

**TOPRAKTAN AKTİNOMİSET
İZOLASYONU VE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Pervin SOYER

Eskişehir 2019

**TOPRAKTAN AKTİNOMİSET İZOLASYONU VE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pervin SOYER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Nisan 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Pervin Soyer'in, "Topraktan Aktinomiset İzolasyonu ve Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması" başlıklı tezi 18/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Yöğmür TUNALI	
Üye	: Prof. Dr. Meral Sağırçın	
Üye	: Doç. Dr. Filiz BADEMİR	

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür

FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled "Actinomycetes Isolation From Soils and Determination of the Some Biological Activities" has been prepared and submitted by Pervin Soyer in partial fulfillment of the requirements in "Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination" for the Degree of Master of Science in Pharmaceutical Microbiology Department has been examined and approved on 18/04/2019.

Committee Members

Signature

Member (Supervisor)

: Prof. Dr. Yöğmur TUHAU

Member

: Prof. Dr. Meral Sağdıç

Member

: Doç. Dr. Filiz Özdemir

Director

Graduate School of Health Sciences

Prof. Dr. Nalan GUNDOĞDU-KARABURUN

Mudur

ÖZET

Toprakta Aktinomiset İzolasyonu ve Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması

Pervin SOYER

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mart 2019

Danışman: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Aktinomisetler farklı ve geniş habitatlarda, özellikle doğal toprak habitatlarında yayılış gösteren, mikroorganizmalar arasındaki en kalabalık popülasyona sahip bakteri grubudur. Eski zamanlardan beri mikroorganizmaların özellikle toprak mikroorganizmalarının biyoaktif metabolitleri çalışılmakta ve elde edilen bilgiler bilim, tıp, tarım ve farmasötik endüstrilerine katkılar sağlamaktadır.

Bu çalışmada orman topraklarından Aktinomiset türlerinin izolasyonu, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler metodlar ile tanımlamaları yapılmış olup; izolatların biyoaktif metabolitinin ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen ekstrenin antimikrobiyal, antibiyofilm ve sitotoksik gibi biyolojik aktivitelerinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Toplanan orman toprakları örneklerinden mikrobiyolojik izolasyon metodları ile elde edilen izolatlarının morfolojik biyokimyasal ve moleküler özellikleri araştırıldıktan sonra, izolatlar Aktinomiset grubunun üyesi, *Brevibacterium spp.* olarak tanımlanmışlardır. *Brevibacterium spp.* Aktinomiset cinsinin endüstriyel açıdan önemli bir cinsi olarak bilinmektedir. İzolatların antibiyotik direnç özellikleri standart antibiyotiklerle ve farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal metodlar kullanılarak belirlenmiştir. Genelde *Brevibacterium*, toprakta bulunan ağır metallerle tolerans gösterme potansiyelleriyle bilindikleri için izolatların krom toleransları araştırılmıştır. *Brevibacterium spp.* izolatları hazırlanan modifiye besiyerinde kültüre edilerek biyoaktif metabolitleri ekstrakte edilmiştir. Ekstrenin antimikrobiyal, antibiyofilm etkileri standart mikroorganizmalar ve sitotoksik etkileri *Artemia salina* larvaları üzerinde farklı konsantrasyonlar kullanılarak çalışılmıştır. Antimikrobiyal (MİK) değerleri bakteriler için 2500 µg/mL ve mayalar için 1250 µg/mL olarak belirlenmiştir. Antibiyofilm (MBEK) değeri ise 1250 µg/mL'dir. Sitotoksik etkin değer 2500 µg/mL konsantrasyonda bulunmuştur. Bu sonuçlar, elde edilen *Brevibacterium spp.* izolatının endüstriyel ve farmasötik açıdan bir potansiyel taşıdığını göstermiş olup daha detaylı farmasötik araştırmalar da planlanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Aktinomiset, Toprak mikroorganizmaları, *Brevibacterium*, Antibakteriyel, Antifungal, Sitotoksikite

ABSTRACT

Actinomycetes Isolation From Soils and Determination of the Some Biological Activities

Pervin SOYER

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, March 2019

Supervisor: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Actinomycetes bacterial group has the one of the most populous population in microorganisms that extends very different and extensive habitats especially natural soil habitats on earth. Since ancient times, bioactive metabolites of microorganisms especially soil microorganisms have studied and the results have provided that metabolites of soil microorganisms have significant benefits to science, medicine, agriculture and pharmaceutical industry.

In this study, isolation of Actinomycetes strains from forest soils, identification of morphological, biochemical and molecular features, extraction the bioactive metabolite of isolates and determination the antimicrobial, antibiofilm and cytotoxicity activities of bioactive extract was tested. The microbiological isolation methods for collected forest soil samples were used and after the determination of their morphological, biochemical and molecular features, isolates were defined as *Brevibacterium spp.* that is member of *Actinomycetes*. It is known as an important species of Actinomycetes genus. The antibiotic resistance of the isolates were determined by different methods and different concentrations of standard antibiotics. The chromium tolerance of isolates were determined because *Brevibacterium spp.* is usually known by its tolerance against heavy metals. The bioactive metabolites of isolates were produced in modified medium and extracted. The antimicrobial, antibiofilm and cytotoxicity activities of different and serial concentrations of bioactive metabolite were determined against standard microorganisms and *Artemia salina* larvae were used as test organism for cytotoxicity researchs. The antimicrobial (MIC) concentrations of bioactive metabolite 2500 µg/mL for standard bacteria cultures and 1250 µg/mL for yeasts. The antibiofilm (MBEC) value was determined at 1250 µg/mL. The 2500 µg/mL concentration of extract was found the effective cytotoxic value. The results are provided that the *Brevibacterium spp.* isolates have industrial and pharmaceutical potential and more detailed pharmaceutical researchs are planned.

Keywords: Actinomycetes, Soil microorganisms, *Brevibacterium*, Antibacterial, Antifungal, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca akademik ve hayata dair bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her konuda öneri, yardım, destek, sevgi ve sabrı ile yetişmemi ve ilerlememi sağlayan, tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Sayın Yağmur TUNALI'ya saygılarımı ve en içten minnetimi sunarım.

Tez sürecinde bana her türlü çalışma olanağı sağlayan Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanları, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hayatımın her anında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren, gösterdiği sonsuz destek ve sabırla beni yücelten canım babam Ümit SOYER'e, bütün aileme ve mesafelere rağmen hep yanımda olduğunu bildiğim dostum Demay ZABİTOĞLU'na içtenlikle teşekkür ederim.

18/04/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
(İmza)

Pervin Sayer

.....
(Öğrencinin Adı Soyadı)

18/04/2019

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

.....
(Signature)

Pervin Soyer

(Name and Surname of the Student)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIKSAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Toprak Mikrobiyolojisi ve Toprak Çeşitleri	3
2.2. Topraklarda Bulunan Mikroorganizmalar	4
2.3. Topraktan Aktinomiset İzolasyonu	4
2.4. Filum: <i>Actinomyces</i> (Aktinobakteriler).....	5
2.4. Aktinomisetlerin Sekonder Metabolitleri	6
2.5. Aktinomisetler ve Antibiyotikleri	8
2.5.1. Penisilinler.....	11
2.5.2. Sefalosporinler	11
2.5.3. Tetrasiklinler	11
2.5.4. Kinolonlar	12
2.5.5. Aminoglikozitler	12
2.5.6. Fativirasinler.....	12

2.5.7. Sefamisinler.....	13
2.5.8. Makrolitler.....	13
2.5.9. Sülfonamidler	13
2.5.10. Fluostatinler	13
2.5.11. Rifampin.....	14
2.5.12. Kloramfenikol.....	14
2.5.13. Linkomisin ve Klindamisin	14
2.5.14. Vankomisinler.....	14
2.5.15. Oligomisin	14
2.5.16. Sparsomisin.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
3.1. Gereçler.....	16
3.1.1. Standart bakteri ve maya suşları.....	16
3.1.2. Kullanılan besiyerleri.....	16
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	18
3.1.4. Kullanılan cihazlar	20
3.2. Yöntemler	21
3.2.1. Toprak örneklerinin toplanması.....	21
3.2.2. Toprak dilüsyon yöntemi ve izolasyon	21
3.2.3. Bakterilerin tanımlanması.....	21
3.2.3.1. Morfolojik tanımlama	21
3.2.3.2. Biyokimyasal tanımlama.....	22
3.2.3.2.1. Katalaz testi	22
3.2.3.2.2. API biyokimyasal tanımlama yöntemi.....	22
3.2.3.3. Moleküler tanımlama.....	24
3.2.4. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi.....	27
3.2.4.1. Disk difüzyon yöntemi.....	27
3.2.4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi	27
3.2.5. İzole edilen toprak kaynaklı bakteri kültürünün krom (Cr) toleransının belirlenmesi.....	28
3.2.6. Biyoaktif sekonder metabolit üretimi ve ekstraksiyonu	28
3.2.7. Metabolit ekstrenin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi	30
3.2.8. Metabolit ekstrenin antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi.....	30
3.2.9. Metabolit ekstrenin brine shrimp sitotoksitesi testi.....	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33

4.1. Toprakta Aktinomiset İzolasyonu Ve Morfolojik Tanımlama Sonuçları.....	33
4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları.....	34
4.3. Moleküler Tanımlama Sonuçları.....	35
4.4. İzolatın Antibiyotik Dirençliliği Sonuçları	37
4.5. İzolatın Krom Toleransı Sonuçları.....	39
4.7. Metabolit Ekstrenin Antibiyofilm Aktivitesi Sonuçları.....	40
4.8. Metabolit Ekstrenin Brine Shrimp Sitotoksitesi Sonuçları	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Aktinomiset grupları ve ürettikleri biyoaktif metabolit sayıları	8
Çizelge 2.2. Aktinomiset üyeleri tarafından üretilen klinik öneme sahip bazı antibiyotikler ve aktiviteleri	9
[Çizelge 2.2. (Devam) Aktinomiset üyeleri tarafından üretilen klinik öneme sahip bazı antibiyotikler ve aktiviteleri].....	10
Çizelge 2.3. Aktinomiset kaynaklı antibiyotiklerin yapılarına göre sınıflandırılması.....	10
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları.....	16
Çizelge 3.2. API 20 Strep kit çubuğu üzerindeki testler, testlerin içeriği ve enzim aktiviteleri.....	23
Çizelge 3.3. Moleküler tanımlamada kullanılan gen bölgeleri dizileri	25
Çizelge 3.4. PCR’da kullanılan bileşenler (Kit içeriği).....	26
Çizelge 3.5. PCR döngü programı.....	26
Çizelge 4.1. <i>Brevibacterium spp.</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen inhibisyon zon çapları.....	38
Çizelge 4.2. Biyoaktif metabolitin ve kontrol grubu antibiyotiklerin MİK değerleri.....	40
Çizelge 4.3. Antibiyofilm aktivite testi sonuçları.....	41
Çizelge 4.4. Brine Shrimp Sitotoksosite Testi sonuçları	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mikrobiyal kaynaklı biyoaktif metabolit üretimi deneysel basamakları	7
Şekil 4.5. İzolatların 27F dizi analiz kromatogramı	35
Şekil 4.6. İzolatların 1492R dizi analiz kromatogramı	35
Şekil 4.7. İzolatların nükleotid dizisi.....	36

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. API 20 Strep negatif test kiti	24
Görsel 3.2. API 20 Strep pozitif test kiti.....	24
Görsel 3.3. a) Fermantasyon sıvısından organik fazı ayırma işlemi; b) Rota evaporatör ile organik fazın uçurulması; c) Uçurma işlemi sonrası balon dibinde kalan ekstreler; d) Balon dibine yapışan ekstrelerin sonikatörde etil asetat eklenerek çözündürülmesi; e) Balonda artık kalan ekstrelerin çözündürülmesinde kullanılan etil asetatın tekrardan uçurulması için kullanılan vakumlu santrifüj cihazı	29
Görsel 3.4. a) <i>Artemia salina</i> kist görüntüleri; b) <i>Artemia salina</i> larva görüntüleri	32
Görsel 4.1. a), b), c) Aktinomiset izolatlarının <i>Gram</i> boyama sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.....	33
Görsel 4.2. Aktinomiset izolatlarının Petri Plağındaki koloni morfolojileri.....	33
Görsel 4.3. API 20 Strep enzimatik aktivite sonuçları.....	34
Görsel 4.4. API 20 Strep enzimatik aktivitesinin renk değişim sonuçları	34
Görsel 4.8. Sırasıyla, a) Amoksisilin; b) Kloramfenikol; c) Amfisilin; d) OFX-10; e)AmC-30; f) TEC-30; g) Sam-20; h) IPM-10; ı) B-0,04 antibiyotik disklerinin inhibisyon zon görüntüleri	37
Görsel 4.9. <i>Brevibacterium spp.</i> izolatının MİK sonuçları	38
Görsel 4.10. Sırasıyla, a) <i>Staphylococcus aureus</i> ; b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; c) <i>Streptococcus pyogenes</i> ; d) <i>Bacillus subtilis</i> ; e) <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; f) <i>Listeria monocytogenes</i> ; g) <i>Escherichia coli</i> ; h) <i>Candida albicans</i> ; ı) <i>Candida krusei</i> ve kontrol gruplarının renklenmiş plaka görüntüleri.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	:Alfa
α GAL	:6-bromo-2-naftil- α D-galaktopiranosit
API	:Analitik Profil Indeks (Analytic Profile Index)
ADH	:L-arjinin
AMD	:Nişasta
ARA	:L-arabinoz
ATCC	:Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
β	:Beta
β GUR	:Naftol asbiglukuronik asit
β GAL	:2-naftil β D-galaktopiranozit
BLAST	:Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
C.L.S.I.	:Klinik&Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical & Laboratory Standards Institute)
dk	:Dakika
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
DMSO	:Dimetil sülfoksit
ESC	:Eskulin-Ferrik Sitrat
GLYG	:Glikojen
HIP	:Hippurik Asit
INU	:İnulin
∞	:Sonsuz
KOB	:Koloni Oluşturan Birim

LAC	:D-laktoz
LAP	:L-lösin- β -naftilamit
MAN	:D-mannitol
mbar	:Milibar
MBEK (MBEC)	:Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
MİK (MIC)	:Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MHA	:Mueller Hinton Agar
MHB	:Mueller Hinton Broth
N.C.B.I.	:Ulusal Biyoteknoloji Bilgileri Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
N.C.C.L.S.	:Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
N.R.R.L.	:Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarı (Northern Regional Research Laboratory)
PAL	:2-naftil fosfat
PCR (PZR)	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PYRA	:Piroglutamik asit- β -naftilamit
RAF	:D-rafinoz
RIB	:D-riboz
RNA	:Ribo Nükleik Asit
rRNA	:Ribozomal RNA
rpm	:Dakikadaki devir (Rounds Per Minute)
SDA	:Saboroud Dekstroz Agar
SDB	:Saboroud Dekstroz Broth
sn	:Saniye

SOR	:D-sorbitol
TRE	:D-trehaloz
TSA	:Tyrpton Soy Agar
TSB	:Trypton Soy Broth
TAE	:Tris-asetat
VP	:Sodyum Piruvat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde yeni farmasötiklerin keşfi ve doğal yöntemlerle üretilmelerine yönelik çalışmalar, özellikle Aktinomiset grubu bakteriler ve sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Son yıllarda farmasötiklerin özellikle antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı sonucunda dirençli izolatların ve yeni patojen organizmaların ortaya çıkması, biyolojik aktiviteleri araştırılmış yeni farmasötiklerin keşfini zorunlu hale getirmiştir.

Artan dünya nüfusu, endüstriyel faaliyetler, doğanın bilinçsizce kullanımı ve tüketilmesi çok çeşitli çevresel sorunlara yol açmaktadır. Çevresel kirlilik oluşumu yanısıra tehlikeli ve yeni patojenlerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde, yeni yarı sentetik ve sentetik maddelerin kullanılmasını zorunlu hale gelmiştir. Ancak üretilen yeni kimyasalların üretim sürecinde doğanın kirlenmesi yanısıra, zaman zaman hastalık tedavisinde yetersiz kaldıkları da gözlemlenmiştir. Bu sorunların giderilmesi için doğru farmasötik kullanımı temel prensip olmalıdır. Doğru farmasötik kullanımı için izlenecek yol, ilaçların istenmeyen etkilerinin araştırılması, ilaç etkileşimlerinin en aza indirilmesi, yeni mekanizmaların belirlenmesi ve yeni farmasötiklerin geliştirilmesi olmalıdır (Özşen, 2009).

Son yıllarda, kullanımda olan antimikrobiyal ilaçlara karşı, ikili antibiyotik dirence sahip klinik mikroorganizmalar denendiğinde, tek yönlü antibiyotiklerin mikroorganizmalara karşı etkisinin yeterli olamadığı görülmüştür. Antibiyotiklere direnç kazanmış patojenleri kontrol altına almak için, biyolojik olarak aktif, yeni bileşikler keşfetmek gerekli olacağından, etki alanı daha geniş ve daha güçlü biyoaktif metabolitler üreten yeni mikroorganizmaların araştırılması önem kazanmaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Coğrafik konumu, iklimi ve topografik yapısıyla Türkiye, çeşitli toprak yapılarına sahiptir. Toprak, çok zengin organik ve inorganik içeriğinin yanısıra farklı mikroorganizma topluluklarına sahip bir ekosistemdir.

Topraktan farklı Aktinomiset üyelerinin izolasyonu, karakterizasyonu, antimikrobiyal, antibiyofil ve sitotoksik etki gösteren biyoaktif bileşiklerinin araştırılması amacıyla yapılan bu tez çalışmasında, örnek toplamak için özellikle işlenmemiş farklı habitat olması açısından orman toprakları tercih edilmiştir. Orman toprakları bir çok bitki ve hayvan artıklarının bulunduğu mikrobiyal popülasyon açısından çok zengin bir ortamdır. Türkiye'nin Çanakkale–Gelibolu ili ormanlık bölge açısından oldukça zengin ve işlenmemiş bölgeler olarak bilinmektedir.

Yapılan tez çalışmasında sadece medikal açıdan değil, endüstriyel ve tarımsal alanlarda potansiyel fayda oluşturabilecek yeni mikrobiyal metabolitlerin keşfedilmesine yönelik olarak izole edilen yeni Aktinomiset türleri ve biyoaktif metabolitleriyle çalışılmıştır. İzole edilen Aktinomiset üyesi türün antibiyotik dirençliliği farklı dozlardaki standart antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç ile belirlenmiştir. Tarım alanında fide-tohum gelişimi ve koruması için aşırı ve ayırt etmeksizin sentetik tarımsal kimyasalların kullanımı toprak ekolojisinde ve insan sağlığında olumsuz etkilere yol açmıştır (Duche, Iheukwumere ve Omoigui, 2015). Bu nedenle, bitki ve toprak kirliliğinin kontrolü için kimyasal yöntemler yerine kullanılabilecek yeni alternatif biyolojik yöntemlerin keşfi, son yıllarda ivme kazanmıştır. Kimyasal yöntemler yerine, mikrobiyal topluluklar kullanarak yapılan biyoremediasyon çalışmalarıyla çevre ve doğa kirliliğinin önlenmesi, bitki hastalıklarının çevresel etkisinin azaltılması mümkündür. Toprakta bulunan krom bitkiler ve diğer canlılar için potansiyel mutajen ve karsinogen olarak tanımlanan son derece toksik bir metal iyonudur. Bu amaçla, toprak kaynaklı bakterinin krom klorit ve potasyum kromat toleransı araştırılmıştır. İzole edilen bakteriden biyoaktif metabolit üretimi yapılmış, yeni antibiyotik aktif madde arayışı için çıkılan bu yolda, üretilen metabolitin antimikrobiyal, antibiyofilm ve sitotoksik etkileri de araştırılmıştır. Yaptığımız bu çalışma ile yeni, doğal ve etki mekanizmaları araştırılmış toprak kaynaklı mikroorganizmanın ve biyoaktif metabolitin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın Türkiye’de ve dünyada konu ile ilgili yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu tez kapsamında izole edilen Aktinomiset türünün özellikleri ve biyoaktif metabolitinin etkinlikleri ilk kez bu kadar kapsamlı çalışılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Toprak Mikrobiyolojisi ve Toprak Çeşitleri

Mikroorganizmalar yeryüzünde bitki ve hayvan gruplarından milyonlarca yıl önce ortaya çıkmış olup, tarih boyunca yeryüzündeki yaşam için en önemli canlı gruplarından biri olmuştur. Dünyadaki mikroorganizmaların çoğu toprak ya da toprak çevresi kökenlidir. Toprak; zengin organik ve inorganik besin içeren, çok kompleks, heterojen, sıvı-gaz gözeneklere ve yüksek mikrobiyal çeşitliliğe sahip bir çevredir (Matthew vd., 2010). Rizosfer; toprak ile bağlantılı bitki kökleri ve bitki kökü kalıntılarını içeren, mikrobiyal bağlantıların ve aktivitelerin yoğun olduğu dar toprak çevresi bölge olarak tanımlanır (Mendes, Garbeva ve Raaijmakers, 2013). Araştırmacılar daha önce yapılan çalışmalarla, toprakta bulunan bitki kalıntılarının, rizosferdeki mikroorganizmalar için uygun besin kaynağı olduğunu öne sürmüştür. Bu kalıntılar orada bulunan yerleşmiş mikrobiyal popülasyonun gelişim ortamı olarak kullanılır. Topraktaki mikroorganizmalar, besin döngüsünün başlangıç basamağına önemli katkı sağlayarak yeryüzündeki yaşamın görünmez kahramanları olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmaların özellikle tarımsal bölgelerde yoğun bulunmaları ve bitki büyümesini önemli bir şekilde olumlu yönde etkilemeleri mikroorganizmaların önemini artırmaktadır (Yang vd., 2011; Beneduzi, Ambrosini ve Passaglia, 2012; Paulitz vd., 2000; Kyuchukova vd., 2006). Topraktan izole edilen mikroorganizmalar yüksek miktarda antibiyotik üretiminde ve çeşitli hastalıkların diğer ilaçlar ile birlikte tedavisinde kullanılır (Demain ve Sanchez, 2009). Tarih boyunca toprak mikrobiyolojisinin gelişmesi, mikrobiyoloji biliminin gelişimi ile doğru orantılı ilerlemiştir.

Yeryüzü toprakları, Ekvatorial bölgedeki aşırı yağış alan laterit, Akdeniz bölgesindeki kırmızı olan Terra Rossa, orta kuşak nemli orman arazilerindeki orman toprakları, soğuk bölgelerdeki podzol, çöl toprakları, kireç ve tuz oranı yüksek bozkır, karasal bölgedeki çernozyum ve yılın büyük bir bölümünü donmuş olarak geçiren tundra toprakları şeklinde sınıflandırılabilir. Orman toprağı, orman örtüsü altında gelişmiş olan toprak türüdür. Orman topraklarının içeriğinde derin ağaç kökleri, orman ölü örtüsü ve bunların ayrışma ürünlerinin yanında orman vejetasyonuna bağlı özel organizmalar bulunmaktadır. Orman örtüsü altında gelişmiş topraklar, organik madde içeriği ve mikroorganizma çeşitliliği bakımından kendine özgü yapılara sahiptir. Ağaç kökleri, gövdeleri, dökülen yapraklar ve bunların ayrışmasından oluşan orman

ekosistemi orman topraklarına diğer toprak türlerinden ayrı yapısal özellikler ve organizma çeşitliliği kazandırmaktadır. Orman toprakları ile diğer tarım toprakları arasındaki farklardan en önemlisi, tarım topraklarının sürekli olarak işlenmesi, sulanması ve gübrenmesidir (Çepel, 1988).

2.2. Topraklarda Bulunan Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar yeryüzünde, bitki, hayvan ve diğer canlı gruplarından milyonlarca yıl önce ortaya çıkmışlardır. Mikroorganizmalar yeryüzündeki ilk canlı grubu olmalarının yanında diğer canlı gruplarının yaşamlarının başlangıcında ve devamında en önemli destekçiler olmuşlardır. Dünyadaki mikroorganizma türlerinin çoğu toprak kökenlidir. Bir gram topraktaki mikroorganizma sayısı bir ve dört milyon arasında değişmektedir. Toprak mikroorganizmalarının tümü edafon olarak tanımlanmaktadır. Toprak mikroflorasının oluşturan virüsler, bakteriler, mantarlar, algler, protistler organik ve inorganik madde degradasyonunu sağlayarak toprakları daha verimli hale getirmektedirler. Topraklarda bulunan mikroorganizma sayısı ve çeşitliliği toprağın, sıcaklığı, organik ve inorganik madde içeriği, pH ve bölgedeki tarımsal faaliyetlere göre değişiklikler göstermektedir.

Toprak bakterilerinin bir kısmı, topraktaki işlevlerine göre sınıflandırılacak olursa; *Bacillus* ve *Pseudomonas* grupları çürükçüller, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Gluconobacter*, *Flavobacterium* ve *Herbaspirillum* grupları azot fiksatorleri ve toprağı verimli hale getirerek, sekonder metabolitleri ile farmsötik endüstrisine çok büyük katkı sağlayan *Actinomyces* (Aktinobakteriler) grubu şeklinde sınıflandırılabilir (Reid ve Wong, 2005).

2.3. Topraktan Aktinomiset İzolasyonu

Toprak Aktinomistlerin en bol bulunduğu ortam olup, hemen hemen bütün toprak tiplerinde bulunmaktadır (Kutzner, Kroppensted ve Korn, 1986; Williams, Goodfellow ve Alderson, 1989). Aktinomisetlerin, bahçe toprağında bir metreye kadar, kumsal toprakta iki metreye kadar çok miktarda (Beijerinck., 1900) ve orman topraklarında aşağıya doğru 25-30 cm arasında bol miktarda bulundukları ortaya koyulmuştur. Hiltner ve Störmer 1903'de jelatin plak metodunu kullanarak Aktinomisetleri ilk defa saymışlar ve Aktinomisetlerin sayısının mevsime bağlı olarak değiştiğini bulmuşlar; onların toprak mikroflorasının %13-30'nu oluşturduğunu, mevsime bağlı olarak ilkbaharda %20, yazın %13 ve sonbaharda %30 olarak saptamışlardır. Bilimadamları, Aktinomisetlerin bitki köklerine zengin toprakların

mikrobiyal popölasyonlarının %40'ına kadar çıktıklarını; fakat, ekimi yapılan topraklarda onların sayılarının toplam mikrofloranın sadece %21'ini teşkil ettiğini saptamıştır. Topraktaki organik ve inorganik maddeleri parçalamalarından dolayı ekolojik rolleri büyüktür (Khan ve Williams, 1975; Kutzner, Kroppensted ve Korn, 1986; Williams, Goodfellow ve Simpson, 1987; Nielsen ve Winding, 2002). Toprakta en yoğun bulundukları yer organik horizondur (Labovitz ve Hagedorn, 1976). Çoğu toprakta, canlı mikroorganizmanın %1-20'sini, (Kutzner, Kroppensted ve Korn, 1986) Aktinomisetlerin ise %64-97' sini oluştururlar (Xu vd., 2010, Wang vd., 1999).

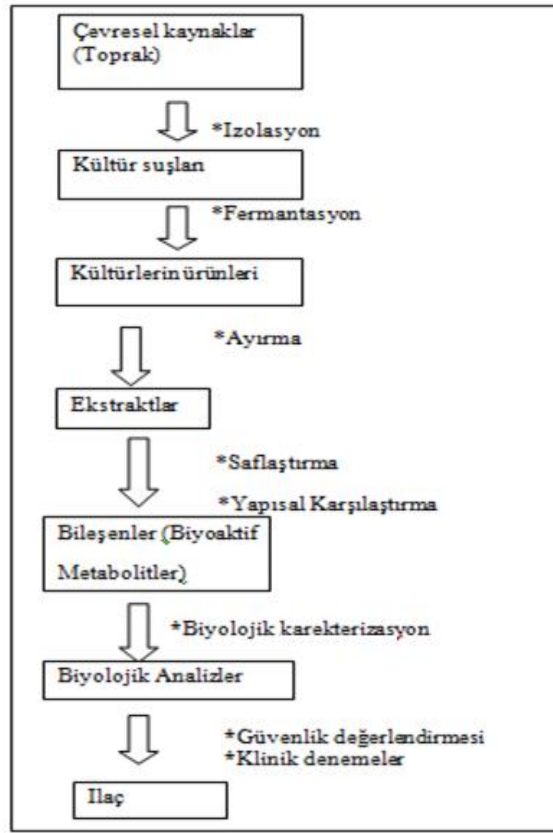
2.4. Filum: *Actinomycetes* (Aktinobakteriler)

Actinomycetes adı Yunanca “atkis” (ışın) ve “mykes” (fungus) kelimelerinin bir araya gelmesi ile oluşmuş, hem bakteri hem de mantar benzeri canlılar olarak tanımlanmaktadır (Das vd., 2008). Farklı ve en zor koşullarda yaşayabilen *Actinobacteria* ya da *Actinomycetes* çok çeşitli türleri ile *Bacteria* domaininin önemli gruplarından biridir (Stackebrandt, Rainey ve Rainey, 1997). Aktinobakteriler 16 sınıfa ayrılmıştır; *Actinomycetales*, *Actinopolysporales*, *Bifidobacteriales*, *Catenulisporales*, *Corynebacteriales*, *Frankiales*, *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Kineosporiales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Incertae sedis* (Chaudhary vd., 2013).

Aktinomisetlerin sayısı ve çeşitliliği, tarımsal kullanımlar sonucunda topraklarda artış göstermiştir. Topraklarda bulunan Aktinomisetler; *Brevibacterium*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Microbispora*, *Saccharopolyspora*, *Saccharomonospora* ve *Microtetraspora* olarak başlıca sınıflandırılabilir. Aktinomisetler; toprakta, bitki köklerinde ve rizosfer ekosisteminde önemli role sahip olan filamentli, Gram-pozitif, aerobik bakteri grubudur (Xue vd., 2013; Sardi vd., 1992). Hif benzeri yapılar şeklinde dallanarak gelişmeleri ile mantarlara benzemektedirler (Sprusansky vd., 2005). Yaş toprağa karakteristik kokusunu ve aromasını veren, geosmin biyomolekülünü üretmeleri tanımlayıcı özelliklerindendir (Flardh ve Buttner, 2009). Aktinomisetler karmaşık yapıları, çeşitli biyolojik aktiviteleri ve ürettikleri biyoaktif moleküller ile çok iyi bilinirler (Abdelmohsen vd., 2015). Aktinomisetler diğer bakteri gruplarından daha yavaş büyüme özellikleri ile ayrılır. Bazı grupları zor şartlarda büyüme konusunda oldukça esnektir.

2.4. Aktinomisetlerin Sekonder Metabolitleri

Mikrobiyal sekonder metabolitler arasında antibiyotikler, pigmentler, toksinler, enzim inhibitörleri, feromonlar, immün ajanlar, reseptör antagonist ve agonistleri, pestisitler, antitümöral ajanlar ile bitki ve hayvan büyüme promotörleri bulunmaktadır (Oskay, 2006). Moleküler filogenetik analizler, toprak ve rizosferin her gramında binlerce bakteri türü içerirken (Uroz vd., 2010), günümüzde sadece küçük bir bölümü kültüre edilip, biyoaktif sekonder metabolit üretimleri yapılmıştır. Kültür tabanlı çalışmalar, tek tür bakterinin *in vitro* koşullarda transkribe olmayan gizli gen parçalarında saklı kodları ile geniş kapsamlı sekonder metabolit üretebildiğini göstermektedir. Sekonder metabolitler direkt olarak bakterilerin büyümesi, gelişmesi ya da üremelerinde görevli değil, aynı zamanda diğer mikroorganizmalar ile olan ilişkileri düzenlemekle de çok önemli ekolojik role sahiptirler. Bakteri kaynaklı sekonder metabolit üretimi farklı çevresel faktörlerle gerçekleşir; besin, sıcaklık, pH, nem ve ışık bu faktörlerdendir. Sekonder metabolit üretimi sıcaklık ile, bakteri büyümesini olumsuz etkileyen karbon, azot, fosfat ya da diğer anahtar besin kaynaklarının azalması ile tehlikeye girer. Sekonder metabolitlerin ekolojik rolleri; büyüme inhibisyonu, sporulasyon faktörleri üretimi ve stimülasyonu, bitki büyüme faktörleri üretimi, çeşitli sinyaller üreterek farklılaşma sağlanması, hareket ve biyofilm oluşturmayı teşvik ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi şeklindedir (Tyc vd., 2017). **Şekil 2.1**'de görüldüğü gibi, mikrobiyal kaynaklı yeni biyoaktif (sekonder) metabolitin keşfinde, metabolitin üretimini artırmak için uygun koşullar altında mikroorganizmanın üretilmesini gerekmektedir. Bu metabolitler ekstrakte edilip, test edildikten sonraki aşamalarda, metabolit orijinal karışımdan izole edilmek ve çeşitli biyolojik testlerle tanımlanmak zorundadır.



Şekil 2.1. Mikrobiyal kaynaklı biyoaktif metabolit üretimi deneysel basamakları

Doğal ve endüstriyel uygulamalar ile birincil ya da ikincil metabolitler çeşitli bitki ve mikroorganizma gibi kaynaklardan elde edilebilir. Bu metabolitler çeşitli insan ve hayvan hastalıklarına karşı tedavi ve koruma amaçlı kullanılır (Pang vd., 2007). Yüzyıldan fazla süredir sekonder metabolitlerin zengin çeşitliliği toprak bakterileri tarafından sağlanmaktadır, kimyasal analizler ile ve gen sekanslama yöntemleri ile biyokimyasal yapıları bizim için daha anlaşılabilir olmuştur. Günümüzde farklı mikrobiyal metabolitlerin üretimleri, fizyokimyasal yapılarının aydınlatılması, ekolojik rollerinin araştırılması konusunda yapılan çalışmalar halen başlangıç aşamasında sayılabilir. Henüz bilinen yöntemlerle keşfedilmemiş farklı potansiyellere sahip pek çok metabolit mevcuttur.

Aktinomisetler çok çeşitli fazla miktarda farmasötik sekonder biyoaktif metabolit üretimleri ile bilinirler. Sentezi yapılan sekonder metabolitler immün düzenleyici, fungusit ve antikanser ajanlarıdır (Lima ve Melo, 2017; Huang vd., 2015). Aktinomisetler ayrıca antiviral (Sacramento vd., 2004), antibakteriyel, antifungal (Zarandi vd., 2009), antibiyofilm, antitümör (Hong vd., 2009), insektisit (Pimentel-Elardo vd., 2010), antioksidan (Janardhan vd., 2014), antiinflamator (Renner vd., 1999),

anti-biofiling (doğal ortamlarda oluşan karışık mikroorganizma tabakasını önleyen) (Xu vd., 2010), immun desteleyiciler (Mann, 2001), antiparazitikler (Pimentel-Elardo vd., 2010), bitki büyüme promotörleri ve herbisit maddeler (Sousa vd., 2008), enzim inhibitörleri (Hong vd., 2009) ve endüstriyel alanda önemli enzimler gibi çeşitli görevlerde ve yapılarda olabilirler. Aktinomisetler, sekonder metabolitlerini kendi doğal ortamlarında özellikle toprakta ve morfolojik değişimlerle üretmeye başlamaktadırlar (Vining, 1990). *Actinobacteria* sınıfı üyeleri, doğal antibiyotiklerin yaklaşık %70'inin oluşturarak, kayda değer bir şekilde kullanışlı pek çok biyoaktif metabolitin kaynağıdır (Raja vd., 2011). *Actinomycetales* grubunda bulunan bazı popüler sınıfların ürettiği biyoaktif metabolitlerin sayısı **Çizelge 2.1**'de gösterildiği gibi yaklaşık 1000 adettir.

Çizelge 2.1. Aktinomiset grupları ve ürettikleri biyoaktif metabolit sayıları (Sharma, Dangi ve Choudhary, 2014).

Aktinomiset Grupları	Sayıları
<i>Streptomyces</i>	8350
<i>Actinoplanetes</i>	1150
<i>Pseudonocardia</i>	700
<i>Streptosporangiaceae</i>	160
<i>Thermomonosporaceae</i>	630
<i>Actinobacteria</i>	310

2.5. Aktinomisetler ve Antibiyotikleri

Antibiyotiklerin tedavide ilk kez kullanımı 1928 yılında Alexander Fleming'in penisilini tesadüfen keşfetmesi ile başlamıştır. 1940' lı yıllarda az miktarda üretilen ham penisilin Stafilokok ve Streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Antibiyotik araştırmaları 1943 yılında Waksman'ın araştırma grubunun streptomisini bulmasıyla hız kazanmıştır. O yıllarda, Aktinomisetlerin tip türü *Streptomyces griseus*' dan elde edilmiş olan streptomisin tüberkülozun (verem) tedavisinde kullanılan ilk etkili antibiyotik olmuştur. Waksman ve arkadaşlarının bu önemli buluşundan sonra 1950 ve 1960'lı yıllarda çok sayıda antibakteriyel ve antifungal antibiyotikler keşfedilmiş, bu dönem antibiyotik keşiflerinin '*Altın Çağı*' olarak nitelendirilmiştir (Hopwood, 2004).

Aktinomisetler çeşitli ve günümüzde hala yaygın olarak kullanılan farklı etkilere sahip farmasötikler üretirler. Ürettikleri geniş spektrumlu biyolojik aktivitesi olan bazı sekonder metabolitler, antimikrobiyal (streptomisin, neomisin, kloramfenikol, eritromisin, rifampin ve vankomisin) dahil olmak üzere, immün baskılayıcı ajanlar (FK-

506, rapamisin ve askomisin), antidiyabetikler (akarboz), antihelmintikler (ivermektin ve milbemisin) ve antikanser ajanlar (bleomisin, daktinomisin, doksorobusin ve staurosporin) (Demain, 1999; Newman ve Cragg, 2004; Lima ve Melo, 2017). Klinik ve tarımsal açıdan önemli antibakteriyel, antifungal, antipoliferatif, immun destekleyici ve antiparaziter özelliğe sahip bazı antibiyotik grupları ve üretici üyeleri **Çizelge 2.2**'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Aktinomiset üyeleri tarafından üretilen klinik öneme sahip bazı antibiyotikler ve aktiviteleri (Chaudhary vd., 2013).

Antibiyotik Adları	ÜretildikleriAktinomiset Türleri	AntibiyotiklerinAktivitesi
Sagamisin	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	Antibakteriyel
Amiklenomisin	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Antibakteriyel
Metilenomisin	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Antibakteriyel
Roseoflavin	<i>Streptomyces davawensis</i>	Antibakteriyel
Minosaminomisin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibakteriyel
Libramisin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antifungal
Kandihekzin	<i>Streptomyces viridoflavus</i>	Antifungal
Nanaomisin	<i>Streptomyces rosa</i>	Antifungal
Purpuromisin	<i>Actinoplanes ianthinogenes</i>	Antifungal
Zorbonomisin	<i>Streptomyces bikiniensis</i>	Antifungal
Validamisin	<i>Streptomyces hygroscopicus 5008</i>	Antifungal
Rosamisin	<i>Micromonaspora rosaria</i>	Antibakteriyel
Rifamisin	<i>Micromonaspora rifamycinica</i>	Antibakteriyel
Platenomisin	<i>Streptomyces platensis</i>	Antibakteriyel
Linkomisin	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Antibakteriyel
Azalomisin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Antifungal
Azalomisin	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Antifungal
Streptomidon	<i>Streptomyces sp.</i>	Tarımsal kullanım
Kinamisin	<i>Streptomyces murayamaensis</i>	Antibakteriyel
Kuvaitimisin	<i>Streptomyces kuwaitinensis</i>	Antibakteriyel
Sarkomisin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antitümör
Salinomisin	<i>Streptomyces albus</i>	Antiparazitik
Antimisin	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Antifungal
Antimisin	<i>Streptomyces lucitanus</i>	Antifungal
Tomaymisin	<i>Streptomyces achromogenes</i>	Antiviral
Eritromisin	<i>Actinopolyspora sp.</i>	Antibakteriyel
Rapamisin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Anti-poliferatif

[Çizelge 2.2. (Devam) Aktinomiset üyeleri tarafından üretilen klinik öneme sahip bazı antibiyotikler ve aktiviteleri (Chaudhary vd., 2013).]

Miyomisin	<i>Nocardia sp.</i>	Antibakteriyel
Lomofungin	<i>Streptomyces lomodensis</i>	Antiviral
Sklerotrisin	<i>Streptomyces scleogranulatus</i>	Antifungal
Spoksamisin	<i>Streptosporangium oxazolinicum</i>	Antitripanozomal
Avermektin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Antiparazitik

Antagonistik Aktinomisetler kimyasal yapısı, antimikrobiyel aktivitesi, hayvanlara olan toksisitesi ve kemoterapotik potansiyelleri bakımından değişiklikler gösterirler. Aktinomisetlerden izole edilen antibiyotikler saflaştırma derecelerine göre farklılıklar gösterirler. Bazıları ekstre, bazılarının ise kristalleşmiş yapıda olmaları kimyasal yapıları hakkında bilgiler vermektedir (Waksman, Schatz ve Reynolds, 2010). Yapılarına göre sınıflandırılmış Aktinomiset kaynaklı antibiyotikler **Çizelge 2.3’de** verilmiştir.

Çizelge 2.3. Aktinomiset kaynaklı antibiyotiklerin yapılarına göre sınıflandırılması

Yapılar	Antibiyotikler	Kaynaklar
Amino glikozitler	Streptomisin ve Kanamisin	(Nanjawade vd., 2010)
Ansamisin	Rifampin	(Floss ve Yu, 1999)
Anthrasiklinler	Doksorubisin	(Kremerve Van Dalen, 2001)
Beta-laktam	Sefalosporinler	(Kollef, 2009)
Macrolitler	Eritromisin	(Harvery ve Champe, 2009)
Tetrasiklinler		(Harvery ve Champe, 2009)

Aktinomisetler, antibiyotik endüstrisinde ve sağlıklı beslenme alanında çok önemli roller oynayan çeşitli farmasötiklerin üretimi için en önemli destekçilerdendir (Magarvey vd., 2004). Dirençli patojenlere karşı etkili yeni antibiyotiklerin keşfi antibiyotik araştırmaları için önemli bir alandır. Yeni yapılara sahip, doğal ürünlerin kullanışlı biyolojik aktiviteleri olduğu gözlemlenmiştir (Dancer, 2004). Kimyasal sentezinde ve antibakteriyel maddelerin biyosentezinde önemli ilerlemeler olmasına rağmen, doğa hala en zengin, değişik ve antibiyotikler için kolay elde edilebilir kaynak olmaya devam ediyor (Koehn ve Carter, 2005; Baltz, 2006; Peláez, 2006; Bull ve Stach, 2007). Bugüne kadar binlerce antibiyotik keşfedilmesine rağmen, sadece bir kısmı insan ve hayvanlar için toksik değildir. Bu problemin aşılması için toksik etkisi olmayan yeni antibiyotikler keşfedilmelidir. Bir başka sağlık problemi ise antibiyotik dirençliliğidir.

Bu duruma özellikle çoklu-ilaç dirençli patojenlere karşı yeni antibiyotikler keşfederek acilen çözüm getirilmelidir (Alanis, 2005; Sharma vd., 2011). Günümüzde kullanılan Aktinomiset kaynaklı antibiyotikler;

2.5.1. Penisilinler

Penisilin yapısal olarak tiazolidin ve β -laktam halkası içermektedir; bu yapıya 6-aminopenisillanik asit denmektedir (Batchelor, Dewdney ve Gazzard, 1965). Penisilin, bakteriyel hücre duvarının peptidoglikan tabakanın yapısal komponentlerinin sentezini engeller. Konak hücre metabolizmasını etkilemezken, bakteriyel enfeksiyon için en etkili gruplardan biridir. Anaerobik *Gram* pozitif bakterilere karşı çok etkili olup, aerobik *Gram* pozitif bakterilere karşı daha az etki göstermektedir. Streptokok, Stafilokok, *Pasteurella multocida*, *Neisseria*, *Clostridia* gibi enfeksiyonlarda tavsiye edilmektedir (Park ve Strominger, 1957). Penisilin V asilazın *Streptomyces lavendulae* tarafından yüksek dozlarda üretildiği bilinmektedir (Torres vd., 1999).

2.5.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler farmakolojik ve yapısal olarak penisilinlere benzer yapıda olup en çok önerilen sınıftır. Penisilinler gibi β -laktam halkasına sahip olup, bakteriyel hücre duvarını etkileyip bakterileri öldürebilirler yani bakterisidal etkilidirler. Penisilinlerden farklı olarak β -laktam halkaları 6-üyelı dihidrotiazin halkalarıdır. *Gram* pozitif ve *Gram* negatif bakterilerin özellikle, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella sp.* sebep olduğu hastalıklarda önerilirler. *Streptomyces clavuligerus* tarafından üretildikleri bilinmektedir (Rius ve Demain, 1997; Xiao, Wolfe ve Demain, 1991; DePestel vd., 2008).

2.5.3. Tetrasiklinler

Tetrasiklin molekülleri farklı fonksiyonel grupları bağlanmış linear tetrasiklik çekirdeği içermektedir. 4 farklı hidrokarbon halkalarına göre adlandırılırlar. Aminoasil-tRNA'nın ribozomal akseptör bölgesine bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe ederler. Tetrasiklinler geniş spektrumlu ajanlar olup *Gram* pozitif ve *Gram* negatif bakterilere, *Chlamydiae*, *Mycoplasmas* ve *Rickettsiae*, ve protozoon parazitlere karşı etkilidir. İlk kez Benjamin Duggar, tarafından 1945 yılında *Streptomyces aureofaciens* bakterisinden izole etmiştir (Darken vd., 1960; Blackwood vd., 1963; Chopra ve Roberts, 2001).

2.5.4. Kinolonlar

Kinolonlar bakterisidal ve konsantrasyona bağı etki göstererek bakteriyel topoizomerazları inhibe edici etki gösterirler (Hardman vd., 1996). Bakteriyel DNA girazı, topoizomeraz IV'ü, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli enzimlerin aktivitesini hedef alır. İlk kinolonlar örneğin; nalidiksik asit, *Gram* negatif bakteriler üzerinde az etkisi varken, bir sonraki jenerasyonların da örneğin florokinolonlar (siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, lomefloksasin, ve enoksasin), *Gram* negatiflere karşı iyi etki gösterirler. Yeni kinolonlar (levofloksasin, sparfloksasin, trovafloksasin, ve grepafloksasin) geniş spektrumlu ajanlar olup *Gram* pozitif ve negatiflere karşı güçlü etki gösterirler. Kinolonlar özellikle *Helicobacter pylori*'lere karşı etkilidirler. Kinolonlar Aktinomiset olan *Pseudonocardia sp.* tarafından üretilirler (Dekker vd., 1998; Smith, 1986; Siegmund vd., 2005).

2.5.5. Aminoglikozitler

Aminoglikozit molekülü, bir ya da birkaç aminlenmiş şekerin glikozidik bağlarla dibazik siklik halkası oluşturmaktadır (Mingeot-Leclercq, Glupczynski ve Tulkens, 1999). Aminoglikozitler en iyi ribozomal RNA'ya bağlanmalarıyla karakterize edilirler. Ribozom translokasyonunu ve translasyonunu azaltır (Davies, Gorini ve Davis, 1965; Davies ve Davis, 1968). *Gram* negatiflerin sebep olduğu bazı ciddi enfeksiyon hastalıkları için iyi bir tedavidir. Mikroorganizmadaki protein sentezini inhibe eder, konsantrasyona bağı bakterisidal etki gösterirler (Bryan ve Van Den Elzen, 1977). *Streptomyces spp.* (*Streptomyces kanamyceticus*, *Streptomyces spectabilis*, *Streptomyces tenjimariensis*) ve *Micromonospora sp.* tarafından izole edilirler. Aminoglikozitler *Streptomyces* cinsinden izole edilirse suffix-masin, *Micromonaspor*'dan izole edilir ise suffix-misin olarak adlandırılır (Benveniste ve Davies, 1973).

2.5.6. Fativirasinler

Fativirasinler makrosiklik diester olup 4-D-glukoz birimi, 2-hidrooksi yağ asidi, içerirler. Fativirasinler, EC50'ye göre çok az µg/mL miktarlarda DNA virüslerine özellikle herpes ailesine HSV-1, VZV, RNA virüslerine karşı örneğin İnfluenza A ve B virüsleri ve 3 çeşit HIV-1'e karşı etkilidirler. Fativirasinler *Streptomyces microflavus* tarafından üretilirler (Uyeda, 2003).

2.5.7. Sefamisinler

Sefamisinler, Aktinomisetlerin ürettiği sefem yapısı ile β -laktam antibiyotikleridir. Sefalosporinler dışında sefamisinler anaerobik mikroplara karşı çok etkilidirler. *Streptomyces clauligerus* ve *Nocardia lactamdurans* tarafından üretilirler (Miller vd., 1972; Fuente, Martin ve Liras, 1996). Sefalosporin ve penisiline dirençli olan mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu etki gösterirler (Stapley vd., 1972).

2.5.8. Makrolitler

Makrolitler geniş glikozidik bağlarla bağlanmış 12-16 atom ve bir ya da iki şekerden oluşmuş laktam halkalarıyla tanımlanırlar (Mazzei vd., 1993). Nefes borusu, deri, yumuşak deri ve genital sistemlerdeki *Gram* pozitif enfeksiyonlarda, *Gram* negatif ve anaerobik bakterilerin tedavisinde kullanılırlar. Birçok Streptomiset türünden elde edilirler. Ribozomlardaki protein sentezini inhibe ederler (Brisson-Noël, Trieu-Cuot ve Courvalin, 1988). Makrolitler, eritromisin grubu antibiyotikleri (azitromisin, klaritromisin, diritromisin, roksitromisin, fluritromisin, josamisin, rokitamisin, kitasamisin, misinamisin, mirosamisin, oleandomisin, rosaramisin, spiramisin ve tilozin içerirler (Alvarez-El ve Enzler, 1999). *Streptomyces venezuela* tarafından üretilirler (Xue vd., 1998).

2.5.9. Sülfonamidler

Sülfonamidler, radikal SO_2NH_2 maddesi içeren organik sülfür maddeleridir. Antimikrobiyal ajanlar olup bakteri gelişimini engellerler ve sülfü ilaçları olarak adlandırılırlar (Henry, 1943). Bakteriyel septisemiler, dokulardaki Streptokok ve *Nocardia* benzeri mantar enfeksiyonlarını tedavi eden ilk antibiyotiktir. Bakteri enfeksiyonlarında, diabette, hipertansiyonda ve gut hastalığında da kullanılır (Weinstein, Madoff ve Samet, 1960). *Streptomyces spp.* tarafından üretildiği bilinir (Fukuda vd., 2009).

2.5.10. Fluostatinler

Fluostatinler adını içerdiği fluorenon kromofordan alır. İnsan tümör hücrelerine etkilidirler. *Streptomyces spp.* tarafından üretildiği bilinir (Akiyama vd., 1998; Baur vd., 2006; Schneider vd., 2006).

2.5.11. Rifampin

Rifampin, rifamisin grubundan hem intraselüler hem de ekstraselüler organizmalarda etkili antibiyotiktir. *Amycolatopsis rifamycinica* (*Amycolatopsis mediterranei*) ve *Streptomyces mediterranei* tarafından yarı-sentetik olarak üretilirler. Geniş spektrumlu antibiyotik olup özellikle Mikobakterilere karşı etkilidirler. RNA sentezini baskırlar (Atlas ve Turck, 1968; Kunin, Brandt ve Wood, 1969; Farr, 2000).

2.5.12. Kloramfenikol

Kloramfenikol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) geniş spektrumlu protein sentezi inhibitörüdür fakat bakteriyostatik etkilidir. 1940'lı yıllarda Bolivia'da tifo hastalığının tedavisinde ilk kez kullanılmıştır. *Streptomyces venezuelae* tarafından üretilir (Ahmed ve Vining, 1983; He vd., 2001).

2.5.13. Linkomisin ve Klindamisin

Linkomisin, *Streptomyces lincolnensis* tarafından üretilen linkosamit antibiyotığıdır. Linkomisin ve kliniksel analogu olan klindamisin birçok Gram pozitif bakterilere etkili olup, Gram negatiflere karşı etkisizdir (Verdier vd., 2000; Michalik vd., 1975).

2.5.14. Vankomisinler

Vankomisin, Gram pozitif etkilidir. Veteriner ve insan sağlığında kullanılırlar. Enzim inhibitörüdürler. *Streptomyces sp.* tarafından üretildiği bilinir (Chatterjee vd., 1995; Pusecker vd., 1997).

2.5.15. Oligomisin

Oligomisin makrolit antibiyotiklere benzemektedir. Birçok Streptomiset, *Streptomyces avermitilis* (Lin vd., 2009) ve *Streptomyces griseolus* (Grammatikova vd., 2003) tarafından üretilirler.

2.5.16. Sparsomisin

Sparsomisin sitotoksik etkili bir ilaç olup, birçok tümör hücre hatlarına karşı geniş spektrumlu etki göstermektedir (Zylicz vd., 1987). Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde protein sentezini bloklayarak antitümöral antibiyotik etkisi gösterir (Lazaro vd., 1991). İlaça dirençli bakteri olan *Streptomyces sparsogenes* tarafından üretilir (Cundliffe, 1989).

Aktinomisetlerin ürünleri sadece potansiyel terapötik aktivitelerin yanı sıra önemli farmakokinetik özellikleri ile de klinik gelişimin önemli parçasıdır (Farnet ve Zazopoulos, 2005). Ayrıca sadece farmasötik endüstrinin değil, tarım için de önem arz etmektedir. Aktinomisetler bazı bitki patojenlerinin *Erwinia amylovora* ve *Agrobacterium tumefaciens* gelişimlerinin önlenmesine de yardımcı olmaktadır (Jeffrey, 2008; Oskay, Same ve Azeri, 2004). Aktinomisetler, ölü bitkilerdeki, hayvan ve mantarlardaki karmaşık polimer yapıları ayırıştırarak tohum gelişimi için faydalı olacak ekstraselüler enzimleri üretirler. Bunun yanı sıra, Aktinomisetlerin biyolojik tamponlanmış topraklara, azot fiksasyonu ve ağır metaller indirgemesi ile toprak kirlenmesinin önlenmesine büyük katkı sağlamaktadır (Srinivasan, Laxman ve Deshpande, 1991; Suzuki vd., 1994). Aktinomisetler çok farklı biyolojik aktiviteye sahip olup örneğin; kozmetik, vitamin, besin maddeleri, herbisit, antibiyotik, pestisit, antiparazitik ve selüloz, ksilenaz enzimleri başta olmak üzere birçok farklı aktiviteye sahip sekonder metabolit sentezi yapabilme kapasiteleri vardır (Ogunmwonyi vd., 2010). Aktinomisetler ayrıca, melanin ya da melanoit gibi koyu pigmentleri salgılar ve sentezler (Zenova, 1965; Arai ve Mikami, 1972; Amal vd., 2011). Bu melanin maddeleri, düzensiz, koyu kahverengi polimerler olup, canlıları UV ışınlarına karşı korur ve antioksidan özellikleri de vardır (Romero-Martinez vd., 2000). Melaninler genellikle tıp, farmakognozi ve kozmetik ürünleri için kullanılır (Quadri ve Asgar, 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Standart bakteri ve maya suşları

Toprakтан izole edilen mikroorganizmaların, üretilen biyoaktif metabolitin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerinin tespiti için, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan test mikroorganizma kültürleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizma kültürleri **Çizelge 3.1**'deki gibidir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları

Tür adı	Kod
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B478
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 13615
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258

3.1.2. Kullanılan besiyerleri

Besiyeri 1: Aktinomisetlerin Kültür Ortamı

Dekstroz	4 g/L
Yeast Ekstrakt	4 g/L
Malt Ekstrakt	10 g/L
Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃)	2 g/L
Agar	20 g/L
Distile Su	1 L
pH	7,3

Besiyeri 2. Muller-Hinton Broth (MHB)

21 g Muller-Hinton Broth (TSB, Merck) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak steril edilmiştir. Katı besiyeri için besiyeri içeriğinin %2'si kadar agar eklenmiştir.

Besiyeri 3. Saboroud Dekstrozo Broth (SDB)

65 g Muller-Hinton Broth (TSB, HiMedia) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak steril edilmiştir. Katı besiyeri için besiyeri içeriğinin %2'si kadar Agar eklenmiştir.

Besiyeri 4. Trypton Soy Broth (TSB)

30 g Triptik Soya Broth (TSB, Oxoid) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak steril edilmiştir. Katı besiyeri için besiyeri içeriğinin %2'si kadar Agar eklenmiştir.

Besiyeri 5. Fermantasyon ortamı (Bitoaktif metabolit üretim ortamı)

Glikoz	4 g/L
Yeast Ekstrakt	4 g/L
Malt Ekstrakt	10 g/L
Kalsiyum Karbonat (CaCO ₃)	2 g/L
Dipotasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	1 g/L
Demir sülfat (FeSO ₄)	0,001 g/L
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	1 g/L
Sodyum klorür (NaCl)	1 g/L
Agar	20 g/L
Distile Su	1 L
pH	7,4

Besiyeri 6. Pepton-Yeast (Maya) Ekstrakt Agar (PYE)

Pepton	5 g/L
Yeast Ekstrakt	3 g/L
Agar	20 g/L

Besiyeri 7. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Sodyum klorür (NaCl) 9 g/L

Distile Su 1L

Deney aşamalarında steril olarak kullanılması gereken tüm cam, plastik sarf malzemeler ve besiyeri içerikleri distile suda çözülerek, pH ayarlamaları yapıldıktan sonra, otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C’de, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Gram Boyama Seti, (Kristal Viyole, Gram İyodin, Etanol, Safranin), (Norateks Gram Boyama Seti)
- Glikoz, (Sigma)
- Dekstroz, (Sigma)
- Sodyum klorür, (Sigma)
- Pepton, (Merck)
- Malt Ekstrakt, (Himedia)
- Krom klorit, (Sigma)
- Dimetil sülfoksit, (Zag Kimya)
- Etil asetat, (Merck)
- Kalsiyum karbonat, (Sigma)
- Dipotasyum fosfat, (Sigma)
- Potasyum kromat, (Sigma)
- Demir sülfat, (Sigma)
- Magnezyum sülfat, (Sigma)
- Agar, (Himedia)
- Yeast Ekstrakt, (Himedia)
- Resazürin, (Alfa Aesar)
- Hidrojen peroksit, (Sigma)
- Tris-asetat, (Thermo)
- Ketokonazol, (Sigma)
- Kloramfenikol, (Sigma)
- Amoksisilin, (Across)
- Amfisilin, (Sigma)
- Standart Antibiyotik Diskler, (Oxoid)
- Agaroz, (AppliChem)

3.1.4. Kullanılan cihazlar

- Binoküler Işıık mikroskobu (3144002045, CARL ZEISS-Almanya)
- Otoklav, (HV 50L-Hirayama-Hindistan)
- Steril Kabin, (Heraeus HeraSafe-Almanya)
- Mikrobiyolojik Etüv, (FD53,WTC Binder-Hollanda)
- Su Banyosu, (11370, TERMAL-Türkiye)
- PCR, (Applied Biosystems-İngiltere)
- Sonikatör, (4235,Bandelin Sonorex-Almanya)
- Buzdolabı, (27050EB, Arçelik-Türkiye)
- Saf Su Cihazı, (01-0489,Nüve-Türkiye)
- pH metre, (PH211, Hanna-İngiltere)
- Analitik Terazı, (Ohaus AV812-Türkiye)
- Sanger dizileme cihazı, (ABI 3730XL,Seqgen-Amerika)
- Hassas Terazi, (CP2250, Sartorius-Türkiye)
- Vorteks, (TTS 2-Yellowline Jeiotech-Kore)
- Mc Farland Densitometre, (DEN 1B-Biosan-Letonya)
- Rota Evaporatör, (Heidolph-Almanya)
- Vakumlu Santrifüj Evaporatör (Labconco Centrivap-Amerika)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Toprak örneklerinin toplanması

Aktinomiset izolasyonunda kullanılan toprak örnekleri Türkiye'nin Çanakkale-Gelibolu ilindeki orman bölgelerinden toplanmıştır. Örnekleme Aktinomisetlerin çevresel istekleri göz önüne alınarak organik maddece zengin, nemli ve verimi bölgelerden yapılmıştır. Toprak örnekleri yerin 10-15 cm altından alınıp, steril polietilen naylon torbalar içinde laboratuvara getirilmiş ve örnekler hemen çalışmaya alınmıştır.

3.2.2. Toprak dilüsyon yöntemi ve izolasyon

Alınan her toprak örneğinden 10 g tartılmıştır ve üzerlerine 20 mL % 0,9'luk NaCl çözeltisi eklenip 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Toprağın dibe çökmesi için 5 dakika bekletilip steril kapaklı tüplere örneğin (toprağın) süpernatant (sıvı) kısımları süzdürülmüştür. Böylece toprağın içerisinde bulunan daha ağır maddeler dibe çökerken, süpernatant yani sulu kısımda izolasyonu yapılacak mikroorganizmalar kalmıştır. Süzdürülen örneklerden 1 mL alınıp 10^{-5} 'e kadar 9 mL distile sulu tüpler içerisinde dilüsyon (sulandırma) yapılmıştır. Her dilüsyon tüpünden 100 µL alınıp önceden hazırlanmış Aktinomiset izolasyon besiyerlerine 3 paralel şekilde tek koloni için çizgi ekim yapılmıştır. Kültürler 37°C sıcaklıkta 3-5 gün kadar inkübe edilmiştir (Yen, Hsiao ve Chen, 2013). İnkübasyon sonrasında oluşan farklı koloniler tespit edilmiş ve çizgi ekim işlemine devam edilerek saflaştırılmıştır. İzolasyonu yapılan bakteriler diğer deney basamaklarında kullanılmak üzere MHA ve TSA besiyerlerine ekilmiştir.

3.2.3. Bakterilerin tanımlanması

3.2.3.1. Morfolojik tanımlama

Bakteri izolatları temiz lam üzerine çekilmiş, Gram boyama metodu uygulanarak saflık ve morfolojik tayinleri yapılmıştır. Lam üzerindeki izolatlar sırayla önce kristal viyole boyası ile 60-90 sn, lugol (Gram iyodin) boyası ile 60-90 sn, etanol ile 10-30 sn ve safranin boyası ile 60 sn kadar muamele edilmiştir her işlem arasında distile su ile yıkanmışlardır ve kurumaya bırakılmıştır. Lamalar kuruduktan sonra ışık mikroskobu altında görüntüler 25x, 40x ve 100x objektifle büyütülerek kolonilerin morfolojik yapıları incelenmiştir.

3.2.3.2. *Biyokimyasal tanımlama*

3.2.3.2.1. *Katalaz testi*

MHB besiyerine hazırlanmış izolatlar temiz lam üzerine 1 mL damlatılarak üzerine 1 damla %3'lük H₂O₂ eklenmiştir. Oksijen kabarcığı oluşturan kültürler pozitif, aynı şekilde kalıp reaksiyona girmeyenler ise negatif olarak tanımlanmış ve sonuçlar bu bilgiye göre değerlendirilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır.

3.2.3.2.2. *API biyokimyasal tanımlama yöntemi*

Testte BioMérieux markalı API 20 Strep kiti kullanılmıştır. API 20 Strep, geniş kapasiteye sahip 20 kimyasal testi kombine eden standartlaştırılmış bir metodudur. API 20 Strep stribi, şekerlerin enzimatik aktivitesi ya da fermentasyonunun belirlenmesi için dehidrate substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Test edilen şekerlerin isimleri **Çizelge 3.2**'de verilmiştir. Enzimatik testler, enzimatik substratları yeniden hidrate etmek için kullanılan saf bir kültürden yapılmış yoğun bir organizma süspansiyonu ile inoküle edilmiştir. İnkübasyon periyodu sırasında ortaya çıkan metabolik son ürünler spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişiklikleri kaydedilmiştir. Reaksiyonlar, okuma tablosu'na göre okunur ve tanımlama, analitik profil indeksin bilgisayar tanımlama programı kullanılarak elde edilmiştir.

Testi yapılacak olan izolalar katı besiyerinde geliştirilip, kit içeriğinde bulunan 2 mL'lik API Süspansiyon Medium ortamına aktarılmıştır. Süspansiyon vorteks mikserde homojenize edilip, kültür McFarland 4'e (1.2x10⁹ KOB/mL) ayarlanmıştır. Kültürler test stribinde bulunan VP (Sodyum Piruvat), HIP (Hippurik Asit), ESC (Eskulin - Ferrik Sitrat), PYRA (Piroglutamik asit - β-naftilamit), αGAL (6-bromo-2-naftil- αD-galaktopiranosit), βGUR (naftol asbiglukuronik asit), βGAL (2-naftilβD- galaktopiranozit), PAL (2-naftil fosfat), LAP (L-lösin-β-naftilamit), ADH (L-arjinin), RIB (D-riboz), ARA (L-arabinoz), MAN (D-mannitol), SOR (D-sorbitol), LAC (D-laktoz), TRE (D-trehaloz), INU (İnulin), RAF (D-rafinoz), AMD (Nişasta), GLYG (Glikojen) kuyucuklarına inokülasyon yapıldıktan sonra mineral yağ ile kaplanmıştır (**Görsel 3.1**) Testlerin içeriği ve enzim aktiviteleri **Çizelge 3.2**'deki gibidir. İnokülasyon işlemi bitmiş olan stripler, test sisteminde yer alan özel kutularına yerleştirilerek 37°C'lik etüvde 24- 48 saat bekletilmiş, bu sürenin sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir. İnkübasyon sırasında, metabolizma sonucu spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle renk değişimi oluşmaktadır. İnkübasyon sonunda kit üzerinde kuyucukların renk değişimlerine göre sonuçlar +/- (var/yok) şeklinde değerlendirilmiştir (**Görsel 3.2**). Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır

Çizelge 3.2. *API 20 Strep kit çubuğu üzerindeki testler, testlerin içeriği ve enzim aktiviteleri*

API 20 Strep Kit Çubuğu Üzerindeki Test	Testin içeriği	Enzim aktivitesi
VP	Sodyum Piruvat	Asetoin üretimi (Voges Proskauer)
HIP	Hippurik Asit	Hidroliz
ESC	Eskulin	β -glukozidaz hidrolizi
	Ferrik Sitrat	
PYRA	Piroglutamik asit	Pirolidonil Arilamidaz
	β -naftilamit	
α GAL	6-bromo-2-naftil- α D-galaktopiranosit	α -Galaktozidaz
β GUR	naftol asbiglukuronik asit	β -Glukuronidaz
β GAL	2-naftil β D-galaktopiranozit	β -Galaktozidaz
PAL	2-naftil fosfat	Alkalın fosfotaz
LAP	L-lösin- β -naftilamit	Lösin Aminopeptidaz
ADH	L-arjinin	Arjinin Dihidrolaz
RIB	D-riboz	Asidifikasyon
ARA	L-arabinoz	Asidifikasyon
MAN	D-mannitol	Asidifikasyon
SOR	D-sorbitol	Asidifikasyon
LAC	D-laktoz	Asidifikasyon
TRE	D-trehaloz	Asidifikasyon
INU	İnulin	Asidifikasyon
RAF	D-rafinoz	Asidifikasyon
AMD	Nişasta	Asidifikasyon
GLYG	Glikojen	Asidifikasyon



Görsel 3.1. API 20 Strep negatif test kiti*

* İnokülasyon öncesi kitin görünümü ve (-) reaksiyon görüntüsü



Görsel 3.2. API 20 Strep pozitif test kiti*

*İnokülasyon sonrası (+) reaksiyon görüntüsü

3.2.3.3. Moleküler tanımlama

16s rRNA gen sekanslama mikroorganizmlar arasında filogenetik sınıflandırma yapmak için kullanılır (Stackebrandt, Rainey ve Rainey, 1997). 1550 baz çifti uzunluğundaki 16s rRNA gen sekanslama farklı ve korunmuş bölgelerdedir.

İzolatların moleküler tanımlamaları Ankara'da bulunan BM Laboratuvarı (BM Yazılım Danışmanlık Ve Laboratuvar Sistemleri) kapsamında yapılmıştır. Topraklatan izole edilen bakteri izolatları MHA besiyerlerine ekilip, geliştirildikten sonra iyi koloniler seçilmiştir. Hücrelerden DNA izolasyonu üreticinin direktifleri doğrultusunda hazır kit ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyon işlemi Eures Bakteri DNA izolasyon kiti (Cat.no.E3580) protokolüne uygun yapılmıştır. Deney aşamasında eklenen tüm solüsyonlar kit içeriğinde bulunan solüsyonlardır. Bu solüsyonlar ile DNA'nın tüpler içine özel olarak yerleştirilen matriks tabakasına tutunması sağlamaktadır. Aynı aşamada DNA haricindeki moleküller matrikse tutunamadığı için ortamdan uzaklaşır ve DNA izolasyonu gerçekleştirilir.

Ticari kit prensibine göre, seçilen koloni tüp içerisinde lizis BG solüsyonunun 200 µLsi ile karıştırılmıştır. Üzerlerine 50 µL tampon BL ve 2 µL RNaz A solüsyonu eklenip 3 saniye vortekslenmiştir. Karıştırma işleminden sonra 15 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üzerlerine 15 µL proteinaz K solüsyonu eklenip yine 3 saniye vortekslenmiştir. Karıştırma işleminden sonra 30 dakika 55°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üzerlerine 350 µL BG solüsyonu eklenip yine 3 saniye vortekslenmiştir. Karıştırma işleminden sonra 5 dakika 55°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüp 15 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra, 11,000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

Santrifüj işleminin ardından tüpteki supernatant kısmından 600 µL alınarak kit içeriğinde bulunan DNA binding spin-column (DNA bağlayıcı çöktürücü kolon) tüp sistemine aktarılmıştır. Ve tüp 11,000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Tüp sisteminin altında bulunan parça tüp atılıp, üstünde kalan parçanın içerisindeki karışım yeni bir DNA binding spin-column tüp sistemine aktarılıp 11,000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Tüp sisteminin altındaki parça yine atılıp, üstteki tüp içeriği yeni DNA binding spin-column sistemine aktarılmıştır. Yeni tüpün üzerine 450 µL yıkama BGX tampon eklenip, 11,000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Tüp sisteminin altındaki parça yine atılıp, üstteki tüp içeriği yeni DNA binding spin-column sistemine aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra 11,000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir ve tüp içeriğindeki yıkama BGX tamponu dökülerek uzaklaştırılmıştır. Karışım yeni ve steril bir tüpe aktarılarak üzerine 50-100 µL yıkama tamponu eklenip, DNA bağlarının elüsyonu sağlanmıştır.

Elde edilen mikroorganizma DNA’larından PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile hedeflenen DNA bölgesi çoğaltılır. DNA replikasyonu PCR amplifikasyonuna dayanan bir işlemdir. Replikasyon sırasında, DNA molekülünün çift sarmal yapısı çözülerek açılır ve her iplik, yeni bir tamamlayıcı ipliğin sentezi için kalıp olur. Her yavru molekül bir eski bir de yeni DNA ipliğinden oluşur ve ana molekülün birebir kopyasıdır. Çalışmada, 27F/1492R universal primer seti kullanılmıştır. 16S rRNA geni yaklaşık 1450 baz çifti uzunluğundaki bir bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. PCR işlemi Solis Biodyne FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Kullanılmış primer adları ve dizileri **Çizelge 3.3**’te verilmiştir. Kullanılan PCR reaksiyon bileşenleri ve döngü programı **Çizelge 3.4** ve **3.5**’da verilmiştir.

Çizelge 3.3. Moleküler tanımlamada kullanılan gen bölgeleri dizileri

Primer Adı	Dizisi (5’->3’)
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Çizelge 3.4. PCR'da kullanılan bileşenler (Kit içeriği)

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyon Konsantrasyonu	Hacim (µL)
PCR Tampon (Solis Biotek)	10X	1X	3,5
MgCl ₂ (Solis Biotek)	25mM	2,0 mM	2,8
dNTP Karışımı (Solis Biotek)	20 mM	0,2 mM	0,35
Primer- 27F	10 µM	0,5 µM	1,75
Primer- 1492R	10 µM	0,5 µM	1,75
Taq DNA Polimeraz (Solis Biotek)	5U/ µl	2 U	0,40
PCR saf su			22,45
DNA			2

Çizelge 3.5. PCR döngü programı

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
95	5 dk.	1
95	40 sn.	
56	40 sn.	35
72	60 sn.	
72	5 dk.	1
8	∞	

Elde edilen PCR ürünleri 1xTAE tampon ile hazırlanan %1 agaroz jelde 100 volt akımda 80 dakika elektroforezde yürütülmüştür ve etidyum bromid boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. PCR ürünü saflaştırma için, normal tek bant örnekler için ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent saflaştırma enzimi kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır. PCR ürünleri saflaştırma işleminden sonra PCR ürünleri, ilgili ileri ve geri yönlü primeriyle karıştırılarak çift yönlü dizi analizine yapılmıştır. Analizler Sanger dizileme cihazı ve Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystems) ile çift yönlü olarak yapılmıştır. Elde edilen çift yönlü DNA dizi analiz sonuçları için hizalama işleminden sonra BLAST analizi yapılarak NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)’da tür tanımlaması gerçekleştirilmiştir (Rintala vd., 2001; Singh vd., 2009).

3.2.4. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Disk difüzyon yöntemi

Antibiyotik dirençliliği N.C.C.L.S. standartlarındaki kurallara göre disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Clark, Jacobs ve Appelbaum, 1998). Tanımlaması yapılan mikroorganizma kültürlerinin, antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için antibiyotik diskler kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotik diskler; AmC-30 (amoksisilin+klavulanik asit 30/10 µg), SAM-20 (amfisillin + sülbaktam 10/10 µg), IPM-10 (imipenem 10 µg), TEC-30 (teikoplanin 30 µg), B (basitrasin 0,004 µg) ve OFX-10 (tarivid+ofloksasin 10 µg). Ayrıca saf, standart antibiyotiklerden amfisillin (2500 µg), kloramfenikol (2500 µg) ve amoksisilin (2500 µg) %5'lik DMSO'da çözdürüldükten sonra 10 µL'si 6 mm'lik kağıt disklerle emdirilip kontrol amaçlı kullanılmıştır. Bakteri izolatları McFarland 0,5 standartına göre hazırlanıp, mililitredeki mikroorganizma sayısı 10^8 'e ayarlanmış ve 200 µL alınıp MHA besiyeri üzerine yayma ekim yapılmıştır. Agar yüzeyi kuruduktan sonra steril pens yardımı ile antibiyotik diskler agar üzerine yerleştirilmiştir. 24 saat, 37 °C'de inkübasyondan sonra, antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. (Mayrhofer vd., 2010). Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve aritmetik ortalamaları verilmiştir.

3.2.4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile mikroorganizma izolatlarının C.L.S.I. standartlarına göre minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlenir (CLSI, 2009). Ampisilin, amoksisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri için 96 kuyucuklu "U" tipi mikrolakalarda bir seri dilüsyon yapılmıştır. (156,25, 78,125, 39,062, 19,53, 9,75 4,88 µg/mL) Bakteri izolatları MHB sıvı besiyerinde içerisinde Mc Farland 0,5 standartına göre hazırlanarak mililitredeki mikroorganizma sayısı 10^8 'e ayarlanmıştır. 96'lık plakada antibiyotik serilerinin üzerine 100 µL bakteri izolatları aktarılmış ve 24 saat 37°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. Kontrol grubu olarak ise MHB besiyeri ayrıca mikroorganizmalar için de büyüme kontrol grupları en az 3 paralel şeklinde 96 'lık plakaya aktarılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 20 µL resazürin boyası eklenerek, 4 saat daha inkübe edildi. 4 saat sonunda kuyucuklardaki renk değişimlerine göre sonuçlar yorumlanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve aritmetik ortalamaları verilmiştir.

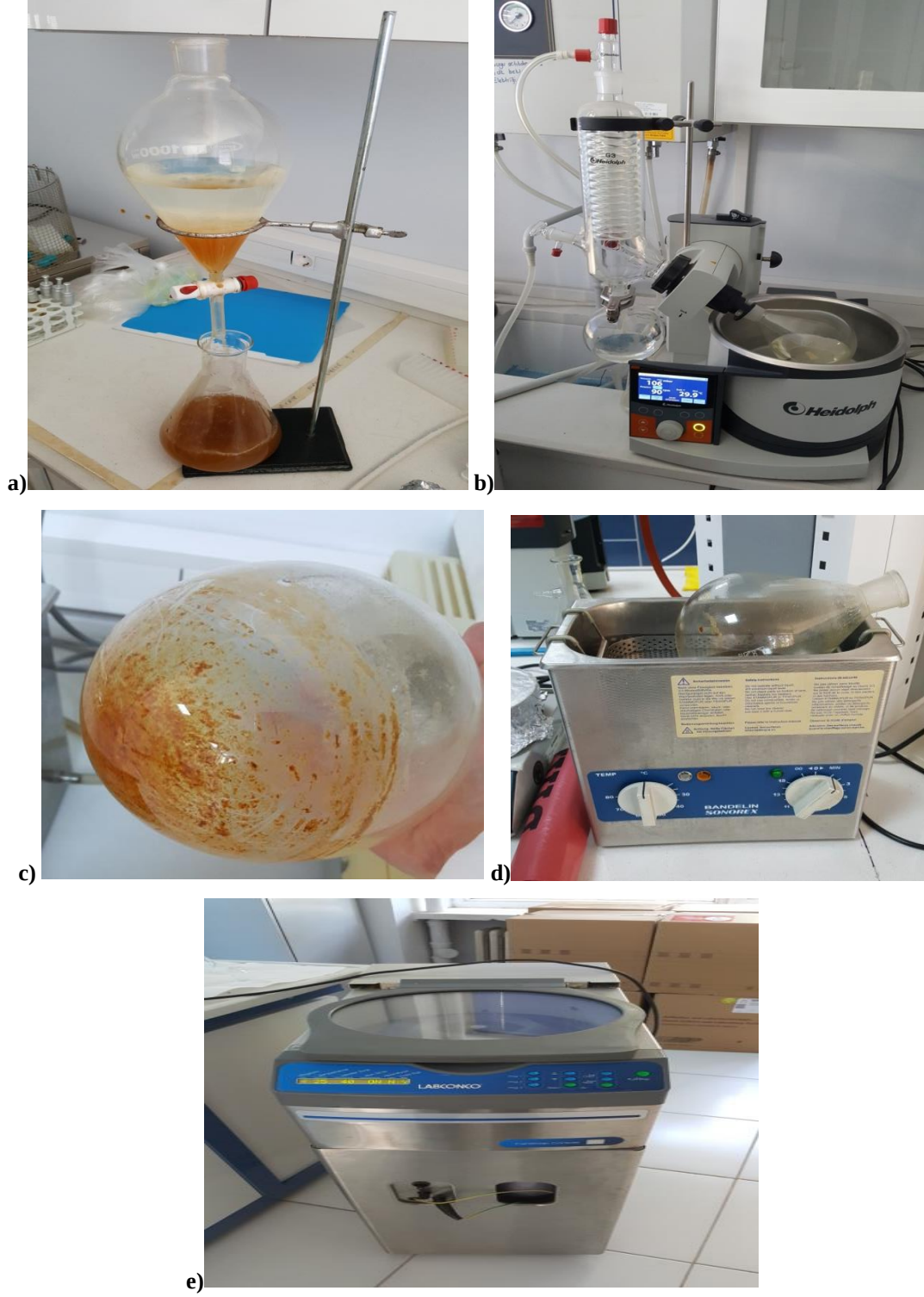
3.2.5. İzole edilen toprak kaynaklı bakteri kültürünün krom (Cr) toleransının belirlenmesi

Krom (Cr) toleransının tespiti için önce agar dilüsyon tekniği kullanılmıştır. PYE agar, potasyum kromat (K_2CrO_4) ve krom klorit ($CrCl_3$) tuzlarının farklı konstrasyonları (100, 75, 50, 25, 12,5 mg/100 mL) eklenerek hazırlanmıştır (Poornima vd., 2010). Hazırlanan besiyerleri üzerine 50 µL bakteri izolatlarından yayma ekim yapıp, 37°C’de 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda agar yüzeyinde oluşan bakteri kolonileri sayılmıştır.

Krom toleransının tespiti için aynı zamanda, mikrodilüsyon yöntemi ile de deneme yapılmıştır. 96 kuyucuklu “U” tipi mikropalaklarda 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562 mg/100 mL şeklinde hazırlanmış potasyum kromat ve krom klorit tuzlarının seri dilüsyonlarına, MHB sıvı besiyerinde içerisinde Mc Farland 0,5 (10^8 KOB/mL) ayarlanmış bakteri izolatından 100 µL aktarılıp, 37°C’de, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, her konsantrasyon kuyucuğundan 150 µL’şer alınarak MHA besiyerine yayma ekim yapıp, 37°C’de, 96 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra, besiyeri yüzeyinde oluşan koloniler sayılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve aritmetik ortalamaları verilmiştir.

3.2.6. Biyoaktif sekonder metabolit üretimi ve ekstraksiyonu

Aktinomiset izolatlarından biyoaktif sekonder metabolit üretimi için 1 L’lik Erlen Mayer şişeleri içerisinde fermantasyon ortamı hazırlanmıştır (Zhao vd., 2013). Böylece bakterilerin sekonder metabolit üretimi için gerekli karbon, azot ve tuz gereksinimleri fermantasyon ortamı içeriğindeki bileşenler sağlanmıştır. Hazırlanan besiyerine 2 öze dolusu bakteri izolatı inoküle edilip 37 °C’de 7-8 gün inkübe edilmiştir. Bu işlem en az 6 tane 1 L’lik Erlen şişelerinde 2-3 paralel şeklinde yapılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler Whatmann No:1 kağıdından filtre edilip, temiz Erlen Mayer şişeleri içerisine aktatılmıştır. Elde edilen fermantasyon sıvılarının üzerine 1:1 oranında etil asetat eklenerek 3 kez ekstrakte edilmiştir. Ayırma hunisi yardımı ile organik (üst) faz alınarak rota evaporatörde 37°C sıcaklıkta, 80 rpm’de ve 187- 230 mbar vakum altında etil asetat uçurularak ham metabolit ekstre eldesi gerçekleştirilmiştir. Rota evaporatör dibine yapışan ekstreler de etil asetat eklenerek sonikatörde çözdürüldükten sonra vakumlu santrifüj ile uçurma işlemi tamamlanmıştır (**Görsel 3.3**). Elde edilen ekstreler tarama testlerinde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.



Görsel 3.3. a) Fermantasyon sıvısından organik fazı ayırma işlemi; b) Rota evaporatör ile organik fazın uçurulması; c) Uçurma işlemi sonrası balon dibinde kalan ekstreler; d) Balon dibine yapışan ekstrelerin sonikatörde etil asetat eklenerek çözündürülmesi; e) Balonda artık kalan ekstrelerin çözündürülmesinde kullanılan etil asetatın tekrardan uçurulması için kullanılan vakumlu santrifüj cihazı

3.2.7. Metabolit ekstrenin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesi 0-2500 µg/mL (2500, 1250, 625, 312,5, 156,25, 78,125, 39,0625, 19,531, 9,765, 4,882, 2,441, 1,220, 0,610 µg/mL) değerleri arasındaki konsantrasyonlar ile test edilmiştir. Elde edilmiş biyoaktif ham ekstre uygun hacimde DMSO'da çözdürüldükten sonra maddenin antimikrobiyal gücü minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2004). Organizmalarına karşı üremeyi durduran en küçük konsantrasyon üretilen biyoaktif metabolitin MİK değeri olarak kabul edilmiştir (Kavitha vd., 2010). Kullanılan test mikroorganizmaları; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Eschericia coli* ATCC 35218, *Klebsiealla pneumonia* ATCC 700603, *Bacillus subtilis* NRRL B478, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Streptococcus pyogenes* ATCC 13615, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida krusei* ATCC 6258 'dir. Mikroorganizma sayısı bakteriler için MHB, maya kültürleri için ise SDB içerisinde Mc Farland 0,5 (10^8 KOB/mL) standartına göre ayarlanmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda; bakteriyel ekstrenin seri konsantrasyonlarının bulunduğu kuyucukların üzerine 100 µL mikroorganizma inoküle edilmiştir. Plakalar 24 saat, 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda kuyucuklara 20 µL resazürin boyası eklenip 4 saat daha inkübe edilmişlerdir. Sonuçlar oluşan renk değişimlerine göre değerlendirilmiştir. Bu deneyde pozitif kontrol grubu olarak kullanılan antibiyotikler, bakteriler için kloramfenikol ve mayalar için ise ketokonazol şeklindedir. Konsantrasyonları, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25, 78,125, 39,0625, 19,531, 9,765, 4,882, 2,441, 1,220, 0,610 µg/mL şeklinde ayarlanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ise MHB ve SDB besiyeri ayrıca mikroorganizmalar için de büyüme kontrol grupları en az 3 paralel şeklinde 96 'lık plakaya aktarılmıştır. Ayrıca, deneyde kullanılan standart mikroorganizmaların seçilen standart antibiyotiklerle gösterdiği MİK değerleri literatür taramalarında tespit edilip, deneyin kalite kontrolü amacı literatürdeki konsantrasyonlarıyla da deneme yapılmıştır. Bu konsantrasyon aralıkları bakterilere karşı kullanılan kloramfenikol için 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195 µg/mL şeklinde ve mayalara karşı kullanılan ketokonazole karşı 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781, 0,390, 0,195 µg/mL şeklindedir. Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve aritmetik ortalamaları verilmiştir.

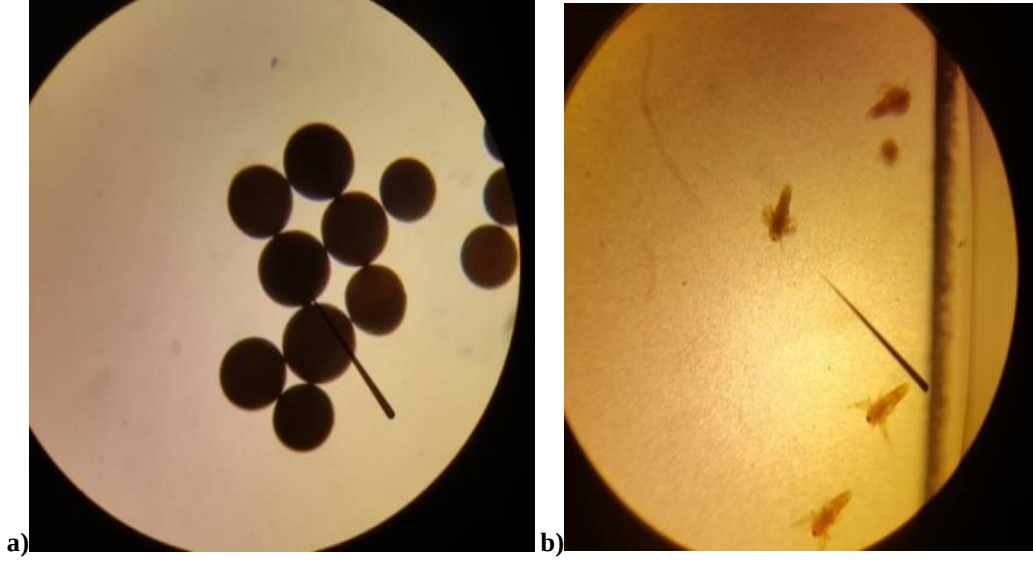
3.2.8. Metabolit ekstrenin antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi

Biyofilm yüzeye bağlı mikrobiyal hücrelerin toplanmasıyla oluşan bir tabakadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, antimikrobiyal maddelere diğer mikroorganizmalara göre daha dayanıklıdır (Branda vd., 2001; Schlag vd., 2007). Bakteriyel ekstrenin

antibiyofilm aktivitesi minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) yöntemi ile belirlenmiştir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Candida albicans* ATCC 90028 Mc Farland 0,5 (10^8 KOB/mL) hazırlanıp uygun besiyerlerine (bakterier için TSB, maya için SDB) inoküle edilmiştir. Mikroorganizma kültürlerinden 200 µL alınıp, 96'lık plakanın kuyucuklarına aktarılır ve biyofilm oluşturmaları için 48 saat, 37°C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyerleri alınıp, kuyucuklar 2-3 kez FTS solüsyonu ile yıkanmıştır. Ekstre için bir seri dilüsyon (1250, 625, 312, 156 and 78 µg/mL) yapılmıştır. Daha sonra, kuyucuklara 100 µL ekstrelerden ve 100 µL de besiyerlerinden eklenip plaka 24 saat 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltılıp FTS ile yıkandıktan sonra, 20 µL resazürin boyası eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve inkübasyondan sonra renk değişimlerine göre sonuçlar değerlendirilmiştir (Cruz, Shah ve Tammela, 2018; Chaieb vd., 2011; Teanpaisan vd., 2017) Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve aritmetik ortalamaları verilmiştir.

3.2.9. Metabolit ekstrenin brine shrimp sitotoksosite testi

Brine shrimp sitotoksosite, LC₅₀ test yöntemi eski olmakla beraber halen geçerli olan bir yöntemdir. Deney, *Artemia salina* larvaları ile yapılmıştır (Meyer, 1982). Ticari olarak satılan *Artemia salina* kistlerinden 30 g, içinde 500 mL saf su bulunan akvaryum içinde ve 37°C sıcaklıkta 48-52 saat inkübe edilmiştir. Kistlerinin açılıp larva formu oluştuktan sonra deneye geçilmiştir. *Artemia salina* kist ve larvaları **Görsel 3.4**'deki gibidir. Ekstrelerin 2500, 1250, 625, 312 ve 156 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. 96'lık plakadaki her bir kuyucuğa 100 µL deniz suyu içerisinde 10'ar adet larva ve yine 100 µL ekstre dilüsyonları sırasıyla aktarılmıştır. Plakalar 37 °C 'de 24 saat su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki canlı *Artemia salina* larvaları sayılmıştır (Solis vd., 1993). Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır ve aritmetik ortalamaları verilmiştir.

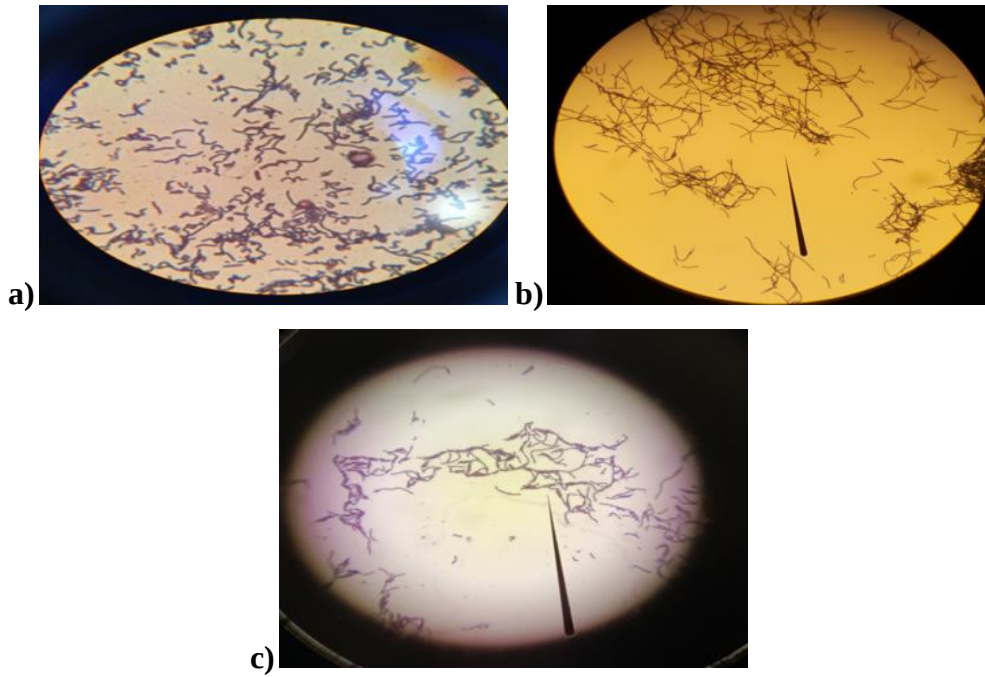


Görsel 3.4. a) *Artemia salina* kist görüntüleri; b) *Artemia salina* larva görüntüleri

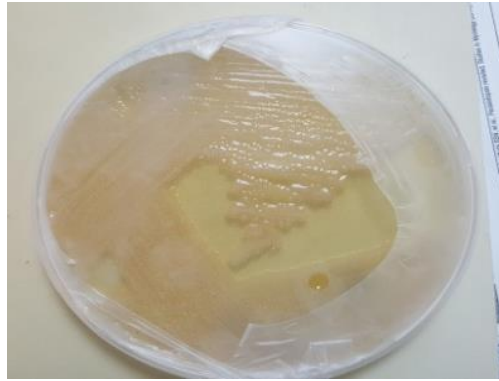
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toprakten Aktinomiset İzolasyonu Ve Morfolojik Tanımlama Sonuçları

Türkiye'nin Çanakkale–Gelibolu ilinde ormanlık bölgelerden toplanan toprak örneklerinden 25 kültüreedilebilir saf Aktinomiset izolatları elde edilmiştir. Denemelere alınan ve tanımlaması yapılan izolatların morfolojik tanımlamaları için uygulanan *Gram* boyama sonrası mikroskop görüntüleri **Görsel 4.1**'deki gibidir. Mikroskop altında incelenen hücreler, *Gram* boyamadan sonra mor-mavi renkte, dallanmış, uzun filamentli ve V-şekilli açışeklinde organize olmuş hücre yığınları halinde gözlemlenmişlerdir. Petri Plaklarındaki koloni özelliklerine bakıldığında gri-beyaz renkte, iri ve parlak koloni formunda gözlemlenmiştir (**Görsel 4.2**).



Görsel 4.1. a), b), c) Aktinomiset izolatlarının *Gram* boyama sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüleri

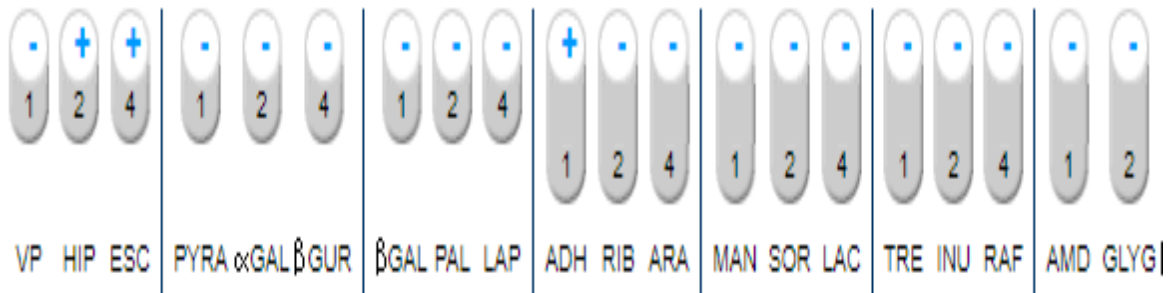


Görsel 4.2. Aktinomiset izolatlarının Petri Plağındaki koloni morfolojileri

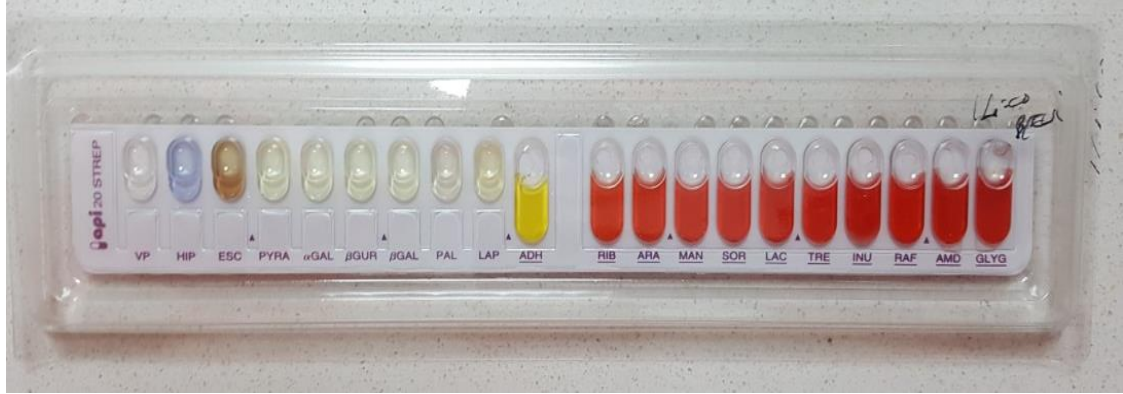
4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları

Katalaz enzimi aerobik bakterilerde olup, ortamdaki hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanmasını sağlamaktadır. Yapılan katalaz testinde tüm izolatların katalaz pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Yani, lam üzerine aktarılan izolata damlatılan %3'lük H_2O_2 'nin bakteri kolonileriyle reaksiyona girerek hava kabarcığı oluşturması katalaz pozitif sonucunu vermektedir.

API 20 Strep sribi, şekerlerin enzimatik aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Yapılan test sonucu, bakteri izolatlarının verdiği enzimatik aktivite sonuçları **Görsel 4.3** ve **4.4**'deki gibidir.



Görsel 4.3. API 20 Strep enzimatik aktivite sonuçları

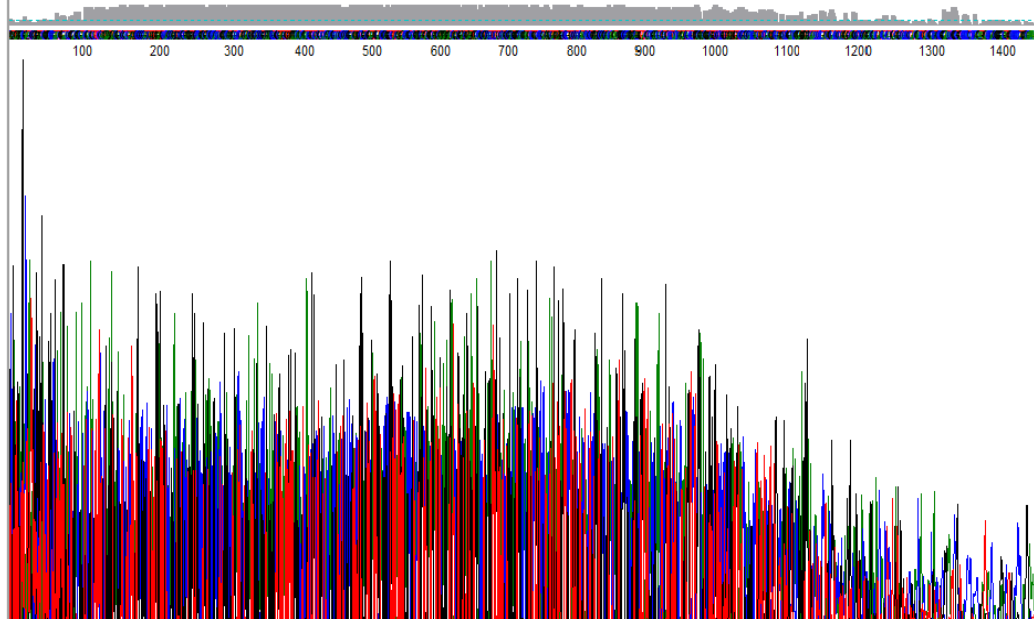


Görsel 4.4. API 20 Strep enzimativitesinin renk değişim sonuçları

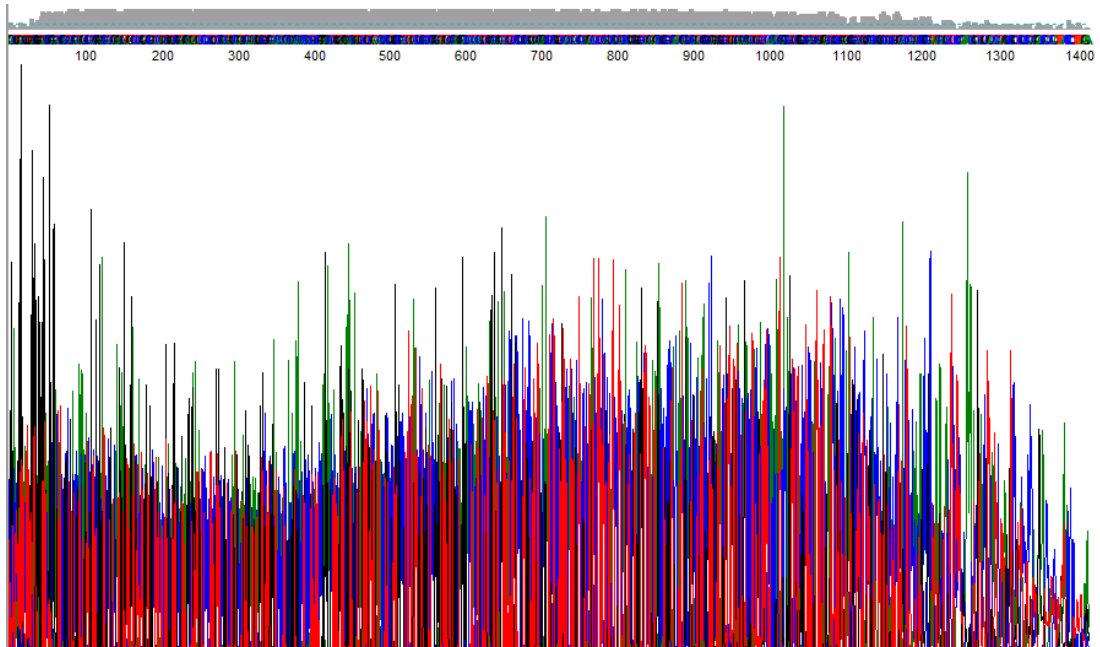
API 20 Strep sonuçlarına göre, Aktinomiset izolatlarının kit çubuğu üzerinde bulunan HIP, ESC ve ADH içerikli mikrotüplerle pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre izolatların, hippurik asit hidrolizisi yaparak fenolik maddeleri kullandığını, esculini karbon enerji kaynağı olarak kullandığını ve arjinin dihidrolaz aktivitesi ile bakteri izolatlarının karbon enerji kaynağı olarak arjinini kullandığı yorumu yapılabilir.

4.3. Moleküler Tanımlama Sonuçları

Aktinomiset izolatlarının tanımlanmasında 16s rRNA gen bölgeleri kullanılmıştır. Dizi analizi sonuçları 'www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/web' adresinden BLAST programı ile veritabanındaki 16s rRNA dizileri karşılaştırılmıştır. İzole edilen türlerin dizi analizi kromatogramları, nükleotid dizilimi Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.5. İzolatların 27F dizi analiz kromatogramı



Şekil 4.6. İzolatların 1492R dizi analiz kromatogramı

ATACCGGATACGTTCTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAGACGGTTACGGTGTCACTTATAGATGGGCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAATCTTCGCAATGGAGGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGAAGAAG
GCCTTCGGGTCTGAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAGTACCAAGTAAGTGTCTGACGTTACCTAACCAAGGCGCGCTAACCTGCGCAGCGCGGTAAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGAGGTGGTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAAG
TGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACAGTGGCGAAGCGACTTCTGCTCTGTAAGTGAACCTGAGGCGCGAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGTGACGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCGCAAGGCTGAACTCAAGGAATTGACG
GGGCGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTCGTAGCTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGAGTACGCTAAATCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGTTACAAAGGCTGCAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCATAAGCCATTCTCAGTTGCGATT
GCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCGCGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGG

Şekil 4.7. İzolatların nükleotid dizisi

Dizi analizinden elde edilen sonuçlar, BLAST programı kullanılarak diğer türlerle olan maksimum yakınlık dereceleri belirlenmiştir. Aktinomiset izolatlarının *Brevibacterium spp.* ve *Brevibacterium frigoritolerans* türleri ile %99 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Bazı kaynaklarda *Corynebacterium* olarak adlandırılan *Brevibacterium* cinsinin taksonomik sınıflandırılma şeması;

Alem: Bacteria

Filum: Actinobacteria (Actinomycetes)

Order: Actinomycetales

Suborder: Micrococcineae

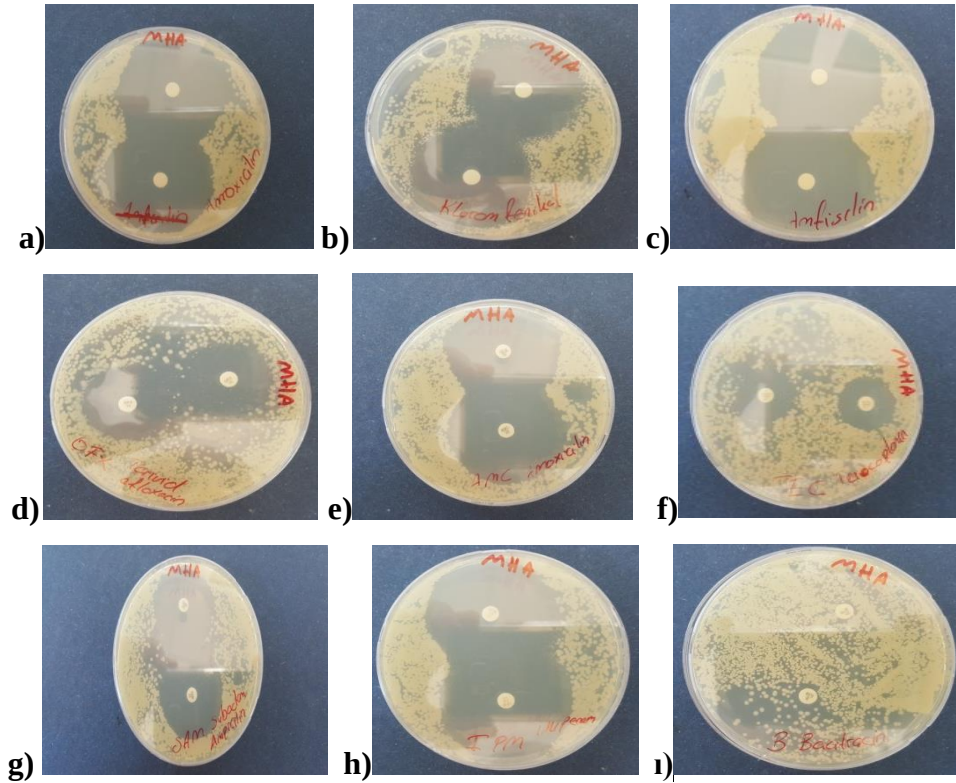
Familya: *Brevibacteriaceae*

Cins: *Brevibacterium* (Breed., 1953)

Brevibacterium cinsi, *Actinomycetes* filumunun önemli özelliklere sahip ve çok yaygın olmayan üyelerindendir. *Brevibacterium* cinsi 1953 yılında ilk kez Breed tarafından tanımlanmıştır. Cins üyeleri Gram pozitif, aerobik ve kemo-organotrofik özelliklere sahiptir. Kompleks ortamlarda gelişmeleri esnasında, çubuk-kok döngüsü oluşturmaktadır; taze kültürde (1-3 günlük) çubuk, daha eski kültürde (3-7 günlük) ise kok şeklinde morfolojiye sahiptirler. Hücreler çeşitli oranlarda boylara sahipken, genişlikleri 0,6-1 µm'dir. Toplu hücre organizasyonları V şeklinde açılar ile bir araya gelmektedirler. *Brevibacterium*'lar hareketsiz yapıda olup endospor da oluşturmamaktadırlar. Gelişmeleri için gerekli optimum koşullar, 37°C sıcaklık ve nötral pH olmalıdır. Tüm türleri çok yüksek NaCl konsantrasyonlarına tolere edebilmektedir (Onraedt, Soetaert ve Vandamme, 2005). Endüstriyel ve farmasötik özellikleri, enzim, aroma, pigment (karotenoid), amino asit ve antimikrobiyal madde üretimi şeklindedir.

4.4. İzolatın Antibiyotik Dirençliliği Sonuçları

Brevibacterium spp.'nin antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi için disk difüzyon yönteminde; AmC-30 (amoksisilin+klavulanik asit 30/10 µg), SAM-20 (amfisillin+sülbaktam 10/10 µg), IPM-10 (imipenem 10 µg), TEC-30 (teikoplanin 30 µg), B-0,04 (basitrasin-0,04 µg) ve OFX-10 (tarivid+ofloksasin 10 µg). 6 mm çaplı antibiyotik disklerine ek olarak antibiyotiklerden amfisilin (2500 µg), kloramfenikol (2500 µg) ve amoksisilin (2500 µg) gibi antibiyotikler de kullanılmıştır. Yayma ekim yöntemi ile MHA besiyeri üzerine ekilen bakteri izolatlarının üzerine yerleştirilen disklerin inkübasyondan sonra oluşturdukları inhibisyon zonları **Görsel 4.8**'deki gibidir.



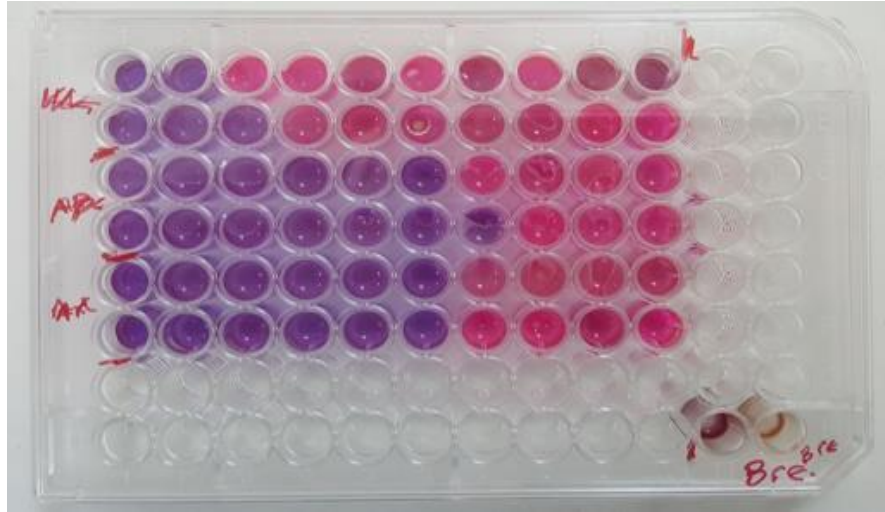
Görsel 4.8. Sırasıyla, a) Amoksisilin; b) Kloramfenikol; c) Amfisilin; d) OFX-10; e) AmC-30; f) TEC-30; g) Sam-20; h) IPM-10; i) B-0,04 antibiyotik disklerinin inhibisyon zon görüntüleri

İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları cetvel ile ölçülmüştür. Sonuçlar **Çizelge 4.1**'deki gibidir. *Brevibacterium spp.* izolatları en yüksek hassasiyeti IPM-10 (imipenem 10 µg)'a karşı gösterirken diğer antibiyotik diskleri de etkili olmuştur.

Çizelge 4.1. *Brevibacterium spp.* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen inhibisyon zon çapları (mm)

Standart antibiyotik diskleri	<i>Brevibacterium spp.</i> inhibisyon zon çapları (mm)
AmC-30	19
SAM-20	16
IPM-10	20
TEC-30	8
OFX-10	12
B-0,04	0
Amfisilin	20
Kloramfenikol	18
Amoksisilin	19

Brevibacterium spp.'nin antibiyotik direçliliklerinin belirlenmesi için amfisilin, kloramfenikol ve amoksisilin antibiyotiklerinin 156,25, 78,125, 39,062, 19,53, 9,75 4,88 µg/mL konsantrasyonlarında minimum inhibitör konsantrasyonu belirleme yöntemi kullanılmıştır (**Görsel 4.9**). Mavi-mor kuyucuklar bakteriyel gelişmesinin olmadığını, pembe kuyucuklar ise gelişmenin olduğunu göstermektedir. İlk pembe kuyucuktan önceki mavi kuyucuk maddenin MİK değeri olarak kabul edilmektedir. Deney sonucu saptanan MİK değerleri kloramfenikol için 78,25 µg/mL, amoksisilin ve amfisilin için ise 4,88 µg/mL şeklinde belirlenmiştir. Bakteri izolatının amoksisilin ve amfisilin antibiyotiklerine kloramfenikole gösterdiğinden daha yüksek hassasiyet gösterdiği saptanmıştır.



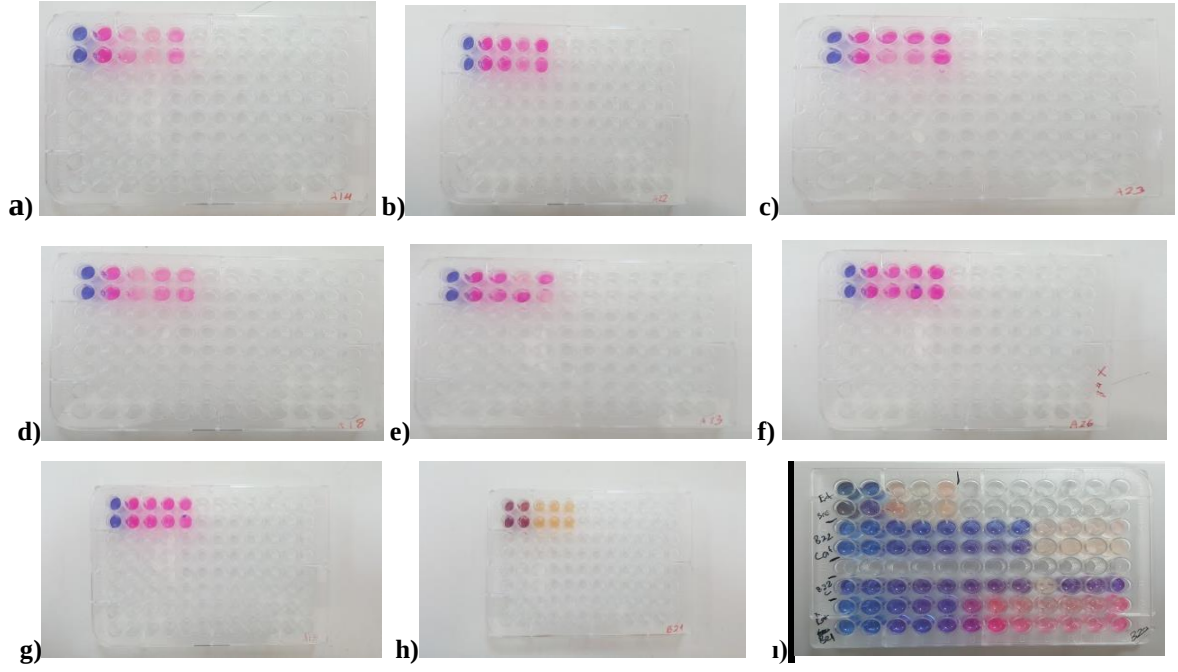
Görsel 4.9. *Brevibacterium spp.* izolatının MİK sonuçları

4.5. İzolatın Krom Toleransı Sonuçları

Brevibacterium spp. izolatının krom toleransının saptanması için potasyum kromat (K_2CrO_4) ve krom klorit ($CrCl_3$) tuzlarının farklı konstrasyonları (100, 75, 50, 25, 12,5 mg/100mL) denenerek, önce agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki krom tuzları eklenerek hazırlanmış PYE agarlar üzerinde oluşan koloniler inkübasyondan sonra sayılmıştır. Krom kloritin 50 mg/100mL'lik Petri Plağında 150-160 adet koloni sayılırken 25 mg/100mL'lik Petri Plağında de ise 200-300 adet koloni sayılmıştır. Potasyum kromatın 50mg/100mL'lik Petri Plağında 50-100 ve 25 mg/100mL'lik Petri Plağında ise 100-150 koloni sayılmıştır. Ayrıca, krom toleransı için kullanılan mikrodilüsyon yönteminde krom klorit ve potasyum kromatın 25, 12,5 6,25, 3,125, 1,562 mg/100mL'lik konsantrasyonları için deneme yapılmıştır. Krom kloritin 3,125mg/100mL'lik konsantrasyonundan alınan örnekte 1-2 koloni sayılırken, 1,562 mg/100mL'lik konsantrasyonunda 18 koloni sayılmış fakat potasyum kromat için sonuç alınamamıştır. Bu sonuçlar, *Brevibacterium spp.* izolatının belirli konsantrasyonlarda krom klorite, potasyum kromattan daha toleranslı olduğunu göstermektedir.

4.6. Metabolit Ekstrenin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Metabolitin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Eschericia coli* ATCC 35218, *Klebsiealla pneumonia* ATCC 700603, *Bacillus subtilis* NRRL B478, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Streptococcus pyogenes* ATCC 13615, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida krusei* ATCC 6258 test mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. İnkübasyondan sonra renklenmiş mikropilaka görüntüleri **Görsel 4.10**'daki gibidir. Mavi-mor kuyucuklar mikroorganizma gelişmesinin olmadığını, pembe-sarı kuyucuklar ise gelişmenin olduğunu göstermektedir. İlk pembe kuyucuktan önceki mavi kuyucuk maddenin MİK değeri olarak kabul edilmektedir. MİK değerleri **Çizelge 4.2.**'deki gibidir. Sonuçlara göre, biyoaktif metabolitin MİK değerleri deneyde kullanılan test bakterilerinin tümünde 2500 µg/mL, mayaların tümünde ise 1250 µg/mL'dir. Test edilen maya suşlarının, bakteri suşlarına göre biyoaktif metabolite karşı daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, literatürdeki MİK değerleri baz alınarak yapılan kalite kontrol denemesinde de, standart bakterilere karşı kullanılan kloramfenikol için 100-0,195 µg/mL ve mayalara karşı kullanılan ketokonazol için de 50-0,195 µg/mL arasında değerler saptanmış olup, kontrol grubunda bulunan MİK değerleriyle benzer sonuçlar göstermiştir.



Görsel 4.10. Sırasıyla, **a)** *Staphylococcus aureus*; **b)** *Staphylococcus epidermidis*; **c)** *Streptococcus pyogenes*; **d)** *Bacillus subtilis*; **e)** *Klebsiella pneumoniae*; **f)** *Listeria monocytogenes*; **g)** *Escherichia coli*; **h)** *Candida albicans*; **i)** *Candida krusei* ve kontrol gruplarının renklenmiş plaka görüntüleri

Çizelge 4.2. Biyoaktif metabolitin ve kontrol grubu antibiyotiklerin MİK değerleri*

Mikroorganizmalar	MİK Değerleri (µg/mL)	
	Biyoaktif Metabolit	Kontrol*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	2500	78,125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2500	4,882
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	2500	9,765
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	2500	19,531
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B478	2500	2,441
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	2500	9,765
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 13615	2500	39,0625
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	1250	19,531
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1250	39,0925

* Bakteriler için, kloramfenikol ve mayalar için ise ketokonazol standart antibiyotikleri kullanılmıştır.

4.7. Metabolit Ekstrenin Antibiyofilim Aktivitesi Sonuçları

Metabolit ekstrenin antibiyofilim aktivitesi MBEK değerleri ile tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 ve *Candida albicans* ATCC 90028 mikroorganizma suşları için test yapılmıştır. Biyoaktif metabolit ekstrenin MBEK değeri tüm test mikroorganizmaları için 1250 µg/mL olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.3). Test mikroorganizmalarına aynı dozda etki ettiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Antibiyofilm aktivite testi sonuçları

Mikroorganizmalar	Biyoaktif metabolit konsantrasyonları (µg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	1250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1250
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	1250

4.8. Metabolit Ekstrenin Brine Shrimp Sitotoksosite Sonuçları

Metabolit ekstrenin Brine Shrimp (*Artemia salina*) larvaları üzerindeki akut toksisitesini belirleyebilmek için, toksisite verileri her konsantrasyon kuyucuğuna aktarılan 10 larvadan kalan canlı larvalar sayılmıştır. Biyoaktif metabolit ekstrenin 2500, 1250, 625, 312 ve 156 µg/mL konsantrasyonları ile yapılan denemede doza bağlı aktivite gözlemlenmiştir. Sitotoksosite değerleri **Çizelge 4.4**'de verilmiştir. 2500 ve 1250 µg/mL konsantrasyonları %100 ve %80 etkinlikleriyle larvalar üzerindeki en etkili dozlar olarak gözlemlenmişlerdir.

Çizelge 4.4. Brine Shrimp Sitotoksosite Testi sonuçları

Biyoaktif Metabolit Konsantrasyonları (µg/mL)	Canlı <i>Artemia salina</i> Larva Miktarı (10 larva üzerinden)	Biyoaktif Metabolitin %'lik Etkisi
2500	0	%100
1250	2	%80
625	3 ± 1	%60-70
312	3 ± 1	%60-70
156	4 ± 1	%50-60

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin Çanakkale–Gelibolu ilindeki ormanlık alanlardan toplanan toprak örneklerinden Aktinomiset grubu bakteri izolasyonu yapılmış, tanımlanmış, izole edilen bakteriden metabolit üretilmiş ve biyoaktif metabolit ekstrenin bazı biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. İzole edilen bakterilerin detaylı tanımlanması için morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere üç farklı analiz yöntemi kullanılmıştır. Analiz işlemleri tamamlandıktan sonra bakteri izolatının antibiyotik dirençliliği ve krom toleransı belirlenmiştir. Bakteri izolatından metabolit ekstraksiyonu yapıp, elde edilen ekstre antimikrobiyal, antibiyofilm ve sitotoksik özellikleri bakımından detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Konu ile ilgili yapılan literatür çalışmalarında özellikle yerli tezler, bildiriler, makaleler ve uluslararası çalışmalar incelendiğinde orman topraklarından izole edilen *Brevibacterium spp.* ve biyoaktif metabolit ekstreleriyle ilgili bu tez kapsamında yapılan çalışmalar kadar detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma kapsamında izole edilen suş ile yapılan araştırma literatürde benzerine rastlanılmadığı için orijinallik arz etmektedir.

Toprak kaynaklı Aktinomiset üyeleri yıllardır bakteri izolasyonu ve biyoaktif metabolit eldesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında farklı toprak habitatlarından izolasyon yapılmıştır. Orman topraklarından elde edilen 60 saf bakteri izolatının tanımlanması için morfolojik ve biyokimyasal tanımlamalar yapılmış ve toplam 60 izolattan, 25 tanesinin Aktinomiset benzeri özellikler verdiği gözlemlenmiştir. 25 saf Aktinomiset izolatı içerisinde seçilerek moleküler tanımlama yöntemleri ile detaylı tür tayini çalışması yapılmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda izolatların çoğu *Brevibacterium spp.* olduğu belirlenmiştir. *Brevibacterium* türleri, Aktinomiset üyesi olup organik madde açısından zengin ve tuzlu orman topraklarında yaygın olarak bulunmaktadır. Başkaya'nın 2015 yılında yaptığı çalışmada 60 mikroorganizma izole edilmiş bunların içinden aktif antimikrobiyal etkiye sahip 9 bakteri ve 6 küf teste alınmıştır. *Brevibacterium spp.* izolatının antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi için standart antibiyotik AmC-30 (amoksisilin+klavulanik asit 30/10 µg), SAM-20 (amfisillin+sülbaktam 10/10 µg), IPM-10 (imipenem 10 µg), TEC-30 (teikoplanin 30 µg), B (basitrasin-0,04 µg) ve OFX-10 (tarivid+ofloksasin 10 µg) diskleriyle yapılan denemede en etkili antibiyotik 20 mm'lik inhibisyon zon çapı oluşturması ile IPM-10 (imipenem 10 µg) olduğu ayrıca, B (basitrasin-0,04 µg) standart antibiyotikinin de hiç etki etmediği tespit edilmiştir.

Çevre kirliliği sonucu topraklarda biriken ağır metal ve kanserojen madde olan krom tuzlarına karşı izolatin toleransı olup olmadığı belirlenmiştir. Das ve Mishra'nın 2008 yılında yaptığı çalışmada *Brevibacterium spp.*'nin potasyum kromata tolere edebildiğini gözlemlemiştir. Krom klorit ve potasyum kromat ile yapılan denemede izolatin, krom klorite, potasyum kromattan daha toleranslı olduğu gözlemlenmiştir. Yeni doğal farmasötiklerin keşfedilmesinde kaynak olarak toprak kaynaklı mikroorganizmalarının kullanılmasının büyük avantajları vardır. Temelde bir bakteri hücresi, bakterilerin üretilmesi için yeterlidir ve fermentasyon, mevsim ve iklimden bağımsız olarak gerçekleştirilebilir (Yavuz, 2010). İzole edilen *Brevibacterium spp.* bakterisinden biyoaktif metabolit üretimi için bakterinin karbon, azot ve tuz gereksinimleri değerlendirilerek hazırlanan fermentasyon ortamında üretim yapılarak, etil asetat kullanılarak biyoaktif metabolit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen biyoaktif metabolit ekstre antimikrobiyal, antibiyofilm ve sitotoksik özellikleri bakımından araştırılmıştır ve önemli sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada elde edilen Aktinomiset kaynaklı aktif metabolitin, farklı zaman dilimlerinde *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliklerini tespit etmiştir (Oskay, 2006). Başka bir çalışmada ise, yine Aktinomiset kaynaklı metabolitin *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Proteus vulgaris* ve *Enterococcus faecalis* bakteri bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinlikleri olduğu mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak gözlemlenmiştir (Başkaya, 2005). Bu tez çalışmasında, elde edilen biyoaktif metabolit ekstrenin antimikrobiyal aktivitesi 0-2500 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda standart test mikroorganizmalarına karşı denenmiştir. MİK değerleri, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Eschericia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Bacillus subtilis* NRRL B478, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Streptococcus pyogenes* ATCC 13615, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 bakteri gruplarında 2500 µg/mL ve *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 maya türlerinde ise 1250 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çıkan MİK değerlerinde, maya grubu mikroorganizma suşlarının, bakteri suşlarına göre metabolite karşı daha düşük dozda etkilendiği ve hassas olduğu gözlemlenmiştir. Metabolit ekstrenin antibiyofilm aktivitesi 78-1250 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarında *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, ve *Candida albicans* ATCC 90028 test mikroorganizmalarına karşı denenmiştir ve MBEK değeri 1250 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, hem bakteri hem de maya grubu mikroorganizmalarına

karşı aynı konsantrasyonda biyoaktif metabolit ekstrenin etki ettiğini göstermektedir. Çeşitli araştırmalar, toprak bakterileri tarafından üretilen sekonder metabolitlerin, mikrobiyal savaşta silah görevi görerek, aynı ekolojik niş içinde diğer mikrobik rakiplere karşı bir avantaj sağladığını göstermiştir (Foster ve Bell, 2012).

Tez kapsamında yapılan sitotoksik çalışmada ise, *Artemia salina* larvaları üzerinde biyoaktif metabolit ekstrenin 156-2500 µg/mL konsantrasyonları için deneme yapılmıştır. 2500, 1250 µg/mL konsantrasyonları %100 ve %80 oranlarında sitotoksik aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Üretilen biyoaktif metabolitin antikanser madde olarak kullanılma potansiyeli taşıdığı yorumu yapılabilir. Yapılan çalışmalarda Aktinomiset kaynaklı aktif metabolitin 0,1-10 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarında %100'lük sitotoksik aktivite saptanmıştır (Yavuz, 2010). Bu sonuçlar, üretilen Aktinomiset kaynaklı biyoaktif metabolitlerin suda yaşayan canlılara karşı yüksek derecede toksik etkiye sahip olması, güçlü bir antitümör madde olabileceğini işaret eden literatür çalışmalarını desteklemektedir (Takashima ve Sakai, 1960).

Doğa özellikle toprak habitatları çeşitli biyolojik aktivitelere sahip yeni mikroorganizmaların izole edilmesi için en önemli kaynaklardan biridir. Yapılan tez çalışmasında, izole edilen *Brevibacterium spp.* bakterisi orman topraklarından farklı özelliklerdeki ve yaygın olmayan mikroorganizmaların izole edilip, araştırılabileceğinin göstergesi olmuştur. Yeni etkilere sahip farmasötiklerin keşfi için yeni mikrobiyal kaynakların araştırılması günümüz biyoteknolojisinin en önemli araştırma konularından biridir. Tez kapsamında izole edilen bakteriden biyoaktif metabolit üretilmiş ve *in vitro* çalışmalarla özellikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, toprak kaynaklı Aktinomiset grubu bakteri izolatının standart antibiyotiklere direnç göstermesi, toprak kirliliğine sebep olan kanserojen maddelerden krom tuzlarına tolere edebilmesi ayrıca uygun fermantasyon ortamında antimikrobiyal, antibiyofilm, sitotoksik etkilere sahip biyoaktif metabolit üretmesi izole edilen suş için önemli bir potansiyeldir. İleride bu çalışmaya yapılacak ilave araştırmalarla endüstriyel ve farmakolojik potansiyelin farklı yönlerden araştırılması, mikroorganizma ve biyoaktif metabolitlerinin faydalı farmasötiklerin geliştirilmesi konusunda önemli bir adım olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelmohsen, U.R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M.S., Quinn, R.J., Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in *Actinomycetes*. *Biotech. Advances*, 33, 798-811.
- Ahmed, Z.U. and Vining, L.C. (1983). Evidence for a chromosomal location of the genes coding for Chloramphenicol Production in *Streptomyces venezuelae*., *J. Bacteriol.*, 154, 239-244.
- Akiyama, T., Harada, S., Kojima, F., Takahashi, Y., Imada, C., Okami, Y. (1998). Fluostatins A and B, new inhibitors of dipeptidyl peptidase III, produced by *Streptomyces* sp. TA-3391. I. Taxonomy of producing strain, production, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J. Antibiot.*, 51, 553-559.
- Alanis, A.J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era. *Arch. Med. Res.*, 36, 697-705.
- Alvarez-Elcoro, S. and Enzler, M.J. (1999). The macrolides: erythromycin, clarithromycin, and azithromycin. *Mayo. Clin. Proc.*, 74, 613-634.
- Amal, A.M., Abeer, K.A., Samia, H.M., Nadia, A.H., Ahmed, K.A., El- Hennawi, H.M. (2011). Selection of Pigment (Melanin) production in *Streptomyces* and their application in Printing and Dyeing of Wool Fabrics. *Res. J. Chem. Sci.*, 1, 22-28.
- Arai, T. and Mikami, Y. (1972). Chromogenecity of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.*, 23, 402-406.
- Atlas, E. and Turck, M. (1968). Laboratory and clinical evaluation of rifampicin. *Am. J. Med. Sci.*, 256, 47-54.
- Baltz, R.H. (2006). Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constitution or lack of inspiration. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 507-513.
- Başkaya, Y. (2015). *Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkili Antimikrobiyal Maddeler Üretebilen Mikroorganizmaların Toprakta İzolasyonu*. Yüksek Lisans Tezi Biyoloji Anabilim dalı Yüksek Lisans Programı.

- Batchelor, F.R., Dewdney, J.M. and Gazzard, D. (1965). Penicillin allergy: the formation of the penicilloyl determinant. *Nature.*, 206, 362-364.
- Baur, S., Niehaus, J., Karagouni, A.D., Katsifas, E.A., Chalkou, K., Meintanis, C. (2006). Fluostatins C-E, novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain Acta 1383. *J. Antibiot.*, 59, 293-297.
- Beijerinck, M.W. (1900). On different forms of hereditary variation of microbes. *KNAW.*, 3, 352–365.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Bio.*, 35(4), 1044-1051.
- Benveniste, R. and Davies, J. (1973). Aminoglycoside Antibiotic-Inactivating Enzymes in *Actinomycetes* Similar to Those Present in Clinical Isolates of Antibiotic-Resistant Bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 2276-2280.
- Blackwood, R.K. Beereboom, J.J., Rennhard, H.H., Wittenau, M.V., Stephens, C.R. (1963). 6-Methylene tetracyclines. III. Preparation and Properties. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3943–3953.
- Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(20), 11621–11626.
- Breed, R.S. (1953). The *Brevibacteriaceae* fam. nov. of order Eubacteriales. *Rias. Commun. VI Congr. Int. Microbiol. Roma*, 1, 13–14.
- Brisson-Noël, A., Trieu-Cuot, P. and Courvalin, P. (1988). Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22, B:13-23.
- Bryan, L.E. and Van, D.E.H.M. (1977). Effect of membrane energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of Streptomycin and Gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12, 163-177.
- Bull, A.T. and Stach, J.E. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.*, 15, 491-499.
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N. (2004). *Microbiology: A Laboratory Manual*. 10th ed. Singapore: Pearson.

- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complement. Alter. Med.*, 11, 29.
- Chatterjee, S., Vijayakumar, E., Franco, C., Maurya, R., Blumbach, J., Ganguli, B. (1995). Phenocomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species HIL Y-9031725. *J. Antibiot.*, 48, 1353-1354.
- Chaudhary, H.S., Soni, B., Shrivastava, A.R., Shrivastava, S. (2013). Diversity and Versatility of *Actinomycetes* and its Role in Antibiotic Production. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3, 83-94.
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65, 232-260.
- Cruz, C. D., Shah, S., and Tammela, P. (2018). Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for *Gram*-positive clinical reference strains. *BMC Microbiol.*, 173, 1–9.
- Clark, C.L., Jacobs, M.R. and Appelbaum, P.C. (1998). Antipeumococcal Activities of Levofloxacin and Clarithromycin as Determined by Agar Dilution, Microdilution, ETest and Disk Diffusion Methodologies, *J. Clinical. Microb.*, 36(12), 3579-3584.
- CLSI, (2009). *Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing*. 29th ed. informational supplement, M100-S19. Wayne PA: Clinical Laboratory Standarts Institute.
- Cundliffe, E., (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-233.
- Çepel N. (1988). *Toprak İlmi Ders Kitabı*. İstanbul: Orman Fakültesi Dergisi.
- Dancer, S.J., (2004) How antibiotics can make us sick: the less obvious adverse effects of antimicrobial chemotherapy. *Lancet Infect. Dis.*, 4,611-619.
- Darken, M.A., Berenson, H., Shirk, R.J., Sjolander, N.O. (1960). Production of Tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in Synthetic Media. *Appl. Microbiol.*, 8, 46–51.
- Das, A. and Mishra, S. (2008). Hexavalent chromium reduction and 16S rDNA identification of bacteria isolated from a Cr (VI) contaminated site. *Internet. J. Microb.*, 7, 1.

- Das, S., Lyla, P.S. and Khan, S.A. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine *Actinomycetes* from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 26, 166-177.
- Davies, J. and Davis, B.D. (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.*, 243, 3312–3316.
- Davies, J., Gorini, L. and Davis, B.D. (1965). Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.*, 1, 93–106.
- Dekker, K.A., Inagaki, T., Gootz, T.D., Huang, L.H., Kojima, Y., Kohlbrenner, W.E. (1998). New quinolone compounds from *Pseudonocardia* sp. with selective and potent anti-*Helicobacter pylori* activity: taxonomy of producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot.*, 51, 145-152.
- Demain, A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 455-463.
- Demain, A.L. and Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.*, 62, 5–16.
- DePestel, D.D., Benninger, M.S., Danziger, L., LaPlante, K.L., May, C., Luskin, A., Pichichero, M., Hadley, J.A. (2008). Cephalosporin use in treatment of patients with penicillin allergies. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 48, 530-540.
- Duche, T.R., Iheukwumere, C.C. and Omoigui, L. (2015). Evaluation of selected cowpea genotypes for resistance to bacterial blight, *Inter. J. Curr. Microb. App. Sci.*, 4(6), 257-270.
- Farnet, C.M. and Zazopoulos, E. (2005). Improving drug discovery from microorganisms. In *Natural products: Drug discovery and Therapeutic medicine*. Humana press inc., 95-106.
- Farr, B.M. Rifamycin, In., Madell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E., Dolin, R. (2000). *Principles and practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone., 348-361.
- Flärdh, K. and Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(1), 36-49.
- Floss, H.G. and Yu, T.W. (1999). Lessons from the rifamycin biosynthetic gene cluster. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 592.

Foster, K.R. and Bell, T. (2012). Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Curr. Biol.*, 22, 1845–1850.

Fuente, J.L., Martin, J.F. and Liras, P. (1996). New type of hexameric ornithine carbamoyltransferase with arginase activity in the cephamycin producers *Streptomyces clavuligerus* and *Nocardia lactamdurans*. *Biochem. J.*, 320, 173-179.

Fukuda, K., Tamura, T., Segawa, Y., Mutaguchi, Y., Inagaki, K. (2009). Enhanced Production of the Fluorinated Nucleoside Antibiotic Nucleocidin by a rif R-Resistant Mutant of *Streptomyces calvus* IFO13200. *Actinomycetologica*, 23, 51-55.

Grammatikova, N.E., Bibikova, M.V., Spiridonova, I.A., Kabanov, A.E., Katlinskiĭ, A.V. (2003) *Streptomyces griseolus* no. 182-a novel organism producing oligomycin antibiotics. Taxonomy, fermentation, and isolation. *Antibiot. Khimioter.*, 48, 11-15.

Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman, G.A. (1996). The Pharmacological Basis of Therapeutic. *Antimicrob. Agents.*, 9, 1065–1068.

Harvery, R.A. and Champe, P.C. (2009). Lippincott's Illustrated Reviews: *Pharmacology.*, 4.

He, J., Magarvey, N., Pirae, M., Vining, L.C. (2001). The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular nonribosomal peptide synthetase gene. *Microbiol.*, 10, 2817-2829.

Henry, R.J. (1943). The mode of action of Sulfonamides. *Bacteriol. Rev.*, 7, 175-262.

Hiltner, L. and Störmer, K. (1903). Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. *Arb. Biol. Reichsanst Land – Forstwirtschaft Berl–Dahlem.*, 3, 443–545.

Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P. (2009). *Actinomycetes* for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs.*, 7, 24–44.

Hopwood, D. (2004). New Drugs by Manipulating *Streptomyces* genes. *Microb. Today.*, 34, 65.

- Huang Y., Lu, Z., Laura, T., Vining, L.C., Hua H.W. (2015). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front. Microbiol.*, 6(914), 1-7.
- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D.V.R., Narasimha, G. (2014). Production of bioactive compounds by *Actinomycetes* and their antioxidant properties. *Biotechnol. Res. Int.*, 217030, 1-9.
- Jeffrey, L.S.H. (2008). Isolation, characterization and identification of *Actinomycetes* from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *Afr. J. Biotechnol.*, 7, 3697-3702.
- Khan, M.R. and Williams, S.T. (1975). Studies on the ecology of *Actinomycetes* in soil. VIII. Distribution and characteristics of acidophilic *Actinomycetes*. *Soil Bio. Biochem.*, 7, 345-348.
- Koehn, E. and Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 206-20.
- Kollef, M.H. (2009). New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Crit. Care Resusc.*, 11, 282-286.
- Kremer, L.C., Van Dalen, E.C. and Offringa, M. (2001). Anthracycline-induced clinical heart failure in a cohort of 607 children: long-term followup study. *J. Clin. Oncol.*, 19, 191-196.
- Kunin, C.M., Brandt, D. and Wood, H. (1969). Bacteriologic studies of rifampin, a new semisynthetic antibiotic. *J. Infect. Dis.*, 119, 132-137.
- Kutzner, H.J., Kroppensted, R.M., Korn-Wendisch, F. (1986). Methoden zur Untersuchung von Streptomyceten und einigen anderen Actinomyceten. *Auflage*, 4.
- Kyuchukova, M.A., Büttner, J.C., Gabler, B., Bar-Yosef, R., Grosch, H., Kläring, P. (2006). Evaluation of a method for quantification of *pythium aphanidermatum* in cucumber roots at different temperatures and inoculum densities. *J. Pl. Disease. Protect.*, 113(3), 113-119.
- Labovitz-Hagedorn., (1976). *Kritéria hodnocení experimentálních výzkumných projektů Srovnej*. Czech Republic: Program Theta.
- Lazaro, E., San Felix, A., Van den Broek, L.A., Ottenheijm, H.C., Ballesta, J.P. (1991). Interaction of the antibiotic sparsomycin with the ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 10-13.

- Lima, S.M.A. and Melo, J.G.S. (2017). Characterization of the biochemical, physiological and medical properties of *Streptomyces hygrosopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil), *Appl. Microb. Cell Physiol.*, 101, 711-723.
- Lin X., Wen Y., Li M., Chen Z., Guo J., Song Y. (2009). A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines *in vitro*. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 81, 839-845.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Berman, V., Dworkin, M., Sherman, D.H. (2004). Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7520- 7529.
- Mann, J. (2001). Natural products as immune suppressive agents. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 417–430.
- Matthew, G., Bakker , J. D., Glover , J.G., Mai, L.L.,. (2010). Plant community effects on the diversity and pathogen suppressive activity of soil *Streptomycete*. *Appl. Soil Ecol.*, 46, 35-42.
- Mayrhofer, S., Van Hoeck, A. H. A. M., Mair, C., Huys, G., Arts, H. J. M., Kneifel, W. (2010). Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *Int. J. Food Microbiol.*, 144, 81–87.
- Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A., Periti P. (1993). Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob Chemother.*, 31,C:1-9.
- Mendes, R., Garbeva, P. and Raaijmakers, J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microb. Rev.*, 37, 634-663.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., (1982). *J. Med. Pl. Researh*, 45,31-34.
- Michalik, J., Emilianowicz-Czerska, W., Switalski, L., Bojanowska, K. (1975). Monophenol monooxygenase and lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 8, 526-531.

- Miller, T.W., Goegelman, R.T., Weston, R.G., Putter, I., Wolf, F.J. (1972). Cephamycins, a new family of beta-lactam antibiotics. Isolation and chemical characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2, 132-135.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P.M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 727–737.
- Nanjawade, B.K., Chandrashekhara, S., Ali, M.S., Prakash, S.G., Fakirappa, V.M. (2010). Isolation and morphological characterization of antibiotic producing *Actinomycetes*. *Trop. J. Pharm. Res.*, 9, 231-236.
- Neiendam, N. and Winding, A. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health*. Denmark: NERI Technical. Report.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.*, 67(8), 1216-1238.
- Nielsen, N., and Winding, A., (2002). Microorganisms as indicators of soil health. *Tech. Rep.*, 388.
- Ogunmwonyi, H., Mazomba, N., Mabinya, L., Ngwenya, E., Green, E., Akinpelu, D.A. (2010). Studies on the culturable marine *Actinomycetes* isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 2223-2230.
- Onraedt, A., Soetaert, W., Vandamme, E. (2005). Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. *Biotech. Lett.*, 27, 527-533.
- Oskay, M. (2006). *Kuzey Kıbrıs Topraklarından Antimikrobiyal Aktivitesi Yüksek Streptomyces Suşlarının İzolasyonu, Taksonomisi Ve Fermentasyon Çalışmaları Üzerine Bir Araştırma*. Doktora tezi. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji.
- Oskay, M., Same, A. ve Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.*, 3, 441-446.
- Özşen, E. (2009). *Çanakkale İli (Türkiye) Tarım Alanlarındaki Topraklardan İzole Edilen Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Pang,X., Vu,P., Byrd,T.F., Ghanny,S., Soteropoulos,P., Mukamolova, G.V., Wu, S., Samten, B., Howard, S.T. (2007). Evidence for complex interactions of stress-associated regulons in an mprAB deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol.*, 153(4), 1229-12242.
- Park. T. and Strominger, J.L. (1957). Mode of Action of Penicillin. *Science*, 125, 99-101.
- Paulitz, T., Nowak-Thompson, B., Gamard, P., Tsang, E., Loper, J. (2000). A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. *J. Chem. Ecol.*, 26(6), 1515-1524.
- Peláez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products--can history repeat. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 981-990.
- Pimentel-Elardo, S.M., Kozytskam, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H., Hentschel, U. (2010). Antiparasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar. Drug*, 8, 373–380.
- Poornima, K., Karthik, L., Swadhini, S.P., Mythili, S., Sathiaivelu, A. (2010). Degradation of Chromium by Using a Novel Strains of *Pseudomonas* Species. *J. Microb. Biochem. Technol.*, 2, 95-99.
- Pusecker, K., Laatsch, H., Helmke, E., Weyland, H. (1997). Dihydrophencomycin methyl ester, a new phenazine derivative from a marine *Streptomyces*. *J. Antibiot.*, 50, 479-483.
- Quadri, R.S. and Asgar, D. (2012). Detection of melanin producing thermoalkaliphilic *Streptomyces* from limestone quarries of the Deccan traps. *World J. Sci. Technol.*, 2, 8-12.
- Raja, M.M.M.A., Raja, M.M.I. and Vani Ugin, E. (2011). Anti Mycobacterial Activity of *Actinomycetes* Producing Mycothiol. *Singapore J. Sci. Research.*, 1, 144-148.
- Reid, G. and Wong, P. (2005) *Soil bacteria*, Wales: Soil biology basics.
- Renner, M.K., Shen, Y.C., Cheng, X.C., Jensen, P.R., Frankmoelle, W., Kauffman, C. A. (1999). Cyclomarins A-C, new anti-inflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 11273–11276.
- Rintala, H., A. Nevalainen, A. and Rönkä, M.S. (2001). PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of *Streptomyces*. *Mol. Cell. Probes.*, 15, 337-347.

Rius, N. and Demain. A.L., (1997). Lysine epsilon-aminotransferase, the initial enzyme of cephalosporin biosynthesis in *Actinomycetes*. *J. Microb. Biotechnol.*, 7, 95-100.

Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico. G., Torres-Guerrero, H. (2000). Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.*, 68, 3696-3703.

Sacramento, D.R., Coelho, R.R.R., Wigg, M.D., Linhares, L.F. T. L., Santos, M.G.M., Smedo, L.T.A.S. (2004). Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 225–229.

Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, B., Borgonovi, G.E., Merli, S. (1992). Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2691-2693.

Schlag, S., Nerz, C., Birkenstock, T.A, Altenberend F, Gotz F. (2007). Inhibition of Staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J. Bacteriol.*, 189(21), 7911–7919.

Schneider, K., Nicholson, G., Ströbele, M., Baur, S., Niehaus, J., Fiedler, H.P. (2006). The Structures of Fluostatins C, D and E, Novel Members of the Fluostatin Family. *J. Antibiot.*, 59, 105–109.

Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B.S., Manhas, R.K. (2011). Antimicrobial activity of *Actinomycetes* against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Trop. J. Pharm. Res.*, 10:801-808.

Siegmund, K., Maheshwary, S., Narayanan, S., Connors, W., Riedrich, M., Printz, M. (2005). Molecular details of quinolone–DNA interactions: solution structure of an unusually stable DNA duplex with covalently linked nalidixic acid residues and non-covalent complexes derived from it. *Nucleic Acids Res.*, 33, 4838-4848.

Singh, V., Praveen, F. and Khan, C.K.M. (2009). Tripathi, Phylogenetics of an antibiotic producing *Streptomyces* strain isolated from soil. *Bioinformation*, 4, 53-58.

Smith, J.T. (1986). Mechanism of action of quinolones. *Infect.*, 14, 13-15.

Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M., Gupta, M. P., Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica*, 26, 250-252.

Sousa, C.S., Soares, A.C.F., and Garrido, M.S. (2008). Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Sci. Agric.*, 65, 50–55.

Sprusansky, O., Stirrett, K., Skinner, D., Denoya, C., Westpheling, J. (2005). The bkdR gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.*, 187, 664-671.

Srinivasan, M.C., Laxman, R.S. and Deshpande, M.V. (1991). Physiology and nutrition aspects of *Actinomycetes* – An overview. *World J. Microb. Biotechnol.*, 7, 171-184.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 479–491.

Stapley, E.O., Jackson, M., Hernandez, S., Zimmerman, S.B., Currie, S.A., Mochales, S. (1972). Cephamycins, a new family of betalactam antibiotics. I. Production by *Actinomycetes*, including *Streptomyces lactamdurans* sp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2, 122-131.

Suzuki, K., Nagai, K., Shimizu, Y., Suzuki, Y. (1994). Search for *Actinomycetes* in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetol.*, 8, 122-127.

Takashima, M. and Sakai, H. (1960). A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by *Streptomyces*, Part II. Biological Studies of Teleocidin. *Bulletin Agri. Chem. Soc. Japan.*, 24(7), 652-655.

Teanpaisan, R., Kawsud, P., Pahumunto, N., Puripattanavong, J. (2017). Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *J. Trad. Complemen. Med.*, 7(2), 172-177.

Torres, R., Ramón, F., de la Mata, I., Acebal, C., Castellón, M.P. (1999). Enhanced production of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 81-84.

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J.S., Vos, M., Garbeva, P. (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trend. Microb.*, 25(4), 280–292.

- Uroz, S., Buée, M., Murat, C., Frey-Klett, P., Martin, F. (2010). Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil *Environ. Microbiol.*, 2, 281–288.
- Uyeda, M. (2003). Fattviracins, antiviral antibiotics produced by an *Actinomycete*. *Actinomycetologica*, 17, 57–66.
- Verdier, L., Bertho, G., Benarous, J., Girault, J.P. (2000). Lincomycin and Clindamycin Conformations. A Fragment Shared by Macrolides, Ketolides and Lincosamides Determined from TRNOE Ribosome-Bound Conformations. *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 1225-1243.
- Vining, L.C. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 395-427.
- Waksman, S.A., Schatz, A. and Reynolds, D.M. (2010). Production of antibiotic substances by *Actinomycetes*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1213, 112–124.
- Wang X, et al. (1999) The topoisomerase II-associated protein, Pat1p, is required for maintenance of rDNA locus stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 261(4-5), 831-840.
- Weinstein, L., Madoff, M.A. and Samet, C.M. (1960). The Sulphonamides. *N. Engl. J. Med.*, 263, 793-800.
- Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943.339AL. In Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. *Williams & Wilkins Company, Baltimore*, 4, 2452-2492.
- Xiao, X., Wolfe, S. and Demain, A.L. (1991). Purification and characterization of cephalosporin 7 α -hydroxylase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem. J.*, 280, 471-474.
- Xu, Y., He, H., Schulz, S., Liu, X., Fusetani, N., Xiong, H., (2010). Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresour. Technol.*, 101, 1331–1336.
- Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C., Shen, G., Zhao, J., (2013). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton. *Crop Prot.*, 43, 231–240.

- Xue, Y., Zhao, L., Liu, H.W., Sherman, D.H. (1998). A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: Architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 12111-12116.
- Yang, S.J., Du, Z.Y., Yu, Y., Zhang, Z.L., Sun, X.Y., Xing, S.J. (2011). Effects of root pruning on physico-chemical characteristics and biological properties of winter jujube rhizosphere soil, *Pl. Soil Environ.*, 57, 493-498.
- Yavuz, M. (2010). *Lokal Streptomyces Türlerinin Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması Ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yen, H., Hsiao, H. and Chen, L. (2013). The enhancement of rapamycin production using *Streptomyces hygroscopicus* through a simple pH-shifted control. *J. Tai. Ins. Chem. Engineers*, 44, 743-747.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı Y. (2003). Bacillus Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi. *Orlab Mikrobiol.*, 7, 35-49.
- Zarandi, M.E., Bonjar, G.H.S., Dehkaei, F.P., Moosavi, S.A.A., Farokhi, P.R., Aghighi, S. (2009). Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *Am. J. Appl. Sci.*, 6, 194–199.
- Zenova, G.M. (1965). Melanoid pigments of *Actinomycetes*. *Mikrobiologiya*, 34, 278-83.
- Zhao, S., Huang, D., Qi H., Wen, J., Jia, X. (2013). Comparative metabolic profiling-based improvement of rapamycin production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl. Microb. Biotech.*, 97, 5329-5341.
- Zylicz, Z., Wagener, D.J., Fernandez del Moral, P., Van, R.H., Wessels, J.M., Winograd, B. (1987). Pharmacokinetics and toxicology of sparsomycin in beagle dogs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 20, 115-124.