

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**MAĞARALARDAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ,
DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİLEŞİKLERİN
KARAKTERİZASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Fatma Seçil ÇELİK

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL

BURDUR, 2024

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Mağaralardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Doğal Antimikrobiyal Bileşiklerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması**” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05/08/2024

Fatma Seçil ÇELİK

ÖNSÖZ

Tüm lisansüstü eğitim sürecim ve bu çalışma süresi boyunca bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL' e teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalar ve analizlerin yürütülmesinde imkanlarından faydalandığım Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin personeline, HPLC analizlerini gerçekleştiren Doç. Dr. Hale Seçilmiş CANBAY'a, Kimya Mühendisi Mahmut DOĞANTÜRK'e ve deneysel çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Orhan YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

LC-Q-TOF MS analizlerinin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz/test Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (EGE-MATAL) personeline teşekkürlerimi sunarım.

0738-DR-21 No' lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Beni her anlamda destekleyen annem Hayriye KOÇ, babam İsmail KOÇ ve eşim Mehmet Ali ÇELİK' e sonsuz sevgilerimi sunarım.

Ağustos, 2024

Fatma Seçil ÇELİK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antibiyotiklerin Tanımı ve Kısa Tarihçesi.....	3
2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	5
2.3. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	5
2.3.1. Beta-laktamlar.....	5
2.3.2. Makrolidler	6
2.3.3. Tetrasiklinler.....	7
2.3.4. Kinolonlar	9
2.3.5. Aminoglikozitler.....	10
2.4. Antibiyotiklerin Etki Tarzlarına Göre Sınıflandırılması	11
2.4.1. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	12
2.4.1.1. Hücre Çeperi ve Sitoplazmik Membranın İnhibisyonu	12
2.4.1.2. Protein sentezinin inhibisyonu	12
2.4.1.3 Nükleik asit sentezinin inhibisyonu	13
2.4.1.4. Diğer metabolik süreçlerin inhibisyonu.....	14
2.5. Antibiyotik Direnci.....	14
2.5.1. Direncin Kökeni.....	14
2.5.1.1. Doğal Direnç	14
2.5.1.2. Kazanılmış Direnç	14
2.5.2. Direnç Mekanizmaları	15
2.5.2.1. İlaç Alımının Sınırlanması.....	15
2.5.2.2. İlaç inaktivasyonu	16
2.6. Doğal Antimikrobiyal Ürünler	18
2.6.1. Doğal Antimikrobiyal Ürünlerin Özellikleri	18
2.7. Doğal Antimikrobiyal Ürünlerin Ekstrem Ortamlardan Keşfi.....	21
2.8. Mağara Ekosistemleri ve Mikroflorası.....	25
2.8.1. Mağara Ekosistemleri	25
2.8.2. Mağara Mikroflorası.....	27
2.8.2.1. Bakteriyel Çeşitlilik	28
2.8.2.2. Fungal Çeşitlilik.....	30
2.8.2.3. <i>Archaea</i> Çeşitliliği	31
2.9. Mağara Mikroorganizmalarının Biyoteknolojik Açıdan Önemi	33
2.9.1. Mağara Mikroorganizmalarının Sekonder Metabolit Üretimi.....	33
2.9.2. Mağara Mikroorganizmalarının Biyoaktif Bileşenleri	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. MATERYAL.....	38
3.1.1. Çalışmada Kullanılan İzolatlar	38
3.1.2. Test Mikroorganizmaları	38

3.1.3. Sarf Malzemeler.....	39
3.1.3.1. İzolatların Kültüre Edilmesinde Kullanılan Sarf Malzemeler	39
3.1.3.2. Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Sarf Malzemeler	41
3.1.3.3. İzolatların Tanılamasında Kullanılan Sarf Malzemeler.....	42
3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar	43
3.2. Yöntem	44
3.2.1. Antimikrobiyal Madde Üretici İzolatların Seçilmesi	44
3.2.1.1. Gram Boyama Yöntemi	44
3.2.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	45
3.2.2.1. Kültür Sıvılarının Toplanması	45
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Disk Difüzyon Yöntemi ile Taranması.....	47
3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Ekstrasellüler Enzim	
Aktiviteleri ve Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimlerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.4.1. Katalaz Testi	49
3.2.4.2. Proteaz Testi.....	49
3.2.4.3. Amilaz Testi.....	49
3.2.4.4. Jelatinaz Testi.....	50
3.2.4.5. Üreaz Testi	50
3.2.4.6. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi	50
3.2.5. Çoklu Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Belirlenmesi	50
3.2.6. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Tanılanması.....	50
3.2.6.1. İzolatların Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi	50
3.2.6.2. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	51
3.2.6.3. İzolatların Filogenetik Özelliklerinin Belirlenmesi	51
3.2.7. Antimikrobiyal Bileşiklerin Üretimi İçin Kültür Büyüme Parametrelerinin	
Optimizasyonu	53
3.2.8. Antimikrobiyal Bileşiklerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.....	54
3.2.8.1 Kültür Sıvılarının Toplanması	54
3.2.8.2. Protein Tayini.....	55
3.2.9 Antimikrobiyal Maddenin Ekstraksiyonu.....	56
3.2.10. İnce Tabaka Kromatografisi	57
3.2.11. Antimikrobiyal Maddenin HPLC Analizi ile Karakterizasyonu	58
3.2.12. Antimikrobiyal Maddenin LC/Q-TOF MS Analizi ile Karakterizasyonu.....	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	64
4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tarama Testlerinde Kullanılacak İzolatların	
Belirlenmesi	64
4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	68
4.2.1. Kültür Sıvılarının Toplanması	68
4.2.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi	70
4.3. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Ekstrasellüler Enzim ve EPS	
Üretimlerinin Belirlenmesi	73
4.4. Çoklu Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Belirlenmesi	76
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Tanılanması.....	80
4.6. Antimikrobiyal Bileşiklerin Üretimi İçin Kültür Büyüme Parametrelerinin	
Optimizasyonu	85
4.7. Antimikrobiyal Maddenin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	
4.7.1. Kültür Sıvılarının Toplanması	96
4.7.2. Protein Tayini	97
4.7.3. Antimikrobiyal Maddenin Ekstraksiyonu	101
4.7.4. İnce Tabaka Kromatografisi(TLC).....	98

4.7.5. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Karakterizasyonu	104
4.7.5.1. Antimikrobiyal Etkili Maddenin HPLC Analizi İle Karakterizasyonu	104
4.7.5.2. Antimikrobiyal Maddenin LC-Q-TOF MS Analizi ile Karakterizasyonu	117
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	133
KAYNAKLAR	138
EKLER.....	164



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Antibiyotik sonrası dönem zaman çizelgesi	4
Şekil 2.2. Beta laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. Makrolid grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4. Tetrasiklinler grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.5. Kinolon grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı.	10
Şekil 2.6. Aminoglikozit grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.7. Gram negatif bakterilerde en yaygın bakteri direnci mekanizmaları. Atılım pompaları, porin mutasyonu, penisilin bağlayıcı proteinlerde (PBP'ler) mutasyon, enzimatik inhibisyon ve ilacın hedef modifikasyonu.	15
Şekil 2.8. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif bileşiklerin ve sekonder metabolitlerin izolasyonu, karakterizasyonu, tanımlanması ve potansiyel uygulamalarının şematik bir temsili	23
Şekil 2.9. Kültüre bağlı doğal ürün keşfinin basamakları	24
Şekil 2.10. Mağara ekosistemlerinde bulunan bölgeler	27
Şekil 2.11. Grotta Nera Mağarası (İtalya) iç tavanı (a, b, c), duvarları (d, e, f) ve zemininde (g, h, i) bulunan moon milk yapıları	28
Şekil 2.12. Yarasalarda beyaz burun sendromu	31
Şekil 2.13. Çeşitli mağaralardan izole edilen biyoaktif bileşenlerin molekül yapıları ..	37
Şekil 4.1. Disk difüzyon testi sonucunda oluşan zon görünüşleri	72
Şekil 4.2. Eksrasellüller enzim testleri	76
Şekil 4.3. İzolatların EPS üretim ortamında gelişimi	76
Şekil 4.4. İzolatların test mikroorganizmalarına göre antimikrobiyal aktiviteleri (%)....	77
Şekil 4.5. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda görüntülenen bant görünüşleri	81
Şekil 4.6. <i>Rhodoccus erythropolis</i> BP-2G-M izolatının farklı sıcaklıklarda büyüme eğrisi grafiği	85
Şekil 4.7. <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M izolatının farklı sıcaklıklarda büyüme eğrisi grafiği	86
Şekil 4.8. <i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M izolatının farklı sıcaklıklarda büyüme eğrisi grafiği	86

Şekil 4.9. <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP- K9D-M izolatının farklı gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafiği.....	88
Şekil 4.10. <i>Rhodoccus erythropolis</i> BP-2G-M izolatının farklı besiyerlerinde gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafikleri.....	88
Şekil 4.11. <i>Arthrobacter sp.</i> BP- 2F-M izolatının farklı besiyerlerinde gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafikleri	89
Şekil 4.12. <i>Arthrobacter sp.</i> BP- 2F-M izolatının farklı pH içeren gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafikleri	91
Şekil 4.13. <i>Rhodoccus erythropolis</i> BP-2G-M izolatının farklı pH içeren gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafiği.....	91
Şekil 4.14. <i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M izolatının farklı pH içeren besi yeri ortamlarında gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafiği	92
Şekil 4.15. Kültür sıvılarının toplanması deneyinin aşamaları (Yücel, 2017).....	97
Şekil 4.16. BSA standart grafiği	98
Şekil 4.17. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların <i>Listeria monocytogenes</i> 'e karşı antimikrobiyal aktivitesi	99
Şekil 4.18. İnce tabaka kromatografisi sonucunda görüntülenen spotlar	103
Şekil 4.19. Gallik asit kalibrasyon grafiği	105
Şekil 4.20. Kafeik asit kalibrasyon grafiği.....	105
Şekil 4.21. p-kumarik asit kalibrasyon grafiği.....	105
Şekil 4.22. Ferulik asit kalibrasyon grafiği.....	106
Şekil 4.23. Rutin kalibrasyon grafiği	106
Şekil 4.24. Kateşin kalibrasyon grafiği.....	106
Şekil 4.25. Kuersetin kalibrasyon grafiği	107
Şekil 4.26. Fenolik bileşik numune kromatogramı.....	107
Şekil 4.27. Askorbik asit numune kromatogramı	109
Şekil 4.28. α - tokoferol numune kromatogramı.....	110
Şekil 4.29. α - tokoferol standart kromatogramı	110
Şekil 4.30. Askorbik asit kalibrasyon grafiği.....	111
Şekil 4.31. Alfa tokoferol kalibrasyon grafiği	111
Şekil 4.32. Butirik asit kalibrasyon grafiği	115
Şekil 4.33. Asetik asit kalibrasyon grafiği	115
Şekil 4.34. Propiyonik asit kalibrasyon grafiği.....	115
Şekil 4.35. Benzoik asit kalibrasyon grafiği	116

Şekil 4.36.	Fenol kalibrasyon grafiği.....	116
EK 1 - Şekil 2.1.	BP-2F-M ekstraktında saptanan streptomisin Q-TOF-MS grafiği... 	164
EK 2 - Şekil 2.2.	BP-2F-M ekstraktında saptanan betain Q-TOF-MS grafiği.....	164
EK 3 - Şekil 2.3.	BP-2F-M ekstraktında saptanan His Ile Gln Q-TOF-MS grafiği.....	164
EK 4 - Şekil 2.4.	BP-2F-M ekstraktında saptanan pyridoxine Q-TOF-MS grafiği	165
EK 5 - Şekil 2.5.	BP-2F-M ekstraktında saptanan His Leu Q-TOF-MS grafiği.....	165
EK 6 - Şekil 2.6.	BP-2F-M ekstraktında saptanan His Leu Q-TOF-MS grafiği.....	165
EK 7 - Şekil 2.7.	BP-2F-M ekstraktında saptanan nikotinik asit Q-TOF-MS grafiği..	166
EK 8 - Şekil 2.8.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Pro Val Q-TOF-MS grafiği	166
EK 9 - Şekil 2.9.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Val Pro Gln Q-TOF-MS grafiği ...	166
EK 10 - Şekil 2.10.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Gly Pro Val Q-TOF-MS grafiği	167
EK 11 - Şekil 2.11.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Leu Pro Gln Q-TOF-MS grafiği	167
EK 12 - Şekil 2.12.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Tyr Pro Glu Q-TOF-MS grafiği	167
EK 13 - Şekil 2.13.	BP-2F-M ekstraktında saptanan DL- phenylalanine Q-TOF-MS grafiği	168
EK 14 - Şekil 2.14.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Glu Val Val Q-TOF-MS grafiği	168
EK 15 - Şekil 2.15.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Asp Leu Q-TOF-MS grafiği	168
EK 16 - Şekil 2.16.	BP-2F-M ekstraktında saptanan trimazosin Q-TOF-MS grafiği..	169
EK 17 - Şekil 2.17.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Phe Val Gly Q-TOF-MS grafiği	169
EK 18 - Şekil 2.18.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Phe Leu Gly Val Q-TOF-MS grafiği	169
EK 19 - Şekil 2.19.	BP-2F-M ekstraktında saptanan lappaconitine Q-TOF-MS grafiği	170
EK 20 - Şekil 2.20.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Val Pro Ile Q-TOF-MS grafiği .	170
EK 21 - Şekil 2.21.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Met Pro Leu Q-TOF-MS grafiği	170
EK 22- Şekil 2.22.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Ile Pro Ile Q-TOF-MS grafiği.....	171
EK 23 - Şekil 2.23.	BP-2F-M ekstraktında saptanan Phe Pro Ile Q-TOF-MS grafiği .	171
EK 24 - Şekil 2.24.	BP-2F-M ekstraktında saptanan indolasetik asit Q-TOF-MS grafiği	171
EK 25 - Şekil 2.25.	BP-2F-M ekstraktında saptanan denatonium Q-TOF-MS grafiği	172

EK 26 - Şekil 2.26. BP-2F-M ekstraktında saptanan palmitic amide Q-TOF-MS grafiği	172
EK 27 - Şekil 2.27. BP-2F-M ekstraktında saptanan N-tert- Butyl-a-phenylnitrone Q-TOF-MS grafiği	172
EK 28 - Şekil 2.28. BP-2F-M ekstraktında saptanan artrobasilin A Q-TOF-MS grafiği	173
EK 29 - Şekil 2.29. BP-2F-M ekstraktında saptanan azitromisin A Q-TOF-MS grafiği	173
EK 30 - Şekil 2.30. BP-2F-M ekstraktında saptanan eritromisin A Q-TOF-MS grafiği	173
EK 31 - Şekil 2.31. BP-2F-M ekstraktında saptanan oleandamisin A Q-TOF-MS grafiği	174
EK 32 - Şekil 2.32. BP-2F-M ekstraktında saptanan kinolon türevleri Q-TOF-MS grafiği	174
EK 33 - Şekil 2.33. BP-2G-M ekstraktında saptanan heterobaktin A Q-TOF-MS grafiği	174
EK 34 - Şekil 2.34. BP-2G-M ekstraktında saptanan heterobaktin B Q-TOF-MS grafiği	175
EK 35 - Şekil 2.35. BP-2G-M ekstraktında saptanan kinolon türevleri Q-TOF-MS grafiği	175
EK 36 - Şekil 2.36. BP-2G-M ekstraktında saptanan Nocardia heterobaktin Q-TOF-MS grafiği	175
EK 37 - Şekil 2.37. BP-2G-M ekstraktında saptanan rodostreptomisin A2 Q-TOF-MS grafiği	176
EK 38 - Şekil 2.38. BP-2G-M ekstraktında saptanan rhodochelin A2 Q-TOF-MS grafiği	176
EK 39 - Şekil 2.39. BP-2G-M ekstraktında saptanan DL-pipecolic asit Q-TOF-MS grafiği	176
EK 40 - Şekil 2.40. BP-2G-M ekstraktında saptanan betain Q-TOF-MS grafiği	177
EK 41 - Şekil 2.41. BP-2G-M ekstraktında saptanan 5'-AMP / Adenosine 5'-monophosphate Q-TOF-MS grafiği	177
EK 42 - Şekil 2.42. BP-2G-M ekstraktında saptanan adenozin Q-TOF-MS grafiği	177
EK 43 - Şekil 2.43. BP-2G-M ekstraktında saptanan 3-aminokinolin Q-TOF-MS grafiği	178

EK 44 - Şekil 2.44. BP-2G-M ekstraktında saptanan D-Pantothenic asit Q-TOF-MS grafiği	178
EK 45 - Şekil 2.45. BP-2G-M ekstraktında saptanan Asp Leu Q-TOF-MS grafiği	178
EK 46 - Şekil 2.46. BP-2G-M ekstraktında saptanan Asp Gly Ile Q-TOF-MS grafiği	179
EK 47 - Şekil 2.47. BP-2G-M ekstraktında saptanan Gly Val Leu Q-TOF-MS grafiği	179
EK 48 - Şekil 2.48. BP-2G-M ekstraktında saptanan Glu Arg Leu Q-TOF-MS grafiği	179
EK 49 - Şekil 2.49. BP-2G-M ekstraktında saptanan indol Q-TOF-MS grafiği	180
EK 50 - Şekil 2.50. BP-2G-M ekstraktında saptanan 4-Formil indol Q-TOF-MS grafiği	180
EK 51 - Şekil 2.51. BP-2G-M ekstraktında saptanan Gamma-Glu-Leu Q-TOF-MS grafiği	180
EK 52 - Şekil 2.52. BP-2G-M ekstraktında saptanan 16,16-dimethyl Prostaglandin E2 p-(pacetamidobenzamido) phenyl ester Q-TOF-MS grafiği	181
EK 53 - Şekil 2.53. BP-2G-M ekstraktında saptanan anthranilic asit Q-TOF-MS grafiği	181
EK 54 - Şekil 2.54. BP-2G-M ekstraktında saptanan denatonium Q-TOF-MS grafiği	181
EK 55 - Şekil 2.55. BP-2G-M ekstraktında saptanan benzododecinium Q-TOF-MS grafiği	182
EK 56 - Şekil 2.56. BP-2G-M ekstraktında saptanan dodecyl glucoside Q-TOF-MS grafiği	182
EK 57 - Şekil 2.57. BP-2G-M ekstraktında saptanan acetyl tributyl citrate Q-TOF-MS grafiği	182
EK 58 - Şekil 2.58. BP-K9D-M ekstraktında saptanan betain Q-TOF-MS grafiği	183
EK 59 - Şekil 2.59. BP-K9D-M ekstraktında saptanan DL- pıpecolic asit Q-TOF-MS grafiği	183
EK 60 - Şekil 2.60. BP-K9D-M ekstraktında saptanan L-Lysine Q-TOF-MS grafiği	183
EK 61 - Şekil 2.61. BP-K9D-M ekstraktında saptanan guanin Q-TOF-MS grafiği	184
EK 62 - Şekil 2.62. BP-K9D-M ekstraktında saptanan 5' - AMP Q-TOF-MS grafiği.	184
EK 63 - Şekil 2.63. BP-K9D-M ekstraktında saptanan nikotinic asit Q-TOF-MS grafiği	184
EK 64 - Şekil 2.64. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Val Glu Q-TOF-MS grafiği ..	185

EK 65 - Şekil 2.65. BP-K9D-M ekstraktında saptanan 3-aminokinolin Q-TOF-MS grafiği	185
EK 66 - Şekil 2.66. BP-K9D-M ekstraktında saptanan DL-Phenylalanine Q-TOF-MS grafiği	185
EK 67 - Şekil 2.67. BP-K9D-M ekstraktında saptanan D-Pantothenic acid Q-TOF-MS grafiği	186
EK 68 - Şekil 2.68. BP-K9D-M ekstraktında saptanan D-Pantothenic acid Q-TOF-MS grafiği	186
EK 69 - Şekil 2.69. BP-K9D-M ekstraktında saptan Pro Leu Q-TOF-MS grafiği	186
EK 70 - Şekil 2.70. BP-K9D-M ekstraktında saptan Ile Asp Q-TOF-MS grafiği	187
EK 71 - Şekil 2.71. BP-K9D-M ekstraktında saptan Val Glu Val Q-TOF-MS grafiği	187
EK 72 - Şekil 2.72. BP-K9D-M ekstraktında saptanan L-Tryptophan Q-TOF-MS grafiği	187
EK 73 - Şekil 2.73. BP-K9D-M ekstraktında saptanan indol Q-TOF-MS grafiği	188
EK 74 - Şekil 2.74. BP-K9D-M ekstraktında saptanan 4-Formil indol Q-TOF-MS grafiği	188
EK 75 - Şekil 2.75. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Phe Asp Q-TOF-MS grafiği	188
EK 76 - Şekil 2.76. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Ile Asp Val Q-TOF-MS grafiği	189
EK 77 - Şekil 2.77. BP-K9D-M ekstraktında saptanan oksikinolin -MS grafiği	189
EK 78 - Şekil 2.78. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Val Pro Ile Q-TOF-MS grafiği	189
EK 79 - Şekil 2.79. BP-K9D-M ekstraktında saptanan norharman Q-TOF-MS grafiği	190
EK 80 - Şekil 2.80. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Ala Gly Q-TOF-MS grafiği	190
EK 81 - Şekil 2.81. BP-K9D-M ekstraktında saptanan harman Q-TOF-MS grafiği ...	190
EK 82 - Şekil 2.82. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Pro Ile Q-TOF-MS grafiği	191
EK 83 - Şekil 2.83. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Glu Val Q-TOF-MS grafiği	191
EK 84 - Şekil 2.84. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Pro Leu Q-TOF-MS grafiği	191

EK 85 - Şekil 2.85. BP-K9D-M ekstraktında saptanan phenacyclamine Q-TOF-MS grafiği	192
EK 86 - Şekil 2.86. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Enantio-PAF Q-TOF-MS grafiği	192
EK 87 - Şekil 2.87. BP-K9D-M ekstraktında saptanan N-tert-Butyl- α -phenylnitrone Q-TOF-MS grafiği.....	192
EK 88 - Şekil 2.88. BP-K9D-M ekstraktında saptanan kanamisin Q-TOF-MS grafiği	193
EK 89 - Şekil 2.89. BP-K9D-M ekstraktında saptanan oleandamisin Q-TOF-MS grafiği	193
EK 90 - Şekil 2.90. BP-K9D-M ekstraktında saptanan oleandamisin Q-TOF-MS grafiği	193
EK 91 - Şekil 2.91. BP-K9D-M ekstraktında saptanan tetrasiklin Q-TOF-MS grafiği	194

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yayınlanan antibiyotiğe dirençli "öncelikli patojenler" listesi	1
Çizelge 2.1. Farklı antibiyotik sınıflarının etki biçimleri	11
Çizelge 2.2. Antibiyotik gruplarına göre direnç mekanizmaları.....	17
Çizelge 2.3. Primer ve sekonder metabolitlerin özellikleri.....	20
Çizelge 2.4. Doğal antimikrobiyal ürünlerin avantajları ve başlıca zorluklar	21
Çizelge 2.5. Doğal kaynaklardan keşfedilen çeşitli antimikrobiyal bileşenler, etki ettiği patojenler ve hedef bölgeleri	24
Çizelge 2.6. Çeşitli mağaralardan izole edilen aktinomisetler ve biyoaktiviteleri	29
Çizelge 2.7. Çeşitli mağaralardan izole edilen <i>Archea</i> taksonları	32
Çizelge 2.8. Çeşitli mağaralardan izole edilen suşların biyoaktiviteleri ve tanımlanan biyoaktif bileşenler	36
Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivitenin taranmasında kullanılan test mikroorganizmaları ve suş kaynağı	38
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	43
Çizelge 3.3. İzolatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan test mikroorganizmaları, gelişmesi için kullanılan besiyerleri ve sıcaklık	47
Çizelge 3.4. TOF/Q-TOF MS cihaz bilgileri	62
Çizelge 3.5. TOF/ Q-TOF MS analizinden kullanılan çözücü kompozisyonu.....	62
Çizelge 3.6. TOF/ Q-TOF MS analizi zaman çizelgesi	62
Çizelge 3.7. TOF/ Q- TOF MS cihaz parametreleri	63
Çizelge 4.1. Çalışmada test edilen mikroorganizmaların koloni morfolojisi, Gram boyama ve hücre morfolojisi özellikleri.....	64
Çizelge 4.2. Sıvı kültürlerin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölçülen absorbans değerleri	69
Çizelge 4.3. Antimikrobiyal aktivite görülen izolatlar, etkili oldukları test suşları ve ölçülen zon çapları (mm).....	72
Çizelge 4.4. Antimikrobiyal etkili izolatların ekstrasellüller enzim ve EPS üretimi test sonuçları	74
Çizelge 4.5. Çoklu antimikrobiyal aktivite gösteren BP-2F-M, BP-2G-M ve BP-K9D-M izolatlarının test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonları (mm).....	77

Çizelge 4.6. İzolatların endospor boyama testi sonuçları ve hücre morfolojisi.....	80
Çizelge 4.7. İzolatların tür tanınması ve NCBI erişim numaraları	81
Çizelge 4.8. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen izolatların disk difüzyon testinde oluşturdukları zon çapları (mm).....	87
Çizelge 4.9. Farklı besiyerlerinde geliştirilen <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M ve <i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M izolatların disk difüzyon testinde oluşturdukları zon çapları (mm).....	89
Çizelge 4.10. Farklı besiyerlerinde geliştirilen <i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M izolatların disk difüzyon testinde oluşturdukları zon çapları (mm)	90
Çizelge 4.11. Farklı pH değerlerinde geliştirilen izolatların <i>P. aureginosa</i> 'ya karşı oluşturdukları zon çapları (mm).....	92
Çizelge 4.12. Farklı pH değerlerinde geliştirilen izolatların <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı oluşturdukları zon çapları (mm).....	93
Çizelge 4.13. Farklı pH değerlerinde geliştirilen izolatların <i>L. monocytogenes</i> ' e karşı oluşturdukları zon çapları (mm).....	93
Çizelge 4.14. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum antimikrobiyal madde üretim koşulları.....	94
Çizelge 4.15. İzolatların 500 ml üretim hacminde ölçülen kuru ağırlıkları.....	96
Çizelge 4.16. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların disk difüzyon testi sonucunda oluşturdukları zon çapları (mm).....	98
Çizelge 4.17. Kültür sıvılarının Bradford protein tayin yöntemi sonucunda belirlenen protein konsantrasyon değerleri	99
Çizelge 4.18. Kültür sıvılarının protein konsantrasyonu	101
Çizelge 4.19. Ekstraktların ince tabaka kromatografisi sonucunda belirlenen R_F (geciktirme faktörü) değerleri	103
Çizelge 4.20. HPLC analizi ile belirlenen fenolik bileşikler ve miktarları (ppm).....	108
Çizelge 4.21. HPLC analizi ile belirlenen askorbik asit ve α - tokoferol miktarları	112
Çizelge 4.22. HPLC analizi sonucunda ekstraktlarda saptanan organik asit miktarları (ppm)	114
Çizelge 4.23. LC- Q-TOF MS analizi ile ekstraktlarda tanımlanan antibiyotikler ve sideroforlar	117
Çizelge 4.24. <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M ekstraktında saptanan metabolitler.....	118

Çizelge 4.25. <i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M ekstraktında saptanan çeşitli metabolitler.....	123
--	-----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACP	: Asil Taşıyıcı Protein
Arg	: Arjinin
BSA	: Sığır Serum Albumin
CFS	: Hücresiz Süpernatant
CoA	: Koenzim A
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
DOX	: Doksisiklin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EPS	: Ekzopolisakkarit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-Q-TOF MS	: Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MHA	: Mueller Hinton Agar
MIN	: Minosiklin
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MPLC	: Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi
MRSA	: Çoklu İlaça Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NRPS	: Ribozomal Olmayan Peptid Sentaz
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Proteinler
PKS	: Poliketid Sentaz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
Trp	: Triptofan
VRE	: Vankomisine Dirençli Enterokok
µl	: Mikrolitre

ÖZET

Doktora Tezi

Mağaralardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Doğal Antimikrobiyal Bileşiklerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması

Fatma Seçil ÇELİK

**Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nermin SARIGÜL

Ağustos, 2024

Bu tez çalışmasında mağaralardan izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Patojenlere karşı test edilen 170 Gram pozitif bakteri izolatından 41 izolat en az 1 test organizmasına karşı aktivite göstermiştir. 12 izolatın 2 test organizmasına, 9 izolatın ise 3 test organizmasına karşı etkili olduğu görülmüştür. Ekstrasellüler enzim testi sonuçlarına göre antimikrobiyal etkili izolatların %58' inin proteaz, %73'ünün katalaz, %39'unun amilaz, %7' sinin jelatinaz enzimi aktivitesi sergiledikleri görülmüştür. İzolatların %24'ünün ise EPS ürettikleri saptanmıştır. Birden fazla test mikroorganizmasına karşı etkili izolatlar arasında hem bakteriyel hem fungal izolatlarla karşı aktivite gösteren 3 izolat filogenetik tanılama, kültür büyüme parametrelerinin optimizasyonu, antimikrobiyal bileşenlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması çalışmaları için seçilmiştir. Dizi analizi ile yapılan tür tanılaması sonucunda izolatlar *Arthrobacter sp.* BP-2F-M, *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal etkili maddenin karakterizasyonu HPLC analizi ve LC-Q-TOF MS analizi ile yapılmıştır. HPLC analizi ile izolatlardan elde edilen ekstraktların çeşitli fenolik asitler, organik asitler ve vitaminler açısından karakterizasyonu yapılmıştır. LC-Q-TOF MS analizi sonuçlarına göre suşların streptomisin, kanamisin, oleandomisin, tetrasiklin kinolon türevleri, eritromisin, azitromisin, Arthrobacilin A, Rodostreptomisin A antibiyotikleri ürettikleri saptanmıştır. Antibiyotiklerin yanı sıra çeşitli sidereforlar, alkaloidler, peptidler gibi biyoteknolojik açıdan önemli bileşikler saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: aktinomiset, antimikrobiyal aktivite, doğal bileşikler, HPLC, LC-Q-TOF MS

Hazırlanan bu Doktora tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0738-DR-21 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

**Evaluation of Antimicrobial Activities of Microorganisms Isolated from Caves,
Characterization and Purification of Natural Antimicrobial Compounds**

Fatma Seçil ÇELİK

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Asst. Prof. Nermin SARIGÜL

Ağustos, 2024

In this thesis study, it was aimed to evaluate the antimicrobial activities of microorganisms isolated from caves. Of 170 Gram positive bacterial isolates tested against pathogens, 41 isolates showed activity against at least 1 test organism. It was observed that 12 isolates were effective against 2 test organisms, and 9 isolates were effective against 3 test organisms. Based on the results of extracellular enzyme tests, approximately 58% of isolates with antimicrobial activity exhibited protease activity, 73% showed catalase activity, 39% displayed amylase activity, and 7% had gelatinase enzyme activity. Additionally, 24% of the isolates were found to produce EPS. Three isolates showing activity against both bacterial and fungal isolates were selected for phylogenetic identification, optimization of culture growth parameters, characterization and purification of antimicrobial components. Through sequence analysis, the isolates were identified as *Arthrobacter sp.* BP-2F-M, *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M, and *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M. Characterization of the antimicrobial effective substance was performed using HPLC analysis and LC-Q-TOF MS analysis. HPLC analysis characterized the extracts obtained from the isolates in terms of various phenolic acids, organic acids and vitamins. According to the results of LC-Q-TOF MS analysis, it was determined that the strains produced the antibiotics streptomycin, kanamycin, oleandomycin, tetracycline quinolone derivatives, erythromycin, azithromycin, Arthrobacin A, Rhodostreptomycin A. In addition to antibiotics, biotechnologically important compounds such as various siderophores, alkaloids, peptides were detected.

Keywords: actinomycetes, antimicrobial activity, natural compounds, HPLC, LC-Q-TOF MS

The present Ph.D. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Coordination Office under the Project number of 0738-DR-21.

1. GİRİŞ

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları öldüren ya da gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli sekonder metabolitlerdir. Antibiyotiklerin, dünyadaki yaygın kullanımı antibiyotiklere dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Patojenik bakterilerin antibiyotik direnci son birkaç on yılda insan sağlığına yönelik en büyük sorunlardan biri haline gelmiştir (Smith vd., 2015). Bulaşıcı hastalıklar ve artan patojenite, insanlara, hayvanlara ve çevreye karşı ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yayınlanan antibiyotiğe dirençli “öncelikli patojenler” listesi insan yaşamı için en büyük tehdit olarak kabul edilen 12 bakteriyi içermektedir (Çizelge 1.1). Antibiyotik geliştirme üzerine yapılan araştırmalar, kısa süreli tedavi amaçlı kullanımları nedeniyle artık farmasötik endüstriler için ekonomik bir fayda sağlamamakta ve kronik rahatsızlıkları tedavi etmek için yeterli olmamaktadır. Bu sorunu çözmek için yeni antibiyotiklerin kimyasal sentezi, mevcut direnç mekanizmalarından etkilenmeyen veya etkisiz hale getirebilen yeni ajanların keşfi ve geliştirilmesi, yeni doğal antimikrobiyallerin araştırılması gibi farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır.

Çizelge 1.1. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yayınlanan antibiyotiğe dirençli "öncelikli patojenler" listesi (Timothy, 2024)

ÖNCELİK	PATOJEN BAKTERİLER	ANTİBİYOTİKLER
KRİTİK	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacter spp.</i>	Karbapenem
YÜKSEK	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Campylobacter spp</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Vankomisin Vankomisin ve Metisilin Karbapenem Fluorokimolon Fluorokinolon Sefalosporinve Fluorokinolon
ORTA	Grup A Streptokok <i>Streptococcus pneumonia</i> <i>Haemophilus influenza</i> Grup B Streptokok	Makrolid Makrolid Ampisilin Penisilin

İnsanlar tarafından keşfedilmemiş veya nadiren ziyaret edilen bozulmamış bölgelerden elde edilen mikroorganizmaların yeni taksonlar veya faydalı kimyasal bileşikler üreten suşlar olacağına inanılmaktadır. Yüksek nem, nispeten düşük ve sabit sıcaklık ve düşük besinleri içeren koşulları nedeniyle ekstrem çevreler olarak kabul edilen mağaraların yüksek tür çeşitliliğine sahip olan biyoteknolojik faydaları olan yeni mikroorganizmaları barındırması beklenmektedir. Mağaralar yeni antimikrobiyal

ürünlerin keşfi için güçlü potansiyele sahip ortamlardan birini temsil etmektedir (Silva vd., 2021). Mağaralardaki yetersiz besin seviyeleri, mikroorganizmalar arasında yüksek miktarda ekzopolimerik madde, enzim ve antimikrobiyal metabolitlerin üretimi gibi hayatta kalma stratejileri geliştirmeye zorlayarak rekabeti teşvik etmektedir. Bu nedenle mağaralar, yeni antibiyotiklerin keşfi ve yeni enzimlerin üretimi için önemli ortamlar olarak düşünülmektedir (Elmanama vd., 2013). Özellikle aktinomisetlerin önemli bir antibiyotik kaynağı olduğu kanıtlanmıştır (Jose vd., 2021). Biyolojik olarak aktif 22.500 bileşikten %45'i aktinomisetler tarafından üretilmektedir ve *Streptomyces* türleri toplam antibiyotik üretiminin %70'ini oluşturmaktadır (Lam, 2006).

Çalışmamızda mağaralardan izole edilen Gram pozitif bakteri izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi ve geniş spektrumda antimikrobiyal etki gösteren izolatların çeşitli metabolitler yönünden karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. 300 bakteri izolatu için Gram boyama yapılmış ve Gram pozitif bakteri izolatları belirlenmiştir. 170 Gram pozitif bakteri izolatından elde edilen supernatant sıvılarındaki antimikrobiyal aktivite disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Etkili 41 izolat ekstrasellüler enzim ve EPS üretimi yönünden değerlendirilmiştir. Antibakteriyel ve antifungal aktivite gösteren 3 izolat için tür tanılaması yapılmıştır. Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin birlikte görüldüğü bu 3 izolat *Arthrobacter spp.*, *Rhodococcus erythropolis* ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* olarak tanımlanmıştır. 3 izolatın farklı besiyeri, sıcaklık ve pH içeren ortamlarda üretilmesi ve elde edilen supernatantların antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi ile optimum üretim koşulları belirlenmiştir. Bu 3 izolat için etil asetat ekstraksiyonu yapılmış, ekstraktlara proteinaz K ilave edilip antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilerek etkili maddenin protein yapısında olduğu saptanmıştır. Protein konsantrasyonu ise Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkili ekstraktların karakterizasyonu HPLC ve Q-TOF-MS analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre antimikrobiyal etkili ekstraktlarda çeşitli fenolik bileşikler, organik asitler, vitaminler, antibiyotikler, sidereforlar ve polipeptidler saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotiklerin Tanımı ve Kısa Tarihçesi

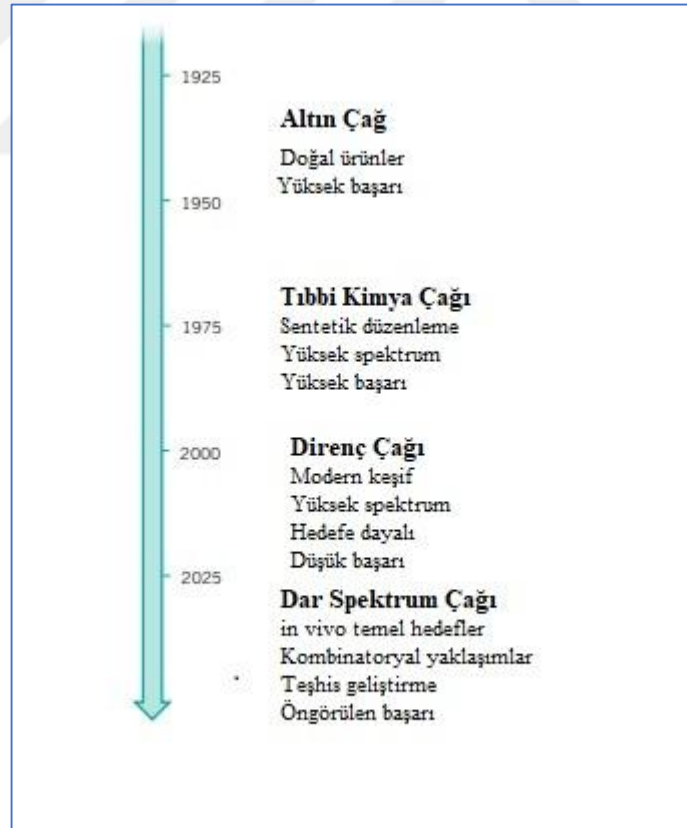
Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonlara karşı yirminci yüzyıldan beri yaygın olarak kullanılan en etkili ilaçlardır. 1928'de Alexander Fleming, ilk doğal antibiyotik olan penisilini keşfetmiştir. *Penicillium* küflerinin stafilokoklara karşı antibakteriyel aktiviteye sahip dağılabilir bir ekstrakt ürettiği gözlemlenmiştir (Silverman ve Holladay 2014). Waksman, antibiyotikleri “mikroorganizmalar tarafından üretilen, bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilen ve hatta yok edebilen kimyasal bir madde” olarak tanımlamıştır (Bud, 2007). Antibiyotikler doğal veya sentetik olabilmektedir. Antibiyotikler, bakteri hücre duvarı, sitoplazmik membran, DNA/RNA ve proteinlerin sentezi gibi temel hücresel süreçleri hedefleyerek mikroorganizmanın üremesini engellemekte ve büyümeyi geciktirerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Mohr, 2016).

İlk antibiyotik olan mikofenolik asit, 1893 yılında İtalyan mikrobiyolog Bartolomeo Gosio tarafından keşfedilmiştir (Mohr, 2016). 1909'da Paul Ehrlich ve diğer araştırmacılar, frengiye neden olan patojen *Treponema pallidum*'a karşı etkili olan ilk sentetik arsenik türevi antibiyotik olan salvarsanı (arsfenamin) keşfetmiştir (Hutchings vd., 2019). Bu ilaçların her ikisi de arsenik varlığı nedeniyle yüksek risk faktörlerine sahip olduğundan, 1930'da bir Alman bakteriyolog Gerhard Domagk tarafından keşfedilen geniş spektrumlu bir antibakteriyel sülfonamid (sulfamidokrisoidin) ilacı olan Prontosil esas olarak tedavide kullanılmıştır. 1928'de İskoç bakteriyolog Alexander Fleming, tesadüfen *Penicillium notatum*'un *S. aureus* kolonilerinin gelişimini engellediğini keşfetmiştir. Mantarın bakterileri inhibe eden bir bileşik salgılamış olması gerektiğini öne sürerek 1929'da aktif molekülü izole etmeyi başarmıştır ve ilk gerçek antibiyotik olan penisilin keşfedilmiştir. 1939'da Fransız mikrobiyolog René Dubos, Gram pozitif bakterileri etkili bir şekilde inhibe eden toprak bakterisi *Basillus brevis*'ten tirotrisini (gramicidin D ve tirosidin karışımı) izole ettiğinde antibiyotik keşfinde yeni bir dönem başlamıştır. Bununla birlikte, gramisidin insanlarda yüksek toksisite göstermiştir ve günümüzde sadece topikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Mohr, 2016). 1940'larda Selman Waksman, aktinomisin (*Streptomyces spp.*'den türetilmiştir), neomisin (*Streptomyces fradiae*'den türetilmiştir), streptomisin (*Streptomyces griseus*'tan türetilmiştir), klavasin (*Aspergillus clavatus*'tan türetilmiştir) ve fumigasin (*Aspergillus*

fumigatus' tan türetilmiştir) dahil olmak üzere birçok büyük antibiyotik ve antifungal keşfetmiştir (Ribeiro da Cunha vd., 2019).

Waksman'ın çalışması 1940'lar ve 1970'ler arasında antibiyotik keşfinin 'Altın Çağı' nı başlatmıştır (Durand vd., 2019) (Şekil 2.1). Aktinomisin, streptomisin ve neomisin gibi antibiyotiklerin çoğunun günümüzde de klinik kullanımı mevcuttur (Sykes ve Papich, 2014). Bu altın dönemde yüzlerce bakteri türünden ve mantardan 20'den fazla antibiyotik sınıfı keşfedilmiştir (Durand vd., 2019).

2000'li yılların başından itibaren antibiyotik direnci, ciddi endişe yaratan küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Küresel olarak antimikrobiyal direnç nedeniyle yılda yaklaşık olarak 7.000 ölüm meydana gelmektedir ve ölüm sayısının 2050 yılına kadar 10 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir. Geçtiğimiz on yılda, Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Dünya Ekonomik Forumu dahil olmak üzere çeşitli kuruluşlar, antibiyotik direncini raporların ve konferansların odak noktası haline getirmiştir (Durand vd., 2019).



Şekil 2.1. Antibiyotik sonrası dönem zaman çizelgesi (Brown ve Wright, 2016)

2.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotiklerin en yaygın sınıflandırması moleküler yapılarına, etki biçimlerine, uygulama şekillerine (enjekte edilebilir, oral ve topikal) ve aktivite spektrumlarına dayanmaktadır (Etebu ve Arikekpa, 2016). Aynı kimyasal yapıya sahip antibiyotikler benzer etkinlik, toksisite ve alerjik aktivite gösterirler. En yaygın antibiyotik sınıfları, kimyasal veya moleküler yapıya dayalı olarak beta-laktamlar, makrolidler, tetrasiklinler, kinolonlar, aminoglikozidlerdir (Adzitey 2015; Etebu ve Arikekpa 2016; Frank ve Tacconelli 2012; van Hoek vd., 2011).

2.3. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

2.3.1. Beta-laktamlar

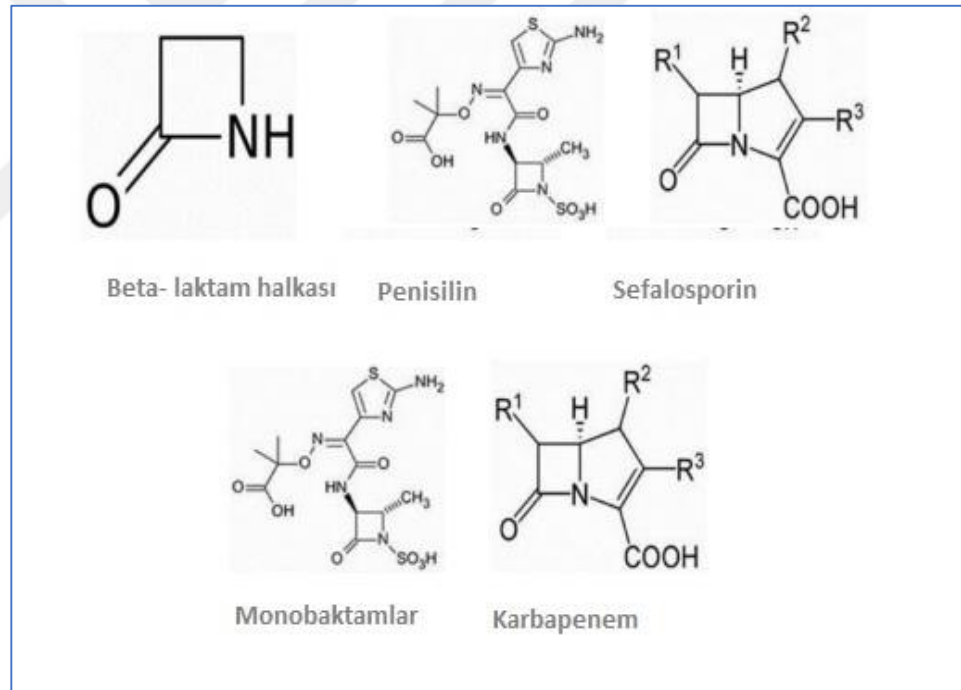
Beta-laktam grupları sık reçete edilen antibiyotik gruplarıdır. Beta-laktam sınıfının en bilinen üyeleri penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerdir. Beta-laktam grubuna ait tüm üyeler, beta-laktam halkası içerir (Etebu ve Arikekpa, 2016).

Yüksek reaktif beta-laktam halkası, halkada 3-karbon ve 1-nitrojen içerir ve bu halka bakteri hücre duvarının protein sentezini bozarak hücre ölümüne yol açar veya büyümesini engeller. Ayrıca bu halka, penisilin bağlayıcı bir proteini (PBP) bloke ederek bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan sentezine de müdahale ederek hücre lizisi ve ölümüyle sonuçlanır. Penisilin, yan zincirlere bağlı bir tiazolidin halkası veya beta-laktam halkasından oluşur (Şekil 2.2). Penisilin ilk olarak *Penicillium notatum*'dan izole edilmiştir. Penisilin G, penisilin V, oksasilin (dikloksasilin), metisilin, nafsilin, ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, piperasilin, mezlosilin ve ticarcillin, penisilin sınıfına ait üyelerdir (Etebu ve Arikekpa, 2016; Petri, 2011).

Sefalosporin, penisilin ile benzer yapı ve etki şekline sahip beta-laktam grubu antibiyotiklerin bir üyesidir (Şekil 2.2). 1945 yılında Guiseppe Brotzu tarafından *Cephalosporium acremonium*'dan izole edilmiştir (Petri, 2011). 7-aminosefalosporanik asit çekirdeği ve 3,6-dihidro-2 H-1,3-tiazan halkaları içeren yan zincir içerir (Şekil 2.2). Sefalosporinler en yaygın olarak kimyasal yapıları, klinik farmakolojileri, beta-laktamazlara dirençleri, antimikrobiyal spektrumları ve nesillerine göre sınıflandırılır. Sefalosporinlerin kuşaklara göre sınıflandırılması da önemlidir ve antimikrobiyal aktivite spektrumlarına göre yapılmıştır (Mandlle vd., 2005). Sefalosporin grubu antibiyotikler,

hedef organizmalarına göre 1. ila 5. nesillere ayrılır. 5. nesil sefalosporinler Gram negatif bakterilere karşı daha etkilidir. Sefalosporinler en yaygın olarak penisilinaz üreten, metisiline duyarlı *Staphylococci* ve *Streptococci*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteria* ve *Aerikaria*'dan kaynaklanan bakteriyel enfeksiyon ve hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Karbapenemler, Amerika Birleşik Devletleri'nde klinikte yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Karbapenemler hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedir. En yaygın çeşitleri olarak imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem olarak adlandırılan dört karbapenem türüdür. Karbapenemler, bakteri dış çeperinden bakterilere kolayca nüfuz edebilir, çoklu penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) için yüksek bir afinite gösterir. Genellikle "son çare antibiyotik" olarak adlandırılırlar ve hastaların dirençli bakteri barındırdığından şüphelenildiğinde veya ağır hasta olduklarında reçete edilir (Mandlle vd., 2005).



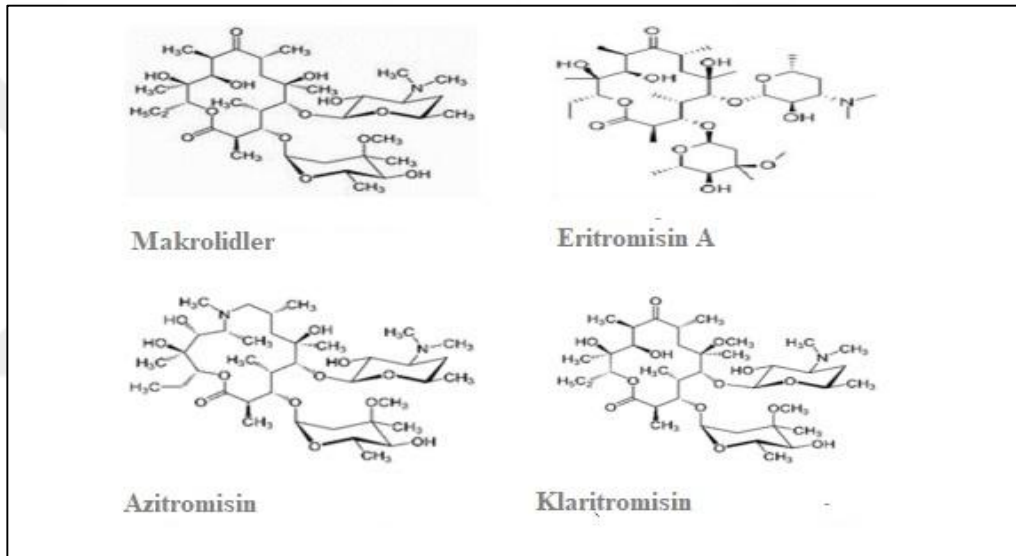
Şekil 2.2. Beta laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Pancu vd., 2021)

2.3.2. Makrolidler

Eritromisin A, 1952'de J. M. McGuire tarafından toprakta yaşayan fungus *Saccharopolyspora erythraea*'dan keşfedilen ve izole edilen ilk makrolid olarak bilinmektedir (Etebu ve Arikekpa, 2016; Zhanel vd., 2001). Geniş spektrumlu bir

antibiyotiktir ve öncelikle solunum, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanılır. Makrolidlerin üyeleri eritromisin, azitromisin ve klaritromisindir (Şekil 2.3) (Aminov, 2017; Zhanel vd., 2001).

Makrolidler bakteriyel protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Makrolidlerin etki mekanizması, bakteriyel protein sentezinin kesilmesine neden olan bakteriyel 50S ribozomal alt birime bağlanma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Bağlandıktan sonra ilaç, peptidiltransferaz enziminin tRNA'ya bağlı sonraki amino asidi eklemesini önleyerek mRNA'nın, özellikle büyüyen peptit zincirinin translasyonunu önlemektedir. Makrolidler, sadece protein sentezini inhibe ettikleri için bakteriyostatik ajanlardır, ancak yüksek dozlarda bakterisidal olabilirler (Patel ve Hashmi, 2022)



Şekil 2.3. Makrolid grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Wang vd., 2017)

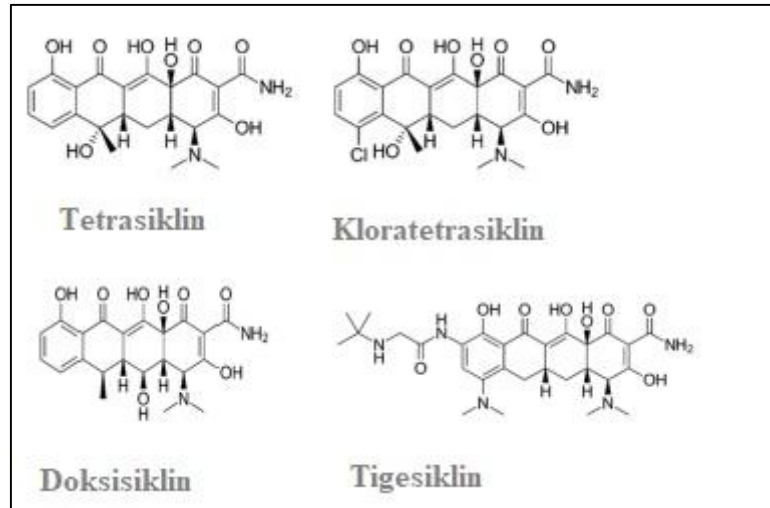
2.3.3. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler, protein biyosentezini inhibe ederek bakteriyel büyümeyi önleyen önemli bir geniş spektrumlu antibiyotik sınıfıdır. Bu sınıf bakteriyostatik aktiviteye sahiptir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlardan protozoa ve hücre içi parazit organizmaların neden olduğu enfeksiyonlara kadar geniş bir kullanım yelpazesine sahip bileşikler içerir. Saresiklin, tetrasiklin sınıfı ailedeki tek dar spektrumlu antibiyotiktir. Tetrasiklinlerin temel yapısı, bir hidronaftasen çekirdeğinde doğrusal olarak yoğunlaşmış dört benzen halkasından meydana gelir (Rusu ve Buta, 2021). Tetrasiklinlerin kimyasal yapısı Şekil 2.4'te gösterilmektedir.

Tetrasiklinler, öncelikle bakteriyel ribozoma bağlanarak ve protein sentezini durdurarak etki gösterir. Bakteriyel ribozomlar hem 30S hem de 50S alt birimlerinde çok sayıda düşük afiniteli bölge ve 30S alt biriminde yer alan yüksek afiniteli bir bağlanma bölgesine sahiptir. Tetrasiklinler ribozoma bağlandıktan sonra allosterik olarak amino asil-tRNA'nın alıcı bölgede (A bölgesi) bağlanmasını engeller ve protein sentezi durur (Griffin vd., 2011).

Tetrasiklin, 1945 yılında Benjamin Duggar tarafından bir *Streptomyces* bakterisinden izole edilerek keşfedilmiştir (Sanchez vd., 2004). Klortetrasiklin bu sınıfın ilk üyesidir. Tetrasiklinler sentez yöntemine göre farklı nesillere (1'den 3'e) ayrılabilir. Birinci kuşak tetrasiklinlerin üyeleri, biyosentezden türetilen tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve demeklosiklidir. İkinci kuşak tetrasiklinler yarı sentetik olan doksisisiklin, lymesiklin, meklosiklin, metasiklin, minosiklin ve rolitetrasiklidir. 3. nesil tetrasiklinler (örneğin; tigesiklin) sentetiktir. Tetrasiklinler; sıtma, fil hastalığı, amip parazitleri ve riketsiya tedavisinde kullanılır (Sanchez vd., 2004).

Klinikte daha yaygın olarak kullanılan yarı sentetik tetrasiklinlerden ikisi doksisisiklin (DOX) ve minosiklidir (MIN). Geniş spektrumlu antibiyotik etkinliği nedeniyle DOX; şarbon, klamidyal enfeksiyonlar, toplum kökenli pnömoni, lyme hastalığı, kolera, sifiliz, *Yersinia pestis* (veba), periodontal enfeksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. MIN geniş spektrumlu etkinlik göstermekte ve şiddetli akne tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Griffin vd., 2011).



Şekil 2.4. Tetrasiklinler grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Nguyen vd., 2014)

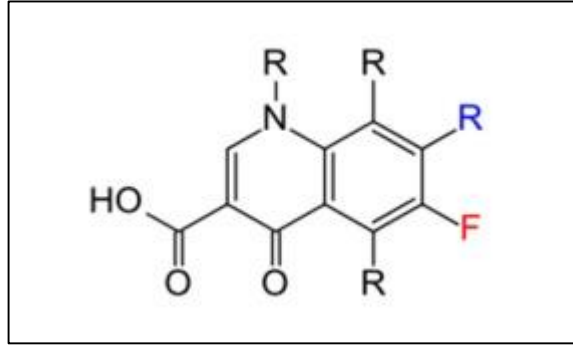
2.3.4. Kinolonlar

Kinolon sınıfı antibiyotikler, Leshner'in 1962'de sıtma önleyici bileşik klorokin sentezinin bir yan ürünü olarak nalidiksik asidin tesadüfen keşfedilmesiyle kimyagerler tarafından keşfedilmiştir (Andriole, 2005). Kinolon antibiyotikler, 1960'ların başında, dar bir aktivite spektrumuna sahip ilk örneklerle ortaya çıkmıştır. Zamanla, yeni kinolon antibiyotiklerin geliştirilmesi ile birlikte genişletilmiş spektrum ve yüksek etkinliğe sahip gelişmiş analoglar ortaya çıkmıştır. Günümüzde kinolonlar, solunum yolu enfeksiyonu, mide-bağırsak enfeksiyonu, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, idrar yolu enfeksiyonu, kemik ve eklem enfeksiyonu, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu gibi enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tang ve Zhazo, 2023). Kinolonlar, mikobakteriler ve anaeroblar dahil olmak üzere hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı aktif olan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (Pham vd., 2019).

Kinolonların yapısı iki halkadan oluşmaktadır, ancak son nesil kinolonlar, antimikrobiyal aktivite spektrumlarını artırmak için ana yapıda daha fazla halkaya sahiptir (Andriole, 2005). Kinolonların kimyasal yapısı Şekil 2. 5'te gösterilmektedir.

Kinolon sınıfı antibiyotikler, bakteriyel topoizomeraaz tip II'yi bozarak bakterilerin DNA sentezini, DNA giraz ve topoizomeraaz IV'ün katalitik aktivitesini inhibe etmektedir. Bu iki enzim, DNA sentezi için gerekli olan kromozomal aşırı kıvrılmayı (supercoiling) düzenleyen kritik bakteriyel enzimlerdir. Zamanla, kinolon direnci, ortaya çıkan birçok dirençli patojen arasında ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bakterilerin kinolonlara karşı oluşturduğu mutasyonlar genellikle hedef enzim üzerinde yerleşir. Ayrıca, bu antibiyotik sınıfına direnç, dirençli bir plazmitin ortamdaki diğer kaynaklardan yatay transfer yoluyla alınmasıyla oluşabilir. Bu durum direncin hızla yayılmasına yol açmaktadır (Pham vd., 2019).

Kinolonların üyeleri yaygın olarak sinoksasin, norfloksasin, ofloksasin, siprofloksasin, temafloksasin, sparfloksasin, nalidiksik asit, enoksasindir (Domagala, 1994). Kinolon sınıfı antibiyotikler, bakterilerde DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna müdahale edebilir. Bu antibiyotik sınıfları üriner, sistemik ve solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Etebu ve Arikekpa, 2016).



Şekil 2.5. Kinolon grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Kwiatkowska vd., 2013).

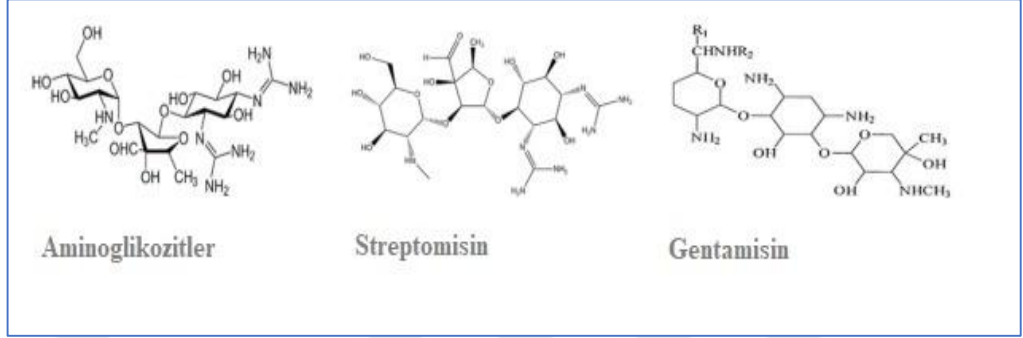
2.3.5. Aminoglikozitler

Streptomisin, 1943'te topraktan *Actinomycetes*'ten izole edilen ilk aminoglikozit antibiyotikidir. Aminoglikozitler, protein sentezinin inhibisyonu yoluyla etki gösteren güçlü ve geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Streptomisin ilk olarak *Streptomyces griseus*'tan izole edildiğinden ve 1944'te klinik kullanıma sunulduğundan beri aminoglikozitler antibakteriyel tedavinin temel taşı olmuştur. Aradan geçen yıllarda, sınıfın diğer birkaç üyesi tanımlanmıştır. 1949'da *S. fradiae*' den neomisin, 1957'de, *S. kanamyceticus*' tan kanamisin, 1963'te, *Micromonospora purpurea*'dan gentamisin, 1967'de, *S. tenebrarius* topramisini ve 1972'de kanamisin'den türetilen amikasin keşfedilmiştir (Krause vd., 2016).

Aminoglikozit sınıfı antibiyotikler, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bu antibiyotik sınıfları ribozomal alt birimlere bağlanabilir ve böylece bakterilerde protein sentezini engelleyebilir (Peterson ve Kaur, 2018). Veba, tularemi ve tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar (Mahajan, 2012).

Aminoglikozitler, 30S ribozomun 16S ribozomal RNA'sındaki A bölgesine yüksek afinite ile bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Aminoglikozit sınıfı üyeleri, A-bölgesindeki farklı bölgeler için farklı bir özgüllüğe sahip olmakla birlikte bu bölgenin konformasyonunu değiştirmektedir. Bu etkileşimin bir sonucu olarak antibiyotik, kodonun yanlış okunmasını indükleyerek hatalı translasyona sebep olmaktadır. Bu durum, hatalı amino asitlerin hücre zarında ve başka yerlerde hasara neden olacak şekilde daha sonra salınan bir polipeptit halinde bir araya gelmesine izin vererek hataya açık protein senteziyle sonuçlanır (Mingeot-Leclercq vd., 1999). Bazı aminoglikozitler ayrıca doğrudan başlamayı engelleyerek protein sentezini etkilemektedir (Davis, 1987; Kotra vd., 2000; Wilson, 2014).

Aminoglikozitler, genellikle 2-deoksistreptamin olmak üzere bir dibazik aminosiklitle glikozidik bağlar yoluyla bağlanan amino şekerlerin çekirdek yapısı ile karakterize edilir (Mingeot-Leclercq vd., 1999). Aminoglikozit sınıflarının üyelerinin kimyasal yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Aminoglikozit grubu antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Tsakou vd., 2020)

2.4. Antibiyotiklerin Etki Tarzlarına Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler, mikroorganizmalarda yer alan temel işlevleri bloke eder veya çoğalmalarını durdurarak bağışıklık sisteminin bakteriyel enfeksiyona karşı savaşmasına yardımcı olur. Geniş yelpazede mikroorganizma grubunu etkileyen antibiyotikler geniş spektrumlu antibiyotikler olarak bilinir. Dar spektrumlu antibiyotikler olarak bilinen antibiyotikler ise yalnızca birkaç bakteri türünü etkilemektedir. Farklı antibiyotik sınıflarının etki biçimleri Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı antibiyotik sınıflarının etki biçimleri (Joseph vd., 2021)

Etki Tarzı	Hedefler	İlaç Sınıfı	İlaç Örnekleri
Hücre duvarı sentezi inhibisyonu	Penisilin bağlayıcı proteinler	Beta laktamlar	Penisilin G, amoksisilin ve sefalosporin C
Protein sentezi inhibisyonu	Peptidoglikan alt birimleri	Glikopeptidler	Vankomisin
	30S alt birim	Aminoglikozidler ve tetrasiklinler	Streptomisin, gentamisin, neomisin, tetrasiklin ve doksisisiklin
	50 S alt birim	Makrolidler, kloramfenikol ve oksazolidinonlar	Eritromisin, azitromisin, kloramfenikol ve linezolid
Nükleik asit sentezi inhibisyonu	RNA DNA	Rifampisin Florokinolonlar	Rifampin

			siprofloksasin ve ofloksasin
Anti metabolitler	Folik asit sentezi enzimleri	Sülfonamidler ve trimetoprim	Sülfametoksazol, dapson ve trimetoprim.
Membranların bozulması	Lipopolisakkaritler	Polimiksinler	Polimiksin B ve kolistin

2.4.1. Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

2.4.1.1. Hücre Çeperi ve Sitoplazmik Membranın İnhibisyonu

İnsanların ve hayvanların hücrelerinde hücre duvarları yoktur, bakteri hücreleri sert bir peptidoglikan tabakası ile çevrilidir, bu yapı bakteri türlerinin yaşamı ve hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Antibiyotikler (örneğin, penisilinler, sefalosporinler, basitrasin ve vankomisin) bakterilerin hücre duvarlarını hedefler ve bakterileri seçici olarak öldürebilir veya üremelerini engelleyebilir (Etebu ve Ariekpa, 2016; Josephine vd., 2004; Park ve Uehara, 2008).

Bakterilerin hücre zarlarına etki eden antibiyotik sınıfları, hücre zarlarındaki lipit tiplerindeki farklılıklara bağlı olarak her bir mikrobiyal gruba özgüdür. Örneğin, daptomisin kalsiyum bağımlı zarı depolarize eder ve bu da bakterilerde makromolekülerin sentezinin durmasına ve hücre zarının bozulmasına yol açar. Polimiksinler, bakteri hücresindeki lipopolisakaritin lipid kısmına etkili bir şekilde bağlanarak bakteri hücre zarının parçalanmasına neden olur (Falagas vd., 2010).

Maddelerin hücre içi ve hücre dışı akışının düzenlendiği hücre zarı bariyeri bozulur veya hasar görürse, hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olan temel çözünenler sızar. Bu yapı hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde bulunduğundan, bu antibiyotik sınıfının etkisi genellikle yetersiz seçicidir ve memeli konakçıda kullanım için sıklıkla toksik etkisi olabilmektedir. Bu nedenle çoğu klinik kullanım topikal uygulamalarla sınırlıdır (Falagas vd., 2010).

2.4.1.2. Protein Sentezinin İnhibisyonu

Protein sentezi, enzimler ve hücresel yapıların esas olarak protein yapılı olması nedeniyle tüm mikroorganizma hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması için temel bir süreçtir. Proteinler yapısal bileşimden, metabolik ve fizyolojik süreçlerden ve olumsuz koşullara tepkiden sorumludur. Çeşitli antimikrobiyal ajan türleri, hücre içi ribozomların 30S veya 50S alt birimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibisyonunu hedefler. Bu aktivite daha sonra bakterilerin normal hücresel metabolizmasının

bozulmasına neden olur ve sonuç olarak mikroorganizmanın ölümüne veya büyümesinin ve çoğalmasının inhibisyonuna yol açar. Aminoglikozitler, makrolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, tetrasiklinler bu mekanizma ile etki göstermektedir (Hong vd., 2014).

Eritromisin, klindamisin, linkomisin, kloramfenikol, linezolid antibiyotikleri 50S ribozom inhibitörleri arasında yer almaktadır (Douthwaite, 1992; Katz ve Ashley, 2005). Genel anlamda, 50S ribozomu inhibe eden antibiyotikler bunu, protein translasyonunun başlangıç aşamasını ya da protein sentezinin uzama fazını fiziksel olarak bloke ederek yapmaktadır (Menninger ve Otto, 1982; Patel vd., 2001; Vannuffel ve Cocito, 1996). Protein translasyonunun başlamasını bloke eden antibiyotik örnekleri oksazolidinonların üyeleridir (Patel vd., 2001). Linkozamid ve streptogramin gibi makrolidler mRNA translasyonunun uzama fazını inhibe ederek protein sentezini bloke eder (Menninger ve Otto, 1982; Vannuffel ve Cocito, 1996).

30S ribozom inhibitörleri, aminoasıl-tRNA'ların ribozoma erişimini bloke ederek çalışır. Bu mekanizma ile etki gösteren antibiyotikler arasında tetrasiklin, streptomisin, spektinomisin vb. yer alır (Chopra ve Roberts, 2001; Hong vd., 2014). Bazı çalışmalar, tetrasiklinin 50S ribozomlarındaki bazı proteinleri de inhibe ettiğini göstermektedir (Epe ve Woolley, 1984).

2.4.1.3. Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu

Nükleik asit (DNA ve RNA) sentezi, mikroorganizmalar dahil tüm canlı organizmalar için gerekli bir süreçtir. Bazı antibiyotikler, DNA veya RNA sentezi sürecinde yer alan bileşenlere bağlanarak çalışır ve bu durum normal hücresel süreçlerin etkilenmesine neden olur ve nihayetinde mikroorganizmanın çoğalmasını ve hayatta kalmasını tehlikeye atar. Kinolonlar, metronidazol ve rifampin bu mekanizma ile etki göstermektedir (Etebu ve Arikekpa, 2016).

Nükleik asit sentezinin bozulması, bakteri hücrelerinin hem hayatta kalması hem de sonraki nesiller için zararlıdır. Antibiyotikler, replikasyonu bloke ederek veya transkripsiyonu durdurarak nükleik asit sentezine müdahale etmektedir. DNA replikasyonu, helikaz enzimleri tarafından kolaylaştırılan bir süreç olan çift sarmal yapısının çözülmesini içerir (Camarata, 1973). Kinolon grubu antibiyotikler, helikaz enziminin işlevselliğine müdahale ederek enzimin DNA'yı çözme işlevini yerine getirmesini engeller. Kinolonların bu antibiyotik etkisi, duyarlı bakteriler arasında DNA replikasyonu ve onarımı sürecini kısaltır. Nükleik asit sentezinin inhibisyonu ile etki

gösteren antibiyotikler bakterilerin topoizomeraz II ve topoizomeraz IV enzimlerini de hedef almaktadır. Bakterilerde bu enzimlerin aktivitelerinin bozulması RNA polimerazı olumsuz etkilemekte ve RNA sentezini engellemektedir (Chen vd., 1996).

2.4.1.4. Diğer Metabolik Süreçlerin İnhibisyonu

Diğer antibiyotikler, bakteriyel patojenlerin hayatta kalması için gerekli olan hücresel süreçler üzerinde etkilidir. Örneğin, hem sülfonamidler hem de trimetoprim, bakterilerin DNA sentezi için önemli olan öncülleri üretmesi için gerekli bir adım olan folik asit yolunu bozar. Sülfonamidler dihidropteroat sentazı hedefler ve ona bağlanır, trimetofrim dihidrofolat redüktazı inhibe eder. Her iki enzim de bakteriler tarafından sentezlenen bir vitamin olan folik asit üretmek için gereklidir (Etebu ve Arikekpa, 2016).

2.5. Antibiyotik Direnci

2.5.1. Direncin Kökeni

2.5.1.1. Doğal Direnç

Doğal direnç içsel olabilir (her zaman türde ifade edilir) veya uyarılmış olabilir (genler bakterilerde doğal olarak oluşur, ancak yalnızca bir antibiyotiğe maruz kaldıktan sonra direnç seviyelerine ifade edilir). İç direnç, bir bakteri türü içinde evrensel olarak paylaşılan, önceki antibiyotik maruziyetinden bağımsız ve yatay gen transferi ile ilgili olmayan bir özellik olarak tanımlanabilir (Cox ve Wright, 2013; Martinez, 2014).

İç dirence dahil olan en yaygın bakteriyel mekanizmalar, dış zarın geçirgenliğinin azalması (özellikle Gram negatif bakterilerde lipopolisakarit, LPS) ve akış pompalarının doğal aktivitesidir. Çoklu ilaç akış pompaları da indüklenen direncin yaygın mekanizmalarından biridir (Cox ve Wright, 2013; Fajardo vd., 2008).

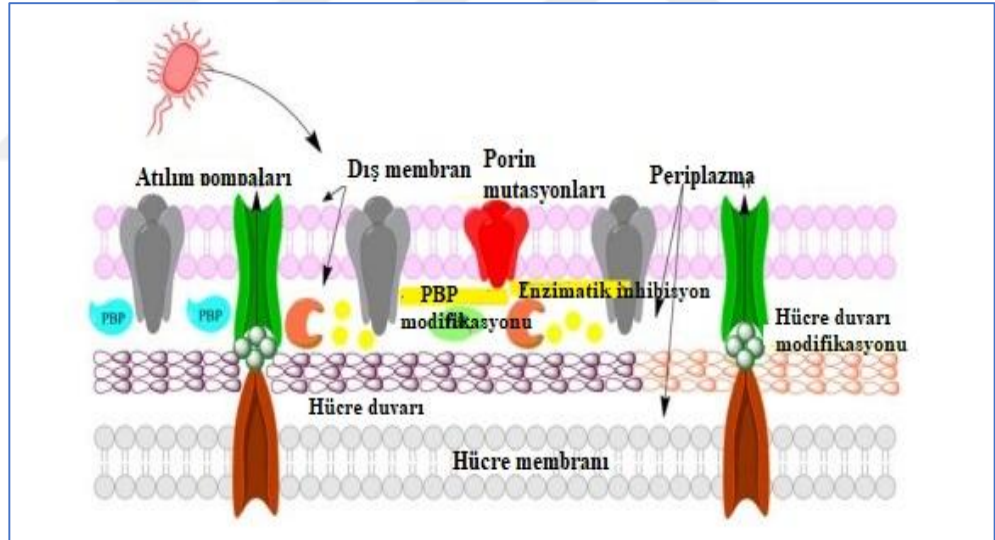
2.5.1.2. Kazanılmış Direnç

Direnç sağlayan genetik materyalin elde edilmesi, bakterilerin herhangi bir genetik materyali elde ettiği ana yolların tümü aracılığıyla mümkündür: transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon (tümü yatay gen transferi olarak adlandırılır). Bakterilerin kromozomal DNA'sında mutasyonlar görülebilir. Edinme geçici veya kalıcı olabilir. Direnç genlerinin plazmit aracılı iletimi, dış genetik materyalin elde edilmesi için en yaygın yoldur; bakteriyofaj kaynaklı bulaşma oldukça nadirdir. *Acinetobacter spp* gibi bazı bakteriler doğal olarak yetkindirler ve bu nedenle doğrudan dış ortamdan genetik

materyal elde etme yeteneğine sahiptirler. Bakteriler üzerindeki stresörler (açlık, UV radyasyonu, kimyasallar, vb.) genetik mutasyonların yaygın nedenleridir. Bakterilerin her 10^6 - 10^9 hücre bölünmesi için ortalama mutasyon oranı 1'dir ve bu mutasyonların çoğu hücre için zararlı olmaktadır (Davies ve Davies, 2010). Antimikrobiyal dirençte etkili olan mutasyonlar genellikle ilaç hedeflerini kodlayan, ilaç taşıyıcılarını kodlayan, ilaç taşıyıcılarını kontrol eden düzenleyicileri kodlayan ve antibiyotik modifiye edici enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar olarak gruplandırılmaktadır (Martinez, 2014).

2.5.2. Direnç Mekanizmaları

Mikroorganizmalarda birçok direnç mekanizması meydana gelmektedir (Tablo 2.2). Bunlardan beşi sık gözlenmekte olup klinik izolatlarda yüksek prevalans gösterir. Bunlar enzimatik inhibisyon, penisilin bağlayıcı protein (PBP) modifikasyonları, porin mutasyonları, akış pompaları ve hedef değişiklikleridir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Gram negatif bakterilerde en yaygın bakteri direnci mekanizmaları. Atılım pompaları, porin mutasyonu, penisilin bağlayıcı proteinlerde (PBP'ler) mutasyon, enzimatik inhibisyon ve ilacın hedef modifikasyonu (Matamoros-Recio vd., 2021).

2.5.2.1. İlaç Alımının Sınırlanması

Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakterilere göre doğal olarak bazı antibiyotiklere daha az geçirgendir çünkü dış zarları bir lipopolisakkarit (LPS) tabakasının varlığından dolayı bir geçirgenlik kalkanı oluşturur. Glikopeptit

antibiyotiklerin, örneğin vankomisin, dış zardan penetrasyon eksikliği nedeniyle Gram-negatif bakterilere karşı etkili olmaması, bu doğal bariyerin etkinliğinin başlıca örneğidir. Beta-laktamlar, tetrasiklinler ve bazı florokinolonlar dahil olmak üzere hidrofilik moleküller, dış zarın geçirgenliğindeki değişikliklerden etkilenir. Polar moleküller, enterokokların hücre duvarına girmekte güçlük çekerler. Ayrıca, son araştırmalar, porin ekspresyonundaki azalmaların, Enterobacterales, *Acinetobacter spp.* ve *Pseudomonas spp.* üyelerinde karbapenemler gibi ilaçlara karşı büyük ölçüde direnç yol açtığını ileri sürmektedir. Örneğin, mutasyonlar porin üretimini azaltırsa veya mutasyona uğramış porin alelleri mevcutsa, *Enterobacterales*'te karbapenemlere direnç, karbapenemaz enzimlerinin yokluğunda ortaya çıkmaktadır (Iredell vd., 2016). Biyofilm oluşumu, bakterilerin kolonizasyonuna yardımcı olan başka bir mekanizmadır (Pang vd., 2019). Biyofilm matrisi polisakkaritleri, proteinleri ve DNA'yı içerir, bu da antimikrobiyal ajanların bakteri hücrelerine etki etmesini zorlaştırır ve böylece savunma sağlar (Hall ve Mah, 2017).

2.5.2.2. İlaç İnaktivasyonu

Mikroorganizmalar antibiyotikleri iki yoldan biriyle etkisiz hale getirmektedir. Bu mekanizmalar ilacın yok edilmesi veya ilacın hedefinin modifikasyonunu içermektedir (Blair vd., 2015).

a. İlacın Kimyasal Modifikasyonu

Mikroorganizmalar, ilaçlara çeşitli kimyasal gruplar ekleyebilen enzimler üretebilir. Böylece, antibiyotiğin mikroorganizma hücreindeki hedefine bağlanmasını önlemektedir. Fosforil, asetil ve adenil gruplarının bileşiğe transferi, kimyasal grup transferi ile ilaç inaktivasyonunun en etkili yöntemidir (Lin vd., 2015).

Aminoglikozitler, kloramfenikol, streptograminler ve florokinolonların asetilasyon ve kimyasal grup transferinin her ikisini de kullandığı düşünüldüğünde en sık kullanılan mekanizmadır. Aminoglikozitlerin adenilasyon ve fosforilasyon yoluyla hedeflendiği kabul edilir. Aminoglikozit değiştirici enzimlerin (AME'ler) katılımı, aminoglikozit molekülünün hidroksil veya amino gruplarını kovalent olarak değiştirir ve onu inaktif hale getirir. İlaç modifikasyonu yoluyla direncin en iyi örneklerinden biridir (Munita ve Arias, 2016).

b. İlacın Yok Edilmesi

Penisilin ve sefalosporinler gibi beta-laktam ilaçları en sık kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Bu ilaç sınıfının yapısı, tüm üyeler arasında paylaşılan bir beta laktam halkasından oluşmaktadır. Beta-laktamazların aktivitesi, beta-laktam direncinin anahtar mekanizması olan beta-laktam halkasını yok eder. Beta-laktamazlar, beta-laktam halka oluşumunu hidrolize ederek penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanmasını inhibe eder (Bush ve Bradford, 2020).

c. İlaç Hedef Modifikasyonu

Antibiyotiğin hedefinin modifikasyonu, mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazanmasında yaygın bir mekanizmadır. Penisilin bağlayıcı proteinlerin düzenlenmesi ve/veya miktarındaki değişiklikler, beta-laktam ilaçlara karşı direnç mekanizmalarından biridir. Hedefe bağlanabilen ilaç miktarı, penisilin bağlayıcı protein sayısındaki değişikliklerden etkilenir (Bush ve Bradford, 2020). Yapısal bir değişiklik, (örn. *S. aureus*'ta mecA geninin varlığı) ilaç bağlanmasını azaltmakta veya tamamen önlemektedir (Foster, 2017).

Başka bir örnek, 16S rRNA'yı metilleyen ve ilaç bağlama bölgesini değiştiren, makrolidleri, streptograminleri ve linkozaminlerin bağlanmasını bloke eden eritromisin ribozommetilaz (erm) gen ailesidir (Peterson ve Kaur, 2018). Nükleik asit sentezini inhibe eden ilaçlara direnç, örneğin florokinolonlar, DNA giraz veya topoizomerez IV'teki değişikliklere aracılık etmektedir. Bu mutasyonlar ilacın bu bileşenlere bağlanma yeteneğini azaltır veya ortadan kaldırır (Saito vd., 2017). Antibiyotik gruplarına göre çeşitli direnç mekanizmaları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Antibiyotik gruplarına göre direnç mekanizmaları (Reygaert, 2018)

Antibiyotik	İlaç Alımının Sınırlanması	İlaç Hedef Modifikasyonu	İlaç İnaktivasyonu	Atılım Pompaları
β-Laktamlar	Azalmış porin sayısı, dış hücre duvarı yok	Gram pozitif-PBP'lerde değişiklikler	Gram negatif, Gram pozitif- β- laktamazlar	RND
Karbapenemler	Porin seçiciliğinin değiştirilmesi			
Sefalosporinler	Porin seçiciliğinin değiştirilmesi			
Glikopeptidler	Kalınlaşmış hücre duvarı, dış hücre duvarı yok	Peptidoglikanda değişiklikler		

Aminoglikozitler	Hücre duvarı polaritesi	Ribozomal mutasyon, metilasyon	Aminoglikozit modifiye edici enzimler, asetilasyon, fosforilasyon, adenilasyon	RND
Tetrasiklinler	Porin sayısının azalması	Ribozomal koruma	Antibiyotik modifikasyonu, oksidasyon	MFS RND
Kloramfenikol		Ribozomal metilasyon	İlaç asetilasyonu	MFS RND
Linkozamidler		Gram pozitif-ribozomal metilasyon		ABC, RND
Makrolidler		Ribozomal mutasyon, metilasyon		ABC, MFS, RND
Florokinolonlar		Gram negatif—DNA giraz modifikasyonu	İlacın asetilasyonu	MATE, MFS, RND
Sulfonamidler		DHPS azaltılmış bağlanma, dirençli DHPS'nin aşırı üretimi		RND

ABC—ATP bağlayıcı kaset ailesi, DHFR—dihidrofolat redüktaz, DHPS—dihidropteroat sentaz, MATE—çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon ailesi, MFS—ana kolaylaştırıcı üst ailesi, PBP—penisilin bağlayıcı protein, RND—direnç-nodülasyon-hücre bölünme ailesi

2.6. Doğal Antimikrobiyal Ürünler

2.6.1. Doğal Antimikrobiyal Ürünlerin Özellikleri

Günümüzde antibiyotiklere dirençli patojenlerin artışıyla birlikte daha etkili antimikrobiyal bileşiklere olan ihtiyaç artmıştır. Bu nedenle, türe özgü çalışmaların ötesine geçilerek doğal kaynakların araştırılması önem taşımaktadır. Bu araştırma alanı, potansiyel antimikrobiyal ajanlar için keşfedilmemiş bir kaynak sunduğundan, giderek artan dirençli enfeksiyonlara karşı yeni biyoaktif moleküllerin tanımlanması açısından önemlidir. Doğal kaynaklardan yeni antimikrobiyal bileşiklerinin araştırılmasının, artan dirençli patojenlere karşı yeni ilaçların tanımlanmasında yararlı ipuçları üreteceği düşünülmektedir (Mullis vd., 2019).

Doğal ürünlerin genel tanımı, en geniş anlamıyla “çeşitli canlılardan izole edilen kimyasal bileşikler” olarak vurgulanmaktadır. Bu bileşikler, canlı organizmaların primer veya daha çok sekonder metabolizması ile üretilebilir. Primer metabolitler (polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve yağ asitleri) tüm biyolojik sistemlerde ortaktır. Sekonder metabolitler ise düşük moleküler ağırlıklı (MW 3000), kimyasal ve taksonomik olarak son derece çeşitli, farklı organizma türlerine özgü olan bileşiklerdir. Primer ve sekonder metabolitlerin özellikleri Çizelge 2.3’ te verilmiştir. Doğal ürünlerin

önemli bir kısmı, mikroorganizmaların moleküler sekonder metabolitleridir ve genellikle bazı biyolojik aktiviteler sergilemektedir (Berdy, 2025).

Mikroorganizmalardan izole edilen sekonder metabolitler; antimikrobiyal, antitümör ve/veya antiviral aktiviteler sergilemektedir. Genel olarak, mikrobiyal metabolitleri içeren doğal ürünler, pratik olarak üç farklı şekilde kullanılmaktadır:

- Doğal/fermantasyon ürününün doğrudan ilaç, tarım veya diğer alanlarda uygulanması,
- Sonraki kimyasal veya mikrobiyolojik modifikasyon (türevlendirme) için başlangıç materyali olarak kullanılması,
- Yeni analogların kimyasal sentezi için öncü bileşikler olarak veya rasyonel ilaç tasarımı çalışmalarında şablon olarak kullanılabilirler (Bérdy, 2005).

Çizelge 2.3. Primer ve sekonder metabolitlerin özellikleri (Thirumurugan vd., 2018)

ÖZELLİKLER	PRİMER METABOLİTLER	SEKONDER METABOLİTLER
Tanım	Metabolik yolda ilk üretilen ara bileşiklerdir.	Metabolik yolun son ürünleridir.
Üretildiği Faz	Trofofaz veya log fazında meydana gelir.	İdiofaz veya durağan fazda oluşur.
Metabolit Tipleri	İki tip (Primer temel metabolitler ve Primer metabolik son ürünler)	Sınıflandırılmamıştır.
Metabolizma Tipi	Primer metabolizmanın ürünleridir.	Sekonder metabolizmanın ürünleridir.
Üretim Miktarı	Büyük	Küçük
Mikrobiyal Hücre Büyümesindeki Rolü	Üretimi mikroorganizmaların hayatta kalması ve büyümesi için gereklidir.	Üretiminin hücre büyüme ve gelişmesinde hiçbir önemi yoktur.
Savunma Etkisi	Savunma eylemlerinde yer almazlar.	Biyoaktif sekonder metabolitler savunma eylemi özelliğine sahiptir
Üretim Süreci	Basit	Kompleks
Örnekler	Proteinler, enzimler, nükleik asitler, karbonhidratlar, amino asitler, vitaminler, etanol vb.	Antibiyotikler, pigmentler, toksinler vb.

Tarihsel olarak, doğal ürünler, özellikle kanser ve bulaşıcı hastalıklar için ilaç keşfinde, ayrıca kardiyovasküler hastalıklar (örneğin, statinler) ve multipl skleroz (örneğin, fingolimod) dahil olmak üzere diğer terapötik alanlarda önemli bir rol oynamıştır (Newman ve Cragg, 2016).

Doğal ürünler ilaç keşif süreci için hem avantajlar hem de zorluklar içeren geleneksel sentetik moleküllere kıyasla farklı özelliklere sahiptir. Doğal ürünler yapısal çeşitlilik ve yapısal karmaşıklık ile karakterize edilir. Tipik olarak daha yüksek moleküler kütleye, daha fazla sayıda sp³ karbon atomuna ve oksijen atomuna sahiptirler ancak daha az nitrojen atomuna, daha yüksek sayıda H-bağ alıcısı ve vericisine, daha düşük hesaplanmış oktanol-su bölünme katsayılarına (cLogP değerleri, daha yüksek hidrofilikliği gösterir) ve daha yüksek moleküler sertliğe sahiptirler. Doğal ürünler, savunma mekanizmalarının düzenlenmesi gibi belirli biyolojik işlevlere hizmet etmek için yapısal olarak optimize edilmiştir. Ayrıca, geleneksel tıpta kullanımları, etkinlik ve güvenlik konusunda fikir verebilir. Genel olarak, doğal ürün havuzu, tipik sentetik küçük molekül kitaplıklarına kıyasla daha geniş bir kimyasal alanı kapsayan "biyoaktif" bileşiklerle zenginleştirilmiştir (Lachance vd., 2012).

Bu avantajlara ve çok sayıda başarılı ilaç keşfi örneğine rağmen doğal ürünlerin çeşitli dezavantajları ilaç şirketlerini doğal ürün bazlı ilaç keşif programlarını azaltmaya

yöneltmiştir. İlgili biyoaktif bileşiklerin belirlenmesi zor olabilmektedir ve bilinen bileşiklerin yeniden keşfedilmesini önlemek için replikasyon araçlarının uygulanması gerekmektedir. Biyoaktif bir doğal ürünü izole etmek ve karakterize etmek için yeterli biyolojik materyale erişmek de zor olabilmektedir. Ayrıca, ilgili biyoaktiviteleri sergileyen doğal ürünlerin sentezlediği bileşikler orijinal formlarında her zaman patentlenemeyebilir (Cragg vd., 1993). Doğal ürün bazlı ilaç keşfinin sentetik kimyasal ürünlere kıyasla avantajları ve zorlukları Çizelge 2.4’ te özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Doğal antimikrobiyal ürünlerin avantajları ve başlıca zorluklar

AVANTAJLAR	BAŞLICA ZORLUKLAR
Doğal ürünler, kompleks yapısı ve biyolojik gücü ile eşsiz kimyasal çeşitlilik sunar (Verdine, 1996).	Yeni mikrobiyal bileşiklerin keşfi için ekosistemlerin sistematik olarak kullanılmaması, rastgele örnekleme ile sonuçlanmış ve birçok bölgenin gerçek potansiyeli ortaya çıkmamıştır (Czárán vd., 2002).
Doğal ürünler, belirli biyolojik etkileşimler için doğası gereği seçilmiştir. Proteinlere bağlanmak ve ilaca benzer özelliklere sahip olmak için evrimleşmişlerdir.	Suşların seçimi, daha güçlü kimyasal çeşitlilik ve genotip yaklaşımlarından ziyade geleneksel olarak morfolojiye dayanmaktadır.
Doğal ürün kaynakları büyük ölçüde keşfedilmemiştir. Yeni keşif stratejileri, yeni biyoaktif bileşiklere kaynaklık etmektedir.	Dereplikasyonun olmaması, birçok doğal ürün ekstraktı kütüphanesinde suşların ve bileşiklerin fazlalığına neden olmuştur (Handelsman vd., 1998).
Doğal ürün ekstraktları sentetik ürünlerin ve doğal ürünlerle sentetik ürünlerin sentezini içeren kütüphanelerin tamamlayıcısıdır.	Doğal ürün ekstraktlarından aktif bileşiklerin karakterizasyonu ve izolasyonu son derece yoğun emek ister ve zaman alıcıdır (Monaghan vd., 1995).
Doğal ürünler, sentetik bileşiklerin tasarımına rehberlik edebilir (Breinbauer vd., 2003).	

2.7. Doğal Antimikrobiyal Ürünlerin Ekstrem Ortamlardan Keşfi

Antimikrobiyal ürünlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Piyasada bulunan antibiyotiklerin %70’i toprak bakterilerinden elde edilmektedir. Mikroorganizmalar, karşılıklı yarar sağlayan bir ilişki içinde bir arada var olmalarına rağmen, besin eksikliği olması durumunda, diğer türler için toksik olan ürün ve metabolitlerin üretimi ile sonuçlanan antagonistik bir ilişki geliştirebilirler (Martínez, 2008).

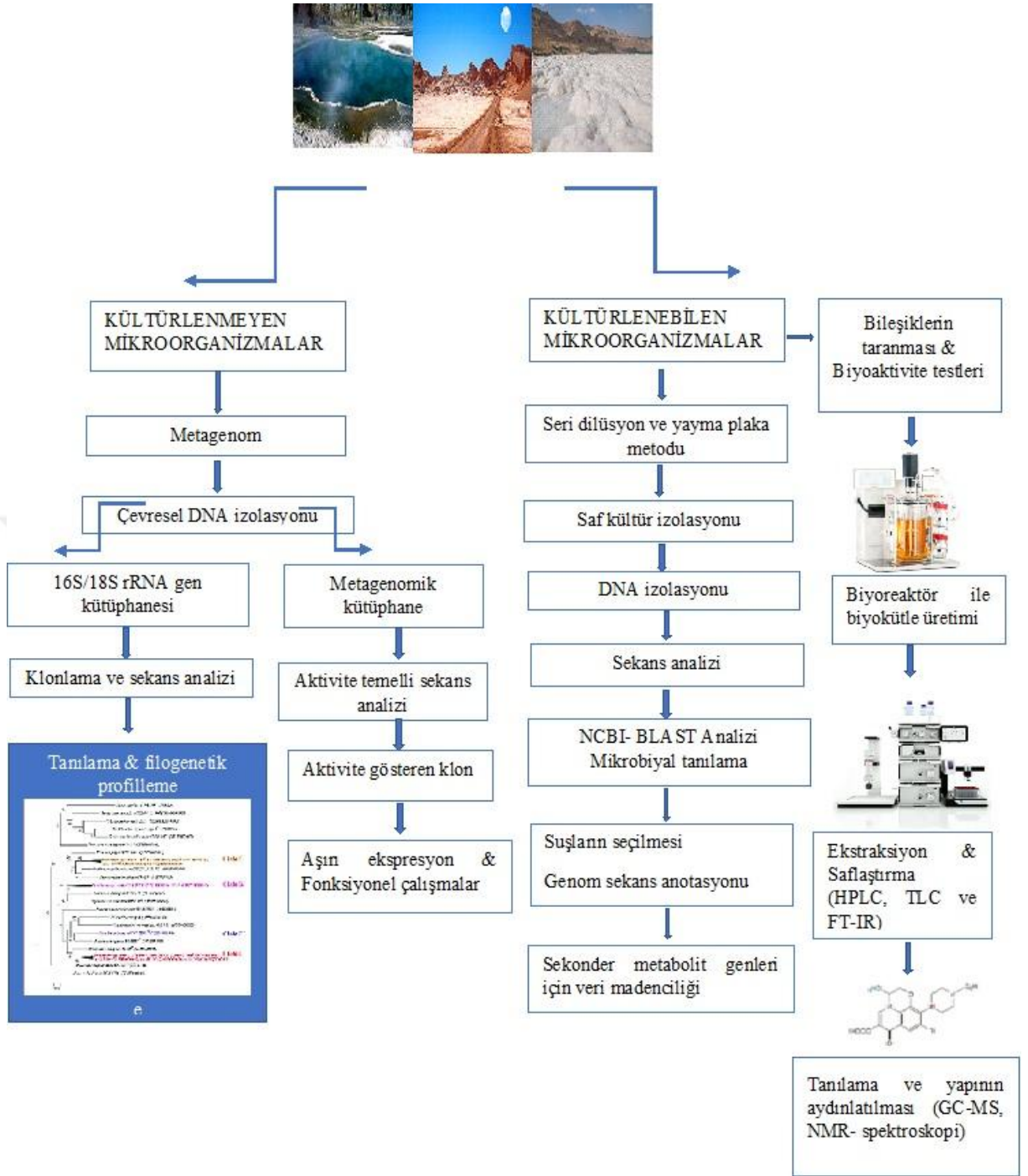
Mikroorganizmalar, rakip mikroorganizmaları öldürmek ve/veya büyümesini engellemek için işlev gören antimikrobiyallerin üretimi dahil olmak üzere çeşitli hayatta kalma mekanizmalarına sahiptir. Antimikrobiyal madde üretim çalışmaları, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmalardaki artışa karşın laboratuvar koşulları altında izole edilmiş saf kültürleri içermiştir. Yeni doğal ürün arayışı biyofilmlere, toprağa, okyanuslara, mercan resiflerine ve sığ kıyı çökellerine kadar pek çok ortama uzanmıştır. Enerjinin

sınırlı olduğu aşırı ortamlarda prokaryotlar hayatta kalmak için mikrobiyal popölasyonları ya metabolizmalarını rekabeti aşacak şekilde uyarlama ya da rekabeti engelleyen yeni antimikrobiyal metabolitler üretme gibi stratejiler geliştirmektedir (Kochhar vd., 2022).

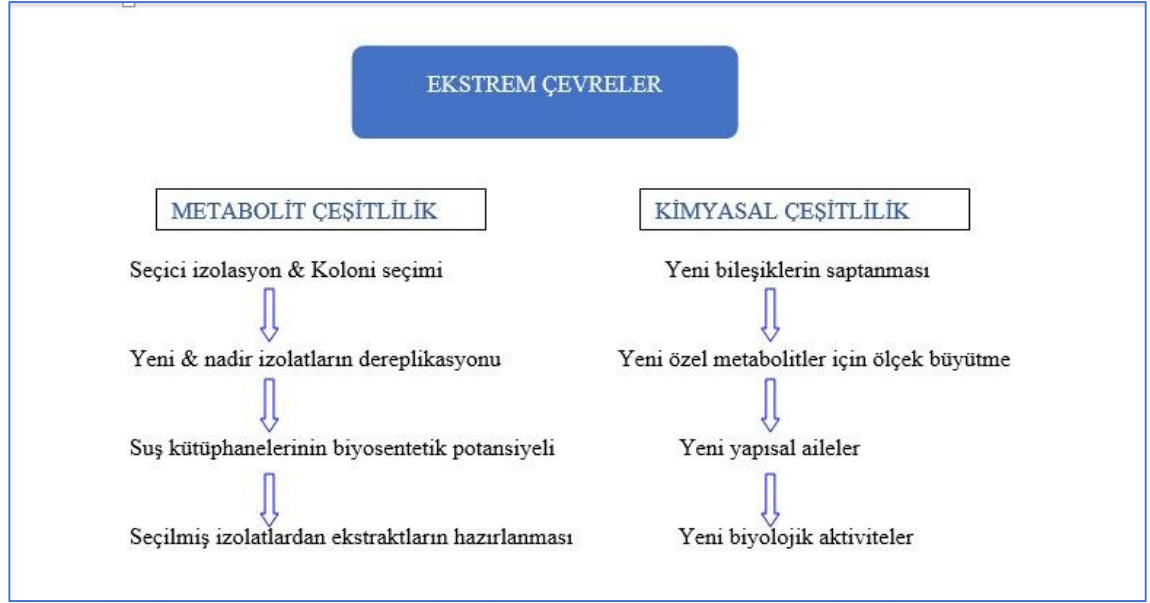
Ekstremofiller, insanlar tarafından “aşırı” olarak adlandırılan koşullarda hayatta kalabilen ve gelişebilen organizmalardır. Sıcaklık ve pH dalgalanmaları, yüksek tuzluluk gibi ekstrem koşullarda çeşitli nedenlerle geleneksel yöntemler uygulanamaz. Ekstremofillerin yapıları bu ortamlarda gelişmeye uygundur ve sürdürülebilir, daha ucuz ve verimli ürünler üretebilir. Bu nedenle geleneksel yöntemlere daha iyi alternatifler olarak hizmet ederler. Biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerle bu ortamlara uyum sağlarlar ve sürdürülebilir tarım, gıda, kozmetik ve ilaç gibi çok çeşitli endüstrilerde yararlı olduğu görülen ekstremolitler, ekstreozimler, biyosümfaktanlar vb. ürünler üretirler. Bu ürünler ayrıca biyoremediasyon, biyoyakıt üretimi, biyorafineri ve astrobiyolojide çok önemli bir rol oynamaktadır (Kochhar vd., 2022).

Ekstremobiyosfer, aşırı kurak çöller, derin deniz çökelleri ve permafrost toprakların yanı sıra asit ve yüksek sıcaklık ortamlarını içeren geniş bir biyom yelpazesini kapsar. Bu tür aşırı habitatlar; kuraklık, aşırı sıcaklıklar, düşük organik madde konsantrasyonları, yüksek tuzluluk gibi çevresel değişkenlerin kombinasyonları ile karakterize edilmektedir (Sivalingam vd., 2019).

Ekstrem çevrelere uyum sağlamış aktinobakterilerin yeni ilaç öncülerini sentezlemek için benzersiz bir kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir (Genilloud, 2017). Bu organizmalar, özellikle *Streptomyces*, klinik kullanımda olanların çoğu dahil, bilinen antibiyotiklerin yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır (Newman ve Cragg, 2016). Ekstrem çevrelerden izole edilen mikroorganizmaların sekonder metabolit ve biyoaktif bileşiklerinin keşfi ve tanılanması çalışma basamakları Şekil 2.8’de, kültüre bağı doğa ürün keşfinin basamakları Şekil 2.9’da verilmiştir.



Şekil 2.8. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif bileşiklerin ve sekonder metabolitlerin izolasyonu, karakterizasyonu, tanımlanması ve potansiyel uygulamalarının şematik bir temsili (Yadav, 2021)



Şekil 2.9. Kültüre bağlı doğal ürün keşfinin basamakları (Ali vd., 2018)

Çizelge 2.5. Doğal kaynaklardan keşfedilen çeşitli antimikrobiyal bileşenler, etki ettiği patojenler ve hedef bölgeleri

KAYNAK	ANTİMİKROBİYAL BİLEŞEN	ETKİ ETTİĞİ PATOJENLER	HEDEF BÖLGE	REFERANSLAR
<i>Penicillium notatum</i>	Penisilin	Çoğu Gram pozitif bakteri	Bakteri hücre duvarı	Hobby vd., 1942; Waxman ve Strominger, 1983
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomisin	<i>B. subtilis</i> ve esas olarak Gram negatif bakterilere karşı, <i>A. aerogenes</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> dahil	Bakteri ribozomunun 30S alt biriminin küçük 16SrRNA'sına bağlanan bir protein sentezi inhibitörü	Schatz vd., 1944
<i>Aspergillus</i> ve <i>Trichoderma</i>	Epipolitiyadioksopiperazin adı verilen bir diketo piperazin türü olan gliotoksin	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Mucor racemosus</i>	Sitoplazmik zarlarda bulunan tiyol gruplarına seçici olarak bağlanarak etki eder.	Abraham vd., 1953; Newton ve Abraham, 1955
<i>Acremonium</i>	Sefalosporinler	Çeşitli jenerasyonlarına göre Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler	Bakteri hücre duvarı	Abraham vd., 1953; Newton ve Abraham, 1955
<i>Pseudomonas bromoutilis</i> (Deniz türü)	Pirol içeren antimikrobiyal madde	<i>S. aureus</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>M. tuberculosis</i>	İnhibitör özellikler	Burkholder vd., 1966

<i>Basillus</i> türleri	Mercaidin	MRSA	Bakterisidal aktivite	Chatterjee vd., 1992
<i>Streptomyces</i> sp. (Deniz sedimenti)	Anthracimycin	<i>Basillus anthracis</i> MRSA	RNA ve DNA sentezinin inhibisyonu	Jang vd., 2013
<i>Streptomyces</i> sp. (Deniz türü)	Salinamide F	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> <i>E. coli</i>	RNA polimerazın inhibisyonu	Hassan vd., 2015
Deniz süngeri <i>Xestospongia testudinaria</i> ' dan izole edilen simbiyotik bakteri suşları	Alkaloid, steroid/triterpenoid ve fenoller	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Basillus subtilis</i>	Büyümeyi inhibe edici etki	Cita vd., 2017
<i>Aspergillus</i> sp. (Deniz türü)	Aspergillsteroid A	<i>Vibrio harveyi</i>	Sitotoksik ve antibakteriyel	Xu vd., 2020
<i>Penicillium citrinum</i> (Deniz kökenli)	Citrinadin C	<i>Xanthomonas campestris</i> (fitopatojen)	Sitotoksik ve antibakteriyel	Jiang vd., 2022
<i>Nonomuraea</i> sp. (Deniz kökenli)	Fluvirucins B7–B10	Fluconazol dirençli <i>Candida albicans</i>	Antifungal	Yu vd.,2022
<i>Talaromyces mangshanicus</i> (Deniz kökenli)	Talaromanloid türevleri	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , ve <i>Candida albicans</i>	Antibakteriyel ve antifungal	Zhang vd., 2022

2.8. Mağara Ekosistemleri ve Mikroflorası

2.8.1. Mağara Ekosistemleri

Mağaralar, sabit sıcaklık, yüksek nem, düşük basınç, düşük oksijen konsantrasyonu ve düşük besinlerle sınırlı bir ekosisteme sahip, karanlık, doğal yeraltı alanlarıdır. Mağaralar dünya çapında farklı coğrafi koşullarda mevcuttur. Mağaralar, farklı bileşiklerin kimyasal reaksiyonları, kayaçların çözünmesi, kayalarının aşınması, buzulların erimesi ve kayaların su, tektonik kuvvetler, atmosferik etkiler, mikroorganizmalar tarafından aşınmalar ve ayrıca kazılar gibi çeşitli jeolojik süreçlerle oluşur (Engel vd., 2004).

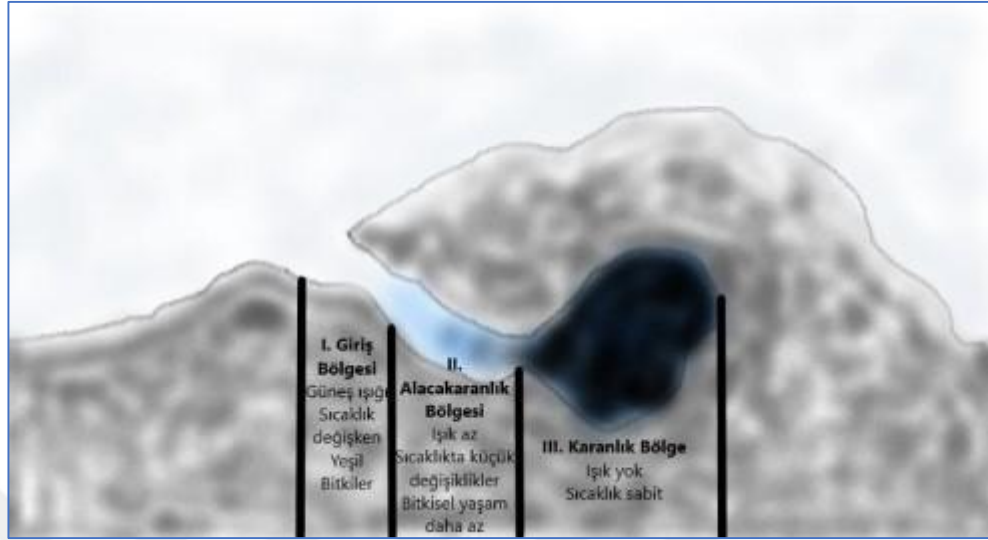
Mağaralar ışık girişine göre üç bölgeye ayrılır: giriş bölgesi, alacakaranlık bölgesi ve karanlık bölge (Şekil 2.10). Giriş bölgesi, yaklaşık 5 m uzunluğunda, tam güneş ışığı alan, fotosentetik yaşamın (bitkilerin) bulunduğu dış ortama benzer ve sıcaklık dış ortama göre değişir. Alacakaranlık bölgesinde, fotosentetik faaliyetlerin durduğu 10-20 m

uzunluğunda daha az ışık penetrasyonu vardır ve bu bölgede hiçbir bitki yaşamaz. Sıcaklık sabit kalır, ancak zaman zaman yer üstü havasıyla dalgalanır. Karanlık bölge, yıl boyunca sabit sıcaklığa sahip olmakla birlikte tamamen karanlıktır (Zada vd., 2016).

Su mağaraları, karasal mağaralar (örneğin buz mağaraları, lav mağaraları) ve deniz mağaraları gibi birçok mağara türü vardır (Ford, 2006; Mylroie ve Mylroie, 2013). Bildirilen mağaraların çoğu kireçtaşı, alçıtaşı ve dolomit kayalarından oluşmaktadır. Kalsitin yanı sıra, mağaralarda bildirilen diğer ilginç mineraller, kalsiyum karbonata (CaCO_3) benzeyen, ancak CaCO_3 kadar yaygın olmayan ve esas olarak antoditler olarak adlandırılan aragonittir. Sodyum ve magnezyum sülfatlar da bazı mağara sistemlerinde bulunur (Zada vd., 2016). Limonit, kalsiyum nitritler, barit, selestit, endellit ve atapulgit gibi diğer mineraller de mağara ortamlarında bulunur (Bögli, 1980). Dünyanın en büyük mağarası ABD'nin Kentucky eyaletinde bulunan Mammoth Mağarası'dır. Yaklaşık 80 mil kareyi kapsayan ve 365 mil uzunluğunda olan bir kireçtaşı. Binlerce yıldır kireçtaşı tavandan sızan su binlerce sarkıt oluşturmuştur (Algeo, 2004). Mağaralarda yaşayan hayvanlar gelişmemiş gözlere, uzun antenlere ve pigment eksikliğine sahiptir (Pipan vd., 2020).

Tarih öncesi çağlardan beri mağaralar insanlığa fayda sağlamada önemli bir rol oynamıştır. İnsanlar ve mağaralar arasındaki bağlantı insanlık tarihi kadar eskidir. Mağaralar, tarihi ve çevredeki rolleri nedeniyle önemli doğal kaynaklar olarak kabul edilir. Mağaralar yeraltı suyu akışında önemli bir rol oynar ve tehdit altındaki ve nesli tükenmekte olan hayvanlara ev sahipliği yapar. Bazı mağaralar ayrıca tarih öncesi hayvanların heykellerini ve ilk insanların eserlerini de korur. Tarih öncesi insanlar mağaraları barınaklar, eski kutsal alanlar, su kaynakları, kil ve diğer malzemeler gibi farklı amaçlar için kullanmıştır. Hindistan'daki 29 mağaradan oluşan Ajanta mağaraları MÖ 2. yüzyılda inşa edilmiştir (Singh ve Arbad, 2015). Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü'nün (UNESCO) dünya mirası alanlarından biridir. Bu mağaralar dini faaliyetler için kullanılmış ve uzun zamandır Hindistan'da kutsal bir yer olarak kabul edilmiştir. Mezolitik dönem mağaraların ilk kullanımına ve modifikasyonuna tanık olmuştur. Budist dini sanatının şaheserleri olan bu mağaralarda birçok kayaya oyulmuş Hindu ve Budist heykel ve tabloları bulunmuştur (Artioli, 2008). Mağaralar, sabit sıcaklıkları nedeniyle şarap ve bira mahzeni olarak da kullanılmıştır. Yıl boyunca yüksek nem ve sabit sıcaklık nedeniyle insanlar mağaraları solunum yolu hastalıklarının tedavisi için hastane olarak kullanmıştır. Geçmişte mağaralar ayrıca geçiş ritüellerini kutlamak,

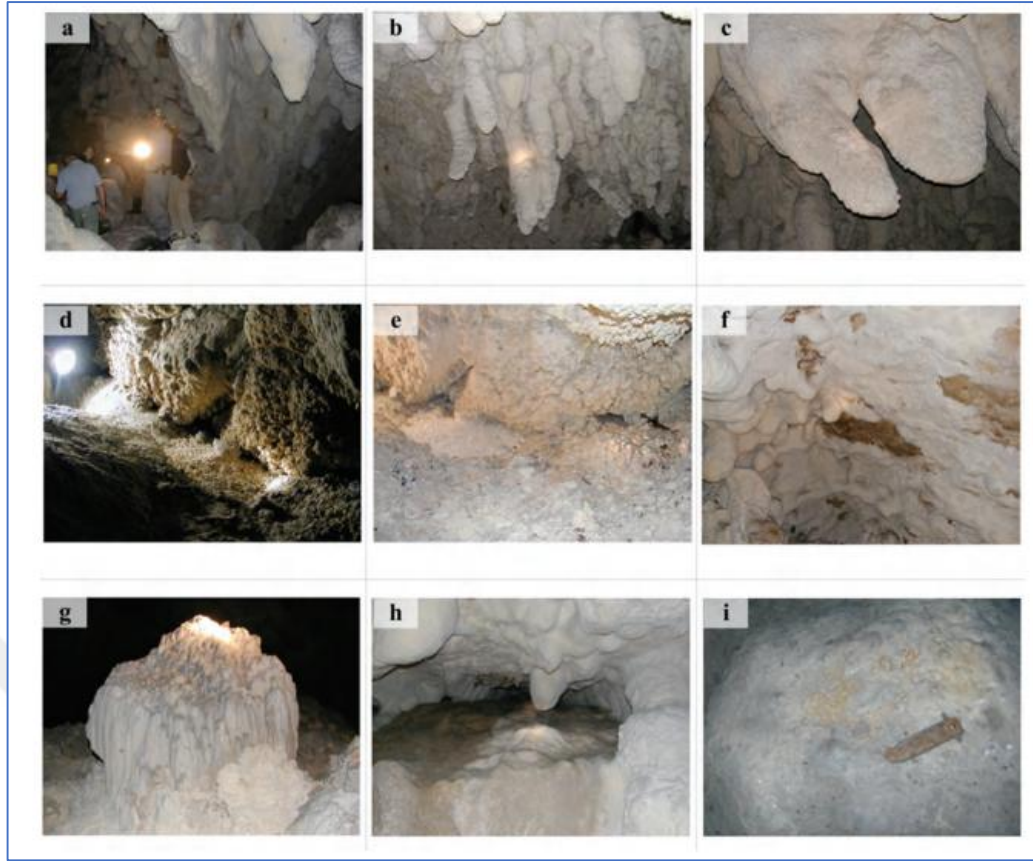
paleolitik tablolar, tarihi yerler ve gizli hazine avı için de kullanılmıştır (Singh ve Arbad, 2015).



Şekil 2.10. Mağara ekosistemlerinde bulunan bölgeler (Koç ve Sarıgül, 2019)

2.8.2. Mağara Mikroflorası

Olumsuz büyüme koşullarına ve karanlık, oligotrofi, yüksek mineral konsantrasyonu gibi birçok sınırlayıcı faktöre rağmen, mikroorganizmaların mağaranın ekolojik nişlerinde gelişebildiği bildirilmiştir. Bu zorlu ekosisteme mükemmel Şekilde adapte olmuş mağara mikroorganizmaları, sayısız yeni türle geniş bir biyolojik çeşitlilik göstermektedir. Bakteriler, algler ve funguslar, kaya duvarlarından, mağara toprağından, sudan, moon milk yapılarından (Şekil 2.11) ve vermikülasyon birikintilerinden izole edilmiştir (Jaroszewicz vd., 2021). Ototroflar genellikle enerjiyi kemosentez yoluyla ve organik ve inorganik bileşikleri kayalardan, mağara çökellerinden ve yeraltı sularından çeker. Fotosentez ise yalnızca ışık kaynağına yakın, mağara girişinin yakınında yaşayan mikroorganizmalar için mevcuttur. Her durumda, bu tür mikrobiyal toplulukların, çeşitli biyojeokimyasal süreçleri etkileyen mağaraların ve tortuların oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir. Esas olarak kaya ve mağara sularında minerallerin çökmesini veya çözünmesini teşvik ederler, bu da yeni mağara oluşumlarının ortaya çıkmasına neden olur (Moldovan, 2018; Paula vd., 2020).



Şekil 2.11. Grotta Nera Mağarası (İtalya) iç tavanı (a, b, c), duvarları (d, e, f) ve zemininde (g, h, i) bulunan moon milk yapıları (Cacchio vd., 2014)

2.8.2.1. Bakteriyel Çeşitlilik

Mikrobiyal kültürlerle dayanan çalışmalar mağaralarda öncelikle *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Firmicutes* gruplarının baskın olduğunu göstermektedir (Barton vd., 2007). Lee vd., (2000). tarafından yapılan çalışmada *Proteobacteria*, *Chlorobi*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Chloroflexi* en yaygın bakteri sınıfları olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu sonuçlar her mağaranın özelliklerine göre farklılık göstermektedir. *Gammaproteobacteria* ve *Acidobacteria* ABD'deki Wind Mağarasında baskın olurken, sülfidik mağara biyofilminde *Gammaproteobacteria* ve *Epsilonproteobacteria* baskındır (Chelius ve Moore, 2004; Engel vd., 2004). Avustralya, Çin, İspanya ve ABD'deki mağaraları karşılaştırmış ve *Proteobacteria*'nın İspanya ve Çin mağaralarında baskın grup olduğunu ve *Acidobacteria*'nın ikinci baskın grup olduğunu bildirmiştir (Zhou vd., 2007). *Actinobacteria* üyelerinin bazı mağara ekosistemlerinde baskın bir mikrobiyal popülasyon olduğu bildirilmektedir (Cheeptham vd., 2013; Ghosh vd., 2017; Groth vd., 1999; Tomczyk-Żak ve Zielenkiewicz, 2016). *Actinobacteria*'lar ticari olarak temin edilebilen antibiyotiklerde biyoaktif bileşiklerin en

retken kaynağı olarak kabul edilir. *Actinobacteria*' lar piyasadaki tüm antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisini üretmektedir, bunların çoğu *Streptomyces* cinsinin üyeleridir (Barka vd., 2016). Çeşitli aktinobakteriyel taksonların birkaç üyesinin antibakteriyel, antikanser veya antifungal ilaçlar için çok çeşitli diğer biyolojik olarak aktif bileşikler ürettiği bildirilmiştir (Barka vd., 2016; Castro vd., 2018; Genilloud, 2017; Takahashi ve Nakashima, 2018). Çeşitli mağaralardan izole edilen aktinomisetler ve biyoaktiviteleri izelge 2.6' da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Çeşitli mağaralardan izole edilen aktinomisetler ve biyoaktiviteleri

Suşlar	Mağara	Lokasyon	Aktivite	Kaynaklar
<i>Streptomyces</i> (79.3%); <i>Nocardia</i> (<10%)	Helmcken Falls Mağarası	Kanada	Antimikrobiyal	Saiz-Jimenez, 1999
<i>Streptomyces</i> ; <i>Agromyces</i> ; <i>Arthrobacter</i> ; <i>Rhodococcus</i>	Grotta dei Cervi	İtalya	Halotolerans Mineralizasyon Antimikrobiyal	Groth, 2001
<i>Microbispora thailandensis</i> spp.	Tropikal Kiretaşı Mağaraları	Tayland	Antimikrobiyal	Duangmal vd., 2012
<i>Streptomyces</i> spp. 52%; <i>Actinoplanes</i> spp. 13%; <i>Nocardioides</i> 8.7%; <i>Micromonospora</i> 8.7%; <i>Agromyces</i> 8.7%; <i>Oerskovia</i> 4.4%; <i>Rhodococcus</i> 4.4% <i>Streptomyces</i> (54%); <i>Micromonospora</i> (18%); <i>Micrococcus</i> (5%); <i>Kocuria</i> (4%); <i>Corynebacterium</i> (5%)	Shuanghe Mağarası	Asya	Antimikrobiyal	Long vd., 2019
<i>Streptomyces</i> (54%); <i>Micromonospora</i> (18%); <i>Micrococcus</i> (5%); <i>Kocuria</i> (4%); <i>Corynebacterium</i> (5%)	Hampoeil Mağarası	İran	Ağır metal toleransı	(Hamedi vd., 2019)
<i>Streptomyces</i> ; <i>Micromonospora</i> ; <i>Microbacterium</i> ; <i>Kocuria</i> ;	Pukzing Mağarası	Hindistan	Antimikrobiyal	Iquebal vd., 2021

<i>Micrococcus;</i> <i>Nocardiopsis;</i> <i>Actinocorallia;</i> <i>Actinomadura;</i> <i>Agromyces;</i> <i>Alloactinosynnema;</i> <i>Amycolatopsis;</i> <i>Beutenbergia;</i> <i>Cellulosimicrobium;</i> <i>Gordonia;</i> <i>Isoptericola;</i> <i>Jiangella;</i> <i>Knoellia;</i> <i>Kocuria;</i> <i>Krasilnikoviella;</i> <i>Kribbella;</i>				
<i>Streptomyces sp.</i>	Garhwal Himalayan Bölgesi Mağaraları	Himalaya	Antibakteriyel	Mushtaq vd., 2021
<i>Crossiella sp.</i>	Altamira Mağarası	İspanya	Antibakteriyel ve antifungal	Gonzalez-Pimentel vd., 2022
<i>Streptomyces,</i> <i>Pseudonocardia,</i> <i>Kocuria,</i> <i>Micromonospora,</i> <i>Nonomuraea sp.</i>	Fiji kireçtaşı Mağaraları	Fiji	Antibakteriyel	Pipite vd., 2022
<i>Streptomyces sp.</i>	Guldeman Mağaraları	Tunus	Antimikrobiyal ve antioksidan	Djebbah vd., 2022
<i>Microbacterium sp.</i> (%21) <i>Pseudarthrobacter sp.</i> (%14)	Parsık Mağarası	Kocaeli/Türkiye	Antimikrobiyal ve enzimatik	Rachid ve-Güngör, 2023
<i>Actinoplanes sp.</i> <i>Glutamicibacter uratoxydans</i>	Bahadurkhel Karak Bölgesi Mağaraları	Pakistan	Antibakteriyel	Nawaz vd., 2023
<i>Streptomyces tuius</i>	Maros-Pangkep karst ekosistemleri	Endonezya	Antifungal	Rante vd., 2024

2.8.2.2. Fungal Çeşitlilik

Mağaralardaki fungus çeşitliliği araştırmaları, Kuzey Amerika mağaralarındaki yarasalar arasında beyaz burun sendromu adı verilen ölümcül mantar hastalığının görülmesi ile dikkat çekmiştir (Şekil 2.12) (Wibbelt vd., 2010). O zamandan bu yana

mağara habitatlarında fungus biyoçeşitliliği kapsamında yeni ilaçlar ve yeni genlerle ilgili çalışmalar yapılmıştır (Docampo vd., 2011; Nováková, 2009; Ogórek vd., 2013; Pusztos vd., 2015). Dünya çapında mağaralarda ve yeraltı ortamlarında 550 cinsten 1150'den fazla fungus türü keşfedilmiştir. Mağara ortamlarında funguslar çoğunlukla kayalardan, mağaranın sedimentlerinden, yarası guanosundan, speleothem yüzeylerinden ve havadan izole edilmiştir. Çalışmaların çoğunda, sonuçlar *Ascomycota*'nın diğer şubelerden daha fazla tespit edildiğini ortaya koymaktadır. Çoğu mağara örneğinde *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* ve *Fusarium* cinslerinin hakim olduğu bildirilmiştir. Mağara ortamlarında tespit edilen fungus taksonlarının çoğu saprotroflardır; çoğunun karst yüzeyinde yaşadığı ve bozulan organik maddeleri kolonize ederek oligotrofik mağara funguslarının büyümesini engellediği bilinmektedir (Vanderwolf vd., 2013).



Şekil 2.12. Yarasalarda beyaz burun sendromu (Perry, 2013)

2.8.2.3. *Archaea* Çeşitliliği

Archaea üyelerinin mağaraların ekstrem yaşam koşullarına iyi adapte oldukları ve besin döngüsüne katkıda bulunarak besin girişinin düşük olduğu mağara ekosistemlerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu alanda, tanımlanmış mikroorganizmalar aerobik, fakültatif veya zorunlu anaerobik, kemolitotrofik, kemoheterotrofik, asidofilik, termofilik veya halofilik olabilir. Bu organizmaların çoğu kükürtü metabolize edebilmektedir. *Archaea* 'lar ayrıca aerobik amonyak oksidasyonu ve anaerobik metan oksidasyonunu da gerçekleştirebilirler. Bu özellikler nedeniyle, *Archaea* 'lar küresel karbon ve azot döngülerinde önemli rol oynamaktadır (Cavicchioli, 2011) Mağara sistemlerinde *Archaea* oluşumu hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Genellikle tanımlanan arkeal türlerin Crenarchaeota ve Euryarchaeota' ya ait olduğu bilinmektedir. Her iki tipte

16S rRNA dizilerinin kaydedildiği çalışmalar da mevcuttur. Frassasi mağara sistemine ait düşük pH'lı (pH 0-1; Grotta del Fiume) başka bir mağarada, bir grup *Archaea* mikroorganizması tanımlanmış ve tanımlanan mikroorganizmaların %40' ını oluşturduğu belirlenmiştir (Macalady vd., 2007). Bu mağarada hiçbir *Crenarchaeota* temsilcisi tespit edilmemiştir ve popülasyona esas olarak azaltılmış sülfür bileşiklerini oksitleyebilen *Ferroplasma* cinsinin hakim olduğu bildirilmiştir (Okibe vd., 2003). Altamira Mağarası'nda ise yeni bir psikrofilik *Crenarchaeota* mikroorganizması dalı tanımlanmıştır. Bu mağaranın duvarlarını örten sarı, gri ve beyaz kolonilerin metabolik bileşenleridir (Gonzalez-Pimentel vd., 2022). Bu mikroorganizmaların ortamdaki rolü belirsizliğini korumaktadır. Mezofilik *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*' ya ait türler ise, Lechuguilla Mağarasında tanımlanmıştır (Schleper vd., 2005). Çeşitli mağaralardan izole edilen *Archea* taksonları Çizelge 2.7' de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Çeşitli mağaralardan izole edilen *Archea* taksonları

Suşlar	Mağara	Lokasyon	Kaynaklar
<i>Nitrososphaerales</i> sp. <i>Methanobacterium</i> sp. <i>Methanolinea</i> sp.	Alpler Buzul Mağaraları	Avusturya	Itcus vd., 2018
<i>Nitrososphaeraceae</i> (58.5-68.8 %) <i>Candidatus</i> sp. <i>Nitrososphaera</i> sp. <i>Cenarchaeum</i> sp. <i>Thermococcus</i> sp. <i>Thermoplasma</i> sp. <i>Thermogymnomonas</i> sp.	Dupnisa Mağarası	Kırklareli, Türkiye	Güngör, 2020
<i>Halobacteria</i> (77%) <i>Methanomicrobia</i> (16%)	Çal Mağarası	Trabzon, Türkiye	Demirci ve Ordu, 2020
<i>Thaumarchaeota</i>	Wind Cave Ulusal Parkı	ABD	Geerdes, 2021
<i>Thermoplasmata</i> (<i>Euryarchaeota</i>) <i>Nitrosopumilaceae</i> (<i>Thaumarchaeota</i>) <i>Aenigmarchaeales</i> (<i>Nanoarchaeaeota</i>)	Heshang Mağarası	Hubei, Çin	Cheng vd., 2023
<i>Nitrososphaera</i> sp. <i>Nitrosopumilus</i> sp. <i>Methanomassiliicoccus</i> sp. <i>Acidianus</i> sp. <i>Ignicoccus</i> sp. <i>Termocladium</i> sp. <i>Methanothermobacter</i> sp. <i>Methanobacterium</i> sp. <i>Methanosphaera</i> sp. <i>Thermococcus</i> sp.	İtalya Karst Mağaraları (Bossea, Caudano Pertosa-Auletta, Vento, Costacalda)	İtalya	Biagoli vd., 2023
<i>Ferroplasma</i> , <i>Cuniculiplasma</i> (<i>Thermoplasmatales</i>)	Villa Luz Mağarası, Luna Azufre Mağarası Grotte del Fiume Mağarası, Grotta Nuova di Rio Garrafo Mağarası	Meksika İtalya	Jones vd., 2023

<i>Thermoplasmatota</i> (60 %) <i>Halobacterota</i> (<i>Methanomicrobiales</i> , <i>Methanosaeta</i> , <i>Methanolobus</i> , <i>Methanosarcina</i>)	Pindal Mağarası	Kuzey İspanya	Martin- Pozas, 2024
---	-----------------	------------------	------------------------

2.9. Mağara Mikroorganizmalarının Biyoteknolojik Açıdan Önemi

2.9.1. Mağara Mikroorganizmalarının Sekonder Metabolit Üretimi

Potansiyel uygulamalara sahip olabilecek mağara mikroorganizmalarının gösterdiği tüm özellikler arasında, tıpta sekonder metabolitlerin kullanımı dikkat çekmektedir (Ghosh vd., 2017). Mağaralar gibi ekstrem, oligotrofik ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar tarafından antimikrobiyal özelliklere sahip sekonder metabolitlerin üretilmesi, özellikle mağaranın en derin kısımlarında kaynaklar için rekabetin güçlü olmasından kaynaklanmaktadır (Ghosh vd., 2017; Maciejewska vd., 2016).

Mağara mikrobiyomları üzerinde yapılan çalışmalar, *Streptomyces* cinsi de dahil olmak üzere *Actinobacteria*'nın mağaralarda yaygın olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bakteriler, sekonder metabolitler olarak çeşitli antibakteriyel ve antifungal bileşiklerin üretimi ile bilinmektedir (Jakubec-Krzesniak vd., 2018; Selim vd., 2021). Antik çağlardan beri iyileştirici ve antibakteriyel özelliklerle ilişkilendirildiği için geleneksel tıpta popüler olan moon milk yapılarında *Streptomyces*'in yaygın olduğu gösterilmiştir (Quinn vd., 2020). Son yirmi yılda, antibakteriyel ve antifungal özellikler gösteren *Streptomyces*, Belçika (Maciejewska vd., 2016), Polonya (Jaroszewicz vd., 2021), Sırbistan (Stankovic vd., 2012), Çin (Jiang vd., 2015), Hindistan (Rajput vd., 2012), Türkiye (Yücel ve Yamaç, 2010) ve Kanada dahil olmak üzere dünyanın her yerindeki mağaralardan moon milk yapılarından, toprak ve su örneklerinden izole edilmiştir (Axenov-Gibanov vd., 2016). *Streptomyces* dışındaki aktinobakterilerin *de Basillus spp.*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal potansiyeli olan metabolitler ürettiği bildirilmiştir (Lee vd., 2000; Nakaew vd., 2009). Ayrıca, antimikrobiyal bileşiklerin üretiminin *Actinobacteria* ile sınırlı olmadığı ortaya bilinmektedir. Avrupa'daki mağaralardan alınan örnekler üzerinde yapılan araştırmalar, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Cyanobacteria* üyelerinin *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas oryzae*, VRE (Vancomisine Dirençli Enterekok) ve MRSA (Metisilin Dirençli *S. aureus*) suşları gibi bakterilerin büyümesini de engellediğini göstermiştir (Lamprinou vd., 2015).

2010' da Yamaç tarafından yapılan çalışmada Türkiye'deki 19 karstik mağaranın taş duvar ve speleothem yüzeylerinden ve toprak örneklerinden aktinomiset izole

edilmiştir. İzole edilen 290 izolattan 180 izolatin (%62), tarama sonucuna göre dört bakteri, iki maya ve dört filamentli fungustan oluşan indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir (Yamaç vd., 2010).

Dünyanın en derin mağarası olan Krubera-Voronja Mağarası'ndan bakteri izolasyonu yapılarak çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Toplam 874 heterotrofik kültür, Krubera-Voronja Mağarasında 220 m ile 1640 m derinlikte toplanan su ve tortu örneklerinden izole edilmiştir. Tüm izolatların %14.0'ı Gram-pozitif ve Gram-negatif test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Klusaite vd., 2016)

Krubera-Voronja Mağarasında yapılan bir başka çalışmada ise izole edilen mikroorganizmalarda çeşitli biyoaktif bileşikleri kodlayan biyosentetik genlerin ekspresyonu incelenmiştir. Toplamda, mağaradan izole edilen 91 bakteri suşu, poliketid sentaz ve ribozomal olmayan peptid sentetaz genlerinin varlığı açısından taranmıştır. PCR bazlı tarama sonucunda, suşların çoğunun en az bir biyosentetik gen içerdiği bildirilmiştir (Bukelskis vd., 2019).

2019' da İran' ın kuzeybatısında yer alan Hampoeil mağarasının aktinobakteriyel çeşitliliği ve biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. İzolatların 10 bakteri ve fungusa karşı antimikrobiyal aktivite için taranması, 5 hidrolitik enzim üretimi ve 5 ağır metale karşı direnci araştırılmıştır. 33 farklı örnek arasından *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Micrococcus*, *Kocuria* ve *Corynebacterium* dahil olmak üzere çeşitli cinslerden 76 aktinobakteri izole edilmiştir. Suşların yüzde sekseninin incelenen hidrolitik enzim aktivitesinden birine sahip olduğu, %25,3'ünde en az bir tip antimikrobiyal aktivite olduğu görülmüştür. Hampoeil mağarasının, hidrolitik enzimler ve biyolojik ıslah üretiminde etkili olan mağarada yaşayan aktinobakterilerin çeşitliliği açısından iyi bir kaynak olduğu sonucuna varılmıştır (Hamedi vd., 2019)

2.9.2. Mağara Mikroorganizmalarının Biyoaktif Bileşenleri

Mağaralardan izole edilen aktinobakterilerden biyoaktif metabolitler saflaştırılmış, yapıları son yıllarda açıklanmış ve rapor edilmiştir (Çizelge 2.8). Bu bileşikler çoğunlukla anti-bakteriyel ve / veya anti-kanser aktiviteler sergilemiştir. En verimli üretici suşların *Streptomyces* cinsinin üyeleri olduğu bildirilmiştir.

Servimisin A, B, C ve D, İtalya'daki Grotta dei Cervi'de bulunan eski bir mağarada bir kaya duvarından izole edilen *Streptomyces tendae* suşu HKI 0179'dan üretilmiştir. Servimisin A ve B, yeni poliketid glikozitlerdir. Bununla birlikte, servimisin C ve D

bilinen A2121-3 ve A2121-2 bileşikleri ile aynı yapıya sahiptir. Dört bileşiğin tümü, agar difüzyon deneylerinde standart test türlerine karşı kayda değer ölçüde güçlü antimikrobiyal etkiler göstermiştir. Servimisin A-D, Gram pozitif bakterilere (*B. subtilis* ve *S. aureus*) ve çoklu ilaca dirençli *S. aureus*' a (MRSA), vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis*' e karşı oldukça aktif olduğu bildirilmiştir (Herold vd., 2005)

Xiakemycin A, *Streptomyces* spp. tarafından üretilen yeni bir piranonaftokinon (PNQ) antibiyotiktir. Çin'de karstik mağara topraklarından izole edilen *Streptomyces* sp. CC8-201 suşundan elde edilen Xiakemisin A, Gram pozitif bakterilere (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* ve *E. faecium*) karşı güçlü inhibitör aktiviteler ve çok sayıda kanser hücre hattına (insan akciğer kanseri A549 hücreleri, meme kanseri MCF-7 hücreleri, hepatom) , HepG-2 hücresi, serviks kanseri HeLa hücreleri, kolon karsinomu HCT-116 hücre p53 wt hücreleri, nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri ve insan prostat kanseri PC-3)' ne karşı sitotoksik etki göstermiştir (Jiang vd., 2015).

Hipogeamisin A, B, C ve D, ABD'deki Hardin mağara sisteminden izole edilen *Nonomuraea* sp. tarafından üretilmiştir. Hipogeamisin A, kolon kanseri hücre hattı TCT-1'e sitotoksiste gösterirken hipogeamisin B-D, TCT-1'e sitotoksiste olmaksızın *B. subtilis*'e karşı aktiftir. Bununla birlikte, hipogeamisin B-D, *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal aktivite açısından eritromisin ve gentamisin kadar güçlü değildir (Derewacz vd., 2014).

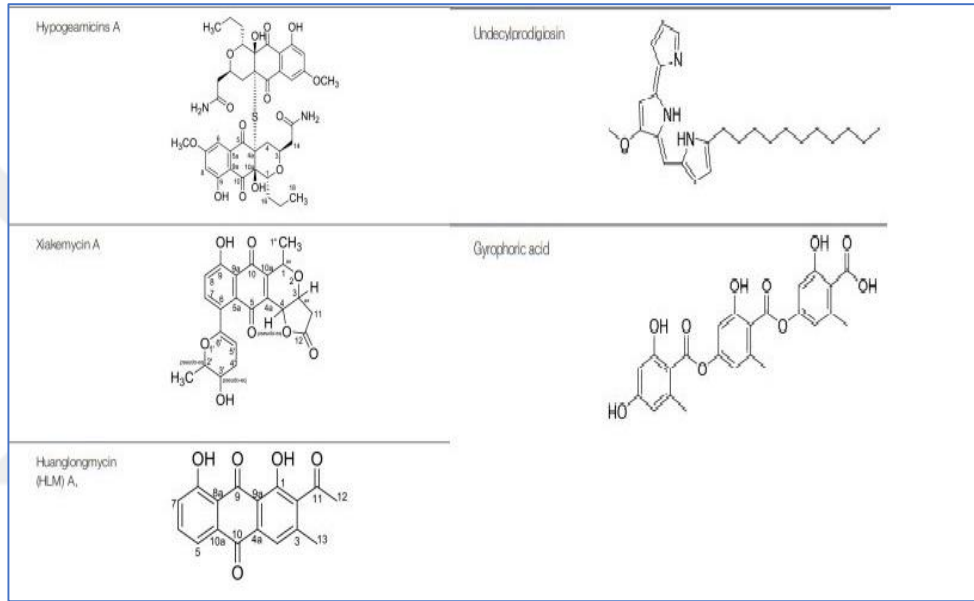
Huanglongmisin A, B ve C, *Streptomyces* sp. CB09001, Çin, Xiangxi' den karstik mağara topraklarından izole edilmiştir. Huanglongmisin A, Gram negatif bakterilere karşı zayıf (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*) ve A549 akciğer kanseri hücre hattına karşı ılımlı sitotoksiste göstermiştir. Huanglongmisin B, *S. aureus* ve çoklu ilaca dirençli *S. aureus*' a (MRSA) karşı zayıf antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Huanglongmisin C için antibakteriyel ve antikanser aktivite kaydedilmemiştir (Jiang vd., 2018).

Undecylprodigiosin, *Streptomyces* sp. JS520 Miroc, Sırbistan mağara tortularından izole edilmiştir. Undecylprodigiosin, *Micrococcus luteus*, *B. subtilis* ve *C. albicans*' a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip koyu kırmızı bir pigmenttir. Ayrıca, antioksidatif ve UV koruyucu özellikler göstermiştir (Stankovic vd., 2012).

Çizelge 2.8. Çeşitli mağaralardan izole edilen suşların biyoaktiviteleri ve tanımlanan biyoaktif bileşenler

Biyoaktivite	Bileşenler	Üretici Suş	Suşun Kaynağı	Referanslar
Antioksidatif	Undecylprodigiosin	<i>Streptomyces</i> sp. JS520	Miroc dağı mağaraları, Serbia	Stankovic vd., 2012
Lipid metabolizmasına karşı inhibe edici aktivite	Gyrophoric acid	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2014/II/78-8	Bolshaya Oreshnaya Mağarası Mansk Bölgesi Krasnoyaesk, Siberia, Russia	Axenov-Gibanov vd., 2016 Tomoda ve Omura, 2001
Antimikrobiyal	Cervimycin A, B, C ve D	<i>Streptomyces tendae</i> strain HKI 0179	The Grotta dei Cervi, Mağarası, Italya Taş duvarlardan	Herold vd., 2005
	Undecylprodigiosin	<i>Streptomyces</i> sp. JS520	Miroc Dağı Mağaraları, Serbia	Stankovic vd., 2012
	Xiakemycin A	<i>Streptomyces</i> sp. CC8-201	Karst mağara toprakları, Chongqing city, Çin	Jiang vd., 2015
	Chaxalactin B	<i>Streptomyces</i> sp. IB 2014/II/78-8	Bolshaya Oreshnaya cave in the Mansk area of the Krasnoyaesk, Siberia, Russia	Axenov-Gibanov vd., 2016
	Huanglongmycin A-C	<i>Streptomyces</i> sp. CB09001	Karstik Mağara Xiangxi, China	Jiang vd., 2018
	Diketopiperazin alkaloidleri	<i>Streptomyces</i> sp. ICC1 ve ICC4	Iron Curtain Mağarası, Kanada	Gosse vd., 2021
	Dichloroanthrabenzoxocinone türevleri	<i>Streptomyces</i> sp.	Szczelina Chochołowska Mağarası, Tatra Dağları, Polonya	Jaroszewicz vd., 2021
	Huanglongmycin D- F	<i>Streptomyces</i> sp. CB09001	Karstik Mağara Xiangxi, China	Jiang vd., 2022
	Lunaemycin A	<i>Streptomyces lunaelactis</i>	Grotte des collemboles, moonmilk yapıları, Belçika	Martinet vd., 2023
	Sulfurasperines A-D, 4-methoxy-7-methylbenzo[d]thiazole-5,6-diol, 2-hydroxymethyl-4-methoxy-7 methylbenzo[d]thiazole-A	<i>Aspergillus fumigatus</i> GZWMJZ-152	Guizhou Karst alanları, Çin	Liu vd., 2024

Antikanser	Hypogeamicins A	Nonomuraea specus	Hardin's mağara sistemleri Ashland City, Tennessee	Derewacz vd., 2014
	Xiakemycin A	<i>Streptomyces</i> sp. CC8-201	Karst mağara toprakları Xiangxi, Çin	Jiang vd., 2018
	Dichloroanthrabenzoquinone türevleri	<i>Streptomyces</i> sp.	Szczelina Chochłowska Mağarası, Tatra Dağları, Polonya	Jaroszewicz vd., 2021



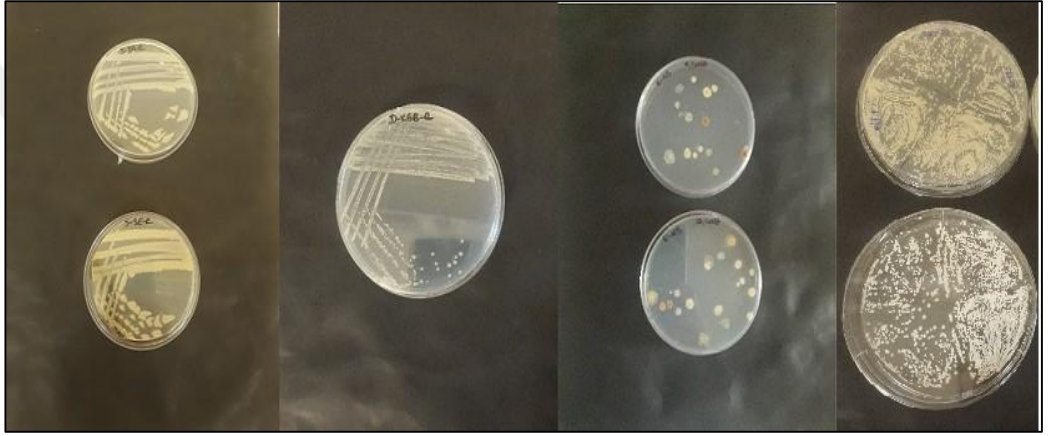
Şekil 2.13. Çeşitli mağaralardan izole edilen biyoaktif bileşenlerin molekül yapıları
(Rangseekaew ve Pathom-Aree, 2019)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan İzolatlar

Çalışmanın biyolojik materyalini önceki çalışmalarımızda mağaralardan izole edilen 350 saf mikroorganizma kültürü oluşturmaktadır (Şekil 3.1). İzolatlar Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde -80 °C'de %40 gliserol içeren %10 oranında seyreltilmiş Nutrient Agar besiyerinde muhafaza edilmektedir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bazı mikroorganizma kültürleri

3.1.2. Test Mikroorganizmaları

Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan test mikroorganizmaları ve temin edildiği kaynaklar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivitenin taranmasında kullanılan test mikroorganizmaları ve suş kaynağı

TEST MİKROORGANİZMALARI	SUŞ KAYNAĞI
<i>Listeria monocytogenes</i> RSSK 02028	T.C Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, BİLTEKMER
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	T.C Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, BİLTEKMER
<i>E. coli</i> ATCC351150	T.C Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, BİLTEKMER
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	T.C Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, BİLTEKMER
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	Amerikan Kültür Koleksiyon Merkezi
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 363	ARS Kültür Koleksiyon Merkezi

<i>Penicillium sp.</i> NS 26	T.C. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu -Çevresel İzolat
------------------------------	---

3.1.3. Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan besiyerleri içeriği steril saf suda çözülerek ve pH ayarlaması yapılarak otoklavda 1,1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.3.1. İzolatların kültüre edilmesinde kullanılan sarf malzemeler

Nutrient Agar

Ticari besiyerinden 20 g/L oranında Nutrient agar ve 15 g/L Agar- agar tartılarak distile su ilave edilmiştir. Bu besiyeri stok bakteri kültürlerinin ve indikatör bakteri kültürlerinin aktifleştirilmesinde, antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesinde kullanılmıştır. Nutrient agar besiyeri stok bakteri kültürlerinin geliştirilmesinde 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Bakteri kültürlerinin aktifleştirilmesi için 1X, 0,1X ve 0,5X oranlarında kullanılmıştır.

Nutrient agar besiyeri içeriği (MERCK g/ L):

Et peptonu	5,0 g/L
Et ekstraktı	3,0 g/L
Agar-agar	12,0 g/L

Nutrient Broth

İzolatların aktifleştirilmesi ve kültür büyüme parametrelerinin optimizasyonu çalışmalarında 0,1X, 0, 5X ve 1X Nutrient Broth sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Nutrient broth besiyeri içeriği (MERCK g/ L):

Et peptonu	5,0 g/L
Et ekstraktı	3,0 g/L
Deionize su	1000 ml.

R2A Agar

İzolatların aktifleştirilmesinde R2A agar besiyeri kullanılmıştır.

R2A Broth besiyeri içeriği (Biolife g/ L):

Maya ekstraktı	0,5
Proteoz pepton	0,5
Kazein	0,5
Glikoz	0,5

Çözünür nişasta	0,5
Dipotasyum fosfat	0,3
Magnezyum sülfat	0,024
Sodyum piruvat	0,3
Agar agar	14

M9 Agar

İzolatların aktifleştirilmesi için M9 besiyeri kullanılmıştır. M9 besiyeri içeriği (1 L):

M9 Tuzları

Na ₂ HPO ₄	12,8 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
DeiYonize su	478 ml

Agar solüsyonu

Agar agar	15,0 g
Deiyonize su	500 ml

%20 Glukoz Solüsyonu

Glukoz	4,0 g
Deionize su	20 ml

M9 tuzları, agar solüsyonu ve %20 glukoz solüsyonu ayrı ayrı 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildikten sonra karıştırılarak steril petri kutularına dökülerek kullanılmıştır.

Tryptone Soya Broth Besiyeri

Kültür büyüme parametrelerinin optimizasyonu çalışmalarında 1X ve 0,1 X oranında Tryptone soya broth besiyeri kullanılmıştır.

Tryptone Soya Broth Besiyeri İçeriği (OXOID g/ L):

Kazein	17,000 g/L
Soya peptonu	3,000 g/L
Sodyum klorid	5,000 g/L
Dekstroz	2,500 g/L
Dibazik potasyum fosfat	2,500 g/L

Final pH (25°C) 7.3±0.2

Maya Ekstraktı Sükroz Agar (YESA)

Maya ve küf test mikroorganizmalarının aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Maya ekstraktı	4,0 g
Sükroz	20,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0g
MgSO ₄	0,5g
Agar agar	15,0g
Deiyonize su	1,0 L

Mueller Hinton Agar

Antimikrobiyal aktivite tarama testlerinde kullanılmıştır.

Mueller Hinton besiyeri (OXOID) içeriği:

Dehydrated infusion from beef	300,0 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Starch	1,5 g.
Agar	17,0 g
pH 7.3 ± 0.1,25 °C	

3.1.3.2. Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Sarf Malzemeler

Proteaz Test Ortamı

Proteaz aktivitesi tayini için kullanılan besiyeri içeriği:

Nutrient Agar	20, 0 gr/L
Skim milk	10,0 gr/L
Jelatin	10,0 gr/L
Deionize su	1000 ml.

121 °C’de 15 dakikada otoklavda steril edilmiştir.

Amilaz Test Ortamı

Amilaz testi için %2 nişasta içeren Nutrient Agar ortamı kullanılmıştır. Ortamın içeriği:

Nutrient Agar	20,0 g/L
Agar agar	2,0 g/L
Çözünebilir nişasta	20,0 g/L
Deionize su	1000 ml.

121 °C’de 15 dakikada otoklavda steril edilmiştir.

Jelatinaz Test Ortamı

Jelatinaz testi için %10 jelatin içeren Nutrient Agar ortamı kullanılmıştır. Besiyeri içeriği:

Nutrient Agar	20,0 gr/L
Jelatin	10 gr/L
Deionize su	1000 ml.

121 °C’de 15 dakikada otoklavda steril edilmiştir.

Üreaz Test Ortamı

Üreaz testi için Christensen Base Agar kullanılmıştır.

1. Christensen Base Agar

Pepton	1g/L
NaCl	5 g/L
Glukoz	1 g/L
KH ₂ PO ₄	2 g/L
Fenol Red	0,012 g/L
Agar agar	15 g/L

Hazırlanan Cristensen Agar Base 121°C’de 15 dk. steril edilmiştir.

2. %40 üre hazırlanmıştır. Hazırlanan üre şırınga filtre ile steril edilmiştir.
3. Hazırlanan Cristensen Agar Base'e litresine 50 ml olacak şekilde steril %40'luk üre ilave edilmiştir.

Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Ortamı

İzolatların EPS üretiminin belirlenmesi için Congo Red Agar besiyeri kullanılmıştır. Congo Red Agar besiyeri kompozisyonu aşağıda verilmiştir.

Congo red boyası	0,8 g.
Sükroz	36 g.
BHIA	52 g.
Deionize Su	1000 ml

121 °C’de 15 dakikada otoklavda steril edilmiştir

3.1.3.3. İzolatların tanılamasında kullanılan sarf malzemeler

Kristal Viyoleto Solüsyonu

Kristal viyoleto solüsyonu içeriği (100 ml ;

Solüsyon A:

Kristal viyoleto (%90 boya içeren)	2 g
Etanol (%96 v/v)	20 ml

Solüsyon B:

Amonyum okzalat 0,8 g

Deiyonize su 80 ml

A ve B solüsyonları ayrı ayrı hazırlanıp karıştırılmıştır. Solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekledikten sonra filtre edilerek kullanılmıştır (Harley ve Prescott 2002).

Gram İyodür Solüsyonu

Gram iyodür solüsyonu içeriği (300 ml):

Potasyum iyodür 2g

İyot 1 g

Potasyum iyodür ve iyot havan içerisinde ezilmiş ve üzerine su ilave edilerek 300 ml ye tamamlanmıştır. Solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekledikten sonra filtre edilerek kullanılmıştır.

Safranin Solüsyonu

Safranin solüsyonunun içeriği (110 ml için);

Safranin O 0,25 g

Etanol (%95 v/v) 10 ml

Deiyonize su 100 ml

Safranin O %95 etanol içerisinde çözülmüş ve üzerine steril saf su eklenmiştir. Solüsyon 24 saat oda sıcaklığında bekledikten sonra filtre edilerek kullanılmıştır (Harley ve Prescott, 2002).

Malaşit Yeşili Solüsyonu

Malaşit yeşili solüsyonunun içeriği (100 ml için)

Malaşit yeşili 5 g.

Deiyonize su 100 ml

5 g boya tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözündürülmüştür.

3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar kullanım amaçları ile birlikte Çizelge 3. 2. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada Kullanılan Alet/Cihaz Türü ve Modeli	Kullanım Amacı
İnkübatör: NÜVE ES120	Mikroorganizmaların uygun besiyeri ve sıcaklıklarda geliştirilmesi
Otoklav: ALP	Çalışmada kullanılacak besiyeri, kimyasal çözeltiler ve

	deney ekipmanlarının sterilizasyonu
Faz Kontrast Işık Mikroskobu: Olympus CX41	İzolatların morfolojik özelliklerinin, Gram boyama ve spor oluşturma özelliklerinin belirlenmesi
Çalkalayıcı İnkübatör: IKA KS 4000	İzolatların sıvı besiyerinde geliştirilmesi
Santrifüj: BECKMAN COULTER Allegra X-22R	Kültür süpernatantlarının toplanması
Uv/Görünür Alan Mikroplaka Spektrofotometre: BioTek, Epoch	Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların optimum büyüme koşullarının belirlenmesinde ve genomik DNA izolasyonunda absorbans değerlerinin ölçümü
Thermal Cycler: Long Gene A300 Fast Thermal Cycler	Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların filogenetik tanılması için PCR yöntemi
Elektroforez Sistemi: Thermo EC 300 XL	Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların filogenetik tanılması için agaroz jel elektroforezi
Jel Görüntüleme: Vilber Lourmat Tansilluminatör	Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların filogenetik tanılması için agaroz jel elektroforezi
PH Ölçme Cihazı: Mettler Toledo S220	Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların optimum büyüme koşullarının belirlenmesinde besiyeri pH ölçümünde
McFarland Densitometre: BIOSAN DEN-1B	Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında test organizmalarının turbiditesinin belirlenmesinde
Soğutmalı santrifüj: BECKMAN-COULTER Allegra X-30R Centrifuge	Kültür sıvılarının toplanması
Shimadzu Prominence HPLC Cihazı	Antimikrobiyal maddenin karakterizasyonu
Agilent G6550A TOF/Q-TOF Mass Spectrometer	Antimikrobiyal maddenin karakterizasyonu

3.2. Yöntem

3.2.1. Antimikrobiyal Madde Üretici İzolatların Seçilmesi

Çalışma önceki çalışmalarımızdan izole edilen 350 mikroorganizma kültürü arasından Gram pozitif bakteri izolatları ile yürütülmüştür. Antimikrobiyal madde üretici mikroorganizmaların çoğunluğunu Gram pozitif bakterilerin oluşturması nedeniyle Gram boyama yöntemi kullanılarak Gram pozitif bakteri izolatları belirlenmiştir. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde -80 °C 'de %40 gliserol içeren %10 oranında seyreltilmiş Nutrient Agar besiyerinde muhafaza edilen izolatlar 0,1X Nutrient agar, R2A ve M9 agarda aktifleştirilmiştir. Çalışmada Gram pozitif olarak belirlenen izolatlar antimikrobiyal tarama testleri için seçilmiştir.

3.2.1.1. Gram Boyama Yöntemi

Gram boyama yönteminde uygulanan prosedürün basamakları aşağıda verilmiştir:

- Genç (24 saatlikten az) kültürlerden lam üzerinde, distile su ile yayılarak, preparat hazırlanmıştır.
- Hazırlanan preparatlar, havada kurutularak, ateşte fikse edildikten sonra Gram'ın kristal viyole boyası ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Havada

kurutulduktan sonra, iyot çözeltisi ile 1 dakika muamele edilen preparatlar, distile su ile yıkanıp, tekrar havada kurutulmuştur.

- Daha sonra alkol ile renk giderilmiş ve preparatlar en son Gram'ın safranin boyası ile 30 saniye boyanmıştır.
- Distile su ile yıkandıktan sonra havada kurutulan preparatlar mikroskopta 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir (Bisen, 2014).

3.2.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Kültür Sıvılarının Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan Gram pozitif bakteri izolatları aktiveleştirildikten sonra 100 ml'lik erlenlerde hazırlanmış 25'er ml 0,1X Nutrient broth, 0,5X Nutrient broth ve Nutrient broth besiyerlerine inoküle edilmiştir (Şekil 3.2). Çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm' de 35 °C 'de inkübe edilmiştir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda sıvı kültürlerden 2' şer ml alınarak eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorflara alınan sıvı kültürlerin 600 nm 'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Negatif kontrol olarak 0,5X Nutrient broth steril besiyeri kullanılmıştır. Ölçüm değerlerinin en yüksek olduğu saatlere ait kültür sıvıları antimikrobiyal etkinin taranması için seçilmiştir. Kültür sıvıları 8000 g de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenerek hücresiz süpernatantlar (CFS) steril eppendorf tüplere aktarılmıştır (Başbül, 2009).

Antimikrobiyal madde üretici izolatların seçilmesi çalışmalarında 1X Nutrient agar, R2A ve M9 agarda aktiveleştirilen izolatlardan morfolojik olarak aktinomisetlerin karakteristik özelliklerini gösteren ve 0,1X Nutrient broth, 0,5X Nutrient broth ve Nutrient broth ortamlarında tanecikli yapıda olan izolatlar için spektrofotometrik ölçüm yapılmamış, sıvı besiyerlerinde 7 gün geliştirildikten sonra kültür sıvıları 8000 g de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenerek hücresiz süpernatantlar (CFS) steril eppendorf tüplere aktarılmıştır (Klusaite vd., 2016).

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Disk Difüzyon Yöntemi ile Taranması

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin taramasında agar disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. İzolatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan test mikroorganizmaları, gelişmesi için kullanılan besiyerleri ve sıcaklık değerleri Çizelge 3.4’ te verilmiştir.

Çizelge 3.3. İzolatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan test mikroorganizmaları, gelişmesi için kullanılan besiyerleri ve sıcaklık

SUŞ	BESİYERİ	SICAKLIK
<i>Listeria monocytogenes</i> RSSK 02028	Nutrient agar	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Nutrient agar	37 °C
<i>E. coli</i> ATCC351150	Nutrient agar	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ARCC 15442	Nutrient agar	37 °C
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	YES agar	30 °C
<i>Aspergillus niger</i>	YES agar	25 °C
<i>Penicillium sp.</i> NS 26	YES agar	25 °C

Listeria monocytogenes RSSK 02028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC351150, *Pseudomonas aeruginosa* ARCC 15442 ve *Candida albicans* ATCC 10239 test organizmaları Çizelge 3.3’ te verilen aktifleştirilmiş taze kültürlerden Mac Farland 0,5 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. *Aspergillus niger* ve *Penicillium sp.* NS 26 test organizmaları için 250 ml erlenlere YES agar yatık olarak hazırlanmıştır. 50 ml’lik erlenlere Tween 80 solüsyonları hazırlanmış ve steril edilmiştir. Thoma lamı kullanılarak spor sayımı yapılmış ve 10^6 spor/ ml olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Steril eküvyon kullanılarak süspansiyonlar MHA yüzeyine yayıldıktan sonra, diskler yüzeye arada boşluk kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir (Yücel, 2007). Disklere test edilecek supernatantlardan 50 µl emdirilmiştir. Çizelge 3.3’ te verilen sıcaklık ve uygun sürede inkübe edildikten sonra zon çapları ölçülmüştür. İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan disk difüzyon testi şu basamaklardan oluşmaktadır:

Mueller-Hinton agar petrilerinin hazırlanması:

1. MHA besiyeri hazırlanıp otoklavlanarak oda sıcaklığına gelmesi beklenir ve 4 mm kalınlıkta olacak şekilde Petriler hazırlanır.
2. Agar yüzeyinde görünür sıvı varsa, plaka ters çevrilerek aşırı sıvının agardan akmasına izin vermek için kapağın üzerinde aralık yüzey bırakılarak buharlaşması sağlanır. Petriler, kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletilir

3. Her bir organizma için her MHA plakası uygun Şekilde etiketlenir.

İnokulumun hazırlanması:

1. Steril bir inokülasyon özesi veya iğne kullanarak test edilecek mikroorganizmanın dört veya beş izole kolonisinden alınır.
2. Mikroorganizma 2 ml steril salin içinde süspanse edilir.
3. Pürüzsüz bir süspansiyon oluşturmak için salin tüpü vortekslenir.
4. Süspansiyonun ağırlığı az ise daha fazla organizma ekleyerek veya süspansiyonun ağırlığı fazla ise steril salinle seyrelterek bu süspansiyonun turbiditesi 0,5 McFarland standardına ayarlanır.
5. Bu süspansiyon hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde kullanılır.

Aşı hazırlama:

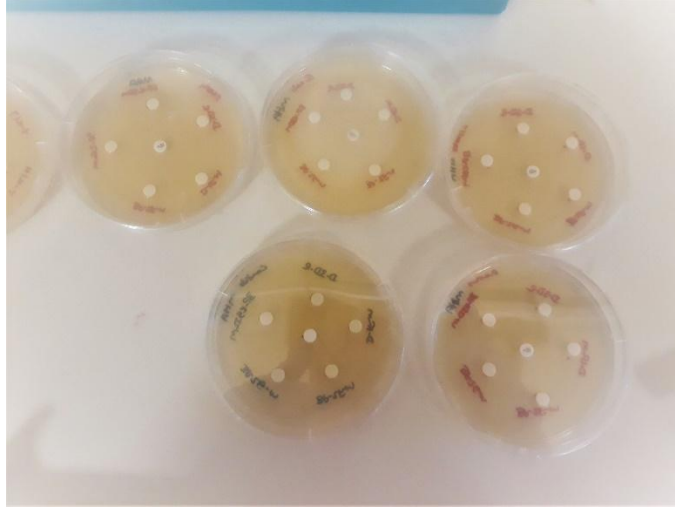
Sonuçların geçerli olabilmesi için test edilecek organizmalar büyümenin logaritmik üreme aşamasında olmalıdır. Test edilecek mikroorganizmalar 24-48 saat önce aktifleştirilir.

MHA plakasının aşılınması:

1. İnokulum tüpüne steril bir eküvyon batırılır.
2. Eküvyon tüpün kenarına doğru çevirilir.
3. Eküvyonu tüm agar yüzeyine üç kez sürerek MH agar plakasının kurutulmuş yüzeyi inoküle edilir; inokulumun eşit dağılımını sağlamak için plaka her seferinde yaklaşık 60° döndürülür.
4. Fazla sıvı swab ile toplanır.
5. Eküvyon uygun bir kaba atılır.
6. Kapağı hafifçe aralık bırakarak, plaka oda sıcaklığında en az 3 ila 5 dakika, en fazla 15 dakika bekletilir.

Bir sonraki adıma geçmeden önce agar plakasının yüzeyini kurutulur.

6 mm. çapında diskler her Petriye yaklaşık 5-6 disk olacak Şekilde aseptik koşullarda yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Süpernatantlardan 50 µl alınarak her diske emdirilmiştir. Tüm diskler yerleştirildikten sonra plakalar 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan zonlar cetvel yardımıyla milimetre cinsinden ölçülmüştür (Bauer vd., 1966).



Şekil 3.3. Disk difüzyon yöntemi

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Ekstrasellüler Enzim Aktiviteleri ve Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimlerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Katalaz testi

Katalaz Testi için 0,5X Nutrient Agar besiyerinde 24 saat aktifleştirilen izolatlarda bir öze ucu miktarı alınarak boş bir petri kutusuna aktarılmıştır. Örnek üzerine Pastör pipeti ile %3 H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılmıştır. Gaz çıkışı gözlemlenmesi katalaz testi için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Arda, 2000).

3.2.4.2. Proteaz testi

Proteaz testi için %1 skim milk ve %2 jelatin içeren Nutrient Agar besiyeri kullanılmıştır. Besiyerine spotlama tekniği ile ekim yapılmış ve izolatlar 35 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroorganizma kültürü etrafında oluşan şeffaf zon görünümü proteaz testi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Montville, 1983).

3.2.4.3. Amilaz testi

Amilaz testi için %2 nişasta içeren Nutrient Agar besiyeri kullanılmıştır. 0,5X Nutrient Agar besiyerinde aktifleştirilmiş saf kültürden hazırlanan besiyerine spotlama tekniği ile ekim yapılmış ve 35 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri plakaları üzerine Pastör pipeti ile yüzeyi kaplayacak miktarda İyodine Mordant Solüsyonu damlatılmış ve yaklaşık 1 dakika yayılarak bekletilmiştir. Üreyen

mikroorganizma kültürü etrafında oluşan parlak ve şeffaf zon görünümü amilaz testi için pozitif sonuç kabul edilmiştir (Cappucino ve Sherman, 2007).

3.3.4.4. Jelatinaz testi

Jelatinaz testi için %10 jelatin içeren Nutrient Agar besiyeri kullanılmıştır. 0,5X Nutrient Agar besiyerinde aktiveleştirilmiş saf kültür hazırlanan besiyerine inoküle edilmiş ve 35 °C 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 1 saat +4 °C 'de buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda tüplerde katılaşma olup olmadığı gözlemlenmiştir. Tüplerde katılaşma görülmesi jelatinaz testi için negatif, besiyerinde sıvı görünüm ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Cappucino ve Sherman, 2007).

3.2.4.5. Üreaz testi

Üreaz testi için Christensen's Urea Agar besiyeri kullanılmıştır. 0,5X Nutrient Agar besiyerinde aktiveleştirilmiş saf kültürlerden hazırlanan besiyerine öze ile ekim yapılmış ve 35 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda turuncu renkte olan besiyerinin kırmızıya döndüğü izolatlar için sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir (Christensen, 1946).

3.2.4.6. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

İzolatların EPS üretiminin belirlenmesi için Congo Red Agar besiyeri kullanılmıştır. 0,5X Nutrient Agar besiyerinde aktiveleştirilmiş saf kültürlerden hazırlanan besiyerine öze ile ekim yapılmış ve 35 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kahverengi – siyah renkte üreme görülen izolatlar için sonuç pozitif kabul edilmiştir.

3.2.5. Çoklu Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitenin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesinden sonra birden fazla test organizmasına karşı aktivite gösteren izolatlar belirlenmiştir. Bakteriyel ve fungal izolatlara karşı birlikte aktivite gösteren 3 izolat tanılama, kültür büyüme parametrelerinin optimizasyonu antimikrobiyal etki tarzının belirlenmesi ve antimikrobiyal bileşenlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması çalışmaları için seçilmiştir

3.2.6. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Tanılanması

3.2.6.1. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesi

İzolatların katı besiyerindeki kolonilerin şekli, pigmentasyonları, büyüklükleri, sıvı besiyerinde sedimentasyon ve bulanıklık özellikleri belirlenmiştir.

3.2.6.2. İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Gram Boyama Yöntemi

Gram Boyama yöntemi ve hücre morfolojisi özelliklerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar yöntem 3.2.1' de verilmiştir.

Endospor Boyama Yöntemi

Çoklu aktivite gösteren izolatların belirlenmesinden sonra hem Gram pozitif hem Gram negatif test organizmalarına ve hem bakteriyel hem de fungal test organizmalarına karşı aktif olduğu belirlenen 13 izolat için endospor boyama yapılmıştır.

Endospor boyama yönteminin basamakları aşağıda verilmiştir:

- İzolatların endospor oluşturup oluşturmadıklarını ve endosporların hücre içerisindeki pozisyonunu belirlemek amacıyla 0,5X Nutrient agar besiyerinde geliştirilen kültürler kullanılmıştır.
- Kolonilerden öze ile alınarak, lam üzerindeki suda yayıldıktan ve açık havada kurutulduktan sonra, alevden geçirilerek tespit edilmiştir.
- Daha sonra, sıcak su buharı üzerine alınan lam üzerine malaşit yeşili ilave edilip, 5 dakika beklenmiş ve distile su ile tekrar yıkanmıştır.
- Preparatlara safranin boyası ilave edilerek 30- 60 saniye beklenmiş ve sonra distile su ile yıkanmıştır.
- Açık havada kurutulan preparatlar, mikroskop altında 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. Pembe olarak boyanan kısımlar hücrenin vejetatif kısmı, yeşil renkli görünenler ise endosporlar olarak belirlenmiştir. (Tamer vd., 1984).

3.2.6.3. İzolatların Filogenetik Özelliklerinin Belirlenmesi

a. Genomik DNA İzolasyonu

Endospor boyama yapılan 13 izolat için bakteriyel DNA izolasyon (Magen HiPure) kiti kullanılarak, üretici firma talimatına göre gerçekleştirmiştir. DNA izolasyonu protokolü:

1. Bakteriyel sıvı kültürden 1 ml alınarak eppendorf tüplerine transfer edilir.
2. 250 µl buffer P1 ve 20 mikrolitre lizozim eklenir. Vortekslenir ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilir.

3. 20 µl buffer SDS ve 20 mikrolitre proteinaz K eklenir. İyice karıştırılır ve 65 °C’de 30 dk inkübe edilir.
4. 12.000 g’de 3 dk. santrifüj edilir. Süpernatanttan 250 µl yeni ependorf tüpe aktarılır.
5. Örneklere 250 µl Buffer DL ve 250 mikrolitre etanol (%96-100) eklenir, vortekslenir.
6. Hi Pure DNA mini kolon, 2 ml koleksiyon tüpü içine konulur.
7. 6. adımdaki karışım kolona uygulanır. Kapak kapatılır ve 10.000 g’de 1 dk santrifüjlenir.
8. Sıvı kısım atılır ve koleksiyon tüpleri yeniden kullanılır. 650 µl Buffer GW2 eklenir. Kapak kapatılır ve 10.000 g’ de 1 dk santrifüjlenir.
9. Sıvı kısım atılır ve ependorf tüpü yeniden kullanılır. 10.000 g’de 1 dk santrifüjlenir.
10. Kolon steril ependorf tüplere yerleştirilir ve filtrat içeren toplama tüpü atılır.
11. Kolon steril ependorf tüpe yerleştirilir ve filtrat içeren toplama tüpü atılır. 50-200 mikrolitre Buffer AE ya da dh₂O eklenir. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir ve 10.000 g ‘de 1 dk santrifüjlenir.

DNA miktarı ve saflığı spektrofotometre cihazında A₂₆₀, A₂₈₀ ve A₂₆₀/A₂₈₀ oranına bakılarak ölçülmüştür.

a. 16S rRNA geninin PCR yardımı ile çoğaltılması

Kullanılan primerler:

16S (Bacterial ve Archaeal universal primerler)

8F (forward 5’- AGA GTT GAT CCT GGC TCA G -3’)

1492R (reverse 5’- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3’)

Reaksiyon bileşenleri (50 µl için) :

DNA - 5 µL

10X Buffer- 5 µL

dNTP karışımı (2 µM her biri)- 5 µL

MgCl₂ (25 mM)- 3 µL

Forward Primer (10 µM)- 1 µL

Reverse Primer (10 µM) – 1µL

Taq DNA polimeraz (5 U/ µL)- 0,3µL

PZR koşulları:

94 °C 5 dk

94 °C	1 dk	}	x 35
56 °C	1 dk		
72 °C	1 dk		
72 °C	10 dk		

PZR sonrasında, elde edilen ürünlerin bant büyüklüklerinin görülmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. %1,2 oranında agaroz içeren jel 1xTAE (Tris acetate-EDTA) buffer ile hazırlanmıştır. Jel içerisine 10 µl Gel Red solüsyonu eklenmiştir. PZR ürününden 5 µl alınarak 2µl 6x yükleme boyası ile karıştırılmış ve agaroz içeren jelde yürütülmüştür. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacı ile 1 kb DNA Marker'dan yararlanılmıştır. Elektroforez sonrasında jel görüntüleme sistemi ile incelenmiştir.

b. DNA Dizi Analizi

Tanımlama ve sonraki çalışmalar için seçilen 4 izolatın 16S rRNA gen bölgesi için PZR amplifikasyonu gerçekleştirilerek elde edilen PZR ürünlerinden çift yönlü dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi BM Labosis firması tarafından yapılmıştır. Sonraki dönemde dizi analizi sonuçları “ApE” ve “Finch TV” programları kullanılarak düzenlenmiş ve NCBI üzerinden Blast edilerek GenBank veri tabanları ile karşılaştırılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır.

3.2.7. Antimikrobiyal Bileşiklerin Üretimi İçin Kültür Büyüme Parametrelerinin Optimizasyonu

Yüksek verim ve miktarda antimikrobiyal bileşik izolasyonu için seçilen 4 izolat için optimum büyüme koşulları spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Sıcaklık, pH, NaCl, besiyeri için optimum antimikrobiyal madde üretim koşulları belirlenmiştir.

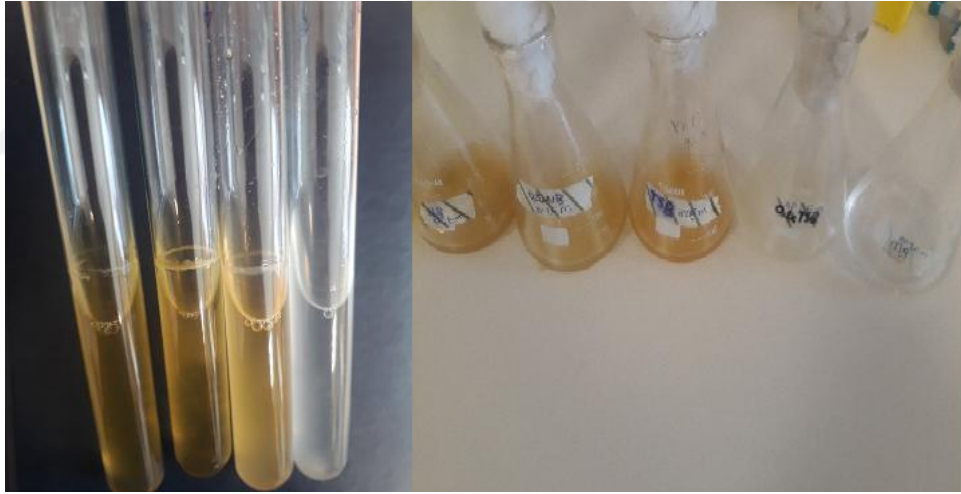
Uygun sıcaklıkların belirlenmesi için izolatlar aktive edilerek daha önce geliştirildiği besiyerlerine (0,1X Nutrient broth ve 0,5X Nutrient broth) %1 oranında aşılanmıştır (Şekil 3.4). Tüm izolatlar 30 ve 35 °C sıcaklıkta çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Çalışılan kültürlerden periyodik olarak (4 saatte bir) örnek alınarak 600 nm’de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre büyüme eğrisi oluşturulmuştur.

İzolatların optimum antimikrobiyal aktivite sergilediği besiyerlerinin belirlenmesi için 0,1X Nutrient broth, 0,5X Nutrient broth, Nutrient broth, TSB ve 0,1X TSB besiyerleri kullanılmıştır. Tüm izolatlar önceki aşamada belirlenen optimum sıcaklıkta çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. BP-2G-M ve BP-K9D-M izolatları 30 °C, BP-2F-M izolatı 35 °C’ de durağan faza kadar inkübe edilmiştir. Çalışılan kültürlerden periyodik

olarak (4 saatte bir) örnek alınarak 600 nm’de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur.

Antimikrobiyal bileşiklerin üretimi için uygun besiyerlerinin belirlenmesinden sonra belirlenen besiyerleri pH 5, 7 ve 9 olacak Şekilde hazırlanmıştır. İzolatlar farklı pH değerlerindeki besiyerinde ve önceki aşamalarda belirlenen optimum sıcaklıkta BP-2G-M ve BP-K9D-M izolatları 30 °C, BP-2F-M izolatı 35 °C’de inkübe edilmiştir. Kültürlerden periyodik olarak (4 saatte bir) örnek alınarak 600 nm’de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur.

Farklı üretim koşulları ile gerçekleştirilen denemelerde logaritmik fazın başından itibaren alınan örnekler saklanarak sonraki antimikrobiyal madde tayinleri çalışmalarında kullanılmadan önce eşit hacimde disklere emdirilmiştir. Etkili oldukları test organizmaları ile disk difüzyon testi yapılmış, en yüksek zon çapına sahip olduğu üretim koşulu ve zaman belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon zonunun ölçüldüğü üretim koşulları antimikrobiyal madde üretim koşulları olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.4. İzolatların farklı üretim koşullarında gelişimi

3.2.8. Antimikrobiyal Bileşiklerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

3.2.8.1. Kültür Sıvılarının Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan bakteri izolatları 0,5X Nutrient agar ortamında aktifleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda her bir izolatın optimum aktivite gösterdiği besiyerleri belirlenen optimum pH’a ayarlanarak hazırlanmıştır. BP-2F-M izolatı için 0,1X TSB hazırlanmış ve pH 9 olarak ayarlanmıştır. BP-2G-M izolatı için Nutrient Broth hazırlanmış ve pH 7 olarak ayarlanmıştır. BP-K9D-M izolatı için 0,5X

Nutrient Broth hazırlanmış ve pH 9 olarak ayarlanmıştır. Üretim hacmi 500 ml olacak şekilde sıvı besiyerleri 1000 ml'lik 4 şişede hazırlanmıştır. Aktifleştirilmiş izolatlar inokülüm oranı %1 olacak şekilde optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen besiyerlerine aşılanmıştır. 250 rpm'de optimum aktivitenin belirlendiği sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Kültür sıvıları 8000 g'de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenerek hücresiz süpernatantlar (CFS) steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Pelletlerin ise tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Hücresiz süpernatantlar 0,22 µm membran filtreden geçirilerek steril edilmiş ve steril şişelere aktarılmıştır. Kültür sıvıları çalışmaya başlanıncaya kadar +4 °C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5. İzolatların sıvı besi yerinde çalkalayıcı inkübatörde gelişimi

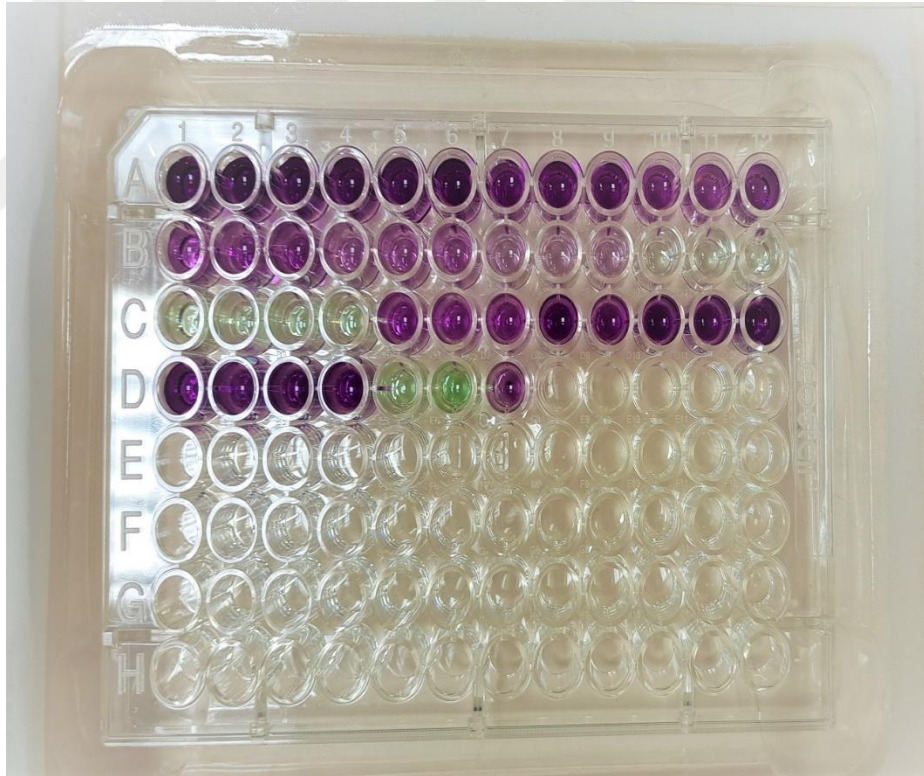
3.2.8.2. Protein tayini

Antimikrobiyal maddenin protein tabiatında olup olmadığının belirlenmesi için aktivitesi önceden bilinen süpernatantlara son hacim 1 mg/ml olacak şekilde proteinaz K eklenmiştir. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların aktivitesi etkili oldukları bir indikatör mikroorganizmaya karşı disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş zon çapları (mm) ölçülmüştür.

Örneklerdeki protein miktarları Bradford metoduyla ölçülmüştür (Bradford, 1976). Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA standartlarının farklı derişimlerde hazırlanması ve Bradford metodunun uygulanması ABP Bioscience Bradford Protein Assay kit kullanılarak üretici talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Yöntem şu aşamalardan oluşmaktadır:

1. Tüm standart ve test edilen örnekler 20 µl hacimde 96 kuyucuklu plakaya pipetlenmiştir. Kör olarak 20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7) kullanılmıştır.
2. Her kuyuya 200 µl BCA Working reagent eklenerek karıştırılmıştır. Plaka 30 sn. boyunca sallanmıştır.
3. Plakanın üstü kapatılmıştır ve 37 °C sıcaklıkta 30 dk. inkübe edilmiştir.
4. Plaka oda sıcaklığında bekletilerek soğuması sağlanmıştır.
5. 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır.
6. Belirlenen ölçümler kullanılarak her BSA standardı için µg/ml cinsinden konsantrasyona göre standart bir eğri oluşturulmuştur.

Yöntemin uygulanmasında 96 kuyucuklu plakalar kullanılmış (Şekil 3.6) ve 562 nm spektrofotometrik ölçüm sonucuna göre protein standart eğrisi oluşturulmuş ve kültür sıvılarının protein konsantrasyonu (µg/ml) belirlenmiştir.

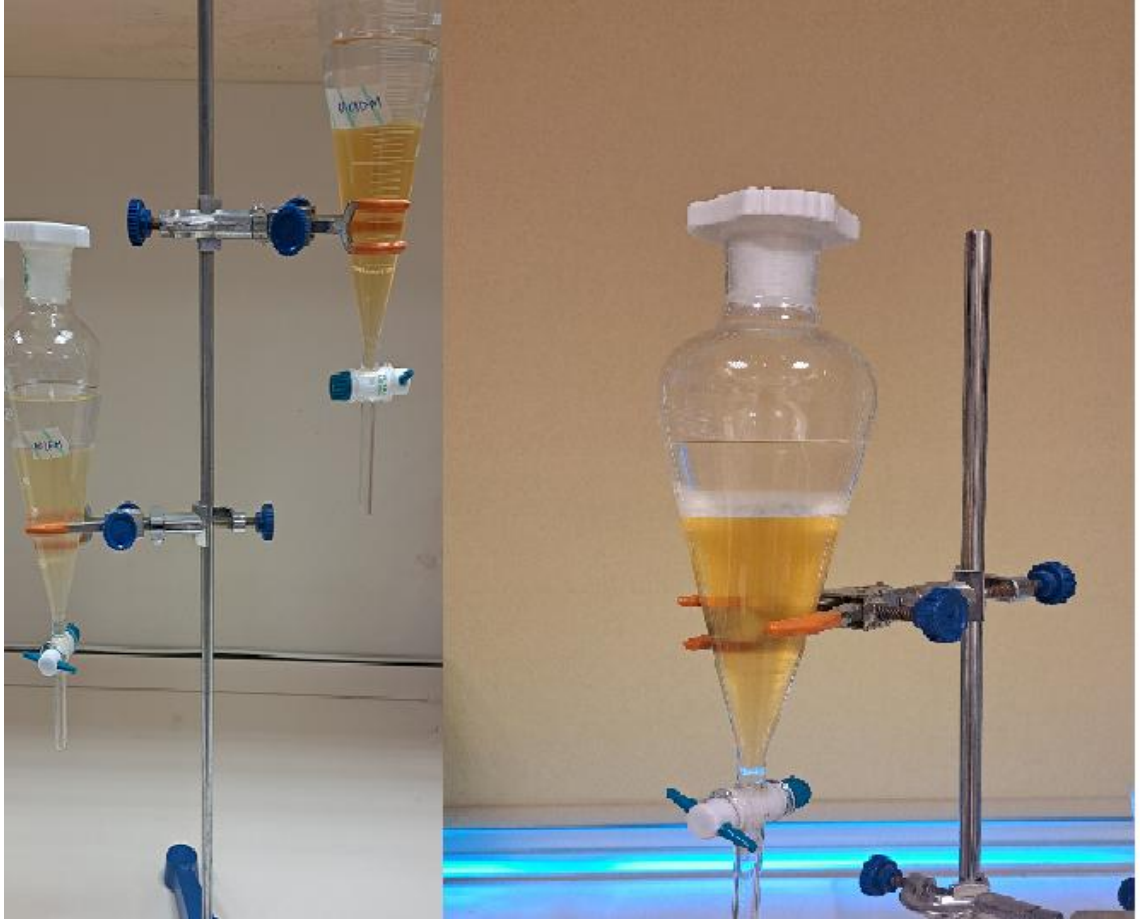


Şekil 3.6. Bradford protein tayin yöntemi

3.2.9. Antimikrobiyal Maddenin Ekstraksiyonu

Kültür sıvılarının toplanması ve steril edilmesinden sonra etil asetat çözücüsü ile ekstraksiyona tabi tutularak antimikrobiyal etkili maddenin izolasyonu amaçlanmıştır.

Ekstraksiyon çalışmalarında 250 ml hacminde ayırma hunileri (Isolab) ile hazırlanan deney düzeneği kullanılmıştır (Şekil 3. 7). Ayırma hunisine 100 ml steril kùltür sıvısı ve 100 ml etil asetat eklenerek 5 dk boyunca çalkalanmıştır. 5 dk sonunda ayırma hunisinin musluğu açılmış, sulu faz ve çözücü fazı dikkatli bir Şekilde farklı steril falconlara alınmıştır. Ekstraksiyon sonrası alt fazın antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve Bradford yöntemi ile protein tayini yapılmıştır.



Şekil 3.7. Kùltür sıvılarının etil asetat çözücüsü ile ekstraksiyonu

3.2.10. İnce Tabaka Kromatografisi

Antimikrobiyal etkili ekstraktın içinde bulunan farklı bileşiklerin oluşturduğu spotların belirlenmesinde ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Ekstraksiyon alışmaları sonucunda elde edilen BP-2F-M (*Arthrobacter spp.*), BP-2G-M (*Rhodococcus erythropolis*) ve BP-K9D-M (*Streptomyces rubiginosohelvolus*) ekstraktları ile kloramfenikol antibiyotiği 20x20 TLC plakalarına (silica gel G60 F254, Merck) uygulanmıştır. Tüm örnekler taban kısmından 2-3 cm. yukarıda olacak ve yaklaşık 0,5 mm çapında spotlar oluşacak Şekilde mikropipet ile spotlanmıştır. Spotlama

işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Çözücü olarak 85:15 kloroform:metanol kullanılmıştır. Örneklerin spotlandığı silika gel plakası 20x20 TLC tankı içine yerleştirilmiştir. Spotların başlangıç noktasının altında kalacak miktarda 85:15 kloroform: metanol eklenerek plakanın üstü kapatılmıştır. Çözücü plakanın yaklaşık 2/3' ünü geçene kadar karanlık ortamda yürütülmüştür. Yürütme sonlandırıldığında plaka kurutulduktan sonra oluşan lekeler H₂ SO₄ çözeltisi ile spreylenecek görünür hale getirilmiş ve UV ışığı altında incelenmiştir. Örneklerin R_F faktörü (geciktirme faktörü), çözücünün göç mesafesi ve analitin göç mesafesi ölçülerek aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

RF : Geciktirme faktörü
dR : Maddenin göç mesafesi
dM : Çözücünün göç mesafesi

$$RF = \frac{dR}{dM} \quad (3.1)$$

3.2.11. Antimikrobiyal Maddenin HPLC Analizi ile Karakterizasyonu

Antimikrobiyal etkili maddenin içinde bulunan farklı bileşiklerin karakterizasyonu için HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizi T.C. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Shimadzu Prominence marka HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi ile izolatların çeşitli fenolik asitler, organik asitler ve vitaminler açısından karakterizasyonu yapılmıştır.

Fenolik ve flavanoid bileşik analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence Marka HPLC

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20ACHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

Kolon: Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron)

Mobil Faz: A: %3 Formik asit B: Metanol

Gradient programı: 93% A + 7% B for 3 min, 72% A + 28% B in 28 min, 67% A + 33% B in 60 min, 58% A + 42% B in 62 min, 50% A + 50% B in 70 min, 30% A + 70% B in 75 min, 93% A + 7% B in 90 min.

HPLC analizinde Caponio vd., (1999) metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

Askorbik asit analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence Marka HPLC

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20ACHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

Kolon: ODS 4 (250 mm*4,6 mm, 5 µm) (GP Sciences, Inertsil ODS-4, Japonya)

Mobil faz: pH'sı ortofosforik asitle 3'e ayarlanmış ultrasaf su.

Askorbik asit analizlerinde Aktaş vd., (2015) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır.

E vitamini (Alfa-tokoferol) analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence

Mobil Faz: Heptane: tetrahydrofuran (95:5, v/v)

Akış Hızı: 1,5 ml/dk.

Kolon Sıcaklığı: 40°C

Dedektör: Fluorescence Detector (Ex 295 nm, Em 330 nm)

Kolon: una Silica (250*4.6 mm, 5 µm, Phenomonex, Torrance, USA)

System CBM: 20A controller

Autosampler: SIL-20AC HTA prominence

LC-20AT prominence pump

Tüm numuneler mobil fazda çözülüp enjekte edilmiştir.

Butirik asit analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Cihazlar: Agilent 7697A Headspace

Agilent 7890A GC 5975C MS

Metot: Kolon sıcaklık programı: 35 °C'de 5 dakika bekledikten sonra dakikada 50 °C'lik artışla

150 °C'ye ulaşılmakta ve bu sıcaklıkta 5 dakika beklenmektedir.

Dedektör ve enjektör sıcaklığı: 200 °C ve 180 °C

Akış Hızı: 25 psi (He)

Needle: 90 °C

Transfer line: 120 °C

Vial oven: 85 °C

Termostat time: 5 dakika

Pressurize time: 0,5 dakika

Inject time: 0,08 dakika

Withdraw time: 0,5 dakika

4 g/4 ml numune alınmış headspace sisteminde enjekte edilmiştir.

HPLC analizlerinde Yılmaz ve Seçilmiş (2006) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır (Yılmaz ve Seçilmiş, 2006).

Fenol analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

HPLC Metodu: Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence Marka HPLC

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20ACHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

Kolon: Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron)

Mobil Faz: A: %3 Formik asit B: Metanol

Gradient programı: 93% A + 7% B for 3 min, 72% A + 28% B in 28 min, 67% A + 33% B in 60 min, 58% A + 42% B in 62 min, 50% A + 50% B in 70 min, 30% A + 70% B in 75 min, 93% A + 7% B in 90 min.

Benzoik asit analizleri için çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

HPLC Çalışma Şartları:

Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence Marka HPLC

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20ACHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

Kolon: Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron)

Mobil Faz: A: %3 Formik asit B: Metanol

Gradient programı: 93% A + 7% B for 3 min, 72% A + 28% B in 28 min, 67% A + 33% B in 60 min, 58% A + 42% B in 62 min, 50% A + 50% B in 70 min, 30% A + 70% B in 75 min, 93% A + 7% B in 90 min.

HPLC analizinde Caponio vd., (1999) tarafından bildirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

Butirik asit, asetik asit ve propiyonik asit analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Cihazlar: Agilent 7697A Headspace

Agilent 7890A GC 5975C MS

Metot: Kolon sıcaklık programı: 35 °C'de 5 dakika bekledikten sonra dakikada 50 °C'lik artışla

150 °C'ye ulaşılmakta ve bu sıcaklıkta 5 dakika beklenmektedir.

Dedektör ve enjektör sıcaklığı: 200 °C ve 180 °C

Akış Hızı: 25 psi (He)

Needle: 90 °C

Transfer line: 120 °C

Vial oven: 85 °C

Termostat time: 5 dakika

Pressurize time: 0,5 dakika

Inject time: 0,08 dakika

Withdraw time: 0,5 dakika

Fenol ve benzoik asit analizleri için HPLC çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Sistem: Shimadzu Prominence Marka HPLC

CBM: 20ACBM

Dedektör: DAD (SPD-M20A)

Kolon Fırını: CTO-10ASVp

Pompa: LC20 AT

Autosampler: SIL 20AHT

Bilgisayar Programı: LC Solution

Kolon: Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron)

Mobil Faz: A: %3 Formik asit B: Metanol (Capoino vd., 1999).

Gradient programı: 93% A + 7% B for 3 min, 72% A + 28% B in 28 min, 67% A + 33% B in 60 min, 58% A + 42% B in 62 min, 50% A + 50% B in 70 min, 30% A + 70% B in 75 min, 93% A + 7% B in 90 min.

3.2.12. Antimikrobiyal Maddenin LC/Q-TOF MS Analizi ile Karakterizasyonu

Antimikrobiyal etkili ekstraktlarda bulunan çeşitli primer ve sekonder metabolitler LC- Q-TOF MS analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda antimikrobiyal etkili ekstraktlarda biyoaktif peptidler, antibiyotikler, sideroforlar, organik asitler saptanmıştır. LC-Q-TOF MS analizleri Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) 'nde yaptırılmıştır.

LC- Q-TOF MS analizi cihaz bilgileri Çizelge 3.4' te, çözücü kompozisyonu Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. TOF/Q-TOF MS cihaz bilgileri

Cihaz	Binary Pump
Model	G1312B
Akış	0.400 ml/dk
Düşük Basınç Limiti	0.00 bar
Yüksek Basınç Limiti	425.00 bar
Maksimum Basınç Gradienti	100.000 ml/min ²
Stroke A Automatic Stroke Calculation A	Evet
Stroke B Automatic Stroke Calculation B	Evet
Stop Time	Time set 15.00 dk
Stop Time Mode	
Stop Time	
Post Time	Kapalı
Stop Time Mode	

Çizelge 3.5. TOF/ Q-TOF MS analizinden kullanılan çözücü kompozisyonu

Kanal	Solvent	İsim	Yüzde
A	H ₂ O	% 100 H ₂ O % 90 w/ % 0.1 Formik Asit	%90
B	ACN	% 100 ACN	%10

TOF/ Q- TOF MS analizi zaman çizelgesi Çizelge 3.6' da, cihaz parametreleri Çizelge 3.7' de verilmiştir.

Çizelge 3.6. TOF/ Q-TOF MS analizi zaman çizelgesi

ZAMAN	A	B
0,50 dk	% 90	% 10
5,00 dk	% 30	% 70
7,00 dk	% 5	% 95

10, 00 dk	% 5	% 95
12, 00 dk	% 30	% 10

Çizelge 3.7. TOF/ Q- TOF MS cihaz parametreleri

Cihaz Parametreleri	
Parametre	Değer
Gaz Sıcaklığı (°C)	290
Gaz Akışı (L/dk)	14
Nebulizatör (psig)	35
Sheath Gaz Sıcaklığı	400
Sheath Gaz Akışı	10
Tarama Segmentleri Tarama Segment Parametreleri	
Parametre	Değer
VCap	4000
Nozzle Voltaj (V)	1000
Fragmentor	300
Skimmer1	0
OctopoleRFPeak	750

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tarama Testlerinde Kullanılacak İzolatların Belirlenmesi

Gram boya yöntemi ve mikroskopik inceleme sonucunda 300 bakteri izolatu arasında 130 tanesi Gram negatif, 170 tanesi Gram pozitif olarak belirlenmiştir. Gram pozitif olarak belirlenen 170 bakteri izolatu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır. Çalışma için seçilen izolatların Gram boyama, hücre morfolojisi ve koloni morfolojisi özellikleri de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada test edilen mikroorganizmaların koloni morfolojisi, Gram boyama ve hücre morfolojisi özellikleri

İZOLAT NO	KOLONİ MORFOLOJİSİ	GRAM BOYAMA VE HÜCRE MORFOLOJİSİ
D-1C-M	Krem rengi yuvarlak koloni	Gram pozitif kok
D-1F-M	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif kok
D-1A-N	Beyaz küçük rizoid koloni	Gram pozitif basil
D-1B-N	Beyaz cıvık yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
D-1D-N	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif kok
D-1K-N	Beyaz nokta koloni	Gram pozitif basil
D-3C-N	Beyaz cıvık rizoit koloni	Gram pozitif sporlu kokobasil
D-3D-N	Beyaz elips Şekilli koloni	Gram pozitif sporlu basil
D-3F-N	Beyaz-krem rengi kenarı tırtıklı	Gram pozitif basil
D-3B-R	Beyaz kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif streptobasil
D-3C-R	Beyaz nokta koloni	Gram pozitif kok
D-3E-R	Beyaz tam yuvarlak olmayan nokta koloni	Gram pozitif basil
D-3F-R	Aktinomiset benzeri kahverengi mat koloni	Gram pozitif basil
D-3G-R	Krem rengi nokta koloni	Gram pozitif kok
D-3I-R	Mat beyaz yuvarlak	Gram pozitif basil/kok
D-3H-R	Beyaz küçük cıvık elips şeklinde	Gram pozitif sporlu basil
D-3J-R	Krem rengi cıvık kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif basil
D-3K-R	Beyaz küçük cıvık elips şeklinde	Gram pozitif sporlu basil
D-3L-R	Beyaz mat elips Şekilli koloni	Gram pozitif basil
D-3M-R	Krem rengi cıvık kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif sporlu basil
D-K4A-N	Sarı küçük nokta koloni	Gram pozitif kok
D-K4C-N	Beyaz mat küçük yuvarlak koloni	Gram pozitif kok
D-K4D-N	Beyaz cıvık büyük rizoit koloni	Gram pozitif sporlu basil
D-K4E-N	Sarı cıvık nokta koloni	Gram pozitif kok
D-K4F-N	Şeffaf su damlası şeklinde yuvarlak	Gram pozitif sporlu basil

D-K4G-N	Beyaz cıvık koloni	Gram pozitif sporlu basil
D-K4H-N	Şeffaf su damlası şeklinde yuvarlak	Gram pozitif sporlu basil
D-K5C-R	Krem rengi cıvık nokta koloni- sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif basil
D-5A-N	Beyaz cıvık yuvarlak	Gram pozitif basil
D-K5G-N	Gömülü mat beyaz yuvarlak	Gram pozitif basil
D-K6D-R	Beyaz cıvık yuvarlak	Gram pozitif basil
D-K6H-R	Beyaz cıvık nokta	Gram pozitif basil
D-6F-R	Krem rengi cıvık kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif kok
D-6G-R	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
D-K6A-N	Parlak beyaz kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif basil
D-K6D-N	Beyaz parlak nokta koloni	Gram pozitif basil
D-K6F-N	Beyaz- şeffaf nokta koloni	Gram pozitif basil
D-K6J-N	Beyaz cıvık küçük yuvarlak	Gram pozitif basil
Y-K1A	Kahve- bordo pudralı aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil
Y-K1C	Beyaz cıvık kenarı tırtıklı	Gram pozitif basil
Y-K1E	Şeffaf yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
Y-K1F	Pembe yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
Y-K1G	Şeffaf yuvarlak su damlası benzeri	Gram pozitif basil
Y-K1H	Beyaz cıvık bulut benzeri	Gram pozitif basil/ kokobasil
Y-K1I	Turuncu- sarı küçük yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
Y-K1J	Parlak sarı yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
Y-K1K	Beyaz küçük kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif basil
Y-K1N	Krem rengi ortası şeffaf kenar tırtıklı	Gram pozitif kokobasil
Y-K1S	Mat beyaz yuvarlak	Gram pozitif basil
Y-K1T	Beyaz cıvık büyük rizoit	Gram pozitif kokobasil
Y-K1V	Şeffaf renkli yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
Y-K1Z	Parlak sarı yuvarlak koloni	Gram pozitif kok/kokobasil
K-K3A-N	Parlak beyaz elips koloni	Gram pozitif streptobasil
K-4A-N	Mat beyaz pudralı aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil
K-4H-N	Cıvık beyaz yuvarlak	Gram pozitif basil
K-4I-N	Beyaz küçük nokta	Gram pozitif basil
K-4J-N	Şeffaf ortası mat beyaz	Gram pozitif basil
K-K4A-N	Beyaz mat nokta koloni	Gram pozitif kok
K-K4D-N	Mat beyaz nokta koloni	Gram pozitif basil
K-K4G-N	Krem rengi cıvık nokta koloni	Gram pozitif kok
K-K4L-N	Cıvık beyaz elips koloni	Gram pozitif kok
K-K4M-N	Mat beyaz pudralı aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil
K-K4A-M	Krem rengi cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
K-K4B-M	Beyaz mat nokta koloni	Gram pozitif kok
K-K4C-M	Gri cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
K-K4D-M	Beyaz mat pudralı (aktinomiset olabilir)	Gram pozitif kok
K-K4F-M	Beyaz cıvık nokta	Gram pozitif streptobasil
K-K4G-M	Beyaz cıvık nokta	Gram pozitif basil
K-K4H-M	Beyaz mat nokta	Gram pozitif kok
K-K5C-N	Şeffaf çok küçük nokta koloni	Gram pozitif basil
K-K5F-N	Şeffaf/beyaz çok küçük nokta	Gram pozitif basil
K-6B-N	Beyaz nokta koloni	Gram pozitif basil
K-7A-M	Şeffaf nokta koloni	Gram pozitif basil
K-K7B-R	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif sporlu basil
K-K7C-R	Krem rengi kenar tırtıklı koloni	Gram pozitif basil
K-K7F-R	Krem rengi cıvık koloni	Gram pozitif basil

K-7H-R	Açık pembe çok küçük nokta- Sıvı besiyerinde turuncu pigmentasyon	Gram pozitif basil
K-7A-N	Beyaz mat yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
K-7B-N	Beyaz cıvık rizoit koloni	Gram pozitif basil
K-7C-N	Krem rengi cıvık rizoit koloni	Gram pozitif kok
K-7D-N	Parlak sarı nokta koloni	Gram pozitif kok
K-7E-N	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
K-7F-N	Beyaz kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif basil
K-7G-N	Beyaz mat yuvarlak koloni aktinomiset benzeri	Gram pozitif kok
K-7I-N	Beyaz mat nokta koloni	Gram pozitif basil
K-7J-N	Beyaz mat nokta koloni	Gram pozitif basil
İG-2E-R	Kahverengi cıvık yaygın koloniler	Gram pozitif basil/kok
İG-K2D-N	Beyaz cıvık yuvarlak	Gram pozitif basil
İG-K2A-M	Beyaz cıvık yaygın koloniler	Gram pozitif basil
İG-2B-M	Sarı büyük yuvarlak- Sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif basil
İG-2C-M	Sarı büyük yuvarlak- Sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif streptobasil
İ-K1D-R	Beyaz cıvık küçük yaygın koloniler	Gram pozitif basil
İ-1A-R	Beyaz cıvık küçük nokta	Gram pozitif streptobasil
İ-1E-R	Krem rengi büyük yuvarlak ortası koyu renk	Gram pozitif kokobasil
İ-K1B-N	Küçük parlak sarı nokta- Sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif basil
İ-3A-M	Toprak rengi pudralı mat nokta koloni (aktinomiset olabilir)	Gram pozitif basil
İ-3C-M	Pembe küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-K3A-N	Krem rengi cıvık büyük koloni	Gram pozitif kokobasil
İ-K3A-R	Parlak sarı yuvarlak koloni	Gram pozitif kok
İ-4A-M	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif sporlu basil
İ-4B-M	Beyaz mat nokta koloni	Gram pozitif basil
İ-K4C-M	Beyaz cıvık büyük rizoit	Gram pozitif kokobasil
İ-5A-M	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
İ-5D-M	Beyaz büyük rizoit	Gram pozitif kokobasil
İ-K5A-M	Şeffaf küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-5A-R	Beyaz cıvık rizoit	Gram pozitif basil
İ-5B-R	Krem rengi cıvık büyük koloni	Gram pozitif basil
İ-5D-R	Krem rengi cıvık büyük koloni	Gram pozitif basil
İ-K6D-M	Beyaz küçük nokta	Gram pozitif basil sporlu
İ-7A-N	Şeffaf nokta koloni	Gram pozitif basil
İ-7B-N	Şeffaf küçük nokta	Gram pozitif basil/kok
İ-8A-N	Şeffaf küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-8B-R	Büyük krem rengi mat kenarı tırtıklı	Gram pozitif kokobasil
İ-8E-R	Beyaz küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-K8B-N	Turuncu küçük yuvarlak nokta	Gram pozitif basil
İ-9C-N	Şeffaf küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-9D-N	Şeffaf küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-K9B-N	Parlak turuncu küçük nokta	Gram pozitif basil
İ-11B-M	Mat beyaz küçük nokta	Gram pozitif sporlu basil
İ-11C-M	Şeffaf çok küçük su damlası nokta koloni	Gram pozitif basil
İ-11D-M	Açık pembe cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
BP-2C-M	Beyaz küçük cıvık elips	Gram pozitif basil
BP-2F-M	Krem rengi çok küçük koloniler	Gram pozitif basil/kok
BP-2G-M	Beyaz yuvarlak nokta koloni	Gram pozitif basil
BP-2H-M	Beyaz yuvarlak nokta koloni	Gram pozitif basil
BP-2A-N	Beyaz cıvık çok küçük yuvarlak	Gram pozitif sporlu basil
BP-2F-N	Krem rengi cıvık elips	Gram pozitif basil

BP-2A-R	Beyaz cıvık yuvarlak	Gram pozitif basil
BP-2B-R	Beyaz cıvık yuvarlak	Gram pozitif streptobasil
BP-2H-R	Beyaz çok küçük nokta koloni- Sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif basil/kok
BP-K2B-R	Krem rengi nokta koloniler- Sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif streptobasil
BP-K2C-R	Beyaz cıvık koloni	Gram pozitif basil
BP-K2E-R	Krem rengi cıvık koloni	Gram pozitif basil
BP-K2F-R	Beyaz mat küçük koloni	Gram pozitif basil
BP-K2I-R	Krem rengi cıvık çok küçük koloni	Gram pozitif basil
BP-K2J-R	Krem rengi cıvık tam yuvarlak olmayan koloni	Gram pozitif basil
BP-K2K-R	Krem rengi cıvık koloni	Gram pozitif basil
BP-3A-N	Beyaz cıvık yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
BP-3B-N	Krem rengi küçük gömülü nokta koloni	Gram pozitif basil
BP-3C-N	Beyaz cıvık bulut benzeri koloni	Gram pozitif sporlu basil
BP-3B-M	Beyaz cıvık çok küçük yuvarlak	Gram pozitif basil
BP-4B-N	Beyaz mat nokta aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil
BP-4D-N	Beyaz nokta gömülü koloni	Gram pozitif basil
BP-4B-R	Mat koyu kahverengi nokta	Gram pozitif basil
BP-4C-R	Beyaz nokta gömülü koloni	Gram pozitif basil
BP-4E-R	Krem rengi cıvık yuvarlak	Gram pozitif basil
BP-4G-R	Mat beyaz nokta	Gram pozitif kok
BP-K5A-M	Beyaz cıvık çok küçük yuvarlak	Gram pozitif basil
BP-K5B-M	Beyaz cıvık nokta koloni	Gram pozitif basil
BP-5D-R	Krem rengi gömülü nokta	Gram pozitif basil
BP-8B-R	Aktinomiset benzeri küçük beyaz mat pudralı	Gram pozitif basil
BP-8A-N	Beyaz pudralı aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil
BP-8B-N	Kahverengi pudralı nokta aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil/streptobasil
BP-9A-M	Beyaz- krem rengi pudralı aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil
BP-K9B-M	Aktinomiset benzeri küçük beyaz mat pudralı	Gram pozitif basil
BP-K9DM	Aktinomiset benzeri küçük beyaz mat pudralı	Gram pozitif basil
S-1A-R	Parlak turuncu yuvarlak	Gram pozitif basil
S-1F-R	Beyaz cıvık yuvarlak	Gram pozitif basil
S-1I-R	Krem rengi mat yuvarlak (aktinomiset olabilir)	Gram pozitif basil/streptobasil
S-K1B-N	Krem rengi cıvık kenarı tırtıklı koloni	Gram pozitif basil
S-K1E-N	Sarı çok küçük nokta	Gram pozitif basil
S-K1F-R	Krem rengi çok küçük yuvarlak- Sıvı besiyerinde koyu kahverengi pigmentasyon	Gram pozitif basil/kokobasil
S-K1G-R	Kahverengi ortası beyaz pudralı aktinomiset benzeri	Gram pozitif basil/streptobasil
S-2D-R	Şeffaf küçük nokta	Gram pozitif basil sporlu
S-3C-N	Ortası mat kenar şeffaf yuvarlak	Gram pozitif basil
S-3D-N	Beyaz mat gömülü nokta	Gram pozitif basil
S-3D-M	Krem rengi kenarı tırtıklı ortası pudralı koloni	Gram pozitif kok
S-3G-M	Krem rengi ortası mat koloniler	Gram pozitif basil
S-3A-R	Krem rengi cıvık koloni	Gram pozitif sporlu basil
S-3E-R	Krem rengi cıvık koloni	Gram pozitif basil
S-4B-N	Beyaz cıvık çok küçük koloni	Gram pozitif sporlu basil
S-5C-R	Beyaz cıvık çok küçük yuvarlak koloniler	Gram pozitif basil

S-5D-R	Beyaz cıvık çok küçük yuvarlak koloniler	Gram pozitif sporlu basil
S-K5B-R	Şeffaf küçük yuvarlak koloni	Gram pozitif basil
S-K6F-M	Aktinomiset benzeri kahverengi mat pudralı yuvarlak- sıvı besiyerinde tanecikli	Gram pozitif basil

Yapılan çalışmalar Gram pozitif bakterilerin antimikrobiyal aktivite açısından yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. İran'da bulunan Hampoil Mağarasında yapılan çalışmada izole edilen aktinomisetlerin %25,3'ünde en az bir test suşuna karşı antimikrobiyal aktivite olduğu bildirilmiştir (Hamedi vd., 2019).

Usta (2012) tarafından yapılan çalışmada Türkiye 'de bulunan 25 farklı ilden toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus sp.* suşlarının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. 57 izolatın 25'inde antibakteriyel aktivite saptanmıştır (Usta, 2012).

Avguştin vd., (2019) tarafından yapılan çalışmada Sloven karst mağaralarındaki mikrobiyal matlardan izolasyon yapılmıştır. İzolatların %71'ini Gram pozitif, %29'unu Gram negatif bakteri izolatları oluşturmaktadır. İzolatların %46'sında antimikrobiyal aktivite bildirilmiştir.

Çil vd., (2016) tarafından toprak aktinomisetleri ile yürütülen çalışmada izolatların 10 patojen mikroorganizmaya karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışma üç *Actinomadura*, bir *Kribella*, üç *Micromonospora*, iki *Streptomyces* cinsi bakteri izolatları ile yürütülmüştür. Çalışma sonuçları *Streptomyces* cinsine ait suşların yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

2012'de denizlerden izole edilen *Streptomyces* suşları ile yapılan çalışmada izolatların *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *A. niger* ve *C. albicans* suşlarına karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Attimarad., 2012).

Yapılan çalışmalar antimikrobiyal aktivite üretici mikroorganizmaların çoğunlukla Gram pozitif bakteriler olduğunu göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda antimikrobiyal aktivite çalışmaları için Gram pozitif bakteriler seçilmiştir.

4.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

4.2.1. Kültür Sıvılarının Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan Gram pozitif bakteri izolatları aktiveleştirildikten sonra 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda sıvı kültürlerden 2' şer ml alınarak eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorflara alınan sıvı kültürlerin 600 nm 'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçüm değerlerinin en yüksek olduğu saatlere ait kültür sıvıları toplanarak antimikrobiyal etkinin taranmasında kullanılmıştır. İzolatların sıvı kültürlerinin 24, 48,

72 ve 96. saatlerde ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.2’ de verilmiştir. Çizelge 4.1’ e göre aktinomisetlerin karakteristik morfolojik özelliklerini gösteren izolatların sıvı kültürleri 5-7 gün inkübasyondan sonra toplanarak antimikrobiyal etkinin taranmasında kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. Sıvı kültürlerin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölçülen absorbans değerleri

Suşun Kodu	Absorbans _{600nm}			
	24 s.	48 s.	72 s.	96 s.
Y-K1C	0,297	0,54	0,17	0,066
Y-K1F	0,162	0,791	0,307	0,046
Y-K1H	0,239	0,766	0,102	0,101
Y-K1J	0,148	0,598	0,115	0,278
K-K4A-N	0,09	0,539	0,121	0,142
K-4H-N	0,194	1,096	0,051	0,042
K-4J-N	0,281	0,401	0,119	0,432
K-4L-N	0,039	0,262	0,254	0,481
Y-K1T	0,154	0,217	0,78	0,243
BP-2A-M	0,151	0,329	0,522	0,122
BP-2G-M	0,42	0,51	0,57	0,294
BP-2F-M	0,552	0,124	0,689	0,193
K-K3A-N	0,837	0,139	0,227	0,486
K-K4B-M	0,683	0,102	0,183	0,168
K-K5F-M	0,639	0,141	0,086	0,185
D-1F-M	0,254	0,343	0,253	0,053
D-3D-R	0,25	0,794	0,421	0,053
D-3G-R	0,249	0,568	0,071	0,053
D-3H-R	0,095	0,571	0,081	0,051
D-3E-R	0,152	0,721	0,437	0,049
D-3J-R	0,376	0,303	0,195	0,164
D-3K-R	0,075	0,358	0,264	0,161
S-1A-R	0,125	0,214	0,322	0,107
S-K1F-R	0,167	0,423	0,506	0,553
S-K1E-N	0,348	0,386	0,371	0,687
S-K4E-N	0,044	0,12	0,137	0,351
S-2D-R	0,046	0,58	0,62	0,46
S-K5B-R	0,38	0,41	0,557	0,249
S-4B-N	0,592	0,724	0,748	0,762
D-K6A-N	0,144	0,282	0,372	0,266
K-7B-N	0,14	0,276	0,37	0,26
K-7C-N	0,147	0,249	0,358	0,146
K-4A-N	0,827	0,899	0,906	0,956
K-7H-R	0,134	0,157	0,206	0,371
BP-K2C-R	0,468	0,335	0,293	0,285
BP-K2I-R	0,477	0,428	0,44	0,431
BP-K2J-R	0,211	0,309	0,403	0,151
K-K5CN-N	0,152	0,337	0,401	0,408
BP-K2B-R	0,502	0,473	0,431	0,236
D-3M-R	0,295	0,336	0,398	0,443
K-K7C-R	0,162	0,166	0,199	0,429
D-K3C-N	0,229	0,299	0,326	0,408
D-K4D-N	0,381	0,226	0,191	0,04
D-3C-N	0,162	0,189	0,306	0,146
D-K4C-N	0,279	0,635	0,435	0,461
D-K6D-N	0,14	0,151	0,128	0,5

BP-2B-R	0,378	0,373	0,375	0,1
BP-K2F-R	0,11	0,103	0,118	0,413
D-K6J-N	0,343	0,241	0,176	0,398
D-K6H-R	0,467	0,461	0,493	0,167
BP-3B-N	0,157	0,127	0,129	0,161
BP-K2E-R	0,257	0,283	0,374	0,18
Y-K1G	0,522	0,623	0,224	0,155
Y-K1I	0,169	0,171	0,213	0,413
Y-K1S	0,281	0,222	0,233	0,273
B-4D-N	0,552	0,623	0,654	0,117
BP-5D-R	0,184	0,197	0,206	0,337
i-9D-N	0,337	0,401	0,408	0,396
İ-K8B-N	0,217	0,558	0,54	0,492
İ-K3A-R	0,406	0,363	0,391	0,378
İ-5A-M	0,383	0,442	0,389	0,384
BP-K5B-M	0,383	0,422	0,402	0,389
İ-K5B-N	0,403	0,227	0,2	0,19
İ-7B-N	0,408	0,434	0,426	0,582
BP-2E-R	0,398	0,399	0,424	0,435
S-K5B-R	0,366	0,588	0,56	0,588
D-K4C-N	0,334	0,332	0,372	0,34
D-K4E-N	0,48	0,433	0,421	0,395
K-K4C-M	0,44	0,543	0,56	0,537
İ-3C-M	0,361	0,498	0,485	0,521
İ-K3A-N	0,311	0,252	0,257	0,395
İ-1E-R	0,297	0,24	0,214	0,194
İ-8B-R	0,233	0,258	0,313	0,332
İ-8E-R	0,043	0,046	0,389	0,571
Y-K1N	0,156	0,322	0,549	0,566
Y-K1Z	0,434	0,353	0,398	0,606
D-1A-N	0,462	0,094	0,114	0,101
D-1B-N	0,047	0,047	0,067	0,449
D-1D-N	0,041	0,045	0,302	0,342
D-1K-N	0,187	0,266	0,353	0,316
D-3D-N	0,211	0,173	0,257	0,32
D-3F-N	0,101	0,243	0,186	0,224
D-K4A-N	0,294	0,297	0,387	0,35
K-7H-R	0,048	0,049	0,047	0,371
K-7E-N	0,129	0,268	0,424	0,324
İG-2E-R	0,112	0,46	0,342	0,345
S-K6F-M	0,389	0,365	0,341	0,335
BP-K2J-R	0,359	0,49	0,491	0,473
İ-K1D-R	0,507	0,185	0,253	0,471

4.2.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

İzolatların antibakteriyel aktivite açısından taramasında agar disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon testi 170 Gram pozitif bakteri izolatı için uygulanmıştır. Disk difüzyon test sonuçlarına göre izolatların yaklaşık %25' i en az 1 test organizmasına karşı aktivite göstermiştir. Aktivite görülen 41 izolatın yaklaşık %51 'inin birden fazla test organizmasına karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm izolatların %35'i *P. aureginosa*'ya, %23'ü *E. coli*'ye, %15'i *S. aureus*'a, %13'ü *C. albicans*'a, %10'u *L.*

monocytogenes'e, %4'ü ise *Penicillium spp.* suşuna karşı etki göstermiştir. 12 izolatın 2 test organizmasına, 9 izolatın ise 3 test organizmasına karşı etkili olduğu görülmüştür. *Aspergillus niger* NRRL 363 test mikroorganizmasına karşı aktivite görülmemiştir. Antimikrobiyal aktivite görülen izolatlar, etkili oldukları test suşları ve ölçülen zon çapları (mm) Çizelge 4.3'te verilmiştir. Disk difüzyon testi sonucunda oluşan zon görünüşleri Şekil 4.1' de verilmiştir.

Mağaralardan izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktivitelerinin bildirildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur.

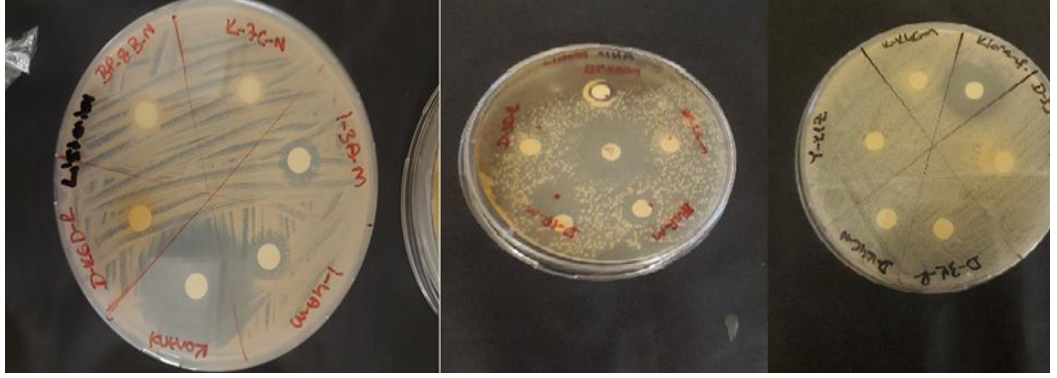
Türkiye'de yapılan çalışmada Parsık mağarasından izole edilen 41 *Actinobacteria* izolatının çeşitli Gram negatif, Gram pozitif bakteri ve fungus test suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. İzolatlar *E. coli* (ATCC 8739), Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) (ATCC 33591), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), ve *C. albicans* (ATCC 10231) suşlarına karşı test edilmiştir. Tüm izolatların yalnız 2' sinde *C. albicans*'a karşı aktivite görülmüştür. Ayrıca PCR temelli yöntemlerle Poliketid sentaz (PKS) ve ribozomal olmayan peptid sentaz (NRPS) gen kümeleri araştırılmıştır. Kültür sıvılarının GC-MS analizi sonucunda antimikrobiyaller, antioksidanlar, antikanser ve bilinmeyen bileşikler kaydedilmiştir (Rachid ve Güngör, 2022). Çalışmamızda da funguslara karşı görülen aktivitenin bakterilere karşı görülen aktiviteden daha az olduğu görülmüştür.

Jaroszewicz vd., (2011) tarafından yapılan çalışmada Szczelina Chochołowska Mağarası (Tatra Dağları, Polonya) çeşitli *Actinobacteria* suşlarının *Candida spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonuçları *Streptomyces* suşlarının bakteriyel ve fungal etki gösterdiklerinin ortaya koymuştur. Çalışmamızda da *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşlarına karşı aktivite kaydedilmiştir.

Lema vd., (2022) tarafından Momela Soda Gölü (Arusha National Park, Tanzania) toprak ve su örneklerinden izole edilen 120 *Actinobacteria* izolatının antibakteriyel potansiyeli araştırılmıştır. 44 izolatın *S. aureus* ve *E. coli*' ye karşı aktivite sergilediği görülmüştür. Çalışmamızda antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların %15 'inin *S. aureus*' a, %23'ünün *E. coli*' ye karşı etkili olduğu görülmüştür.

2010' da yapılan çalışmada Türkiye'deki 19 karstik mağaranın taş duvar ve speleothem yüzeylerinden ve toprak örneklerinden aktinomiset izole edilmiştir. İzole edilen 290 izolattan 180 izolatın (%62), dört bakteri, iki maya ve dört filamentli fungustan oluşan indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği

bildirilmiştir (Yamaç, 2010). Çalışmamızda da antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde bakteri, maya ve küf test mikroorganizmaları kullanılmış ve izolatların %25'i en az bir test mikroorganizmasına karşı etkili olarak saptanmıştır.



Şekil 4.1. Disk difüzyon testi sonucunda oluşan zon görünümleri

Çizelge 4.3. Antimikrobiyal aktivite görülen izolatlar, etkili oldukları test suşları ve ölçülen zon çapları (mm)

İZOLAT NO	Test mikroorganizmaları					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Penicillium sp.</i>
D-1F-M	10±0,57	-	-	-	-	-
D-3C-N	-	8±0,28	8±0,28	10±0,57	-	-
D-3D-N	-	15±0,57	-	18±1	-	-
D-3F-N	-	7±0	-	9±0,28	-	-
D-3D-R	-	-	-	12±1	-	-
D-3I-R	-	-	-	-	15±1	-
D-3J-R	-	-	-	-	15±1	-
D-3L-R	-	-	12±0,57	-	-	-
D-K4D- N	14±1	-	-	-	18±1	-
D-K4G-N	-	9±0,28	9±0,28	8±0,28	-	-
D-K4H-N	-	9±0,28	9±0,28	8,5±0,28	-	-
D-K6A-N	-	8	-	-	-	-
Y-K1A	-	-	-	-	10±0,57	-
Y-K1J	-	-	12±0,57	9±0,28	-	-
K-K3A-N	-	10±0,57	11±0,57	-	-	-
K-4I-N	-	-	-	9±0,28	-	-
K-K4C-M	-	-	-	-	19±1	-
K-K4D-M	-	9±0,28	8±0,28	9±0,28	-	-
K-K4H-M	-	-	-	9±0,28	-	-
K-7G-N	-	-	10±0,57	-	-	-
K-K7B-R	-	-	-	-	18±1	-
BP-2F-M	10±0,57	-	-	11±1	-	8±0,28
BP-2G-M	-	-	-	14±1	-	10±0,28
BP-K2B-R	15±1	-	15±1	-	10±0,28	-
BP-4B-N	-	11±0,57	-	8±0,28	-	-
BP-4D-N	-	-	-	8±0,28	-	-
BP-K9D-M	11±0,57	-	-	11±0,57	-	9±0,28
S-1A-R	-	-	-	9±0,28	-	-

S-K1B-N	-	-	11±0,57	-	-	-
S-K1F-R	-	-	-	-	12±1	-
S-K1G-R	-	-	-	9±0,28	-	-
S-3D-N	-	8±0,28	-	7,5±0	-	-
S-3D-M	-	9±0,28	-	6±0	-	-
S-3G-M	-	9±0,28	-	8±0,28	-	-
S-3A-R	-	-	-	-	15±1	-
İ-3A-M	14±1	8±0,28	-	8±0,28	-	-
İ-4A-M	14±1	8±0,28	-	8±0,28	-	-
İ-7A-N	-	-	-	18±1	-	-
İ-7B-N	-	12±0,57	13±0,57	-	-	-
İ-8A-N	-	-	-	9±0,28	-	-
İ-11D-M	-	10±0,57	-	10±0,57	-	-

4.3. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Ekstrasellüler Enzim ve EPS Üretimlerinin Belirlenmesi

En az 1 test mikroorganizmasına karşı etkili izolatların ekstrasellüler enzim üretimi ve EPS üretimi incelenmiştir. Ekstrasellüler enzim testi sonuçlarına göre izolatların %58'inin proteaz, %73'ünün katalaz, %39'unun amilaz, %7' sinin jelatinaz enzimi aktivitesi sergiledikleri görülmüştür. En az 1 test mikroorganizmasına karşı etkili izolatlarda üreaz enzim aktivitesi görülmemiştir. İzolatların %24'ünün ise EPS ürettikleri saptanmıştır. Ekstrasellüler enzim ve EPS üretimi testlerinin sonuçları Çizelge 4.4'te, deney fotoğrafları Şekil 4.2' de verilmiştir.

Kadıni Mağarasından (Antalya/Türkiye) izole edilen bakteri örnekleri ile yapılan çalışmada izolatların antimikrobiyal aktivitesi ve enzimatik profilleri araştırılmıştır. İzolatların *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, MRSA ve VRE suşlarına karşı aktiviteleri incelenmiştir. Tüm izolatların %15,5'inin antimikrobiyal aktivite sergilediği saptanmıştır. Tüm izolatların çoğunluğunda proteolitik enzim aktivitesi, Gram pozitif izolatların yaklaşık %10'unda amilaz, %50'sinde üreaz aktivitesi görülmüştür. Gram pozitif bakterilerin %96'sının, Gram negatif bakterilerin ise %100'ünün en az bir enzim aktivitesi sergilediği bildirilmiştir (Güngör vd., 2020). Bizim çalışmamızda yalnızca Gram pozitif bakteriler antimikrobiyal aktivite ve enzim testleri için seçilmiş olup en yüksek enzim aktivitesi oranı %73 olarak katalaz enzimi için belirlenmiştir.

Parsık Mağarasından (Kocaeli/Türkiye) izole edilen 321 bakteri izolatı ile yürütülen çalışmada izolatların antibiyotik dirençliliği, antimikrobiyal aktiviteleri ve enzimatik profilleri incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi sonuçlarına göre toplam 129 izolatın bakteri ve fungus test organizmalarına etkili olduğu belirlenmiştir. Gram pozitif izolatların yaklaşık %10'unda amilaz, %30'unda üreaz aktivitesi görülmüştür

(Çandiroğlu ve Güngör, 2020). Çalışmamızda izolatların %39'unda amilaz aktivitesi görülmüş olup üreaz aktivitesi kaydedilmemiştir.

2023'te yapılan çalışmada Amazon bölgesindeki mağara topraklarından izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal ve enzimatik aktivitesi değerlendirilmiştir. Mikroorganizmaların amilolitik, sellülotik ve proteolitik aktivitesi incelenmiştir. Çalışma 10 izolat ile yürütülmüştür. Tüm mikrobiyal suşlar arasında 7 selülotik, 1 amilolitik, 2 fosfat çözündürücü, 3 nişasta ve kazein parçalayıcı olmak üzere proteolitik aktivite görülmüştür. İzole edilen on mikrobiyal suş arasından dördünde *B. subtilis* ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı farklı duyarlılık derecelerinde antimikrobiyal aktivite kaydedilmiştir (Lima vd., 2023). Çalışmamızda amilaz aktivitesi %39, proteaz aktivitesi %58 olarak saptanmış olup sellülotik aktivite değerlendirilmemiştir.

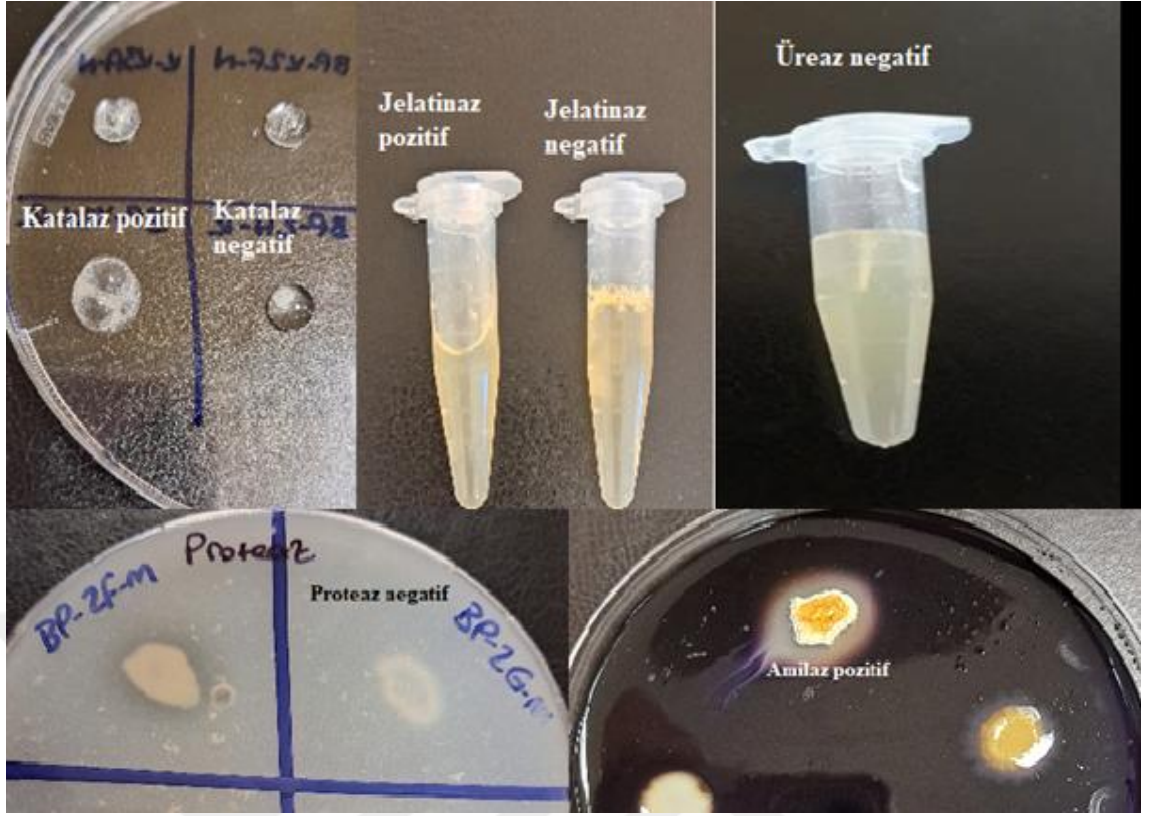
Vulcano Adası'ndaki (İtalya) sığ bir deniz menfezinden izole edilen *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72 suşu tarafından üretilen ekzopolisakaritin (EPS-2), immünomodülatör ve antiviral özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Çalışma sonuçları, viral enfeksiyonlarda bağışıklık yanıtının terapötik manipülasyonu için EPS-2 kullanımının potansiyel yolunu göstermiştir (Arena vd., 2009).

Bakteriler hayatta kalabilmek için bileşimi karbon kaynağı kullanma yeteneklerine bağlı olan EPS'yi büyük miktarlarda sentezlemektedir. Macaristan'da yürütülen çalışmada iki farklı karst bölgesinden (Baradla ve Csodabogyos Mağaraları) farklı karbonatlı speleotemlerin mikrobiyotasının ortaya çıkarılması ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, EPS'nin kalsiyum karbonat çöktürmesinde rol oynadığını ortaya koymuştur (Lange-Enyedi vd., 2022). Çalışmamızda kullanılan bakteri kültürleri de mağaralardan izole edilmiş olup antimikrobiyal aktivite sergileyen izolatların %25'inde EPS üretimi saptanmıştır.

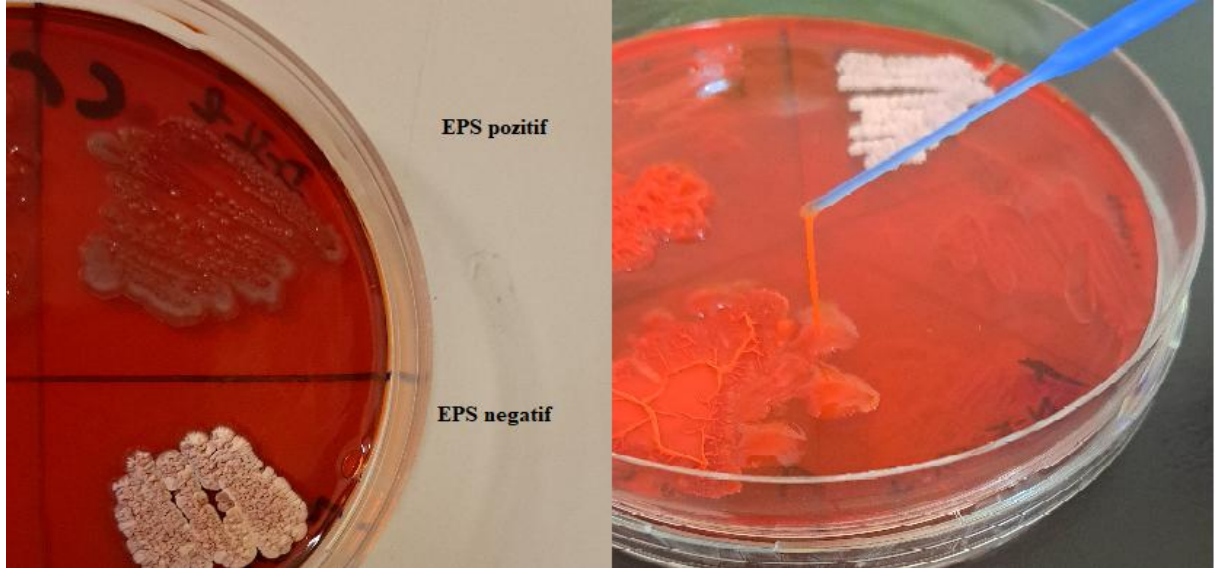
Çizelge 4.4. Antimikrobiyal etkili izolatların ekstrasellüller enzim ve EPS üretimi test sonuçları

İzolat Kodu	Proteaz	Katalaz	Amilaz	Üreaz	Jelatinaz	EPS Üretimi
BP-2F-M	+	+	-	-	-	-
BP-2G-M	-	+	-	-	-	-
Y-K1J	+	+	-	-	-	+
BP-K9D-M	+	+	+	-	-	+
K-K3A-N	+	+	+	-	-	+
D-3L-R	+	+	-	-	-	+
BP-4B-N	+	+	-	-	-	-
BP-4D-N	+	+	+	-	-	+
S-K1B-N	+	+	+	-	-	+

Y-K1A	-	+	+	-	-	-
D-3D-R	-	+	-	-	-	-
D-1F-M	-	+	-	-	+	-
I-8A-N	-	-	-	-	-	-
I-7A-N	+	-	-	-	-	-
S-3D-N	+	+	-	-	-	+
K-K4C-M	+	+	+	-	+	+
S-3A-R	+	+	+	-	+	-
K-K4D-M	+	+	+	-	-	+
D-3C-N	+	+	+	-	-	-
D-3D-N	+	+	-	-	-	+
D-3F-N	-	+	-	-	-	+
I-4A-M	-	-	+	-	-	-
I-7B-N	-	-	+	-	-	+
S-K1F-R	+	+	-	-	-	+
BP-K2B-R	+	+	+	-	-	+
D-K4G-N	-	-	+	-	-	+
D-K4H-N	-	+	+	-	-	+
D-K4D-N	+	+	-	-	-	+
I-3A-M	-	-	+	-	-	-
I-11D-M	-	-	+	-	-	+
K-K7B-R	+	+	-	-	-	+
S-K1G-R	+	+	-	-	-	+
K-7G-N	-	+	-	-	-	-
K-K4H-M	+	+	-	-	-	+
S-1A-R	-	+	-	-	-	+
S-3D-M	+	-	-	-	-	-
S-3G-M	+	-	-	-	-	+
D-K6A-N	+	+	-	-	-	-
K-4I-N	-	+	-	-	-	-
K-7G-N	-	-	-	-	-	+
D-3I-R	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.2. Eksrasellüller enzim testleri



Şekil 4.3. İzolatların EPS üretim ortamında gelişimi

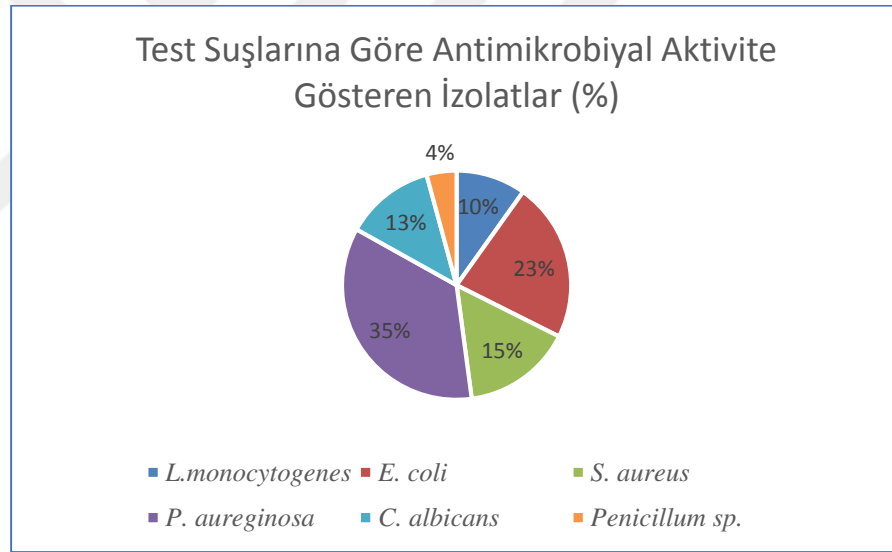
4.4. Çoklu Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Belirlenmesi

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre izolatların test mikroorganizmaları arasında Gram pozitif bakteri suşlarına karşı aktivitesi %41, Gram negatif bakteri suşlarına karşı aktivitesi %65, fungal test organizmalarına karşı aktivitesi %29 olarak belirlenmiştir. Test

mikroorganizmalarına göre antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların Grafiği Şekil 4.4.'te verilmiştir Çizelge 4.3' te verilen *P. aureginosa* ve *Penicillum spp.*'ye karşı etkili BP-2G-M izolatı ile *L. monocytogenes*, *P. aureginosa* ve *Penicillum spp.*'ye karşı etkili BP-2F-M ve BP-K9D-M izolatları tanılama, kültür büyüme parametrelerinin optimizasyonu antimikrobiyal etki tarzının belirlenmesi ve antimikrobiyal bileşenlerin karakterizasyonu ve saflaştırılması çalışmaları için seçilmiştir.

Çizelge 4.5. Çoklu antimikrobiyal aktivite gösteren BP-2F-M, BP-2G-M ve BP-K9D-M izolatlarının test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonları (mm)

İZOLAT NO	Test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonları (mm)					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Penicillum spp.</i>
BP-2F-M	10	-	-	11	-	8
BP-2G-M	-	-	-	14	-	10
BP-K9D-M	11	-	-	11	-	9



Şekil 4.4. İzolatların test mikroorganizmalarına göre antimikrobiyal aktiviteleri (%)

Türkiye'deki karstik mağara örnekleri ile yürütülen çalışmada mağaralardan izole edilen aktinomiset kültürlerinin %33'ü sadece gram pozitif bakteriler, %27' si sadece Gram negatif bakteriler ve %15,17'si her iki grup üzerinde aktivite gösterdikleri, %19'unun mayalar, %14,82'sinin küfler üzerinde etkili oldukları bildirilmiştir. Çalışmamızda ise Gram negatif bakterilere karşı aktivitenin daha fazla olduğu görülmüştür (Yücel ve Yamaç, 2010).

Hindistan' da bulunan mağara izolatları ile yapılan bir çalışmada toplam 30 izolatın *S. typhii*, *S. aureus* ve *C. Albicans*'a karşı aktivitesi incelenmiştir. Toplam 5 izolatın

antibakteriyel aktivite gösterdiği, 2 izolatın ise *C. albicans*'a karşı etkili olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda kullanılan izolatların da antibakteriyel etkisinin *C. albicans*'a karşı görülen etkiden daha fazla olduğu görülmektedir (Yasir, 2018).

Mason (2015) çeşitli mağara izolatlarının *P. aureginosa* biyofilmlerine karşı etkili olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda *P. aureginosa* suşuna etkili olan izolat sayısının diğer test organizmalarına göre daha fazla olduğu görülmektedir.

İspanya'da bulunan çeşitli mağaralardan izole edilen nadir *Actinobacterium* suşlarının antibakteriyel ve antifungal aktivitesi araştırılmıştır. Suşların *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* patojen bakterileri ile *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani* ve *Ochroconis lascauxensis* funguslarına karşı etkisi belirlenmiştir. Çalışma sonuçları *Crossiella* suşlarının hem bakteri hem de fungus test mikroorganizmalarına karşı etkili olduğunu göstermiştir (Gonzalez-Pimentel vd., 2022). Bizim çalışmamızda da çoklu antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar arasında hem bakteri hem de fungus test mikroorganizmalarına karşı etkili izolatlar olduğu belirlenmiştir.

Kanada'da yer alan karstik mağaradan izole edilen bakteriler ile yürütülen çalışmada izolatların antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada 106 bakteri izolatının aktivitesi denenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre 5 bakteri izolatı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşuna karşı antimikrobiyal özellik sergilemiştir (Walsh vd., 2023). Bizim çalışmamızda test edilen bakteri izolatlarının %15'i *S. aureus*'a karşı etkili bulunmuştur.

Türkiye'de yapılan çalışmada Gümüşhane' de bulunan Akçakale, Kırklar (Altıntaş) ve Köprübaşı Mağaralarından 179 aktinomiset izolatının antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada Gram pozitif ve Gram negatif bakteri suşları ile 1 maya suşu test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Çapraz çizgi testi sonuçlarına göre izolatların %29,6'sının en az bir test mikroorganizmasına karşı etkili olduğu kaydedilmiştir. En az üç test mikroorganizmasına karşı etkili aktinomisetler arasından 26 izolatın filogenetik analizi yapılmıştır. 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre 24 izolatın çeşitli *Streptomyces* türleri, 2 izolatın ise *Embleya scabrispora* ve *Couchioplanes caeruleus* ile benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Tüfekçi vd., 2023).

Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada yapılan çalışmada Kocaeli ilinde yer alan Parsık Mağarasından izole edilen *Actinobacteria* izolatlarının tanımlanması, antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi ve ürettikleri biyoaktif bileşiklerin

araştırılması amaçlanmıştır. 28 türü *Actinobacteria* olduğu belirlenen 41 izolatın 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Microbacterium* ve *Pseudarthrobacter* en çok tanımlanan *Actinobacteria* cinsleri olarak belirlenmiştir. Tanımlanan *Actinobacteria* suşlarında amilaz, jelatinaz, selüloz, deoksiribonükleaz (DNAaz), üreaz ve kazein hidrolize edici aktiviteler gözlemlenmiştir. PCR agaroz jel elektroforezi çalışmaları yapılarak izolatların %53'ünün NRPS (Ribozomal Olmayan Peptid Sentetaz) geni, %32'sinin PKS (Poliketid sentaz) geni taşıdığı saptanmıştır. GC-MS analizi ile karakterizasyon yapılmış ve analiz sonucunda çeşitli biyoaktif peptidler ve bilinmeyen bileşikler kaydedilmiştir (Rachid ve Güngör, 2023). Çalışmamızda da antimikrobiyal aktivitesi belirlenen izolatların enzim üretme potansiyelleri değerlendirilmiş ve biyoaktif bileşiklerin araştırılması amaçlanmıştır.

Endonezya'nın Maros-Pangkep kentinde karst ekosisteminden toplanan toprak örnekleri ile yürütülen çalışmada izolatların antifungal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Antifungal aktivitenin taranmasında *C. albicans* ve *A. niger*'e karşı etki disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. 8 aktinomiset izolatından 2' sinde antifungal aktivite saptanmıştır (Rante vd., 2024). Bizim çalışmamızda *A. niger*'e karşı aktivite görülmezken *C. albicans*' a karşı izolatların %13'ünün etkili olduğu görülmüştür.

2024'te yapılan çalışma Portekiz ve İspanya' da bulunan karasal ve deniz mağaralarından izole edilen farklı bakteri türlerinin biyoaktiviteleri araştırılmıştır. Bu suşlardan elde edilen ekstraktlarda patojenik bakterilerin büyümesini engelleme potansiyeli, güçlü antioksidan etki ve meme kanseri hücrelerine karşı aktivite görülmüştür. İzolatlar Gram pozitif bakteriler *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve Gram negatif bakteriler *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı aktivite sergilemiştir (Gatinho vd., 2024). Bizim çalışmamızda da *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı etki görülmüştür.

Oliveira vd., (2024) tarafından yürütülen çalışmada Brezilya Amazon'da topraklardan izole edilen aktinomisetlerin antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan izolatlardan elde edilen ekstraktların Gram pozitif bakterilere ve *C. albicans*'a karşı etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamızda antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilen izolatlar da mağara toprakların izole edilmiş olup Gram pozitif bakteriler *S. aureus* ve *L. monocytogenes*' e karşı aktivite sırasıyla %15 ve %10, *C. albicans*'a karşı aktivite %13 olarak belirlenmiştir.

Liu vd., (2024) tarafından yürütülen çalışmada mağara kökenli fungus türü *Aspergillus fumigatus*' tan yeni benzofenon bileşikleri cavephenones A ve B keşfedilmiştir. Bileşiklerin antioksidan özellik sergilediği bildirilmiştir.

ABD'de yapılan çalışmada Missouri/ABD' de bulunan mağaradan çeşitli aktinomiset suşları izole edilmiştir. Çalışma sonucunda *Streptomyces sp.* suşunun Caveamides A ve B adlı iki yeni metabolit ürettiği keşfedilmiştir. Caveamide B'nin çeşitli kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite ve MRSA ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği kaydedilmiştir (Hagar vd., 2024).

Yapılan çalışmalar mağaralardan izole edilen mikroorganizmaların yeni biyoaktif metabolitlerin keşfinde önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir

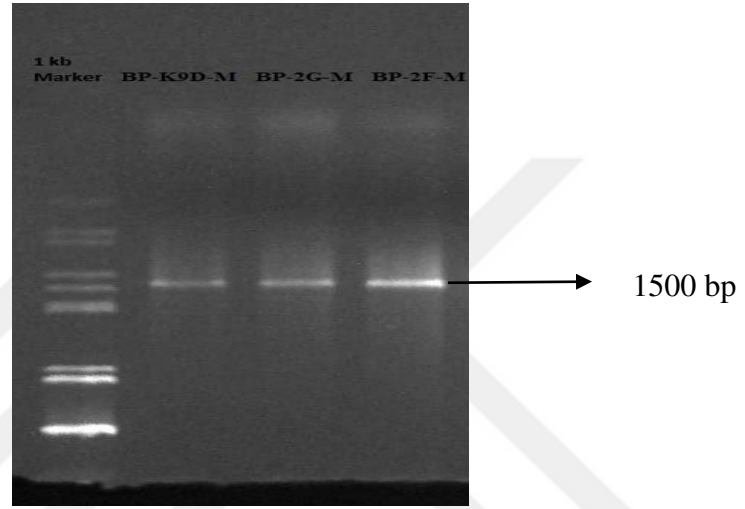
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların Tanılanması

İzolatların Gram boyama, hücre morfolojisi ve koloni morfolojisi özellikleri antimikrobiyal aktivitenin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi çalışmalarında incelenmiş olup, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi çalışmaları sonucunda en az 1 Gram pozitif test organizmasına ve en az 1 Gram negatif test organizmasına birlikte aktivite gösteren ve en az 1 bakteriyel test organizması ile en az 1 fungal test organizmalarına karşı birlikte aktivite gösteren izolatlar için endospor boyama yapılmıştır. 13 izolat için endospor boyama yapılmış ve 2 izolat için endospor yapısı gözlemlenmiştir. Çoklu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi çalışmaları sonucunda belirlenen 3 izolat için endospor yapısı görülmemiştir. Endospor boyama testi sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. İzolatların endospor boyama testi sonuçları ve hücre morfolojisi

İzolat No	Endospor Boyama	Hücre Morfolojisi
D-K4C-N	-	Kok/kokobasil
D-K4D-N	-	Basil/streptobasil
BP-2F-M	-	Kok
BP-2G-M	-	Basil
İ-3A-M	-	Kok
İ-4A-M	-	Basil
İ-7B-N	-	Kok
Y-K1J	-	Kok
D-3C-N	-	Basil
K-K4D-M	+	Basil/kokobasil
K-K3A-N	+	Basil/streptobasil
D-K4H-N	-	Basil
BP-K9D-M	-	Basil

Çoklu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi çalışmaları sonucunda seçilen 3 izolatın 16S rRNA gen bölgesi için PZR amplifikasyonu yapılmıştır. PZR çalışmasında 8F ve 1492R universal primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri elektroforez ile %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda yaklaşık 1500 baz çifti boyutunda bantlar görülmüştür (Şekil 4.4). Elde edilen PZR ürünlerinden çift yönlü dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi BM Labosis firması tarafından yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda yapılan tür tanılaması ve NCBI erişim numaraları Tablo 4.5' te verilmiştir.



Şekil 4.5. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucunda görüntülenen bant görünümleri

Çizelge 4.7. İzolatların tür tanılaması ve NCBI erişim numaraları

İZOLAT KODU	TÜR	NCBI ERİŞİM NUMARASI
BP-2F-M	<i>Arthrobacter spp.</i>	OQ300212
BP-2G-M	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	OQ300137
BP-K9D-M	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	OQ300132

Çalışmamızda tür tanılaması yapılan çoklu antimikrobiyal aktivite sergileyen 3 izolatın *Actinobacteria* şubesine ait olduğu belirlenmiştir. *Actinobacteria*, mağara habitatlarında baskın bakteri şubelerinden biridir ve türlerinin çoğu, hem su hem de karasal ekosistemlerde bulunan serbest yaşayan mikroorganizmalardır. Çeşitlilikleri, yeni antibiyotik maddeler de dahil olmak üzere biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretiminde çok yönlülük gibi bu grubun ana özelliklerini sağlamaktadır. *Actinobacteria*, yeni

antibiyotiklerin araştırılmasında, keşfedilmesinde ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynayan doğal ürünlerin zengin bir kaynağını temsil etmektedir (Zhao vd., 2018).

Tatlı su sedimentlerinden izole edilen çeşitli *Streptomyces* türleri ile yapılan çalışmada *Streptomyces* türlerinin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* ve *C. albicans* suşlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca etkili *Streptomyces* suşlarının çeşitli uçucu organik bileşikleri ve trimetoprim, flukanazol, ketoconazol, rifamisin antibiyotiklerini ürettiği bildirilmiştir (Zothanpuia vd., 2018).

Joshua vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada denizle ilişkili bir ekosistemden elde edilen aktinomiset izolatlarının çoklu ilaca dirençli insan patojenlerine karşı etkisinin taranması amaçlanmıştır. İzolatların metisiline duyarlı ve dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi gözlemlenmiştir. *Acinetobacter baumannii*'ye karşı aktif olan 2 suş için 16S rRNA filogenetik analizi yapılmıştır. Suşlar *Streptomyces antibiotikus* ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* olarak tanımlanmıştır. *Streptomyces rubiginosohelvolus* olarak tanımlanan suş *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes* ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* 'a karşı antibakteriyel aktivitesi saptanmıştır. Çalışmamızda *S. aureus* suşu test organizması olarak kullanılmış, *S. rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşunun *S. aureus* 'a karşı etkisi görülmemiştir.

Lacey (2022) tarafından toprak kökenli *Actinobacteria* türleri ile yapılan çalışma *Streptomyces* spp.'in zengin sekonder metabolit çeşitliliğini ortaya çıkarmıştır. *Streptomyces* spp.'in spektroskopik yapısal analizi ve biyoaktivite profili sonucunda altı yeni konglobatin analogu ve 4 yeni aromatik asit ve yeni bir armeniaspirol C2 analogu bildirilmiştir.

Mağaralardan izole edilen aktinomisetler, antibakteriyel, antioksidan ve antikanser aktiviteleri olan yeni biyoaktif bileşikler nedeniyle son yıllarda artan bir ilgi görmüştür. Literatür araştırmaları, başta *Streptomyces*, *Micromonospora* ve *Nocardiosis* olmak üzere birçok aktinomiset cinsinin mağara ekosistemlerinde bulunduğunu göstermektedir. Mağara aktinomisetleri arasında *Streptomyces*, yaygın olarak bulunması, hayatta kalma yetenekleri ve metabolik çok yönlülüğü nedeniyle en çok çalışılan cinstir (Farda vd., 2022). Çalışmamızda çoklu antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlenen BP-K9D-M izolatu *S. rubiginosohelvolus* olarak tanımlanmıştır.

Szczelina Chochołowska Mağarasından (Tatra Dağları, Polonya) izole edilen *Actinobacteria* türleri ile yapılan çalışmada iki yeni *Streptomyces* suşunun antibakteriyel, antifungal ve antikanser etkileri araştırılmıştır. *Streptomyces* suşlarının *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* test suşlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Jaroszewicz

vd., 2021). Çalışmamızda *Streptomyces rubiginosohelvolus* suşunun en az bir Gram pozitif ve Gram negatif bakteri ve fungal test organizmasına karşı etkili olduğu görülmüştür.

Rhodococcus cinsine ait bakteriler, metabolik çok yönlülükleri, çok çeşitli organik bileşikler parçalama yetenekleri ve metal toksisitesi, kuruma ve yüksek konsantrasyonda organik çözücüler gibi çeşitli stres koşullarına karşı dirençleri nedeniyle mikrobiyal biyoteknoloji uygulamaları için idealdir. *Rhodococcus* cinsi, klorlu alifatik ve aromatik hidrokarbonlar, çeşitli toksik moleküller dahil olmak üzere çok çeşitli organik bileşikler biyolojik olarak parçalama kapasiteleri nedeniyle, biyoremediasyon, biyotransformasyon ve biyokataliz uygulamaları için büyük ölçüde araştırılmıştır (Cappelletti vd., 2020).

Kitagawa vd., (2018) tarafından çeşitli bakteri kültürü koleksiyonlarından 80 *Rhodococcus* suşunun biyoaktivitesi incelenmiştir. Beş farklı *Rhodococcus* türüne ait 18 suşun antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında *R. erythropolis* türüne ait çok sayıda suşun antibiyotik ürettiği saptanmıştır. Çalışmada *R. erythropolis* suşları antibiyotik üretimine göre gruplara ayrılmıştır. Özellikle antibiyotik üreten suşlardan biri olan *R. erythropolis* JCM 6824'ün yeni bir kinolin antibiyotik olan aurachin RE ürettiği açıklanmıştır. Aurachin, Gram pozitiflere karşı güçlü bir aktivite sergilemiştir. *Rhodococcus erythropolis* JCM 2895 suşunda bakteriyosin benzeri molekül ve yapısal geni (rap) saptanmıştır.

Yellamanda vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada *Rhodococcus spp.* suşunun biyoaktivitesi belirlenmiş ve biyoaktif bileşenlerin analizi yapılmıştır. Bu suştan izole edilen bileşiklerin Gram pozitif ve Gram negatif bakteri, maya ve küflere karşı biyoaktivitesi belirlenmiştir. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Corynebacterium diphtheriae* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etkinin daha belirgin olduğu, maya ve funguslara karşı ise daha az etki görüldüğü kaydedilmiştir. Çalışmamızda yapılan antimikrobiyal aktivite testlerinde *R. erythropolis* suşunun hem bakteriyel hem fungal suşlara karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Ramlawi vd., (2022) tarafından çeşitli *Arthrobacter spp.* suşları ile yapılan çalışmada *Arthrobacter humicola* M9-1A, M9-2 ve M9-8 suşlarının ve *Arthrobacter psychrophenicus* M9-17 suşunun antimikrobiyal aktivitesi in vitro olarak dokuz bitki patojenine karşı değerlendirilmiştir ve suşların hücresiz süpernatantları domates meyvesinde siyah küf hastalığının baskılanmasında denenmiştir. Sonuçlar, *A. humicola* M9-1A ve *A. psychrophenicus* M9-17'nin test mikroorganizması yedi patojenin büyümesini en çok inhibe eden ve azaltan suşlar olduğunu göstermiştir. *A.*

psychrophenicus M9-17'nin hücresiz filtratları çoğu patojenin büyümesini azaltmıştır. Suşların birine ait hücresiz süpernatant haricinde tüm hücresiz bakteriyel süpernatantların domates meyvesindeki siyah küfün gelişimini baskıladığı görülmüştür. Ayrıca süpernatantların *Alternaria alternata*'nın misel gelişimini azalttığı belirlenmiştir. *A. psychrophenicus* suşunun antifungal tetrapeptid olan Arthropeptide A ürettiği belirlenmiştir. Çalışmamızda *Arthrobacter* sp. suşunun antibakteriyel aktivite ile birlikte *Penicillium* sp. suşuna karşı antifungal etkisi de saptanmıştır.

Arctic Okyanusundan izole edilen *Arthrobacter* spp. suşunun *V. anguillarum* ve *S. aureus* suşlarının gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. *Arthrobacter* sp. suşundan elde edilen ekstraktların LC-MS analizi ile sekonder metabolit profili ortaya koyulmuştur. Analiz sonuçları ekstraktlarda arthrobasilin A, B ve C antibiyotiklerinin bulunduğunu göstermiştir (Wietz vd., 2012).

Khangkhui Mağarasından (Manipur, Hindistan) izole edilen *Arthrobacter globiformis* suşu ile yürütülen çalışmada bu suşun sekonder metabolit gen kümeleri araştırılmıştır. *Arthrobacter globiformis* genomunun analizi, desferrioksamın biyosentetik gen kümeleri, streptomisin biyosentetik gen kümeleri, sideroforlar, tip III poliketid sentaz gen kümesini içeren sekonder metabolit gen kümeleri ile benzerlik olduğunu göstermiştir (Sahoo vd., 2019).

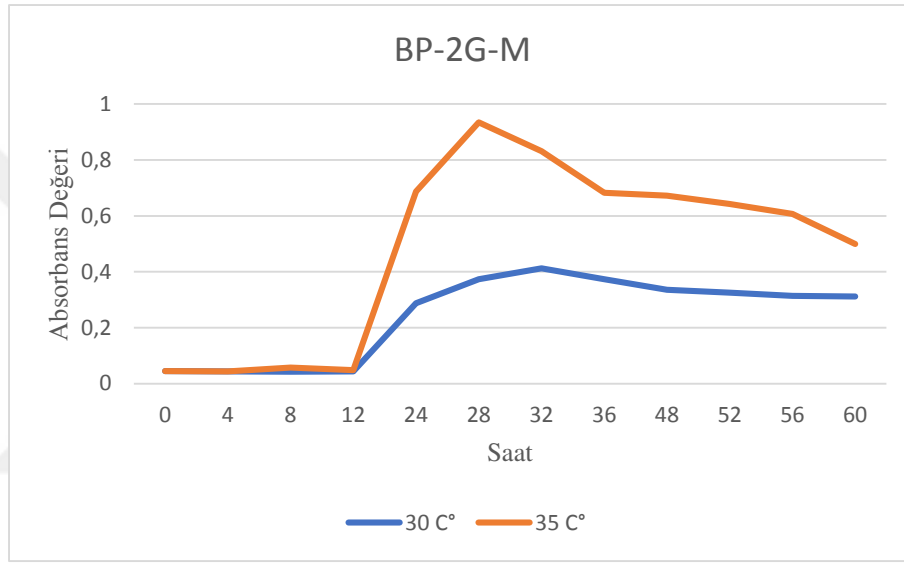
Toprak kökenli mikroorganizmalar ile yapılan çalışmada toprak kökenli *Arthrobacter* sp. suşlarının Gram pozitif ve Gram negatif patojen bakterilerine karşı etkili olduğu kaydedilmiştir (Bernacchi vd., 2024). Çalışmamızda *Arthrobacter* sp. BP-2G-M suşunun Gram pozitif bakteri *L. monocytogenes*'e ve Gram negatif bakteri *P. aurescens*'e karşı etkili olduğu görülmüştür.

Chen vd., (2024) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces* sp. M5205 suşunun kültür sıvılarından doğal ürünlerin antifungal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Fusarium* sp., *Neopestalotiopsis* sp ve *Colletotrichum gloeosporioides* suşlarına karşı aktivite kaydedilmiştir. Bzim çalışmamızda *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşu fungal test organizmalarından *Penicillium* sp.'a karşı etkili bulunmuştur.

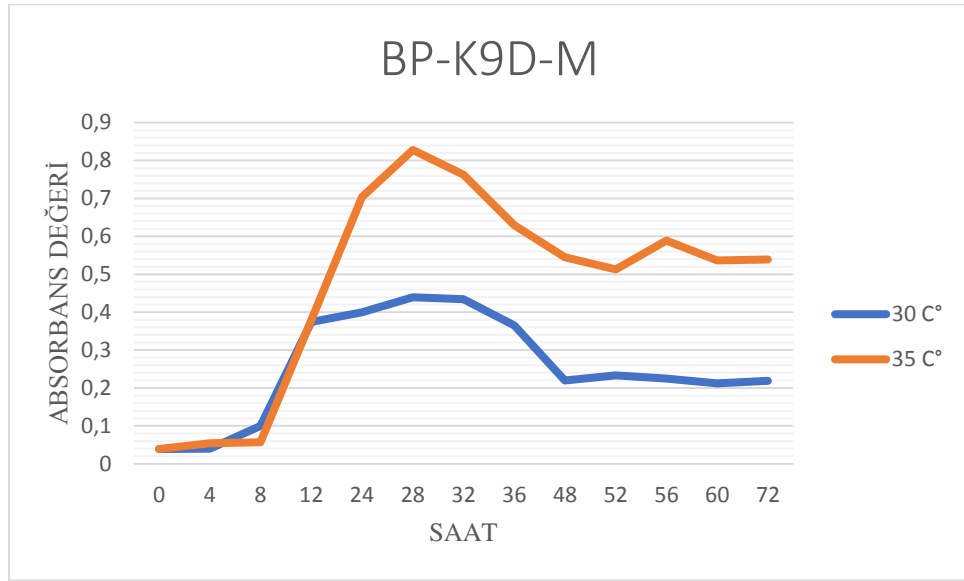
Nepal'de farklı toprak ekosistemlerinden izola edilen mikroorganizmalar ile yürütülen çalışmada *Streptomyces* sp. PC1 suşunun Gram pozitif ve Gram negatif patojen bakterilerine karşı etkili olduğu ve çeşitli polipeptid, alkaloid, amino bileşikler, diketopiperazin metabolitlerini ürettiği kaydedilmiştir (Thapa vd., 2024). Çalışmamızda *S. rubiginosohelvolus* (BP-K9D-M) suşunun Gram pozitif bakteri *L. monocytogenes*'e ve Gram negatif bakteri *P. aurescens*'e karşı etkili olduğu görülmüştür.

4.6. Antimikrobiyal Bileşiklerin Üretimi İçin Kültür Büyüme Parametrelerinin Optimizasyonu

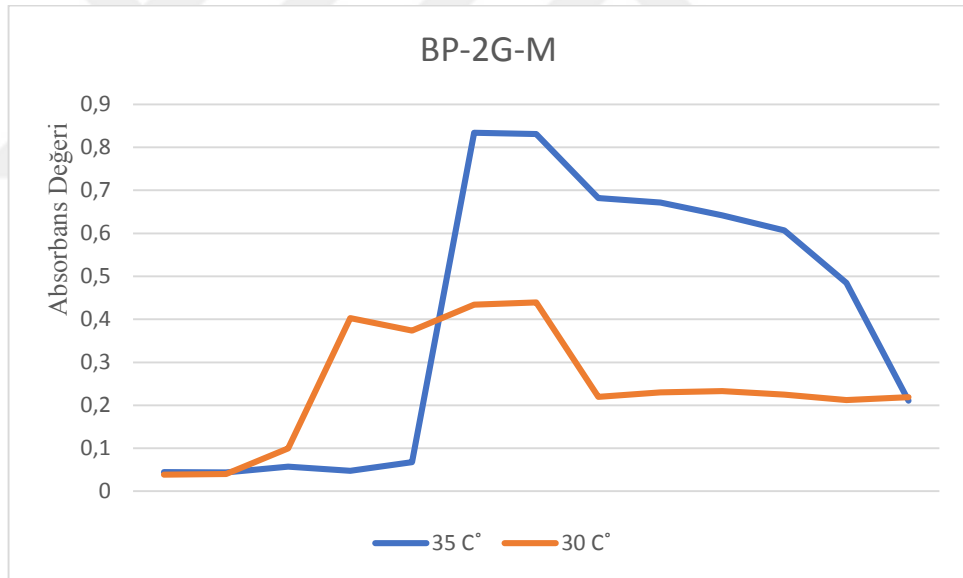
Optimizasyon çalışmalarında çoklu antimikrobiyal aktiviteye sahip ve filogenetik tanılması yapılan *Arthrobacter spp.* Bp-2F-M, *R. erythropolis* BP-2G-M ve *S. rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşları için optimum gelişme koşulları ve antimikrobiyal etkinin görüldüğü optimum koşullar belirlenmiştir. Tüm izolatların 30 ve 35 °C sıcaklıkta geliştiği görülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.6. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatının farklı sıcaklıklarda büyüme eğrisi grafiği



Şekil 4.7. *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatının farklı sıcaklıklarda büyüme eğrisi grafiği



Şekil 4.8. *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatının farklı sıcaklıklarda büyüme eğrisi grafiği

Farklı sıcaklık koşulları ile gerçekleştirilen denemelerde logaritmik fazın başından itibaren alınan süpernatant örnekleri eşit hacimde disklerle emdirilerek tüm izolatların etkili oldukları *P. aureginosa*' ya karşı denenerek en yüksek zon çapına sahip olduğu üretim koşulu ve zaman belirlenmiştir.

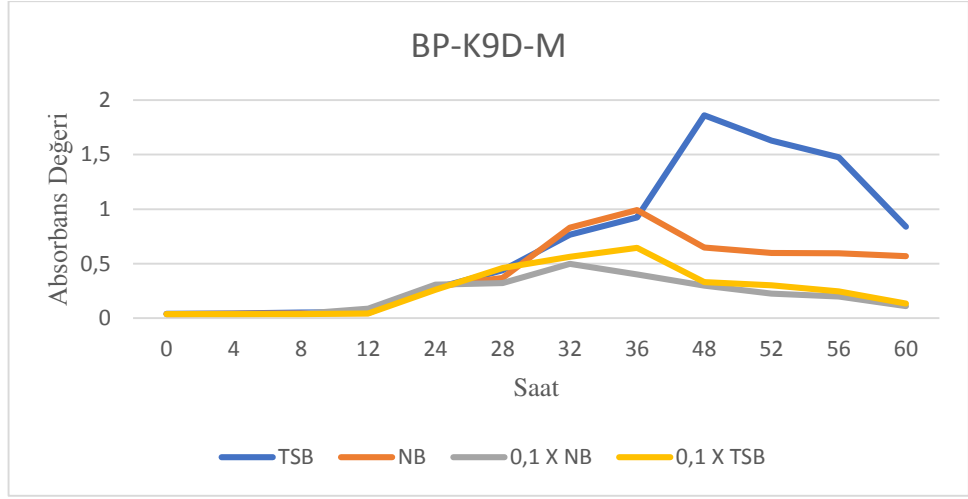
Çizelge 4.8. Farklı sıcaklıklarda geliştirilen izolatların disk difüzyon testinde oluşturdukları zon çapları (mm)

	<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M		<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M		<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	
SAAT/SICAKLIK	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C
24	10	8	10	10	*	10
28	11	8	10	10	*	10
32	10	10	10	*	*	10
36	10	8	10	*	9	10
48	11	9	10	*	10	10
52	11	8	10	*	12	10
56	11	8	10	*	10	10
60	11	8	8	*	12	10
72	11	8	10	*	12	10
76	-	-	11	*	-	-

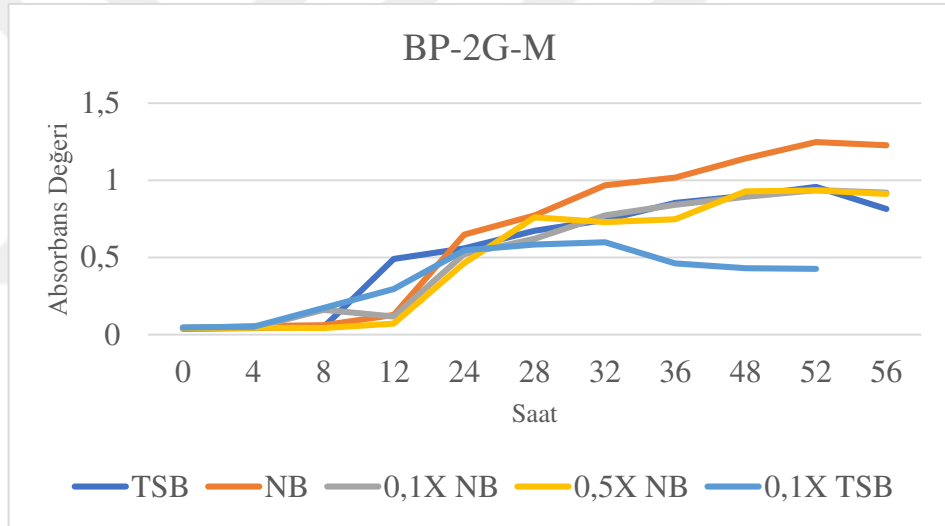
* : Zon oluşumu görülmemiştir.

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda BP-2F-M ve BP-2G-M izolatlarının 30 °C’ de, BP-K9D-M izolatının ise 35 °C de optimum gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre optimum antimikrobiyal aktivitenin görüldüğü sıcaklıklar ise BP-2F-M izolatı için 35 °C iken, diğer iki izolat için 30 °C olarak belirlenmiştir.

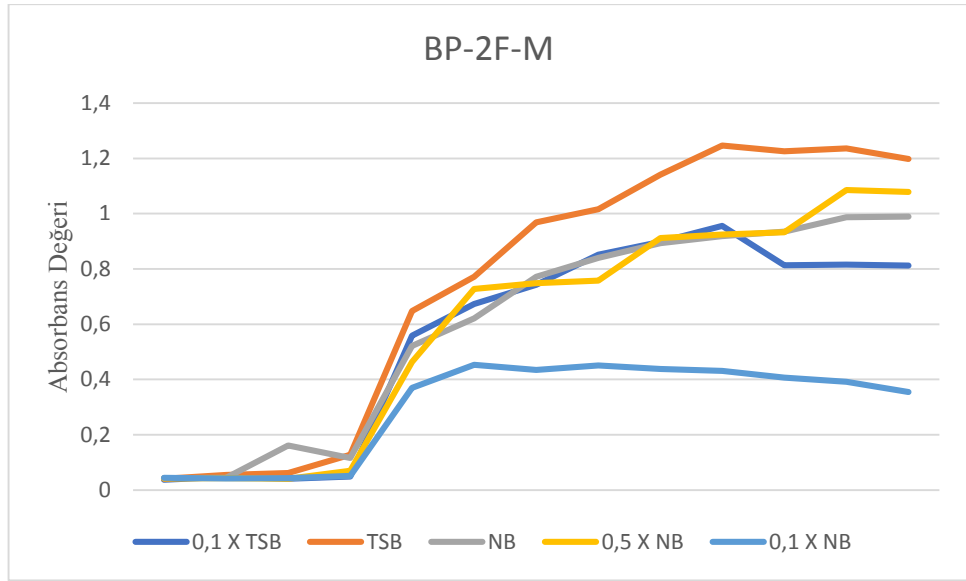
İzolatların optimum antimikrobiyal aktivite gösterdiği besiyerlerinin belirlenmesi için 0,1X Nutrient broth, 0,5X Nutrient broth, Nutrient broth, TSB ve 0,1X TSB ortamları kullanılmıştır. Tüm izolatlar önceki aşamada belirlenen optimum sıcaklıkta çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. BP-2F-M izolatı 35 °C’ de diğer iki izolat ise 35 °C’ de inkübe edilmiştir. Çalışılan kültürlerden periyodik olarak (4 saatte bir) örnek alınarak 600 nm’ de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Tüm izolatların 0,1X Nutrient broth, 0,5 X Nutrient broth, Nutrient broth, TSB ve 0,1X TSB ortamlarında geliştiği görülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11).



Şekil 4.9. *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP- K9D-M izolatının farklı gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafiği



Şekil 4.10. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatının farklı besiyerlerinde gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafikleri



Şekil 4.11. *Arthrobacter sp.* BP- 2F-M izolatının farklı besiyerlerinde gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafikleri

Farklı besiyerleri ile gerçekleştirilen denemelerde logaritmik fazın başından itibaren alınan süpernatant örnekleri eşit hacimde disklerle emdirilerek tüm izolatların etkili oldukları *P. aureginosa*'ya karşı denenerek en yüksek zon çapına sahip olduğu üretim koşulu ve zaman belirlenmiştir (Çizelge 4.9 ve 4.10).

Çizelge 4.9. Farklı besiyerlerinde geliştirilen *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Rhodococcus erytropolis* BP-2G-M izolatların disk difüzyon testinde oluşturdukları zon çapları (mm)

Denenen Suşlar										
İnkübasyon zamanı 										

* : Zon oluşumu görülmemiştir.

** : Belirtilen saatlerde ölçüm yapılmamıştır. İnkübasyon süresi belirtilen saatlerden önce tamamlanmıştır.

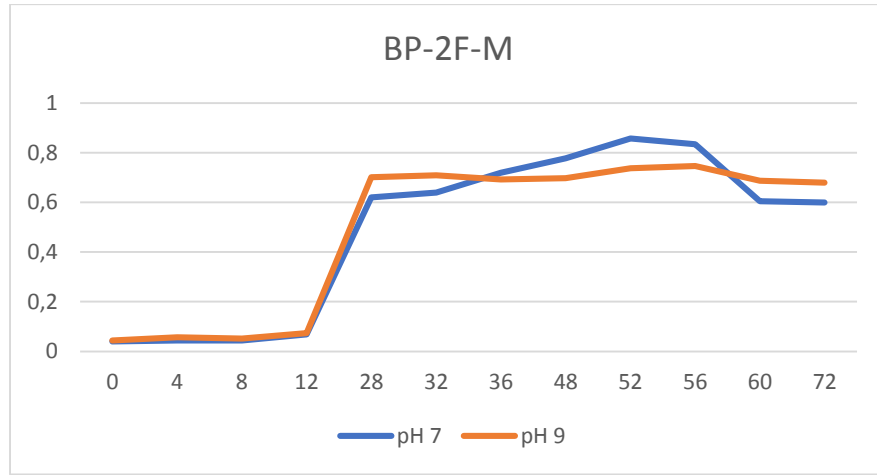
Spektrofotometrik ölçümler sonucunda *Rhodococcus erythropolis* BP-2F-M ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatlarının TSB besi yeri ortamında, BP-2G-M izolatının ise Nutrient broth besi yeri ortamında optimum gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre optimum antimikrobiyal aktivitenin görüldüğü besi yeri ortamları ise *Rhodococcus erythropolis* BP-2F-M izolatı için 0,1X TSB, *Arthrobacter sp.* BP-2G-M izolatı için Nutrient Broth, *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatı için ise 0,5X Nutrient Broth olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı besiyerlerinde geliştirilen *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatların disk difüzyon testinde oluşturdıkları zon çapları (mm)

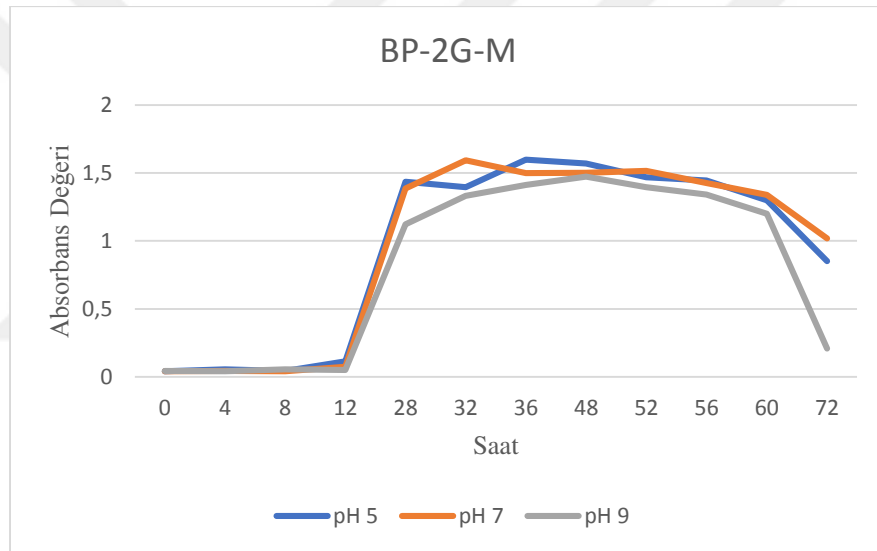
<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M					
SAAT/BESİYERİ	0,1X TSB	TSB	0,1X NB	0,5X NB	NB
24	*	*	10	*	8
28	*	*	11	*	8
32	*	*	10	*	10
36	*	*	10	*	8
48	*	*	11	*	8
52	11	*	11	*	8
56	11	*	11	*	8
60	11	*	11	*	8

* : Zon oluşumu görülmemiştir.

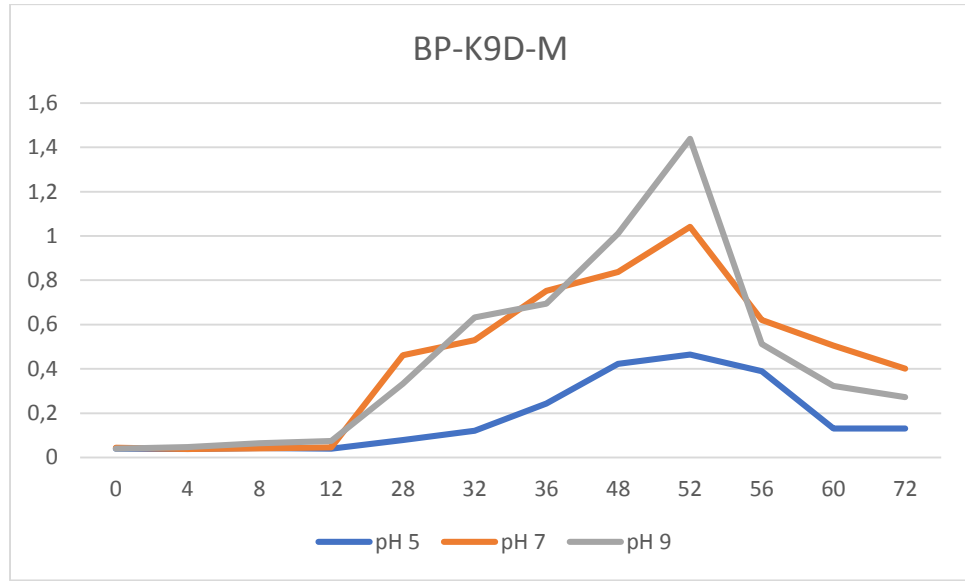
Antimikrobiyal bileşiklerin üretimi için uygun besiyerlerinin belirlenmesinden sonra belirlenen besiyerleri pH 5, 7 ve 9 olacak şekilde hazırlanmıştır. İzolatlar farklı pH değerlerindeki besiyerinde ve önceki aşamalarda belirlenen optimum sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Kültürlerden periyodik olarak (4 saatte bir) örnek alınarak 600 nm’ de spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatı için pH 5 ortamında üreme görülmemiştir. Ölçüm sonuçlarına göre büyüme eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.12. *Arthrobacter sp.* BP- 2F-M izolatının farklı pH içeren gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafikleri



Şekil 4.13. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatının farklı pH içeren gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafiği



Şekil 4.14. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatının farklı pH içeren besi yeri ortamlarında gelişimini gösteren büyüme eğrisi grafiği

Farklı pH içeren besi yeri ortamları ile gerçekleştirilen denemelerde logaritmik fazın başından itibaren alınan süpernatant örnekleri eşit hacimde disklerle emdirilerek tüm izolatların etkili oldukları *P. aureginosa* test organizmasına karşı denenerek en yüksek zon çapına sahip olduğu üretim koşulu ve zaman belirlenmiştir

Çizelge 4.11. Farklı pH değerlerinde geliştirilen izolatların *P. aureginosa*'ya karşı oluşturdukları zon çapları (mm)

pH İnkübasyon zamanı (sa)	Denenen Suşlar						
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M			<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M		<i>Arthrobacter</i> sp. BP-2F-M	
	5	7	9	7	9	7	9
28	*	*	*	*	*	9	8
32	8	8	*	*	*	9	8
36	9	9	*	*	*	9	8
48	9	9	*	*	*	9	8
52	8	9	*	*	*	9	8
56	9	11	9	*	9	9	8
60	9	8	11	*	9	9	8
72	*	*	*	*	9	*	8

* : Zon oluşumu görülmemiştir.

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda BP-2F-M izolatı için pH 5'te üreme görülmezken pH 7 ve 9'da yakın değerlerde üreme görülmüştür. BP-2F-M izolatının hem optimum gelişim hem de optimum antimikrobiyal etki gösterdiği üretim koşulu pH 7

olarak belirlenmiştir. BP-2G-M izolatının pH 5, 7 ve 9’ da gelişim gösterdiği değerler birbirine yakın olarak belirlenirken, disk difüzyon testleri sonucunda optimum üretim koşulu pH 7 olarak belirlenmiştir. BP-K9D-M izolatı için hem optimum gelişim hem de optimum antimikrobiyal aktivite pH 9’ da görülmüştür.

Sıcaklık, pH, besiyeri parametreleri ile yapılan disk difüzyon testleri sonuçlandıktan sonra izolatlar etkili oldukları diğer test organizmalarına karşı belirlenen optimum parametreleri ve farklı pH değerlerini içeren ortamlarda denenmiştir. Eşit hacimde emdirilen ve en yüksek inhibisyon zonunun gerçekleştiği üretim koşulları antimikrobiyal madde üretim koşulları olarak belirlenmiştir. Farklı üretim koşulları ile gerçekleştirilen denemelerin sonucunda ölçülen zon çapları Çizelge 4.12 ve 4.13’te verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı pH değerlerinde geliştirilen izolatların *Penicillium sp.*’a karşı oluşturdukları zon çapları (mm)

pH İnkübasyon zamanı	DENENEN SUŞLAR					
	<i>Rhodococcus erytropolis</i> BP-2G-M			<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M		
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
28	*	*	*	*	*	*
32	*	*	*	*	*	*
36	8	*	*	*	*	*
48	*	*	*	*	8	*
52	*	*	*	*	8	*
56	*	*	*	*	8	*
60	*	*	*	*	*	*
72	*	*	*	*	*	*

* : Zon oluşumu görülmemiştir.

Çizelge 4.13. Farklı pH değerlerinde geliştirilen izolatların *L. monocytogenes*’ e karşı oluşturdukları zon çapları (mm)

pH İnkübasyon zamanı	DENENEN SUŞLAR				
	<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M		<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M		
	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9
28	8	12	*	*	*
32	8	11	*	*	*
36	8	11	*	*	*
48	8	11	*	8	*
52	8	11	*	8	*
56	8	9	*	9	*
60	8	8	*	9	*
72	8	8	*	9	*

* : Zon oluşumu görülmemiştir.

Penicillium sp. test mikroorganizmasına karşı optimum aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen pH denemelerinde *Arthrobacter sp.* BP-2G-M izolatı için pH 5, *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatı için pH 7 koşullarında optimum antifungal aktivite görülmüştür. *L. monocytogenes* test mikroorganizmasına optimum aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen pH denemelerinde ise *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatı için pH 9, *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatı için pH 7 koşullarında optimum aktivite görülmüştür. *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatı *Penicillium sp.* 'a karşı etkili olmadığı için optimizasyon çalışmalarında bu suşa karşı denenmemiştir. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatı ise *L. monocytogenes* 'e karşı etkili olmadığı için optimizasyon çalışmalarında bu suşa karşı denenmemiştir. Tüm optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum antimikrobiyal madde üretim koşulları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum antimikrobiyal madde üretim koşulları

İZOLATLAR	SICAKLIK	BESİYERİ	pH	SAAT
<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M	35 °C	0,1X TSB	9	52
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	30 °C	Nutrient broth	7	48
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	30 °C	0,5X Nutrient broth	9	56

Kruber-Voronja Mağarasından izole edilen 874 mikroorganizma kültürü ile yürütülen çalışmada izolatların %14'ünün antibakteriyel aktivite sergilediği belirlenmiştir. İki izolat, iki Gram pozitif test mikroorganizmasına karşı yüksek aktiviteleri nedeniyle optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları için seçilmiştir. Her iki suşun *Firmicutes* şubesinde yer alan *Bacillaceae* familyasına ait olduğu belirlenmiştir. Antibakteriyel bileşiklerin üretimini optimize etmek amacıyla besin konsantrasyonu, besi yeri ortamı, pH, sıcaklık ve havalandırmanın kültür büyümesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Besin konsantrasyonunun etkilerini belirlemek için 1X Tryptic Soy Broth (TSB), 0,5X TSB ve yüksek oranda besleyici içeriği bulunan BHI Broth kullanılmıştır. pH'ın etkisini test etmek için, büyüme ortamı 50 mM Tris-HCl tamponunda pH 7, 8 ve 9 olarak hazırlanmıştır. Suşlardan biri için en yüksek optik yoğunluk (600 nm) ve en yüksek antimikrobiyal aktivite 0,5X TSB ortamında görülmüştür. Diğer suş için TSB ve 0,5X TSB'de benzer maksimum optimum yoğunluk ve antibakteriyel aktivite elde edilmiştir ancak büyüme oranının 0,5X TSB'de daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada

pH 7 besi yeri ortamı ve 30 °C sıcaklık her iki suş için optimum büyüme ve antimikrobiyal etki parametreleri olarak belirlenmiştir (Klusaite vd., 2016). Çalışmamızda da mağaralardan izole edilen suşların optimum gelişme ve üretim koşulları belirlenmiş olup *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatları için en yüksek absorbans değeri 1X TSB ortamı için belirlenmiştir. *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatının en yüksek zon çapında aktivite gösterdiği besiyeri 0,1X NB ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatı için ise 0,5X Nutrient broth olarak belirlenmiştir. Optimum büyüme 3 izolat için de 35 °C'de gerçekleşirken optimum antimikrobiyal aktivite 2 izolat için 30 °C bir izolat için 35 °C'de görülmüştür. Hem optimum büyüme hem de optimum antimikrobiyal etki pH 7 ve pH 9' da görülmüştür.

Khatab vd., (2016) tarafından yürütülen çalışmada Kızıl Deniz (Sudan) toprak sedimentlerinden izole edilen 50 *Streptomyces spp.* suşunun yüksek verimde antimikrobiyal etkisini belirlemek için kültür büyüme koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* test organizmalarına etkili izolatların optimum aktiviteleri TSB ortamında, farklı sıcaklık ve farklı pH içeren ortamlarda yapılan denemelerle belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda *Streptomyces sp.* suşlarının optimum aktivite sergilediği koşullar 7- 7,5 pH ve 30 °C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşunun optimum antimikrobiyal aktivite gösterdiği sıcaklık 30 °C iken optimum pH'ın 9 olduğu belirlenmiştir.

Ibnouf (2021) tarafından Sudan, Hartum'daki farklı yerlerden toplanan toprak örneklerinden izole edilen aktinomiset suşları ile antimikrobiyal aktivite çalışması yapılmıştır. Suşlar Gram pozitif, Gram negatif bakteri, maya ve funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Test mikroorganizması olarak *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *A. niger* ve *C. albicans* kullanılmıştır. Sıcaklık, pH ve ışık, çalkalama, havalandırma ve fermentasyon süresi gibi çeşitli fermentasyon koşulları da maksimum antibiyotik üretimi için yapılandırılmıştır. 62 izolattan %18'inin test organizmalarından en az birine karşı aktif olduğu görülmüştür. Bir suşun (O-7), diğer izolatlardan çok daha geniş bir spektrum gösterdiği belirlenmiştir. Bu suş için optimum fermentasyon koşulları sıcaklık 28 °C, pH 7.0, çalkalama 180 rpm ve fermentasyon süresi 96 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda iki izolatın antimikrobiyal madde üretimi için optimum sıcaklık 30 °C iken bir izolat için de 35 °C olarak belirlenmiştir. İzolatların biri pH 7'de

diğer ikisi pH 9'da daha fazla aktivite göstermiştir. Optimum koşulların sağlandığı fermentasyon süreleri ise 48, 52 ve 56. saat olarak belirlenmiştir.

4.7. Antimikrobiyal Maddenin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

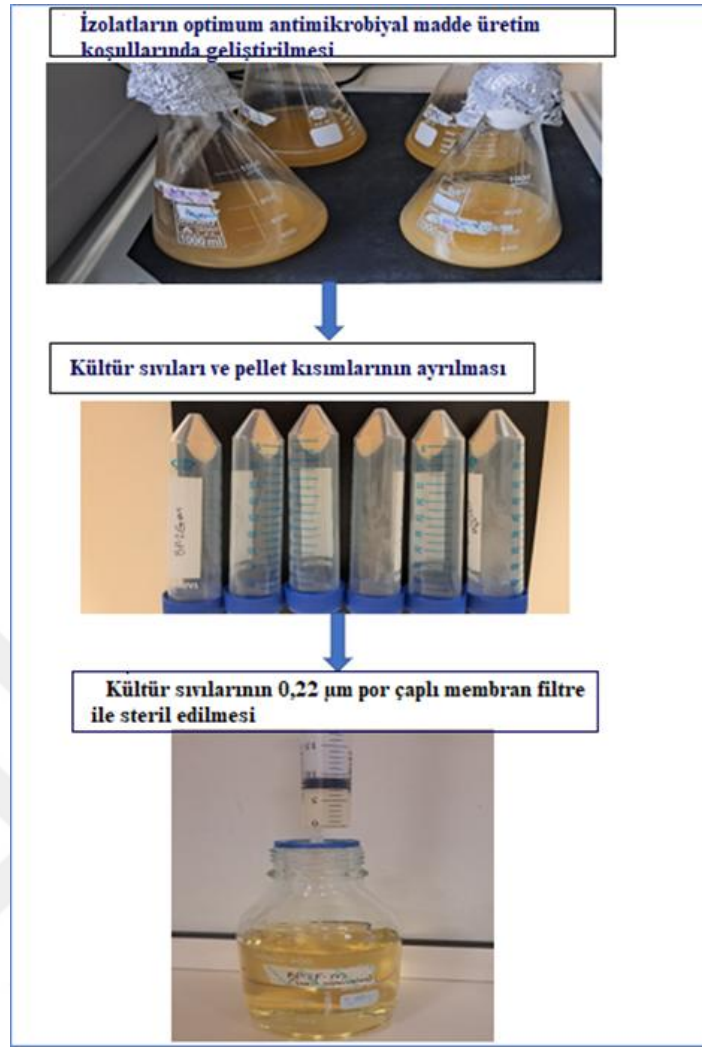
Antimikrobiyal etkili maddenin ekstraksiyonu kültür sıvılarının toplanması, antimikrobiyal etkili maddenin protein tabiatında olup olmadığının belirlenmesi ve protein konsantrasyonunun belirlenmesi ve etil asetat ekstraksiyonu aşamalarından oluşmaktadır. Antimikrobiyal etkili maddenin saflaştırılmasında ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Antimikrobiyal etkili bileşiklerin karakterizasyonu ise HPLC analizi ile yapılmıştır.

4.7.1. Kültür Sıvılarının Toplanması

Antimikrobiyal etkili maddenin ekstraksiyonu için 500 ml hacminde sıvı besi yerinde üretim yapılmıştır. Üretim koşulları optimizasyon çalışmaları sonucunda her bir izolatın optimum aktivite gösterdiği parametrelere göre belirlenmiştir. *Arthrobacter sp.* BP-2F-M izolatı için 0,1X TSB besiyeri pH 9 değerinde ayarlanarak 35 °C'de inkübe edilmiştir. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatı pH 7'ye ayarlanmış Nutrient broth besiyerinde 30 °C 'de inkübe edilmiştir. *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatı ise pH 9' a ayarlanmış 0,5X Nutrient broth besiyerinde 30 °C 'de geliştirilmiştir. Tüm izolatlar 180 rpm'de 56 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kültür sıvıları 8000 g de 10 dakika (+4 °C) santrifüjlenerek hücresiz süpernatantlar (CFS) steril eppendorf tüplere aktarılmış, steril 0,22 µm membran filtreden geçirilmiştir. Pelletlerin kuru ağırlıkları Çizelge 4.15' te verilmiştir. Kültür sıvılarının toplanması çalışmasının aşamaları Şekil 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. İzolatların 500 ml üretim hacminde ölçülen kuru ağırlıkları

SUŞLAR	Kuru Madde Ağırlığı (gr/ 500 ml)
<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M	5,23
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	1,31
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	13,33



Şekil 4.15. Kültür sıvılarının toplanması deneyinin aşamaları (Yücel, 2017)

4.7.2. Protein Tayini

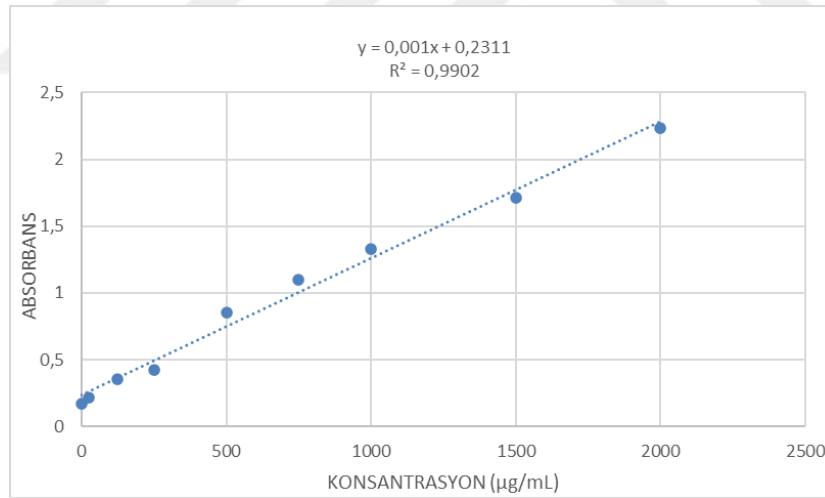
Antimikrobiyal maddenin protein tabiatında olup olmadığının belirlenmesi için aktivitesi önceden bilinen süpernatantlara son hacim 1 mg/ml olacak şekilde proteinaz K eklenmiştir. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların aktivitesi etkili oldukları bir indikatör mikroorganizmaya karşı disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş zon çapları (mm) ölçülmüştür (Çizelge 4.16). Disk difüzyon testi sonucunda aktif süpernatanta proteinaz K uygulamasından sonra *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatının antimikrobiyal aktivitesinin tamamen kaybolduğu, *Arthrobacter sp.* BP-2F-M ve *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatlarının ise aktivitesinde azalma olduğu görülmüştür. Proteinaz K ilavesinin aktivite kaybı ve azalmasına neden olması nedeniyle antimikrobiyal etkili maddenin protein yapısında olduğu düşünülmektedir. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların oluşturduğu zon çapları Şekil 4.17'

de verilmiştir. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların antimikrobiyal aktivite testleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Örneklerdeki protein miktarları Bradford metoduyla ölçülmüştür. Yöntemin test kiti talimatlarına göre uygulanmasını takiben 562 nm spektrofotometrik ölçüm sonucuna göre protein standart eğrisi oluşturulmuş (Şekil 4.16) ve kültür sıvılarının protein konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Spektrofotometrik ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır.

Çizelge 4.16. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların disk difüzyon testi sonucunda oluşturdukları zon çapları (mm)

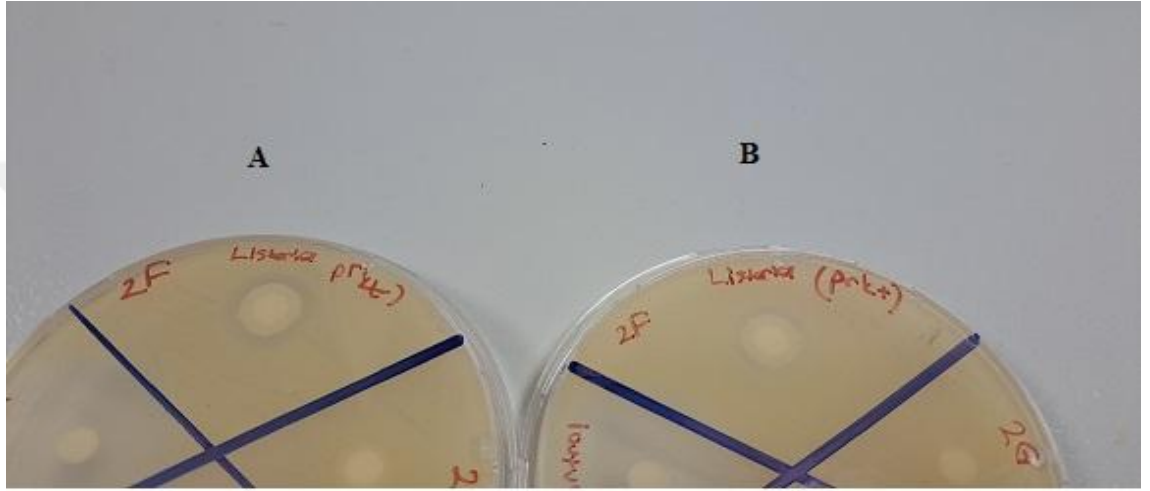
SUŞLAR	Proteinaz K İlave Edilmeyen Süpernatantların Oluşturduğu Zon çapı(mm)	Proteinaz K İlave Edilen Süpernatantların Oluşturduğu Zon çapı (mm)
<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M	18 $\pm$ 1,0	14 $\pm$ 1,15
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	12 $\pm$ 0,57	9 $\pm$ 0,57
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	11 $\pm$ 0,57	-



Şekil 4.16. BSA standart grafiği

Çizelge 4.17. Kültür sıvılarının Bradford protein tayin yöntemi sonucunda belirlenen protein konsantrasyon değerleri

SUŞLAR	Kültür Sıvılarının Protein Konsantrasyonu (µg/ml)
<i>Arthrobacter spp.</i> BP-2F-M	1073±0,40
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	1986±0,55
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	2151±0,76



Şekil 4.17. Proteinaz K eklenen ve eklenmeyen süpernatantların *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivitesi

- A. Proteinaz K eklenmeyen BP-2F-M süpernatantının oluşturduğu zon çapı
B. Proteinaz K eklenen BP-2F-M süpernatantının oluşturduğu zon çapı

Zampolli vd., (2022) tarafından yapılan çalışmada *Rhodococcus opacus* R7 suşunun antimikrobiyal özelliklere sahip biyosüpfaktan sınıfına ait yeni bir biyoaktif bileşik üretme yeteneği ortaya çıkarılmıştır. MIC testi yapılarak *R. opacus* R7 biyosüpfaktan peptidinin *Escherichia coli* ATCC 29522 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538'e karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlenmiştir. Saflaştırılmış biyosüpfaktanın toplam protein konsantrasyonu Bradford Protein Tayini metoduyla belirlenmiştir. Ekstraktın proteinaz K'ye duyarlılığının değerlendirilmesi için saflaştırılmış biyosüpfaktan, optimum pH değerinde proteinaz K'ye (1:4) maruz bırakılmıştır. Aktivite agar kuyu difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar Proteinaz K ile muamelenin saflaştırılmış biyosüpfaktan bileşiğinin *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 6538'e karşı antimikrobiyal aktivitesinin, proteinaz K ile muamele

edilmemiş numunede değişmezken Proteinaz K muamelesi sonucunda azaldığını göstermiştir. İzole edilen bileşiğin kimyasal ve biyokimyasal analizleri, biyosürfaktanın hidrofobik bir peptit olarak sınıflandırılabilceğini göstermiştir.

Girma ve Aemiro (2022) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole edilen *Streptomyces* suşlarının gıda kaynaklı bakteriyel patojenlere karşı etkisi araştırılmıştır. Toplam 118 aktinomiset suşu izole edilmiş, 3 Gram pozitif ve 3 Gram negatif bakteri suşuna karşı aktivitesi incelenmiştir. 118 izolattan yaklaşık %30'u test edilen bakterilerin en az ikisine karşı aktif olarak değerlendirilmiştir ve 8 *Streptomyces* suşu geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite göstermeleri nedeniyle sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre izolatlardan elde edilen etil asetat ekstraktlarının zon çapları 7-24 mm arasında değişmektedir. *Streptomyces* hücresiz kültür süpernatantlarının proteinaz K, papain, amilaz ve lizozim enzimleri ilave edilerek aktivitesi değerlendirilmiştir. Proteinaz K eklenen süpernatantların oluşturduğu zon çaplarının 8 mm ve daha az değerlere düştüğü belirlenmiştir. Çalışmamızda *Arthrobacter* sp. BP-2F-M ve *R. erytopolis* BP-2G-M suşlarının Proteinaz K ilavesinden sonra aktivitesinin azaldığı, *S. rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşunun ise aktivitesinin kaybolduğu görülmüştür.

Saad vd., (2015) tarafından yapılan çalışmada *Lactobasillus acidophilus*' tan ekstrakte edilen bakteriyosinin farklı pH değerlerine, ısı işlemlere ve proteinaz K enzimine karşı stabilitesinin ortaya koyulması amaçlanmıştır. Çalışmada bakteriyosinlerin *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışma sonuçları bakteriyosinin Gram pozitif bakteriler üzerindeki etkisinin Gram negatif bakterilere göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. *L. acidophilus* tarafından üretilen bakteriyosinin en yüksek inhibisyon zonu *B. subtilis*'e karşı, düşük inhibisyon zonu ise *E. coli*' ye karşı elde edilmiştir. Proteinaz K enzimine duyarlılığı test etmek için, 1 ml ham bakteriyosine pH 7'de 1 mg/ml konsantrasyonda proteinaz K ilave edilmiştir. Hem kontrol örnekleri hem de enzim içeren örnekler agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktivite açısından test edilmiştir. Proteinaz K içeren örneklerde aktivite saptanmamıştır. Çalışmamızda *S. rubiginosohelvolus* BP-K9D-M izolatının aktivitesinin proteinaz K ilavesinden sonra kaybolduğu gözlemlenmiştir.

4.7.3. Antimikrobiyal Maddenin Ekstraksiyonu

Antimikrobiyal maddenin ekstraksiyonu için etil asetat çözücüsü kullanılmıştır. Steril kültür sıvıları ve etil asetat çözücüsü 1:1 oranında musluklu ayırma hunilerinde karıştırıldıktan sonra organik faz steril falcon tüplerde toplanmıştır. Kültür sıvısı ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre kültür sıvısı ekstraktlarında aktivite kaybı gözlemlenmemiştir. Kültür sıvılarının protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiş olup konsantrasyon değerleri Çizelge 4.18' de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Kültür sıvılarının protein konsantrasyonu

İZOLAT KODU	Kültür Sıvısı Ekstraktlarının Protein Konsantrasyonu (µg/ml)
<i>Arthrobacter spp.</i> BP-2F-M	1198 ±0,78
<i>R. erythropolis</i> BP-2G-M	1643±0,44
<i>S. rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	1795±0,77

Tayland'da bulunan mangrov sedimentlerinden izole edilen *Streptomyces* örnekleri ile yürütülen çalışmada *S. omiyaensis* SCH2 suşunun hücresiz süpernatantlarından elde edilen etil asetat ekstraktının antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. *S. omiyaensis* tarafından üretilen sekonder metabolitlerin belirlenmesi için 21 gün boyunca %3 NaCl (w/v) içeren ISP2 fermantasyon ortamı kullanılmıştır. Kültür filtratı etil asetat ile ekstre edilmiştir. Kimyasal bileşenler, GC-MS analizi ile tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları, *S. omiyaensis* ekstraktının antibakteriyel ve antioksidan aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. GC-MS analizi, biyolojik aktivitelerden sorumlu olabilecek ana kimyasal bileşenlerin, asetamid ve pirolpirazin olduğunu ortaya koymuştur. *S. omiyaensis* ekstraktının, farmasötik ve tıbbi uygulamalar için potansiyel doğal antibakteriyel ve antioksidan ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Tangjitjaroenkun, 2018).

Suudi Arabistan' da yapılan çalışmada çöllerden 10 farklı bölgeden alınan toprak örneklerinden morfolojik olarak farklı 134 *Actinobacteria* suşu elde edilmiştir. Ön tarama sonucunda bu izolatlardan 16'sının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. *Streptomyces sp.* olarak tanımlanan bir izolatın hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere ve ayrıca funguslara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces sp.*'nin etil asetat ekstraktının *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı etkili olduğu ayrıca MCF-7 insan meme adenokarsinom hücrelerine karşı güçlü sitotoksiste gösterdiği belirlenmiştir.

Biyoaktif bileşğin HPLC ile saflaştırılması ve GC-MS analizi ile karakterizasyonu sonucunda aktif bileşğin yeni bir piridin alkoloidi olduğu bildirilmiştir (Nithya vd., 2018).

Ambarwati vd., (2020) tarafından yapılan çalışmada *Streptomyces sp.* suşunun etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Streptomyces sp.* CRB46 suşu Endonezya'nın Cemoro Sewu yaylasında *Cyperus rotundus L.*' den izole edilmiştir. *Streptomyces sp.*'nin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için ilk taramada *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* FNCC 0060, *E. coli* ATCC 35281 ve *C. albicans* olmak üzere 4 test mikroorganizması kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin ikinci taramasında *Streptomyces spp*' nin süpernatantının ve pelletinin etil asetat ekstraktlarının aktivitesi test edilmiştir. Çalışma sonuçları süpernatant etil asetata ekstraktının test mikroorganizmalarına karşı pelletlerin etil asetat ekstraktına göre daha etkili olduğunu göstermiştir. LC MS analizi ile ekstraktın 20 organik bileşik karışımından oluştuğu görülmüştür. FTIR analizi ile, ekstraktlarda 16 fonksiyonel grup bulunmuştur. Ayrıca AntiSMASH analizine göre *Streptomyces spp.* CRB46 tarafından üretilen altı bileşğin kimyasal yapısı tanımlanmıştır. Çalışma sonuçları *Streptomyces sp.* CRB46 suşunun, mikrobiyal enfeksiyon tedavisi için kullanılabilecek biyoaktif bileşikler üretme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ile birlikte *Arthrobacter spp.* BP-2F-M ve *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M izolatlarının kültür sıvıları için etil asetat ekstraksiyonu yapılmıştır. Pelletler için ise etil asetat ekstraksiyonu yapılmamıştır. Elde edilen pelletler HPLC analizi ile fenolik bileşiklerin belirlenmesinde, ekstraktlar ise HPLC ve LC-MS analizleri ile organik asitler, antibiyotikler ve diğer metabolitlerin belirlenmesinde kullanılmıştır.

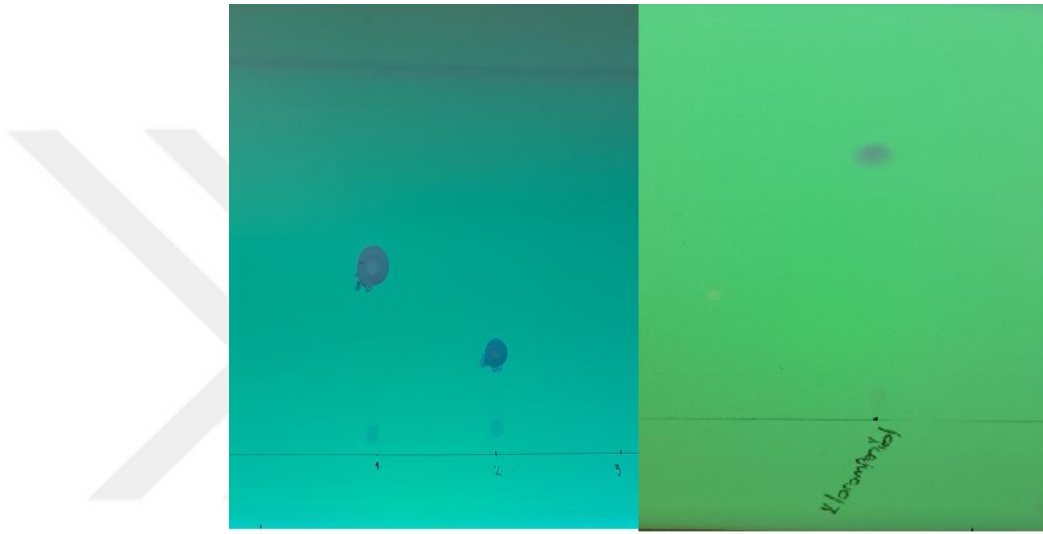
4.7.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Etil asetat ekstraksiyonundan sonra elde edilen ekstrakt içindeki maddelerin polaritelerine göre oluşacak spotları belirlemek amacıyla TLC yapılmıştır. TLC deneyi filogenetik çoklu antimikrobiyal aktivite gösteren *Arthrobacter spp.*, BP-2F-M, *R. erythropolis* BP-2G-M ve *S. rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşlarından elde edilen ekstraktlar ve kloramfenikol antibiyotiği için yapılmıştır. Çalışma sonucunda 3 ekstraktın da tek spot oluşturduğu görülmüştür. Hesaplanan R_F (geciktirme faktörü) değerlerine göre BP-2F-M izolatının ekstraktı ile kloramfenikolün aynı R_F değerine sahip olduğu

görülmüştür. R_F (geciktirme faktörü) değerleri Çizelge 4.19’ da oluşan spotların görünümleri Şekil 4.18’ de verilmiştir.

Çizelge 4.19. Ekstraktların ince tabaka kromatografisi sonucunda belirlenen R_F (geciktirme faktörü) değerleri

SUŞLARA	R_F (Geciktirme Faktörü)
<i>Arthrobacter sp</i> BP-2F-M	0,65
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	0,54
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	0,36
Kloramfenikol	0,65



Şekil 4.18. İnce tabaka kromatografisi sonucunda görüntülenen spotlar

TLC; küçük organik doğal ve sentetik ürünlerin analizi ve izolasyonu için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Gibbons, 2012). Vaijyanthi vd., (2012) tarafından yapılan çalışmada Orathanadu, Thanjavur (Hindistan)’dan karasal topraklardan çeşitli *Actinobacteria* suşları izole edilmiştir. Karasal toprak örneğinden toplam 10 aktinobakteri izole edilmiş ve morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre karakterize edilmiştir. İzolatlar *Actinobispora spp.*, *Actinosynnema spp.*, *Actinoplanes spp.*, *Agromyces spp.*, *Actinomadura spp.*, *Jonesia spp.*, *Catellatospora spp.*, *Micromonospora spp.*, *Microtetraspora spp.* ve *Nocardia spp.* olarak tanımlanmıştır. Suşların antibakteriyel aktivitesi, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacter aerogenes* patojenlerine karşı belirlenmiştir. Antibakteriyel bileşiğin saflaştırılması ince tabaka kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Actinobispora sp.* için TLC plakasında üç biyoaktif bölge (nokta) tespit edildi. Biyoaktif bileşiklerin fonksiyonel grupları FT-IR

ve UV spektral çalışmaları ile belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise antimikrobiyal maddelerin TLC plakasında tek spot oluşturduğu görülmüştür. Antimikrobiyal ekstraktların içinde bulunan metabolitlerin metanol: kloroform çözücüsü ile aynı etkileşime girebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte ekstraktların silika jel plakada ve metanol: kloroform çözücüsü ile spot oluşturması etkili maddenin polar olabileceğini düşündürmektedir.

Sreenivasan vd., (2022) tarafından yapılan çalışmada çeşitli şifalı bitkilerden endofitik *Actinobacteria* örnekleri izole edilerek klinik patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. 11 şifalı bitkiden izole edilen 50 *Actinobacteria* kültürünün %58'i test edilen 9 patojenden en az ikisine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Phyllanthus niruri* yapraklarından izole edilen KCA1 suşu ise test edilen 9 patojenin tümüne karşı maksimum inhibisyon bölgesi göstermiştir. KCA1 suşu, 9 günlük inkübasyon sırasında katı hal fermantasyonunda maksimum düzeyde antimikrobiyal metabolit üretimi sergilemiştir. KCA1 suşunun etil asetat ekstraktı TLC ile analiz edilmiş ve iyi ayrılmış üç spot gözlemlenmiştir. TLC biyootografik analizinde geciktirme faktörü değeri 0,82 olan bir noktanın *Staphylococcus aureus*'u inhibe ettiği belirlenmiştir. İnce tabaka kromatografisinde belirlenen aktif fraksiyon ayrıca gaz kromatografisi-kütle spektral analizi ile karakterize edilmiştir. Analiz sonuçları, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan 2,4-di-tert-bütilfenol, 1-heksadekanol ve 1-nonadesen gibi üç bileşiğin varlığını ortaya koymuştur.

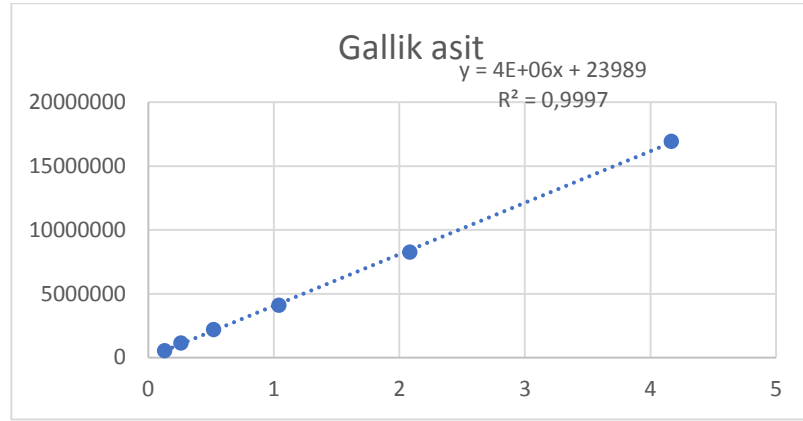
Bizim çalışmamızda da *Arthrobacter sp.* BP-2F-M, *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M olmak üzere 3 *Actinobacteria* suşundan elde edilen ekstraktlar ve kloramfenikol ince tabaka kromatografisi için kullanılmıştır. Çalışma sonucunda tüm ekstraktlar için tek spot oluşumu görülmüştür.

4.7.5. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Karakterizasyonu

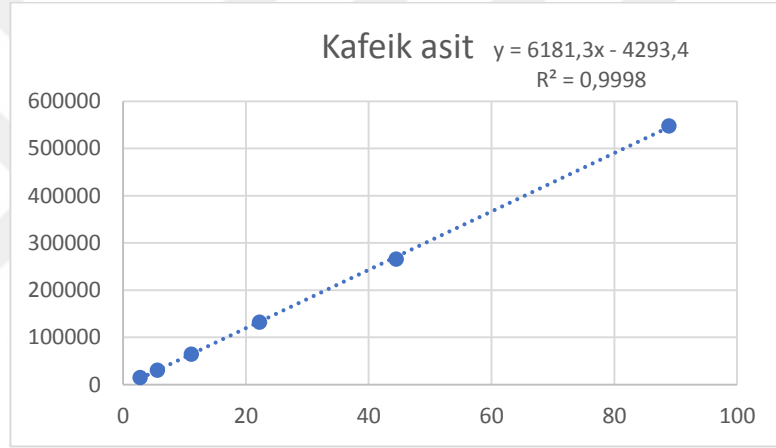
4.7.5.1. Antimikrobiyal etkili maddenin HPLC analizi ile karakterizasyonu

Arthrobacter sp. BP-2F-M, *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşlarından elde edilen antimikrobiyal etkili maddelerin karakterizasyonu HPLC analizi ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri sonucunda antimikrobiyal etkili maddelerin içeriğinde bulunan çeşitli fenolik bileşikler, organik asitler, vitaminler ve miktarları belirlenmiştir.

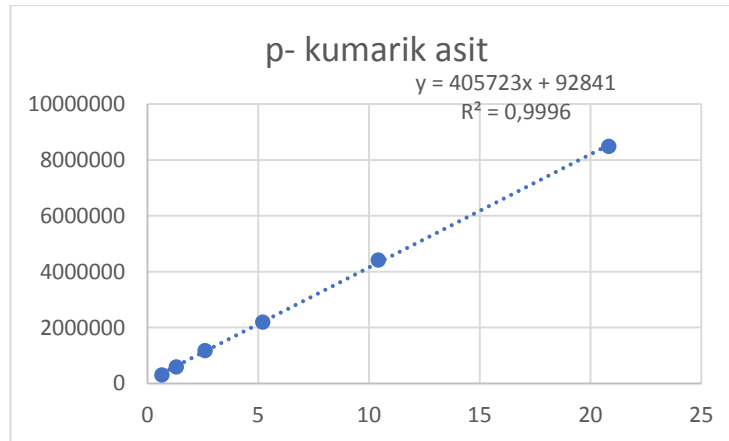
HPLC analizi için kullanılan fenolik bileşiklerin standart grafikleri Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25'te verilmiştir.



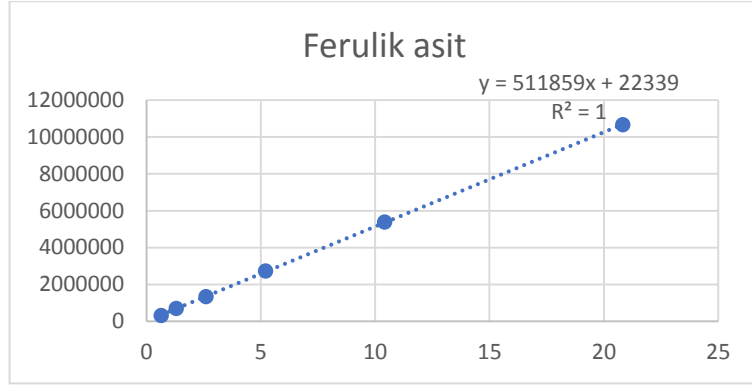
Şekil 4.19. Gallik asit kalibrasyon grafiği



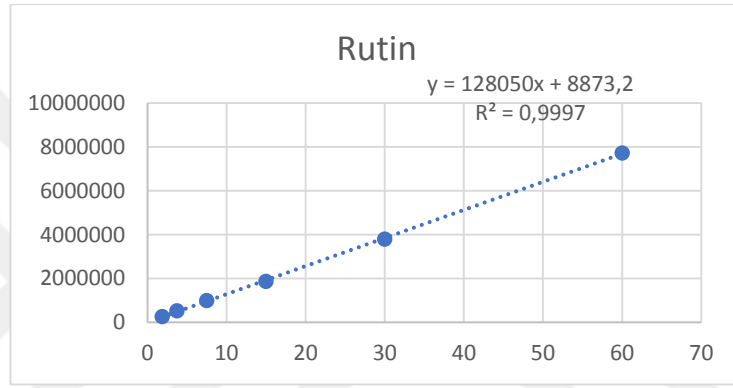
Şekil 4.20. Kafeik asit kalibrasyon grafiği



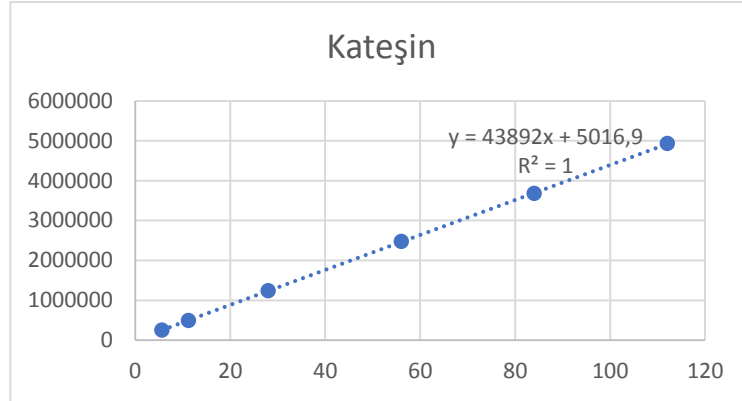
Şekil 4.21. p-kumarik asit kalibrasyon grafiği



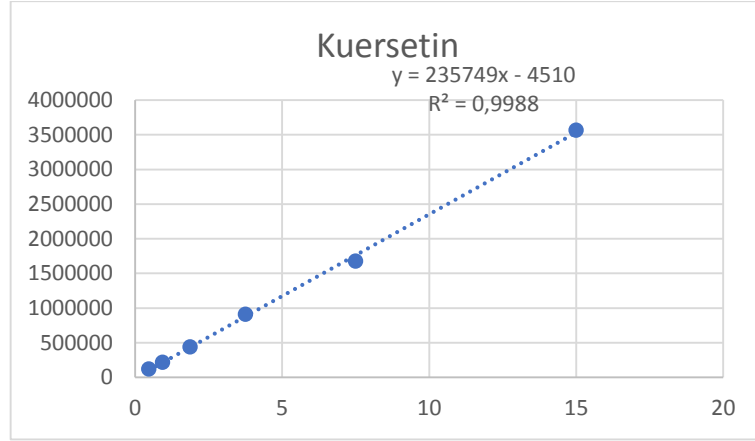
Şekil 4.22. Ferulik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.23. Rutin kalibrasyon grafiği



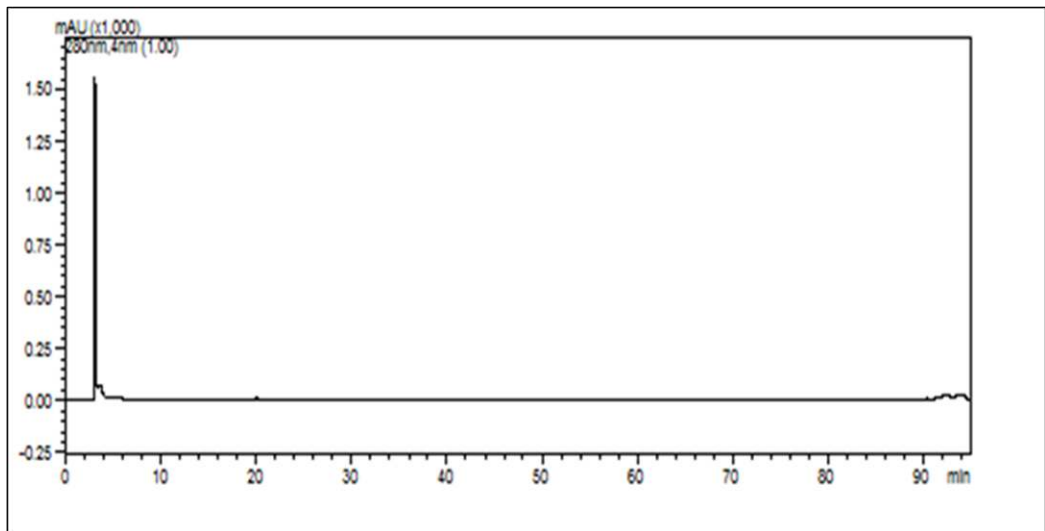
Şekil 4.24. Kateşin kalibrasyon grafiği



Şekil 4.25. Kuersetin kalibrasyon grafiği

Optimum antimikrobiyal madde üretim koşullarında sıvı besiyerinde üretilen suşların ürettiği fenolik bileşikler ve 1 mg örnekte bulunan miktarlar Çizelge 4.21’ de verilmiştir. Fenolik bileşik analizi için numune kromatogramı Şekil 4.26’da verilmiştir.

HPLC analizi sonuçlarına göre tüm izolatların fenolik içeriğinde en yüksek miktarın kafeik asite ait olduğu belirlenmiştir. Ferulik asit üretimi hiçbir izolat için kaydedilmemiştir. p-kumarik asit üretimi *Arthrobacter sp.* BP-2F-M suşunda görülmezken diğer iki suş için saptanmıştır. Kafeik asidi takiben en yüksek miktarda fenolik bileşikler; *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşları için rutin, *Arthrobacter sp.* BP-2F-M suşu için kateşin olarak saptanmıştır.



Şekil 4.26. Fenolik bileşik numune kromatogramı

Çizelge 4.20. HPLC analizi ile belirlenen fenolik bileşikler ve miktarları (ppm)

Suşlar / Bileşikler	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M
Gallik asit	3,760	0,004	3,625
Kafeik asit	31,725	15,456	175,132
p-Kumarik asit	0,101	-	0,376
Ferulik asit	-	-	-
Rutin	26,351	1,225	18,903
Kuersetin	1,315	0,854	7,859
Kateşin	2,033	1,583	9,098

Polifenoller antioksidan, anti-alerjik, anti-inflamatuar, antikanser, antihipertansif ve antibakteriyel özellikler göstermektedir. Polifenoller, bakterilere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sergilemektedir. Polifenoller arasında flavanoller, flavonoller ve fenolik asitler; enzimler ve toksinler gibi bakteriyel virülans faktörlerini inhibe etme, sitoplazmik zarla etkileşime girme ve biyofilm oluşumunu baskılama yetenekleri sayesinde yüksek antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Miklasińska-Majdanik vd., 2018). Çalışmamızda da antimikrobiyal etkisi bilinen ekstraktlarda çeşitli fenolik bileşikler saptanmıştır.

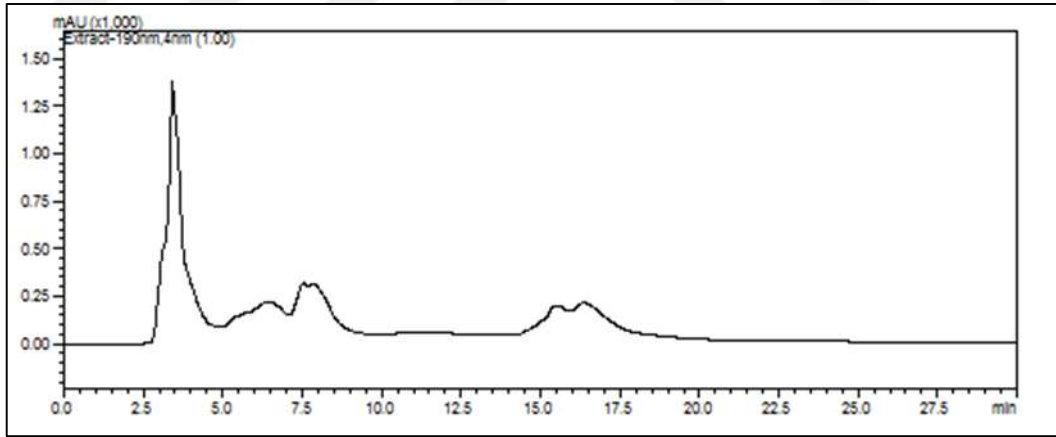
Almuhayawi vd., (2021) tarafından yapılan çalışmada Suudi Arabistan çöllerinden izole edilen *Actinobacteria* suşlarının biyoaktif potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma, izolatların fenolik ve flavonoid içerikleri ile birlikte antioksidan, antibakteriyel ve antiprotozoal aktivitelerine odaklanmıştır. Yüksek biyoaktivite sergileyen 5 *Actinobacteria* izolatının *Streptomyces sp.* türüne ait olduğu belirlenmiş ve bu izolatların fenolik profilleri ortaya koyulmuştur. Çalışma sonuçları seçilen tüm izolatlarda gallik asidin en baskın fenolik bileşik olduğunu göstermiştir. İzolat 21, tüm izolatlar arasında fenolik içerik olarak büyük bir çeşitlilik göstermiştir. İzolat 19' un en yüksek kafeik asit, apigenin ve daidzein seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar ayrıca izolat 2 ve 12'nin sırasıyla en yüksek kuersetin ve luteolin değerlerini içerdiğini göstermiştir. Çalışmamızda da *Actinobacteria* suşlarının ekstraktları fenolik bileşikler açısından değerlendirilmiş ve gallik asit, kuersetin ve kafeik asit tüm ekstraktlarda saptanmıştır.

Çeşitli araştırmacılar kafeik asidin, p-kumarik asit ve rutinden daha güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Stojković vd., 2013). Luis vd. (2014) kafeik asidin etki mekanizmasını incelemiş ve etkinin polifenol-membran etkileşimi ile ilişkili olabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, bir fenolik asit olarak kafeik

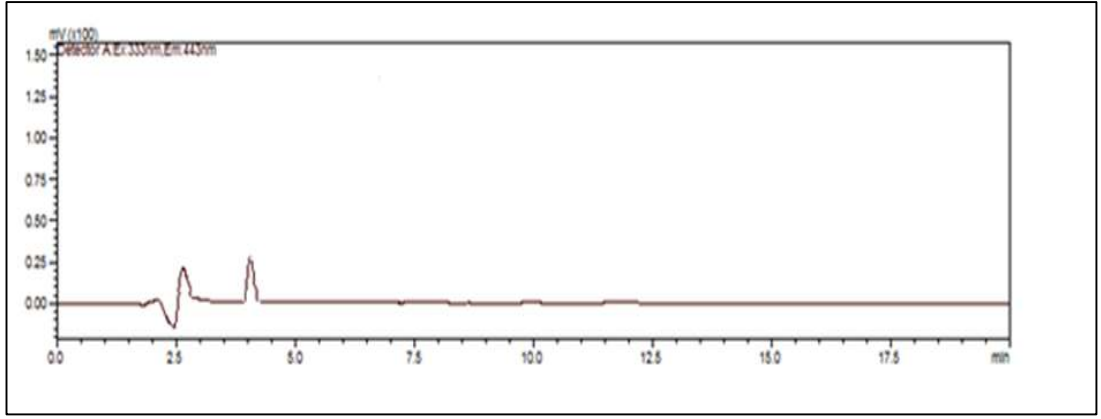
asit, plazma membran proteinlerinin ve/veya lipidlerinin membran disfonksiyonuna yol açan güçlü nükleofilik özelliklere sahiptir (Nguefack vd., 2004).

Zhao vd., (2011) şeker kamışından ekstrakte edilen polifenollerin antibakteriyel etkisini incelemiştir. Ekstraktta bulunan baskın fenolik bileşikler gallik asit başta olmak üzere ferulik, kumarik asit ve klorojenik asitlerden oluşmaktadır. İncelenen karışım 0,625 mg/ml MİK değeri ile *S. aureus* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Araştırmacılar *S. aureus* hücre süspansiyonlarını şeker kamışı ekstraktına maruz bırakarak ve kontrol suşları ile kıyaslayarak ekstraktın antimikrobiyal potansiyeli ile test edilen bakterilerin zar geçirgenliği arasında bir ilişki olup olmadığını değerlendirmiştir. Araştırma sonucunda ekstraktın bakteriyel membran bütünlüğünü etkileyerek hücrel elektrolit sızıntısına neden olduğu öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda kumarik asit *Arthrobacter sp.* BP-2F-M ekstraktında, ferulik asit ise 3 ekstraktta da saptanmamıştır. Gallik asit ise tüm ekstraktlarda saptanmıştır.

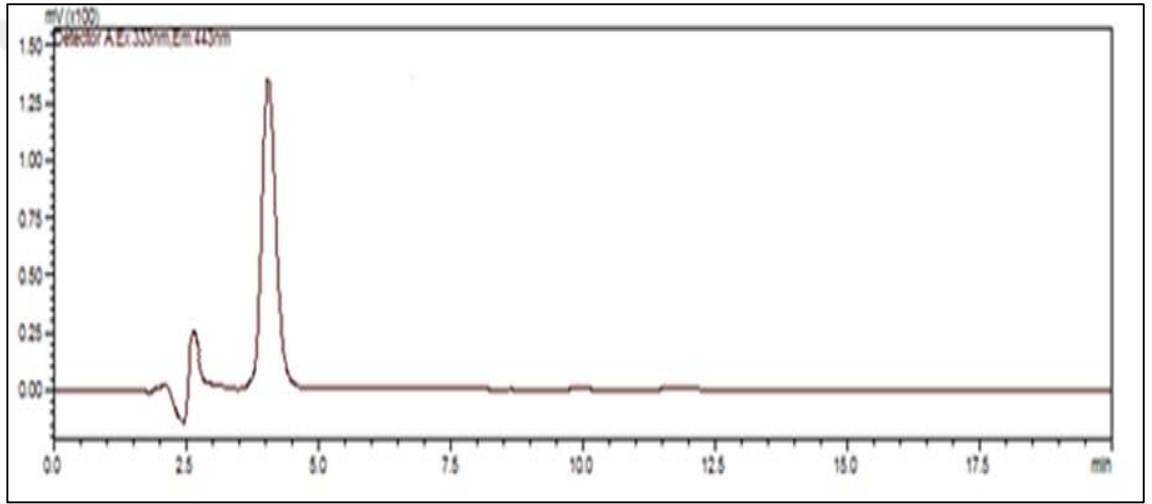
Askorbik asit (Vitamin C) ve α - tokoferol (Vitamin E) analizlerine ait numune kromatogramları Şekil 4.27 ve 4.28’ de, α - tokoferol standardına ait kromatogram Şekil 4.29’da verilmiştir.



Şekil 4.27. Askorbik asit numune kromatogramı

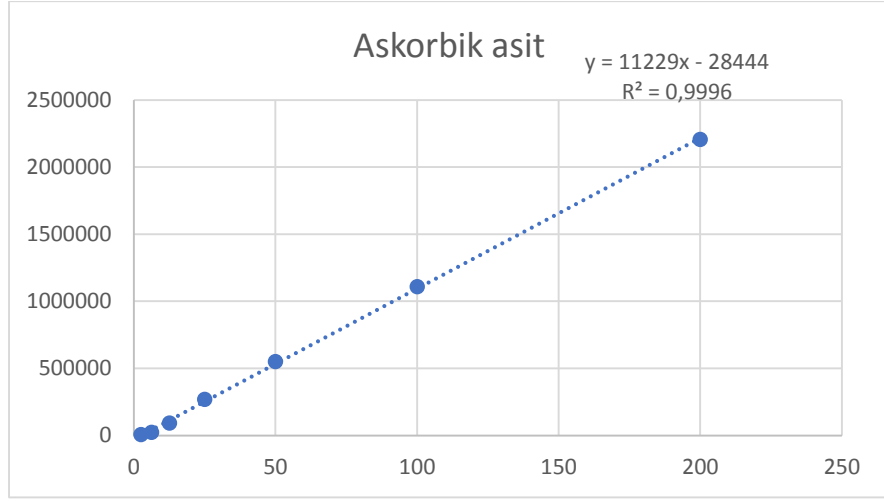


Şekil 4.28. α - tokoferol numune kromatogramı

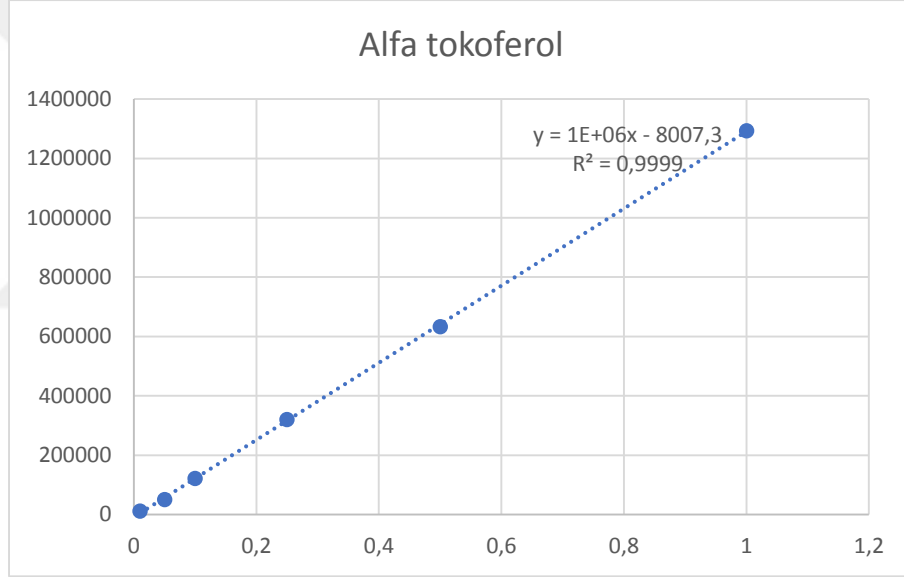


Şekil 4.29. α - tokoferol standart kromatogramı

Askorbik asit (Vitamin C) ve α - tokoferol (Vitamin E) analizlerinde kullanılan standartların kalibrasyon grafikleri Şekil 4.30 ve 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.30. Askorbik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.31. Alfa tokoferol kalibrasyon grafiği

İzolatlara göre saptanan askorbik asit (Vitamin C) ve α - tokoferol (Vitamin E) miktarları Çizelge 4.21’ de verilmiştir.

Çizelge 4.21. HPLC analizi ile belirlenen askorbik asit ve α - tokoferol miktarları

Suşlar	Askorbik asit (mg/kg)	α - tokoferol (μ g /g)
<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M	10,460	0,141
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BP-2G-M	41,755	0,717
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	30,431	0,835

2023'te yapılan çalışmada Cezayir'de bulunan çöl toprağından izole edilen aktinomisetlerde antifungal ve antioksidan aktivitenin tanımlanması, aktivitede etkili bileşenlerin saflaştırılması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 18 izolat incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite testlerinde izolatlar *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* olmak üzere iki Gram pozitif bakteri ve beş fungusa karşı test edilmiştir. 14 izolat, iki bakteriye karşı ve 15 izolat, beş fungus türüne karşı (*Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum* ve *Aspergillus parasiticus*) inhibitör aktivite göstermiştir. Sonuçlara göre güçlü biyoaktiviteye sahip A10 ve A7 kodlu iki *Actinomycetes* suşu seçilmiş ve katı hal fermantasyonu için kullanılmıştır. 28 °C'de 14 günlük inkübasyonun ardından üretilen metabolitlerin ekstraksiyonu için metanol kullanılmıştır. Metanolik ekstraktı, düşük dozları da dahil olmak üzere beş fungus türüne karşı etkili olmuştur. İki ekstraktın kromatografik yöntemlerle karakterizasyonu yapılmış ve antioksidan aktivitesi ölçülmüştür. DPPH testi ile iki ekstraktın ve askorbik asidin IC 50 değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar askorbik asidin antioksidan aktivitesinin ekstraktların aktivitesinden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Belgacem vd., 2023). Çalışmamızda etil asetat ekstraksiyonu yapılmış olup antimikrobiyal aktivite sergileyen *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M, *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Arthrobacter sp.* BP-2F-M ekstraktlarının tümünde askorbik asit saptanmıştır.

Mumtaz vd., (2023) tarafından çalışmada çeşitli sıcaklıklarda (4 °C, 37 °C ve 50 °C) ve pH' da (3, 8 ve 11), farklı konsantrasyonlarda (5, 10 ve 20 mg/ml) C vitamininin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. C vitamininin, *Basillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* Gram pozitif bakterileri ile ve *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* Gram negatif bakterilerine karşı değişen zon çaplarında inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. C vitamininin stabilitesi, çeşitli pH ve sıcaklık değerlerinde gözlemlenmiştir. C vitamininin tüm test bakterilerine karşı asidik

pH' ta (pH 3) en yüksek zon çapına sahip inhibisyon bölgesini gösterdiği, pH 11'de hiçbir inhibisyon zonu görülmediği kaydedilmiştir. Gram negatif bakterilere karşı 20 mg/ml konsantrasyonda daha yüksek zon çapında aktivite grlmştir. Çeşitli sıcaklıklarda (4°C, 37°C ve 50°C) yapılan denemelerde *S. aureus* ve *K. pneumoniae* dışındaki tüm bakteri suşlarına karşı 4 °C'de en yüksek inhibisyon bölgesi grlmştir. En kk inhibisyon zonu tüm bakteri suşlarına karşı 50 °C'de grlmştir, bu sonuçlar sıcaklık arttıķa inhibisyon zon çapının azaldığını göstermektedir. Çalışma sonuçlarına göre C vitamininin gelecekte insanlarda enfeksiyonlarla mücadelede ek tedavi seçeneği olarak kullanılabilecek etkili ve güvenli bir antibakteriyel ajan olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda aksorbik asit saptanan *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M, *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Arthrobacter sp.* BP-2F-M ekstraktların tümü *Pseudomonas aeruginosa* ve 1 fungal test mikroorganizmasına etkilidir.

Andrade vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada alfa-tokoferolün *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'nin çoklu dirençli suşlarına karşı etkisi değerlendirilmiş, kolesterol ve ergosterolün modülatör etki mekanizması ile herhangi bir benzerlik olup olmadığı belirlenmiştir. Alfa-tokoferol solüsyonu mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiş ve minimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. MIC testi sonuçlarına göre standart bakteri suşlarına karşı klinik olarak anlamlı antibakteriyel aktivite gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar 1024 g /ml olarak tespit edilmiştir. Çalışma, oklu dirençli bakterilere karşı alfa-tokoferol tarafından aminoglikozitlerin antibakteriyel aktivitesi ve güçlendirilmesine ilişkin ilk rapordur ve alfa-tokoferolün diğer ilaçlarla birlikte antibiyotik modlatr olarak kullanıldığına dair bir rapor bulunmamaktadır.

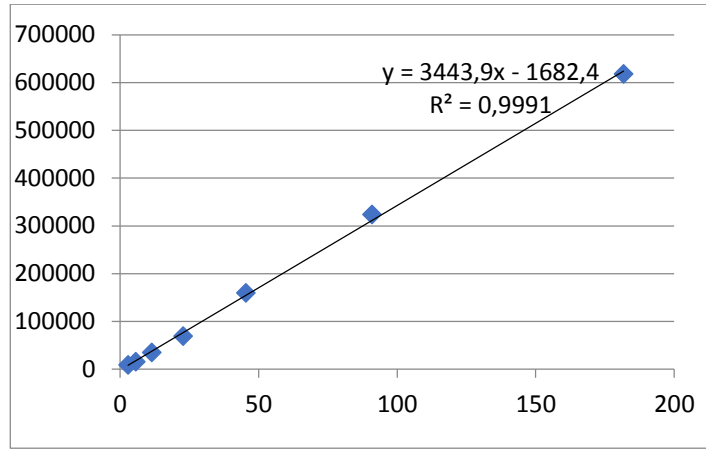
2018'de yapılan bir çalışmada E vitamininin antimikrobiyal duyarlılık üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada kistik fibrozlu hastalarda ciddi solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı Gram negatif bakteri *Burkholderia cenocepacia* kullanılmıştır. *B. cenocepacia*'nın bakterisidal antibiyotiklerin öldürücü olmayan konsantrasyonlarına maruz kalması üzerine hücre dışı bakteriyel lipokalin proteini BcnA ürettiği keşfedilmiştir. BcnA, bakteri hücrelerinin dışındaki bir dizi antibiyotiği yakalayarak hücre dışı antimikrobiyal direnç mekanizması meydana getirmektedir. Çalışmada, BcnA tarafından antibiyotik bağlanması inhibitörleri olarak E vitamininin suda çözünür ve yağda çözünür formları araştırılmıştır. Sonuçlar in vitro olarak, her iki E vitamini formunun da BcnA'ya güçlü bir şekilde bağlandığını ve her ikisinin de norfloksasin (florokinolon grubu antibiyotik) ve seftazidimin (β-laktam grubu

antibiyotik) MIC değerlerini azaltma etkisi olduğunu göstermiştir (Naguib ve Valvano, 2018). Bizim alışmamızda antimikrobiyal ekstraktlarda E vitamini saptanmış olup antimikrobiyal duyarlılık üzerine etkisi incelenmemiştir.

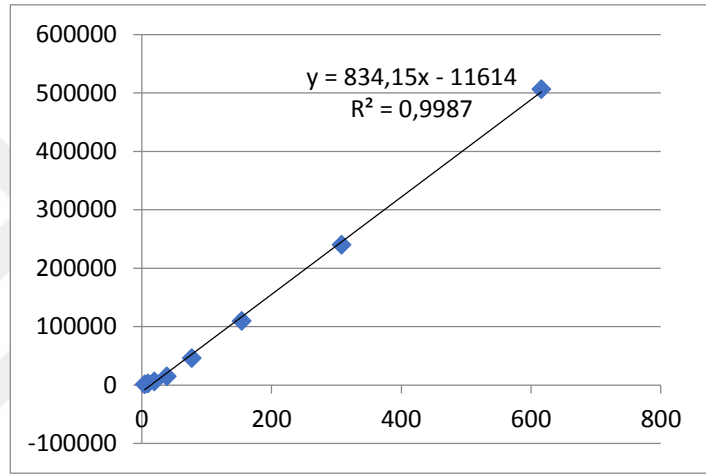
Arthrobacter spp. BP-2F-M, *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşlarından elde edilen ekstraktlarda saptanan organik asitler bütirik asit, propiyonik asit ve asetik asit miktarları izelge 4.22’de verilmiştir. bütirik asit, propiyonik asit ve asetik asit kalibrasyon grafikleri şekil 4.32, 4.33 ve 4.34’te verilmiştir.

Çizelge 4.22. HPLC analizi sonucunda ekstraktlarda saptanan organik asit miktarları (ppm)

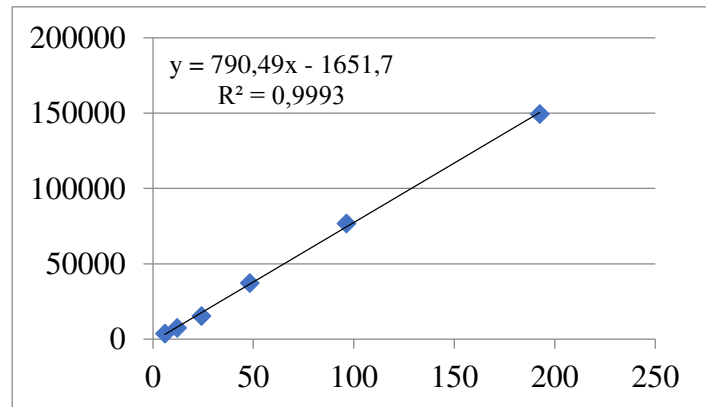
Suşlar Bileşikler	<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2G-M	<i>R erythropolis</i> BP-2F-M	<i>S. rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M
Butirik asit (mg/kg)	60,714	244,082	44,926
Propiyonik asit (mg/kg)	37,749	55,903	14,386
Asetik Asit (mg/kg)	10,639	23, 089	9,738
Fenol (mg/kg)	54, 009	33,465	670,758
Benzoik asit (mg/kg)	11,84	7,79	32,58



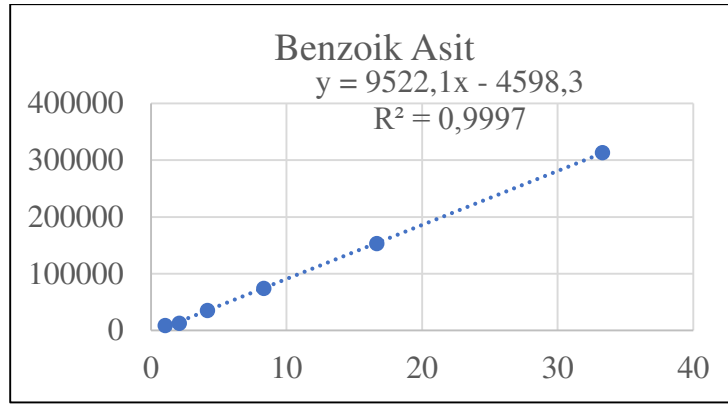
Şekil 4.32. Butirik asit kalibrasyon grafiği



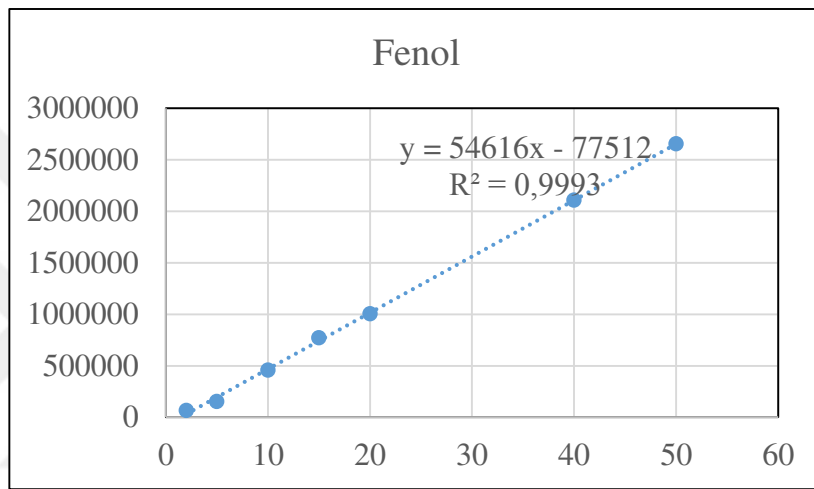
Şekil 4.33. Asetik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.34. Propiyonik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.35. Benzoik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.36. Fenol kalibrasyon grafiği

Du vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada benzoik asit, bütirik asit, kaprilik asit ve sorbik asidin tek başına ve kombinasyon halinde potansiyel antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçları organik asitlerin *Campylobacter jejuni*' ye karşı etkili olduğunu göstermiştir.

Wali ve Abed (2019) tarafından yapılan çalışmada asetik asidin gıdalardan izole edilen patojenlere karşı antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre asetik asidin patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ve gıda ürünlerinin raf ömrünü artırdığına varılmıştır.

Kvaliauskas vd., (2024) tarafından yürütülen çalışmada yeni propiyonik asit türevi 3-((4-hydroxyphenyl)amino) propiyonik asidin çoklu ilaca dirençli patojenlere karşı etkisi incelenmiştir. Yeni propiyonik asit türevinin ilaca dirençli bakteriler ve *Candida spp.* suşlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda da antimikrobiyal aktivitesi bilinen ekstraktlarda butirik asit, asetik asit ve propiyonik asit saptanmıştır.

4.7.5.2. Antimikrobiyal Maddenin LC-Q-TOF MS Analizi ile Karakterizasyonu

LC- Q-TOF MS analizi sonucunda antimikrobiyal etkili ekstraktlarda bulunan çeşitli metabolitler belirlenmiştir. Analiz sonucunda antimikrobiyal etkili ekstraktlarda biyoaktif peptidler, antibiyotikler, sideroforlar, organik asitler saptanmıştır.

Streptomyces rubiginosohelvolus BP-K9D-M suşundan elde edilen ekstraktta streptomisin, kanamisin, oleandomisin ve tetrasiklin antibiyotikleri saptanmıştır. BP-2F-M *Arthrobacter sp.* suşundan elde edilen ekstraktta kinolon türevleri, streptomisin, eritromisin, azitromisin, oleandomisin ve arthrobasilin A antibiyotikleri saptanmıştır. *Rhodoccus erythropolis* BP-2G-M suşundan elde edilen ekstraktta kinolon türevleri ve Rodostreptomisin A antibiyotikleri ile birlikte Heterobaktin A2, Heterobaktin B, Nocardia Heterobaktin, Rhodochelin sideroforları saptanmıştır. LC- Q-TOF MS analizi ile ekstraktlarda tanımlanan antibiyotikler ve sideroforlar Çizelge 4.23' te verilmiştir.

Çizelge 4.23. LC- Q-TOF MS analizi ile ekstraktlarda tanımlanan antibiyotikler ve sideroforlar

İZOLAT	BİLEŞİK	FORMÜL	KÜTLE	ETKİ
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> BP-K9D-M	Streptomisin	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	582	Geniş spektrum bakterisidal aktivite (Webster ve Shepherd, 2023)
	Kanamisin	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	484	Bakteriyel ribozomal 30S alt birimi ve protein sentezini inhibe edici (X. Zhang vd., 2019)
	Oleandomisin	C ₃₅ H ₆₁ NO ₁₂	687	Ribozomların 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe etme (Polishchuk ve Bambura, 2022)
	Tetrasiklin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444	Ribozomların 30S alt birimi, tRNA'nın mRNA-ribozom kompleksine bağlanmasını bloke edici (Polishchuk ve Bambura, 2022)
<i>Arthrobacter sp.</i> BP-2F-M	Kinolon Türevleri	C ₃₁ H ₂₈ ClFN ₆ O ₄	603	Geniş spektrum antibakteriyel aktivite (Pham vd., 2019)
	Streptomisin	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	582	Geniş spektrum bakterisidal aktivite (Webster ve Shepherd, 2023)
	Eritromisin	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	734	Geniş spektrum antibakteriyel etki, anti-inflamatuar etki (Platon vd., 2022)
	Azitromisin	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748	Antimikrobiyal, anti inflammatuar ve anti viral etki (Kournoutou ve Dinos, 2022)
	Oleandomisin	C ₃₅ H ₆₁ NO ₁₂	687	Ribozomların 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe

				etme (Polishchuk ve Bambura, 2022)
	Arthrobasilin A	C ₅₄ H ₉₆ O ₂₁	1080	Antibakteriyel aktivite (Wietz vd., 2012)
<i>Rhodoccus erythropolis</i> BP-2G-M	Kinolon Türevleri	C ₃₁ H ₂₈ ClFN ₆ O ₄	603	Geniş spektrum antibakteriyel aktivite (Pham vd., 2019)
	Rodostreptomisin A	C ₂₂ H ₄₀ N ₈ O ₁₃	624,27	Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı etki (Cappelletti vd., 2020)
	Heterobaktin A2	C ₂₆ H ₃₁ N ₅ O ₁₃ S	653	Siderofor (Cappelletti vd., 2020)
	Heterobaktin B	C ₁₉ H ₂₇ N ₅ O ₇	537	
	Nocardia Heterobaktin	C ₂₆ H ₃₁ N ₅ O ₁₀	573	
	Rhodochelin	C ₂₃ H ₃₃ N ₅ O ₁₂	571	

Streptomyces rubiginosohelvolus BP-K9D-M suşundan elde edilen ekstraktlarda belirlenen çeşitli metabolitler Çizelge 4.24 'te verilmiştir.

Çizelge 4.24. *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ekstraktında saptanan metabolitler

BİLEŞİK İSMİ	BİLEŞİK ETİKETİ	FORMÜL	KÜTLE	M/Z	RT	ETKİ
Betain	Cpd 32: Betaine	C ₅ H ₁₂ NO ₂	118.0873	118.0867	0.704	Bakterisidal (Lindstedt vd., 1990) Antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser (Salzano vd., 2022)
Betain	Cpd 47: Betaine	C ₅ H ₁₂ NO ₂	118.0873	118.0867	0.985	
DL-pipecolic asit	Cpd 49: DL-pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.0803	130.0875	1.03	Aktinomisin analogu (Formica vd., 1968)
L-Lysine	Cpd 50: L-Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.1069	147.1142	1.041	Antiviral etki (Leonetti vd., 1990)
Guanin	Cpd 64: Guanine	C ₅ H ₅ N ₅ O	151.0509	152.0582	1.322	Antiviral ve antikanser ilaç öncülü (Sherin ve Manojkumar, 2021)
5'-AMP / Adenosin 5'-monofosfat	Cpd 66: 5'-AMP / Adenosine 5'-monophosphate	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	347.0644	348.0717	1.367	
Nikotinic asit	Cpd 73: Nicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	123.0318	124.0391	1.472	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'e karşı antibakteriyel aktivite (Asif, 2014)
Val Glu	Cpd 86: Val Glu	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	246.123	247.1303	1.782	Antioksidan etki (Sabrina vd., 2022)

3-Aminokinolin	Cpd 94: 3-Aminokinolin	$C_9H_8N_2$	144.0693	145.0766	1.888	Antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar ve analjezik etki (Zengin vd., 2016)
DL-Phenylalanine	Cpd 90: DL-Phenylalanine	$C_9H_{11}NO_2$	165.0804	166.0877	1.883	<i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> ve <i>C. albicans</i> ' a karşı biyosidal aktivite (Lukáč vd., 2010)
D-Pantotenik asit (Vitamin B5)	Cpd 98: D-Pantothenic acid	$C_9H_{17}NO_5$	219.112	220.1193	2.04	Antiparazitik etki (Saliba vd., 2005)
Pro Leu	Cpd 120: Pro Leu	$C_{11}H_{20}N_2O_3$	228.1488	229.156	2.444	Bakterisidal etki (Mukherjee vd., 2018)
Ile Asp	Cpd 134: Ile Asp	$C_{10}H_{18}N_2O_5$	246.123	247.1303	2.714	Antimikrobiyal (Decker vd., 2022)
Val Glu Val	Cpd 138: Val Glu Val	$C_{15}H_{27}N_3O_6$	345.1913	346.1986	2.781	Antimikrobiyal (Decker vd., 2022)
L-Triptofan	Cpd 143: L-Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.0913	205.0986	2.882	Antimikrobiyal, anti inflamatuvar ve antiviral etki (Friedman, 2018)
Indol	Cpd 144: Indole	C_8H_7N	117.0585	118.0658	2.894	Antifungal (Böhlenndorf vd., 2006)
4-Formil Indol	Cpd 147: 4-Formyl Indole	C_9H_7NO	145.0535	146.0608	2.894	Antitüberküloz etki (Reddy ve Pal, 2021)
Phe Asp	Cpd 161: Phe Asp	$C_{13}H_{16}N_2O_5$	280.1072	281.1144	3.219	Antioksidan (Danquah ve Agyei, 2012)
Ile Asp Val	Cpd 184: Ile Asp Val	$C_{15}H_{27}N_3O_6$	280.1072	346.1986	3.219	Antimikrobiyal (Decker vd., 2022) Antitümör (Han vd., 2023)
Oksikinolin	Cpd 185: Oxyquinoline	C_9H_7NO	145.0535	146.0608	3.668	Antiprotozoal, antiinflamatuvar, antimalaryal, antikanser, antibakteriyel ve anti-HIV aktivite (Movassaghi, 2018)
Val Pro Ile	Cpd 189: Val Pro Ile	$C_{16}H_{29}N_3O_4$	327.2169	328.2242	3.736	Antioksidan (Nadalian vd., 2019) Antitümör (Han vd., 2023)
Phenacylamine	Cpd 275: Phenacylamine	C_8H_9NO	135.0689	136.0762	5.363	Antimikrobiyal (Şirikci vd., 2014)
Enantio-PAF C-16	Cpd 277: Enantio-PAF C-16	$C_{26}H_{55}NO_7P$	524.3726	524.372	5.409	Trombosit aktive edici faktör (PAF) analogu (Gomez-Cambronero vd., 1991)
N-tert-Butyl- α -phenylnitron	Cpd 354: N-tert-Butyl- α -phenylnitron	$C_{11}H_{15}NO$	177.1164	178.1237	6.834	Antioksidan (Butterfield vd., 1998)

Pro Ala Gly	Cpd 202: Pro Ala Gly	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₄	243.1234	244.1307	3.971	Antimikrobiyal (Decker vd., 2022)
Pro Pro Ile	Cpd 220: Pro Pro Ile	C ₁₆ H ₂₇ N ₃ O ₄	325.2011	326.2084	4.308	Antimikrobiyal (Decker vd., 2022)
Pro Glu Val	Cpd 243: Pro Glu Val	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O ₆	343.1765	344.1838	4.757	Antioksidan (Nadalian vd., 2019) Antitümör (Han vd., 2023)
Pro Leu	Cpd 257: Pro Pro Leu	C ₁₆ H ₂₇ N ₃ O ₄	325.2011	326.2084	5.027	Antimikrobiyal (Decker vd., 2022)

Streptomyces rubiginosohelvolus BP-K9D-M suşundan elde edilen ekstraktan LC-Q- TOF MS analizi ile oleandomisin, tetrasiklin, streptomisin, kanamisin antibiyotikleri saptanmıştır.

Çevresel örneklerden elde edilen aktinomisetlerin, alkaloidler, flavanoidler, terpenoidler gibi kimyasal olarak çeşitli sekonder metabolitlerin geniş düzeyde üretimi ve çeşitli ortamlarda organik atıkların geri dönüştürülmesiyle ilişkili oldukları bilinmektedir. Aktinobakteriler önemli antibiyotik üreticileri olarak dikkat çekmektedir ve piyasada bilinen tüm antibiyotiklerin dörtte üçünü oluştururlar. Birçok antibiyotiğin, antitümör ajanın, immün baskılayıcı ajanın ve çeşitli enzimlerin üretiminden sorumlu oldukları bilinmektedir. Bu organizmalar antifungal, antibakteriyel, antiparaziter, antiviral, immünosüpresif, insektisidal, antitümör, antioksidan, antiinflamatuvar, diyabetojenik ve enzim inhibisyonu gibi geniş spektrumlu biyolojik aktivitelere sahiptir. Aktinomisetler beta-laktamlar, poliketitler, glikopeptitler, makrolidler, tetrasiklin, aminoglikozitler, polienler ve aktinomisinler gibi antimikrobiyal metabolitleri sentezleme potansiyeline sahiptir (Al-ansari vd., 2019).

Tetrasiklin antibiyotikler, insan ve hayvan tedavisinde ve tarımsal amaçlarla kullanılan başlıca antibiyotik gruplarından biridir. Tetrasiklinler geniş spektrumlu antibiyotiklerdir ve hem Gram pozitif hem de Gram negatif mikroorganizmaların yanı sıra mikoplazma, klamidy, riketsiya ve protozoa parazitlerinin neden olduğu enfeksiyonlara karşı aktivite gösterirler (Samanidou vd., 2007; Önal, 2011; Ding ve Mou, 2000). Çalışmamızda tetrasiklin ürettiği saptanan *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşunun antimikrobiyal aktivite testlerinde hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu görülmüştür.

Streptomisin, *Streptomyces griseus* bakterisinden izole edilen bir aminoglikozit antibiyotiktir. Keşfedilen ilk aminoglikozit antibiyotik olarak bilinmektedir. Tüm aminoglikozitlerde olduğu gibi streptomisin de bakterisidaldır ve ribozomal peptid/protein sentezine müdahale eder. Bakteriyel ribozomun 30S biriminde yer alan 16S

rRNA'ya bağlanarak işlevselliğini engeller ve peptid bağ oluşumunun inhibisyonu yoluyla protein sentezini durdurmaktadır (Dagur vd., 2023).

Oleandomisin, *Streptomyces antibioticus* tarafından üretilen makrolid grubu antibakteriyel maddedir. Oleandomisin genellikle üst solunum yollarında enfeksiyonlara neden olan *Staphylococcus* ve *Enterococcus* cinsi bakterilere karşı kullanılmaktadır. Diğer makrolidlerden farklı olarak oleandomisin, 50S alt birimine bağlanan, bakterinin hayatta kalması için önemli olan proteinlerin tamamlanmasını engelleyen bakteriyostatik bir maddedir (Hahn, 1967).

Aminoglikozidler aktinomisetlerden türetilen doğal veya yarı sentetik antibiyotiklerdir. Bu grup klinik kullanıma sunulan ilk antibiyotikler arasındadır ve birçok üyesi insanlarda kullanılmaktadır. Aminoglikozitler, protein sentezinin inhibisyonu yoluyla etki eden güçlü, geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Kanamisin *S. kanamyceticus*'tan izole edilmiştir. Aminoglikozidler çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı aktiftir. Aminoglikozidlerin *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae* ve *E. aerogenes*, *Providencia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.* ve *Serratia spp.* dahil olmak üzere *Enterobacteriaceae* familyası üyelerine karşı özellikle etkili olduğu bilinmektedir. Sınıf aynı zamanda metisiline dirençli ve vankomisine orta-dirençli izolatlar, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve daha az ölçüde *Acinetobacter baumannii*'ye karşı da iyi aktiviteye sahiptir (Krause vd., 2016). Çalışmamızda da aminoglikozit ürettiği saptanan *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşunun antimikrobiyal aktivite testlerinde hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğunu tespit ettik.

Önceki çalışmalarda *S. rubiginosohelvolus* 'un bir anti-tümör ajanı olan rubomisin (Lapchinskaia vd. 1975) ve antrasiklin türevi antibiyotik daunomisin bileşiklerini ürettiği rapor edilmiştir (Huk ve Blumauerova, 1989).

Lee vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada topraktan izole edilen *Streptomyces sp.* W2061 suşu ekstraktlarının kromatografik ve yapısal karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Orta basınçlı kromatografi (MPLC) sistemi kullanılarak fraksiyonlama yapılmıştır. Etil asetat ekstraktlarının LC-MS analizi ile karakterizasyonu yapılmıştır. Analiz sonucunda kidamisin kollismisin, fotokidamisin ve bilinmeyen riboflavin bileşikleri saptanmıştır. Bileşiklerin yapıları nükleer manyetik rezonans (NMR) analizi ile aydınlatılmış ve biyoaktiviteleri araştırılmıştır. Rubiflavin G, fotorubiflavin G ve fotorubiflavin E olmak üzere üç yeni pluramisin türevi kaydedilmiştir. Çalışma sonucunda pluramisin bileşiklerinin meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etki

gösterdiği kaydedilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda *Streptomyces spp.* W2061 suşu *Streptomyces rubiginosohelvolus* olarak tanılanmıştır. Bizim çalışmamızda da antimikrobiyal etki gösteren suşlardan biri *Streptomyces rubiginosohelvolus* olarak tanılanmış ve elde edilen etil asetat ekstraktlarının LC-MS analizi ile karakterizasyonu yapılmıştır. *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ekstraktında çeşitli antibiyotiklerin yanı sıra antikanser etkisi bilinen 3- aminokinolin ve oksikinolin bileşikleri ile antikanser ilaç öncülü guanin saptanmıştır.

Rhodococcus erythropolis BP-2G-M suşundan elde edilen ekstraktta saptanan çeşitli metabolitler Çizelge 4.25'te verilmiştir.



Çizelge 4.25. *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ekstraktında saptanan çeşitli metabolitler

BİLEŞİK İSMİ	BİLEŞİK ETİKETİ	FORMÜL	KÜTLE	M/Z	RT	ETKİ
DL-pipecolic asit	Cpd 48: DL-pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.0798	130.0871	1.027	Aktinomisin analogu (Formica vd., 1968)
Betain	Cpd 62: Betaine	C ₅ H ₁₂ NO ₂	118.0869	118.0863	1.259	Bakterisidal (Lindstedt vd., 1990) Antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser (Salzano vd., 2022)
5'-AMP / Adenozin 5'-monofosfat	Cpd 68: 5'-AMP / Adenosine 5'-monophosphate	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	347.0637	348.071	1.385	
Adenozin	Cpd 72: Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.0979	268.1052	1.475	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ' a karşı antibakteriyel aktivite (Vitali vd., 2012)
3-Aminokinolin	Cpd 94: 3-Aminoquinoline	C ₉ H ₈ N ₂	144.0693	145.0766	1.888	Antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar ve analjezik etki (Zengin vd., 2016)
D-Pantotenik asit (Vitamin B5)	Cpd 101: D-Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.1115	220.1188	2.034	Antiparazitik etki (Saliba vd., 2005)
Indol	Cpd 144: Indole	C ₈ H ₇ N	117.0582	118.0654	2.839	Antifungal Antitüberküloz (Böhlendorf vd., 2006)
4-Formil Indol	Cpd 150: 4-Formyl Indole	C ₉ H ₇ NO	145.0532	146.0605	2.951	(Reddy ve Pal, 2021)

Anthranilic asit	Cpd 239: Anthranilic acid	C ₇ H ₇ NO ₂	137.0479		4.63	Antimikrobiyal, antiviral, antikanser ve insektisidal aktivite (Prasher ve Sharma, 2021)
Denatonium	Cpd 274: Denatonium	C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O	325.2291	325.2285	5.276	Bitki patojenlerine karşı bakterisidal etki (Compant vd., 2005)
Benzododecinium (Ajatin)	Cpd 398: Benzododecinium (Ajatin)	C ₂₁ H ₃₈ N	304.301	304.3005	7.595	<i>S. aureus</i> 'ta biyofilm formuna karşı aktivite, hücre lizisi (Cabo vd., 2009)
Dodecyl glucoside	Cpd 447: Dodecyl glucoside	C ₁₈ H ₃₆ O ₆	348.2517	371.2409	8.524	Biyosüpfaktan (Recke vd., 2013)
Acetyl tributyl citrate	Cpd 465: Acetyl tributyl citrate	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	402.2261	403.2334	8.859	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ve <i>Staphylococcus aureus</i> ' a karşı antibakteriyel aktivite (Tan vd., 2020)
Asp Leu	Cpd 108: Asp Leu	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	246.1228	247.1301	2.157	Antihipertansif (Zaky vd., 2022)
Asp Gly Ile	Cpd 132: Asp Gly Ile	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₆	303.1438	304.1511	2.616	
Gly Val Leu	Cpd 139: Gly Val Leu	C ₁₃ H ₂₅ N ₃ O ₄	287.185	288.1922	2.761	Antimikrobiyal ve biyofilm oluşumunu inhibe edici (Rewak-Soroczyńska vd., 2019)
Glu Arg Leu	Cpd 140: Glu Arg Leu	C ₁₇ H ₃₂ N ₆ O ₆	416.238	417.2453	2.772	Antiinflatuvar (Lu vd., 2021)

BP-2G-M (*Rhodococcus erythropolis*) ekstraktında Çizelge 4.23' te verilen metabolitler ile birlikte kinolon türevleri ve rodostreptomisin antibiyotikleri; rhodochelin ve çeşitli heterobaktin sideroforları da saptanmıştır.

Rhodococcus cinsine ait bakteriler, metabolik çeşitlilikleri, organik bileşikleri parçalama yetenekleri ve metal toksisitesi, kuraklık ve yüksek organik çözücü konsantrasyonu gibi çeşitli stres koşullarına karşı dirençleri nedeniyle mikrobiyal biyoteknoloji uygulamaları için ideal mikroorganizmalardır. *Rhodococcus* suşları aynı zamanda zorlu ve kirli ortamlarda güçlü dayanıklılıklarına katkıda bulunan ve onlara

diğer mikroorganizmalara karşı rekabet avantajı sağlayan kendine özgü biyosentetik aktivitelere de sahiptir.

Rhodococcus suşlarının, rhodochelin, rhodobactin, heterobactin A, rhequichelin ve rhequibactin gibi kimyasal olarak çeşitli sideroforlar üretebildikleri açıklanmıştır. Carrano vd., (2001), *R. erythropolis* IGTS8 kültüründen heterobaktinler adı verilen yeni bir siderofor sınıfını izole eden ilk araştırmacılar arasındadır. IGTS8 suşu tarafından üretilen üç heterobaktin arasında en çok bulunan ikisi, heterobaktin A ve B olarak adlandırılmıştır. Heterobaktinler ayrıca Bosello vd., (2013) tarafından *R. erythropolis* PR4'ten izole edilmiştir, bakteri genomunun biyoinformatik analizi yoluyla, heterobaktin A'nın biyosentezinden sorumlu gen kümesini tanımlamıştır. Bizim çalışmamızda *R. erythropolis* BP-2G-M suşu ekstraktında heterobaktin A2, heterobaktin B ve *Nocardia* heterobaktin saptanmıştır.

Sideroforlar, bazı bakteriler tarafından hücre dışı demiri şelatlamak ve hücre içinde taşımak için salınan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Sideroforların üretimi ve salınması, bakterilerin hücre içi demir havuzu biriktirmesine ve metal sınırlayıcı koşullar altında da besinsel demir ihtiyacını karşılamasına olanak tanır (Kraemer, 2004). Sideroforların ayrıca çinko, manganez, molibden ve vanadyum gibi diğer temel metalleri almak için bağladıkları ve ayrıca hücresel girişlerini önlemek için ağır metallerle etkileşime girdikleri de rapor edilmiştir. Diğer siderofor fonksiyonları arasında oksidatif strese karşı koruma ve antibiyotik hedefleme yer almaktadır. Sideroforlar kimyasal yapılarına göre fenolat, hidroksamat, katekolat, (hidroksi-) karboksilat ve karışık tipler olarak sınıflandırılır ve biyosentezleri farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşir. Sideroforların uygulama alanları arasında tarım, tıp, farmakoloji, biyoremediasyon, biyolojik bozunma ve gıda endüstrisi bulunmaktadır (Miethke ve Marahiel, 2007).

Kitagawa ve Tamura (2018) tarafından yapılan çalışmada *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824 kültür sıvısından yeni bir kinolin antibiyotiği olan aurachin RE, izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Aurachin RE' nin yapısı, NMR ve kütle spektrometrik analizleri ile belirlenmiştir. Çalışma sonuçları Aurachin RE' nin Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda da *R. erythropolis* BP-2G-M suşu ekstraktında kinolon türevleri saptanmış, Gram pozitif bakterilere etkisi kaydedilmemiştir.

Kurosawa vd., (2018) tarafından *Rhodococcus fascians* 307CO kültür sıvılarından rodostreptomisin A ve B antibiyotikleri izole edilmiştir. Rodostreptomisinler, yapı olarak *Streptomyces* tarafından üretilen aktinomisinlerden büyük ölçüde farklı olan yeni bir

aminoglikozit sınıfının iki izomeri olarak tanımlanmıştır. Rodostreptomisinler; *Streptomyces padanus*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *H. pylori* gibi çok çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bununla birlikte Rodostreptomisin B'nin, rodostreptomisin A'dan daha güçlü olduğu kaydedilmiştir.

Arthrobacter spp. BP-2F-M suşundan elde edilen ekstraktta LC-Q-TOF MS analizi ile saptanan çeşitli metabolitler Çizelge 4.26' da verilmiştir.

Çizelge 4.26. *Arthrobacter* spp. BP-2F-M suşundan elde edilen ekstraktta saptanan metabolitler

BİLEŞİK İSMİ	BİLEŞİK ETİKETİ	FORMÜL	KÜTLE	M/Z	RT	ETKİ
Streptomisin	Cpd 50: Streptomycin	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	581.2668	582.274	1.035	Bakterisidal (Jones-Lopez ve Ellner, 2011)
Betain	Cpd 62: Betaine	C ₅ H ₁₂ NO ₂	118.0869	118.0863	1.259	Bakterisidal (Lindstedt vd., 1990)
Trimazosin	Cpd 123: Trimazosin	C ₂₀ H ₂₉ N ₅ O ₆	435.21	436.2173	2.389	Antihipertansif (Taylor vd., 1983)
Lappaconitine	Cpd 189: Lappaconitine	C ₃₂ H ₄₄ N ₂ O ₈	584.3172	585.3245	3.653	Antitümör, antiinflamatuvar, analjezik etki (Pang vd., 2019)
His Ile Gln	Cpd 63: His Ile Gln	C ₁₇ H ₂₈ N ₆ O ₅	396.2123	397.2196	1.27	Antioksidan (Zaky vd., 2022)
Nikotik asit	Cpd 73: Nicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	123.0318	124.0391	1.472	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' e karşı antibakteriyel aktivite (Asif, 2014)
Val Pro Gln	Cpd 74: Val Pro Gln	C ₁₅ H ₂₆ N ₄ O ₅	342.191	343.1983	1.483	İlaça karşı dirençli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite (Li vd., 2020)
Gly Pro Val	Cpd 83: Gly Pro Val	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₄	271.1536	272.1609	1.65	
Pro Val	Cpd 86: Pro Val	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	214.1322	215.1395	1.706	
Leu Pro Gln	Cpd 89: Leu Pro Gln	C ₁₆ H ₂₈ N ₄ O ₅	356.2062	357.2135	1.762	Vankomisine dirençli suşları inhibe etme (Li vd., 2020)
Tyr Pro Glu	Cpd 92: Tyr Pro Glu	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₇	407.17	408.1772	1.818	Bakteri, fungus ve <i>Leishmania</i> parazitine karşı sitotoksik etki, antioksidan aktivite (Teran vd., 2019)
DL-Phenylalanine	Cpd 99: DL-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.0796	166.0869	1.941	<i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> ve <i>C. albicans</i> ' a karşı

						biyosidal aktivite (Lukáč vd., 2010)
Glu Val Val	Cpd 118: Glu Val Val	C ₁₅ H ₂₇ N ₃ O ₆	345.1907	346.1979	2.311	Kanser Hücrelerine karşı sitotoksik etki (Zhong vd., 2009)
Asp Leu	Cpd 120: Asp Leu	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	246.1226	247.1299	2.333	
Phe Val Gly	Cpd 164: Phe Val Gly	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₄	321.169	322.1763	3.172	Antibakteriyel ve sitotoksik etki (E. Lee vd., 2014)
Leu Gly Val	Cpd 182: Leu Gly Val	C ₁₃ H ₂₅ N ₃ O ₄	287.1853	288.1926	3.508	
Val Pro Ile	Cpd 195: Val Pro Ile	C ₁₆ H ₂₉ N ₃ O ₄	327.2167	328.224	3.765	Antioksidan (Nadalian vd., 2019)
Met Pro Leu	Cpd 201: Met Pro Leu	C ₁₆ H ₂₉ N ₃ O ₄ S	359.188	360.1953	3.877	Antioksidan (Danquah ve Agyei, 2012)
Ile Pro Ile	Cpd 208: Ile Pro Ile	C ₁₇ H ₃₁ N ₃ O ₄	341.2317	342.239	4	Antifungal (Mishra vd., 2017)
Phe Pro Ile	Cpd 226: Phe Pro Ile	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₄	375.2162	376.2235	4.347	
IAA / 3-Indol asetik asit	Cpd 269: IAA / 3-Indoleacetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.0641	176.0714	5.175	Endofitik funguslara karşı karşı antimikrobiyal aktivite (Eze vd., 2018)
Denatonium	Cpd 274: Denatonium	C ₂₁ H ₂₉ N ₂ O	325.2291	325.2285	5.276	Bitki patojenlerine karşı bakterisidal etki (Compant vd., 2005)
Palmitik amid	Cpd 323: Palmitic amide	C ₁₆ H ₃₃ NO	255.2565	256.2638	6.227	<i>Listeria monocytogenes</i> ' e karşı antimikrobiyal aktivite (Yosief vd., 2020)
N-tert-Butyl- α -phenylnitrone	Cpd 356: N-tert-Butyl- α -phenylnitrone	C ₁₁ H ₁₅ NO	177.116	178.1233	6.853	Antioksidan (Biazus Soares vd., 2023)

Arthrobacter spp. toprak, tatlı su, petrol, hava, kanalizasyon, deniz suyu ve 220 m'ye kadar olan karasal yeraltı çökeltileri dahil olmak üzere birçok farklı ortamda bulunan Gram pozitif bakteri cinsidir. Sekonder metabolit üreticileri oldukları bilinmektedir ve farklı *Arthrobacter* suşlarının, farklı büyüme koşulları altında artrobasilin antibiyotiğinin farklı varyantlarını ürettiği kaydedilmiştir (Ohtsuka vd., 1992).

Arthrobacter türlerinin herbisitler, pestisitler ve çeşitli sentetik moleküllerin degradasyonunda rol oynadıkları bilinmektedir. Bazı *Arthrobacter* türleri bitki hormonu üretimi ve dinitrojen fiksasyonunda rol oynamaktadır (Jones ve Keddie, 2006).

Kamigiri vd., (1996) tarafından yapılan çalışmada Endonezya' da toprak örneklerinden *Arthrobacter sp.* izole edilmiştir. *Arthrobacter sp.* suşunun fermentasyon sıvısı etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Ham ekstrakt silika jel kolonuna tabi tutulmuş ve antibakteriyel aktivite sergileyen fraksiyonlar toplanmıştır. Aktif fraksiyonlar için HPLC analizi yapılmıştır. ¹H ve ¹³C NMR analizleri ile kimyasal yapı ortaya koyulmuştur. Çalışma sonucunda yeni bir kinolon antibiyotiği olan YM-30059 tanımlanmıştır. YM-30059, çoklu ilaca dirençli *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis* dahil olmak üzere Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir.

Çalışmamızda da ekstraksiyon yöntemi olarak etil asetat kullanılmış ve ekstraktların HPLC yöntemi ile karakterizasyonu yapılmıştır. HPLC analizi sonucunda ekstraktlarda organik bileşikler tespit edilmiştir.

Lokesha vd., (2019) tarafından yapılan çalışmada Hindistan'ın Haydarabad kentindeki endüstriyel olarak kirlenmiş toprak örneklerinden izole edilen *Arthrobacter sp.* suşlarının moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bulgular, izole edilen *Arthrobacter globiformis* HYJE003 suşunun *Arthrobacter phenanthrenivorans* HYJE005 suşuna göre kolin klorürün betaine dönüşüm oranının dört kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Betain hiperosmotik ortamlarda dehidrasyonu ve plazmolizi önlemek için osmoregülatör görevi görmektedir. *Arthrobacter spp.*'de kolin oksidaz geni kolinin betaine iki aşamalı oksidasyon reaksiyonunu ve ardından hücrelerde betain birikimini kataliz etmektedir. Bu durum mikroorganizmanın zorlu çevre koşullarında hayatta kalmasına ve gelişmesine yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda karakterizasyonu yapılan suşlar da mağaralardan izole edilmiş olup mağaralar yüksek nem, düşük sıcaklık içeren ve besin maddelerinin sınırlı olduğu ortamlardır. Mağaralar gibi ekstrem habitatlarda yaşayan mikroorganizmaların antimikrobiyal bileşikler ve çeşitli sekonder metabolitleri üretebilme yeteneği mikroorganizmanın zorlu koşullarda hayatta kalmasını sağlayan bir savunma mekanizması olarak görülmektedir (Tüfekçi vd., 2023).

Wang vd., (2025) tarafından yapılan çalışmada *Arthrobacter spp.* kültüründe hidroksil radikal üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Bulgular demir bağlayıcı ligandların *Arthrobacter* türleri ve diğer toprak bakterileri için süperoksit üretimini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Çalışma sonuçları çevresel kirlenme sorunlarına yönelik bir çözüm alternatifi olarak mikrobiyal reaktif oksijen türlerinin biyoremediasyonda kullanılabileceğini göstermektedir. Biyoremediasyon çalışmalarında glutamik asit gibi çeşitli peptidlerin de etkili olduğu bilinmektedir (Luo vd., 2024). Çalışmamızda *Arthrobacter spp.* BP-2F-M suşunun glutamik asit içeren peptidleri ürettiği kaydedilmiştir.

Çeşitli peptidlerin antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteye sahip doğal bileşikler çeşitli mekanizmalarla hareket etmektedir. Antimikrobiyal biyoaktif peptitlerin çoğu mikrobiyal membran bütünlüğünü bozarak ya da membran boyunca yer değiştirerek iç hedeflere etki ederek hareket etmektedir. Antimikrobiyal peptitler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler, mantarlar, virüsler ve parazitler dahil olmak üzere çok çeşitli mikrobiyal konakçılara karşı etkilidir. Bu nedenle peptidler potansiyel doğal biyokoruyucular olmakla birlikte aynı zamanda bakteriyel enfeksiyonların kontrolünde geleneksel antibiyotiklerin yerini alacak alternatif stratejiler olarak hareket ederken, hızla artan çoklu ilaca dirençli enfeksiyonlarla mücadelede de etkilidirler (Hancock ve Sahl, 2006; Steinstraesser vd., 2011). Çalışmamızda antimikrobiyal aktivitesi bilinen ekstraktlarda çeşitli peptidler saptanmıştır.

Prolin bakımından zengin antimikrobiyal peptidler diğerlerinden farklı olarak membranı yok ederek bakterileri öldürmek yerine bakteriyel sitoplazmaya iç membran taşıyıcısı yoluyla girerler. Sitoplazmaya girdikten sonra, ribozomları hedefleyerek aminoasıl-tRNA'nın peptidiltransferaz merkezine bağlanmasını bloke eder veya protein sentezine müdahale ederler (Seefeldt vd., 2015).

Histidin bazik bir amino asittir ve histidin açısından zengin antimikrobiyal peptidler iyi membran geçirgenlik aktivitesi gösterir. Histidin açısından zengin peptidlerin bakteri hücre zarlarının geçirgenliğini artırarak hücre zarı yırtılmasına ve ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Dong vd., 2019).

Polar olmayan bir amino asit olarak triptofan (Trp), bakteri hücre duvarının lipit çift katmanının arayüz bölgesi üzerinde etkiye sahipken, bazik bir amino asit olarak arjinin (Arg) peptit yükü ve hidrojen bağı etkileşimlerini sağlar. Gram negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* ve Gram pozitif *S. aureus*'u inhibe eden Trp ve Arg bakımından zengin

antimikrobiyal peptidler bildirilmiştir. Trp ve Arg bakımından zengin antimikrobiyal peptitler bakterilere karşı güçlü inhibitör etki göstermektedir (Bacalum vd., 2017; Strøm vd., 2002).

Glisin bakımından zengin antimikrobiyal peptidler doğada yaygın olarak bulunmaktadır. (Kwon vd., 2008; Lee vd., 2011). Glisin açısından zengin bir antimikrobiyal peptidin, fagosit aracılı mikrobisidal mekanizmaları aktive ettiği bildirilmiştir (D'Este vd., 2016). Ayrıca glisin açısından zengin, Gram negatif bakterilere karşı ideal ilaç adayları da rapor edilmiştir (Wang vd., 2015). Çalışmamızda *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M, *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Arthrobacter sp.* BP-2F-M suşlarının tümü Gram-negatif bakteri *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı etkili olup ekstraktlarında glisin içeren peptidler saptanmıştır.

Çalışmamızda da antimikrobiyal ekstraktlarda glisin, metionin, sistein, tirozin fenilalanin, valanin gibi antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkisi bilinen peptidler saptanmıştır.

Çeşitli çalışmalar, farklı protein kaynaklarından türetilen bazı peptidlerin antioksidan özelliklerini ortaya koymuştur. Metionin, sistein, tirozin ve fenilalanin peptitlerinin hidroksil radikallerini temizleme ve Fe²⁺ şelatlama yoluyla DNA hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2012).

Antikanser özellik gösteren peptidler tümör hücrelerini öldürmek için bağışıklık hücrelerini çalıştırarak, kanser hücrelerinin nekrozunu veya apoptozunu indükleyerek, tümör beslenmesini ortadan kaldırmak ve metastazı önlemek için anjiyogenezi inhibe ederek, gen transkripsiyonuna müdahale etmek için bazı düzenleyici fonksiyonel proteinleri aktive ederek antikanser mekanizmalarını göstermektedir (Ma vd., 2020; Wu vd., 2014).

Çalışmamızda karakterizasyonu yapılan tüm ekstraktlarda saptanan metabolitler arasında betain, ilaç öncülü olarak kullanılmaktadır. Trimetilglisin olarak da bilinen betain hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan stabil, toksik olmayan doğal bir maddedir. Betainin karaciğer dokusundaki dejeneratif değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı, anti kanser etkisi olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte antioksidan kapasitesine de sahiptir (Arumugam vd., 2021).

BP-2F-M (*Arthrobacter sp.*) ekstraktında saptanan trimazosin ve lappakonitin metabolitleri ilaç öncülleridir. Trimazosin kan basıncını düşürücü etkisinden dolayı anti hipertansif özellik göstermektedir (Taylor vd., 1983). Alkaloid türevi olan lappaconitine (LA), Çin'de analjezik olarak kullanılmaktadır (Li vd., 2022). Lappakonitin ağrı kesici

özellikler gösterir. Bununla birlikte, lappakonitinin modifikasyonu ile elde edilen lappakonitin sülfat, suda az çözünen lappakonitinden daha belirgin analjezik etki göstermektedir (Thawabteh vd., 2021).

Streptomyces rubiginosohelvolus (BP-K9D-M) ekstraktında saptanan harman ve norharman bileşikleri alkaloidlerdir. Bu alkaloidler antioksidan, nörokoruyucu ve antiinflamatuvar etkiler gibi geniş bir biyolojik ve farmakolojik etki sergilemektedir (Piechowska vd., 2019).

3- Aminokinolin ve oksikinolin metabolitleri kinolin türevleridir. Kinolin türevleri antikanser, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral ilaç keşfinde farmakolojik potansiyele sahiptir. Kinolon türevleri hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, anjiyogenez, hücre göçünün ve modülasyonunun bozulması gibi farklı etki mekanizmaları ile hareket etmektedir. Kinolin halkaları taşıyan antimalaryal ilaçlar kinin, kinidin, klorokin, meflokin, amodiakin, primakin ve siprofloksasin, sparfloksasin, gatifloksasin gibi antibakteriyel ilaçlar kinolin türevleridir (Yadav ve Shah, 2021). Nepali vd., (2019) tarafından 3- Aminokinolin bileşiğinin tümör oluşumu ile ilişkili ısı şok proteinine karşı antikanser etki gösterdiği bildirilmiştir. Oksikinolinin de antikanser aktivite sergilediğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Yadav ve Shah, 2021). Çalışmamızda *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ekstraktında 3- Aminokinolin ve oksikinolin saptanmıştır.

Streptomyces rubiginosohelvolus BP-K9D-M ve *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ekstraktında saptanan DL- piperkolik asitin ise aktinomisin içeriğinde bulunduğu Gram pozitif bakterileri inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Formica vd., 1968). Çalışmamızda DL- piperkolik asit üreten *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşu Gram pozitif bakteri *L. monocytogenes*'e karşı inhibe edici etki gösterirken *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M suşunun Gram pozitif bakterilere karşı etkisi kaydedilmemiştir.

D- Pantotenik asit (Vitamin B5), *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ekstraktında saptanmıştır. Pantotenat veya B5 vitamini olarak da bilinen pantotenik asit, suda çözünebilen bir B kompleksi vitaminidir. Pantotenik asit, koenzim A (CoA) ve asil taşıyıcı proteine (ACP) dahil olması nedeniyle biyolojik öneme sahiptir. Pantotenil alkol, farmasötik vitamin ürünleri için pantotenat aktivitesinin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Panteteinin disülfürü olan Pantetin ve CoA da birçok ülkede farmasötik ürünler olarak kullanılmaktadır. Kolesterol seviyelerini

düşürmede, karaciğer yağlanmasını iyileştirmede ve ilgili hastalıkların tedavisinde etkili oldukları öne sürülmüştür (Gonzalez- Lopez vd., 2016).

İndol ve 4- formil indol *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M ve *Rhodococcus erythropolis* BP-2G-M ekstraktlarında saptamıştır. İndol türevleri anti-tüberküloz özellikleri açısından uzun süredir araştırılmakta ve üzerinde çalışılmaktadır. Birçok indol türevi için antitüberküloz aktivitelere yönelik hedef veya etki mekanizması (MOA) rapor edilmiştir (Reddy ve Pal, 2021). Çeşitli indol türevlerinin antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bilinmektedir. İndol türevlerinin hem Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere hem de funguslara karşı inhibe edici özellik gösterdiği bilinmektedir (Kumar ve Ritika). Çalışmamızda da indol türevleri üretici *Streptomyces rubiginosohelvolus* BP-K9D-M suşunun hem Gram pozitif ve Gram negatif bakteri hem de fungus test organizmalarına karşı etkili olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları öldüren ya da gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli sekonder metabolitlerdir. Antibiyotiklerin, dünyadaki yaygın kullanımı antibiyotiklere dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Antimikrobiyal direnç, halk sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri haline gelmiştir. Patojenik bakterilerin antibiyotik direnci son 20-30 yılda insan sağlığına yönelik en büyük sorunlardan biri olarak kabul edilmektedir. Çoklu ilaca dirençli bakterilerle ilişkili artan morbidite ve mortalite, yeni ve daha etkili ilaçların keşfedilmesini gerektirdiği için etki alanı daha geniş ve daha güçlü antimikrobiyal madde üreten yeni mikroorganizma suşlarının araştırılması önem kazanmaktadır. Mikroorganizmaların içinde bulunduğu habitat koşulları antimikrobiyal etkinlik açısından önemlidir. Aşırı yaşam ortamları biyoteknolojik açıdan önemli yeni bileşiklerin keşfi için önemli fırsatlar sunmaktadır. Yeni antimikrobiyal ajanların keşfi için kıtasal topraklar, mağaralar, çöl toprakları, derin denizler gibi birçok habitat araştırılmıştır. Mağaralar yüksek nem, düşük sıcaklık içeren, enerji girişi ve besin maddelerinin sınırlı olduğu karanlık ortamlar olmaları nedeniyle ekstrem ortamlar olarak kabul edilmektedir. Mağaralar son 20 yılda mikrobiyal çeşitlilik araştırmaları açısından ilgi çeken ortamlar olmakla birlikte mağara mikroorganizmalarının patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesini bildiren çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızın kapsamını mağaralar gibi biyoteknolojik açıdan önemli habitatların ve burada yerleşik olarak bulunan mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerinin oluşturması literatüre katkı sağlaması açısından önemlidir.

Bu tez çalışmasında önceki çalışmalarımızda mağaralardan izole edilen yaklaşık 350 mikroorganizma arasından Gram pozitif bakteri izolatları kullanılmıştır. Antimikrobiyal madde üretici mikroorganizmaların çoğunluğunu Gram pozitif bakterilerin oluşturması nedeniyle Gram boyama yöntemi kullanılarak Gram pozitif bakteri izolatları belirlenmiştir. Bunun için stok muhafaza edilen izolatlar uygun besiyerlerinde aktifleştirilmiş ve saf kültürler kullanılarak Gram boyama yapılmıştır. Gram pozitif olarak belirlenen 170 bakteri izolatu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır. İzolatların antimikrobiyal aktivite taramasında agar disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. İzolatların *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* suşlarına karşı antibakteriyel; *A. niger* ve *Penicillium spp.* suşlarına karşı

antifungal etkisi değerlendirilmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre izolatların yaklaşık %25'i en az 1 test organizmasına karşı aktivite göstermiştir. Aktivite görülen 41 izolatın yaklaşık %51'i birden fazla test organizmasına karşı etkili bulunmuştur. Çalışmamızda izolatların tıbbi açıdan önemli patojenlere karşı test edilmesinin klinik açıdan da önem taşıdığı düşünülmektedir.

İzolatların test mikroorganizmaları arasından Gram pozitif bakteri suşlarına karşı aktivitesi %41, Gram negatif bakteri suşlarına karşı aktivitesi %65, fungal test organizmalarına karşı aktivitesi %29 olarak belirlenmiştir. Bakteriye ve fungal izolatlara karşı birlikte aktivite gösteren BP-2F-M, BP-2G-M ve BP-K9D-M izolatları seçilerek filogenetik tanılama, kültür büyüme parametrelerinin optimizasyonu, antimikrobiyal bileşenlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları için seçilmiştir. Seçilen izolatlardan BP-2F-M ve BP-K9D-M izolatı *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Penicillium sp.* suşlarına karşı etkilidir. BP-2G-M izolatı ise *Pseudomonas aeruginosa* ve *Penicillium sp.* suşlarına karşı etkili bulunmuştur. 3 izolatın da antimikrobiyal etki gösterdiği *P. aeruginosa*'nın önemli bir hastane enfeksiyonu etkeni olduğu bilinmektedir bununla birlikte DSÖ tarafından yayımlanan öncelikli patojenler listesinde yer almaktadır. Bu nedenle elde edilen bulguların klinik açıdan da önem taşıdığı düşünülmektedir.

Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda en az 1 test mikroorganizmasına karşı etkili 41 izolatın ekstrasellüler enzim üretimi ve EPS üretimi incelenmiştir. Ekstrasellüler enzim testi sonuçlarına göre izolatların %58'inin proteaz, %73'ünün katalaz, %39'unun amilaz, %7'sinin jelatinaz enzimi aktivitesi sergiledikleri görülmüştür. EPS üretimi ise izolatların %24'ünde saptanmıştır.

Tanılama, optimizasyon, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları için seçilen 3 izolatın 16S rRNA gen bölgesi için PZR amplifikasyonu gerçekleştirilerek elde edilen PZR ürünlerinden çift yönlü dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonuçlarına göre izolatlar *Arthrobacter sp.*, *Rhodococcus erythropolis* ve *Streptomyces rubiginosohelvolus* olarak tanılanmıştır. Tanılama sonucunda belirlenen türlerin tamamı *Actinobacteria* filumuna aittir. Aktinobakteriler doğal biyoaktif ürünler açısından önemli bir gruptur. Biyoaktif metabolit üretme yeteneği aktinobakterilerin cinsine bağlı olarak değişmektedir. *Actinobacteria* filumu üyeleri önemli antibiyotik üreticileri olmakla birlikte herbisit, antifungal, antitümör veya immün baskılayıcı ajanlar olarak da kullanılabilir. Biyoteknoloji alanında potansiyel uygulamalara sahip olan *Actinobacteria* grubundan lignin peroksidaz, lakkaz, tirozinaz gibi birçok farklı enzim rapor edilmiştir.

Çalışmamızda da tanımlanan suşların antimikrobiyal aktiviteleri ile birlikte *Arthrobacter sp.* için proteaz ve katalaz, *Rhodococcus erythropolis* için katalaz, *Streptomyces rubiginosohelvolus* için katalaz, proteaz ve amilaz üretimi kaydedilmiştir.

Son 20 yılda *Rhodococcus spp.* türleri biyoyakıt üretimi, metal biyo geri kazanımı ve yeni ilaç keşfi dahil olmak üzere endüstriyel, çevresel ve tıbbi alanlarda uygulama bulmaktadır. *Streptomyces* türleri tıpta, çevre endüstrisinde, gıda endüstrilerinde ve tarım sektöründe önemli biyolojik aktivitelere sahip, çeşitli ve değerli doğal ürünler üretme kapasitesi bulunan bakteri türleridir. *Streptomyces* türlerini 100.000' den fazla antibiyotik bileşiği ürettiği ve bunun farmakolojik veya zirai kimyasal uygulamalara sahip tüm doğal biyoaktif ürünlerin %70-80'ini oluşturduğu bilinmektedir. *Arthrobacter* türleri ise tıbbi açıdan önemli enzimlerin verimli kaynaklarıdır. Ayrıca pestisitler ve herbisitlerle kirlenmiş yeraltı suyunun biyolojik olarak arıtılmasında da kullanılmaktadır. *Arthrobacter sp.* türleri kirlenmiş habitatların biyoindikatörleri olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda filogenetik tanınması ve karakterizasyonu yapılan türler önemli biyoteknolojik uygulama alanlarına sahiptir.

Antimikrobiyal etkili maddenin karakterizasyonu HPLC analizleri ve LC-Q-TOF MS analizi ve kütüphane taraması ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri ile antimikrobiyal etkili ekstrakt ve hücre pelleti içeriğinde bulunan çeşitli fenolik bileşikler, organik asitler, vitaminler saptanmıştır. Fenolikler antioksidanlar olarak kabul edilmektedir. Mikrobiyal kökenli fenolik asitlerin tümör hücrelerine karşı etki ve patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Organik asitler hücre zarını geçme, sitoplazmadaki protonu ve anyon konsantrasyonlarını değiştirme yeteneklerine bağlı olarak antimikrobiyal özelliklere sahiptir. C vitamininin güçlü antioksidan, immün sistemi düzenleyici ve antienfeksiyöz etkileri bilinmektedir. E vitamininin de antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösterdiği bilinmektedir. HPLC analizleri ile mikrobiyal ekstrakt ve hücre pelleti içeriğinde tanımlanan bileşikler antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile ön plana çıkmaktadır.

LC-Q-TOF MS analizi ve kütüphane taraması ile antimikrobiyal etkili ekstraktlarda çeşitli antibiyotikler ve diğer metabolitler tespit edilmiştir. BP-K9D-M (*Streptomyces rubiginosohelvolus*) ekstraktında streptomisin, kanamisin, oleandomisin ve tetrasiklin antibiyotikleri tespit edilmiştir. BP-2F-M (*Arthrobacter sp.*) ekstraktında kinolon türevleri, streptomisin, eritromisin, azitromisin, oleandomisin ve arthrobasilin A antibiyotikleri tespit edilmiştir. Ekstraktlarda tespit edilen antibiyotiklerin çoğunluğunun geniş spektrumda etki gösterdiği bilinmektedir. Çalışmamızda yapılan antimikrobiyal

aktivite testleri sonuçları da bu üç ekstraktın birden fazla test mikroorganizmasına etkili olduğunu, hem antibakteriyel hem de antifungal aktivite sergilediğini göstermiştir.

Rhodoccus erythropolis BP-2G-M ekstraktında kinolon türevleri ve rodostreptomisin A antibiyotikleri ile birlikte heterobaktin A2 heterobaktin B, nocardia heterobaktin, rhodochelin sideroforları tespit edilmiştir. *Rhodococcus* cinsi bakterilerden elde edilen biyoürünlerin çevresel, endüstriyel ve tıbbi önemi vardır. Bununla birlikte *Rhodococcus* cinsi üyelerinin önemli siderofor üreticileri oldukları bilinmektedir. Sideroforlar sağlık, tarım ve kozmetik alanlarında kullanılmakta, kanser ve malaria tedavisinde demir taşıyıcısı ve antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda *R. erythropolis* ekstraktında çeşitli sideroforların saptanması biyoteknolojik açıdan önem taşımaktadır.

LC- Q-TOF MS analizleri ile tüm ekstraktlarda antibiyotiklerin yanı sıra çok çeşitli peptidler saptanmıştır. Mikrobiyal peptidler antimikrobiyal, antikanser, antiparazitik ve antioksidan özelliklere sahiptir. Prolin, triptofan ve arjinin, histidin, glisin peptidlerinin antimikrobiyal etkide rol oynadığı bilinmektedir. Antimikrobiyal peptidler membran hedefleme mekanizması, protein biyosentezinin inhibisyonu, nükleik asit biyosentezinin inhibisyonu, hücre bölünmesinin inhibisyonu gibi farklı mekanizmalarla etki göstermektedir. Çalışmamızda karakterizasyon analizlerinden önce antimikrobiyal etkili ekstraktlara Proteinaz K eklendiğinde aktivitede azalma ve kayıp gözlemlenmiş bununla birlikte Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Proteinaz K eklendiğinde aktivitede azalma ve kayıp gözlemlenmesi antimikrobiyal etkili maddenin protein yapısında olduğunu göstermektedir. LC- Q-TOF MS analizleri ile antimikrobiyal etkili ekstraktlarda çeşitli peptidlerin saptanması çalışmanın önceki sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Çalışma sonuçları mağaralardan izole edilen mikroorganizmaların enzim üretimi, EPS üretimi, fenolik bileşikler, vitaminler, organik asitler, biyoaktif peptidler, antibiyotikler ve ilaç öncülleri gibi biyoteknolojik açıdan önemli pek çok metaboliti üretebildiğini göstermektedir. Özellikle ülkemizde yapılan çalışmalarda mağaralardan izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal etki potansiyelleri ortaya koyulmakla birlikte etkili maddelerin karakterizasyonu henüz aydınlanmamıştır. Çalışmamızın bu açıdan literatüre katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızın sonraki aşamalarında elde edilen antimikrobiyal etkiye sahip metabolitlerin yapısının aydınlatılması, antimikrobiyal aktivitenin yanı sıra antioksidan

ve antikanser aktivitenin araştırılması gibi biyoaktivite çalışmalarının yapılması hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR

- Abraham, E. P., Newton, G. G. F., Crawford, K., Burton, H. S., Hale, C. W. (1953). Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature*, 171(4347), 343.
- Adzitey, F. (2015). Antibiotic classes and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from selected poultry; a mini review. *World's Veterinary Journal* 6(1), 36.
- Ahamada Rachid, N., ve Doğruöz Güngör, N. (2022). Screening of bioactive compounds for biomedical and industrial uses from Actinobacteria isolated from the Parsik Cave (Turkey). *Johnson Matthey Technology Review*. <https://doi.org/10.1595/205651322X16482034395036>
- Aktaş, A. H., Şen, S., Yilmazer, M., Cubuk, E. (2005). Determination of carboxylic Acids in apple Juice by RP HPLC. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 24(1), 1-6.
- Algeo, K. (2004). Mammoth Cave and the making of place. *Southeastern Geographer*, 44(1), 27–47. <https://doi.org/10.2307/26222126>
- Ali, S.M, Siddiqui, R, Khan, N.A. (2018). Antimicrobial discovery from natural and unusual sources. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(10):1287-1300. doi: 10.1111/jphp.12976. PMID: 30003546.
- Almuhayawi, M. S., Mohamed, M. S. M., Abdel-Mawgoud, M., Selim, S., Al Jaouni, S. K., Abdelgawad, H. (2021). Bioactive potential of several actinobacteria isolated from microbiologically barely explored desert habitat, Saudi Arabia. *Biology*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biology10030235>
- Ambarwati, A., Wahyuono, S., Moeljopawiro, S., Yuwono, T. (2020). Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts of streptomyces sp. CRB46 and the prediction of their bioactive compounds chemical structure. *Biodiversitas*, 21(7), 3380-3390. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210763>
- Ambrožič Avguštin, J., Petrič, P., Pašić, L. (2019). Screening the cultivable cave microbial mats for the production of antimicrobial compounds and antibiotic resistance. *International Journal of Speleology*, 48(3), 295-303.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, (4)19 133.
- Andrade, J. C., Morais-Braga, M. F. B., Guedes, G. M. M., Tintino, S. R., Freitas, M. A., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M. (2014). Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68(8), 1065-1069.
- Andriole, V. T. (2005). The quinolones: Past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases*, 41(2), 113-119. <https://doi.org/10.1086/428051>

- Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., Maugeri, T. L. (2009). An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology Letters*, 123(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.03.001>
- Artioli, D., Capanna, F., Giovagnoli, A., Ioele, M., Marcone, A., Mariottini, M., Ozinocaligaris, E., Rissotto, L., Singh, M. (2008). Mural paintings of Ajanta Caves, part II: Non destructive investigations and microanalysis on execution technique and state of conservation. *International Journal of Scientific ve Engineering Research*, 3(10), 25-30.
- Arumugam, M., Paal, M., Donohue, T., Ganesan, M., Osna, N., Kharbanda, K. (2021). Beneficial effects of betaine: A comprehensive review. *Biology*, 10(6), 456.
- Asif, M. (2014). Antimicrobial Potential of Nicotinic Acid Derivatives Against Various Pathogenic Microbes. *European Reviews of Chemical Research*, 1(1), 10-21. <https://doi.org/10.13187/ejchr.2014.1.10>
- Attamirad, S.L., Gaviraj, E.N., Nagesh, C., Kugaji, M.S. (2012). Screening, isolation and purification of antibiotic(s) from marine actinomycetes. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 3(3):447-453
- Axenov-Gibanov, D., Voytsekhovskaya, I., Tokovenko, B. T., Protasov, E. S., Gamaionov, S., Rebets, Y., Luzhetsky, A. N., Timofeyev, M. A. (2016). Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the biggest conglomeratic karstic cave in Siberia as sources of novel biologically active compounds. *PLOS ONE*, 11(2), 1-12.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., ve van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Barton, H. A., Taylor, N. M., Kreate, M. P., Austin, C. S., ve Stuart, A. O. (2007). The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *International Journal of Speleology*, 44(2), 124-139.
- Başbülbul, G. (2009). Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, (Yüksek Lisans Tezi). Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- Belgacem, H., Benreguieg, M., Houari Adli, D. E., Benzerga, A. (2023). Antifungal and antioxidant activities of *Actinobacteria* isolated from Algerian Desert soils. *Journal of Applied Biological Sciences*. 17(1), 20-38.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>

- Bernacchi, A., Semenzato, G., di Mascolo, M., Amata, S., Bechini, A., Berti, F. Renato, F. (2024). Antibacterial activity of *Arthrobacter* strains isolated from Great Gobi a strictly protected area, Mongolia. *AIMS Microbiology*, 10(1), 161.
- Biazus Soares, G., Mahmoud, O., ve Yosipovitch, G. (2023). Role of antioxidants in itch treatment: lessons learned from pain management. *Itch*, 8(1), 68-68. <https://doi.org/10.1097/itx.0000000000000068>
- Bisen, P. S. (2014). Microbes in Practice, *Microbial Staining*, IK International: New Delhi, 139-155.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., ve Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bosello, M., Zeyadi, M., Kraas, F. I., Linne, U., Xie, X., ve Marahiel, M. A. (2013). Structural characterization of the heterobactin siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and elucidation of their biosynthetic machinery. *Journal of Natural Products*, 76(12), 2282–2290. <https://doi.org/10.1021/np4006579>
- Bögli, A. (1980). *Karst Hydrology and Physical Speleology*. Springer- Verlag: Berlin.
- Böhlendorf, B., Bedorf, N., Jansen, R., Trowitzsch-Kienast, W., Höfle, G., Forche, E., Gerth, K., Irschik, H., Kunze, B., ve Reichenbach, H. (2006). Antibiotics from gliding bacteria, LXXIII indole and quinoline derivatives as metabolites of tryptophan in *Myxobacteria*. *Liebigs Annalen*, 1996(1), 49-53.
- Breinbauer, R., Vetter, I. R., ve Waldmann, H. (2003). From protein domains to drug candidates natural products as guiding principles in compound library design and synthesis. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 42, 167–188. https://doi.org/10.1007/978-3-662-05314-0_11
- Brown, E., Wright, G. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529, 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>
- Bud, R. (2007). *Medicating Modern America: Prescription Drugs in History*. New York University Press: New York.
- Bukelskis, D., Dabkeviciene, D., Lukoseviciute, L., Bucelis, A., Kriaučiūnas, I., Lebedeva, J., ve Kuisiene, N. (2019). Screening and transcriptional analysis of polyketide synthases and non-ribosomal peptide synthetases in bacterial strains from Krubera–Voronja Cave. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2149.
- Burkholder, P. R., Pfister, R. M., ve Leitz, F. H. (1966). Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Applied Microbiology*, 14(4), 649-653.
- Bush, K., ve Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>

- Butterfield, D. A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M., ve Carney, J. (1998). Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-Butyl-alpha-phenylnitrone and vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 448-462.
- Cabo, M. L., Herrera, J. J., Crespo, M. D., ve Pastoriza, L. (2009). Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. *Food Control*, 20(5), 521-525.
- Cammarata, A. (1973). The molecular basis of antibiotic action. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(9), 1577-1578.
- Caponio, F., Alloggio, V., ve Gomes, T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203-209. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00146-0)
- Cappelletti, M., Presentato, A., Piacenza, E., Firrincieli, A., Turner, R. J., Zannoni, D. (2020). Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8567–8594.
- Carrano, C. J., Jordan, M., Drechsel, H., Schmid, D. G., Winkelmann, G. (2001). Heterobactins: a new class of siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups. *BioMetals*, 14(2), 119-125. <https://doi.org/10.1023/A:1016633529461>
- Castro, J. F., Razmilic, V., Gomez-Escribano, J. P., Andrews, B., Asenjo, J., ve Bibb, M. (2018). The ‘gifted’ actinomycete *Streptomyces leeuwenhoekii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(8), 1433–1448. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1034-8>
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Lad, S. J., Phansalkar, M. S., Rupp, R. H., Ganguli, B. N., Fehlhaber, H., Kogler, H. (1992). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus* Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *The Journal of Antibiotics*, 45(6), 832-838. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.832>
- Chen, J. J., Cheng, M. J., Tseng, M., Wu, M. D., Weng, J. R. (2024). Natural products from the culture broth of an actinobacteria *Streptomyces* sp. M5205 and evaluation of their antifungal activity. *Phytochemistry Letters*, 59, 59-63.
- Cheeptham, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L., Azad, N., Donkor, K., Horne, D. (2013). Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, 42(1), 35–47. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.5>
- Chen, C.-R., Malik, M., Snyder, M., Drlica, K. (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology*, 258(4), 627-637.

- Chelius, M. K., ve Moore, J. C. (2004). Molecular Phylogenetic Analysis of *Archaea* and *Bacteria* in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21(2), 123–134. <https://doi.org/10.1080/01490450490266389>
- Chopra, I. ve Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260.
- Cita, Y. P., Suhermanto, A., Radjasa, O. K., Sudharmono, P. (2017). Antibacterial activity of marine bacteria isolated from sponge *Xestospongia testudinaria* from Sorong, Papua. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 450-454. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.024>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., ve Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.
- Cox, G. ve Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Cragg, G., Schepartz, S., Suffness, M., Grever, M. (1993). The Taxol Supply Crisis. New NCI Policies for Handling the Large-Scale Production of Novel Natural Product Anticancer and Anti-HIV Agents. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1657-1668.
- Czárán, T. L., Hoekstra, R. F., ve Pagie, L. (2002). Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(2), 786–790. <https://doi.org/10.1073/pnas.012399899>
- Çandiroğlu, B. ve Güngör, N. D. (2020). The biotechnological potentials of bacteria isolated from Parsık Cave, Turkey measuring the enzyme profiles, antibiotic resistance and antimicrobial activity in bacteria. *Johnson Matthey Technology Review*, 64(4), 466–479. <https://doi.org/10.1595/205651320X15923194903811>
- Cheng, X., Xiang, X., Yun, Y., Wang, W., Wang, H., Bodelier, P. (2023). Archaea and their interactions with bacteria in a karst ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1068595>
- Çil, E., Işık, K. ve Özdemir Koçak, F. (2016). Bazı toprak aktinomisetlerinin antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(2), 75-84.
- Dagur, P., Ghosh, M., ve Patra, A. (2023). Aminoglycoside antibiotics. *Medicinal Chemistry of Chemotherapeutic Agents*. Academic Press, 135-155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90575-6.00009-0>
- Danquah, M. ve Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *Open Access Biotechnology Journal*, 1(2). <https://doi.org/10.13172/2052-0069-1-2-294>

- Davies, J., ve Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433.
- Davis, B. D. (1987). Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiological Reviews*, 51(3), 341-350.
- Decker, A. P., Mechesso, A. F., ve Wang, G. (2022). Expanding the landscape of amino acid-rich antimicrobial peptides: Definition, eployment in nature, implications for peptide design and therapeutic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 12874. <https://doi.org/10.3390/ijms232112874>
- Demirci, H., Ordu, E. (2020), Metagenomic analysis of the microbial community in Çal Cave soil to elucidate biotechnological potential. *Türkiye Ormançılık Dergisi*, 21 (3), 254-259
- Derewacz, D. K., McNees, C. R., Scalmani, G., Covington, C. L., Shanmugam, G., Marnett, L. J., Polavarapu, P. L., Bachmann, B. O. (2014). Structure and stereochemical determination of hypogeamicins from a cave-derived Actinomycete. *Journal of Natural Products*, 77(8), 1759–1763.
- Djebbah, F. Z., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Belyagoubi, L., Kherbouche, F., Abdelouahid, D. E., Ravindran, B. (2022). Isolation and characterisation of Streptomyces sp. Strain GLD25 with antimicrobial and antioxidant effects from Gueldaman cave (GLD1), Akbou-Algeria. *Journal of King Saud University-Science*, 34(1), 101719.
- Docampo, S., Trigo, M. M., Recio, M., Melgar, M., García-Sánchez, J., Cabezudo, B. (2011). Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): Diversity and origin. *Science of The Total Environment*, 409(4), 835–843. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.048>
- Doğruöz-Güngör, N., Çandıroğlu, B., Altuğ, G. (2020). Enzyme profiles and antimicrobial activities of bacteria isolated from the Kadiini cave, Alanya, Turkey. *Journal of Cave and Karst Studies*, 82(2), 106–115.
- Doğruöz-Güngör, N. (2020). The microbial community structure of the Dupnisa cave in Kırklareli, Turkey. *Acta Carsologica*, 49. <https://doi.org/10.3986/ac.v49i2-3.8575>
- Douthwaite, S. (1992). Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with Escherichia coli 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 20(18), 4717-4720. <https://doi.org/10.1093/nar/20.18.4717>
- Domagala, J. M. (1994). Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(4), 685-706. <https://doi.org/10.1093/jac/33.4.685>
- Du, K., Foote, M. S., Mousavi, S., Buczkowski, A., Schmidt, S., Peh, E., Heimesaat, M. M. (2023). Combination of organic acids benzoate, butyrate, caprylate, and sorbate provides a novel antibiotics-independent treatment option in the combat of acute

- Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Niyomvong, N., Inahashi, Y., Matsumoto, A., Thamchaipenet, A., Takahashi, Y. (2012). *Microbispora thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil. *The Journal of Antibiotics*, 65(10), 491-494. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.57>
- Durand, G. A., Raoult, D., ve Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>
- Elmanama, A. A., Alhour, M. T., ve Info, A. (2013). Isolation, Characterization and application of calcite producing bacteria from urea rich soils. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 3(4), 388–399.
- Engel, A. S., Stern, L. A. ve Bennett, P. C. (2004). Microbial contributions to cave formation: New insights into sulfuric acid speleogenesis. *Geology*, 32(5), 369. <https://doi.org/10.1130/G20288.1>
- Epe, B. ve Woolley, P. (1984). The binding of 6-demethylchlortetracycline to 70S, 50S and 30S ribosomal particles: a quantitative study by fluorescence anisotropy. *The EMBO Journal*, 3(1), 121-126.
- Etebu, E. ve Arikekpa, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90-101.
- Eze, P., Ojimba, N., Abonyi, D., Esimone, C., Chukwunwejim, C., Abba, C., Okoye, F. (2018). Antimicrobial activity of metabolites of an endophytic fungus isolated from the leaves of citrus jambhiri (Rutaceae). *Tropical Journal of Natural Product Research*, 2(3), 145-149. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v2i3.9>
- Falagas, M. E., Rafailidis, P. I., Matthaïou, D. K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*, 13, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.05.002>
- Farda, B., Djebaili, R., Vaccarelli, I., del Gallo, M., Pellegrini, M. (2022). Actinomycetes from caves: An overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*, 10(2), 453.
- Fajardo, A., Martínez-Martín, N., Mercadillo, M., Galán, J. C., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tümmeler, B., Baquero, F., Martínez, J. L. (2008). The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE*, 3(2),1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>
- Ford, DC. (2006). *Karst geomorphology, caves and cave deposits: a review of North American contributions during the past half century*. Geological Society of America Special Papers: Clifornia.

- Formica, J. V., Shatkin, A. J., Katz, E. (1968). Actinomycin analogues containing pipercolic acid: Relationship of structure to biological activity. *Journal of Bacteriology*, 95(6), 2139-2150. <https://doi.org/10.1128/jb.95.6.2139-2150.1968>
- Friedman, M. (2018). Analysis, nutrition, and health benefits of tryptophan. *International Journal of Tryptophan Research*, 11. <https://doi.org/10.1177/1178646918802282>
- Foster, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiology Review*. 41(3):430-449.
- Frank, U., ve Tacconelli, E. (2012). The Daschner guide to in-hospital antibiotic therapy: European standards. *European standards. Springer Science ve Business Media*.
- Gatinho, P., Salvador, C., Gutierrez-Patricio, S., Macedo-Arantes, S., Martins, M. R., Silva, A. M., Caldeira, A. T. (2024). From cultural and natural heritage to reservoir of biomedicine: Prospection of bioactive compounds produced by bacterial isolates from caves. *International Biodeterioration ve Biodegradation*, 190, 105773. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2024.105773>
- Geerdes, N. (2021). *Measuring diversity and quantity of Archaea in Wind Cave National Park*. Honors Program Theses, University of Northern Iowa, ABD.
- Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 34(10), 1203–1232. <https://doi.org/10.1039/C7NP00026J>
- Gibbons, S. (2012). An Introduction to planar chromatography and its application to natural products isolation. *Methods in Molecular Biology*, 864, 117-153. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_6.
- Girma, A. ve Aemiro, A. (2022). Evaluation of soil *Streptomyces* isolates from North-Western Ethiopia as potential Inhibitors against Spoilage and Foodborne Bacterial Pathogens. *Journal of Chemistry*, 4, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2022/5547406>
- Ghosh, S., Kuisiene, N., Cheeptham, N. (2017). The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochemical Pharmacology*, 134, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.018>
- Gomez-Cambronero, J., Wang, E., Johnson, G., Huang, C. K., Sha'afi, R. I. (1991). Platelet-activating factor induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6240-6245.
- Gonzalez- Lopez, J., Aliaga, L., Gonzalez- Martinez, A., Martinez- Toledo, M. (2015). Pantothenic Acid. *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, 67-101. Wiley: ABD.
- Gonzalez-Pimentel, J. L., Dominguez-Moñino, I., Jurado, V., Laiz, L., Caldeira, A. T., Saiz-Jimenez, C. (2022). The rare actinobacterium *Crossiella* sp. is a potential source of new bioactive compounds with activity against bacteria and fungi. *Microorganisms*, 10(8), 1575. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081575>

- Gosse, J. T., Ghosh, S., Sproule, A., Overy, D., Cheeptham, N., Boddy, C. N. (2019). Whole genome sequencing and metabolomic study of cave *Streptomyces* isolates ICC1 and ICC4. *Frontiers in Microbiology*, 10(10), 1020.
- Griffin, M. O., Ceballos, G., Villarreal, F. J. (2011). Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: Possible mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 63(2), 102-107.
- Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., Saiz-Jimenez, C. (1999). Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods*, 36(1–2), 115–122.
- Hagar, M., Morgan, K. D., Stumpf, S. D., Tsingos, M., Banuelos, C. A., Sadar, M. D., Blodgett, J. A. V., Andersen, R. J., Ryan, K. S. (2024). Piperazate-guided isolation of caveamides A and B, cyclohexenylalanine-containing nonribosomal peptides from a cave Actinomycete. *Organic letters*, 26(19), 4127–4131.
- Hall, C. W. ve Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Hamed, J., Kafshnouchi, M., Ranjbaran, M. (2019). A Study on actinobacterial diversity of Hampoeil cave and screening of their biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1587–1595. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.010>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry ve Biology*, 5(10), 245–249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hassan, H. M., Degen, D., Jang, K. H., Ebright, R. H., Fenical, W. (2015). Salinamide F, new depsipeptide antibiotic and inhibitor of bacterial RNA polymerase from a marine-derived *Streptomyces* sp. *The Journal of antibiotics*, 68(3), 206-209.
- Hobby, G. L., Meyer, K., ve Chaffee, E. (1942). Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. *Experimental Biology and Medicine*, 50(2), 281-285. <https://doi.org/10.3181/00379727-50-13773>
- Hong, W., Zeng, J., ve Xie, J. (2014). Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(4), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.06.012>
- Lee, B., Lee, G., Hwang, G.J., Heo, K.T., Lee, J.K., Jang, J., Hwang, B.Y., Jang, J., Cho, Y., Hong, Y. (2023). Rubiflavin G, photorubiflavin G, and photorubiflavin E: Novel pluramycin derivatives from *Streptomyces* sp. W2061 and their anticancer activity against breast cancer cells. *The Journal of Antibiotics*, 76, 585–591. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00643-w>
- Hong, Y. (2023). Rubiflavin G, photorubiflavin G, and photorubiflavin E: Novel pluramycin derivatives from *Streptomyces* sp. W2061 and their anticancer activity against breast cancer cells. *The Journal of Antibiotics*, 76, 585–591.

- Huk, J. ve Blumauerova, M. (1989). Streptomycetes producing daunomycin and related compounds: Do we know enough about them after 25 years?. *Folia Microbiologica*, 34, 324–349.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80.
- Ibnouf, E. O. (2021). Screening of O-7 Isolate actinomycete producing antimicrobials in different growth conditions against selected pathogens. *International Journal Of Pharmaceutical And Phytopharmacological Research*, 11(2), 13-23. [ht](#)
- Iredell, J., Brown, J. ve Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ Journal*, 352. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- Iquebal, M. A., Passari, A. K., Jagannadham, J., Ahmad, F., Leo, V. V., Singh, G., Jaiswal, S., Rai, A., Kumar, D., Singh, B. P. (2021). Microbiome of Pukzing Cave in India shows high antimicrobial activity against plant and animal pathogens. *Genomics*, 113(6), 4098-4108. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.10.004>
- Itcus, C., Pascu, M. D., Lavin, P., Perşoiu, A., Iancu, L., Purcarea, C. (2018). Bacterial and archaeal community structures in perennial cave ice. *Scientific reports*, 8(1), 15671.
- Jang, K. H., Nam, S. J., Locke, J. B., Kauffman, M. C. A., Beatty, M. D. S., Paul, M. L. A., Fenical, W. (2013). Anthracimycin, a potent anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete. *Angewandte Chemie*, 52(30), 7822-7824.
- Jakubiec-Krzsniak, K., Rajnizs-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., Solecka, J. (2018). Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 259–272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
- Jaroszewicz, W., Bielańska, P., Lubomska, D., Kosznik-Kwaśnicka, K., Golec, P., Grabowski, Ł., Wiczerzak, E., Drózd, W., Gaffke, L., Pierzynowska, K., Węgrzyn, G., Węgrzyn, A. (2021). Antibacterial, antifungal and anticancer activities of compounds produced by newly isolated Streptomyces strains from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland). *Antibiotics*, 10(10), 1212. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101212>
- Jiang, Z., Guo, L., Chen, C., Liu, S., Zhang, L., Dai, S., He, Q., You, X., Hu, X., Tuo, L., Jiang, W., Sun, C. (2015). Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic, produced by the Streptomyces sp. CC8-201 from the soil of a karst cave. *The Journal of Antibiotics*, 68(12), 771–774. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.70>
- Jiang, L., Pu, H., Xiang, J., Su, M., Yan, X., Yang, D., Zhu, X., Shen, B., Duan, Y., Huang, Y. (2018). Huanglongmycin A-C, Cytotoxic Polyketides Biosynthesized by a Putative Type II Polyketide Synthase From *Streptomyces* sp. CB09001. *Frontiers Chemistry*, 26(6), 254. doi: 10.3389/fchem.2018.00254

- Jiang, L., Xiang, J., Zhu, S., Tang, D., Gong, B., Pu, H., Duan, Y., Huang, Y. (2022). Undescribed benzophenone and xanthenes from cave-derived *Streptomyces* sp. CB09001. *Natural Product Research*, 36(7), 1725-1733.
- Jiang, J., Jiang, H., Shen, D., Chen, Y., Shi, H., He, F. (2022). Citrinadin C, a new cytotoxic pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. *The Journal of Antibiotics*, 75(5), 301-303.
- Jones, D., Keddle, R. M. (2006). The genus *Arthrobacter*. *The prokaryotes*. 3, 945-960. Springer: New York.
- Jones, D., Schaperdorth, I., Northup, D., Gómez-Cruz, R., Macalady, J. (2023). Convergent Community Assembly among Globally Separated Acidic Cave Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(1). <https://doi.org/10.1128/aem.01575-22>
- Jones-Lopez, E. C. ve Ellner, J. J. (2011). Tuberculosis and Atypical Mycobacterial Infections. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, 228-247. Wiley: ABD. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3935-5.00035-5>
- Jose, P. A., Maharshi, A., Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246.
- Josephine, H. R., Kumar, I., Pratt, R. F. (2004). The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-Peptidase by peptidoglycan-mimetic β -Lactams. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (26), 8122-8123.
- Joshua, S. A., Sangeetha, N., Iniyan, A. M., Vincent, S. G. P. (2021). Exploring antagonistic actinobacteria from a mangrove ecosystem of the southern coast of India against multidrug-resistant pathogens. *Environmental and Experimental Biology*, 19(4). <https://doi.org/10.22364/eeb.19.24>
- Kamigiri, K., Tokugana, T., Shibasaki, M., Setiawan, B., Morioka, M., Suzuki, K., ve Rantiatmodjo, R. M. (1996). YM-30059, a novel quinolone antibiotic produced by *Arthrobacter* sp. *The Journal of Antibiotics*, 49(8), 823-825.
- Katz, L., ve Ashley, G. W. (2005). Translation and Protein Synthesis: Macrolides. *Chemical Reviews*, 105(2), 499-528. <https://doi.org/10.1021/cr030107f>
- Kavaliauskas, P., Grybaitė, B., Sapijanskaitė-Banevič, B., Vaickelionienė, R., Petraitis, V., Petraitienė, R., Mickevičius, V. (2024). Synthesis of 3-((4-Hydroxyphenyl) amino) propanoic acid derivatives as promising scaffolds for the development of antimicrobial candidates targeting multidrug-resistant bacterial and fungal pathogens. *Antibiotics*, 13(2), 193.
- Khattab, A. I., Eltahir, H. B., Humodi, A. S. (2016). *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. *International Current Pharmaceutical Journal*, 5(3), 27-32.

- Kitagawa, W. ve Tamura, T. (2008). Three Types of Antibiotics Produced from *Rhodococcus erythropolis* Strains. *Microbes and Environments*, 23(2), 167-171. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.167>
- Kitagawa, W., Mitsuhashi, S., Hata, M., Tamura, T. (2018). Identification of a novel bacteriocin-like protein and structural gene from *Rhodococcus erythropolis* JCM 2895, using suppression-subtractive hybridization. *The Journal of Antibiotics*, 7, 872-879.
- Klusaite, A., Vickackaite, V., Vaitkeviciene, B., Karnickaite, R., Bukelskis, D., Kieraite-Aleksandrova, I., Kuisiene, N. (2016). Characterization of antimicrobial activity of culturable bacteria isolated from krubera-voronja cave. *International Journal of Speleology*, 45(3), 275–287. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.45.3.1978>
- Kochhar, N., I. K. K., Shrivastava, S., Ghosh, A., Rawat, V. S., Sodhi, K. K., Kumar, M. (2022). Perspectives on the microorganism of extreme environments and their applications. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100134>
- Kotra, L. P., Haddad, J., Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3249-3256.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Kraemer, S. M. (2004). Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences- Research Across Boundaries*, 66(1), 3-18. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0690-5>
- Kumar, S., ve Ritika. (2020). A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 121.
- Kurosawa, K., Ghiviriga, I., Sambandan, T. G., Lessard, P. A., Barbara, J. E., Rha, C., Sinskey, A. J. (2008). Rhodostreptomycins, Antibiotics Biosynthesized Following Horizontal Gene Transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *Journal of the American Chemical Society*, 130(4), 1126-1127.
- Kwiatkowska, B., Maslinska, M., Przygodzka, M., Dmowska-Chalaba, J., Dabrowska, J., Sikorska-Siudek K. (2013). Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 91-101, 4.
- Lacey, H. J. (2022). *Hidden Underworld: A Study Of Secondary Metabolites From Soil-Derived Actinobacteria*, (Ph.D. Thesis). The University of Sydney, Faculty of Science, School of Chemistry, Australia.
- Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 245–251.

- Lamprinou, V., Tryfinopoulou, K., Velonakis, E., Vatopoulos, A., Antonopoulou, S., Fragopoulou, E., Pantazidou, A., Economou-Amilli, A. (2015). Cave Cyanobacteria showing antibacterial activity. *International Journal of Speleology*, 44(3), 231–238.
- Lange-Enyedi, N. T., Németh, P., Borsodi, A. K., Halmy, R., Czuppon, G., Kovács, I., Leél-Őssy, S., Demény, A., Makk, J. (2022). Calcium carbonate precipitating cultivable bacteria from different speleothems of karst caves. *Geomicrobiology Journal*, 39(2), 107–122. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.2019857>
- Lapchinskaia O.A., Saburova T.P., Siniagina O.P., Konstantinova N.V, Filicheva V.A. (1975). Spontaneous and induced variability in *Actinomyces rubiginosohelvolus*, a new producer of the antibiotic rubomycin. *Antibiotiki*, 20(12), 1061–1065.
- Lee, S. D., Kim, E. S., Roe, J. H., Kim, J., Kang, S. O., Hah, Y. C. (2000). *Saccharothrix violacea* sp. nov., isolated from a gold mine cave, and *Saccharothrix albidocapillata* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1315–1323. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1315>
- Lema, W., Mahadhy, A., Damas, M., Munissi, J., Lyimo, T. (2022). Characterisation and antimicrobial potential of Actinobacteria isolated from Momela Soda Lakes, Tanzania. *Tanzania Journal of Science*, 48(3), 607-622.
- Leonetti, J. P., Degols, G., Lebleu, B. (1990). Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine) conjugates: mechanism of cell uptake. *Bioconjugate Chemistry*, 1(2), 149-153. <https://doi.org/10.1021/bc00002a010>
- Li, Y., Shang, Y., Li, X., Zhang, Y., Xie, J., Chen, L., Gao, F., Zhou., X. (2021). Design, synthesis, and biological evaluation of low-toxic lappaconitine derivatives as potential analgesics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 243. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114776>
- Lima, B., Scherer, R., Albino., U., Siqueira, F., Bitencourt, J., Santos, S. (2023). Enzymatic and antimicrobial activity of microorganisms isolated from a cave in the Amazon region. *Scientia Plena*, 19(4). doi: 10.14808/sci.plena.2023.046201
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I., ve Zhang, L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034>
- Lindstedt, M., Allenmark, S., Thompson, R. A., Edebo, L. (1990). Antimicrobial activity of betaine esters, quaternary ammonium amphiphiles which spontaneously hydrolyze into nontoxic components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10), 1949-1954. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.10.1949>
- Liu, W., Xu, Y., Wu, D., He, W., Zuo, M., Fu, P., Wang, L. (2024). Novel benzophenones cavephenones A and B from cave-derived *Aspergillus fumigatus* GZWMJZ-152. *Tetrahedron*, 156(52). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2024.133946>

- Lokesha, S., Ravi Kumar Y.S., Sujana Ganapathy, P., Arjun, H., Gaur, P. (2019). Arthrobacter strains from industrial polluted soil and its oxidative potential of choline oxidase gene. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(3), 1847-1854. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.62>
- Long, Y., Jiang, J., Hu, X., Zhou, J., Hu, J., Zhou, S. (2019). Actinobacterial community in Shuanghe Cave using culture-dependent and independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 153. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2713-y>
- Lu, Y., Wang, J., Soladoye, O. P., Aluko, R. E., Fu, Y., Zhang, Y. (2021). Preparation, receptors, bioactivity and bioavailability of γ -glutamyl peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 113, 301-314.
- Luo Y, Zhang Y, Xiong Z, Chen X, Sha A, Xiao W, Peng L, Zou L, Han J, Li Q. (2024). Peptides used for heavy metal remediation: A promising approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12):6717. <https://doi.org/10.3390/ijms25126717>
- Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69-79. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.845878>
- Lukáč, M., Lacko, I., Bukovský, M., Kyselová, Z., Karlovská, J., Horváth, B., Devínsky, F. (2010). Synthesis and antimicrobial activity of a series of optically active quaternary ammonium salts derived from phenylalanine. *Open Chemistry*, 8(1), 194-201. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0126-8>
- Maciejewska, M., Adam, D., Martinet, L., Naômé, A., Całusińska, M., Delfosse, P., Carnol, M., Barton, H. A., Hayette, M.-P., Smargiasso, N., de Pauw, E., Hanikenne, M., Baurain, D., Rigali, S. (2016). A phenotypic and genotypic analysis of the antimicrobial potential of cultivable *Streptomyces* isolated from cave moonmilk deposits. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01455>
- Mahajan, G. B. (2012). Antibacterial Agents from Actinomycetes - A Review. *Frontiers in Bioscience*, 4(1), 240. <https://doi.org/10.2741/373>
- Mandlle, J. L., Bennett, J. E., Dolin, R. (2005). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eighth Edition. Springer: New York.
- Marahier, M. A., Nakano, M. M., Zuber, P. (1993). Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology*, 7(5), 631-636.
- Martin-Pozas, T., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Gonzalez-Pumariega, M., Elez, J., Duarte Ede la Rasilla, M., Canaveras, J., Saiz-Jimenez, C., Sanchez-Moral S. (2024). Adaptive response of prokaryotic communities to extreme pollution flooding in a Paleolithic rock art cave (Pindal Cave, northern Spain). *Science of The Total Environment*, 15, 921.
- Martinet, L., Naômé, A., Rezende, L. C., Tellatin, D., Pignon, B., Docquier, J. D., ... ve Rigali, S. (2023). Lunaemycins, new cyclic hexapeptide antibiotics from the cave

- moonmilk-dweller *Streptomyces lunaelactis* MM109T. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1114.
- Martinez, J. (2008), *Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments, Science*, 365-367, 321(5887)
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33–39.
- Mason, C. (2015). Screening of Cave Bacteria for Antimicrobial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Thompson Rivers University Undergraduate Research Conference*, Kamloops BC, Canada.
- Matamoros-Recio, A., Franco-Gonzalez, J. F., Forgione, R. E., Torres-Mozas, A., Silipo, A., Martín-Santamaría, S. (2021). Understanding the antibacterial resistance: Computational explorations in bacterial membranes. *American Chemical Society omega*, 6(9), 6041-6054.
- Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y., ve Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 727-737. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.727>
- Miethke, M., ve Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413-451. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>
- Menninger, J. R., ve Otto, D. P. (1982). Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(5), 811-818.
- Mikłasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Wąsik, T. J. (2018). Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of staphylococcus aureus clinical strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph15102321>
- Mishra, A., Choi, J., Choi, S.-J., Baek, K.-H. (2017). Cyclodipeptides: An Overview of Their Biosynthesis and Biological Activity. *Molecules*, 22(10), 1796. <https://doi.org/10.3390/molecules22101796>
- Mohr K. I. (2016). History of Antibiotics Research. *Current topics in microbiology and immunology*, 398, 237–272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499
- Moldovan, O. T.; K. L.; H. S. (2018). *Cave Ecology*. Springer International Publishing: New York. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-98852-8>
- Monaghan, R. L., Polishook, J. D., Pecore, V. J., Bills, G. F., Nallin-Omstead, M., ve Streicher, S. L. (1995). Discovery of novel secondary metabolites from fungi—is it

- really a random walk through a random forest? *Canadian Journal of Botany*, 73(1), 925–931. <https://doi.org/10.1139/b95-340>
- Movassaghi, S. (2018). Bioactive Ligands in Organoruthenium Complexes: Synthesis, Biological Studies and Pharmacological Properties (Ph.D. Thesis), The University of Auckland, New Zealand.
- Mukherjee, I., Ghosh, A., Bhadury, P., De, P. (2018). Leucine-Based Polymer Architecture-Induced Antimicrobial Properties and Bacterial Cell Morphology Switching. *ACS Omega*, 3(1), 769-780. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01674>
- Mullis, M. M., Rambo, I. M., Baker, B. J., Reese, B. K. (2019). Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02518>
- Mumtaz, S., Mumtaz, S., Ali, S., Tahir, H. M., Kazmi, S. A. R., Mughal, T. A., Younas, M. (2023). Evaluation of antibacterial activity of vitamin C against human bacterial pathogens. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.247165>
- Munita, J. M. ve Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Myloie, J. E. ve Myloie, J. R. (2013). *Caves and Karst of the Bahama Islands*. Lace, M.J., Mylorie, J.E. (Ed.) Coastal Karst Landforms içinde (147-176 ss.). Springer: New York.
- Nadalian, M., Kamaruzaman, N., Yusop, M. S. M., Babji, A. S., Yusop, S. M. (2019). Isolation, purification and characterization of antioxidative bioactive elastin peptides from poultry skin. *Food Science of Animal Resources*, 39(6), 966-979. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e90>
- Naguib, M. M. ve Valvano, M. A. (2018). Vitamin E increases antimicrobial sensitivity by inhibiting bacterial lipocalin antibiotic binding. *mSphere*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00564-18>
- Nakaew, N., Pathom-aree, W. ve Lumyong, S. (2009). First record of the Isolation, identification and biological activity of a new strain of *Spirillospora albida* from Thai Cave soil. *Actinomycetologica*, 23(1), 1–7.
- Nawaz, S., Fatima, A. ve Saleem, M. (2023). Exploring the antimicrobials production potential of Actinobacteria isolated from caves at Bahadurkhel Karak, Pakistan: Antimicrobial activities of cave actinobacteria against XDR Salmonella. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences*, 60(1), 101-112.
- Newman, D. J. ve Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661.

- Newton, G. G. F. ve Abraham, E. P. (1955). Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid. *Nature*, 175(4456), 548.
- Nguefack, J., Budde, B. B. ve Jakobsen, M. (2004). Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Letters in Applied Microbiology*, 39(5), 395-400.
- Nguyen, F., Starosta, A., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395(5), 559-575.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Biswas, B., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Dhanasekaran, D. (2018). Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphases on Pyridine-2,5-diacetamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7. *Microbiological Research*, 207, 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.012>.
- Nováková, A. (2009). Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *International Journal of Speleology*, 38(1), 71–82. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.38.1.8>
- Ogórek, R., Lejman, A. ve Matkowski, K. (2013). Fungi isolated from Niedźwiedzia Cave in Kletno (Lower Silesia, Poland). *International Journal of Speleology*, 42(2), 161–166. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.2.9>
- Ohtsuka, T., Itezono, Y., Nakayama, N., Kurano, M., Nakada, N., Tanaka, H., Sawairi, S., Yokose, K. Seto, H. (1992). Structural elucidation of arthrobasilins A, B and C, structurally unique secondary metabolites of A microorganism. *Tetrahedron Letters*, 33(19), 2705-2708. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79062-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79062-9)
- Oliveira, R. C. D., Diniz, F. V., Peters, L. P., Carvalho, C. M. (2024). Antimicrobial activity of Actinomycetes isolated from soils in the Brazilian Amazon. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024230213>
- Pancu, D., Scurtu, A., Macasoi, I., Marti, D., Mioc, M., Soica, C., Coricovac, D., Horhat, D., Poenaru, M., Dehelean, C. (2021). Antibiotics: Conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity-A pharmaco-toxicological screening. *Antibiotics*, 10(4), 401.
- Pang, X., Wong, C., Chung, H.-J., Yuk, H.G. (2019). Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. *Food Control*, 98, 200-208.
- Patel, U., Yan, Y. P., Hobbs, F. W., Kaczmarczyk, J., Slee, A. M., Pompliano, D. L., Kurilla, M. G., Bobkova, E. v. (2001). Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37199-37205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102966200>

- Park, J. T. ve Uehara, T. (2008). How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 211-227.
- Patel, P. H. ve Hashmi, M. F. (2022). *Macrolides*. StatPearls (Internet).
- Paula, C. C. P. de, Bichuette, M. E., ve Selegim, M. H. R. (2020). Nutrient availability in tropical caves influences the dynamics of microbial biomass. *Microbiology Open*, 9(7). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1044>
- Peterson, E., ve Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Petri, W. A. (2011). Penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* içinde. 12th. Edition. (1477-1504 ss.).
- Pham, T. D. M., Ziora, Z. M. ve Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *RSC Medicinal Chemistry*, 10(10), 1719-1739. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>
- Piechowska, P., Zawirska-Wojtasiak, R., Mildner-Szkudlarz, S. (2019). Bioactive β -carboline in food: A Review. *Nutrients*, 11(4), 814.
- Pipan, T., Deharveng, L., ve Culver, D. C. (2020). Hotspots of Subterranean Biodiversity. *Diversity*, 12(5), 209. <https://doi.org/10.3390/d12050209>
- Pipite, A., Lockhart, P. J., McLenachan, P. A., ve Christi, K. (2022). Isolation, antibacterial screening, and identification of bioactive cave dwelling bacteria in Fiji. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1012867>
- Polishchuk, L. V., ve Bambura, O. I. (2022). Resistance to Tetracycline and Oleandomycin of a Number of Streptomyces Producers of Polyketide Antibiotics. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 84(3), 60-68.
- Prasher, P., ve Sharma, M. (2021). Medicinal chemistry of anthranilic acid derivatives: A mini review. *Drug Development Research*, 82(7), 945-958.
- Pusz, W., Ogórek, R., Knapik, R., Kozak, B., Bujak, H. (2015). The occurrence of fungi in the recently discovered Jarkowicka Cave in the Karkonosze Mts. (Poland). *Geomicrobiology Journal*, 32(1), 59-67.
- Quinn, G. A., Banat, A. M., Abdelhameed, A. M., Banat, I. M. (2020). Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology*, 69(8), 1040-1048. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
- Rachid, N. A. ve Güngör, N. D. (2023). Screening of Bioactive Compounds for Biomedical and Industrial Uses from Actinobacteria Isolated from the Parsik Cave,

- Turkey: Identifying novel compounds from extreme environments. *Johnson Matthey Technology Review*, 67(2), 159-170.
- Rajput, Y., Biswas, J. ve Rai, V. (2012). Potentiality test in antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of subterranean *Streptomyces* strains isolated from Kotumsar Cave of India. *International Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 53–60.
- Rauthan, J. V. S., Rawat, S., ve Chhetri, G. (2021). Physico-chemical parameters and seasonal variation of zooplankton in Song River at Gularghati of Dehradun, Uttarakhand. *Journal of Mountain Research*, 16(3.), 359-366.
- Ramlawi, S., Aitken, A., Abusharkh, S., McMullin, D. R., Avis, T. J. (2022). Arthropeptide A, an antifungal cyclic tetrapeptide from *Arthrobacter psychrophenicus* isolated from disease suppressive compost. *Natural Product Research*, 36(22), 5715-5723. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2018434>
- Rangseekaew, P. ve Pathom-Aree, W. (2019). Cave actinobacteria as producers of bioactive metabolites. In *Frontiers in Microbiology*. 22(10), 387.
- Rante, H., Manggau, M., Alam, G., Pakkı, E., Erviani, A., Hafidah, N., Abidin, H., Alimuddin, A. A. (2024). Isolation and identification of Actinomycetes with antifungal activity from karts ecosystem in Maros-Pangkep, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 25(2). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d250203>
- Recke, V. K., Gerlitzki, M., Hausmann, R., Sylatk, C., Wray, V., Tokuda, H., Suzuki, N., Lang, S. (2013). Enzymatic production of modified 2- dodecyl- sophorosides (biosurfactants) and their characterization. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), 452-463. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300012>
- Reddy, G. S., ve Pal, M. (2021). Indole derivatives as anti-tubercular agents: An overview on their synthesis and biological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 28(22), 4531-4568.
- Reygaert, W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. (2018). *AIMS Microbiology*, 4(3):482-501.
- Rewak- Soroczyńska, J., Paluch, E., Siebert, A., Szalkiewicz, K., Obłąk, E. (2019). Biological activity of glycine and alanine derivatives of quaternary ammonium salts (QASs) against micro- organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 69(3):212-220
- Ribeiro da Cunha, Fonseca, ve Calado. (2019). Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics*, 8(2), 45.
- Rusu, A., ve Buta, E. L. (2021). The development of third-generation tetracycline antibiotics and new perspectives. *Pharmaceutics*, 13(12), 2085.
- Saad, M. A., Abdelsamei, H. M., Ibrahim, E. M. A., Abdou, A. M., Sohaimy, S. A. El. (2015). Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of

- Lactobacillus Acidophilus bacteriocin. *Benha Veterinary Medical Journal*, 28(1), 210-215. <http://www.bvmj.bu.edu.eg>
- Sabrina, N., Rizal, M., Nurkolis, F., Hardinsyah, H., Tanner, M. J., Gunawan, W. Ben, Handoko, M. N., Mayulu, N., Taslim, N. A., Puspaningtyas, D. S., Noor, S. L., Yusuf, V. M., Permatasari, H. K., Radu, S. (2022). Bioactive peptides identification and nutritional status ameliorating properties on malnourished rats of combined eel and soy-based tempe flour. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.963065>
- Sahoo, D., Devi, N. J., Ngashangva, N., Momota, P., Rojeena, Y., ve Indira Devi, S. (2019). Draft genome sequence of *Arthrobacter globiformis* mrc11, an antimicrobial agent isolated from a Khangkhui Cave deposit. *Microbiology Resource Announcements*, 8(11). <https://doi.org/10.1128/MRA.01620-18>
- Saito, K., Warrier, T., Somersan-Karakaya, S., Kaminski, L., Mi, J., Jiang, X., Park, S., Shigyo, K., Gold, B., Roberts, J., Weber, E., Jacobs, W. R., Nathan, C. F. (2017). Rifamycin action on RNA polymerase in antibiotic-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* results in differentially detectable populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.1705385114>
- Saiz-Jimenez, C. (1999). Biogeochemistry of weathering processes in monuments. *Geomicrobiology Journal*, 16(1), 27–37.
- Saliba, K. J., Ferru, I., ve Kirk, K. (2005). Provitamin B₅ (Pantothenol) Inhibits growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 632-637. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.632-637.2005>
- Salzano, A., Di Meo, M. C., D'Onofrio, N., Bifulco, G., Cotticelli, A., Licitra, F., Iraci Fuintino, A., Cascone, G., Balestrieri, M. L., Varricchio, E., Campanile, G. (2022). Breed and feeding system impact the bioactive anti-inflammatory properties of bovine milk. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11088. <https://doi.org/10.3390/ijms231911088>
- Sanchez, A. R., Rogers, R. S., ve Sheridan, P. J. (2004). Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International Journal of Dermatology*, 43(10), 709-715.
- Schatz, A., Bugle, E., ve Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Experimental Biology and Medicine*, 55(1), 66-69.
- Sherin, D. R., ve Manojkumar, T. K. (2021). Exploring the selectivity of guanine scaffold in anticancer drug development by computational repurposing approach. *Scientific Reports*, 11(1), 16251. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95507-4>
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., ve Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>

- Silva, E. I. P., Jayasingha, P., Senanayake, S., Dandeniya, A., Munasinghe, D. H. (2021). Microbiological study in a gneissic cave from Sri Lanka, with special focus on potential antimicrobial activities. *International Journal of Speleology*, 50(1), 41-51. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.50.1.2343>
- Silverman, R. B., ve Holladay, M. W. (2014). *The organic chemistry of drug design and drug action*. Third Edition. Academic Press: USA. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64537-2>
- Singh, M., ve Arbad, B. R. (2015). Characterization of 4th–5th century A.D. earthen plaster support layers of Ajanta mural paintings. *Construction and Building Materials*, 82, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.02.043>
- Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., Prabakar, K. (2019). Extreme environment Streptomyces: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads, *International Journal of Microbiology*, 1-20.
- Smith, R. A., M'ikanatha, N. M., ve Read, A. F. (2015). Antibiotic resistance: A primer and call to action. *Health Communication*, 30(3), 309-314.
- Sreenivasan, A., Manikkam, R., ve Manigundan, K. (2022). Isolation, characterization and antimicrobial activity of endophytic *Actinobacteria* from medicinal plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(5), 1150-1160.
- Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J. (2012). Streptomyces sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(5), 1217–1231. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4237-3>
- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., Petrović, S. (2013). *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p* -coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3205-3208. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6156>
- Sykes, J. E. ve Papich, M. G. (2014). *Canine and feline infectious diseases*. Elsevier Health Sciences: New York.
- Şirikci, G., Ancın, N., Öztaş, S. G., Yenişehirli, G., Öztaş, N. A. (2014). Synthesis, spectral, theoretical studies and in vitro antimicrobial activities of novel diphenyltin (IV) complexes of Schiff bases derived from phenacylamine. *Applied Organometallic Chemistry*, 28(7), 537-544. <https://doi.org/10.1002/aoc.3160>
- Takahashi, Y., ve Nakashima, T. (2018). Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics. *Antibiotics*, 7(2), 45.
- Tan, M. A., Castro, S. G., Oliva, P. M. P., Yap, P. R. J., Nakayama, A., Magpantay, H. D., dela Cruz, T. E. E. (2020). Biodiscovery of antibacterial constituents from the endolichenic fungi isolated from Parmotrema rampoddense. *Biotechnology*, 10(5), 212. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02213-5>

- Tang, K ve Zhao, H. (2023) Quinolone antibiotics: resistance and therapy. *Infection and Drug Resistance*, 16, 811-820,
- Tangjitjaroenkun, J. (2018). Evaluation of antioxidant, antibacterial, and gas chromatography-mass spectrometry analysis of ethyl acetate extract of streptomyces omiyaensis SCH2. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(7), 271-276. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i7.25692>
- Taylor, C. R., Leader, J. P., Singleton, W., Munster, E. W., Falkner, F. C., O'Neil, J. A. (1983). Profile of trimazosin: An effective and safe antihypertensive agent. *American Heart Journal*, 106(5), 1269-1281. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(83\)90188-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(83)90188-6)
- Thapa, B. B., Huo, C., Budhathoki, R., Chaudhary, P., Joshi, S., Poudel, P. B., Sohng, J. K. (2024). Metabolic Comparison and Molecular Networking of Antimicrobials in Streptomyces Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4193.
- Thawabteh, A., Thawabteh, A., Lelario, F., Bufo, S., Scrano, L. (2020). Classification, toxicity and bioactivity of natural diterpenoid alkaloids. *Molecules*, 26(13), 4103.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A ve Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: secondary metabolites. *Secondary metabolites-sources and applications*, 1, 13. Intechopen: London.
- Timothy, J. (2024). WHO publishes updated list of bacterial priority pathogens. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.003>
- Tomczyk-Żak, K. ve Zielenkiewicz, U. (2016). Microbial diversity in caves. *Geomicrobiology Journal*, 33(1), 20–38.
- Tsakou, F., Jersie-Christensen, R., Jenssen, H., Mojsoska. B. (2020). The role of proteomics in bacterial response to antibiotics. *Pharmaceuticals*, 13(9), 217.
- Tüfekci, E.F., Uzun, Ü., Sağlam Ertunga, N., Biber, A., Hıdıroğlu, İ.A., Tekkılıç, İ., Altay, B., Kılıç, A.O. (2023). Doğu Karadeniz bölgesindeki karstik mağaralardan izole edilen aktinomisetlerin antimikrobiyal aktivitelerinin ve 16S rRNA dizilerinin araştırılması. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi* 26 (6), 1277-1290.
- Usta, A. (2012). *Topraktan antibiyotik üreten Bacillus sp.' lerin taranması, antibiyotik üretimi üzerine bazı parametrelerin etkisi ve sporulasyonla ilişkisinin belirlenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi). Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye.
- Vaijayanthi, G., Cholarajan, A., ve Vijayakumar, R. (2012). Isolation, characterization and antibacterial activity of terrestrial Actinobacteria in the soils of Thanjavur District, Tamil Nadu, India. *Research Journal. Science and Technology*, 4(3), 132-139.
- van Hoek, Angela H. A. M., Dik Mevius, Beatriz Guerra, Peter Mullany, Adam Paul Roberts, ve Henk J. M. Aarts. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 2, 203.

- Vanderwolf, K., Malloch, D., McAlpine, D., Forbes, G. (2013). A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *International Journal of Speleology*, 42(1), 77–96. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.9>
- Vannuffel, P., ve Cocito, C. (1996). Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, 51(1), 20-30. <https://doi.org/10.2165/00003495-199600511-00006>
- Verdine, G. L. (1996). The combinatorial chemistry of nature. *Nature*, 384(6604), 11–13. <https://doi.org/10.1038/384011a0>
- Wali, M. K., ve Abed, M. M. (2019). Antibacterial activity of acetic acid against different types of bacteria causes food spoilage. *Plant Archives*, 19(2), 1827-1831.
- Walsh, M., Ghosh, S., Ponce, A., James, C., Kam, G., Lauriente, T., Cheeptham, N. (2023). Bacteria isolated from Canada's White Rabbit Cave revealed antimicrobial activities. *Fine Focus*, 9(1), 66-83.
- Wang, C., Zhao, F., Zhang, L., Chai, X., Meng, Q. (2017). Synthesis and antibacterial evaluation of a series of 11,12-cyclic carbonate azithromycin-3-O-descladinosyl-3-O-carbamoyl glycosyl derivatives. *Molecules*, 22(12), 2146.
- Wang, Y., Ning, X., Liang, J., Wang, A., Qu, J. (2025). Enhancing microbial superoxide generation and conversion to hydroxyl radicals for enhanced bioremediation using iron-binding ligands. *Journal of Environmental Sciences*, 147, 597-606. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.11.023>
- Waxman, D. J., ve Strominger, J. L. (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), 825-869.
- Wibbelt, G., Kurth, A., Hellmann, D., Weishaar, M., Barlow, A., Veith, M., Prüger, J., Görföl, T., Grosche, L., Bontadina, F., Zöphel, U., Seidl, H.-P., Cryan, P. M., Blehert, D. S. (2010). White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8), 1237–1243. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100002>
- Vitali, L. A., Petrelli, D., Lambertucci, C., Prenna, M., Volpini, R., Cristalli, G. (2012). In vitro antibacterial activity of different adenosine analogues. *Journal of Medical Microbiology*, 61(4), 525-528. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038174-0>
- Webster, C. M. ve Shepherd, M. (2023). A mini-review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03445-8>
- Wietz, M., Mansson, M., Bowman, J. S., Blom, N., Ng, Y., Gram, L. (2012). Wide distribution of closely related, antibiotic-producing arthrobacter strains throughout the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 2039-2042. <https://doi.org/10.1128/AEM.07096-11>

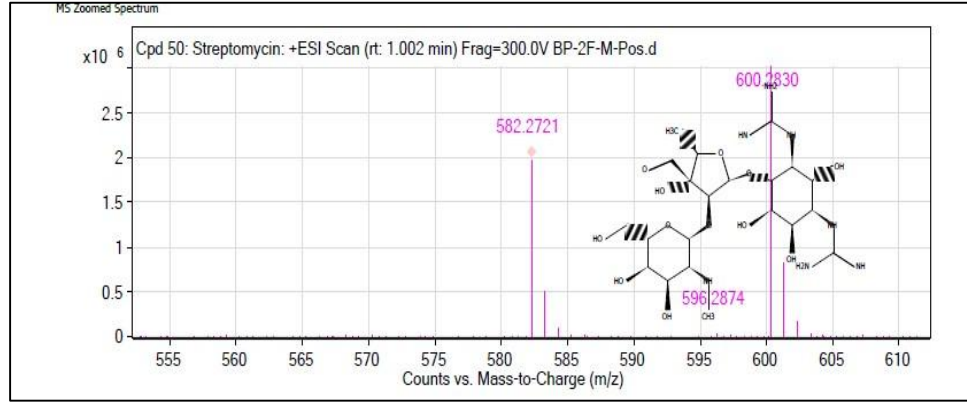
- Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35-48.
- Xu, P., Ding, L., Wei, J., Li, Q., Gui, M., He, X., Su, D., He, S., Jin, H. (2020). A new aquatic pathogen inhibitor produced by the marine fungus *Aspergillus* sp. LS116. *Aquaculture*, 520. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734670>
- Yadav, A. (2021). Microbial biotechnology for bio-prospecting of microbial bioactive compounds and secondary metabolites. *Journal of Applied Biology ve Biotechnology*, 9(2), 1-6.
- Yadav, P. ve Shah, K. (2021). Quinolines, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry. Quinolines, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry. *Bioorganic Chemistry*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104639>
- Yamac, M., ve Yücel, S. (2010). Selection of *Streptomyces* isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1). <https://www.researchgate.net/publication/41000533>
- Yasir, M. (2018). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.005>
- Yellamanda, B., Vijayalakshmi, M., Kavitha, A., Reddy, D. K., Venkateswarlu, Y. (2016). Extraction and bioactive profile of the compounds produced by *Rhodococcus* sp. VLD-10. *Biotechnology*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0576-6>
- Yılmaz, M. ve Seçilmiş, H. (2006). Gaz Kromatografisi Headspace Sistemi ile Süt Ürünlerinde. Bazı Aroma Bileşenlerinin Analizi. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu
- Yosief, H. O., Hussain, S. A., Sarker, M. I., Annous, B. A. (2020). Efficacy of Fatty Acid Amide Derivatives against *Listeria monocytogenes*. *ChemistrySelect*, 5(39), 12261-12265. <https://doi.org/10.1002/slct.202003501>
- Yu, H., Chen, S., Li, H., Wang, R., Jiang, Y., Yan, L., Sun, P. (2022). Fluvirucins B 7–B 10, new antifungal macrolactams from a marine-derived *Nonomuraea* sp. MYH522. *RSC Advances*, 12(24), 15479-15485.
- Yücel, S. (2007). *Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar*, (Yüksek Lisans Tezi). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye.
- Yücel, S., ve Yamaç, M. (2010). Selection of *Streptomyces* isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 1–6.

- Zada, S., Naseem, A. A., Lee, S.-J., Rafiq, M., Khan, I., Shah, A. A., ve Hasan, F. (2016). Geochemical and mineralogical analysis of Kashmir Cave (SMAST), Buner, Pakistan, and isolation and characterization of bacteria having antibacterial activity. *Journal of Cave and Karst Studies*, 78(2), 94–109.
- Zada, S., Sajjad, W., Rafiq, M., Ali, S., Hu, Z., Wang, H., Cai, R. (2021). Cave microbes as a potential source of drugs development in the modern era. *Microbial Ecology*. 84(3):676-687. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01889-3>
- Zaky, A. A., Simal-Gandara, J., Eun, J. B., Shim, J. H., Abd El-Aty, A. M. (2022). Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. İçinde *Frontiers in Nutrition* (C. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>
- Zampolli, J., De Giani, A., Di Canito, A., Sello, G., Di Gennaro, P. (2022). Identification of a Novel Biosurfactant with Antimicrobial Activity Produced by *Rhodococcus opacus* R7. *Microorganisms*, 10(2), 475.
- Zengin, G., Nafea Al Kawaz, A. M., Zengin, H., Mert, A., Kucuk, B. (2016). Synthesis and characterization of 3-aminokinolin derivatives and studies of photophysicochemical behaviour and antimicrobial activities. *Journal of Molecular Structure*, 1103, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.09.016>
- Zhanel, G. G., Dueck, M., Hoban, D. J., Vercaigne, L. M., Embil, J. M., Gin, A. S., Karlowsky, J. A. (2001). Review of macrolides and ketolides. *Drugs*, 61(4), 443-498. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161040-00003>
- Zhang, X., Wang, J., Wu, Q., Li, L., Wang, Y., Yang, H. (2019). Determination of kanamycin by high performance liquid chromatography. *Molecules*, 24(10), 1902. <https://doi.org/10.3390/molecules24101902>
- Zhang, K., Zhang, X., Lin, R., Yang, H., Song, F., Xu, X., Wang, L. (2022). New secondary metabolites from the marine-derived fungus *Talaromyces mangshanicus* BTBU20211089. *Marine Drugs*, 20(2), 79.
- Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T. (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -Lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1737-1742. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1737-1742.2001>
- Zhao, P., Xue, Y., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Feng, S., Bai, X., Zuo, Y., Li, P. (2018). Actinobacteria-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*, 103, 48-59. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.03.011>
- Zhou, J. P., Gu, Y. Q., Zou, C. S., Mo, M. H. (2007). Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou Province, Southwest of China. *Journal of Microbiology*, 45(2), 105-112.
- Zothanpuia, Passari, A. K., Leo, V. V., Chandra, P., Kumar, B., Nayak, C., Hashem, A., Abdullah, E. F., Alqarawi, A. A., Singh, B. P. (2018). Correction to: Bioprospection

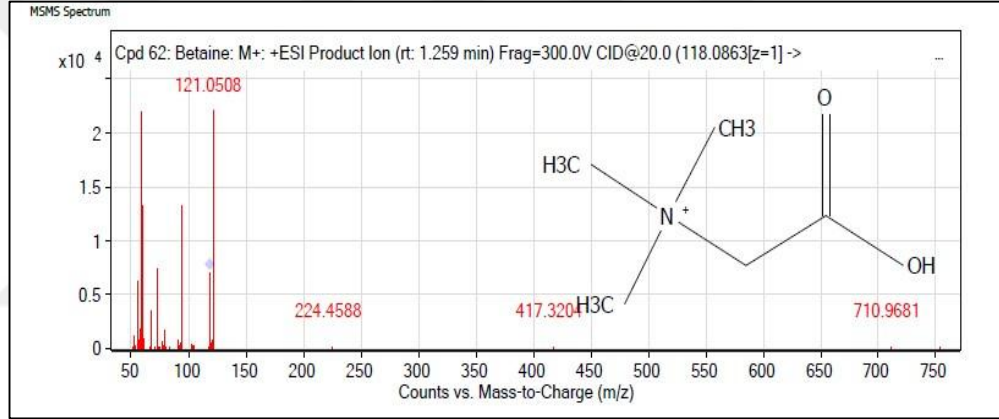
of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 86.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0933-8>



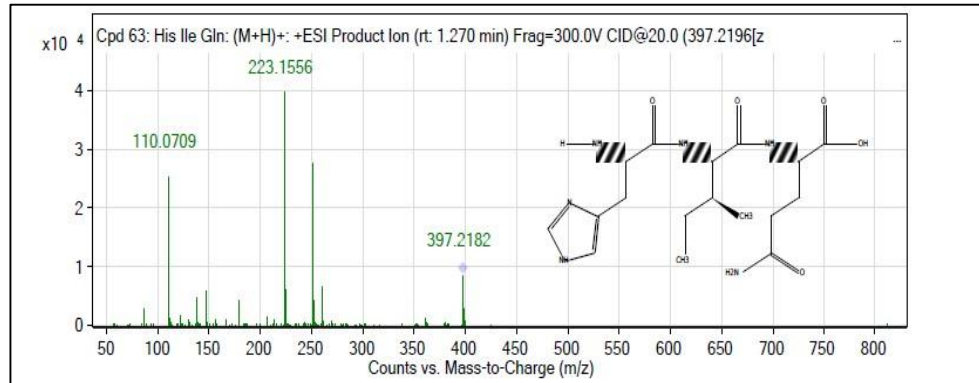
EKLER



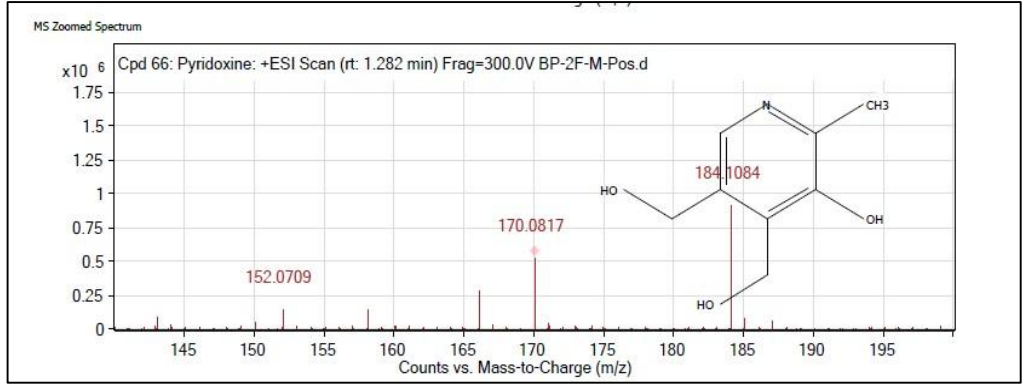
EK 1- Şekil 2.1. BP-2F-M ekstraktında saptanan streptomisin Q-TOF-MS grafiği



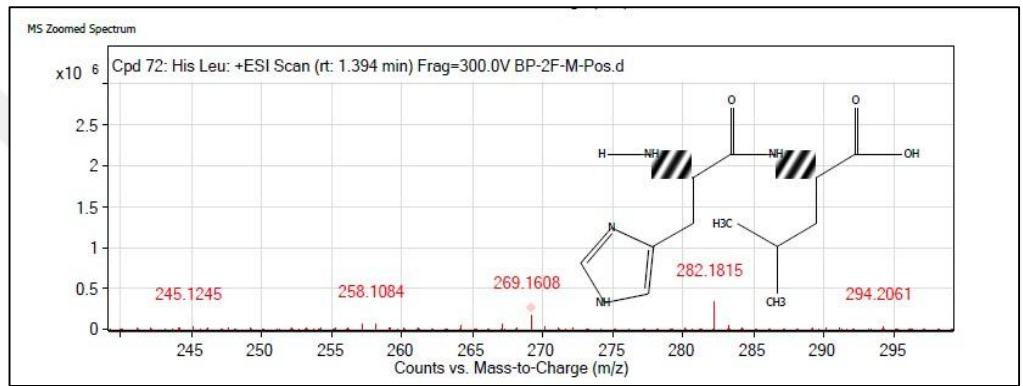
EK 2- Şekil 2.2. BP-2F-M ekstraktında saptanan betain Q-TOF-MS grafiği



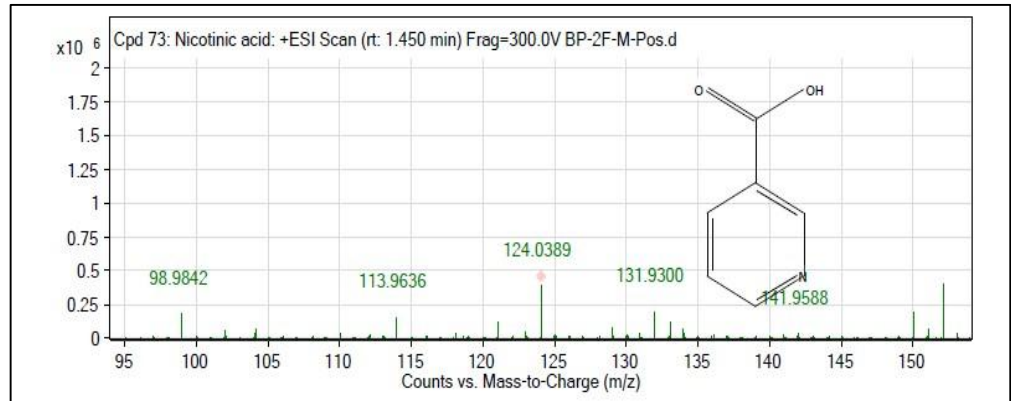
EK 3- Şekil 2.3. BP-2F-M ekstraktında saptanan His Ile Gln Q-TOF-MS grafiği



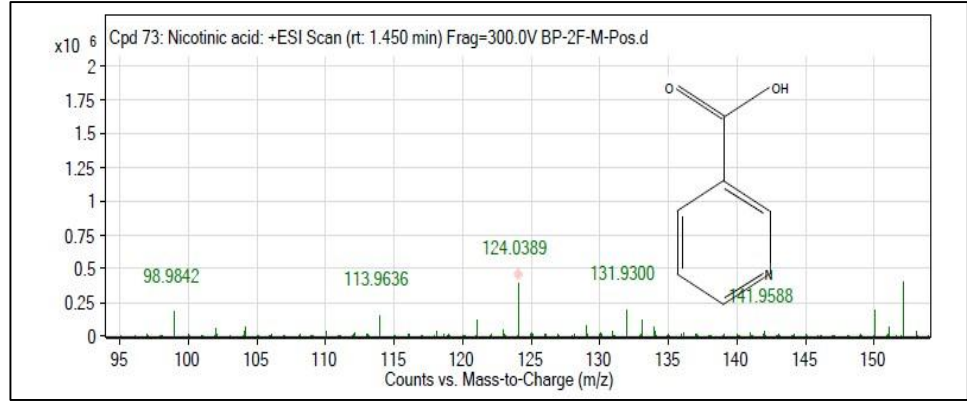
EK 4 - Şekil 2.4. BP-2F-M ekstraktında saptanan Pyridoxine Q-TOF-MS grafiği



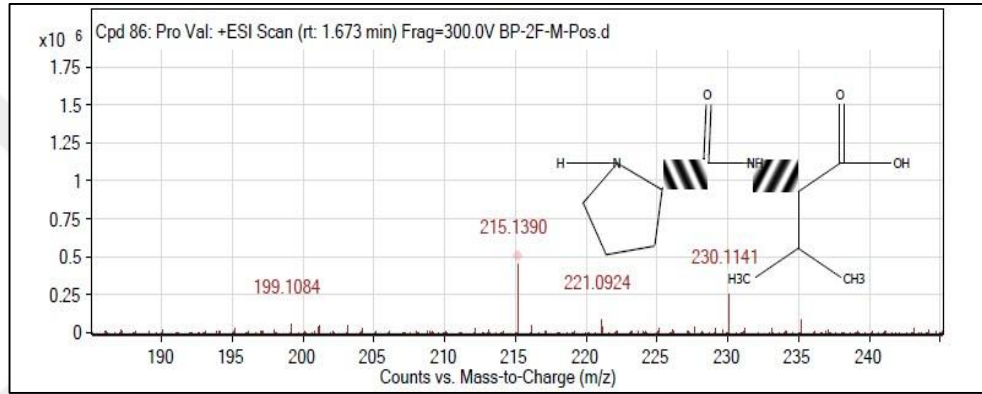
EK 5 - Şekil 2.5. BP-2F-M ekstraktında saptanan His Leu Q-TOF-MS grafiği



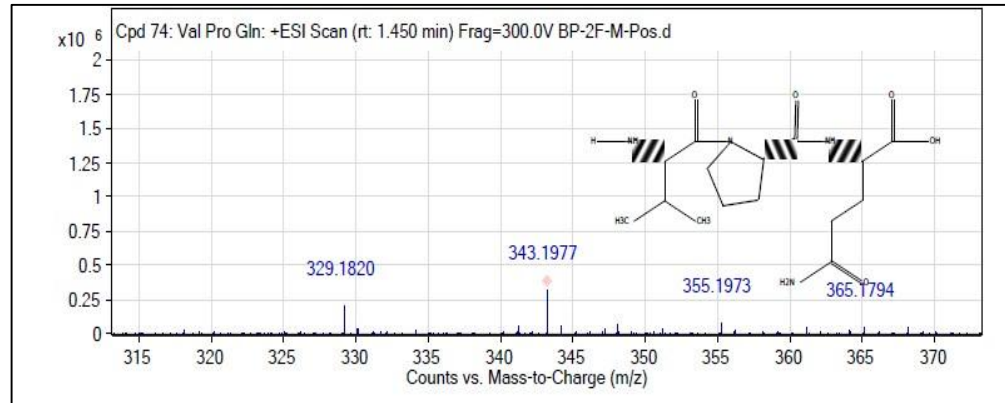
EK 6 - Şekil 2.6. BP-2F-M ekstraktında saptanan His Leu Q-TOF-MS grafiği



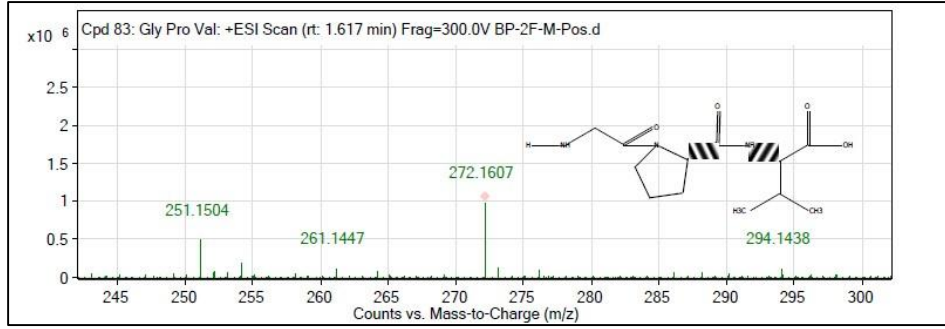
EK 7 - Şekil 2.7. BP-2F-M ekstraktında saptanan nikotinic asit Q-TOF-MS grafiği



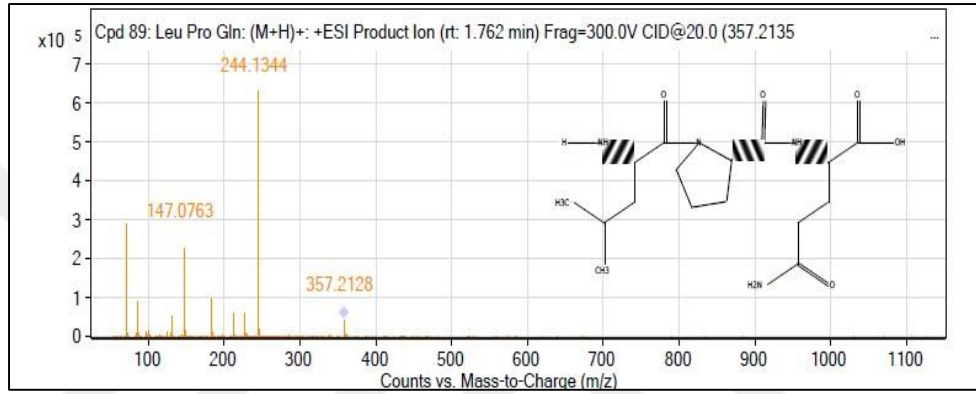
EK 8 - Şekil 2.8. BP-2F-M ekstraktında saptanan Pro Val Q-TOF-MS grafiği



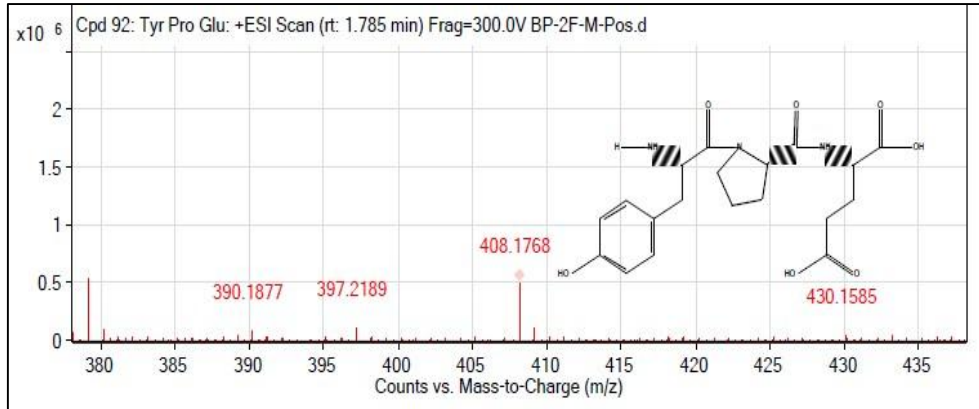
EK 9 - Şekil 2.9. BP-2F-M ekstraktında saptanan Val Pro Gln Q-TOF-MS grafiği



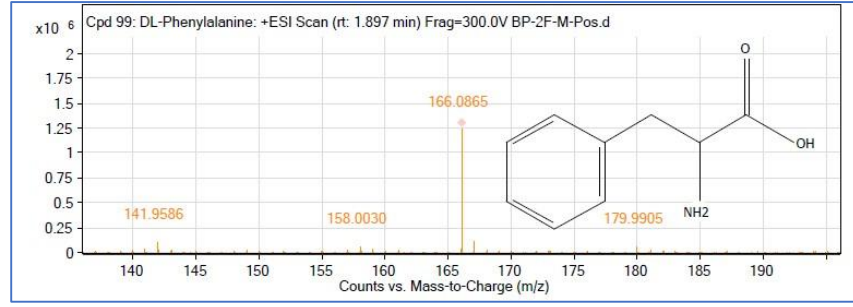
EK 10 - Şekil 2.10. BP-2F-M ekstraktında saptanan Gly Pro Val Q-TOF-MS grafiği



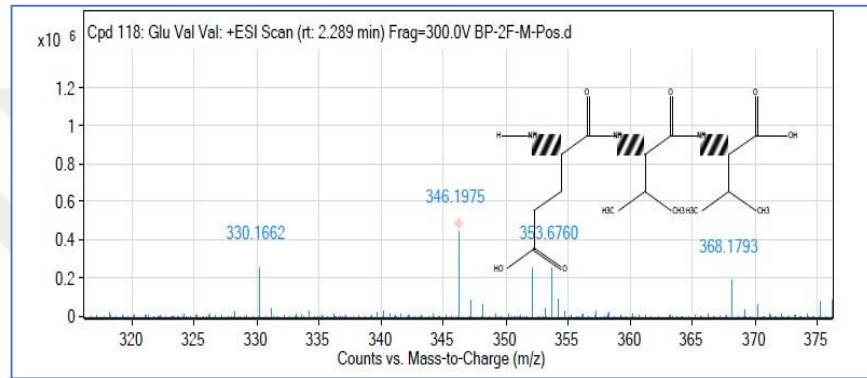
EK 11 - Şekil 2.11. BP-2F-M ekstraktında saptanan Leu Pro Gln Q-TOF-MS grafiği



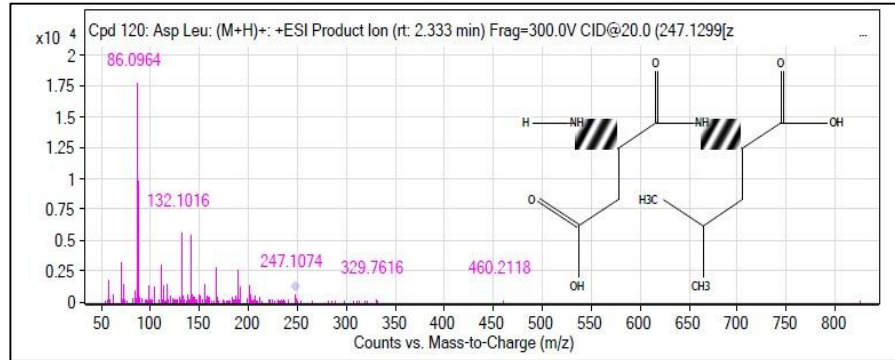
EK 12 - Şekil 2.12. BP-2F-M ekstraktında saptanan Tyr Pro Glu Q-TOF-MS grafiği



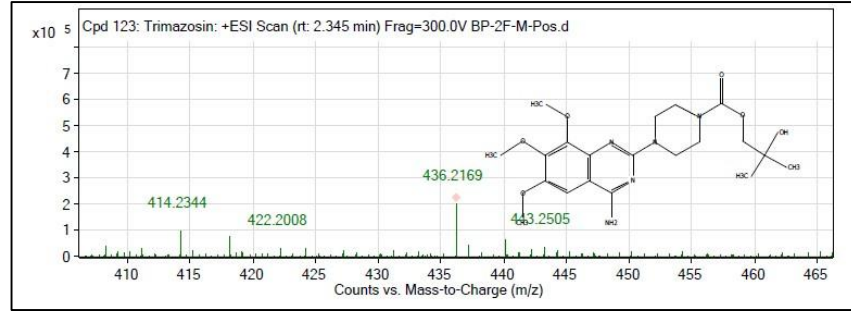
EK 13 - Şekil 2.13. BP-2F-M ekstraktında saptanan DL- phenylalanine Q-TOF-MS grafiği



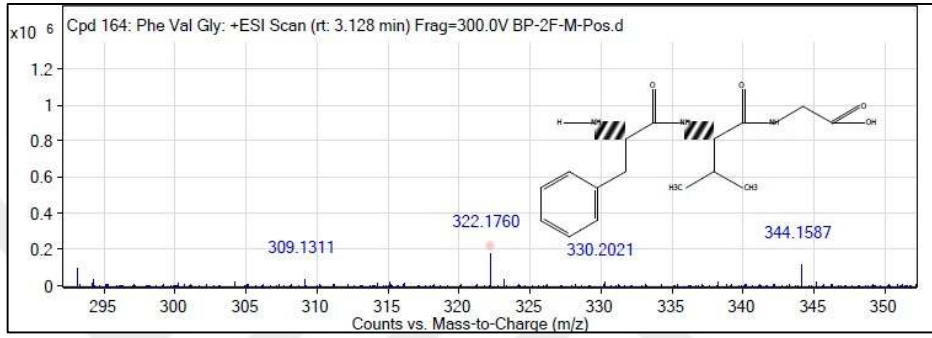
EK 14 - Şekil 2.14. BP-2F-M ekstraktında saptanan Glu Val Val Q-TOF-MS grafiği



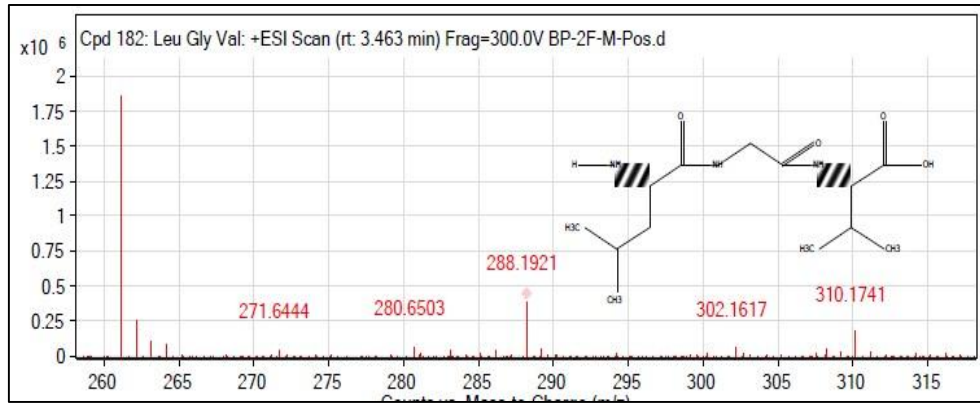
EK 15 - Şekil 2.15. BP-2F-M ekstraktında saptanan Asp Leu Q-TOF-MS grafiği



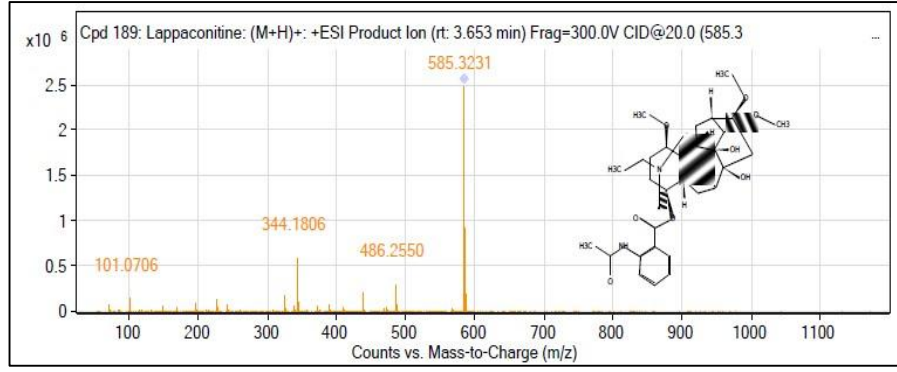
EK 16 - Şekil 2.16. BP-2F-M ekstraktında saptanan trimazosin Q-TOF-MS grafiği



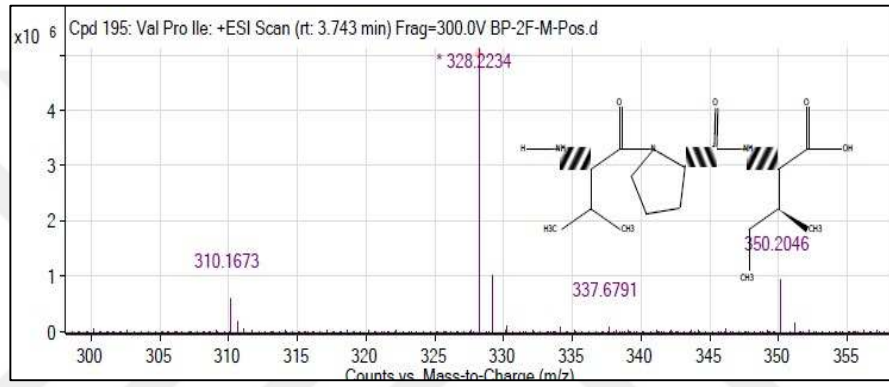
EK 17 - Şekil 2.17. BP-2F-M ekstraktında saptanan Phe Val Gly Q-TOF-MS grafiği



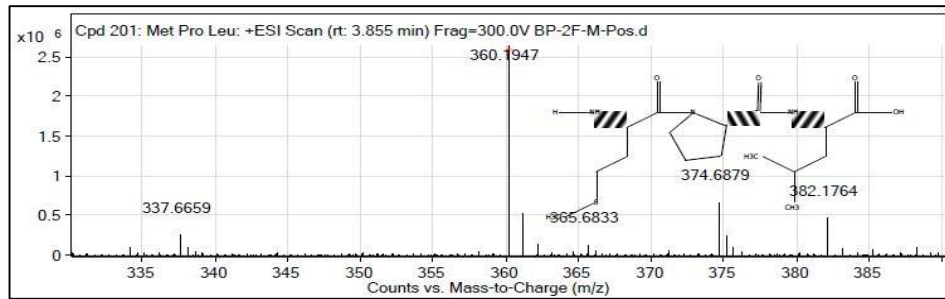
EK 18 - Şekil 2.18. BP-2F-M ekstraktında saptanan Phe Leu Gly Val Q-TOF-MS grafiği



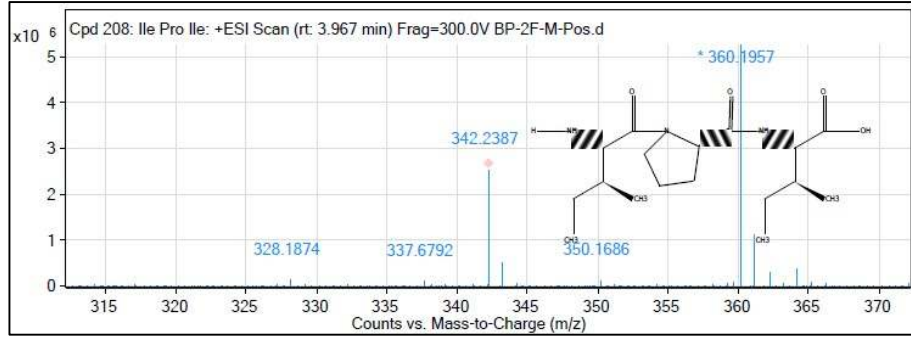
EK 19 - Şekil 2.19. BP-2F-M ekstraktında saptanan lappaconitine Q-TOF-MS grafiği



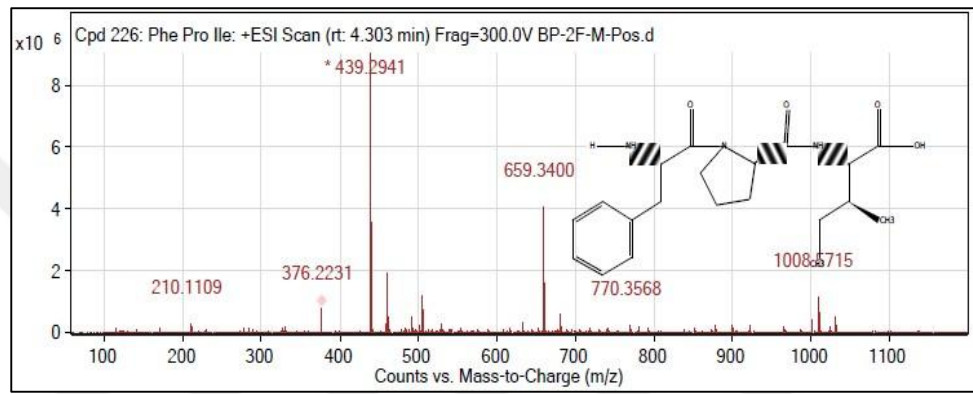
EK 20 - Şekil 2.20. BP-2F-M ekstraktında saptanan Val Pro Ile Q-TOF-MS grafiği



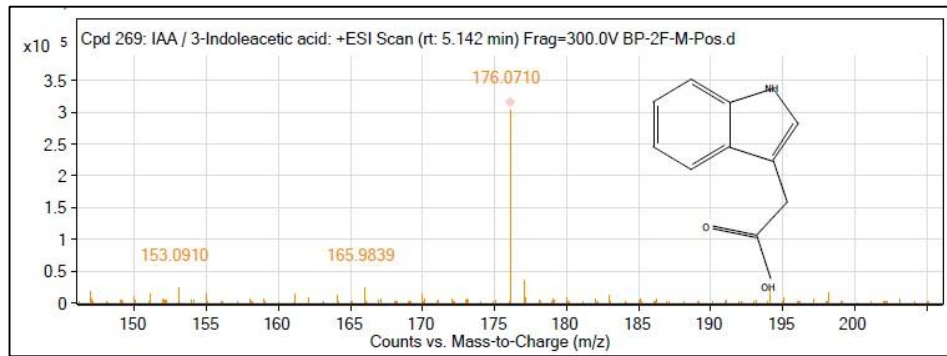
EK 21 - Şekil 2.21. BP-2F-M ekstraktında saptanan Met Pro Leu Q-TOF-MS grafiği



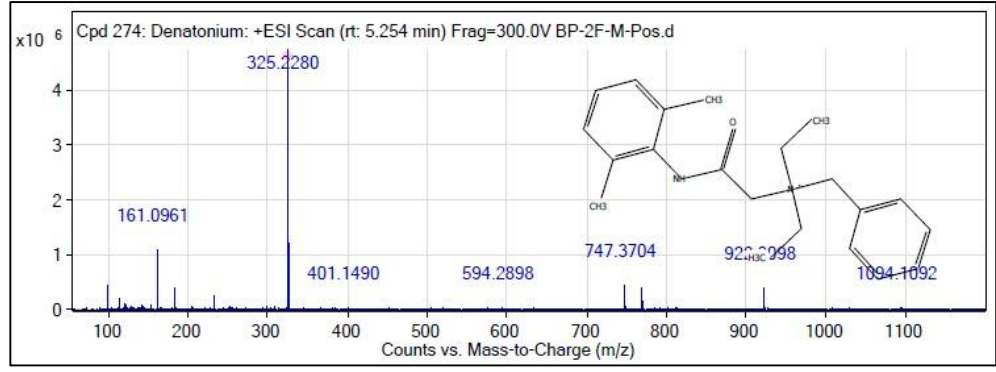
EK 22 - Şekil 2.22. BP-2F-M ekstraktında saptanan Ile Pro Ile Q-TOF-MS grafiği



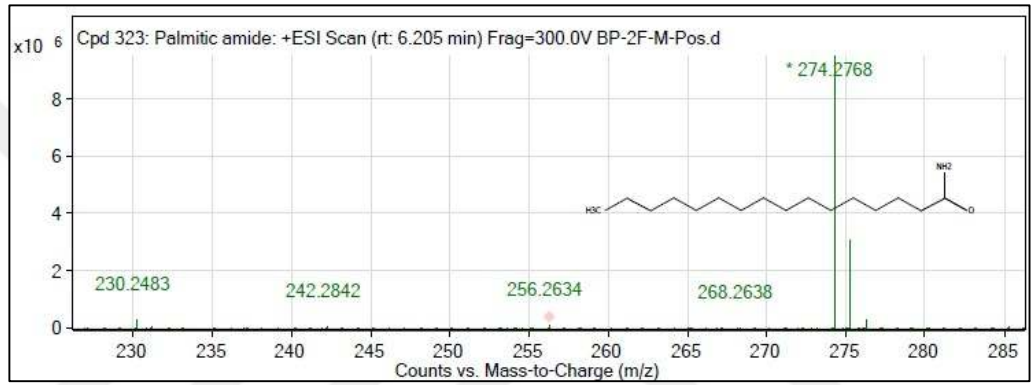
EK 23 - Şekil 2.23. BP-2F-M ekstraktında saptanan Phe Pro Ile Q-TOF-MS grafiği



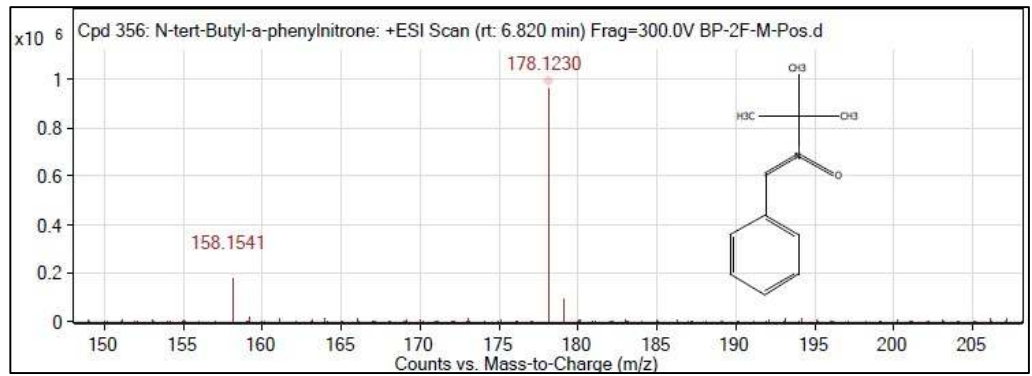
EK 24 - Şekil 2.24. BP-2F-M ekstraktında saptanan indolasetik asit Q-TOF-MS grafiği



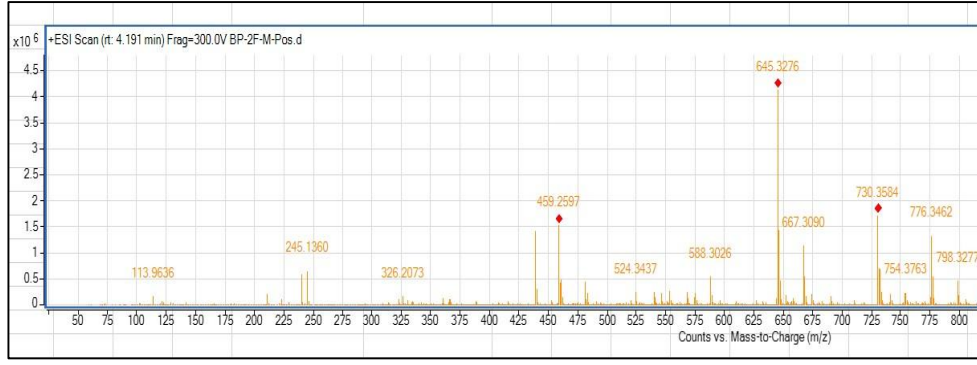
EK 25 - Şekil 2.25. BP-2F-M ekstraktında saptanan denatonium Q-TOF-MS grafiği



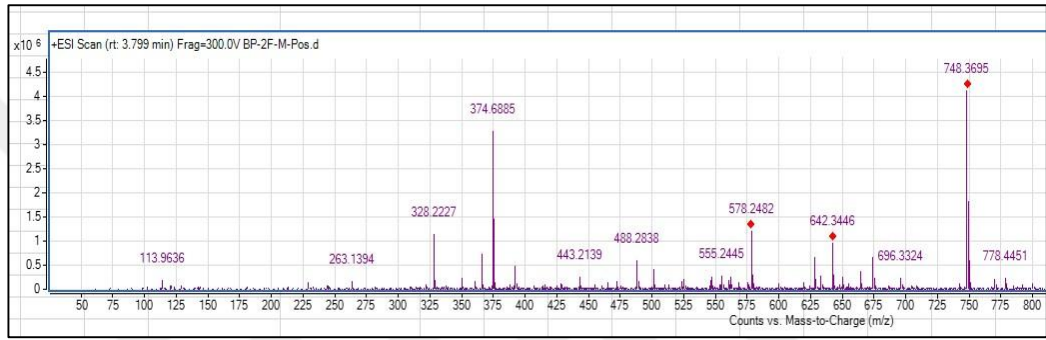
EK 26 - Şekil 2.26. BP-2F-M ekstraktında saptanan palmitic amide Q-TOF-MS grafiği



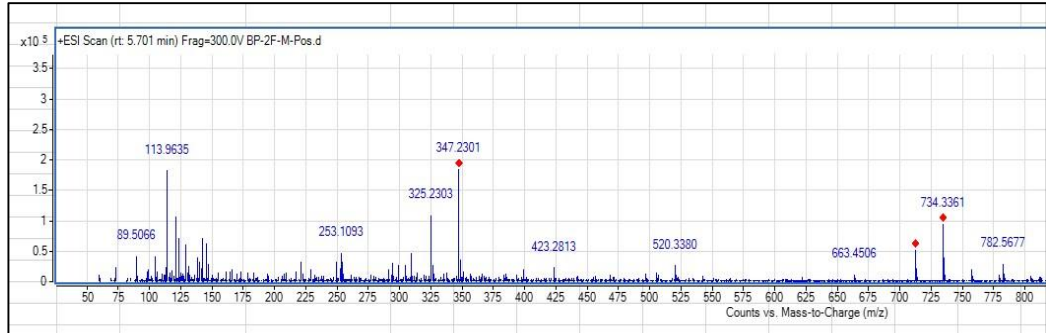
EK 27 - Şekil 2.27. BP-2F-M ekstraktında saptanan N-tert- Butyl-a-phenylnitrone Q-TOF-MS grafiği



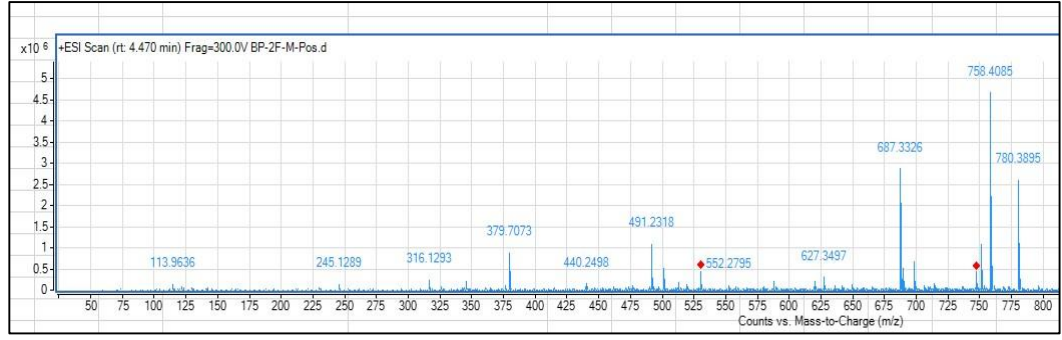
EK 28 - Şekil 2.28. BP-2F-M ekstraktında saptanan artrobasilin A Q-TOF-MS grafiği



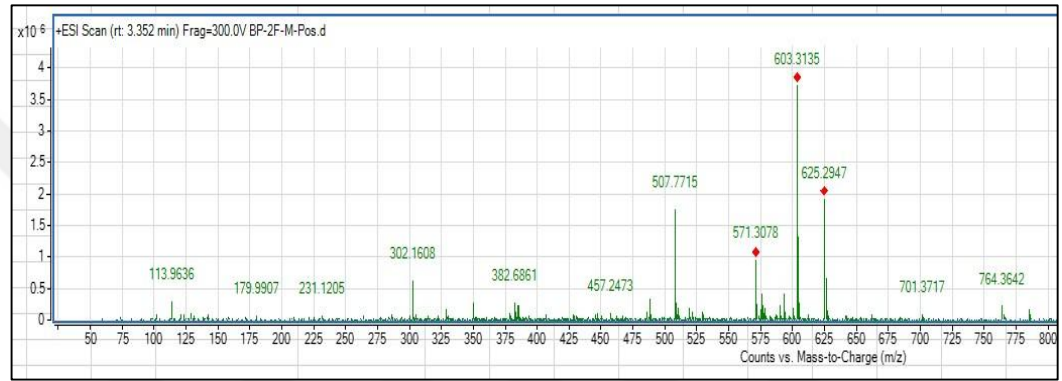
EK 29 - Şekil 2.29. BP-2F-M ekstraktında saptanan azitromisin A Q-TOF-MS grafiği



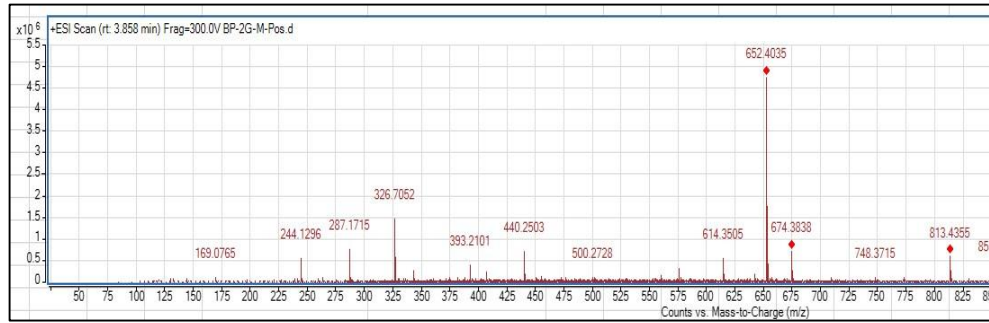
EK 30 - Şekil 2.30. BP-2F-M ekstraktında saptanan eritromisin A Q-TOF-MS grafiği



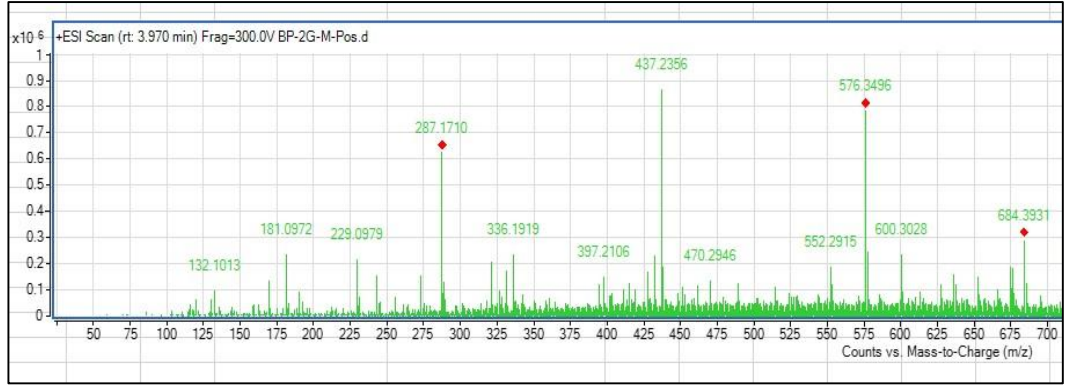
EK 31 - Şekil 2.31. BP-2F-M ekstraktında saptanan oleandamisine A Q-TOF-MS grafiği



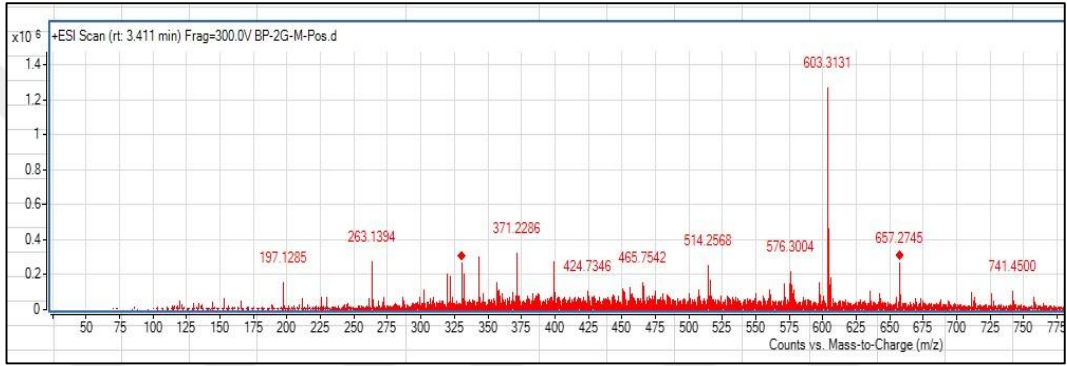
EK 32 - Şekil 2.32. BP-2F-M ekstraktında saptanan kinolon türevleri Q-TOF-MS grafiği



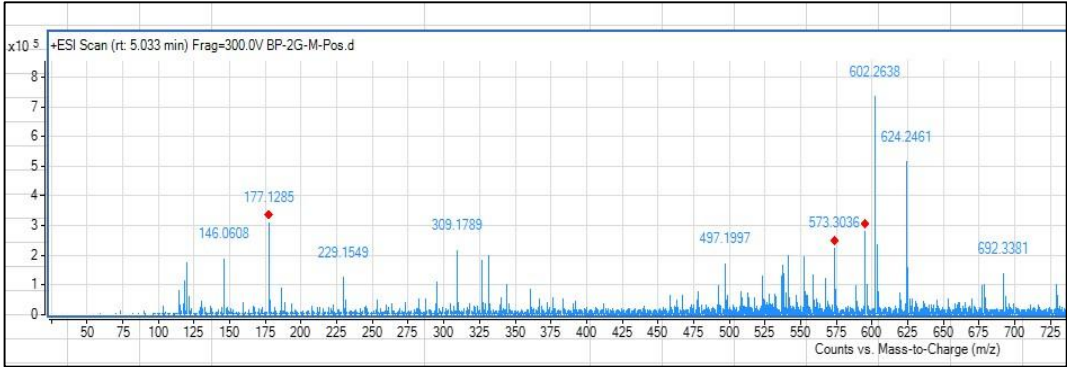
EK 33 - Şekil 2.33. BP-2G-M ekstraktında saptanan heterobactin A Q-TOF-MS grafiği



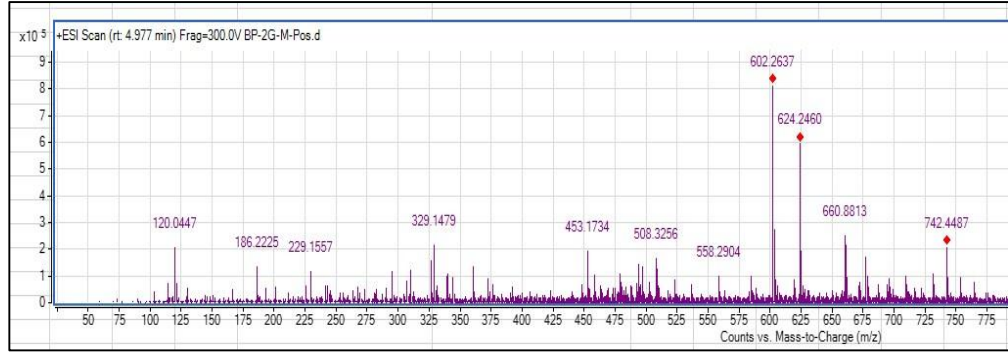
EK 34 - Şekil 2.34. BP-2G-M ekstraktında saptanan heterobaktin B Q-TOF-MS grafiği



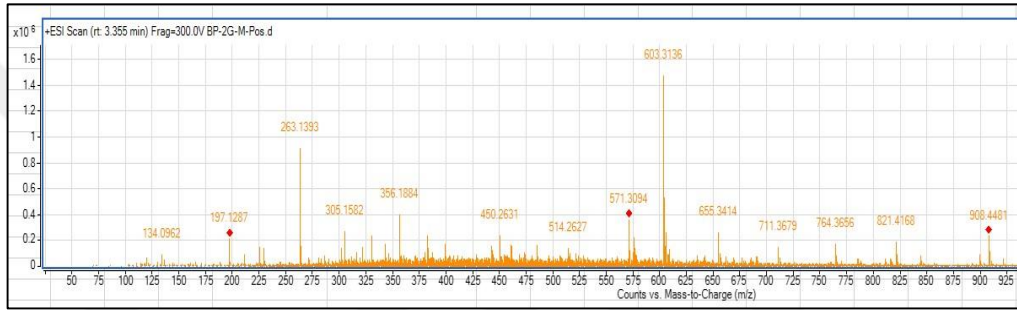
EK 35 - Şekil 2.35. BP-2G-M ekstraktında saptanan kinolon türevleri Q-TOF-MS grafiği



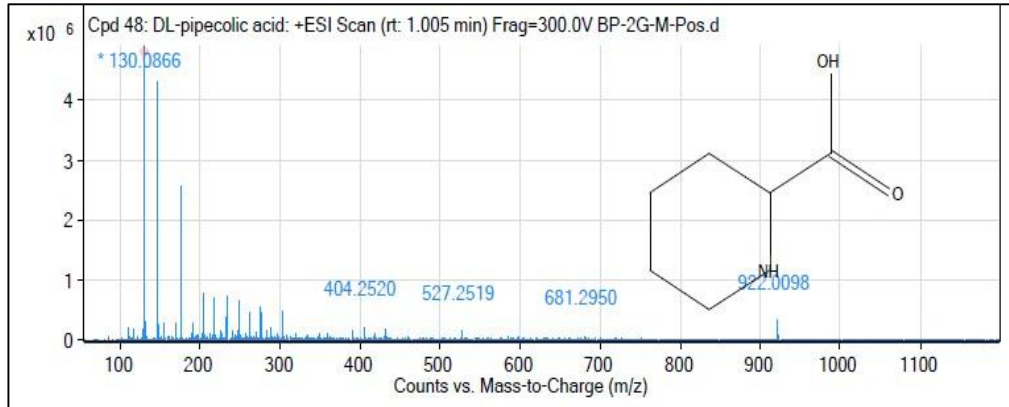
EK 36 - Şekil 2.36. BP-2G-M ekstraktında saptanan Nocardia heterobaktin Q-TOF-MS grafiği



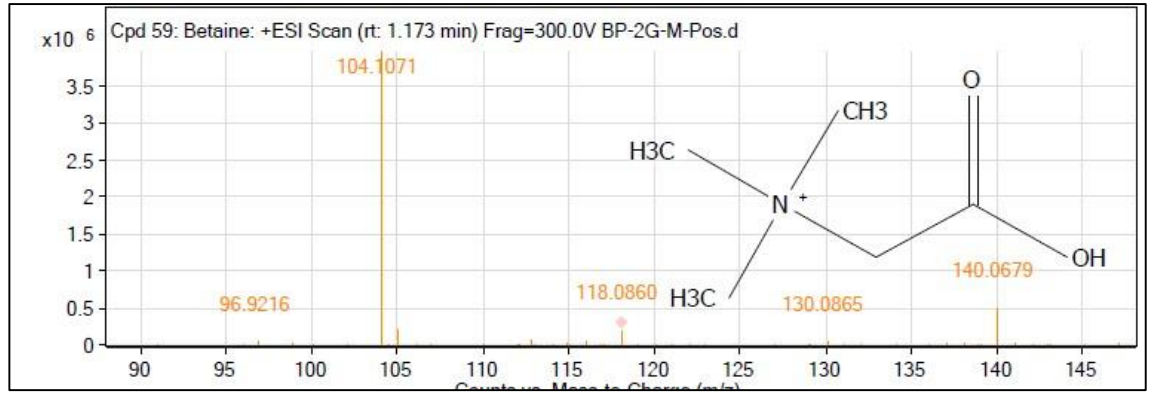
EK 37 - Şekil 2.37. BP-2G-M ekstraktında saptanan rodostreptomisin A2 Q-TOF-MS grafiği



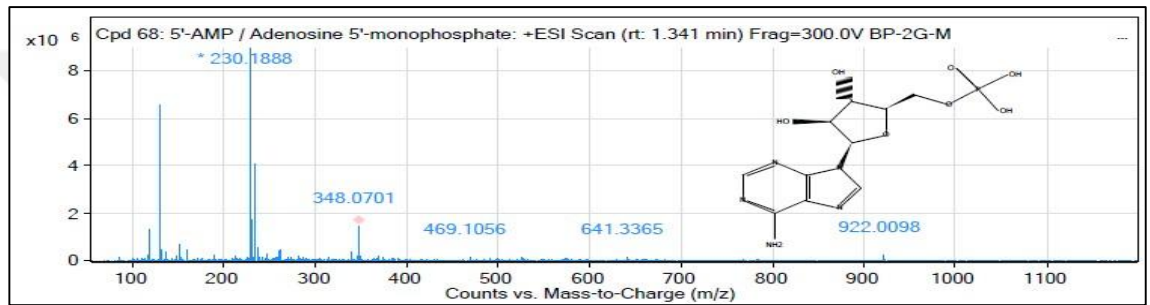
EK 38 - Şekil 2.38. BP-2G-M ekstraktında saptanan rhodochelin A2 Q-TOF-MS grafiği



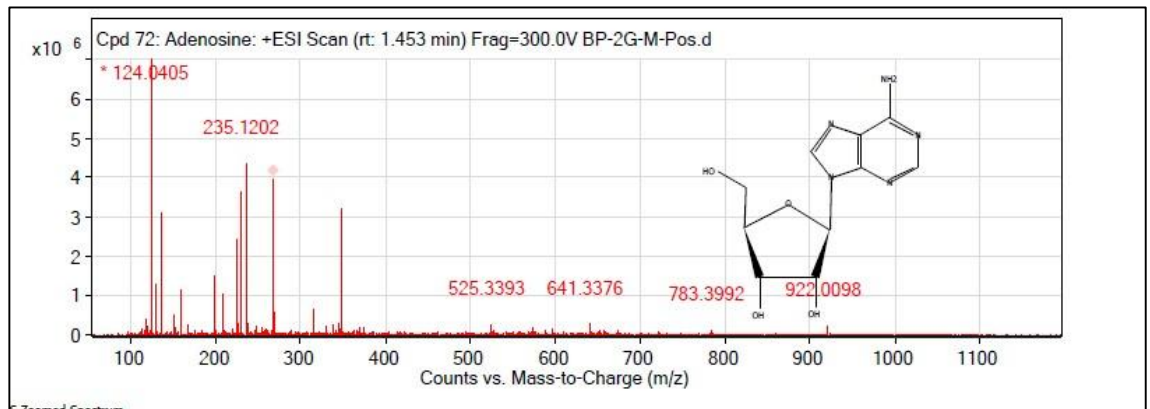
EK 39 - Şekil 2.39. BP-2G-M ekstraktında saptanan DL-pipecolic asit Q-TOF-MS grafiği



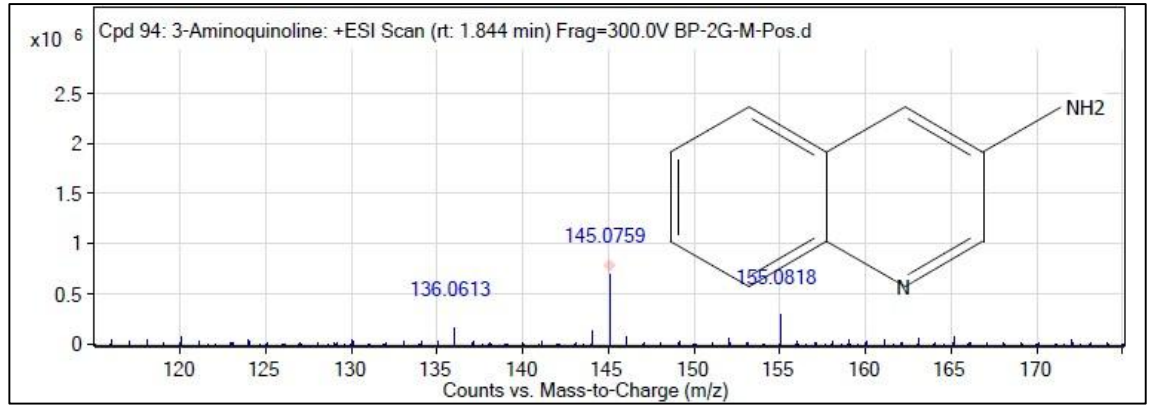
EK 40 - Şekil 2.40. BP-2G-M ekstraktında saptanan betain Q-TOF-MS grafiği



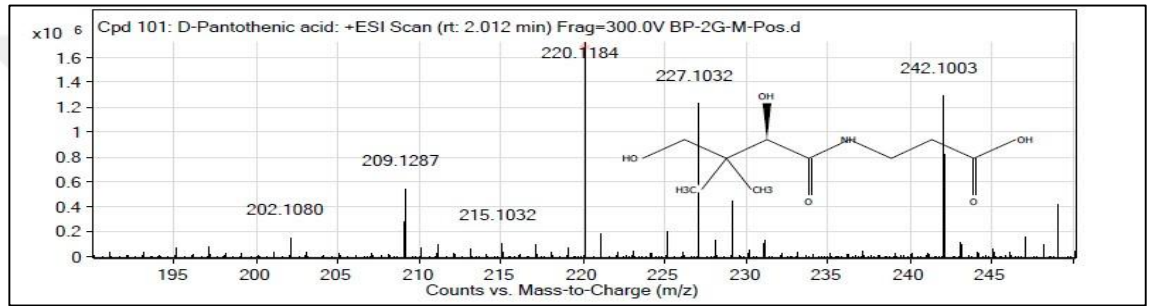
EK 41 - Şekil 2.41. BP-2G-M ekstraktında saptanan 5'-AMP / Adenosine 5'-monophosphate Q-TOF-MS grafiği



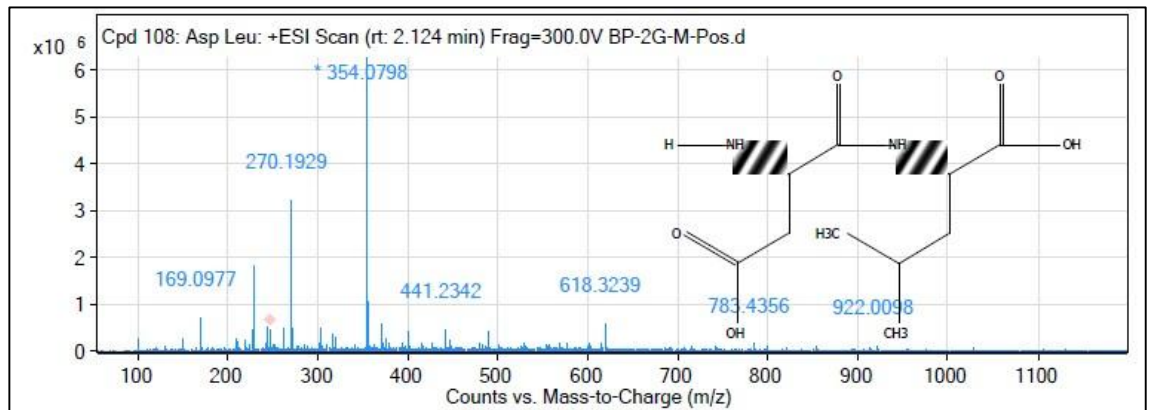
EK 42 - Şekil 2.42. BP-2G-M ekstraktında saptanan adenosin Q-TOF-MS grafiği



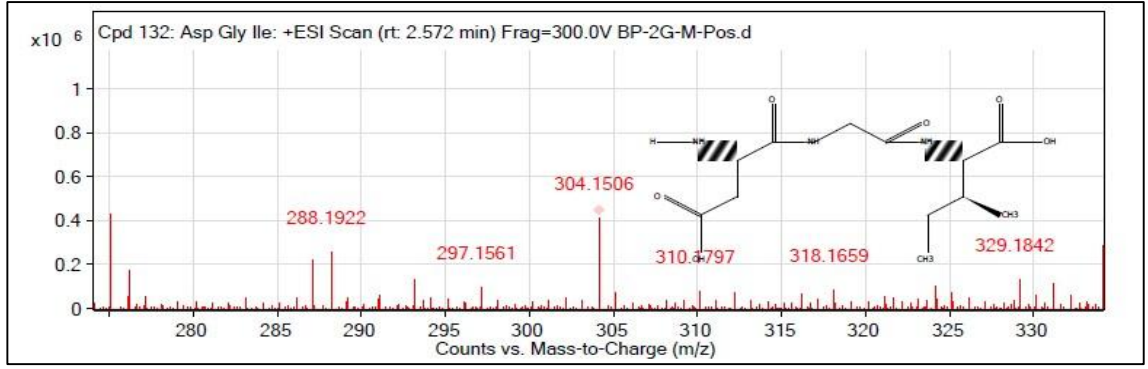
EK 43 - Şekil 2.43. BP-2G-M ekstraktında saptanan 3-aminokinolin Q-TOF-MS grafiği



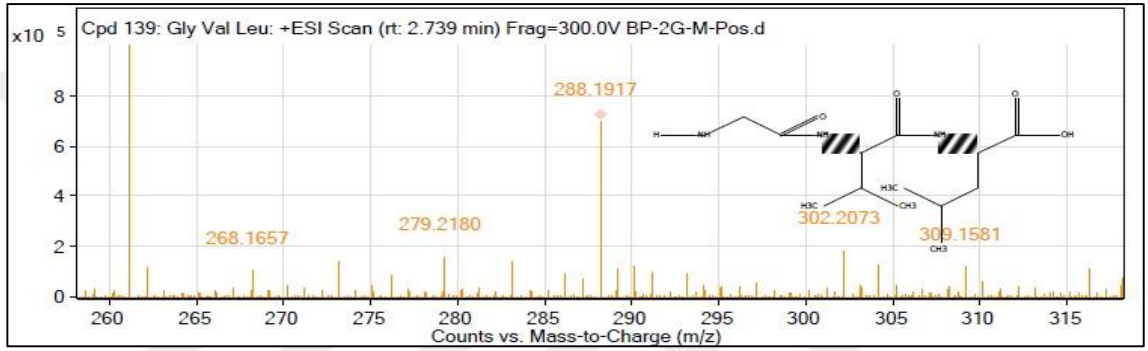
EK 44 - Şekil 2.44. BP-2G-M ekstraktında saptanan D-Pantothenic asit Q-TOF-MS grafiği



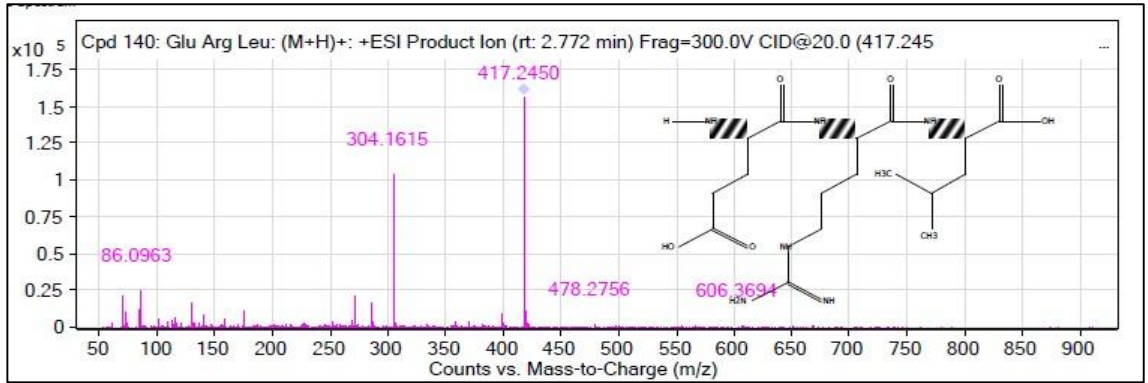
EK 45 - Şekil 2.45. BP-2G-M ekstraktında saptanan Asp Leu Q-TOF-MS grafiği



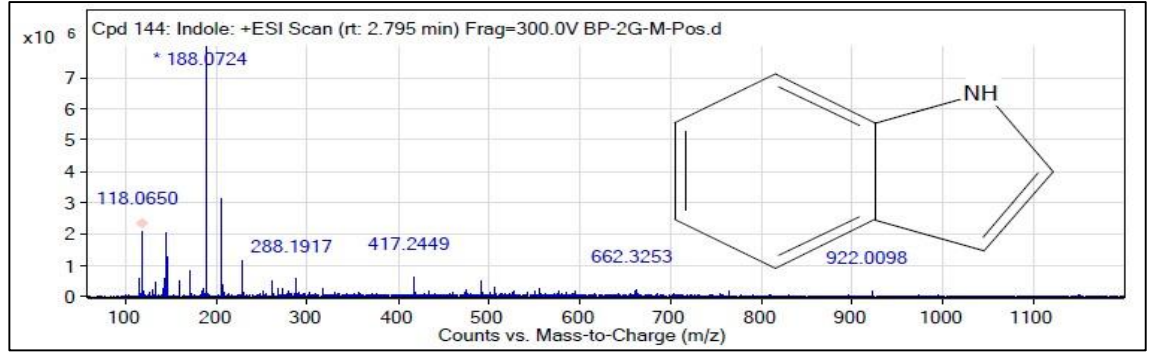
EK 46 - Şekil 2.46. BP-2G-M ekstraktında saptanan Asp Gly Ile Q-TOF-MS grafiği



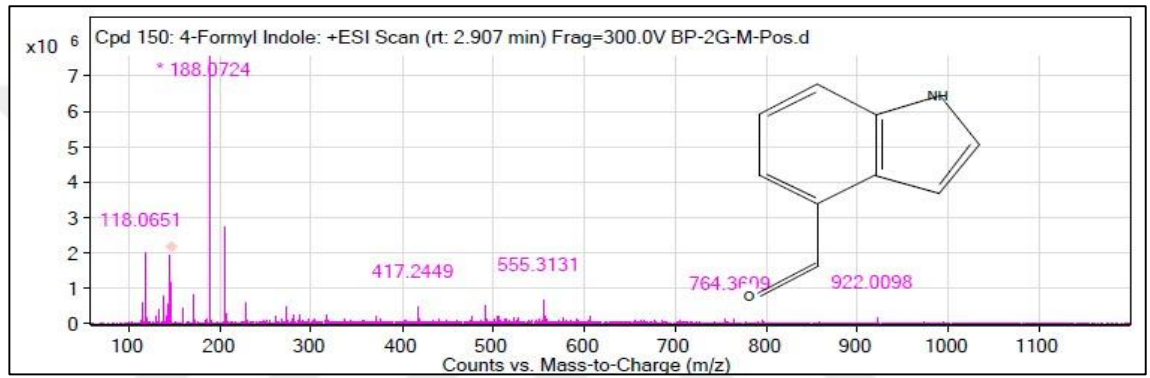
EK 47 - Şekil 2.47. BP-2G-M ekstraktında saptanan Gly Val Leu Q-TOF-MS grafiği



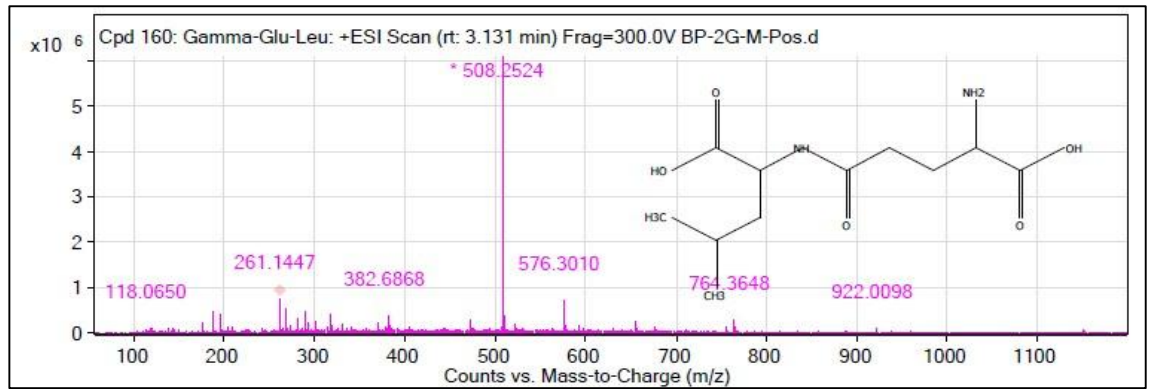
EK 48 - Şekil 2.48. BP-2G-M ekstraktında saptanan Glu Arg Leu Q-TOF-MS grafiği



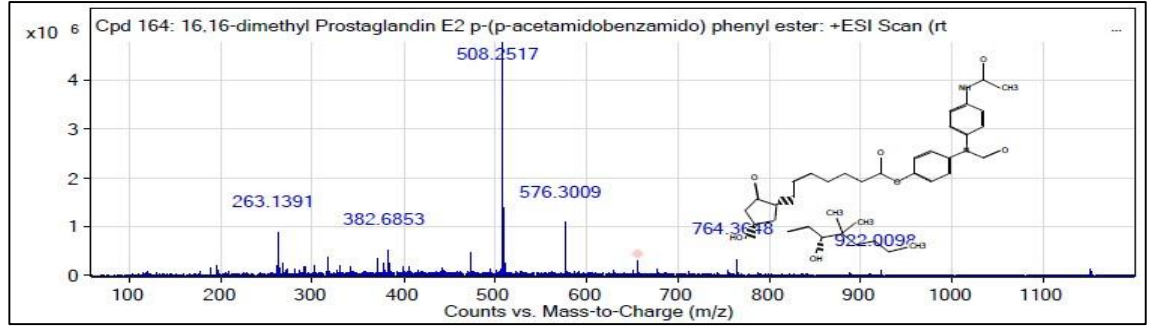
EK 49 - Şekil 2.49. BP-2G-M ekstraktında saptanan indol Q-TOF-MS grafiği



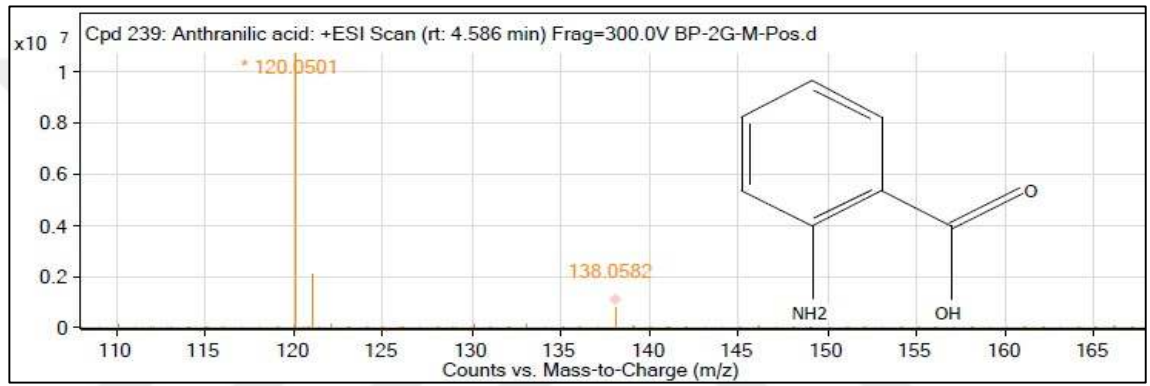
EK 50 - Şekil 2.50. BP-2G-M ekstraktında saptanan 4-Formil indol Q-TOF-MS grafiği



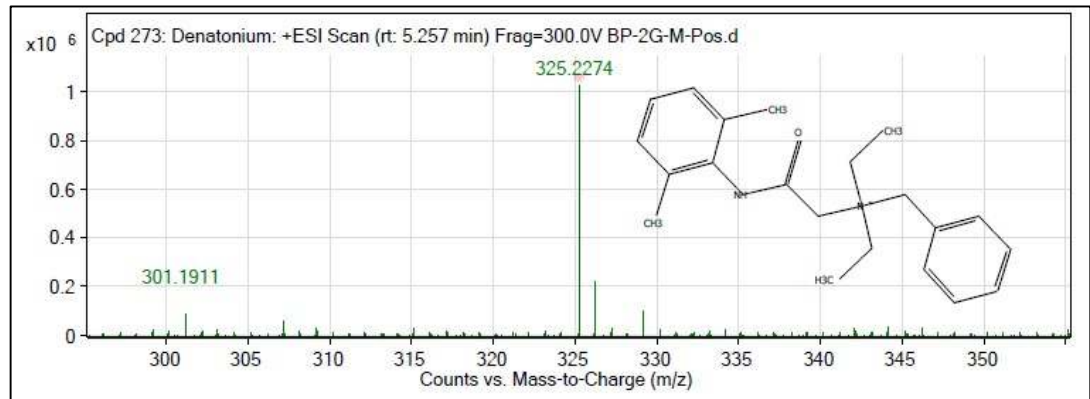
EK 51 - Şekil 2.51. BP-2G-M ekstraktında saptanan Gamma-Glu-Leu Q-TOF-MS grafiği



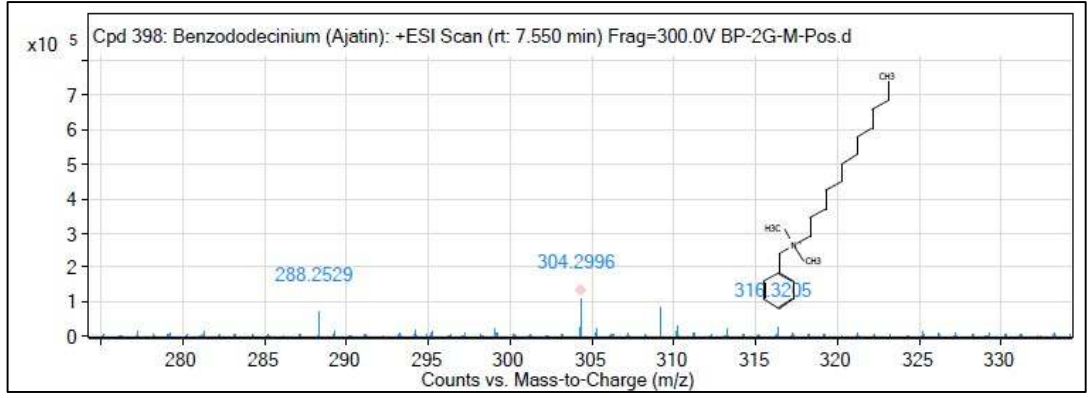
EK 52 - Şekil 2.52. BP-2G-M ekstraktında saptanan 16,16-dimethyl Prostaglandin E2 p- (pacetamidobenzamido) phenyl ester Q-TOF-MS grafiği



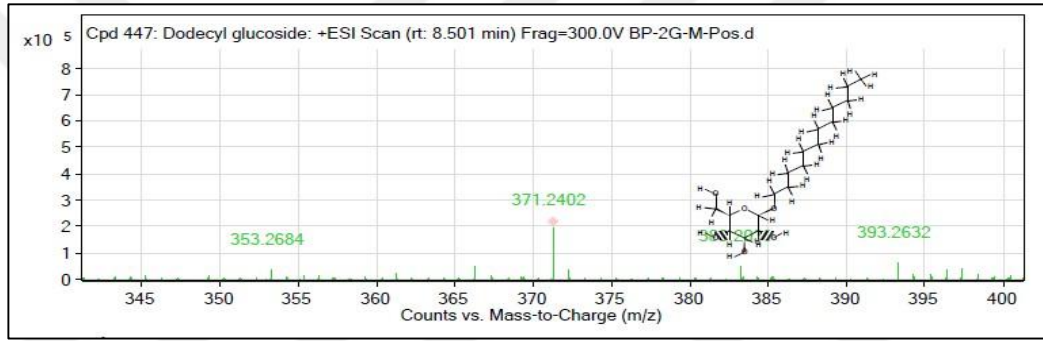
EK 53 - Şekil 2.53. BP-2G-M ekstraktında saptanan anthranilic asit Q-TOF-MS grafiği



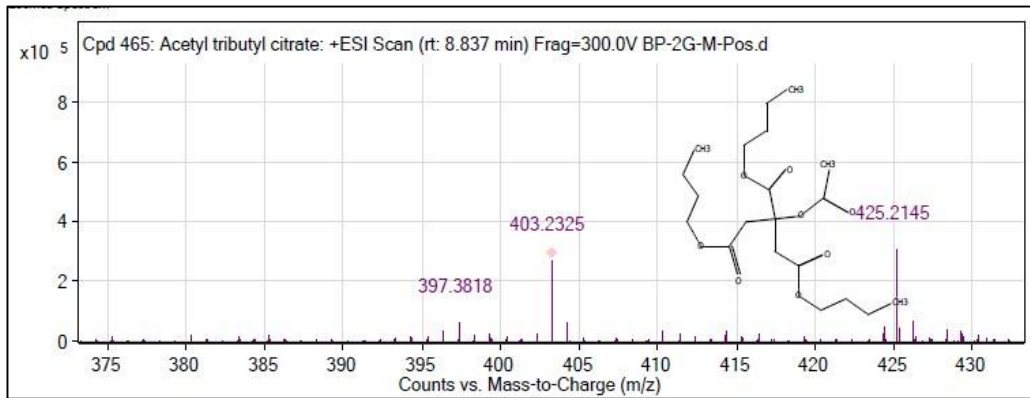
EK 54 - Şekil 2.54. BP-2G-M ekstraktında saptanan denatonium Q-TOF-MS grafiği



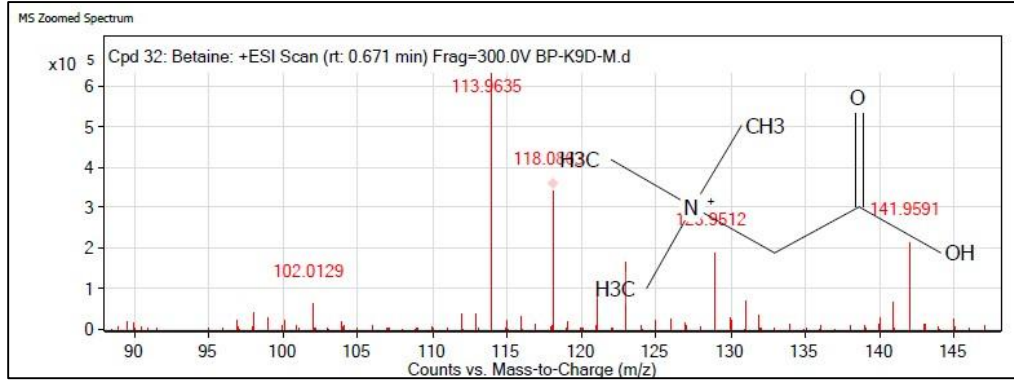
EK 55 - Şekil 2.55. BP-2G-M ekstraktında saptanan benzododecinium Q-TOF-MS grafiği



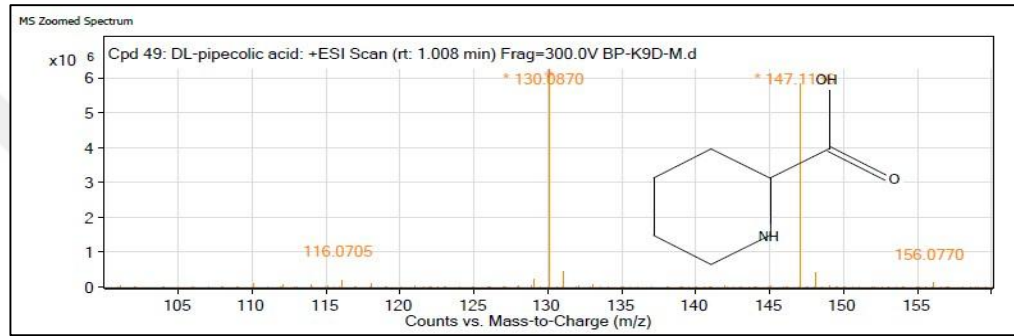
EK 56 - Şekil 2.56. BP-2G-M ekstraktında saptanan dodecyl glucoside Q-TOF-MS grafiği



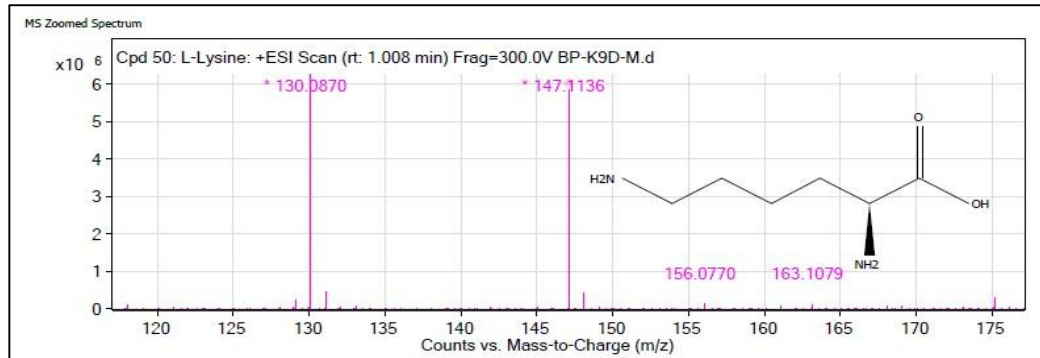
EK 57 - Şekil 2.57. BP-2G-M ekstraktında saptanan acetyl tributyl citrate Q-TOF-MS grafiği



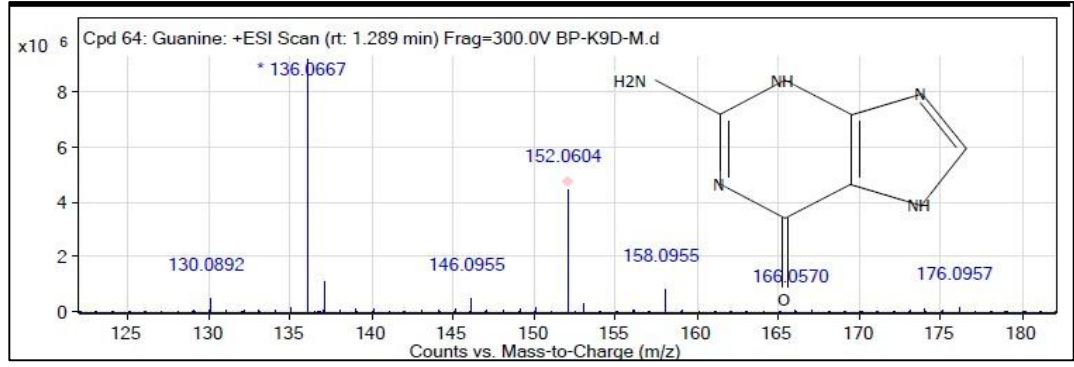
EK 58 - Şekil 2.58. BP-K9D-M ekstraktında saptanan betain Q-TOF-MS grafiği



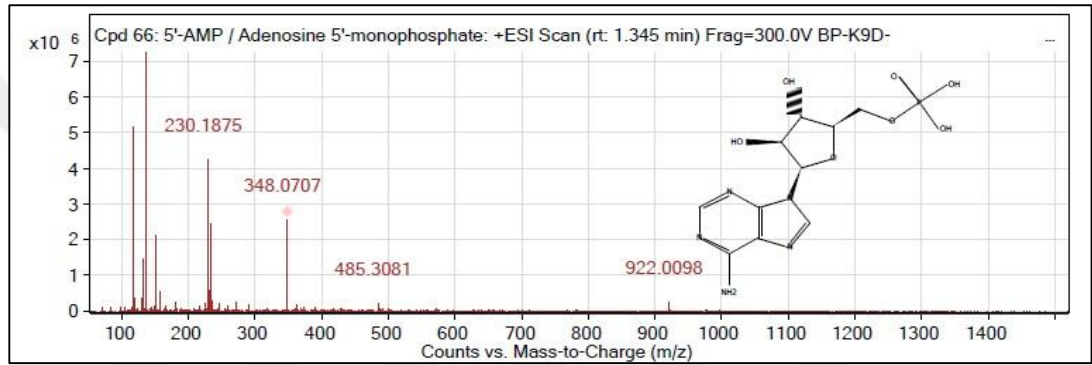
EK 59 - Şekil 2.59. BP-K9D-M ekstraktında saptanan DL- pipecolic asit Q-TOF-MS grafiği



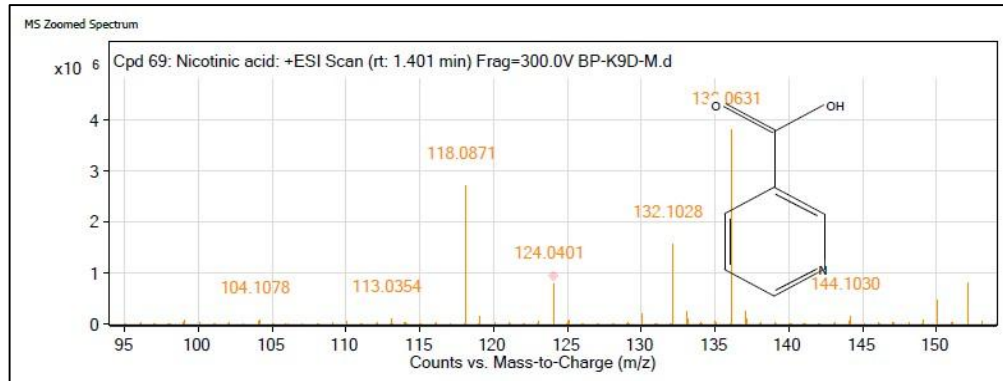
EK 60 - Şekil 2.60. BP-K9D-M ekstraktında saptanan L-Lysine Q-TOF-MS grafiği



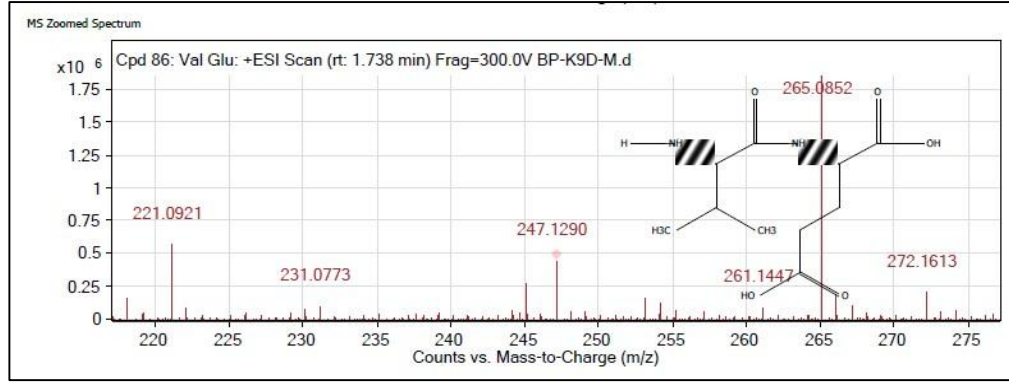
EK 61 - Şekil 2.61. BP-K9D-M ekstraktında saptanan guanin Q-TOF-MS grafiği



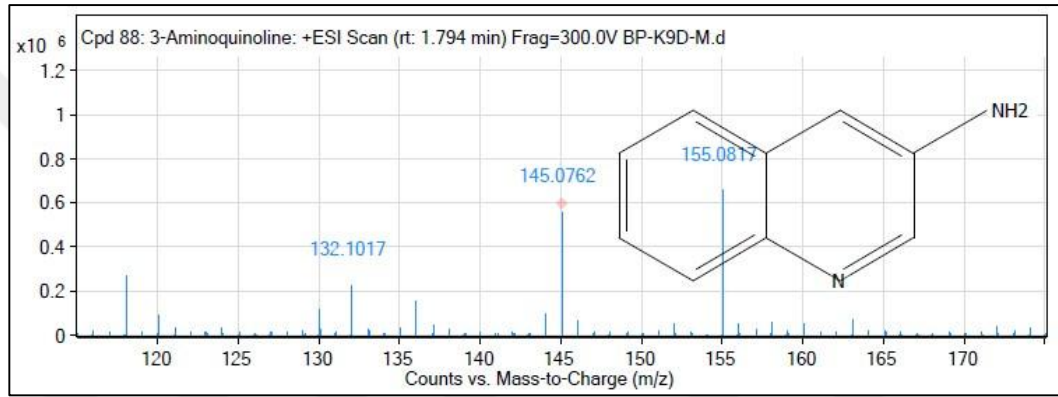
EK 62 - Şekil 2.62. BP-K9D-M ekstraktında saptanan 5'- AMP Q-TOF-MS grafiği



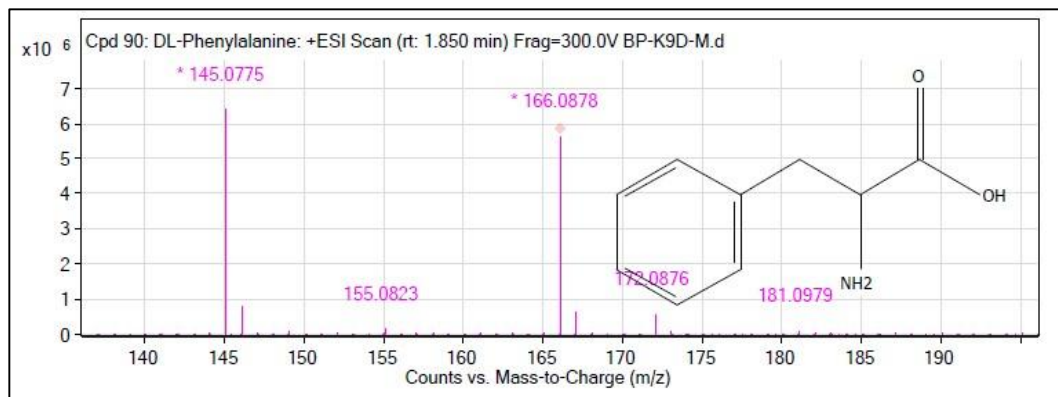
EK 63 - Şekil 2.63. BP-K9D-M ekstraktında saptanan nikotinik asit Q-TOF-MS grafiği



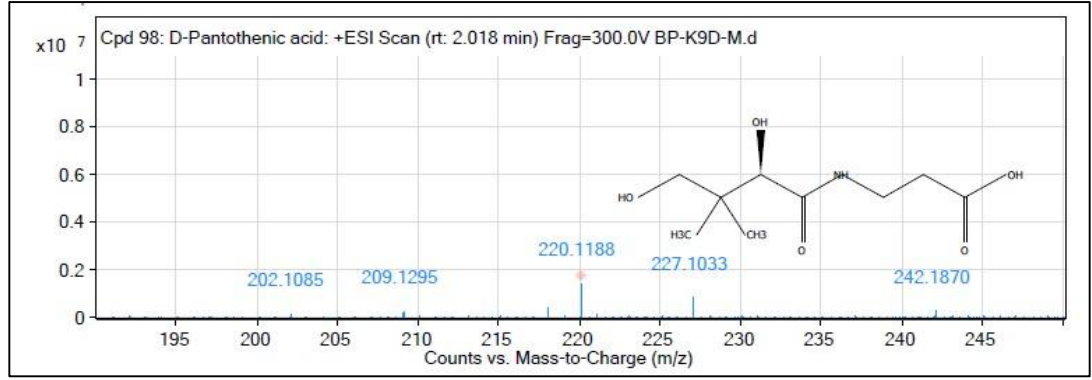
EK 64 - Şekil 2.64. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Val Glu Q-TOF-MS grafiği



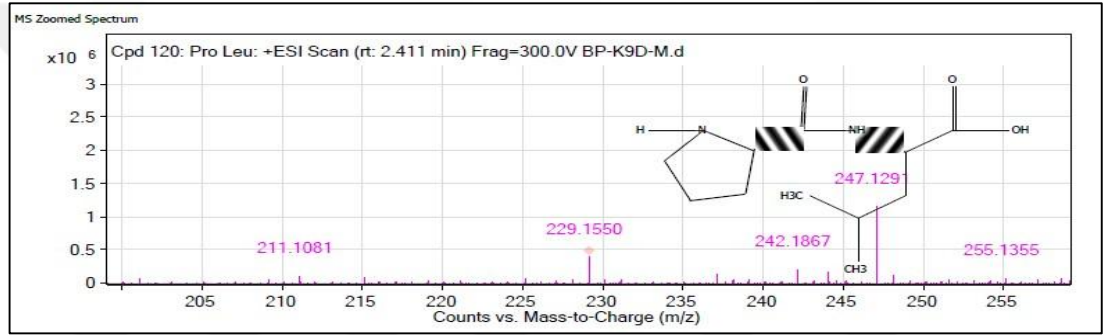
EK 65 - Şekil 2.65. BP-K9D-M ekstraktında saptanan 3-aminokinolin Q-TOF-MS grafiği



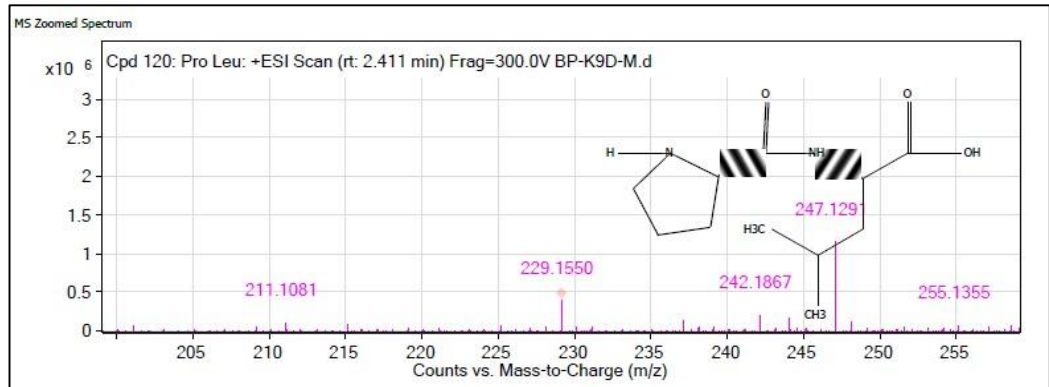
EK 66 - Şekil 2.66. BP-K9D-M ekstraktında saptanan DL-Phenylalanine Q-TOF-MS grafiği



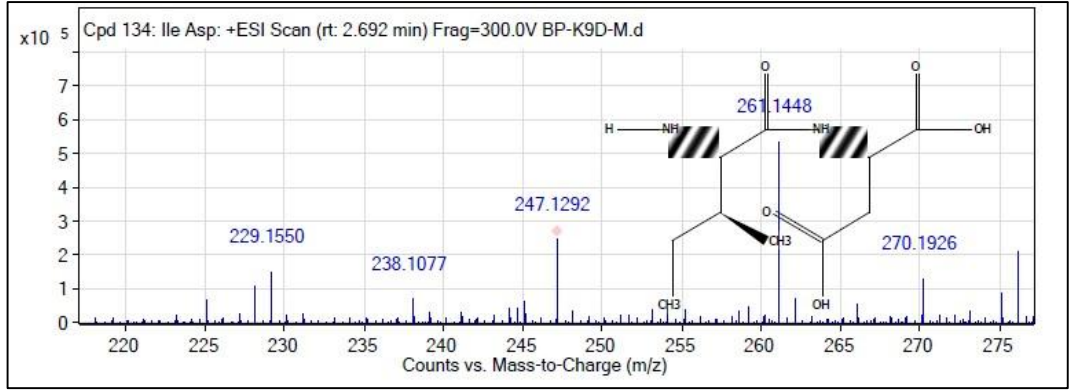
EK 67 - Şekil 2.67. BP-K9D-M ekstraktında saptanan D-Pantothenic acid Q-TOF-MS grafiği



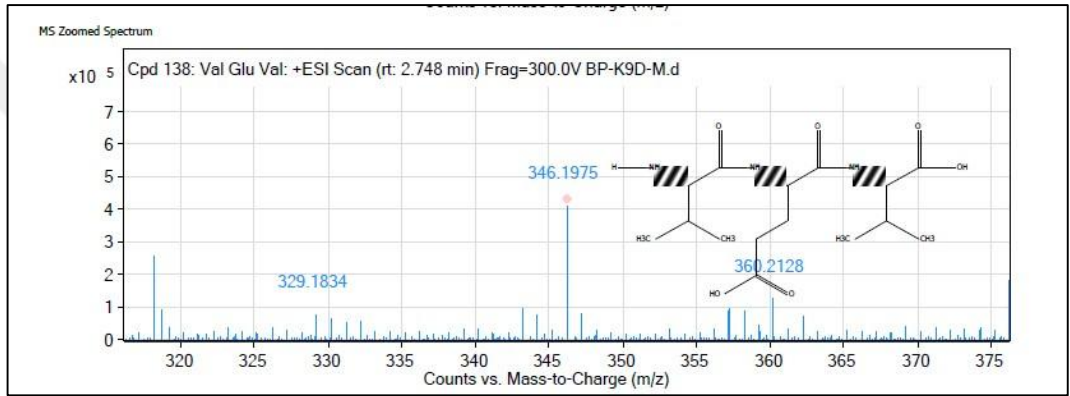
EK 68 - Şekil 2.68. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Leu Q-TOF-MS grafiği



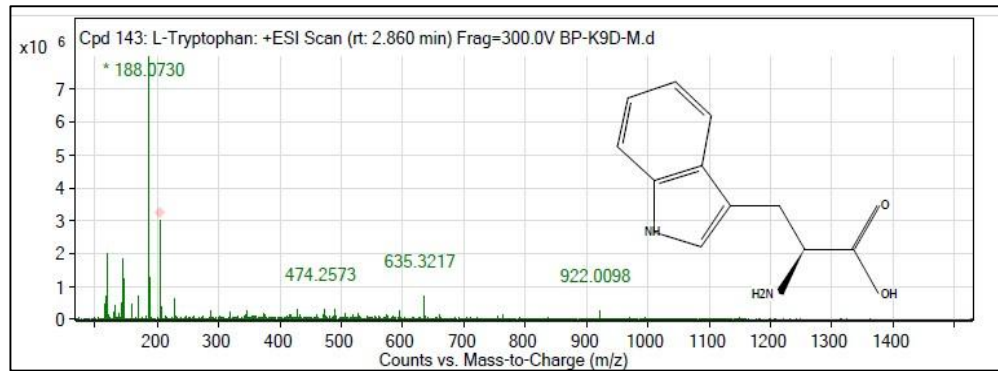
EK 69 - Şekil 2.69. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Leu Q-TOF-MS grafiği



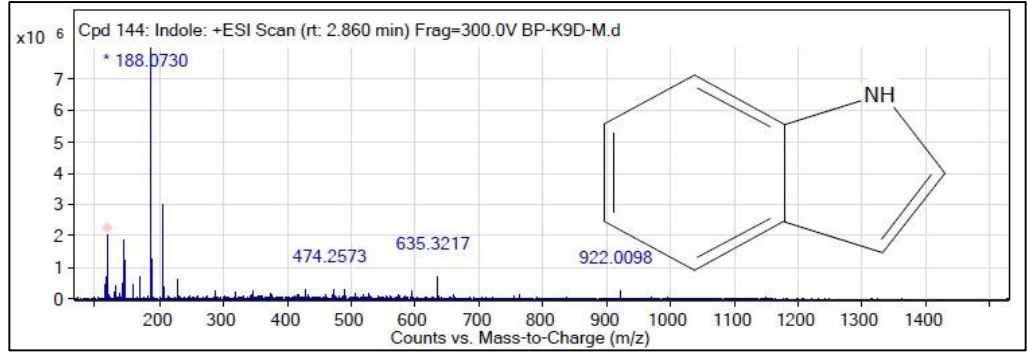
EK 70 - Şekil 2.70. BP-K9D-M ekstraktında saptan Ile Asp Q-TOF-MS grafiği



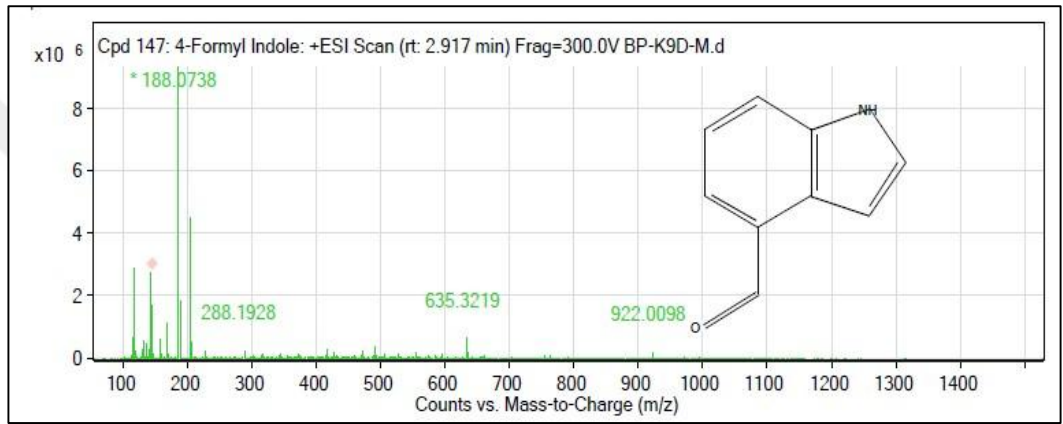
EK 71 - Şekil 2.71. BP-K9D-M ekstraktında saptan Val Glu Val Q-TOF-MS grafiği



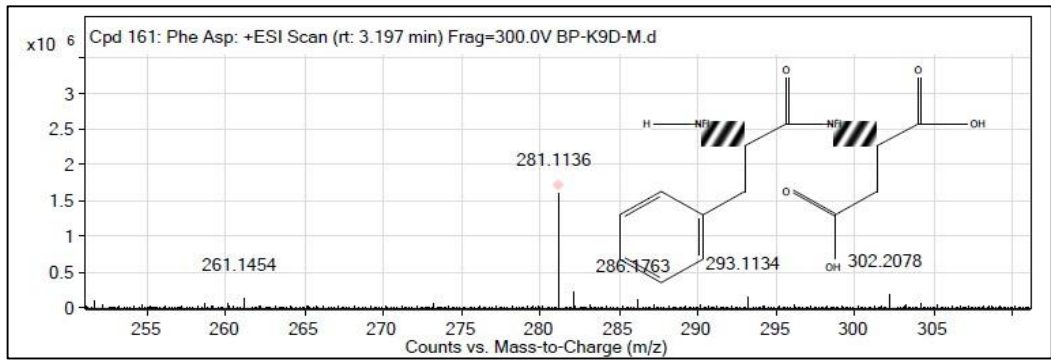
EK 72 - Şekil 2.72. BP-K9D-M ekstraktında saptanan L-Tryptophan Q-TOF-MS grafiği



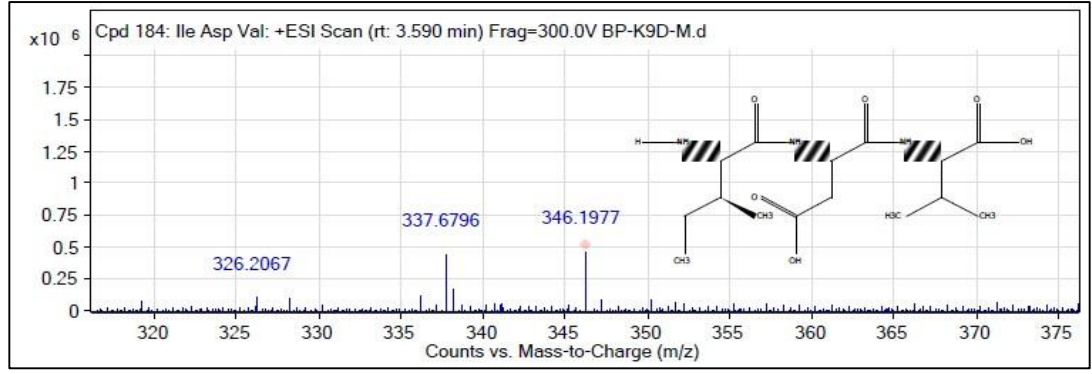
EK 73 - Şekil 2.73. BP-K9D-M ekstraktında saptanan indol Q-TOF-MS grafiği



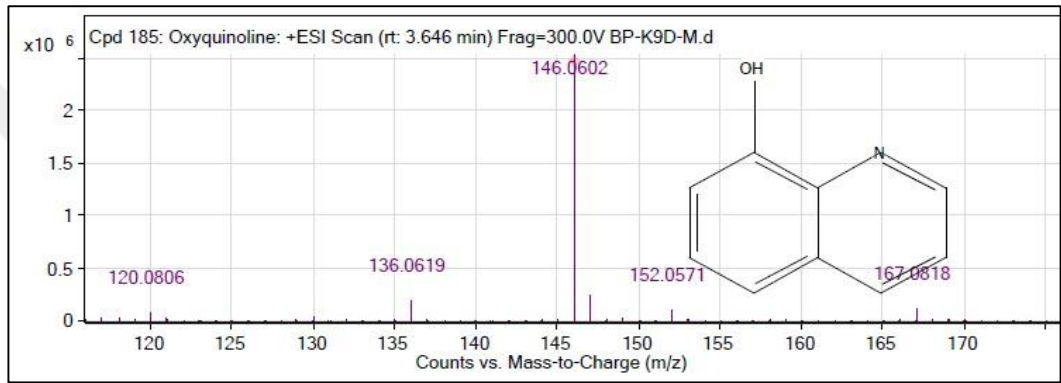
EK 74 - Şekil 2.74. BP-K9D-M ekstraktında saptanan 4-formil indol Q-TOF-MS grafiği



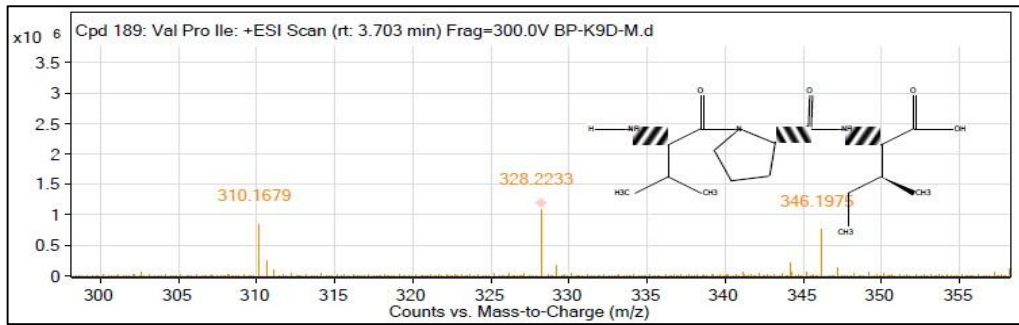
EK 75 - Şekil 2.75. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Phe Asp Q-TOF-MS grafiği



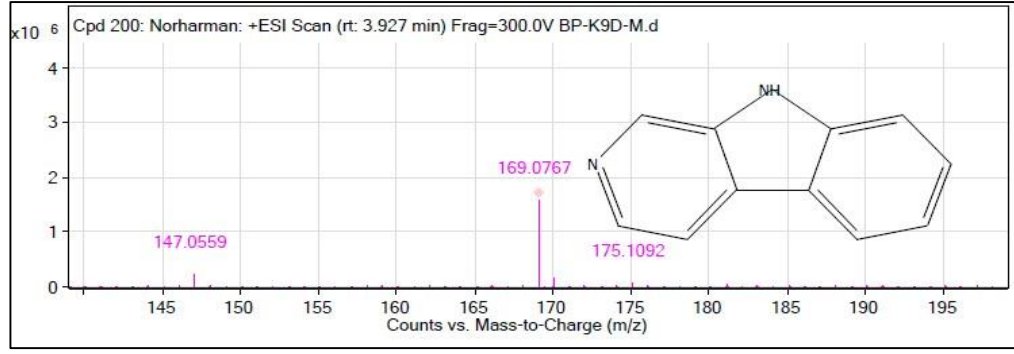
EK 76 - Şekil 2.76. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Ile Asp Val Q-TOF-MS grafiği



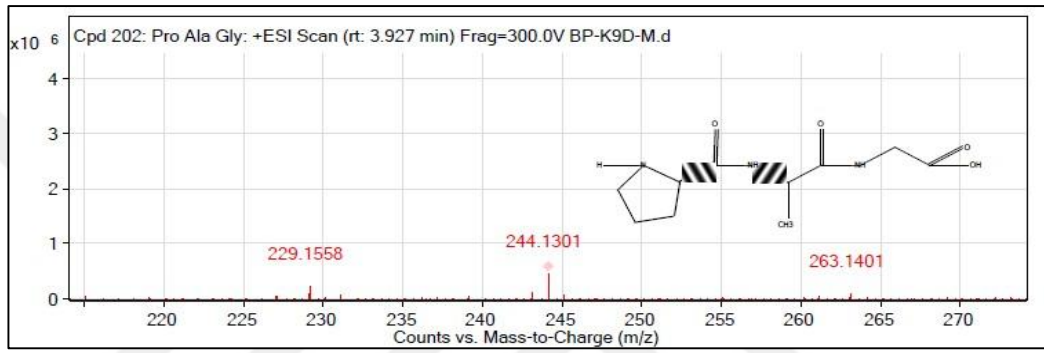
EK 77 - Şekil 2.77. BP-K9D-M ekstraktında saptanan oksikinolin MS grafiği



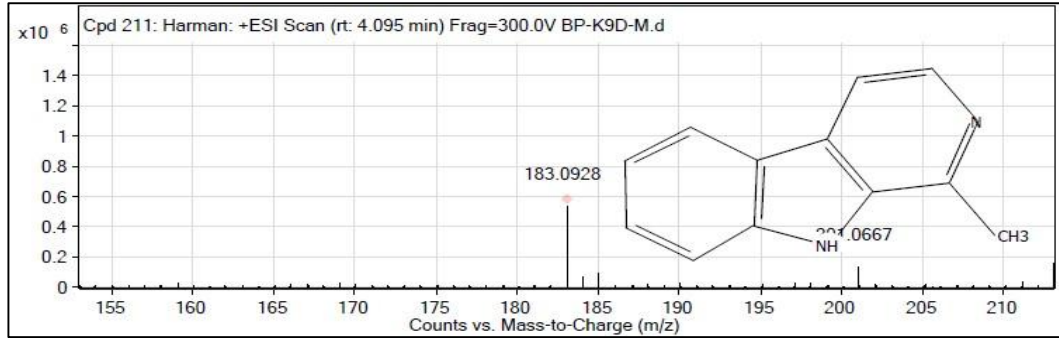
EK 78 - Şekil 2.78. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Val Pro Ile Q-TOF-MS grafiği



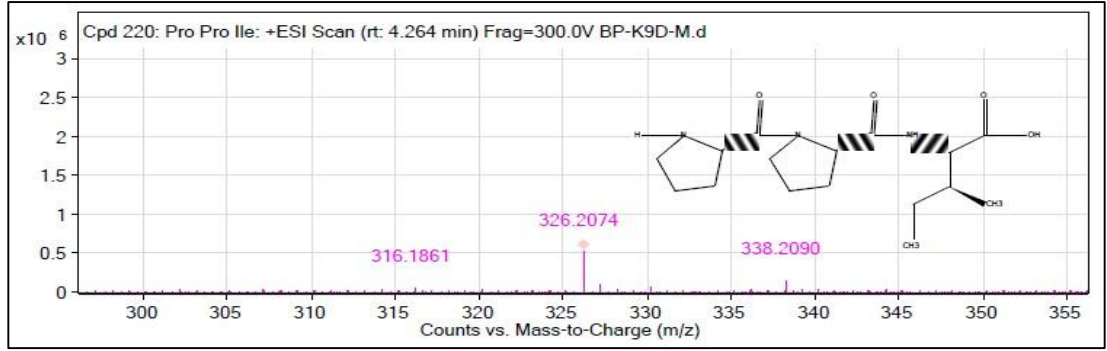
EK 79 - Şekil 2.79. BP-K9D-M ekstraktında saptanan norharman Q-TOF-MS grafiği



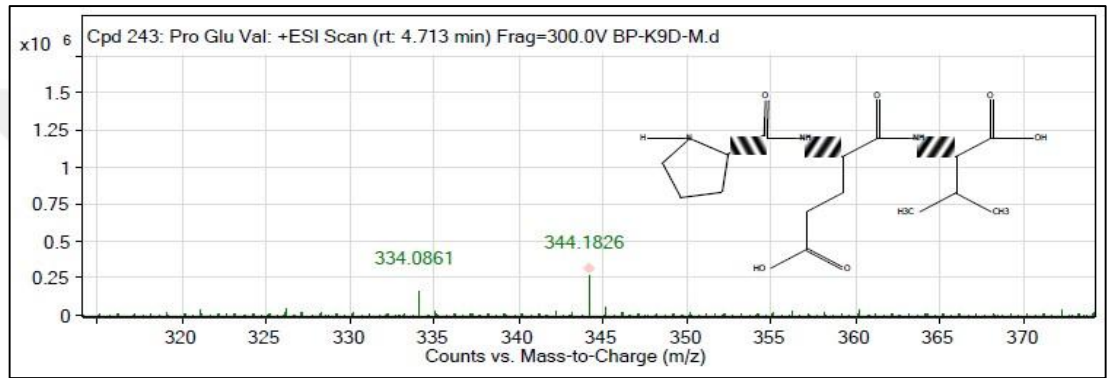
EK 80 - Şekil 2.80. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Ala Gly Q-TOF-MS grafiği



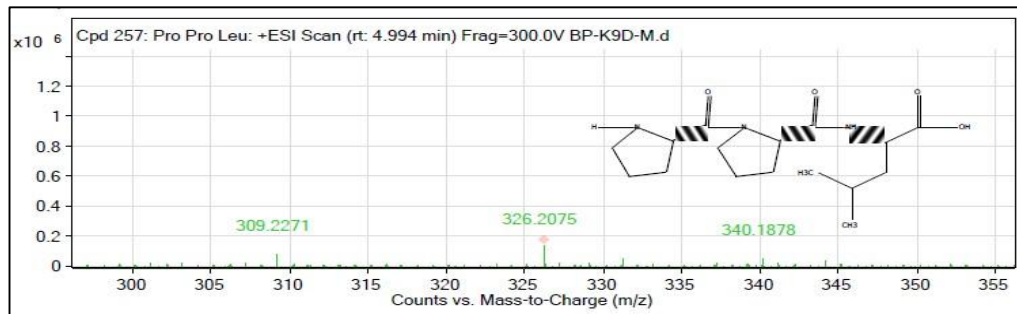
EK 81 - Şekil 2.81. BP-K9D-M ekstraktında saptanan harman Q-TOF-MS grafiği



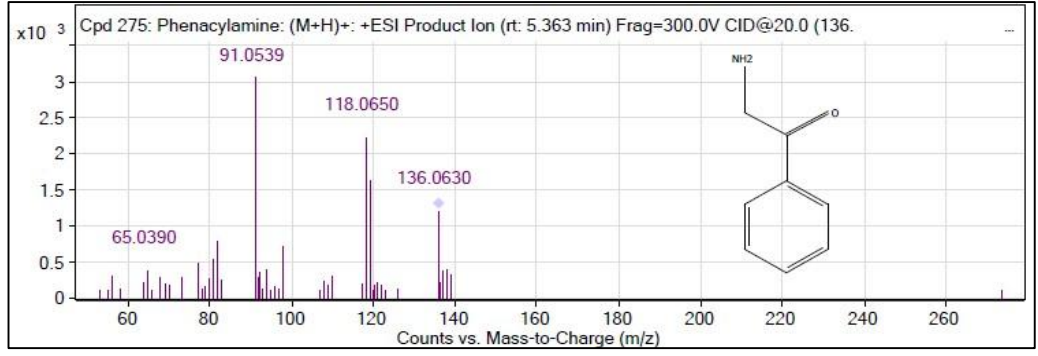
EK 82 - Şekil 2.82. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Pro Ile Q-TOF-MS grafiği



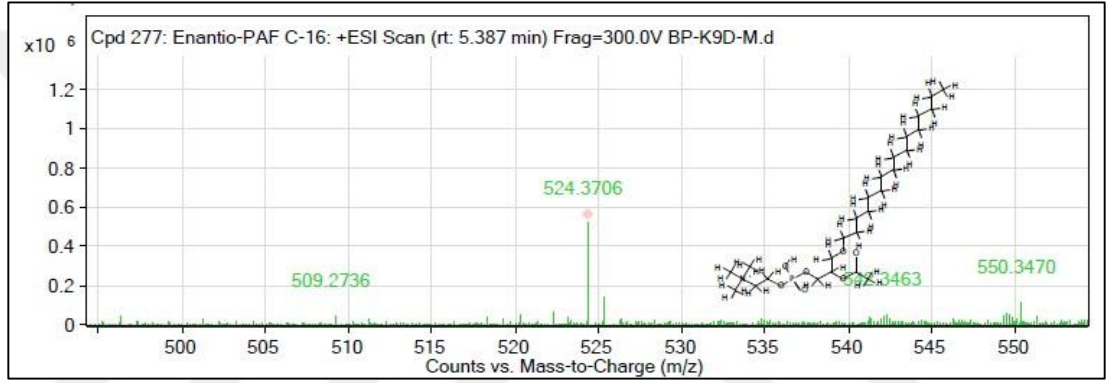
EK 83 - Şekil 2.83. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Glu Val Q-TOF-MS grafiği



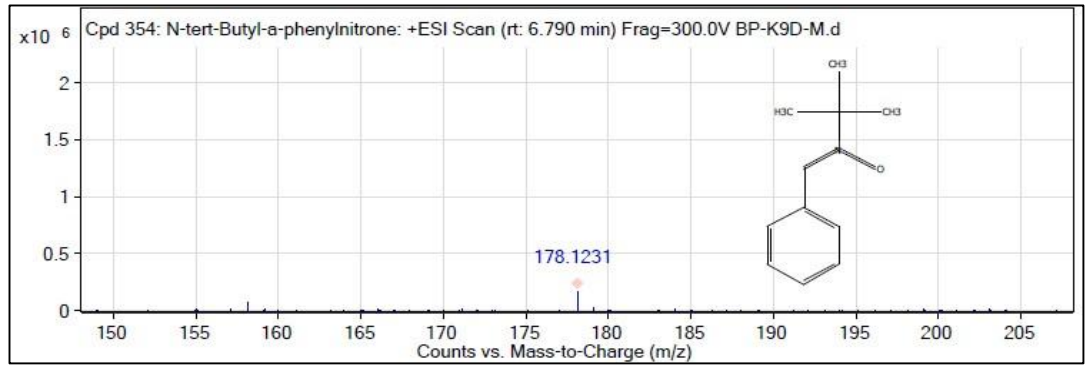
EK 84 - Şekil 2.84. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Pro Pro Leu Q-TOF-MS grafiği



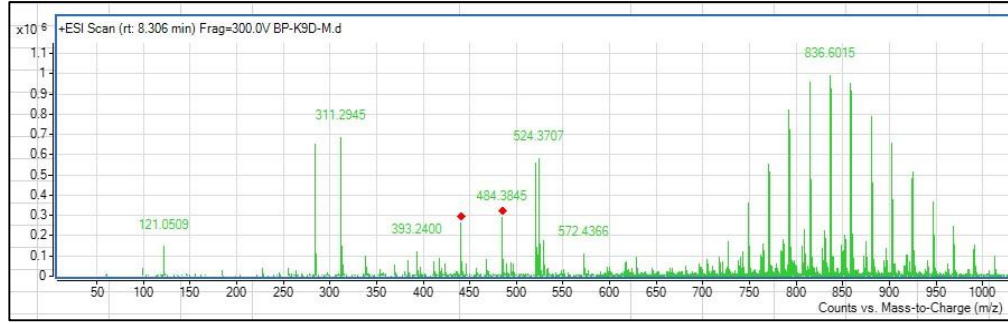
EK 85 - Şekil 2.85. BP-K9D-M ekstraktında saptanan phenacyclamine Q-TOF-MS grafiği



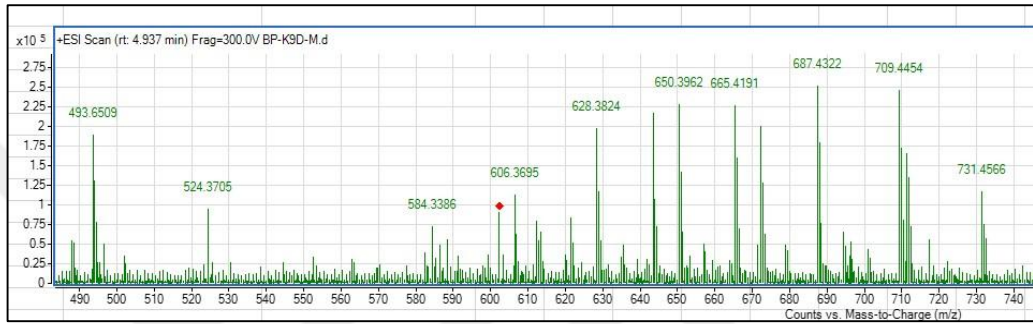
EK 86 - Şekil 2.86. BP-K9D-M ekstraktında saptanan Enantio-PAF Q-TOF-MS grafiği



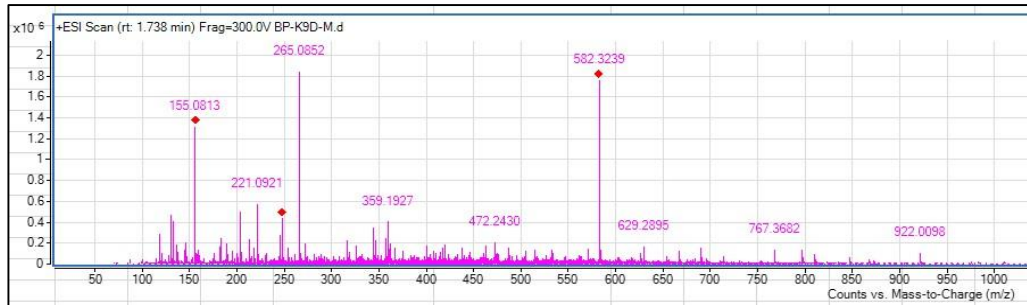
EK 87 - Şekil 2.87. BP-K9D-M ekstraktında saptanan N-tert-Butyl- α -phenylnitrone Q-TOF-MS grafiği



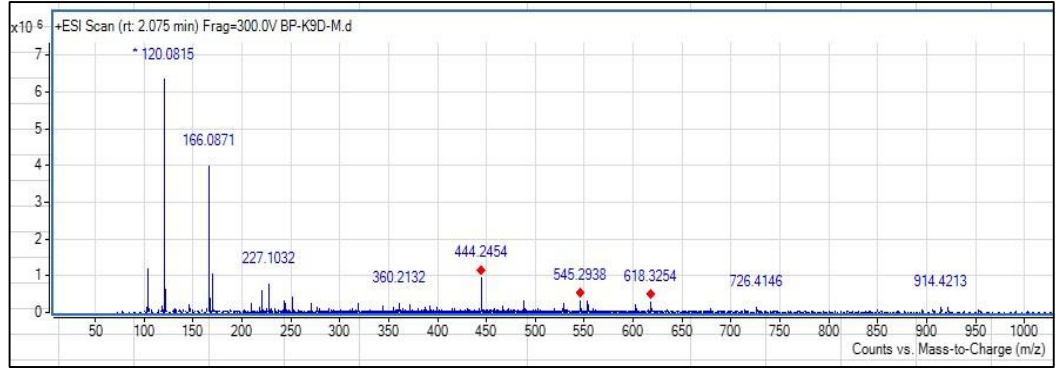
EK 88 - Şekil 2.88. BP-K9D-M ekstraktında saptanan kanamisin Q-TOF-MS grafiği



EK 89 - Şekil 2.89. BP-K9D-M ekstraktında saptanan oleandamis Q-TOF-MS grafiği



EK 90 - Şekil 2.90. BP-K9D-M ekstraktında saptanan oleandamis Q-TOF-MS grafiği



EK 91 - Şekil 2.91. BP-K9D-M ekstraktında saptanan tetrasiklin Q-TOF-MS grafiği