

Toraktan İzole Edilen Actinomycet'lerin Antimikrobiyal
Aktivitesinin Saptanması

Yüksek Lisans Tezi

Neslihan BALKAR

Yrd.Doç.Dr. S.Elif KORCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz 2007

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Topraktan İzole Edilen Actinomycet'lerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması

Neslihan BALKAR

Yrd.Doç.Dr. S.Elif KORCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Temmuz 2007

ONAY SAYFASI

Yrd.Doç.Dr. S.Elif KORCAN danışmanlığında, Neslihan BALKAR tarafından hazırlanan Toprakten İzole Edilen Actinomyces'lerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 16/08/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, SOYADI	İmza
Başkan	Prof. Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	Prof. Dr. Muhsin KONUK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. S. Elif KORCAN (Danışman)	

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetin Kurulu'nun
01./08/2007 tarih ve
2007/17-04 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr. Zehra AKINCI BOZKURT
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Actinomycet'lerin Morfolojik Özellikleri	4
2.1.1 Makroskobik Morfolojisi	4
2.1.1.1. Havasal misel (Aerial misel)	4
2.1.1.2. Substrat misel (Vejetatif veya batık misel)	5
2.1.2 Mikroskobik Morfolojisi	5
2.2 Actinomycet'lerin Sınıflandırılması	6
2.3 Streptomyces'lerin Genel Özellikleri	7
2.3.1 Streptomyces Ekolojisi	10
2.3.2 Streptomyces'in Taksonomisi	11
2.3.3 Streptomyces'in Metabolizması	12
2.3.4 Streptomycesler Tarafından Üretilen Sekonder Metabolitler	12
2.3.5 Streptomyceslerden Elde Edilen Antimikrobiyal Maddeler	13
2.4 Antimikrobiyal Maddeler	16
2.4.1 Antibiyotiklerin Tarihçesi	20
2.4.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	22
2.4.3 Antibiyotiklerin Biyosentezi	23
2.4.4 Antimikrobiyal Maddelerin Etki Mekanizması	23
2.4.5 Antimikrobiyal Maddelerin Kullanım Alanları	24
2.4.5.1 Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı	24
2.4.5.2 Ziraat Alanında Kullanımı	25
2.4.5.3 Hayvancılıkta kullanımı	25

2.4.5.4 Araştırma materyali olarak kullanımı	27
2.5 Antimikrobik ve Kemoterapötik Maddelere Karşı Oluşan Bakteriyal Direnç	27
3. MATERİYAL VE METOT	29
3.1. Materyal	29
3.1.1 Araştırma İçin Seçilen İstasyonlar	29
3.1.2 Araştırmada Kullanılan Test Mikroorganizmaları	29
3.1.3 Kimyasal Maddeler	30
3.1.4 Kullanılan Solüsyon ve Çözücüler	31
3.1.5 Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanması	32
3.2 Metot	43
3.2.1 Toprakta Actinomyces İzolasyonu	44
3.2.2 İzole Edilen Actinomyces'lerin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi	45
3.2.3 Seçilen İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	45
3.2.3.1 Nişasta Hidrolizi	45
3.2.3.2 Lipit Hidrolizi	46
3.2.3.3 Jelatin Hidrolizi	46
3.2.3.4 Hidrokarbonların Parçalanması	46
3.2.3.5 Melanin Üretimi	46
3.2.3.6 Tirozinin Parçalanması	47
3.2.3.7 Katalaz Testi	47
3.2.4 Seçilen İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	47
3.2.4.1 Karbon Kaynaklarının Kullanımı	47
3.2.4.2 Azot Kaynaklarının Kullanımı	47
3.2.4.3 İnhibitör Ortamlar	48
3.2.5 Seçilen İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	48
3.2.6 Fermantasyonla Antimikrobiyal Etkili Molekülün Üretimi	48
3.2.6.1 Sporulasyon	49
3.2.6.2 İnokulum Hazırlanması	49
3.2.6.3 Fermantasyon	49
3.2.7 Fermantasyon Sıvısında Antimikrobiyal Etkinin Saptanması	49
3.2.8 Antibakteriyel Etkili Molekülün İzolasyonu	50

3.2.8.1 Solvent Ekstraksiyonu	50
3.2.8.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Uygun Solvent Sisteminin Belirlenmesi	50
3.2.8.3. Biyootogram	51
3.2.8.4 Kolon Kromatografisi ve UV Spektrofotometre	52
4. BULGULAR	53
4.1 İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi	53
4.2 Kültürel ve Morfolojik Özelliklerin İncelenmesi	56
4.3 Biyokimyasal ve Fizyolojik Özelliklerin İncelenmesi	59
4.4 Fermantasyonla Antimikrobiyal Etkili Moleküllerin Üretimi	66
4.5 Antimikrobiyal Etkili Aktif Moleküllerin İzolasyonları	70
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	98

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Topraktan İzole Edilen Actinomycet'lerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması

Neslihan BALKAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. S. Elif KORCAN

Afyonkarahisar ili topraklarından 52 Streptomyces izole edilmiştir. Kültür ortamlarında en iyi gelişen, Gr (+), Gr (-) bakteriler ve mayalara karşı en yüksek aktiviteyi gösteren 3 izolat seçilmiştir. İzolatlar en fazla antimikrobiyal aktiviteyi *S. aureus* ATCC 25923'e karşı göstermiş olup, zon çapı ≥ 23 mm olarak ölçülmüştür. İzolatların morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenmiştir. Antimikrobiyal etkili maddenin eldesi için izolatlar farklı besiyeri ortamlarında üretilmişlerdir.

AA32 izolatından elde edilen ekstre UV spektrofotometrede 211-284 nm arasında pik vermiştir. TLC'de yürütüldükten sonra antimikrobiyal etkiye sahip olan bölge kazanmış ve R_f değeri 0.527 olarak tespit edilmiştir. Bu bölge UV spektrada 216, 254 ve 284nm de pikler vermiştir. AA33 ise 262-282 nm de pik vermiş olup antimikrobiyal etkiye sahip 2 bölge tespit edilmiştir (R_f 0.487 ve 0.527). Bu bölgelerin UV değerleri 1.bölgenin; 254, 282 ve 2. bölgenin; 208, 256 ve 282 olarak ölçülmüştür.

2007, 97 sayfa

Anahtar kelimeler; Streptomyces, izolat antimikrobiyal aktivite, Afyonkarahisar

ABSTRACT

MSc Thesis

Investigation of the Antimicrobial Activity of Actinomycet Isolated from Soil

Neslihan BALKAR

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asist. Prof. S. Elif KORCAN

Fifty-two *Streptomyces* isolates were gained from the soils of Afyonkarahisar. 3 *Streptomyces* isolates which have the widest antimicrobial spectrum have been chosen as the best cultures isolates they showed very strong anti-microbial activity against Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeasts. The results indicated that obtained isolates were highly active against *S.aureus* ATCC 25923. The morphological and the physiological characteristics of those *Streptomyces* have been determined. Isolates fermented in different nutritive substances and antimicrobial metabolites have been extracted.

The UV spectra of the culture AA32 extracts for the active isolates showed absorbance peaks ranging between 211 and 284 nm. Bioactive region was detected on the TLC plate (R_f 0.527). The UV spectra of the active compounds in aqua showed maximum peaks at 216, 254 and 284. The UV spectra of the other culture of AA33 extracts for the active isolates showed absorbance peaks ranging between 262 and 282 nm (R_f 0.487 and 0.527). Two bioactive regions were detected on the TLC plate (R_f 0.487 and 0.527). Isolates showed absorbance peaks in first region 254, 282; second region; 208, 256 and 282.

2007, 97 pages

Key words: *Streptomyces*, isolates antimicrobial activity Afyonkarahisar

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam esnasında beni yönlendiren, bilgisini, yardımlarını ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. S. Elif KORCAN'a, çalışmalarımın her aşamasında deneyimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Muhsin KONUK'a, Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye ve Yrd. Doç. Dr. Meltem DİLEK'e, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Neslihan BALKAR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

°	Derece
cm	Santimetre
°C	Santigrad derece
dk	Dakika
gr	Gram
h	Saat
lt	Litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikromolar

2. Kısaltmalar

CoNS	Koagülaz (-) Staphlococcus
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DAP	Diamino Pimelik Asit
ISP	International Streptomyces Project
Gr(-)	Gram negatif
Gr(+)	Gram pozitif
Rf	Tutucu Faktör (Retention factor)
RNA	Ribonükleik Asit
TLC	İnce Tabak Kromatografi (Thin Layer Chromatography)
UV	Ultra Viole
VRE	Vankomisin Dirençli Enterekok
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1 a) Farklı Renklerde Streptomyces Kolonileri b) Sentezlenen Bir Antibiyotik	8
Şekil 3.1 Biyootogram Sonucu Oluşan Zon Alanları	51
Şekil 4.1 İzolatların Gliserol Yeast Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	63
Şekil 4.2 İzolatların ISP 4 Ortamında 7 Günde Gelişimi	63
Şekil 4.3 İzolatların ISP 5 Ortamında 7 Günde Gelişimi	63
Şekil 4.4 İzolatların Sakaroz Nitrat Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	64
Şekil 4.5 İzolatların ISP 7 Ortamında 7 Günde Gelişimi	64
Şekil 4.6 İzolatların Glukoz Asparajin Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	64
Şekil 4.7 İzolatların Gliserol Nitrat Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	64
Şekil 4.8 İzolatların Glukoz Nitrat Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	65
Şekil 4.9 İzolatların Nutrien Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	65
Şekil 4.10 İzolatların Malt Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi	65
Şekil 4.11 İzolatların Melanin Formasyon Ortamında 7 Günde Gelişimi	65
Şekil 4.12 İzolatların Spor Zincir Morfolojisi	66
Şekil 4.13 İzolatların TLC' de Oluşan Görüntüleri	72
Şekil 4.14 Biyootogram Sonucu Oluşan Zon Alanları	72
Şekil 4.15. 4-10 Arası Fraksiyonların Oluşturduğu Antimikrobiyal Etki (<i>Stphylococcus aureus</i>)	73
Şekil 4.16 Ham Madde, Kazıntı Bant ve Kolon Kromatorafisi Sonucu Elde Edilen Maddelerin Pik Değerleri	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1 Actinomycetales Takımının Taksonomik Sınıflandırılması	6
Çizelge 2.2 Çeşitli Actinomycet'ler Tarafında Üretilen Biyoaktif Mikrobiyal Metabolitler	9
Çizelge 2.3 Streptomycesler Tarafından Üretilen Antibiyotikler	14
Çizelge 2.4 Çeşitli Türlerin Biyoaktif Mikrobiyal Metabolit Üretimi	18
Çizelge 2.5 Çeşitli Canlılar Tarafından Üretilen Biyoaktif Mikrobiyal Metabolitler	19
Çizelge 2.6 Hayvancılıkta Kullanılan Bazı Antibiyotikler	26
Çizelge 3.1 Çalışma basamakları	43
Çizelge 4.1 İzolasyon Bölgelerine Göre Antimikrobiyal Aktivite Oranları	53
Çizelge 4.2 Afyonkarahisar İlinden İzole Edilen Aktinomiset'lerin Antimikrobiyal Aktiviteleri (mm)	54
Çizelge 4.3 İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özellikleri	56
Çizelge 4.4 AA32 No'lu İzolatın Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri	59
Çizelge 4.5 AA33 No'lu İzolatın Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri	60
Çizelge 4.6 KA11 No'lu İzolatın Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri	61
Çizelge 4.7 AA32 ve AA33 Numaralı İzolatların Farklı Besiyeri Ortamlarında Antibiyotik Üretimi	67
Çizelge 4.8 AA32 ve AA33 Numaralı İzolatların Farklı Besiyeri Ortamlarında Antibiyotik Üretimi	67
Çizelge 4.9 Farklı Besiyeri Ortamlarında 32 Numaralı İzolatın Yaş Ağırlık Ölçümleri	68
Çizelge 4.10 Farklı Besiyeri Ortamlarında 32 Numaralı İzolatın Büyüme Eğrisi	69
Çizelge 4.11 Farklı Besiyeri Ortamlarında 33 Numaralı İzolatın Yaş Ağırlık Ölçümleri	69
Çizelge 4.12 Farklı Besiyeri Ortamlarında 33 Numaralı İzolatın Büyüme Eğrisi	70
Çizelge 4.13 AA32 ve AA33 Numaralı İzolatların Farklı Çözgenlerle Ekstraksiyonu	71
Çizelge 4.14 İzolatların UV spektrum ve Rf değerleri	74

1. GİRİŞ

Geçen 40 yıl esnasında doğal ürünlerin kimyası sürekli bir gelişim göstermektedir. Doğal ürünlerin kolay elde edilebilirliği ve maliyetinin düşük olması özellikle fakir ülkelerde önemlidir. Dünya sağlık örgütü (WHO), dünya üzerindeki insanların % 80'inin tedavi amacı ile doğal ürünlerden yararlandığını bildirmiştir (Farnsworth et al.1985).

Son yıllarda antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı ile kemoterapötikler ve antimikrobiyal ajanlara karşı patojen organizmaların direnç kazanması nedeniyle antibiyotiklerin aktivitelerinin bu mikroorganizmalara karşı araştırılması ile yeni, etkili antimikrobiyal maddelerin elde edilmesi zorunlu hale gelmiştir. Özellikle 1988'ler den bu yana vankomisin dirençli Enterokokların (VRE) ortaya çıkışı, buna ek olarak bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan virüs (HIV) gibi yeni patojenlerin ortaya çıkması doğal ürünlerin önemini tüm dünyada artırmaktadır. Bu nedenle yeni biyoaktif doğal ürünlerin araştırılması kimyacılar, mikrobiyologlar ve farmakologların ilgilendiği temel konuların başında gelmektedir.

Çevremizde bulunan mikroorganizmaların birçoğu halen bilinmemektedir çünkü birçok mikroorganizma laboratuvar koşullarında kültüre edilememektedir. Eğer kültüre edilemeyen bu bakterilerin sekonder metabolitleri araştırılabilirse şüphesiz ki birçok aktif doğal ürünlerin keşfi mümkün olacaktır (Rondon et al. 2000, MacNeil et al. 2001, Martinez et al. 2004).

Saprofitik yaşayan Actinomycet'ler birçok ekolojik alanda bulunmasına rağmen, toprak populasyonunun bakteri ve funguslarla beraber en büyük populasyonunu oluşturur (İsizawa and Araragi, 1986). Actinomycet'ler içinde, toprakta en yaygın olan ve en çok türe sahip olan genusun Streptomyces olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Waksman 1967, Küster 1976). Streptomyces genusu üyelerinin, peptidoglukanda diaminoasit olarak diaminopimelik asitin LL izomerinin (LL DAP) bulunması ile hızlı bir şekilde genus seviyesinde identifikasyonları yapılır. Alkali, organik maddece zengin toprakların Streptomyces türleri için iyi bir habitat olduğu ve bu durumun birçok

antagonist türler içinde geçerli olduğu çeşitli araştırmalar ile saptanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Actinomycet'ler den elde edilen antibiyotiklerin büyük çoğunluğunun Streptomyces genusuna ait olduğu bildirilmiştir (Waksman1967, Lancini et al. 1995).

Vuillemin 1889 yılında ilk defa, antibiosis sözcüğünü bir organizmanın kendi hayatını devam ettirebilmek için diğer bir organizmayı parçalaması durumunu ifade etmek için kullanmıştır. Daha sonra Papacostas ve Gate bu kelimenin manasını şu şekilde tanımlamıştır “Eğer bir organizmanın diğer bir organizma üzerinde zararlı etkisi invivo’da ise buna antogonizm, invitro’da ise antibiosis olarak adlandırılır”. Waksman 1942’de antibiyotiği; mikroorganizmaların büyümelerini inhibe edici özelliğe sahip mikrobiyal orjinli kimyasal madde olarak tanımlamıştır (Waksman 1967). Antibiyotikler, düşük konsantrasyonlarda mikroorganizmalar üzerine etkili olan, düşük moleküler ağırlıkta mikrobiyal moleküllerdir (Öner 1989). Antibakteriyal etkili lizozim gibi enzimler yada kolisin gibi kompleks protein molekülleri, glisin, lösin gibi aminoasitler, etanol butanol gibi anaerobik fermentasyon ürünleri antibiyotik olarak kabul edilmezler. Kemoterapötikler ise antibiyotiklerle aynı özelliğe sahip oldukları halde kimyasal ve sentetik olarak elde edilen maddelerdir (Öner 1989).

Antibiyotikler heterojen bir gruptur molekül ağırlığı 150-5000 dalton arasında değişir. Molekülleri sadece karbon veya hidrojen veya çok yaygın olarak karbon, hidrojen, oksijen ve azot, hatta bir kısmı kükürt, fosfor veya halojen atomları içerir. Hemen hemen tüm organik kimyasal fonksiyonel guruplar (hidroksil, karbonil, nitrojen fonksiyonel grupları vb.) ve bütün organik yapılar (alifatik zincirler, alisiklik zincirler, aromatik halkalar, heterosiklikler, karbonhidratlar, polipeptitler vb.) bulunur. Genellikle antibiyotikler, bakteri büyümesini inhibe eden polar gruplara sahiptirler (Lancini et al. 1995).

Diğer sekonder ürünler gibi antibiyotiklerde, enzimatik olarak katalize edilmiş uzun bir reaksiyonlar serisinin son ürünüdür. Sentez için yapısal ve düzenleyici genler iş görür. Bir antibiyotik 15-20 genin ortak ürünüdür. Antibiyotiklerin sentezindeki reaksiyonlar birkaç biyosentetik yol izinde gruplanmıştır. Bu yol izlerinin, normal hücresel

metabolizmanın basit biyosentetik yol izi varyasyonları olduğunu ve buradaki küçük değişimlerin şaşırtıcı düzeyde farklı maddeler verebileceğinin bilinmesi önemlidir.

Ülkemizde Actinomyces'ler den antibiyotik üretimi ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ülkemizin coğrafik konumu düşünüldüğünde farklı Actinomyces suşlarının izole edilebileceği ve hatta izole edilen bu suşlarda farklı antibiyotik türevlerinin sentezlenebileceği söylenebilir. Bol hammadde kaynağına sahip olan ülkemizde halen antibiyotik aktif maddeleri dışarıdan satın alınmaktadır. Bunun nedeni konu ile ilgili yeterli araştırmanın yapılamaması ve teknolojinin tam olarak bilinmemesidir. Yapacağımız bu çalışma ile Afyonkarahisar ilinden izole ettiğimiz Actinomyces suşlarının antimikrobiyal madde üretim kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ülkemizde yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Actinomycet'lerin Morfolojik Özellikleri

2.1.1 Makroskobik Morfolojisi

Actinomycet'ler tipik koloni özelliği göstermektedirler. Bir Actinomycet kolonisi bakteriler gibi tek tek hücre kolonisi olmayıp dallanan filamentler şeklindedir. Katı ortam üzerinde büyüyen bir koloni vejetatif ve havasal misellerden oluşmaktadır. Üzerinde havasal misel gelişmemişse, pudramsı ve pamuksu bir durum gösterir. Ayrıca koloninin yapısı, şekli, büyüklüğü ve renginin kültürel koşullara göre değiştiği gözlenmiştir (Waksman et al. 1957).

Actinomycet'in karakterizasyonu ve tanımlanabilmesi için, agar üzerinde büyüyen Actinomycet kolonisinin yapısının önemli kriterler arasında olduğu düşünülmüş, koloninin büyüklüğü ve şekli en önemli teşhis kriterlerinden biri olarak kabul edilmiştir (Krinsky 1914).

2.1.1.1 Havasal misel (Aerial misel)

Actinomycet'lerin çeşitli türleri batık misel üzerinde havasal bir misel oluşturmalarıyla karakterize edilmektedirler. Havasal miselin oluşumunda organizmanın yapısı, ortamın yapısı ve büyüme şartları rol oynamaktadır. *Streptomyces ambofaciens*'de ortamdaki Ca^{+2} miktarının 0.1-0.5 μg arasında olması havasal misel gelişimini arttırdığı saptanmıştır. Agar ortamları üzerinde gelişen kolonilerde havasal misel üzerinde konsantrik halkalar halinde sporlu ve sporsuz halkalar olduğu görülmüştür (Natsome et al. 1989).

Havasal misel, substrat miselinden oluşur ve tüm koloniyi örtebilir, böylece pamuksu, pudramsı bir görünüm kazanır (Kutzner 1956).

Havasal hifler yapı ve uzunluk bakımından oldukça farklılık göstermektedirler. Bu hiflerin çapları 1-1.4 μm 'ye ulaşabilir. Havasal hifler yapısı çok farklı olan sporoforlar oluşturabilirler. Sporoforlar düz, uzun veya kısa olabilir. Standart koşullarda her bir *Streptomyces* türünde havasal miselin yapısı sabit ve karakteristiktir, bu durum taksonomik çalışmalar için iyi bir kriter olarak kullanılabilir (Korcan 1995).

2.1.1.2 Substrat misel (Vejetatif veya batık misel)

Vejetatif miselde bazı hiflerin uzunluğu 600 μm 'den fazla olabilir; bazıları çok kısa, dallanmış ve eğridirler. Dallanma tipik olarak monopodial'dir. Actinomycetaceae ve Dermatophillaceae'da olduğu gibi vejetatif hifler çubuksu, kokoid elementlere parçalanabilir. Fakat bu durum Streptomycetaceae'da görülmez. Miselyum serttir, yaşlı kültürlerde bile septasız ve yapışık kalır. Son zamanlarda yaşlı kültürlerde en azından ara sıra septa oluşumu gözlemlendiği iddia edilmiştir (Waksman 1957).

Hif hücrelerinin sitoplazması önceleri homojen olup, hücre yaşlandıkça koful oluşur, kofullarda yağ ve volutin granülleri bulunabilir. Ultrasonik muamele ile hiflerin sıvı kültürlerde geliştirilmesinde Ca^{+2} ve Mg^{+2} seviyelerinin önem taşıdığı bildirilmiştir (Elisa 1993).

2.1.2 Mikroskobik Morfolojisi

Lam lamel arasında 300-400 büyütme ile incelendiklerinde şekilsiz ve ipliklerin karışmasından meydana gelmiş yumak şeklinde, çevreye ışınal biçimde uzanan, uçlarında oval yada yuvarlak biçimli şişliklerin bulunduğu iplikler şeklinde görülürler. Gram boyalı preparatlarında filamanlar gram pozitif, orta kısım granüllü bir görünüm verir. Hematoksilin eozin ile boyamada topuz kısımlar eozinofil boya ile boyanır doku kesitlerinden hazırlanan histolojik preparatların boyanması ile Actinomycet granülleri etraflarını lenfositlerin çevrelediği bir rozet biçiminde görünürler. Asidorezistan, boyanmazlar hareketsiz ve kapsülsüzdürler (Bilgehan 1995).

Streptomyceslerin mikroskopik incelemelerinde ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu kullanılır. Işık mikroskobu ile yapılacak incelemelerde selofaj tekniği immersiyon preparasyonu ve slayt kültürlerden yararlanılır (Kieser 2000).

2.2 Actinomycet'lerin Sınıflandırılması

Actinomycet'lerin sınıflandırılması Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Actinomycetales Takımının Taksonomik Sınıflandırılması

Altakım	Aile	Cins
Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Catellatospora</i> , <i>Couchioplanes</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Dactylosporangium</i>
Frankineae	Frankiaceae Sporichthyaceae Geodermatophilaceae Microsphaeraceae Acidothermaceae	<i>Frankia</i> <i>Sporichthya</i> <i>Geothermatophills</i> , <i>Blastococcus</i> <i>Microsphaera</i> <i>Acidohermus</i>
Pseudonocardineae	Pseudonocardiaceae	<i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Kibdelosporium</i> , <i>Kutzneria</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Saccarothrix</i> , <i>Streptoalloteichus</i> , <i>Thermocrispum</i> .
Streptomisineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>
Corynebacterium	Nocardiaceae Gordoniaceae Mycobacteriaceae Dietziaceae Tsukamurellaceae Corynebacteriaceae	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> . <i>Gordonia</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Dietzia</i> <i>Tsukamurella</i> <i>Corynebacterium</i> , <i>Turicella</i>
Micrococcineae	Micrococcaceae Brevibacteriaceae Cellulomonadaceae Dermabacteraceae Intrasporangiaceae Jonesiaceae Microbacteriaceae Promicromonosporaceae	<i>Micrococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Nesterenkonia</i> , <i>Rorhia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Stomatococcus</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Cellulomonas</i> , <i>Oeskovia</i> , <i>Rarobacter</i> <i>Dermatobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> <i>Intrasporangium</i> , <i>Sanguibacter</i> , <i>Terrabacter</i> <i>Jonesia</i> <i>Microbacterium</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Aureobacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Rathaybacter</i> <i>Promicromonospora</i>
Actinomyineae	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Arcanobacterium</i>

Propionibacteriaceae	Propionibacteraceae	<i>Propionibacterium, Luteococcus, Microlunatus, Propioniferax</i>
Streptosporangineae	Streptosporangiaceae	<i>Streptosporangium, Herbidospora, Microbispora, Microtetrastora, Planobispora, Planomonospora</i>
	Thermomonosporaceae	<i>Thermomonospora, Actinomadura, Spirillospora</i>
	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>
Glycomycineae	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih/>

2.3 Streptomyces’lerin Genel Özellikleri

Streptomyces cinsi, Actinomycet genusuna dahil olan, miselyal, çok hücreli, prokaryot toprak bakterileridir. Toprakta sayıları çok fazla olduğu için toprak mikrobiyal popülasyonunun önemli bir kısmını oluşturur. Toprağın özelliğine, pH, organik ve anorganik madde miktarına göre farklı Streptomyces popülasyonları oluşur.

Actinomycet’ler toprak, göl, deniz, kanalizasyon çamuru, 60°C’de iyi büyüyen formlar dahil bol miktarda Actinomycet içerirler (Umreit and Mc’Coy 1941; Waksman 1967). Ayrıca bazı böceklerin iç organlarında da bulunurlar (Redavut böceği *Rhodrius prolixus*) (Erikson 1935). Çoğunlukla optimum sıcaklık istekleri 25°C -30°C ve pH 6.5-8 arasında olup bunun dışında termofilik, psikrofilik, asidofilik ve alkalofilik olanlarda mevcuttur (Denizci 1996).

Toprak ıslatıldığı zaman oluşan toprak kokusunu Actinomycet’lerin salgıladığı uçucu madde verir (Korcan 1995).

Streptomyces üyeleri aerob ve kemoorganotroftur. Oksidatif tipte metabolizmaya sahiptirler. Actinomycet’ler katalaz pozitifler ve genellikle nitrati nitrite indirgerler. Adenini, eskulini, kazeini, jelatini, hipoksantini, nişastayı ve L-tirozini degrade ederler (Korcan 1995).

Koloniler bakterilerden farklı olarak tek tek hücre ya da hücre gruplarından oluşmazlar. Havasal ve vejetatif hiften oluşan örümcek ağı benzeri bir görüntüsü vardır. Koloniler

ilk başta pürüzsüz görünüştedir. Çünkü havasal hifler dallanma yapmamıştır. Havasal miselin dallanması ile granüllü, pamuksu, pudramsı ve kadifemsi şekilde koloniler oluşur (Korcan 1995). Şekil 2.1’de farklı renkte koloniler gösterilmiştir (Chater 1998).



Şekil 2.1 a) Farklı Renklerde Streptomyces kolonileri
b) Sentezlenen Bir Antibiyotik (Chater 1998).

Koloniler genellikle havasal hifin tepe kısmı tüylenince oluşur (Thompson et al. 98-99). Ve türe özgü renk meydana getirirler (Şekil 2.1), (Redenbach et al. 1996). Bu kolonilerde gri, beyaz, sarı, sarı-yeşil, lila, kırmızı, turuncu, pembe ve kahverengi gibi birçok renk gözlenir (Chater 1998). Koloninin renk vermesi sekonder metabolit sentezinin görsel kaynağıdır (Thompson et al.2000).

Streptomycesler olumsuz çevre koşullarından kurtulmak için morfolojik ve fizyolojik olarak farklılaşırlar ve çok çeşitli yararlı madde, sekonder metabolit, anti-bakteriyal, anti-viral, anti-fungal, anti-algal ve anti-tümoral, bileşimleri sentezlerler (Thompson et al.98-99).

Ortamdaki bakteri ve fungusları elemine etmek için onların hücre duvarlarındaki murain tabakasını parçalayan hidrolazları ve hücre duvarı oluşum mekanizmasını bloke eden bir takım maddeleri sentezlerler.

Bu sekonder metabolitler; eczacılıkta, immün cevap modülatörleri, farklı enzim inhibitörleri, herbisitler, insektisitler ve anti parazitik bileşimlerin yapımında

kullanılırlar. Ekonomik ve ticari açıdan çok önemlidirler (Thompson et al.2000). Doğadaki antibiyotiklerin yaklaşık %80'ini Actinomycet'ler ve bunun yaklaşık %70'ini de Streptomyces'ler üretir. Diğer antibiyotiklerin 4'ü funguslardan penisilin, fumagilin, variotin ve griseofulin; 3 tanesini bakterilerden basitrasin, polimiksin ve tirotrisin elde edilir ve tedavi amaçlı kullanılır (Korcan 1995). Çeşitli Actinomycet'ler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitler çizelge 2.2'de verilmiştir (Berdy 2004).

Çizelge 2.2 Çeşitli Actinomycet'ler Tarafında Üretilen Biyoaktif Mikrobiyal Metabolitler (Berdy 2004)

Streptomycetaceae	MİKTAR	Thermomonosporaceae	MİKTAR
Streptomyces	~ 8000	Actinomadura	345
Streptoverticillium	258	Saccharothrix	68
Kitasatospora	37	Microbiospora	54
Chainia	30	Actinosynnema	51
Microellobosporia	11	Nocardiopsis	41
Nocardioides	9	Microtetrastora	26
Micromonosporaceae		Thermomonospora	19
Micromonospora	740	Micropolyspora/Faenia	13/3
Actinoplanes	248	Thermoactinomyces	14
Dactylosporangium	58	Thermopolyspora	1
Anpullariella	9	Thermoactinopolyspora	1
Glycomyces	2		

Catenuloplanes	3	Mycobacteriaceae	
Catellatospora	1	Nocardia	357
Pseudonocardiaceae		Mycobacterium	57
Saccharopolyspora	131	Arthrobacter	25
		Brevibacterium	17

Amicalotopsis/Nocardia	120/357		
Kibdellosporangium	34	Proactinomyces	14
Pseudonocardia	27	Rhodococcus	13
Amicolata	12	Diğer türler	
Saccharomonospora	2	Actinosporangium	30
Actinopolyspora	1	Microellobosporia	11
Streptosporangiaceae		Frankia	7
Streptosporangium	79	Westerdykella	6
Streptoalloteichus	48	Kitasatoa	5
Spirillospora	11	Synnenomyces	4
Planobispora	10	Sebekia	3
Kutzneria	4	Elaktomyces	3
Planomonospora	2	Excelsospora	3
		Alkalomyces	1
		Catellatospora	1
		Erythrosporangium	1
		Streptoplanospora	1
		Microechinospora	1
		Salinospora	1

2.3.1 Streptomyces Ekolojisi

Streptomycesler doğada ekolojik açıdan bakıldığında oldukça ilginç organizmalardır. Actinomycet cinslerinin %90'dan fazlasının temsilcileri topraktan izole edilmiştir. Streptomyces, cinsinin üyeleri arasında en yaygınlarından ve aynı zamanda en fazla çalışılanlarındandır. Toprak kompleks bir habitat olup yüksek organik maddeli asit toprak zonunun, Streptomyces popülasyonu ile, nötral ve mineralce zengin aynı topraktaki Streptomyces popülasyonun tamamen farklı olabileceği görülmüştür (Williams et al. 1982).

Toprakta koloniler halinde vejetatif hifleri ile gelişirler ve sporlarıyla çevreye yayılırlar, sporlar semi-dormant oldukları için toprakta canlı kalabilirler. Hatta 70 yıllık toprak örneklerinden *Streptomyces* kültürleri elde edilmiştir. Sporlar düşük besin ve suya karşı dirençlidirler fakat miseller kuraklığa karşı oldukça hassastırlar. Laboratuvar koşullarında sporların gelişmesinde sporlar ön germinasyona uğrarlar daha sonra tekrar spor oluşumu görülür. Germinasyon spor yoğunluğunu etkilerken, türler arasındaki çapraz reaksiyonların etkili olmadığı saptanmıştır. Spor germinasyonu için besinsel (eksogenus) maddelere, kalsiyum ve suya ihtiyaç vardır. Topraktaki Actinomycet'ler birçok ekstraselüler madde üretirler ve bu sayede polimerlerin ölü bitki, hayvan ve fungus materyalinin parçalanmasını sağlarlar bu nedenle rekalsitrant polimerleri ile birlikte besinsel siklus ile topraktaki biyodegradasyonda önem taşırlar. Asitofilik *Streptomyces*ler kitinolitik aktiviteye de sahiptirler. Aynı zamanda selüloz, amilaz, maltaz, ksilenaz aktiviteleri de mevcuttur. Toprağın yanı sıra Actinomycet'ler rizosferdede bulunurlar (Kieser et al. 2000) .

Havadan izole edilen ilk Actinomycet türüne *Streptothrix alba* adı verilmiştir (Rossi-Doria 1891) daha sonra bu tür *Streptomyces albus* olarak adlandırılmıştır. Aynı zamanda *Streptomyces* ve micromonospora türlerinin ev içi ve dışı atmosferde 28°C ile 37°C arasında izole edildiği bildirilmiştir (Devries 1960). Tatlı su gölleri nehirler ve kanalizasyon çamuru 60°C'de iyi büyüyen termofilik formlar dahil bol miktarda Actinomycet içerirler. Göl tabanı çamurunun tüm mikrobiyal popülasyonun %10-20'sini mikromonospora'nın teşkil ettiği saptanmıştır (Ubmerit and Mc'Coy 1941; Waksman 1967).

Kompostlar ve küflü yemler; nem, aerobik nötral ve alkali pH şartlarında üremesi teşvik edilen birçok farklı Actinomycet popülasyonu içerir. Mikrobiyal aktivite genelde yüksek organik besleyici madde ile uyarılır (Kieser et al. 2000).

2.3.2 Streptomyces'in Taksonomisi

Streptomyces cinsi Actinomycet ailesine ait olan 4 cinsten *Streptomyces*, *Aktinomyces*, *Nocordia* ve *Mycobacterium*'dan biridir. İlk başta bu canlıların

sistematiklerini oluşturmakta güçlük çekildi. Çünkü bu canlılar bakteri ve fungus gruplarına benzer özellikler gösteriyorlardı. Actinomycet'lere bakteri ve funguslar arası bir geçiş grubu olarak bakılmış ise de ileri düzeyde yapılan testler ile ortaya çıkarılan özellikler Actinomycet'lerin bakteri olarak kabul edilmesine yol açmıştır (Korcan 1995).

2.3.3 Streptomyces'in Metabolizması

Birçok Streptomyces glukoz katabolizmasında Emden-Meyerhof- Parnas yolunu kullanır fakat *S. antibioticus* görünüşte hekzoz monofosfat döngüsünü kullanır. *S. clavuligerus* glukozu karbon ve enerji kaynağı olarak metabolize edemez fakat nişastayı kullanır. Bazı Streptomyceslerin sekonder metabolizma sırasında glikolizisin hekzoz monofosfata dönuştüğü bilinmektedir. Kısacası Streptomyceslerin Pseudomonaslarda olduğu gibi genel olarak Emden- Meyerhof döngüsünü kullandıklarını söyleyemeyiz. Şekerler spesifik kinazlar ile fosforilasyona uğratıldıklarında hücre için önemli gibi görünmektedirler fakat furuktozun fosforilasyonu ve transportu için fruktoz fosfotransferaz sistem (PTS)'nin varlığı *S.coelicolor*, *S. lividans* ve *S. griseofuscus* da daha yeni bulunmuştur. Glukoz ve galaktoz katabolizmaları üzerine yapılan çalışmalar diğerk bakterilerle oldukça ilginç benzerlikler ve farklılıklar göstermektedir (Kieser et al. 2000).

2.3.4 Streptomycesler Tarafından Üretilen Sekonder Metabolitler

Bazı Actinomycet'ler metabolit salgılama özelliğine sahiptir. Bu metabolitler başta insan ve hayvan olmak üzere çok çeşitli canlıların büyümeleri üzerine olumlu etki yaparlar. Actinomycet'ler'in vitamin B₁₂'yi üretme yetenekleri keşfedildikten sonra (Rickes et al. 1948) bu organizma vitamin kaynağı olarak incelenmeye başlanmıştır. Streptomyces cinsine dahil suşların antibiyotik üretimi esnasında, atılan misel artıklarının bol miktarda B₁₂ vitamini içerdiği bilinmektedir (Goodwin 1963). Bu vitamine ek olarak B kompleks vitaminlerinden niasin, peptatonik asit, biotin, pridoksin, tiamin, riboflavin'de üretilmektedir (Hall et al.1979).

Gerek organik gerekse sentetik ortamlarda büyütüldüklerinde çok sayıda Actinomycet, çeşitli pigment oluşturma özelliğine sahiptir. Özellikle antibiyotik üretebilen kültürlerin rodosisine ve sinerubine benzer pigmentler oluşturduğu bildirilmiştir (Corbaz et al. 1957). Pigmentin yapısı tür tanımlanmasında önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir. Sentetik ortamların kullanılmasıyla birlikte farklı organizmaların kırmızıdan maviye, turuncuya, sarıdan kahverengiye ve siyaha kadar değişen çok çeşitli pigmentler oluşturdıkları bildirilmiştir (Lindenbein 1952).

Actinomycet'ler aynı zamanda çok çeşitli enzim üretme kapasitesine sahiptir. Bu enzimlerden bazıları izole edilmiş, konsantre hale getirilmiş ve saflaştırılmıştır. Bu enzimlerden biri de kitinazdır. Kitinaz üreten organizmalar özellikle tropik topraklarda yaygın olup bazı *Streptomyces* türleri tarafından üretildiği tespit edilmiştir (Sykes 1973). *Streptomyces lividans*'ın kitini karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı saptanmıştır (Neugebauer 1991). Kitinaz üretme yeteneği olmayan bazı türlerin fungusların hücre çeperini eritme yeteneğinden yoksun olduğu bildirilmiştir (Boucher 1992).

2.3.5 Streptomyceslerden Elde Edilen Antimikrobiyal Maddeler

Streptomyceslerden yaklaşık 8000 kadar doğal biyoaktif sekonder metabolit elde edilmiştir. Doğada üretilen antibiyotiklerin %70'ini Streptomyces genusu üretmektedir (Berdy 2004). Streptomycesler tarafından üretilen antibiyotikler Çizelge 2.3.'de verilmiştir. Bu antibiyotiklerin antibakteriyal, antiviral, antifungal, antitümoral, insektisit ve herbisit vb. gibi etki mekanizmalarına sahip oldukları görülmektedir.

Çizelge 2.3 Streptomycesler Tarafından Üretilen Antibiyotikler (Kieser et al. 2000)

Antibiyotik	Üreten Organizma	Kimyasal sınıfı	Hedef	Uygulama alanı
Actinomycin D	<i>S.ssp.</i>	Peptid	Transkripsiyon	Antitümör
Actinomycin A	<i>S.ssp.</i>	Makrolit	Sitokrom sistem	Telosidal
Avermektin	<i>S. avermitilis</i>	Makrolit	Klorit iyon yolu	Antiparazitik
Bambermycin	<i>S. bambergiensis</i>	Substitued amino glukozit	Peptidoglikan	Growth promotant
Bialophos	<i>S. hygroscopicus</i>	Peptit	Glutamin sentezi	Herbisidal
Bleomycin	<i>S. verticillus</i>	Glikopeptit	DNA strandbreakeage	Antitümör
Candididin	<i>S. griseus</i>	Polien Makrolit	Membran	
Cephameycin	<i>Nocardia lactamdurans</i> (ve diğerleri)	β -Laktam	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Chloramphenicol	<i>S. venezuelae</i>	N-dichloroacyl phenylpropanoid	R	Antibakteriyal
Chlorotetracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Tetrasiklin (PK)	R	Antibakteriyal
Cycloserine	<i>S. orchidaceus</i>	Substitued siklik peptit	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Daptomycin	<i>S. roseosporus</i>	Lipopeptit	Lipoteikoik asit	Antibakteriyal
Daunomycin	<i>S. peucetius</i>	Anthrasiklin	DNA intercalation	Antitümör
Desferrioxamin	<i>S. pilosus</i>	Peptit	Demir	-
Doxorubicin (Adriamycin)	<i>S. peucetius var. caesius</i>	Anthrasiklin (PK)	DNA intercalation	Antitümör
Eritromisin	<i>Sac. erythraea</i>	Makrolit (PK)	R	Antibakteriyal
FK506 (Tacrolimus)	<i>S. hygroscopicus</i>	Makrolit (PK)	FK proteinlerini bağlayarak	İmmunosuppressant
Fortimicin	<i>Micromonospora olivoasterospora</i>	Aminoglukozit	R	Antibakteriyal
Fosfomycin	<i>S.spp.</i>	Fosforik asit	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Gentamicin	<i>Micromonospora spp.</i>	Aminoglukozit	R	Antibakteriyal
Hygromycin B	<i>S. hygroscopicus</i>	Substitued aminoglukozit	R	Antihelmintik
Kanamycin	<i>S. kanamyceticus</i>	Aminoglukozit	R	Antibakteriyal

Lasalocid	<i>S.lasaliensis</i>	Polieter (PK)	Membran	Anticoccidial growth promotant
Lincomycin	<i>S.lincolensis</i>	Şeker-amide	R	Antibakteriyal
Milbemycin	<i>S.hygroscopicus</i>	Makrolit	Klorit demir cannels	Antiparazitik
Mithramycin	<i>S.argillaceus</i>	Aureolik asit (PK)	DNA alkylation	Antitümör
Mitomycin C	<i>S.caespitosus</i> <i>S.verticillatus</i>	Benzokuinon	DNA	Antitümör
Monensin	<i>S.cinnamomensis</i>	Polieter (PK)	Membran	Anticoccidial Büyüme durdurucu
Natamycin	<i>S.nataensis</i>	Tetraene polien	Membran	Antifungal
Neomycin	<i>S.fradiae</i>	Aminoglukozit	R	Antibakteriyal
Nikkomycin	<i>S.tendale</i>	Nükleosit	Kitin biyosentezi	Antifungal insektisidal
Nocardin	<i>Nocardia uniformis</i>	β -Laktam	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Nosiheptide	<i>S.actuosus</i>	Tiopeptit	R	Büyüme durdurucu
Novobiocin	<i>S.niveus</i>	Coumerin glukozit	DNA giraz (β altünitesi)	Antibakteriyal
Nystasin	<i>S.noursei</i>	Polien Makrolit(PK)	Membran	Antifungal
Oleandomycin	<i>S.antibioticus</i>	Makrolit (PK)	R	Antibakteriyal
Oxytetracyclin	<i>S.rimosus</i>	Tetrasiklin(PK)	R	Antibakteriyal
Phleomycin	<i>S.verticillus</i>	Gliikopeptit	DNA	Antitümör
Paromomycin	<i>S.rimosus</i>	Aminoglukozit	R	Antiamibal
Polyoxins	<i>S.cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Nüklozit peptit	Kitin biyosentezi	Antifungal (Bitki koruma)
Pristinamycin	<i>S.pristinaespiralis</i>		R	Antibakteriyal
Puromycin	<i>S.alboniger</i>	Pürin nükleosit	R	Araştırma
Rapamycin	<i>S.hygroscopicus</i>	Makrolit (PK)	Protein bağları	İmmün baskılayıcı
Rifamycin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Anamycin (PK)	RNA polimeraz	Antibakteriyal Tüberkiloz
Ristocetin	<i>Nocardia lurida</i>	Glikopeptit	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Salinomycin	<i>S.albus</i>	Polieter (PK)	Membran	AntikoksidalBüyüme durdurucu
Spectinomycin	<i>S.spectabilis</i>	Aminocyclitol	R	Antibakteriyal

Spinosyns	<i>Sac.spinosa</i>	Tetrasiklik makrolit (PK)	Bilinmiyor	İnsektisidal
Spiramycin	<i>S.ambofaciens</i>	Makrolid	R	Antibakteriyal
Streptogramins	<i>S.graminofaciens</i>	Makrosiklik laktonlar	R	Antibakteriyal
Streptomisin	<i>S.griseus</i>	Aminoglukozit	R	Antibakteriyal
Streptothricin	<i>S.lavendulae</i>	N-glukozit	R	Büyüme durdurucu
Teichoplanin	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Glikopeptit	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Tetracycline	<i>S.aureofaciens</i>	Tetrasiklin(PK)	R	Antibakteriyal
Thienamycin	<i>S.cattlea</i>	β -Laktam	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Thiostrepton	<i>S.azureus</i>	Tiopeptit	R	Büyüme durdurucu
Tobramycin	<i>S.tenebrarius</i>	Aminoglukozit	R	Antibakteriyal
Tylosin	<i>S.fradiae</i>	Makrolit(PK)	R	Büyüme durdurucu
Validamycin	<i>S.hygroscopicus</i>	Aminoglukozit	R	Bitki koruyucusu
Vancomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Glikopeptit	Peptidoglikan	Antibakteriyal
Virginamycin	<i>S.virginiae</i>	Makrosiklik lakton(PK)	R	Büyüme durdurucu

PK= Poliketit

R= Ribozomlara bağlanarak ve protein sentezini inhibe ederek

2.4 Antimikrobiyal Maddeler

Antibiyotiklerin hikayesi yarım yüzyıl öncesine dayanır. Fleming'in araştırmalarından bu yana günümüzde antibiyotik çalışmaları oldukça ilginç sürekli değişen, gelişen bir süreç göstermektedir. Günümüzde on bin mikrobiyal doğal ürün bilinmektedir. Bazı zamanlar bu konuya olan ilgi azalsa da yinede gitgide artmaktadır. Antibakteriyal antibiyotiklerin önemli grupları olan tetrasiklinler, sefalosporinler, makrolitler ve aminoglukozitler keşfedilmiştir. Antibiyotik keşiflerinde temel izolat *Streptomyces* türleri olmuştur. Tüm izole edilen bileşiklerin %70-80'i *Streptomyces* türlerindendir. Bu bileşikler bakteri ve funguslara etkilidirler. Bu periyot içerisinde antitümör, antiviral,

antibiyotik olmayan enzimler ve inhibitör-metabolitler keşfedilmiştir. Antitümör olarak faydalanılan ilaçların başında doksorubisin bunun yanı sıra tarımda antiparazitik avermektin, besinlere katılan monensin, herbisitik etkisi olan glufosinat ve farmakolojik olarak kullanılan sitatinler, siklosporinler yeni bulunan önemli ürünlerdir. Yeni patojenlerin ortaya çıkmasıyla nadir olarak rastlanılan Actinomycet ve bunların ürünleri de önem kazanmıştır.

1940'lı yıllarda yaklaşık 10-20 arasında antibiyotik keşfedilmiş 1950'lerde 300-400, 1960'da 800-1000, 1970'lerde 2500 antibiyotik biliniyordu. 1980'lerde 5000, 1990'da 10000 ve 2000'ler de ise 20000 antibiyotik bileşiği biliniyordu. 2002 yılına geldiğimizde ise 22000 biyoaktif sekonder metabolit (antibiyotikleri içine alan) ile ilgili bilimsel yayınlar yapılmıştır.

Sekonder metabolitler; düşük moleküllü (~3000'in altında), taksonomik olarak farklılıklar gösteren, organizmaya özgü doğal ürünlerdir. Bu doğal ürünlerin biyolojik aktiviteleri vardır bunlara biyoaktif mikrobiyal sekonder metabolitler denir. Sekonder metabolitlerin atası bitkilerdir daha sonra *Penicillium glaucoma*'dan kristalize fungal ürün olarak 1986'da mikofenolik asit keşfedilmiştir. Sekonder metabolitler antimikrobiyal, antifungal, antibakteriyel, antiprotozoal, antitümöral ve antiviral etkiye sahip olabilirler. Bunların tümü antibiyotik olarak adlandırılırlar. Antimikrobiyal etkiye sahip olmayan sekonder metabolitler biyoregülatörler ya da biyokimyasal modülatörler olarak adlandırılabilir.

Antibiyotikler ve benzer doğal ürünler sekonder metabolitler olup prokaryotik (Prokaryotae, Monera) ve ökaryotik organizmalar tarafından üretilir. Prokaryotlar arasında son yıllarda Bacillus ve Pseudomonas'ın yanı sıra Mycobacteria ve Cyanobacteria'da bu gruba katılmıştır. Yaklaşık 3800 aktif bileşik Mycobacterilerden elde edilmiştir. Buda tüm antimikrobiyal bileşiklerin %17'si dir. İpliksi Actinomycet türlerinde on binin üzerinde biyoaktif bileşikler üretilir. Bunların 7600'ü Streptomyces'den köken alır 2500'ü de nadir olarak rastlanılan Actinomycete'ler dir ve biyoaktif mikrobiyal ürünlerin en geniş grubudur (%45). Basidiomycetes grubuna ait funguslardan yaklaşık 8600 metabolit üretilir ve buda mikrobiyal ürünlerin %35'i olur.

Bilinen bu 22500 antibiyotikten ancak 150 tanesi veterinerlik, tıp ve tarım alanlarında kullanım bulmuştur. 20000-25000 inaktif metabolit bulunmaktadır. Bugün günümüzde 50000 mikrobiyal metabolit bilinmektedir.

Yüksek bitkilerden (Spermatophyta) gymnospermiler ve angiospermiler antimikrobiyal metabolit üretirler. Şüphesiz ki yüksek bitkilerde alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler vardır. Bunlar toksik ve farmakolojik etkiye sahip olup bazılarıda antiviral ve antitümöral etkiye sahiptir.

Hayvanlar aleminde Polifera, Mollusca, Cnidaria, Anthozoa, Echinodermata ve Bryozoa (Süngerler, mollusklar) antimikrobiyal metabolit üretirler. 1972’de sadece 25, 1982’de yaklaşık 30, 1992’de 1500 ve günümüzde 6000 kadar deniz kökenli biyoaktif bileşik bulunmaktadır.

Streptomycetlerden streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve makrolid antibiyotiklerinin eldesi ile çalışmalar bu türde yoğunlaşmıştır. Bu türden yaklaşık %70 ve nadir elde edilen Actinomycete’ler den %25-30 arasında antibiyotik elde edilmiştir. Çeşitli canlı gruplarının üretmiş olduğu biyoaktif mikrobiyal ürünler Çizelge 2.4. ve 2.5.’de gösterilmiştir (Berdy 2004).

Çizelge 2.4 Çeşitli Türlerin Biyoaktif Mikrobiyal Metabolit Üretimi (Berdy 2004)

Kaynak	Antibiyotikler		Biyoaktif Metabolitler		Toplam Biyoaktif Metabolitler
	Total	Diğer Aktivitelerle	Aktivite yok	Diğer	
Bakteriler	2900	(780)	900	(1680)	3800
Eubacteriales	2170	(570)	580	(1150)	2750
<i>Bacillus sp.</i>	795	(235)	65	(300)	860
<i>Pseudomonas</i>	610	(185)	185	(370)	795
Myxobacter	400	(130)	10	(140)	410
Cyanobacter	300	(80)	340	(420)	640

Aktinomisetler	8700	(2400)	1400	(3800)	10100
<i>Streptomyces sp.</i>	6550	(1920)	1080	(3000)	7630
<i>Rare actinos</i>	2250	(580)	220	(800)	2470
Fungi	4900	(2300)	3700	(6000)	8600
Mikroskobik fungi	3770	(2070)	2680	(4750)	6450
<i>Penicillium/Aspergillus</i>	1000	(450)	950	(1400)	1950
Basidiomycetes	1050	(200)	950	(1150)	2000
Mayalar	105	(35)	35	(70)	140
Yumuşak küfler	30	(5)	20	(25)	60
Toplam Mikrobiyal	16500	(5500)	6000	11500	22500
Protozoa	35	10	5	(45)	50

Çizelge 2.5 Çeşitli Canlılar Tarafından Üretilen Biyoaktif Mikrobiyal Metabolitler
(Berdy 2004)

Kaynak	Antibiyotikler	Diğer Biyoaktif	Toplam
Likenler	160	?	160
Algler	620	730	1350
Alçak Yapılı Bitkiler	200	?	200
Yüksek Yapılı Bitkiler	11500	?	11500
Omurgasızlar*	480	?	480
Böcekler*	320		320
Solucanlar,Diğerleri* (Kabuklular)	160		160
Deniz Hayvanları (Tamamı)	3400	2700	6100
Süngerler	1850	1500	3350
Sölenterler	630	570	1100
Tunikatlar	420	230	650
Mollusklar	300	350	650
Ekinodermiler	220	60	280
Bryozoa	70	50	120
Balıklar*	50	?	50
Amfibiler,Sürüngeçenler*	240	?	240
Terrestrial,vertebrata*	410	?	410
Memeliler*	340		340
Diğer(Kuşlar,v.s*)	50		50

2.4.1 Antibiyotiklerin Tarihçesi

Antibiyotik kelimesi Yunanca anti (karşı) ve bios (yaşam) sözcüklerinden türetilmiştir. Sözlüklerdeki tanımlamasıyla “Bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan ya da yapay olarak üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır”. Antibiyosis sözcüğü ise, “Mikroorganizmalar arasındaki karşıtlık” olarak adlandırılır. Penisilin’in bulunmasından sonra geriye dönük olarak yapılan araştırmalar, günümüzden 2500 yıl kadar önce Çinlilerin, küflü soya fasulyesinden yapılan ilaçları tedavi amacıyla kullandıklarını göstermiştir. Benzer ilaçlara, her toplumun geçmişinde rastlamak olasıdır. Bugün bile toplumda “koca karı ilacı, ev ilacı, halk ilacı” adıyla bilinen ve çoğu bitkisel kaynaklı olan bu ilaçların bir bölümünün, antibiyotik oluşturan mikroorganizmaları veya bunların etkili maddelerini içerdiği düşünülebilir. Mikrobiyolojinin en büyük atılımını yaptığı 19. yüzyılın ikinci yarısında, mikroorganizmalardan tedavi amacıyla yararlanılabileceğini ilk düşünen 1877 yılında Pasteur ve Joubert olmuştur. 1880’lerde zararsız bakterileri, hastalık yapan bakterilere karşı kullanma çabalarına girilmiştir. “Replacement” tedavisi denen bu yöntemin temelini, bir hastalık etkeninin üremesini in vitro koşullarda inhibe edebilen, ancak kendisi patojen olmayan bir bakteriyi, tedavi amacıyla hastalara inoküle etmek oluşturmaktaydı. Bu yöntem tüberküloz, difteri, veba, kolera, flarbon gibi hastalıklarda sınırlı bir başarı ile kullanılmıştır. 1920-1930 yılları arasında, bazı barsak enfeksiyonlarının tedavisinde *Lactobacillus acidophilus*’un, streptokok taşıyıcılığına karşıda *Staphylococcus aureus*’un sık olarak kullanıldığı görülmektedir.

Londra’da St Mary’s Hospital’da stafilokok varyantları üzerinde çalışmalar yapan Alexander Fleming, bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresinde stafilokokların üreyemediklerini, tersine ölüp eridiklerini görmüştür. Bu mantarın kültür filtratları, deneysel enfeksiyonlarda birçok bakteriye karşı güçlü biçimde etkin bulunmuş ve Fleming, üreyen küf mantarlarının Penicillinum türünden oluşundan esinlenerek, etkili maddeye penisilin adını vermiştir. 1928 yılındaki ilk gözlem ve çalışmalardan sonra bu konu ile bir süre ilgilenen olmamıştır. 1940 yılında Oxford Üniversitesi Tıp Fakültesinden Florey, Chain ve Abraham penisilin konusu ile yeniden ilgilenmeye başlamış; bu antibiyotiğin farelerde oluşturulan streptokok

enfeksiyonlardaki yüksek etkinliğini deneysel olarak kanıtlamış ve sonuçlarını Mayıs 1940'da yayınlamışlardır.

Penisilin'in insanlardaki ilk ve büyük başarısı 1941 yılında gerçekleşmiş, 1939 yılından başlayarak 1943 yılına kadar Actinomycetes türleri üzerinde çalışmalar yapan Waksman ve arkadaşları sonunda, *Streptomyces griseus* kültürlerinden streptomisin adını verdikleri bir madde elde etmişlerdir. 1944 yılında tedavi alanına giren bu antibiyotik, birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizma yanında Mycobacterium'lara karşı da çok etkili olmuştur. Uzun ve yıpratıcı 2. Dünya Savaşının geniş insan kitlelerine yaydığı tüberküloz hastalığının denetim altına alınmasında büyük katkısı olan streptomisin, özellikle gram negatif mikroorganizmalarda ve Mycobacterium'larda giderek artan direnç gelişmelerine yol açtı. Sonuçta, etkinliğini giderek yitirdi ve daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlandı.

Streptomisin'in temsil ettiği aminoglukozid grubu antibiyotikler, birbirini izleyerek tedavi alanına girmeye devam ettiler. Waksman ve Lechevalier *Streptomyces fradiae*'den neomisin'i elde ettiler. Günümüzde sindirim sisteminden hemen hemen hiç emilmediği için yalnızca barsak florasını inhibe etmek için sınırlı olarak kullanılmaktadır.

Topraktan izole edilen Actinomycete'lerin antibiyotik oluşturma özelliklerinin bilimsel yöntemlerle araştırılması sırasında McGuire ve ark. 1952 yılında Filipinlerde, *Streptomyces erythreus* kültürlerinden eritromisin adı verilen ve makrolit grubu antibiyotiklerin ilk bireyini oluşturan yeni bir antibiyotik elde ettiler. Ağızdan ve parenteral kullanılabilen bu antibiyotik birçok gram negatif ve gram pozitif bakteri yanında, Actinomyces, Mycobacterium, Treponema, Mycoplasma, Chlamydia ve Rickettsia'lara karşıda yüksek düzeyde aktivite göstermekteydi. Eritromisin ve türevleri geniş spektrumlu antibiyotikler olmakla birlikte genel olarak penisilinlerin ilk alternatifleri olarak kullanılmaktadırlar. 1970'li yıllarda İspanya'da izole edilen *Streptomyces cattleya* kültürlerinden yeni bir β -laktam antibiyotiği elde edildi. Tienamisin adı verilen bu madde karbapenem'lerin ilk örneğini oluşturmaktaydı. Görüldüğü gibi insanlık mikroorganizmalarla savaş halindedir. Yüzyıllar boyunca mikroorganizmaların dediği olmuş; 19. yüzyıl sonu ve 20. yüzyılın başında

mikrobiyolojide ulaşılan noktalar, aşı ve serumların sağaltım alanına girmesi, bu savaşta dengeyi sağlamış; kemoterapötik ve antibiyotiklerin keşfiyle üstünlük insanlara geçmiştir. Ancak doğada bir canlının diğerini tümüyle yok edemediği de ortadadır (Aktuğlu 1997).

2.4.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler kimyasal yapılarına göre 10 gruba ayrılır (Berdy 1974).

- 1- Karbonhidrat antibiyotikler (saf sakkaritler, aminoglukozitler, diğer C ve N glukozitler, Diğer şeker derivatları)
- 2- Makrosiklik lakton (Laktam) antibiyotikler (Makrolit antibiyotikler, Polyen antibiyotikler, diğer makrosiklik lakton antibiyotikler, makrolaktam antibiyotikler)
- 3- Qinonlar ve benzer antibiyotikler (linear kondanse polisiklik bileşikler, naftokinon türevleri, benzokuinon türevler, çeşitli kinon benzeri bileşikler)
- 4- Aminoasit, peptit antibiyotikler (aminoasit türevleri, homopeptitler, heteromer peptitler, peptolitler, yüksek molekül ağırlıklı peptitler)
- 5- Nitrojen içeren heterosiklik antibiyotikler (kondense olmamış (tek) heterosiklikler, kondanse heterosiklikler, antibiyotik (antitümör) etkili alkoloidler)
- 6- Oksijen içeren heterosiklik antibiyotikler (Furan türevleri, piran türevleri, benzopiran türevleri, küçük laktonlar, polieter antibiyotikler)
- 7- Alisiklik antibiyotikler (sikolakton türevleri, küçük terpenler, oligaterpen antibiyotikler)
- 8- Aromatik antibiyotikler (benzen bileşikleri, kondanse aromatik bileşikler, nan-benzoid aromatik bileşikler, aromatik bileşiklerin farklı türevleri)
- 9- Alifatik antibiyotikler (alkan türevleri, alifatik karboksilik asit türevleri, S veya P içeren alifatik bileşikler)
- 10- Misellaneous antibiyotikler

2.4.3 Antibiyotiklerin Biyosentezi

Kimyasal yapıları ve üretici organizmalar açısından çok büyük farklılıklar göstermesine karşı, antibiyotiklerin sentezindeki reaksiyonlar birkaç biyosentetik yol izinde gruplanmıştır. Bu yol izlerinin, normal hücresel metabolizmanın basit biyosentetik yol izi varyasyonları olduğunu ve buradaki küçük değişimlerin şaşırtıcı düzeyde farklı maddeler verebileceğinin bilinmesinin önemli olduğu belirtilmektedir (Denizci 1996).

Biyosentetik yol izlerine göre antibiyotikler iki ana grup altında toplanmışlardır.

- 1- Primer metabolitlere analog olanlar (Aminoasitler, koenzimler, nükleosidazların analogları).
- 2- Polimerizasyon yolu ile türevlenenler. Bunlar dört grup altında toplanırlar;
 - a- Klasik protein sentez mekanizmasında görev almayan aminoasitlerin kondensasyonu sonucunda oluşan, sonraki reaksiyonlar ile modifiye edilmiş olan peptit antibiyotikleri ve türevleri.
 - b- Asetat ve propionat birimlerinden meydana gelenler. Yağ asitlerinin biyosentetik yol izinden türevlenirler (poliketit sentezi).
 - c- Terpenoid olanlar. İsoopren sentezinden türevlenirler. Sadece Funguslar ve bazı Actinomysetler tarafından üretilirler.
 - d- Aminoglikosid olanlar. Birkaç şeker molekülünün kondensasyonu ile (genellikle amino şeker ve siklik aminoalkol) meydana gelenler (Lancini ve ark 1995).

2.4.4 Antimikrobiyal Maddelerin Etki Mekanizması

Antibiyotikler etkili oldukları mikropların metabolik işlemlerine müdahale ederek çalışırlar. Antibiyotikler müdahale ettikleri metabolik işlemlere göre spesifiktir. Bu metabolik işlemlere örnek olarak; protein sentezi, hücre çeperi sentezi, nükleik asit sentezi veya hücre zarı fonksiyonlarını verebiliriz. Penisilin, vankomisin ve sefalosporin gibi antibiyotikler bugün en çok kullanılan antibiyotiklerdendir. Bu antibiyotiklerin hepsi bakterilerin hücre çeperini zayıflatırlar.

Bakterilerin hücre çeperleri uzun peptidoglikan zincirlerinden oluşur. Antibiyotikler bu molekülleri bir arada tutan peptit bağlantılarının sentezini önlerler. Böylece hücre çeperleri zayıflar ve bakteri liziz olur. Streptomisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi antibiyotikler ise ya protein sentezini önlerler ya da anormal proteinlerin sentezlenmesine yol açarlar. Antibiyotikler bunları bakterilerin ribozomlarına bağlanarak yaparlar. Bakteri ribozomları ökaryotik ribozomlardan daha küçük oldukları için, bu tür antibiyotikler sadece bakterileri etkiler. Böylece bakterilerin, saldırdığı canlılara zarar vermezler.

Rifampisin ve antrasiklin gibi antibiyotikler ise nükleik asit sentezine müdahale ederler. Antrasiklinler bunu DNA replikasyonunu önleyerek yaparken, rifampisin transkripsiyonu önler.

Bazı antibiyotikler ise patojenleri hücre zarlarına müdahale ederek yok ederler. Hücre zarına yapılan müdahaleler, hücre zarının yapısını değiştirerek onun birçok özelliğini de kaybetmesine yol açar. Bu, hücre sitoplazmasının hücre dışına akması gibi hücrenin yıkımıyla sonuçlanacak olaylara yol açabilir (Int kaynağı 2).

2.4.5 Antimikrobiyal Maddelerin Kullanım Alanları

Genellikle antibiyotikler, kimyasal tedavide kullanılmak üzere, antimikrobiyal etkili madde olarak üretilirler (Crueger & Crueger 1984).

Ayrıca antibiyotikler çiftlik hayvanları, tavukçuluk ve bitkilerdeki hastalıkların tedavisinde, besinlerin muhafazasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak kullanılmaktadır (Waksman 1963,1967, Porter 1976, Berdy 1986, Lancini et al. 1995).

2.4.5.1 Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı

Günümüzde antibiyotikler, klinik tedavide en önemli olan ve en çok kullanılan ilaçlar arasındadır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi, antibiyotik veya diğer antimikrobiyal

maddelerin düzenli bir şekilde, ilaç olarak verilmesi ile mikrobiyal kaynaklı hastalıkların iyileştirilmesi olarak ifade edilir (Lancini et al. 1995).

2.4.5.2 Ziraat Alanında Kullanımı

Bugün çok sayıda antibiyotik, tehlikeli etkileri olan bakteriyal, fungal, viral enfeksiyonlara, böceklerin ve diğer parazitlerin neden olduğu hastalıklara karşı hatta, rekabetçi otlara karşı kültür bitkilerini korumak için tarımda kullanılmaktadır (Waksman 1967, Arai et al. 1976, Drautz et al. 1985, Berdy 1986, Lancini et al. 1995).

Antibiyotiklerin tarımdaki uygulamaları şu şekilde sıralanabilir (Lancini et al. 1995).

- 1- Bakteriyal enfeksiyonların kontrolünde. Bu amaçla genellikle insanlar için geliştirilmiş ve kullanılan streptomisin, özellikle, *Erwina sp.* ve *Xanthomonas sp.* enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır.
- 2- Fungal enfeksiyonların kontrolünde. Bunların birçoğu *Piricularia oryzae* türüne karşı etkili olan blastisidin S gibi nükleosid ve polioksinlere aittirler. Diğer önemli antifungal antibiyotikler ökaryotlarda protein sentezi inhibitörü olarak bilinen siklohegzimid ve kasugamisinidir.
- 3- Yabancı ot kontrolünde. Antibiyotik özellik gösteren çok sayıda sentetik bileşiklerin bazıları bitki zararlılarının kontrolünde herbisit olarak kullanılmaktadırlar.

2.4.5.3 Hayvancılıkta kullanımı

Günümüzde antibiyotikler, hayvanların çeşitli enfeksiyonlara karşı korunması amacı ile kullanılmaktadır (Waksma 1967, Berdy 1986, Öner 1989, Lancini et al. 1995).

İlk defa 1948'de düşük dozda antibiyotiklerin diyetlerde kullanımı ile tavuklarda ağırlık artışının gözlemlendiği rapor edilmiş ve daha sonraki yıllarda farklı antibiyotikler ile farklı hayvanlarda yapılan çalışmalarda intestinal bakteriyal floranın etkilenmesi neticesinde ağırlık artışı olduğu saptanmıştır.

Büyüme üzerine antibiyotiklerin etkisi, aşağıda verilen nedenlere dayandırılmıştır; (Lancini et al. 1995).

- 1- Toksin üreten intestinal bakterilerin inhibisyonuna,
- 2- Aseptomik hastalıklara neden olan bakterilerin inhibisyonuna,
- 3- Diyetlerde sequiester proteinler veya esansiyel besinleri parçalayan bakterilerin inhibisyonuna,
- 4- Floranın bir bölümünün inhibisyonu sonucunda konukçunun büyümesi için gerekli besin faktörlerini sentezleyen bakterilerin stimülasyonuna dayandırılmıştır.

Antibiyotiklerin hayvancılıkta kullanılmaya başlamasının ilk yıllarında medikal amaçlı olarak penicilin, tetrasiklin, eritromisin, streptomisin gibi antibiyotikler birçok ülkede kullanılmıştır. Hayvancılıkta kullanılan antibiyotikler Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6 Hayvancılıkta Kullanılan Bazı Antibiyotikler (Berdy 1986)

Antibiyotik	Ticari İsmi	Üreten Organizma
Monensin	Rumensin Ruminsin Coban Elancoban	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
Salinomisin	Coxistae Bio-cox eustin	<i>Streptomyces albus</i>
Lasalocid	Bovatec Avatec	<i>Streptomyces lasaliensis</i>
Moenomisin	Flavomisin	<i>Streptomyces bambergiensis</i> <i>Streptomyces ghanaensis</i> <i>Streptomyces ederensis</i> <i>Streptomyces geysirensis</i>

2.4.5.4 Araştırma materyali olarak kullanımı

Tedavi edici hiçbir değeri olmayan ve pratikte hiç kullanılmayan, fakat biyokimyasal araçlar olarak kullanılan, birçok antibiyotik bulunmaktadır. Bunların bazıları enzim inhibitörü olarak kullanılıp hücrel metabolizma da görev alan bir molekülün işlevinin saptanmasında kullanılırlar. Örneğin, protein sentezinde birçok ayrıntılı bilgiler, kloramfenikol ve siklohegzimidin inhibitör olarak kullanılması ile ortaya çıkarılmışlardır (Waksman 1967, Umezawa et al.1972, Lancini et al. 1995).

Ayrıca prokaryot ve ökaryotlarda RNA polimeraz arasındaki farklılık rifamisin kullanımı sayesinde saptanmıştır. Bunların yanında antibiyotikler, birkaç genetik işlemlerde markırlar olarak veya konjugasyon denemelerinde verilen karakterlerdeki mikroorganizmaları seçmek amacı ile ve hedef enzim inhibisyonu sonucunda, hedef enzimin genetik haritada gen pozisyonunun belirlenmesinde, bir veya daha çok antibiyotik direnç genleri taşıyan vektörlerin gen transferi için kullanıldığı genetik mühendisliğinin bütün işlemlerinde, rekombinanat klonların seçiminde kullanılmaktadır (Lancini et al. 1995). Leben ve Keitt tarafından, 1948 yılında bulunan ve *Streptomyces kistazawaensis*, *St. griseus*, *St. blastomycetius*, *St. flavochromogenes* tarafından üretilen antimitisin, solunumun elektron transport çalışmalarında, oksidatif inhibitör olarak biyokimya laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Berdy 1986).

2.5 Antimikrobik ve Kemoterapötik Maddelere Karşı Oluşan Bakteriyal Direnç

Antimikrobik kemoterapötik maddelere karşı bakterilerde iki tip direnç oluşur. Bunlardan ilki doğal (İntirinsic) direnç diğeri ise edinsel (Non- İntirinsic) dirençtir.

Doğal direnç, mikroorganizmanın temel özelliğidir. Bakterilerin birçoğunda, antimikrobik kemoterapötik maddeler kullanılmadan önce de var olan dirençtir. *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* *Morgenella*, *Edwardsiella*, *Cedecea* cinslerinin polimiksinlere (polimiksin B ve kolitsin) karşı olan dirençleri doğal dirence örnektir.

Edinsel direnç de ise normal olarak, bakteri önce antimikrobik kemoterapötik madde ile karşılaşmamışsa meydana gelmez. Duyarlı bir bakteri toplumunda edinsel direncin oluşması iki türlü olur.

A- Spontan kromozomal mutasyonla kazanılan direnç; Kromozomal mutasyonlar spontan olarak her 10^5 - 10^6 hücre bölünmesi sonucu normal olarak meydana gelmektedir. Bu türlü mutasyonlar antimikrobik tedavi sırasında meydana gelebildiği gibi, ilaç alınmadığı zamanlarda da meydana gelebilir. Antimikrobik kemoterapötik maddeye mikroorganizmanın maruz kalması, dirençlilerin hızla çoğalmasını ve duyarlı hücrelerin azalmasını, dolaylı olarak da yeni ve dirençli bir hücre topluluğunun ortaya çıkması sonucunu doğurur.

B- Plazmid ve transpozomlar gibi kromozom dışı elementler yoluyla kazanılan direnç;

a- Plazmitlere bağlı direnç; Plazmitler, kromozomdan bağımsız olarak replike olan, kromozom dışı DNA parçacıklarıdır. R- plazmidi ası verilen direnç plazmitleri, sayıları ona varan farklı antimikrobik kemoterapötik maddeler karşı direnç genleri taşımaktadırlar. Vücutta normal floranın plazmit transferine karşı bir koruma sağladığı anlaşılmıştır. Özellikle barsak florasının büyük bir kısmını oluşturan anaerob basillerin meydana getirdiği anaerob şartlar plazmit transferini engellemektedir.

b- Transpozonlara bağlı direnç; Transpozonlar ise, bir DNA molekülünden diğerine geçebilen DNA dizileridir. Bunlar bağımsız olarak replike olmamaktadırlar. Bu nedenle, kromozom ve plazmit içinde bulunurlar. Kromozomlar ile plazmitler arasında gidip gelebilirler. Son yıllarda çoklu direnç genlerini taşıyan bakterilerde transpozonların rolleri olduğu düşünülmüştür (Kılıçturgay 1992).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Araştırma İçin Seçilen İstasyonlar

Araştırmada kullanılan toprak örnekleri Afyonkarahisar ilinin 7 farklı bölgesinden (Ahmet Necdet Sezer Kampüsü (ANS), Ataköy, Devlet parkı, Hıdırlık, Akarçay, Gümüşkent ve Özdilek) alınmıştır. Örnekler alınırken, izole edilecek mikroorganizma grubunun çevresel istekleri dikkate alınarak arazide bitki örtüsünün bol olarak bulunduğu yerler olmasına özen gösterilmiştir. Toprak örnekleri steril petrilere konularak laboratuvara getirilip incelenmeye başlanmıştır.

3.1.2 Araştırmada Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Topraktan izole edilen Actinomycet'lerin antimikrobiyal aktivitelerini saptamak için Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'da Phonix BD (Phonix, BD,USA) otomatik identifikasyon sistemi ile identifikasyonları yapılan hasta izolatları ve standart test organizmaları kullanılmıştır.

1*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.*Klebsiella pneumoniae*

3. *Esherichia coli* ATCC 25922

4.*Pseudomonas aeuroginosa* ATCC 27853

5.*Proteus vulgaris*

6. *Salmonella enteriditis*

7. *Candida albicans*

3.1.3 Kimyasal Maddeler

Gliserol (Riedel-de Haën 15524)

Yeast Ekstarkt (Fluka 09182)

K₂HPO₄ (Merck 1.05101.1000)

Pepton (Fluka 19942)

Agar (Fluka 05039)

Malt Ekstrakt (Fluka 70167)

Çözüdür nişasta

(NH₄)₂SO₄

NaCl (Riedel-de Haën 13423)

CaCO₃

FeSO₄·7H₂O (Riedel-de Haën 12354)

MnCl₂·4 H₂O (Merck 1.05927.1000)

ZnSO₄·7 H₂O (Riedel-de Haën 14455)

CuSO₄·5 H₂O (Riedel-de Haën 12849)

MgSO₄·7H₂O (Fluka 63140)

L-Asparagin (Merck 1.01565.0100)

L- Tirozin (Merck 1.08371)

DL-Alanin (Merck 751 K144563)

L-Histidin (Sigma H-8000)

Potasyum nitrat (GPR 29638)

L-Glutamin (Duchefa Biochemie G0708.0050)

Glisin (Duchefa Biochemie G0709.1000)

Sodium azide (Riedel-de Haën 13412)

Kristal viole (Merck 1.014)

Sodyum klorit (Riedel-de Haën 13423)

Fenol (Riedel-de Haën 16017)

Sakkaroz (Merck 1.07651)

Laktoz (Merck 1.07657)

D-mannitol (Riedel-de Haën15719)

Glukoz (Merck 1.08342)

D-galaktoz (Duchefa biochemie 002381.05)
D-fruktoz (Duchefa biochemie 000757.04)
Myo-İnozitol (Duchefa biochemie 10609.0100)
NaNO₃ (Fluka 71757)
KCl (Riedel-de Haën 12636)
Jelatin (Merck 1.04078.0500)
Beef Ekstrakt (acumedia 7228A)
Meat Ekstrakt (Merck 1.03979)
Tributirin (Aldrich 113026)
NH₄Cl (Riedel-de Haën 11209)
NaH₂PO₄.2H₂O (Riedel-de Haën 04270)
KMnO₄ (Merck 1.05080.1000)
K₂CO₃ (Aldrich S24452-015)
NaOH (Riedel-de Haën 06203)
MTT (3-[4,5-dimetiltiazol 2-yl]-2,5-difenil. tetrazolyum bromit) (MTT)
Ninhidrin (Merck 1,06762.0010)
Siklohegzimit (Sigma C-7698)

3.1.4 Kullanılan Solüsyon ve Çözücüler

%3' lük H₂O₂ çözeltisi
Gramın iyot çözeltisi
Aseton (CARLO ALBO 400974)
Etilasetat (Merck 1.00864.2500)
Asetik asit (Riedel-de Haën 27225)
Metanol (Sigma-Aldrich 34885)
Kloroform (Riedel-de Haën 24216)
n- Butanol (Merck 1.00988)
Hegzan (TEKKİM TK.080210.01000)
Metilen klorit (Merck 1.06050.2500)
Ninhidrin solüsyonu
MTT solüsyonu

3.1.5 Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanması

Gliserol Yeast Agar

Gliserol (Riedel-de Haën 15524)	1gr
Yeast Ekstarkt (Fluka 09182)	0.4 gr
K ₂ HPO ₄ (Merck 1.05101.1000)	0.2gr
Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Agar (Fluka 05039)	3 gr
Distile su	200 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra 50µg/ml siklohegzimit (Huck et al. 1991, Waksman,, 1967, Williams & Davies, 1965, Mc Carthy & Williams 1990) ilave edilmiştir. Gliserol Yeast Agar ortamı Actinomycet’lerin topraktan izolasyonunda, büyüme ortamı olarak ayrıca agar ilave edilmeden hazırlanan broth hali ise fermentasyon için fermentasyon ortamı 1 olarak kullanılmıştır (Tamer vd. 1989).

ISP 2 Yeast Ekstrakt – Malt Ekstrakt Agar

Yeast Ekstrakt (Fluka 09182)	4gr
Malt Ekstrakt (Fluka 70167)	10 gr
Glukoz (Merck 1.08342)	4 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Shirling & Gottlieb, 1966, Williams&Cross 1971). Ayrıca Actinomycet’lerin topraktan izolasyonunda büyüme ortamı olarak, agar ilave edilmeden hazırlanan broth hali ise fermentasyon için fermentasyon ortamı 2 olarak kullanılmıştır (Huck et al.1991).

ISP 4 İnorganik Tuz – Nişasta Agar

Çözünür nişasta	10 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	2gr
KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04871.1000)	1 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka 63140)	1gr
NaCl (Riedel-de Haën 13423)	1gr
CaCO ₃	2 gr
*Shirling ve Gottlieb iz tuzlar solüsyonu	1 ml
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt
<u>*Shirling ve Gottlieb iz tuzlar solüsyonu</u>	
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.1 gr
MnCl ₂ . 4 H ₂ O (Merck 1.05927.1000)	0.1 gr
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (Riedel-de Haën 14455)	0.1 gr
Distile su	100 ml

Az miktarda soğuk su ile karıştırılıp çözülen nişasta distile su ile 1 lt'ye tamamlandıktan sonra üzerine diğer maddeler ilave edilmiştir. İz tuzlar solüsyonu kullanılarak hazırlanan ortam, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Shirling & Gottlieb 1966, Wendisch & Kutzner 1991).

ISP 5 Gliserol Asparagin Agar

L-Asparagin (Merck 1.01565.0100)	1gr
Gliserol (Riedel-de Haën 15524)	10gr
K ₂ HPO ₄ (Merck 1.05101.1000)	1 gr
*Shirling ve Gottlieb iz tuzlar solüsyonu	1 ml
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1lt

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Pridham & Lyons, 1961, Shirling & Gottlieb 1966, Williams & Cross 1971, Wendisch & Kutzner 1991).

ISP 7 Tirozin Agar

Gliserol (Riedel-de Haën 15524)	15 gr
L- Tirozin (Merck 1.08371)	0.5 gr
L- Asparagin (Merck 1.01565.0100)	1 gr
K ₂ HPO ₄ (Merck 1.05101.1000)	0.5gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka 63140)	0.5 gr
NaCl (Riedel-de Haën 13423)	0.5 gr
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.01 gr
Distile su	1 lt
*Pridham ve Gottlieb iz tuzlar solüsyonu	1 ml
Agar (Fluka 05039)	15 gr
<u>*Pridham ve Gottlieb iz tuzlar solüsyonu</u>	
CuSO ₄ .5 H ₂ O (Riedel-de Haën 12849)	0.64 gr
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.11 gr
MnCl ₂ . 4 H ₂ O (Merck 1.05927.1000)	0.79 gr
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (Riedel-de Haën 14455)	0.15 gr
Distile su	100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Shirling & Gottlieb 1966).

Sakkaroz Nitrat Agar

Sakkaroz (Merck 1.07651)	30 gr
NaNO ₃ (Fluka 71757)	2 gr
K ₂ HPO ₄ (Merck 1.05101.1000)	1 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka 63140)	0.5 gr
KCl (Riedel-de Haën 12636)	0.5 gr
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.01 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Bu ortam sıklıkla “Czapek’s agar veya Czapek’s solüsyon agarı” olarak bilinir. Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Waksman 1967, Ohkuma et al. 1992).

Glukoz Asparagin Agar

Glukoz (Merck 1.08342)	10 gr
Asparagin (Merck 1.01565.0100)	0.5 gr
K ₂ HPO ₄ (Merck 1.05101.1000)	0.5 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Waksman 1967, Ohkuma et al. 1992).

Melanin Formasyon Ortamı

Yeast Ekstrakt (Fluka 09182)	1 gr
L- Tirozin (Merck 1.08371)	1 gr

NaCl (Riedel-de Haën 13423)	8.5 gr
Agar (Fluka 05039)	15gr
Distile su	1 lt

Otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların fizyolojik özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Waksman 1967).

ISP 12 Karbon Nutrient Ortamı

*Karbon kaynağı	10 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 gr
KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04871.1000)	2.38 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka 63140)	1 gr
CuSO ₄ .5 H ₂ O (Riedel-de Haën 12849)	0.0064 gr
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.001 gr
MnCl ₂ . 4 H ₂ O (Merck 1.05927.1000	0.007 gr
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (Riedel-de Haën 14455)	0.0015 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Karbon kaynakları membran filtre ile steril edilerek ortama %1 oranında ilave edilmiştir. Glukoz pozitif kontrol ortamı olarak, karbon kaynağı bulunmayan ortam ise negatif kontrol ortamı olarak kullanılmıştır. (Shirling & Gottlieb 1966, Waksman 1967).

Azot Kullanım Ortamı

D-Glukoz (Merck 1.08342)	1 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka 63140)	0.05 gr
NaCl (Riedel-de Haën 13423)	0.01 gr
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.001 gr
K ₂ HPO ₄ (Merck 1.05101.1000)	0.1 gr

Agar (Fluka 05039)	1.5 gr
Distile su	100 ml

Test edilecek azot kaynakları, ortama % 0.1 (w/v) oranında ilave edilmiştir. Hazırlanan ortamlar izolatların kullanabildiği azot kaynaklarının belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. L-Asparagin içeren ortamlar pozitif kontrol ortamı olarak kullanılmıştır (Williams et al. 1983, Locci 1989).

Bennet's Ortamı

Gliserol (Riedel-de Haën 15524)	20 gr
L-Alanin (Merck 751 K144563)	2.5 gr
NaCl (Riedel-de Haën 13423)	1 gr
CaCO ₃	0.1 gr
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Riedel-de Haën 12354)	0.1 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka 63140)	0.1 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Otklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların fizyolojik özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Jones 1949, Locci 1989).

Jelatin besiyeri

Jelatin (Merck 1.04078.0500)	12 gr
Nutrient Broth	100 ml

Otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dk süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Çotuk 2003).

Gliserol – Nitrat Agar

Besiyeri 9'daki sakarozun yerine 30 gram gliserol ilave edilerek hazırlanan bu ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Waksman 1967).

Glukoz- Nitrat Agar

Besiyeri 9'daki sakarozun yerine 30 gram glukoz ilave edilerek hazırlanan bu ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Waksman 1967).

Nutrient Agar

Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Beef Ekstrakt (acumedia 7228A)	3 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde ve izolatların antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Öner 1989).

Nutrient Broth

Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Beef Ekstrakt (acumedia 7228A)	3 gr
Distile su	1 lt

Otklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam çalışmalarda test organizmalarının aktive edilmesi ve fermentasyon ortamı kullanılmıştır (Öner 1989).

Malt Ekstrakt

Malt Ekstrakt (Fluka 70167)	30 gr
Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde ve izolatların stoklanmasında kullanılmıştır (Öner 1989).

Malt Broth

Malt Ekstrakt (Fluka 70167)	30 gr
Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Distile su	1 lt

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların kültürel özelliklerinin incelenmesinde ve fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır (Öner 1989).

Nişasta Agar

Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Meat Ekstrakt (Merck 1.03979)	3 gr
Nişasta	2 gr
Agar (Fluka 05039)	15 gr
Distile su	1 lt

***Gramın İyot Çözeltisi**

İyot	1 gr
KI	2 gr
Distile su	300 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. İzolatların nişasta agara ekimleri yapıldıktan sonra inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda petrilere gramın iyot çözeltisi dökülmüş ve renk oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. (Çotuk 2003).

Tributirin Agar

Pepton (Fluka 19942)	5 gr
Meat Ekstrakt (Merck 1.03979)	3 gr
Tributirin (Aldrich 113026)	10gr
Agar (Fluka 05039)	15gr
Distile su	1 lt

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatlarımızın biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Pepton, agar ve meat ekstrakt ısıtılarak eritildi, 90°C’ye kadar soğutulduktan sonra tributirin ilave edilmiştir ve karıştırıcıda emülsiyon haline getirilmiştir (Çotuk 2003).

Temel Mineral Ortamı

NH ₄ Cl (Riedel-de Haën 11209)	0.05gr
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (Riedel-de Haën 04270)	0.05gr
KH ₂ PO ₄ (Merck 1.04871.1000)	0.05gr
MgSO ₄ .7H ₂ O (Fluka 63140)	0.05gr
NaCl (Riedel-de Haën 13423)	0.4gr
Agar (Fluka 05039)	1.5 gr
Distile su	100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Bu ortam steril tüplere 10’ar ml konulduktan sonra üzerine %1 oranında hidrokarbon ilave edilmiştir. Çalışmamızda hidrokarbon kaynağı olarak mazot kullanılmıştır (Öner 1989).

Fermantasyon Ortamı A

Glukoz (Merck 1.08342)	10gr
Pepton (Fluka 19942)	5gr
Meat Ekstrakt (Merck 1.03979)	5gr
NaCl (Riedel-de Haën 13423)	5gr
Distile su	1 lt

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dk. süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam izolatlardan antibakteriyal molekülün üretimi için fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır (Schatz & Waksman 1944’e göre Hepgüvendik1989’dan).

Ninhidrin Solüsyonu

Ninhidrin	0.2gr
Aseton	100ml

TLC plaklarına sıkılarak aktif molekülün peptit yapısı saptanmıştır. Solüsyon aminoasitler için kullanılmaktadır (Toennies 1951).

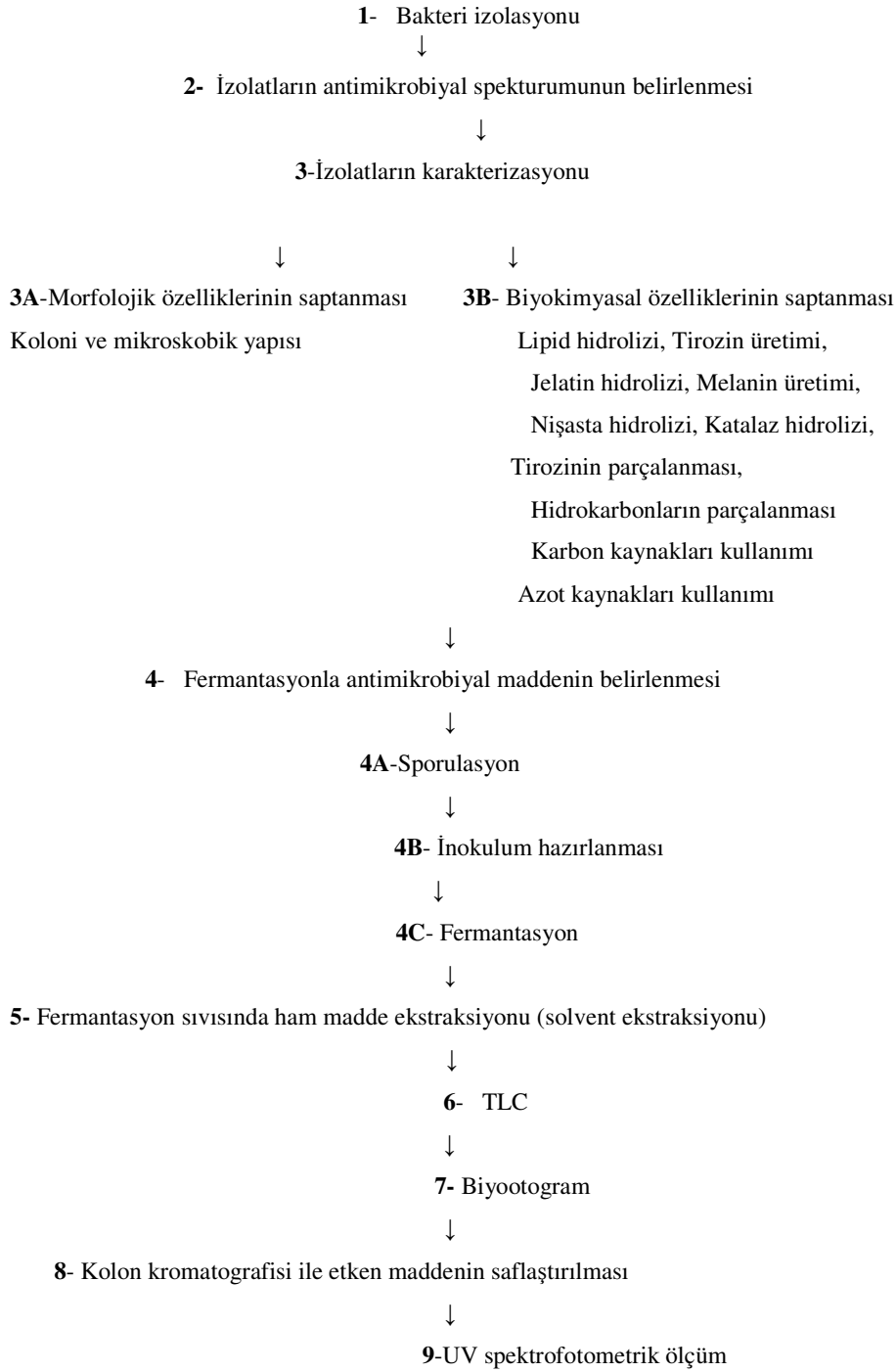
MTT (3-[4,5-dimetiltiaksol 2-yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromit) Solüsyonu

MTT	0.025gr
Distile su	10ml

Bu Solüsyon biyootogram sonrası bakterilerin canlı kaldığı bölgeyi pembe renge boyamaktadır (Lund et al. 1975).

3.2. Metot

Çizelge 3.1 Çalışma basamakları



3.2.1 Toprakta Actinomyces İzolasyonu (Waksman 1922)

Toprak örnekleri, alkol ile temizlenmiş bir çapa ile 5-10 cm derinlikte açılan toprak profilinden, alkolle temizlenmiş bir kaşıkla steril petrilere alınmıştır (Brown 1958). Alınan her bir kompozit topraktan, steril koşullarda 10 gr tartılıp 500 ml'lik steril erlenlere konulduktan sonra üzerine %0.1 oranında CaCO_3 ilave edilerek karıştırılmış ve bir gün süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir (El-Nakeeb&Lechevalier 1963, Williams&Cross 1971).

Erlenlerde bulunan her bir toprak örneği üzerine 90 ml steril distile su ilave edilerek çalkalanmıştır. Böylece toprak örnekleri yaklaşık 10^{-1} oranında sulandırılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış her bir toprak örneği süspansiyonundan steril bir pipet yardımı ile 1 ml alınarak, içinde 9 ml steril distile su bulunan tüplere aktarılmış ve böylece yaklaşık 10^{-2} 'lik toprak süspansiyonu elde edilmiştir. Aynı işlem 10^{-3} ve 10^{-5} 'lik sulandırmalar elde etmek için tekrarlanmıştır. Hazırlanan 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} 'lik sulandırmalardan steril bir pipetle 0.5 ml alınarak steril petrilere konulmuş ve üzerine soğutulmuş besiyeri Malt Agar, Nutrient Agar ve Gliserol Yeast Agar ilave edilerek üç paralel çalışılmıştır. Besiyeri ile toprak süspansiyonun homojen karışmasını sağlamak için petrilere rotasyon hareketi yaptırılmıştır. Hazırlanan petriler 27°C ' ve 40°C 'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüm petriler inkübasyon süresi boyunca Actinomyces kolonilerinin var olup olmadığını saptamak için gözlenmiştir.

Katı ortam üzerinde pudramsı, derimsi veya pamuksu bir görünüme sahip olan kolonilerin mikroskopik incelemeleri yapılmış ve gram boyama özelliklerine bakılarak Actinomyces izolatları belirlenmiştir. Her bir toprak örneğinden elde edilen izolatlar, mikroskopik ve makroskopik özelliklerine göre gruplandırılarak, grubu temsil eden rasgele bir izolat çalışma için seçilmiştir.

3.2.2 İzole Edilen Actinomycet'lerin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi

İzole edilen Actinomycet kültürlerinde antimikrobiyal etkinin varlığı Spektrum-Plak Metodu (Raper et al. 1949, Nakayama 1981) kullanılarak saptanmıştır. Nutrient Agarlı petriler üzerine, antimikrobiyal aktivitesi belirlenecek izolatın ekimi, petriyi ortalayacak şekilde, bir uçtan diğer uca doğru yapılmıştır. Bu şekilde ekimleri yapılan izolatlar 27°C'de 5 -7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Test organizması olarak kullanılacak mikroorganizmaların (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aureoginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Salmonella enteriditis*) 24 saatlik taze Nutrient Broth kültürleri hazırlanmış ve bu mikroorganizmalar Actinomycet kolonisi ile 90° açı yapacak şekilde Actinomycet kolonisinden başlayarak petri kenarına doğru tek çizgi halinde ekilmiştir. Test mikroorganizmalarının gelişimi için petriler 24 saat 37°C'de inkübasyona tabi tutulmuş ve inkübasyon sonunda Actinomycet izolatının test organizmasına inhibisyon etkisi milimetre olarak ölçülmüştür (Raper et al. 1949).

3.2.3 Seçilen İzolatların Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1 Nişasta Hidrolizi

Seçilen izolatlar Nişasta Agar üzerine ekilmiş ve 27°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Bekleme süresi sonunda petriyi örtecek şekilde Gram'ın iyodin çözeltisi agar üzerine dökülmüş ve dökülen solüsyonun fazlası akıtılmıştır. İyodinin varlığında nişasta, besiyerinde mavi-siyah bir renk verir, bu sonuç ortamda nişasta parçalayan enzimin bulunmadığının bir göstergesi olup, negatif bir sonuçtur. Eğer nişasta hidroliz edilmişse, organizmanın ürediği bölge etrafında açık bir hidroliz zonu oluşacaktır (Çotuk 2003).

3.2.3.2 Lipit Hidrolizi

Tributirin Agar bulunan petrilere izolatlar ekilmiş ve 27°C’de 5-7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Bu süre sonunda petrilere açık zon oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Açık zon oluşumu lipit hidrolizi için pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Çotuk 2003).

3.2.3.3 Jelatin Hidrolizi

Jelatin besiyerine izolatların taze kültürlerinden ayrı ayrı ekim yapılmış olup tüpler 27°C’de 5 gün inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda 4°C’de 30 dk. buzdolabında bekletilmiştir. Yüzeyinde sıvılaşma saptanan kültürler jelatinaz oluşturan ve jelatini hızla hidrolize eden suşlar olarak değerlendirilmiştir. Katı kalan kültürler ek olarak 5 gün daha inkübe edilerek, jelatinin hidrolize olup olmadığına tekrar bakılmıştır. Sıvılaşma görülen suşlar jelatini yavaş hidrolize eden suşlar olarak saptanmıştır (Çotuk 2003).

3.2.3.4 Hidrokarbonların Parçalanması

Mikroorganizmaların hidrokarbonları parçalamalarını belirlemede izolatların Malt Agardaki taze kültürleri kullanılmıştır. Hidrokarbonun parçalanması için gerekli olan temel mineral ortamından, steril deney tüplerine 10’ar ml konulmuştur. Mineral ortama %1 oranında hidrokarbon örneği katılarak ortam hazırlanmış ve izolatlar tüplere ekilmiştir. Çalışmada hidrokarbon olarak mazot kullanılmıştır. Tüpler 27°C’de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda açık zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Öner 1989).

3.2.3.5 Melanin Üretimi

Melanin üretimi için Melanin Formasyon Ortamı kullanılmıştır. Besiyeri petrilere döküldükten sonra izolatların ekimleri yapılmış ve 27°C’de 5-7 gün inkübasyona

bırakılmışlardır. Bu süre sonunda petrilere kahverengi renk oluşumu melanin üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Denizci 1996).

3.2.3.6 Tirozinin Parçalanması

İzolatların ekimleri Bennet's ortamına L-Tirozin ilave edilerek hazırlanmış besiyerinde yapılmış ve 27°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda bulanıklık oluşan tüplerdeki suşlar tirozini parçalayan suşlar olarak saptanmıştır (Denizci 1996).

3.2.3.7 Katalaz Testi

Petrilerde bulunan taze kültürlerin üzerine % 3'lük hidrojen peroksit çözeltisinden ilave edilerek suşların katalaz aktiviteleri incelenmiştir. Oksijen kabarcıklarının çıkması ve yüzeyde köpük birikimi görülen suşlar katalazın mevcut olduğu suşlar olarak belirlenmiştir (Çotuk 2003).

3.2.4 Seçilen İzolatların Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.4.1 Karbon Kaynaklarının Kullanımı

İzolatların karbon kaynaklarının belirlenmesinde Karbon Nutrient Ortamı kullanılmıştır. Farklı karbon kaynakları içeren ortamlar 27°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Karbon kaynağı olarak D-glukoz, laktoz, sakkaroz, gliserol, D-mannitol, D-galaktoz, D-fruktoz, inozitol kullanılmıştır (Denizci 1996).

3.2.4.2 Azot Kaynaklarının Kullanımı

İzolatların azot kaynaklarının belirlenmesinde Azot Kullanım Ortamı kullanılmıştır. Farklı azot kaynakları içeren ortamlar 27°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Azot kaynakları olarak L-asparajin, DL-alanin, L-histidin, potasyum nitrat, L-tirozin, L-glutamin, KNO₃ ve glisin kullanılmıştır (Denizci 1996).

3.2.4.3 İnhibitör Ortamlar

Malt Agara inhibitör olarak, sodyum klorit (%4, %7, %10 ve %13 oranlarında), kristal viole (0.0001gr), sodyum azid (0.01,0.02gr), ve fenol (0.1gr) katılarak 27°C’de 5-7 gün inkübe edilmiştir. Kontrol olarak içinde inhibitör bulunmayan Malt Agar kullanılmıştır. Besiyeri üzerindeki organizmanın gelişimi, kontrol grubu ile karşılaştırılarak inhibitörlerin etkisi saptanmıştır. Ayrıca 3 farklı sıcaklığın (10°C, 37°C ve 45°C) suşlar üzerine etkisi izolatların 27°C’deki gelişimleri ile karşılaştırılarak incelenmiştir (Denizci 1996).

3.2.5 Seçilen İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Seçilen izolatların Gliserol Yeast Agar, Yeast Ekstrakt- Malt Ekstrakt Agar (ISP 2), İnorganik Tuz- Nişasta Agar (ISP 4), Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5), Tirozin Agar (ISP 7), Sakaroz Nitrat Agar, Gliserol Nitrat Agar, Glukoz Nitrat Agar, Glukoz Asparagin Agar, Nutrient Agar ve Malt Agar ortamlarında morfolojik ve kültürel özelliklerinin incelenmesi amacıyla 27°C’de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Bu ortamlarda inkübe edilen izolatlar, aerial misel rengi, batık misel rengi ve difüze pigment rengi açısından makroskobik olarak incelenmiştir. İzolatların melanin pigment üretimi Melanin Formasyon Ortamı kullanılarak incelenmiştir (Denizci 1996).

3.2.6 Fermantasyonla Antimikrobiyal Etkili Molekülün Üretimi

Antimikrobiyal aktiviteleri olduğu saptanan izolatlar arasından seçilen AA32 ve AA33’ün fermantasyonla antimikrobiyal etkili maddelerinin üretiminin belirlenmesi için farklı fermantasyon ortamları (Gliserol Yeast Broth, ve Fermantasyon Ortamı A) kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri sporulasyon, inokulum ve fermantasyon olmak üzere başlıca üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süresince izolatların antimikrobiyal madde üretimi ve biomas’ın inkübasyon süresince değişimi yaş ağırlık metodu kullanılarak belirlenmiştir (Denizci 1996).

3.2.6.1 Sporulasyon

Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmaların Malt Agarda taze kültürleri hazırlanmış, bu ortamda aktif hale geçmesi ve sporulasyona girmesi için 5-7 gün 28°C’de inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda izolatlar inokulum ortamını aşılama için kullanılmıştır (Denizci 1996).

3.2.6.2 İnokulum Hazırlanması

İçinde 100’er ml fermantasyon ortamı bulunan 250 ml’lik erlenlere bir öze dolusu spor aşılandıktan sonra çalkalamalı etüvde (N-BİOTEK.INC NB-205) 28°C’de 200rpm’de (devir/dakika) 3 gün boyunca inkübe edilerek fermantasyon ortamının aşılmasında kullanılmışlardır (Ohkuma et al. 1992).

3.2.6.3 Fermantasyon

Fermantasyon, 250 ml olarak hazırlanmış fermantasyon ortamlarına, inokulumdan %5 (v/v) oranında aşı ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Erlenler çalkalamalı etüvde 28°C’de 200 devir/dakika çalkalama hızında 168 saat süreyle çalkalanarak inkübe edilmişlerdir (Ohkuma et al. 1992).

3.2.7 Fermantasyon Sıvısında Antimikrobiyal Etkinin Saptanması

Staphylococcus aureus ATCC 25923 ve *E.coli* ATCC 25922 test organizmaları, Nutrient Broth’da 37°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve 0.5 McFarland bulanıklılık antimikrobiyal etkinin saptanmasında kullanılmıştır. Ekim için steril eküvyon çubuğu kullanılarak sıvı kültürdeki test organizmalarından Nutrient Agar üzerine birbirini kesen zig zag’lı çizgiler çekerek her tarafa homojen bir şekilde yayılmak suretiyle ekim yapılmıştır. Ekimleri yapıldıktan sonra agar üzerinde 6mm çapında çukurlar açılmış ve her bir çukura 400 µl fermantasyon ortamı olarak kullanılan besiyeri yüklenmiştir. Petriler 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda oluşan

inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek antimikrobiyal aktivite incelenmiştir (Augustine 2005).

3.2.8 Antimikrobiyal Etkili Molekülün İzolasyonu

AA32 ve AA33'ten ham madde ekstraksiyonu, solvent ekstraksiyonu ile, etken maddelerin tespiti ise ince tabaka kromatografisi, biyootogram, UV spektrofotometre ve kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1 Solvent Ekstraksiyonu

Fermantasyon ortamında üreyen izolatlar Whatman filtre kağıdı kullanılarak uzaklaştırıldıktan sonra 150 ml çözücü (metilen klorit, n-butanol ve hegzan) 250 ml fermantasyon sıvısı ile birlikte bir gün süreyle çalkalanmıştır. Bu işlem sonunda erlenler bir süre bekletilmiş ve yoğunlukları farklı olan fermantasyon sıvısı ile çözücünün birbirinden ayrıldığı görülmüştür. Hegzan ve n- butanol fermantasyon sıvısının üstünde yer alırken metilen klorit altta kalmıştır. Ayırma hunisi yardımıyla iki sıvı birbirinden ayrılmış ve çözücü ile fermantasyon sıvısı ayrı kaplarda toplanmıştır.

Hegzan, n- butanol ve metilen klorid fazları ayrı ayrı evaporatörde (Heidolph 2) 40°C sıcaklıkta yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılmış ekstratlar 37°C'de 3-4 gün tutularak katı ekstrakt elde edilmiştir. Bu ekstraktlar ince tabaka ve kolon kromatografilerinde kullanılmıştır (Zitouni et al. 2005).

3.2.8.2 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Uygun Solvent Sisteminin Belirlenmesi

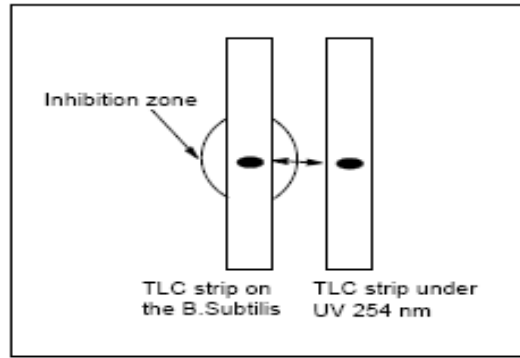
Aktivite gösteren solvent fazlarında çözünen moleküllerin kromatografik ayırma ve inceleme işlemlerinde, ince tabaka kromatografisi için silica jel (Merck 5554) ve solvent sistemi olarak da aşağıda belirtilen sistemler kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile maddeler solvent sistemlerinde yürütüldükten sonra %0.2'lik asetonik ninhidrin ile spreylenerek bantlar görünür hale getirilmiş ve aktif molekülün peptit yapıda olup

olmadığı saptanmıştır. Peptit yapısındaki bantların R_f değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca her bir bant TLC üzerinden kazınarak UV spektradaki maksimum absorbans değerleri belirlenmiştir (Denizci 1996).

Kloroform: Metanol	8:2
Kloroform: Metanol: Su	6.5:3:1
n-Butanol: Asetikasit: Su	6:2:2
Etilasetat: Metanol: Su	40:5.4:5

3.2.8.3 Biyootogram

İçerisinde Nutrient Agar bulunan petrilere, TLC plakları, bantlı yüzeyi dışa bakacak şekilde yerleştirildikten sonra 24 saatlik taze kültürleri hazırlanmış olan *S.aureus* ATCC 25923 test organizması yarı katı Nutrient Agara eklenerek plak yüzeyini kaplayacak şekilde dökülmüştür. 37°C’de 24 saat inkübasyon sonunda petrilere MTT solüsyonu ile spreylenecektir. MTT solüsyonu canlı kalan bakterileri pembe renge boyarken antimikrobiyal aktivitenin bulunduğu ve bakteri üremesinin olmadığı bölgede zon oluşumu gözlenmiştir (Lund et al. 1975). Şekil 3.1’de biyootogram sonucu oluşan zon alanı görülmektedir (Tianjin 2003) .



Şekil 3.1 Biyootogram Sonucu Oluşan Zon Alanları (Tianjin 2003)

3.2.8.4 Kolon Kromatografisi ve UV Spektrofotometre

Solvent ekstraksiyonu sonucu elde edilen ham ekstraktan 0.2 gr tartılıp 1 ml suda çözdükten sonra 3500 g'de 2 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu ham ekstrakt sefakril (S 200) kolonda n-butanol:asetik asit:su (6:2:2) içeren solvent sistemi kullanılarak saatte 4.5ml (4.5ml h^{-1}) akış hızında yürütülerek 1.5 ml'lik 52 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların tamamı UV spektrofotometrede (TU-1880 Double Beam) okunarak ölçümleri yapılmış ve pik değerleri belirlenmiştir. Aktivite gösteren fraksiyonlar TLC'de yürütülerek R_f değeri belirlenen bölge kazınarak aktif madde izolasyonu yapılmıştır (Denizci 1996).

4. BULGULAR

4.1 İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi

Afyonkarahisar ilinin 7 farklı bölgesinden alınan toprak örneklerinden, farklı koloni morfolojisine sahip 52 Actinomycet suşu izole edilmiştir. Sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 İzolasyon Bölgelerine Göre Antimikrobiyal Aktivite Oranları

Örnek Alınan Bölge	İzolat Sayısı	Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolat Sayısı
Akarçay	4 (%7.60)	1 (%25.00)
Ataköy	12 (%23.0)	10 (%83.30)
Gümüşkent	5 (%9.60)	3 (%60.00)
Devlet Parkı	5 (%9.60)	2 (%40.00)
Hıdırlık	6 (%11.50)	2 (%33.30)
ANS	18 (%34.60)	10 (%55.50)
Özdilek	2 (%3.80)	1 (%50.00)
Toplam	52	29 (%55.70)

En fazla izolasyon ANS kampüsünden 18 izolatla (%34.6) elde edilmiştir. Bunu Ataköy 12 (%23) ve Hıdırlık 6 (%11.5) izolatla takip etmiştir. İzolatların 29’unun (%55.7) antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. En fazla izolasyon ANS kampüsünden olmasına karşın en fazla antimikrobiyal aktivite gösteren bölge %83.3 ile Ataköy olmuştur. İzole edilen 52 farklı suşun Gram(+) ve Gram(-) bakteriler ile mayalara karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş olup sonuçlar çizelge 4.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2 Afyonkarahisar İlinden İzole Edilen Actinomycet’lerin Antimikrobiyal Aktiviteleri (mm)

TEST ORG. İZOLAT	<i>Salmonella</i> <i>enteriditis</i>	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeuoginosa</i> ATCC 27853	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>	<i>Candida</i> <i>albicans</i>	<i>Stphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923
KA1	-	-	-	-	-	-	-
KA 2	-	-	-	-	-	-	-
KA 3	-	-	2	-	-	-	-
KA 4	-	-	2	-	-	-	4
KA 5	-	-	-	-	-	-	-
KA 6	-	-	-	-	-	-	-
KA 7	1	-	-	-	-	-	3
KA 8	-	-	-	-	-	2	4
KA 9	-	-	-	-	-	-	-
KA 10	-	-	-	2	-	-	12
KA 11	-	-	3	5	-	-	12
AA12	-	-	-	-	-	-	-
DA13	-	-	-	-	-	-	-
GA14	6	-	-	-	-	-	3
ÖA15	-	-	-	-	-	-	4
AA16	-	-	-	-	-	2	4
AA17*	5	-	-	-	-	-	3
AA18	-	-	-	-	-	-	-
AA19	3	-	4	-	-	-	4
AA20	-	-	-	-	-	-	7
AA21*	-	1	-	14	-	-	-
DA22	-	-	-	-	-	-	-
DA23	-	-	-	-	-	-	-
DA24	-	-	-	-	-	-	4

DA25	4	-	-	-	-	-	7
GA26	-	-	-	-	-	-	-
GA27	3	-	5	2	-	-	-
GA28	-	-	-	-	-	-	-
GA29	-	-	-	-	-	-	6
AA30	2	-	-	-	-	-	4
AA31	-	-	4	-	-	-	2
AA32	-	5	5	7	4	-	23
AA33	-	7	5	5	5	2	22
AA34	20	-	-	-	-	2	2
KA35	-	-	-	-	-	-	-
KA36	2	-	-	-	-	-	6
KA37	-	-	12	2	-	-	20
KA38	-	-	-	-	-	-	-
KA39	2	-	-	-	-	4	-
KA40	-	3	8	-	-	-	-
KA41	-	-	-	-	-	-	-
ÇA42	-	-	-	-	-	-	-
ÇA43	-	-	-	-	-	-	-
ÇA44	-	-	-	-	-	-	-
ÇA45	3	-	2	6	-	-	-
ÖA46	-	-	-	-	-	-	-
HA47	-	-	-	-	-	-	-
HA48	-	-	-	-	-	-	-
HA49	-	-	-	4	-	-	9
HA50	5	-	6	-	-	-	1
HA51	-	-	-	-	-	-	-
HA52	-	-	-	-	-	-	-

AA: Ataköy izolatlari, , ÇA: Akarçay izolatlari, DA: Devlet Parki izolatlari, GA: Gümüşkent izolatlari

HA: Hıdırlık izolatlari, KA: ANS izolatlari, ÖA: Özdilek izolatlari

* Termofilik Actinomycet türleri

Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların %46.1'i Gr(-)'lere, %44.2'si Gr(+) 'lere, %9.6'sı mayalara karşı etkin iken %9.6'sı hem antibakteriyal hem de antifungal aktivite göstermiştir. İzolatlar %44.2 ile en fazla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e etkili olup bunu *Salmonella enteriditis* (%23), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (%23), *E.coli* (%19.2), *C.albicans* (% 9.6), *Klebsiella pneumoniae* (%7.6) ve *Proteus vulgaris* (%3.8) takip etmiştir. En fazla antimikrobiyal etkiye sahip olan suşlar AA32, AA33 ve KA11 olarak saptanmıştır. Termofilik izolatlardan AA17 *Salmonella enteriditis* ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e, AA21 ise *Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli* ATCC 25922'ye karşı etkili bulunmuştur. İnhibisyon zonuna bakıldığında her üç izolatta Gr(+) bakterilere karşı Gr(-)'lere oranla daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir. AA33 izolatının AA32 ve KA11'den farklı olarak *C.albicans*'ın üremesini inhibe ettiği görülmüştür (Çizelge 4.2).

4.2 Kültürel ve Morfolojik Özelliklerin İncelenmesi

İzolatların kültürel ve morfolojik özellikleri saptanmış ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 İzolatların Kültürel ve Morfolojik Özellikleri

AA32 Ortam	Üreme	Aerial misel rengi	Batık misel Rengi	Çözünür pigment rengi
Gliserol Yeast Agar	++	Krem	Kahverengi	-
ISP 2	+	Sarı	Sarı	-
ISP 4	+ + +	Sarı-Krem	Sarı	Sarı
ISP 5	+ +	Sarı-Beyaz	Sarı- Krem	-
ISP 7	++	Sarı- Beyaz	Sarı	-
Sakkaroz Nitrat Agar	++	Beyaz	Beyaz	-
Glukoz Asparajin Agar	+ + +	Sarı- Beyaz	Sarı- Krem	-
Gliserol Nitrat Agar	++ +	Beyaz	Kahverengi	-
Glukoz Nitrat Agar	+ + +	Krem	Krem	-
Nutrient Agar	++	Sarı- Beyaz	Sarı	-
Malt Agar	+ + +	Beyaz-Krem	Kahverengi	Kahverengi
Melanin	+++	Koyu Krem	Kahverengi	Kahverengi

Formasyon				
AA33				
Gliserol Yeast Agar	++	Sarı-Krem	Turuncu	-
ISP 2	+++	Sarı	Sarı	-
ISP 4	+++	Sarı-Krem	Sarı	Sarı
ISP 5	+++	Sarı	Sarı	-
ISP 7	+++	Krem	Sarı	-
Sakkaroz Nitrat Agar	++	Beyaz	Beyaz	-
Glukoz Asparajin Agar	+++	Krem	Beyaz	-
Gliserol Nitrat Agar	+++	Krem	Krem-Kahve	-
Glukoz Nitrat Agar	+++	Krem	Krem-Kahve	-
Nutrient Agar	++	Beyaz	Açık sarı	-
Malt Agar	+++	Sarı-Krem	Kahverengi	Kahverengi
Melanin Formasyon	+++	Koyu Krem	Kahverengi	Kahverengi
KA11				
Gliserol Yeast Agar	+	Beyaz	-	-
ISP 2	+	-	-	-
ISP 4	++	Beyaz	Krem	-
ISP 5	+++	Krem	Krem	-
ISP 7	+++	Pembe	Krem	-
Sakkaroz Nitrat Agar	++	Beyaz	Beyaz	-
Glukoz Asparajin Agar	++	Beyaz	Krem	-
Gliserol Nitrat Agar	+++	Beyaz	Kahverengi	-
Glukoz Nitrat Agar	+++	Krem	Kahverengi	-
Nutrient Agar	+	Beyaz	Krem	-
Malt Agar	+++	Krem-Yeşil	Kahverengi	-
Melanin Formasyon	+++	Koyu Krem	Kahverengi	Kahverengi

(-) Üreme yok

(+) Üreme zayıf

(++) Üreme iyi

(+++) Üreme çok iyi

AA33 numaralı izolatın 12 farklı besiyerindeki aerial misel, batık misel ve çözünür pigment rengi incelendiğinde ISP 2 ve ISP 5’de aerial misel ve batık misel renginin sarı olduğu, ISP 4’de sarı, Malt Agar ve Melanin Formasyon Ortamında kahverengi çözünür pigment oluşturduğu saptanmıştır. İzolatın Gliserol Yeast Agarda batık misel renginin turuncu olduğu görülmüştür. İzolatın 12 besiyerinde 10 farklı renk grubu oluşturduğu saptanmıştır. İzolat Gliserol Yeast Agar, Sakkaroz Nitrat Agar ve Nutrient Agar dışındaki diğer besiyerlerinde çok iyi (+++) üreme gösterirken bu besiyerlerinde üreme iyi (++) olarak tespit edilmiştir.

AA32 izolatı Gliserol Yeast Agar ve Malt Agarda kahverengi batık misel oluştururken ISP 2, ISP 4, ISP 7, ve Nutrient Agarda ise sarı renkli batık misel oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca ISP 4’de sarı, Malt Agarda ise kahverengi çözünür pigment gözlenmiştir. Kullanılan besiyerlerinde 9 farklı renk grubu saptanmıştır. İzolatın en az üreme gösterdiği besiyeri ISP 2 olarak tespit edilmiştir.

KA11 numaralı izolatın batık misel rengi ISP 4, ISP 5, ISP 7, Glukoz Asparajin Agar ve Nutrient Agarda krem, Gliserol Nitrat Agar, Glukoz Nitrat Agar ve Malt Agarda kahverengi olarak saptanmıştır. ISP 7’de aerial misel rengi pembe, Malt Agarda ise krem-yeşil olarak tespit edilmiştir. İzolat hiçbir besiyerinde çözünür pigment oluşturmamıştır. KA11 numaralı izolatın 12 besiyerinde 7 farklı renk grubu oluşturduğu saptanmıştır. İzolat, Gliserol Yeast Agar, ISP 2 ve Nutrient Agarda zayıf üreme gösterirken ISP 5, ISP 7, Gliserol Nitrat Agar, Glukoz Nitrat Agar ve Malt Agarda çok iyi üreme gözlenmiştir.

AA32 ve AA33 izolatlarının ISP 4 ve Malt Agarda oluşturdukları çözünür pigment renklerinin aynı olduğu gözlenmiştir. Her üç izolatta Melanin Formasyon Ortamında aerial misel, batık misel ve difüze pigment rengi olarak aynı sonuçları vermiştir (Çizelge 4.3)

4.3 Biyokimyasal ve Fizyolojik Özelliklerin İncelenmesi

İzolatların biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri saptanmış ve elde edilen sonuçlar çizelge 4.4- 4.6’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.4 AA32 No’lu İzolatın Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikler

Ortam	Karakter	Ortam	Karakter
İnhibitörler		Biyokimyasal özellikleri	
Kristal viole (0.0001gr)	-	Nişasta hidrolizi	+
Fenol (0.1gr)	-	Lipit hidrolizi	+
Sodyum azid(0.01gr)	-	Jelatin hidrolizi	-
Sodyum azid (0.02gr)	-	Katalaz testi	+
Sodyum klorit %4	-	Hidrokarbonların parçalanması	+
Sodyum klorit %7	-	Melanin üretimi(ISP 11)	+++
Sodyum klorit %10	-	Tirozinin parçalanması	+
Sodyum klorit %13	-	Antimikrobiyal aktivite	
Penisilin G inhibisyonu	+	<i>Salmonella enteriditis</i>	-
Yetiştirme Sıcaklıkları		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
10°C	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+
27°C	+	<i>Proteus vulgaris</i>	+
37°C	+	<i>E.coli</i> ATCC 25922	+
45°C	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+
Karbon kaynakları kullanımı		<i>Candida albicans</i>	-
Glukoz	+++		
Laktoz	++		
Sukroz	++		
Gliserol	+++		
İnozitol	++		
Galaktoz	+++		
Fruktoz	++		
Mannitol	+++		
C Kaynaksız	-		
Azot kaynaklarının kullanımı			
KNO ₃	+++		
L-Asparagin	+++		
DL-Alanin	+++		
L-Tirozin	+++		

L-Histidin	+++		
L-Glutamin	+++		
Glisin	+++		
N Kaynaksız	-		

(+) Var (-) Yok

Çizelge 4.5 AA33 No'lu İzolatın Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri

Ortam	Karakter	Ortam	Karakter
İnhibitörler		Biyokimyasal özellikleri	
Kristal viole (0.0001gr)	-	Nişasta hidrolizi	+
Fenol (0.1gr)	-	Lipit hidrolizi	+
Sodyum azid(0.01gr)	-	Jelatin hidrolizi	+
Sodyum azid (0.02gr)	-	Katalaz testi	+
Sodyum klorit %4	++	Hidrokarbonların parçalanması	+
Sodyum klorit %7	-	Melanin üretimi	+++
Sodyum klorit %10	-	Tirozinin parçalanması	+
Sodyum klorit %13	-	Antimikrobiyal aktivite	
Penisilin G inhibisyonu	-	<i>Salmonella enteriditis</i>	-
Yetiştirme Sıcaklıkları		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
10°C	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+
27°C	+	<i>Proteus vulgaris</i>	+
37°C	+	<i>E.coli</i> ATCC 25922	+
45°C	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+
Karbon kaynakları kullanımı		<i>Candida</i>	+
Glukoz	+++		
Laktoz	++		
Sukroz	++		
Gliserol	+++		
İnozitol	++		
Galaktoz	+++		
Fruktoz	++		
Mannitol	+++		
C Kaynaksız	-		
Azot kaynaklarının kullanımı			
KNO ₃	+++		
L-Asparagin	+++		
DL-Alanin	+++		
L-Tirozin	+		
L-Histidin	+++		

L-Glutamin	+++		
Glisin	+++		
N-Kaynaksız	-		

(+) Var (-) Yok

Çizelge 4.6 KA11 No’lu İzolatın Biyokimyasal ve Fizyolojik Özellikleri

Ortam	Karakter	Ortam	Karakter
İnhibitörler		Biyokimyasal özellikleri	
Kristal viole (0.0001gr)	-	Nişasta hidrolizi	+
Fenol (0.1gr)	-	Lipit hidrolizi	+
Sodyum azid(0.01gr)	-	Jelatin hidrolizi	+
Sodyum azid (0.02gr)	-	Katalaz testi	+
Sodyum klorit %4	-	Hidrokarbonların parçalanması	+
Sodyum klorit %7	-	Melanin üretimi	+
Sodyum klorit %10	-	Tirozinin parçalanması	+
Sodyum klorit %13	-	Antimikrobiyal aktivite	
Penisilin G inhibisyonu	-	<i>Salmonella enteriditis</i>	-
Yetiştirme Sıcaklıkları		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
10°C	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+
27°C	+	<i>Proteus vulgaris</i>	-
37°C	+	<i>E.coli</i> ATCC 25922	+
45°C	-	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+
Karbon kaynakları kullanımı		<i>Candida albicans</i>	-
Glukoz	+++		
Laktoz	++		
Sukroz	++		
Gliserol	+++		
İnozitol	+++		
Galaktoz	+++		
Fruktoz	+		
Mannitol	+++		
C kaynaksız	-		
Azot kaynaklarının kullanımı			
KNO ₃	+++		
L-Asparagin	+++		
DL-Alanin	+++		
L-Tirozin	+		
L-Histidin	+++		
L-Glutamin	+++		

Glisin	+++		
N Kaynaksız	-		

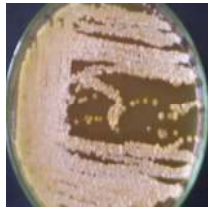
(+) Var (-) Yok

AA32 numaralı izolat penisilin dışında diğer bütün inhibitör ortamlarda inhibe olmuştur. Maksimum üreme 27°C'de gözlenirken izolatın 37°C'de de üreyebildiği belirlenmiştir. Sıcaklık 10°C'ye düşürüldüğünde ve 45°C'ye çıkarıldığında ise üreme saptanmamıştır. İzolat karbon kaynağı olarak glukoz, galaktoz, mannitol ve gliserol bulunan ortamlarda daha iyi üreme göstermiştir. Ortama eklenen tüm azot kaynaklarında üremenin iyi olduğu saptanmıştır. İzolatın Melanin Formasyon Ortamında kuvvetli melanin üretimi yaptığı, jelatin hidrolizi dışında tüm biyokimyasal aktivitelere sahip olduğu ve hidrokarbonları parçaladığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).

AA33'ü kristal viole, fenol ve sodyum azid'in inhibe ettiği saptanmıştır. %7 ve üzerindeki sodyum klorit konsantrasyonlarının AA33 izolatının üremesini inhibe ettiği ancak %4'lük sodyum klorit konsantrasyonunda izolatın üreyebildiği belirlenmiştir. Maksimum üreme sıcaklığı 27°C olarak tespit edilmiştir. 37°C'de üreyebilen izolat sıcaklık 10°C'ye düşürüldüğünde ve 45°C'ye çıkarıldığında üreme saptanmamıştır. İzolatın karbon kaynağı olarak glukoz, gliserol, galaktoz ve mannitol bulunan ortamlarda, diğer karbon kaynakları bulunan ortamlara göre daha fazla ürettiği tespit edilmiştir. L-tirozin dışındaki diğer azot kaynaklarında iyi üreme gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan testlerde bütün biyokimyasal aktivitelere sahip olduğu ve kuvvetli melanin ürettiği saptanmıştır (Çizelge 4.5).

KA11'i bütün inhibitör ortamların inhibe ettiği belirlenmiştir. AA32 ve AA33 izolatlarında olduğu gibi KA11'de de 27°C ve 37 °C'de üreme gözlenirken 10°C ve 45°C'de üreme saptanmamıştır. İzolatın karbon kaynağı olarak glukoz, gliserol, galaktoz, mannitol ve inozitol bulunan ortamlarda diğer karbon kaynaklarına göre daha iyi ürettiği ve fruktozda üremenin en az olduğu tespit edilmiştir. KA11 izolatı azot kaynaklarından sadece L-tirozinli ortamda en az gelişim gösterirken azot kaynağı bulunmayan ortamda üreme gözlenmemiştir. İzolatın, besiyerinde zayıf melanin üretmi yaptığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

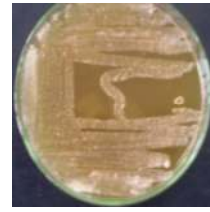
Her üç izolatta karbon kaynağı olarak glukoz, galaktoz, mannitol ve gliserol bulunan ortamlarda iyi gelişim göstermişlerdir. Azot kaynaklarından L-tirozini ise sadece AA32 izolatu kuvvetli şekilde kullanmıştır. Biyokimyasal testlerde melanin üretimi kuvvetli olan izolatlar olarak AA32 ve AA33 belirlenirken KA11 izolatu zayıf melanin üretimi göstermiştir. Ayrıca AA32'nin jelatin hidrolizi yapmadığı saptanmıştır. İzolatların Farklı besiyerlerindeki gelişimleri ve hif yapısı şekil 4.1-4.12'de gösterilmiştir.



AA33

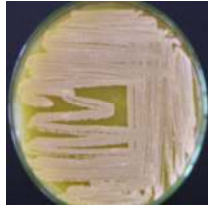


AA32



KA11

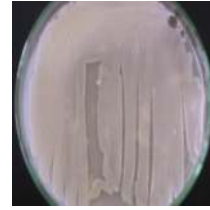
Şekil 4.1 İzolatların Gliserol Yeast Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33



AA32

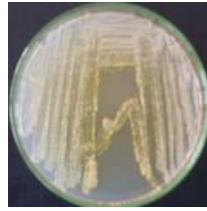


KA11

Şekil 4.2 İzolatların ISP 4 Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33



AA32



KA11

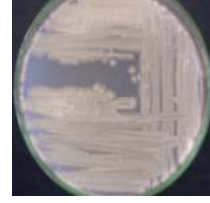
Şekil 4.3 İzolatların ISP 5 Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33



AA32



KA11

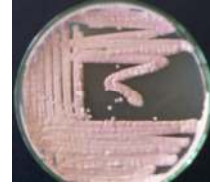
Şekil 4.4 İzolatların Sakaroz Nitrat Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33

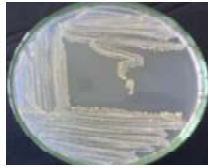


AA32

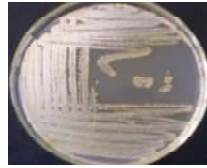


KA11

Şekil 4.5 İzolatların ISP 7 Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33

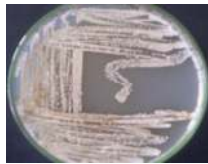


AA32

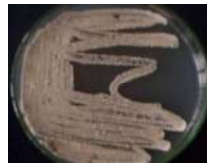


KA11

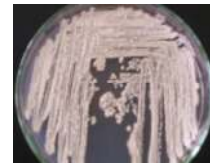
Şekil 4.6 İzolatların Glukoz Asparajin Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33

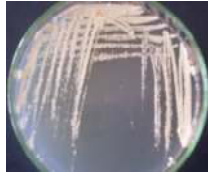


AA32

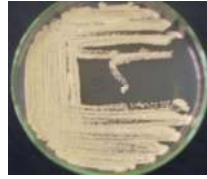


KA11

Şekil 4.7 İzolatların Gliserol Nitrat Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33

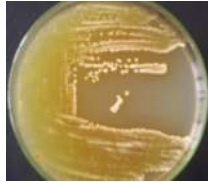


AA32



KA11

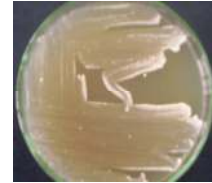
Şekil 4.8 İzolatların Glukoz Nitrat Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33



AA32



KA11

Şekil 4.9 İzolatların Nutrien Agar Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33

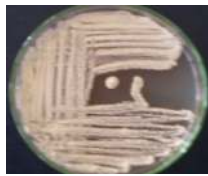


AA32



KA11

Şekil 4.10 İzolatların Malt Agar Ortamında 7 Günde Gelişim



AA33



AA32



KA11

Şekil 4.11 İzolatların Melanin Formasyon Ortamı Ortamında 7 Günde Gelişimi



AA33



AA32



KA11

Şekil 4.12 İzolatların Spor Zincir Morfolojisi

İzolatların hifa yapısı dallanmış, septasız olarak belirlenmiş ayrıca sporların oval olduğu saptanmıştır.

4.4 Fermantasyonla Antimikrobiyal Etkili Moleküllerin Üretimi

Fermantasyon süresince AA32 ve AA33'ün antimikrobiyal etkili moleküllerinin belirlenmesinde test organizmaları olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Altı gün süresince ölçülen zon çapları çizelge 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

İzolatların yaş ağırlıkları ise besiyeri Gliserol Yeast Broth (Fermantasyon ortamı 1), ISP 2 (Fermantasyon ortamı 2) ve Fermantaston Ortamı A'da (FOA) yedi gün boyunca günde iki kez belirli aralıklarla ölçülmüş olup sonuçlar çizelge 4.9, 4.10'da ve grafik 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 AA32 ve AA33 Numaralı İzolatların Farklı Besiyeri Ortamlarında Antibiyotik Üretimi (Zon çapı mm) (*Staphylococcus aureus*)

SAAT Ortam	0	20	24	43	48	67	72	91	96	115	120	139	144
İZOLAT AA32													
GYB	-	-	12	15	16	16	17	13	10	-	-	-	-
FOA	-	20	20	23	24	25	25	24	24	24	18	16	15
İZOLAT AA33													
GYB	-	-	12	14	15	18	13	13	12	11	10	-	-
FOA	-	16	17	18	18	19	20	21	21	20	18	17	15

GYB; Gliseol Yeast Broth, FOA; Fermantasyon Ortamı A

Staphylococcus aureus ile yapılan denemelerde AA32 ve AA33 numaralı izolatlarda antimikrobiyal madde üretimi Fermantasyon Ortamı A'da 20.saatte başlarken Gliserol Yeast Broth'da ise 24. saatte başlamıştır. AA32 numaralı izolatın en yüksek inhibisyon zonu Fermantasyon Ortamı A'da 67.ve 72.saatlerde 25 mm ve AA33 numaralı izolatta ise Fermantasyon Ortamı A'da 91. ve 96.saatlerde 21 mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8 AA32 ve AA33 Numaralı İzolatların Farklı Besiyeri Ortamlarında Antibiyotik Üretimi (Zon çapı mm) (*Escherichia coli*)

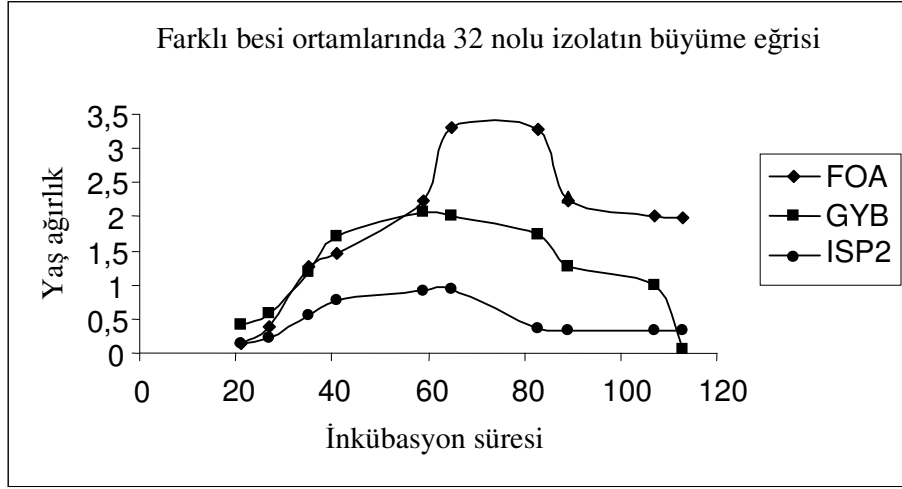
SAAT Ortam	0	20	24	43	48	67	72	91	96	115	120	139	144
İZOLAT AA32													
GYA	-	-	18	18	19	21	16	13	11	-	-	-	-
FOA	-	12	15	18	19	20	23	25	24	21	11	10	5
İZOLAT AA33													
GYA	-	-	13	14	12	11	9	5	-	-		-	-
FOA	-	12	17	17	18	18	23	26	30	25	21	20	11

Test organizması olarak *Esheria coli* kullanılan deneylerde her iki izolattada antimikrobiyal madde üretimi Fermantasyon Ortamı A'da 20.saatte, Gliserol Yeast Broth'da ise 24.saatte başlamıştır. En yüksek inhibisyon zonu AA32 numaralı izolatta Fermantasyon Ortamı A'da 91.saatte 25mm olarak ve AA33 numaralı izolatta ise Fermantasyon Ortamı A'da 96. saatte 30mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.9 Farklı Besiyeri Ortamlarında 32 Numaralı İzolatın Yaş Ağırlık Ölçümleri (gr/100ml)

Zaman(Saat)	FO1(GYB)	FO2 (ISP 2)	FOA
21	0.40	0.15	0.15
27	0.59	0.23	0.39
35	1.18	0.54	1.27
41	1.70	0.77	1.45
59	2.08	0.92	2.23
65	2.00	0.94	3.32
83	1.73	0.37	3.28
89	1.28	0.34	2.24
107	1.00	0.32	2.00
113	0.05	0.32	1.99

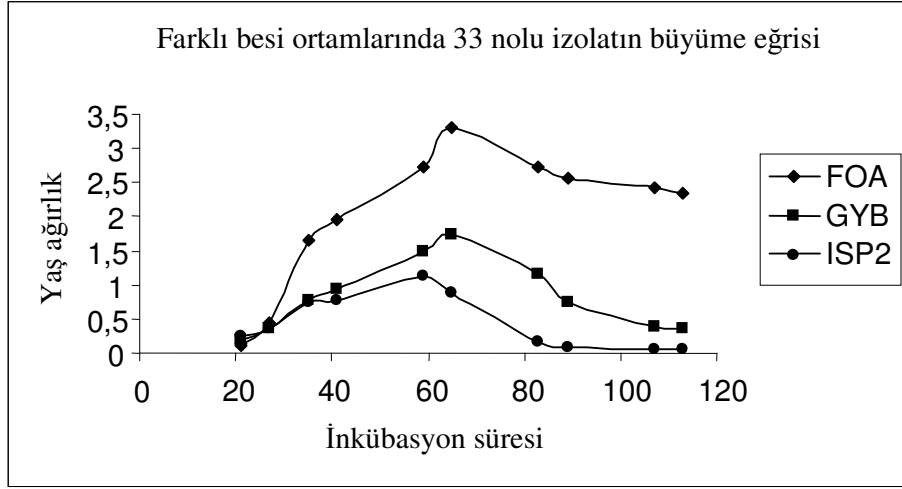
FOA; Fermantasyon Ortamı A, FO1; Gliserol Yeast Broth FO2; ISP 2



Çizelge 4.10 Farklı Besiyeri Ortamlarında 32 Numaralı İzolatın Büyüme Eğrisi

Çizelge 4.11 Farklı Besiyeri Ortamlarında 33 Numaralı İzolatın Yaş Ağırlık Ölçümleri (gr/100ml)

Zaman(Saat)	FO1 (GYB)	FO2 (ISP 2)	FOA
21	0.19	0.26	0.11
27	0.35	0.35	0.44
35	0.77	0.74	1.65
41	0.93	0.76	1.95
59	1.49	1.14	2.74
65	1.75	0.89	3.32
83	1.15	0.16	2.74
89	0.75	0.07	2.55
107	0.38	0.06	2.43
113	0.35	0.05	2.34



Çizelge 4.12 Farklı Besiyeri Ortamlarında 33 Numaralı İzolatın Büyüme Eğrisi

Yaş ağırlık tayininde AA32 numaralı izolat için en yüksek değer FOA’da 3.32 g/100 ml ile 65.saatte, AA33 numaralı izolat için ise FOA’da 3.32 g/100ml ile yine 65.saatte ölçülmüştür. Ağırlık artışı en çok FOA’da tespit edilmiştir. Her iki suş için en az ağırlık artışı FO2’de görülmüştür (Çizelge 4.9, 4.10).

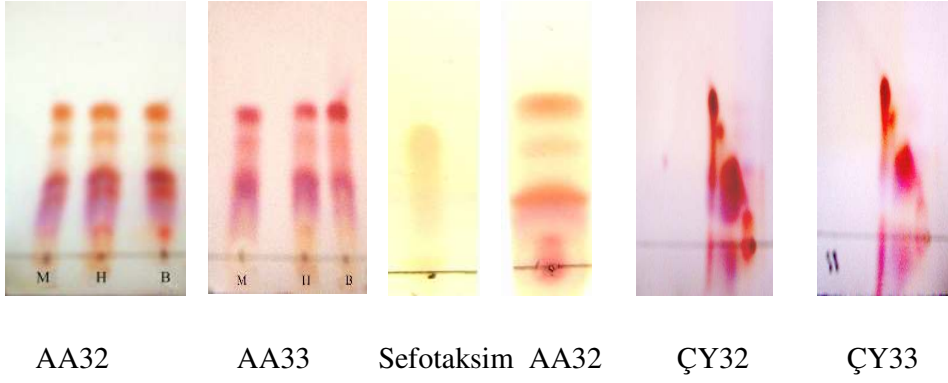
4.5 Antimikrobiyal Etkili Aktif Moleküllerin İzolasyonları

Fermantasyon Ortamı A’da hazırlanan fermantasyon ortamı sonucunda izolatların ürettiği antimikrobiyal etkili aktif molekülün ekstraksiyonu 3 farklı solvent ile yapılmış ve antimikrobiyal aktivite *Candida albicans*, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 test organizmaları kullanılarak zon çapları ölçülmüştür. Sonuçlar çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 AA32 ve AA33 Numaralı İzolatların Farklı Çözgenlerle Ekstraksiyonu
(mm inhibisyon zon çapı)

Test organizması	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Candida albicans</i>
Çözücü			
İZOLAT AA32			
Metilen Klorid	10	6	-
Butanol	12	9	-
Hegzan	-	-	-
İZOLAT AA33			
Metilen Klorid	-	-	-
Butanol	11	9	9
Hegzan	-	-	-

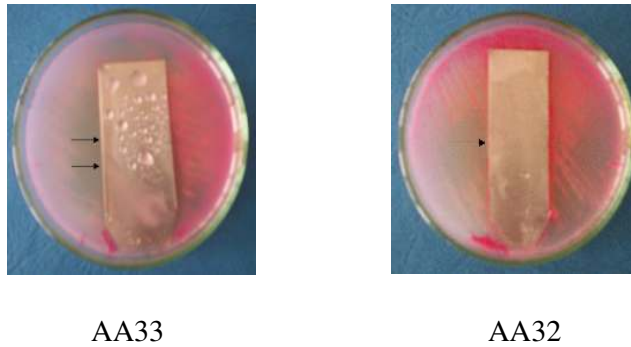
Elde edilen ekstraktlar en iyi su ve DMSO'da (Dimetil sülfoksit) çözülmüştür. Ham ekstrakt n-Butanol: Asetik Asit: Su (6:2:2) solvent sistemi kullanılarak ince tabaka kromatografisinde muamele edilmiştir. İzolatlar TLC' de yürütüldükten sonra ninhidrin püskürtülmesi sonucunda AA32 numaralı izolatta beş bant belirlenirken AA33 numaralı izolatta 4 bant tespit edilmiştir. Üç farklı çözücünden elde edilen ekstraktlardan oluşan bantlar Şekil 4.13.'de gösterilmiş ve bantlar sefotaksim ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15)



Şekil 4.13 İzolatların TLC' de Oluşan Görüntüleri

Yürütülüp Ninhidrin Püskürtülmesiyle Gözlenen Bantlar ve Sefotaksimle karşılaştırılması, Çift Yönlü Yürütme(ÇY) (M: Metilen klorid, H: Hegzan ve B: n-Butanol).

TLC'de bantlar görünür hale getirildikten sonra R_f değerleri hesaplanmıştır. AA32 izolatının 3.bandı ile AA33 numaralı izolatın 2. bandı ve AA32'nin 5. bandı ile AA33'ün 4. bandının R_f değerleri aynı çıkmıştır. İzolatların antimikrobiyal etkili molekülünün tespiti için biyootogramları yapılmıştır. Test organizması olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanılmış olup AA32 numaralı izolatta bir, AA33 numaralı izolatta ise 2 bölge tespit edilmiştir. Bu bölgelerin R_f değerleri hesaplanmış İzolat AA32'de biyootogram sonucunda zon oluşumu 5.bant ($R_{f=}$ 0.527) etrafında, İzolat AA33'de ise 3. ($R_f =$ 0.487) ve 4. bantlar ($R_{f=}$ 0.527) etrafında gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Biyootogram Sonucu Oluşan Zon Alanları

Şekilde görülen pembe alanlar, test organizması üzerine izolatların yürütülmüş olduğu TLC plaklar yerleştirildikten sonra 24 saatlik inkübasyon sonucunda MTT iz tuzlar solüsyonu spreyleneşinden birkaç dakika sonra canlı kalan test organizmasının bulunduğı alanları göstermektedir.

AA32 numaralı izolatın, antimikrobiyal aktivitesi olduğı düşünölen 5. bandı kazınarak kolon kromatografisi sonucu toplanan fraksiyonlarla karşılaştırma yapmak için +4°C’de saklanmıştır. Kazınan bant ile AA32 numaralı izolatın ham ekstraktı tüplere alınıp 1’er ml distile suda çözölüp santrifüj edildikten sonra UV spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.

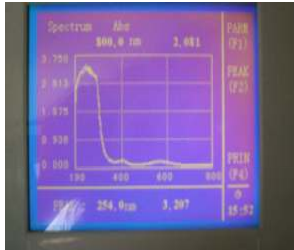
AA32 numaralı izolatın kolon kromatografisi yapılmış ve 1.5 ml’lik tüplerle 52 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan tüm fraksiyonların UV spektrofotometrede ölçümleri yapılmış, ham ekstrakt ve bantla ölçümler karşılaştırılmıştır. Çıkan sonuçlar neticesinde 4-10 arası fraksiyonların disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitelere bakılmış ve hepsinde zon oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.15).



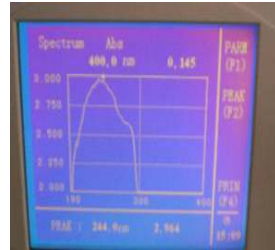
Şekil 4.15. 4-10 Arası Fraksiyonların Oluşturduğu Antimikrobiyal Etki (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)

Çizelge 4.14 İzolatların UV Spektrum ve R_f Değerleri

	Ham Ekstrakt		TLC		6.Fraksiyon	
	R _f	UV	R _f	UV	R _f	UV
AA32	0.179	284				
	0.230	254				
	0.307	245				
	0.408	211				
	0.527	-	0.527	284 254 216	0.527	286 254
AA33	0.256	282				
	0.307	262				
	0.487			282 254 282 256 208		
	0.527					



6.Fraksiyon



5.Bant



AA32 Ham madde

Şekil 4.16 Ham Madde, Kazıntı Bant ve Kolon kromatografisi Sonucu Elde Edilen Maddelerin Pik Değerleri

Çalışmamızda sefotaksimın UV değeri 254 olarak tespit edilmiş olup etken maddemiz ile benzerlik göstermiştir. Ancak sefotaksimın moleköl ağırlığı 455.47 gr/mol iken izolat AA32'den elde edilen etken maddenin ise 467.89 gr/mol olduğu belirlenmiştir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Actinomycet'ler aminoglukozid, makrolit, β -laktam, polien, polieter, tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotik gruplarının üretiminde kullanılırlar (Gupte et al. 2002). Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı sonucunda çoğul dirençli izolatların ortaya çıkması ve yeni patojen organizmaların belirlenmesi, antibiyotik türevlerinin keşfini zorunlu hale getirmektedir. Günümüzde yeni antibiyotikler için yapılan araştırmalar bakteri, Actinomycet, Streptomyces, fungus ve alglerin sekonder metabolitlerinin antimikrobiyal etkisinin incelenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Özellikle toprak mikroorganizması olarak bilinen Actinomycet'ler antimikrobiyal madde üretiminde ilk sırayı almaları ile yeni antimikrobiyal maddelerin belirlenmesi çalışmalarında temel mikroorganizmalar olmuşlardır.

Nakhimovskaia (1937) topraktan izole ettiği 80 Actinomycet kültüründe yaptığı çalışmada 47 tanesinin antogonistik, 27 tanesinin ise aktif madde ürettiğini ve bunların Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğunu saptamıştır. Linder ve Wallhauser (1955) 2500 Streptomyces kültürünün %77'sinin Gram pozitif bakterilere %40'ının gram negatif bakterilere, %32'sinin Mycobacterium ve %18'nin de funguslara etkili olduğunu bildirmişlerdir. En iyi antifungal aktivite ise *Saccharothrix* sp.'lerde görülmüştür. *Saccharothrix* türlerinin *Nocardiosis* genusundan gram pozitiflere karşı daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiş olmasına karşın (Horvath 1954, Isshiki et al.1989, Takeuchi 1992, Wank et al. 2001) gram negatif ve funguslar'a karşı antimikrobiyal etki nadir olarak bildirilmiştir (Lamari et al. 2002). Ouhdouch et al. (2002) Moroccan'dan 320 Actinomycet suşu izole etmişler ve 32 izolatın yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini saptamışlardır. Şahin ve Uğur (2003) 74 Streptomyces izolatının %45.9'unda antimikrobiyal aktivite olduğunu saptamıştır. Özellikle 50 izolat koagülaz (-) Staphylococcus (CoNS) lara karşı kuvvetli antimikrobiyal etki göstermiştir. 5 izolat ise CoNS ve mayalara karşı inhibisyon zonu 20mm üzerinde olan çok kuvvetli antimikrobiyal etki göstermiştir (Şahin ve Uğur 2003).

Çalışmamızda benzer olarak, topraktan izole edilen toplam 52 farklı Actinomycet izolatının 29'unda (%55.7) antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. İzolatların %44.2'si Gram pozitif, %46.1'i Gram negatif bakterilere, %9.62'si *C. albicans*'a ve %9.6'sının ise her üçüne karşı etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca izolatlar %44.2 ile en fazla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e etkili olmuş ve bunu *Salmonella enteriditis* (%23), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (%23), *E.coli* (%19.2), *C.albicans* (%9.6), *Klebsiella pneumoniae* (%7.6) ve *Proteus vulgaris* (%3.8) takip etmiştir.

Kuzey Kanada topraklarından izole edilen 600 Actinomycetin antibiyotik aktivitesi üzerine yapılan çalışmada izole edilen kültürlerin %47'sinin *S.aureus*, %8.2'sinin *E.coli*, %19.5'inin *M.tuberculosis* üzerine etkili olduğu saptanmıştır (Waksman 1967). Başka bir çalışmada Actinomycet izolatlarının %44.5'inde antimikrobiyal etki bulunmuş ve bunlardan 9'u *Bortrytis cinerea*, *Herpes simplex*, *Candida albicans* ve *Staphylococcus epidermis*'e karşı çok yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir (Slavica et al. 2005).

Zitouni et al. (2005) Actinomycet izolatları ile yaptığı çalışmada *Saccharothrix* izolatlarının Gram pozitif bakterilerden *Mycobacterium luteus*'a, mayalardan *S. cerevisia*'e ve funguslardan *M. ramannianus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiğini; gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. fluorescens*'e karşı ise zayıf antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamıştır. Aynı çalışmada *Nocardiopsis* izolatlarının ise *M. luteus*'a karşı kuvvetli antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve bu grupta yer alan suşların *M. ramannianus*'a karşı antifungal aktivitelerinin zayıf ve kuvvetli etki gösterenler olmak üzere başlıca iki gruba ayrıldığını saptamışlardır.

Bu çalışmada, en fazla antimikrobiyal etki gösteren izolatlardan AA33, test mikroorganizmalarından sadece *Salmonella enteriditis* ATCC 25923'ün, AA32 *Salmonella enteriditis* ve *Candida albicans*'ın üremesini inhibe edememektedir. İzolat KA11 ise sadece *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteriditis* ATCC 25923 ve *E.coli* ATCC 25922' nin üremesini inhibe etmiştir.

Birçok Actinomycet türünün renk verici maddeler ve pigmentler ürettiği bilinmektedir. Bu nedenle kültürlerdeki kolonilerin ve aerial hifaların renkleri birbirlerinden farklıdır.

Koloni rengi mavi, menekşe moru, portakal rengi, kırmızı, pembe, sarı, yeşil, gri, siyah vb. olabilir. Genellikle kırmızı pigment üreten türler iplikli miselyal yapı ve küre şeklindeki klamidiosporları ile karakteristiktir. Streptomisin üreten izolatların fermantasyon kültürlerinde rengin yeşilimsi, koyu yeşil ve bazen de pembemsi ve pembemsi gri-kahverengi olduğu gözlenmiştir (Krasil'nikov,1959). Zitouni et al. (2005) kemotaksonomik ve kültürel özelliklerine göre (çözünbilir pigment, aerial misel ve substrat misel rengi) 86 izolatı 12 grupta toplamışlardır.

Çalışmamızda izole edilen 52 Actinomycet izolatının, aerial misel renginin koyu gri, gri, yeşil, sarı, sarı-krem, pembe, pembe-krem, krem, turuncu-gri, mor ve beyaz olduğu görülmüştür.

Actinomycet izolatlarının pigment oluşturmaları kültürel ve fizyolojik koşullara göre değişmektedir. Krasil'nikov (1959) *Actinomyces albus*, *A. vulgaris*, *A. levoris*, *A. griseus*'un protein içeren besiyerinde (Meat-pepton agar vb.) pigment oluşturmadığını, *A. coelicolor*, *Actinomyces cyaneus*, *A. violaceus* ve *A. ruber*'de ise oksijensiz ortamda pigmentasyon gözlenmediğini, dolayısıyla besiyerindeki karbon ve azot kaynağının pigment gelişiminde doğrudan etkili olduğunu bildirmiştir. Nitrojen kaynağı olarak asparajin kullanıldığında *A.cyaneus* renksiz, pepton kullanıldığında ise mavi-gri renktedir. *A.violaceus* ise asparajinli besiyerinde menekşe moru, peptonlu besiyerinde açık kırmızı- menekşe moru renk verir. *Actinomyces viridochromogenes* asparajinli ortamda açık yeşil, peptonlu ortamda ise gri-kahverengi-yeşildir.

Çalışmamızda antimikrobiyal aktivitesi olduğu saptanan KA11 izolatının peptonlu ortamda krem-yeşil, tirozin içeren ortamda ise pembe renk verdiği gözlenmiştir.

Bhattacharyya et al. (1998) fermantasyon ile Streptomyceslerden antimikrobiyal madde üretiminde nitrojen kaynağı olarak arjinin kullanıldığında en iyi verimin alındığını arjinini asparajin, amonyum nitrat, amonyum sülfat ve sodyum nitratın takip ettiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise *S.fraiae*'den sentetik ortamda neomisin üretimi için en iyi azot kaynaklarının sodyum nitrat, α - alanin, L-aspartik asit, L-histidin, L-

prolin ve DL-treonin oluğunu amonyum tuzları ve diğer aminoasitlerin neomisin üretimini desteklemediğini göstermişlerdir (Dulmage 1952).

Antimikrobiyal aktivite gösteren üç izolatomızda KNO₃, L-asparajin, DL-alanin, L-glutamin, ve glisin bulunan ortamlarda kuvvetli üreme gösterirken, AA32 hariç L-tirozin bulunan ortamda üremenin diğer azot kaynaklarına göre daha zayıf olduğu gözlenmiştir.

Azot kaynağının yanı sıra ortamdaki karbon kaynağı da pigmentasyon ve antimikrobiyal madde üretimini etkilemektedir. Karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortamda *A. cyaneus* renksiz iken, sukroz bulunan ortamda koyu mavi, nişastalı ortamda grimsi mavi, sodyum asetatlı ortamda ise kültür renksizdir. Hobbs et al.(1990) *S.coelicolor* tarafından aktinorhodin üretiminde fermantasyon ortamında arjinin (0.75gr/l) ve gliserol (11.5gr/l) bulunmasının antibiyotik üretimini teşvik ettiğini, Legator ve Gottlieb (1953) ise *S.venezuela*'dan kloramfenikol eldesinde ortama %1 gliserol katılmasının etkili olduğunu bildirilmişlerdir. Bhattacharyya et al. (1998) nitrojen kaynağı olarak arjinin, karbon kaynağı olarak gliserol kullandıklarında *Streptomyces hygroscopicus*'dan maksimum antibiyotik elde etmişlerdir. Dulmage (1952) karbon kaynağı olarak gliserolün kullanıldığı sentetik ortamlarda neomisin sentezinin arttığını bildirmiştir.

Çalışmamızda karbon kaynağı olarak inozitol'ün kullanıldığı ortamda KA11'in diğer izolatlarla oranla daha iyi ürediği, fruktoz bulunan ortamda ise üremenin diğer izolatlardan daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. Üç izolatta karbon kaynağı bulunmayan ortamda gelişme göstermemiştir. Karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak pepton kullanılan besiyerinde AA33 izolatının batık misel rengi turuncuya, AA32'nin ise kahverengiye dönüştüğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra karbon kaynağı olarak maltoz, azot kaynağı olarak da pepton ilave ettiğimiz besi ortamında üç izolatında batık misel renginin kahverengi olduğu ve karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum sülfat ilave ettiğimizde ise AA32 ve AA33'de batık misel rengi sarı, KA11'de ise beyaz olarak tespit edilmiştir.

Dastager et al. (2006) melanin üretiminin *Streptomyces*lerin sınıflandırılmasında anahtar rol oynadığını, farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının melanin pigmentinin oluşumunu etkilediğini ve nişastanın melanin üretiminde en etkili karbon kaynağı olduğunu bunu, gliserol ve fruktozun takip ettiğini saptamışlardır. Aynı zamanda araştırmacılar strain DAS139'da miselyal gelişimin az olmasına rağmen melanin pigmenti üretiminin iyi olduğunu, substrat olarak L-tirozin veya L-dopa kullanılarak melanin üretim testinin yapılmasının *Streptomyces*lerin identifikasyonunda ve klasifikasyonunda yararlı olacağını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda melanin pigmenti oluşumu Melanin Formasyon Ortamı kullanılarak belirlenmiştir. Benzer olarak L-tirozin içeren bu ortamda üç izolattada melanin pigmenti oluşmuş ancak KA11'de pigmentasyon diğer izolatlarla göre daha zayıf olmuştur.

Krasıl'nıkov (1959), düşük sıcaklığın (10-15°C) gelişme ve pigmentasyonu olumsuz yönde etkilediği, pigment oluşumunun 25-30°C civarında arttığı fakat daha yüksek sıcaklıklarda (37-40°C) termofilik *Actinomyces*ler haricindeki hiçbir türün pigmentasyon göstermediğini bildirmiştir (Krasıl'nıkov 1959).

Çalışmamızda en fazla antimikrobiyal etki gösteren 3 izolatın optimum sıcaklık isteklerinin 27°C ile 37°C arasında olduğu ve bu sıcaklık aralığında pigment oluşturduğu, 10°C ve 45°C sıcaklıklarda üremedikleri gözlenmiştir.

Kültürel özelliklerin yanı sıra biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerde *Streptomyces*lerin identifikasyonunda kullanılan kriterler arasındadır.

Bu çalışmada AA33 numaralı izolat, içerisinde % 4'lük sodyum klorit bulunan ortamda oldukça iyi gelişim göstermesi, AA32 ise jelatini hidroliz etmemesi ile diğer izolatlardan farklılık göstermiştir. KA11 ve AA32 izolatları inhibitör bulunan ortamda gelişme göstermemiştir. Ayrıca; AA33 ve KA11'in penisilin G'ye duyarlı, AA32 nin ise dirençli olduğu bulunmuştur.

Ouhdoucha et al. (2001) mezofilik *Streptomyces* izolatlarının antibiyotik üretiminde baskın olduğunu ve genellikle 27°C civarında antibiyotik ürettiklerini bildirmişlerdir.

Benzer olarak bu çalışmamızda antimikrobiyal etkinliklerinin en fazla olduğunu saptadığımız izolatlar mezofilik *Actinomycet* izolatları olup, fermantasyon denemelerinde 28°C inkübasyon sıcaklığı olarak kullanılmıştır.

Denizci (1996) dört farklı *Streptomyces* izolatında yaptığı çalışmada farklı besiyerleri kullanarak fermantasyon ortamında antibiyotik üretiminin 16. saatte başladığını ve 72-96. saatleri arasında inhibisyon zonunun en yüksek düzeye ulaştığını saptamıştır. Zitouni (2005) ise fermantasyon ortamında antibiyotik üretiminin 2. gün başladığını 4. gün maksimuma ulaştığını bildirmiştir.

Çalışmamızda AA32 ve AA33 izolatlarının Fermantasyon Ortamı A'da üremeleri ve antimikrobiyal madde üretimleri diğer fermantasyon ortamlarına göre daha iyi olduğu için antimikrobiyal madde ekstraksiyonunda bu ortam kullanılmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı AA32 ve AA33'ün antimikrobiyal madde üretimi Fermantasyon Ortamı A'da 20.saatte başladığı; Gliserol Yeast Broth'da (Fermantaston Ortamı 1) ise 24. saatte başladığı saptanmıştır. AA32'de en yüksek inhibisyon zonu Fermantasyon Ortamı A'da 67.ve 72. saatlerde 25 mm ve AA33'de ise Fermantasyon Ortamı A'da 91. ve 96.saatte 21 mm olarak ölçülmüştür. Test organizması olarak *Escherichia coli* ATCC 25922'ye karşı antimikrobiyal madde üretimi Fermantasyon Ortamı A'da 20.saatte, Gliserol Yeast Broth'da ise 24.saatte başlamıştır. En yüksek inhibisyon zonu AA32 suşunda Fermantasyon Ortamı A'da 91.saatte 25 mm olarak ve AA33'de ise Fermantasyon Ortamı A'da 96. saatte 30 mm olarak ölçülmüştür.

Denizci (1996) etken madde ekstraksiyonu için en iyi solventin metilen klorit olduğunu bunu n-butanolün izlediğini bildirmiştir. Zitouni (2005) Solvent ekstraksiyonunda butanol ve metilen klorit kullandığında, elde ettiği ham madde antimikrobiyal etki göstermiş, hegzan kullandığında ise etki göstermemiştir. Diğer bir çalışmada antimikrobiyal etki gösteren ham madde için en iyi solventin n butanol olduğu ve bu bileşiğin renksiz olup, suda ve DMSO'da (Dimetil sülfoksit) çözündüğünü fakat metanol, n-butanol, etilasetat, 1-propanol, 2-propanol, etanol, asetonitril, dikloro metan,

n-hegzan, aseton, kloroform ve toluende çözünmediği bildirilmiştir. Genel olarak iyonik bileşikler solvent ekstraksiyonu sonucunda suda iyonik olmayan bileşiklerden daha iyi çözünmektedirler (Calton et al.1986).

Çalışmamızda hegzan nonpolar, metilenklorit zayıf polar, n-butanol ise yüksek polar yapıda olup, bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Metilen klorit ile n-butanol ekstratlarından elde edilen ham maddelerin antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. AA33 ve AA32'den elde edilen ham maddeler için en iyi solvent su olup bunu DMSO takip etmiştir. Aseton, metanol, kloroform, hegzan, butanol de ise ham madde çözünmemiştir. Suda çözünebilen maddeler polar bantlar içerirler. Polaritesi en fazla olan bantlar O-H' tır bunu N-H ve C-H izler. Ekstraktımızın su gibi polar çözücünde çok iyi çözünmesi, ekstraktımızda O-H ve N-H gruplarının varlığını göstermektedir.

Bush et al.(1993) iki Streptomyces izolatından elde ettiği antimikrobiyal maddenin UV visible spektrada maksimum pik değerlerinin 263 ve 266 nm olduğunu saptanmışlardır. Bu değerlerden yola çıkarak etken maddenin aromatik halka içerdiğini bildirmişlerdir. Aromatik halka (N-H ve C=N) serbest amin ve karbonil (C=O) içeren heterosiklik bir yapıdır. Nükleosit ve nükleotid antibiyotikleri asidik zincir ve fosfat grupları ile bağlı yapılardır. Renksiz olup suda çözünürler. Maksimum UV- visible spektraları genelde 260-270 nm arasındadır. Bu antibiyotikler genellikle Streptomyces türleri tarafından üretilirler. Saccharothrix türleri tarafından üretilen tek nükleosit antibiyotik vardır. Fakat bu antibiyotiğin antifungal aktivitesi yoktur ve herbisidal aktiviteye sahiptir. Taddei et al.(2006) Actinomycet izolatlarındaki sekonder metabolitlerin belirlenmesinde 2D TLC uygulamasının basit ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Swaadoun ve ark. (1999) Sudan izole ettikleri Actinomycet'lerden polyen tabiatında, 215-270 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren antibiyotik elde etiklerini bildirmişlerdir. Ouhdoucha et al.(2002) Actinomycet'lerden elde ettiği etken maddenin UV 410-250-380-290 nm'de maksimum absorbans gösterdiğini ve nonpolyenik antibiyotik olduğunu saptamışlardır. Şahin ve Uğur (2003) CoNS ve mayalara karşı antimikrobiyal etki gösteren Actinomycet izolatlarından elde ettiği ham ekstraktın UV

spektrumunu 212 ve 260 nm, TLC plaklarında aktif bölgenin R_f değerlerini 0.60 ve 0.80 olarak belirlemiştir.

Augustine et al.(2005) ise *Streptomyces albidoflavus*'dan antifungal aktiviteye sahip nonpolyen antibiyotik elde etmiş ve bu etken maddenin 211, 216 ve 218 nm'de UV spektrada maksimum absorbans gösterdiğini ve bu maddenin karbon atomları arasında çift bağ olduğunu belirtmişlerdir. Saf bileşiğin suda çözündüğünü fakat hamisin gibi standart antifungal antibiyotiklerin suda çözünmediğini aynı zamanda nistatin, amfoterisin gibi standart polyen antifungal antibiyotiklerin UV spektrumunun, elde ettiği nonpolar antimikrobiyal maddeden farklı olduğunu bildirmiştir

Zitouni (2005) Actinomycet'ten elde ettiği ham maddeyi, solvent sistem olarak n-butanol-asetik asit-su (3:1:1) kullanarak TLC plaklarında yürütmüş ve ninhidrin ile spreyleyerek R_f değeri 0.07 olan tek bir bant elde etmiştir. Ninhidrin serbest amin grupları başka bir deyişle aktif maddenin peptit yapısında olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır.

Sırbistan'dan izole edilen 20 farklı *Streptomyces* izolatu ile yapılan bir çalışmada izolatların invitro olarak gram pozitif, gram negatif ve mayalara karşı etkileri araştırılmış aktif izolatların kültür ekstraktlarının UV spektrumu 221 ve 240 nm'de maksimum absorbans göstermiştir. TLC plaklarında aktif bölgeler R_f 0.70 ve 0.88 ve aktif bileşiğin metanolde UV spektrumu 217 ve 221nm olarak belirlenmiştir (Slavica et al.2005).

Bu çalışmada elde edilen ham ekstre için en iyi sistemin n-butanol:asetik asit:su (6:2:2) olduğu belirlenmiştir. TLC plaklarına ninhidrin püskürtülerek bant oluşumu gözlenmiştir. AA32 numaralı izolatta beş (0.179, 0.230, 0.307, 0.408 ve 0.527), AA33 numaralı izolatta dört bant (0.256, 0.307, 0.487, 0.527) tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Biyootogram sonucunda AA32 numaralı izolattan elde edilen ham maddede bir, AA33 numaralı izolattan elde edilen ham maddede ise 2 zon oluşumu görülmüştür. Bu bölgelerin R_f değerleri AA32'de 0.527, AA33'de ise 0.527 ve 0.487 olarak belirlenmiştir. Etken maddenin UV spektrumlarının AA32'de 284, 254 ve 216 olduğu bu değerlerin AA33'deki 4. bandın UV değerlerine benzediği ancak AA33 deki R_f

değeri 0.487 olan bandın UV değerlerinin (282, 254) farklı olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etki gösteren maddelerin ninhidrin ile saptanması etken maddelerin amin grubu içerdiğini göstermiştir. Sonuç olarak AA32 numaralı izolatta bir, AA33 numaralı izolatta ise iki antimikrobiyal madde olduğu ve antimikrobiyal etkisi olduğu saptanan AA32 deki 5. bant ile AA33 deki 4. bantların benzer maddeler olabileceği düşünülmüştür.

Daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, UV spektrumlarının 260 nm civarında olması antimikrobiyal özellik gösteren maddelerin aromatik yapıda ya da polyen tabiatında olabileceğini göstermektedir.

Zitouni (2005) Actinomyces'lerden elde ettiği ham ekstreyi kolon kromatografisi ile ayırtmış (5ml her bir tüp) 6 ile 11. fraksiyonlar arasında antifungal aktiviteye sahip ham maddenin bulunduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda ham ekstrenin kolon kromatografisi sonucunda (1.5 ml her bir tüp) 4-10. fraksiyonlar arasında antimikrobiyal aktivite tespit edilmiş ve UV değerleri, TLC üzerinden kazınarak okunan değerlerle benzer bulunmuştur. Çalışmamızda kontrol olarak kullanılan sefotaksim TLC deki R_f değeri 0.513 olup, hem izolat AA32 hemde AA33'de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanan ve R_f değeri 0.527 olan madde ile benzerlik göstermektedir.

Barbarin and Tilquin (2001) yaptığı çalışmada sefotaksimlerin 256 nm civarlarında pik verdiği bununda sephem halkasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Çalışmamızda sefotaksimin UV değeri 254 nm olarak tespit edilmiş olup etken maddemiz ile benzerlik göstermiştir. Ancak sefotaksimin molekül ağırlığı 455.47 gr/mol iken izolat AA32'den elde edilen etken maddenin ise 467.89 gr/mol olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; antimikrobiyal etkisi olduğunu belirlediğimiz madde O-H bakımından zengin, amin grupları içeren, molekül ağırlığı 467.89 gr/mol, R_f değeri 0.527, Maksimum UV spektrumu 254 nm olan polar yapıya sahip bir bileşiktir. Sefalosporine olan benzerliği ve UV spektra değerleri etken maddenin aromatik yapıda ya da polyen

tabiatında olabileceğini göstermektedir. Ancak NMR, MS, İnfrared UV vb. teknikler kullanılarak maddenin molekül yapısının tanımlanması gereklidir.

Farklı habitatlardaki Actinomycet suşları ve bunların metabolitlerinin araştırılması yeni antimikrobiyal maddelerin keşfi için gereklidir (Ouhdouch et al.2001). Çin ve Avusturalya’da farklı habitatlardan Actinomycet izole edilerek antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır (Okazaki and Naito1986, Nolan et al.1988,). Ancak coğrafik konumu göz önüne alındığında çok farklı habitatlara sahip olan ülkemizde, Actinomycet sekonder metabolitleri ile ilgili çalışmalar metabolitin kimyasal yapısının tam olarak ortaya konulamaması ile sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalar aktif bileşiğin yapısının belirlenmesi üzerine yoğunlaşmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aktuğlu, Y., 1997, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu 2-3 Mayıs , İstanbul, 11-25.
- Arai, T., Kuroda, S& Mikami, Y., 1976, "Classification of Actinomycetes with Reference to Antibiotics Production In Actinomycetes". The Boundary Microorganisms. 543-651. Ed. by. T. Arai, Toppan Company Limited, Tokyo-Singapor.
- Augustine, S. K., Bhavsar, S.P., and Kapandis, B.P., 2005, "A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus*". PU 23 *J. Biosci* Vol.30, pp. 201–211.
- Barbarin N.,and Tilquin B., 2001, "Study of nonvolatile degradation compounds produced by radiosterilization of cefotaxime". Radiation Physics and Chemistry Vol. 60, pp. 359–367.
- Berdy J., 1974, "Recent developments in antibiotic research and claaification of antibiotics according to chemical structure". Adv. Appl. Microbiol., Vol.18, pp.309-406.
- Berdy, J., 1986, "Further antibiotics with practical application". In Biotechnology Vol, 4, pp. 487-505. Ed. by H. Pape & H.J. Rhem,VCH Verlag, Weinheim.
- Bilgehan, H., 1995, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları 465-474.
- Bhattacharyya, B.K., Sushil C.P., Sukanta K.S., 1998, "Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1.5: Cultural Effect". Revista de Microbiologia Rev. Microbiol.Vol. 29, pp.1-6.

- Boucher. I., Dupuy. A., Vidal P., 1992, "Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174". Applied and microbiology Biotechnology springer-verlog Vol. 38, pp. 188-193.
- Brown, J.C., 1958, "Soil fungi of Some British sand dunes in relation to soil type and succession". Ecology Vol. 46, pp. 641-664.
- Bush, B.D., G.V. Fitchett, D.A., Gates, D. Langely, 1993, "Carbocyclic nucleosides from a species of *Saccharothrix*". Phytochemistry Vol. 32, pp. 737-739.
- Carlton, J.G., Carrington, S.C., and Hamman, J. P., 1986, Product Recovery. In Manual Industrial Microbiology and Biotechnology. 436-447. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Chater K.F., 1998, "Taking a genetic scalped to the *Streptomyces* colony". Microbiology Vol. 114, pp. 1465-1478.
- Corbaz, R., Ettlinger, L., Kemler, Schrlein, W., and Zahner., H., 1957, "Zur Systematik der Actinomyceten. 1.Über *Streptomyceten mitrhodomycinartigen*" Pigmenten Arch. Microbial. Vol. 25, pp. 325-332.
- Cruger, W.&Cruger, A., 1984, Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Microbiologie, 197-242. R. Oldenbourg Verlag München Wien.
- Çotuk, A., 2003. Genel Mikrobiyoloji Laboratvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri LTD.ŞTİ. 79-92.
- Dastager S.G, Wen-Jun Li, Dayanand A, Shu-Kun Tang, Xin-Peng Tian Xiao-Yang Zhi, Li-Hua Xu and Cheng-Lin Jiang 2006, "Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*". African Journal of Biotechnology Vol. 5, pp. 1131-1134, 16 April.

- Denizci, A., 1996, "Ege ve Doğu Kardeniz Bölgesi Topraklarında İzole edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma". Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Devries, G. A., 1960, "Aspergillus fumigatus and actinomycetes in air". Acta Allegol Vol.15, pp. 99-106.
- Drautz, H., Reuschenbach, P. and Zahner, H., 1985. Metabolic Products of Microorganisms. 225 Elloramycin. A new anthracyclin-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation Characterization Structure and Biological Properties. The Journal of Antibiotics. Vol. 38, pp. 1291-1301.
- Dulmage, T.H., 1952, "The Production of Neomycin by *Streptomyces fradiae* in Synthetic Media". Appl. Microbiol Vol.1, pp. 103-106.
- El-Nakeeb, M.A and Lechevalier, H.A., 1963, Selective isolation of aerobic *Actinomycetes*. Appl. Microbiol. Vol. 11, pp. 75-77.
- Elisa, M., Migue'lez, Gruz Martín, Carlos Hardisson and Manuel, B., Manzanal, 1993, "Hyphal Death during Colony Development in *Streptomyces antibioticus*: Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote". The Journal of Cell Biology, Vol. 145, pp. 515-525.
- Erikson, D., 1935, "The pathogenic aerobc organismus of the Actinomyces group" Med. Research Council (Gt. Brit) Spec. Rep. Vol. 203, pp. 5-61.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O. A. S. Bingel, D. D. Soejarto, Z. Guo, Bull.WHO.1985, "Medicinal plants in therapy". Bull. World Health Organisation, Vol. 63, pp. 965.
- Goodwin, T.W., 1963, "Vitamins Biochemistry of Industrial microorganisms". Roinbow, C-,Rose, A.H=Academic Pres, London, pp. 151-205.

- Gupte, M., Kulkarni, P., and Ganguli, B.N., 2002, "Antifungal Antibiotics. *Appl Microbiol. Biotechnol.* Vol. 58, pp. 46–57.
- Hall, A.N., Thomas, G. A., Tiwari, K. S., and Walker, T. K., 1953, "Nutrition of *Acetobacter* species". *Arch. Biochem. and Biophys* Vol. 46, pp. 485-487.
- Hepgüvendik, N., 1989, "Toprakta İzole Edilen Bir Actinomycete Türünün Antibiyotik Üretim Faliyetleri Üzerine Bir Araştırma". Yüksek Lisans Tezi, E.Ü, Fen. Fak. B.y.Bİ, Temel ve End. Mikrobiy. Anabilim Dalı. Bornova- İZMİR.
- Horvath, J., 1954, "Contributions to the biology of quantitative changes antibiotic production, based upon Investigations on a *Streptomyces*". *Acto Microbial. Acad. Sci. Hung.* Vol. 1, pp. 131-140.
- Huck, T.A., Porter, N and Bushell, M., 1991, "Positive selection of antibiotic producing soil isolates". *Journal of General Microbial.*, Vol. 137, pp. 2321-2329.
- Isizawa, S.&Araragi, M., 1976, Composition of Actinomycete Population in Soil. In *Actinomycetes, The Boundary Microorganisms* pp. 97-108. Ed. by. T. Arai, Toppan Company Limited, Tokyo-Singapore.
- Isshiki, K., Sawa, T., Nakagawa, H., Matsuda, N., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., 1989, "3-*O*-Isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-*O*-isobutyrylkinamycin antibiotics produced by a *Saccharothrix* species". *J. Antibiot.* Vol. 42, pp. 467–469.
- János, B., 2004. "Bioactive Microbial Metabolites". A Personal View Received 2004, Japan Antibiotics Research Association. *J. Antibiot.* Vol. 58, pp.1–26.
- Jones, K.L., 1949, "Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of Sporogenous aerial mycelium is fluctuating characteristic". *Journal of Bacteriology* Vol. 57, pp. 141-146.

- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A., 2000, "Practical Streptomyces Genetics". John Innes Foundation Norwich. Printed by Crowes, Norwich 5-17.
- Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Göral G., Helvacı, S., 1992, "Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji". Onur Yayıncılık 90-91.
- Korcan, E., 1995, "Topraktan ve havadan izole edilen Actinomycete türlerinin aktivitesinin belirlenmesi". Yüksek Lisans Tezi, Osman Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Krainsky, A., 1914, "Die Actinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur, Zentr Bakteriell Parasitenk". II Abt. Vol. 41, pp. 649-688 der.
- Krasil'nikov, N.A., 1959, "Rules for the classification of antibiotic-producing Actinomycetes" *Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten*. Veb. G.Fischer Verlag, Jena . English transl. Of section on Actinomycetes, C.Pfizer & Co., Inc.
- Kutznet, H. J. 1956, "Beitrag zur Systematik und Ökologie der Gattung Streptomyces Waksman et Henrici". Dissertation, Hohenheim.
- Küster, E., 1976, "Ecology and Predominance of Soil *Streptomyces*. In *Actinomycetes, The Boundary Microorganisms*". pp. 109-122. Ed. by. T.Arai Toppan Company Limited, Tokyo-Singapor.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. & Tillequin, F. 2002, "New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities". *J Antibiot* Vol. 55, pp. 696–701.
- Lancini, G., Parenti, F&Gallo, G.G., 1995, "Antibiotics": A Multidisciplinary Approach. Plenum Press, New York and London.

- Legator, M., and Gottlieb, D. 1953, "The dynamics of chloramphenicol synthesis". *Antibiot. Chemother.* Vol. 3, pp. 809-817.
- Liang, L., 2003, "Investigation of Secondary Metabolites of North Sea Bacteria Fermentation, Isolation Structure Elucidation and Bioactivity". Ph. D.thesis. University of Göttingen, Göttingen, Germany.
- Lindenbein, W., 1952, "Über einige chemisch interessante Actinomycetenstämme und ihre Klassifizierung". *Arch. Microbiol.*, Vol.17, pp. 361-383.
- Linder, W. and Wallhausser, K.H., 1955, "Die Arbeitsmethoden der Forschung zur Auffindung neuer Antibiotica". *Arch Microbiol.* Vol. 22, pp. 219-234.
- Locci, R., 1989, "*Streptomyces* and Related Genera". Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, pp. 2451-2508.
- Lund, B.M. and Lyon, G.D., 1975, "Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *Eherbicola* on thin-layer chromatograms". *J Chromatogr* Vol.110, pp. 193-196.
- MacNeil, I. A., C. L. Tjong, C. Minor, P. R. August, T. H. Grossman, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, T. Phillips, S. Narula, R. Sundaramoorthi, A. Tyler, T. Aldredge, H. Long, M. Gilman, D. Holt, and M. S. Osburne. 2001, "Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries". *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* Vol.3, pp. 301–308.
- Martinez, A., S. J. Kolvek, C. L. Tjong Yip, J. Hopke, K. A. Brown, I. A. MacNeil, and M. S. Osburne. 2004, "Genetically modified bacterial strains and novel bacterial Artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple bacterial hosts". *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.70, pp. 2452–2463.

- Nakayama, K., 1981, "Sources of Industrial Microorganisms In Biotechnology". Vol. 1, pp. 355-410. Ed. by H.J. Rehm & G. Reed, VCH Verlag, Weinheim.
- Nakhimovskaya, M. I., 1937, "The antagonism between actinomycetes and soil bacteria". *Microbiology* (U.S.S.R.), Vol. 6, pp.131-57.
- Natsume, M., Yosui, K., Maruma, S., 1989, "Department of Agricultural Chemistry", Nagoya University, Chikusa, JAPAN. *J. Antibiotic*. Tokyo; Vol. 42, pp. 440.
- Neugebauer, E., Gomache, B., Derry, V.C., and Brezezinski, R., 1991, "Chitinolytic properties of *Streptomyces lividans*". *Arch. Microbial*. Vol. 156, pp. 192-197.
- Nolan R., Cross T., 1988, "Isolation and screening of actinomycetes, in: Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M. (Eds.), *Actinomycetes in Biotechnology*". Academic Press, London, pp. 1-32.
- Ohkuma, H., Naruse, N., Nishiyama, Y., Tsuno, T., Hoshino, Y., Sawada, Y., Konishi, M. And Oki, T., 1992, "Sultreicin. New Antifungal and Antitumor Antibiotic from *Sterptomyces roseiscleroticus* Production, Isolation, Structure and Biology Activity". *The Journal of Antibiotics*, Vol. 45, pp.1239-1249.
- Okazaki T., Naito A., 1986, "Studies on actinomycetes isolation from Australian soil". in: Szabo G., Biro S., Goodfellow M. (Eds.), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, Akademiai Kiado, Budapest, , pp. 739-741.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C., 2001, "Actinomycetes of Moroccan habitats, isolation and screening for antifungal activities". *Eur. J. Biol*. Vol. 37, pp. 69-74.
- Öner, M., 1989, "İleri Endüstriyel Mikrobiyoloji Ders Notları". Ege Üniv. Fen Fak. Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Bornova-İzmir.

- Porter, J.N., 1976, "Antibiotics In Industrial Microbiology" pp. 460-478. Ed.by B.M Miller & W. Litsky, Mc Graw- Hill BookCompany.
- Raper, K.B., Thom, C., Fennel. D.L., 1949, "A manual of the Penicilia". Williams Wilkins Company, Baltimore.
- Redenbach M., Kieser H. M, Denapaite D., Eichner D., Cullum J., Kinashi H. and Hopwood D.A.1996, "Aset of ordered cosmids and adetailed genetic and Physical map fort the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromozome" Mol. Microbiol. Vol. 27, pp. 77-96.
- Rickes, E.L., Brink, N.G., Koniuszy, F.r., Wood, T.R., and Folkers, K., 1948, Comporative data on vitamin B₁₂ , from liver and from anev sorce, *S.griseus*" Science Vol.108, pp. 634-635,148.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M.R.J. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M.Gilman, M. S. Osburne, Clardy, J. Handelsman, and R. M. Goodman. 2000, "soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 66, pp. 2541–2547.
- Rossi-Doria, T. 1891, "Su di alcune specie di " Streptotrix" trovate nell'aria studiate in rapporto a quelle giA note e specialmente all Actinomyces". Ann. igiene, Vol.1, pp. 399- 439.
- Schatz, A. and Waksman, S.A., 1944, "Sptertomycin A. Substance Exhibiting Antibiotic Activity Aganist Gram- negative and Gram- positive Bacteria". Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. Vol. 55, pp. 66-69.
- Shirling, E.B. and Göttlieb, D.,1966, "Methods for Charecterization of *Streptomyces* species". Int. J. Syst. Bacteriology, Vol.16, pp. 313-340.

- Slavica, B.I., Sandra, S. K., Zoran, B.T., 2005 “UV/VIS Analysis and Antimicrobial Activity of *Streptomyces* Isolates Medicine and Biology” Vol. 12, pp. 44-46.
- Swaadoun, I., Hameed, K.M., Moussauui. A., 1999, “Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes”. Microbios; Vol.99, pp. 173-179.
- Şahin, N., Uğur, A., 2003, “Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates”. Turk J Biol. Vol.27 pp. 79-84 TÜBİTAK 79.
- Taddei A., Margaret V., Juan G., Maikahl R., Cristina C., 2006, “Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research” Research in Microbiology Vol.157 pp. 291–297.
- Thompson C. J., Chiu M., Christiansen I., Dale G., Folcher M., Li X.-M., Morris R., Nguyen L., RİCHTER M., Taubert S., Tenor J., Süstrünk U., Violler P., Weihofen A., 1998-1999 “Differentiation in *Streptomyces* a Prokaryotic multicellular developmental system”, Biozentrum: Biennial Report. pp. 1-6.
- Takeuchi, Y., Satow, Y., Nakamura, K.T., and Mitsui, Y. 1991, “Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and *Streptomyces* subtilisin inhibitor at 1.8 Å resolution”. *J. Mol. Biol.* Vol. 221, pp.309–325.
- Takeuchi, M., Takahashi, S., Enokita, R., Sakaida, Y., Haruyama, H., Nakamura, T., Katayama, T., Inukai, M., 1992, “Galacardines A and B, new glycopeptide antibiotics”. *J. Antibiot.* Vol. 45, pp.297–305.
- Toennies, G., 1951, and Kolb, J.J. Techniques and reagents for paper chromatography. *Anal. Chem.*
- Umberit, W.W., and McCoy, E., 1941, “The occurrence of actinomycetes of the genus *micromonospora* in inland lakes, symp Hydrobiology”. *Univ. Wis.* pp 106-114.

- Umberit, W.W., and Mc Coy, E., 1956, The antibiotic approach. In The Strategy of Chemotherapy. 8th Symp. Soc. Gen Microbial., London, pp. 29-48.
- Umezawa, H., Tsuchiya, T., Muto, R.& Umezawa, S., 1972, "Studies on Aminosugars XXIX. The synthesis of 3'-O-Methylkanamycin". Microbiology Bull. Chem. Soc. Jpn. Vol. 45, pp. 2842-2847.
- Waksman, S.A., 1922, "A Method Counting the numbers of fungi in the soil". J. Bact., Vol. 7, pp. 339-341.
- Waksman, S.A., 1957, "The Species concept among the *actinomycetes* with special reference to the genus *Streptomyces*". Bact. Review, Vol. 21, pp.1-29.
- Waksman, S.A., 1963, "The Actinomycetes and Their Antibiotics". In Advances in Applied Microbiology, Vol 5. pp. 235-295. Ed. by W.W. Umbreit, Academic Pres, New York and London.
- Waksman, S.A., 1967, "Actinomycetes". A Summary of Current Knowledge. The Ronald Pres Company, New York.
- Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y Liu, Z., Maldonado, L., Goodfellow, M., 2001, "*Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 51 pp. 1783-1788.
- Wendisch, F.K., & Kutzner, H.J., 1991, "The family Streptomycetaceae. In Prokaryotes". Second Edition Vol. 1. pp. 922-925. Ed. by A. Ballows et.al, Springer Verlag.
- Williams, S.T & Davies, F.L., 1965, "Use of Antibiotics for Selective Isolation and Enumeration of *Actinomycetes* in soil". J.Gen. Microbiol. Vol 48, pp. 251-261.

Williams, S.T & Cross, T., 1971, “*Actinomycetes. Methods Microbiol.* Vol. 4, pp. 295-334.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A.& Sackin, M.J., 1983, “Numerical classification of *Streptomyces* and related genera”.*Journal of General Microbiology* Vol.129, pp.1743-1813.

Zaehner, H. P. Fiedler, 1995, “The need for new antibiotics”: possible ways forward, N. J. Russell (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, England, pp.67-84

Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2005, “*Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria:Isolation biological activities and partial characterization of antibiotics”. *Research in Microbiology* Vol.156, pp. 984-993.

İnternet Kaynakları

1. <http://www.ncbi.nlm.nih/> 10.05.2007

2. [http:// tr.wikipedia.org/wiki/Antibiyotik](http://tr.wikipedia.org/wiki/Antibiyotik) 07.06.2007

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Neslihan BALKAR

Doğum Yeri: Çorum

Doğum Tarihi: 24.07.1982

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise: Halkalı Toplu Konut Lisesi

Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi

Yüksek Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi