



GİRESUN
ÜNİVERSİTESİ



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CYSTOSEIRA* SP. KOMPOSTUNDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERİN ENZİM VE ANTİBAKTERİYEL
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI
Yüksek Lisans Tezi**

**Zeynep Şule TOPATAN
20142102016
Haziran 2018**

GİRESUN

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CYSTOSEIRA* SP. KOMPOSTUNDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERİN ENZİM VE ANTİBAKTERİYEL
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Şule TOPATAN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hatice KATI

Haziran 2018

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CYSTOSEIRA SP. KOMPOSTUNDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERİN ENZİM VE ANTİBAKTERİYEL
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Şule TOPATAN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 29/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr.
Mustafa TÜRKMEN
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.
Hatice KATI
Üye**

**Prof. Dr.
Remziye NALÇACIOĞLU
Üye**

**Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Zeynep Şule TOPATAN

29/06/2018

TEŞEKKÜR

Tez çalışma konumun belirlenmesi, tezimin yürütülmesi ve her aşamasında bana rehber olan, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum, disiplini ve hoşgörüsü ile her zaman örnek alacağım Sayın Hocam Prof. Dr. Hatice KATI 'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans sürecimin başında bana ilk desteği vererek her zaman yanımda olan Sayın Hocam Prof. Dr. Mustafa TÜRKMEN 'e teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen sevgili babam Halil TOPATAN'a, sevgili annem Hatice Sevil TOPATAN'a ve sevgili kardeşlerime, ayrıca laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının bir bölümü, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenmiştir. Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: FEN-BAP-A-140316-52) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Aktinomisetler	2
1.1.1. Aktinomisetlerin Tarihçesi.....	3
1.1.2. Aktinomisetlerin Morfolojisi ve Fizyolojisi	3
1.1.3. Aktinomisetlerin Ekolojisi.....	6
1.1.4. Toprak Aktinomisetleri.....	6
1.1.5. Deniz Kaynaklı Aktinomisetler	6
1.2. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması	7
1.2.1. <i>Streptomyces</i> Türleri.....	8
1.3. Aktinomisetlerin Ürettiği Bileşikler	11
1.3.1. Antibakteriyel Bileşikler.....	12
1.3.1.1. Antibiyotik.....	12
1.3.2. Aktinomisetlerin Ürettiği Enzimler	14
1.4. <i>Cystoseira</i> sp.	16
1.5. Alg Kompostu.....	17
BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ	19

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Kompost Örnekleri	22
3.1.2. Test Mikroorganizmaları	22
3.1.3. Kullanılan Besiyerler.....	23
3.1.4. Gram Boyama İşleminde Kullanılan Boyalar	28
3.1.5. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar	29
3.1.6. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler	30
3.2. Yöntem.	30
3.2.1. Aktinomiset İzolasyonu	30
3.2.1.1. İzolatların Saflaştırılması ve Saf Kültürlerin Stoklanması.....	31
3.2.2. İzolatların Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi	31
3.2.3. İzolatların Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi	31
3.2.3.1. Karşıt Çizgi	31
3.2.3.2. Nokta Ekimi	32
3.2.3.3. Disk Difüzyon	33
3.2.4. Bazı Aktinomiset İzolatlarının Tanımlanması.....	33
3.2.4.1. Morfolojik Tanımlama	33
3.2.4.2. Fiziksel Tanımlama	34
3.2.4.3. Moleküler Tanımlama	35
3.2.4.3.1. DNA İzolasyonu.....	35
3.2.4.3.2. 16S rDNA PCR Çalışmaları.....	36
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI	37
4.1. Aktinomiset İzolatları	37
4.2. İzolatların Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi	39
4.3. İzolatların Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi	43
4.3.1. Karşıt Çizgi.....	43
4.3.2. Nokta Ekimi	47
4.3.3. Disk Difüzyon	48
4.4. Aktinomiset İzolatlarının Tanımlanması	48
4.4.1. Morfolojik Tanımlama.....	48

4.4.2. Fiziksel Tanımlama	51
4.4.3. Moleküler Tanımlama	54
 BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	 56
 KAYNAKLAR.....	 63
ÖZGEÇMİŞ.	72

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat derece
ATCC	: American Type Culture Collection
BSC	: Black Sea <i>Cystoseira</i>
CMC	: Carboxymethylcellulose
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetrasetik asit
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molarite
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
µm	: Mikrometre
NA	: Nutrient Agar
NB	: Nutrient Broth
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribosomal Deoksiribonükleik asit
rpm	: (Revolution Per minute) Dakikadaki devir sayısı
SCA	: Starch Casein Agar
V	: Volt
w/v	: Ağırlık/Hacim

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Flamantöz (miselyum) hücre yapısını gösteren <i>Nocardia</i> cinsinden bir aktinomiset kolonisi.	4
Şekil 1.2. Aktinomisetlerin spor taşıyan yapılarının fotomikrografı.	5
Şekil 1.3. Spor keseleri içinde spor üretimi	5
Şekil 1.4. <i>Streptomyces</i> yaşam döngüsü	9
Şekil 1.5. <i>Streptomyces</i> cinsine ait uzun zincirlerde spor üretimi.....	11
Şekil 1.6. <i>Cystoseira</i> sp. tür örneği (A), <i>Cystoseira</i> cinsinin yapıları (B)	16
Şekil 3.1. <i>Cystoseira</i> sp. kompost örnekleri.....	22
Şekil 3.2. Karşıt çizgi yöntemi.	32
Şekil 4.1. Seri dilüsyon sonucu oluşan aktinomiset izolatlarının petrideki toplam görüntüsü.....	37
Şekil 4.2. Bazı BSC izolatlarının petri görüntüleri.	38
Şekil 4.3. Bazı izolatların enzim aktivite görüntüleri.	42
Şekil 4.4. Bazı aktinomiset izolatlarının karşıt çizgi yöntemiyle aktibakteriyel aktivite petri görüntüleri.....	46
Şekil 4.5. Nokta ekim yöntemi aktivite testine ait bazı petri görüntüleri.	47
Şekil 4.6. <i>Staphylococcus aureus</i> test bakterisine karşı BSC-37 nolu izolatın fermentasyon besiyerinde 6., 8., 10. ve 17. günlere kadar çoğaltılmış nünunelerinin göstermiş olduğu antibakteriyel aktivitesi.	48
Şekil 4.7. İzolatların petri ve koloni görüntüleri.....	49
Şekil 4.8. İzolatların Gram boyama sonuçlarının ışık mikroskobu görüntüleri	50
Şekil 4.9. İzolatların cover slip yöntemi ile spor zincir morfolojileri.....	51
Şekil 4.10. İzolatların sıcaklık toleranslarının petri görüntüleri.	53
Şekil 4.11. İzolatların pH toleranslarının petri görüntüleri.....	53
Şekil 4.12. İzolatların tuz toleranslarının petri görüntüleri.....	54

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.2. <i>Streptomyces</i> 'lerin ürettiği antibiyotikler	14
Tablo 3.1. Kullanılan test bakterileri.....	23
Tablo 4.1. BSC izolatlarının enzim içerikleri.	39
Tablo 4.2. BSC izolatlarının antibakteriyel aktivite sonuçları.....	43
Tablo 4.3. Nokta ekim yöntemi ile BSC-13, BSC-37 ve BSC-38 nolu izolatların antibakteriyel aktivite sonuçları.	47
Tablo 4.4. Bazı İzolatların sıcaklık toleransları.	52
Tablo 4.5. Bazı izolatların pH toleransları.	52
Tablo 4.6. Bazı izolatların tuz toleransları.	52
Tablo 4.7. Yüksek aktivite gösteren BSC izolatlarının 16S rDNA analiz sonuçlarına göre benzediği bakteriler.....	55

CYSTOSEIRA SP. KOMPOSTUNDAN İZOLE EDİLEN AKTİNOMİSETLERİN ENZİM VE ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Aktinomisetler, GC baz içeriği yüksek, filamentli ve Gram pozitif bakterilerdir. Bu bakteri grubu sekonder metabolitlerden enzim ve antibakteriyel maddeler gibi önemli bileşikler üretirler. Yüksek ticari değere sahip olan bu bileşikler farklı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, *Cystoseira* sp. alg kompostundan izole edilen aktinomiset izolatlarının enzim ve antibakteriyel aktiviteleri araştırıldı. Yüksek enzim ve antibakteriyel aktivite gösteren 6 aktinomiset izolatının morfolojik ve fizyolojik karakterizasyonu ile 16S rDNA dizi analizine göre moleküler tanımlaması yapıldı.

Kompost örneklerinden toplamda 73 tane aktinomiset izolatı (BSC) izole edildi. Aktinomiset izolatlarının enzim aktivite sonuçları değerlendirildiğinde %68,5'i amilaz, %100'ü selülaz, %47,9'u kitinaz, %94,5'i pektinaz, %98,6'sı proteaz ve %96,3'ü lipaz/esteraz enzim aktivitesi gösterdiği bulundu. Antibakteriyel aktivite deney sonuçları, izolatların %98,6'sı *Staphylococcus aureus*'a ve %84,9'u *Enterococcus faecalis*'e karşı çok yüksek aktivite gösterdi. Yüksek enzim ve antibakteriyel aktivite gösteren aktinomiset izolatlarının (BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49) 16S rDNA dizi analizlerine göre *Streptomyces* cinsine ait oldukları belirlendi.

Anahtar kelimeler: Aktinomiset, antibakteriyel, enzim, kompost, *Cystoseira*

INVESTIGATION OF ENZYME AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM *CYSTOSEIRA* SP. COMPOST

SUMMARY

Actinomycetes are GC base content high, filamentous and Gram positive bacteria. This bacterial group produces important compounds such as enzyme and antibacterial substances among secondary metabolites. These compounds, which have high commercial value, are used in various industrial areas.

In this study, enzymes and antibacterial activities of actinomycetes isolated from *Cystoseira* sp. algae compost were investigated. The morphological and physiological characterization of 6 actinomycetes isolates which shows high enzyme and antibacterial activity was performed as well as molecular identification according to 16S rDNA sequence analysis.

A total of 73 actinomycetes isolates (BSC) were isolated from the compost samples. When the enzyme activity results of actinomycetes isolates were evaluated, it is found that 68,5% of these have amylase, 100% have cellulase, 47,9% have chitinase, 94,5% have pectinase, 98,6% have protease and 96,3% have lipase/esterase enzyme activities. Results of antibacterial activity assay showed that 98,6% of the isolates had very high activity on *Staphylococcus aureus*, 84,9% of the isolates had very high activity on *Enterococcus faecalis*. It has been determined that the actinomycetes isolates (BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 and BSC-49) showing high enzyme and antibacterial activity belong to *Streptomyces* genus according to 16S rDNA sequence analysis.

Keywords: Actinomycetes, antibacterial, enzyme, compost, *Cystoseira*

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Deniz ortamı, aktinomiset bakterileri için önemli biyolojik ve kimyasal çeşitliliğe sahip benzersiz zengin bir kaynaktır. Deniz kaynaklı aktinomisetler, yapısal olarak çeşitlilik gösteren sekonder metabolitlerin kaynağı olmuştur. Bu bileşiklerin birçoğunun antikanser özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Denizel kaynaklardan elde edilen antrasimisin gibi umut verici antibiyotikler, denizleri daha da keşfetmek için önemli motivasyon sağlamaktadır (Hassan ve ark., 2015).

Yeni antibiyotiklerin üretimi için mikroorganizmaların taranması, bilim adamları tarafından yıllarca yoğun bir şekilde devam etmiştir ve aktinomisetlerden, antibiyotikler gibi biyolojik olarak aktif birçok sekonder metabolit elde edilmiştir. Bu bileşiklerin antibiyotik ağırlıklı olması ticari açıdan önemlidir (Oskay ve ark., 2004).

Mikroorganizmalar sekonder bileşikler olarak yalnızca antibiyotik üretmemektedirler. Günümüze kadar birçok anti-kanserojen, immün baskılayıcı, anti-viral gibi değişik aktiviteye sahip birçok madde üretilmiştir (Özcan, 2012). Bu maddelerden aktinomisetler, herbisitler, böcek öldürücü ilaçlar, anti-parazitik maddeler ve atık arıtımında kullanılan selüloz ve ksilanaz gibi sekonder metabolitler üretirler (Oskay ve ark., 2004). Aktinomisetler kitin, selüloz gibi diğer birçok mikroorganizma tarafından metabolize edilemeyen organik materyalleri, içerdikleri ekstraselüler enzimler sayesinde hidrolize etme yeteneğine sahiptirler. Bu özellikleri ile topraktaki besinlerin dekompozisyon ve minerilizasyon döngülerinde önemlidir (Liman, 2007).

Aktinomisetler, çoğu aerobik olan ve basit beslenme gereksinimine sahip, Guanin+Sitozin (GC) içeriği yüksek olan (>%55) Gram (+) bakterilerdir (Lacey, 1997). Ayrıca aktinomisetler, tarım, biyoteknoloji ve klinikte kullandığımız

antibiyotiklerin çoğunluğu da dahil olmak üzere, tıpla ilgili çok sayıda doğal ürün üreten çeşitli filamentli bakterilerin bir ailesidir (Meij ve ark., 2017).

Aktinomisetler doğada en yaygın bulunan mikroorganizma gruplarıdır. Çoğu durumda, özellikle kuru alkalın koşullar altında, toprağın mikrobiyal popülasyonunun büyük bir kısmını oluşturur (Oskay ve ark. 2004). Hatta birçok aktinomiset, diğer bitkiler, mantarlar, böcekler ve süngerler ile birlikte simbiyoz yaşamaktadır. Bu organizmalar aktinomisetler tarafından üretilen doğal ürünler ve enzimlerden, örneğin patojenik mikroplara karşı korunma, büyüme teşviki veya lignoselüloz gibi kompleks doğal polimerlerin dekompozisyonundan yararlanmaktadır (Meij ve ark., 2017).

Topraktaki ve diğer karasal aktinomisetlerden, 1940'lerden günümüze kadar çok fazla aktif bileşik elde edilmiştir ve bu bileşiklerin %70-80'i *Streptomyces* cinsi tarafından üretilmektedir (Özcan, 2012). *Streptomyces* cinsi doğal habitatlarda bakteriyel ve fungal rakiplerine karşı rekabet edebilmelerini sağlayan birçok antimikrobiyal bileşik üretme yeteneğine sahiptir (Thompson ve ark., 2002). *Streptomyces* cinsinin 100,000 civarında antimikrobiyal bileşik üretme kapasitesinden çok az bir kısmı tanımlanabilmiştir (Watve ve ark., 2001).

1.1. Aktinomisetler

Aktinomiset terimi aktis (ışın demeti), mykes (mantar) sözcüklerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur ve bu terim aktinomisetlerin morfolojileri dikkate alınarak verilmiştir (Embley ve Stackebrandt 1994). Aktinomisetler, morfolojik ve fizyolojik çeşitliliğe sahip çoğu aerobik olan mikroorganizmalardır (Suihko ve ark., 2006). Genomlarının guanin + sitozin (GC) içeriği açısından, Gram pozitif bakteriler düşük ve yüksek GC içeriği olarak ikiye ayrılırlar. Düşük GC içeren Gram pozitif bakteriler için *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* örnekler verilirken, yüksek GC içeren Gram pozitif bakterilere aktinomisetler örnektir (Keiser ve ark., 2000).

1.1.1. Aktinomisetlerin Tarihçesi

Actinomyces cinsi 1877’de Harz’ın sığırlarda aktinomikoz hastalığına neden olan *Actinomyces bovis* adındaki mikroorganizmayı keşfetmesiyle tanımlanmıştır (Whitman ve ark., 2012). 1943’te Waksman ve Henrici, Harz tarafından sığırlarda görülen bu mikroorganizmanın o günün (1877) standartlarına göre yapılan tanımlamasının çok yetersiz olmasından tanımlanamayacağını belirtmiştir. Bununla birlikte *Actinomyces* adı, 1943 yılı standartlarına göre tanımlanabilen aerobik ve spor oluşturan türlere uygulanan ilk isim olmuştur (Waksman ve Henrici, 1943).

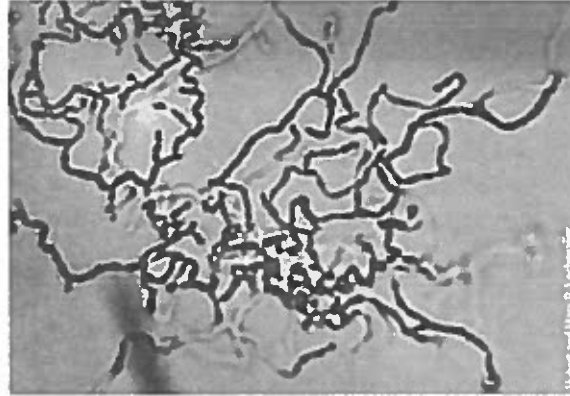
1.1.2. Aktinomisetlerin Morfolojisi ve Fizyolojisi

Aktinomisetlerin morfolojileri, organizmanın yapısına, ortamın yapısına, büyüme koşullarına, büyümeyi destekleyen ya da engelleyen maddelerin varlığına bağlıdır (Lacey ve Lacey, 1964).

Aktinomisetlerin kültür ortamındaki büyüme ve reaksiyonları, türlerin karakterizasyonu için kullanılan en yaygın yöntemdir. Bununla birlikte, farklı türler arasında büyük bir benzerlik vardır. Bu benzerlikleri ayırt etmede kullanılan en önemli kültürel özelliklerinden biri pigment üretimidir. Hem sentetik hem de organik ortamlarda üretilen pigmentler dikkate alınmaktadır. Sentetik ortamlarda, birçok pigment üretilir; bu ister vejetatif veya hava miselyumunda olsun, ister ortam içinde çözünmüş pigment olsun birçok türün tanımlanmasını sağlar. Bu pigmentler, kültürün yaşam süresi ve büyüme koşullarıyla büyük ölçüde değişiklik gösterir (Waksman, 1950).

Aktinomiset kolonileri sıvı ortamda ve agar besiyerinde kümeler halinde büyür. Sıvı kültürde büyümeleri diğer bakteri gruplarından farklı olarak ortamı bulandırmaz. Koloni morfolojileri çok çeşitlidir. Kullanılan besiyeri içeriğine ve inkübasyon süresine göre de koloni renkleri değişmektedir. Pembe, yeşil, beyaz, krem, gri, mavi ve siyah gibi farklı renklerde kolonilere rastlamak mümkündür (Waksman, 1989).

Aktinomisetler kültüre edildikleri ortam üzerinde substrat ve havasal misel oluştururlar. Aktinomisetlerde yaygın olarak sadece substrat miseli oluşumu gözlenirken sadece havasal misel oluşturanlara da rastlanmaktadır. Misel çeşidi koloni morfolojisini etkilemektedir. Substrat miselleri batık bir şekilde koloni oluşumuna, havasal miseller ise kireç şeklinde kolonilerin oluşumuna neden olur (Waksman, 1989). Aktinomisetler agar besiyerinde büyüdüğünde, agarın hem alt hem de üst yüzeyinde dallanmış bir hif ağı oluştururlar (Sharma ve ark., 2014). Miselyum denilen filamentler ağı başarılı büyüme ve dallanma sonucunda oluşur (Madigan ve Martingo, 2010). Filamentleri silindirik şeklinde dallanmış, genellikle 0,5-1,2 µm çapında (Şekil 1.1), mantarlara göre küçük ve Gram pozitiflerdir. Aktinomisetlerin iplikçi yapıları diğer bakterilere göre daha gelişmiş olarak kabul edilir ve kolonileri monopodyal veya nadiren dikotomik dallı, ışınal yapı oluşturan tek hücreli iplikçi bakteri olarak tanımlanırlar (Öner, 1989).



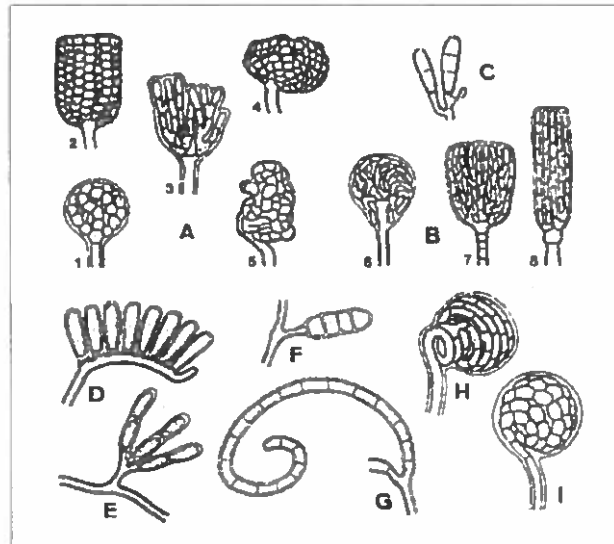
Şekil 1.1. Flamantöz (miselyum) hücre yapısını gösteren *Nocardia* cinsinden bir aktinomiset kolonisi. Her bir filament yaklaşık 0,8 µm çapındadır (Madigan ve Martingo, 2010).

Aktinomisetlerde 37°C'den daha yüksek sıcaklıklarda misel parçalanarak bol miktarda spor oluşturur ve spor oluşumu genellikle parçalanma ya da segmentasyon şeklindedir. Miselyum, spor içermeyen vesiküller taşıdığı gibi pek çok spor da içerebilir (Şekil 1.2). Sporları genelde kullanılan ortam üzerinde pudramsı şekilde gözlenir (Tresner ve ark., 1966; Waksman, 1989). Glukoz-maya özütü-malt özütü, yulaf unu, nişasta ve gliserol-asparajin agar besiyerileri spor oluşumu evresi için uygun ortamlardır (Shirling ve Gottlieb, 1966).



Şekil 1.2. Aktinomisetlerin spor taşıyan yapılarının fotomikrografi. *Streptomyces*, kapalı spiral tip (Madigan ve Martingo, 2010).

Aktinomisetler hava hiflerinde farklılaşmış, spor taşıyan miselyum oluşturur. Bu tür spor oluşumu çoğu aktinomiset cinsinde ortaya çıkar. Spor zincirleri morfolojik olarak uzunluklarına ve spor sayılarına göre ayrılır. Aktinomiset türlerinin ayırt edilmesinde spor zincirinin uzunluğuna, şekline, pozisyonuna ve rengine de bakılmaktadır. Pek çok filogenetik olarak farklı grup, spor keselerinde sporlar oluşturur. Spor keseleri, torba benzeri yapılardır ve sporların geliştiği ve bırakılncaya kadar bir arada tutulduğu kesedir. Spor keseleri, hem boyut hem de şekil bakımından önemli ölçüde değişmektedir (Şekil 1.3) (Li ve ark., 2016).



Şekil 1.3. Spor keseleri içinde spor üretimi (Miyadoh ve ark., 1997). A) *Actinoplanes*. B) *Pilimelia*. C) *Dactylosporangium*. D) *Planomonospora*. E) *Planobispora*. F) *Planobetraspora*. G) *Planopolyspora*. H) *Spirillospora*. I) *Streptosporangium*.

Aktinomisetlerin çoğunluğu aerobiktir. pH 5-9 aralığını tercih ederler ve alkali koşullarda büyürler (Waksman, 1989). Aktinomisetler genellikle 25-30°C'de büyümektedir. Zor koşullara hayatta kalmak için iyi adapte olurlar. Aktinomisetlerden termofilik olanlar gibi bazıları ise 45-55°C gibi yüksek sıcaklıklarda büyüebilir (Williams ve ark., 1983; Sharma, 2014).

1.1.3. Aktinomisetlerin Ekolojisi

Aktinomisetler topraklar, tatlı sular, kompostlar, besin maddeleri gibi her türlü doğal madde üzerinden izole edilebilirler. Bazik ve nötral topraklarda asit topraklara göre daha iyi büyürler (Breed ve ark., 1957). Kompostlarda selüloz, hemiselülöz, lignin ve kitin gibi organik maddelerin dekompozisyonu sonucu topraktaki humus oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu yönü ile ekolojik bakımdan önemlidirler (Steger ve ark., 2007).

1.1.4. Toprak Aktinomisetleri

Aktinomisetler toprakta humus oluşumuna sebep olmalarıyla birlikte toprağın verimliliğini artırırlar (Kızıloğlu, 1995). Sayı bakımından topraktaki diğer bakterilerden sonra gelirler ve bir gram toprakta 10^5 - 10^7 adet düzeyinde bulunurlar. Bu sayılar ortam pH'sına ve karbon kaynaklarına göre değişmektedir. Alkali ve yüksek organik madde içeren topraklarda sayıları yüz milyon civarını bulabilir (Breed ve ark., 1957).

1.1.5. Deniz Kaynaklı Aktinomisetler

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini buluşuyla birlikte mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Fleming, 1929). Fleming'i takiben araştırmacılar birçok değerli ilaç etken maddelerini karasal mikroorganizmalardan elde etmişlerdir (Hölker ve ark., 2004). Fakat zamanla çalışmalar tek düze hale gelmiştir ve doğal ürün keşfi için farklı kaynaklar araştırılmaya başlanmıştır

(Verdine, 1996). Karadan sonra farklı kaynak olarak denizler ve okyanuslar keşfedilmeyi bekleyen geniş kaynağı oluşturmıştır. Çünkü okyanuslar, dünya yüzeyinin %70'ini kaplar ve gezegenin biyolojik çeşitliliğinin çoğunu barındırır. Deniz bitkileri ve omurgasız hayvanlar doğal ürün keşfi için önemli bir kaynak olmasına rağmen, bu çeşitliliğin mikrobiyolojik bileşeni nispeten keşfedilmemiştir. Yapılan araştırmalar, seçkin deniz aktinomiset gruplarının yeni doğal ürünler için sağlam bir kaynak olduğunu ortaya koymuştur (Fenical, 2006).

1.2. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması

Aktinomisetlerin taksonomik karakterizasyonu, özellikle yararlı metabolitler için herhangi bir tarama çalışmasında önemli bir adımdır. Bu nedenle, izolatların hızlı ve kesin olarak tanımlanması, çalışmalarda üretilen metabolitin türü üzerinde, özellikle de izolatın tür seviyesine kadar tanımlanması halinde yeni bir metabolit olup olmadığına dair önemli ipuçları sağlar (Yap, 2015). Aktinomiset türlerini tanımlamak için, bazı karakteristik özelliklerini tanımlamak yeterlidir. Bunlar, bu organizmaların doğal substratlarına, morfolojilerine, kültürel özelliklerine ve biyokimyasal özelliklerine dayanır (Waksman, 1950).

Aktinomisetlerin filamentleri ve sporları diğer bakterilere benzemesine rağmen, miselyumlarının dallanma şekli funguslarla benzerlik gösterir (Waksman, 1950). Bu nedenle aktinomisetlere bakteriler ve mantarlar arasında bir geçiş formu olarak bakılmaktadır (Öner, 1989). Buna göre aktinomisetlerin, morfolojik özelliklerinde büyük ölçüde değişen ve bazı açılardan gerçek bakterilere ve gerçek mantarlara benzeyen, oldukça heterojen bir grup organizma içerdiği sonucuna varılabilir (Waksman, 1950).

Aktinomisetler yapılan taksonomik çalışmalarda aktinomiset yerine Actinobacteria olarak adlandırılmışlardır. Bu nedenle aktinomisetler bakteri olarak kabul edilmektedirler (Yallop ve ark., 1997 ; Suihko ve ark., 2006).

Aktinomisetlerin taksonomisinde büyük ilerlemeler moleküler çalışmalar ile olmuştur. Birçok araştırmacı tarafından zamanla çeşitli cinsler tanımlanıp 1980'li yıllardan bugüne aktinomisetlerin filogenetik sınıflandırılması bu yöntemle geliştirilmiştir (Stackebrandt ve Schumann, 2006). Aktinomisetler, birçok farklı cinsi içerisinde bulunduran bir sınıftır. Günümüz sınıflandırmasında aktinomiset beş alt sınıf, dokuz takım, elli beş familya, iki yüz kırk cins ve üç bin türden oluşan, *Bacteria* üstalemindeki en büyük ve önemli sınıflardan biridir (Goodfellow ve Fiedler, 2010).

Actinobacteria takımı içerisinde, *Streptomyces* cinsi geniş yayılım alanları ve morfolojik yapıları ile antibiyotiklerin ve diğer sekonder metabolitlerin birinci derecede üreticileri olmalarından dolayı en iyi bilinen cinsidir (Cross, 1982; Crandall ve Hamill, 1986; Okami ve Hotta, 1988; Williams ve ark., 1989; Berdy, 1989; Korn-Wendisch ve Kutzner, 1992).

Waksman ve Henrici 1943 yılında, aerobik ve spor oluşturan aktinomiset grubunu *Streptomyces* cinsi adı altında farklı bir grup olarak tanımlamıştır. Bu tanımlama cinsin sistematğinde bir dönüm noktası olmuştur (Williams ve ark., 1989). Actinomycetales takımının içerisinde *Streptomyces*'lerin filogenetik olarak farklı bir takson oluşturduğu 16S rDNA dizi analizi çalışmaları ile ortaya konmuştur (Witt ve Stackebrandt, 1990; Embley ve Stackebrandt, 1994).

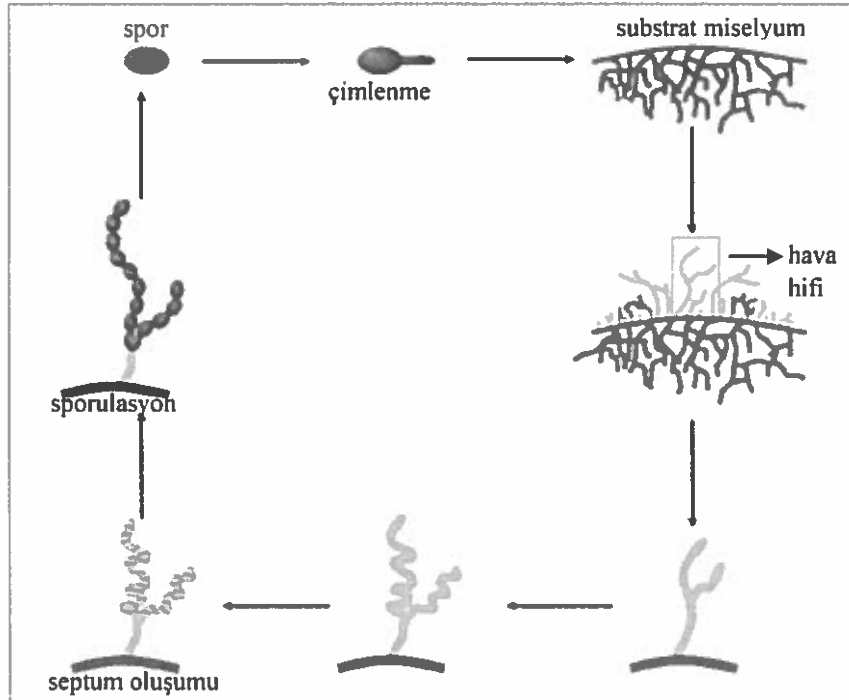
1.2.1. *Streptomyces* Türleri

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabına göre *Streptomyces* türleri Actinobacteria sınıfından, Streptomycetales takımının Streptomycetaceae familyasında sınıflandırılmaktadır (Whitman ve ark., 2012).

Streptomyces türleri Gram pozitif, hücre duvarına sahip, ipliğimsi bakterilerdir ve 0,5-2,0 µm çapındaki vejetatif hifleriyle bir substrat miselyum üretmektedir (Holt ve ark., 1994). Bu türleri birçok fungus gibi hareketsiz bir yaşam tarzına sahiptir ancak

daha küçük spor ve hifleriyle de funguslardan kolaylıkla ayrılabilir (Karahan ve Katircioğlu, 2014).

Streptomyces türünün katı ortamdaki yaşam döngüsü üç ayrı safhadan oluşmaktadır (Şekil 1.4). Birincisi, organizmanın sporları filamentli çok çekirdekli hifadan oluşan ve ince katmanlı septalı geniş bölmelere ayrılmış substrat miselyum üretmek için çimlenir. Substrat miselyum, makromoleküler sentezin azalmasıyla kısa bir büyüme durgunluğuna kadar, ortamın içinde ve üstünde büyümeye devam eder. Bu aşamada, substrat miselyumun havaya dallanmasıyla ortaya çıkan dik uzantılar havasal miselyum oluşumunun başlamasına işaret eder. Bu arada, miselyumun hızlı bir şekilde gelişimi sırasında bölmeler kaybolur ve hava hiflerinin yüzeyinde hidrofobik bir tabaka oluşur. Daha sonra, uçlardaki hava hifleri spor zincirleri olmak üzere çift tabakalı septa ile ayrılmış geniş bölümlere ayrılırlar. Sporlar olgunlaştıktan sonra spor zincirlerini örten lifli kılıf kırılır. Daha sonra, döngü serbest bırakılan sporların çimlenmesi üzerine tekrar başlar (Ünsaldı, 2010).

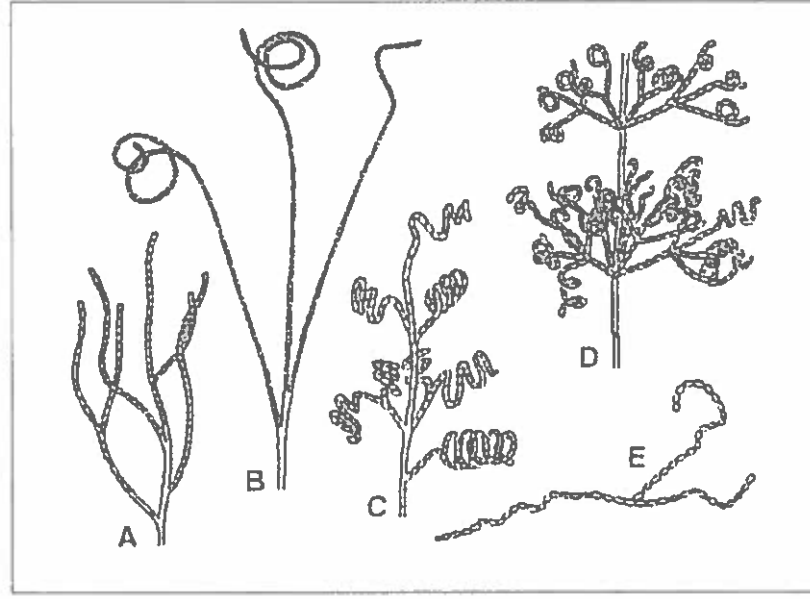


Şekil 1.4. *Streptomyces* yaşam döngüsü (Schinko ve ark., 2009).

Streptomyces kolonilerinin başlangıçta yüzeyi düzdür, havasal miselyumun gelişmesi sonucu yünüksü, granüler, tozlu veya kadifemsi görünüm olmaktadır. Substrat ve havasal misellerin rengini veren değişik pigmentlerin yanı sıra birçok tür bir veya daha fazla sayıda antibiyotik üretmektedir (Holt ve ark., 1994). *Streptomyces* filamentli bakterilerdir (Chater ve Chandra, 2006). Yüzeylerde büyüme sırasında, vejetatif bir substrat miselyumu oluşur, bundan sonra pigmentli sporlar haline gelen hava hifleri ortaya çıkar (Manteca, 2005).

Streptomyces türlerinin morfolojik özellikleri ve karbon kaynaklarını kullanmalarına dayanan tanımlama yöntemleri günümüzde halen geçerliliğini korumaktadır. Morfolojik ve fizyolojik tanımlama çalışmalarının mutlaka çok iyi sporulasyon vermiş koloniler üzerinden yapılması gerekmektedir. *Streptomyces* türleri 15 ile 20 gün hatta 1 ayı bulan sürelerde ancak spor verebilmektedir. Yine morfolojik tanımlamada önemli bir kriter olan spor zincirlerinin şeklinin gözlemlendiği kültürlerin de tam sporulasyon vermiş fakat çok yaşlanmamış kültürler olması önemlidir. Çünkü yaşlanmış kültürlerde spor zinciri yapısında değişiklikler oluşabilmektedir (Karahana ve Katırcıoğlu, 2014).

Streptomyces türünün spor üreten hava hifleri Şekil 1.5'teki gibi ana tiplere ayrılabilir: A) Rectiflexibiles tipi, düz spor zincirleri, kısmen fasiküller halinde; B) Retinaculiaperti tipi, kancalar, açık döngüler veya 1 ila 4 dönüşe sahip kısa, düzensiz spiraller içeren spor zincirleri; C) Spira tipi, iki farklı alt türü gösteren spirallerde spor zincirleri: (a) Kapalı, yoğun spiral ve (b) açık, gevşek ve gerilmiş spiraller; D) Verticillati tipi, şemsiyeler gibi dallı ve kıvrımlı spor zincir yapıları. Uzun zincirlerde sporları oluşturan diğer bir tipik cins, iyi gelişmiş hava hiflerine sahip olan ve düz-eğimli veya zikzak şeklinde olabilen ve çeşitli uzunluklardaki sporlara tamamen parçalanabilen *Nocardiosis* türleridir (Li ve ark., 2016).



Şekil 1.5. *Streptomyces* cinsine ait uzun zincirlerde spor üretimi (Miyadoh ve ark., 1997). A) *Rectiflexibiles* tipi, B) *Retinaculiaperti* tipi, C) *Spira* tipi, D) *Verticillati* tipi (Hütter, 1967). *Nocardiopsis*: E) dallanmış hava hifleri parçalanması.

1.3. Aktinomisetlerin Ürettiği Bileşikler

Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif sekonder metabolitlerin yaklaşık 23,000 olduğu bilinmektedir; bunların 10,000'i aktinomisetler tarafından üretilir. Böylece aktinomisetler keşfedilen tüm biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin % 45'ini oluştururlar. Aktinomisetler arasında, *Streptomyces* türleri tarafından yaklaşık 7,600 bileşik üretilmektedir. Bu sekonder metabolitlerin birçoğu güçlü antibiyotiklerdir. Bunun sonucunda *Streptomyces* türleri, ilaç endüstrisi tarafından kabul edilen birincil antibiyotik üreticisi organizmalar haline gelmiştir (Berdy, 2005). Sharma ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmaya göre *Streptomyces* türleri tarafından 8,000 bileşiğin ürettildiği bulunmuştur.

Mikroorganizmalar arasında aktinomisetler, yüksek ticari değere sahip biyoaktif bileşikler üretir ve yeni biyoaktif maddeler için rutin olarak taranmaya devam eder (Okami ve Hotta, 1988; Sanglier ve ark., 1993; Masayuki ve ark., 1993; Demain, 1999; Berdy, 2005). Aktinomisetler, antibiyotik gelişimi için potansiyel ilaç adayları olarak görev yapan yeni biyoaktif bileşikler için mükemmel kaynaklardır. Son yirmi

yılda, yeni antimikrobiyalleri bulmak ve geliştirmek için yapılan endüstriyel çabalar ciddi ölçüde azalmıştır. Çoklu ilaca dirençli patojenlerin artan tehdidi ve bu tür bileşiklerin bulunması, üretilmesi için yeni teknolojilerin geliştirilmesi bu alandaki ilgiyi bir kez daha etkilemiştir (Weber ve ark., 2015).

1.3.1. Antibakteriyel Bileşikler

Farklı substratlardan izole edilen ve farklı ortamlarda kültürlenene aktinomisetler ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Kültüre edildikleri ortamın derinliklerinde yaşayan aktinomisetlerin büyük bir kısmı, bakteriler ve diğere mikroorganizmaların büyümesini engelleme kapasitesine sahiptir. Bu aktinomisetlerin mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etki gösterme kabiliyeti oldukça spesifiktir. Bu seçicilik, sadece organizma türüne değıl, aynı zamanda yetiştirildiğı ortama ve büyüme koşullarına da bağılıdır. Antagonistik aktinomisetler, ortamın kimyasına, antimikrobiyal etkilere, hayvanlara karşı toksisiteye ve kemoterapötik potansiyellerine göre değışen çeşitli antibakteriyel bileşikler üretirler (Waksman ve ark., 2010).

Aktinomisetlerden antibiyotik üretimi çalışmaları diğere sekonder metabolitlerine göre daha yoğun çalışılmıştır (Lacey, 1973; Öner ve ark., 1987; Hsieh ve Jones, 1995; Denizci, 1996; Pandza ve ark., 1997; Sheldon ve ark., 1999; Hatano, 1999; Ceylan, 2007; Ünsaldı, 2010).

1.3.1.1. Antibiyotik

Selman A. Waksman 1914-1939 yılları arasında, tüberküloz hastalığına antibiyotik bulmak için sürekli sistematik olarak toprak bakterilerini ve mantarlarını taramıştır. 1939'da, bazı mantarların bilhassa aktinomisetlerin bakteriyel büyümeye karşı etkisini keşfetmiştir. 1940 yılında, tüberküloza etki eden aktinomisin antibiyotiğini izole etmiştir ve 1944 yılında streptomisini elde etmesiyle başarılı olmuştur (Sharma, 2014). Kloramfenikol 1947 yılında tifus salgınında yaygın olarak kullanılmıştır. 1948 yılında bu antibiyotiğin, geniş bir Gram (-) ve Gram (+) bakteri topluluğı dışında riketsiyalara karşı da çok aktif olduğı bulunmuştur. 1949 yılında *Streptomyces*

türünden neomisin adı verilen antibakteriyel etkiye sahip antibiyotik keşfedilmiştir. Bu antibiyotik yüzeysel enfeksiyonların sağaltımında ve barsak florasının inhibe edilmesinde kullanılmaktadır. 1952 yılında bir aktinomiset olan *Saccharopolyspora erythraea* türünden eritromisin antibiyotiği elde edilmiştir. Eritromisin antibiyotik etki spektrumu bakımından penisiline benzemesiyle penisilinlere aşırı duyarlılık kazanmış bireylerde birinci alternatifini oluşturmaktadır (Aktuğlu, 2002).

Biyoaktif metabolitlerin üreticileri olan başlıca mikroorganizma türlerinin önemi ve sıklığı son yıllarda önemli ölçüde değişmiştir. Antibiyotik döneminin başlangıcında fungal (penisilin, griseofulvin) ve bakteriyel (gramicidin) türleri ön plandaydı, fakat streptomisin ve daha sonra kloramfenikol, tetrasiklin ve makrolidlerin keşfiyle *Streptomyces* türü dikkat çekmiştir (Berdy, 2005). Bununla birlikte, aktinomisetlerden iyi bilinen ve değerli birçok antibiyotik üretilmiştir (Tablo 1.1). Bunlar arasında amfoterisin, nistatin, gentamisin, eritromisin, vankomisin, novobiyosin ve neomisin gibi antibiyotikler bulunur (Sharma, 2014).

Şimdiye kadar aktinomisetlerden izole edilen antibiyotikler saflaştırma derecesine göre değişmektedir. Bazıları ham iken, diğerleri kristalleştirilmiştir ve kimyasal tabiatlarıyla ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Bunlar aktinomisit, aktinomises lizozim, aktinomisin, mikromonosporin, streptotrisin, streptomisin ve mycetin olan antibiyotik maddeleridir. Bazı aktinomisetler birden fazla antibiyotik maddesi üretir. Bazı antibiyotikler birkaç farklı organizma tarafından üretilir. Bununla birlikte, aynı genel madde türünün çeşitli kültürler tarafından oluşturulabilmesine rağmen, tam olarak aynı antibiyotik spektrumuna sahip olmayabileceğine dair bazı kanıtlar vardır; Bu, maddenin kimyasal yapısında varyasyon olasılığını düşündürmektedir (Waksman ve ark., 2010).

Tablo 1.1. *Streptomyces*'lerin ürettiği antibiyotikler (Oskay ve Tamer, 2009).

Antibiyotik	Kaynak
Streptomisin	<i>Streptomyces griseus</i>
Kanamisin A, B	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Higromisin B	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
Sefamisin A, B	<i>Streptomyces chartreusis</i>
Tienamisin	<i>Streptomyces cattleya</i>
Klavulanik asit	<i>Streptomyces clavuligeru</i>
Oleandomisin	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Lankasidin	<i>Streptomyces violaceoniger</i>
Pristinamisin	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Oksitetrasiklin	<i>Streptomyces rimosus</i>
Linkomisin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Spiramisin	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
Eritromisin A	<i>Streptomyces erythreus</i>
Kloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Valinomisin	<i>Streptomyces griseus</i>
2-OH-metilklavam	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Nistatin	<i>Streptomyces noursei</i>

1.3.2. Aktinomisetlerin Ürettiği Enzimler

Aktinomisetler toprak ve sedimentlerde organik materyallerin iyi bir ayrıştırıcısıdır. Bununla birlikte, bazı aktinomiset suşları amilaz, proteaz, selüloz, jelatinaz, pektinaz ve üreaz gibi çeşitli enzimler üretirler (Kar ve Ray, 2008; Gluve ve Desmukh, 2012).

Doğada bulunan çeşitli mikroorganizmalar, çoğunlukla mantarlar ve bakteriler, nişastayı ayrıştıran ve nişasta içindeki basit şekerleri hidrolize etmekten sorumlu kompleks amilolitik enzim sistemlerine sahiptir. Buna göre aktinomisetler hücre dışı sindirimi gerçekleştirmek için hücrelerin dışına amilaz salgılar. Yapılan çalışmalarda, birkaç grup Actinobacteria üyesi amilaz enzimi üretiminde bilinen

mikroorganizma gruplarına karşı dikkat çekmiştir (Pandey ve ark., 2000; Singh ve ark., 2014).

Selülaazlar, selülozun glikozidik bağlarını hidrolize eden bir grup hidrolitik enzimdir (Ito, 1997). Biyoteknoloji alanında yeni sınırların ortaya çıkmasıyla birlikte, selülozun yelpazesi, gıda, tekstil, çamaşır, kağıt, tarım ve ayrıca araştırma ile geliştirme dahil olmak üzere çeşitli sektörlerle yayılmıştır (Bhat, 2000). Bununla beraber, aktinomisetler bilinen selüloz üreticilerinden en dikkat çekici olanlarından biridir (Jang ve Chen, 2003; Arunachalam ve ark., 2010).

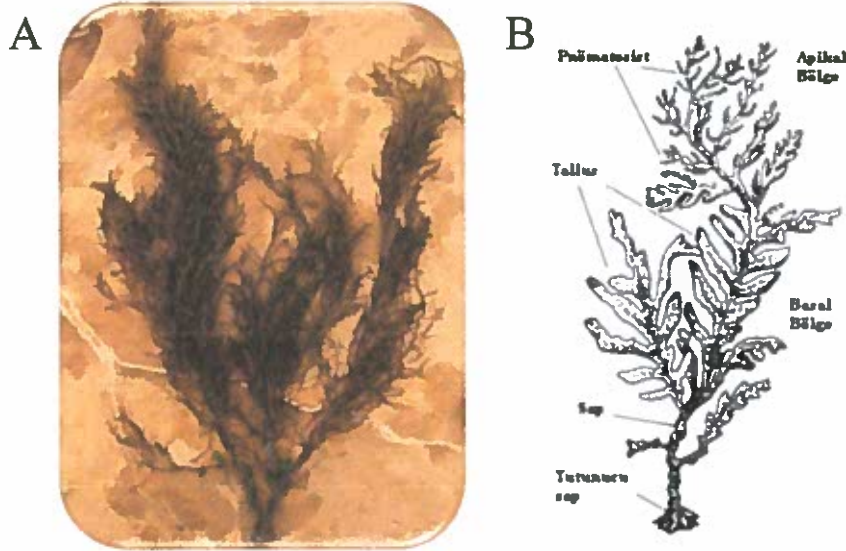
Lipazlar gliserol ve uzun zincirli yağ asitlerinden oluşan esterlerin hidrolizi ve sentezini katalize eder. Doğada yaygın olarak bulunur, ancak sadece mikrobiyal lipazlar ticari olarak önemlidir. Çoğu mikroorganizma kaynaklı lipaz pH 5,6-8,5 aralığında en yüksek aktiviteyi gösterir ve nötral pH'da en yüksek kararlılığa sahiptir (Sharma ve ark., 2001). Lipazlar gıda, ilaç ve deterjan endüstrileri gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir (Schmind ve Verger, 1998). Ayrıca biyopolimerlerin ve biyodizellerin sentezi için yeni biyoteknolojik uygulamalar lipazlar kullanılarak başarıyla oluşturulmuştur (Jaeger ve Eggert, 2002). Lipazlar, birçok enzimin aksine oldukça geniş substrat spesifikliği ve organik çözümlere karşı toleranslarından dolayı geniş sentetik potansiyele sahiptir (Kamini ve ark., 2000). Çeşitli bakteri, mantar ve aktinomisetlerden lipaz üretimi bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Kulkarni ve Gadre, 2002).

Aktinomisetler, çok sayıda biyoteknolojik uygulamaya sahip çeşitli enzimlerin yanı sıra çok çeşitli biyoaktif bileşikler ürettikleri bilinmektedir. Bunlar önemli bir lignoselüloz hidrolize edici enzim kaynağıdır ve doğal ortamda biyokütlenin bozulmasından sorumlu olan toprak veya suda yaşayan mikrofloranın önemli bir kısmını oluşturur (Limaye ve ark., 2017).

1.4. *Cystoseira* sp.

Cystoseiraceae ailesine ait *Cystoseira* cinsi çok yıllık bir algdır. Bu cins sıcak, temiz ve oksijeni bol olan denizlerde yaygındır. Akdeniz ve Karadeniz sahillerinde bulunurlar. Akdeniz'de 24 kadar türü yaşamaktadır ve bu türlerden denizlerimizdeki *Cystoseira* ve *Sargassum* türlerinin alginat kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Cirik ve ark., 2001; Cirik ve Cirik, 2004). Bu türler alginik asitçe zengin olduğundan ekonomik alglerdir (Kavuk, 2013).

Cystoseira cinsinin tallusları yaklaşık 80-100 cm uzunluktadır ve kuvvetli bir tutunma noktasından yükselen eksen, oldukça sağlamdır. Bu talluslar çevresine doğru çok miktarda dallanma gösterir (Şekil 1.6). Dalsı yapı yine çok sayıda dalcıklara ayrılır ve son segmentler dikotomik olarak çatallanır. Gerek yan dallar, gerekse küçük segmentler oval ve şişkin hava keseleri taşırlar ayrıca bu dalcıklarının uç kısımları konseptakulumları taşıyan şişkin yapılarla sonlanır. Yaklaşık 2-3 m'den 40-50 m derinlere kadar inmektedirler. Sert zeminlere tutunarak yaşamlarını sürdürürler (Aydın, 1991).



Şekil 1.6. *Cystoseira* sp. tür örneği (A), *Cystoseira* cinsinin yapıları (B) (Tüney, 2011).

1.5. Alg Kompostu

Alg ve alg ekstraktlarının toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine olumlu etki yaptığı ve topraktaki faydalı mikroorganizmaların büyümesini tetiklediği bilinmektedir (Cardozo ve ark., 2007). Bu nedenle Uzakdoğu ülkelerinde ve Avrupa ülkelerinde alglerden kompost geliştirildiği gözlenmektedir (Eyras ve ark., 1998).

Kompostlama, mikroorganizmaların aktiviteleri sonucu ayrışabilen organik maddelerin biyokimyasal yol ile oksijenli ortamda parçalanmaya tabi tutulmasıdır. Kompost içeriğinde patojen mikroorganizma yoktur, bolca bitki besin elementleri vardır, organik maddece zengindir, su tutma kapasitesi yüksektir ve organik humus oluşturulmasıdır. Humusca zengin maddeye kompost denir (Bender, 2014).

Bir kompostlama çeşiti olan oksijenli kompostlama sürecinde fakültatif ve zorunlu mikroorganizmalar aktiftir. Kompostlama sürecinin başlangıcında toplam canlı bakteri daha baskındır. Sonra kompost sıcaklığının artışıyla yüksek sıcaklığa dirençli bakteri baskın hale geçer. Son aşamasında ya da yanma periyodunda ise küfler ve aktinomisetler görülür (Tchobanoglous ve ark., 1993).

Kompost sürecinde patojen mikroorganizmaları yok etme önemli bir faktördür. Patojenlerin ölümünde sıcaklık ve zaman etkilidir. Örneğin patojen bir tür olan *Salmonella* cinsi bakteriler 60°C sıcaklıkta 15–20 dakikada yok olabilmektedirler. Kompost yığının bütün kısımları yaklaşık 55°C sıcaklığa geldiğinde mikroorganizmaların hızlı bir şekilde yok olduğu görülebilmektedir. Bu mikroorganizmalardan bazıları kısa bir zaman içinde 67°C sıcaklıkta daha uzun ömürlü olabilmektedir. Bütün patojen mikroorganizmalar yaklaşık 1–2 saat içinde 70°C sıcaklığa maruz kalındığında elimine olurlar (Tchobanoglous ve ark., 1993). Buna göre alg türünden yapılan kompost içinde hayatta kalabilen mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklara dayanabilen dirençli canlılar olabileceği ve bu canlıların uç koşullarda üreteceği maddelerin güçlü bileşikler olabileceği düşündürücü olmuştur.

Bu bilgiler doğrultusunda tezin amacı Giresun sahillerindeki bir alg türü olan *Cystoseira* sp. kompostundan izole edilen aktinomiset grubu bakterilerin antibakteriyel ve enzim aktivitelerinin araştırılmasıdır. Ayrıca yüksek enzim ve antibakteriyel aktivite gösteren izolatların morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve 16S rDNA dizi analizleri ile tanımlanması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yapılan bazı çalışmalarda aktinomisetler toprak, kompost, deniz suyu, sedimentler ve bitki köklerinden izole edilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında aktinomiset suşlarının antimikrobiyal aktivitesi, yeni biyoaktif bileşik üretmeleri, enzim aktivitesi ve morfolojik ve fizyolojik tanımlamaları araştırılmıştır.

Groth ve arkadaşları (1997) Almanya, Jena yakınlarındaki dondurulmuş kompost toprağı örneğinden yeni bir aktinomiset olan *Demetria terragena*'ı izole etmişlerdir.

Ghanem ve arkadaşları (2000) İskenderiye kıyısı boyunca farklı ekosistemleri temsil eden 4 bölgeden almış oldukları deniz suyu ve sediment örneklerinden aktinomiset izole etmişlerdir. Deniz suyu ve sedimentlerden izole edilen aktinomisetlerin sayımı için dört seçici kültür ortamı kullanmışlardır. En yüksek sayım nişasta-nitrat kültür ortamında olmuştur. Bu ortam farklı morfolojik karakterler ve pigmentasyon ile değerlendirilen farklı aktinomiset türlerinin izolasyonunun olabileceğini ortaya koymuştur. Bu nedenle nişasta nitrat ortamı en uygun kültür ortamı olarak seçilmiştir. Nişasta nitrat ortamı bu mikroorganizmaların çoğalmasını desteklemiştir. Sonuç olarak İskenderiye sahilinin yeni biyoaktif bileşikler üreten suşları izole etmek için uygun bir ekosistem olduğunu kanıtlamışlardır.

Oskay ve arkadaşları (2004) Manisa ilinden ve çevresinden toplanan tarım toprak örneklerinden toplam 50 farklı aktinomiset suşu izole etmişlerdir. Bu izolatları dört fitopatojenik ve altı patojenik bakteriye karşı antibakteriyel aktiviteleri için incelemişlerdir. Sonuçlar, tüm izolatların %34'ünün, en azından test organizmalarından (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas viridiflova*, *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Bacillus subtilis* ATTC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 10031, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541,

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 29998 ve *Sarcina lutea* ATCC 9341) birine karşı aktif olduğunu göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada Fiedler ve arkadaşları (2005), Pasifik ve Atlantik Okyanuslarının çeşitli yerlerindeki deniz sedimentlerinden 600 aktinomiset suşu izole etmişlerdir. Bu aktinomiset suşlarını biyoaktif sekonder metabolitlerin üretimi için taramışlardır. Tarama sonucunda deniz kaynaklı suşların, karasal suşlardan izole edilen kimyasal olarak iyi bilinen antibiyotiklerin üreticileri olduğunu bulmuşlardır.

Özdemir ve Atalan (2012) yaptıkları çalışmada Van Yöresinde doğal olarak yayılış gösteren yabani mercimek (*Lens orientalis* Boiss., Hand & Mazz.) ve yabani nohut (*Cicer anatolicum* Alef.) bitkisinin kök ve çevresinden toplanan 51 toprak numunesinden *Streptomyces* suşları izole etmişlerdir. İzole ettikleri 98 *Streptomyces* suşunun, 8 patojen ve non-patojen bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Test edilen tüm *Streptomyces* türlerinin %65,3'ünün *Bacillus subtilis*, %54'ünün *Escherichia coli*, %45,9'unun *Proteus vulgaris*, %53'ünün *Pseudomonas aeruginosa*, %10,2'sinin *Salmonella enteridis*, %44,8'inin *Staphylococcus aureus*, %58,1'inin *Streptococcus pyogenes* ve %56,1'inin *Xanthomonas compestris* bakterisine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduklarını belirlemişlerdir.

Parthasarathi ve arkadaşları (2012) Güney Kore'nin Güney Batı Kıyısı'ndaki Bigeum Adası'nın sahilinden aldığı örneklerden 68 aktinomiset izole etmişlerdir. 68 aktinomiset izolatının, koloni morfolojisi ve mikroskopik morfolojilerini belirlemişlerdir. Suşların hem morfolojik hem de kültürel özelliklerle tanımlanması ile izolatların % 54' ünün koloni renklerinin beyaz ve gri olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında izolatların moleküler olarak tanımlanması % 66'sının *Streptomyces* sp. cinsine ve kalanlarında *Nocardiopsis* sp. (% 18), *Micromonospora* sp. (% 11) ve *Actinopolyspora* sp. (%5) cinslerine ait olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç olarak *Streptomyces* izolatlarının baskın türler olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca 68 izolattan 23 izolatın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu, 12 izolatın

antibakteriyel aktivite gösterdiğini, 9 izolatin *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Jeffrey (2008) yaptığı çalışmada Malezya tarım topraklarından aldığı 7 toprak örneğinden 62 aktinomiset izole etmiştir. Bütün isolatları daha sonra saflaştırmıştır ve çeşitli enzimatik testlere tabi tutmuştur. Enzim testleri sonucu isolatların yaklaşık % 98,4'ü (61 izolatu) bir veya daha fazla enzimatik aktivite göstermiştir. Toplam isolatlardan % 16,2'si sadece bir enzim üretmişken, % 54,8'i iki tip enzim üretmiştir ve % 27,4'ü test edilen tüm enzimleri üretmiştir. Sonuç olarak aktinomisetlerin, geniş bir aralıktaki enzimleri salgılama potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Amore ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada komposttan selüloolitik mikroorganizma izole etmiştir. Kompost içeriğinin %65'i çekirdekleri ile beraber meyve ezmesi, %22'si sıvı atık çamuru, %13'ü şeker kamışı ve sebzeden (patates ve havuç) oluşturulmuştur. Daha sonra kompostan izole edilen selüloolitik *Streptomyces* sp. G12 suşunda bir selülazın klonlanması ve rekombinant ekspresyonunu araştırmışlardır.

Yang ve Song (2018) Güney Çin Denizi sedimentlerinden 28 aktinomiset suşu izole etmişlerdir. İzole edilen suşlardan 4'ünün anti-*Mycobacterium phlei* aktivitesine sahip olduğunu ve 5'inin metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı aktivitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca 3 suşun büyüdüğü fermantasyon sıvısında yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için araştırma yapmışlardır. Araştırma sonucu deniz *Streptomyces* sp. NHF86'dan paulomenol benzeri bir bileşik, *Salinispora* sp. NHF45 tarafından üretilen yeni bir rifamisin B ve *Nocardioopsis* sp. NHF48'den bir α -pyron bileşiği elde etmişlerdir. Sonuç olarak Güney Çin Denizi sedimentlerinden izole ettikleri denizel aktinomisetlerin yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için uygun bir kaynak olacağı sonucuna varmışlardır.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kompost Örnekleri

BAP proje (FEN-BAP-A-200515-82) kapsamında *Cystoseira* sp. alginden hazırlanan kompost örneği bu tez çalışmasında kullanıldı (Şekil 3.1). Bu kompostlardan yaklaşık 10 g kadar örnekler alınarak steril plastik tüpler içine bırakıldı ve laboratuvarında +4 °C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.



Şekil 3.1. *Cystoseira* sp. kompost örnekleri.

3.1.2. Test Mikroorganizmaları

İzole edilen aktinomisetlerin antibakteriyel aktivitelerinin tespiti için kullanılan patojen bakteriler Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Kullanılan test bakterileri.

Gram Negatif Bakteriler	Gram Pozitif Bakteriler
Pv: <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	Sa: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Ec: <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Ef: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
Eco: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	
St: <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	
Kp: <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 1383	
Yp: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 911	
Pa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	

3.1.3. Kullanılan Besiyerler

Besiyeri 1: Potasyum Dikromat Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Besiyeri aktinomiset izolasyonu ve koloni seçimi için kullanıldı (Tan ve ark., 2009).

İçerik	g/l
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g
Glukoz	10 g
Potasyum dikromat	25 mg/l

Besiyeri 2: Nişasta Kazein Agar Besiyeri (SCA)

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH 'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Bu besiyeriden sıvı olarakta hazırlandı. Nişasta Kazein Agar Besiyeri (SCA) seçilen aktinomiset kolonilerinin saflaştırılması, kültürlerin devamlılığı ve fiziksel tanımlama çalışmaları için büyüme ortamı olarak kullanıldı (Jeffrey, 2008).

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Çözünür nişasta	10 g
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18 g
Saf su	1000 ml

Enzim Aktivite Besiyerleri

Enzim aktivite besiyerleri; aktinomiset büyümesinde kullanılan Nişasta Kazein Agar Besiyeri'nde nişasta yerine ilgili enzimin substratları ilave edilerek kalitatif çalışmalar için hazırlandı.

Besiyeri 3: Nişasta Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Nişasta Besiyeri'ndeki amilaz aktivitesi için iyot solüsyonu (I₂= 1 g, KI=2 g /300 ml) damlatılarak aktinomiset etrafındaki zon oluşumuna bakıldı (Coşkun, 2010).

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Çözünür nişasta	10 g
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18g
Saf su	1000 ml

Besiyeri 4: Lipaz/esteraz Enzim Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Tween 20, Tween 80 ve tribütirin (10 ml) her birinden bir tanesi kullanılarak üç besiyeri hazırlandı. Bu besiyerler lipolitik aktivite tayininde kullanıldı.

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri 5: Kitin Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi.

Kolloidal kitin hazırlanması: Roberts ve Selitrennikof (1988)'e göre değiştirilerek hazırlandı. Buna göre 5 g toz kitin, 60 ml konsantre HCl'e yavaş yavaş ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra +4 °C'de bir gece yüksek devirde çalkalayıcıya bırakıldı. Karışıma 2 L soğuk % 95'lik etanole ilave edildi ve 48 saat -20 °C'de bekletildi. Oluşan çökelti 5000 g'de 20 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Steril distile su ile koloidal kitin nötral (pH=7,0) oluncaya kadar yıkama işlemi yapıldı. Yıkanmış kitin gece boyunca 90 °C'de kurutuldu ve bir havanda dövülerek toz haline getirildi.

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Kolloidal kitin	1 g
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri 6: CMC Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Selülaaz aktivitesi için inkübasyon sonrası %0,1 w/v kongo kırmızısı boyası petriye ilave edildi ve 15 dakika bekletildikten sonra boya uzaklaştırıldı, plağın üzerine bu sefer 1 M NaCl solüsyonu ilave edildi. Solüsyon 15 dakika bekletilerek sonrasında aktinomiset etrafındaki zonlara bakıldı (Coşkun, 2010).

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
CMC (Karboksimetilselüloz)	10 g
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri 7: Proteaz Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Proteaz aktivitesi için civa klorür solüsyonu (HgCl₂ 15 g, HCl 20 ml, H₂O 80 ml) damlatılarak aktinomiset etrafındaki zonlara bakıldı (Ali, 1992).

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Jelatin	15 g
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g

NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18 g
Saf su	1000 ml

Besiyeri 8: Pektin Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH 'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Pektinaz aktivitesi için %0,1'lik CTAB damlatılarak aktinomiset etrafındaki zonlara bakıldı (Altan, 2004).

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Pektin (elmadan yapılmış pektin)	5 g
Kazein hidrolaz	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	18 g
Saf su	1000 ml

Antibakteriyel Aktivite Besiyerleri

Besiyeri 9: Mueller Hinton Agar (MHA) Besiyeri

21 g besiyeri (Merck Mueller-Hinton Broth, Agar 20 g) 1000 ml saf su ile karıştırılarak hazırlandı. Besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Bu besiyeri antibakteriyel aktivite tayininde kullanıldı (Atlas, 2004).

Besiyeri 10: Yumuşak Agar Besiyeri

Aşağıda belirtilen besiyeri içeriğinin ortam pH 'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Bu besiyeri antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında indikatör bakterilerini test etmede kullanıldı.

<u>İçerik</u>	<u>g/l</u>
Nutrient Broth (NB)	8g
Agar-agar	7g
Saf su	1000ml

Test Organizmaları İçin Kullanılan Besiyerler

Besiyeri 11: Nutrient Agar (NA) Besiyeri

NA'dan 20 g alınarak 1000 ml saf su ile karıştırılarak hazırlandı. Besiyeri içeriğinin ortam pH'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Bu besiyeri antibakteriyel aktivite çalışmalarında test organizmalarını büyütmek için kullanıldı.

Besiyeri 12: Nutrient Broth (NB) Besiyeri

NB'den 8 g alınarak 1000 ml saf su ile karıştırılarak hazırlandı. Besiyeri içeriğinin ortam pH 'ı 7,5 olacak şekilde ayarlandı ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklav yapılarak steril edildi. Bu besiyeri antibakteriyel aktivite çalışmalarında test organizmalarını büyütmek için kullanıldı.

3.1.4. Gram Boyama İşleminde Kullanılan Boyalar

Kristal Violet;

Solüsyon A: 2 g kristal violet 10 ml etanolde çözüldü.

Solüsyon B: 0,8 g ammonyum oksalat 80 ml dH₂O'da çözüldü.

İki solüsyon karıştırılıp, 24 saat bekletildi. Sonra süzgeçten geçirilerek temiz cam şişeye alındı.

Gram İyodu;

1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür (KI) 5 ml dH₂O'da çözüldü. Daha sonra 250 ml dH₂O ve 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ilave edilerek gram iyodu hazırlandı.

Gram Safranin;

2,5 g safranin O, 100 ml % 95'lik etanol ve 500 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

3.1.5. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar Liu ve arkadaşları (2000)'e göre hazırlandı.

Liziz Tamponu

Tris (pH 8)	400 mM
EDTA (pH 8)	60 mM
NaCl	150 mM
SDS	% 1

Potasyum Asetat Tamponu

Potasyum asetat (pH 4,8) 5M	60 ml
Glasiyal asetik asit	11,5 ml
Saf su	28,5 ml

Tris EDTA Tamponu

Trisma base 1 M	0,5 ml
EDTA (pH 8.0) 0.5 M	0,1 ml
Saf su	40,4 ml

3.1.6. PCR Reaksiyonlarında Kullanılan Primerler

PCR çalışmalarında 16S rDNA primerleri (F 5'–ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA–3'; R 5'–ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA–3') kullanıldı (Beffa ve ark., 1996).

PCR sonucu elde edilen 16S rDNA gen sıraları MACROGEN (Hollanda) firmasında dizi analizi yapıldı. Dizi analiz sonuçları Gen Bankasındaki mevcut dizilerle BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Aktinomiset İzolasyonu

Laboratuvarda +4 °C'de steril plastik tüpler içine alınan 10 g kadar *Cystoseira* sp. kompost örnekleri ile aktinomiset izolasyonu için seri dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan seri dilüsyonlardan 10^{-3} , 10^{-6} ve 10^{-8} seyreltiklerinden aktinomiset izolasyon besiyeri (potasyum dikromatlı besiyeri) üzerine 100 µl ilave edilerek yayma ekim yapıldı. Ekimler 30°C'de 14-21 gün inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası petrillerdeki kolonilerden aktinomiset koloni morfolojisine sahip olanlar seçildi.

Seri Dilüsyon Hazırlama

1. Kompost örneğinden 1g tartılarak steril falkon tüp içerisine alındı.
2. 1g örneğin üzerine 9 ml steril saf su ilave edildi.
3. Saf su ilave edilen karışımın homojenize olabilmesi için vorteks yapıldı.
4. Vortekslenen örnek oda sıcaklığında 5 dk dinlenmeye bırakıldı.
5. 10^{-1} dilüsyonu için vortekslenen örnekten 1 ml alınarak steril cam tüpe koyuldu ve üzerine 9 ml steril saf su ilave edilerek 10^{-1} dilüsyonu hazırlandı.
6. 10^{-8} dilüsyonuna kadar sırasıyla bir önceki dilüsyondan 1 ml alınıp üzerine 9 ml steril saf su ilave edildi.
7. 10^{-3} , 10^{-6} ve 10^{-8} dilüsyonlarından 100'er ml alınarak potasyum dikromatlı ve potasyum dikromatsız besiyeri üzerine yayma ekim yapıldı.

3.2.1.1. İzolatların Saflaştırılması ve Saf Kültürlerin Stoklanması

Aktinomiset izolasyonu sonrası petrilerdeki kolonilerden aktinomiset benzeri koloni morfolojileri seçildi. Seçilen koloniler Nişasta-Kazein Agar (SCA) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekildi. Saf kültürler elde edilebilmesi için izolatlar aktinomiset büyümesini sağlayan SCA besiyerine ekildi ve 30°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra saf kültürler çalışılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

Saf kültürlerin stoğu için sıvı Nişasta-Kazein Broth besiyeri hazırlandı. 10 ml'lik cam tüp içerisine 3 ml besiyeri koyuldu. Besiyeri içerisine saf kültür steril kürdan ile inoküle edilerek 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası saf kültürlerden % 20'lik steril gliserol hazırlanarak -20°C ve -80°C'lerde stoklandı.

3.2.2. İzolatların Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi

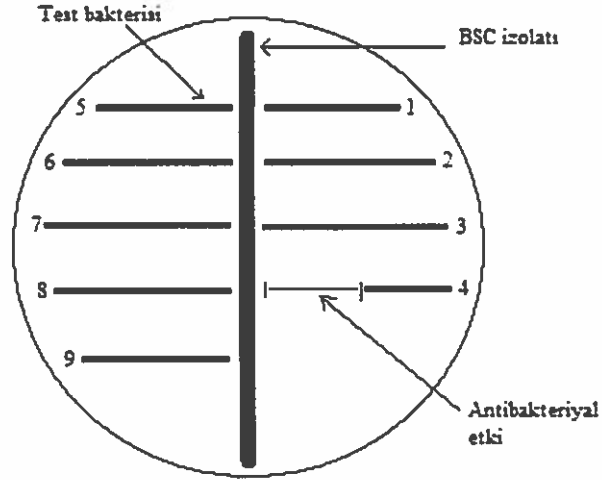
Cystoseira sp. kompostundan izole edilen aktinomisetlerin lipaz/esteraz, amilaz, kitinaz, proteaz, selüloz ve pektinaz enzimi üretilip üretilmediği incelendi. Aktinomisetlerin enzim içerikleri; aktinomiset büyümesinde kullanılan SCA besiyerinde nişasta yerine ilgili substratlar ilave edilerek kalitatif olarak araştırıldı. Ekimler 30°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası izolatların etrafındaki zonlar değerlendirildi.

3.2.3. İzolatların Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Karşıt Çizgi

Cystoseira sp. kompostuna ait aktinomisetlerin antibakteriyel özelliklerini araştırmak amacıyla karşıt-çizgi testi kullanıldı. Antibakteriyel çalışmalar için hazırlanan MHA besiyerinin merkezine saf kültürler öze ile Şekil 3.2'de gösterildiği gibi çizgi ekim yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra 4-7 gün 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası büyüyen aktinomisetlere dik olacak şekilde test bakterilerinin ekimi yapıldı

ve 30°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar test bakterilerinin etrafındaki açık zona bakılarak değerlendirildi.



Şekil 3.2. Karşıt çizgi yöntemi.

3.2.3.2. Nokta Ekimi

Karşıt çizgi yönteminde *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 test bakterilerine karşı yüksek aktivite gösteren izolatlar için nokta ekim yöntemi kullanıldı. Test bakterileri aktif hale getirilerek taze kültürler kullanıldı. Aktinomiset izolatlarının inkübasyonu için petrilere MHA besiyeri döküldü. Antibakteriyel aktivitesi kontrol edilecek aktinomiset kültürü steril kürdan yardımıyla MHA besiyeri bulunan petrinin ortasına nokta şeklinde ekildi. Aynı işlem 3. günden başlayarak 7. güne kadar tekrar edildi. Sonrasında izolatlar 30°C’de inkübasyona bırakıldı. Uygun besiyeri ve inkübasyon sıcaklığında 24 saat geliştirilen test bakterilerinden 100 µL alınarak, 5 mL yumuşak agar ile karıştırıldı. Agar karışımının MHA besiyerinde geliştirilen aktinomiset bakterisi kolonileri üzerine homojen bir şekilde yayılması yapıldı. Petri kutuları test bakterilerinin gelişimi için 30°C’de 1 gün inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda, aktinomiset izolatlarının test bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları (mm) ölçülerek

değerlendirildi. Çalışma üç tekrarlı yapıldı ve mm olarak ölçülen sonuçların ortalamaları not edildi.

3.2.3.3. Disk Difüzyon

Yüksek aktivite gösteren izolatların antibakteriyel aktivitesinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi amacıyla fermantasyon besiyeri ortamında çoğaltılması yapıldı. Disk difüzyon yöntemi için test bakterisi deneme öncesi aktif hale getirilerek genç kültür kullanıldı. Aktivasyonda bakteri için MHA besiyeri kullanıldı. Test bakterisi petriye dökülmüş besiyerinin (MHA) üzerine inoküle edildi. Petri yüzeyi kuruyuncaya kadar bekletildi ve üzerine diskler steril pens yardımıyla yerleştirildi (Bauer et al., 1966).

Fermantasyon sıvısı hazırlamak için MHB besiyeri 250 ml'lik erlene 50 ml besiyeri olacak şekilde koyuldu. Taze aktinomiset kültüründen bir öze dolusu olarak erlene ekimi yapıldı ve 30°C'de inkübasyona bırakıldı (Mincer et al., 2002). 6., 8., 10. ve 17. günlerde fermantasyon sıvısından 1-2 ml ependorflara alındı. İncelenecek fermantasyon sıvıları disklerle 60 µl olacak şekilde emdirildi ve kuruması için 30-60 dk steril kabin içerisinde bekletildi. Petriler 30°C etüvde 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda disklerin çevresinde oluşan zonlar değerlendirildi.

3.2.4. Bazı Aktinomiset İzolatlarının Tanımlanması

Enzim ve antibakteriyel aktivitesi yüksek olan 6 izolat (BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49) seçilerek morfolojik, fiziksel ve moleküler tanımlanması yapıldı.

3.2.4.1. Morfolojik Tanımlama

İzolatların koloni morfolojisinin belirlenmesi için kültürler SCA ortamında 3 gün 30°C'de inkübe edildi. Daha sonra izolatların kolonileri incelendi.

Mikroskopik özelliklerinin belirlenmesi için izolatlar SCA ortamında 24 saat 30°C’de inkübe edildi ve daha sonra Gram boyaması yapıldı (Williams ve ark., 1993);

1. Temiz bir lama bir damla saf su damlatıldı ve kültürlerin steril öze ile lama yayılması sağlandı.
2. Preparat havada kurutulduktan sonra ısı ile fiksasyonu sağlandı.
3. Hazırlanan preparata ilk olarak kristal violet damlatıldı ve 1 dk bekletilerek saf su ile yıkandı. Daha sonra gram iyodu ile boyanarak 1 dk bekletilerek saf su ile yıkandı. Sonrasında mor rengin akması için etanol ile 20 saniye yıkandı ve saf su ile etanol temizlendi. Son olarak safranin damlatılarak 30-60 saniye kadar bekletildi ve saf su ile yıkandı.
4. Gram boyaması yapılan preparatlar kurumaya bırakıldı.
5. Boyama sonucunda hücreler mikroskop altında 1000X boyutunda incelendi ve fotoğraflandı.

Seçilen izolatların spor zincir morfolojilerinin tanımlanmasında Sahilah (1991)’e göre modifiye edilen cover slip yöntemi kullanıldı.

Cover slip yöntemi;

1. Steril bir lama SCA besiyeri ince bir şekilde döküldü. Lam steril bir petriye yerleştirilerek 3-7 gün 30°C ‘de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası kültürle kristal violet damlatılarak 1 dk bekletildi ve saf su ile yıkandı.
3. Preparat lamel ile kapatıldı ve üzerine inversiyon yağı damlatıldı.
4. Daha sonra ışık mikroskobu altında incelendi.

3.2.4.2. Fiziksel Tanımlama

Aktinomiset izolatlarıyla yapılan enzim ve antibakteriyel aktivite çalışmaları sonucunda yüksek aktivite gösteren BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatların sıcaklık, pH ve tuz toleransları belirlendi.

İzolatların sıcaklık toleranslarının belirlenmesi için SCA ortamı bulunan petrideki besiyerlerine çizgi ekim yapıldı. Daha sonra 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C ve 50°C’de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı ve büyümenin var olup olmadığı gözlemlendi.

İzolatların pH toleransının belirlenmesi için SCA ortamı pH 5, 6, 7, 8 ve 9 olarak hazırlandı. İzolatların petrilere çizgi ekimi yapıldı. Daha sonra 30°C’de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı ve büyümenin var olup olmadığı gözlemlendi.

Tuz toleranslarının belirlenmesi için SCA ortamına %2.5, %5, %7.5 ve %10 (w/v) oranında NaCl ilave edilerek hazırlanan petrilere izolatlar çizgi ekim yapıldı. Daha sonra 30°C’de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı ve büyümenin var olup olmadığı gözlemlendi.

3.2.4.3. Moleküler Tanımlama

3.2.4.3.1. DNA İzolasyonu

Moleküler genomik DNA izolasyonu çalışmalarında Liu ve arkadaşları (2000)’e göre modifiye edilen yöntem kullanıldı.

DNA izolasyonu aşağıdaki aşamalara göre yapıldı;

- DNA izolasyonu yapılacak olan izolatlar Starch Kazein Broth besiyerinde 30°C’de 48 saat inkübe edildi.
- Sıvı besiyerinde iki gece büyütülen kültürler steril ependorf tüpüne aktarıldı, 13.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
- Ependorf tüp içerisindeki pellet üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edildi. Solüsyon homojenize olana kadar karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Ependorf tüpündeki karışıma 150 µl potasyum asetat tamponu ilave edildi ve vortekslendi. 10.000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

- Elde edilen süpernatanta eşit hacimde izopropanol ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra 10.000 rpm'de 2 dksantrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet 300 µl %70'lik etanol ile yıkandı ve 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Tüpte kalan pellet havada kurutuldu ve TE (Tris-EDTA) tamponunda çözöldü.
- İzole edilen DNA'lar %0,7'lik agaroz jel elektroforezinde 80 V'de yürütöldü.

3.2.4.3.2. 16S rDNA PCR Çalışmaları

İzole edilen DNA'lar PCR çalışmalarında kullanıldı. İzolatların DNA'ları kullanarak 16S rDNA gen bölgelerini çoğaltmak için 16S rDNA primerleri (F 5'–ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA–3'; R 5'–ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA–3') kullanıldı (Beffa ve ark., 1996). PCR reaksiyonu 50 µl olacak şekilde 1 µl DNA, 5 µl 10xPCR tamponu, 5 µl 20 mM MgSO₄, 0.2 U Tag DNA polimeraz, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1'er µl 10 mM forward ve reverse primeri alınarak hazırlandı.

PCR şartları; başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 2 dk olacak şekilde 94 °C'de 1 dk, 56 °C'de 1 dk, 72 °C'de 2 dk 36 döngü ile 72 °C'de 10 dk son uzama basamağı ile gerçekleştirildi. PCR sonucunda elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rDNA gen sıraları MACROGEN (Hollanda) firmasında dizi analizi yapıldı. İzolatların 16S rDNA dizileri BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırıldı.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada *Cystoseira* sp. alg kompostundan aktinomiset izole edilerek izolatların antibakteriyel ve enzim içerikleri araştırıldı. Araştırma sonucunda yüksek aktivite gösteren 6 izolat seçilerek bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve moleküler olarak tanımlanması yapıldı.

4.1. Aktinomiset İzolatları

Cystoseira sp. kompost örneklerinden aktinomiset izolasyonu için hazırlanan seri dilüsyonlar, potasyum dikromatlı ve potasyum dikromatsız besiyerileri üzerine ekimi yapıldı (Şekil 4.1). Petrilerde büyüyen aktinomiset benzeri bakteri kolonileri renk ve şekil karakterlerine göre ayrıştırıldı. Farklı koloni morfolojileri olduğu düşünülen 73 tane aktinomiset bakterisinin SCA besiyerinde saf kültürleri elde edildi. *Cystoseira* sp. izolatları BSC (Black Sea *Cystoseira*) kısaltması ile numaralandırıldı. BSC izolatlarından bazılarının SCA besiyerinde 3 gün inkübasyonu sonunda petrilerdeki görüntüleri Şekil 4.2’de gösterildi.



Şekil 4.1. Seri dilüsyon sonucu oluşan aktinomiset izolatlarının petrideki toplam görüntüsü.



Şekil 4.2. Bazı BSC izolatlarının petri görüntüleri.

4.2. İzolatların Enzim Aktivitelerinin Kalitatif Olarak Belirlenmesi

Cystoseira sp. kompostundan izole edilen 73 aktinomiset izolatının enzim aktiviteleri Bölüm 3.2’de anlatıldığı şekilde belirlendi ve aktivite testinin yapıldığı bazı izolatlara ait petri görüntüleri Şekil 4.3’de gösterildi. Toplam 73 izolatın amilaz, selüloz, kitinaz, pektinaz, proteaz ve lipaz/esteraz (Tween 20, Tween 80, Tribütirin) enzim aktivite sonuçları Tablo 4.1’de listelendi.

Tablo 4.1. BSC izolatlarının enzim içerikleri.

İzolat No	Amilaz	Selüloz	Kitinaz	Pektinaz	Proteaz	Tween 20	Tween 80	Tribütirin
BSC-1	-	++++	+	++++	+++	++++	++	+
BSC-2	+	++++	+	++++	+++	++++	++	+
BSC-3	-	++++	-	++++	+++	++	+	+
BSC-4	-	++++	+	++++	+++	++++	++	+
BSC-5	-	++++	-	++++	++	+++	++	+
BSC-6	+++	++++	-	++++	+++	+	+	++
BSC-7	++	++++	+	++	+	+++	+	+
BSC-8	+	++++	++	++	++	++	+	+
BSC-9	++	+++	-	+	+++	++	+	+
BSC-10	+	++++	+	++	++	+	+	++
BSC-11	-	++++	-	++++	+++	++	+	+++
BSC-12	+++	+++	++	++	++++	++++	+	+
BSC-13	+++	+++	++	+++	++++	+++	+	+
BSC-14	++	+++	-	+++	++	+++	+	++
BSC-15	-	++	++	++++	+++	++	+	+
BSC-16	-	++++	-	++++	+++	+++	++	+
BSC-17	-	++++	-	++++	+	+++	+	++
BSC-18	-	++++	-	++++	+++	+++	+	++
BSC-19	-	++++	+	++++	++	+++	+	++
BSC-20	-	++	+	++++	+++	+++	+	+
BSC-21	+	+++	+	+++	+	++++	++	+

Tablo. 4.1. (Devamı)

İzolat No	Amilaz	Selüloz	Kitinaz	Pektinaz	Proteaz	Tween 20	Tween 80	Tribütirin
BSC-22	++	++++	+	++++	++++	+++	+	+++
BSC-23	+	++++	-	++++	+	++++	+	++
BSC-24	++	++++	+	++	+++	++++	+	++
BSC-25	+	++++	++	++	++++	++++	+	+
BSC-26	-	++	-	+++	++++	-	+	+
BSC-27	+	++++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-28	-	++++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-29	+++	+++	++	++++	++	++++	+	+
BSC-30	+++	++++	++	++++	++	++++	+	+
BSC-31	+++	++++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-32	+	+++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-33	-	++++	-	++++	+++	++	+	-
BSC-34	+	++++	-	++++	+++	++++	+	+
BSC-35	+	++	-	++++	++++	++++	+	-
BSC-36	++	+++	+	++++	++++	++++	+	-
BSC-37	++	+++	+	++++	++++	++++	+	+
BSC-38	+	++++	+	++++	+++	++++	+	+
BSC-39	++	+++	-	++++	+++	++++	+	+
BSC-40	++	++++	-	++++	++++	++++	+	+
BSC-41	++	+	-	++++	++++	-	-	+
BSC-42	+	+++	++	++++	+	++++	+	+
BSC-43	+	+++	+	++++	+	++++	+	+
BSC-44	-	++++	-	++++	++++	++++	+	+
BSC-45	-	+++	-	++++	+++	++++	++	+
BSC-46	+	++++	-	++++	++++	++	+	+
BSC-47	-	+++	-	++++	+	++++	+	+
BSC-48	-	+++	-	++++	+	++++	+	+
BSC-49	-	+++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-50	++	++++	-	++++	+++	++++	+	++

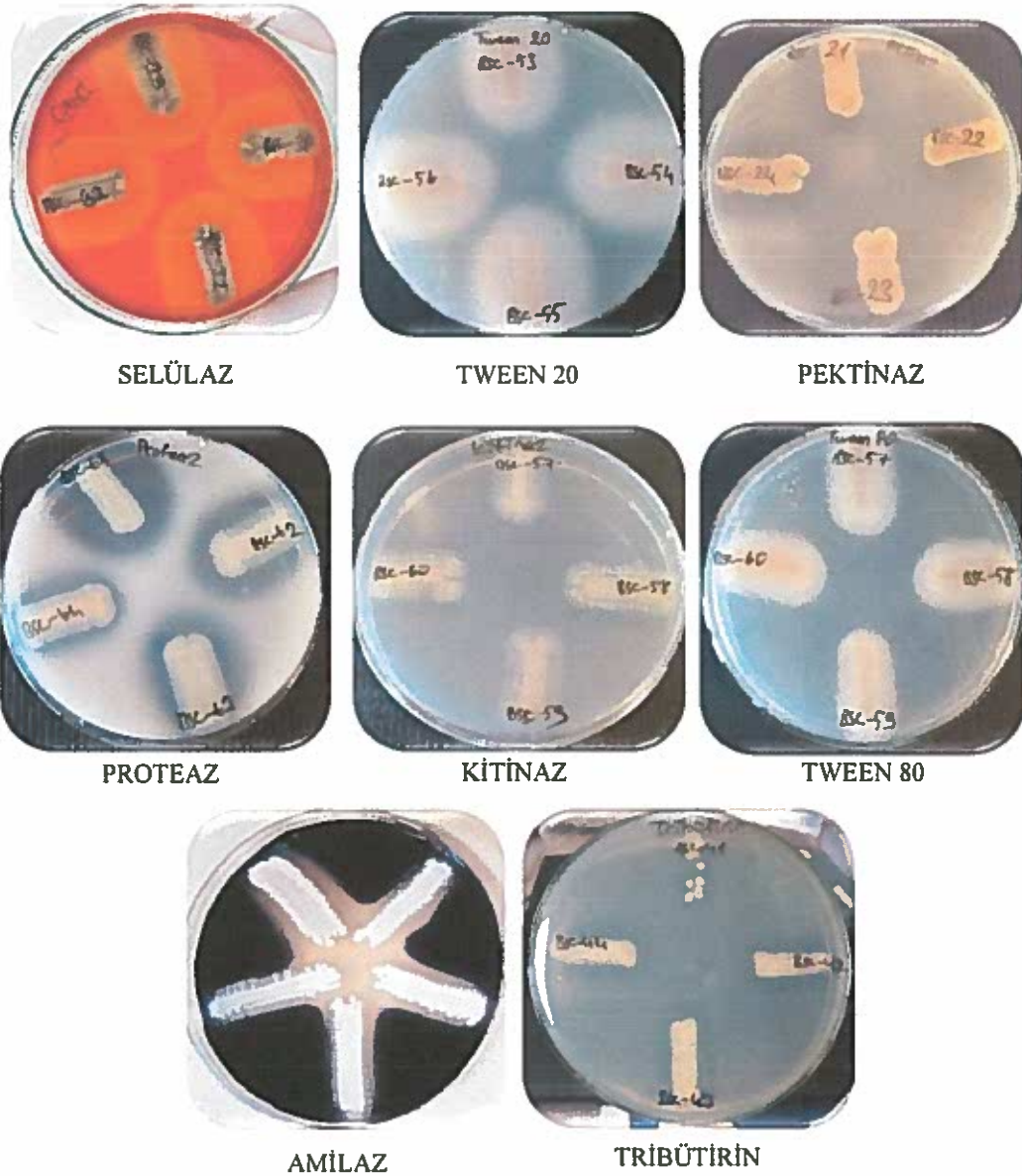
Tablo. 4.1. (Devamı)

İzolat No	Amilaz	Selüloz	Kitinaz	Pektinaz	Proteaz	Tween 20	Tween 80	Tribütirin
BSC-51	+	+++	-	++++	+++	++++	+	+
BSC-52	+	++	+	++++	++++	+++	+	++
BSC-53	+	+++	+	++++	++	+++	+	+
BSC-54	-	+++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-55	-	++++	-	++++	+++	++++	+	+
BSC-56	++	++	++	++++	+++	++++	+	+
BSC-57	++	+++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-58	+	++++	++	++++	+++	++++	+	+
BSC-59	-	+++	-	++++	+	++++	+	+
BSC-60	+	+++	-	++++	+++	++++	+	+
BSC-61	+	+++	-	++++	++++	++++	+	+
BSC-62	++	+++	-	++++	++	++++	+	+
BSC-63	+++	+++	+	++++	++	++++	+	+
BSC-64	+	+++	-	++++	+	++	+	+
BSC-65	+	++	+	++++	++	++++	+	+
BSC-66	+	+++	+	-	++++	++++	+	+
BSC-67	+++	+++	+	-	++++	++++	++	+
BSC-68	++	+++	+	-	++++	++++	+	+
BSC-69	+	+++	++	++	+++	+++	+	+
BSC-70	+	+++	+	+	++++	++++	+	+
BSC-71	+	+++	++	++	++++	+++	+	+
BSC-72	++	+++	+	++++	+++	++++	+	+
BSC-73	-	++	-	-	-	-	-	+

- ;Aktivite yok, +; 10mm 'den küçük, ++; 10mm-20mm arasında, +++ ;20mm'den büyük, ++++; yüksek aktivite (+ : zon çapı mm olarak ölçülmüştür)

Cystoseira sp. kompostundan izole edilen 73 aktinomiset izolatının 8 tanesinde diğer izolatlar göre daha iyi amilaz aktivitesi gözlemlendi. İzolatların tamamında selüloz aktivitesi belirlendi. 73 izolattan sadece 35 tanesi kitinaz aktivitesi gösterdi. Pektinaz aktivitesi 55 izolatta yüksek olarak belirlendi. Proteaz aktivitesi sadece BSC-73 nolu

izolatta gözlenmedi. Lipaz aktivitesi için 70 izolat Tween 20 besiyerinde aktivite gösterdi. Tween 80 besiyerinde 73 izolattan 71'inde aktivite gözlemlendi. Tribütirin agar besiyerinde 73 izolattan 70'inde aktivite gözlemlendi ve BSC-11 ile BSC-22 nolu izolatlar iyi aktivite gösterdi. BSC izolatları genel olarak en yüksek lipolitik aktiviteyi Tween 20 ihtiva eden besiyerinde gösterdi.



Şekil 4.3. Bazı izolatların enzim aktivite görüntüleri.

4.3. İzolatların Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1. Karşıt Çizgi

Aktinomiset izolatlarının 2 tane Gram pozitif, 7 tane Gram negatif olmak üzere toplam 9 tane patojen test bakterisine karşı karşıt çizgi yöntemi ile antibakteriyel aktiviteleri test edildi. *Cystoseira* sp. kompostundan izole edilen 73 izolattan 72 tanesi *E. faecalis* test bakterisine karşı iyi antibakteriyel aktivite gösterdi. *S. aureus* test bakterisine karşı 6 izolatta aktivite gözlenmedi. 67 izolatta iyi antibakteriyel aktivite gözlemlendi. 73 izolattan 23 tanesi en az üç test bakterisine karşı aktivite gösterdi. *Yersinia pseudotuberculosis* test bakterisine karşı hiçbir izolatta aktivite gözlenmedi. Aktinomiset izolatlarından 17 izolat Gram negatif bakterilerden *Klebsiella pneumonia*'ya karşı antibakteriyel aktivite gösterdi. Gram negatif bakterilerden *Salmonella typhimurium*'a karşı 1 izolatta aktivite gözlemlendi. Test bakterilerine karşı en yüksek antibakteriyel aktivite BSC-37 nolu izolatta gözlemlendi (Tablo 4.2). Bazı İzolatların karşıt çizgi yöntemi antibakteriyel aktivite petri görüntüleri Şekil 4.4'te gösterildi.

Tablo 4.2. BSC izolatlarının antibakteriyel aktivite sonuçları.

İzolat No	<i>Yp</i>	<i>Pv</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Kp</i>	<i>Eco</i>	<i>Ef</i>	<i>Sa</i>
BSC-1	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-2	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-3	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-4	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-5	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-6	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
BSC-7	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-8	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-9	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
BSC-10	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-11	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++
BSC-12	-	-	-	++	-	-	-	++	++

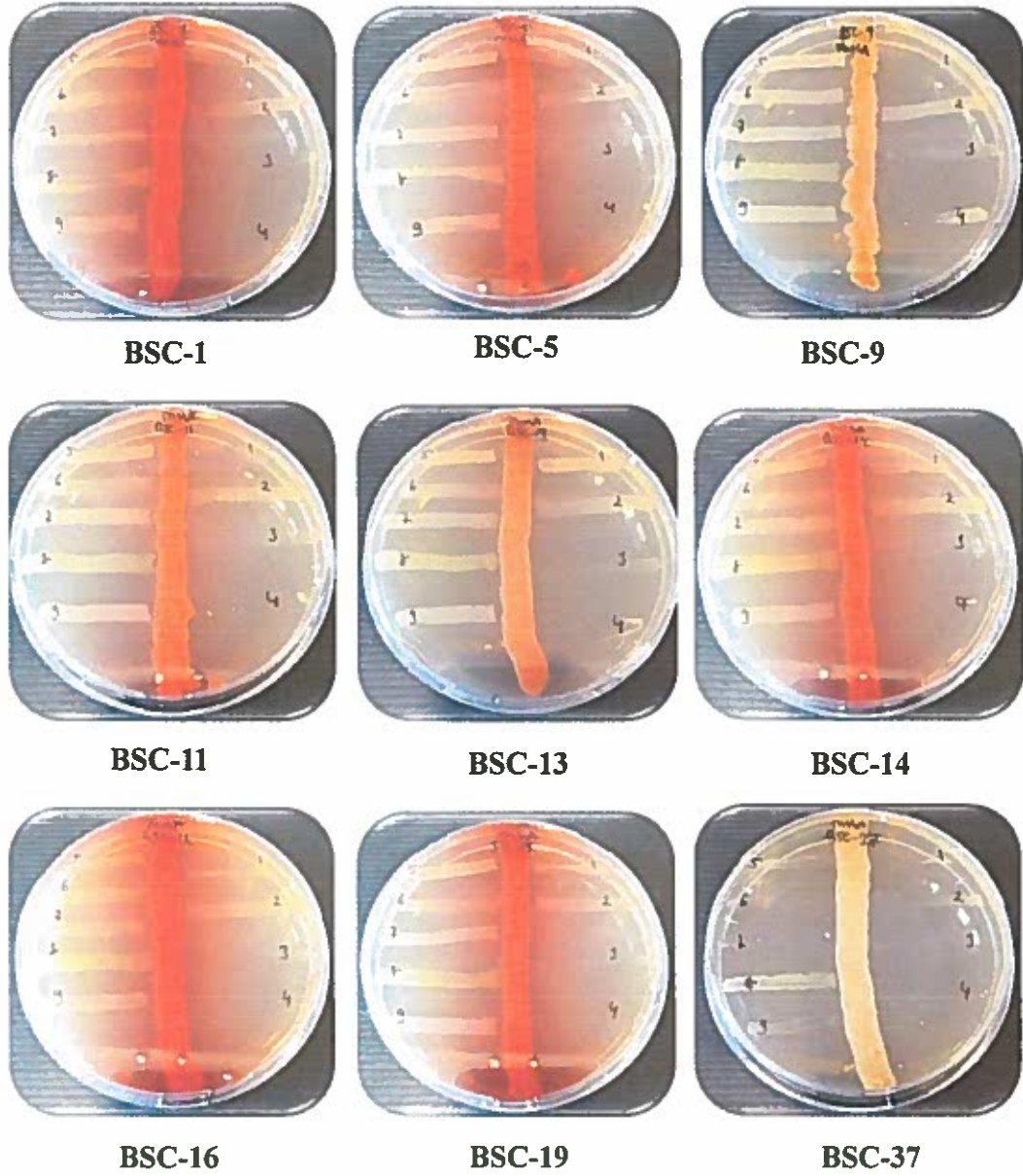
Tablo 4.2. (Devamı)

İzolot No	<i>Yp</i>	<i>Pv</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Kp</i>	<i>Eco</i>	<i>Ef</i>	<i>Sa</i>
BSC-13	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++
BSC-14	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++
BSC-15	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
BSC-16	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++
BSC-17	-	-	++	++	-	-	-	+++	+++
BSC-18	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++
BSC-19	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++
BSC-20	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
BSC-21	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++
BSC-22	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-23	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-24	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-25	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-26	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
BSC-27	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-28	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-29	-	-	++	++	-	-	-	+++	++
BSC-30	-	-	-	-	-	++	-	+++	++
BSC-31	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++
BSC-32	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-33	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-34	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-35	-	-	-	-	-	-	-	-	++
BSC-36	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-37	-	++	++	-	-	++	++	+++	+++
BSC-38	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++
BSC-39	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-40	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-41	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
BSC-42	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-43	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++

Tablo 4.2. (Devamı)

İzolot No	<i>Yp</i>	<i>Pv</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Kp</i>	<i>Eco</i>	<i>Ef</i>	<i>Sa</i>
BSC-44	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-45	-	-	-	-	-	++	-	+++	+++
BSC-46	-	-	-	++	-	-	-	+++	++
BSC-47	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-48	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-49	-	+	+	-	+	-	-	+++	+++
BSC-50	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
BSC-51	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++
BSC-52	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-53	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
BSC-54	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-55	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-56	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-57	-	-	-	-	-	+	-	+++	-
BSC-58	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-59	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-60	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-61	-	++	-	-	-	-	-	+++	-
BSC-62	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-63	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-64	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-65	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-66	-	-	-	-	-	++	-	+++	++
BSC-67	-	+	-	-	-	+	+	+++	++
BSC-68	-	+	-	-	-	++	-	+++	++
BSC-69	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-70	-	-	-	-	-	+	-	+++	++
BSC-71	-	-	++	++	-	-	-	+++	++
BSC-72	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
BSC-73	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

Pv: Proteus vulgaris; Ec: Enterobacter cloacae; Eco: Escherichia coli; St: Salmonella typhimurium; Kp: Klebsiella pneumonia; Yp: Yersinia pseudotuberculosis; Ef: Enterococcus faecalis; Pa: Pseudomonas aeruginosa; Sa: Staphylococcus aureus
 - : Aktivite yok + : Düşük aktivite ++: iyi aktivite +++: çok iyi aktivite



Şekil 4.4. Bazı aktinomiset izolatlarının karşıt çizgi yöntemiyle aktibakteriyel aktivite petri görüntüleri. (Test bakterileri numaraları; 1. *Klebsiella pneumonia*; 2. *Escherichia coli*; 3. *Enterococcus faecalis*; 4. *Staphylococcus aureus*; 5. *Yersinia pseudotuberculosis*; 6. *Proteus vulgaris*; 7. *Enterobacter cloacae*; 8. *Pseudomonas aeruginosa*; 9. *Salmonella typhimurium*).

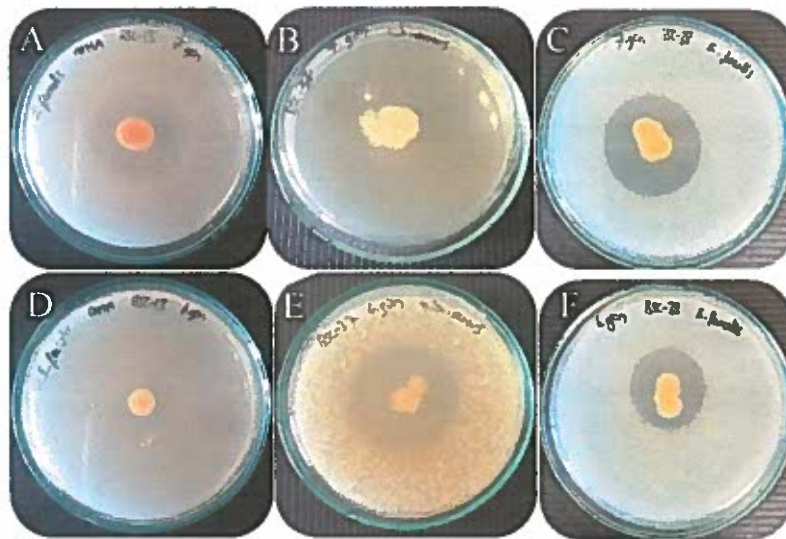
4.3.2. Nokta Ekimi

Cystoseira sp. kompostundan izole edilen BSC-13, BSC-37 ve BSC-38 nolu izolatların nokta ekim yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi Bölüm 3.2’de anlatıldığı şekilde belirlendi. İzolatların *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite testinin mm cinsinden ölçülen zon değerleri Tablo 4.3’te verildi. Nokta ekimi antibakteriyel aktivite testinin yapıldığı 6. ve 7. gün petri görüntüleri Şekil 4.5’te gösterildi.

Tablo 4.3. Nokta ekim yöntemi ile BSC-13, BSC-37 ve BSC-38 nolu izolatların antibakteriyel aktivite sonuçları.

İzolat No	BSC-13	BSC-37	BSC-38
Test Bakterisi	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Gün			
3.	-	15mm	-
4.	10mm	21mm	10mm
5.	11mm	20mm	11mm
6.	17mm	38mm	17mm
7.	30mm	57mm	26mm

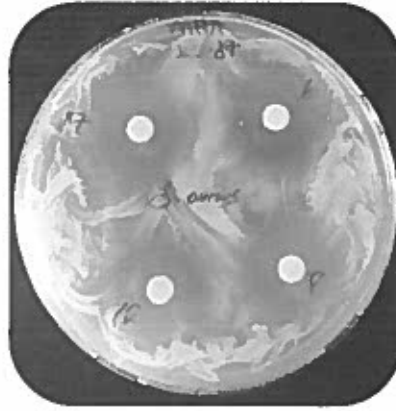
mm değerler inhibisyon zon çapıdır. -; aktivite yok.



Şekil 4.5. Nokta ekim yöntemi aktivite testine ait bazı petri görüntüleri. A; BSC-13 7. gün *E. faecalis*, B; BSC-37 7. gün *S. aureus*, C; BSC-38 7. gün *E. faecalis*, D; BSC-13 6. gün *E. faecalis*, E; BSC-37 6. gün *S. aureus*, F; BSC-38 6. gün *E. faecalis*.

4.3.3. Disk Difüzyon

Cystoseira sp. kompostundan izole edilen BSC-37 nolu izolatin disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivitesi Bölüm 3.2’de anlatıldığı şekilde belirlendi ve aktivite testinin yapıldığı petri Şekil 4.6’da gösterildi. BSC-37 nolu izolatin fermantasyon sıvısına ait aktivite taraması sonucu *S. aureus* test bakterisine karşı iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.6. *Staphylococcus aureus* test bakterisine karşı BSC-37 nolu izolatin fermantasyon besiyerinde 6., 8., 10. ve 17. günlere kadar çoğaltılmış numunelerinin göstermiş olduğu antibakteriyel aktivitesi.

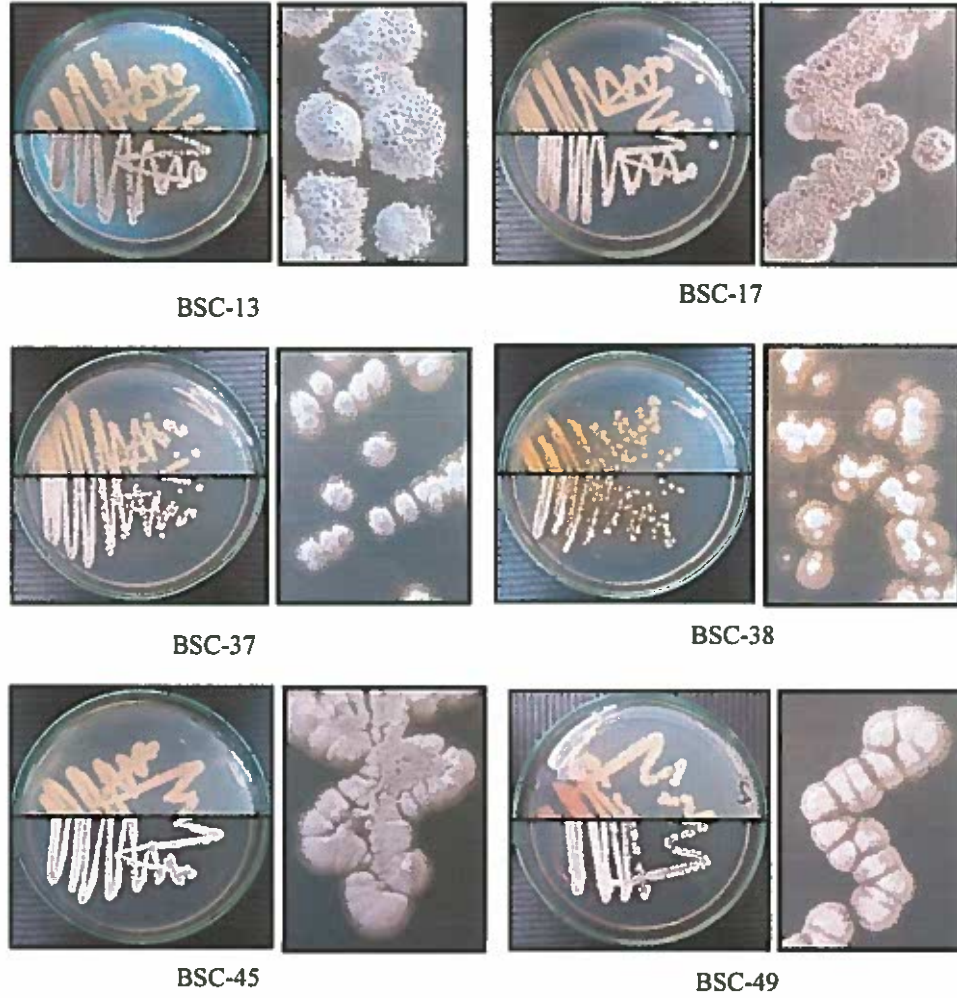
4.4. Aktinomiset İzolatlarının Tanımlanması

Enzim ve antibakteriyel aktivite çalışmaları sonrasında yüksek aktivite gösteren BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatlar tanımlama için seçildi.

4.4.1. Morfolojik Tanımlama

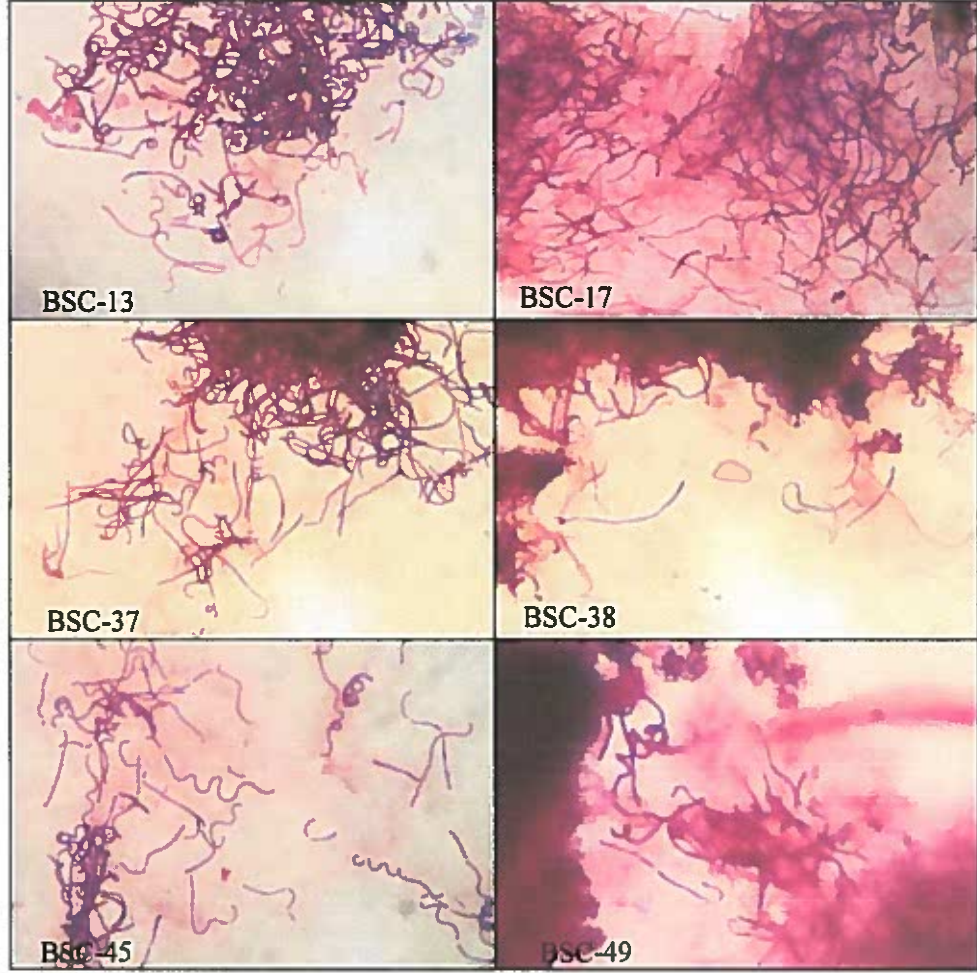
BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatların morfolojik tanımlanması makroskobik ve mikroskobik olarak Bölüm 3.2’de anlatıldığı şekilde yapıldı.

SCA ortamında 3 gün inkübe edilen 6 izolatin koloni yapısı incelendi. SCA ortamında koloni renkleri BSC-13 ve BSC-37’de gri, BSC-17 ve BSC-38’de krem, BSC-45 ve BSC-49’da beyaz olarak gözlemlendi. Koloniler BSC-13 ve BSC-17’de kireç görünümünde, BSC-37 ve BSC-38’de ise agara batık bir şekilde gözlemlendi. Ayrıca BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatlarda koloni görüntüsü pamuksu ve yumuşak olarak gözlemlendi (Şekil 4.7).



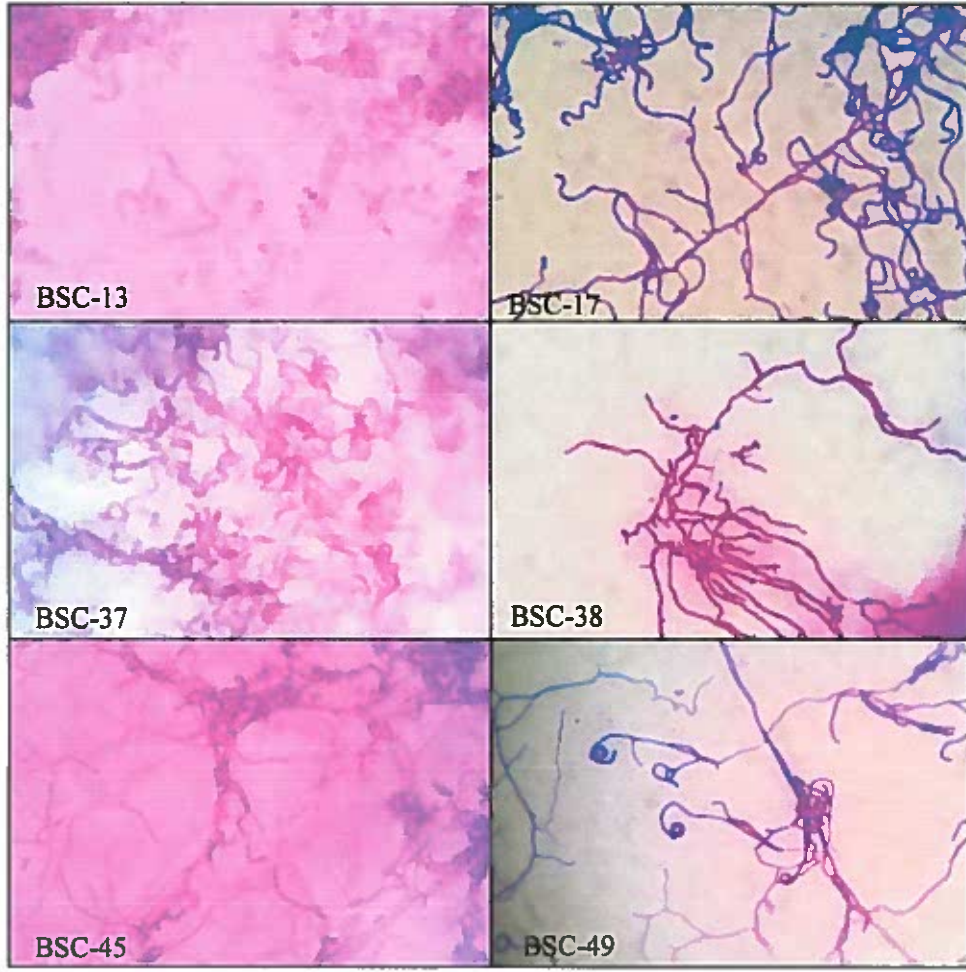
Şekil 4.7. İzolatların petri ve koloni görüntüleri.

SCA ortamında 24 saat büyütülen 6 izolatin Gram boyaması yapıldı (Şekil 4.8). Gram boyamaları sonucu 6 izolat Gram pozitif olarak belirlendi. 24 saat büyümeleri sonucu 6 izolatta ışık mikroskobu altında aktinomiset bakterilerindeki gibi filamentli yapılar gözlemlendi.



Şekil 4.8. İzolatların Gram boyama sonuçlarının ışık mikroskobu görüntüleri 1000X.

Cover slip yöntemine göre SCA ortamında 3-7 gün inkübe edilen 6 izolatın spor zincir morfolojilerine ilişkin görüntüler Şekil 4.9’da verildi. BSC-13 nolu izolatta kanca şeklinde, BSC-37 nolu izolatta ise yoğun spor zincirleri ve kanca şeklinde yapılar belirgin bir şekilde gözlemlendi. BSC-45 nolu izolatda düz spor zincirleri görüldü. BSC-17 ve BSC-49 nolu izolatlarda yoğun spor zincirlerine ve 1-2 döngülü spirallere rastlandı.



Şekil 4.9. İzolatların cover slip yöntemi ile spor zincir morfolojileri 1000X.

4.4.2. Fiziksel Tanımlama

BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45, BSC-49 nolu izolatların fiziksel tanımlanması için sıcaklık, pH ve tuz toleransları Bölüm 3.2’de anlatılan yöntemler ile belirlendi.

6 izolatın sıcaklık toleransları Tablo 4.4’te gösterildi. İzolatlar 10°C’de büyümedi, 20°C ile 45°C arasında tamamı büyüdü. 50°C’de BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatta zayıf büyüme gözlemlendi. İzolatlara ait sıcaklık toleranslarının petride görünümü Şekil 4.10’da verildi.

Tablo 4.4. Bazı İzolatların sıcaklık toleransları.

Sıcaklık İzolat No	10°C	20°C	25°C	30°C	37°C	45°C	50°C
BSC-13	-	++	++	++	++	++	-
BSC-17	-	++	++	++	++	++	-
BSC-37	-	++	++	++	++	++	-
BSC-38	-	++	++	++	++	++	-
BSC-45	-	++	++	++	++	++	+
BSC-49	-	++	++	++	++	++	+

++ iyi büyüme, + zayıf büyüme, - büyüme yok.

İzolatlarının pH toleransları Tablo 4.5'te, tuz toleransları Tablo 4.6'da gösterildi. İzolatlar pH 6, 7, 8 ve 9 aralıklarında yoğun büyüdü, pH 5' te az büyüme gözlemlendi. Tuz toleranslarında %2.5, %5 ve %7.5 oranlarında büyüme gözlemlendi. İzolatlar %10 tuz konsantrasyonunda büyümedi. İzolatlara ait pH toleranslarının petride görünümü Şekil 4.11'de, tuz toleranslarının petride görünümü Şekil 4.12'de verildi.

Tablo 4.5. Bazı izolatların pH toleransları.

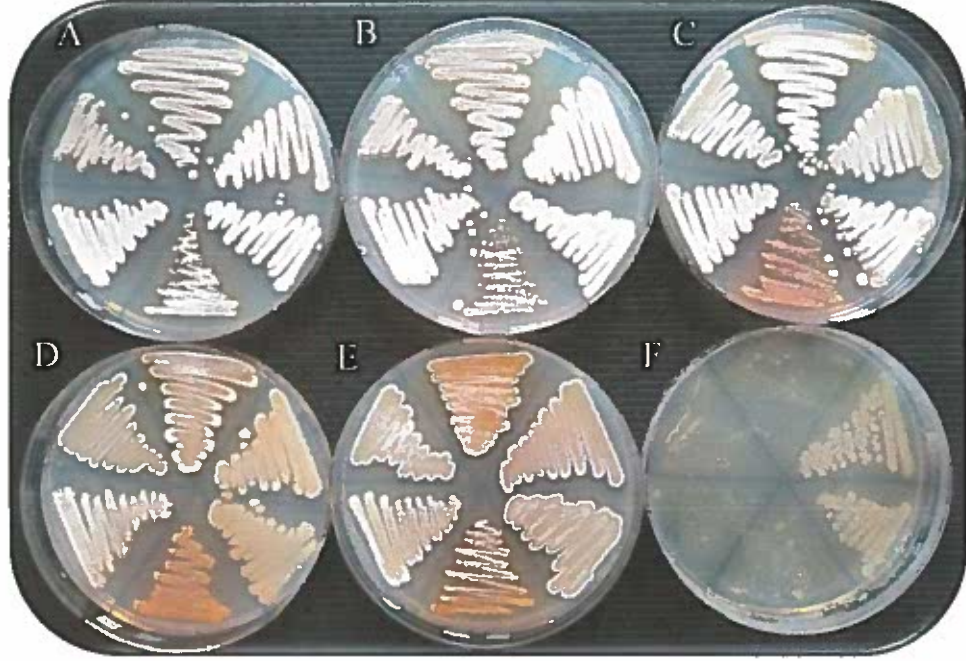
pH İzolat No	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
BSC-13	+	++	++	++	++
BSC-17	+	++	++	++	++
BSC-37	+	++	++	++	++
BSC-38	+	++	++	++	++
BSC-45	+	++	++	++	++
BSC-49	+	++	++	++	++

++ iyi büyüme, + zayıf büyüme, - büyüme yok.

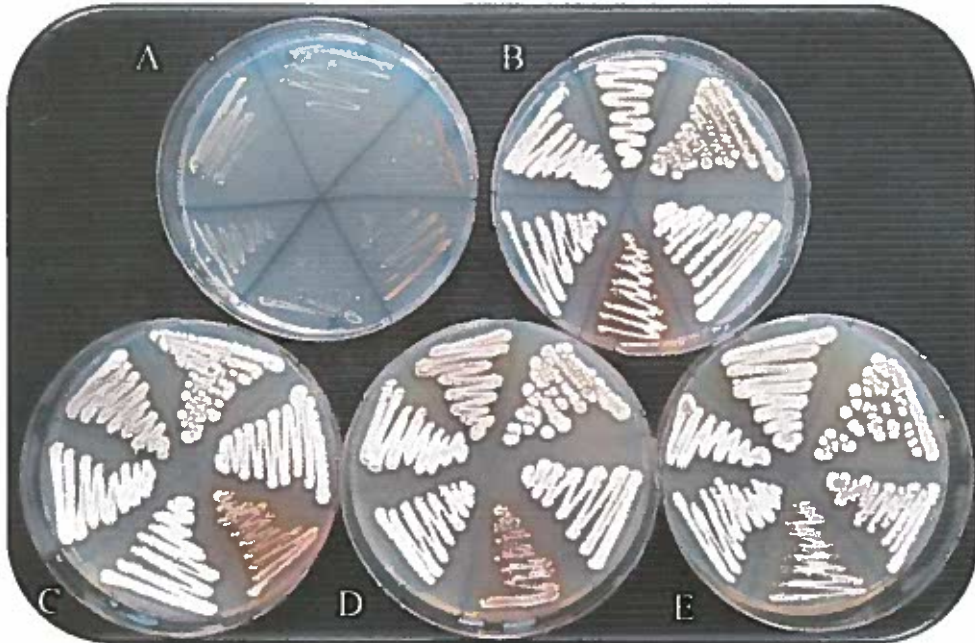
Tablo 4.6. Bazı izolatların tuz toleransları.

Tuz Yüzdesi İzolat No	Kontrol	%2.5	%5	%7.5	%10
BSC-13	++	++	++	++	-
BSC-17	++	++	++	++	-
BSC-37	++	++	++	++	-
BSC-38	++	++	++	++	-
BSC-45	++	++	++	++	-
BSC-49	++	++	++	++	-

++ iyi büyüme, + zayıf büyüme, - büyüme yok.



Şekil 4.10. İzolatların sıcaklık toleranslarının petri görüntüleri. A) 20°C, B) 25°C, C) 30°C, D) 37°C, E) 45°C, F) 50°C.



Şekil 4.11. İzolatların pH toleranslarının petri görüntüleri. A) pH 5, B) pH 6, C) pH 7, D) pH 8, E) pH 9.



Şekil 4.12. İzolatların tuz toleranslarının petri görüntüleri. A) Kontrol, B) %2.5, C) %5, D) %7.5, E) %10.

4.4.3. Moleküler Tanımlama

BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatların DNA'ları Bölüm 3.2'deki yöntemle göre izole edildi ve 16S rDNA PCR'ları yapıldı.

Moleküler tanımlamada kullanılan BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatlara ait 16S rDNA dizilerinin NCBI programında blast yapılması sonucunda Tablo 4.7'te verilen bakterilere benzediği bulundu. Seçili izolatların *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlendi.

Tablo 4.7. Yüksek aktivite gösteren BSC izolatlarının 16S rDNA analiz sonuçlarına göre benzediği bakteriler.

İzolat No	Erişim Numarası	Bakterinin Adı	Benzerlik Yüzdesi
BSC-13	KX352792	<i>Streptomyces griseorubens</i> strain JJ67	99
	KF742497	<i>Streptomyces coelicolor</i> strain 140	99
	FJ775012	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> isolate SA-5	99
	KF029644	<i>Streptomyces albogriseolus</i> strain ASC842	99
	MF352004	<i>Streptomyces viridodiatstaticus</i> strain sh15	99
BSC-17	JN627185	<i>Streptomyces variabilis</i> strain A4-3	99
	KU500360	<i>Streptomyces labedae</i> strain NHF7	99
	KJ571055	<i>Streptomyces erythrogriseus</i> strain 7-6	99
	HQ848083	<i>Streptomyces coelicolor</i> strain MLA-21	99
	NR_112312	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> strain NBRC 12871	99
BSC-37	KU535562	<i>Streptomyces griseorubens</i> strain G19	98
	KF742497	<i>Streptomyces coelicolor</i> strain 140	98
	KF029644	<i>Streptomyces albogriseolus</i> strain ASC842	98
	AB184516	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> subsp. <i>glucofermentans</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13833	98
BSC-38	KX352792	<i>Streptomyces griseorubens</i> strain JJ67	98
	KF742497	<i>Streptomyces coelicolor</i> strain 140	98
	AB184516	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> subsp. <i>glucofermentans</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13833	98
	MF352004	<i>Streptomyces viridodiatstaticus</i> strain sh15	98
	KF029644	<i>Streptomyces albogriseolus</i> strain ASC842	98
BSC-45	EU593727	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> strain 173998	96
	KJ789389	<i>Streptomyces matensis</i> strain SUZ96	96
	EU684319	<i>Streptomyces xylophagus</i> strain kx6	96
	X80827	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> 16S rRNA gene, strain NRRL 3985	96
	KY120283	<i>Streptomyces althioticus</i> strain PST5	96
	AY999782	<i>Streptomyces almquistii</i> strain NRRL B-1685	96
BSC-49	X80827	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i> 16S rRNA gene, strain NRRL 3985	97
	KU535562	<i>Streptomyces griseorubens</i> strain G19	97
	KF742497	<i>Streptomyces coelicolor</i> strain 140	97

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deniz mikroorganizmaları, tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli enzimlerin üretiminde giderek daha önemli bir kaynak haline gelmektedir (Bernan, 2004). Mikroorganizmalar arasında deniz aktinomisetlerinin ise sığ kıyı sedimentlerinden en derin sedimentlere kadar dünyanın her yerinden izolasyonları yeni bileşiklerin kaynağını oluşturmaktadır (Piel, 2004).

Deniz aktinomisetlerinin fizyolojik, biyokimyasal ve 16S rDNA gibi moleküler özellikleri incelendiğinde biyolojik olarak çeşitli aktif enzimler üreten karasal aktinomisetlerden farklı olduğu görülmektedir (Jenson ve Lauro, 2008). Aynı zamanda karasal ortamlarda geniş bir yaşam alanı bulmuş olan *Streptomyces* türlerine denizlerde de sıklıkla rastlanmaları ile birlikte karasal üyelerinden daha farklı türler içerdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Dharmaraj, 2010; Goodfellow ve Fiedler, 2010). Farklı türler içermesiyle beraber deniz ortamının, aktinomiset grubu bakterilerin zengin ve farklı bir kaynağı olduğunu göstermektedir (Williams, 2009). Buna göre denizde yaşayan bir alg türünden elde edilen kompost içinde hayatta kalabilen mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklara dayanabilen dirençli türler olabileceği ve bu türlerin zor koşullarda üreteceği sekonder metabolitlerin güçlü bileşikler olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kompostlar aktinomisetlerin yeni cins ve türleri için kaynaktır.

Kompostlaştırma ortamdaki bitki ve diğer canlıların materyali ayrıştırmasındaki kontrollü bir sürecidir. Bu süreçte bakteriler, mantarlar, protozoalar, algler, larvalar ve eklembacaklılar gibi makro ve mikroorganizmalar organik maddenin ayrıştırılmasına katılabilirler. Bununla birlikte, kompostlaştırma işlemleri genellikle ağırlıklı olarak karmaşık mikrobiyal topluluklar tarafından gerçekleştirilir (Ryckeboer ve ark., 2003). Bu tür yoğun mikrobiyal aktivite, sıcaklık ve pH'taki

değişiklikleri düzenler (Kumar, 2011). Kompostlama işlemi sırasında farklı zamanlarda bulunan organizmaların yüksek çeşitliliği, çalışma için önemli çevresel mikroorganizma ve türlerin kaynağını sağlar (Lima-Junior ve ark., 2016).

Deniz aktinomisetleri, potansiyel doğal ürünler kaynağı olarak karasal suşlara kıyasla daha az araştırılmaktadır (Yang ve Song, 2018). Bu nedenle araştırmalarda farklı deniz ortamlarından toplanan örneklerden aktinomisetler izole edilmektedir. Yapılan çalışmalarda farklı kaynak olarak alg kompostundan aktinomiset izolasyonu yapılmamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda farklı bir ortam olarak seçilen alg kompostundan yeni enzim ve antibakteriyel bileşikler keşfetmek için aktinomisetleri tarama çalışmaları önemlidir.

Bu çalışmada, Giresun ili sahilindeki bir alg türü olan *Cystoseira* sp. kompostundan 73 tane aktinomiset bakterisi izole edildi. Groth ve arkadaşları (1997) Almanya, Jena yakınlarındaki dondurulmuş kompost toprağı örneğinden yeni bir aktinomiset olan *Demetria terragena*'ı izole etmişlerdir. Diğer bir çalışmada Ghanem ve arkadaşları (2000) İskenderiye kıyısı boyunca aldıkları örneklerden aktinomiset izole etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Oskay ve arkadaşları (2004) Manisa ilinden ve çevresinden toplanan tarım toprak örneklerinden toplam 50 farklı aktinomiset suşu izole etmişlerdir. Jeffrey (2008) yaptığı çalışmada Malezya tarım topraklarından aldığı 7 toprak örneğinden 62 aktinomiset izole etmiştir. Amore ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada komposttan selülitik mikroorganizma olan *Streptomyces* sp. G12 suşunu izole etmiştir. Bir çalışmada Parthasarathi ve arkadaşları (2012) Güney Kore'nin Güney Batı Kıyısı'ndaki Bigeum Adası'nın sahilinden aldığı örneklerden 68 aktinomiset izole etmişlerdir. Özdemir ve Atalan (2012) yaptıkları çalışmada 51 toprak numunesinden *Streptomyces* suşları izole etmişlerdir.

Aktinomiset izolatları enzim aktivitelerine göre kantitatif olarak test edildi. Aktinomiset izolatlarının %68,5'i amilaz, %100'ü selülaz, %47,9'u kitinaz, %94,5'i pektinaz, %98,6'sı proteaz ve %96,3'ü lipaz/esteraz enzim aktivitesi gösterdi. Sztajer ve arkadaşları (1988), yaptıkları çalışmada lipolitik aktivite için 160'ın üzerinde mikroorganizma suşlarını taramıştır. Bu suşlar içerisinde en yüksek lipaz aktivitesini

Streptomyces sp., *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerinde belirlemişlerdir. Enzim üretimi, kültürün yaşından büyük ölçüde etkilenmiştir. Tribütirin ve zeytinyağı, lipaz üreten suşların en iyi karbon kaynağı olmuştur. Yapılan diğer bir çalışmada Selvam ve arkadaşları (2011), Hindistan sahil bölgesindeki deniz sedimentlerinden 56 deniz aktinomiseti izole etmiştir. Deniz aktinomisetlerinden 9 tanesini amilolitik, selüloolitik ve lipolitik aktivitelerine göre test etmişlerdir. Amilolitik ve selüloolitik aktiviteleri 1, 3, 51 ve 12, 29, 49 suşlarında koloniler etrafındaki hidroliz bölgelerinin açık zon oluşturmalarıyla bildirmişlerdir. Lipolitik aktiviteyi 3, 10, 28 suşlarında gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada da aktinomisetler ile yapılan benzer çalışmalardaki gibi izolatların yüksek enzim aktivitesi gösterdiği görülmektedir.

Bu çalışmada 73 izolat antibakteriyel aktivite taramasında karşıt çizgi yöntemi ile *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere 9 patojen test bakterilerine karşı test edildi. İzolatların %98,6'sı *Staphylococcus aureus* ve %84,9'u *Enterococcus faecalis* Gram pozitif test bakterilerine karşı çok yüksek etki gösterdi. *Yersinia pseudotuberculosis* Gram negatif test bakterisine karşı hiçbir izolat aktivite göstermedi. Aktinomiset izolatlarından 17 izolat Gram negatif bakterilerden *Klebsiella pneumonia*'ya karşı antibakteriyel aktivite gösterdi. Gram negatif bakterilerden *Salmonella typhimurium*'a karşı 1 izolatta antibakteriyel aktivite gözlemlendi. Buna göre aktinomiset bakterilerinin Gram pozitif test bakterilerine karşı daha iyi antibakteriyel aktivitesi olduğu görüldü. Yapılan bir çalışmada Oskay (2006) topraktan izole ettiği 251 *Streptomyces* izolatının antimikrobiyal etkisini 10 patojen organizmaya karşı test etmiştir. Test bakterilerine karşı en fazla antibakteriyel etki 35 (%13,94) izolat ile Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a karşı belirlemiştir. Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisi bulunan en yüksek izolat sayısı 12 (%4,78) ile *E. coli*'ye karşı, en düşük olarak ise 4 (%1,59) izolat tarafından *P. fluorescens*'e karşı belirlemiştir. Yapılan bu çalışmalara bakıldığında Gram negatif test bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip izolatların sayıca çok olmadığı görülmektedir. Çil ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada *Actinomadura*,

Kribella, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardioide*s, *Nonomurae* ve *Streptomyces* olan toprak aktinomisetlerine ait izolatların antimikrobiyal aktivitesini 10 patojen organizmaya karşı araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivitesi taranan aktinomiset izolatları içerisinde en yüksek inhibisyon zonu *Streptomyces* izolatında olmuştur. Sonuç olarak izolatlardan *Streptomyces* cinsine ait suşlarda önemli antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir.

Çalışmada BSC-37 nolu izolat diğer izolatlara göre 6 patojen bakteriye karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdi. BSC-37 nolu izolat, nokta ekim yöntemiyle 7 günlük inkübasyonu sonucu Gram pozitif *Staphylococcus aureus* test bakterisine karşı yüksek inhibisyon zonu oluşturdu. Ayrıca BSC-37 nolu izolatın fermantasyon sıvısında *Staphylococcus aureus* test bakterisine karşı antibakteriyel etkisi tespit edildi. Undabarrena ve arkadaşları (2017) çalışmasında denizden izole edilen *Streptomyces* sp. H-KF8 türüne *Staphylococcus aureus* test bakterisine karşı antibakteriyel aktiviteyi test etmek için çift katmanlı yöntem kullanmışlardır. Bu yöntem ile izolatın 6., 9. ve 15. günlerdeki inkübasyonu sonucu *S. aureus*'a karşı inhibisyon zonunu değerlendirmişlerdir. 5. günde, ISP2 ortamında, *Streptomyces* sp. H-KF8'in nispeten az bir koloni büyümesi gözlenmesine rağmen, 6. günde *S.aureus*'a karşı hafif bir inhibisyonu bildirmişlerdir. 15. gündeki inhibisyon zonunun 9. gündeki inhibisyon zonundan daha büyük olması büyüme ile antibakteriyel aktivite arasında da sıkı bir ilişki olduğunu düşündürmüştür. Bu çalışmada da genel olarak inhibisyon zonları inkübasyon süresi ile doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi.

Enzim ve antibakteriyel aktivite çalışmaları sonrasında yüksek aktivite gösteren BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatlar morfolojik, fizyolojik ve moleküler tanımlama için seçildi. Morfolojik tanımlamada izolatların koloni yapıları, Gram boyaması ve spor zincir morfolojilerine bakıldı. Gram boyaması yapılan 6 izolat Gram pozitif olarak değerlendirildi. Işık mikroskopunda incelenen izolatlarda aktinomisetlerde bulunan filamentli yapılar görüldü. Spor zincir morfolojilerini araştırmak üzere cover slip yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle göre SCA besiyerinde 7 gün inkübe edilen izolatların ışık mikroskopunda yapılan incelemede spor zincir yapıları düz, kanca şeklinde, yoğun spiralli, 1-2 döngülü spiraller şeklinde

tanımlandı. Yapılan bir çalışmada, Oskay (2006) Kuzey Kıbrıs topraklarından izole ettiği 251 *Streptomyces* suşundan seçilen 4 izolatın spor zincir morfolojilerini incelemiştir. Bu 4 izolatın *Streptomyces* benzeri spor zincir yapılarını mikroskopta havasal misel üzerinde uzun spor zincirlerini, spiral ve rektifleksibils şeklinde gözlemlemiştir. Ayrıca kolonilerin kültür ortamlarında başlangıçta derimsi-yumuşak iken sonradan sert-sıkı, koloni görünüşlerinin pamuksu oluşu ile izolatların *Streptomyces* cinsi üyeleri olduğunu düşünmüştür. Yapılan diğer bir çalışmada Ceylan (2007), *Streptomyces* cinsine özgü morfolojik özellikler gösteren izolatların test bakteriler üzerinde göstermiş oldukları yüksek antibakteriyel aktiviteye göre 3 izolatı seçmiştir. İzolatların seçimini test bakterilerine karşı yüksek inhibisyon zon değerlerine ve etki spektrumlarına göre yapmıştır. Seçilen 3 izolatın tür düzeyinde identifikasyonları sonucu izolatlardan OC. 25-4 ve OC. 124-2'nin spor zincir morfolojisinin *retinaculiaperti*, OC. 35-1'in spor zincir morfolojisinin ise spiral şeklinde olduğunu belirlemiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar Oskay (2006) ve Ceylan (2007) ile benzer sonuçlar göstermektedir. Bu çalışmada SCA ortamındaki koloni yapıları incelenen aktinomisetlerin Ventorino ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışmadaki *Streptomyces* türlerinin SCA ortamındaki koloni morfolojileri ile benzer sonuçlar gösterdiği görülmektedir. Ayrıca Chanthasena ve Nantapong (2016) yaptıkları çalışmada toprak örneklerinden izole ettikleri aktinomisetlerin SCA ortamındaki koloni yapıları ile yapılan bu çalışmadaki koloni yapıları benzemektedir. Fizyolojik tanımlama için 6 izolatın farklı sıcaklık, pH ve tuz oranlarında büyümesinin olup olmadığına bakıldı. Sıcaklık değerlerine bakıldığında 10°C'de hiçbir izolatta büyüme gözlenmedi. BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatlar 50°C'de büyüme gösterdi. Stackebrandt ve Schuman (2006) yaptıkları çalışmaya göre termofilik aktinomisetler yüksek sıcaklığın olduğu bitki atıkları, gübreler ve kompostlarda yer almaktadırlar. Ayrıca kompost mikroflorasının en önemli bileşenini oluştururlar. Yapılan bir çalışmada ise 45°C'de büyüyen aktinomisetler termotolerant, 55°C'de büyüeyebilen aktinomisetler termofilik olarak belirtilmiştir (Korn-Wenish ve Kutzner, 1992). Waksman ve arkadaşlarına (1939) göre ise kompost ve topraktaki termofilik aktinomisetlerin 50°C-65 °C arasında hatta 75 °C'de bile normal bir gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu benzer çalışmalar doğrultusunda BSC-45 ve BSC-49 nolu izolatların 50°C'de zayıf büyüme göstermesinden dolayı termofilik

yerine termotolerant olduğu söylenebilir. İzolatlar pH toleranslarına bakıldığında, pH 6-9 aralıklarında yoğun büyüme gösterdi. pH 5 değerine bakıldığında izolatlarda az büyüme gözlemlendi. Tuz toleransına bakıldığında izolatlar %2.5, %5 ve %7.5 oranlarında büyüdü, fakat %10 tuz oranında büyümedi. Benzer bir çalışmada, Öner (2011) 19 aktinomiset izolatının 4°C, 10°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C ve 60°C sıcaklık değerlerindeki büyüme varlığını incelemiştir. 4,55,60°C’de hiçbir izolat büyümemiştir ve 10-37°C’de tüm izolatlar büyümüştür. 45°C ve 50°C’de sadece 7 izolatta büyüme gözlemlenmiştir. Ayrıca 19 aktinomiset izolatı için besiyerlerine %2.5, %5, %7.5, %10, %12.5, %15, %17.5 oranlarında NaCl ilave etmiş ve üreyebildikleri tuz konsantrasyon aralıklarını belirlemiştir. Tüm izolatlar %7.5’luk ortamda üremeyi başarmışken, bir kısmı %10’luk ortamda üreyebilmiş, bir izolat da (07-SM-040) %12.5’luk ortamda az da olsa üreme göstermiştir. Yine aynı çalışmada 19 izolatın pH 2-12 arası toleranslarını belirlenmiştir. Tüm izolatlar pH 5-12 arasında büyümüştür ve pH 2-3 arasında büyümemiştir. pH 4’te sadece iki izolatta büyüme gözlemlenmemiştir.

Moleküler tanımlamada kullanılan izolatlara ait 16S rDNA PCR ürünleri NCBI programında blast yapılması sonucu BSC-13, BSC-17 %99; BSC-37, BSC-38 %98; BSC-45 %96 ve BSC-49 %97 benzerlik oranında *Streptomyces* cinsine ait olduğu bulundu. Benzer bir çalışmada, Ceylan (2007) Muğla ve civarındaki değişik bitki örtülerinin bulunduğu yerlerden aldığı toprak örneklerinden 154 *Streptomyces* suşu izole etmiştir. 154 izolata antibakteriyel aktivite testi uygulamıştır. Antibakteriyel aktivite ve etki spektrumlarını dikkate alarak seçtiği 3 izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal kriterler kullanılarak tanımlanmasını yapmıştır. 16S rDNA dizi analizine göre izolatların tanımlama sonuçları OC. 25-4 kodlu izolatın *Streptomyces bambergiensis*, OC. 35-1 kodlu izolatın *Streptomyces griseorubens* ve OC. 124-2 kodlu izolatın *Streptomyces griseoflavus* olarak bulunmuştur. Dolayısıyla aktinomisetler içerisinde *Streptomyces*’ler çok sayıda farklı metabolit üretmeleri nedeni ile önemli bir gruptur. Bu bakterilerin birbirlerine bazı özellikleri ile benzer olmalarından dolayı tür seviyesinde tanımlanmaları oldukça güçtür. Bu nedenle tür seviyesinde tanımlama yapabilmek için ileri fenotipik, kemotaksonomik ve moleküler analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, Giresun sahilindeki bir alg türü olan *Cystoseira* sp. kompostundan SCA ortamında saflaştırılarak 73 aktinomiset izolatı elde edildi. Bu izolatların enzim aktiviteleri incelendiğinde %68,5'i amilaz, %100'ü selülaz, %47,9'u kitinaz, %94,5'i pektinaz, %98,6'sı proteaz ve %96,3'ü lipaz/esteraz enzim aktivitesi gösterdiği bulundu. İzolatların antibakteriyel özellikleri incelendiğinde %98,6'sı *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve %84,9'u *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 Gram pozitif test bakterilerine karşı çok yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi. Yüksek aktivite gösteren izolatlar içerisinde BSC-37 nolu izolat, nokta ekim yöntemi ve fermantasyon sıvısı ile yapılan çalışmalarda *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 test bakterisine karşı yüksek antibakteriyel aktivitesi belirlendi. Yüksek enzim ve antibakteriyel aktivite gösteren BSC-13, BSC-17, BSC-37, BSC-38, BSC-45 ve BSC-49 nolu aktinomiset izolatları 16S rDNA dizi analizlerine göre *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- Aktuğlu, Y. 2002. Geçmişten Günümüze Antibiyotikler. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar. Sempozyum Dizisi, 31: 9-22.
- Ali, O.A.G. 1992. Formation of proteases by *Aspergillus fumigatus* and *Pencillium* sp. Journal King Saud University, 4: 127-136.
- Amore, A., Pepe, O., Ventorino, V., Birolo, L., Giangrande, C., Faraco, V. 2012. Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. Microb. Cell Factories, 11:64.
- Arunachalam, R., Wesely, E.G., George, J., Annadurai, G. 2010. Novel, cellulase production. Curr. Res. Bacteriol, 3(1): 15-26.
- Atlas, R.M. 2000. Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Boca Raton, 2051.
- Aydın, A. 1991. Sporlu Bitkiler Sistematığı I (Algler), İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 3593.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol, 45:493-496.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., Aragno, M. 1996. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). Appl. Environ. Microbiol, 62: 1723-1727.
- Bender, Ş. 2014. Evsel organik atıklarından yeni bir yöntemle kompost oluşturulması ve bu kompostun biber verimi üzerine etkisinin belirlenmesi. Çanakkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites from microorganisms. In bioactive metabolites from microorganisms. Elsevier Science Publishers, 3-25.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal view. J. Antibiot, 58: 1-26.
- Bernan, V.S., Greenstein, M., Carter, G.T. 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobials and antifungals. Curr. Med. Chem. Anti infective agents, 3: 181-195.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv, 18: 355-383.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D., Smith, N.R. 1957. Bergey's Manual of Determination Bacteriology, 7th Edition, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 146: 60-78.
- Ceylan, Ö. 2007. Antibiyotik üretici streptomisetlerin izolasyonu, idendifikasyonu, aktif metabolitlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Chanthasena, P., Nantapong, N. 2016. Biodiversity of antimicrobial-producing actinomycetes strains isolated from dry Dipterocarp forest soil in Northeast Thailand. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.59: e16150674.
- Chater, K.F., Chandra, G. 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 651-672.
- Cirik, S. ve Cirik, S., 2004. Su Bitkileri (Deniz Bitkilerinin Biyolojisi Ekolojisi Yetiştirme Teknikleri Ders Kitabı), Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir, 58.
- Cirik, Ş., Akçalı, B., Bilecik, N. 2001. Gökova Körfezi (Ege Denizi) Deniz Bitkileri, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Enstitüsü Yayınları, İzmir.
- Coşkun, A. 2010. Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Crandall, L.W., Hamill, R.L. 1986. Antibiotics produced by *Streptomyces*: Major structural classes, 355–402. In: Queener, St.W., Day, L.E. (ed.), *The bacteria*, vol. 9: Antibiotic producing *Streptomyces*, Academic Press, Orlando, FL.
- Cross, T. 1982. Actinomycetes: A continuing source of new metabolites. *Dev. Ind. Microbiol.* 23: 1-8.
- Çil, E., Işık, K., Özdemir-Koçak, F. 2016. Bazı toprak aktinomisetlerinin antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.* 6(2):75-84.
- Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 455-63.
- Denizci, A.A. 1996. Ege ve Doğu Karadeniz topraklarından izole edilen aktinomisetlerden antibakteriyal antibiyotiklerin aranması ve üretimi üzerine bir araştırma. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Dharmaraj, S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substance. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 2123-2139.
- Embley, T.M., Stackebrandt, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 257-289.
- Eyras, M.C., Rostagno, C.M., Defosse, G.E. 1998. Biological evaluation of seaweed composting. *Comp. Sci. Util.* 6:74-81.
- Fenical, W., Jensen, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2: 666-674.

- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C., Mihm, G. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 37-42.
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. *Br. J. Exp. Pathol*, 10: 226-236.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York Berlin Heidelberg, 206.
- Ghanem, N.B., Sabry, S. A., El-Sherif, Z. M., El-Ela G.A.A. 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 46(3): 105-11.
- Goodfellow, M., Fiedler, H.P. 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98: 119-142.
- Groth, I., Schuma, P., Rainey, F.A., Martin, K., Schuetze, B., Augsten, K. 1997. *Demetria terragena* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes isolated from compost soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol*, 47: 1129-1133.
- Gulve, R.M., Deshmukh, A.M. 2012. Antimicrobial activity of the marine actinomycetes. *Inter. Multidiscipl. Res. J*, 2(3): 16-22.
- Hassan, H.M., Degen, D., Jang, K.H., Ebright, R. H., Fenical, W. 2015. Salinamide F, new depsipeptide antibiotic and inhibitor of bacterial RNA polymerase from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J. Antibiot*, 68(3): 207-209.
- Hatano, K. 1999. Replacement of ATCC 21273, the current type strain of *Streptomyces rameus* Shibata 1959, with IFO 3782: Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 49: 931-932.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., William, S.T. 1994. *Streptomyces* and Related Genera, 605-667. In Hensyl, W.R. (ed), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edition, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory scale solid state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotech*, 64: 175-186.
- Hsieh, C.J., Jones, G.H. 1995. Nucleotide sequence, transcriptional analysis, and glucose regulation of the phenoxazinone synthase gene (*phsA*) from *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol*, 20: 5740-5747.
- Hütter, R. 1967. Classification of the streptomycetes with special regard to the antibiotics formed from them. *Bibl. Microbiol*, 6:1-382.
- Ito, S. 1997. Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, 1(2): 61-66.
- Jaeger, K.E., Eggert, T. 2002. Lipase for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol*, 13(4): 390-397.
- Jang, H.D., Chen, K.S. 2003. Production and characterisation of thermostable cellulase from *Streptomyces* transformant T3-1. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 19: 263-268.

- Jeffrey, L.S.H. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African J. Biotechnol*, 7(20): 3697-3702.
- Jenson, P.R., Lauro, F.M. 2008. An assessment of antibacterial diversity in the marine environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94: 51-62.
- Kar, S., Ray, R.C. 2008. Statistical optimization of alpha amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. *Polish J. Microbiol*, 57: 49-57.
- Karahan, A., Katırcıoğlu, Y.Z. 2014. Patateste patojen *Streptomyces* türlerinin tanımlama yöntemleri. *Selçuk Tar. Bil. Der.*, 1(2): 80-90.
- Kavuk, E. 2013. Bazı deniz makroalglerinden (*Ulva* sp., *Cystoseira* sp., *Corallina* sp.) süspanse organik gübre üretimi ve biyodeneyle etkisinin belirlenmesi. Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Keiser, T., Bibb, M.J., Buttner M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, United Kingdom.
- Kızıloğlu, T.F. 1995. Toprak Mikrobiyolojisi ve Biyokimyası. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Erzurum, 255.
- Korn-Wendisch, F., Kutzner, H.J. 1992. The Family Streptomycetaceae. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 921–995. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (ed), 2nd Edition., vol1. Springer-Verlag, NewYork.
- Kulkarni, N., Gadre, R.V. 2002. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J. Ind. Food. Microbiol*, 28: 344-348.
- Kumar, S. 2011. Composting of municipal solid waste. *Crit. Rev. Biotechnol*, 31(2): 112-36.
- Lacey, J. 1973. Actinomycetales; Characteristics and Pratical Importance. Skyes, G., Skinner, F. (ed), *The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No:2*, Acedemic Press, London- New York.
- Lacey, J. 1997. Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med*, 4: 113-121.
- Lacey, J., Lacey, M.E. 1964. Spore concentrations in the air of fram buildings. *Brit. Myco. Soc. Trans*, 47: 547-552.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61461.
- Lima-Junior, J.D., Viana-Niero, C., Oliveria, D.V.C., Machado, G.E., Rabello, M.C.S., Martins-Junior, J., Martins, L.F., Digiampietri, L.A., Silva, A.M., Setubal, J.C., Russell, D.A., Jacobs-Sera, D., Pope, W. H., Hatfull, G.F., Leão, S.C. 2016. Characterization of mycobacteria and mycobacteriophages isolated from compost at the São Paulo Zoo Park Foundation in Brazil and creation of the new mycobacteriophage Cluster U. *BMC Microbiol*, 16:111.

- Liman, R. 2007. *Streptomyces coelicolor*'daki metabolik değişiklikler üzerine bir araştırma. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Limaye, L., Patil, R., Ranadive, P., Kamath, G. 2017. Application of potent actinomycete strains for bio-degradation of domestic agro-waste by composting and treatment of pulp-paper mill effluent. Adv. Microbiol, 7: 94-108.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pederson, J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. J. Clin. Microbiol, 38: 471.
- Madigan, M.T., Martingo, J.M. 2010. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çeviri Editörü: Cumhur Çökmüş, Palme Yayınevi, Ankara, 331-394.
- Manteca, A., Fernandez, M., Sanchez, J. 2005. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. BMC Microbiol, 5: 51.
- Meij, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I., Wezel, G.P. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev, 41(3): 392-416.
- Miyadoh, S., Hamada, M., Hotta, K., Seino, A., Vobis, G., Yokota, A. 1997. Digital Atlas of Actinomycetes: Society for Actinomycetes, Japan: Akasura Publishing, Tokyo, Japan, 244.
- Masayuki, T., Rita, R.C., Russell, T.H. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol, 59: 997-1002.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinobacteria taxon in ocean sediments. Appl. Environ. Microbiol, 68: 5005-5011.
- Okami, Y., Hotta, K. 1988. Search and Discovery of New Antibiotics, In Goodfellow, M., Williams, S.T., Mordarski, M. (ed.), Actinomycetes in Biotechnology, Academic Press, Inc., San Diego, 33-67.
- Oskay, M., Tamer, A.Ü., Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African J. Biotechnol, 3 (9): 441-446.
- Oskay, M. 2006. Kuzey Kıbrıs topraklarından antimikrobiyal aktivitesi yüksek *Streptomyces* suşlarının izolasyonu, taksonomisi ve fermentasyon çalışmaları üzerine bir araştırma. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Oskay, M., Tamer, A. 2009. *Streptomyces* kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarın. J. New World Sci. Academy, 4: 48-60.
- Öner, M. 1989. Actinomycetes (Selman A. Waksman 1967'den çeviri). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 89. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 328.
- Öner, M., Tamer, A.Ü., Bursalıoğlu, M. 1987. Rifamisin kompleksinin üretimi. Mikrobiyoloji Bült, 21: 296-300.

- Öner, Ö. 2011. Denizel kaynaklardan aktinomiset grubu mikroorganizmaların izolasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Özcan, K. 2012. Türkiye'deki bazı denizel sedimentlerin prokaryotik çeşitliliğinin metagenomik analizle belirlenmesi ve denizel aktinomisetlerden antimikrobiyal bileşiklerin izolasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Özdemir, K., Atalan, E. 2012. Van yöresinde yetişen *Lens orientalis* (Boiss.) Hand & Mazz. ve *Cicer anatolicum* Alef. bitki kök topraklarından *Streptomyces* suşlarının izolasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/J. Inst. Nat. Appl. Sci, 17(2): 95-10.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. 2000. Advances in microbial analysis. Biotechnol. Appl. Biochem, 31: 135-152.
- Pandza, K., Pfalze, G., Cullum, J., Hranueli, D. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. Microbiol, 143: 1493-1501.
- Parthasarathi, S., Sathya, S., Bupesh, G., Manikandan, M., Kim, C.J., Manikandan, T., Balakrishnan, K. 2012. Isolation, characterization and extraction of antimicrobial compound from marine actinomycete *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. Res. J. Biotechnol, 8(3): 40-49.
- Piel, J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. Nat. Prod. Rep, 21: 519-533.
- Roberts, W. K., Selitrennikoff, C.P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gene. Microbiol, 134: 169-176.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., Swings. J. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. J. Appl. Microbiol, 94(1): 127-37.
- Sahilah, A.M. 1991. Aktinomiset yang berkaitan dengan bahan buangan ternakan ayam. BSc Tesis, University Malaya, Malaysia. (Jeffrey, L.S.H., Sahilah, A.M., Son, R., Tosiah, S. 2007. Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. J. Trop. Agric. And Fd. Sc. 35(1): 159-164).
- Sanglier, J.J., Wellington, E.M.H., Behal, V., Feidler, H.P., Ghorbel, R.E., Finance, C., Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D.K., Prinzi, S., Tringo, C. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes. Res. Microbiol, 144: 661-663.
- Selvam, K., Vishnupriy, B., Subhash-Chandra-Bose, V. 2011. Screening and quantification of marine actinomycetes producing industrial enzymes amylase, cellulase and lipase from South Coast of India. IJPBA, 2(5): 1481-1487.
- Schinko, E., Schad, K., Eys, S., Keller, U., Wohlleben, W. 2009. Phosphinothricin-tripeptide biosynthesis: An original version of bacterial secondary metabolism?. Phytochem, 70(15-16): 1787-1800.
- Schmid, R.D., Verger, R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. Angew. Chem. Int. Ed, 37: 1608-1633.

- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv*, 19: 627-662.
- Sharma, M., Dangi, P., Choudhary, M. 2014. Actinomycetes: source, identification, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 3(2): 801-832.
- Sheldon, P.J., Mao, Y., He, M., Sherman, D.H. 1999. Mitomycin resistance in *Streptomyces lavendulae* includes a novel drug- binding- protein- dependent- export sSystem. *J. Bacteriol*, 8: 2507-2512.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *IJSEM*, 3: 313-340.
- Singh, R., Kumar, V., Kapoor, V. 2014. Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. Hindawi Publishing Corporation, ID 106363.
- Suihko, M.L., Kroppenstedt, E.R., Stackebrandt, E.E. 2006. Occurrence and characterization of *Actinobacter* and *Thermoactinomyces* isolated from pulp and board samples containing recycled fibres. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 33: 183-191.
- Stackebrandt, E., Schumann, P. 2006. Introduction to the taxonomy of actinobacteria. *The Prokaryotes*, 3: 297-321.
- Steger, K., Jarvis, A., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I. 2007. Effects of differing temperature management on development of actinobacteria populations during composting. *Res. Microbiol*, 158: 617-624.
- Sztajer, H., Maliszewska, I., Wieczorek, J. 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol*, 10(8): 492-497.
- Tan, H., Deng Z., Cao, L. 2009. Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Lett. Appl. Microbiol*, 49: 248-253.
- Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S.A., 1993. Integrated Solid Waste Management Mc-Graw-Hill. International Editions, Civil Engineering Series.
- Thompson, C.J., Fink, D., Nguyen, D. 2002. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol. Rev*, 3: 1020.
- Tresner, H.D., Da-Vies, M.C., Englert, M.E. 1966. Morphological subtype of the smooth-spored streptomycetes. *L. Bacteriol*, 91: 1998-2005.
- Tüney, İ. 2011. Kuzey Ege denizinde bulunan *Cystoseira* türlerinin moleküler özelliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Doktora Tezi.
- Undabarrena, A., Ugalde, J.A., Seeger, Michael., Cámara, B. 2017. Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp. H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis. *PeerJ*, 5: 2912.

- Ünsaldı, E. 2010. Medium optimization for cephamycin C overproduction and comparison of antibiotic production by ask, hom and ask+hom recombinants of *Streptomyces clavuligerus*. Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences, Master Thesis.
- Ventorino, V., Lonata, E., Birolo, L., Montella, S., Marcolongo, L., Chiaro, A., Espresso, F., Faraco, V., Pepe, O. 2016. Lignocellulose-adapted endo-cellulase producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. *Front. Microbiol*, 7: 2061.
- Verdine, G.L. 1996. The combinatorial chemistry of nature. *Nature*, 384: 11- 13.
- Waksman, S.A., Umbreit, W.W., Cordon, T.C. 1939. Thermophilic actinomycetes and fungi in soil and in composts. *Soil Sci.* 47: 37-61.
- Waksman, S.A., Henrici, A.T. 1943. The Nomenclature and Classification Of The Actinomycetes, New Jersey Agricultural Experiment Station, Rutgers University, and the Department of Bacteriology, University of Minnesota, 337-341.
- Waksman, S.A. 1950. The Actinomycetes Their Nature, Occurrence, Activities, and Importance. Published by the Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A.
- Waksman, S.A. 1989. Actinomycetes, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 328.
- Waksman, S.A., Schatz, A., Reynolds, D.M. 2010. Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 1: 112-124.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch. Microbiol*, 176: 386-390.
- Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E.M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H.U., Lee, S.Y. 2015. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends Biotechnol*, 33(1): 15-26.
- Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*, New York Dordrecht Heidelberg London, 87.
- Williams, P.G. 2009. Panning for chemical gold: Marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol*, 27: 45-52.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackins, M.J. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gene. Microbiol*, 129: 1743-1813.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}, 2452-2492. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Williams, S.T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D.I., Kuznetsov, V.D., Lemonnier, F.J., Long, P.F. 1993. Detection and identification of novel actinomycetes. *Res. Microbiol*, 144(8): 653-656.

- Witt, D., Stackebrandt, E. 1990. Unification of the genera *Streptovericillium* and *Streptomyces* and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339^{AL}. Syst. Appl. Microbiol, 13: 361-371.
- Yallop, C.A., Edwards, C., Williams, S.T. 1997. Isolation and growth physiology of novel *Thermoactinomyces*. J. Appl. Microbiol, 83: 685-692.
- Yang, N., Song, F. 2018. Bioprospecting of novel and bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from South China sea sediments. Curr. Microbiol, 75(2): 142-149.
- Yap, S.M. 2015. Isolation and Characterisation of Metaltolerant Actinomycetes From a Karstic Cave in Malaysia. University of Malaya Kuala Lumpur, Institute of Biological Sciences Faculty of Science.

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep Şule TOPATAN 1990 yılında Sivas'ta doğdu. İlk ve orta eğitimini Trabzon İskender Paşa İlköğretim Okulu'nda 2003 yılında tamamladı. 2006 yılında Ankara Kaya Bayazıtöğlu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Giresun Üniversitesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nü 2013 yılında bitirdi. 2014 yılında Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.