorganizmaların hızlı büyümesi ve genetik manipülasyon kolaylığı açısından temizlik teknolojisinde ticari olarak oldukça önemlidirler. İzolatın lipaz enzim aktivitesinin olup olmadığını öğrenmek adına iki farklı besiyeri kullanılmıştır. Tribütirin agar ve Tween 80 agar besiyerlerine nokta ekim yapılmıştır ve 30 °C'ta 9 gün boyunca inkübasyonu sağlanmıştır.

3.2.10. Ağır Metal Dirençliliği

Canlı organizmalardaki ağır metal iyonları, hücre zarı, mitokondri, çekirdek, DNA ve enzimler gibi hücre organellerini ve bileşenlerini etkileyerek hasara ve konformasyonel değişikliklere sebep olmaktadır. Ağır metalle kirlenmiş topraktaki baskın bakteri gruplarından biri de aktinobakterilerdir Ağır metal miktarının yoğun olduğu koşullarda hayatta kalabilmek için bu bakteriler, metallerin indirgeme, oksidasyon veya metilasyon yoluyla daha az toksik ve daha az hareketli formlara dönüşmesini içeren direnç mekanizmaları geliştirmek zorunda kalırlar. Bu mekanizmalar sayesinde bakteriler, biyoremediyasyon adı verilen biyolojik yöntemlerle kontamine ortamların iyileştirilmesinde kullanılır [112], [113], [114].

Pseudonocardia izolatının ağır metal dirençliliğinin karşılaştırılması, 6 farklı ağır metalin farklı konsantrasyonlarını (Tablo 3.7) içeren TSA besiyerlerine 50 µl kadar hücre yayılarak ekilmiş ve 96 saat 30 °C’ta inkübasyonları ile sağlanmıştır.

Tablo 3.7: Kullanılan ağır metaller ve konsantrasyonları.

Ağır Metal Adı	Konsantrasyonlar (µg/ml)
CdCl ₂	12.5, 25, 50, 100, 200, 400
CoCl ₂	100, 200, 400, 800, 1600, 3200
CrCl ₃	100, 200, 400, 800, 1600, 3200
CuCl ₂	200, 400, 800, 1600, 3200, 6400
Pb(NO ₃) ₂	100, 200, 400, 800, 1600, 3200
ZnCl ₂	100, 200, 400, 800, 1600, 3200

3.2.11. UV Toleransı

Bu çalışmada, UV toleransını gözlemlemek amacıyla ilk olarak 50 ml TSB besiyerinde 72 saat büyütülmüş olan ön kültürden her seferinde 3 ml hücre alınıp sırasıyla 5, 10 ve 20 dk boyunca UV ışık altında bekletilmiştir. UV ışık altında bekletilen hücreler 10⁻⁴, 10⁻⁶ ve 10⁻⁸ oranında seyreltilip TSA besiyerine yayma ekim yapılarak ekilmiştir. Kontrol amaçlı UV ışığına maruz bırakılmayan hücreler de aynı oranlarda seyreltilip TSA’ya ekilmiştir. Bu çalışma üçer replikadan oluşmaktadır. 96 saat boyunca 30 °C’ta inkübasyonları sağlanmıştır ve tek koloni düşmesi

hedeflenmiştir. İnkübasyon sonunda gözlemlenen tek koloniler sayılmıştır, dilüe oranları baz alınarak hesaplama yapılmıştır. Maruz bırakılan UV süresine göre grafik oluşturulmuştur.

3.2.12. Farklı Besiyerlerinde Sporlandırma ve Spor Sayımı

Pseudonocardia türleri sporlanarak üremektedir. Bu bilgi doğrultusunda, 50 ml TSB besiyerinde 72 saat büyütülmüş olan ön kültürden ıslak ağırlık hesaplanmıştır ve MS agar, ISP2 agar ve TBO agar besiyerlerine 100 µL hücre yayma ekim ile ekilmiştir. 15-20 gün boyunca 30 °C'ta sporlanmaya bırakılmıştır. Sporlanma sonunda her bir besiyerindeki sporlar %40'lık soğuk gliserol ile toplanmıştır ve -80 °C'a kaldırılmıştır. Spor sayımı için toplanan sporlar 10^{-4} , 10^{-6} ve 10^{-8} oranında seyreltilip TSA besiyerine yayma ekim yapılarak ekilmiştir. Bu çalışma üçer replikadan oluşmaktadır. 96 saat boyunca 30 °C'ta inkübasyonları sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda gözlemlenen tek koloniler sayılmıştır, seyreltme oranları baz alınarak hesaplama yapılmıştır.

3.2.13. Farklı pH ve Sıcaklıkların *Pseudonocardia* İzolatının Büyüme Profiline Etkisi

Bu çalışmada, ıslak ağırlığı hesaplanan ön kültürden 500'er µL alınıp, pH=5, 7, 9 ve 10'a ayarlanmış 120 ml TSB besiyerlerine ekim yapılmıştır ve sıcaklık 30 °C olarak sabit tutularak 120 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. Öte yandan pH=7'ye ayarlanmış 120 ml TSB besiyerlerine ıslak ağırlığı hesaplanan ön kültürden 500'er µL alınıp ekilmiştir ve 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 45 °C'de 120 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. Her 24 saatte bir 5 ml alınan örnekler, ikişer defa dH₂O ile yıkanmıştır (4000 rpm, 15 dk, 25 °C). Yıkanan örnekler -20 °C'ta saklanır. 120 saat sonunda hücreler 2-3 ml dH₂O ile çözünmüştür ve daha önceden tartılan tartım kaplarına aktarılmıştır. 70 °C'a ayarlanmış olan etüvde 3-4 gün kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sonrası tartım kapları tekrar tartılmış ve kuru ağırlık miktarı mg/ml şeklinde hesaplanarak grafik oluşturulmuştur.

3.2.14. Antibiyotik Direnci

Antibiyotik olarak β -laktam halkasına sahip olan penisilin diski (10U) (Bioanalyse) kullanılmıştır. Buna ek olarak apramisin (50 $\mu\text{g/mL}$), ampisilin (100 $\mu\text{g/mL}$), nalidiksik asit (25 $\mu\text{g/mL}$) ve kloramfenikol (25 $\mu\text{g/mL}$) kullanılmıştır.

Ön kültürden 100 μL alınıp TSA besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Penisilin (10 U) diski agarın tam ortasına konulmuştur. Diğer antibiyotiklerden 7'şer μL alınıp agarın ortasına yerleştirilen emdirme kağıdının üstüne eklenmiştir. Antibiyotikli disklerin etrafında zon oluşmaması durumunda *Pseudonocardia* izolatının kullanılan antibiyotiklere dirençli olduğunu göstermektedir.

3.2.15. Polietilen Glikol (PEG) Degradasyonu

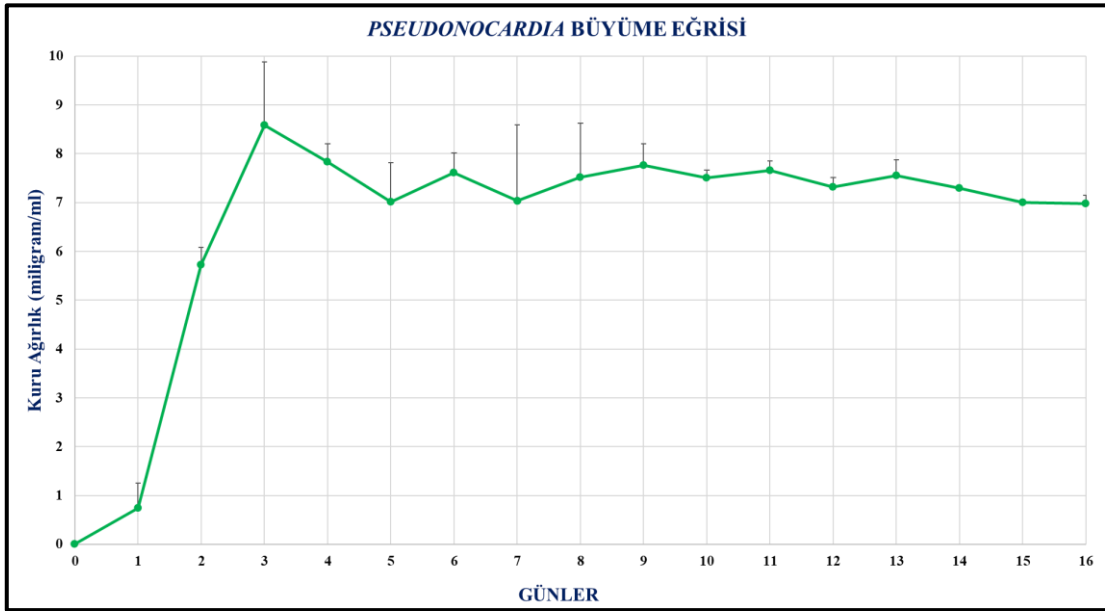
Polietilen glikol (PEG), polimerik bir bileşiktir ve birçok endüstriyel ve tıbbi uygulamada yaygın olarak kullanılan bir polimer türüdür. Boyaların, verniklerin, elektronik devrelerin, plastiklerin ve diğer birçok endüstriyel ürünün üretiminde kullanılmaktadır. Çevresel atıkların başında plastikler gelmektedir ve doğada parçalanması çok güçtür [150].

Bu çalışmada *Pseudonocardia* izolatının PEG'i degrade edip etmediğini anlamak amacıyla %1'lik PEG içeren M9 besiyerine nokta ekim yapılmıştır. Toplamda 18 gün boyunca 30°'ta inkübasyonda bırakılmıştır. 6, 12 ve 18 gün sonunda petri Coommasie Blue ile ~20 dk boyunca boyanmıştır ve Destaining Solüsyonu ile ~20 dk yıkanmıştır. Hücre etrafında görülecek şeffaf zon PEG'in degrade olduğunu gösterecektir.

4. SONUÇLAR

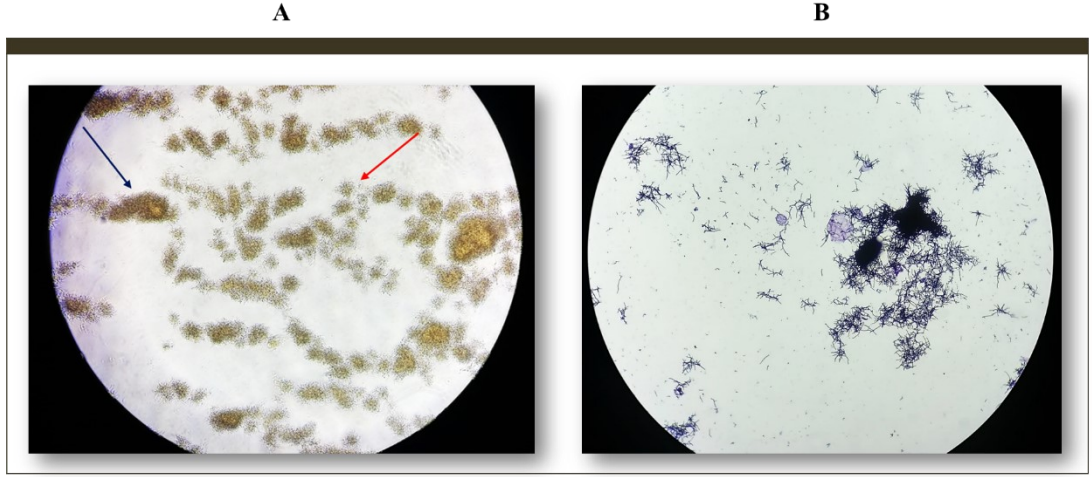
4.1. Olası *Pseudonocardia* İzolatının Büyüme Eğrisi, Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

TSB besiyerinde 16 gün boyunca büyütülen izolatın zamana bağlı büyüme eğrisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bakterinin 72 saatte (3. gün) durağan faza ulaştığı ve bu fazda uzun bir süre kaldığı görülmüştür.



Şekil 4.1: *Pseudonocardia* izolatının zamana bağlı büyüme eğrisi.

TSB besiyerinde 72 saat büyütülen kültürün morfolojisi incelendiğinde hifli yapıda olduğu, öbeklenerek pelletler halinde büyüdüğü ve Gram pozitif olduğu görülmektedir (Şekil 4.2). Olası *Pseudonocardia* izolatının tanımlanması için öncelikle bazı biyokimyasal identifikasyon testleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.1’de, görselleri ise Şekil 4.3’te sunulmuştur. Elde edilen bulgular, farklı araştırmacılar tarafından izole edilmiş 61 farklı *Pseudonocardia* suşunun tabii tutulduğu testlerin sonuçlarıyla karşılaştırılmış [4] ve izolatın *Pseudonocardia* ile benzer özellikler taşıdığı tespit edilmiştir.

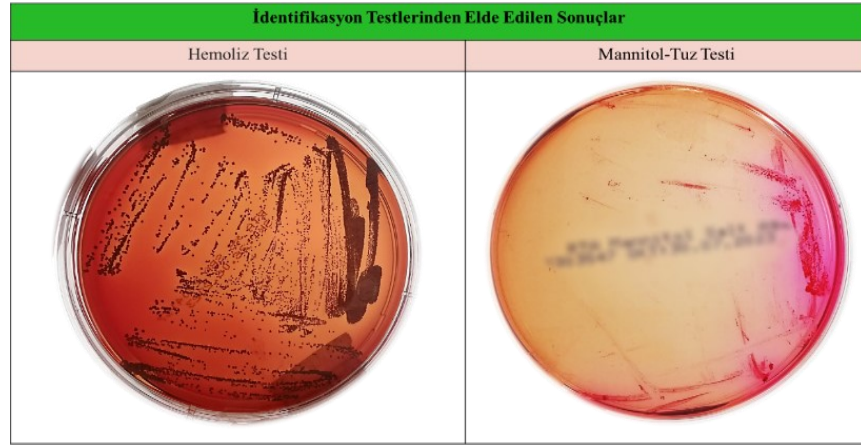


Şekil 4.2: A) İzolatın ışık mikroskobu altındaki morfolojik görüntüsü (20x). Lacivert ok (→) hücreyi, kırmızı ok (→) ise oluşan hipleri göstermektedir. B) İzolatın Gram boyama sonucu (20x).

Tablo 4.1: Biyokimyasal test sonuçları.

Test Adı	Sonuç	Test Adı	Sonuç
Sitrat Testi	+	Katalaz Testi	+
Nitrat Testi	+	Glikoz Testi	-/+
Jelatinaz Testi	-	Sükroz Testi	+
Üreaz Testi	+	Laktoz Testi	-
SIM Testi	-	Mannitol-Tuz Testi	+
Metil Kırmızısı (MR) Testi	-	Hemoliz Testi	-
Voges-Proskauer (VP) Testi	-		

İdentifikasyon Testlerinden Elde Edilen Sonuçlar										
Jelatinaz Testi	SIM Testi	MR-VP Testi		Üreaz Testi	Sitrat Testi	Nitrat Testi	Glikoz Testi	Sükroz Testi	Laktoz Testi	Katalaz Testi
										



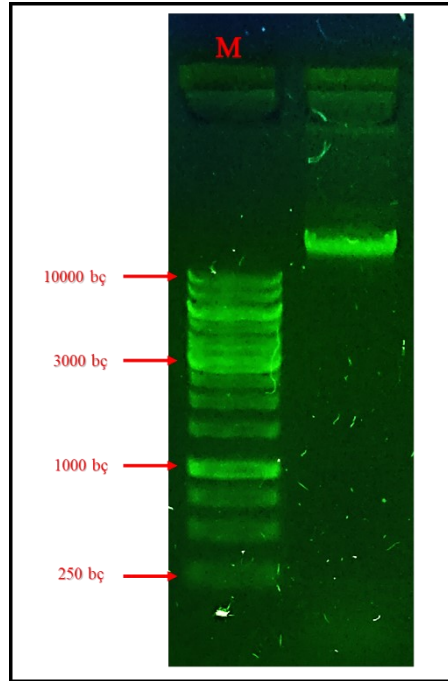
Şekil 4.3: Biyokimyasal identifikasyon test sonuçlarının görselleri.

4.2. Olası *Pseudonocardia* İzolatından Genomik DNA İzolasyonu

İzolatın moleküler olarak tanımlanması için genomik DNA'sı izole edilmiş (Şekil 4.4), dizi analizi yapılmış (GenEra Diagnostik A.Ş.) ve genomun biyoinformatik analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler için kullanılan yazılımlar ve programlar Tablo 3.5.'te listelenmiştir. Bu izolata ait genomik DNA'nın ~5.75 Mb boyutunda ve % 74.45 GC oranında olduğu tespit edilmiştir. EzBioCloud programı yardımıyla elde edilen 16S rRNA dizisinin (Şekil 4.4) NCBI veri tabanı BLAST sonuçlarına göre izolatın *Pseudonocardia* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. İzolatın *Pseudonocardia* türleri arasındaki yerini ve benzerliğini anlamak amacıyla tüm *Pseudonocardia* suşlarına ait 16S rRNA'lar kullanılarak MEGA 11 üzerinden Neighbor-Joining modeli

kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.5). *Pseudonocardia* izolatının sentezlediği olası ikincil metabolitler, tüm genoma ait DNA dizisi kullanılarak antiSMASH programı vasıtasıyla tespit edilmiştir. Elde edilen ikincil metabolitler ve türleri Tablo 4.2’de listelenmiştir.

Pseudonocardia izolatının sentezlediği başlıca önemli enzimler, proteinler ve vitaminler, genomik DNA dizisine ait en uzun ilk 15 kontig dizisi baz alınarak (sonraki dizilerin sonuçları tekrar etmektedir) BLAST programı ile analiz edilmiş ve en yüksek benzerlik oranına sahip ilk 3 bakteriye ait bilgiler kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına ait ayrıntılı bilgiler Tablo 4.2’den Tablo 4.9’a kadar gruplara göre kategorize edilerek listelenmiştir.



Şekil 4.4: Olası *Pseudonocardia* izolatından izole edilen genomik DNA.

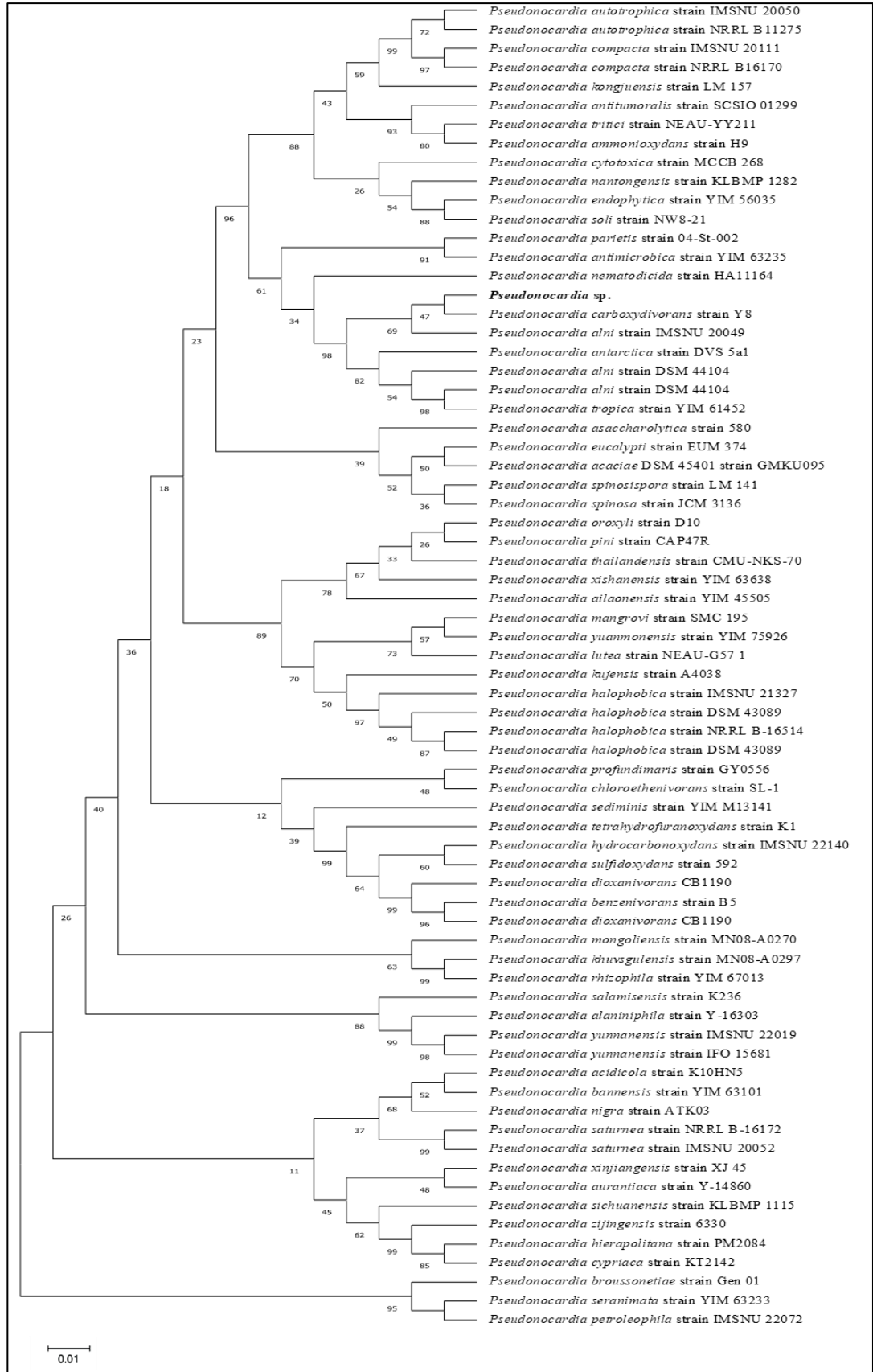
M: 1 kb’lık moleküler DNA belirteci.

TTGTTGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTTCGG
GGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTCCACTCTGGGATAAGCCCGGGAACTGGGTCTAA
TACCGGATAGGACCACTGATCGCATGGTTGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTGGGGGATGGGCCCGCGGCTATCAGCTTGTTG
GTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGGTGACGGGTAGCCGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGCGGGAAGCCTGACGCAGCGACCGCCGTGGGGGATGACGG
CCTTCGGGTGTAAACCTCTTCGCCAGGGACGAAGAGCAATTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGTAACACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTGTGTCCGCTCGGC
CGTGAAAACCTTGGGGCTTAACCTCTGAGCGTGCGGTGATACGGGCATCACTTGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACCAATCCACGG
TTTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAAGCGGGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTGACATGCACCAGACATCCCTA
GAGATAGGGCTTCCCTTGTGGTGGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCTCATACAGAGGGCTGCGAG
ACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGTGAGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCGTGAAGTTGGAGTCCGT
AGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACCGAAAGTTGGTAAC
ACCCGAAGCCGGCGGCCAACCCCTGTGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAAGGTAG
CCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCTT

Şekil 4.5: İzolatın 16S rRNA dizisi.

Tablo 4.2: *Pseudonocardia* izolatı tarafından sentezlenen olası ikincil metabolitler ve türleri.

İkincil Metabolit	Türü
İkarugamisin	Antibiyotik, Antitümör
Rustmisin	Antibiyotik
Fosfonoglikanlar	Antifungal
Funisamin	Antibiyotik
SF2575 ★ Poliketit (Tetrasiklin) ★ Sakkarit	Antitümör
Kendomisin B	Antibiyotik, Antitümör
Lankasidin C	Antibiyotik
Ektoin	Antiultraviyole
Nistatin benzeri <i>Pseudonocardia</i> polien	Antibiyotik
Sakaroşelinler (A, B, C, D, E, F, G, H)	Antitümör
Stenotrisin	Antibiyotik
Streptamidin	Antibiyotik
Karotenoid	Antitümör



Şekil 4.6: 16S rRNA dizisi ile oluşturulan filogenetik ağaç.
İzolat “*Pseudonocardia* sp.” olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.3: *Pseudonocardia* izolatu tarafından sentezlenen olası vitaminler.

Sentezlenen Olası Vitaminler	İlgili Vitamin Sentazlar ve Proteinler
B1	*Thiamine pyrophosphate protein *Thiamine biosynthesis protein ThiJ *Thiamine biosynthesis protein ApbE *Thiamine-monophosphate kinase *Thiamine ABC transporter permease *Thiamin pyrophosphokinase *Thiamine biosynthesis protein ThiS
B2	*Riboflavin biosynthesis protein RibBA *Riboflavin synthase subunit alpha *Riboflavin biosynthesis protein RibD *Riboflavin kinase
B5	Pantothenate synthetase
B6	Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase
B7	*Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit *Biotin sulfoxide reductase *ATP-dependent dethiobiotin synthetase BioD *Biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase *Dethiobiotin synthetase *Biotin biosynthesis protein BioC *Biotin--acetyl-CoA-carboxylase ligase *Biotin transporter BioY
B12	*B12-dependent methionine synthase * Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase *Cobalamin biosynthesis protein CobD *Cobalamin-binding protein *Cobalamin/Fe3+-siderophore ABC transporter ATP-binding protein * Putative cobalamin synthesis protein *Hypothetical cobalamin synthesis protein P47K/CobW *Putative cobalamin biosynthesis protein CobN *Putative cobalamin biosynthesis protein CobI *Cobalamin biosynthesis protein CbiX *Cobalamin biosynthesis protein CbiM *Cobalamin biosynthesis protein CobQ
K2	*Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase *Dimethylmenaquinone methyltransferase
Folat	Dihydrofolate synthase
Diğer	İlgili Sentazlar
Kinolinate (Nikotinik asit mononükleotidi)	Quinolinate synthetase
Metanogen (metan üretimi)	Coenzyme F390 synthetase

Tablo 4.4: *Pseudonocardia* izolatının dirençli olabileceği bileşikler ve elementler.

Olası Bileşikler ve Elementler	Türü	İlgili Direnç Proteinleri
Bakır (Cu)	Geçiş Metali	Copper resistance protein
Bleomisin	Antitümör	Putative glyoxalase/bleomycin resistance protein
Kloramfenikol	Antibiyotik	Chloramphenicol resistance protein
Daunorubisin	Antitümör	Daunorubicin resistance protein DrrA family
Tellür (Te)	Toksik Yarı Metal	Tellurium resistance protein TerC
Arsenik (As)	Toksik	Arsenic resistance protein
Hidroperoksit	Ağartıcı	Organic hydroperoxide resistance protein
Amonyum (NH ₄ ⁺)	Güçsüz asit	Quaternary ammonium compound-resistance protein SugE
Diğer	Türü	İlgili Direnç Proteinleri
Hücrel ilaç direnci pompaları	İyon çiftlerini veya ilaç moleküllerini hücre içinden dışarı taşıyan pompalar	Putative drug resistance transporter, EmrB/QacA family protein
<i>Bacillus cereus</i> / kloramfenikol-florfenikol	Mikroorganizma/ Antibiyotik	Bcr/CflA family drug resistance efflux transporter

Tablo 4.5: *Pseudonocardia* izolatı tarafından degrade edilen olası bileşikler.

Degrade Edilen Olası Bileşikler	Türü	İlgili Degradasyon Enzimleri
Sinnamik asit	Aromatik bileşik	Bifunctional 3-phenylpropionate/cinnamic acid dioxygenase ferredoxin
Atrazin	Herbisit	Hydroxydechloroatrazine ethylaminohydrolase
Katekol	Bitkilerde antioksidan	*Catechol 1,2-dioxygenase *
Benzoat	Antimikrobiyal	*Benzoate transporter *2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase *2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase *4-chlorobenzoate--CoA ligase
Benzen	Aromatik bileşik	Benzene 1,2-dioxygenase
Gentisik asit	Katalizör	Gentisate 1,2-dioxygenase
Allofanat	Poliüretan üretimi	Allophanate hydrolase
Protokateşuat	Aromatik bileşik	*Extradiol dioxygenase *Protocatechuate 4,5-dioxygenase subunit beta *2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase
Hidroksi kinol	Aromatik bileşik	Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase

Tablo 4.6: *Pseudonocardia* izolatı tarafından sentezlenen olası lipazlar.

Sentezlenen Olası Lipazlar	Görevi
Lysophospholipase	Fosfolipid metabolizması, lizofosfolipidlerin hidrolizi
Monoacylglycerol lipase	Monoasilgliserol hidrolizi
GDSL family lipase	Bitkilerde lipit hidrolizi
Phospholipase D	Fosfolipid hidrolizi, hücre zarı geçirgenliği ve sinyal iletimi

Tablo 4.7: *Pseudonocardia* izolatı tarafından sentezlenen olası proteazlar.

Sentezlenen Olası Proteazlar	Görevi
Clp protease ClpP, ClpS	Hücrelerde protein yıkımı
Zinc protease	Hücre döngüsü düzenlemesi ve proteinlerin parçalanması
Zinc metalloprotease	Proteinlerin parçalanması
Lon protease	Proteinlerin doğru katlanması, hatalı katlanmanın düzeltilmesini ve proteinlerin parçalanması
CAAX protease	Protein işleme ve sinyal transdüksiyonu
HtpX protease	Proteinlerin doğru katlanması, hatalı katlanmanın düzeltilmesini ve proteinlerin parçalanması

Tablo 4.8: *Pseudonocardia* izolatu tarafından sentezlenen olası transferazlar.

<i>Pseudonocardia</i> İzolatu Tarafından Sentezlenen Olası Transferazlar			
1. tRNA/rRNA metiltransferase	33. Spermidine N1-acetyltransferase*	65. Putative alpha-(1-6)-mannopyranosyltransferase	97. Alpha-1,4-glucan:maltose-1-phosphate maltosyltransferase
2. Phosphoserine aminotransferase	34. Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	66. Arylamine N-acetyltransferase	98. UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
3. Acetyl-CoA acetyltransferase	35. tRNA (guanine-N(1))-methyltransferase	67. Oleandomycin glycosyltransferase	99. Cob(D)irnic acid a,c-diamide adenosyltransferase
4. Glycosyl transferase	36. Methyltransferase type 11	68. 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	100. 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
5. UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	37. Putative dual-specificity RNA methyltransferase RimN	69. Dolichol-phosphate mannosyltransferase	101. tRNA (adenosine(37)-N(6)-threonyl)carbamoyltransferase complex dimerization subunit type 1 TsaB
6. Molybdopterin molybdenumtransferase	38. 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	70. Arabinosyltransferase	102. tRNA (adenosine(37)-N(6)-threonyl)carbamoyltransferase complex ATPase subunit type 1 TsaE
7. Ribosomal-protein-alanine N-acetyltransferase	39. Homoserine O-acetyltransferase	71. Precorrin-4 C(11)-methyltransferase	103. Demethylmenaquinone methyltransferase
8. Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	40. Aminotransferase class V	72. Precorrin-6Y methyltransferase	104. Hydroxyurea phosphotransferase
9. Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	41. Ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	73. Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	105. 1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase
10. Nicotinate phosphoribosyltransferase	42. CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	74. Hydroxyneurosporene-O-methyltransferase	106. Bifunctional uroporphyrinogen-III C-methyltransferase/uroporphyrinogen-III synthase
11. Glutamine amidotransferase	43. Glycosyl transferase family 39	75. Aminoglycoside phosphotransferase	107. D-inositol-3-phosphate glycosyltransferase
12. Methyltransferase	44. ACP S-malonyltransferase	76. 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	108. L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase
13. Glucose-1-phosphate cytidylyltransferase	45. Trans-aconitate methyltransferase	77. TlyA family rRNA (cytidine-2'-O)-methyltransferase	109. Carnitine O-acetyltransferase
14. CoA transferase	46. Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	78. Ornithine carbamoyltransferase	110. 23S rRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RimB
15. Isoprenyl transferase	47. Sulfurtransferase	79. Acetylornithine aminotransferase	111. 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase
16. Putative methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase	48. GNAT family N-acetyltransferase	80. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase	112. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
17. N-acetyltransferase	49. 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	81. Histidinol-phosphate aminotransferase	113. NDP-hexose methyltransferase
18. Apolipoprotein acyltransferase	50. Glutamate-ammmonia-ligase adenylyltransferase	82. Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	114. Flavin prenyltransferase UbiX
19. tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	51. Octanoyltransferase	83. Phospho-N-acetylmutaromyl-pentapeptide-transferase	115. CCA tRNA nucleotidyltransferase
20. 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	52. Aminomethyltransferase	84. GDP-mannose-dependent alpha-(1-6)-phosphatidylinositol monomannoside mannosyltransferase	116. Protoheme IX farnesyltransferase
21. Aminotransferase	53. Branched-chain-amino-acid aminotransferase	85. Anthranilate phosphoribosyltransferase	117. Aromatic amino acid aminotransferase
22. O-methyltransferase	54. Adenosylcobinamide-GDP ribazoletransferase	86. Putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase subunit A	118. Dihydrolipoamide acetyltransferase
23. Aspartate aminotransferase family protein	55. Protein-L-isospartate O-methyltransferase	87. 4'-phosphopantetheinyl transferase	119. 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase
24. Adenylyltransferase/sulfurtransferase MoeZ	56. Phospho-N-acetylmutaromyl-pentapeptide-transferase	88. Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	120. 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
25. Acyltransferase	57. Myristoyl transferase	89. Cob(J)alamin adenosyltransferase	121. GCN5 family acetyltransferase
26. 4-hydroxybutyrate CoA-transferase	58. 23S rRNA methyltransferase	90. Serine-glyoxylate aminotransferase	122. CDP-alcohol phosphatidyltransferase
27. DNA methyltransferase	59. SAM-dependent methyltransferase	91. Formyl-CoA transferase	123. Thiosulfate sulfurtransferase
28. rRNA methyltransferase	60. Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	92. Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	124. Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase
29. Serine hydroxymethyltransferase	61. Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	93. 5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase	125. Uroporphyrin-III methyltransferase
30. Formiminotransferase-cyclodeaminase	62. GDP-mannose-dependent alpha-(1-2)-phosphatidylinositol mannosyltransferase	94. 2-phospho-L-lactate guanylyltransferase	126. Galactofuranosyl transferase
31. Glutathione S-transferase	63. Putative aminotransferase YuhH	95. Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	127. N-succinylidiaminopimelate aminotransferase
32. Carbamoyltransferase	64. Protoheme IX farnesyltransferase	96. Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	

Tablo 4.9: *Pseudonocardia* izolatu tarafından sentezlenen olası hidrolazlar.

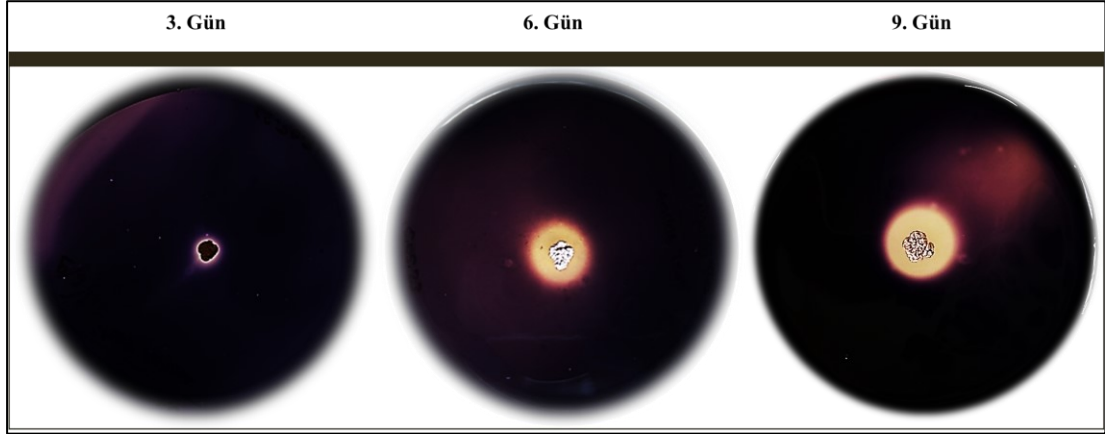
<i>Pseudonocardia</i> İzolatu Tarafından Sentezlenen Peptidaz Özellikteki Olası Hidrolazlar		<i>Pseudonocardia</i> İzolatu Tarafından Sentezlenen Olası Hidrolazlar	
1. Xaa-Pro Dipeptidase	21. Aminopeptidase N	1. NUDIX hydrolase	21. Nucleoside hydrolase
2. Peptidase M13	22. Peptidase M50	2. MBL fold metallo-hydrolase	22. N-acyl-L-amino acidamidohydrolase
3. Peptidase M16	23. Methionine aminopeptidase	3. Peroxyureidoacrylate/ureidoacrylate amidohydrolase RutB	23. Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
4. Putative Cytosol Aminopeptidase	24. Peptidase S15	4. 2-hydroxy-6-ketono-2,4-dienediolic acid hydrolase	24. Dienelactone hydrolase
5. Peptidase P60	25. Prolyl oligopeptidase	5. Phosphohydrolase	25. N-dimethylarginine dimethylaminohydrolase
6. Membrane Dipeptidase	26. Peptidase M48 Ste24p	6. Ethylamine chlorohydrolase	26. SGNH hydrolase
7. X-Pro dipeptidase	27. Proline iminopeptidase	7. Oleoyl-ACP hydrolase	27. Carbon-nitrogen hydrolase
8. Peptidase S1	28. X-Pro dipeptidase	8. Alpha/beta hydrolase	28. Peptidyl-tRNA hydrolase
9. Peptidase S9	29. Peptidase S49	9. Amidohydrolase	29. ADP-ribosylglycohydrolase
10. Putative peptidase	30. Peptidase M75	10. HAD family hydrolase	30. 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase
11. L,D-transpeptidase	31. O-sialoglycoprotein endopeptidase	11. 3D-(3,5/4)-trihydroxycyclohexane-1,2-dione hydrolase	31. Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase
12. Peptidase M20	32. Leucyl aminopeptidase	12. Hydroxydechloroatrazine ethylaminohydrolase	32. Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase
13. Peptidase M23	33. Signal peptidase	13. Glycosyl hydrolase	33. Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase
14. Dipeptidase	34. Gamma-glutamyltranspeptidase	14. Allophanate hydrolase	34. Diadenosine tetraphosphate hydrolase
15. Metallopeptidase	35. Putative M18 family aminopeptidase 2	15. HIT family hydrolase	35. Creatinine amidohydrolase
16. Peptidase M38	36. Peptidyl-dipeptidase Dep	16. Epoxide hydrolase	36. Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
17. Putative dipeptidyl peptidase IV	37. CysO-cysteine peptidase	17. Ribonucleoside hydrolase	37. Zn-dependent hydrolase
18. Aminopeptidase (A ve N)	38. Peptidase M52	18. Metal-dependent hydrolase	
19. Prolyl endopeptidase	39. Peptidase C14	19. Guanosine polyphosphate pyrophosphohydrolase	
20. Dipeptidyl aminopeptidase	40. Peptidase P60	20. GTP cyclohydrolase	

4.3. *Pseudonocardia* İzolatının Antimikrobiyal Etkisi

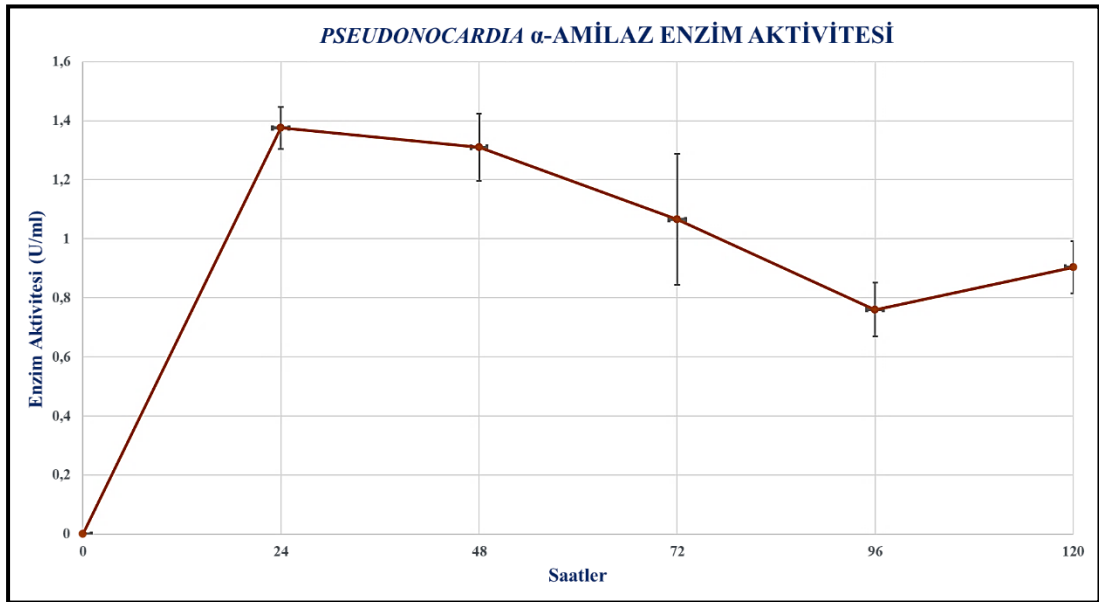
Pseudonocardia'ya ait kültür süpernatantının, sonikasyon sonucu elde edilen süpernatant ve pelletin antimikrobiyal özellik taşıyıp taşımadığını belirlemek için 6 farklı mikroorganizma kullanılmıştır. İzolatın farklı ekstraksiyonlarının, *Bacillus subtilis* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29122, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Candida albicans* ATCC 10231 mikroorganizmaları üzerinde yapılan bu çalışmada herhangi bir antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmüştür.

4.4. α -Amilaz Enzim Aktivitesi

İzolatın α -amilaz enzimini ürettiği %1'lik nişastalı TSB agarda 3, 6 ve 9 gün boyunca büyütülen hücrelerin lügol çözeltisiyle muamale edilmesiyle tespit edilmiştir (Şekil 4.7). %1'lik nişastalı sıvı TSB besiyerinde büyütülen *Pseudonocardia* izolatının α -amilaz enzim aktivitesi de ölçülmüştür (Şekil 4.8).



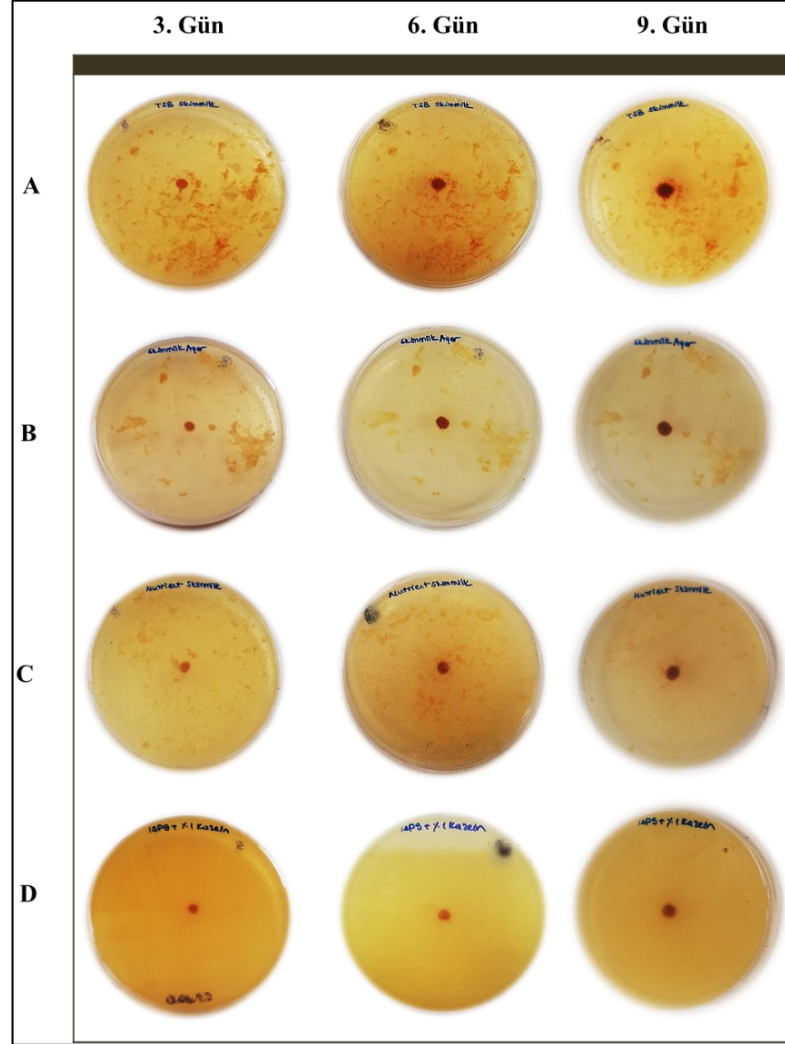
Şekil 4.7: *Pseudonocardia* izolatının α -amilaz üretimi.



Şekil 4.8: *Pseudonocardia* izolatının α -amilaz enzim aktivitesi (U/ml).

4.5. Proteaz Enzim Aktivitesi

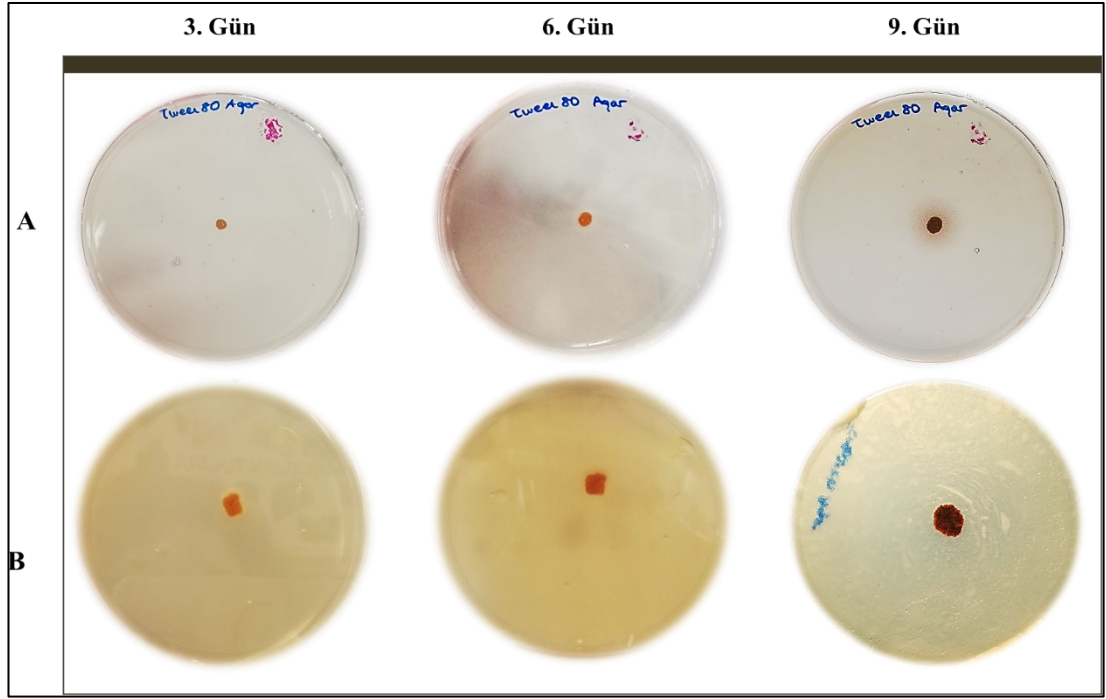
Bölüm 3.2.7.'te listelenen 4 farklı besiyerine nokta ekim yapılan hücrelerin 3, 6 ve 9. gün sonundaki proteaz aktivite testine ait sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bakterinin ekstraselüler proteaz aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.9: *Pseudonocardia* izolatına ait proteaz aktivitelerinin farklı besiyerinde gösterilmesi. A) TSB Skimmilk agar B) Skimmilk Agar C) Nutrient Broth Skimmilk Agar D) ISP9+%1 Kazein Agar.

4.6. Lipaz Enzim Aktivitesi

Tablo 3.2’de listelenen besiyerlerine nokta ekim yapılan hücrelerin 3, 6 ve 9. gün sonundaki lipaz aktivite testine ait sonuçlar Şekil 4.10’da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 9. gün sonunda Tween 80 agarda hücre etrafında opak zon oluşması nedeniyle lipaz aktivitesinin az da olsa olduğu görülmektedir (Şekil 4.10. A-9.gün). Fakat tribütirin agarda herhangi bir zon oluşmamıştır.



Şekil 4.10: *Pseudonocardia* izolatına ait lipaz aktivitelerinin farklı besiyerlerinde gösterilmesi. A) Tween 80 Agar. B) Tribütirin Agar.

4.7. Ağır Metal Dirençliliği

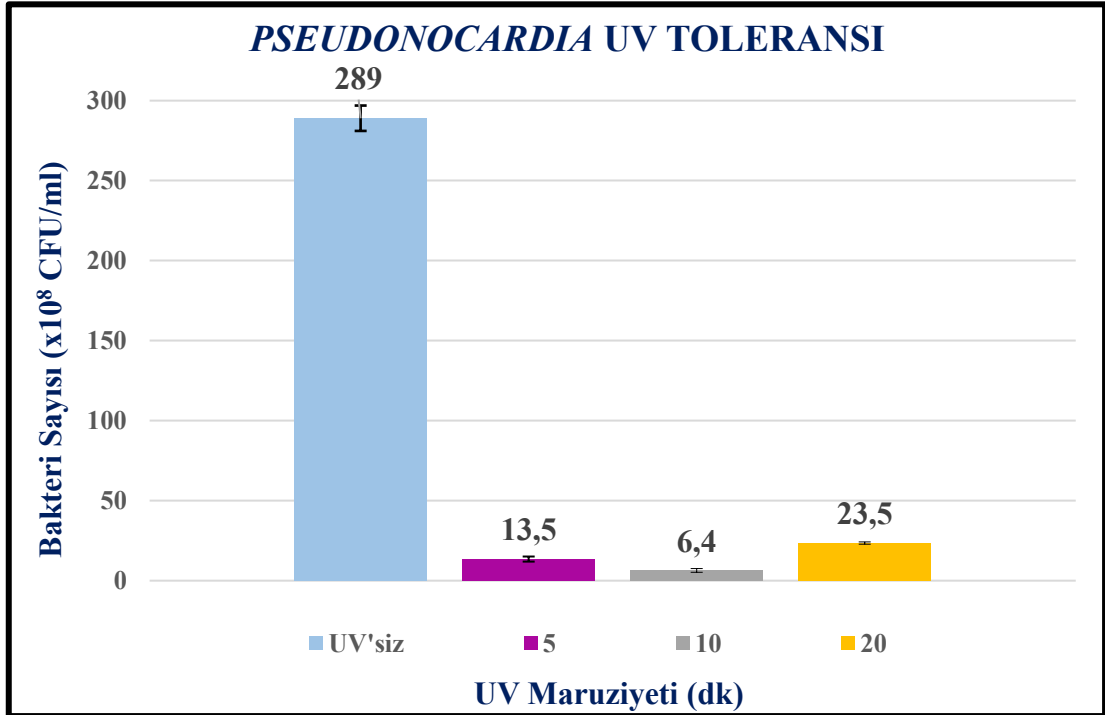
Tablo 3.7.'de listelenen ağır metaller ve uygulanan konsantrasyonlar sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.11.'de özetlenmiştir. Sonuçlara ilişkin detaylı görsellere Ek A'da yer verilmiştir. Kontrol olarak ağır metal içermeyen TSA besiyerinde de bakteri büyütülmüştür. Bu verilere göre *Pseudonocardia* izolatının CdCl_2 dışındaki diğer ağır metallere oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlar da bile (3200 $\mu\text{g/ml}$ CoCl_2 hariç) büyümenin olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.11: Farklı ağır metal ve konsantrasyonlarının *Pseudonocardia* izolatı üzerindeki büyüme etkisi. Üç artı (+++) üremenin çok fazla, çift artı (++) üremenin fazla, tek artı (+) üremenin az olduğunu ve eksi işareti (-) üremenin olmadığını göstermektedir.

Ağır Metalsiz (Kontrol)		+++			
CdCl_2 ($\mu\text{g/ml}$)		CrCl_3 ($\mu\text{g/ml}$)		ZnCl_2 ($\mu\text{g/ml}$)	
12,5	++	100	+++	100	+++
25	+	200	+++	200	+++
50	-	400	+++	400	+++
100	-	800	+++	800	+++
200	-	1600	+++	1600	+++
400	-	3200	+++	3200	++
CoCl_2 ($\mu\text{g/ml}$)		CuCl_2 ($\mu\text{g/ml}$)		$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ($\mu\text{g/ml}$)	
100	+++	200	+++	100	+++
200	+++	400	+++	200	+++
400	+++	800	+++	400	+++
800	++	1600	+++	800	+++
1600	+	3200	++	1600	+++
3200	-	6400	+	3200	+++

4.8. UV Toleransı

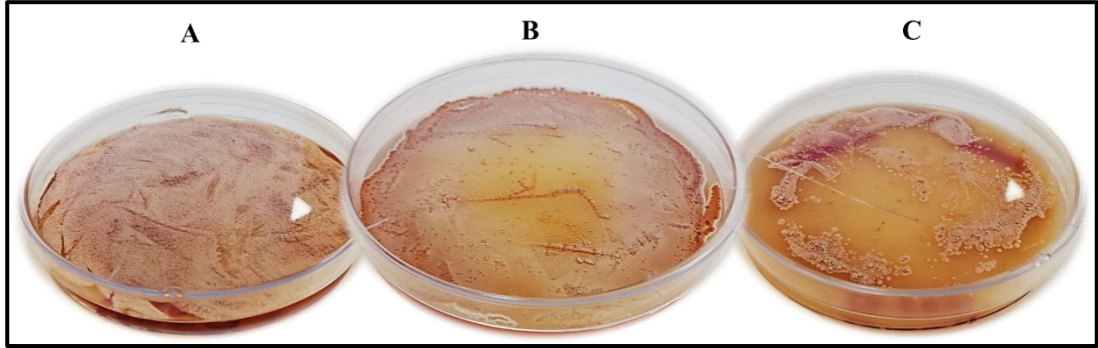
Sırasıyla 5, 10 ve 20 dk boyunca UV ışığı altında bırakılan *Pseudonocardia* hücreleri TSA besiyerine yayılmış, inkübasyon sonucu oluşan tek koloniler sayılmış ve 1 ml'deki koloni oluşturan birim (KOB/ml) hesaplanmıştır (Şekil 4.11). UV dozu Joule/metre-kare/saniye (J/m^2) birimi ile ifade edilmektedir [139]. Deneyde 5., 10. ve 20. dakikalarda bakterilere uygulanan UV dozu sırasıyla $2400 J/m^2$, $4800 J/m^2$ ve $9600 J/m^2$ 'dir. UV'ye maruz kalmayan bakterilerin sayısı 289×10^8 KOB/ml iken 5 dk UV ışığında kalan hücrelerin yaklaşık % 95,33'nün, 10 dk sonunda ise % 97,785'inin öldüğü görülmüştür. İlginç bir şekilde UV ışığı altında beklenen 20 dk sonunda bakteri sayısının 23.5×10^8 KOB/ml'a yükseldiği görülmüştür.



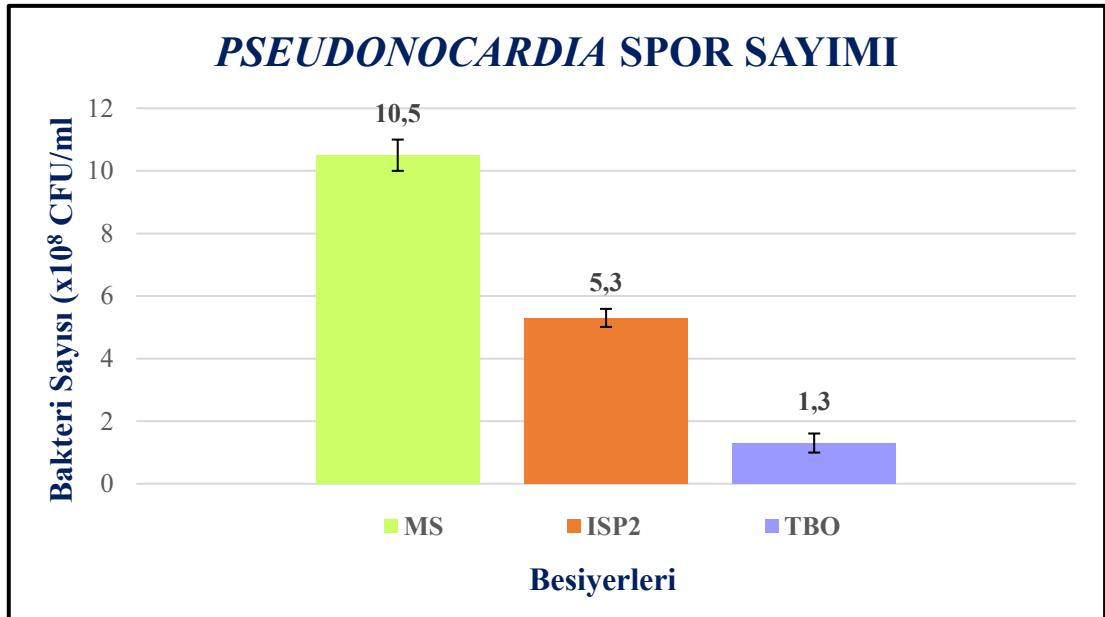
Şekil 4.11: *Pseudonocardia*'nın UV direnci ölçüm grafiği.

4.9. *Pseudonocardia*'nın Farklı Besiyerlerinde Sporlanması

MS, ISP2 ve TBO agar besiyerlerine 100'er µL ekilip inkübe edilmesiyle elde edilen sporlar Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Sporların %40'luk gliserol ile toplanıp dilüe edilmesi sonucu elde edilen sporlar sayılmış ve 1 ml'deki koloni oluşturan birim (KOB/ml) değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.13). Spor sayımına göre MS, ISP2 ve TBO besiyerinden elde edilen bakteri sayıları sırasıyla 10.5×10^8 KOB/ml, 5.3×10^8 KOB/ml ve 1.3×10^8 KOB/ml şeklindedir. Sporlanmayı destekleyen en iyi besiyerinin MS besiyeri olduğu görülmüştür.



Şekil 4.12: *Pseudonocardia* izolatının farklı besiyerlerinde sporlandırılması.
A) MS agar B) ISP2 agar C) TBO agar.

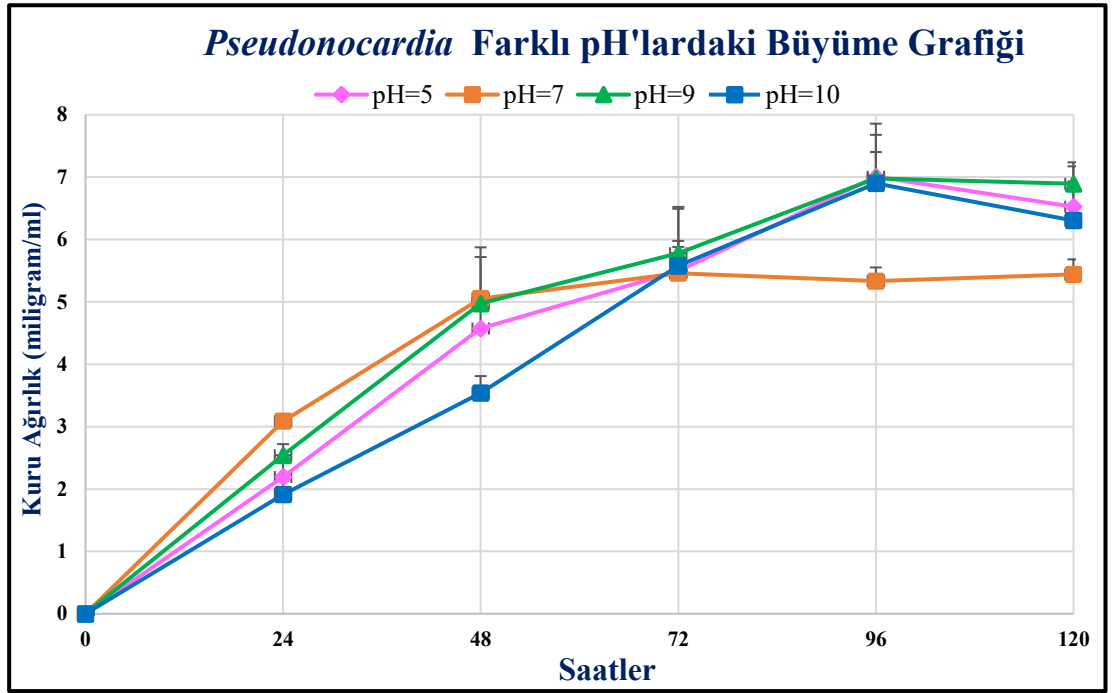


Şekil 4.13: *Pseudonocardia* izolatının farklı besiyerlerindeki spor sayımları.

4.10. Farklı pH ve Sıcaklıkların *Pseudonocardia* İzolatının Büyümesi Üzerindeki Etkisi

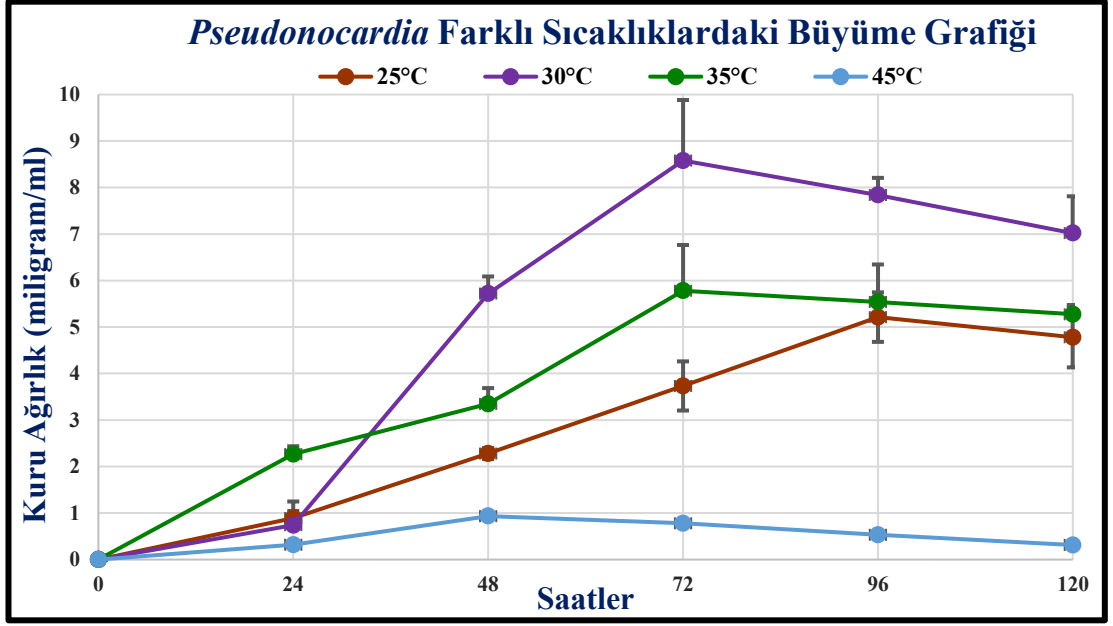
Pseudonocardia izolatının farklı pH değerlerine (5, 7, 9 ve 10) sahip TSB besiyerindeki büyüme grafiği Şekil 4.14'te, farklı sıcaklıklardaki (25 °C, 30 °C, 35 °C ve 45 °C) büyüme grafiği ise Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

pH 7'de 72. saatte durağan faza giren hücrelerin pH 5, 9 ve 10'da durağan faza 96. saatte geçtiği bulunmuştur. 96. ve 120. saatlerde pH 5, 9 ve 10'da hücre sayısının pH 7'ye göre daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 4.14: *Pseudonocardia* izolatının farklı pH'lara sahip TSB besiyerindeki büyüme grafiği.

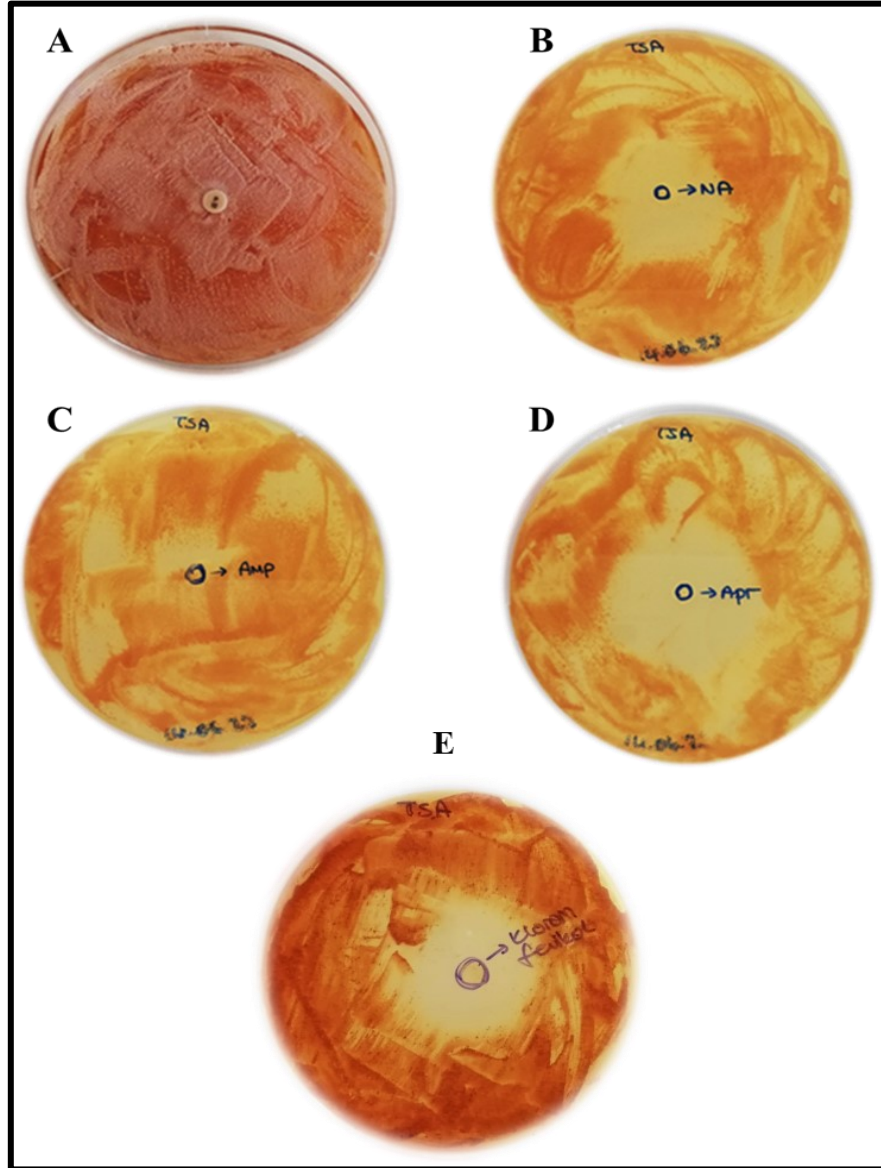
İzolatın farklı sıcaklık değerlerindeki büyüme miktarlarına bakıldığında, en fazla üremenin 30 °C’de olduğu ve 72. saatte durağan faza ulaştığı görülmüştür. 35 °C’de üremenin 30 °C’ye oranla ~1,5 kat daha az olduğu ve hücrelerin 72. Saatte durağan faza girdiği gözlenmiştir. 25 °C’de büyüyen hücrelerin 96. saatte durağan faza girdiği görülmüştür. 45 °C, üremenin en az olduğu sıcaklık olarak bulunmuştur. Bu sıcaklıkta hücreler 48. saatte durağan faza geçmiştir.



Şekil 4.15. *Pseudonocardia* izolatının farklı sıcaklıklardaki büyüme grafiği.

4.11. Antibiyotik Direnci

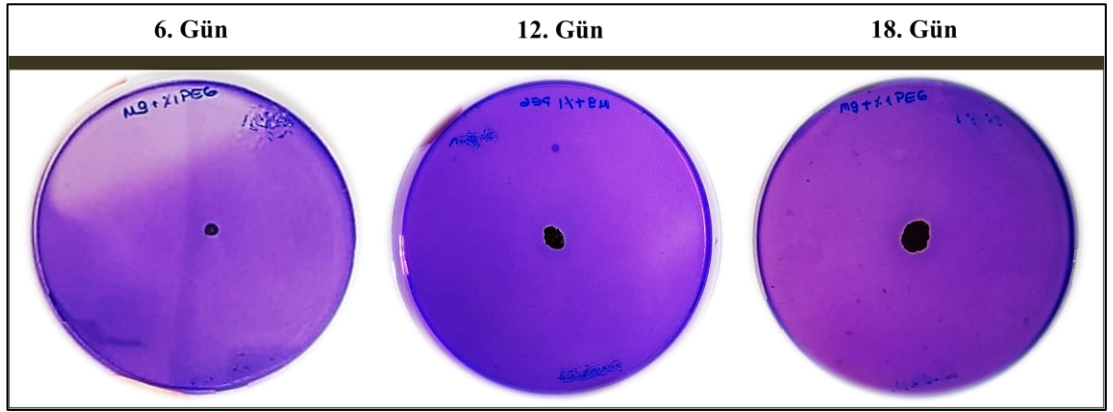
Bu çalışmada penisilin diski (10U), apramisin (50 µg/mL), ampisilin (100 µg/mL), nalidiksik asit (25 µg/mL) ve kloramfenikol (25 µg/mL) kullanılmıştır. Şekil 4.16'te kullanılan antibiyotiklerin etkileri gösterilmektedir. Buna göre, *Pseudonocardia* izolatının CLSI değerlerine göre apramisin, nalidiksik asit ve kloramfenikole hassas olduğu, penisilin ve ampisiline dirençli olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.16: *Pseudonocardia* izolatının antibiyotik direnci. A) Penisilin (10U). B) Nalidiksik asit (25 µg/mL). C) Ampisilin (100 µg/mL) D) Apramisin (50 µg/mL) E) Kloramfenikol (25 µg/mL).

4.12. Polietilen Glikol (PEG) Degradasyonu

%1'lik PEG içeren M9 agar besiyerine hücreler nokta ekim ile ekilmiştir. 6, 12 ve 18 günün sonunda Commasie Blue ile boyanan petrilerin sonuçları Şekil 4.17'da gösterilmiştir. Her ne kadar boyama sonucunda hücrenin etrafında açık renkli geniş bir halka görülmese de *Pseudonocardia*'nın PEG'i karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak büyüebildiği görülmektedir.



Şekil 4.17: *Pseudonocardia* izolatının PEG degradasyonuna ilişkin sonuçları.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİ

Pseudonocardia, Actinobacteria sınıfına ait Gram pozitif bir bakteri cinsi olup birçok habitatta bulunur ve farklı organizmalarla mutualist bir şekilde yaşarlar [10], [118]. İlk defa yaprak kesici karınca türüne ait *Acromyrmex*'lerin bağırsaklarında bulunan bu bakteriler biyoteknolojik önemi olan farklı ikincil metabolitler üretmektedir [1], [2].

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sırasında, her zaman çalıştığımız aktinomiset gruplarından farklı morfoloji sergileyen ve kahverengi pigment üreten bir bakteri, biyoteknolojik değeri olabilir şüphesiyle izole edilmiştir. Bu tez çalışmasında, söz konusu izolat biyokimyasal testler aracılığıyla ve genomu dizilenerek *Pseudonocardia* olarak tanımlanmış ve ön karakterizasyonu yapılmıştır.

İlk incelemelerde, Gram pozitif hif oluşturan bir bakteri olduğu belirlenen izolata biyokimyasal identifikasyon testleri uygulanmıştır. Elde edilen bulgular, farklı araştırmacılar tarafından izole edilmiş 61 farklı *Pseudonocardia* suşunun test sonuçlarıyla karşılaştırılmış [4] ve diğer suşlarla büyük oranda benzediği bulunmuştur. Literatür araştırmalarında *Pseudonocardia* türü ifade edilirken katalaz pozitif ve hareketsiz bakteri tanımı yapılmakta olup [118], söz konusu izolatın da bu özellikleri taşıdığı görülmüştür. Çoğu *Pseudonocardia* türü gibi bizim izolatımızın da sitratı karbon kaynağı, amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. İzolatımızın nitrat testi pozitif olup çoğu *Pseudonocardia* türü gibi nitratı (NO_3) redükte ederek nitritlere (NO_2) ve hatta daha ileri basamaklara amonyak (NH_3) ve nitrojen gazına (N_2) kadar ayrıştırabildiği anlaşılmıştır. Glikozu kısmen, sükrozu tamamen karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilen izolatın, laktozu kullanamadığı bulunmuştur. Jelatinaz aktivitesi olmayan, MR-VP testi negatif sonuç veren izolatın, %5'lik koyun kanlı agar'da büyüdüğü ancak hemoliz yeteneğinin olmadığı görülmüştür.

İzolatımızın %7.5'luk NaCl içeren mannitol agardaki renk değişimine göre (pembeden sarıya) hem yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı olduğu hem de D-mannitolü karbon kaynağı olarak kullanabildiği sonucuna varılmıştır. Daha önce Şahin ve ekibi tarafından yeni izole edilen 11 farklı *Pseudonocardia* suşun sadece 1 tanesinin yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklı olduğu ve aynı zamanda mannitolü

kullanabildiği anlaşılmıştır. Aynı çalışmada, 11 suştan 7 tanesinin ise sadece D-mannitolü kullabildiği görülmüştür [44].

Hemoliz yeteneği gözlenmeyen izolatın patojen olup olmayacağı konusunda yaptığımız araştırmalarda, *Pseudonocardia*'nın ciddi bir hemoliz aktivitesi olmasa bile enfeksiyona sebebiyet veren patojen suşlarının olduğu bulunmuştur. Travmatik beyin yaralanması geçiren bir hastanın beyin omurilik sıvısı örneğinden *Pseudonocardia carboxydivorans*'ın izole edilmesiyle, *Pseudonocardia*'nın ilk enfeksiyon vakası literatüre girmiştir [124]. Diğer bir çalışmada, İdiyopatik Trombositopenik Purpura (kemik iliğinde üretilen ve kanamanın durdurulmasında görevli trombositlerin kandaki sayısının azalması durumu) ve Splenektomi (dalağın cerrahi işlem ile çıkarılması) sonrası uzun süreli kortikosteroid kullanımına bağlı olarak gelişen *Pseudonocardia oroxyli* enfeksiyonu nedeniyle hastalarda Süpüratif Sialadenitin (tükürük bezlerinin enfeksiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan bir durum) vakası bildirilmiştir [125].

İdentifikasyon çalışmalarına ek olarak izolatın, endüstriyel önemi büyük olan α -amilaz, proteaz ve lipaz enzim aktiviteleri de incelenmiştir. %1'lik nişastalı TSA besiyerinde büyütülen bakterinin α -amilaz ürettiği gözlenmiş, enzim aktivitesi ölçümleriyle de bu bulgu desteklenmiştir. Bazı *Pseudonocardia* suşlarının nişastayı parçalayabilen enzimlere sahip olduğu bilinmektedir [4]. 2011 yılında yapılmış olan bir çalışmada, 56 farklı aktinomiset suşu amilaz aktivitesi bakımından incelenmiş ve en düşük 2.04 U/ml, en yüksek ise 6.48 U/ml değerleri elde edilmiştir [130]. Buna ek olarak, 2020 yılında yapılmış bir çalışmada geviş getiren hayvanların işkembe sıvısından amilolitik aktinobakteriler izole edilmiş, içlerinden 10 izolatın amilaz ürettiği ve elde edilen en yüksek amilaz aktivitesinin 2.53 U/ml olduğu bulunmuştur [131]. *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen α -amilaz enzim aktivitesinin ise 54 U/ml olduğu bilinmektedir [132]. Enzim üretimi konusunda mikroorganizmalar arasında farklılıklar bulunmakta olup aktinomisetlerin α -amilaz enzim aktivitesinin çok yüksek olmadığı bilinmektedir. Bir aktinomiset üyesi olan izolatın ürettiği enzimin aktivite değerleri de bu duruma bir örnektir.

Dört farklı besiyerinde proteaz aktivitesi için değerlendirilen izolatın ekstraselüler proteaz aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Literatür araştırmalarına göre *Pseudonocardia* suşlarının çoğunlukla proteaz negatif olduğu, ortamda bulunan kazeini parçalayamadıkları bilinmektedir [4], [44]. Yaptığımız biyoinformatik analizler sonucunda tespit edilen proteazların intraselüler enzimler oldukları ve

bunların çoğunluğunun proteinlerin yanlış katlanmalarını düzenleme özelliği gösterdikleri bulunmuştur.

Lipaz enzim aktivitesi için kullanılan farklı besiyerlerinden sadece %1'lik Tween 80 içeren besiyerinde, 9. gün sonunda, kısmî pozitif olarak değerlendirilebilecek bir sonuç elde edilmiştir. Şahin ve ekibi, 11 *Pseudonocardia* suşundan 8'inde %1'lik Tween 80 içeren besiyerinde pozitif sonuç almıştır [44]. Aşağıda detaylıca bahsedilecek olan biyoinformatik analizlere göre izolatomuzun fosfolipaz D (PLD) enzimini sentezlediği ve bu enzimin ekstraselüler olduğu bilinmektedir. Bu enzim sayesinde kısmi pozitif sonuç alındığı düşünülmüştür.

Biyokimyasal testler ile kısmî tanımlaması yapılan izolatuın moleküler seviyede de tanımlanması ve biyoteknolojik potansiyelinin in siliko olarak belirlenmesi için genomik DNA'sı dizilenmiştir. 16S rRNA dizisi kullanılarak izolatuın taksonomik konumu belirlenmiş ve *Pseudonocardia* cinsine ait olduğu doğrulanmıştır.

Biyoinformatik analiz sonuçları, izolatomuzun birçok biyoaktif bileşik sentezleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. İlk dikkat çeken özelliği olan kahverengi rengi, bakterinin bir ikincil metabolit olan karotenoid üretme yeteneğinden kaynaklanmaktadır. Karotenoidler sarı, turuncu, kırmızı ve kahverengi arasında değişen renklerden sorumlu doğal pigmentlerdir. Biyolojik olarak üretilen karotenoidlerin besinsel (provitamin A), antioksidan ve fotokoruyucu gibi tıbbi etkileri vardır. Mikroalgler, mikrofunguslar ve bakteriler tarafından sentezlenen karotenoidler β -karoten, likopen, lutein, astaksantin, kantaksantin ve zeaksantin şeklinde çeşitli gruplara ayrılır ve farklı molekül yapılarına göre bu sayı artabilmektedir [127], [128]. Bu çalışma kapsamında, izolatuın hangi karotenoid formunu sentezlediği araştırılmamıştır fakat, bir mikroalg olan *Phaedactylum tricornutum* tarafından sentezlendiği bilinen fukoksantin, kahverengi renkli bir karotenoid olup [129] izolatuın fukoksantin benzeri bir molekül üretebileceği düşünülmüştür.

Biyoinformatik analiz sonuçlarına göre çeşitli sentaz (vitamin ve diğerleri), hidrolaz (degradaz ve peptidaz) ve transferaz enzimlerini ve buna bağlı olarak çeşitli protein gruplarını da sentezleyebildiği tespit edilmiştir. Vitaminler, organizmaların yaşamsal fonksiyonları için gerekli olan organik bileşiklerdir ve vitamin sentazlar tarafından sentezlenmektedir. Degradazlar, biyolojik sistemlerde organik maddelerin parçalanmasından sorumlu enzimlerdir ve kompleks moleküllerin daha küçük bileşenlerine dönüştürülmesini sağlar. Biyolojik sistemlerde moleküler döngülerin sürdürülmesi ve hücre içi ve dışı maddelerin dönüşümü için önemli rol oynarlar.

Peptidazlar, proteinlerin peptit bağlarını çözerek peptitleri hidrolize ederek amino asitlere parçalarlar. Transferazlar, bir kimyasal grubu bir molekülden başka bir moleküle transfer eden enzimlerdir. Bu enzimler, bir substratın belirli bir kimyasal grubunu başka bir bileşik üzerine aktararak reaksiyonları katalizler.

Bu tez çalışması kapsamında, izolatın farklı besiyerlerinde sporlanması, plastik türevlerini parçalayabilme potansiyeli, farklı fizyolojik koşullar altında (pH, sıcaklık vb.) büyümesi, antimikrobiyal etkisi, ağır metal, UV ve antibiyotik direnci de çalışılmıştır. 10-14 günde sporlandığı bilinen *Pseudonocardia* [4], MS, ISP2 ve TBO besiyerlerinde büyütülmüş ve sporlanmayı en çok destekleyen besiyerinin MS olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin, yaptığımız identifikasyon test sonuçlarına göre MS besiyeri içeriğinde bulunan mannitolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yapılan diğer çalışmalarda ISP2 besiyerinin sporlandırma amaçlı çok sık kullanıldığı görülmüş [21], [41], [44], [146] fakat bu çalışmayla MS besiyerinin *Pseudonocardia* için en etkili besiyeri olduğu bulunmuştur.

Genom analizine göre farklı çevresel kirleticileri parçalayan enzimlere sahip olduğu görülen izolatın polietilen glikol parçalama yeteneği test edilmek istenmiştir. %1'lik PEG içeren M9 besiyerine ekilen ve toplamda 18 gün boyunca inkübe edilen hücrelerin etrafında çok küçük bir zon elde edilmiştir. Ancak besiyerinde bulunan %2'lik glikozun hemen tükeneyeceği bilindiğinden, bakterinin bu besiyerinde hiç zorlanmadan büyüebilmesi, PEG'i karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabildiğini göstermiştir. Fakat biyoinformatik analizlerde PEG degradasyonu ile direk ilişkili olabilecek bir enzim bulunamamıştır. Kohlweyer ve arkadaşları tarafından izole edilen *Pseudonocardia* K1 suşunun da PEG içeren besiyerinde büyüdüğü görülmüştür [79].

Pseudonocardia suşlarının genel olarak ISP2 katı besiyerinde büyütüldüğü, optimum sıcaklık olarak 25 °C-28 °C'ta ve optimum pH olarak ise 7.0-7.5 değerlerinin tercih edildiği bilinmektedir [21], [41], [44], [146]. Bu çalışmada, yukarıda adı geçen sporlandırma ve PEG içeren besiyerleri dışında katı besiyeri olarak TSA, sıvı besiyeri olarak ise TSB kullanılmıştır. Literatürde, *Pseudonocardia cypriaca* ve *Pseudonocardia salamisensis* suşlarının TSA besiyerinde büyümediği [44] bilgisi mevcut olmasına rağmen, bizim suşumuzun bu besiyerinde büyüebildiği gözlenmiştir. Bakteri, pH değerleri 5, 7, 9 ve 10 olan besiyerlerinde oldukça rahat büyümüştür ama optimum pH 7 olarak bulunmuştur. Bizim bulgularımızı destekler

şekilde, Şahin ve ekibinin izole ettiği 11 *Pseudonocardia* suşun arasından 9'unun pH 5 ve 10'a dayanıklı olduğu görülmüştür [44].

Farklı sıcaklıklarda (30 °C, 35 °C, 25 °C ve 45 °C) büyütülen izolatın optimum büyüme sıcaklığı literatürle uyumlu olacak şekilde 30 °C olarak bulunmuştur. Farklı sıcaklıklarda pigmentasyon miktarının değiştiği gözlenmiştir. Pigmentasyonun en yoğun olduğu sıcaklık sırasıyla 35 °C, 30 °C ve 25 °C şeklinde olup en az pigmentasyonun gerçekleştiği sıcaklık 45 °C olarak bulunmuştur.

Pseudonocardia izolatının *B. subtilis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal etkisi, izolata ait farklı ekstraksiyonların kullanılması (süpernatant, sonikasyon sonucu elde edilen süpernatant ve pellet ile bunların metanollü ekstraksiyonları) ile çalışılmıştır. Fakat kullanılan mikroorganizmalara karşı, bu çalışma için, herhangi bir antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. Oysa yapılan biyoinformatik analizlerde, antimikrobiyal özellik taşıyan ikincil metabolitlerin varlığı saptanmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada, *Pseudonocardia* sp. JB05'in farklı ekstraksiyonları kullanılmış ve *S. aureus*'a oldukça yüksek ve *B. subtilis*'a kısmî antimikrobiyal etkisi olduğu; *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya ise hiçbir etki yapmadığı görülmüştür [133]. İn siliko sonuçlarla uyumlu olmayan sonuçlarımızın, farklı konsantrasyonda özütlerin kullanılmasıyla, farklı çözücülerin devreye sokulmasıyla tekrarlanmasının gerekliliği açıktır.

Biyoinformatik analizler vasıtasıyla izolatımızın ağır metallere, özellikle bakır ve çinko metaline dirençli olabileceği görülmüştür. Bu sebeple; CdCl₂, CoCl₂, CrCl₃, CuCl₂, Pb(NO₃)₂, ZnCl₂ ağır metallerinin farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerlerinde izolat büyütülmeye bırakılmıştır. İzolatımızın CdCl₂'e hassas olduğu ve diğer ağır metallerin oldukça yüksek konsantrasyonlarında oldukça iyi ürettiği bulunmuştur. Laboratuvarımızda yapılmış olan başka bir çalışmada, bir aktinomiset olan *Streptomyces coelicolor*'ın 400 µg/ml CdCl₂ ve 3200 µg/ml Pb(NO₃)₂ konsantrasyonunun altında kalan değerlerde büyüyebildiği görülmüştür [134]. İzolatımızın *Streptomyces coelicolor*'a göre CdCl₂'e çok daha hassas olduğu fakat Pb(NO₃)₂'a *S. coelicolor*'a çok daha dirençli olduğu görülmüştür. Bildiğimiz kadarıyla, *Pseudonocardia* türlerinin ağır metal direnci daha önce çalışılmamıştır. Bu tez çalışması, *Pseudonocardia*'nın çalışılan ağır metallere karşı oldukça dirençli olduğunu göstermektedir.

Bakteri kökenli karotenoid pigmentlerin radyasyon koruyucu ve antioksidan özelliklere sahip olan ikincil metabolitler olduğu bilinmektedir [136], [137], [138]. Bu

çalışmada, izolatımızın ürettiği karotenoidlerin UV ışığına karşı koruyucu etkisi olup olmadığı da değerlendirilmiştir. UV ışığına maruz kalmayan hücrelerin sayısına göre değerlendirildiğinde; 5 dk sonunda hücre sayısının ~21,5 kat, 10 dk sonunda ~45 kat ve 20 dk sonunda ~12,3 kat düştüğü görülmüştür. 10. dakikaya kadar hücre sayısında ciddi azalma görülmüştür, fakat pigmentasyon açısından gözle görülür belirli bir fark bulunmamasına rağmen 20. dakikada hücre sayısında ufak bir artış gerçekleşmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda *Bacillus subtilis*'in en düşük 220 J/m² UV dozunda; küf grubuna ait *Aspergillus niger*'in 3300 J/m² UV dozunda; tütün mozaik virüsünün 4400 J/m² UV dozunda ve maya türü olan *Saccharomyces sp.*'nin ise 176 J/m² UV dozunda inhibe oldukları gösterilmiştir [140], [143]. İzolatımızın 9600 J/m² UV dozunda bile yaşayabilmesi UV ışığına oldukça dirençli olduğunu göstermiştir. Bunun sebebinin, izolatımızın GC oranının %74.45 gibi oldukça yüksek bir oran olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Aktinomiset'lerin yüksek GC oranları sayesinde UV'nin sebep olduğu DNA hasarlarını tolere edebildiği bilinmektedir [144].

Pseudonocardia izolatının apramisin, ampicilin, nalidiksik asit, penisilin ve kloramfenikole karşı direnci test edildiğinde penisilin (10U) ve ampisiline (100 µg/ml) dirençli olduğu fakat apramisin, nalidiksik asit ve kloramfenikole hassas olduğu tespit edilmiştir. İzolatın, penisiline direnç göstermesi, biyoinformatik analizler sonucu bulunan β-laktam grubu antibiyotiklere olan potansiyel direnci doğrulamıştır. İn siliko olarak kloramfenikol antibiyotiğine direnci olduğu saptanan suşun, bu antibiyotiğe 25 µg/ml konsantrasyonda hassas olduğu görülmüştür. 25 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlarda biyoinformatik analizle uyumlu bir sonuç elde edilmesi mümkün olabilir.

Bu tez çalışmasından elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, *Pseudonocardia* izolatının geniş yelpazede biyoaktif bileşikler/enzimler üretebildiği ve pH, sıcaklık, ağır metal, UV gibi stres faktörlerine oldukça dayanıklı olduğu bulunmuştur. Yeni izolatın, biyoteknolojik potansiyeli hakkında ön bilgi niteliği taşıyan bu çalışma, gelecekte yapılacak daha kapsamlı araştırmalar için başlangıç materyali olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Zhang M. M., Poulsen, M., Currie, C. R., (2007), "Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants", *International Society for Microbial Ecology*, 1:313-320.
- [2] Currie C. R., Scott S. A., Summerbell R. C., David M., (1999), "Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites", *Nature*, 398:701-704.
- [3] Kumar N., Singh R. K., Mishra S. K., Singh A.K., Pachouri U.C., (2010), "Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria", *International Journal of Microbiology Research*, Volume 2, Issue 2, 12-16.
- [4] Riahi H. S., Heidarieh P., Fatahi-Bafghi M., (2022), "Genus *Pseudonocardia*: what we know about its biological properties, abilities and current application in biotechnology", *Journal of Applied Microbiology*, 132;890–906.
- [5] Huang Y., Goodfellow M., (2015), "*Pseudonocardia*", *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–32.
- [6] Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel, G. P., (2016), "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- [7] Chater K. F., (2006), "Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361:761-768.
- [8] de Lima E., da Silva I. R., Martins M. K., de Azevedo J. L., de Araújo J. M., (2012), "Antibiotics produced by Streptomyces", *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466-471.
- [9] Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G. P., (2016), "An Introduction to Actinobacteria", 6(9), 111-133.
- [10] Henssen, A., (1957), "Beiträge zur Morphologie und Systematik der thermophilen Actinomyceten", *Archiv für Mikrobiologie*, 26(4), 373-414.
- [11] Trujillo M. E., Idris H., Riesco R., Nouioui I., Igual J. M., Bull A. T., Goodfellow M., (2017), "*Pseudonocardia nigra* sp. nov., isolated from Atacama Desert rock", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:2980–2985.
- [12] Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K.F., Hopwood D. A., (2000), "Practical Streptomyces Genetics: John Innes Foundation", Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, UK.

- [13] Huang Y., Wang L., Lu Z., Hong L., Liu Z., Tan G. Y., 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, 52:977-982.
- [14] Evtushenko L. I., Akimov V. N., Dobritsa S. V., Tapykova S. D., (1989), "A new species of actinomycete, *Amycolata alni*", International Journal of Systematic Bacteriology, 39:72-77.
- [15] Weber N. A., (1972), "Gardening Ants, The Attines", American Philosophical Society.
- [16] Warwick S., Bowen T., McVeigh H., Embley T. M., (1994), "A phylogenetic analysis of the family *Pseudonocardiaceae* and the genera *Actinokineospora* and *Saccharothrix* with 16S rRNA sequences and a proposal to combine the genera *Amycolata* and *Pseudonocardia* in an emended genus *Pseudonocardia*", International Journal of Systematic Bacteriology, 44:293–299.
- [17] Goldstein S. L., Klassen J. L., (2020), "Pseudonocardia Symbionts of Fungus-Growing Ants and the Evolution of Defensive Secondary Metabolism", Frontiers in Microbiology, 11:621041.
- [18] Hoy M. A., (2013), Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications, 4.12.5.
- [19] Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A. L., Keren A. M., (2018), "Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome", Science, 359:4120.
- [20] Pathak, A., Kett, S., Marvasi, M., (2019), "Resisting Antimicrobial Resistance: Lessons from Fungus Farming Ants", Trends in Ecology & Evolution, 34 (11), 974–976.
- [21] Parra J., Soldatou S., Rooney L. M., Duncan K. R., (2021), "*Pseudonocardia abyssalis* sp. nov. and *Pseudonocardia oceani* sp. nov., two novel actinomycetes isolated from the deep Southern Ocean", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71:5032.
- [22] Duangmal K., Thamchaipenet A., Matsumoto A., Takahashi Y., (2009), "*Pseudonocardia acaciae* sp. nov., isolated from roots of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59:1487-1491.
- [23] Klaysubun C., Lipun K., Duangmal K., (2020), "*Pseudonocardia acidicola* sp. nov., a novel actinomycete isolated from peat swamp forest soil", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70:5648-5653.
- [24] Kaewkla O., Franco C. M., (2010), "*Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey

box tree (*Eucalyptus microcarpa*)”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60:2818-2822.

- [25] Qin S., Su Y. Y., Zhang Y. Q., Wang H. B., Jiang C. L., Xu L. H., Li W. J., (2008), “*Pseudonocardia ailaonensis* sp. nov., isolated from soil in China”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58:2086-2089.
- [26] Xu L. H., Jin X., Mao P. H., Lu Z. F., Cui X. L., Jiang C. L., (1999), “Three new species of the genus *Actinobispora* of the family *Pseudonocardiaceae*, *Actinobispora alaniniphila* sp. nov., *Actinobispora aurantiaca* sp. nov. and *Actinobispora xinjiangensis* sp. nov.”, International Journal of Systematic Bacteriology, 49:881-886.
- [27] Jones S., Ho L., Rees C., Hill J., Nodwell J., Elliot M., (2017), *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals”, eLife, 6.
- [28] Gust B., Kieser T., Chater K., (2002), "PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2)", John Innes Centre, 3(2), 1-39.
- [29] Medema M. H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E., Breitling R., (2011), “antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences.”, Nucleic Acids Research, 339-46.
- [30] Liu Z. P., Wu J. F., Liu Z. H., Liu S. J., (2006), “*Pseudonocardia ammonioxydans* sp. nov., isolated from coastal sediment”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56:555-558.
- [31] Prabahar V., Dube S., Reddy G. S., Shivaji S., (2004), “*Pseudonocardia antarctica* sp. nov. an Actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica”, Systematic and Applied Microbiology, 27:66-71.
- [32] Zhao G. Z., Li J., Qin Y. L., Miao C. P., Wei D. Q., Zhang S., Xu L. H., Li W. J., (2012), “*Pseudonocardia antimicrobica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete associated with *Artemisia annua* L. (sweet wormwood)”, The Journal of Antibiotics, 65:469-472.
- [33] Tian X. P., Long L. J., Li S. M., Zhang J., Xu Y., He J., Li J., Wang F. Z., Li W. J., Zhang C. S., (2013), “*Pseudonocardia antitumoralis* sp. nov., a deoxyxyboquinone-producing actinomycete isolated from a deep-sea sediment”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63:893-899.
- [34] Zhao G. Z., Li J., Huang H. Y., Zhu W. Y., Zhao L. X., Tang S. K., Xu L. H., Li W. J., (2011), “*Pseudonocardia artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Artemisia annua* L.”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61:1061-1065.

- [35] Reichert K., Lipski A., Pradella S., Stackebrandt E., Altendorf K., (1998), "*Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia*", International Journal of Systematic Bacteriology, 48:441-449.
- [36] Takamiya A., Tubaki K., (1956), "A new form of *Streptomyces* capable of growing autotrophically", Archives of Microbiology, 25:58-64.
- [37] Sakiyama Y., Thao N. K., Vinh H. V., Giang N. M., Miyadoh S., Hop D. V., Ando K., (2010), "*Pseudonocardia babensis* sp. nov., isolated from plant litter", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60:2336-2340.
- [38] Zhao G. Z., Li J., Zhu W. Y., Li X. P., Tian S. Z., Zhao L. X., Xu L. H., Li W. J., (2011), "*Pseudonocardia bannaensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the surface-sterilized roots of *Artemisia annua* L.", Antonie Van Leeuwenhoek, 100:35-42.
- [39] Kämpfer P., Kroppenstedt R. M., (2004), "*Pseudonocardia benzenivorans* sp. nov.", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54:749-751.
- [40] Mo P., Zhao Y., Liu J., Xu Z., Gao J., (2019), "*Pseudonocardia broussonetiae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of *Broussonetia papyrifera*", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71:0.
- [41] Park S. W., Park S. T., Lee J. E., 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, 58:2475-2478.
- [42] Lee S. B., Strand S. E., Stensel H. D., Herwig R. P., (2004), "*Pseudonocardia chloroethenivorans* sp. nov., a chloroethene-degrading actinomycete", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54:131-139.
- [43] Henssen A., Happach-Kasan C., Renner B., Vobis G., (1983), "*Pseudonocardia compacta* sp. nov.", International Journal of Systematic Bacteriology, 33:829-836.
- [44] Sahin N., Veyisoglu A., Tatar D., Sproer C., Cetin D., Guven K., Klenk H. P., (2014), "*Pseudonocardia cypriaca* sp. nov., *Pseudonocardia salamisensis* sp. nov., *Pseudonocardia hierapolitana* sp. nov. and *Pseudonocardia kujensis* sp. nov., isolated from soil", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64:1703-1711.
- [45] Dhaneesha M., Umar M., Merlin T. S., Krishnan K. P., Sukumaran V., Sinha R. K., Anas A., Fu P., MacMillan J. B., Sajeevan T. P., (2021), "*Pseudonocardia cytotoxica* sp. nov., a novel actinomycete isolated from an Arctic fjord with

- potential to produce cytotoxic compound”, *Antonie Van Leeuwenhoek*; 114:23-35.
- [46] Mahendra S., Alvarez-Cohen L., (2005), “*Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:593-598.
 - [47] Chen H. H., Qin S., Li J., Zhang Y. Q., Xu L. H., Jiang C. L., Kim C. J., Li W. J., (2009), “*Pseudonocardia endophytica* sp. nov., isolated from the pharmaceutical plant *Lobelia clavata*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:559-563.
 - [48] Kaewkla O., Franco C. M., (2011), “*Pseudonocardia eucalypti* sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from roots of a native Australian eucalyptus tree”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61:742-746.
 - [49] McVeigh H. P., Munro J., Embley T. M., (1994), “The phylogenetic position of *Pseudoamycolata halophobica* and a proposal to reclassify it as *Pseudonocardia halophobica*”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:300-302.
 - [50] Cuesta G., Soler A., Alonso J. L., Ruvira M. A., Lucena T., Arahall D. R., Goodfellow M., (2013), “*Pseudonocardia hispaniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from industrial wastewater activated sludge”, *Antonie Van Leeuwenhoek*; 103:135-142.
 - [51] Zan Z. Y., Ge X. F., Huang R. R., Liu W. Z., (2022), “*Pseudonocardia humida* sp. nov., an Actinomycete Isolated from Mangrove Soil Showing Distinct Distribution Pattern of Biosynthetic Gene Clusters”, *Current Microbiology*, 79:87.
 - [52] Nölde G., Hirsch P., (1962), “*Nocardia hydrocarbonoxydans* n. spec: ein oligocarbophiler Actinomycete”, *Archiv für Mikrobiologie*; 44:266-277.
 - [53] Ara I., Tsetseg B., Daram D., Suto M., Ando K., (2011), “*Pseudonocardia mongoliensis* sp. nov. and *Pseudonocardia khuvsgulensis* sp. nov., isolated from soil”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; 61:747-756.
 - [54] Lee S. D., Kim E. S., Min K. L., Lee W. Y., Kang S. O., Hah Y. C., (2001), “*Pseudonocardia kongjuensis* sp. nov., isolated from a gold mine cave”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:1505-1510.
 - [55] Gao Y., Piao C., Wang H., Shi L., Guo X., Song J., Xiang W., Zhao J., Wang X., (2018), “*Pseudonocardia lutea* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from soil in Chad”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68:1992-1997.

- [56] Chanama S., Janphen S., Suriyachadkun C., Chanama M., (2018), "*Pseudonocardia mangrovi* sp. nov., isolated from soil", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68:2949-2955.
- [57] Xing K., Qin S., Bian G. K., Zhang Y. J., Zhang W. D., Dai C. C., Liu C. H., Li W. J., Jiang J. H., (2012), "*Pseudonocardia nantongensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from the coastal halophyte *Tamarix chinensis* Lour", Antonie Van Leeuwenhoek; 102:659-667.
- [58] Liu M., Xing S. S., Yuan W. D., Wei H., Sun Q. G., Lin X. Z., Huang H. Q., Bao S. X., (2015), "*Pseudonocardia nematodicida* sp. nov., isolated from mangrove sediment in Hainan, China", Antonie Van Leeuwenhoek; 108:571-577.
- [59] Trujillo M. E., Idris H., Riesco R., Nouioui I., Igual J. M., Bull A. T., Goodfellow M., (2017), "*Pseudonocardia nigra* sp. nov., isolated from Atacama Desert rock", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67:2980-2985.
- [60] Schatz A., Isenberg H. D., Angrist A., Schatz V., (1954), "Microbial metabolism of carbamates isolation of *Streptomyces nitrificans*, spec. nov., and other organisms which grow on urethane", Journal of Bacteriology, 68:1-4.
- [61] Gu Q., Luo H., Zheng W., Liu Z., Huang Y., (2006), "*Pseudonocardia oroxyli* sp. nov., a novel actinomycete isolated from surface-sterilized *Oroxylum indicum* root", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56:2193-2197.
- [62] Schäfer J., Busse H. J., Kämpfer P., (2009), "*Pseudonocardia parietis* sp. nov., from the indoor environment", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59:2449-2452.
- [63] Hirsch P., Engel H., (1956), "Über oligocarbophile Actinomyceten", Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft; 69:441-454.
- [64] Kaewkla O., Franco C. M. M., (2021), "*Pseudonocardia pini* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from roots of the pine tree *Callitris preissii*", Archives of Microbiology, 203:3407-3413.
- [65] Hirsch P., (1960), "Einige weitere, von Luftverunreinigungen lebende Actinomyceten und ihre Klassifizierung", Archives of Microbiology, 35:391-414.
- [66] Zhang D. F., Jiang Z., Li L., Liu B. B., Zhang X. M., Tian X. P., Zhang S., Li W. J., (2014), "*Pseudonocardia sediminis* sp. nov., isolated from marine sediment", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64:745-750.
- [67] Qin S., Xing K., Fei S. M., Lin Q., Chen X. M., Cao C. L., Sun Y., Wang Y., Li W. J., Jiang J. H., (2011), "*Pseudonocardia sichuanensis* sp. nov., a novel

endophytic actinomycete isolated from the root of *Jatropha curcas L.*”, *Antonie Van Leeuwenhoek*; 99:395-401.

- [68] Thawai C., (2018), “*Pseudonocardia soli* sp. nov., isolated from mountain soil”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68:1307-1312.
- [69] Henssen A., Schäfer D., (1971), “Emended description of the genus *Pseudonocardia* Henssen and description of a new species *Pseudonocardia spinosa* Schäfer”, *International Journal of Systematic Bacteriology*; 21:29-34.
- [70] Lee S. D., Kim E. S., Kang S. O., Hah Y. C., (2002), “*Pseudonocardia spinospora* sp. nov., isolated from Korean soil”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:1603-1608.
- [71] Muangham S., Duangmal K., (2022), “*Pseudonocardia terrae* sp. nov., an actinobacterium isolated from rice rhizosphere soil in Thailand”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 5430.
- [72] Kämpfer P., Kohlweyer U., Thiemer B., Andreesen J. R., (2006), “*Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* sp. nov”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56:1535-1538.
- [73] Sujarit K., Sujada N., Kudo T., Ohkuma M., Pathom-Aree W., Lumyong S., (2017), “*Pseudonocardia thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from a subterranean termite nest”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:2773-2778.
- [74] Henssen A., (1957), “Morphology and system of thermophilic actinomycetes”, *Archives of Microbiology*, 26:373-414.
- [75] Song J., Qiu S., Zhao J., Han C., Wang Y., Sun X., Jiang S., Wang X., Xiang W., (2019), “*Pseudonocardia tritici* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum L.*)”, *Antonie Van Leeuwenhoek*; 112:765-773.
- [76] Qin S, Zhu W. Y., Jiang J. H., Klenk H. P., Li J., Zhao G. Z., Xu L. H., Li W. J., (2010), “*Pseudonocardia tropica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Maytenus austroyunnanensis*”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:2524-2528.
- [77] Daye K., Groff J., Kirpekar A., Mazumder R., (2003), “High efficiency degradation of tetrahydrofuran (THF) using a membrane bioreactor: identification of THF-degrading cultures of *Pseudonocardia* sp. strain M1 and *Rhodococcus ruber* isolate M2”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 705–714.
- [78] Lee J. J., Yoon J. H., Yang S. Y., Lee S. T., (2006), “Aerobic biodegradation of 4-methylpyridine and 4-ethylpyridine by newly isolated *Pseudonocardia* sp. strain M43”, *FEMS Microbiology Letters*, 254, 95–100.

- [79] Kohlweyer U., Thiemer B., Schröder T., Andreesen J. R., (2000), "Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1", FEMS Microbiology Letters, 186, 301–306.
- [80] Sakakibara F., Takagi K., Kataoka R., Kiyota H., Sato Y., Okada S., (2011), "Isolation and identification of dieldrin-degrading *Pseudonocardia* sp. strain KSF27 using a soil–charcoal perfusion method with aldrin trans-diol as a structural analog of dieldrin", Biochemical and Biophysical Research Communications, 411, 76–81.
- [81] Apinya T., Sombatsompop N., Prapagdee B., (2015), "Selection of a *Pseudonocardia* sp. RM423 that accelerates the biodegradation of poly (lactic) acid in submerged cultures and in soil microcosms", International Biodeterioration and Biodegradation, 99, 23–30.
- [82] Konkitt M., Jarerat A., Khanongnuch C., Lumyong S., Pathom-Aree W., (2012), "Poly (lactide) degradation by *Pseudonocardia alni* AS4. 1531T", Chiang Mai Journal of Science, 39, 128–132.
- [83] Yamamoto N., Inoue D., Kuroda M., Ike M., (2017), "Draft genome sequence of *Pseudonocardia* sp. strain N23, a 1, 4-dioxane-degrading bacterium", Genome Announcement, 5, e01240-17.
- [84] Derosa C. T., Wilbur S., Holler J., Richter P., Stevens Y. W., (1996), "Health evaluation of 1, 4-dioxane", Toxicology and Industrial Health, 12, 1–43.
- [85] He Y., Mathieu J., Da Silva M. L., Li M., Alvarez P. J., (2018), "1, 4-Dioxane-degrading consortia can be enriched from uncontaminated soils: prevalence of *Mycobacterium* and soluble di-iron monooxygenase genes", Microbial Biotechnology, 11, 189–198.
- [86] Hamill D. B., Cotter J. J., (2018), "Compositions and methods for activation and overexpression of secondary metabolites in microorganisms", Google Patents.
- [87] Yushchuk O., Binda E., Marinelli F., (2020), "Glycopeptide antibiotic resistance genes: distribution and function in the producer actinomycetes", Frontiers in Microbiology, 11.
- [88] Sayed A. M., Abdel-Wahab N. M., Hassan H. M., Abdelmohsen U. R., (2020), "*Saccharopolyspora*: an underexplored source for bioactive natural products", Journal of Applied Microbiology, 128, 314–329.
- [89] Zhao W., Zhong Y. I., Yuan H., Wang J., Zheng H., Wang Y., (2010), "Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism", Cell Research, 20, 1096–1108.
- [90] Mangamuri U. K., Muvva V., Poda S., Chitturi B., Yenamandra V., (2016), "Bioactive natural products from *Pseudonocardia endophytica* VUK-10", Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 14, 261–267.

- [91] Braña A. F., Sarmiento-Vizcaíno A., Pérez-Victoria I., Otero L., Fernández J., Palacios J.J., (2017), “Vicente, Branimycins B and C, antibiotics produced by the abyssal actinobacterium *Pseudonocardia carboxydivorans* M-227”, *Journal of Natural Products*, 80, 569–573.
- [92] Mangamuri U. K., Vijayalakshmi M., Poda S., Manavathi B., Bhujangarao C., Venkateswarlu Y., (2015), “Bioactive metabolites produced by *Pseudonocardia endophytica* VUK-10 from mangrove sediments: isolation, chemical structure determination and bioactivity”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 629–636.
- [93] Dekker K. A., Inagaki T., Gootz T. D., Huang L. H., Kojima Y., Kohlbrenner W. E., (1998), “New Quinolone compounds from *Pseudonocardia* sp. with selective and potent anti-*Helicobacter pylori* activity”, *Journal of Antibiotics*, 51, 145–152.
- [94] Pupo M. T., Currie C. R., Clardy J., (2017), “Microbial symbionts of insects are the focus of the first international cooperative biodiversity group (ICBG) in Brazil”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28, 393–401.
- [95] Kim H. J., Kang S. H., Choi S. S., Kim E. S., (2017), “Redesign of antifungal polyene glycosylation: engineered biosynthesis of disaccharide-modified NPP”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 5131–5137.
- [96] Van Arnem, E. B., Currie C. R., Clardy J., (2018), “Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses”, *Chemical Society Reviews*, 47, 1638–1651.
- [97] Won H. J., Kim H. J., Jang J. Y., Kang S. H., Choi S. S., Kim E. S., (2017), “Improved recovery and biological activities of an engineered polyene NPP analogue in *Pseudonocardia autotrophica*”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44, 1293–1299.
- [98] Maskey R. P., Kock I., Helmke E., Laatsch H., (2003), “Isolation and structure determination of phenazostatin D, a new phenazine from a marine actinomycete isolate *Pseudonocardia* sp. B6273”, *Zeitschrift für Naturforschung B*, 58, 692–694.
- [99] Luo J., Jiang F., Fang W., Lu Q., (2017), “Optimization of bioconversion conditions for vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D using *Pseudonocardia autotrophica* CGMCC5098”, *Biocatalysis and Biotransformation*, 35, 11–18.
- [100] Mangamuri U. K., Muvva V., Poda S., Manavathi B., Bhujangarao C., Yenamandra V., (2016), “Chemical characterization and bioactivity of diketopiperazine derivatives from the mangrove derived *Pseudonocardia endophytica*”, *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42, 169–175.
- [101] Zhang X. M., Zhang D. F., Li W. J., Lu C. H., (2016), “Pseudonocardides A-G, new γ -butyrolactones from marine-derived *Pseudonocardia* sp. YIM M13669”, *Helvetica Chimica Acta*, 99, 191–196.

- [102] Wu Q., Chen J., Li X., Chen S., Wang H., (2017), “Advances in antimicrobial natural products derived from marine actinomycetes”, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 14, 501–515.
- [103] Barke J., Seipke R. F., Grüşchow S., Heavens D., Drou N., Bibb M. J., (2010), “A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*”, *BMC Biology*, 8, 109.
- [104] Sit C. S., Ruzzini A. C., Van Arnem E. B., Ramadhar T. R., Currie C. R., Clardy J., (2015), “Variable genetic architectures produce virtually identical molecules in bacterial symbionts of fungus-growing ants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 13150–13154.
- [105] Kim H. J., Han C. Y., Park J. S., Oh S. H., Kang S. H., Choi S. S., (2018), “Nystatin-like *Pseudonocardia* polyene B1, a novel disaccharide-containing antifungal heptaene antibiotic”, *Scientific Reports*, 8, 13584.
- [106] Zhong F. L., Dong W. W., Wu S., Jiang J., Yang D. C., Li D., (2016), “Biotransformation of gypenoside XVII to compound K by a recombinant β -glucosidase”, *Biotechnology Letters*, 38, 1187–1193.
- [107] Challinor V. L., Bode H. B., (2015), “Bioactive natural products from novel microbial sources”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 82–97.
- [108] Lee M. J., Kong D., Han K., Sherman D. H., Bai L., Deng Z., Lin S., Kim E. S., (2012), “Structural analysis and biosynthetic engineering of a solubility-improved and less-hemolytic nystatin-like polyene in *Pseudonocardia autotrophica*”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), 157–168.
- [109] Saikia J., Mazumdar R., Thakur D., (2022), “Phylogenetic affiliation of endophytic actinobacteria associated with selected orchid species and their role in growth promotion and suppression of phytopathogens”, *Frontiers in Plant Science*, 13, 1058867.
- [110] Tamura K., Stecher G., Kumar S., (2021), “MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11.”, *Molecular Biology and Evolution*, 38: 3022–3027.
- [111] Yoon S. H., Ha S. M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J., (2017), “Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies.”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:1613–1617.
- [112] Hur M., Park S. J., (2019), “Identification of Microbial Profiles in Heavy-Metal-Contaminated Soil from Full-Length 16S RRNA Reads Sequenced by a PacBio System”, *Microorganisms*, 7, 357.

- [113] Álvarez A., Catalano S. A., Amoroso M. J., (2013), "Heavy Metal Resistant Strains are Widespread along Streptomyces Phylogeny", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 1083–1088.
- [114] Frankovská J., Slaninka I., Kordík J., Jurkovič L., Greif V., Šottník P., Dananaj I., Mikita S., Dercová K., Jánová V., (2010), "Atlas Sanačných Metód Environmentálnych Zátiaží", Štátny Geologický Ústav Dionýza Štúra: Bratislava, Slovakia.
- [115] Hill T.W., Käfer E., (2001) "Improved Protocols for *Aspergillus* Medium: Trace Elements and Minimum Medium Salt Stock Solutions", *Fungal Genet Newslett*, 48:20–21.
- [116] Beever R.E., Bollard E.G., (1970), "The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract", *The Journal of General Microbiology*, 60; 273–279.
- [117] Miller G. L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical chemistry*, 31 (3), 426–428.
- [118] Nikou M. M., Ramezani M., Harirchi S., Makzoom S., Amoozegar M. A., Sa S.F., (2017), "*Salinifilum* gen. nov., with description of *Salinifilum proteinilyticum* sp. nov., an extremely halophilic actinomycete isolated from Meighan wetland, Iran, and reclassification of *Saccharopolyspora aidingensis* as *Salinifilum aidingensis* comb. nov. and *Saccharopolyspora ghardaiensis* as *Salinifilum ghardaiensis* comb. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67;4221–4227.
- [119] Tyc O., Song C., Dickschat J. S., Vos M., Garbeva, P., (2017) "The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria", *Trends in Microbiology*, 25;280–292.
- [120] Li H., Sosa-Calvo J., Horn H. A., Pupo M. T., Clardy J., Rabeling C., (2018), "Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115;10720–10725.
- [121] Schultz T. R., Brady S., (2008), "Major evolutionary transitions in ant agriculture", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105;5435–5440.
- [122] Ison J., Kalas M., Jonassen I., Bolser D., Uludag M., McWilliam H., Malone J., Lopez R., Pettifer S., Rice P., "EDAM: an ontology of bioinformatics operations, types of data and identifiers, topics and formats" *Bioinformatics*, 5;29(10):1325–32.
- [123] Kanehisa M., Goto S., (2000), "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes", *Nucleic Acids Research*, Volume 28, Issue 1, Pages 27–30.
- [124] Navarro-Martínez A., Corominas N., De Baranda C. S., Escudero-Jiménez Á., Galán-Ros J., Sáez-Nieto J. A., (2017), "*Pseudonocardia carboxydvorans* in

human cerebrospinal fluid: a case report in a patient with traumatic brain injury”, BMC Infectious Diseases, 17, 472.

- [125] Asdamongkol N., Eswas C., Wongsuk T., Santanirand P., Wattanatrano D., Kiertiburanakul S., (2012), “*Pseudonocardia oroxyli* suppurative sialadenitis: the first case report in human infection”, International Journal of Infectious Diseases, 16, e247.
- [126] Geddis S. M., Carro Santos L., Hodgkinson J. T., Spring D. R., (2016), “Divergent synthesis of Quinolone natural products from *Pseudonocardia* sp. CL38489”, European Journal of Organic Chemistry.
- [127] Türkcan O., Ökmen G., (2012), “Mikrobiyal Karotenoidler”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5(1):115-122.
- [128] Türkcan O., Ökmen G., (2013), “Gıdalarda Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Pigmentler”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2):56-68.
- [129] Erdoğan A., Conk Dalay M., Ötleş S., (2015), “Sudan Gelen Sağlık: Mikroalgal Karotenoidler”, Dünya Gıda Dergisi.
- [130] Selvam K., Vishnupriya B., Subhash Chandra Bose V., (2011), “Screening and Quantification of Marine Actinomycetes Producing Industrial Enzymes Amylase, Cellulase and Lipase from South Coast of India”, International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 2(5):1481-1487.
- [131] Ratnakomala S., Perwitasari U., Yopi, (2020), OP Conference Series: Earth and Environmental Science, 439, 012019.
- [132] Rothstein D. M., Devlin P. E., Cate R. L., (1986), “Expression of alpha-amylase in *Bacillus licheniformis*”, Journal of Bacteriology, 168(2), 839–842.
- [133] Jafari N., Behrooz R., Farajzadeh D., Farsi M., Akbari-Noghabi K., (2014), “Antibacterial activity of *Pseudonocardia* sp. JB05, a rare salty soil actinomycete against *Staphylococcus aureus*”, BioMed Research International, 182945.
- [134] Savaş Ü., (2010), “Çok kopyalı polifosfat kinaz ve ekzopolifosfataz genlerinin potansiyel ekspresyonunun *Streptomyces coelicolor*'ın ağır metal toleransına ve fosfat depolamasına etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [135] Ahmad I., Hayat S., Ahmad A., Inam A., Samiullah, (2005), “Effect of heavy metal on survival of certain groups of indigenous soil microbial population”, Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 9(1), 115- 121.
- [136] Presentato A., Piacenza E., Turner R. J., Zannoni D., Cappelletti M., (2020), “Processing of Metals and Metalloids by Actinobacteria: Cell Resistance Mechanisms and Synthesis of Metal(loid)-Based Nanostructures”, Microorganisms, 8(12), 2027.

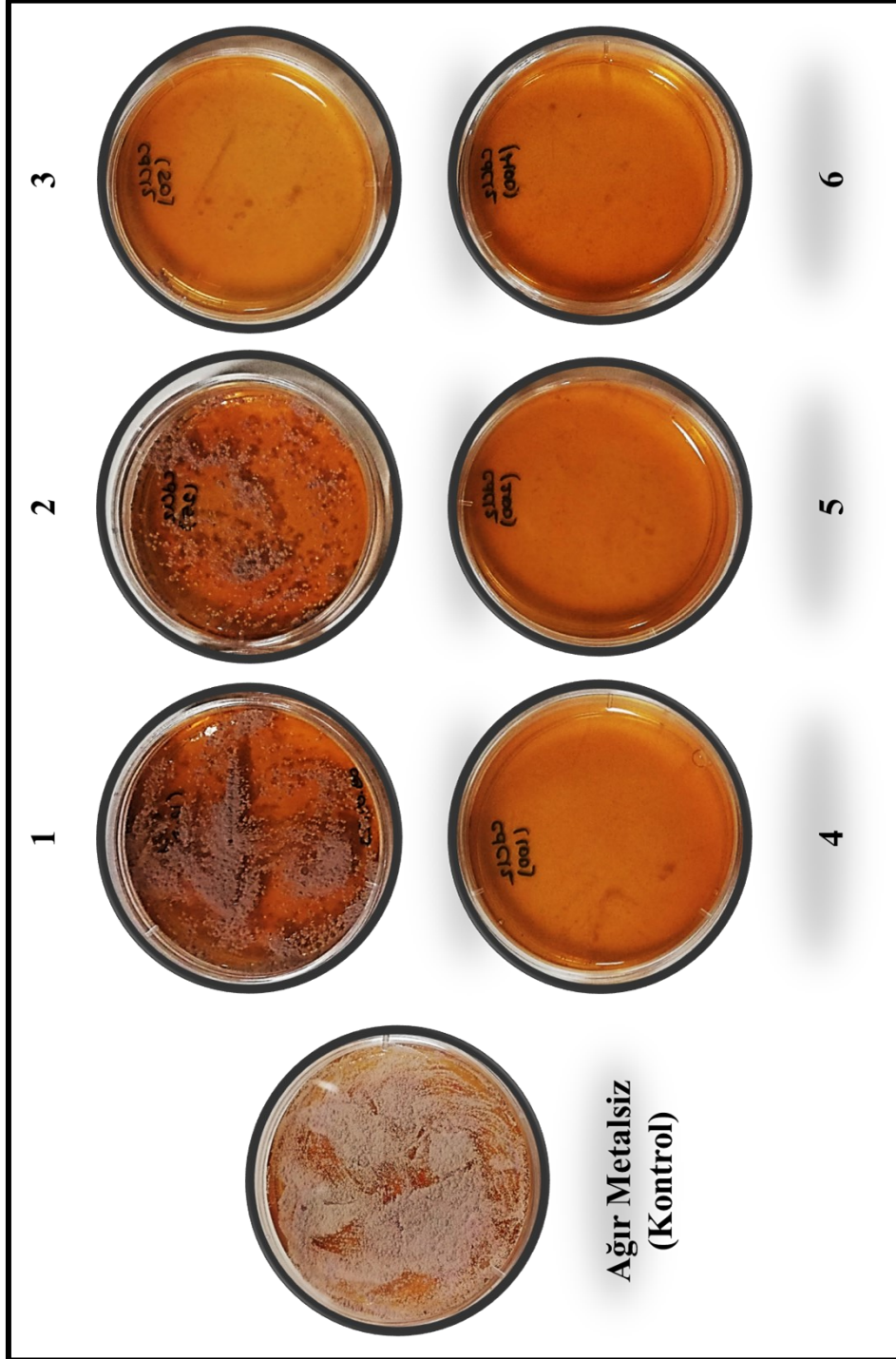
- [137] Nishino H., Murakoshi M., Tokuda H., Satomi Y., (2009) “Cancer prevention by carotenoids”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483:165-8.
- [138] Delgado-Vargas F, Jiménez A. R., Paredes-López O., (2000), “Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains-Characteristics, biosynthesis, processing, and stability”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40:173-289.
- [139] Stahl W., Sies H., (2003), “Antioxidant activity of carotenoids”, *Molecular Aspects of Medicine*, 24:345-51.
- [140] Manzocco L., Nicoli M.C., (2015), “Surface Processing: Existing and Potential Applications of Ultraviolet Light”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 469-484.
- [141] Grossman D., Leffell D., (1997), *Archives of Dermatological Research*, 13:1263–1270.
- [142] Goodsell D. S., (2001), *The Oncologist*, 6, (Cooper, 2000): 298–299.
- [143] Cooper G. M., (2000), “DNA Repair; in *The Cell: A Molecular Approach*”, 2. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- [144] Quek P. H., Hu J., (2008), “Indicators for photoreactivation and dark repair studies following ultraviolet disinfection”, *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 533-541.
- [145] Warnecke F., Sommaruga R., Sekar R., Hofer J. S., Pernthaler J., (2005), “Abundances, identity, and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5551–5559.
- [146] Priest F. G., Goodfellow C. T., Todd C. A., (1988), “A numerical classification of the Genus *Bacillus*”, *The Journal of General Microbiology*, 134:1847-1882.
- [147] Shirling E. T., Gottlieb D., (1966), “Methods for characterization of *Streptomyces* species”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16:313–340.
- [148] Haba E., Espuny M. J., Busquets M., Manresa A., (2000), “Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils”, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 379-387.
- [149] Frazier W. C., Ripp P., (1928), *Journal of Bacteriology*, 16: 57.
- [150] Andrady A. L., (2003), “The plastic in the environment: degradation and its implications”, In *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 358:1438, 1719-1726, The Royal Society.

ÖZGEÇMİŞ

Kevser Sanhueza GÜREŞEN, 2019 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde lisans eğitimini bölüm birincisi olarak tamamladıktan sonra 2020 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Eğitim süresi boyunca 2210-A TÜBİTAK BİDEB bursu dahil olmak üzere çeşitli başarı bursları kazandı.

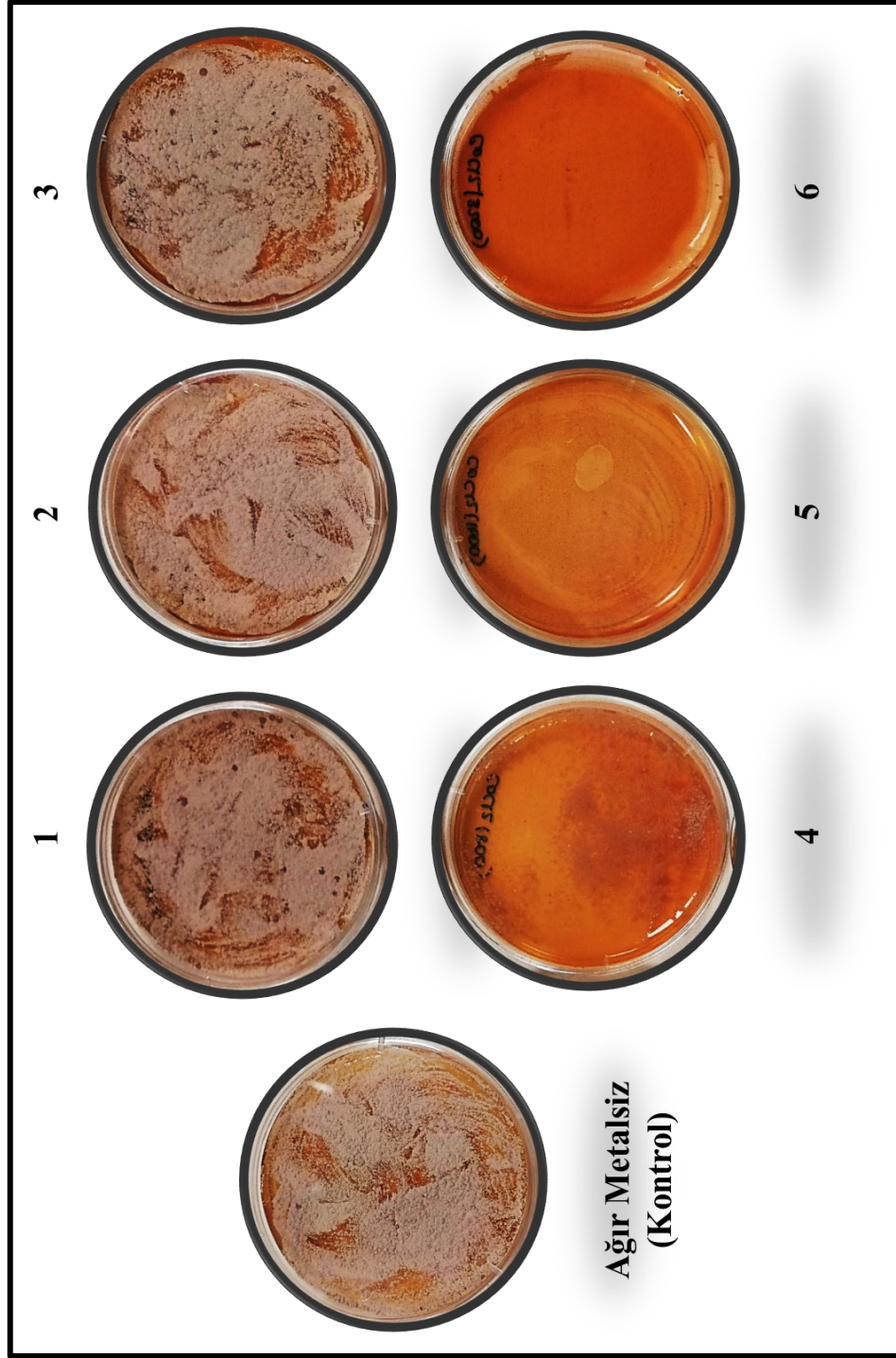
EKLER

Ek A: Ağır Metal Dirençliliği Deney Sonuçları



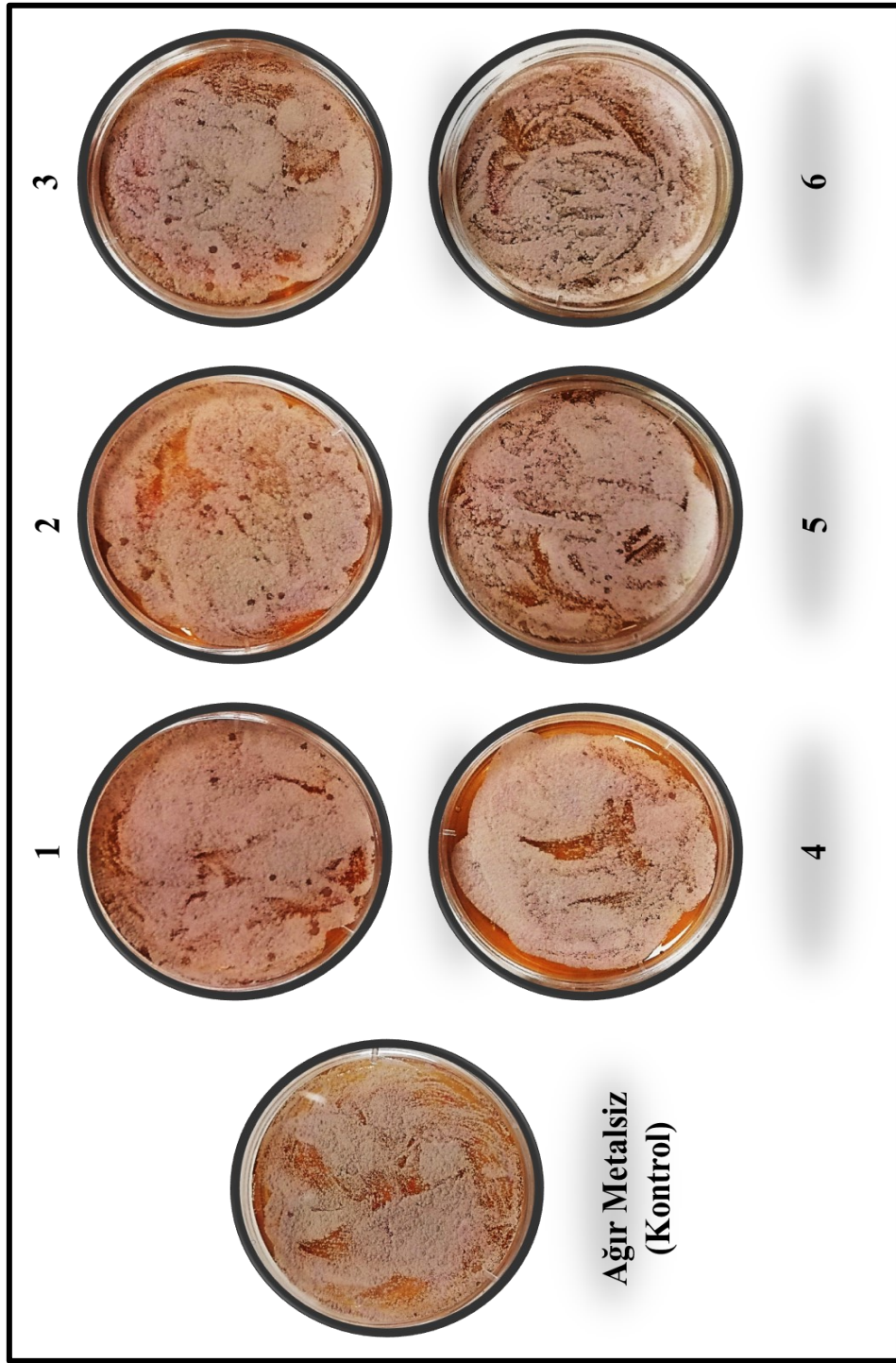
Şekil A1: *Pseudonocardia* izolatının CdCl_2 'a direnci.

1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaraları sırasıyla 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarını ifade etmektedir.



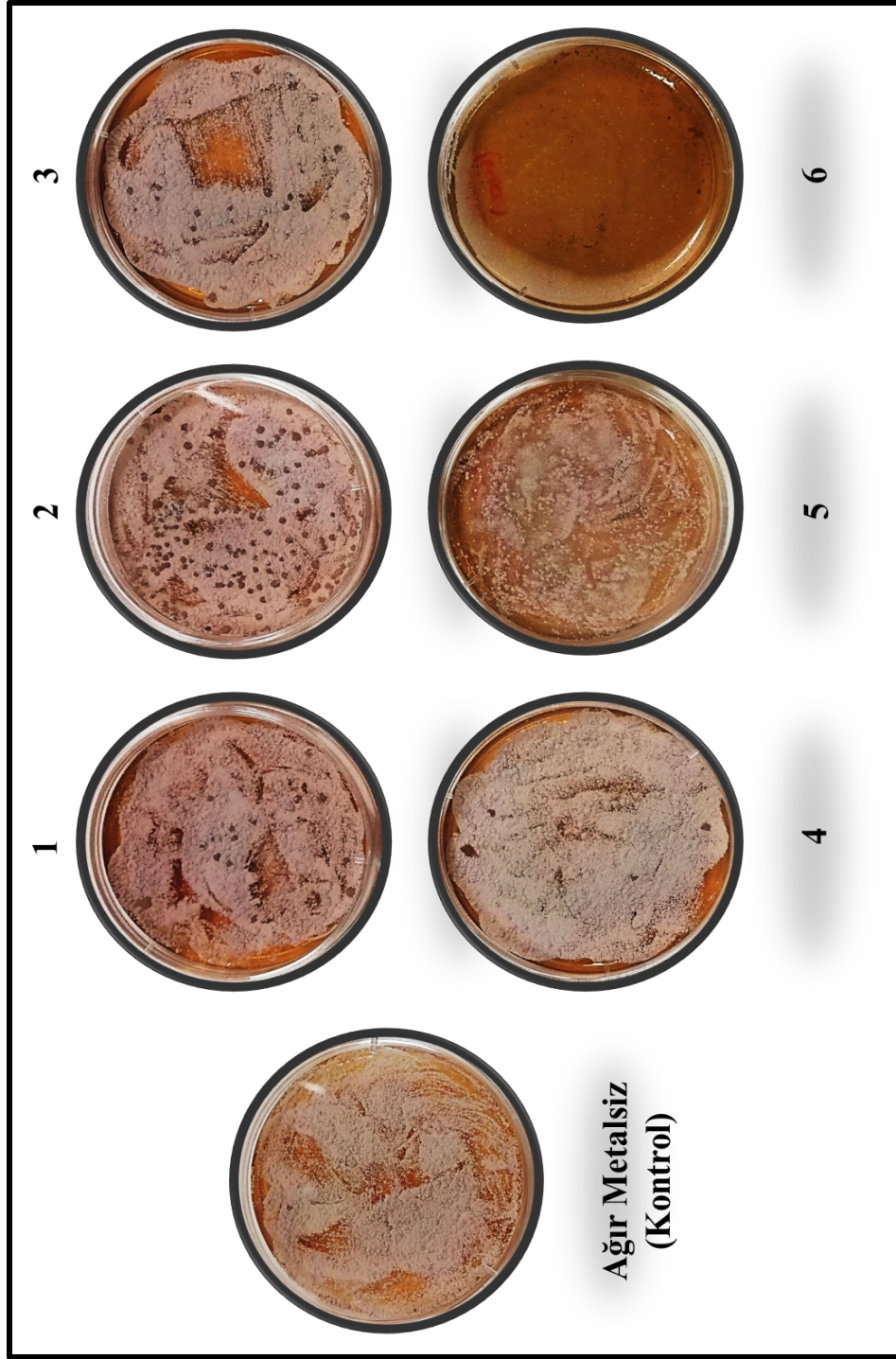
Şekil A2: *Pseudonocardia* izolatının CoCl_2 'a direnci.

1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaraları sırasıyla 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarını ifade etmektedir.



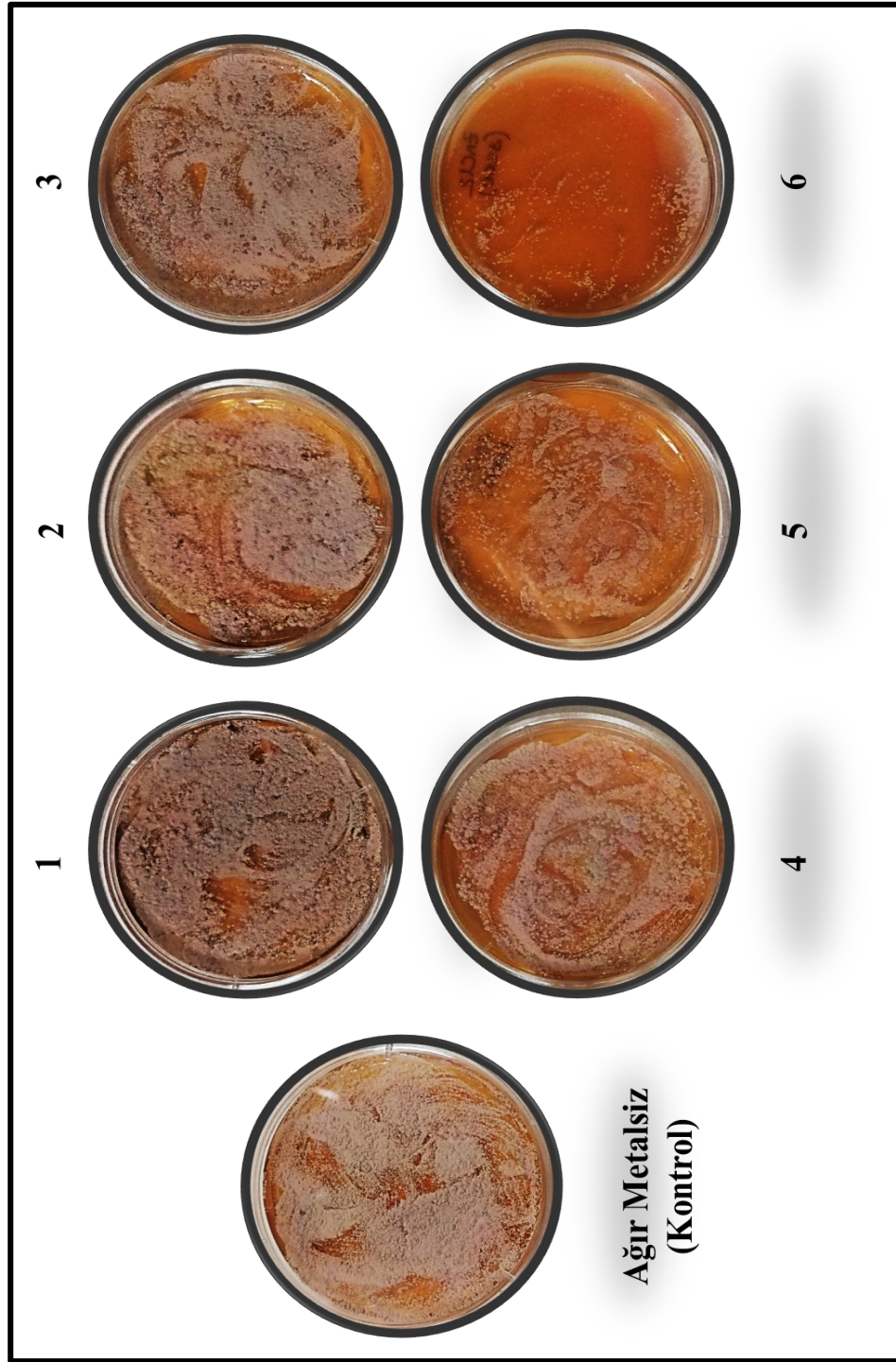
Şekil A3: *Pseudonocardia* izolatının CrCl_2 'a direnci.

1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaraları sırasıyla 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarını ifade etmektedir.



Şekil A4: *Pseudonocardia* izolatının CuCl_2 'a direnci.

1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaraları sırasıyla 200, 400, 800, 1600, 3200 ve 6400 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarını ifade etmektedir.



Şekil A5: *Pseudonocardia* izolatının $ZnCl_2$ 'a direnci.

1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaraları sırasıyla 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarını ifade etmektedir.



Şekil A6: *Pseudonocardia* izolatının $Pb(NO_3)_2$ 'a direnci.
1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaraları sırasıyla 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarını ifade etmektedir.