



**İMMOBİLİZE EDİLMİŞ *Streptomyces griseus*
HÜCRELERİ İLE STREPTOMİSİN ÜRETİMİ**

Pelin ERDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Anabilim Dalı: Biyomühendislik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan KALENDER

EYLÜL 2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMOBİLİZE EDİLMİŞ *Streptomyces griseus* HÜCRELERİ İLE
STREPTOMİSİN ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pelin ERDEMİR

171132104

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 29.07.2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 16.09.2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan KALENDER

Diğer Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM

Dr. Öğr. Üyesi Aykut TOPDEMİR

H. Kalender
Arserim
Topdemir

EYLÜL -2019

ÖNSÖZ

Çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmam boyunca bana yol gösteren ve destekleyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Hakan KALENDER' e,

Bu zamana kadar desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan annem Sezin ERDEMİR'e babam Besim ERDEMİR'e, amcam Metin ERDEMİR'e ve engellerle dolu olan, aslında o engellerle benim başarıma katkıda bulunan, başarılı olmamı her daim kamçılayan, daha fazla gayret etmemi sağlayan otizmli kardeşim Furkan ERDEMİR'e,

Bu tezi MF.18.59 proje numarası ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)' ne,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Pelin ERDEMİR
ELAĞIĞ – 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
KISALTMALAR	XIV
1.GİRİŞ	1
1.1. Antibiyotikler	2
1.1.1. Antibiyotik Tanımı ve Tarihçesi	2
1.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	2
1.1.2.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması.....	2
1.1.2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması	4
1.1.2.3. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	5
1.1.3. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları	7
1.1.3.1. Hücre Duvarını Hedef Alan Antibiyotikler.....	7
1.1.3.1.1. Beta-laktam Antibiyotikler	8
1.1.3.2. Protein Biyosentezi İnhibitörleri	8
1.1.3.2.1. 30S Alt Birimine Bağlananlar	8
1.1.3.2. 50S Alt Birimine Bağlananlar	9
1.1.3.3. DNA Replikasyon İnhibitörleri.....	9
1.1.3.4. Folik Asit Mekanizması İnhibitörleri.....	9
1.1.4. Antibiyotiklere Mikrobiyal Direncin Temeli.....	10
1.1.4.1 Kalıtsal (Doğal) Direnç	10
1.1.4.2. Kazanılmış Direnç.....	10
1.1.5.Antibiyotiklerin Direnç Mekanizmaları.....	11
1.1.6. İmmobilizasyon Tanımı ve Gelişimi	13
1.1.6.1. İmmobilizasyon Teknikleri	14
1.1.6.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Metodu	15

1.1.6.1.2. Kovalent Bağlama Metodu	15
1.1.6.1.3. İyonik Bağlama Metodu	15
1.1.6.1.4. Fiziksel Adsorpsiyon Metodu.....	15
1.1.6.1.5. Biyospesifik Bağlama Metodu	16
1.1.6.1.6. Çarpaz Bağlama Metodu.....	16
1.1.6.1.7. Tutuklama Metodu	16
1.1.6. Hücre İmmobilizasyonu Destekleri	16
1.1.7. Çalışmanın Amacı.....	17
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1 Materyal.....	18
2.1.1 Bakteri Suşları.....	18
2.1.2. Kimyasallar ve Sarflar	18
2.1.3. Cihazlar	18
2.1.4. Besiyerleri.....	19
2.1.4.1. Nutrient Agar (Lab M)	19
2.1.4.2.Nutrient Broth (Lab M).....	19
2.1.4.3. Nişasta Kazein Agar.....	19
2.1.4.4. Nişasta Kazein Broth.....	19
2.1.4.5. Müller Hinton Agar (Himedia)	20
2.2. Metot.....	20
2.2.1. Streptomisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem İle Bulunması	20
2.2.2. Liyofilize <i>S.griseus</i> Suşunun Üretilmesi	20
2.2.3. Streptomisin Üretimi İçin Serbest <i>S. griseus</i> Suşunun Kullanılması.....	21
2.2.4. <i>S. griseus</i> Suşunun İmmobilize Edilme Yöntemi	21
2.2.5. Fermantasyon Ortamlarında Üretilen Streptomisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti.....	22
2.2.6. SPSS Programı ile İstatiksel Analiz.....	23
3.BULGULAR	24
3.1. Streptomisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunması	24
3.2. Streptomisin Üretimi İçin Serbest <i>S. griseus</i> Suşunun Kullanılması	25
3.3. Streptomisin Üretimi İçin İmmobilize <i>S. griseus</i> Suşunun Kullanılması.....	37

3.4. Fermantasyon Ortamlarında Üretilen Streptomisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti	45
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	57



ÖZET

Antibiyotikler, bakterileri öldüren veya gelişmesini durduran, biyolojik kaynaklı ya da sentetik olarak elde edilen, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan biyoaktif maddelerdir. Streptomisin antibiyotiği pekçok hastalığın tedavisinde kullanılan bir antibiyotik olması yönüyle aminoglikozidler arasında önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada serbest ve immobilize edilmiş *S.griseus* hücreleri kullanılarak farklı sıcaklık, farklı çalkalama hızı ve farklı karbon kaynakları içeren ortamların streptomisin antibiyotiğinin üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, streptomisin üretimi için, karbon kaynağı olarak nişasta ve farklı konsantrasyonlarda şeker pancarı melası içeren iki farklı ortam kullanıldı. Hem serbest bakteri hücrelerinin hem de PVA/aljinat ile immobilize edilen bakteri hücrelerinin streptomisin üretimi üzerine etkileri incelendi.

Çalışmamız sonucunda, karbon kaynağı olarak kullanılan 30 g/l şeker pancarı, 33°C sıcaklık ve 200 rpm fermantasyon ortamında 3. gün sonunda 0,986 µg/ml*saat ile en yüksek verimlilik değerine ulaşıldı. PVA/aljinat ile yapılan immobilizasyon deneyleri sonucunda ise ilk gün 2,019 µg/ml*saat ile en yüksek verimlilik değeri elde edildi.

Sonuç olarak şeker pancarı melası karbon kaynağıyla yapılan deneylerde nişasta karbon kaynağına göre daha düşük maliyette bir streptomisin üretimi sağlanmış, daha yüksek verim ve verimlilik değerleri elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Streptomisin, İmmobilizasyon, *Streptomyces griseus*, Antibiyotik

SUMMARY

Production of Streptomycin with Immobilized *Streptomyces griseus* Cells

Antibiotics are bioactive substances commonly used in the treatment of human and animal diseases, either biologically or synthetically derived, which kill bacteria or stop their growth. Streptomycin antibiotic has an important place among aminoglycosides as it is an antibiotic used in the treatment of many diseases. In this study, free and immobilized *S. griseus* cells were used to investigate the effects of different temperature, different agitation rate and different carbon sources on streptomycin antibiotic production.

In our study, two different media containing starch and sugar beet molasses of different standards were used as the carbon source for streptomycin production. Effects of both free bacteria cells and bacterial cells immobilized with PVA/alginate on streptomycin production were investigated.

In this study, the highest value was reached with $0.986 \mu\text{g} / \text{ml} * \text{hour}$ at the end of the 3rd day in 30 g / l sugar beet used as carbon source, 33°C temperature and 200 rpm fermentation. Immobilization experiments with PVA / alginate yielded the highest efficiency at $2.019 \mu\text{g} / \text{ml} * \text{h}$ on the first day.

As a result, in the experiments carried out with sugar beet molasses carbon source, streptomycin production was provided at a lower cost than starch carbon source and higher yield and efficiency values were obtained.

Keywords: Streptomycin, Immobilization, *Streptomyces griseus*, Antibiotic

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. <i>S. griseus</i> 'un morfolojik görüntüsü.....	7
Şekil 1.2. Streptomisin kimyasal yapısı	7
Şekil 1.3. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları.	10
Şekil 3.1. UV kalibrasyon için farklı konsantrasyonlardaki streptomisin numuneleri.	24
Şekil 3.2. Streptomisin kalibrasyon grafiği.	25
Şekil 3.3. Nutrient kazein agar'da üreme.	26
Şekil 3.4. Nutrient kazein broth'da üreme.	26
Şekil 3.5. Nişasta kazein broth ve farklı şeker pancarı melası fermantasyon ortamları ile streptomisin üretimi.	26
Şekil 3.6. Serbest hücre nişasta karbon kaynağı verim değerleri.	29
Şekil 3.7. Serbest hücre nişasta karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (30 santigrat).	29
Şekil 3.8. Serbest hücre şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı verim değerleri. ..	31
Şekil 3.9. Serbest hücre şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı için en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	32
Şekil 3.10. Serbest hücre şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı verim değerleri. ..	34
Şekil 3.11. Serbest hücre şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	34
Şekil 3.12. Serbest hücre şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı verim değerleri. ..	37
Şekil 3.13. Serbest hücre şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	37
Şekil 3.14. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin verim değerleri.	42
Şekil 3.15. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun nişasta karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	42

Şekil 3.16. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası(20g/l) ile streptomisin verim değerleri.	43
Şekil 3.17. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası(20g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	43
Şekil 3.18. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) ile streptomisin verim değerleri.	43
Şekil 3.19. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	44
Şekil 3.20. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) ile streptomisin verim değerleri.	44
Şekil 3.21. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).	44
Şekil 3.22. Fermantasyon ortamında üretilen streptomisin antibiyotiğinin antimikrobiyal aktivite test görüntüsü.	45

TABLolar LİSTESİ

Sayfa No

Tablo.3.1.	Streptomisin kalibrasyon eğrisinin spektrofotometrik yöntem ile bulunması deneyinin absorbans sonuçları tablosu.....	24
Tablo 3.2.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı)	27
Tablo 3.3.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı)	27
Tablo 3.4.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı)	27
Tablo 3.5.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı)	28
Tablo 3.6.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı)	28
Tablo 3.7.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı)	28
Tablo 3.8.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu 30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı)	29
Tablo 3.9.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı)	30
Tablo 3.10.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı)	30
Tablo 3.11.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı)	30
Tablo 3.12.	Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı)	31

Tablo 3.13. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	31
Tablo 3.14. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	32
Tablo 3.15. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	32
Tablo 3.16. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	33
Tablo 3.17. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	33
Tablo 3.18. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	33
Tablo 3.19. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	34
Tablo 3.20. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	35
Tablo 3.21. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	35
Tablo 3.22. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	35
Tablo 3.23. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	36

Tablo 3.24. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	36
Tablo 3.25. Serbest <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).....	36
Tablo 3.26. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	38
Tablo 3.27. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (20 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	38
Tablo 3.28. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (30 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	39
Tablo 3.29. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (40 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	39
Tablo 3.31. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (20 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	40
Tablo 3.32. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (30 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	40
Tablo 3.33. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (40 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	40
Tablo 3.34. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	41
Tablo 3.35. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (20 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	41

Tablo 3.36. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (30 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	41
Tablo 3.37. İmmobilize <i>S. griseus</i> suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (40 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).....	42



KISALTMALAR

AG	: Aminoglikozid
FQ	: Florokinolonlar
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
PVA	: Polivinil alkol
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
S (30S vb.)	: Svedberg ünitesi
PBP	: Penisilin bağlayıcı proteinler
G	: Gram
°C	: Santigrat Derece
l	: Litre
Dk	: Dakika
ml	: Mililitre
M	: Molar
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
Sn	: Saniye
Nm	: Nanometre
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı

1.GİRİŞ

Biyoaktif doğal ürünler; antibiyotikler, antitümör ajanlar, toksinler ve sideroforları içeren, işlevsel olarak birbirinden oldukça farklı biyokimyasal sınıflara dahil olan bileşiklerdir. Biyoaktif doğal ürünlerin en önemli grubunu teşkil eden sekonder metabolitler kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı diğer makromoleküllerden ayrılırlar (Cannell, 1998).

Bitkiler ve mikroorganizmalar önemli biyoaktif sekonder metabolit üreticisidirler. Her iki organizma grubunun sentezlemiş olduğu bileşikler karşılaştırıldığında mikroorganizmalarca sentezlenen sekonder metabolitler, kimyasal yapıları bakımından daha kompleks olup, daha fazla çeşitlilik gösterir. Sekonder metabolitler sahip oldukları özel kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı ilaç araştırmalarında öncül madde olma niteliğine sahiptirler. Mikrobiyal sekonder metabolitler; antibiyotiklerin üretiminde en büyük paya sahiptir. 1983–1994 yılları arasında keşfedilen 520 yeni ilacın, yaklaşık %39'u mikrobiyal kaynaklıdır. Şu ana kadar keşfedilen mikrobiyal kaynaklı antibiyotiklerin çoğunluğu *Streptomyces* cinsinin üyeleri tarafından üretilmektedir ve henüz bu antibiyotiklerin sadece % 3'ünün belirlendiği sanılmaktadır (Oskay ve Tamer, 2009).

Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu yaygın kullanımları hem ekonomik yükü hem de yan etkilerinin sıkça ortaya çıkmasına yol açmış, bu ise aynı zamanda, toplum sağlığını da tehdit eder bir hale gelmelerine neden olmuştur. Özellikle az gelişmiş toplumlarda bilinçsizce kullanılması ve patojen mikroorganizmaların bunlara karşı hızla direnç kazanmaları sorun olmaktadır. Bundan dolayı antibiyotiklere karşı direnç kazanılması, yeni ve daha etkili ilaçların doğal ya da yapay yolla acilen üretilmeleri gerektiği konusunda bilim adamlarını bir araya getirmiştir. Tam zamanlı klasik antibiyotik araştırma programlarına ek olarak, mikrobiyal genetiğe dayanan yeni bütünleşik metodlar devreye sokulmuştur. Bunlar arasında daha çok, antibiyotik üretiminden sorumlu gen dizilerinin belirlenmesi ile biyosentez teknolojisi ön plana çıkmaktadır (Levy, 1992).

1.1. Antibiyotikler

1.1.1. Antibiyotik Tanımı ve Tarihçesi

Mantar veya benzeri mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların ve başka canlıların gelişmesini durdurma ve hatta bunları öldürme gücü bulunan doğal ya da kimyevi maddelere "antibiyotik" denir (Öner, 1992). Antibiyotik terimi, Yunanca “anti (karşı)” ve “bios (yaşam)” sözcüklerinden türetilmiştir. Yine sözlüklerdeki tanımlamasıyla ‘bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır’ (Tunçtan ve Buharalıoğlu, 2005).

İlk antibiyotik 1929 yılında *Penicillium* küfü ile kontamine agar plağında stafilokokların üremesinin inhibe olduğunu gözleyen Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. İkinci Dünya Savaşı sırasında savaşla ilişkili yaraların sekonder bakteriyel enfeksiyonların ve pnömoni, sepsis gibi sistemik enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılarak, bu nedenle olabilecek ölümler azaltılmıştır. Bundan sonraki yıllarda her yeni antibiyotik veya antibiyotik sınıfının kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmaya başlamıştır. Penisilinin kullanıma girmesinden sonraki 40 yılda 20 antibiyotik sınıfı keşfedilmesine rağmen, 1980 yılından sonra çok az sayıda önemli antibiyotik keşfedilmiştir. Direnç sorununu aşacak antibiyotiklerin geliştirilmesinin direnç gelişimine göre daha yavaş olması ve önemli miktarda ekonomik kaynak gerektirmesi konunun önemini ortaya koymaktadır. Son zamanlarda sinüzit, akut otitis media, pnömoni gibi çocukluk çağı enfeksiyonlarının ve menenjitin en sık etkenlerinden biri olan *Streptococcus pneumoniae*’nin direnç geliştirmesi sorunun boyutlarını artırmıştır. Ayrıca bugün için enterokoklar, stafilokoklar gibi bazı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların varolan antibiyotiklerin hiçbiri ile tedavi edilememesi potansiyel bir tehlikedir (Kümmerer, 2009) .

1.1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

1.1.2.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler birçok kritere göre gruplandırılabilir. Günümüzde en yaygın bilimsel sınıflandırma aşağıda belirtildiği gibi etki güçlerine, etki mekanizmalarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırmadır. Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki

derecelerine göre iki farklı gruba ayrılır. Bunlar bakteriyostatikler ve bakterisidlerdir. Bakteriyostatikler, bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Bakteriyostatikler, tetrasiklinler, makrolid, sülfonamidler, amfenikoller, linkozamidler, metronidazol ve mikonazol olarak farklı gruplara ayrılırlar. Bakterisidler ise ağır tahribatlar yaratarak bakteri hücrelerini yok ederler ve hücrenin ölmesine neden olurlar. Bu şekilde etki eden bakterisidler beta laktamlar (penisilinler, sefalosparinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta laktamaz inhibitörleri), polipeptidler, florokinolonlar, vankomisin, rifamisin ve teikoplanindir (Akkan, 1997).

Tetrasiklinler, geniş spektrumlu bir antibiyotik grubu olup bakteriyostatik etki gösterirler. Tetrasiklinler pasif difüzyonla gram negatif bakterilerin porinlerinden bakteriye girer (Nguyen vd., 2014). Tetrasiklinler memeli hücrelerinde, özellikle mitokondriyal ribozomlarda da protein sentezini durdurur, ama ciddi toksisite oluşturacak düzeyde birikim olmaz (Beğendik vd., 1999).

Makrolidler, 1952’de eritromisinin bulunmasının ardından çeşitli kullanıma sunulmuştur (Özaras vd., 2002).

Sülfonamidler, insanlarda 1930’lu yıllarda kullanılmaya başlanan sistemik etkili ilk antibakteriyal ilaçlardır (Mondal, 2017). Folik asit sentezini bozarak sonuçta DNA sentezini azaltıp mikroorganizmanın büyümesini engellemek suretiyle bakteriyostatik etki gösterirler. Bu etkiyi gösterirken bakteriyal direnci azaltmaları ve sinerjistik etki göstermeleri bu antibiyotiklerin iki önemli avantajıdır (Altun vd., 1998).

Linkozamitler grubunda linkomisin ve klindamisin antibiyotikleri bulunmaktadır. Linkomisin 1962 yılında elde edilmiştir. Linkozamidler, etki şekli ve spektrumları bakımından makrolidlere benzerler (Maslinska, 2013). Sığırlarda ciddi yan etkilere neden olduklarından dolayı kullanılmaları pek tavsiye edilmez (Kaya, 2007). Bakteri ribozomlarının 50S alt kısmına bağlanıp protein sentezini engellerler. Bakteriyostatik etki gösterirler. Klindamisin, düşük dozlarda bile opsonizasyon, fagositoz ve hücre içi bakteri öldürülmesini kolaylaştırır (Drusano, 2001).

Metronidazol, 1957 yılında bulunmuş, protozoonlara ve anaerobik bakterilere karşı etkin sentetik bir ilaçtır. Nitroimidazol bileşiğidir (Naveed vd., 2014). Hücre içine pasif difüzyonla girdikten sonra bir dizi reaksiyondan sonra kısa yarı ömürlü metabolitleri ortaya çıkar. Bu metabolitler bakterinin DNA’sına zarar vererek ölümüne yol açar. Bu

sürecin işleyebilmesi için düşük bir oksidasyon-redüksiyon potansiyeli gerektirdiğinden aerobik bakterilere karşı etkin değildir (Falagas ve Gorbach, 1995).

1.1.2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılır. Bunlar; bakteri hücre duvarı sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotikler, sitoplazma membran permeabilitesini bozan antibiyotikler, ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler, bakteri genetik materyali üzerine etki yapan antibiyotikler ve bakteriyel antimetabolitlerdir. Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotikler; beta laktamlar (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler), siklosein, ristosetin, basitrasin, teikoplanin ve vankomisinidir. Sitoplazma membran permeabilitesini bozan antibiyotikler deterjan etkisi yapanlar olarakta bilinmektedir. Bunlar; polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, kandisein, ketokonazol ve diğer antifungal imidazoller, flukonazol ve diğer antifungal trizoller, heksaklorofen ve katyonik deterjanlardır. Ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, amfenikoller, linkozamidler ve fusidik asit olarak sınıflanırılabilir. Bakteri genetik materyali üzerine etki yapan antibiyotikler, DNA ve RNA sentezini bozanlar olarakta tanımlanabilir (Shlaes vd., 1993 ; Akkan, 1997).

Penisilinler, tıp alanında kullanılan en eski antibiyotiklerdir (Marques vd., 2018). Bakterisid aktiviteye sahip olmaları, tüm vücuda dağılım gösteren iyi bir farmakokinetik özellikleri, toksisitelerinin az olması, ucuz olması ve duyarlı olan bakteriyel enfeksiyonlarda etkin sonuçlar oluşturması gibi özelliklerinden ötürü pek çok enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kurt, 2000).

Sefalosporinler, altı üyeli dihidrotiyazin halkası ve buna bağlı dört üyeli beta laktam halkasından oluşan kimyasal yapıya sahiptirler (Marques vd., 2018). İlk olarak 1940'lı yıllarda *Cephalosporicum acremonium* isimli bir mantardan elde edilen sefalosporin C'nin bulunmasından itibaren, günümüze kadar moleküler özellikleri sürekli geliştirilerek antibakteriyel tedavide yaygın kullanılan antibiyotik türlerinden biri durumuna gelmiştir (Barriere ve Flaherty, 1984).

Karbapenemler, beta laktam halkası bulunduran, karbon atomu sülfür ile yer değiştirmiş olan bir kimyasal yapıya sahip ve bugüne kadar geliştirilen en geniş spektrumlu beta laktam grubu antibiyotiklerdir (Marques vd., 2018). Hem gram pozitif

hem de gram negatif aerob ve anaerob bakterilere etkilidir. Klinik kullanımda bulunan iki üyesi imipenem ve meropenemdir (Kahan ve Kahan, 1979).

Monobaktamlar, içeriğinde bulunan monosiklik yapıdaki çekirdek nedeniyle diğer beta-laktamlardan farklılık gösteren beta-laktam antibiyotiklerdir. Bu monosiklik beta-laktamlar *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Gluconobacterium*, *Flexibacterium* ve *Pseudomonas* gibi toprakta yaşayan değişik bakteriler tarafından üretilir (Marques vd., 2018). Çoğu zayıf antibakteriyel etkinlik gösteren bu bileşikler içinde günümüzde tek kullanılan monobaktam, *Chromobacter violaceum*'dan elde edilen aztroenamdir (Kahan ve Kahan, 1979).

Vankomisin, molekül ağırlığı 1450 Dalton olan trisiklik bir polipeptiddir. Teikoplanin ise yaklaşık 2000 Dalton ağırlığında komplike bir peptiddir. (Fekety, 2000).

1.1.2.3. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Kimyasal yapılarına göre antibiyotikler; beta laktamlar, fenikoller, sülfonamidler, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, linkozamidler, polipeptidler, kinolonlar, nitrofuranlar, imidazoller ve rifamisinler olarak sınıflandırılırlar (Akkan, 1997).

Fenikoller, florfenikoller, sentetik, yağda eriyen, geniş spektrumlu ve uzun süre etkili bir antibakteriyel ilaçtır (Karaman ve Jum, 2015). Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkilidir. Sadece veteriner sahada kullanılır (Sattur vd., 2012). Bakteriostatik etkilidir (Shin vd., 2005).

Kinolonlar, geniş spektrumlu ilaçlardır. Özellikle Gram (-) aerobik bakterilere, mikoplazma türleri ve bazı Gram (+) bakterilere (*Stafilokokus* türleri) karşı etkilidirler (Yazar, 2009). Oksijensiz ortamda ve anaerobik bakterilere karşı etkisizdirler. Önemli doku ve organlardaki yoğunlukları plazmadakinden daha yüksektir (Lucia vd., 2018). Yarı ömürleri uzundur. Plazma proteinlerine düşük oranda bağlanırlar (Kaya, 2007).

Aminoglikozidler, ilk kez 1944 yılında *Streptomyces griseus*'tan streptomisin izole edilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 1.1). Sonra sırasıyla diğer *Streptomyces* türlerinden neomisin, kanamisin, paromamisin, tobramisin üretilmiş, bu arada *Micromonospora purpureae*'den gentamisin elde edilmiştir. Sonrasında 1972 yılında amikasin kanamisinden, daha sonra sisomisin, netilmisin ve son olarak da isepamisin gentamisinden sentetik olarak elde edilmiştir (Kim vd., 2001 Horinouchi, 2007;). Spektinomisin yapısal olarak aminoglikozidlere benzese de bir glikozidik bağı

olmadığından aminosiklitol olarak ayrıca ele alınmaktadır (Çokça, 2000). Aminoglikozidler, aerobik Gram negatif bakterilerin neden olduğu ciddi hastane enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan en önemli bileşikler arasındadır (Magnet ve Blanchard, 2005).

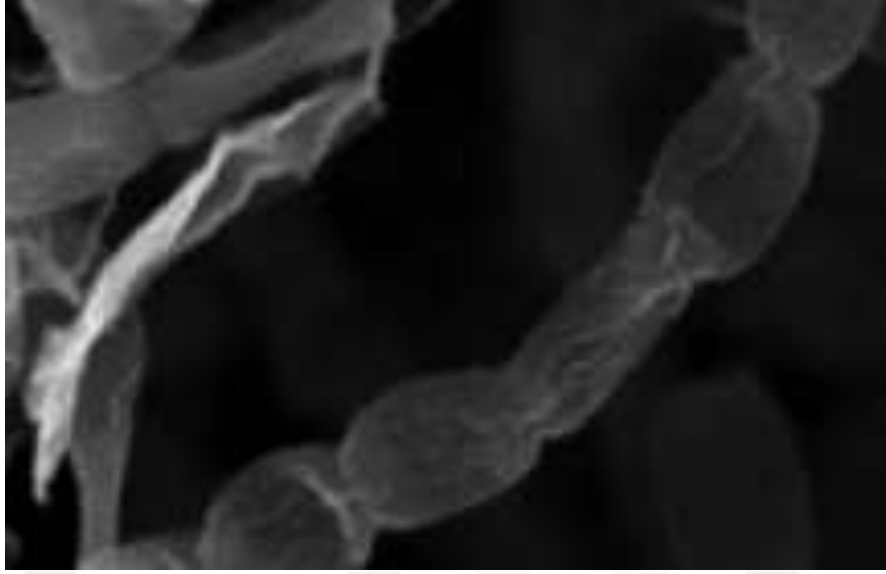
Neomisin, yapısında azot içeren bir aminoglikozid grubu antibiyotiktir. Hidrofilik bir özelliğe sahiptir (Wan vd., 2018). Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (Wan vd., 2018). Neomisin yalnızca lokal olarak kullanılmaktadır. Yara enfeksiyonları tedavisinde, lokal mukozalara uygulanabilir. Kolorektal cerrahi ve karaciğer yetmezliğinde oral preparatları ile dekontaminasyon tedavisi yapılabilir (Aktuğlu, 2002).

Kanamisinler kanamisin A, kanamisin B, tobramisin ve dibekasin içeren 4,6-ikame edilmiş 2-deoksistreptamin aminoglikozit antibiyotiklerin önemli bir alt grubunu oluşturur. Bu bileşikler, hedeflenerek protein sentezine müdahale eder (Sykes ve Papich, 2014).

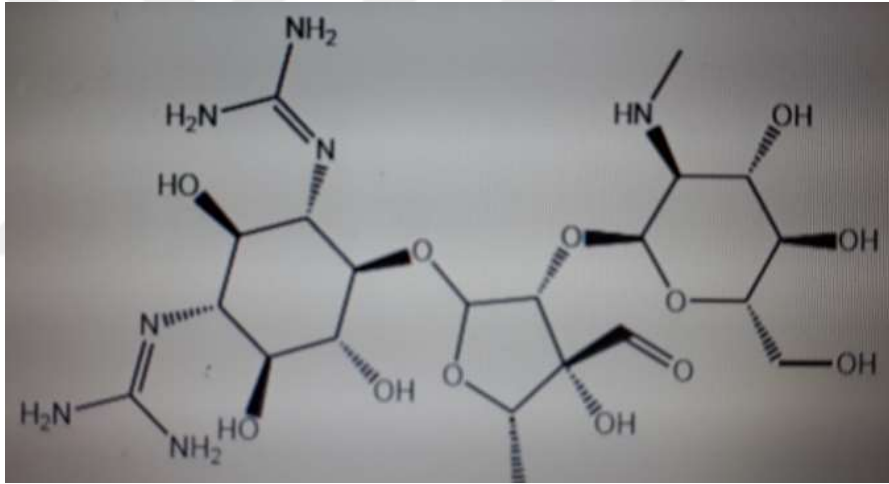
Paromomisin, protozoaya karşı etkinliği olan tek aminoglikoz antibiyotiktir. Gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilir ve enterik protozoal enfeksiyonları, özellikle de kriptosporidiozis tedavisinde kullanılır (Sykes ve Papich, 2014).

Tobramisin, aminoglikozid grubunda bulunan antibiyotiktir. Gram negatif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır (Sykes ve Papich, 2014).

Streptomisin, kimyasal olarak merkezi aminosiklitol halkasına glikozidik bağlarla bağlı iki ya da daha fazla aminoşekerden oluşmuşlardır (Şekil 1.1). Streptomisin, tüberkülozun ve atipik mikobakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde hala kullanılmaktadır (Gilbert vd., 2002). Ayrıca tetrasiklin ile kombine olarak bruselloz tedavisinde, penisilinle gentamisine dirençli enterokok endokarditinde ve tek başına tularemi ve veba tedavisinde kullanılmaktadır (Fekety, 2000).



Şekil 1.1. *S. griseus*'un morfolojik görüntüsü (Aouar vd., 2012).



Şekil 1.2. Streptomisinin kimyasal yapısı (Magnet ve Blanchard, 2005).

1.1.3. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

1.1.3.1. Hücre Duvarını Hedef Alan Antibiyotikler

Bakteriyel hücreler, uzun şeker polimerlerinden oluşan peptidoglikandan yapılmış bir hücre duvarı ile çevrilidir. Peptidoglikan, transglikosidazların etkisiyle glikan ipliklerinin çapraz bağlanmasından geçer ve peptid zincirleri, polimerlerdeki şekerlerden uzanır ve bir peptid diğerine çapraz bağlantılar oluşturur. Peptid zincirinin D-alanil-alanin kısmı, penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) varlığında glisin kalıntıları ile çapraz bağlanır. Bu çapraz bağlama hücre duvarını güçlendirir. Alaktamlar ve glikopeptitler hücre duvarı sentezini inhibe eder (Kahne vd., 2005).

1.1.3.1.1. Beta-laktam Antibiyotikler

Beta-laktam ajanlarının birincil hedefi PBP'lerdir. P-laktam halkasının, normal olarak PBP ile bağlanan peptid zincirinin D-alanil D-alanin kısmını taklit ettiği varsayılmıştır. PBP, β -laktam halkası ile etkileşime girer ve yeni peptidoglikanın sentezi engellenir. Peptidoglikan tabakasının bozulması bakterinin parçalanmasına yol açar (Kos vd., 2008).

Glikopeptitler, öncü peptidoglikan alt ünitesinin peptid yan zincirinin D-alanil D-alanin bölümüne bağlanır. Büyük ilaç molekülü vankomisin bu D-alanil alt ünitesinin PBP'ye bağlanmasını önler ve böylece hücre duvarı sentezini inhibe eder.

1.1.3.2. Protein Biyosentezi İnhibitörleri

Öncelikle, bakteriyel DNA'daki bilgi, mesajcı RNA olarak adlandırılan m-RNA'ya iletilir ve transkripsiyon adı verilen protein sentezi gerçekleşir. Daha sonra ribozom adı verilen makromoleküler yapı, çeviri adı verilen bir işlem olan m-RNA'da bulunan proteinleri sentezler. Protein biyosentezi, ribozomlar ve sitoplazmik faktörlerle katalize edilir. Ribonükleoprotein, 30S ve 50S alt birimlere sahiptir. Antimikrobiyaller, bakteriyel ribozomun 30S veya 50S alt birimini hedef alarak protein biyosentezini inhibe eder (Yoneyama ve Katsumata, 2006).

1.1.3.2.1. 30S Alt Birimine Bağlananlar

Aminoglikozitler (AG), büyük gözeneklerin oluşmasına yol açan negatif yüklü olan ve dolayısıyla bakteri içinde antibiyotik penetrasyonuna izin veren pozitif yüklü moleküllerdir (Vannuffel ve Cocito, 1996). Asıl etki hedefi bakteri ribozomudur; oraya girmek için oksijen ve aktif bir proton hareket kuvveti gerektiren enerjiye bağlı aktif bakteri taşıma mekanizması gerektiren sitoplazmik zarı geçmesi gerekir. Bu nedenlerden dolayı AG, aerobik koşullarda çalışır ve anaerobik bakterilere karşı zayıf aktiviteye sahiptir (Johnston vd., 2002). Bu AG, hücre duvarı sentezini (β -laktam ve glikopeptitler gibi) inhibe eden antibiyotiklerle sinerjiye sahiptir. Bu etki ile düşük dozlarda AG'nin hücre içine daha fazla nüfuz etmesi sağlanır. AG'ler, A bölgesi yakınındaki hidrojen bağlarıyla 30S alt ünitesinin 16S r-RNA'sı ile etkileşime girer. mRNA'nın yanlış okunmasına ve erken çevirinin feshine neden olurlar (Wise, 1999).

Tetrasiklinler, tıpkı aminoglikozidlerde olduğu gibi 30S alt ünitenin, 16S r-RNA'sı ile etkileşime girerek mRNA'nın yanlış okunmasına neden olurlar (Lambert, 2005). Bakteri 30S ribozom alt ünitesine geri dönüşümlü olarak bağlanır, "aminoacyl tRNA'nın" mRNA-ribozom kompleksi üzerindeki akseptör noktasına bağlanmasını bloke eder. Uzayan peptid zincirine yeni aminoasit eklenemez ve protein sentezi durur (Reynolds, 1989).

1.1.3.2. 50S Alt Birimine Bağlananlar

Makrolidler, 50S ribozomal alt ünitesinin 23S r-RNA'sının peptidil transferaz merkezinin korunmuş dizilerini hedefleyerek protein sentezinin erken aşamasını, yani translokasyonu etkiler. Bu, tamamlanmamış peptid zincirlerinin erken ayrılmasıyla sonuçlanır (Reynolds, 1989).

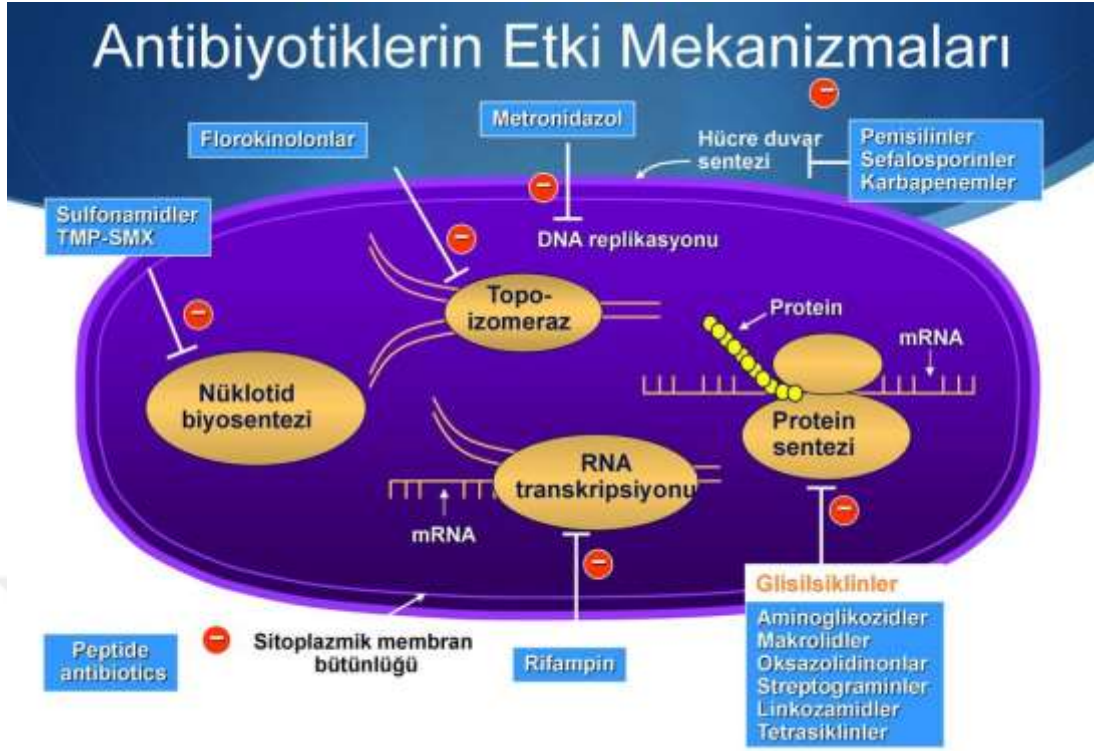
Oksazolidinonlar, linezolid grubun tamamen sentetik olan yeni bir antibiyotik sınıfının onaylı üyesidir. Oksazolidinonlar, birkaç aşamada protein sentezine müdahale eder. İlk aşama 50S alt ünitesinin 23Sr RNA'sına bağlanarak protein sentezini inhibe etmektir. İkinci aşama ise 70S inhibisyonunu bastırarak peptidil-t-RNA ile etkileşime girmektir (Bozdoğan ve Appelbaum, 2004).

1.1.3.3. DNA Replikasyon İnhibitörleri

Florokinolonlar (FQ), DNA'nın en alt katmanına negatif yüklü süper bobinleri ile etki ederek ve DNA'nın iki ucunu mühürleyerek DNA jilatını inhibe eder. Gram pozitif bakterilerde ana etki hedefi, topoizomeraaz enzimini etkileyerek DNA'nın replikasyonunu inhibe etmektir (Higgins vd., 2003).

1.1.3.4. Folik Asit Mekanizması İnhibitörleri

Sülfonamidler ve trimetoprim ilaçlarının her biri inhibitörleri folik asit metabolizmasında belirgin basamakları inhibe eder. Kükürt ilaçlarının ve biyosentetik yolda farklı adımlarda etki gösteren trimetoprimin sinerji ve direnç için düşük mutasyona sahiptir. Sülfonamidler, dihidropteroat sentazı, doğal substrat p-amino benzoik asitten daha yüksek afinite ile rekabetçi bir şekilde inhibe eder. Trimetoprim gibi ajanlar folik asit sentezinin sonraki bir safhasında etki eder ve dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder (Şekil 1.3) (Yoneyama ve Katsumata, 2006).



Şekil 1.3. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları (Mülazımoğlu, 2014).

1.1.4. Antibiyotiklere Mikrobiyal Direncin Temeli

1.1.4.1 Kalıtsal (Doğal) Direnç

Bakteriler bir antibiyotiğe kalıtsal olarak dirençli olabilir. Örneğin Streptomyces kendi antibiyotiğine karşı dirençten sorumlu genlere sahiptir; Gram-negatif bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı permeabilite bariyeri oluşturan bir dış membranları vardır; bazı mikroorganizmaların bazı antibiyotikler için transport sistemleri yoktur veya mikroorganizmaların antibiyotik için uygun hedefi olmayabilir (Töreci, 1989).

1.1.4.2. Kazanılmış Direnç

Bakteriler daha önce duyarlı oldukları antibiyotiklere direnç kazanabilirler. Bu tip direnç bakteriyel genomdaki değişikliklerin sonucudur. Kazanılmış direnç bakterilerdeki iki genetik süreç tarafından yönlendirilir. Bunlar ;

- Mutasyon ve seleksiyon (vertikal evrim);
- Genlerin suşlar ve türler arasında değişimi (horizontal evrim)'dir .

Vertikal evrim Darwin'in doğal seleksiyon kuramına dayanır; bakteriyel kromozomdaki spontan veya antibiyotiklerin indükleyici bir mutasyon bakteriyel popülasyon içinde dirençli üyelerin ortaya çıkmasına yol açar. Antibiyotiğin yarattığı selektif baskıyla vahşi tip (nonmutantlar) duyarlı suşlar ölür; dirençli mutantlar çoğalır ve gelişir.

Horizontal evrim direnç genlerinin başka bir mikroorganizmadan kazanılmasıdır. Bakterilerde mutasyon ve seleksiyon yoluyla direnç geliştikten sonra, dirençten sorumlu genler genetik değişimin bir veya birkaç yoluyla diğer bakterilere aktarılır. Bakteriler gen değişimini üç süreçle yapabilir: konjügasyon, transdüksiyon, transformasyon. Konjügasyon DNA'nın seks pilusu aracılığıyla vericiden alıcıya, hücreden hücreye temasla aktarılmasıdır. Transdüksiyon, bir bakteriyel hücreden geni ekstrakte eden virusların (bakteriyofaj) diğer bakterilere aktarmasıdır. Transformasyon, diğer bir hücreden salınan DNA'nın direkt olarak çevreden kazanılmasıdır. Transdüksiyon ve transformasyon süreçlerinde, gen ancak plazmid denilen ekstrakromozomal genetik elemanlar veya bakteriyel kromozoma integre olursa stabil kalabilir. Bu integrasyon sıklıkla özelleşmiş transpozonlar olan integronlar aracılığıyla gerçekleştirilir. İntegronlar hareketli, küçük DNA segmentleridir ve hem plazmidlere hem de kromozoma integre olma yeteneğindedirler. Bir bakteriyel hücreden diğerine DNA transferi gerçekleştikten sonra genetik rekombinasyon süreci bafıllar ve yeni bir dirençli bakteri genotipi (rekombinan) ortaya çıkar. Hızlı üreme oranları, bakteriyel hücrelerin çokluğu, ayrıca mutasyon, seleksiyon süreçleri ve genlerin değişim yeteneği ile kazanılan genetik çeşitlilik bakterilerdeki ileri derecede gelişmiş adaptasyon ve evrimden sorumludur. Bu nedenlerle antibiyotikli ortama bakteriyel adaptasyon (antibiyotik direnci) çok hızlı bir evrimle sonuçlanmaktadır; yani bakteriler en hızlı evrimleşen canlılardır. Bakteriler dünyası, genleri birbirleri arasında kolaylıkla değiştirebilen dev bir çok hücreli organizma olarak düşünülebilir (Doğancı, 2001) .

1.1.5.Antibiyotiklerin Direnç Mekanizmaları

Mikroorganizmalar için kullanılan ilaçlar etki spektrumuna göre kabaca antibakteriyel, antifungal ve antiviral diye büyük gruplara ayrılabilir. Bu gruplar içinde de etki spektrumu bazı mikroorganizmaları kapsar, bazılarını kapsamaz. Örneğin; antibakteriyel antibiyotikler yalnız gram-pozitif veya gram-negatif bakterilerden bir kısım cins ve türlere etkili olabilir ve buna göre dar veya geniş spektrumlu olarak

adlandırılır. Bir antibiyotiğin kategorik olarak etkili olmadığı bir bakteri cinsi veya türünün o antibiyotiğe “dirençli” olduğunu söylemek doğru değildir; burada “duyarsız” deyimini daha doğrudur. Literatürde bu durum için “intrensek direnç” terimi de çok kullanılır (Baquero, 2001).

Antibiyotik direnci dendiğinde, bir bakteri türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale dönüşmesi kastedilir. Bu direnç de çok değişik, hatta çevre koşullarına (örneğin; asit veya nötr ortama) göre değişen düzeylerde olabilir. Dolayısıyla antibiyotiğin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) çeşitli suşlar için çok farklı bulunabilir. Bu konsantrasyonların pratik bir anlam ifade edebilmesi için (bir enfeksiyonun tedavisinde o antibiyotiğin kullanılıp kullanılmayacağına karar vermek için) kullanılan dozla kanda, çeşitli vücut sıvıları veya dokularda erişilen konsantrasyonlara ve birçok klinik çalışmaların sonuçlarına göre duyarlı-orta duyarlı-dirençli ya da duyarlı-dirençli sınırları belirleyen konsantrasyonlar (breakpoint) saptanır. Bazen bir saf kültürde dahi biraz farklı MİK değeri alınan bakteri popülasyonları bulunabilir ve bu direnç oluşmasında önemli olabilir (Cebula vd., 2001).

Bakterilerde antibiyotik direnci çok değişik mekanizmalarla sağlanırsa da bu mekanizmalar temelde iki gruba ayrılabilir:

1. Bakteri kromozomunda oluşan mutasyonlar örneğin; bakteri hücre duvarı sentezinde rol oynayan enzimler olan penisilin bağlayan proteinler (PBP)'de değişikliğe neden olarak bunların beta laktam antibiyotiklere afinitesini değiştiren mutasyonlar, gram-negatif çomaklarda porinlerde değişikliğe neden olarak antibiyotiğin bakteriye girişini engelleyen ya da zorlaştıran mutasyonlar.

2. Duyarlı bakterinin direnç genini bir başka mikroorganizmadan kazanması

Bakteri kromozomunda mutasyonla kazanılan direnç, o bakteri ve ondan üreyen bakteriler için geçerlidir. Antibiyotik baskısı ile bu dirençli klonun seleksiyonu ve hastadan hastaya yayılması, bir hastanede ya da ilişkili birçok hastanede bir salgına yol açabilmesi de olasıdır. Bu şekilde kazanılan direnç, bir antibiyotik veya bir antibiyotik grubu için geçerlidir. Ancak bu dirençli klonun çoğalması ile oluşan popülasyonda bir başka mutasyonla direnç düzeyinin artması veya bir başka antibiyotiğe ya da antibiyotik grubuna da direnç oluşması olasıdır. Ayrıca, dirence yol açan kromozomal genin bir transpozona ve oradan bir plazmide geçerek başka bakterilere aktarılması da gerçekleşebilir (Shlaes vd., 1997).

Antibiyotik direncinin yayılmasında, direnç genlerinin bakteriler arasında aktarılması daha büyük rol oynar. Bu aktarım transformasyon, transdüksiyon ve daha önemlisi konjugasyonla olabilir. Bakterilerde kromozomdan ayrı, ona ek bir gen repertuarı gibi ve genellikle çok sayıda bulunan, sirküler şekilde DNA molekülleri olan plazmidlerin birçoğu konjugatiftir, aynı veya yakın tür ve cinsten olan bakteri suşları arasında konjugasyon sağlayarak kendilerinin, bazen de bakteri kromozomunun bir kısmının bakteriden bakteriye aktarımını sağlarlar. Konjugatif olmayan plazmidler de başka bir genetik elemanın sağladığı konjugasyonla diğer bakterilere aktarılabilir. R faktörleri de denen direnç plazmidleri 1-2'den 10-12'ye kadar direnç geni taşıyabilir ve duyarlı bir bakteriye aktarıldığında onu bir anda taşıdığı direnç geni kadar antibiyotiğe dirençli kılabilir. Bu nedenle doğada dirençli bakterilerin artmasında çok daha önemli bir rol oynar. Bakterilerde transpozon ve integron gibi kromozomdan plazmide, plazmidden kromozoma veya başka bir plazmide atlayabilen genetik elementlerin bulunması ve bunların birçok direnç geninden oluşan gen kasetleri içermeleri, bu yolla antibiyotik direncinin yayılmasının önemini daha iyi göstermiştir. Bu genetik elementlerde çok sayıda direnç geninin birikmesinde antibiyotik kullanımının doğurduğu selektif baskının rolü büyüktür. Bu kadar çeşitli direnç mekanizmasının kısa sayılabilecek bir sürede ortaya çıkması, milyonlarca yıl sürebilecek bir bakteri evölüsyonunun, antibiyotiklerin çok yaygın kullanılmasının yarattığı seleksiyon etkisi sonucu yarım yüzyıldan kısa bir süreye sığmasıyla açıklanmaktadır (Shlaes vd., 1997).

Antibiyotiklerin etki mekanizmaları ve antibiyotiklere direnç mekanizmaları konusunda, ülkemizde de yayınlanmış çok sayıdaki makalede geniş bilgi bulunabilir (Töreci, 1996). Antibiyotik kullanımının dirençle ilişkisi konusunda da çeşitli derlemeler yapılmıştır (Doğancı, 2001).

1.1.6. İmmobilizasyon Tanımı ve Gelişimi

İmmobilizasyon terimi bir reaktör veya analitik sistem içinde biyolojik olarak aktif katalizörün tutuklanmasını ifade eden bir terimdir. Biyokatalizör ister tek bir enzim olsun isterse enzim karışımı veya bir canlı hücre olsun, taşıyıcı materyal üzerinde veya içinde tutuklanmıştır. İmmobilize kompleks katı desteğin fiziksel karakteristiklerini gösterirken serbest katalizörün temel biyokimyasal aktivitesine de sahiptir. İmmobilizasyon özel bir modül üzerinde çözünür olmayan bir kompleks oluşturarak

akışkanın kolayca geçmesini sağlar. Bir başka deyişle immobilizasyon, heterojen kataliz prensiplerinin biyolojik sistemlere uygulanmasıdır (Messing vd., 1979).

Son otuz yıldan beri enzimlerin immobilizasyonu teorik ve pratik önem kazanmıştır. Immobilizasyon teknolojisi kimya, biyokimya ve hücre biyolojisi disiplinleri ile biyokimyasal ve proses mühendisliklerini birleştirir (Aktaş, 2004). Immobilize enzim “enzimin kinetik aktivitesini kaybetmeden belli bir bölgeye fiziksel olarak yerleştirilmesi veya hapsedilmesi” olarak adlandırılır (Chibata vd., 1972). Immobilizasyon terimi sadece enzimlere değil hücreler, mikrobiyal hücreler, bitki ve hayvan hücreleri gibi tüm biyokatalizör tiplerine de uygundur (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

Nelson ve Griffin bir rastlantı sonucu, aktif karbon üzerine adsorbe edilmiş maya invertazının sükrözün hidrolizini katalizleme yeteneğine sahip olduğunu buldular. Bu, immobilize enzim kavramının ilk gösterimiydi. Bu gelişmenin ardından, çeşitli desteklere kovalent olarak bağlanmış aktif proteinlerin immobilizasyonu hakkında birçok rapor yayınlanmıştır. Bu konudaki pratik uygulamaların artışından sonra, iyonik bağlama, fiziksel adsorpsiyon ve tutuklama gibi çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

Sadece enzimleri değil hücreler, mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal hücreleri de içeren biyokatalizörler kullanılarak dizayn edilen, enerji ve kaynak tasarrufu sağlayan ve düşük kirlilik üreten işlemler, çok az yan ürün çıkışı düşük sıcaklık ve çevrel basınç koşulları ile avantaj sağlamaktadır. Buna karşılık, biyokatalizörler genel olarak katalitik reaksiyonlar için koşullar uygun olsa bile yüksek sıcaklık, düşük veya yüksek pH ve organik çözücülerin varlığında kolaylıkla inaktive olabilirler.

1.1.6.1. Immobilizasyon Teknikleri

Temel olarak 3 çeşit enzim immobilizasyon yöntemi bulunmaktadır. Bunlar;

1. Taşıyıcıya (destek materyaline) bağlama
2. Tutuklama (enkapsülasyon)
3. Çapraz bağlamadır (Vaghari vd., 2016).

1.1.6.1.1. Taşıyıcıya Bağlama Metodu

Taşıyıcıya bağlama, biyokatalizörün suda çözünmeyen taşıyıcıya kovalent bağlar, iyonik bağlar, fiziksel adsorpsiyon veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanmasına dayanan bir metottur. Suda çözünmeyen polisakkaritler (örn. selüloz, dekstran ve agaroz türevleri), proteinler (örn. jelatin ve albumin), sentetik polimerler (örn. polistiren türevleri, iyon değişimi reçineleri ve poliüretan) ve inorganik materyaller (örn. tuğla, kum, cam, seramik ve magnetit) gibi çeşitli çözünmeyen materyaller doğrudan veya özel modifikasyon veya aktivasyon sonrası kullanılabilir (Messing vd., 1979).

1.1.6.1.2. Kovalent Bağlama Metodu

Kovalent bağlama metodu enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan tekniklerdendir, fakat kovalent bağlayıcı ajanların toksisitesi ve doğru immobilizasyon koşullarının bulunmasının zorluğundan dolayı hücreler için kullanımı azdır (Navarro ve Durand, 1977). *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces amurcea* borosilikat camlara veya izosiyanat bağlama ajanı kullanılarak, zirkonyum dioksit (ZrO_2) seramik üzerine kovalent olarak bağlanmıştır (Messing vd., 1979).

1.1.6.1.3. İyonik Bağlama Metodu

Katalazın iyon değiştirici selüloza bağlanma yeteneğinin bulunmasından itibaren iyonik bağlama metodu birçok biyokatalizörün immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Prosedür çok basit olup, taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanımı ve immobilizasyon koşulları oldukça kolaydır (Mitz, 1956).

1.1.6.1.4. Fiziksel Adsorpsiyon Metodu

Fiziksel adsorpsiyon metodu enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir (Flor ve Hayashida, 1983). Proteinler ve özellikle enzimlerin katı yüzeylere adsorpsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp enzim saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarla adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonda oldukça sık kullanıldığı görülmektedir (Nelson ve Griffin, 1916).

1.1.6.1.5. Biyospesifik Bağlama Metodu

Biyospesifik bağlama metodu, çoğunlukla afinite ayrılması işlemlerinde kullanılan koenzimler, inhibitörler, efektörler, lektinler ve antikorlar gibi bileşikler ile enzimler arasındaki biyospesifik etkileşime dayanır. Eğer etkileşim kuvvetli ise enzim bu bileşiklerden biri ile konjugat oluşturarak taşıyıcıya bağlanır. Bunun yanında enzimler ile bağlandıklarında onları inaktive ettiklerinden dolayı antikorlar ve inhibitörler iyi bir seçim olmazlar. Lektin ile spesifik karbonhidrat birimleri içeren enzimler arasındaki etkileşim, bu uygulamalar için faydalıdır (Sulkowski ve Laskowski, 1974).

1.1.6.1.6. Çarpraz Bağlama Metodu

Bu metot, küçük moleküllü bi- ve multifonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çarpraz bağlama derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ve immobilize edilecek enzime doğrudan bağlıdır. En çok kullanılan çarpraz bağlama reaktifleri; gluteraldehit, kloformat, epiklorhidrinlerdir (Telefoncu, 1997).

1.1.6.1.7. Tutuklama Metodu

Prensip olarak tutuklama, biyokatalizörü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Biyokatalizör bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent ve çarpraz bağlamadan ayıran en önemli özellik, biyokatalizörün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama metodu, polimer matrikste tutuklama, mikrokapsül, lipozom, membran ve ters misel olmak üzere beş grupta sınıflandırılmaktadır (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

1.1.6. Hücre İmmobilizasyonu Destekleri

İmmobilizasyon bazı hücreler için, hücreler bir yüzey üzerinde veya doğal bir yapı içinde büyüdüklerinde, doğal olarak oluşur. Birçok mikroorganizmanın doğal olarak kendini farklı tipteki yüzeylere bağlama özelliği vardır (Kourkoutas vd., 2004).

Destek materyali olarak aljinatın, büyük ilgi görmesinin yanında, çeşitli polielektrolit jeller ve komplekslerin hücre tutuklamada kullanılması araştırılmaktadır (Bhatia vd., 2005).

Bakteriyel immobilizasyon, bakterilerin (canlı hücrelerin), substratların bakterilere ve ürünlerin bakterilerden uzağa difüzyonuna izin verecek kadar gözenekli bir polimerik matriks içerisine yerleştirildiği bakteriyel tuzaktır. Hücre sıkışması için başarıyla kullanılan malzemeler arasında agar, agaroz, kappa-karragenan, kollajen, aljinat, kitosan, poliakrilamid, poliüretan ve selüloz bulunur (Vojtisek ve Jirku, 1983). Bununla birlikte, bu polimerlerin her birinin mekanik dayanım ve dayanıklılığının zayıf olması ve yüksek maliyete sahip olması açısından dezavantajlara sahiptir (Kuu ve Polack, 1983).

Bir immobilizasyon matriksi olarak poli vinil alkolün (PVA) kullanımı, yaklaşık 30 yıldan önce Freeman ve Aharonowitz tarafından başlatılmıştır (Freeman ve Aharonowitz, 1981). Birkaç yıl sonra, özellikle atık su arıtımında PVA jelleri başarıyla kullanılmıştır (Hashimoto ve Furukawa, 1987).

PVA, dünyada üretilen en büyük sentetik suda çözünür polimerdir (Ramaraj, 2007). PVA, düşük maliyetli olması, daha yüksek dayanıklılık, kimyasal stabilite ve canlı hücrelerde toksik etki oluşturmama dahil olmak üzere geleneksel aljinat hidrojellerine göre çeşitli avantajlar sunmaktadır (Khoo ve Ting, 2001). PVA jeli suda veya biyolojik sıvılarda yüksek derecede şişlik gösterir ve aynı zamanda elastik bir yapıya sahiptir. Yüksek derecede hidrofilik PVA'yı çözünmez hale getirmek için kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi gerekir (Gholap vd., 2004).

1.1.7. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, serbest ve polivinil alkol(PVA)/sodyum aljinat ile immobilize edilmiş *Streptomyces griseus* hücrelerini kullanarak farklı sıcaklık ve farklı karbon kaynakları içeren ortamlarda streptomisin antibiyotiğinin üretimini gerçekleştirmektir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Bakteri Suşları

Antibiyotik üretiminde kullanılacak olan *S. griseus* suşu (NRRL B-2839) NRLL kültür koleksiyonundan ve antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan *Escherichia coli* (ATCC-25922) suşu Fırat Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

2.1.2. Kimyasallar ve Sarflar

Amonyak solüsyonu (İsolab), Asetonitril (İsolab), BaCl₂.2H₂O (Merck), Borik Asit (ZAG Kimya), CaCO₃ (Chemsolute), CaCl₂ (İsolab), Streptomisin (Chem-Impex), K₂HPO₄ (Chemsolute), MgSO₄.7H₂O (İsolab), Kazein (Lab M), Kloroform (İsolab), Maya Ekstraktı (Multicell), Monosodyum fosfat (Fluka), Müller Hinton Agar (Himedia), Metanol (İsolab), Nişasta (İsolab), NaCl(Merck), NaNO₃ (Roth), NaOH (Chemsolute), Na₂SO₄ (Carlo Erba), Pikrik asit (İsolab), Polivinil Alkol (Aldrich), Sodyum Aljinat (AppliChem), kimyasallar ve diğer sarf malzemeler Biyomühendislik bölümünden veya FÜBAP MF.18.59 projesi ile ticari firmalardan temin edilmiştir.

2.1.3. Cihazlar

Çalkalamalı İnkübatör (Mipro-MCI 120), Vortex (Velp ZX3), Manyetik Karıştırıcı (Weightlab WF-MIA), Hassas Terazı (Weightlab WL303), Buzdolabı (Arçelik A+), Otoklav (Jelo Tech ST-85G), Santrifüj (Nüve- NF800R,NF800), Spektrofotometre (Shmadzu UV-1800), Su Banyosu (Mipro-MSB 15), Steril kabin (Heal Force-HFsafe1200), saf su cihazı (Fine Tech ve pH metre (Martini Instruments- Mi 151) cihazları Biyomühendislik bölümünden veya FÜBAP MF.18.59 projesi ile ticari firmalardan temin edilmiştir.

2.1.4. Besiyerleri

2.1.4.1. Nutrient Agar (Lab M)

Nutrient Agar katı besi yeri 5 g/l peptone, 3 g/l sığır eti ekstraktı, 8 g/l NaClO₂ ve 12 g/l agar no.2 içermektedir. Nutrient Agar besi yeri *S. griseus* ve *E.coli* bakterilerinin üretilmesinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Nutrient Agar besi yerinden 28 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında 15 dk steril edildikten sonra steril petrilere aktarıldı.

2.1.4.2. Nutrient Broth (Lab M)

Nutrient Broth sıvı besi yeri 5 g/l peptone, 1 g/l sığır eti ekstraktı, 2 g/l maya ekstaraktı ve 5 g/l NaClO₂ içermektedir. Nutrient Broth besi yeri *S. griseus* bakterilerinin üretilmesinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Nutrient Broth besi yerinden 13 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek deney tüplerine aktarıldı. Sonrasında otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında 15 dk steril edildi.

2.1.4.3. Nişasta Kazein Agar

Nişasta Kazein Agar, *S. griseus*'un üretilmesinde kullanıldı. Agar hazır olarak alınmadı. Proje kapsamında temin edilen malzemelerle hazırlandı. 1 litre besiyeri hazırlamak için 10 g/l Nişasta, 0,3 g/l Kazein 1g/l KH₂PO₄, 1g/l MgSO₄.7H₂O, 1g/l NaCl, 2 g/l CaCO₃, 0,1 g/l FeSO₄.7H₂O ve 15 g/l Agar saf su içerisinde çözündürüldü ve otoklav cihazında 121 °C sıcaklıkta, 1 atmosfer basınç altında steril edildikten sonra petrilere aktarıldı.

2.1.4.4. Nişasta Kazein Broth

Nişasta Kazein Broth, *S.griseus*'un üretilmesinde kullanıldı. Nişasta Kazein Broth hazır olarak alınmadı. Proje kapsamında temin edilen malzemelerle hazırlandı. 1 litre besiyeri hazırlamak için 10 g/l Nişasta, 0,3 g/l Kazein, 1g/l KH₂PO₄, 2g/l KNO₃, 1g/l MgSO₄.7H₂O, 1g/l NaCl, 2 g/l CaCO₃, 0,1 g/l FeSO₄.7H₂O kullanıldı. Saf su içerisinde çözündürüldü ve deney tüplerine aktarıldı. Otoklav cihazında 121 °C sıcaklıkta, 1 atmosfer basınç altında steril edildi.

2.1.4.5. Müller Hinton Agar (Himedia)

Müller Hinton Agar besi yeri 17.50 g/l kazein asit hidrolizati, 2 g/l et infüzyon katıları, 1.50 g/l çözünür nişasta ve 17 g/l agar içermektedir. Müller Hinton Agar katı besiyeri streptomisin antibiyotiğinin *E. Coli* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite testinde kullanıldı. 1 litre besi yeri hazırlamak için toz Müller Hinton Agar besi yerinden 38.0 g tartılıp saf su içinde çözündürülerek otoklav cihazında 121 °C, 1 atmosfer basınç altında 15 dk steril edildikten sonra steril petrilere aktarıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Streptomisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem İle Bulunması

30 mg streptomisin antibiyotiği hassas terazi ile tartıldı. 10 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Çözelti alkaline hale gelinceye kadar %33'lük amonyak çözeltisinden 1 µl/ml karışıma eklendi. Bu karışım 100 ml'lik behere alındı. 5 µg/ml tobramisin hassas terazi ile tartılarak karışıma eklendi. Daha sonra toplamda 15 ml kloroform çözeltinin içerisine üç porsiyon halinde 5 ml eklenerek ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ekstraksiyondan sonra oluşan tortu 2 ml metanol içerisinde çözdürüldü. Streptomisin konsantrasyonları 200, 400, 600, 800 ve 1000 µl/ml olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. 3 paralel olacak şekilde çalışma yapıldı. Bunların içerisine 1 ml pikrik asit eklendi. Hacimlerin 10 ml'ye tamamlanması için 9 ml asetonitril karışımının içerisine ilave edildi. Böylece son hacimler 20, 40, 60, 80 ve 100 µl/ml oldu. Kör tüpüne 1 µl amonyak çözeltisi, 1 ml pikrik asit, 9 ml asetonitril, 5 µl/ml tobramisin ve 2 ml metanol eklendi. Hazırlanan çözeltilerin kör örneğine karşı 418 nm'de spektrofotometre cihazında absorbans ölçümleri yapıldı. Üretilen streptomisin miktarının belirlenmesi için kalibrasyon eğrisi ve denklemi oluşturuldu (Omar vd., 2013).

2.2.2. Liyofilize *S.griseus* Suşunun Üretilmesi

Liyofilize *S. griseus* suşu steril sıvı besiyeri (Nutrient Broth) ile sulandırıldıktan sonra Nutrient Agar, Nutrient Broth, Nişasta Kazein Agar steril besiyerlerine ekimi yapıldı ve bu besiyeri 30 °C'de 5 gün etüvde inkübasyona bırakıldı. Katı besiyerindeki saf olan bakteri kolonilerden alınarak 5 gün boyunca 30 °C'de Nutrient Broth ve Nişasta

Kazein Agar besiyeri içerisinde yoğun bakteri üremesi için inkübasyona bırakıldı. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Ram, 2014).

2.2.3. Streptomisin Üretimi İçin Serbest *S. griseus* Suşunun Kullanılması

Streptomisin antibiyotiğinin üretimi için nişasta kazein broth ve şeker pancarı melası olmak üzere iki farklı karbon kaynağı içeren besiyeri ortamı kullanıldı. Nişasta Kazein Broth için 10 g/l nişasta, 0,3 g/l kazein 1g/l K_2HPO_4 , 1g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/l NaCl, 2 g/l KNO_3 , 0,1 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/l $CaCO_3$ içeren besiyeri hazırlandı. Şeker pancarı melası ortamı için ise nişasta yerine 20,30,40 g/l şeker pancarı melası içeren ve yine aynı içeriğe sahip besiyerleri hazırlandı. 3 paralel olacak şekilde 50 ml fermentasyon hacminde, 250 ml erlenlerde hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerinin pH'sı 7.0 olarak ayarlandı. Otoklavda sterilizasyon gerçekleştirildi. 30 °C, 100 rpm'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu beş günün sonunda tekrar besiyerleri hazırlandı ve bu sefer 30 °C 200 rpm'de yine aynı sürede inkübasyona bırakıldı. Bu işlemler 33 °C ve 37 °C sıcaklıkta, 100 ve 200 rpm çalkalama hızında inkübasyon gerçekleştirildi. Streptomisin miktarını belirlemek için inkübasyon ortamından her 24 saatte bir 2 ml örnek alınarak +4 C buzdolabında saklandı. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı.

2.2.4. *S. griseus* Suşunun İmmobilize Edilme Yöntemi

S. griseus kültüründen 2 ml bakteri süspansiyonu alınarak steril 50 ml nutrient broth besiyerinde 1 gün boyunca, 30 °C , 100 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında bu besiyeri 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri sıvı ortamdan alındı. İmmobilizasyon için iki farklı yöntem denendi. İlk denemede hazırlanan bakteri hücreleri 0,5 M NaH_2PO_4 , 0,5 M Na_2SO_4 , 3,52 g/l H_3BO_3 , 1 g/l sodyum aljinat ve 10 g/l polivinil alkol olacak şekilde hazırlanan çözeltinin içerisine eklendi. %2'lik g/l $CaCl_2$ çözeltisine enjektör ile damlatılarak ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu ilk denemede boncukların oluşmadığı gözlemlendi. İkinci denemede ise 10 g polivinil alkol, 70 ml suyun içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılarak ve ısıtılarak çözdürüldü. Daha sonra 1 gram sodyum aljinatın 20 ml suyun içerisinde çözdürülmesi sağlandı. Yine %2'lik g/l $CaCl_2$ çözeltisine enjektör ile damlatıldı ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu aşamada boncukların oluştuğu gözlemlendi.

Sonrasında oluşan boncuklar 2 kere fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkandı ve 1 gün boyunca aktivasyon için 10 g/l nişasta, 0,3 g/l kazein 1g/l KH_2PO_4 , 2g/l KNO_3 , 1g/l

MgSO₄.7H₂O, 1g/l NaCl, 2 g/l CaCO₃, 0,1 g/l FeSO₄.7H₂O ve pH'sı 7 olan steril fermantasyon ortamında 30 °C, 100 rpm'de 1 gün inkübasyona bırakıldı. Aktivasyon işleminden sonra streptomisin üretimi için, 1g/l KH₂PO₄, 0,3 g/l kazein, 2g/l KNO₃, 1g/l MgSO₄.7H₂O, 1g/l NaCl, 2 g/l CaCO₃, 0,1 g/l FeSO₄.7H₂O ve 20/30/40 g/l şeker pancarı melası içeren steril ve pH'sı 7'e ayarlanmış besiyeri ortamına alınarak 30, 33, 37 °C sıcaklıkta 100 ve 200 rpm'de her bir işlem için 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamındaki streptomisin miktarını belirlemek için her 24 saatte bir 2 ml örnek alınarak +4 C buzdolabında saklandı. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Dinh ve Bach, 2014).

2.2.5. Fermantasyon Ortamlarında Üretilen Streptomisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti

McFarland 0.5 bulanıklık standardını hazırlanmak için 50 ml hazırlanmış % 1.175 g/l BaCl₂.2H₂O çözeltisinden 0.5 mL alınarak, 99.5 ml 0.36 N H₂SO₄ (%1 l/l) çözeltisi ile karıştırıldı. Oluşan çözeltinin dansitesi 625 nm'de 0.08-0.13 değeri arasında olup olmadığı kontrol edildi. Streptomisin antibiyotiğine duyarlı olan olan *E.coli* (ATCC-25922) suşu 10 ml steril nutrient broth sıvı besiyerine ekim yapılarak 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bakteri dansitesini, hazırlanan McFarland 0.5 çözeltisi ile aynı bulanıklıkta ayarlamak için ayrı bir tüp içerisinde seyreltici olarak steril tuzlu su (% 0.9 NaCl g/l) kullanılarak ayarlandı. Önceden hazırlanmış 3-4 mm kalınlıktaki Müller Hinton Agarlı petrilere McFarland 0.5'e göre hazırlanmış *E.coli* bakteri kültüründen eküvyon ile örnek alınarak petrilere eşit dağıtılacak şekilde ekim yapıldı. Petri yüzeylerinin kuruması için 5 dk bekledikten sonra steril bir şekilde petri yüzeylerinde 6 mm çapta kuyucuklar açıldı. Sonrasında daha önceden fermantasyon ortamından toplanan örneklerde ependorflara 1 ml örnek alındı. 15 sn boyunca vorteks ile karıştırılan ependorflar 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ependorflardan 100 µl örnek alınarak Müller Hinton Agarlı petrillerdeki kuyucuklara eklendi. 5 dk beklendikten sonra petrilere 16-18 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında zon çapı olup olmadığı kontrol edildi. Tüm çalışmalar steril koşullar altında yapıldı (Gür, 2016; Hamed vd., 2005).

2.2.6. SPSS Programı ile İstatiksel Analiz

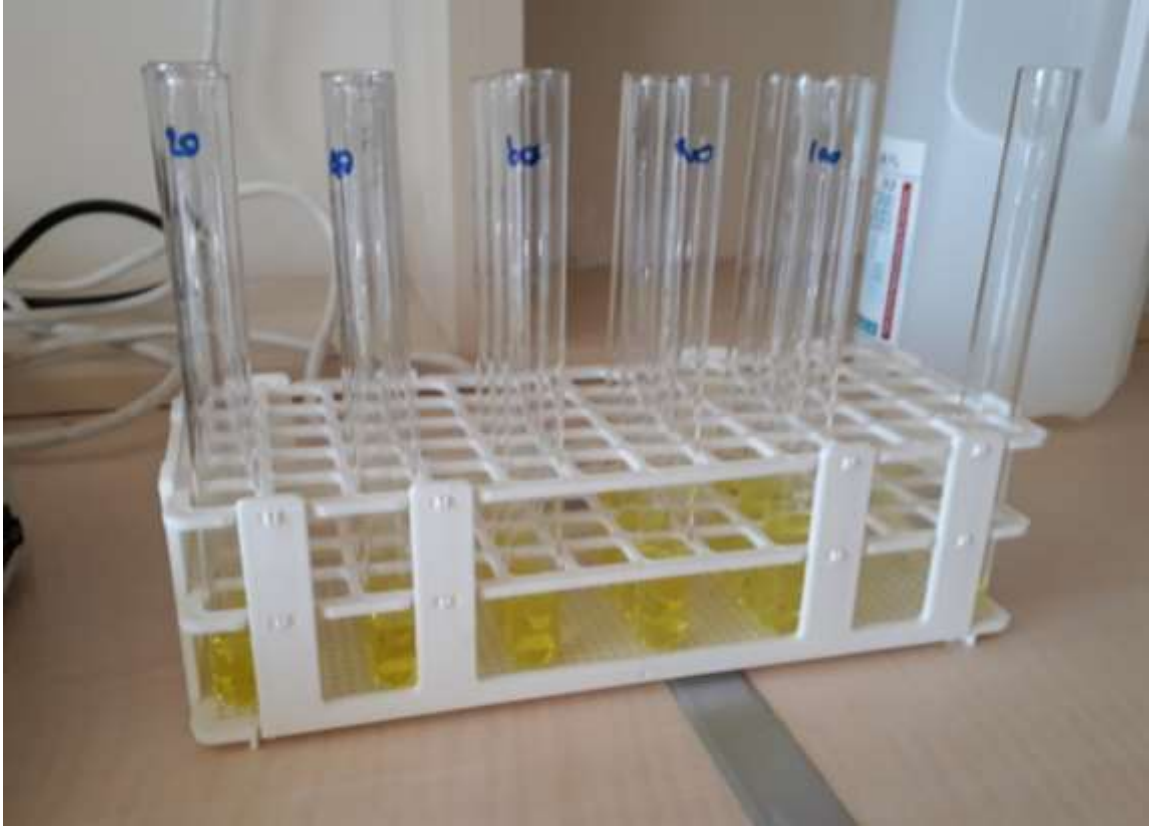
Farklı sıcaklık ve farklı karbon kaynaklarına göre streptomisin antibiyotiği üretim değerleri arasındaki ilişki SPSS (IBM Statistics 22) programında Ki Kare testi ile hesaplandı.



3.BULGULAR

3.1. Streptomisin Kalibrasyon Eğrisinin Spektrofotometrik Yöntem ile Bulunması

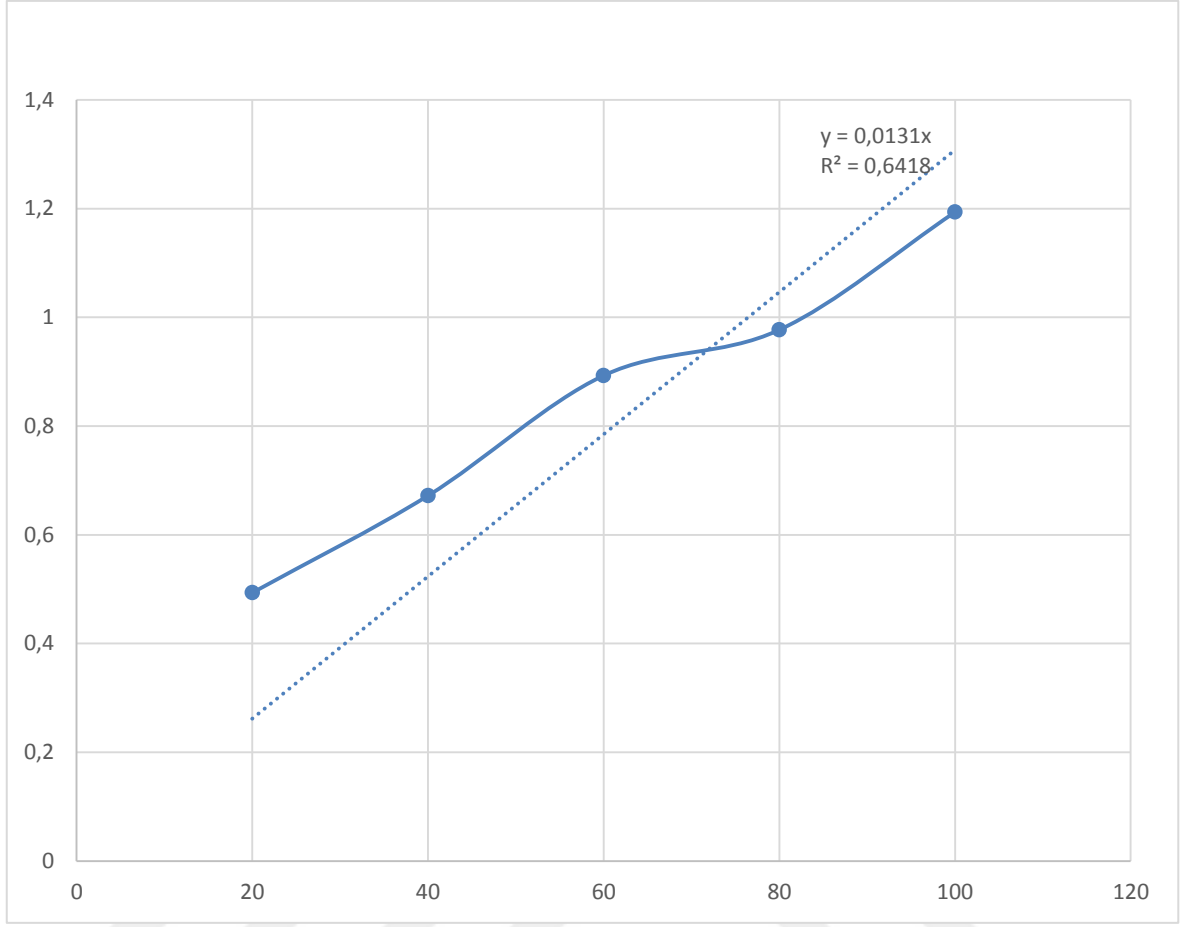
Streptomisin kalibrasyon eğrisinin bulunması deneyinden (Şekil 3.1) sonra absorbens değerleri Tablo 3.1 ile Şekil 3.2’de gösterildi ve kalibrasyon denklemi $y=0,0131x$ bulundu.



Şekil 3.1. UV kalibrasyon için farklı konsantrasyonlardaki streptomisin numuneleri.

Tablo.3.1. Streptomisin kalibrasyon eğrisinin spektrofotometrik yöntem ile bulunması deneyinin absorbens sonuçları tablosu.

$\mu\text{g/ml}$	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ortalama
20	0,447	0,54	0,892	0,493
40	0,664	0,68	0,923	0,672
60	0,883	0,903	0, 95	0,893
80	0,965	0,989	0,98	0,977
100	1,111	1,276	1.0	1,1935



Şekil 3.2. Streptomisin kalibrasyon grafiği.

3.2. Streptomisin Üretimi İçin Serbest *S. griseus* Suşunun Kullanılması

Nişasta kazein agar ve nişasta kazein broth'a yapılan ekimler sonucu *S. griseus*'un üremesi Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Şeker pancarı melası ve nişasta kazein broth fermentasyon ortamlarındaki üreme Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Elde edilen üretim değerleri Tablo 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25'de, verim ve verimlilik değerleri ise Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 ve 3.13'de gösterilmiştir. Streptomisin üretimi için serbest *S. griseus* suşunun farklı konsantrasyonlarda farklı karbon kaynağı içeren besiyerlerinde, farklı sıcaklık ve çalkalama hızlarında gerçekleştirilen deneylerde en yüksek verim 3.günde 30 g/l şeker pancarı melası, 33 °C sıcaklık ve 200 rpm'de 70,977 µg/ml olarak elde edilirken, en yüksek verimlilik yine aynı koşullarda 0,986 µg/ml olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Nutrient kazein agar'da üreme.



Şekil 3.4. Nutrient kazein broth'da üreme.



Şekil 3.5. Nişasta kazein broth ve farklı şeker pancarı melası fermantasyon ortamları ile streptomisin üretimi.

Tablo 3.2. Serbest *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,382	0,611	0,916	0,636	0,027
2	1,297	1,527	1,755	1,526	0,032
3	24,27	24,43	27,02	25,24	0,351
4	41,07	45,11	52,29	46,16	0,481
5	40	42,06	47,33	43,13	0,359

Tablo 3.3. Serbest *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,458	0,687	1,145	0,763	0,032
2	1,450	1,755	1,908	1,704	0,036
3	24,43	24,73	25,57	24,91	0,346
4	41,22	44,50	49,24	44,99	0,469
5	40,46	41,37	46,95	42,93	0,358

Tablo 3.4. Serbest *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,687	0,916	1,145	0,916	0,038
2	1,527	1,832	2,29	1,883	0,039
3	27,48	28,39	29,77	28,55	0,396
4	41,60	46,95	47,86	45,47	0,474
5	40,46	42,90	45,65	43	0,358

Tablo 3.5. Serbest *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

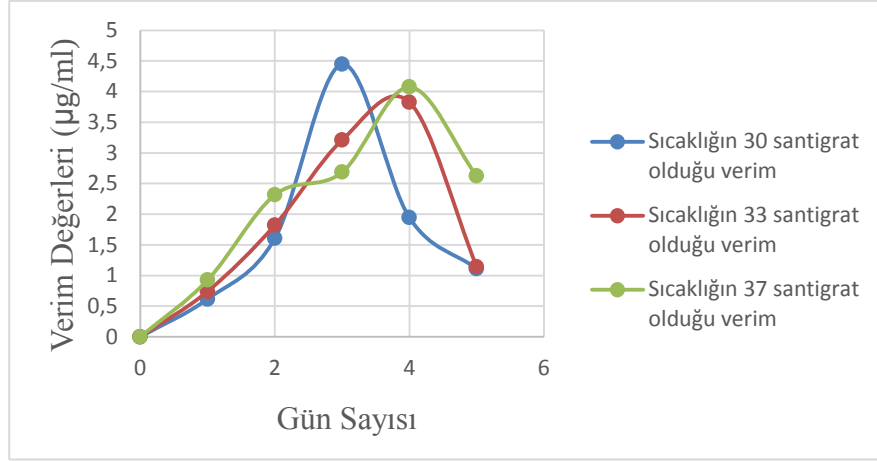
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,840	1,145	1,29	1,092	0,046
2	1,527	1,679	1,832	1,679	0,035
3	28,01	24,12	23,51	25,21	0,35
4	41,60	43,82	47,09	44,17	0,46
5	40,31	41,15	47,56	43	0,358

Tablo 3.6. Serbest *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

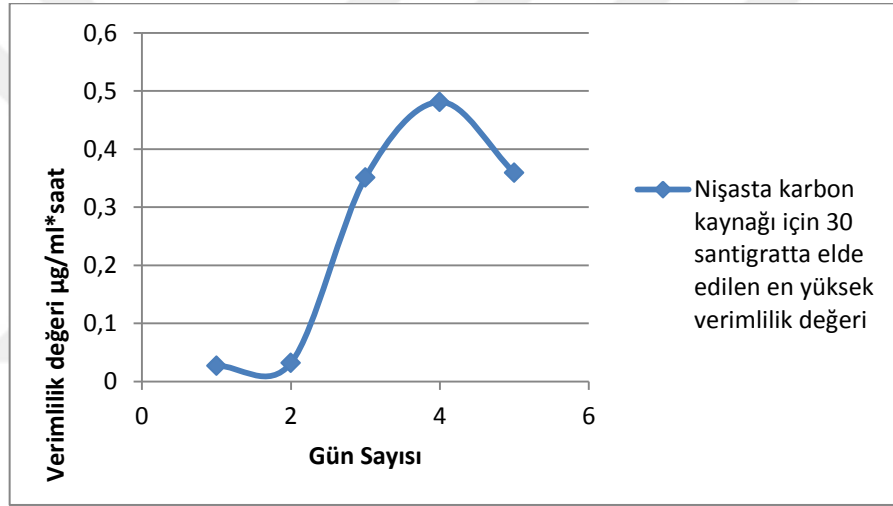
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,153	0,181	0,234	0,189	0,008
2	0,382	0,534	0,550	0,489	0,01
3	0,415	0,437	0,450	0,434	0,006
4	0,504	0,513	0,519	0,512	0,005
5	0,510	0,515	0,526	0,517	0,004

Tablo 3.7. Serbest *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,155	0,182	0,236	0,191	0,008
2	0,385	0,538	0,552	0,492	0,01
3	0,417	0,440	0,450	0,436	0,006
4	0,500	0,505	0,508	0,504	0,005
5	0,510	0,512	0,525	0,516	0,004



Şekil 3.6. Serbest hücre nişasta karbon kaynağı verim değerleri.



Şekil 3.7. Serbest hücre nişasta karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (30 santigrat).

Tablo 3.8. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	1,526	1,374	1,145	1,348	0,056
2	2,290	3,053	4,504	3,282	0,068
3	46,87	49,85	51,53	49,417	0,412
4	46,41	49,85	51,37	49,21	0,513
5	35,80	33,36	35,87	35,01	0,486

Tablo 3.9. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	1,530	1,376	1,148	1,351	0,056
2	2,295	3,057	4,508	3,287	0,068
3	47,45	48,67	50,15	48,757	0,508
4	47,80	49,83	50,55	49,393	0,412
5	35,68	34	35,97	35,217	0,489

Tablo 3.10. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,137	2,214	2,672	2,341	0,098
2	3,206	3,569	4,262	3,679	0,077
3	36,26	37,40	37,56	37,073	0,515
4	46,55	49,24	51,90	49,23	0,513
5	47,87	50	52,10	49,99	0,417

Tablo 3.11. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

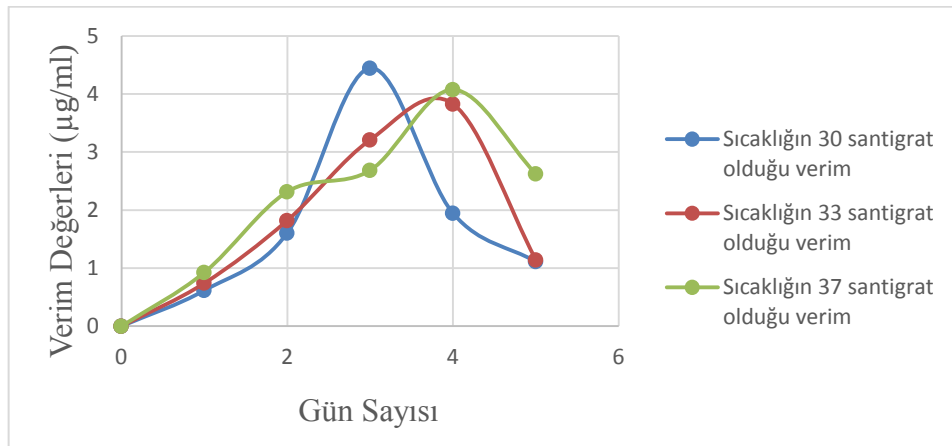
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,134	2,220	2,612	2,322	0,097
2	3,207	3,560	4,145	3,637	0,076
3	37	37,87	38,12	37,663	0,523
4	47,56	49,84	52	49,8	0,519
5	48,15	49,98	51,90	50,01	0,417

Tablo 3.12. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

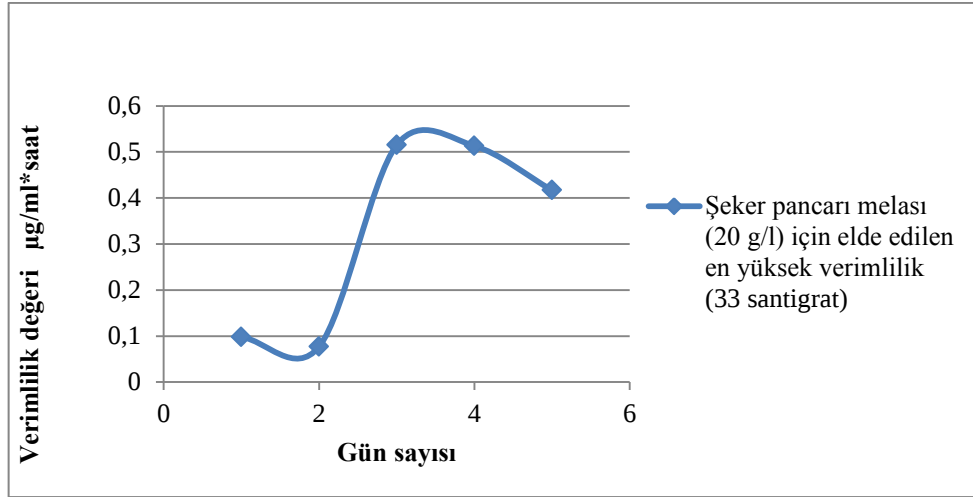
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,458	0,916	1,145	0,84	0,035
2	0,611	0,763	0,770	0,715	0,015
3	1,145	1,374	1,603	1,374	0,019
4	1,603	1,832	2,213	1,883	0,02
5	1,755	1,908	2,06	1,908	0,016

Tablo 3.13. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,460	0,920	1,150	0,843	0,035
2	0,612	0,765	0,776	0,718	0,015
3	1,148	1,375	1,600	1,374	0,019
4	1,604	1,840	2,138	1,861	0,019
5	1,760	1,910	2,08	1,917	0,016



Şekil 3.8. Serbest hücre şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı verim değerleri.



Şekil 3.9. Serbest hücre şeker pancarı melası (20g/l) karbon kaynağı için en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).

Tablo 3.14. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,061	2,214	2,443	2,239	0,093
2	2,671	2,900	3,130	2,9	0,06
3	65,65	70,07	73,05	69,59	0,967
4	39,39	46,03	47,18	44,2	0,614
5	19,54	19,69	20,99	20,073	0,209

Tablo 3.15. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,063	2,216	2,450	2,243	0,093
2	2,675	2,905	3,135	2,905	0,061
3	65,54	70,17	73,38	69,697	0,968
4	41,42	47,13	52,15	46,9	0,489
5	20	21,22	23,63	21,617	0,18

Tablo 3.16. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,443	2,900	3,358	2,9	0,121
2	3,206	3,435	3,664	3,435	0,072
3	66,42	70,15	73,28	69,95	0,972
4	40,92	46,79	51,37	46,36	0,483
5	19,85	20,23	21,60	20,56	0,171

Tablo 3.17. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

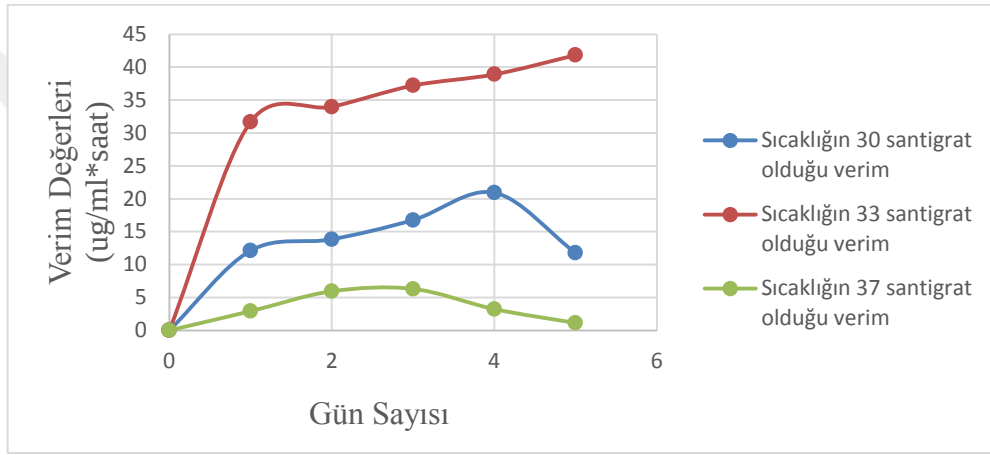
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,445	2,910	3,367	2,907	0,121
2	3,215	3,440	3,670	3,442	0,072
3	67,43	71,23	74,27	70,977	0,986
4	41,13	48,39	52,76	47,427	0,494
5	20	21,24	22,18	21,14	0,176

Tablo 3.18. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,611	1,145	1,297	1,018	0,042
2	1,374	2,061	2,748	2,061	0,043
3	1,755	2,137	2,366	2,086	0,029
4	2,290	2,671	3,053	2,671	0,028
5	2,900	3,206	3,435	3,18	0,027

Tablo 3.19. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,615	1,150	1,300	1,022	0,043
2	1,380	2,068	2,755	2,068	0,043
3	1,780	2,140	2,374	2,098	0,029
4	2,296	2,691	3,100	2,696	0,028
5	2,918	3,215	3,340	3,158	0,026



Şekil 3.10. Serbest hücre şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı verim değerleri.



Şekil 3.11. Serbest hücre şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).

Tablo 3.20. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,443	1,908	1,527	1,959	0,082
2	3,050	3,206	3,511	3,256	0,068
3	24,66	24,27	23,36	24,097	0,335
4	19,54	19,69	20,23	19,82	0,206
5	18,35	17,66	15,25	17,087	0,142

Tablo 3.21. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,454	1,910	1,532	1,965	0,082
2	3,055	3,203	3,412	3,223	0,067
3	23,56	23,12	22,98	23,22	0,323
4	18,27	18,56	19,98	18,937	0,197
5	18,25	18,45	16,26	17,653	0,147

Tablo 3.22. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,672	3,206	3,511	3,13	0,13
2	3,587	3,893	4,580	4,02	0,084
3	42,75	47,18	51,53	47,153	0,655
4	21,22	21,37	21,60	21,397	0,223
5	20,55	21,08	23,05	21,56	0,18

Tablo 3.23. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

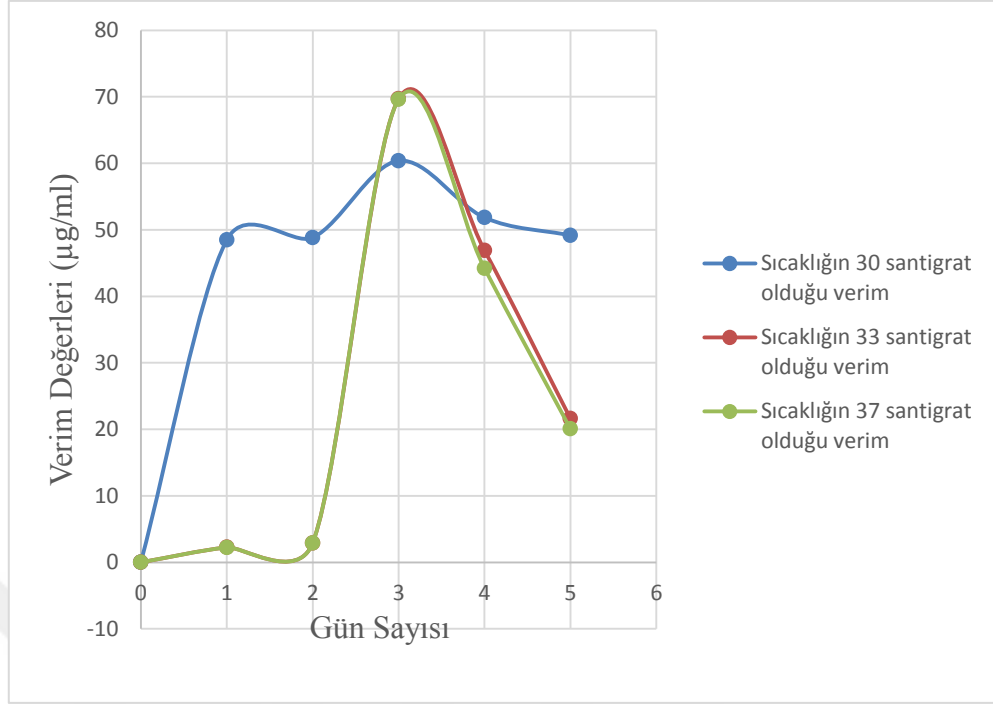
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	2,675	3,210	3,515	3,133	0,131
2	3,590	3,900	4,415	3,968	0,083
3	41,75	46,56	52,17	46,827	0,65
4	22,39	22,45	22,60	22,48	0,234
5	19,32	20,72	21,60	20,547	0,171

Tablo 3.24. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

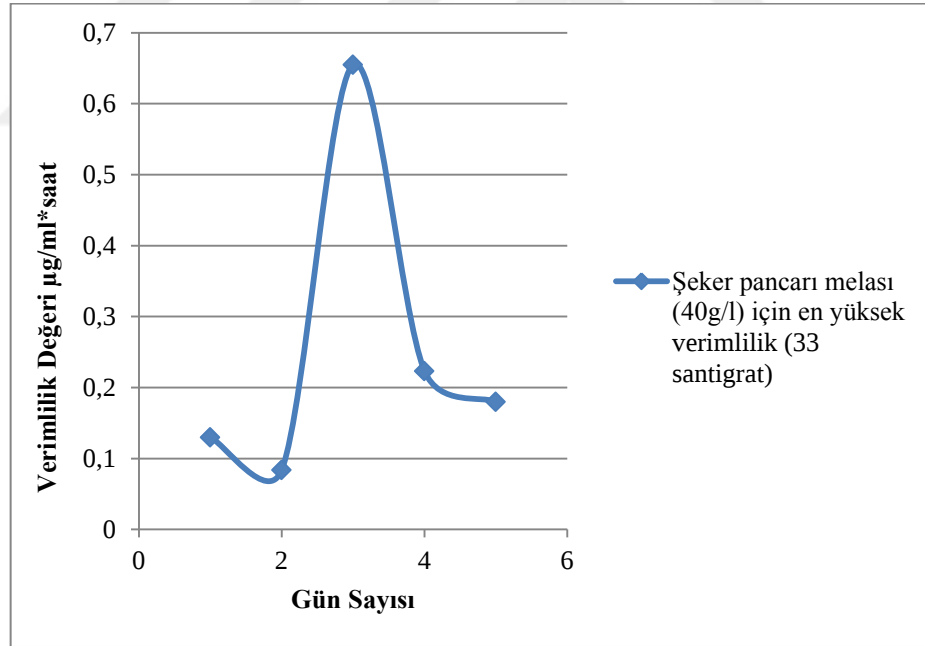
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,960	1,297	1,450	1,236	0,052
2	1,374	1,603	1,908	1,628	0,034
3	1,985	2,214	2,671	2,29	0,032
4	2,137	2,443	2,748	2,443	0,025
5	2,519	2,748	2,977	2,748	0,023

Tablo 3.25. Serbest *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	0,953	1,285	1,376	1,205	0,05
2	1,340	1,598	1,902	1,613	0,034
3	1,976	2,219	2,678	2,291	0,032
4	2,140	2,457	2,785	2,461	0,026
5	2,538	2,687	2,969	2,731	0,023



Şekil 3.12. Serbest hücre şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı verim değerleri.



Şekil 3.13. Serbest hücre şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).

3.3. Streptomisin Üretimi İçin İmmobilize *S. griseus* Suşunun Kullanılması

PVA/aljinat ile immobilize edilmiş hücreler hem nişasta kazein broth besiyerinde hem de 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l şeker pancarı melası besiyerinde 30, 33 ve 37 °C sıcaklık

ve 100 rpm’de her bir işlem için 5 gün inkübasyona bırakıldı. Her gün alınan örnekler ile spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü. Kalibrasyon denkleminde yerine yazılarak üretim değerleri hesaplandı. Elde edilen üretim değerleri Tablo 3.26, 3.27 , 3.28, 3.29, 3.30, 3.31, 3.32, 3.33, 3.34, 3.35, 3.36 ve 3.37 ‘de, verim ve verimlilik değerleri ise Şekil 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20 ve 3.21’ de gösterilmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde en yüksek verim 3.günde, 30 g/l şeker pancarı melası, 33 °C ve 100 rpm’de 60,38 µg/ml olarak elde edilirken en yüksek verimlilik değeri ilk gün 2,019 µg/ml x saat olarak elde edilmiştir.

Tablo 3.26. İmmobilize *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	11,75	11,91	12,67	12,11	0,505
2	13,59	13,74	14,20	13,843	0,288
3	15,98	16,12	18,20	16,767	0,233
4	19,12	20,22	23,43	20,923	0,218
5	13,50	11,25	10,56	11,77	0,098

Tablo 3.27. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (20 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	13,39	14,56	16,78	15,342	0,506
2	14,98	17,76	18,91	17,217	0,359
3	18,65	19,62	23,62	20,63	0,287
4	24,56	25,52	26,67	25,583	0,266
5	20,87	20,33	20,13	20,443	0,17

Tablo 3.28. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (30 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	15,55	16,78	18,53	16,953	0,706
2	16,69	18,85	19,27	18,27	0,381
3	19,65	20,61	22,67	20,977	0,291
4	26,65	27,79	28,89	27,777	0,289
5	29,65	30	31,13	30,26	0,252

Tablo 3.29. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (40 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (30 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	17,53	19,34	21,15	19,34	0,806
2	22,76	23,37	25,57	23,9	0,498
3	25,68	28,89	29,87	28,147	0,391
4	26,87	27,12	28,18	27,39	0,285
5	28,43	29,12	30,15	29,233	0,244

Tablo 3.30. İmmobilize *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	30,34	31,13	33,56	31,677	1,32
2	32,26	34,67	35	33,977	0,708
3	33,49	38,86	39,26	37,203	0,517
4	36,67	39,91	40,13	38,903	0,405
5	38,32	42,15	45	41,823	0,349

Tablo 3.31. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (20 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	38,82	39,13	39,21	39,053	1,627
2	39,23	40,41	42,23	40,623	0,846
3	42,21	45,54	46,43	44,727	0,621
4	45,54	49,65	49,13	48,107	0,501
5	46,65	48,87	45,33	46,95	0,391

Tablo 3.32. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (30 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	46,65	48,83	49,91	48,463	2,019
2	47,76	48,87	49,82	48,817	1,017
3	60,76	60,25	60,13	60,38	0,839
4	55,54	53,32	46,65	51,837	0,54
5	50,13	49,16	48,17	49,153	0,41

Tablo 3.33. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (40 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (33 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	46,67	46,13	45,10	45,967	1,915
2	47,13	48,90	49	48,343	1,007
3	50,45	51	51,12	50,857	0,706
4	51,65	52,25	53,32	52,407	0,546
5	45,76	45,13	45,17	45,353	0,378

Tablo 3.34. İmmobilize *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	4,53	2,13	2,10	2,92	0,122
2	5,90	5,95	5,98	5,943	0,124
3	6,65	6,12	6,15	6,307	0,088
4	3,32	3,26	3,13	3,237	0,034
5	1,12	1,10	1,16	1,127	0,009

Tablo 3.35. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (20 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

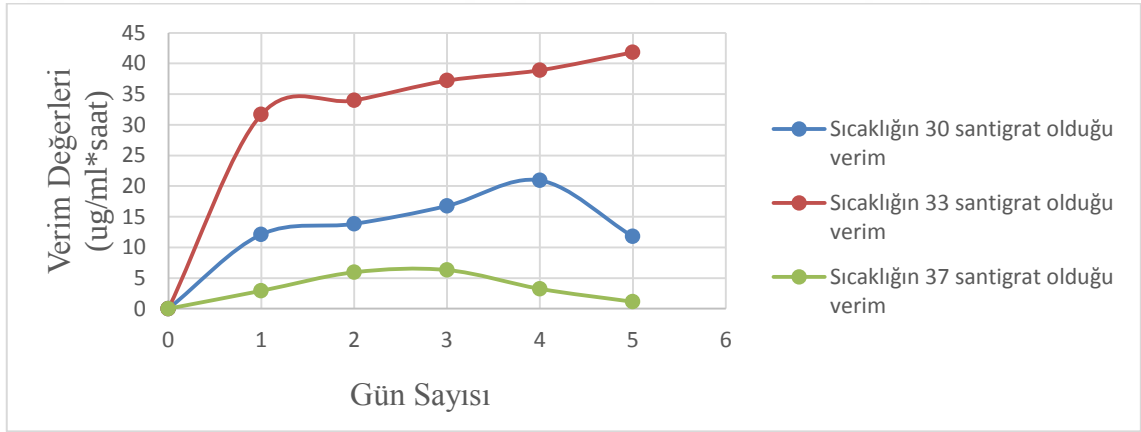
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	7,13	7,75	7,49	7,457	0,311
2	8,18	8,17	8,09	8,147	0,17
3	10,12	10,15	10,18	10,15	0,141
4	5,98	5,09	5,17	5,413	0,056
5	2,13	1,34	0,34	1,27	0,011

Tablo 3.36. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (30 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

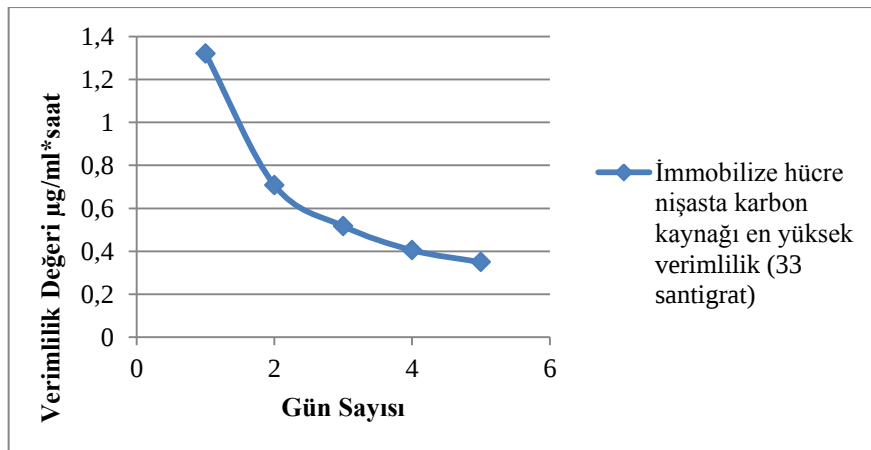
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	9,20	9,13	9,98	9,437	0,393
2	10,12	11,12	13	11,413	0,238
3	14,45	15,43	16	15,293	0,212
4	7,15	7,05	6,96	7,053	0,073
5	3,14	3,15	3,15	3,147	0,026

Tablo 3.37. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası karbon kaynağı ile (40 g/l) streptomisin üretim değerleri tablosu (37 °C sıcaklık ve 100 rpm çalkalama hızı).

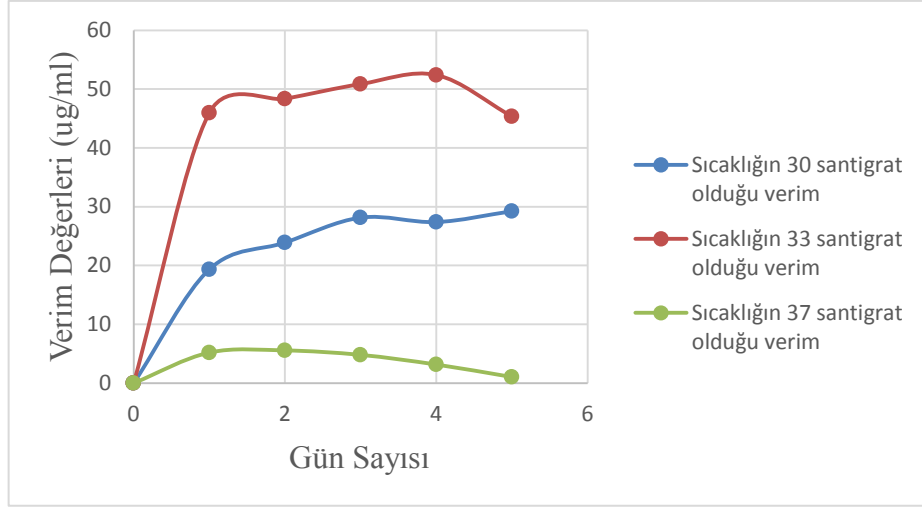
Gün sayısı	1.Örnek Verim (µg/ml)	2.Örnek Verim (µg/ml)	3.Örnek Verim (µg/ml)	Ortalama Verim (µg/ml)	Verimlilik (µg/ml*saat)
1	5,14	5,20	5,25	5,197	0,217
2	5,35	5,65	5,67	5,557	0,116
3	4,78	4,75	4,87	4,8	0,067
4	3,15	3,17	3,16	3,16	0,033
5	1,85	1,13	0,13	1,037	0,009



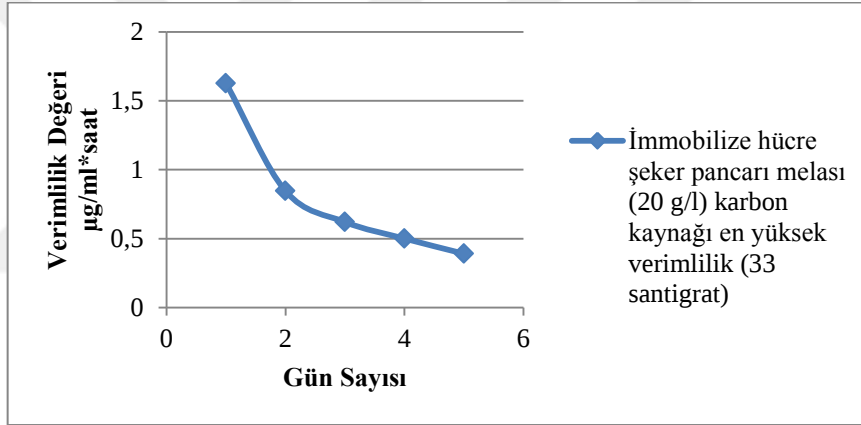
Şekil 3.14. İmmobilize *S. griseus* suşunun nişasta kazein broth ile streptomisin verim değerleri.



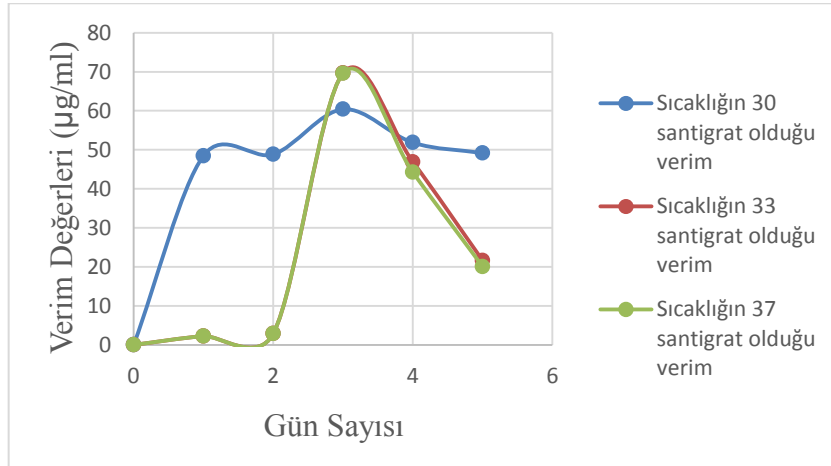
Şekil 3.15. İmmobilize *S. griseus* suşunun nişasta karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).



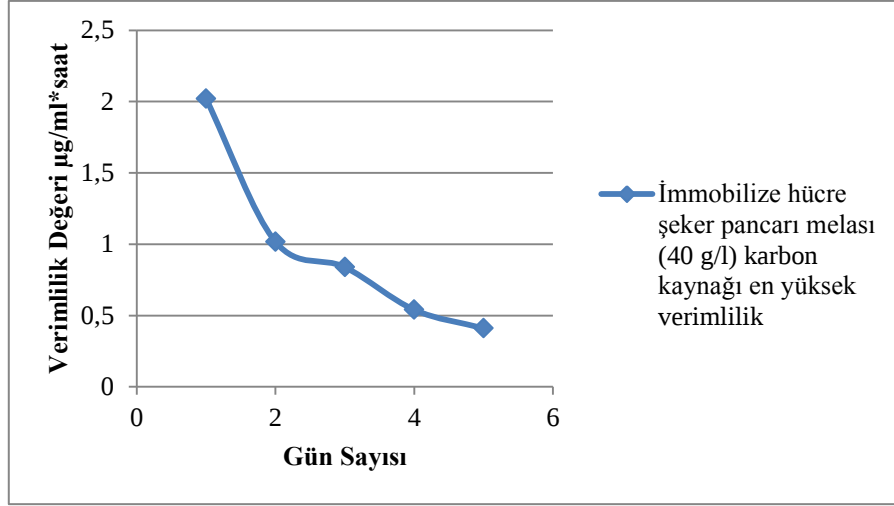
Şekil 3.16. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası(20g/l) ile streptomisin verim değerleri.



Şekil 3.17. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası(20g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).



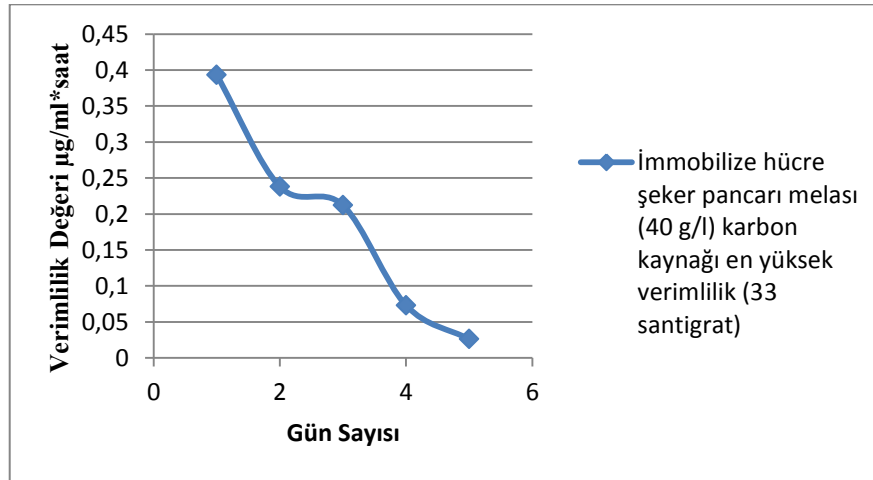
Şekil 3.18. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) ile streptomisin verim değerleri.



Şekil 3.19. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (30g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).



Şekil 3.20. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) ile streptomisin verim değerleri.



Şekil 3.21. İmmobilize *S. griseus* suşunun şeker pancarı melası (40g/l) karbon kaynağı en yüksek verimlilik değeri (33 santigrat).

Sonuçların SPSS ile analizine göre farklı karbon kaynakları ve farklı sıcaklıkta olan verimlilik değerleri arasındaki farklılık hem serbest hem de immobilize *S.griseus* hücreleri için istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

3.4. Fermantasyon Ortamlarında Üretilen Streptomisin Antibiyotiğinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti

Fermantasyon ortamında üretilen streptomisin antibiyotiğinin antimikrobiyal aktivite testinde *E.coli* bakterisine karşı etkili olduğu ve zon çapları oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3.22)



Şekil 3.22. Fermantasyon ortamında üretilen streptomisin antibiyotiğinin antimikrobiyal aktivite test görüntüsü.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Antibiyotikler bakterilerin büyümesini durduran ya da öldüren biyolojik veya sentetik olarak elde edilen oldukça etkili biyoaktif maddelerdir (Saygı vd., 2012). Antibiyotikler, insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde ve hayvanlarda büyümeyi destekleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yalap ve Balcıoğlu, 2008). Krainsky, 1914'te *Streptomyces griseus*'u izole eden ilk kişidir (Waksman vd., 1948).

Gram pozitif, aerobik ve filamentli bakteri özelliği gösteren *S.griseus*'un yaşayabileceği en uygun sıcaklığın 25 ve 35 °C arasında olduğu kanıtlanmıştır (Waksman vd., 1948).

Ram (2014), *S.griseus*'un üretimi için farklı pH ve farklı karbon kaynakları (nişasta, sükröz, maltoz, buğday kepeği ve pirinç kepeği) kullanarak streptomisin üretimi için optimizasyon ortamı sağlamış, *S. griseus*'un Nişasta Kazein Broth'da 24-48 saat boyunca üreme gösterdiğini, nişasta ve pH'nın 9 olduğu ortamda maksimum streptomisin üretiminin gerçekleştiğini belirtmiştir.

Bayer vd. (1990), *S. griseus* bakterilerinin büyümesi için en uygun ortamı bulmaya çalışmışlardır. Bunun için Bangalore topraklarından izole ettikleri *S. griseus* bakterilerini farklı azot ve karbon kaynaklarının olduğu ortamlarda üremeye bırakmışlar, 72 saat sonunda üremelerin maksimum seviyeye çıktığını gözlemlemişlerdir.

Shiroto ve Motoyama (1966), hangi fermantasyon ortamında en yüksek streptomisin veriminin elde edildiğini belirlemek için yaptıkları çalışmada, tuzların *S. griseus* tarafından streptomisin üretimi üzerindeki etkisini incelemişler ve bir glikoz-kazein içeren ortama amonyum tuzlarını eklenmişler ve bu ortamda en yüksek streptomisin veriminin elde edildiğini belirtmişlerdir.

Tanaka ve Omura (1990), antimikrobiyal aktivite testinde streptomisinin *E.coli* ve *Pseudomonas* bakteri türlerine karşı etkili olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir.

Karbon kaynaklarının (Glikoz, gliserol, mannoz, sükröz, nişasta, melas vb.) birçok antibiyotik (eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, neomsin, klaromfenikol vb.) üretiminde etkilerinin araştırılması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır

(Bandyopadhyay vd., 1993; Hamed vd., 2002; Adinarayana vd., 2003; Cruz vd., 2003; Hamed vd., 2005, Rostamza vd., 2008; Sanchez vd., 2010).

S. griseus hücreleri için farklı immobilizasyon teknikleri uygulanmıştır. Bunlardan bir tanesi PVA/aljinat ile immobilizasyondur. *S. griseus* hücreleri pek çok farklı kimyasal kullanarak başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. Fakat toksik etkisi en az ve ucuz olan PVA'nın hücre immobilizasyonu için kullanımının diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu belirtilmiştir. PVA'nın ucuz ve toksik olmayan bir malzeme olduğu ve hücre immobilizasyonu için oldukça avantajlı sonuçlar elde edileceği bildirilmiştir (Dinh and Bach, 2014).

Omar vd. (2013), aminoglikozidlerin (neomisin, gentamisin, amikasin, tobramisin, streptomisin ve kanamisin) farklı farmasötik formülasyonları (hap, şurup, damla, merhem) için spektrofotometrik yöntemi kullanarak elde edilen üretim miktarlarını belirlemişler ve spektrofotometrik yöntemde ilk olarak dinitrofenol (DNP), daha sonra ise pikrik asit (PA) kullanmışlardır. Hem DNP hem de PA için başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Spektrofotometrik prosedürlerin basit olduğunu ve zaman kazandırdığını belirtmişlerdir. Kalite kontrol analizlerinde de bu prosedürlerin avantajlı olduğunu vurgulamışlardır.

Yaptığımız çalışmada, *S.griseus* bakterisinin kullanılmasıyla streptomisin antibiyotikinin üretimi için farklı melas konsantrasyonları, farklı sıcaklık, farklı çalkalama hızı ile optimizasyon sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bunlarla birlikte PVA/aljinat ile immobilizasyon tekniği kullanılmıştır. Serbest hücre ile üretimde en yüksek verim 3.günde 30 g/l melas konsantrasyonunda, 33 °C sıcaklık ve 200 rpm'de 70,977 µg/ml olarak elde edilmiştir. En yüksek verimlilik yine aynı koşullar altında 0,986 µg/ml*saat olarak elde edilmiştir. En yüksek verim ve verimliliğin 33 °C'de olması Waksman vd. (1948) tarafından yapılan çalışmayı desteklemektedir. Immobilize olan hücrelerle gerçekleştirilen çalışmada ise en yüksek verim 1.günde, 30 g/l konsantrasyonda, 33°C sıcaklıkta ve 100 rpm'de 60,38 µg/ml olarak elde edilirken, en yüksek verimlilik ise yine aynı şartlarda fakat 1. günde 2,019 µg/ml*saat olarak elde edilmiştir. Serbest *S. griseus* hücreleri ile yapılan deneylerde üretim değerleri daha geç sürede artış gösterirken, immobilize *S.griseus* hücreleri ile yapılan deneylerde üretim değerleri daha erken sürede artış göstermiştir.

Serbest hücre için farklı sıcaklık, farklı çalkalama hızı ve farklı karbon kaynakları ile yapılan ölçümler sonucunda maksimum üreme düzeyine genel olarak 72 saat sonra

ulaşılmıştır. Bu da Bayer vd. (1990) tarafından yapılan çalışmalar elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Serbest hücre için kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında, Omar vd. (2013) tarafından yapılan çalışma baz alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan streptomisin örneklerinin spektrofotometre cihazında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Çalışma pikrik asit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pikrik asit ile yapılan çalışma sonuçlarında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan streptomisin örnekleri arasında yapılan ölçümler paralellik göstermiştir. Bu sonuçlar birbirleriyle paralellik gösterdiği için çalışmada DNP kullanılmamıştır. Streptomisin miktarının artmasıyla birlikte ölçülen absorbans değerlerinin artmış olması da Omar vd. (2013) tarafından yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak, farklı sıcaklıklar, farklı çalkalama hızları ve farklı melas konsantrasyonlarında yapılan denemeler, elde edilen verim, verimlilik değerleri sonucunda en yüksek verim ve verimlilik değerlerinin 30 ve 33 °C'de olduğu gözlemlenmiştir. Çalkalama hızının serbest hücre üretimine etkisinin çok az olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple immobilize hücre üretiminde çalkalama hızı sabit alınarak üretime devam edilmiştir. En yüksek verim genel olarak 3.gün elde edilmekle birlikte bazı değerlerde 4 ve 5.gün artış olduğu gözlemlenmiştir. Serbest *S. griseus* hücreleri ile yapılan üretim sonucunda elde edilen verim ve verimlilik değerleri immobilize edilmiş *S.griseus* hücrelerinden düşük çıkmıştır. Sıcaklığın 30 °C ve 33 °C olduğu verim ve verimlilik değerleri birbirine yaklaşık değerler olurken 37 °C sıcaklıkta bu değerlerin oldukça düştüğü gözlemlenmiştir.

Sonuçların SPSS ile analizine göre farklı karbon kaynakları ve farklı sıcaklıkta olan verimlilik değerleri arasındaki farklılık hem serbest hem de immobilize *S.griseus* hücreleri için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

KAYNAKLAR

1. **Adinarayana, K., Srinivasulu, B., Bapi-Raju, K.V.V.S.N. and Ellaiah, P.,** 2004. Continuous neomycin production by immobilized cells of *Streptomyces marinensis* NUV-5 in an airlift bioreactor. *Process Biochemistry*, **39** , 1407-1414.
2. **Akkan, A.G.,** 1997. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, İstanbul, **31**, 53-62 .
3. **Aktaş, D.,** 2004. Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Aljinat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
4. **Aktuğlu, Y.,** 2002. Geçmişten Günümüze Antibiyotikler. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*, **8**, 9-22.
5. **Altun, B., Karagöz, S., Uzun, Ö., Akova, M. ve Ünal, S.,** 1998. Türkiye'deki stafılakokların fusidik asit ve diğer dört antibiyotik ile birlikte direnç durumunun karşılaştırılması. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*, **7**, 125-164.
6. **Aouar, L., Lerat, S, Ouffroukh, A. and Boulahrouf, A.,** 2012. Taxonomic identification of rhizospheric actinobacteria isolated from Algerian semi-arid soil exhibiting antagonistic activities against plant fungal pathogens. *Journal of Plant Pathology*, **34**, 1-12.
7. **Bandyopadhyay, A., Das, A.K. and Mandal, S.K.,** 1993. Erythromycin production by *Streptomyces erythreus* entrapped in calcium alginate beads. *Biotechnology Letters*, **15**, 1003-1006.
8. **Barriere, SI. and Flaherty, JF.,** 1984 Third generation cephalosporins: Acritical evaluation. *Clinical Pharmacology*, **3**, 351-373.
9. **Baquero, F.,** 2001. Low-level antibiotic resistance. In: Hughes D, Anderson DI (eds). *Antibiotic Development and Resistance*, London-New York: Taylor and Francis, **5**, 117-136.

10. **Bayer, D., Zhou, W., Holzhauer, K. and Schuegar, K.,** 1990. Investigation cephalosporin C production in an airlift loop towel loop reactor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **30**, 26-33.
11. **Beğendik, F., Fidan, I., Sultan, N. ve Türet, S.,** 1999. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarının fusidik aside direnç durumu. *Ankem Dergisi* **13**, 102-103.
12. **Bhatia, S., Khattak, S. and Robets, C.,** 2005. Polyelectrolytes for Cell Encapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **10**, 45-51.
13. **Bozdoğan, B. and Appelbaum, P.,** 2004. Oxazolidinones: Activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **23**, 113-119.
14. **Cannell, R.J.P.,** 1998. How to Approach the Isolation of a Natural Product. Humana Press. *Chemical Engineering Research and Design*, **1**, 49-51,
15. **Cebula, TA., Levy, DD. and LeClerc, JE.,** 2001. Mutator bacteria and resistance development. In: Hughes D, Anderson DI (eds). *Antibiotic Development and Resistance*, London-New York: Taylor and Francis, **9**, 107-116.
16. **Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Mauto, Y.,** 1972. Preparation and Industrial Application of Immobilized Aminoacylases. *Society for Fermentation Technology*, **5**, 383-389.
17. **Cruz, A.J.G.C., Pan, T., Giordano, R.C., Araujo, M.L.G.C., Hokka, C.,** 2003. Cephalosporin c production by immobilized *Cephalosporium acremonium* cells in a repeated batch tower bioreactor. *Wiley InterScience*, **85**, 96-102.
18. **Çokça, F.,** 2000. Aminoglikozidlerin farmakolojisi ve klinik farmakolojisi. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **5**, 37-45.
19. **Dinh, PV. and Bach LT.,** 2014. Immobilized bacteria by using PVA (Polyvinyl alcohol) crosslinked with sodium sulfate. *International Journal of Science and Engineering(IJSE)*, **7**, 41-47.
20. **Doğancı, L.,** 2001. Antibiyotik direncinin sıklığı üzerine antibiyotik kullanımının etkisi. *Klimik Dergisi*, **14**, 57-61.
21. **Drusano, G.,** 2001. Pharmacodynamic and pharmacokinetic considerations in antimicrobial selection: focus on telithromycin. *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*, **3**, 24-29.

22. **Falagas, M. and Gorbach, S.,** 1995. Clindamycin and metronidazole. *The Medical Clinics of North America*, **79**, 845-867.
23. **Fekety, R.,** 2000. Vancomycin, teicoplanin, and the streptogramins: quinopristin and dalfopristin. *Texas Heart Institute Journal*, **10**, 382-392.
24. **Flor, P. and Hayashida, S.,** 1983. Continuous Production of High-Glucose Syrup by Chitin-Immobilized Amylase. *Biotechnology and Bioengineering*, **8**, 1973-1980.
25. **Freeman, A. and Aharonowitz, Y.,** 1981. Immobilization of Microbial-Cells in Crosslinked, Pre-Polymerized, Linear Polyacrylamide Gels Antibiotic Production by Immobilized *Streptomyces Clavuligerus* Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, **12**, 2747-2759.
26. **Gholap, S.G., Jog, P. and Badiger, M.,** 2004. Synthesis and characterization of hydrophobically modified poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane. *Polymer*, **45**, 5863-5873.
27. **Gilbert, D.N., Moellering, R.C. and Sande, M.A.,** 2002. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, 32nd ed, Antimicrobial Therapy, Inc, USA.
28. **Gür, D.,** 2016. Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: Uygulama, yorum ve uzman kurallar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **46**, 1-206.
29. **Hamed, J., Malekzadeh, F. and Niknam, V.,** 2002. Improved production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by various plant oils. *Biotechnology Letters*, **24**, 697-700.
30. **Hamed, J., Khodagholi, F., Hassani-Nasab, A.,** 2005. Increased erythromycin production by alginate as a medium ingredient or immobilization support in cultures of *Saccharopolyspora erythraea*. *Biotechnology Letters*, **27**, 661–664.
31. **Hashimoto, S. and Furukawa, K.,** 1987. Immobilization of activated-sludge by pva boric-acid method. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 52-59.
32. **Higgins, G., Fluit, C. and Schmitz, F.,** 2003. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current drug targets*, **4**, 181-190.
33. **Horinouchi, S.,** 2007. “Mining and Polishing of the Treasure Trove in the Bacterial Genus *Streptomyces*.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 283-299.
34. **Johnston, N.J., Mukhtar, T.A. and Wright, G.D.,** 2002. Streptogramin antibiotics. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, **3**, 335-344.

35. **Kahan, JS. and Kahan, FM.,** 1979. Goegleman R, et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. 1. Discovery, isolation a new beta-lactam antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, **32**, 1-12.
36. **Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W. and Walsh, C.,** 2005. Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, **105**, 425- 487.
37. **Karaman, R. and Jum, S.,** 2015. Antibiotics. *Nova Science Publisher*, **10**, 41-73.
38. **Kaya, S.,** 2007. Antibiyotikler, Medisan Yayın Evi, Ankara.
39. **Khoo, K.M. and Ting, P.,** 2001. Biosorption of gold by immobilized fungal biomass. *Biochemical Engineering Journal*, **1**, 51-59.
40. **Kim, B.H., Andersen, C. and Benz, R.,** 2001. "Identification of a cell wall channel of *S. griseus*: the channel contains a binding site for streptomycin." *Molecular Microbiology*, **41**, 665–673.
41. **Kos, B., Suskovic, J. and Dzidic, S.,** 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technology and Biotechnology*, **46**, 11-21.
42. **Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R. and Koutinas, A.,** 2004. Immobilization technologies and support materials suitable alcohol beverages production: A Review. *Food Microbiology*, **21**, 377-397.
43. **Kurt, H.,** 2000. Penisilinlerin farmakolojisi ve antibiyotiklerin klinik farmakolojisi, Turgut Yayıncılık, İstanbul.
44. **Kuu, W.Y. and Polack, J.,** 1983. Improving immobilized biocatalysts by gel phase polymerization. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 1995-2006.
45. **Kümmerer, K.,** 2009. Antibiotics in the aquatic environment A Review Part I. *Chemosphere*, **75**, 417-434.
46. **Lambert, T.,** 2005. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**, 291-298.
47. **Levy, S.B.,** 1992. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle, The Antibiotic Paradox, New York.
48. **Lucia, P., Negut, C., Oniscu, C. and Caproiu, M.,** 2018. Synthesis and Antibacterial Activity of Some Novel Quinolones. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**, 151-159.
49. **Magnet, S. and Blanchard, S.,** 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chemical Reviews*, **105**, 477–498.

50. **Marques, D., Machado, S., Ebinuma, V., Duarte, C., Converti, A. and Porto, A.,** 2018. Production of β - Lactamase Inhibitors by *Streptomyces* Species. *Antibiotics*, **7**, 61-63.
51. **Maslinska, M.,** 2013. Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **4**, 91-101.
52. **Messing, R., Opperman, R. and Kolot, F.,** 1979. Pore dimensions for accumulating biomass, in immobilized microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering*, **106**, 13-28.
53. **Mitz, M.,** 1956. New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism. *Science*, **123**, 1076-1077.
54. **Mondal, S.,** 2017. Sulfonamides. *Antibiotics*, **3**, 73-79.
55. **Mülazımoğlu L.,** 2014. Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnç mekanizmaları ve epidemiyoloji. *Klimik dergisi*, **1**, 464-466.
56. **Naveed, S., Shafiq, A., Khan, M., Jamal, M. and Zafar, H.,** 2014. _Degradation study of available brands of metformin in karachi using UV spectrophotometer. *Journal of Diabetes and Metabolism*, **5**, 328-330.
57. **Navarro, M. and Durand, G.,** 1977. Modification of yeast metabolism by immobilization on porous glass. *European Journal of Applied Microbiology*, **4**, 243-254.
58. **Nelson, J. and Griffin, E.,** 1916. Adsorption of invertase. *Journal of the Chemical Society*, **38**, 1109-1115.
59. **Nguyen, F., Starosta, A., Arenz, S. and Sohmen, D.,** 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **76**, 430-451.
60. **Omar, M., Dalia, M., Hammad, M., Alshymaa, A.,** 2013. Validated spectrophotometric in pharmaceutical formulations. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3**, 151-161.
61. **Oskay, M., Tamer, A.,** 2009. Streptomyces kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını. *Journal of New World Science Academy*, **4**, 48-60.
62. **Öner, M.,** 1992. Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:4, İzmir, 231-245.
63. **Özaras, R., Tabak, F. and Öztürk, R.,** 2002. Antibiyotikler. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dergisi*, **31**, 51-82.

64. **Ram, L.,** 2014. Optimization of medium for the production of streptomycin by *Streptomyces griseus*. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, **3**, 1-8.
65. **Ramaraj, B.,** 2007. Crosslinked poly(vinyl alcohol) and starch composite films. II. Physicomechanical, thermal properties and swelling studies. *Journal of Applied Polymer Science*, **2**, 909-916.
66. **Reynolds, P.,** 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **8**, 943-950.
67. **Rostamza, M., Noohi, A. and Hamed, J.,** 2008. Enhancement in production of erythromycin by *Saccharopolyspora erythraea* by the use of suitable industrial seeding-media. *Daru*, **16** , 13-17.
68. **Sanchez, S., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Avalos, M., Guzman-Trampe, S., Rodriguez-Sanoja, R., Langley, E. and Ruiz, B.,** 2010. Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of Antibiotics*, **63**, 442-459.
69. **Sattur, A., Lee, J., Song, K. and Panda, T.,** 2012. Analytical techniques for vancomycin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **5**, 153-158.
70. **Saygi, Ş., Battal, D. ve Özlen Ş. N.,** 2012. Çevre ve insan sağlığı yönünden ilaç atıklarının önemi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **16**, 82-90.
71. **Scrugg, A.H.,** 1991. "Bioreactors in Biotechnology, A Practical Approach", Ellis Horwood Series in Biochemistry and Biotechnology, New York.
72. **Shin, SJ., Kang, SG., Nabin, R., Kang, ML. and Yoo, HS.,** 2005. Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, **106**, 73–77.
73. **Shirato, S. and Motoyama, H.,** Fermentation studies with *S.griseus* synthetic media for the production of streptomycin, *Applied Microbiology*, **14**, 706-710.
74. **Shlaes, DM., Binczewski, B. and Rice, LB.,** 1993. Emerging antimicrobial resistance and the immunocompromised host. *Clinical Infectious Diseases*, **39**, 718-722 .
75. **Shlaes, DM., Gerding, DN. and John, FJ.,** 1997. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Disease Society of America Joint Committee on the prevention of antimicrobial resistance: Guidelines for the

- prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, 25, 584-599.
76. **Sulkowski, E. and Laskowski, M.,** 1974. Venom exonuclease (Phosphodiesterase) immobilized on concanavalin-A-sepharose. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 57, 463-468.
 77. **Sykes, J. and Papich, M.,** 2014. Antiprotozoal Drugs. *Nihon Rinsho*, 2, 97-104.
 78. **Tanaka, A. and Kawamoto, T.,** 1999. Cell and enzyme immobilization. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Ed. Demain, A., and Davies, J., American Society for Microbiology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 4, 128-130.
 79. **Tanaka, Y. and Omura, S.,** 1990. Metabolism and products of actinomycetes: an introduction. *Actinomycetologica*, 4, 13-14.
 80. **Telefoncu, A.,** 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu Notları. Ege Üniversitesi. İzmir.
 81. **Töreci, K.,** 1989. Antibiyotik direnç mekanizmaları, *ANKEM Dergisi*. 3, 445-456.
 82. **Töreci, K.,** 1996. Antibiyotik direnç mekanizmaları ve hastane infeksiyonları açısından önemi. *Aktüel Tıp Dergisi*, 1, 441-447.
 83. **Tunçtan, B. ve Buharaloğlu, K.,** 2005. Farmakoloji Terimleri Sözlüğü. *Türk Farmakoloji ve Klinik Araştırma Dergisi*, 3, 3-44 .
 84. **Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N. and Nasiri S.,** 2016. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnology Letters*, 38, 223–233.
 85. **Vannuffel, P. and Cocito, C.,** 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, 51, 20-30.
 86. **Vojtisek, V. and Jirku, V.,** 1983. Immobilized cells. *Folia Microbiol (Praha). Journal of Biotechnology*, 28, 309-340.
 87. **Waksman, S., Reilly, A., Harris, C. and Dale, A.,** 1948. “*Streptomyces griseus*(Krainsky) Waksman and Henrici.” *Journal Bacteriology*, 56, 259-269.
 88. **Wan, Y.C., Liu, Y., Liu, C., Ma, H., Yu, H., Kang, J., Gao, C., Wu, Z., Zheng, D. and Lu, B.,** 2018. Rapid determination of neomycin in biological samples

using fluorescent sensor based on quantum dots with doubly selective binding sites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 154, 75–84.

89. **Wise, R.**, 1999. A review of the mechanism of action and resistance of antimicrobial agents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 105, 456-498.
90. **Yalap, K.S. ve Balcioğlu, I.A.**, 2008. Oksitetrasiklinin İleri Oksidasyon İle Arıtımına Su Bileşenlerinin Etkisi. *İTÜ Dergisi*, **18**, 51-60.
91. **Yazar, E.**, 2009. Antibiyotikler. Nobel Matbaacılık, İstanbul.
92. **Yoneyama, H. and Katsumata, R.**, 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70, 1060-1075.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Pelin Erdemir

Doğum Tarihi : 13.07.1993

Doğum Yeri : Elazığ

Uyruk : T.C

Medeni Durumu : Bekar

Cinsiyet :Kadın

İletişim Bilgileri

Adres : Akpınar Mah. Kolordu Cad. Karayolcuları Apt. 10/6 ELAZIĞ

Cep Telefonu : 0539 976 0885

E- posta : pelinerdemir93@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Lise :Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi, Fen Bilimleri – Elazığ (11.11. 2008- 17.06.2011)
83,53/100

Üniversite : Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik-Elazığ
(07.09.2012- 09-06.2017) 3,24/4

İş Deneyimi

Haziran 2015-Temmuz 2015 : Stajyer mühendis, Fırat Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı-Elazığ.

Haziran 2016- Temmuz 2016 : Stajyer mühendis, Devlet Su İşleri 9.Bölge Müdürlüğü, Kalite Kontrol ve Su Arıtma Birimi-Elazığ.