

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUZEY KIBRIS TOPRAKLARINDAN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ
YÜKSEK *STREPTOMYCES* SUŞLARININ İZOLASYONU, TAKSONOMİSİ VE
FERMENTASYON ÇALIŞMALARI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

DOKTORA TEZİ

Mustafa OSKAY

Anabilim Dalı : Biyoloji

Programı : Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

MANİSA 2006

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KUZEY KIBRIS TOPRAKLARINDAN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ
YÜKSEK *STREPTOMYCES* SUŞLARININ İZOLASYONU, TAKSONOMİSİ VE
FERMENTASYON ÇALIŞMALARI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

DOKTORA TEZİ

Mustafa OSKAY

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09. 11. 2006

Tezin Savunulduğu Tarih : 07. 12. 2006

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. A. Üsame TAMER

: Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

: Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR

: Yrd. Doç. Dr. İhsan YAŞA

MANİSA 2006

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİL LİSTESİ	V
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
TEŞEKKÜR	IX
TÜRKÇE ÖZET	X
YABANCI DİLDE ÖZET	XI
	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAKLARIN ÖZETİ	3
2.1. Genus: <i>Streptomyces</i> (Waksman ve Henrici 1943)	3
2.1.1. Sınıflandırma	3
2.1.2. Tanılanmaları	4
2.1.3. İzolasyon Metotları	8
2.2. Streptomisetlerin Doğal ve İnsan Yapımı Alanlarda Bulunuşu	10
2.2.1. Toprak	10
2.2.2. Kompost ve Saman	11
2.2.3. Sucul Ortamlar	11
2.3. Sekonder Metabolitler	12
2.3.1. Antibiyotikler	13
2.3.1.1. Antibiyotikler Hakkında Genel Bilgiler	13
2.4. Patojen Streptomisetler	17
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. MATERYAL	19
3.1.1. Araştırma için Seçilen İstasyonlar	19
3.1.2. Test Organizmaları	19
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar	20
3.2. METOT	38
3.2.1. Topraktan <i>Streptomyces</i> Suşlarının İzolasyonu	38
3.2.2. İzole Edilen <i>Streptomyces</i> Suşlarının Antimikrobiyal Spektrumlarının ve Etkinlik Derecelerinin Saptanması	39
3.2.2.1. Birincil Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	39
3.2.2.2. İkincil Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	40
3.2.3. İzolatların Tanılanması	41
3.2.3.1. Renk Gruplaması	42
3.2.3.2. Kültürel ve Morfolojik İncelemeler	42

<i>İçindekiler Devamıdır</i>	Sayfa
3.2.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	43
3.2.3.4. Kemotaksonomik Analizler	44
3.2.3.4.1. Hücre Çeperi Diaminopimelik Asit İzomerlerinin (DAP) Analizi	44
3.2.3.4.2. Seçilen İzolatların Hücre Çeperi Karakteristik Şekerlerinin Tayini	44
3.2.3.5. İstatistiksel Analiz	45
3.2.4. Fermentasyon Çalışmaları	45
3.2.4.1. Sporulasyon	45
3.2.4.2. İnokulum Hazırlanması	46
3.2.4.3. Fermentasyon	46
3.2.4.3.1. Fermentasyon Sırasında pH, Büyüme ve Antibiyotik Üretiminin Belirlenmesi	46
3.2.4.3.2. Uygun Solvent Sisteminin Belirlenmesi ve Biyootogram	46
3.2.5. <i>Streptomyces</i> sp. KGG32 nolu İzolattan Aktif Maddenin İzolasyonu ve Saflaştırılması	47
3.2.5.1. Solvent Ekstraksiyonu	47
3.2.5.2. Kolon Kromatografisi	49
3.2.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi	49
3.2.6. Aktif Madde KGG32-A ve Aktif Madde KGG32-B' nin Kısmi Karakterizasyonu	50
3.2.6.1. Ultraviolet Spektroskopisi	50
3.2.6.2. Infra-Red Spektroskopisi	50
4. BULGULAR	51
4.1. İzolasyon Sonuçları	51
4.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi	51
4.3. Denemelere Alınan Aktif İzolatların Taksonomik Karakterlerinin Belirlenmesi ve Tanımlanmaları	65
4.3.1. Renk Gruplaması	65
4.3.2. Kültürel ve Morfolojik Özellikler	66
4.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler	72
4.3.4. Kemotaksonomik Özellikler	77
4.3.5. İzolatların Tanımlanması İçin Uygulanan İstatistiksel Analiz Sonuçları	78
4.4. Fermentasyonla Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi	93
4.5. <i>Streptomyces</i> sp. KGG32 nolu İzolattan Aktif Maddenin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu	101
5. TARTIŞMA	105
6. KAYNAKLAR	116
ÖZGEÇMİŞ	131

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Antibiyotiklerin Bakteri Hücresinde Hedef Aldığı Bölgeler	15
Şekil 3.1. Spektrum-Plak Yöntemi Uygulama Şeması	40
Şekil 3.2. Nokta (Spot) Ekim Yöntemi Uygulama Şeması	41
Şekil 3.3. Fermentasyon Sıvısından Antimikrobiyal Aktif Maddenin İzolasyonu ve Saflaştırılması Aşamaları	48
Şekil 4.1. Birincil Antimikrobiyal Çalışma Sonucu Test Organizmalarına Karşı Aktif İzolatların Sayısal Dağılımı	60
Şekil 4.2. KEH23 nolu İzolatın Küflere ve <i>C. albicans</i> ' a Karşı Etkisi	63
Şekil 4.3. İzole Edilen <i>Streptomyces</i> Suşlarına ait Farklı Koloni Morfolojileri	64
Şekil 4.4. Fermentasyon denemelerine Alınan Aktif İzolatların Spor Zinciri Morfolojileri	68
Şekil 4.5. KGG13 nolu İzolatın Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Ortamında Görünüşü	69
Şekil 4.6. KGG32 nolu İzolatın Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Ortamında Görünüşü	70
Şekil 4.7. KEH23 nolu İzolatın Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Ortamında Görünüşü	71
Şekil 4.8. Seçilen İzolatların DNaz Aktiviteleri	75
Şekil 4.9. Seçilen İzolatların Kazein Hidrolizi	75
Şekil 4.10. Seçilen İzolatların Ksantin Degradasyonu	75
Şekil 4.11. KGG13 nolu İzolatın Hippurate Hidrolizi	75
Şekil 4.12. Seçilen İzolatların Nişasta Hidrolizi	76
Şekil 4.13. Seçilen İzolatların TLC ile Hücre Çeperi Diaminopimelik Asit Analizleri	77
Şekil 4.14. Seçilen İzolatların TLC ile Hücre Çeperi Karakteristik Şeker Analizleri	78
Şekil 4.15. <i>Streptomyces</i> Ana Gruplarının % Benzerlikleri	82
Şekil 4.16. <i>Streptomyces</i> Tekil-Üye Gruplarının % Benzerlikleri	84
Şekil 4.17. <i>Streptomyces</i> Ana Grupları ile Aktif İzolatların % Benzerlikleri	87
Şekil 4.18. <i>Streptomyces</i> Tekil-Üye Grupları ile Aktif İzolatların % Benzerlikleri	90
Şekil 4.19. Aktif İzolatların Besiyeri 39' de Büyüme Eğrileri	94
Şekil 4.20. Aktif İzolatların Besiyeri 40' da Büyüme Eğrileri	95
Şekil 4.21. Aktif İzolatların Besiyeri 41' de Büyüme Eğrileri	96
Şekil 4.22. Aktif İzolatların Besiyeri 42' de Büyüme Eğrileri	97
Şekil 4.23. Aktif İzolatların 60 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına Karşı Etkisi	99
Şekil 4.24. Aktif İzolatların 72 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına Karşı Etkisi	99
Şekil 4.25. Aktif İzolatların 84 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına Karşı Etkisi	99

Şekil Listesi Devamı**Sayfa**

Şekil 4.26. Aktif İzolatların 96 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına Karşı Etkisi	100
Şekil 4.27. Aktif İzolatların 108 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına Karşı Etkisi	100
Şekil 4.28. Aktif İzolatların 120 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına Karşı Etkisi	100
Şekil 4.29. İzole Edilen İki Aktif maddenin UV Spektrumları	101
Şekil 4.30. KGG32-A' nın IR spektrumu (KBr)	102
Şekil 4.31. KGG32-B' nin IR spektrumu (KBr)	103

ÇİZELGE LİSTESİ	Sayfa
Çizelge 2.1. Aktinomisetlerde Hücre Duvarı Tipleri	5
Çizelge 2.2. <i>Streptomyces</i> ve ilişkili Genusların Bazı Morfolojik Özellikleri	6
Çizelge 2.3. Hücre Çeperi Kemotip I olan Diğer <i>Actinomycetes</i> ile <i>Streptomyces</i> Genusu Ayrımında Kullanılan Karakterler	9
Çizelge 2.4. Bazı Antibiyotikler ve Etki Şekilleri	14
Çizelge 2.5. <i>Streptomyces</i> Genusu Üyeleri Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler	16
Çizelge 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı İstasyonlar	19
Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Test Organizmaları	20
Çizelge 3.3. TLC' de kullanılan Solvent Sistemleri ve Oranları.	47
Çizelge 4.1. Birincil Antimikrobiyal Test Sonuçları	52
Çizelge 4.2. Birincil Antimikrobiyal Aktivite Çalışması Sonucu Test Organizmalarına Karşı Etkili <i>Streptomyces</i> İzolatlarının Sayısal Dağılımı ve % Oranları	60
Çizelge 4.3. Seçilen <i>Streptomyces</i> İzolatlarının Bazı Bakterilere Karşı Antibakteriyal Aktivitesi	61
Çizelge 4.4. Seçilen <i>Streptomyces</i> İzolatlarının Küflere ve <i>C. albicans'</i> a Karşı Antifungal Aktivitesi	62
Çizelge 4.5. Tanılaması Yapılan İzolatlarımızın ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (7 Günlük İnkübasyon Sonuçları)	65
Çizelge 4.6. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 Günlük inkübasyon sonuçları)	65
Çizelge 4.7. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 5 ve ISP 6 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 Günlük inkübasyon sonuçları)	66
Çizelge 4.8. Tanılaması Yapılan İzolatların Bazı Besiyerlerindeki Spor Zinciri Morfolojisi	66
Çizelge 4.9. Tanılaması Yapılan İzolatların Kültürel Karakteristikleri	67
Çizelge 4.10. Seçilen İzolatların Çeşitli Karbon Kaynaklarını Kullanımı	72
Çizelge 4.11. Seçilen İzolatların Azot Kaynaklarını Kullanımı	73
Çizelge 4.12. Seçilen İzolatların Farklı Sıcaklık ve İnhibitörlerle Büyüme Özellikleri	73
Çizelge 4.13. Seçilen İzolatların Bazı Fizyolojik Özellikleri	74
Çizelge 4.14. Seçilen İzolatların Bazı Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları	76
Çizelge 4.15. <i>Streptomyces</i> Türleri Ana Gruplarının % Pozitif Olasılık Matrisi	79
Çizelge 4.16. Tekil-Üye Gruplarının Ayrımında Kullanılan Minimum Karakterler	83
Çizelge 4.17. Aktif İzolatların Tanımlanmasıyla İlgili Minimum Karakterler ve Sonuçları	85
Çizelge 4.18. <i>Streptomyces</i> Ana Tür grupları ile Aktif İzolatların % Benzerliklerinin Oluşturulması İşleminde Minitab Programı, Orijinal İstatistik Sonuçları	88
Çizelge 4.19. <i>Streptomyces</i> Tekil-Üye Grupları ile Aktif İzolatların % Benzerliklerinin	

Çizelge Listesi Devamı

	Sayfa
Oluşturulması İşleminde Minitab Programı, Orijinal İstatistik Sonuçları	91
Çizelge 4.20. Fermentasyon Ortamı 1 (Besiyeri 39)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri	93
Çizelge 4.21. Fermentasyon Ortamı 2 (Besiyeri 40)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri	94
Çizelge 4.22. Fermentasyon Ortamı 3 (Besiyeri 41)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri	95
Çizelge 4.23. Fermentasyon Ortamı 4 (Besiyeri 42)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri	96
Çizelge 4.24. İzolatların Fermentasyon Esnasında Zamana Bağlı İnhibisyon Zonları	98
Çizelge 4. 25. İzole Edilen Aktif Maddelerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri	104

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasını öneren ve çalışmalarımda her türlü desteğini esirgemedi beni yönlendiren, değerli bilgilerinden yararlandığım tez danışmanım, Hocam Sayın Prof. Dr. İsmail KARABOZ ile değerli zamanından ödün verip, çalışmanın her aşamasını yakından takip ederek, sonuçların yorumlanması ve şekillenmesini sağlayan Hocam Sayın Prof. Dr. A. Üsame TAMER' e teşekkür ederim. Ayrıca, zaman zaman görüşme fırsatı bularak önerilerini aldığım ve tecrübelerinden faydalandığım Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan YAŞA' ya teşekkür ederim. Araştırma süresince yanımda, her türlü ihtiyaçlarım için seferber olan Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdal BALCAN ile çalışma arkadaşlarımdan Araş. Gör. Dr. Kamuran AKTAŞ, Araş. Gör. Dr. Fatih KALYONCU, Araş. Gör. Cem AZERİ ve Araş. Gör. Dilek SARI' ya teşekkür ederim.

TÜRKÇE ÖZET

Kuzey Kıbrıs Topraklarından Antimikrobiyal Aktivitesi Yüksek *Streptomyces* Suşlarının İzolasyonu, Taksonomisi ve Fermentasyon Çalışmaları Üzerine Bir Araştırma

Mustafa OSKAY

Doktora Tezi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Aralık, 2006; 142 Sayfa

Streptomisetler Gram-pozitif filamentöz toprak bakterileri olup, her ortamda bulunurlar. Özellikle toprakta çok yaygındırlar, ancak sediment, kompost, saman, sucul ve evsel ortamlarda da bulunmaktadır. Streptomisetler, antibakteriyal, antifungal, antiparazitik, antitümoral biyolojik aktivite gösteren çoğu sekonder metabolitin üreticileri olarak bilinirler.

Kuzey Kıbrıs topraklarından kültüre edilebilir 251 *Streptomyces* suşu izole edilmiştir. İzole edilen *Streptomyces* izolatlarının antimikrobiyal aktivitesi Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler ile küf ve mayalara karşı denenmiştir.

Birincil antimikrobiyal tarama çalışmasıyla; 251 streptomiset izolatından 67 tanesinin kullanılan test organizmalarının en az birine karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bunlardan %52.23' ü sadece Gr (+) bakteriler, %5.97' si sadece Gr (-) bakteriler, %25.37' si hem Gr (+) hem de Gr (-) bakteriler, %16.41' inin ise sadece mayalar üzerine etkili oldukları belirlenmiştir. Antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, birincil antimikrobiyal aktivite sonuçlarına dayanarak seçtiğimiz 16 izolattan 5 tanesi test organizması olarak denenene küflere karşı etkili bulunmuştur. Fermentasyon denemeleri için seçilen 4 izolattan sadece *Streptomyces* sp. KEH23, 5-28 mm arasında değişen oranlarda, PDA ortamında, test edilen küflere karşı antifungal aktivite göstermiştir.

Antimikrobiyal aktivitelerine göre, 4 izolat seçilmiş ve klasik yöntemlerle tanılanmıştır.

Antimikrobiyal etkili molekülün üretimi için 4 farklı ortamda fermentasyon yapılmıştır. Karbon kaynağı sukroz içeren besiyerinde aktif izolat *Streptomyces* sp. KGG32, ileri fermentasyon işlemlerine alınarak üretmiş olduğu 2 farklı antimikrobiyal etkili madde (KGG32-A ve KGG32-B) kolon kromatografisi (Sephadex LH20 ile) ile saflaştırılmış ve nihayetinde kısmi olarak karakterize edilmiştir.

Ayrıca, antimikrobiyal etkili KGG32-A ve KGG32-B maddelerinin UV, IR, çözünürlük ve renk reaksiyonları gibi bazı fizikokimyasal özellikleri (Anisaldehit, sülfirik asit, demir klorür ve ninhidrin) belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, izolasyon, toprak, identifikasyon, antibiyotik üretimi ve antimikrobiyal aktivite.

YABANCI DİLDE ÖZET (ABSTRACT)

A Study on Isolation, Taxonomy and Fermentation of *Streptomyces* Isolates These Have Highly Antimicrobial Activity from North Cyprus Soils

Mustafa OSKAY

PhD. Thesis in Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail KARABOZ

2006, December; 142 Pages

Streptomyces are Gram-positive, filamentous soil bacteria present in almost all kinds of environments. They are very common in soil, but also found in sediments, composts, fodder, aquatic habitats and buildings. *Streptomyces* are known to be producers of many secondary metabolites, which have different biological activities, such as antibacterial, antifungal, antiparasitic and antitumor.

A total of 251 culturable *Streptomyces* strains were recovered from soil samples collected from North Cyprus and its surrounding. These were then assessed for their antimicrobial activity against Gram-Positive, Gram-Negative bacteria, moulds and yeasts.

Results indicated that of 251 *streptomyces* isolates, 67 were active at least one of the tested organisms. Approximately 52.23% isolates produced antibacterial substances against only on Gr (+) bacteria, 5.97% isolates only against Gr (-) bacteria, 12% isolates against both Gr (-) and Gr (+) bacteria and 16.41% isolates only against yeasts. According to primary antimicrobial screening, 16 isolates were selected to find out of antifungal activities and 5 of them were active against tested moulds. For fermentation studies, the most active four strains selected and only one of them, namely *Streptomyces* sp. KEH23 showed antifungal activity ranging from 5 to 28 mm. on PDA medium against tested moulds.

According to their antibacterial activity, four of the isolates were selected and characterized by conventional methods.

For isolation of antimicrobial molecule, fermentation studies carried out with 4 different medium. The most active isolate; *Streptomyces* sp. KGG32 was subjected to further fermentation studies with medium including sucrose as a sole carbon source, and 2 different active substance (KGG32-A and KGG32-B) were isolated and purified by column chromatography on silica gel (Sephadex LH20) and finally partially characterized.

Also, in this study some physiochemical properties of KGG32-A and KGG32-B were determined according to UV, IR, solubility in organic solvents and color reactions (Anisaldehyde, sulphuric acid, ferric chloride and ninhydrin).

Key words: *Streptomyces*, isolation, soil, identification, antibiotic production and antimicrobial activity.

1. GİRİŞ

Streptomisetler Gram-pozitif filamentöz toprak bakterileri olup, hayat döngüleri sırasında bazı morfolojik değişimler geçirirler. Normalde spor formunda bulunurlar, yeterli besin ve su olduğunda çimlenerek vejetatif miselyumu oluştururlar. Bu değişimler gerçekleşirken paralelinde, pigmentlerin, antibiyotiklerin ve diğer sekonder metabolitlerin üretimi de başlar (Kutzner 1986, Williams et al. 1989). En yoğun oldukları ortam topraktır. Bunun yanında, kompostlarda, samanlar üzerinde, sucul ortamlarda, nemli binalarda da yoğun olarak bulunurlar (Kutzner 1986, Andersson et al. 1999, Hyvärinen et al. 2002). Özellikle *Streptomyces* genusu üyeleri antibakteriyal, antifungal, antiparazitik, antitümoral ve immunosupresif biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda antibiyotiğin üreticileri olarak bilinir.

Mikrobiyal doğal ürünler ilaçların, özellikle antibiyotiklerin üretiminde en büyük paya sahiptir. 1983-1994 yılları arasında 520 yeni ilaç keşfedilmiş, bunların %60-80'i antibakteriyal etkili olup, %39' unu doğal ürünler oluşturmaktadır. Şu ana kadar keşfedilen antibiyotiklerin çoğunluğu *Streptomyces* genusu üyeleri tarafından üretilmektedir. 1940' lı yıllarda başlayan antibiyotik tarama çalışmaları 1970' li yıllara doğru hızlı bir artış göstermiş, sonrasında duraklama dönemine girmiştir. Yeni antibiyotiklerin keşfindeki artışın enfeksiyöz hastalıkların ve dirençli organizmaların gündeme gelmesiyle paralellik gösterdiğini görmekteyiz. Diğer taraftan yapılan çalışmalar ışığında *Streptomyces* kökenli antibiyotiklerin henüz %1-3' lük kısmının belirlendiği, %99-97' sine yakın bölümünün henüz keşfedilemediği belirtilmektedir (Watve et al. 2001).

Antibiyotiklerin tedavide ilk kez kullanımı Alexander Fleming' in penisilini tesadüfen keşfetmesinden sonraki yıllara dayanır. 1940' lı yıllarda az miktarda üretilen ham penisilin stafilokok ve streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanıldı. Antibiyotik araştırmaları 1943' de Selman Waksman' nın 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 antibakteriyal ve antifungal antibiyotikler keşfedilmiş, bu dönem antibiyotik keşiflerinin 'Altın Çağı' olarak nitelendirilmiştir (Hopwood 2004).

Çok sayıda antibiyotiğin tedavide kullanılmasına rağmen neden yeni antibiyotiklere gerek vardır? Bunun sebepleri arasında; çok daha az toksik antikanser ilaçlara gerek olması; daha da önemlisi hızla artan antibiyotik direnci ve bu organizmaların kullanılan antibiyotikleri yetersiz kılmasıdır (Alsan 1999). Dirençli bakteriler arasında bulunan metisillin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) hastanelerdeki çoğu enfeksiyondan sorumludur. Karın ameliyatlarında sorun yaratan vankomisin-dirençli *Enterococcus* ve antibiyotiklere çoğul-direnç gösteren *Mycobacterium tuberculosis*' de bilim adamlarını oldukça uğraştırmaktadır. Şu anda

solunum yolu patojeni gram-negatif bakterilerin gittikçe antibiyotiklere direnç kazanması gündemdedir (Durham 2005, Navarro 2006).

Son 40 yılda yeni antibiyotiklerin keşfi için en az 15 milyon organizma izole edilmiş ve yaklaşık on bin farklı antimikrobiyal madde tanımlanmış; her yıl bunların bir çoğu karakterize edilerek 200-300 tanesinin yeni olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalar çoğunlukla, en önemli antibiyotik üreticileri olarak bilinen funguslar, aktinomisetler ve *Bacillus* genusu üyeleri üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Son birkaç yılda diğer genuslar üzerinde detaylı araştırmalar yapılmasının gerekliliği de vurgulanmaktadır.

İnsan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde, hayvan beslemede kullanılan antibiyotikleri ürettiği saptanan organizmalar diğer taraftan tarımda, toprak kaynaklı patojenlerin sebep olduğu ve günden güne büyük bir problem haline gelen, bitki hastalıklarına karşı kullanılabilir. Bitki hastalıklarıyla mücadelede kullanılan kimyasallar; uygulama zorluklarının oluşu, kısa ve dar periyotlu etkileri, patojenlerin bunlara karşı direnç kazanması ve ekonomik yüklerinin çok fazla oluşu gibi nedenlerden dolayı giderek önemini kaybetmektedirler. Bunun aksine, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde mikroorganizmaların kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır.

Aktinomisetler biyo-degradasyon gibi ekolojik önemlerinin (Parkinson et al. 1971, McCarthy and Williams 1990), yanında antibiyotikler ve enzimler gibi endüstriyel açıdan faydalı metabolitleri (Lazzarini et al. 2000)' de üretmektedirler. Aktinomisetler arasında toprakta *Streptomyces* genusu üyeleri en fazla izole edilen ve çok sayıda önemli metaboliti üretmelerinden dolayı en fazla çalışılan cinstir. Bu yoğun çalışmalar sonucunda yeni strainler ve buna bağlı olarak yeni sekonder metabolitler özellikle de antibiyotikler keşfedilmiştir. Bundan dolayıda günümüzde henüz taksonomik pozisyonları tartışmalı olsa bile *Streptomyces* cinsi üyeleri güncelliğini korumaktadır.

Türkiye' de yapılan çalışmalarda kullanılan streptomiset suşlarının genellikle Avrupa kökenli kültür koleksiyonlarından temin edilen suşlar olması nedeni ile Türkiye' ye özgü suşların izole edilmesi, antibiyotik tarama çalışmalarına katkıda bulunmak, dolayısıyla yüksek verimli antibiyotik üreticisi *Streptomyces* suşlarının belirlenmesi bu çalışmanın amaçları arasındadır. Bol hammadde kaynağına sahip olduğumuz halde dışarıdan satın aldığımız çeşitli antibiyotik etkin maddelerinin ülkemizde üretilmemesinin nedeni, konu ile ilgili teknolojilerin yeterli olmayışı ve bu konuda araştırma eksikliğinin bulunmasıdır. Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu yaygın kullanım hem ekonomik yükü hem de yan etkilerinin sık görülmesi gibi önemli sorunları da beraberinde getirirken; dirençli bakterilerin gelişmesine neden olmalarından dolayı da, toplum sağlığını tehdit eder duruma gelmişlerdir. Bu nedenle antibiyotik tarama (screening) programlarının ülkemizde de yaygınlaştırılması gerekmektedir.

2. KAYNAKLARIN ÖZETİ

2.1. Genus: *Streptomyces* (Waksman ve Henrici 1943)

Aktinomisetler içerisinde gerek morfolojisi gerekse toprakta bol bulunan bir cins olmasından dolayı çok iyi tanımlanmış; antibiyotik ve diğer sekonder metabolitleri üretmesi yönünden çok önemli bir genustur (Cross 1989, Locci 1989, Wendisch and Kutzner 1991, Al-Tai et al. 1999).

Streptomyces genusunun kimyasal, moleküler ve taksonomik özellikleri bazı çalışmalar ile şekillendirilmiştir (Goodfellow et al. 1987, Lechevalier 1989, Williams et al. 1989, Anderson and Wellington 2001). Onlar, Gram pozitif, asit fast olmayan, nadiren parçalanmış vejetatif hiflere (0.5-2 µm) sahip ve üremeleri aerial (havasal) hiflerin ucundaki hareketsiz sporlarla gerçekleşen organizmalardır. İstisna birkaç tür substrat miselyumda kısa spor zincirleri oluşturur; sclerotium, piknidium, sporangium ve sinema benzeri yapılar oluşturulabilir. Büyümenin başlangıcında koloniler düz ve yumuşak, sonraları sert-sıkı, pamuksu, flokkoz, granüllü, pudramsı veya kadifemsi görülebilir. Substrat miselin renginden sorumlu çok sayıda pigment üretilebilir, ayrıca diffüze pigmentler de oluşturulabilir. Normalde spor formunda olmalarına rağmen, yeterli nem ve besin olduğunda sporlar çimlenerek vejetatif miselyumu oluşturur. Bu morfolojik değişimlerle beraber pigmentler, antibiyotikler ve diğer sekonder metabolitlerinde üretimi başlar. Çoğu strain tek tip ya da çok çeşitli antibiyotik üretebilir. Aerobik olup, kemo-organotrofik oksidatif metabolizmaya sahiptirler. Katalaz pozitifdir. Genellikle nitratlar nitritlere indirgenir ve adenin, eskulin, kasein, jelatin, hipoksantin, nişasta, L-tirozin parçalanır. Büyüme ve enerji için çok sayıda organik bileşik tek karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Optimum sıcaklık 25-35 °C olup bazı türler, psikrofilik ve termofiliktir. Optimum pH istekleri 6.5-8.0' dır. Hücre çeperi peptidoglikan yapısında büyük miktarda L-Diaminopimelik asit (L-DAP) içerirler. Mikolik asit içermezler ve doymuş izo ve anteizo yağ asitleri, predominant izoprenolok olarak dokuz izopren birimi ile hekza ve okta dehidrojene menaquinon; ayrıca, difosfatidiletionalamin, fosfatidilgliserol, fosfatidilinositol, difosfatidilinositol içeren kompleks polar lipid içerirler; bu lipid karakterleri ile fosfolipid tip 2 grubuna dahildirler. DNA' da % G+C oranı 69-78 arasında değişir. Çoğunlukla saprofitik olup; birkaç tür insanlarda ve hayvanlarda patojen, diğerleri fitopatojendirler.

2.1.1. Sınıflandırma

Streptomyces genusuna giren türlerin sayısı gittikçe artmaktadır. 1997 yılına kadar 464 tür ile 45 alttür rapor edilmiştir (Hain et al. 1997). 2002 yılında Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu (DSMZ)'nda 650' den fazla tür bulunduğu bildirilmiştir. Böylece, bu genus *Actinobacteria* sınıfı *Actinomycetales* ordosunun en fazla tür içeren üyesi olmuştur

(Stackebrandt et al. 1997). *Streptoverticillium* ve *Kitasatospora* taksonomik durumları tam belirlenmemiş olmasına rağmen (Zhang et al. 1997) *Streptomyces* üyelerine dahil edilmektedir (Witt and Stackebrandt 1990, Wellington et al.1992).

Streptomisetlerin sınıflandırılmaları genelde morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik karakterlere dayalıdır (Kutzner 1986, Williams et al. 1983, Goodfellow et al. 1987, Kämpfer et al. 1991, Goodfellow et al. 1992). Ayrıca; Serolojik metotlar (Ridell et al.1986), faj tiplendirmesi (Korn-Wendish and Schneider 1992) ve protein profillerinin çıkarılması teknikleri (Ochi 1995, Taguchi et al. 1997) sınıflandırmada kullanılabilmektedir. Genetik metotlar arasında DNA-DNA homolojisi (Labeda and Lyons 1992, Kim et al. 1999) ve 16S rRNA gen dizi analiz (Gladek et al. 1985, Stackebrandt et al. 1992, Kim et al. 1996, Takeuchi et al. 1996, Hain et al. 1997, Kataoka et al. 1997, Kim et al. 1999) teknikleri bulunmakta ve bu teknikler fenotipik karakterlerle beraber kullanılmaktadır. Anderson and Wellington (2001) streptomisetlerin taksonomisi ile ilgili prosedürleri özetlemektedirler.

Bütün bu sınıflandırmalara dayanarak streptomisetler, 20 major, 41 minor ve 22 tekil-üye gruplarına ayrılmıştır. Major sınıflar 6 ya da daha fazla tip strainlerinden oluşan tür gruplarını, minor sınıf ise 2-5 tip straininden oluşan tek bir tür olarak düşünülmektedir. Bu grupların sayısı ve içeriği kullanılan yöntemle göre değişmekte olup, artabilmekte ya da azalabilmekte; ancak şu an için major grupların değişmeyeceği düşünülmektedir (Anderson and Wellington 2001). En büyük grup *Streptomyces albidoflavus*-grubudur ve 71 straini kapsamakta bunlar da alt gruplara bölünmektedir. En önemli alt gruplar arasında *S. albidoflavus*, *Streptomyces anulatus* ve *Streptomyces halstedii* yer almaktadır (Williams et al.1983).

Streptomiset sistematüğinde tür kavramı hala çelişkilidir. Cinslerin taksonomik durumları oldukça karışık olup, türlerin tanımlanması için minimum standartlar henüz belirlenmemiştir. *Streptomyces* türlerinin ifade edilmesi ve belirlenmesinde daha çok tür grupları geçerli olup, bunun için ise fenotipik ve genotipik karakterlerin beraberce ele alınması gerekmektedir (Labeda and Lyons 1991a, 1991b, Labeda 1993, Labeda et al. 1997, Kim et al.1999).

2.1.2. Tanılanmaları

Aktinomisetlerin hücre çeperi kompozisyonunun detaylı olarak çalışılması onların yeniden sınıflandırılmalarını kolaylaştırmıştır. Lechevalier ve ark. (1977)'nin bulgularına göre *Streptomyceteceae* familyası üyelerinin peptidoglikan yapısında LL-diaminopimelik asit, diğer aktinomiset üyelerinde ise meso-diaminopimelik asit (meso-DAP) bulunmuştur (Çizelge 2.1.). Bazı aktinomisetlerde LL-DAP içermesine rağmen bunlar (*Arachnia*, *Pimelobacter*, *Sporichthya*, *Kineosporia*, *Nocardioidea*, *Kitasatosporia*, *Intrasporangium* v.b.) biyokimyasal, morfolojik ve fiziksel özellikleri ile *Streptomyceteceae*'den kolayca ayrılabilirler (Becker et al. 1965, Langham et al. 1989, Cross 1989, Goodfellow 1989, Williams et al. 1989). Stanek ve Roberts (1974)

basit ince-tabaka kromatografi işlemi ile klinik materyallerden elde ettikleri 35 izolatı tanılamış ve gruplamışlar, ayrıca sonuçlarını 18 referans suşla karşılaştırmışlardır. Sonuçta ince-tabaka kromatografisi ile aktinomisetlerin bütün hücre diaminopimelik asit ve karbonhidratlarının kolayca saptanabildiğini, bu metodun rutin klinik laboratuvarlarında çok daha hızlı sonuç verdiğini ve daha uygun olduğunu açıklamışlardır.

Çizelge 2.1. Aktinomisetlerde Hücre Duvarı Tipleri (Lechevalier et al. 1977, Prescott et al.1990' dan).

Hücre Duvarı Tipi	DAP İzomeri	Glisin	Karakteristik Şeker	Örnek Genus
I	L,L	+		<i>Streptomyces</i>
II	Meso	+		<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>
III	Meso	-		<i>Thermoactinomyces</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	Meso	-	Arabinoz, Galaktoz	<i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardia</i>

Streptomycetaceae' nın sınıflandırılmasında peptidoglikan tipide önemlidir. Bu familyada peptid ara köprüsünün glisinlerden oluştuğu A₃Y tipinde peptidoglikan vardır. Ayrıca hücre çeperleri fosfolipidler, menaquinonlar, yağ asitleri ve asetillenmiş muramik asit kalıntıları içerir. Familya üyelerinin sanıldığı gibi tayinleri kolay yapılamamaktadır. Örneğin; *Kitasatosporia'* da havasal miselden şekillenen sporlar LL-DAP içerir, katı ve sıvı besiyerinde büyüyen vejetatif (substrat) miselyumlarda ise meso-DAP vardır. *Actinomadura* ve *Microtetraspora'* da ise meso-DAP yanında iz halde LL-DAP bulunmaktadır. Familya üyelerindeki yağ asitleri ve polar yağların miktarı ortam şartlarına bağlı olarak değişmektedir.

Streptomisetlerin tanılanmalarında; substrat miselyumun fragmentasyonu, spor zincirlerinin oluşumu, havasal miselin oluşum tipi, spor yüzey süs tipleri ve spor morfolojisi, pigmentasyon, fizyolojik özellikler, antibiyozis, bazı antibiyotiklere dirençlilik, gibi 41 karaktere dayalı olasılık tanı matrisleri Williams ve arkadaşları (1983) tarafından oluşturulmuştur. Bu matris skalası bilinmeyen izolatlara uygulanarak %80 benzerlik gösterenler bir gruba dahil edilmektedir. Kämpfer ve arkadaşları (1991) bu karakterlere yeni karakterler ilave ederek, daha fazla sayıda straine uygulayarak ilgili dataları genişletmişler, bunları genetik ve kemotaksonomik verilerle desteklemişlerdir. Goodfellow ve arkadaşları (1992) fluorogenik substratları kullanarak hızlı enzim testlerini tanılamaya dahil etmişlerdir. Faj duyarlılık ve serolojik testlere ilaveten hücresel yağ asitlerinin belirlenmesi, bilinmeyen *Streptomyces* izolatlarının tanılanmalarında

kullanışlıdır; ancak, cins içindeki türlerin ayrımında yeterli olmamaktadır (Anderson and Wellington 2001).

Sporlar piknidia, sporangia veya sporangiaya benzer vesiküllerde oluşturulabilir. Sporlar fungus sporlarına benzerliğinden dolayı konidia veya artrospor olarak isimlendirilirler. Havasal miselyumun dallanması, spor zincir şekilleri ve spor yüzeyleri gibi morfolojik özellikleri substrat miselyumdan daha önemlidir. Spor yüzey şekilleri; yumuşak, siğilli, spin şeklinde veya tüylü; spor zincir şekilleri ise; düz, fleksiyoöz veya spiral şekilli olabilmektedir. Havasal sporların oluşumu ise, havasal hiflerin spor zincirleri şekline dönüşümüyle gerçekleştiği varsayılmaktadır. Bu olay genustan genusa farklılık göstermekle beraber, hifin fragmentasyonu ile çubuk şeklinde veya kokoid elementler oluşmaktadır. Hareketli sporlar nadir olarak görülmektedir. Çizelge 2.2.' de *Streptomyces* ve ilişkili genusların bazı morfolojik özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Streptomyces* ve ilişkili Genusların Bazı Morfolojik Özellikleri (Lechevalier 1989, Locci 1989, Goodfellow et al. 1992' den).

Substrat miselyum				Havasal miselyum		
Genus	Spor zinciri	Sporangia benzeri vesiküller	Sclerotia	Uzun artrospor zincirleri	Sporangia benzeri vesiküller	Hareketli sporlar
<i>Streptomyces</i>	+, ^a	-	-	+	-	-
<i>Actinopycnidium</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Actinosporangium</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Chainia</i>	-	-	+	+	-	-
<i>Elytrosporangium</i>	-	+	-	+	-	-
<i>Kitasatoa</i>	-	+	-	+	+	?
<i>Microellobosporia</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Streptoverticillum</i>	-	-	-	+	-	-

^a, semboller; +, pozitif; -, negatif; +,-, bazı türler pozitif; ?, kesin belirli değil.

Genus *Chainia* koloni yüzeylerinde büyük miselyum toplulukları içerisinde sferik skleroitik granüller oluştururlar. Havasal hif ve spor zincirleri *Streptomyces* ile hemen hemen aynıdır. Laboratuvarda büyütülmüş olanlarda sclerotia oluşumu kaybolmasına rağmen havasal misel üretimi artmaktadır. *Streptomyces*' de gözlenen sclerotia benzeri yapılar orijin ve yapı bakımından *Chainia*' daki sklerotiumdan farklıdır. Bu granüllerin biokimyasal analizleri yapılamamaktadır.

Chainia' daki sclerotia (20- 75 µm yarıçapında veya daha büyük)' nın detaylı çalışılması, bunların orijininin geniş dallanmış yağ damlaları içeren hifsel bölgeler olduğunu göstermiştir. Bu çok lokuslu yapıların bireysel hücreleri L-2-3 diaminopropionik asit içeren hiflerle çevrilmiş ve hep birlikte çimento şeklinde sıkı bir yapı oluşturmuştur. Zamanla sclerotianın yağ içeriği

yaklaşık kuru ağırlığının %50' sine ulaşır. Sclerotia ezilirse yağ damlaları ortalığa yayılır. *Chainia*'nın yaşam devresinde sclerotianın görevi tam belirli olmayıp; yapılan kültür çalışmalarında sclerotia'nın kuruluğa olağanüstü bir direnç gösterdiği anlaşılmış, fonksiyonunda kuru çevrelerde organizmanın yaşamasını sağlamak olduğu açıklanmıştır.

Genus *Elytrosporangium* ve *Microellobosporia* eskiden burğu şeklindeki vesiküllerin oluşumu nedeniyle *Streptomyces*'den ayrı olarak sınıflandırılıyordu. '*Merosporangia*' ismi verilen yapıda, 7 tane hareketsiz spor bulunmaktadır. Bu yapı, *Elytrosporangium*'da substrat miselyumu üzerinde *Microellobosporia*'da ise ya substrat ya da havasal misel üzerinde oluşturulur. Spor oluşum tarzı diğer *Streptomyces* artrospor zincirleriyle aynı olup, biraz daha büyük olabilir. Vesikül duvarı zayıf buruşuk membranlı olup, diğer aktinomiset genuslarında bulunan spor zincirlerini çevreleyen fibröz kına denk geldiği düşünülmektedir.

Streptomyces'in izolasyon ve karakterizasyon metodları *Kitasatoa* içinde aynı olup, *Streptomyces* havasal miselyumu üzerinde görülen artrospor uzun zincirleri bu genusla aynıdır. Ama filogenetik olarak bu genus sporangia oluşturan aktinomisetlerden uzaktır. DNA homolojisi, hücre duvarı tipi, lipid karakterleri, faj- hücre ilişkileri gibi benzerliklerinden dolayı *Streptomyces* genusuna aktarılmıştır. Çizelge 2.3.'de hücre çeperi kemotip 1 olan diğer aktinomisetler ile *Streptomyces* genusu ayırımında kullanılan karakterler verilmiştir.

Streptomisetlerin tanımlanmalarında ve dolayısıyla türlerin ayırımında DNA'ya dayalı moleküler metotlar kullanılabilir. DNA-DNA homoloji metodu, iki organizmanın DNA benzerliklerinin ortaya konulması olup; birbirine yakın taksonların incelenmesinde oldukça kullanışlıdır. Aynı türe dahil strainlerde DNA-DNA benzerliği %70' den daha fazladır (Stackebrandt and Goebel 1994). Bu metot streptomisetlerin tanımlanmalarında çok sayıda çalışmada (Healy and Lambert 1991, Doering-Saad et al. 1992, Labeda 1992, Labeda and Lyons 1992, Kim et al. 1999, Bouchek-Mechiche et al. 2000) uygulanmış ve morfoloji ile fizyolojiye dayalı tanımlamalara oldukça fazla katkıda bulunmuştur. Her ne kadar *Streptomyces* izolatlarının tanımlanmasında da kullanışlı olmasına rağmen, genomlarının stabil olmamasından dolayı tek başına yeterli değildir, diğer testlerle beraber ele alınıp değerlendirilmesi gerekir (Anderson and Wellington 2001).

Ribozomal alt birimlerini (16S, 23S ve 5SrRNA) kodlayan gen dizilerinin analizi bakteri identifikasyonunda oldukça önemlidir ve türlerin filogenetik düzenlenmelerinde önemli bilgiler vermektedir (Woese 1987, Brenner et al. 2001). Ribozomal genleri kodlayan DNA sekansları oldukça stabil olup, bazı bölgeleri değişken olabilmektedir, bundan dolayı tür ayırımında daha güvenilirdir (Stackebrandt and Goebel 1994, Rosselló-Mora and Amann 2001). Kataoka ve arkadaşları (1997), 16S rRNA değişken gen bölgelerinden yararlanarak *Streptomyces* türlerinin identifikasyonu için bir indeks oluşturmuşlardır. Ancak, 16S rRNA sekans bilgisi tek başına tür tanısında yeterli değildir (Rosselló-Mora and Amann, 2001). Ayrıca, tekrarlayan DNA sekanslarını kodlayan genlerin PCR-RFLP ile belirlenmesi de (Sadowsky et al. 1996,

Steingrube et al. 1997) patojenik ve diğer klinik açıdan önemli *Streptomyces* türlerinin sınıflandırma ve identifikasyonunda sıkça kullanılmaktadır.

2.1.3. İzolasyon Metotları

Streptomisetlerin farklı habitatlardan izolasyonunda tek bir selektif yöntem yoktur. Streptomiset sporlarının Gram-negatif bakterilerden; amonyum, sodyum hipoklorit, ısı, kalsiyum karbonat, klor-amin gibi ön işlemlere daha dayanıklı olmalarından dolayı, bu yollarla zenginleştirme yapılmaktadır (Kutzner 1986, Goodfellow and Simpson 1987).

Daha fazla selektif izolasyon; farklı besin kaynaklarının kültür ortamına ilave edilmesi ile mümkün olmaktadır. Streptomisetler diğer bakterilerin aksine çoğu biyopolimerize elementlerden, özellikle de nitrat gibi inorganik azot kaynaklarından daha iyi yararlanabilmektedirler (Kutzner 1986, Goodfellow and Simpson 1987, Williams et al. 1989). İzolasyon ortamlarının gliserol, nişasta gibi karbon; nitrat, kazein ya da arginin gibi azot kaynakları ile desteklenmesi selektif izolasyonu kolaylaştırmaktadır (Kutzner 1986).

Antifungal ajanların izolasyon ortamlarına ilavesi ile fungus türlerinin büyümesi engellenilebilmekte; ancak, antibakteriyal antibiotikler streptomisetlerinde büyümesini inhibe edebileceğinden dolayı kullanılamamaktadır. Sikloheksimit (50-100 µg/ml), pimarisin ve nistatin (10-50 µg/ml) izolasyonda sıklıkla kullanılan antibiyotiklerdir (Kutzner 1986). Athalye ve arkadaşları (1981) aktinomisetlerin izolasyonunda çok sayıda besiyerine rifampisin (5 µg/ml) ilave etmişler, topraktan *Actinomadura* strainlerini; organik maddeden ve samandan *Thermomonospora chrogea* ile *Streptomyces albus*' u daha kolay izole etmişlerdir. Çalışmalarında bu antibiyotiğe (2-5 µg/ml oranlarda) karşı bazı *Streptomyces* türlerinin duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Toprak örneklerinin 100 °C' de 15 dakika muameleye tabi tutulmasının çok sayıda istenmeyen bakteriyi imha ettiğini çalışmalarında göstermişlerdir.

Mezofilik streptomisetler genellikle 22-37 °C' de 14 gün, termofilik türler 40-55 °C' de 5 gün inkübe edilmektedir (Kutzner 1986, Goodfellow and Simpson 1987, Williams et al. 1989). Streptomisetlerin çoğu nötrofiliktir ve izolasyon için genelde nötral pH tercih edilir. Asidofilik strainler elde edilmek istenirse pH 4.5' e, alkalifilikler için ise pH 10-11' e ayarlanır. Ancak bazı türlerin adaptasyonu hızlı olduğundan pH değerlerinin değişken olabileceği unutulmamalıdır (Suutari et al. 2000).

Çizelge 2.3. Hücre Çeperi Kemotip I olan Diğer *Actinomycetes* ile *Streptomyces* Genusu Ayırımında Kullanılan Karakterler (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ; Locci, 1989' dan).

Karakterler	Streptomyces	Intrasporangi um	Streptoverticillum	Kineosporia	Nocardioides	Sporichthya
Koloni büyüklüğü	Görülür	ND	Görülür	Küçük	ND	Mikroskopik
Substrat miselyum	+ ^a	+	+	+	+	-
Sporlar	+/-	-	-	-	-	-
Sporangia	-	-	-	+	-	-
Hareketli sporlar	-	-	-	+	-	-
Fragmentasyon	-	-	-	-	+	-
Havasal miselyum	+	-	+	-	?	+
Artrospor zinciri	+					+
Vertisil artrosporlar	+,-		+	-		+
Spor yüzeyi						
Düz	+		+	-		+
Spor yüzeyi saçsı,						
kıvrık ya da dikenli	+,-		+,-	-		-
Hareketli sporlar	-					+
Hücre çeperi						
hidrolizatı						
şekerleri;arabinoz,	-	-	-	+	-	-
galaktoz, ksiloz						
Lipid karakterleri						
Fosfolipid tip	PII	PIV	PII	PIII	PI	ND
Predominant						
menaquinon	MK-9(H6)	MK-8	MK-9(H6)	MK-9(H4)	MK-8(H ₄)	MK-9(H6)
Ya da	Ya da		Ya da			Ya da
	MK-9(H8)		MK-9(H8)			MK-9(H8)
Yağ asitleri						
Doygun düz zincirli	+	+	+	ND	+	+
İzo-/anteizo- dallı	+	-	+	ND	+	+
Doymamış	-	+	-	ND	+	+
10-metil dallanmış	-	-	-	ND	+	+
Mol % G+C	69-78	71	69-73	ND	66-72	ND

^a, semboller; +, pozitif; -, negatif; +,-, bazı türler pozitif; ?, kesin belirli değil; ND, belirlenmedi.

Streptomisetlerin moleküler tekniklerle topraktan izolasyonları mümkün olabilmektedir. Stackebrandt et al. (1992) ve Mehling et al. (1995), 16S rDNA sekanslarını belirleyerek, bu bölgeyi kodlayan genleri genus-spesifik problemlerin ve primerlerin oluşturulması için kullanmışlardır. Ancak, bazılarının şu anda var olan streptomiset sekanslarıyla eşleşmelerinde sorun yaşamışlardır. Huddleston et al. (1997) topraktan streptomisin üreten streptomisetlerin izolasyonu için; streptomisin üretiminde rol alan biyosentetik genleri taşıyan DNA problemlerini

kullanarak bir metot geliştirmişlerdir. Roberts ve Crawford (2000), *Streptomyces lydicus* için PCR ile, polimorfik DNA (RAPD) kullanarak strain-spesifik DNA probu geliştirmişlerdir.

2.2. Streptomisetlerin Doğal ve İnsan Yapımı Alanlarda Bulunuşu

Streptomisetler çok sayıda maddeyi parçalayabilen ekstra-sellüler enzim üretirler (Morosoli et al. 1997). Williams (1976), streptomisetlerin silikon, doğal plastik, pamuk, PVC plastik, odun, yün, saman ve tahıl tanelerini kolayca parçalayabildiklerini belirtmiştir. Jendrossek ve arkadaşları (1997) izole ettikleri 50 plastik parçalayıcı aktinomisetten 33 tanesinin streptomiset olduğunu belirtmişlerdir. Mezofilik aktinomisetlerin çoğunluğunu oluşturan *Streptomyces* türleri farklı bina yapımı materyellerden özellikle de seramik, boya ve yapışkandan izole edilebilmiştir (Hyvärinen et al.2002).

2.2.1. Toprak

1900 yılında Beijerinck aktinomisetlerin toprakta, bahçe toprağında bir metreye kadar, kumsal toprakta 2 metreye kadar çok bol miktarda bulunduklarını ortaya koymuştur. Hiltner ve Störmer 1903' de jelatin plak metodunu kullanarak aktinomisetleri ilk defa saymışlar ve aktinomisetlerin sayısının mevsime bağılı olarak değiştiğini bulmuşlar; onların toprak mikroflorasının %13-30' nu oluşturduğunu, mevsime bağılı olarak ilkbaharda %20, yazın %13 ve sonbaharda %30 olarak saptamışlardır. Cohn 1916' da aktinomisetlerin bitki köklerinde zengin toprakların mikrobiyal populasyonlarının %40' ına kadar çıktıklarını; halbuki ekimi yapılan topraklarda onların sayılarının toplam mikrofloranın sadece %21' ini teşkil ettiğini saptamıştır (Öner, 1989).

Toprak streptomisetlerin en bol bulunduğu ortam olup, hemen hemen bütün toprak tiplerinde bulunmaktadır (Kutzner 1986, Williams et al. 1989). Topraktaki organik maddeyi parçalamalarından dolayı ekolojik rolleri büyüktür (Khan and Williams 1975, Kutzner 1986, Goodfellow and Simpson 1987, Nielsen and Winding 2002). Toprakta en yoğun bulundukları yer organik horizondur (Hagedorn 1976). Çoğu toprakta, canlı mikroorganizmanın %1-20' sini, (Kutzner 1986) aktinomisetlerin ise %64-97' sini oluştururlar (Xu et al. 1996, Wang et al. 1999). Organik maddece fakir ve iklimin soğuk sürdüğü bölgelerdeki topraklarda bulunan aktinomisetlerin hemen hemen hepsi streptomiset üyeleridir (Xu et al. 1996). Asidik, bataklık ve maden ocağı topraklarındaki streptomisetlerin sayısı yaklaşık 10^3 - 10^6 cfu / g olarak bulunmuştur (Khan and Williams 1975). Li (1997) topraktan selülozu parçalayan bir aktinomiset izole etmiş, morfolojik karakterleri ve hücre duvarı tipine göre bu izolatını *Streptomyces cellulolyticus* olarak tanılamıştır.

Streptomisetler bitki büyümesini teşvik ettiklerinden ve özellikle antifungal antibiyotikleri üretmelerinden dolayı kök patojenlerinin kontrolünde kullanılmaktadır (Yuan and Crawford 1995, Hamby and Crawford 2000).

Sembiring ve arkadaşları (2000) tropik bir angiosperm olan *Paraserianthes falcataria*'nın kök çevresinden ve yetiştiği alanlardaki topraklardan aldıkları örneklerden çok sayıda *Streptomyces* izole etmişlerdir. İzolatların renk gruplamasını Oat Meal Agar ve Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar' ı besiyerinde belirlemişler, pigment oluşturabilme kabiliyetlerini referans suşlarla karşılaştırmışlardır. Renk gruplaması ve morfolojik özellikleri bakımından 94 suşla uyuşan kendi izolatlarının *Streptomyces violaceusniger* olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 12 izolatı bugün için geçerli olan tanımlanmış *S. violaceusniger* sınıfına giren türlerle karşılaştırmışlar, 6 izolatın genotipik ve fenotipik özellikleri açısından bu sınıf üyelerinden ve kullanılan referans strainlardan farklı olduklarını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar izole ettikleri *S. violaceusniger*' in patojen funguslara karşı antagonist olduğunu çalışmalarında belirtmişlerdir.

2.2.2. Kompost ve Saman

Streptomisetler özellikle ısısal işlem görmüş kompost, hayvan yemleri ve samanda bulunmaktadır (Lacey and Crook 1988). Kompostun oluşumundaki ve ısısal işlemlerin erken safhalarında mezofilik türler, ilerleyen süreçte yerini *Streptomyces albus* ve *Streptomyces griseus* gibi termotolerant türler ve zamanla gerçek termofilik türler almaktadır (Goodfellow and Simpson 1987). Komposttan izole edilen termofilik türlerin sayısı 10^3 - 10^5 cfu/g arasında değişmektedir (Goodfellow et al. 1987). Bu türler, genelde *Streptomyces thermovulgaris*, *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces macrosporus*, *Streptomyces megasporus* ve *Streptomyces thermolineatus* gruplarına dahil edilmektedir (Goodfellow et al. 1987).

Ruiz ve arkadaşları (1995) samandan ksılan' ı parçalayan bir aktinomiseti *Streptomyces halstedii* olarak tanılamışlar, bu organizmanın endüstride kullanılabileceğine işaret etmişlerdir.

2.2.3. Sucul Ortamlar

Streptomisetler her ne kadar çevre toprakların suyla yıkanması sonucu sucul ortamlarda bulunduğu düşüncesiyle tartışma konusu olsada; taze sulardan ve denizsel ortamlardan izole edilmişlerdir (Cross 1981, Goodfellow and Simpson 1987). Moran ve arkadaşları (1995) kıyı bataklığından izole ettikleri streptomisetlerin toplam mikrobiyal komunitenin %2-5' ini oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Streptomisetler nadir olarak içme suyu kaynaklarında bulunabilmekte ve oluşturdukları geosmin ve metil izo-borneol gibi kokuya neden olan sekonder metabolitler ile suyun kalitesini bozmaktadırlar (Bentley and Meganathan 1981, Cross 1981, Wood et al. 1985).

Yapılan alışmalar streptomisetlerin evsel ortamlarda, havada bulunduğunu da göstermektedir (Andersson et al. 1999).

2.3. Sekonder Metabolitler

Mikrobiyal sekonder metabolitler arasında antibiyotikler, pigmentler, toksinler, simbiyozis ve rekabette etkili maddeler, enzim inhibitörleri, feromonlar, immün sisteme etkili ajanlar, reseptör antagonist ve agonistleri, pestisitler, antitümöral ajanlar ile bitki ve hayvan büyüme promotörleri bulunmaktadır. retimlerini, besinler, büyüme oranı, geri-dönüşüm kontrolü (feed back control), enzim inaktivasyonu ya da aktivasyonu regüle edebilmektedir. Hücre içindeki üretimleri ise; düşük moleküler ağırlığa sahip bazı moleküller, tRNA, sigma-faktörleri ve ileri-eksponential gelişimdeki gen ürünleri tarafından etkilenmektedir. Sekonder metabolizma genelde DNA zerindeki bir grup gen tarafından, nadiren plasmid DNA zerindeki genler tarafından kontrol edilir. Primer metabolizmanın aksine, sekonder metabolizmayı yönlendiren biyokimyasal yol izleri tam olarak anlaşılamamıştır (Demain 1998).

Sekonder metabolitlerin hücrede birincil derecedeki metabolik işlemlerde ve büyümede gerekli olmadıkları söylenmektedir. Streptomisetler sekonder metabolitleri kendi doğal ortamlarında ve özellikle toprakta, morfolojik değişimlerle beraber üretmeye başlamaktadırlar (Vining 1990). 23.000' in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin %42'si aktinomisetler, %42' si funguslar ve % 16' sı diğer bakteriler tarafından üretilmektedir. Yaklaşık olarak bilinen 10.000 antibiyotiğin %45-55'i *Streptomyces* genusu yeleri tarafından üretilmektedir (Demain 1999, Lazzarini et al. 2000).

Sekonder metabolitlerin sentezini kodlayan genler gruplandırılmıştır. Bu gruplar aynı zamanda biyosentez, oto-resistant ve regülasyon genlerini de kapsamaktadır (Pissowotzki et al. 1991). Bazı durumlarda bu genler plazmitlere aktarılıp, gen transferiyle sekonder metabolitler retilabilmektedir. Bu olay doğal olarak toprakta da gerçekleşebilmektedir (Egan et al. 1998, Omura et al. 2001). şu anda *Streptomyces coelicolor* (Bentley et al. 2002) ve *Streptomyces avermitilis* (Omura et al. 2001) gen sekansları tamamlanmıştır. Her iki türde genomlarının tümüne yayılmış durumda çok sayıda sekonder metabolitin üretiminden sorumlu genleri içermektedir ve çoğunluğu kromozomlarının u kısımlarında lokalize olmuştur (Omura et al. 2001). Kromozomdaki bu u kısımdaki genler, replikasyonun gerçekleştiği çekirdek (merkez) genlerinden çok daha az stabildir, bu bakımdan araştırmalar u kısımdaki genler üzerine yoğunlaşmıştır (Volf and Altenbuchner 1998).

Sekonder metabolitlerin üretimi ortamdaki besin miktarı ve tipine göre değişmektedir. Fermentasyon ortamlarına büyümeyi sınırlayan karbon kaynağı ilavesi ya da yeterli fosfatın azaltılması antibiyotik üretiminde artışa neden olmaktadır (Aharonowitz and Demain 1978, McDowall et al. 1999). Ortamdaki azot miktarı da sekonder metabolitlerin üretimini

etkileyebilmektedir (Aharonowitz 1980). Sekonder metabolitlerin üretim mekanizması tam olarak bilinmemekte, ancak sporulasyona bağlı olduğu ve paralelinde üretildikleri düşünülmektedir. Hem sekonder metabolit üretimi hem de sporulasyon, *S. griseus*'daki hormon benzeri A-Faktör gibi regülasyon faktörleri ile teşvik edilmektedir (Horinouchi and Beppu 1992). Streptomisetlerin regülasyon mekanizmaları oldukça komplekstir. Örneğin *S. coelicolor*'un proteinlerini kodlayan genlerin yaklaşık %12'sinin regülasyon mekanizmalarından sorumlu olduğu vurgulanmaktadır (Bentley et al. 2002).

Streptomyces genusu üyeleri antibakteriyal, antifungal, antiparazitik, antitümoral ve immüno-supresif biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda sekonder metabolitin üreticileri olarak bilinir (Roy et al. 2006).

2.3.1. Antibiyotikler

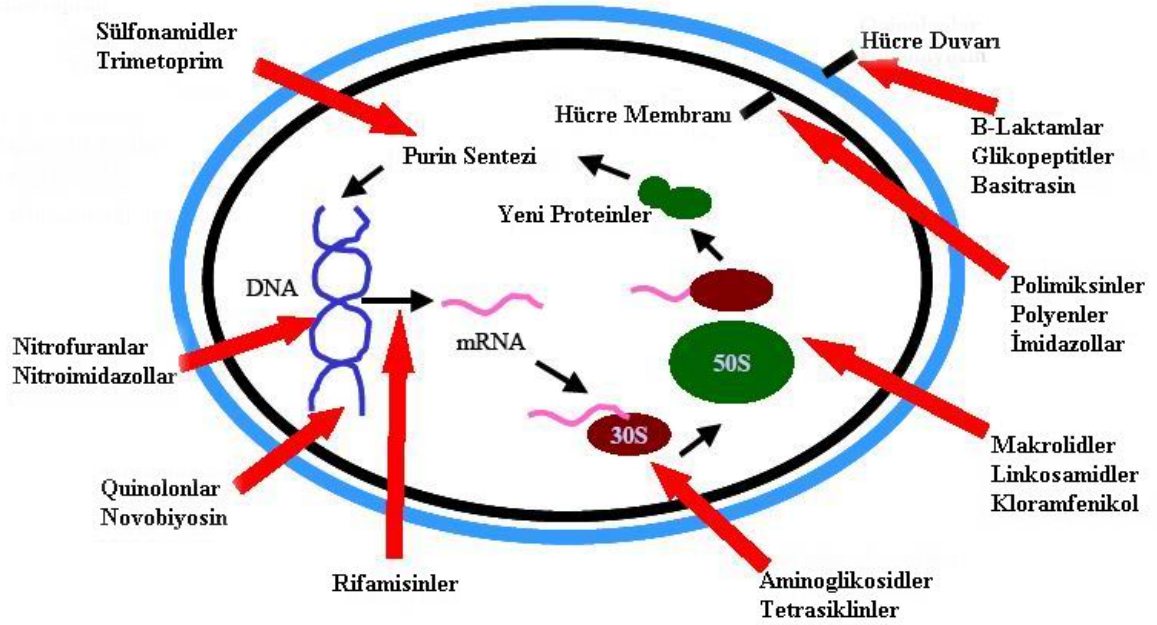
2.3.1.1. Antibiyotikler Hakkında Genel Bilgiler

Antibiyotikler, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların belli bölgelerine olumlu ve/veya olumsuz yönde etki gösteren, düşük moleküler ağırlıkta, mikrobiyal kökenli sekonder metabolitlerdir. Moleküler ağırlıkları 150-5000 dalton arasında değişir. Molekülleri karbon, hidrojen, oksijen ve azot, hatta diğer bir kısmı kükürt, fosfor veya halojen atomlarını içerir. (Öner 1989, Denizci 1996, Anonim 2001, Anonim 2006a, 2006b).

Sidal ya da statik etkili olabilen antibiyotikler; kimyasal yapılarına, üretici organizmaya, etki spektrumlarına ve hücrede etkili oldukları hedef bölgelere (Şekil 2.1.) göre farklı gruplara ayrılabilirler. Çizelge 2.4.'de bazı antibiyotikler ve etki şekilleri verilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı Antibiyotikler ve Etki Şekilleri (Öner 1989; Schlegel 1995; Anonim 2001ve 2006b' den modifiye).

Grup	Alt Grup/ Örnek	Etki Şekli
<i>β-Laktamlar</i>	Penisilinler Metisilin Aminopenisilinler Piperasilin Ampisilin	Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörleri
	Sefalosporinler Sefalordin Sefalotin Sefagisin	
	Monobaktamlar Aztreonam	
	Karbapenemler Imipenem Meropenem	
	Peptitler	
	Glikopeptidler Vankomisin Teikoplanin Avoparsin	
<i>Tetrasiklinler</i>	Tetrasiklin Minosiklin Klortetrasiklin	Protein Sentezi İnhibitörleri
<i>Makrolidler</i>	Eritromisin Azitromisin Oleandomisin Spiramisin Tilosin Karbomisin	
<i>Aminoglikosidler</i>	Gentamisin Tobramisin Streptomisin Kanamisin	
<i>Nitrofurantoin</i>	Nitrofurantoin	DNA Hasarı
<i>Metronidazol</i>	Metronidazol	DNA Sentezi İnhibitörleri
<i>Quinolonlar</i>	Siprofloksasin Ofloksasin Norfloksasin Nalidiksik asit	



Şekil 2.1. Bazı Antibiyotikler ve Bakteri Hücresinde Hedef Aldıkları Bölgeler (Tabarez 2005' den modifiye).

Antibiyotikler insanlar ve de hayvanlardaki çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Terapötik ya da koruyucu amacının yanında, hayvanın günlük besinine antibiyotik karıştırılarak hayvan beslenmesinde de kullanılır (Wassenaar 2005). Bu olay antimikrobiyalların hayvan büyümesini teşvik etmesi ve dolayısıyla hayvanın yeterli ağırlığa sahip olması için uygulanmaktadır. Ayrıca antibiyotikler gıdaların muhafazasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçiciliği sağlamak amacıyla, araştırma materyali olarak, ziraatta koruyucu olarak ya da büyümeyi teşvik amacıyla kullanılmaktadır (Öner 1989, Denizci 1996, Anonim 2001, 2006a).

1943 yılında streptomisin *Streptomyces griseus*' dan izole edilmesinden sonra özellikle toprak kökenli antibiyotik-üreticisi mikroorganizma araştırma çalışmaları yoğunlaşmıştır (Rachev et al. 2003, Taddei et al. 2006). Günümüzde klinikte kullanılan antibiyotiklerin çoğunluğunun aktinomisetler tarafından üretildiği bir gerçektir. Aktinomiset antibiyotiklerinin % 75' e yakını ise *Streptomyces* genusuna giren türler tarafından üretilmektedir (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2.5. *Streptomyces* Genusu Üyeleri Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler (Wendisch and Kutzner 1991, Anonim 2006b' den modifiye).

Biyolojik Aktivite	Antibiyotik	Üreticiler
Antibakteriyal	Streptomisin	<i>S. griseus</i>
	Kanamisin A, B	<i>S. kanamyceticus</i>
	Higromisin B	<i>S. hygrosopicus</i>
	Sefamisin A, B	<i>S. chartreusis</i>
	Tienamisin	<i>S. cattleya</i>
	Klavularik asit	<i>S. clavuligerus</i>
	Oleandomisin	<i>S. antibioticus</i>
	Lankasidin	<i>S. violaceoniger</i>
	Pristinamisin	<i>S. pristinaespiralis</i>
	Spiramisin	<i>S. ambofaciens</i>
	Oksitetrasiklin	<i>S. rimosus</i>
	Eritromisin A	<i>S. erythreus</i>
	Linkomisin	<i>S. lincolnensis</i>
	Kloramfenikol	<i>S. venezuelae</i>
	Valinomycin	<i>S. griseus</i>
Antifungal	2-OH-İmetilklavam	<i>S. clavuligerus</i>
	Nistatin	<i>S. noursei</i>
	Amfoterisin B	<i>S. nodosus</i>
	Candisin/Levorin	<i>S. griseus</i>
	Rapamycin	<i>S. hygrosopicus</i>
Antiviral	Ara-A	<i>S. antibioticus</i>
	Tunikamisin	<i>S. chartreusis</i>
Antitümoral	Daunorubisin	<i>S. peuceticus</i> , <i>S. coeruleorubidus</i>
	Doxorubisin	<i>S. peuceticus</i> var. <i>caesius</i>
	Ditrisarubisin	<i>S. cyaneus</i>
	Mitomisin C	<i>S. caespitosus</i>
	Aktinomisin	<i>S. antibioticus</i>
	Sarkomisin	<i>S. erythrochromogenes</i>
Antiparazitik	Higromisin B	<i>S. hygrosopicus</i>
	Avermektin	<i>S. avermitilis</i>
	Milbemisin	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>aureolacrimosus</i>
	Monensin	<i>S. cinnamomensis</i>
	Salinomisin	<i>S. albus</i>
Insektisidal	Avermektin	<i>S. avermitilis</i>
	Milbemisin	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>aureolacrimosus</i>
Herbisidal	Bialafos	<i>S. hygrosopicus</i>
	Fosfinotirisin	<i>S. viridochromogenes</i>
ATPase inhibitörleri	Bafilomisin	<i>S. griseus</i> <i>S. halstedii</i>
Diyabetik	Streptozotosin	<i>S. achromogenes</i>
Büyüme Promotörü	Lasalosid Sodyum	<i>Streptomyces</i> sp.
	Monensin Sodyum	<i>S. cinnamomensis</i>
	Salinomisin	<i>S. albus</i>
	Tilosin Fosfat	<i>S. cirratus</i>

Günümüzde *Streptomyces* üyelerinin antibiyotik üretiminden sorumlu genler saptanmakta, genin promotor bölgesine etki edilerek antibiyotiğin ekspresyonu artırılmaktadır. Ayrıca antibiyotik üretiminden sorumlu genlerin daha hızlı çoğalan organizmalara aktarımı

yapılarak antibiyotiğin ucuz yoldan hızlı bir şekilde üretimi yapılmaktadır. Sheldon ve arkadaşları (1997, 1999) mitomisin üretiminden sorumlu *Streptomyces lavendulae*' nın gen haritasını çıkarmışlar, antibiyotik üretiminden sorumlu geni saptamışlardır. Aynı şekilde Pandza et al. (1997) *Streptomyces rimosus*' dan oksitetrasiklin üretimiyle ilgili geni belirleyerek, aynı antibiyotiği üreten ve bu organizmayla ilişkili olmayan *S. coelicolor*' un antibiyotik üretiminden sorumlu genleri ile karşılaştırmışlardır. Benzer çalışmalar aktinomisin üreticisi *S. antibioticus* (Hsieh and Jones 1995) ve streptomisin üreticisi *S. rameus* (Hatano 1999) üzerinde yapılmıştır.

1987' de Öner ve ark. *Streptomyces mediterranei*' den; fermentasyon yöntemiyle sentetik ortam kullanarak laboratuvar çapında rifamisin kompleksini üretmişlerdir. Denizci (1996), Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi topraklarından izole ettiği 356 aktinomiset suşunun antibiyotik aktivitelerini saptamış, etkin bulduğu 4 izolattan üretilen antibiyotiklerden üçünü preparatif ince tabaka kromatografisi (TLC) ile saflaştırmıştır. Üretilen antibiyotiklerin peptit yapıda olmadıkları; ikisinin kuvvetli polar diğer ikisinin apolar olduklarını belirlemiştir.

Yapılan araştırmalar (Lacey 1973, Goodfellow and Board 1980, Goodfellow and Williams 1983, Lechevalier 1989, Locci 1989, Öner 1989, McCarthy and Williams 1990, Reis et al. 2006) *Streptomyces* genusu dışında diğer aktinomisetlerinde antibiyotik ürettiklerini göstermiştir. *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Thermoactinomyces*, *Streptoverticillum*, *Microtetraspora*, *Kitasatoa*, *Kitasatosporia*, *Chainia*, *Ampullariella*, *Saccharopolyspora* gibi toprak kökenli aktinomiset genusları antibiyotik üretebilme kabiliyetine sahiptirler.

2.4. Patojen Streptomisetler

Streptomyces türlerinin insanlara patojen olduğuna dair çok fazla kayıt yoktur. Ancak *Streptomyces somaliensis*' in dünyanın farklı yerlerinde aktinomikozise neden olabilen bir tür olduğu rapor edilmiştir (McNeil and Brown 1994). Bu türün haricinde *S. griseus*, *S. albus*, *S. rimosus*, *S. lavendulae*, *S. violaceoruber* ve *S. coelicolor* gibi türler klinik vakalardan özellikle de immun sistem yetersizliği sendromu bulunan hastalardan izole edilmişlerdir (Mishra et al. 1980, McNeil and Brown 1994).

İnsanlarda oluşturulan rahatsızlıklara örnek olarak; ciddi akciğer hastalığı, hiper-sensitif pneumoni (Ahmed et al. 1996), alveollerde alerji, çiftçilerde damar hastalığı verilebilir ve çoğu *Streptomyces* cinsi üyelerini de kapsayan termofilik aktinomisetler tarafından oluşturulur (Lacey and Crook 1988, Kotimaa 1990). Bu bakterilerle temas halindeki çiftçilerde bazı deri reaksiyonları da rapor edilmiştir (Spiewak et al. 2001). Alveollerdeki alerjik rahatsızlığa benzer epidemik solunum hastalığı 1978 yılında Finlandiya' nın küçük bir kasabasında görülmüştür. Aktinomisetlerle özellikle de streptomisetlerle kontamine olmuş çeşme sularını içen kişilerde bu tür rahatsızlıklara neden olmaktadır (Ojanen et al. 1983).

Nemli binalardan izole edilen fungus ve bakteri sporlarıyla, fare, insan makrofajları ve epitelyum hücreleriyle yapılan in-vitro denemelerde inflammatasyon cevapları tetikleyen ve yanıltan potansiyel ajanlar olduğu belirtilmektedir (Hirvonen et al. 1997a, Jussila et al. 1999, Huttunen et al. 2002, Usuki et al. 2006). Streptomisetler, diğer bakteri ve funguslardan daha fazla inflammatasyon (yangı)' a yol açmaktadır (Huttunen et al. 2002) ve buna neden sporların canlı olmasına gerek yoktur (Hirvonen et al. 1997b). Aynı duruma binaların çürümesine neden olan streptomisetlerde de rastlanmaktadır (Murtoniemi et al. 2001, Roponen et al. 2001).

Streptomyces californicus sporlarına maruz bırakılan farelerin ciğerlerinde akut inflammatasyon ve özellikle de dalaklarında sistemik immün-toksisite görülmüştür (Jussila et al. 1999).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1 Araştırma için Seçilen İstasyonlar

Streptomyces suşlarının izolasyonunda kullanılan toprak örnekleri 2001-2002 yıllarında Kuzey Kıbrıs Merkez ve Çevresindeki arazilerden alınmıştır (Çizelge 3.1.).

Örnekleme Streptomisetlerin çevresel istekleri göz önüne alınarak organik maddece zengin, nemli ve nötral pH' daki arazilerden yapılmıştır. Polietilen torbalar içinde laboratuvara getirilen örnekler hemen ön incelemeye alınmıştır.

Çizelge 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı İstasyonlar.

İstasyon Numarası	Alındığı Yer	Tarih
1	Geçitköy Göleti	05.05.2002
2	Güzelyurt Ovası (1)	19.06.2001
3	Alayköy Dönüş Yolu	22.06.2001
4	Gazi-Magosa Yol Kenarı	14.09.2002
5	Lefkoşa Ercan Havaalanı (1)	07.05.2002
6	Alev Kayası	20.06.2001
7	Lefkoşa Ercan Havaalanı (2) Giriş	07.05.2002
8	Bufo-Vento Kalesi Çıkışı	21.06.2001
9	St.-Dilarion Kalesi	21.06.2001
10	Girne Kalesi (Deniz Kenarı)	16.07.2002
11	Karpas Yarımadası-Magosa Yolu Arası	19.06.2001
12	Sazlı Köy	20.06.2001
13	Güzelyurt Ovası (2)	19.06.2001
14	Güzelyurt-Lefkoşa Arası	19.06.2001
15	Lefkoşa-Merkez	05.05.2002

3.1.2. Test Organizmaları

İzole edilen *Streptomyces* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için kullanılan Gram pozitif [Gr (+)], Gram negatif [Gr (-)] bakteriler ile küf ve mayalar Çizelge 3.2.' de görülmektedir.

Çizelge 3.2. Çalışmada Kullanılan Test Organizmaları.

Bakteriler ^a	Küf ve Mayalar ^b
1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	12. <i>Candida albicans</i>
2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> CCM 2318	13. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6683	14. <i>Yarrowia lipolytica</i>
4. <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	15. <i>Geotrichum penicillatum</i>
5. <i>Escherichia coli</i>	16. <i>Fusarium oxysporium</i>
6. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	17. <i>Aspergillus niger</i>
7. <i>Serratia marcescens</i> CCM 583	18. <i>Alternaria alternata</i>
8. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	19. <i>Trichoderma hamatum</i>
9. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 8043	20. <i>Cladosporium oxysporum</i>
10. <i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5445	21. <i>Penicillium</i> sp.
11. Metisillin-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 95047	

^a Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Bornova/İzmir)'nden temin edilmiştir. ^b CBÜ. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Muradiye/Manisa)'nden temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri*, Çözeltiler ve Kimyasallar

Besiyeri 1: Gliserol-Yeast Ekstrakt Agar

Gliserol (Smyras)	1	Gram (g)
Yeast Ekstrakt (Merck 3753 [†])	0,4	g
K ₂ HPO ₄ (Merck 4873)	0,02	g
Bakteriyolojik Pepton (Merck 7214)	5,0	g
Agar (Merck 1613)	3	g
Distile Su	200	Mililitre (ml)
pH	7-7.5	

Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri 55 °C' ye kadar soğutulmuş, üzerine 50 µg/ml oranında steril nistatin (Fluka 74721) antibiyotiği ilave edilmiştir. Ortam çalışmamızda streptomisetlerin izolasyonunda büyüme ortamı olarak kullanılmıştır (Tamer ve ark. 1989' dan modifiye).

* Aksi belirtilmediği sürece, çalışmada kullanılan besiyerleri, Shirling and Gottlieb 1966, Williams et al. 1983 ile Öner 1989' a göre hazırlanmıştır. Kaynak belirtilmeyen besiyerleri ticari olup, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda hazırlanarak kullanılmıştır.

[†] Hazır besiyerleri ve bileşenlerinin ticari firma isimleri ve kodları, ilk söz edildiği yerde belirtilmiştir.

Besiyeri 2: Yeast-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)

Yeast Ekstrakt	4	g
Malt Ekstrakt	10	g
Glukoz (Merck 8337)	4	g
Agar	20	g
Distile Su	1	Litre (L)
pH	7.3	

Besiyeri içerikleri distile suda tamamen çözülmüş ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ortam çalışmamızda hem stok, hem de izolatlarımızın kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966).

Besiyeri 3: Oat Meal Agar (ISP 3)

Oat Meal (yulaf unu)	20	g
Agar	15	g
*Shirling and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu	1	ml
Distile Su	1	L
*İz Element Solüsyonu (Shirling and Gottlieb 1966)		
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1	g
MnCl ₂ .4H ₂ O (Horasan Kimya)	0,1	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0,1	g
Distile Su	100	ml

Ortam şu şekilde hazırlanmıştır: 20 gram yulaf unu 15-20 dakika 1 litre distile suda kaynatılmış ve büyük partiküllerin eliminasyonu için tülbent beziyle süzölmüştür. Filtrata 1 ml iz tuzlar solüsyonu ilave edilerek pH NaOH ile 7.2' ye ayarlanarak, 121 °C' de 1.5 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatlarımızın kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966).

Besiyeri 4: Bennet' s Agar

Glukoz	10	g
Yeast Ekstrakt	1	g
Beef Ekstrakt (Merck 3979)	1	g
CaCO ₃ (Atabay)	0,1	g

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0,1	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.2	

Tüm besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, izolatlarımızın fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Locci 1989).

Besiyeri 5: İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)

Çözünür Nişasta (Horasan Kimya)	10	g
K ₂ HPO ₄	1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	g
NaCl (Atabay)	1	g
(NH ₄)H ₂ SO ₄ (Atabay)	2	g
Shirling and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu	1	ml
Bakteriyolojik Agar	20	g
Distile Su	1	L

Bir miktar soğuk su ile pasta haline getirilen nişasta distile su ile 1 litreye tamamlanır, üzerine diğer besiyeri içerikleri ilave edilerek pH 7.2' ye ayarlanır. Ortam otoklavda 1.5 atmosfer altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Çalışmamızda izolatlarımızın kültürel karakteristiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966).

Besiyeri 6: DNaz Agar

DNaz Agar (Sigma D 8559)	39	g
Distile su	1	L
pH	7.3	

Distile suda tamamen çözünen hazır ortam 1.5 atmosferde 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Mikrobiyal inokülasyondan sonra 7 günlük inkübasyona tabi kültüre 1 M HCl ilavesi sonucu oluşan açık zon DNaz üretimi için pozitif kabul edilmiştir.

Besiyeri 7: Jelatin Hidroliz Ortamı

Nutrient Broth (Merck 5443)	1.3	g
Jelatin (Fluka 48120)	4	g
Distile Su	100	ml

Tüm besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, izolatlarımızın fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Tamer ve ark 1989).

Besiyeri 8: Glukoz-Nitrat Agar

Glukoz	10	g
NaNO ₃ (Horasan Kimya)	2.5	g
KH ₂ PO ₄ (Riedel-de-Haën 60230)	1	g
K ₂ HPO ₄	1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
KCl (Atabay)	0,5	g
İz Element Solüsyonu	1	ml
Agar	15	g
Distile Su	1	L

Tüm besiyeri içerikleri distile suda tamamen çözünmüş ve sterilize edilmiştir. Çalışmada izolatlarımızın kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Öner 1989' dan modifiye).

Besiyeri 9: Nişasta-Nitrat Agar

Besiyeri 8' deki Glukoz yerine 10 g Nişasta ilavesi ile oluşturulan ortam, izolatların kültürel karakteristiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Öner 1989' dan modifiye).

Besiyeri 10: Glukoz-Asparagin Agar

Glukoz	10	g
L-Asparagin (Merck 1565)	0,5	g
K ₂ HPO ₄	0,5	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L

121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam çalışmamızda izolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Öner 1989' dan modifiye).

Besiyeri 11: Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)

L-Asparagin	1	g
Gliserol	10	g
K ₂ HPO ₄	1	g
Shirling and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu	1	ml
Agar	20	g
Distile Su	1	L

pH 7.2' ye ayarlanarak, 121 °C' de 1.5 atmosferde 20 dakika otoklavlanan ortam; çalışmamızda izolasyon ve kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966, Öner 1989' dan modifiye).

Besiyeri 12: Nişasta-Asparagin Agar

Çözünür Nişasta	10	g
L-Asparagin	0,06	g
NaNO ₃	0,2	g
K ₂ HPO ₄	0,06	g
NaCl	0,1	g
MgCO ₃	0,2	g
Agar	3	g
Distile Su	200	ml

pH 7.3' e ayarlanarak, ortam 121 °C' de 1.5 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Çalışmamızda izolatlarımızın kültürel özelliklerinin belirlenmesi ve bazı fizyolojik özelliklerinin tespitinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966' dan modifiye).

Besiyeri 13: Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)

Bakteriyolojik Pepton	15	g
Proteoz Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	1	g
Ferrik Amonyum Sitrat	0,5	g

K ₂ HPO ₄	1	g
Sodyum Tiyosülfat	0,08	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.2-7.4	

Ortam 121 °C' de 1.5 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilerek, çalışmamızda izolatlarımızın kültürel özelliklerinin ve melanin oluşturabilme kabiliyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966).

Besiyeri 14: Tirozin Agar (ISP 7)

Gliserol	15	g
L-Tirozin (Fluka 93830)	0,5	g
L-Asparagin	1	g
K ₂ HPO ₄	0,5	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	g
NaCl	0,5	g
Distile Su	1	L
*Pridham and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu	1	ml
Agar	20	g
pH	7.2-7.4	

***Pridham and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu**

CuSO ₄ .5H ₂ O (Horasan Kimya)	0,64	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,11	g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,79	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,15	g
Distile Su	100	ml

Ortam 121 °C' de 1.5 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilerek çalışmamızda izolatlarımızın melanin oluşturabilme kabiliyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966).

Besiyeri 15: Muller-Hinton Broth

Muller-Hinton Broth (Merck 10293)	21	g
-----------------------------------	----	---

ya da

Beef İnfüzyon	3	g
Kazein Asit Hidrolizat (Fluka 22080)	17.5	g
Çözünür Nişasta	1.5	g
Distile Su	1	L
pH	7.4	

1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam çalışmamızda test organizmalarının aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 16: Muller-Hinton Agar

Besiyeri 15.' e 17 gram agar ilave edilerek hazırlanan ortam, 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, izolatlarımızın antimikrobiyal etkinliklerinin saptanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 17: Patates Dekstroz Agar

Potato Dekstroz Agar (Merck 10130)	23	g
ya da		
Patates İnfüzyon	200	ml
Glukoz	20	g
Agar	20	g
pH	5.6	

Besiyeri içerikleri tamamen karıştırıldıktan sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır ve 1.5 atmosfer, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Ortam çalışmamızda izolatların funguslara karşı antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 18: Nutrient Broth

Nutrient Broth	8	g
ya da		
Bakteriyolojik Pepton	5	g
Meat Ekstrakt	1.5	g
Distile Su	1	L
pH	7.0	

Ortam sterilize edildikten sonra test organizmalarının aktive edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 19: Nutrient Agar

Besiyeri 18' e 15 g agar ilavesi ile oluşturulan ortam, izolatların kültürel karakteristiklerinin belirlenmesi, test organizmalarının stoklarının oluşturulması, antibiyotiklere karşı hassasiyet testleri ve bazı fizyolojik testlerde kullanılmıştır.

Besiyeri 20: Üre Redüksiyonu Ortamı

K ₂ HPO ₄	9.1	g
Na ₂ HPO ₄	9.5	g
Fenol-Red	0,01	g
Yeast Ekstrakt	0,1	g
Distile Su	1	L
*Üre Solüsyonu (%15)	13.3	ml
pH	7.2	

*Üre solüsyonu (%15' lik) membran filtre ile sterilize edilmiştir.

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklavlamadan sonra üre solüsyonu (%15, w/v) steril ortama ilave edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Denizci 1996).

Besiyeri 21: Trypton Yeast-Ekstrakt Glukoz Agar

Glukoz	10	g
Yeast Ekstrakt	3	g
K ₂ HPO ₄	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
Agar	20	g
Distile Su	1	L
pH	7.5	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. İzolatların stok kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966' dan modifiye).

Besiyeri 22:Ksilanaz ve Karboksi-Metil Selulaz (KMS) Aktiviteleri Belirleme Ortamı

Ksilan (Fluka 95588) ya da KMS (Fluka 21901)	10	g
NaCl	0,5	g
K ₂ HPO ₄	1	g
KNO ₃	2	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.5	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Williams et al. 1983' den modifiye).

Besiyeri 23: Nişasta-Kazein Agar

Çözünür Nişasta	10	g
KNO ₃	2	g
Kazein (vitaminsız)	0,3	g
NaCl	2	g
K ₂ HPO ₄	2	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	g
CaCO ₃	0,02	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.2	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatların izolasyonu ve stok kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb 1966' dan modifiye).

Besiyeri 24: Nişasta-Nutrient Agar

Bakteriyolojik Pepton	5	g
-----------------------	---	---

Meat Ekstrakt	3	g
Çözünür Nişasta	10	g
Bakteriyolojik Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.2	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Williams et al. 1983' den modifiye).

Besiyeri 25: Litmus Milk Agar Ortamı

Litmus Milk	100	g
ya da		
Yağsız Süt Tozu	100	g
Litmus Tozu	5	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.0	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar karıştırılmış ve tindalizasyon ile sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 26: *Streptomyces* Kültür Ortamı

Glukoz	4	g
Yeast Ekstrakt	4	g
Malt Ekstrakt	10	g
CaCO ₃	2	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.2	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam izolatların stok kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır (Williams et al. 1983' den modifiye).

Besiyeri 27: *Streptomyces* Aktifleştirme Ortamı

Glukoz	10	g
Yeast Ekstrakt	1	g
Meat Ekstrakt	3	g
Bakteriyolojik Pepton	5	g
K ₂ HPO ₄	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
Agar	18	g
Distile Su	1	L
pH	7.0	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam stoktaki *Streptomyces* suşlarının, stoklarının oluşturulması, biyokimyasal ve fizyolojik testlerden önce aktifleştirilmelerinde kullanılmıştır (Williams et al. 1983' den modifiye).

Besiyeri 28: Sodyum Hippurate Broth

Sodyum Hippurate Broth (Fluka 53275)	10	g
ya da		
Heart İnfüzyon	10	g
Proteoz Pepton	10	g
NaCl	5	g
Sodyum Hippurate	10	g
Distile Su	1000	ml
pH	7.0	

Besiyeri içerikleri homojen bir şekilde karıştırılmış ve filtrasyonla sterilize edilmiştir. 0,8 ml miktarlarda tüplere dağıtılarak, inkübasyondan sonra ortama 0,4 ml bütanol:aseton (1:1) ile hazırlanmış %3.5' lik ninhidrin çözeltisi eklenerek, izolatların Hippurate hidrolizi belirlenmiştir.

Besiyeri 29: Karbon Kaynağı* Yararlanma Ortamı (ISP 9)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64	g
MgSO ₄	1	g
K ₂ HPO ₄	5.65	g

Pridham and Gottlieb İz tuzlar solüsyonu	1	ml
Agar	18	g
Distile Su	1	L

pH 7.0' a ayarlanarak, 1.5 atmosfer basınç altında 121 °C' de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (Shirling and Gottlieb 1966).

***Karbon Kaynakları:** Karbon kaynakları [Adonitol (Fluka 02240), Laktoz, Sukroz (Merck 7651), Galaktoz, Mannitol, Mezo-İnositol, Ksilitol (Fluka 95649), L-Arabinoz, Dekstran (Sigma 1537), L-Ramnoz (Merck 7361), Rafinoz, D-Melezitoz (Fluka 63620), D-Melibioz (Fluka 63630), D-Fruktoz (Fluka 47739), Na Sitrat ve Glukoz]' na ait her bir solüsyon tındalizasyon ile sterilize edilerek aseptik şartlarda, steril ortama son konsantrasyon 10,0 g/L olacak şekilde ilave edilmiştir.

Besiyeri 30: Azot Kaynağı* Kullanım Ortamı

Glukoz	10	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	g
K ₂ HPO ₄	1	g
NaCl	0,5	g
Agar	15	g
Distile Su	1	L

pH 7.2' ye ayarlanarak 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir (Williams et al. 1983).

***Azot kaynakları:** Azot kaynakları [L-Sistein (Fluka 30090), L-Histidin (Fluka 53320), L-Fenilalanin (Merck 7256), L-Valin (Merck 8495), L-Prolin (Fluka 81710), KNO₃, L-Asparagin, L-Hidroksiprolin (Fluka 56250), L-Lizin (Fluka 62820), L-Tirozin ve DL- α -n-Bütirik asit]' na ait her bir solüsyon tındalizasyon ile sterilize edilmiştir ve sonra aseptik şartlarda steril basal ortama son konsantrasyon 10,0 g/L olacak şekilde ilave edilmiştir.

Besiyeri 31: Arbutin Degradasyon Ortamı

Yeast Ekstrakt	3	g
Arbutin (Fluka 10960)	1	g
Ferrik Amonyum Sitrat	0,5	g
Bakteriyolojik Agar	7.5	g
Distile Su	1	L

Ortam bileşenleri homojen şekilde karıştırılmış pH 7.2' ye ayarlanarak tüplere aktarılmış, 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, inokulasyondan sonra arbutin içermeyen kontrol tüpleriyle beraber 21 gün sonra kahve-siyah renk pozitif sonuç olarak alınmıştır (Williams et al. 1983). **Dikkat:** Mutlaka kontrol tüpleriyle karşılaştırılmalıdır, melanin oluşumu ile karıştırılabilir.

Besiyeri 32: Ksantin Degradasyon Ortamı

Yeast Ekstrakt	1	g
Lab-lemko	0,8	g
Gliserol	10	g
Kazein (Digest)	2	g
Ksantin (Fluka 45490)	4	g
Bakteriyolojik Agar	15	g
Distile Su	1	L

Ortam bileşenleri homojen şekilde karıştırılmış pH 7.0' a ayarlanarak, 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, petrilere aktarılarak tek çizgi olarak ekimler yapılmış, inokulasyondan sonra ksantin içermeyen petrilere beraber 21 gün sonra büyümenin etrafındaki açık zon oluşumu pozitif sonuç olarak alınmıştır (Williams et al. 1983).

Besiyeri 33: Nutrient-Elastin Agar

Bakteriyolojik Pepton	5	g
Meat Ekstrakt	3	g
Elastin (Fluka 45130)	4	g
Bakteriyolojik Agar	15	g
Distile Su	1	L

Elastin hariç ortam bileşenleri homojen şekilde karıştırılmış, pH 7.0' a ayarlanarak, 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, tinalizasyon ile sterilize edilen elastin, uygun miktarda eklendikten sonra steril petrilere dağıtılmıştır. İzolatlarımızın elastin degradasyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır (Williams et al. 1983' den modifiye).

Besiyeri 34: Egg-Yolk Agar

Bakteriyolojik Pepton	10	g
Glukoz	1	g
NaCl	10	g
Yeast Ekstrakt	5	g
Agar	12	g
Egg Yolk Emülsiyon	%5	(v/v)

Egg –Yolk dışındaki tüm besiyeri içerikleri homojen bir şekilde çözülerek pH 7.0 'a ayarlanmış, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır. Üzerine %5 oranında egg-yolk ilavesi yapılan ortam çalışmamızda izolatlarımızın lesitinaz, proteolizis ve lipolizis reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Williams et al. 1983' den modifiye).

Besiyeri 35:Nitrat agar

KNO ₃	2	g
Nutrient Broth	1	L
Bakteriyolojik Agar	6	g
pH	7.0	

Ortam, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika otoklavlanmıştır. Nitrat redüksiyonu 7-14 gün inkübasyon sonunda ortama 0,2 ml Griess-Hosvay 1 ve 2* ajanlarının ilavesi ve tüplerin iyice karışması sağlandıktan sonraki 30 dakika içerisinde oluşan pembe-kırmızı renk pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Williams et al. 1983, Denizci 1996' dan modifiye).

*Griess –Hosvay 1 ve 2

- 1) 0,8 ml sülfanilik asit 5 M asetik asitin 100 ml' sinde çözülerek hazırlanmıştır.
- 2) 0,6 ml dimetilnaftilamin 5 m asetik asitin 100 ml' sinde çözülerek hazırlanmıştır.

Aynı besiyerine 0,3 g Na₂S₂O₃ (sodyum tiyosülfat) ilave edilerek hidrojen sülfür üretimi; tüplerin ağız kısımlarına yerleştirilen steril kurşun asetat filtre kağıtlarının 14 gün sonunda kahve ya da siyahlaşmasıyla belirlenmiştir.

Besiyeri 36: Büyüme İnhibisyon Test Ortamı

Yeast Ekstrakt	5	g
Lab-Lemko	0,8	g
Gliserol	10	g

Kazein (Digest)	2	g
Bakteriyolojik Agar	15	g
Distile Su	1	L
pH	7.3	

Otoklavda 1.5 atmosferde, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam, izolatlarımızın büyüme, antibiyotik duyarlılık ve bazı kimyasal inhibitörlere hoşgörü testleri^{1,2'} nde kullanılmıştır (Williams et al. 1983).

¹Kimyasal İnhibitörlere Tolerans Testleri İçin Kullanılan Kimyasallar:

“Her bir test maddesi aşağıdaki oranlarda steril solüsyonları halinde ilave edilmiştir.”

NaCl	%4, %7, %10 ve %13	w/v
NaN ₃ (Merck 6688)	%0,01	w/v
NaN ₃	%0,01	w/v
Fenol	%0,1	w/v
Potasyum Tellürit	%0,001	w/v
Kristal Violet	%0,0001	w/v

Kullanılan Ticari Antibiyotikler

Neomisin (Oxoid)	30	µg/disk
Penisilin G (Bioanalyse)	10	i.u. /disk
Gentamisin (Oxoid)	10	µg/disk
Rifampin (Oxoid)	5	µg/disk
Nalidiksik Asit (Oxoid)	30	µg/disk
Eritromisin (Bioanalyse)	15	µg/disk
Sulfamethoxazole (Oxoid)	25	µg/disk
Vankomisin (Bioanalyse)	30	µg/disk
Novobiyosin (Oxoid)	5	µg/disk
Levofloksasin (Oxoid)	5	µg/disk
Oksasiklin (Bioanalyse)	1	µg/disk
Kloramfenikol (Oxoid)	30	µg/disk
İmipenem (Oxoid)	10	µg/disk

²Kimyasal inhibitörlerin sterilizasyonu:

Kristalviolet, sodyum azid ve sodyum klorürün %10' luk stok solüsyonları distile suyla hazırlanmış ve uygun miktarları Besiyeri 34.' e (otoklavlamadan önce) ilave edilmişlerdir. Fenolün stok solüsyonu distile suda hazırlanmış ve membran filtrasyon ile sterilize edilmiştir. Sonra otoklavlanmış Besiyeri 34.' e ilave edilmiştir. Potasyum tellüritin 0,2 g' ı 20 ml steril distile suda hazırlanmış ve sonra uygun miktarı otoklavlamadan sonra yine aynı besiyerine ilave edilmiştir.

Besiyeri 37: Kitosanaz Aktivitesi Belirleme Ortamı (Chitosanase Detection Agar)

Kitosan (Sigma CAS no: 9012-76-4, %86, N-asetil)	10	g
Na ₂ HPO ₄	1.3	g
KH ₂ PO ₄	3	g
NaCl	0,5	g
NH ₄ Cl	1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,24	g
Bakteriyolojik Agar	20	g
Distile Su	1	L
pH	6.5	

10 gr Kitosan 400 ml distile su + 1 M glasiyel asetik asit (toplam 2 ml)'e aktarılarak hot plate üzerinde 30-40 dk. karıştırılır, agar ayrı bir kapta hazırlanır. Diğer besiyeri bileşimleri ise ayrı bir kapta hazırlanır. Üç solüsyon ayrı ayrı 1.5 atmosferde, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilerek birleştirilir, pH, 1 M NaOH ile 6.5-7' e ayarlanır ve steril petrilere dağıtılır. Seçilen izolatların Kitosan hidrolizi etkinliği özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Cheng and Li 2000' den modifiye)

Besiyeri 38: Yarı Katı Nutrient Agar (Semi-Solid Nutrient Agar)

Nutrient Broth	0,8	g
Agar	0,6	g
Distile Su	100	ml
pH	7.0	

Ortam bileşenleri homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra otoklavlanmış ve izolatların tanımlanmalarında gerekli olan; nokta (spot) ekim tekniğiyle antibiyosis testlerinde ve TLC' de aktif molekülün yerini belirlemek için biyootogram işleminde kullanılmıştır.

Besiyeri 39: Fermentasyon Ortamı 1[†]

Glukoz	10	g
Meat Ekstrakt	3	g
Bakteriyolojik Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	1	g
CaCO ₃	1	g
İz Element Solüsyonu (Shirling and Gottlieb)	1	ml
Distile Su	1	L
pH	7.3	

Ortam 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve aktif izolatlardan antimikrobiyal etkili maddenin üretimi için fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 40: Fermentasyon Ortamı 2

Çözünür Nişasta	12	g
Meat Ekstrakt	3	g
Bakteriyolojik Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	1	g
CaCO ₃	1	g
İz Element Solüsyonu (Shirling and Gottlieb)	1	ml
Distile Su	1	L
pH	7.3	

Ortam 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve aktif izolatlardan antimikrobiyal etkili maddenin üretimi için fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 41: Fermentasyon Ortamı 3

Gliserol	10	g
Meat Ekstrakt	3	g
Bakteriyolojik Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	1	g

[†] Fermentasyon ortamları; Shirling and Gottlieb 1966, Williams et al. 1983, Locci 1989, Öner 1989 ve Denizci 1996 başta olmak üzere, Streptomisetlerin optimum büyüme istekleri ile antibiyotik üretim ortamlarını tarif eden ve bu araştırmada sözü edilen diğer kaynakların detaylı taranmasıyla modifiye olarak oluşturulmuştur.

İz Element Solüsyonu (Shirling and Gottlieb)	1	ml
Distile Su	1	L
pH	6.95	

Ortam 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve aktif izolatlardan antimikrobiyal etkili maddenin üretimi için fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 42: Fermentasyon Ortamı 4

Sukroz	10	g
Meat Ekstrakt	3	g
Bakteriyolojik Pepton	5	g
Yeast Ekstrakt	1	g
CaCO ₃	1	g
K ₂ HPO ₄	1	g
KH ₂ PO ₄	1	g
İz Element Solüsyonu (Shirling and Gottlieb)	1	ml
Distile Su	1	L
pH	7.0	

Ortam 1.5 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve aktif izolatlardan antimikrobiyal etkili maddenin üretimi için fermentasyon ortamı olarak kullanılmıştır.

Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

%10' luk Gliserol	1 N NaOH (Riedel-de-Haën 0623)
%20' lik Gliserol	H ₂ SO ₄
NH ₃	6 N HCl (Riedel-de-Haën 07109)
Toluen	10 N HCl
Dimetil Sulfoksol (Riedel-de-Haën 34869)	%0,1 Ninhidrin (Merck 6762)
Benzen	%3.5 Ninhidrin
Aseton (Riedel-de-Haën 34850)	%0,2 Ninhidrin
Kloroform (Merck 2444)	%25' lik Glutaraldehit (Fluka 49629)
Metilen Klorid (Merck 6049)	DL-α-ε- Diaminopimelik Asit (Sigma D 1377)
n-Butanol (Riedel-de-Haën 24124)	%96' lik Etanol (Merck 11727)
Hegzan (Riedel-de-Haën 15671)	Saf Etanol
Petrol Eteri (Riedel-de-Haën 24541)	1 N HCl
Di Etil Asetat (Merck 801366)	BaOH
Metanol (Riedel-de-Haën 6007)	Glasiyal Asetik Asit (%100)
KBr	Piridin (Fluka 82703)

3.2. METOT

3.2.1. Toprakta *Streptomyces* Suşlarının İzolasyonu

Toprak örnekleri için seçilen istasyonların organik maddece zengin olmasına dikkat edilmiş ve kompozit örnek alma şeklinde örnekleme gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için toprağı sulandırma yöntemi (The Soil Dilution Method) kullanılmıştır. Toprak örneklerinin alınması (Parkinson et al. 1971) ve topraktan streptomiset izolasyonu sırasıyla aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır (Öner 1989).

1. Toprak örnekleri alkolle temizlenmiş bir çapa ile açılan toprak profilinden, toprak alınan yüzey alkolle temizlenmiş bir spatül ile hafifçe kazındıktan sonra yine alkolle temizlenmiş bir kaşıkla, 10-30 cm arasındaki derinliklerden alınmıştır. Her istasyondan beş profil açılarak kompozit toprak örneği alınmıştır.
2. Laboratuvarımıza getirilen her bir örnek kurutulmuş, aseptik koşullarda 10 g alınarak 500 ml' lik erlenlere konmuş üzerine %1 oranında CaCO_3 ilave edilerek karıştırılmış; 30 °C' de 2 gün inkübe edilerek ön işlemden geçirilmiştir.
3. 2.' deki işlemden sonra, yukarıda anılan erlenlerde bulunan 10 g toprak örneği üzerine 90 ml steril distile su ilave edilmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen 1/10 oranında sulandırılmış toprak örneği süspansiyonundan steril bir pipet yardımıyla 1 ml alınarak, içinde 9 ml steril distile su bulunan tüpe aktarılmış, Vorteks yardımıyla homojen şekilde karıştırılmış ve böylece 1/100 ' lük toprak süspansiyonu elde edilmiştir. Aynı işlem 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000 ve 1/10000000' lik süspansiyonlar elde etmek için tekrarlanmıştır.
4. Hazırlanan 1/100000, 1/1000000 ve 1/10000000 ' lik süspansiyonlardan 1' er ml steril pipet ile alınarak steril petri kabına aktarılmış; üzerine 50 °C' ye kadar soğutulmuş Gliserol-Asparagin Agar (Besiyeri 11, GAA), Gliserol-Yeast Ekstrakt Agar (Besiyeri 1, GYA), Yeast-Malt Ekstrakt Agar (Besiyeri 2, YEMA), Nutrient Agar (Besiyeri 19, NA) ve Kazein Nişasta Agar (Besiyeri 23, KNA) ilave edilerek her toprak örneği süspansiyonundan yukarıdaki farklı üç sulandırma için her bir besiyeriyle toplam 30 petri kabı hazırlanmıştır. Besiyeri ile toprak süspansiyonunun homojen karışımının sağlanması için rotasyon hareketi yapılmıştır.
5. Hazırlanan petriler 27-30 °C' de 7-14-21 gün inkübasyona bırakılmıştır.
6. Tüm petri kapları inkübasyonun ikinci gününden itibaren teker teker çıplak gözle ve mikroskopun 10X objektifi altında streptomiset kolonilerinin var olup-olmadığını saptamak için gözlenmiştir.

7. Streptomiset kolonileri izolasyon ortamlarında gözleendiğinde, bu kolonilere numara verilerek besiyeri 2 ve besiyeri 11 ortamlarında çizgi ekim tekniği ile tekrardan bir saflaştırma yapılmıştır.
8. Saflaştırılan streptomiset kolonileri yatık besiyeri 2, 19, 21 ve 26 bulunan tüplere çekilerek, 28 °C' de bir hafta inkübe edilerek büyütölmüşler, inkübasyon sonrasında buzdolabında +4 °C' de saklanmışlardır.

3.2.2. İzole Edilen *Streptomyces* Suşlarının Antimikrobiyal Spektrumlarının ve Etkinlik Derecelerinin Saptanması

İzole edilen streptomisetlerin antimikrobiyal etkilerinin saptanması çalışmaları '*Birincil ve İkincil Antimikrobiyal Aktivite Tarama*' olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır.

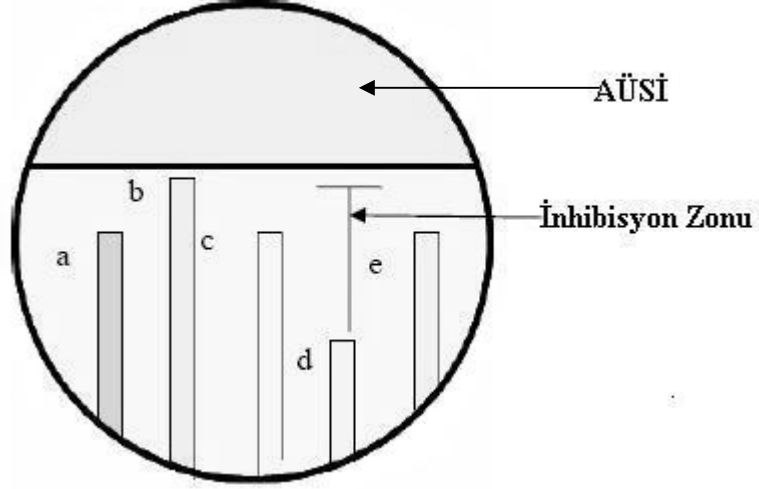
3.2.2.1. Birincil Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

İlk aşamada kullanılan test organizmaları; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Bacillus subtilis* ATCC 6683, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum penicillatum*' dur.

İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri Spektrum-Plak Metodu (Şekil 3.1.) kullanılarak aşağıda açıklandığı gibi belirlenmiştir.

1. Öncelikle stoktaki streptomiset izolatlarımız ve kontrol mikroorganizmalarının aktivasyonu sağlanmışdır. Bakteriler, Nutrient Broth (Besiyeri 18) ya da Muller Hinton Broth (Besiyeri 15) bulunan tüplere aktararak 37 °C' de 24 saat, mayalar, Glukoz Yeast Ekstrat Broth (Besiyeri 2, agar ilavesiz)' da 28 °C' de 48 saat, inkübasyonla büyütölmüşler; stoktaki streptomisetler ise YEMA, KNA, *Streptomyces* Aktifleştirme Ortamı (Besiyeri 27) ya da GAA ortamlarına çizgi ekim yapılarak 28 °C' de 5-7 gün inkübe edilmişlerdir.
2. Önceden hazırlanmış Muller-Hinton Agar (Besiyeri 16)' lı petrilerin bir köşesine aktive edilen streptomisetlerden ekim yapılmıştır. Bu şekilde ekimi yapılan Muller-Hinton Agarlı petrilerimiz 28 °C' de 5-6 gün inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon işlemi sonunda antimikrobiyal etkiyi saptamak için test organizması olarak kullanılacak bakteri ve mayalar aktive edilen broth kültürlerinden alınarak streptomiset kolonisi ile 90° lik açı yapacak şekilde streptomiset kolonisine değmeden en yakın yerden başlayarak, petrinin diğer kenarına doğru tek çizgi halinde ekilmişlerdir.

4. Test organizmalarından bakteriler, 37 °C' de 18-24 saat, mayaların büyümesi için petriler 30 °C' de 48 saat inkübe edilmişlerdir.
5. İnkübasyon sonunda test organizmalarının inhibisyon zonları milimetre cinsinden ölçülmüştür.



Şekil 3.1. Spektrum-Plak Yöntemi Uygulama Şeması. (AÜSİ) Antibiyotik Üreticisi *Streptomyces* İzolatı; (a-e) Test Mikroorganizmaları.

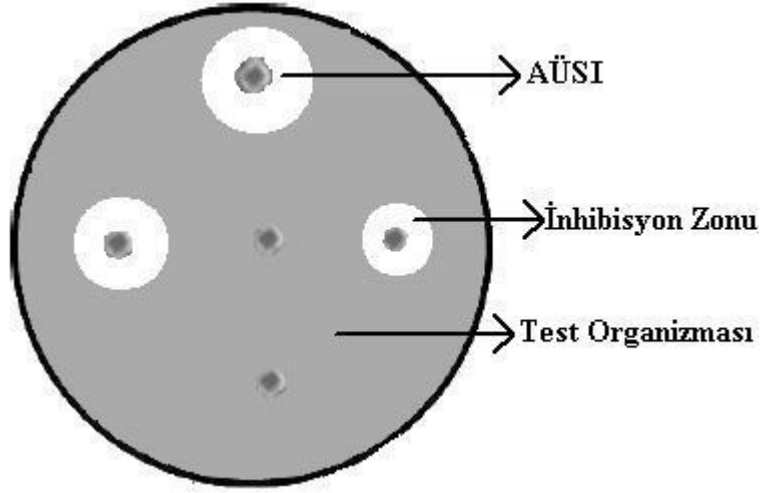
3.2.2.2. İkincil Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Birincil antimikrobiyal aktivite çalışması sonunda test edilen organizmalara karşı yüksek inhibisyon gösteren izolatlar seçilerek ikincil antimikrobiyal aktivite tarama çalışmalarına başlanmıştır. Bunun için bakterilerden; *Bacillus subtilis* ATCC 6683, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Serratia marcescens* CCM 583, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 8043, metisillin-dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 95047, küflerden *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma hamatum*, *Cladosporium oxysporum*, *Penicillium* sp., mayalardan *Candida albicans* test organizmaları kullanılmıştır. Bakterilere karşı antimikrobiyal test birincil tarama çalışmasında olduğu gibi spektrum-plak yöntemiyle 3.2.2.1' de açıklandığı gibi MHA ve NA ortamlarında, *C. albicans* ve küflere karşı etki nokta (spot) ekim yöntemiyle Patates Dekstroz Agar (Besiyeri 17, PDA) ortamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Spot inokulasyon yöntemi (Şekil 3.2.) aşağıda açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir (Yamamura et al. 2003' den modifiye):

1. Stoktaki Birincil antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen ve seçilen izolatlarımız besiyeri 27'de 5 gün 27 °C' de, mayalar Glukoz-Yeast Ekstrakt Broth' lu tüplerde 24 saat 27 °C' de, küfler ise PDA' lı besiyerinde 48 saat 27 °C' de büyütülerek aktifleştirilmiştir.

2. Aktif izolatlar PDA' lı besiyerine belli aralıklarla nokta ekimi yapılarak 3 gün büyütülmüş ve sonrasında 15 ml kloroform ile 10 dakika (dk) muamele edilerek, inaktif duruma getirilmiş, 45 dk süreyle kabinde kloroformun uzaklaştırılması sağlanmıştır.
3. Test organizması küflerin spor süspansiyonlarını içeren yarı katı nutrient agar (Glukoz ve Yeast Ekstrakt ilaveli, Besiyeri 38) ortamından 10 ml nokta ekimi yapılan PDA besiyerinin üzerine ilave edilerek, 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında petriler ters çevrilerek 28 °C' de inkübasyona bırakılmıştır.
4. 2. günden başlanarak 5 gün boyunca streptomiset kolonilerinin etrafındaki inhibisyon zonları milimetre cinsinden kaydedilmiştir.



Şekil 3.2. Nokta (Spot) Ekim Yöntemi Uygulama Şeması. (AÜSİ) Antibiyotik Üreticisi *Streptomyces* İzolatı.

3.2.3. İzolatların Tanılanması

Antimikrobiyal aktivitelerinin yüksek oluşu nedeniyle seçilen izolatların identifikasyonu yapılmıştır. Bunun için elde edilen morfolojik, kültürel, biyokimyasal, fizyolojik ve kemotaksonomik karakterlerin karşılaştırılması; *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology* ile *Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology* başta olmak üzere, Shirling ve Göttlieb (1966), Williams ve ark. (1983) ile ayrıca Williams ve ark. (1989) literatürlerine dayanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Renk Gruplaması

Seçilen 4 izolatımız, içinde ISP 3 (Besiyeri 3), ISP 4 (Besiyeri 5), ISP 6 (Besiyeri 13) ve ISP 5 (Besiyeri 11) besiyerleri bulunan petrilere ekildi; 25 °C' de 3 hafta inkübe edildi (Shirling and Gottlieb 1966). ISP 3 ve ISP 4 ortamlarında inkübe edilen izolatlarımız havasal spor yığını rengi, substrat misel rengi açısından ve ISP 5 ortamında inkübe edilen izolatlarımız ise diffüze pigment açısından incelenmiştir. Bunun için besiyerlerinde iyi gelişen ve sporlanan büyümelerden bir parça alınarak, standart bir aydınlatma (ortalama gün ışığı miktarında) ile mikroskop altında renk daireleri aranmıştır (Tresner and Backus 1963). Eğer renk dairelerini görmek mümkün değilse; incelemeler çıplak göz ile yapılarak gri, kırmızı, yeşil ya da diğer (beyaz, sarı, mavi ya da violet) renk gruplarına ayrılmıştır. Renkler referans olarak Stamp Color Key (Stanley Gibbons Publication Ltd. 1986) kartları kullanılarak saptanmıştır. ISP 6 petrilere karakteristik koyu renkli melanin pigmenti üretimi açısından incelenmiştir.

3.2.3.2. Kültürel ve Morfolojik İncelemeler[§]

İzolatlarımız Oat Meal Agar (ISP 3, Shirling and Gottlieb 1966), ve Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar' da (ISP 6, Shirling and Gottlieb 1966) spor zinciri morfolojisi, havasal, substrat misel rengi, çözünür pigment ve melanin üretim kabiliyetleri açılarından incelenmiştir. Ayrıca izolatlar Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt Agar (ISP 2, Shirling and Gottlieb 1966), Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5), İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4, Shirling and Gottlieb 1966), Tirozin Agar (Besiyeri 14, ISP 7, Shirling and Gottlieb 1966), Glukoz Nitrat Agar (Besiyeri 8, Öner 1989), Glukoz Asparagin Agar (Besiyeri 10, Öner 1989), Nişasta Asparagin Agar (Besiyeri 12, Öner 1989), Nişasta Nitrat Agar (Besiyeri 9) ve Kazein Nişasta Agar (Besiyeri 23) ortamlarında diğer morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacı ile 27 °C' de 7-14 gün boyunca büyütülmüşlerdir. İncelemeler, çıplak gözle ve Jena mikroskop yardımı ile X100 büyütme altında yapılmıştır.

Spor zinciri morfolojileri için izolatlarımızın ISP 4 besiyeriyle slide kültürleri (Önceden sterilize edilmiş lam üzerine 50 °C' ye kadar soğutulmuş ISP 4 besiyerinden 1 damla damlatılmış ve üzerine steril lamel kapatılmıştır. Sonra uygun izolattan iğne yardımıyla spor alınarak lamelin kenarlarındaki besiyerinin dört bir köşesine aktarma yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparat, nemli steril kaplar içinde 27 °C' de 14 gün inkübe edilmiştir) hazırlanarak ışık mikroskobu ile (Nikon, 400X ve 1000X büyütme altında) incelenmiş, Shirling and Gottlieb (1966) tarafından terminolojisi uygulanan kategorilere ayrılmıştır.

[§] Aksi belirtilmediği sürece; kültürel ve morfolojik incelemeler Shirling and Gottlieb 1966' ya göre yapılmıştır.

3.2.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Karbon kaynaklarının kullanımı besiyeri 29 (ISP 9)' da 14-21 gün sonunda, glukoz içeren pozitif kontrol ortamı ve karbon kaynaksız negatif kontrol ortamı (karşılaştırma için daha uygun) ile karşılaştırılarak belirlendi. Azot kaynaklarının kullanımı besiyeri 30' da 15 gün sonunda L-Asparagin ve L-Prolin içeren pozitif kontrol ortamı ve azot kaynaksız negatif kontrol ortamı^{††} (karşılaştırmada daha iyi fikir vermektedir) ile karşılaştırılarak saptanmıştır.

Arbutin degradasyonu besiyeri 31 bulunan tüplerde, arbutin içermeyen tüplerle (melanin oluşumuyla karıştırmamak için gereklidir) karşılaştırılarak, 28 °C' de 21 gün sonunda oluşan kahve-siyah pigmentin görülmesi pozitif kabul edilerek saptanmıştır. Ksantin degradasyonu besiyeri 32 bulunan petrilere çizgi ekim yapılmasıyla, 21 gün sonunda koloniler etrafında açık zon gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Elastin degradasyonu ise Nutrient-Elastin Agar (Besiyeri 33) ortamına çizgi ekim sonucu, 28 °C' de 7-10 gün sonunda açık zon görülmesi pozitif kabul edilerek belirlenmiştir.

Lesitinaz, proteolizis ve lipolizis aktivitesi besiyeri 34 (Egg-Yolk Agar)' de izolatların nokta ekimi, 25 °C' de 4-6 gün inkübasyonu takiben kuvvetli ışık altında, koloniler etrafındaki opak, krem-sarı presipitat; lesitinaz için pozitif, daha az opak presipitat, düzensiz zon oluşumu ise lipolizis için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Nitrat redüksiyonu, besiyeri 35' de 25 °C' de 2 hafta inkübasyon sonunda ortama 0,2 ml Griess-Hosvay reaktifleri I ve II ilavesiyle, 30 dakika içinde pembe-kırmızı renk görülmesiyle saptanmıştır. Aynı ortama iz miktarda çinko tozu ilavesi ve tüplerin karıştırılması sonucu oluşan kırmızı rengin görülmesi (ortamdaki nitrat varlığını gösterir) negatif reaksiyondur. Hidrojen sülfür üretimi; nitrat indirgenmesinde kullanılan kültür tüplerinin uç kısımlarına kurşun asetat ile spreyleneş steril watman filtre kağıtlarında 14 gün sonunda kahve ya da siyah rengin görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Hippurate hidrolizi besiyeri 28' de şu şekilde belirlenmiştir; ortam^{††} hazırlandıktan sonra 0,8 ml miktarlarda tüplere aktarılmış, aktif izolatlardan bir öze dolusu aşıl原因arak, 28 °C' de 4-6 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda aseton:bütanol (1:1, v/v) ile hazırlanan 0,4 ml %3.5' lik ninhidrin solüsyonu^{§§} ilave edilerek 10 dk içinde görülen koyu mor renk (kristalviolet rengi) pozitif sonuç olarak alındı. Jelatin hidrolizi besiyeri 7 (Tamer ve ark. 1989), nişasta hidrolizi besiyeri 24' de 25 °C' de 4. gün inkübasyon sonunda petrilere iyodür solüsyonu ilavesiyle saptandı. Tirozin parçalanması, besiyeri 4' e %0,5 oranında tirozin ilavesi ile 7, 14, 21 günlerde açık zon oluşumunun gözlenmesi ile pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. DNaz

** Aksi belirtilmediği sürece; fizyolojik ve biyokimyasal özellikler Williams et al. 1983' e göre belirlenmiştir.

†† Karbon ve azot kaynaklarından yararlanma testlerinde inokulum için izolatların gliserol süspansiyonları uygun olmamaktadır.

†† Hippurate Broth hazırlandıktan sonra kullanılmaya kadar -20 °C' de saklanmalıdır.

§§ Ninhidrin reaktifi kullanılmaya kadar karanlıkta saklanmalıdır.

besiyeri 6' da 3. gün sonunda ortama 1 N HCl ilavesiyle, koloniler etrafındaki açık zon görülmesi pozitif kabul edilerek belirlenmiştir, üreaz besiyeri 20, kazeinaz besiyeri 25 (pembe renk; asit, mor renk; alkali ürünler ve koloni etrafında açılma kazein hidrolizi)' de, kitosanaz aktiviteleri besiyeri 37 (Chen and Li 2000)' de, melanin üretimi besiyeri 13 ve 14' de belirlenmiştir. Ksilanaz ve Karboksi-Metil Selulaz (KMS) aktiviteleri besiyeri 22' de nokta ekim yöntemiyle; 27 °C' de 14. gün inkübasyon sonunda, kuvvetli ışık altında koloniler etrafında açık zon görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Antibiyotiklere dirençlilik, önceden hazırlanmış besiyeri 36' a aktif izolat inokule edilmiş petrilere; hazır antibiyotik emdirilmiş diskler (Oxoid)' in yerleştirilmesiyle 1,2,3 ve 7. günlerde inhibisyon zonu gözlenerek saptanmıştır. Organizmaların çeşitli kimyasal inhibitörlere ve sıcaklığa^{***} toleransları besiyeri 36' da, genelde 14 gün; 4 °C' de yapılan testlerde 2-4 hafta inkübasyon sonunda; kimyasal ya da inhibitör madde içermeyen kontrol büyüme ortamlarıyla karşılaştırılarak saptanmıştır. Büyüme olmaması ve zayıf büyüme negatif olarak alınmıştır. Aksi belirtilmediği sürece, fizyolojik ve biyokimyasal testler 28-30 °C' de gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4. Kemotaksonomik Analizler

3.2.3.4.1. Hücre Çeperi Diaminopimelik Asit İzomerlerinin (DAP) Analizi

DAP analizi için seçilen izolatlar YEMA (ISP2) ortamında 2 hafta büyütülmüştür. Süre sonunda iyi gelişen kolonilerden steril spatül yardımıyla 50 mg örnek alınarak 1 ml 6 N HCl ile vida kapaklı tüplerde 100 °C' de 1 gece (12 saat) hidroliz edilmiş sonrasında HCl uzaklaşınca kadar distile suyla (2 ml) yıkanmıştır. Sonra kurutulan örnek üzerine 0,2 ml distile su eklenerek iyice karışması sağlanmıştır. 5 µl örnek ve 3 µl standart DAP (DAP, Sigma D-1377) TLC silika jel plakalara (20X20, 60 F₂₅₄, Merck) emdirilmiş 2 saat 40 dakika süreyle metanol: distile su: 6 N HCl: piridin (80: 26: 4: 10) solvent sisteminde gelişmeye bırakılmıştır. Süre sonunda TLC plakalar oda sıcaklığında 30 dk kurutularak %0,1 ninhidrinle spreylenecek, hot plate üzerine alınarak 110 °C' de 10 dk muamele edilmiştir (Shimizu et al. 2000' den modifiye).

Seçilen İzolatların Hücre Çeperi Karakteristik Şekerlerinin Tayini

Karakteristik şeker analizi için seçilen izolatlar YEMA (ISP2) ortamında 2 hafta büyütülmüştür. Süre sonunda iyi gelişen kolonilerden steril spatül yardımıyla 50 mg örnek alınarak 1 ml 1 N H₂SO₄ ile vida kapaklı tüplerde 100 °C' de 2 saat hidroliz edilmiş, sonra bu karışım 3000 rpm' de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatant doymuş baryum hidroksit ile pH:5' e ayarlanarak tekrar 8000 rpm' de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Kalan filtratın fazla sıvısı uzaklaştırılarak 0,1 ml. distile suda çözülmüştür. 5 µl örnek ve 3 µl standart %1 şeker (D-

^{***} 45 °C' de büyüme belirlenmesinde ekimi yapılan ortamdaki buharlaşmayı önlemek için petrilere polietilen torbalarda muhafaza edilmesi daha uygun olmaktadır.

Glukoz, D-Mannoz, L-Arabinoz, D-Fruktoz, D-Ksiloz ve L-Ramnoz) solüsyonları TLC silika jel plakalara (20X20, 60 F₂₅₄, Merck) ayrı ayrı 20 mm aralıklarla spotlanmış, 3 saat 20 dakika süreyle *n*-butanol:distile su: piridin:toluen (10 : 6 : 6 : 1) solvent sisteminde gelişmeye bırakılmıştır. Süre sonunda TLC plakalar oda sıcaklığında 2 saat kurutularak, sonrasında anilin-fitalatla spreylene, hot plate üzerine alınarak 100 °C' de 4 dk muamele edilmiştir (Shimizu et al. 2000' den modifiye).

3.2.3.5. İstatistiksel Analiz

Aktif *Streptomyces* suşlarının tanımlanmaları için gerekli olan, kültürel, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları; ilgili literatürler ışığında, Minitab programı (versiyon 13.20, Minitab Inc., 2000) kullanılarak istatistiksel analize alınmıştır. Multivariable cluster (Correlation Coefficient Distance, Complete Linkage) analiziyle, kendi izolatlarımız ve daha önceki belirlenen *Streptomyces* türlerinin % benzerlikleri ortaya çıkarılmıştır. % benzerliklerinin oluşturulması amacıyla; öncelikle, *Bergey' Manual of Systematic Bacteriology*' de yer alan *Streptomyces* major gruplarının pozitif olasılık matrisleri, programa bire bir girilerek yakınlıklarını veren dendogram oluşturulmuştur. Aynı işlem tekil-üye grupları içinde yapılarak, bunlarında % benzerliklerini veren dendogramları belirlenmiştir. Sonrasında seçtiğimiz izolatların test sonuçları pozitif (+) olanlar için; "1" değeri, negatif (-) olanlar için ise "0" değeri kaydedilmiş, standart *Streptomyces* major gruplarının test pozitif olasılığı "1-49" arasındakiler için negatif yani "0", "50-99" arasındakiler için ise pozitif yani "1" değeri verilerek bir dengeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. En son olarak da kendi değerlerimiz ile dengeleme yapılan major grup üyelerinin değerleri beraberce programa işlenerek, % benzerlikleriyle beraber dendogramları şekillendirilmiştir. Aynı işlemler tekil üye grupları için de yapılmıştır.

3.2.4. Fermentasyon Çalışmaları

Toplam aktif *Streptomyces* izolatlarının antimikrobiyal etkinlik dereceleri ile spektrumları, denenen besiyerlerindeki büyümeleri, pigmentasyon ve sporlanma oranları gibi kriterler göz önünde bulundurularak, fermentasyon çalışmaları için KGG13, KGG32, KEH23 ve KVK11 nolu izolatlar seçilmiştir. Fermentasyon denemeleri sporulasyon, inokulum hazırlanması ve fermentasyon olmak üzere üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Sporulasyon

Seçilen 4 izolat ISP2 (Yeast-Malt Ekstrakt Agar) ortamına çizgi ekim yapılarak 28 °C' de 14 gün inkübasyona alınarak sporulasyon tamamlanmıştır.

3.2.4.2. İnokulum Hazırlanması

Besiyeri 39, 40., 41. ve 42. hazırlandıktan sonra her biri ayrı ayrı iyice karıştırılıp, çözüldükten sonra uygun pH' ya ayarlanarak 250 ml' lik erlenlere 40' ar ml aktarılmış ve sterilize edilmiştir. Sonrasında aktif izolatlardan bir öze dolusu ortama ilave edilerek inkübatörde 150 rpm hızda 28 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılarak inokulum hazırlanmıştır.

3.2.4.3. Fermentasyon

Dört farklı fermentasyon ortamı (Besiyeri 39, 40., 41. ve 42.) hazırlanarak 250 ml' lik erlenlere 40' ml aktarılmış, sterilize edilmiş, üzerine 2 ml inokulum (fermentasyon ortamının %5' i) ilave edilerek döner çalkalayıcıda 150 rpm hızda 28-30 °C' de fermentasyon işlemi başlatılmıştır. İşlem 120 saat süreyle sürdürülmüştür.

3.2.4.3.1. Fermentasyon Sırasında pH, Büyüme ve Antibiyotik Üretiminin Belirlenmesi

Fermentasyon süresince büyüme, pH ve antibiyotik üretimindeki değişimleri belirlemek için aynı koşullarda hazırlanan, 3.2.4.3.' de bahsedilen ortamlarda fermentasyon başlatılmıştır. Belli zaman aralıklarında aseptik şartlarda ortamlardan 1 ml örnek eppendof tüplerine aktararak 8000 rpm' de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant sıvısından 50 µl alınarak çukur (6 mm) diffüzyon yöntemiyle indikatör test organizması olarak seçilen *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans*' a karşı antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Eppendof tüplerinin dip kısmında kalan hücre pelleti distile suyla yıkanarak önceden darası bilinen kaplara alınmış, 100 °C' de 24 saat bekletilerek kuru ağırlıkları tespit edilerek, sonuçlar g/100 ml olarak hesaplanmıştır. Alınan örneklemelerdeki pH değişimleri Hanna pH 211 marka dijital pH metre ile belirlenmiştir.

3.2.4.3.2. Uygun Solvent Sisteminin Belirlenmesi ve Biyootogram

Dört farklı besiyerindeki fermentasyon sonuçları ve antimikrobiyal maddenin üretim miktarı belirlendikten sonra Bölüm 3.2.5.'e geçmeden önce, uygun solvent sisteminin belirlenmesi amacıyla, ön işlemlerden geçirilmiş fermentasyon sıvısı (10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µl miktarlarda) aşağıdaki Çizelge 3.3.'de verilen farklı solvent sistemlerinde TLC' de yürütülmüştür. Sonrasında aktif maddenin yeri, indikatör test organizması olarak seçilen *S. aureus* ve *E. coli* ile aşılınmış 125 ml yarı katı nutrient agarın TLC plakalar üzerine ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılması, 37 °C' de kapalı kaplar içinde 18 saat inkübasyonundan sonra oluşan inhibisyon bölgesinin R_f (Retention Factor) değeri belirlenerek saptanmıştır.

Çizelge 3.3. TLC' de kullanılan Solvent Sistemleri ve Oranları.

Solvent Sistemi	Oran	Süre (retention time)
n-Bütanol:Asetik Asit:Distile Su	3:1:1	7 saat 10 dk
n-Bütanol:Asetik Asit:Distile Su	6:2:1	ND
n-Bütanol:Asetik Asit:Distile Su	4:1:5	4 saat 30 dk
n-Bütanol:Metanol:Distile Su	4:1:2	5 saat
Piridin:Etil Asetat:asetik Asit:Distile Su	5:5:1:3	ND
Etil Asetat:Metanol	100:15	1 saat 30 dk
Etanol:Amonyak:Distile Su	8:1:1	3 saat
Kloroform:Metanol:Distile Su	10:1,5:1	5 saat 30 dk
Metanol:Kloroform:Distile Su	10:2:1	5 saat 30 dk
Metilen Klorid:Metanol:Benzen	4:1:1	4 saat 30 dk
Metanol:Hegzan	3:1	3 saat
Metanol:Distile Su	3:1	3 saat
Saf Etanol:Distile Su	3:1	2 saat 30 dk

3.2.5. *Streptomyces* sp. KGG32 nolu İzolattan Aktif Maddenin İzolasyonu ve Saflaştırılması

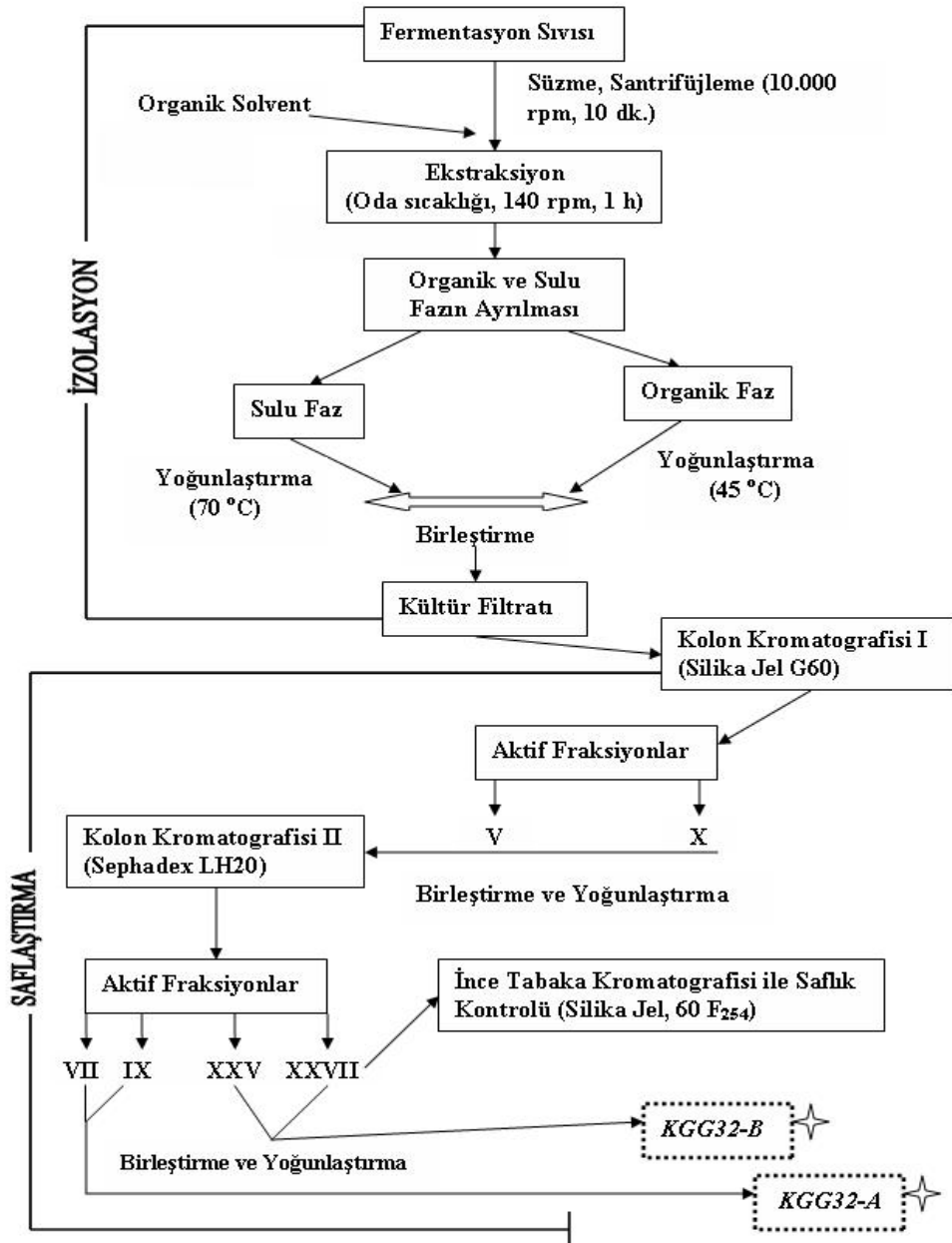
KGG32 nolu izolatımız için daha önceden belirlenen ve optimize edilen Sukrozlu besiyerinde tekrar fermentasyon işlemi başlatılarak 5 litre, fermentasyon sıvısı elde edilmiş ve aktif madde izolasyonu için ileri işlemlere geçilmiştir.

Bu konuyla ilgili tüm aşamalar Şekil 3.3.' de özetlenmiştir.

3.2.5.1. Solvent Ekstraksiyonu

Atık ürünler, biomass ve artan nutrient fermentasyon sıvısından ayrıldıktan sonra, sıvı 6 farklı organik solvent (etil asetat, n-bütanol, kloroform, petrol eteri, n-hegzan, metilen klorid) kullanılarak ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ayrıca aktif maddenin suda iyi ve sözü edilen organik solventlerde kısmi çözünmesi nedeniyle ön işlemlerden geçirilmiş fermentasyon sıvısı suyunun uçurulması yoluna da gidilmiştir (aktif maddenin sıcaklıkla ilişkisi belirlendikten sonra). Önce fermentasyon sıvısındaki hücresel partiküllerin ve nutrientin uzaklaştırılması için peynir süzgeci, ardından Whatman no: 4 ile süzme işlemi ve gerekirse sıvının berraklığına göre, 10.000 rpm' de 10 dk. santrifüjleme yapılarak sıvılar birleştirilmiş, steril distile suyla 3 kez yıkanmış temiz 500 ml erlenlerde toplanmış, üzerine eşit hacimde yukarıda sözü edilen organik solventlerden birisi ilave edilerek oda sıcaklığında 140 rpm' de 1 saat ekstraksiyon yapılmıştır. Süre sonunda ayırma hunisi yardımıyla sulu faz ve solvent fazı ayrı kaplara alınmıştır. Sulu faz

farklı bir solventle tekrar ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Bu işleme sırasıyla 6 farklı solventle devam edilmiştir. Solvent fazları alınarak, ekstraksiyonda kullanılan çözücünün uçurulmasıyla bir yoğunlaştırma yapılmıştır. Ayrıca sulu fazlar toplanarak döner buharlaştırıcıda 70 °C' de su uçurulmuştur. Aktif ham özütler birleştirilerek (kültür filtratı) kromatografik çalışmalar için +4 °C' ye kaldırılmıştır.



Şekil 3.3. Fermentasyon Sıvısından Antimikrobiyal Aktif Maddenin İzolasyonu ve Saflaştırılması Aşamaları.

3.2.5.2. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi 2 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada sabit faz için Silika jel G60 (70-230 mesh, Merck) metanol ile 3 saat oda sıcaklığında aktifleştirilmiş, işlem 2 X 40 cm' lik kolonda (İldam) gravimetrik olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, ekstraksiyonla elde edilen ham özüt, 15 ml. metanolde çözünmüş, jele emdirilmiş, sonrasında metanol:hegzan (3:1) karışımıyla yıkanarak, her 5 ml'lik fraksiyon 5 dk. aralıklarla tüplere toplanmıştır ve toplamda 12 fraksiyon elde edilmiştir. Her bir fraksiyonun indikatör test organizması olarak seçilen *S. aureus* ve *E. coli* ' ye karşı aktivitesi çukur difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Aktif maddenin V. ve X. fraksiyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir. İki aktif fraksiyon birleştirilerek, solvent 45 °C' de uçurulmuş ve kolon kromatografisi 2. aşamaya geçilmiştir.

İkinci aşamada sabit faz Sephadex LH20 (Partikül büyüklüğü 25-100 µ, Sigma-Aldrich) metanolle oda sıcaklığında 3.5 saat süreyle aktifleştirilmiş, yukarıda sözü edilen aynı kolonda hazırlanmış ve 2 saat dinlenmeye bırakılmıştır. İlk aşamada elde edilen yarı saf aktif madde ekstraktı, 10 ml. metanolde çözülerek sabit faz için seçilen Sephadex LH20' ye emdirilmiştir. Sonrasında kolondan nonpolar-polar sıvılar (Metanol, metilen klorid, kloroform, saf etil alkol, steril distile su ve etil asetat) düşük basınç altında geçirilerek, dakikada 1 ml. akış hızıyla 4' er ml.' lik 47 fraksiyon elde edilmiştir. Bütün fraksiyonlarda aktif madde taraması çukur difüzyon yöntemiyle yukarıda bahsedilen indikatör test organizmaları kullanılarak 3' er tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Fraksiyon 7. ve 9. (Metanol), test organizmalarına karşı aynı derecede, fraksiyon 25. ve 27. (Saf etil alkol) ise hemen hemen aynı derecede aktivite göstermiştir. Fraksiyon 29.'da (saf etil alkol) ise çok az kısmi inhibisyon görülmüş ancak ileriki denemeler için göz önünde bulundurulmamıştır.

3.2.5.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Aktivite görülen ve birbirine yakın olan fraksiyon 7. ve 9. ve diğer 25. ve 27. TLC silika jel plakalara (20X20, 60 F₂₅₄, Merck) 30 µl. emdirilerek etanol:amonyak:distile su (8:1:1) ve metanol:kloroform:distile su (10:2:1) solvent sisteminde 3 saat gelişmeye bırakılmış, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra UV altında ve ayrıca anisaldehit:sülfirik asit (1:1, asetik asitle hazırlanmış) reaktifiyle incelenmiştir. Yakın fraksiyonlar arasında bantlaşma tek ve aynı derecede olduğu için bu fraksiyonların aynı aktif madde içerdiği düşünülmüş, birleştirilmiş, yoğunlaştırılarak vida kapaklı temiz tüplere alınmış, **Aktif madde KGG32-A** ve **Aktif madde KGG32-B** şeklinde etiketlenerek -18 °C' ye kaldırılmıştır.

Ayrıca, TLC' den; antimikrobiyal aktif maddenin biyootogramla yerlerinin tespiti, uygun solvent sisteminin belirlenmesi, saflık kontrollerinde yararlanılmasına ek olarak, ninhidrin, sülfirik asit, anisaldehit ve demir klorür ile renk reaksiyonlarının belirlenmesinde yararlanılmıştır.

3.2.6. Aktif Madde KGG32-A ve Aktif Madde KGG32-B' nin Kısmi Karakterizasyonu

3.2.6.1. Ultraviolet Spektroskopisi

Aktif madde KGG32-A (KGG32-A)' nin UV ölçümü UV/Visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzo) kullanılarak metanol solüsyonunda belirlenmiştir. Aktif madde KGG32-B (KGG32-B)' de aynı cihaz kullanılarak saf etil alkol solüsyonunda 200-400 nm dalga boyu taraması yapılarak belirlenmiştir.

3.2.6.2.İnfra-Red Spektroskopisi

Aktif iki maddenin İnfra-red (IR) ölçümleri 2 mg maddenin potasyum bromür (KBr) (100 °C' de 30 dakika etüvde bekletilerek kurutulmuştur) tabletleri şeklinde hazırlanması, PerkinElmer FT-IR System Spektrum BX tipi cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Sonuçları

Kuzey Kıbrıs Merkez ve Çevresindeki toprak örneklerinden toprağı sulandırma yöntemiyle 251 kültüre edilebilir streptomiset izolatu elde edilmiştir. Denemelere alınan ve tanılması yapılan KGG13 ve KGG32 1. istasyon, KEH23 7. ve KVK11 8. istasyondan izole edilmiştir.

4.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi

İzole ettiğimiz streptomisetlerin birincil antimikrobiyal aktiviteleri bölüm 3.2.2.1.' de anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.2.' de inhibisyon zonuna bağılı olarak test organizmalarına karşı etkili aktif izolatların sayıları ve % oranları özetlenmiştir. Elde edilen kültüre edilebilir toplam 251 streptomiset izolatından 67 tanesi kullanılan test organizmalarının en az birine karşı etkili olmuştur (Şekil 4.1.).

İkincil antimikrobiyal aktivite test sonuçları bölüm 3.2.2.2.' de verilen yöntemle belirlenerek, bakterilere karşı antibakteriyal test sonuçları Çizelge 4.3.' de, küflere karşı antifungal aktiviteleri ise Çizelge 4.4.' de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Birincil Antimikrobiyal Test Sonuçları (mm).

Test MO* İzolat No	SA	KP	BC	ML	EC	PF	CA	SC	YL	GP
KSK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK4	15	-	12	-	-	-	-	-	-	-
KSK5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK8	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK9	-	-	6	-	-	-	4	-	-	-
KSK10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK11	12	-	14	-	-	-	10	-	-	-
KSK12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK16	10	-	7	-	-	-	10	-	-	-
KSK17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK19	8	-	-	-	6 ^k	-	-	10	-	-
KSK20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK26	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
KSK27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK30	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KSK34	10	-	12	-	-	-	-	6	-	-

Çizelge 4.1.'in devamıdır.

[illegible]

Çizelge 4.1.' in devamıdır.

İzolot No	SA	KP	BC	ML	EC	PF	CA	SC	YL	GP
KGG26	-	-	6 ^k	-	-	-	-	-	-	-
KGG27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG32	34	14	24	30	26	-	12 ^k	-	12	14
KGG33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG37	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-
KGG38	6	-	5	-	-	-	-	-	-	-
KGG39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGG40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO1	-	-	-	-	-	-	6	14	-	18
KGO2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO3	12	-	-	16	-	-	-	-	-	-
KGO4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO7	-	-	-	-	-	-	17	18	-	-
KGO8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO11	-	-	-	-	-	-	-	-	23	-
KGO12	8	-	-	-	10	-	16	-	-	-
KGO13	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
KGO14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO16	21	-	10	22	-	-	-	-	23	-
KGO17	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
KGO18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO19	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-
KGO20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KGO22	14	-	27	22	-	-	-	-	21	-

Çizelge 4.1.'in devamıdır.

[illegible]

Çizelge 4.1.'in devamıdır.

[illegible]

Çizelge 4.1.'in devamıdır.

[illegible]

Çizelge 4.1.'in devamıdır.

[illegible]

Çizelge 4.1.' in devamıdır.

İzolat No	SA	KP	BC	ML	EC	PF	CA	SC	YL	GP
KEH42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KEH43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KEH44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KEH45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KEH46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KEH47	10	-	-	24	-	-	-	12	-	10
KEH48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*; SA, *Staphylococcus aureus*, KP, *Klebsiella pneumoniae*, BC, *Bacillus cereus*, ML, *Micrococcus luteus*, EC, *Escherichia coli*, PF, *Pseudomonas fluorescens*, CA, *Candida albicans*, SC, *Saccharomyces cerevisiae*, YL, *Yarrowia lipolytica*, GP, *Geotrichum penicillatum*.^k, kısmi inhibisyon.

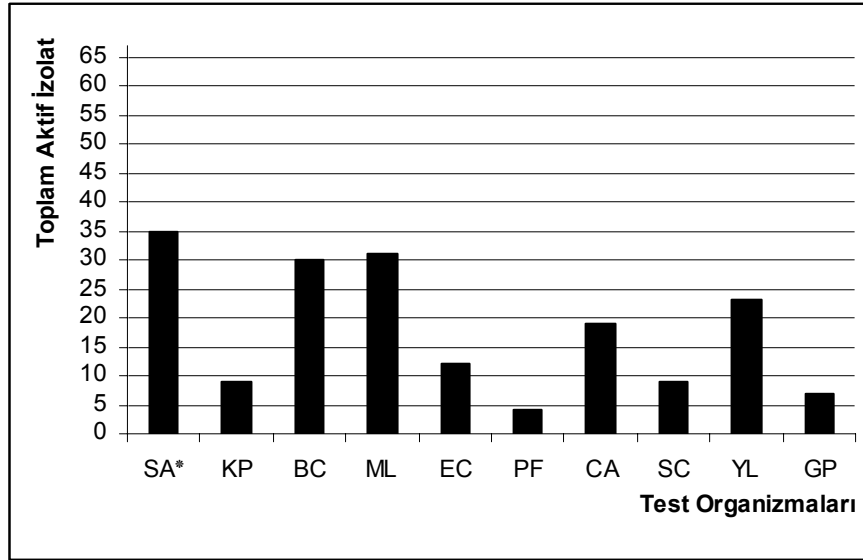
Çizelge 4.1.' e baktığımızda, tanılaması yapılan KGG13 nolu izolat en yüksek antibakteriyal etkiyi 26 mm ile *M. luteus* (Gram pozitif)' a, sonra sırasıyla 16 mm ile *K. pneumoniae* (Gr -), 14 mm ile *S. aureus* (Gr +) ve 8 mm ile *B. cereus* (Gr +)' a karşı; KGG32 nolu izolat 34 mm ile *S. aureus*, 30 mm ile *M. luteus*, 26 mm ile *E. coli* (Gr -)' ye, 24 mm ile *B. cereus*, ve son olarak 14 mm ile *K. pneumoniae*' ya karşı etkili olmuştur. KVK11 nolu izolat ise *K. pneumoniae* haricinde denenen bütün gram pozitif ve gram negatif bakterilerin büyümesini 10-30 mm arasında değişen değerlerde etkilemiştir. KEH23 nolu izolat ise bütün bakterilere karşı 6-26 mm arasında değişen değerlerde inhibisyon göstermiştir. Mayalara karşı aktiviteleri karşılaştırıldığında ise KEH23 nolu izolat 26 mm ile *Yarrowia lipolytica*' ya karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Aynı izolatın *Candida albicans*' a karşı etkisi 22 mm ile en yüksektir. Seçilen 4 izolatın 10 test organizmasına karşı birincil aktivite sonuçları karşılaştırıldığında KGG32 nolu izolatın en yüksek aktivite ve spektruma sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi, 251 *Streptomyces* izolatından test organizmalarına karşı en fazla antibakteriyal etki 35 (%13.94) izolat ile Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*' a karşı belirlenmiştir. Sonra sırasıyla 31 (%12.35) ile *M. luteus*, 30 (%11.95) izolat ile *B. cereus*' a karşı gerçekleşmiştir. Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyal etkisi bulunan en yüksek izolat sayısı 12 (%4.78) ile *E. coli*' ye karşı, en düşük olarak ise 4 (%1.59) izolat tarafından *P. fluorescens*' e karşı gerçekleşmiştir. Mayalara karşı etkili bulunan en yüksek izolat sayısı 23 (%9.16) ile *Y. lipolytica*, en düşük ise 7 (%2.78) ile *G. penicillatum*' a karşı görülmüş olup, *C. albicans*' a karşı aktif izolat sayısı 19 (%7.56)' dur (Şekil 4.1.).

Çizelge 4.2. Birincil Antimikrobiyal Aktivite Çalışması Sonucu Test Organizmalarına Karşı Etkili *Streptomyces* İzolatlarının Sayısal Dağılımı ve % Oranları.

		++++*	+++	++	+	Pasif	Toplam Aktif	% Aktif
Test Organizmaları	<i>S. aureus</i>	1	2	24	8	216	35	13,94
	<i>K.pneumoniae</i>	0	1	5	3	242	9	3,58
	<i>B. cereus</i>	2	3	9	16	221	30	11,95
	<i>M. luteus</i>	3	7	18	3	220	31	12,35
	<i>E. coli</i>	0	3	6	3	239	12	4,78
	<i>P. fluorescens</i>	0	0	2	2	247	4	1,59
	<i>C. albicans</i>	1	2	11	5	232	19	7,56
	<i>S. cerevisiae</i>	0	0	8	1	242	9	3,58
	<i>Y. lipolytica</i>	0	8	9	6	228	23	9,16
	<i>G. penicillatum</i>	0	0	6	1	244	7	2,78

*; +++++, inhibisyon zonu 30 mm ve daha yüksek, +++, 20-29 mm, ++, 10-19 mm, +, 10 mm ve daha düşük.



Şekil 4.1. Birincil Antimikrobiyal Çalışma Sonucu Test Organizmalarına Karşı Aktif İzolatların Sayısal Dağılımı. *; SA, *Staphylococcus aureus*, KP, *Klebsiella pneumoniae*, BC, *Bacillus cereus*, ML, *Micrococcus luteus*, EC, *Escherichia coli*, PF, *Pseudomonas fluorescens*, CA, *Candida albicans*, SC, *Saccharomyces cerevisiae*, YL, *Yarrowia lipolytica*, GP, *Geotrichum penicillatum*.

Çizelge 4.3. Seçilen *Streptomyces* İzolatlarının Bazı Bakterilere Karşı Antibakteriyal Aktivitesi.

Test Organizmaları						
İzolatlar	BS*	STYP	SM	SE	EF	MRSA
KMY3	-	10 ^m	14	8	8	-
KMY8	-	-	-	-	-	-
KGG13	16	20	-	14	16	18
KGG32	30	15	-	-	34	12
KVK11	26	-	20	15	18	14
KVK30	10	18	-	15	20	15
KVK35	10	-	-	-	16	-
KVK36	-	-	-	-	10	-
KEH23	30	12	10	-	20	22
KEH30	-	-	-	-	8	6
KEH47	-	15	-	-	16	14
KAK29	-	-	-	-	-	-
KAK35	-	-	10	14	16	-

*; BS, *Bacillus subtilis* ATCC 6683, STYP, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, SM, *Serratia marcescens* CCM 583, SE, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, EF, *Enterococcus faecalis* ATCC 8043, MRSA, metisillin-dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 95047. ^m; inhibisyon milimetre cinsinden verilmiştir. -; inhibisyon yok.

Birincil antimikrobiyal aktivitesi belirlenen ve denenen test organizmalarına karşı yüksek inhibisyon gösteren izolatlar seçilerek ikincil antimikrobiyal denemeleri için farklı bakteriler ve küfler kullanılmıştır. Seçilen izolatların bakterilere karşı etkileri yine yüksek çıkmıştır. Özellikle fermentasyon denemelerine alınan 4 izolatımız, metisillin-dirençli *Staphylococcus aureus* başta olmak üzere hemen hemen bütün bakterilere karşı etkili bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

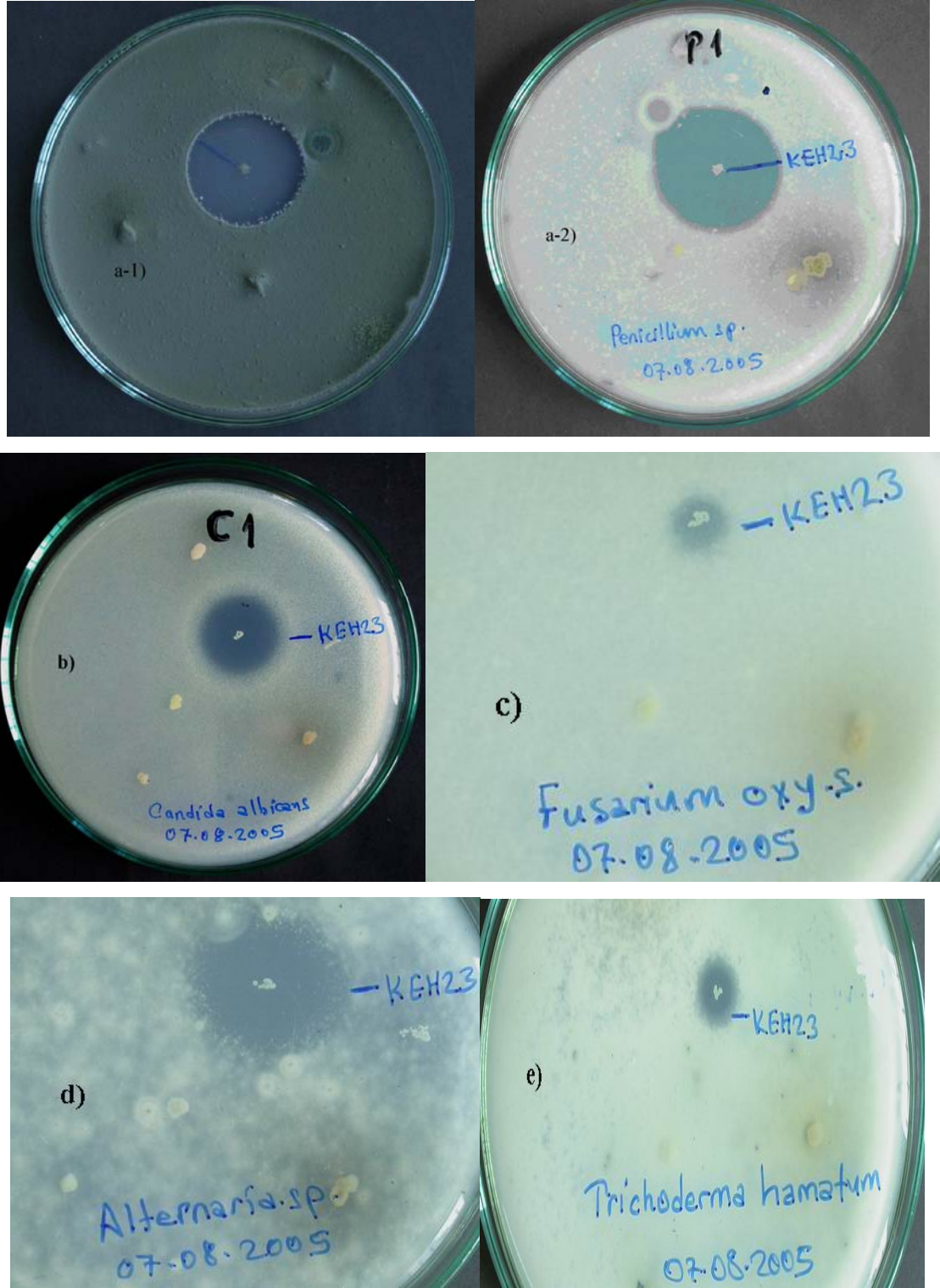
Seçilen izolatların küflere karşı etkilerine (Çizelge 4.4.) baktığımızda; bakterilerin aksine etki gösteren izolat sayısının çok daha az olduğu görülmektedir. Nokta ekim yöntemiyle belirlenen inhibisyon zonları 2. ve 5. günlerde hesaplanmış; fermentasyon denemeleri için seçtiğimiz KEH23 nolu izolat, test organizması olarak kullanılan bütün küflerin büyümesini 5-28 mm arasında değişen değerlerde durdurmuştur. Bu izolatın küflere karşı etkisi Şekil 4.2.' de görülmektedir.

İzolasyon çalışmaları sırasında elde edilen ve çizgi ekim yöntemiyle saflaştırılan farklı olduğunu düşündüğümüz *Streptomyces* izolatlarının koloni morfolojileri Şekil 4.3.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Seçilen *Streptomyces* İzolatlarının Küflere ve *C. albicans*' a Karşı Antifungal Aktivitesi.

	Test Organizmaları ve inhibisyon zonları ^m														
		FOX [*]		AN		AA		TH		COX		P		CA	
	Zaman (gün)	2.	5.	2.	5.	2.	5.	2.	5.	2.	5.	2.	5.	2.	5.
Seçilen İzolatlar	KVK11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KVK17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KVK30	-	-	-	-	-	-	10	5	-	-	-	-	-	-
	KVK35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KVK36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KEH21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KEH23	8	6 ^k	5	6 ^k	20	15	10	5	8	16	28	26	20	20
	KEH30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KEH47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KGG13	6	-	-	-	-	-	7	6 ^k	-	-	6	15	-	-
	KGG30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KGG32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KMY3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KMY8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KMY10	-	-	10	8 ^k	13	10 ^k	12	15 ^k	10	10 ^k	14	13 ^k	10	-
	KAK35	-	-	8	8 ^k	13	8 ^k	-	-	-	10	14	10	12	-

*; FOX, *Fusarium oxysporium*, AN, *Aspergillus niger*, AA, *Alternaria alternata*, TH, *Trichoderma hamatum*, COX, *Cladosporium oxysporum*, P, *Penicillium* sp., CA, *Candida albicans*. ^k; kısmi inhibisyon. ^m; inhibisyon milimetre cinsinden verilmiştir. -; inhibisyon yok.



Şekil 4.2. KEH23 nolu İzolatın Küflere ve *C. albicans*' a Karşı Etkisi (a-1 ve a-2; *Penicillium sp.*, b; *C. albicans*, c; *Fusarium oxysporum*, d; *Alternaria alternata*, e; *Trichoderma hamatum*' a karşı inhibisyon).



Şekil 4.3. İzole Edilen *Streptomyces* Suşlarına ait Farklı Koloni Morfolojileri.

4.3. Denemelere Alınan Aktif İzolatların Taksonomik Karakterlerinin Belirlenmesi ve Tanımlanmaları

4.3.1. Renk Gruplaması

İzolatların renk gruplarının belirlenmesi 3.2.3.1.' de anlatılan yöntemle saptanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5., Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7.' de gösterilmiştir. Ayrıca bu izolatların ISP 2 ortamındaki görünüşleri Şekil 4.5., 4.6. ve 4.7.' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Tanılaması Yapılan İzolatlarımızın ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (7 günlük inkübasyon sonuçları).

Ortamlar		Oat Meal Agar (ISP 3)			İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)		
Özellik		HMR*	SMR	DPR	HMR	SMR	DPR
İzolatlar	KGG13	Sarı	Turuncu	+/-	Beyaz	Sarı	-
	KGG32	Beyaz/Gri	Sarı	-	Gri	Zeytin yeşili	+/-
	KEH23	Sarı	Sarı	-	Krem	Deve tüyü	Kahve
	KVK11	Beyaz/Sarı	Sarı	-	Gri	Krem	+/-

* Sembol ve kısaltmalar, HMR; Havasal Misel Rengi, SMR; Substrat Misel rengi, DPR; Diffüze Pigment Rengi, +/-; değişken, -; negatif.

Çizelge 4.6. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 günlük inkübasyon sonuçları).

Ortamlar		Oat Meal Agar (ISP 3)			İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)		
Özellik		HMR*	SMR	DPR	HMR	SMR	DPR
İzolatlar	KGG13	Turuncu	Krem	+/-	Beyaz	Sarı	-
	KGG32	Gri	Krem	-	Gri	Zeytin yeşili	+/-
	KEH23	Gri/Mor	A. Kahve	-	Duman	Deve tüyü	Kahve
	KVK11	A.Kahve	Sarı	-	Gri	Krem	+/-

* Sembol ve kısaltmalar, HMR; Havasal Misel Rengi, SMR; Substrat Misel rengi, DPR; Diffüze Pigment Rengi, +/-; değişken, -; negatif.

Çizelge 4.7. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 5 ve ISP 6 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 günlük inkübasyon sonuçları).

Ortamlar		Pepton Yeast Ekstakt Iron Agar (ISP 6)			Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)		
Özellik		HMR	SMR	MO	HMR	SMR	DPR
İzolatlar	KGG13	Krem	Krem	-	Sarı	Sarı	-
	KGG32	Gri	Zeytin Yeşili	-	Krem	Krem	-
	KEH23	Duman	Sarı/Kahve	-	Duman	Duman	-
	KVK11	Beyaz/Duman	Krem	-	Beyaz	Sarı	-

* Sembol ve kısaltmalar, HMR; Havasal Misel Rengi, SMR; Substrat Misel rengi, DPR; Diffüze Pigment Rengi, MO; Melanin Oluşumu. -; negatif.

4.3.2. Kültürel ve Morfolojik Özellikler

İzolatların kültürel özellikleri 3.2.3.2.' de anlatılan yöntemle saptanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9.' de verilmiştir. Çizelge 4.8' de ise izolatların ISP 3, ISP 4, ISP 5 ve ISP 6 besiyerlerinde spor zinciri morfolojileri tipleri verilmiş; Ayrıca izolatların spor zinciri morfolojileri Şekil 4.4.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Tanılaması Yapılan İzolatların Bazı Besiyerlerindeki Spor Zinciri Morfolojisi.

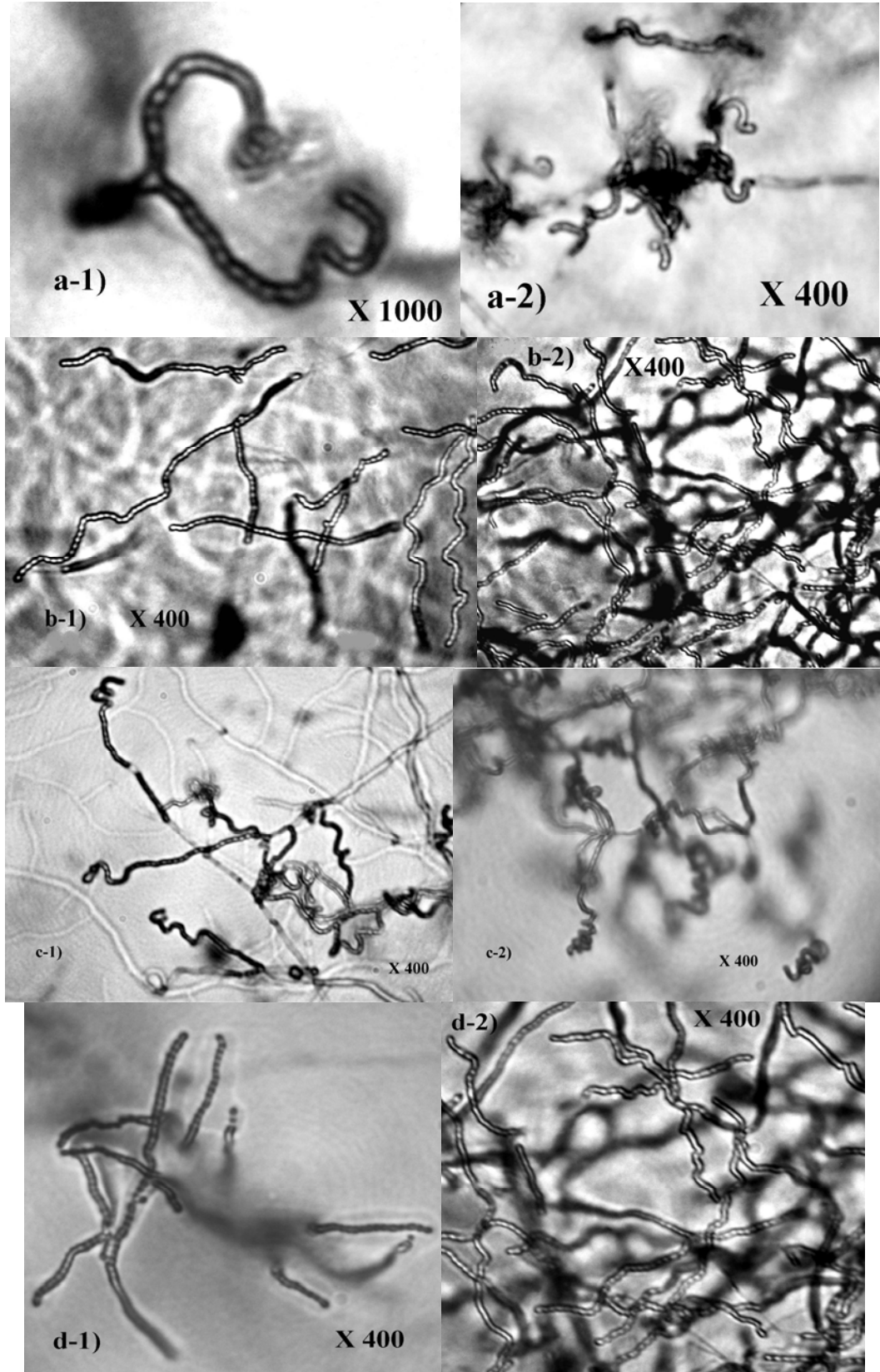
		Besiyerleri			
		ISP 3	ISP 4	ISP 5	ISP 6
İzolatlar	KGG13	Rf	Rf	Rp	Rf
	KGG32	Rf	Rf	Rf	Rf
	KEH23	S	S	S	S
	KVK11	Rf	Rf	Rf	Rf

* Sembol ve kısaltmalar, S; Spiral, Rf; Rektifleksibils. Rp; Rektinakuliaperti, ISP3; Oat Meal Agar, ISP4; İnorganik Tuz-Nişasta Agar, ISP5; Gliserol-Asparagin Agar, ISP6; Pepton Yeast Ekstakt Iron Agar.

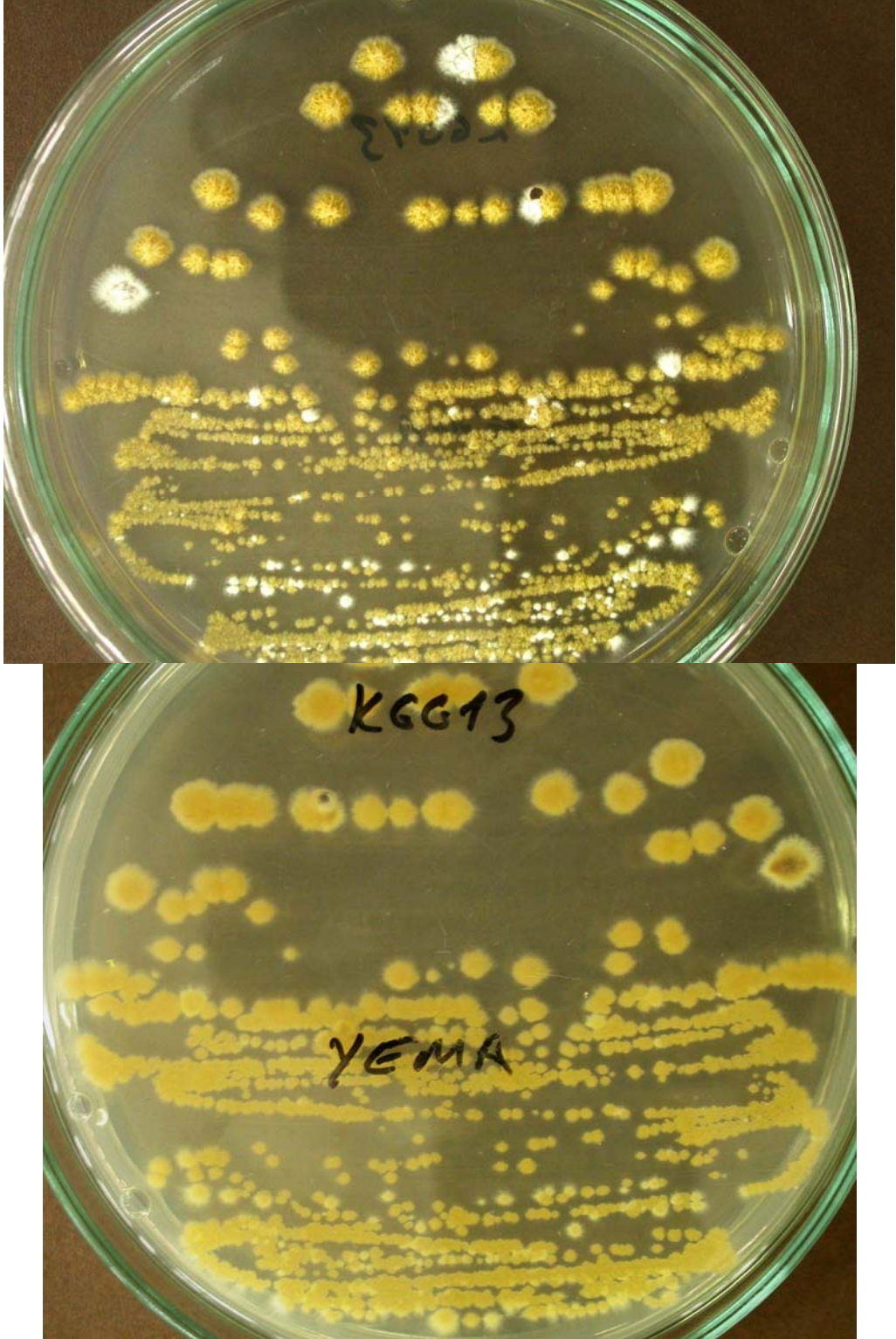
Çizelge 4.9. Tanılaması Yapılan İzolatların Kültürel Karakteristikleri.

İzolat	Ortamlar	Büyüme*	HMR	SMR	DPR
KGG13	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	++++	Sarı/Beyaz	Sarı	+/-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	++++	Turuncu	Krem	+/-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	+++	Beyaz	Sarı	-
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	++	Sarı	Sarı	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	+++	Krem	Krem	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	+++	Beyaz/Gri	Duman	-
	Nişasta Asparagin Agar	++++	Beyaz	Sarı	-
	Glukoz Nitrat Agar	++	Turuncu	Krem	-
	Glukoz-Asparagin Agar	+++	Gri	Yeşil	-
KGG32	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	++++	Gri	Zeytin yeşili	+/-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	++++	Gri	Krem	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	++++	Gri	Zeytin yeşili	?
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	+++	Krem	Krem	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	++++	Gri	Zeytin Yeşili	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	+++	Duman	Duman	-
	Nişasta Asparagin Agar	++++	Gri	Zeytin Yeşili	-
	Glukoz Nitrat Agar	+++	Gri	Gri	?
	Glukoz-Asparagin Agar	+++	Gri	Gri	-
KEH23	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	+++	Gri/Kahve	Kahve	?
	Oat Meal Agar (ISP 3)	+++	Gri/Mor	A. Kahve	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	+++	Duman	Deve tüyü	Kahve
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	++	Duman	Duman	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	++	Duman	Sarı/Kahve	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	++	Duman	Duman	-
	Nişasta Asparagin Agar	+++	Duman	Duman	-
	Glukoz Nitrat Agar	+++	Krem	Krem	Sarı
	Glukoz-Asparagin Agar	++++	Beyaz	Gri	-
KVK11	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	++	Duman	Duman	-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	++	A.Kahve	Sarı	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	+++	Gri	Krem	+/-
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	++	Beyaz	Sarı	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	+++	Beyaz/Duman	Krem	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	+	Gri	A.Kahve	A.Kahve
	Nişasta Asparagin Agar	++	A.Kahve	Sarı	-
	Glukoz Nitrat Agar	+	A.Kahve	A.Kahve	-
	Glukoz-Asparagin Agar	++	Krem	Krem	A.Kahve

* Sembol ve kısaltmalar, HMR; Havasal Misel Rengi, SMR; Substrat Misel rengi, DPR; Diffüze Pigment Rengi, +; zayıf, ++; orta, +++; iyi, ++++; çok iyi büyüme. +/-; değişken, -; negatif, ?; kesin belli değil. A. Kahve; Açık Kahve.



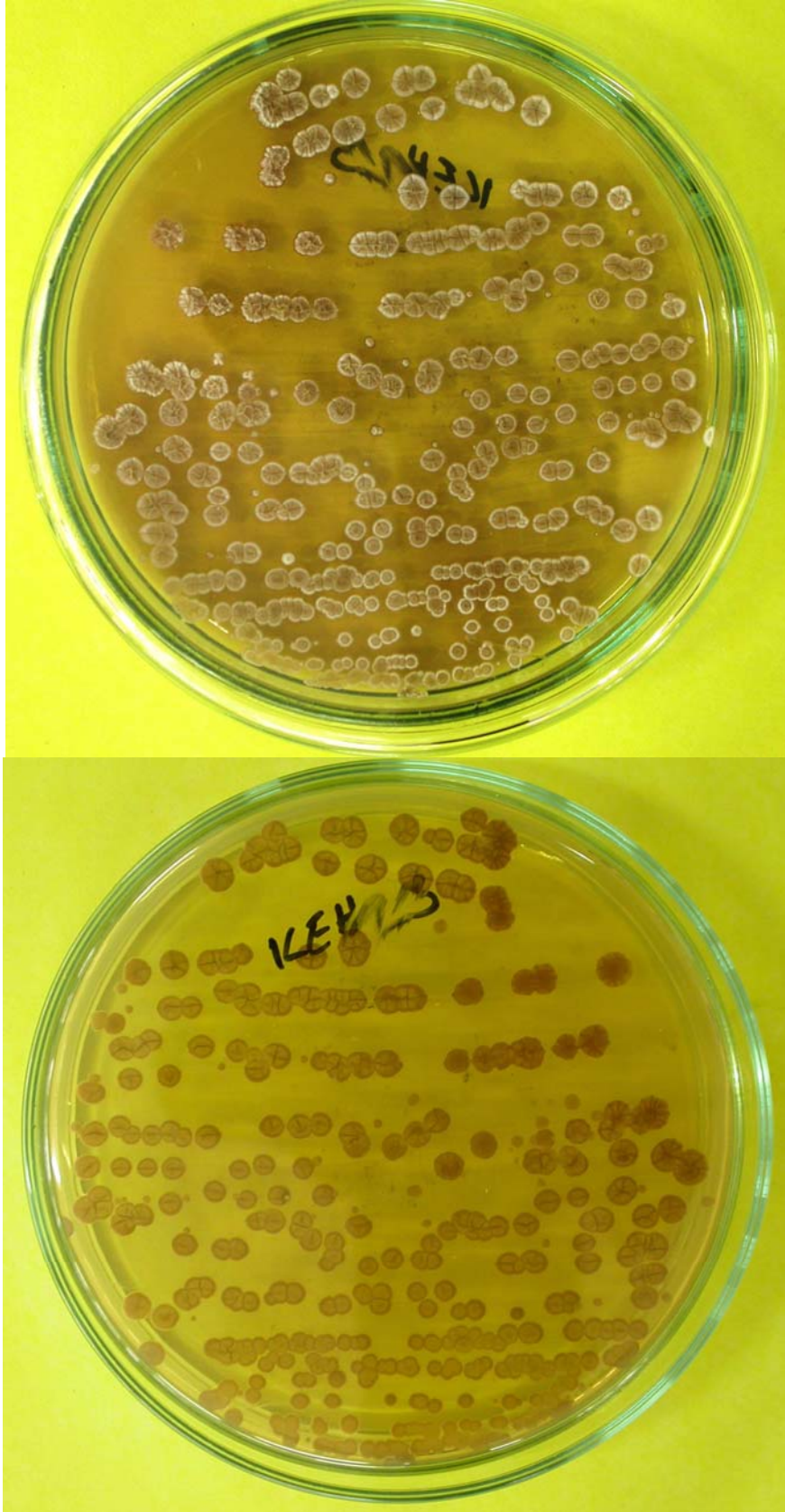
Şekil 4.4. Fermentasyon denemelerine Alınan Aktif İzolatların Spor Zinciri Morfolojileri (a-1 ve a-2; KGG13, b-1 ve b-2; KGG32, c-1 ve c-2; KEH23, d-1 ve d-2; KVK11).



Şekil 4.5. KGG13 nolu İzolatın Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Ortamında Görünüşü.



Şekil 4.6. KGG32 nolu İzolatın Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Ortamında Görünüşü.



Şekil 4.7. KEH23 nolu İzolatın Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Ortamında Görünüşü.

4.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler

İzolatlarımızın fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri 3.2.3.3.'de anlatılan yöntemle saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.10., 4.11., 4.12., 4.13. ve 4.14' de verilmiştir. Ayrıca izolatların DNaz Agar ortamındaki DNaz aktiviteleri Şekil 4.8., Litmus Milk Agar ortamındaki kazeinaz aktiviteleri Şekil 4.9., ksantin degradasyonu Şekil 4.10., KGG13 nolu izolatın hippurate hidrolizi Şekil 4.11. ve nişasta hidrolizi sonuçları Şekil 4.12.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Seçilen İzolatların Çeşitli Karbon Kaynaklarını Kullanımı.

		İzolatlar			
		KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Karbon Kaynakları	Adonitol	-*	+	-	-
	Laktoz	-	+	+	+
	Sukroz	+	+	+	+
	D-Fruktoz	-	+	-	+
	Ksilitol	+/-	-	-	-
	Mannitol	-	+	+	+
	İnozitol	-	-	+	+/-
	Ksiloz	+/-	+	+	+
	Dekstran	-	-	+/-	+
	Ramnoz	+	+	+	+
	Rafinoz	+	+	+	-
	D-Melezitoz	-	-	+/-	-
	D-Melibioz	+	-	-	+
	Glukoz	+	+	+	+
	Karbon Kaynaksız	-	-	-	-

* Semboller; +: pozitif, -: negatif, +/-: zayıf pozitif sonuç.

Çizelge 4.11. Seçilen İzolatların Azot Kaynaklarını Kullanımı.

		İzolatlar			
		KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Azot Kaynakları	L-Arginin	+	-	+	+
	L-Sistein	+	-	-	-
	L-Histidin	+	+	+	+
	L-Fenilalanin	+	+	+	+
	L-Valin	+	-	-	-
	KNO ₃	+	-	+	+
	Asparagin	+	+	+	+
	L-Hidroksiprolin	+	-	+	+/-
	L-Prolin	+	+	+	+
	L-Lizin	-	-	-	+
	L-Tirozin	+	-	+	-
	DL- α -n-bütirik asit	-	+	-	+
	Azot Kaynaksız	-	-	-	-

* Semboller; +: pozitif, -: negatif, +/-: zayıf pozitif sonuç.

Çizelge 4.12. Seçilen İzolatların Farklı Sıcaklık ve İnhibitörlerle Büyüme Özellikleri.

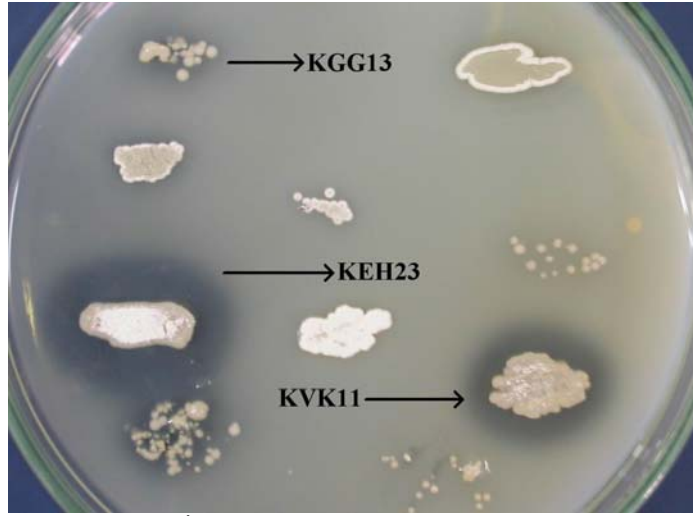
			İzolatlar			
			KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Sıcaklık	4 °C		-*	-	-	-
	37 °C		+	+	+	-
	45 °C		-	-	+	-
İnhibitörler	Fenol	0,1	+	-	-	-
	Sodyum Azid	0,01	-	-	-	-
		0,02	-	-	-	-
	Potasyum Tellürit	0,001	+	+	+	-
	Kristal Violet	0,0001	-	-	-	+
	Sodyum Klorid	%4	+	+	+	+
		%7	-	+	+	-
		%10	-	-	-	-
		%13	-	-	-	-

* Semboller; +: pozitif, -: negatif, +/-: zayıf pozitif sonuç.

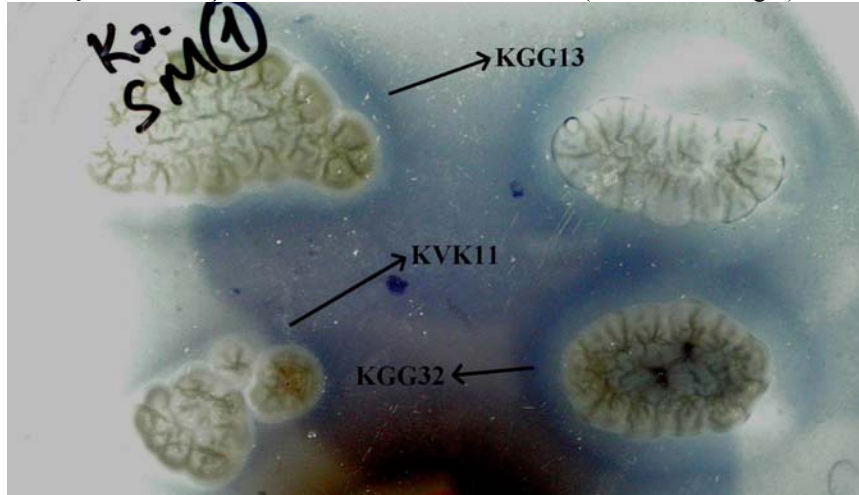
Çizelge 4.13. Seçilen İzolatların Bazı Fizyolojik Özellikleri.

		İzolatlar			
		KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Özellikler	Nişasta Hidrolizi	+/-*	+	+	+/-
	Tirozin Hidrolizi	+	-	+	-
	Kazein Hidrolizi	+/-	+	-	+/-
	Üre Hidrolizi	-	-	-	+
	Elastin	+	+	-	-
	Ksantin	-	+	+	+
	Arbutin	-	-	-	-
	Hippurate	+	-	-	-
	Nitrat Redüksiyonu	+	-	+	-
	Oksalat Kullanımı	+	+	-	+/-
	Melanin (ISP 6 ' da)	-	-	-	-
	Jelatin Hidrolizi	+	-	+	-
	Lesitinaz ^p	-	+	+	-
	Lipolizis ^p	+	+	+	-
	DNaz	+/-	-	+	+
	Ksilanaz	-	+	-	-
	Kitosanaz	+/-	-	-	-
	Karboksi Metil Selülaz	+	-	-	+
	H ₂ S Üretimi	-	-	-	+
	Proteolitik aktivite ^p	-	+	-	+

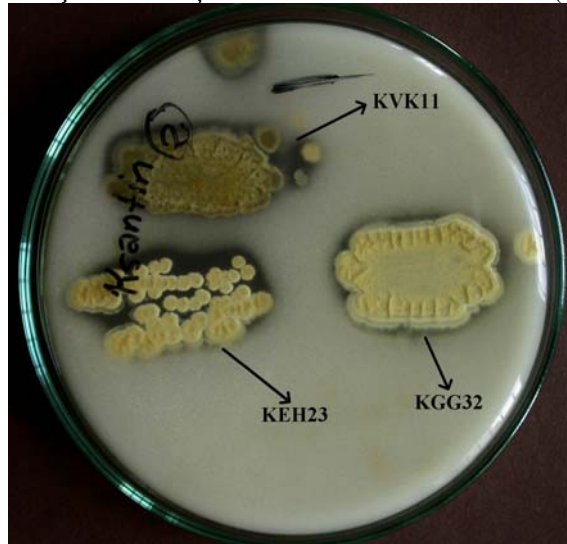
* Semboller; +: pozitif, -: negatif, +/-: zayıf pozitif sonuç ^p: Egg-Yolk Agar ortamında belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Seçilen İzolatların DNaz Aktiviteleri (Ortam DNaz Agar).



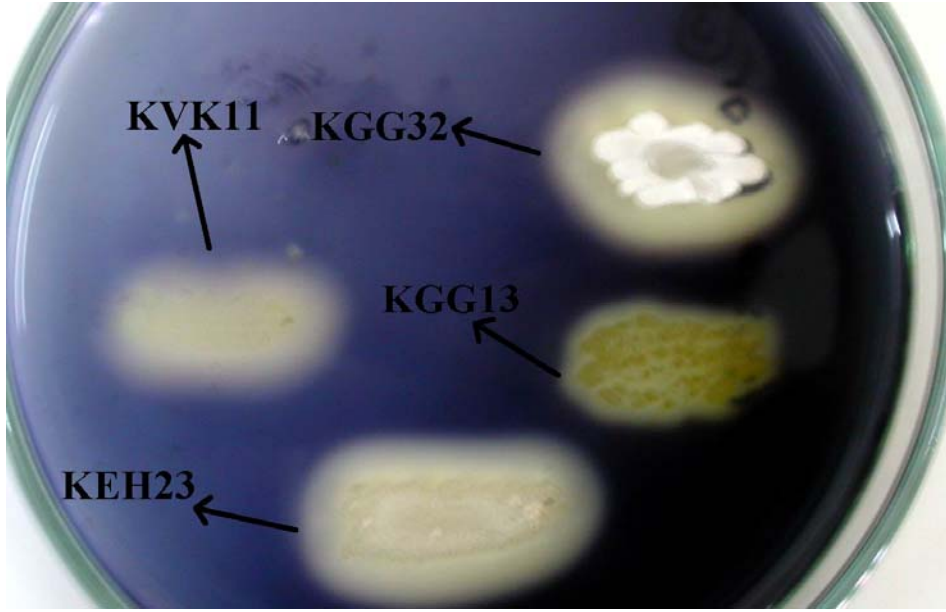
Şekil 4.9. Seçilen İzolatların Kazein Hidrolizi (Ortam; Litmus Milk Agar).



Şekil 4.10. Seçilen İzolatların Ksantin Degradasyonu Hidrolizi (Ortam; Ksantin-Nutrient Agar).



Şekil 4.11. KGG13 nolu izolatin Hippurate (Ortam; Sodyum Hippurate Broth)



Şekil 4.12. Seçilen İzolatların Nişasta Hidrolizi (Ortam; Nişasta-Nutrient Agar, Reaktif; İyodür Solüsyonu).

Çizelge 4.14. Seçilen İzolatların Bazı Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları.

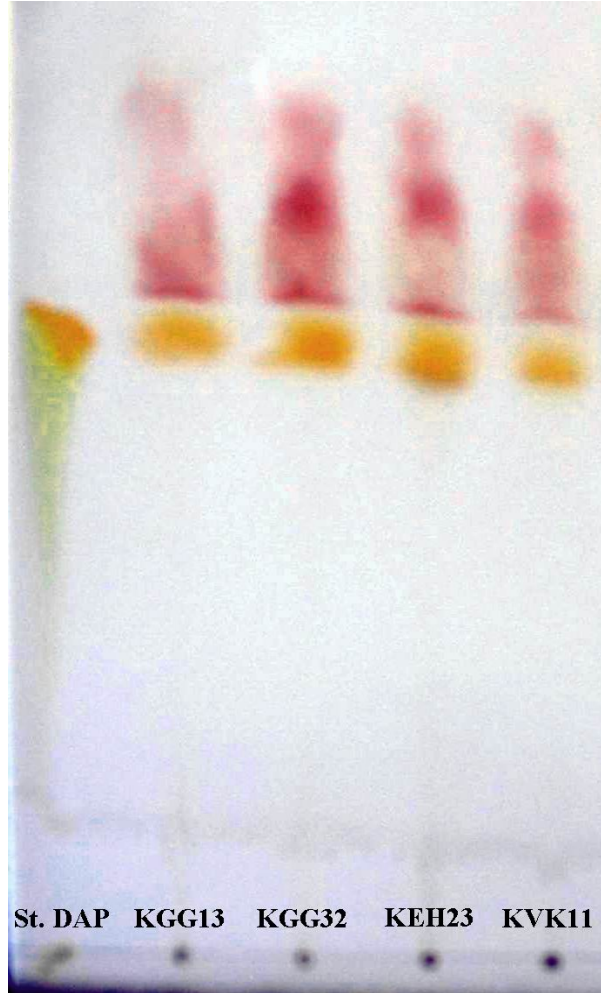
		İzolatlar			
		KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Antibiyotikler	Novobiyosin (30 µg)	R*	R	S	R
	Neomisin (50 µg)	S	R	R	R
	Novobiyosin (5 µg)	R	R	R	R
	Gentamisin (10 µg)	R	R	R	R
	Rifampin (5 µg)	R	R	R	R
	Nalidiksik asit (30 µg)	S	S	R	R
	Imipenem (10 µg)	R	R	S	S
	Eritromisin (15 µg)	S	R	S	S
	Penisilin G (10 i.u)	R	R	R	R
	Levofloksasin (5 µg)	R	R	R	R
	Oksasiklin (1 µg)	R	S	R	R
	Kloramfenikol (30 µg)	R	S	S	S
	Vankomisin (30 µg)	R	R	R	S
	Sulfamethoxazole (25 µg)	R	R	S	S

* Semboller; R; Resistant (Dirençli), S; Sensitif (Duyarlı).

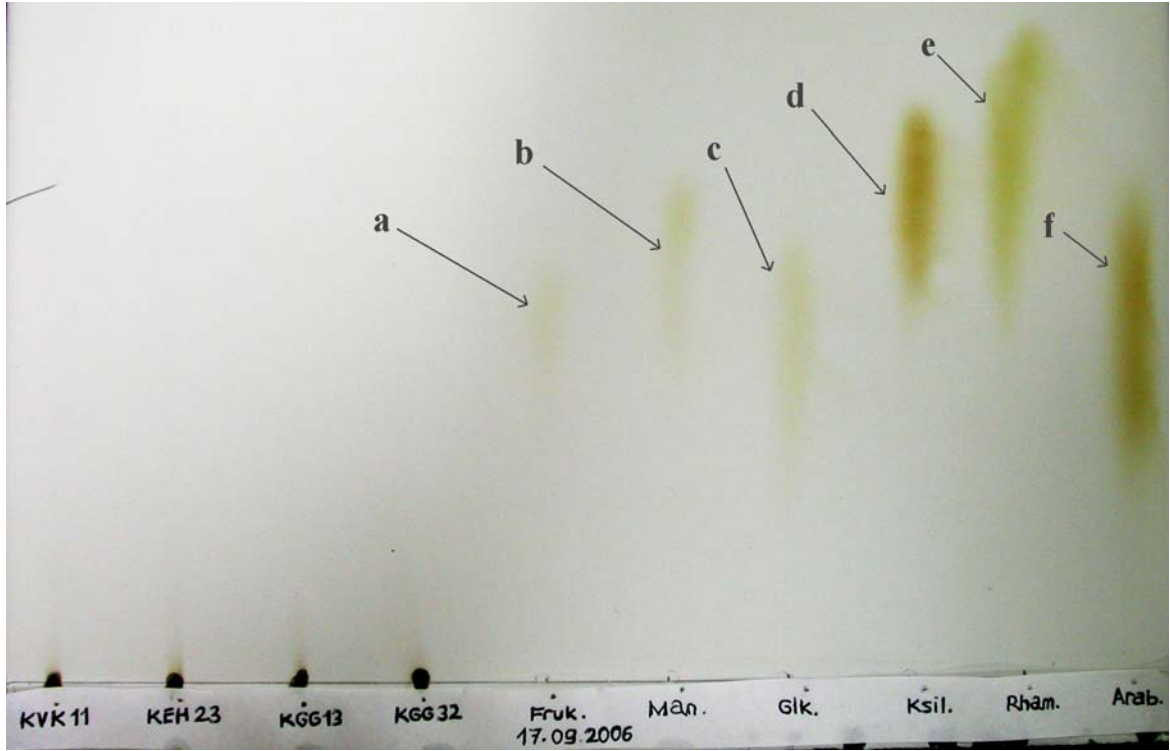
4.3.4. Kemotaksonomik Özellikler

Fermentasyon denemelerine alınan izolatlarda diaminopimelik asit (DAP) analizi, 3.2.3.4.1.' de anlatılan yöntemle gerçekleştirildi ve bütün izolatların hücre çeperi DAP tipi LL-A₂pm (Kemo tip I) olarak saptandı. Aktif izolatların hücre çeperinin L-DAP içerdikleri; önce grimsi-yeşil rengin görülmesi ve standartla karşılaştırılması, işlem bittikten sonra 2 güne kadar rengin sarıya dönmesi ve sonrasında kaybolmasıyla anlaşılmıştır. Rf: 0,527 olarak hesaplanmıştır. Hücre çeperindeki diğer amino asitler mor-menekşe renginde gözlemlenmiştir. (Şekil 4.13.)

Aktif izolatların hücre çeperi karakteristik şeker analizleri bölüm 3.2.3.4.2.' de verilen yöntemle saptanmış olup; İşlem sonucunda aktif izolatların hücre çeperinin karakteristik şeker içermediği görülmüştür (Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. Seçilen İzolatların TLC ile Hücre Çeperi Diaminopimelik Asit Analizleri (Sabit Faz: 20X20, 60 F₂₅₄, Merck; Solvent sistemi: metanol: distile su: 6 N HCl: piridin (80: 26: 4: 10); Standart: Sigma DAP, D-1377; İşlem Sonrası Kullanılan Reaktif: %0,1 ninhidrin; Süre: 2 saat 40 dk; Rf: 0.527).



Şekil 4.14. Seçilen İzolatların TLC ile Hücre Çeperi Karakteristik Şeker Analizleri (Sabit Faz: 20X20, 60 F₂₅₄, Merck; Solvent sistemi: *n*-butanol:distile su: piridin:toluen (10 : 6 : 6 : 1); Standartlar: **a-f** sırasıyla; D-Fruktoz, D-Mannoz, D-Glukoz, D-Ksiloz, L-Rhamnoz ve L-Arabinoz' un %1' lik solüsyonları; İşlem Sonrası Kullanılan Reaktif: Anilin-Fitalat; Süre: 3 saat 20 dk).

4.3.5. İzolatların Tanılanması İçin Uygulanan İstatistiksel Analiz Sonuçları

Seçilen ve fermentasyon denemelerine alınan 4 izolatın tanılanması için 3.2.3.5' de verilen yöntemle % benzerlikleri ve dendogramları oluşturulmuştur. Williams ve arkadaşları (1983) tarafından belirlenen *Streptomyces* türleri ana gruplarının pozitif olasılık standart değerleri, Çizelge 4.15.' de verilmiş olup, aralarındaki % benzerlikleri de Şekil 4.15.' de gösterilmiştir. Çizelge 4.16.' da ise aynı araştırmacılar tarafından belirlenen *Streptomyces* tekil-üye gruplarının ayırımında kullanılan minumum testler ve standart değerleri verilmiş, % benzerlikleri Şekil 4.16.' da gösterilmiştir. Fermentasyon denemeleri için seçilen aktif 4 izolatın, tanılanması için gerekli minumum testler ve sonuçları Çizelge 4.17.' de özetlenmiş olup, elde ettiğimiz bu değerlerle yukarıda ifade edilen standart ana ve tekil-üye gruplarının değerleri ayrı ayrı Minitab programına işlenmiş, % benzerliklerinin oluşturulması amacıyla Multivariable Cluster analizine tabi tutulmuştur. Sonuçta kendi izolatlarımız ile standart *Streptomyces* türlerinin % benzerlik oranları ve uzaklık oranları tespit edilmiştir.

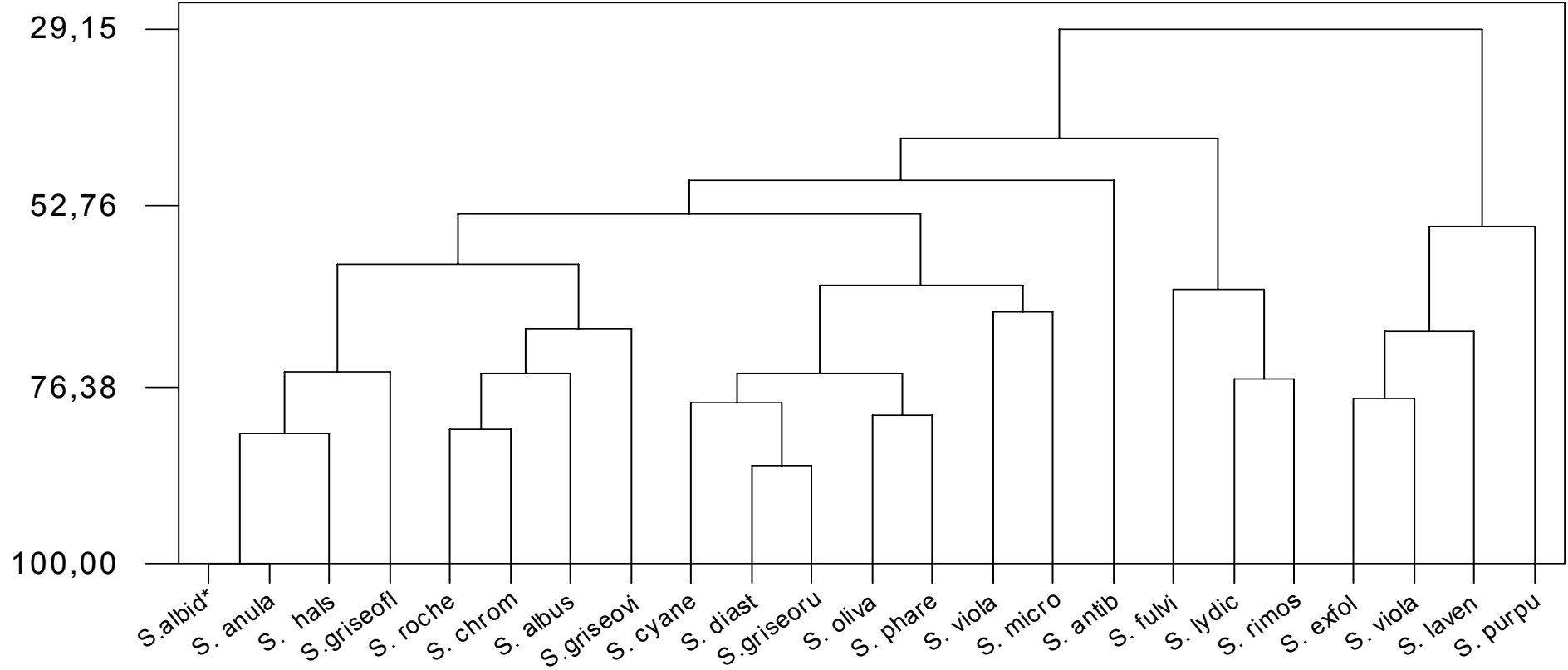
Çizelge 4.15. *Streptomyces* Türleri Ana Gruplarının % Pozitif Olasılık Matrisi (Williams et al. 1983)

	<i>S. albidoflavus</i>	<i>S. anulatus</i>	<i>S. halstedii</i>	<i>S. exfoliatus</i>	<i>S. violaceus</i>	<i>S. fulvissimus</i>	<i>S. rochei</i>	<i>S. chromofuscus</i>	<i>S. albus</i>	<i>S. griseoviridis</i>	<i>S. cyaneus</i>	<i>S. diastaticus</i>	<i>S. olivaceoviridis</i>	<i>S. griseoruber</i>	<i>S. lydicus</i>	<i>S. violaceusniger</i>	<i>S. griseoflavus</i>	<i>S. phaeochromogenes</i>	<i>S. rimosus</i>	<i>S. microflavus</i>	<i>S. antibioticus</i>	<i>S. lavendulae</i>	<i>S. purpureus</i>
Spor Zinciri: Rektifleksibils	70	90	77	99	38	67	4	22	1	1	5	42	1	1	1	1	1	1	14	20	20	92	99
Spiral	1	38	23	1	50	22	64	78	99	99	82	58	86	99	99	99	1	67	57	40	60	17	1
Spor Kütlesi Rengi																							
Kırmızı	5	5	1	39	13	66	7	1	1	99	31	16	14	12	9	1	17	1	1	1	1	83	25
Gri	1	3	99	38	13	11	77	34	1	1	31	48	71	78	91	99	1	1	1	80	99	8	75
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	1	1	1	11	1	89	8	1	1	1	21	16	1	67	1	1	1	1	1	20	1	1	1
Diffüze Pigment Üretilir	20	11	8	39	1	33	4	11	1	99	33	10	29	99	1	1	1	50	1	20	1	1	99
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	15	11	1	28	1	1	4	11	1	99	13	5	29	1	1	1	1	33	1	1	1	1	99
Melanin Üretimi																							
Pepton Yeast Iron Agar' da	5	13	1	61	88	67	4	33	1	1	97	47	14	22	1	1	17	17	1	80	80	99	75
Tirozin Agar' da	10	24	1	61	99	1	1	22	1	17	85	47	14	22	1	1	17	33	1	80	60	92	1
Antibiosis																							
<i>B. subtilis</i>	5	50	8	56	50	78	35	11	17	99	44	21	1	1	73	67	17	17	99	80	40	92	50
<i>M. luteus</i>	5	71	8	44	38	89	35	11	17	99	33	21	1	1	99	99	17	17	86	99	20	83	50
<i>C. albicans</i>	85	21	8	1	1	11	19	1	1	33	3	1	1	1	27	17	1	1	57	1	99	67	1
<i>S. cerevisiae</i>	80	13	8	1	1	22	15	1	1	33	5	1	29	1	27	50	1	17	86	1	99	67	1
<i>S. murinus</i>	10	61	15	39	88	99	39	22	17	80	62	5	1	22	99	50	67	1	99	99	80	99	75
<i>A. niger</i>	55	32	1	6	25	22	27	1	17	33	10	11	1	1	99	33	1	1	99	1	80	75	50
Enzim Aktivitesi																							
Lesitinaz	15	3	15	50	75	44	4	11	1	50	10	1	1	1	64	1	1	1	86	60	40	99	75
Lipolisiz	99	99	99	94	63	99	73	89	99	83	49	26	86	89	18	99	99	83	99	40	1	33	25

Pektin Hidrolizi	5	53	77	61	13	1	42	22	1	67	56	68	14	99	1	50	99	50	14	99	40	8	1
Nitrat İndirgenmesi	20	79	23	83	99	1	27	22	1	33	36	47	14	89	9	83	83	17	86	1	80	50	99
H ₂ S Üretimi	85	90	92	89	63	67	92	89	83	99	90	79	99	99	1	99	99	83	14	99	1	42	75
Hippurate Hidrolizi	1	13	77	44	88	44	9	13	1	67	3	28	50	56	30	67	67	83	71	40	40	1	1
Elastin Degradasyonu	90	87	85	89	88	67	50	67	50	50	41	37	57	44	36	83	17	99	99	60	1	92	99
Ksantin Degradasyonu	95	95	99	94	88	99	96	22	83	83	80	53	29	78	82	1	1	99	86	60	80	83	99
Arbutin Degradasyonu	99	99	99	99	99	67	96	99	99	99	54	53	1	99	99	99	50	67	71	99	99	92	75
Antibiyotiklere Duyarlılık																							
Neomisin (30 µg/ml)	1	1	1	11	25	89	8	1	1	1	1	1	1	1	18	1	1	1	99	1	1	50	75
Rifampisin (5 µg/ml)	40	66	31	11	99	99	89	33	99	83	46	68	86	78	9	83	50	50	99	99	20	33	99
Oleandomisin (100 µg/ml)	70	84	99	44	13	99	46	1	83	17	13	26	1	1	9	59	83	33	71	1	1	8	75
Penisilin G (10 i.u)	90	74	92	44	99	99	92	44	99	99	64	47	14	78	91	17	83	33	99	20	40	58	25
45 °C' de Büyüme	1	5	23	17	1	22	77	67	99	67	41	16	86	1	1	50	1	67	43	60	80	17	1
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)																							
NaCl (%7)	85	74	92	22	38	22	92	44	99	83	18	32	29	78	55	1	33	83	99	1	20	1	25
Sodyum Azid (0,01)	75	32	85	23	63	1	62	56	99	99	15	5	57	11	18	50	33	67	71	60	60	1	1
Fenol (0.1)	90	92	85	72	99	44	96	22	17	83	64	95	86	89	9	1	99	99	71	99	80	58	1
Potasyum Tellürit (0,001)	85	87	99	83	99	56	73	67	50	99	46	74	57	78	55	17	99	99	71	80	60	42	1
Thalious Asetat (0,001)	90	87	92	67	63	22	54	54	1	50	13	21	14	33	46	1	50	33	14	1	40	17	1
C ve N Kaynaklarından Yararlanma																							
DL-α-n-bütirik asit	65	37	54	61	88	89	12	67	1	1	31	32	57	33	9	99	17	67	1	60	20	42	1
L-Sistein	60	61	69	50	38	44	50	67	1	83	72	79	99	78	46	33	17	17	29	80	80	33	1
L-Valin	35	37	62	50	50	99	15	33	17	17	69	74	86	56	27	33	1	99	57	40	60	17	1
L-Fenilalanin	70	61	77	83	99	89	46	11	17	33	67	16	71	33	99	67	17	83	86	99	40	42	1
L-Histidin	40	74	69	78	25	99	77	78	99	83	85	68	99	99	36	99	17	83	99	10	99	8	1
L-Hidroksiprolin	1	37	23	89	88	78	8	1	67	17	28	21	1	22	55	83	17	67	29	20	40	42	1
Sukroz	45	26	23	28	38	34	81	33	33	17	92	74	86	44	73	33	83	83	1	99	80	50	25
Mezo-Inositol	45	32	23	6	63	99	96	89	33	67	92	84	57	99	91	67	83	99	99	40	80	25	75
Mannitol	90	99	69	1	38	99	99	99	99	99	95	90	99	99	91	99	99	99	99	99	80	8	25
L-Ramnoz	20	82	69	61	38	22	96	67	17	83	92	95	99	99	18	83	83	99	1	80	60	17	1
Rafinoz	5	18	31	33	63	89	69	22	33	50	99	84	99	99	82	83	33	99	86	99	60	2	1

D-Melezitoz	55	71	46	22	50	44	81	22	67	33	72	26	29	56	82	83	67	99	57	40	80	33	99
Adonitol	50	66	8	1	13	89	35	22	99	67	82	16	14	22	82	67	1	99	99	1	20	8	1
D-Melibioz	25	32	77	28	75	89	96	44	50	33	98	95	99	78	82	83	67	83	99	40	99	17	25
Dekstran	20	76	69	6	13	22	89	78	1	17	59	16	14	44	1	17	50	50	14	1	1	1	1
Ksilitol	5	21	1	1	1	11	46	1	1	1	21	16	29	1	55	17	1	99	86	40	1	1	25

% Benzerlik



Şekil 4.15. *Streptomyces* Ana Gruplarının % Benzerlikleri.

* Kısaltmaları verilen tür gruplarının açılımları Çizelge 4.15.' de verilmiştir.

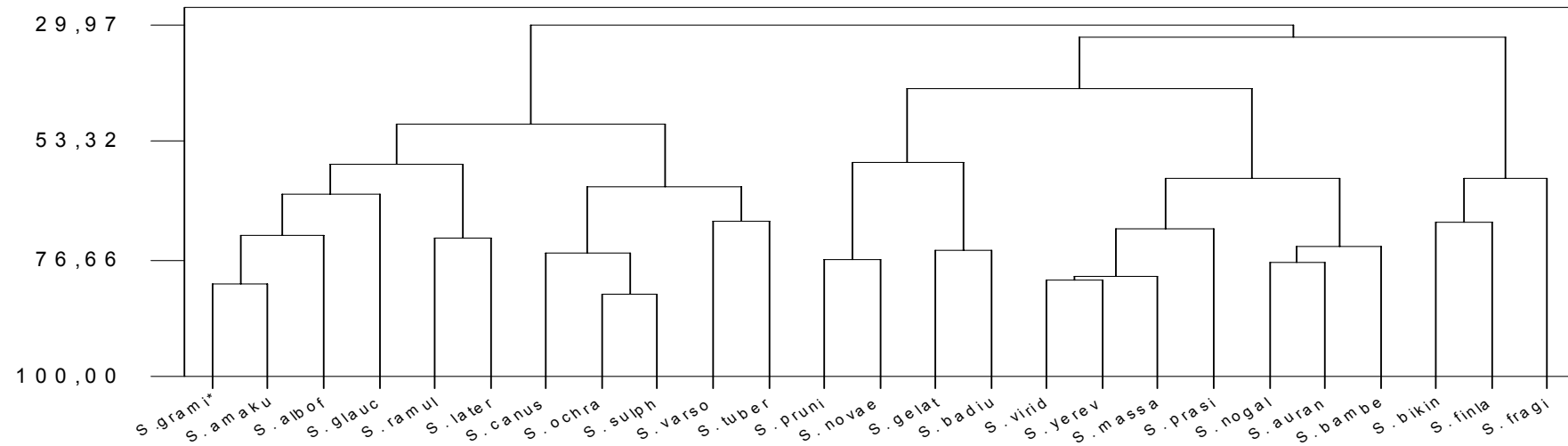
Çizelge 4.16. Tekil-Üye Gruplarının Ayrımında Kullanılan Minimum Karakterler (Williams et al., 1983)

Ayrılmında Kullanılan Minimum Karakterler (Williams et al., 1983)	<i>S. prunicolor</i>	<i>S. canus</i>	<i>S. graminofaciens</i>	<i>S. viridochromogenes</i>	<i>S. glaucescens</i>	<i>S. nogalater</i>	<i>S. prasinosporus</i>	<i>S. ochraceisclerotitcus</i>	<i>S. aurantiogriseus</i>	<i>S. bambergensis</i>	<i>S. gelaticus</i>	<i>S. amakusaensis</i>	<i>S. varsoviensis</i>	<i>S. tubercidius</i>	<i>S. badius</i>	<i>S. ramulosus</i>	<i>S. sulphureus</i>	<i>S. yerevanensis</i>	<i>S. massasporeus</i>	<i>S. alboflavus</i>	<i>S. bikiniensis</i>	<i>S. fragilis</i>	<i>S. lateritius</i>	<i>S. finlayi</i>	<i>S. novaecaesareae</i>
Spor Zinciri Morfolojisi^b																									
Rektifleksibıl	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Spiral	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Spor Kütlesi Rengi																									
Gri	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Diffüze Pigment Üretilir	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
Antibiosis																									
<i>B. subtilis</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>M. luteus</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
Degradasyon																									
Elastin	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
Ksantin	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Antibiyotiklere Duyarlılık																									
Rifampisin (µg/ml)	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
Penisilin G (10 i.u.)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
45 °C' de Büyüme	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)																									
NaCl (%7)	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Sodyum Azid (0,01)	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Fenol (0.1)	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0
Potasyum Tellürit (0,001)	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
C ve N Kaynaklarından Yararlanma																									
L-Fenilalanin	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0

L-Histidin	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Sukroz	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
meso-Inositol	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Mannitol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
L-Ramnoz	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
Rafinoz	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1
D-Melibioz	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1

* Semboller; “1”: %90 ya da daha fazla strain için Pozitif, “0” %10 ya da daha az strain için Pozitif Sonuç.

% B e n z e r l i k



Şekil 4.16. *Streptomyces* Tekil-Üye Gruplarının % Benzerlikleri (* Kısaltmaları verilen tür gruplarının açılımları Çizelge 4.16.' da verilmiştir).

Çizelge 4.17. Aktif İzolatların Tanılanmasıyla İlgili Minimum Karakterler ve Sonuçları.

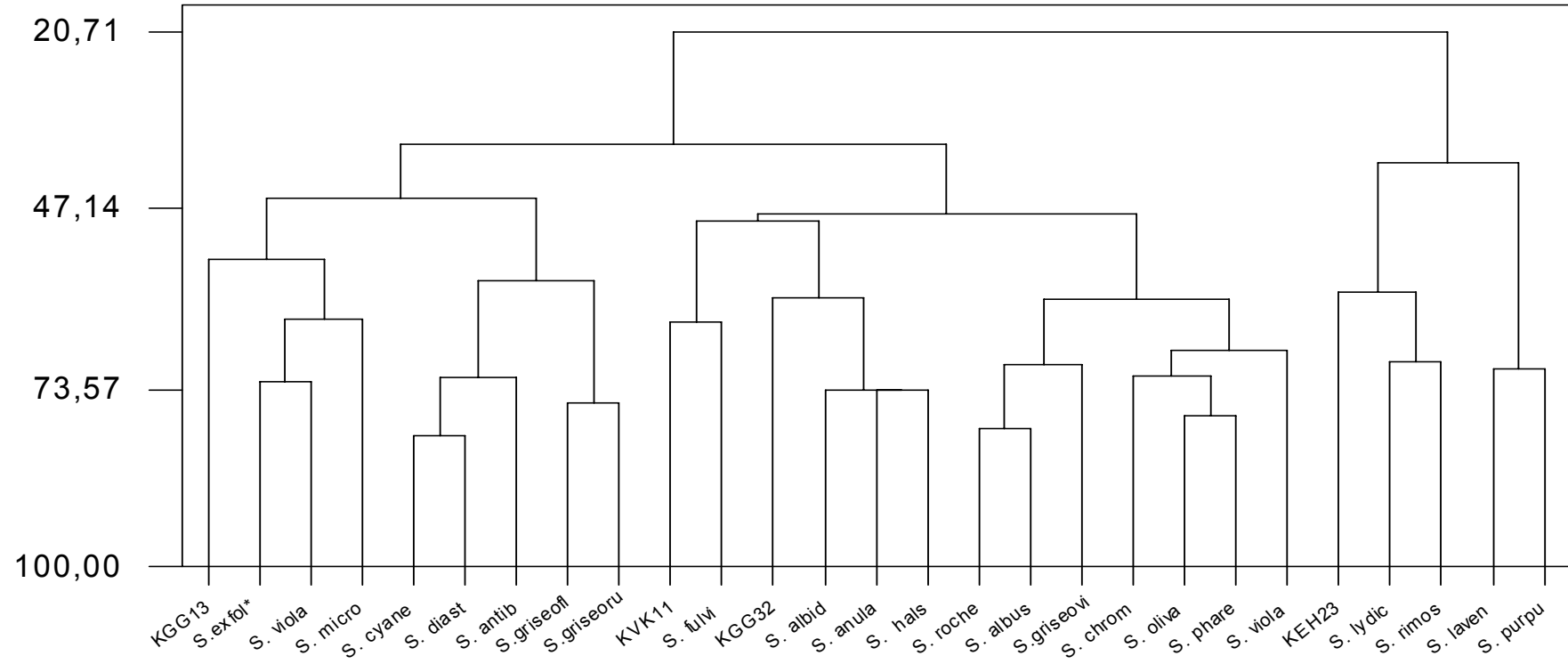
Özellikler	KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Havasal Misel Spor Varlığı	+	+	+	+
Spor Zinciri Morfolojisi^b				
Rektinakuliaperti	+/-	-	-	-
Rektifleksibils	+	+	-	+
Spiral	-	-	+	-
Vertisillat	-	-	-	-
Spor Kütlesi Rengi				
Kırmızı	-	-	-	-
Gri	+	+	+	-
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	-	-	-
Diffüze Pigment Üretilir	-	+	+	+
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	-	-	+	+
Melanin Üretimi				
Pepton Yeast Iron Agar' da	-	-	-	-
Tirozin Agar' da	-	-	-	-
Miselyum fragmentasyonu	-	-	-	-
Batık Misel Sporulasyonu	-	-	-	-
Antibiosis				
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+
<i>M. luteus</i>	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	+	+	-
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	+	-
Enzim Aktivitesi				
Lesitinaz ^c	-	+	+	-
Lipolisiz ^c	+	+	+	-
Nitrat İndirgenmesi	+	-	+	-
H ₂ S Üretimi	-	-	-	+
Degratasyon				
Hippurate	+	-	-	-
Elastin	+	+	-	-
Ksantin	-	+	+	+
Arbutin	-	-	-	-

Çizelge 4.17.'nin devamıdır.

	KGG13	KGG32	KEH23	KVK11
Antibiyotiklere Duyarlılık				
Neomisin (30 µg/ml)	-	-	-	-
Rifampisin (5 µg/ml)	-	-	-	-
Penisilin G (10 i.u.)	-	-	-	-
45 °C' de Büyüme	-	-	+	-
4 °C' de Büyüme	-	-	-	-
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)				
NaCl (%7)	-	+	+	-
Sodyum Azid (0,01)	-	-	-	-
Fenol (0.1)	+	-	-	-
Potasyum Tellürit (0,001)	+	+	+	-
Azot Kaynaklarından yararlanma				
DL-α-n-bütirik asit	-	+	-	+
L-Sistein	+	-	-	-
L-Valin	+	-	-	-
L-Fenilalanin	+	+	+	+
L-Histidin	+	+	+	+
L-Hidroksiprolin	+	-	+	+
Karbon Kaynaklarından Yararlanma				
Sukroz	+	+	+	+
Mezo-Inositol	-	-	+	+
Mannitol	-	+	+	+
L-Ramnoz	+	+	+	+
Rafinoz	+	+	+	-
D-Melezitoz	-	-	+	-
Adonitol	-	+	-	-
D-Melibioz	+	-	-	+
Dekstran	-	-	+	+
Ksilitol	+	-	-	-

^b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; ^c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif, +/-, zayıf pozitif.

% Benzerlik



Şekil 4.17. *Streptomyces* Ana Grupları ile Aktif İzolatların % Benzerlikleri (*Kısaltmaları verilen tür gruplarının açılımları Çizelge 4.15.' de verilmiştir).

Çizelge 4.18. *Streptomyces* Ana Tür grupları ile Aktif İzolatların % Benzerliklerinin (Dendogramlarının) Oluşturulması İşleminde Minitab Programı, Orijinal İstatistik Sonuçları.

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined		New cluster	Number of obs. in new cluster
1	26	80,68	0,386	15	16	15	2
2	25	79,47	0,411	11	13	11	2
3	24	77,64	0,447	17	22	17	2
4	23	75,82	0,484	18	21	18	2
5	22	73,86	0,523	6	7	6	2
6	21	73,86	0,523	5	6	5	3
7	20	72,58	0,548	8	9	8	2
8	19	72,03	0,559	15	25	15	3
9	18	71,83	0,563	12	17	12	3
10	17	70,65	0,587	26	27	26	2
11	16	70,06	0,599	11	14	11	3
12	15	69,72	0,606	19	23	19	2
13	14	67,91	0,642	12	20	12	4
14	13	63,64	0,727	4*	10	4	2
15	12	63,30	0,734	8	24	8	3
16	11	60,31	0,794	11	12	11	7
17	10	60,19	0,796	2	5	2	4
18	9	59,41	0,812	3	19	3	3
19	8	57,55	0,849	15	18	15	5
20	7	54,56	0,909	1	8	1	4
21	6	48,84	1,023	2	4	2	6
22	5	47,73	1,045	2	11	2	13
23	4	45,44	1,091	1	15	1	9
24	3	40,23	1,195	3	26	3	5
25	2	37,37	1,253	1	2	1	22
26	1	20,71	1,586	1	3	1	27

* Aktif İzolatların benzerlik Gösterdiği Grup Sıraları Kalın Yazılmıştır (1=KGG13, 2=KGG32, 3=KEH23, 4=KVK11).

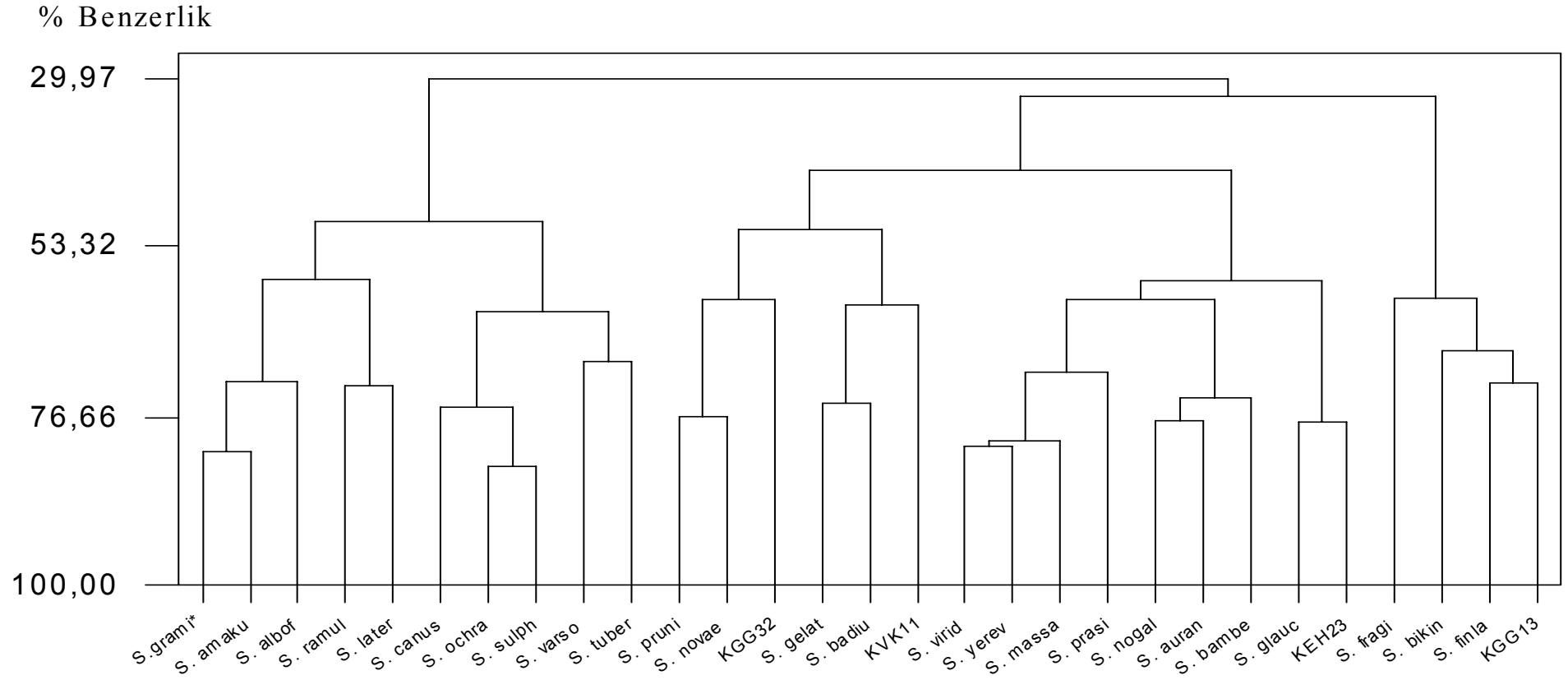
KGG13 nolu izolatin özellikleri, Çizelge 4.17' de verilmiş olup, Çizelge 4.15' deki nümerik taksonomi yöntemiyle tanımlanmış *Streptomyces* Ana Tür gruplarının özellikleri ile karşılaştırıldığında; izolatomız melanin üretmemekte, *S. cerevisiae*' ye karşı aktivite göstermemekte, *A. niger*' e karşı aktivite göstermemektedir. Lesitinaz aktivitesi görülmekte, H₂S üretmemekte, hippurate, elastin hidroliz edilmekte, ksantin ve arbutin edilmemekte, DL- α -n-Butirik asitten yararlanmamakta, D-melibiozdan yararlanmakta, ksilitol kullanılmaktadır. Buna rağmen *Streptomyces exfoliatus* olarak belirlenen 61 strain melanin üretmekte, 39 strain üretmemekte; *S. cerevisiae*' ye karşı 99 strain aktivite göstermemekte 1 strain göstermemekte; *A. niger*' e karşı ise 6 strain aktivite gösterip 94 strain göstermemektedir. 50 strain lesitinaz pozitif, 50 strain negatif; 89 strainde H₂S üretimi görülmesine rağmen 11 strainde görülmemekte; hippurate 44, elastin 89 strain, ksantin 88, arbutin 99 strain ile hidroliz edilmekte; DL- α -n-Butirik asitten 39 strain yararlanmamakta, D- melibiozdan 28 strain, ksilitol ise 1 strain tarafından kullanılmaktadır. KGG13 nolu izolatomız ile *S. exfoliatus* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat %54.56 benzerlik seviyesi (Similarity level; S_{SM}), 0.909 uzaklık

seviyesi (Distance level; D_{DL}) ile 8. gruptaki *Streptomyces exfoliatus* tür grubuna daha yakın bulunmuştur.

KGG32 nolu izolatin özellikleri (Çizelge 4.17.) ile *Streptomyces* Ana Tür gruplarının özellikleri (Çizelge 4.15.) karşılaştırıldığında; izolatomızın spor kütleleri gri olup, *S. cerevisiae* ve *A. niger* e karşı aktivite göstermemektedir. H_2S üretmemekte, arbutin hidroliz edilmemekte, sistein ve D-melezitoz kullanılmamaktadır. Buna rağmen *Streptomyces albidoflavus* olarak belirlenen 1 strainin spor kütleleri gri, 99'unun değildir. *S. cerevisiae*' ye karşı 80 strain aktivite göstermekte, 20 strain göstermemekte; *A. niger* e karşı ise 55 strain aktivite gösterip 45 strain göstermemektedir. 85 strainde H_2S üretimi görülmesine rağmen 15 strainde görülmemekte; arbutin 99 strain ile hidroliz edilmekte; sisteini 60 strain kullanmakta, 40 strain kullanmamakta, D-melezitozdan 55 strain yararlanmakta, 45 strain yararlanamamaktadır. KGG32 nolu izolatomız ile *S. albidoflavus* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat, $S_{SM} = 60.19$ ve $D_{DL} = 0.796$ ile 5. grup sırasında bulunan *S. albidoflavus* tür grubuna daha yakın bulunmuştur.

KEH23 nolu izolatin özellikleri (Çizelge 4.17.) ile *Streptomyces* Ana Tür gruplarının özellikleri karşılaştırıldığında; izolatomız diffuse pigment üretmekte, *S. cerevisiae*' ye karşı aktivite göstermemekte, hippurate hidrolizi ile elastin ve arbutin degradasyonu negatif, 45 °C' de büyüme göstermekte; Adonitol, ksilitol ve D-melibiozdan yararlanamamakta, dekstran kullanılmaktadır. Buna rağmen *Streptomyces lydicus* olarak belirlenen 1 strain diffuse pigment üretilip, 99 strain üretmemekte; *S. cerevisiae*' ye karşı 27 strain aktivite göstermekte, 73 strain göstermemekte; 30 strain tarafından hippurate hidroliz edilirken 70 strain negatif; elastin 36, arbutin 99 strain tarafından degradasyona uğratılmakta; 1 strain 45 °C' de büyüme; adonitol ve D-melibiozdan 82 strain yararlanırken, 18 strain yararlanamamakta; ksilitol ise 55 strain tarafından kullanılmaktadır. KEH23 nolu izolatomız ile *S. lydicus* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat, $S_{SM} = 59.41$ ve $D_{DL} = 0.812$ ile 19. grup sırasında bulunan *S. lydicus* tür grubuna daha yakın bulunmuştur.

KVK11 nolu izolatin özellikleri (Çizelge 4.17.) ile *Streptomyces* Ana Tür gruplarının özellikleri (Çizelge 4.15.) ile karşılaştırıldığında; izolatomız sarı-kahve diffuse pigment üretmekte; peptone yeast ekstrakt agarda melanin oluşturmamakta; lipolizis aktivitesi göstermemekte; elastin ve arbutin degradasyonu negatif; potasyum tellüritli ortamda büyüme göstermemekte; valinden azot kaynağı olarak yararlanamamakta; rafinoz ve adonitolden karbon kaynağı olarak yararlanamamaktadır. Buna rağmen *Streptomyces fulvissimus* olarak belirlenen 99 strain sarı-kahve diffuse pigment üretmekte 1 strain üretmemektedir; 67 straini peptone yeast ekstrakt agarda melanin oluştururken, 33 strain oluşturamamakta; 99 straini lipolizis aktivitesi göstermekte; 67 strainde elastin ve arbutin degradasyonu pozitif, 33 strainde ise negatiftir. 56 straini potasyum tellüritli ortamda büyürken 44 straini büyümemektedir. Valinden 44 strain, rafinozdan ve adonitolden ise 89 strain yararlanırken, 11 strain yararlanamamaktadır. KVK11 nolu izolatomız ile *S. fulvissimus* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat $S_{SM} = 63.64$ ve $D_{DL} = 0.727$ ile 10. grup sırasında bulunan *S. fulvissimus* tür grubuna daha yakın bulunmuştur.



Şekil 4.18. *Streptomyces* Tekil-Üye Grupları ile Aktif İzolatların % Benzerlikleri (* Kısaltmaları verilen tür gruplarının açılımları Çizelge 4.16.' da verilmiştir).

Çizelge 4.19. *Streptomyces* Tekil-Üye Grupları ile Aktif İzolatların % Benzerliklerinin (Dendogramlarının) Oluşturulması İşleminde Minitab Programı, Orijinal İstatistik Sonuçları.

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined	New cluster	Number of obs. in new cluster
1	28	83,65	0,327	8 17	8	2
2	27	81,51	0,370	3 12	3	2
3	26	80,80	0,384	4 18	4	2
4	25	80,13	0,397	4 19	4	3
5	24	77,41	0,452	5* 28	5	2
6	23	77,31	0,454	6 9	6	2
7	22	76,76	0,465	1 25	1	2
8	21	75,42	0,492	2 8	2	3
9	20	74,81	0,504	11 15	11	2
10	19	74,15	0,517	26 10	6	3
11	18	72,41	0,552	16 23	16	2
12	17	72,00	0,560	24 26	24	2
13	16	71,82	0,564	3 20	3	3
14	15	70,55	0,589	4 7	4	4
15	14	69,08	0,618	13 14	13	2
16	13	67,68	0,646	21 24	21	3
17	12	62,29	0,754	2 13	2	5
18	11	61,25	0,775	11 29	11	3
19	10	60,59	0,788	1 27	1	3
20	9	60,59	0,788	4 6	4	7
21	8	60,27	0,795	21 22	21	4
22	7	58,02	0,840	4 5	4	9
23	6	57,73	0,845	3 16	3	5
24	5	50,79	0,984	1 11	1	6
25	4	49,78	1,004	2 3	2	10
26	3	42,62	1,148	1 4	1	15
27	2	32,41	1,352	1 21	1	19
28	1	29,97	1,401	1 2	1	29

* Aktif İzolatların benzerlik Gösterdiği Grup Sıraları Kalın Yazılmıştır (21=KGG13, 1=KGG32, 5=KEH23, 11=KVK11).

KGG13 nolu izolatin özellikleri, Çizelge 4.17' de verilmiş olup, Çizelge 4.16' daki *Streptomyces* Tekil-Üye Tür özellikleri ile karşılaştırıldığında; izolatomuz elastini degradasyona uğratmakta, ramnoz, rafinoz ve D-melibiozu karbon kaynağı olarak kullanmasına rağmen; *Streptomyces finlayi* olarak belirlenen strainin elastin degradasyonu, ramnoz, rafinoz ve D-melibiozu karbon kaynağı olarak kullanması negatiftir. KGG13 nolu izolatomuz ile *S. finlayi* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat %60.27 benzerlik seviyesi (Similarity level; S_{SM}), 0.795 uzaklık seviyesi (Distance level; D_{DL}) ile *Streptomyces finlayi* tekil-üye tür grubuna dahil edilmiştir.

KGG32 nolu izolatin özellikleri (Çizelge 4.17.) ile' daki *Streptomyces* Tekil-Üye Tür özellikleri (Çizelge 4.16.) karşılaştırıldığında; izolatomuzun spor kütleleri rengi gri, elastini degradasyona uğratmakta, %7 NaCl ve potasyum tellüritli (0,001) ortamda büyüebilmekte, histidini azot kaynağı olarak kullanmakta ve D-melibiozu karbon kaynağı olarak kullanamamaktadır. Buna rağmen; *Streptomyces prunicolor* olarak belirlenen strainin elastin

degradasyonu negatif, %7 NaCl ve potasyum tellüritli (0,001) ortamda büyümemekte, D-melibiozu karbon kaynağı olark kullanmaktadır. KGG32 nolu izolatomuz ile *S. prunicolor* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat $S_{SM} = 60.59$ ve $D_{DL}=0.788$ ile *Streptomyces prunicolor* tekil-üye tür grubuna dahil edilmiştir.

KEH23 nolu izolatin özellikleri (Çizelge 4.17.) ile' daki *Streptomyces* Tekil-Üye Tür özellikleri (Çizelge 4.16.) karşılaştırıldığında; %7 NaCl' lı ortamda büyüebilmekte, mezo-inositol ve rafinozu karbon kaynağı olarak kullanamamaktadır. Buna rağmen; *Streptomyces glaucescens* olarak belirlenen strain %7 NaCl' lı ortamda büyümemekte, mezo-inositol ve rafinozu karbon kaynağı olarak kullanamamaktadır. KEH23 nolu izolatomuz ile *S. glaucescens* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat $S_{SM} = 77.41$ ve $D_{DL}=0.452$ ile *Streptomyces glaucescens* tekil-üye tür grubuna dahil edilmiştir.

KVK11 nolu izolatin özellikleri (Çizelge 4.17.) ile' daki *Streptomyces* Tekil-Üye Tür özellikleri (Çizelge 4.16.) karşılaştırıldığında; izolatomuz *B. subtilis*' e karşı aktivite göstermekte, elastin degradasyonu negatif, %7 NaCl, sodyum azid (0,01), fenol (0,1) ve potasyum tellüritli (0,001) ortamda büyümemekte, fenilalanini azot kaynağı olarak kullanmakta, ramnoz, mezo-inositol ve D-melibiozu karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Buna rağmen; *Streptomyces badius* olarak belirlenen strainin *B. subtilis*' e karşı aktivitesi olmamakla birlikte, elastin degradasyonu pozitif, %7 NaCl, sodyum azid (0,01), fenol (0,1) ve potasyum tellüritli (0,001) ortamda büyüebilmekte, fenilalanini azot kaynağı olarak kullanamamakta ayrıca, ramnoz, mezo-inositol ve D-melibiozu karbon kaynağı olarak kullanamamaktadır. KVK11 nolu izolatomuz ile *S. badius* arasındaki büyük farkların bunlar olması nedeniyle, bu izolat $S_{SM} = 61.25$ ve $D_{DL}=0.775$ ile *Streptomyces badius* tekil-üye tür grubuna dahil edilmiştir.

Streptomyces major ile tekil-üye gruplarını oluşturan strainler ile seçtiğimiz aktif izolatların minimum karakterlerinin karşılaştırılması sonucu yüzde benzerlik oranlarının yaklaşık olarak %54-77 arasında olması nedeniyle ve hala *Streptomyces* cinsine ait türlerin taksonomik pozisyonlarının tartışmalı olduğu düşünülürse ve de her ne kadar tanımlanmalarında kültürel, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri büyük oranda geçerli olmasına ve kullanılmasına rağmen, aktif izolatlar herhangi bir tür grubuna dahil edilmemişlerdir. Çünkü söz konusu karakterlere dayanarak bu tür gruplarına dahil edilebilmeleri için en az benzerlik oranlarının %80 ve üzerinde bulunması gerekmektedir. Diğer taraftan, yüzde benzerlikleri yüksek olsa bile, 16S rRNA analizleri, serolojik ve faj duyarlılık testleriyle beraber hızlı enzim testlerinin de tamamlanması yerinde olacaktır. Bu yüzden çalışmada taksonomik durumlarını belirlemeye çalıştığımız aktif izolatlarımız; *Streptomyces* sp. KGG13, *Streptomyces* sp. KGG32, *Streptomyces* sp. KEH23 ve *Streptomyces* sp. KVK11 şeklinde kendi verdiğimiz orijinal numaralandırma ile saklı tutulacak ve muhafaza edilecektir.

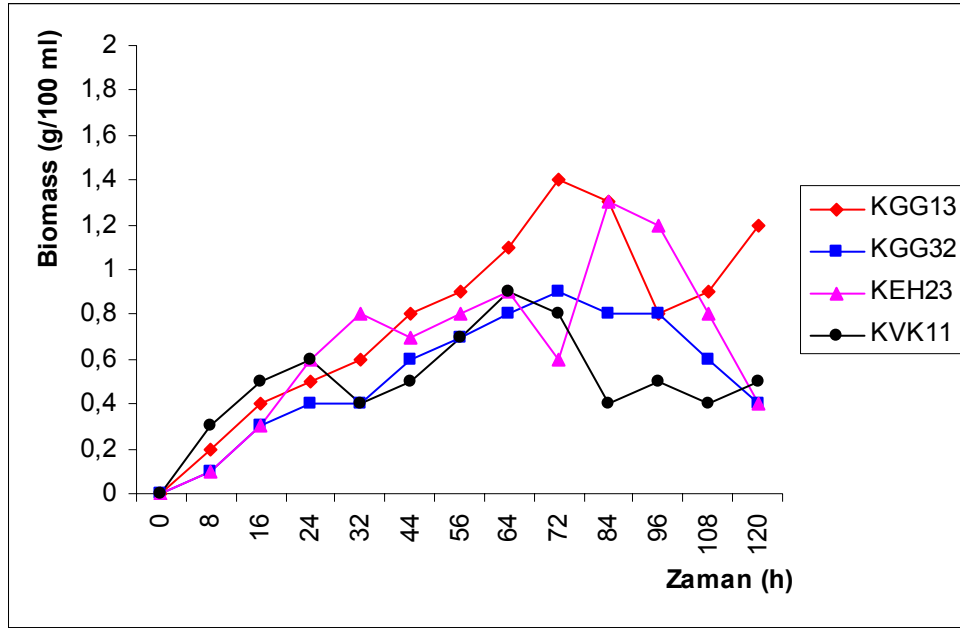
4.4. Fermentasyonla Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi

Aktif izolatların fermentasyon çalışmaları 3.2.4.' de anlatılan prosedürle, besiyeri 39, 40, 41 ve 42' de gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonla antimikrobiyal etkili molekülün üretim çalışmalarıyla ilgili sonuçlar; kuru ağırlık (biyomass) ve pH değişimleri; Çizelge 4.20., 4.21., 4.22. ve 4.23.' de, her bir fermentasyon ortamındaki büyüme eğrileri Şekil 4.19., 4.20., 4.21. ve 4.22.' de, zamana bağlı olarak antibiyotik üretim oranları Çizelge 4.24' de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Fermentasyon Ortamı 1 (Besiyeri 39)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri.

		Zaman (saat)												
İzolatlar		0	8	16	24	32	44	56	64	72	84	96	108	120
KGG13	KA		0.2	0.4	0.5	0.6	0.8	0.9	1.1	1.4	1.3	0.8	0.9	1.2
	pH	7.3	7.65	7.95	8.45	8.80	9.04	8.83	8.92	8.94	8.83	9.20	8.70	9.40
KGG32	KA	0	0.1	0.3	0.4	0.4	0.6	0.7	0.8	0.9	0.8	0.8	0.6	0.4
	pH	7.3	7.07	7.4	7.45	7.65	7.80	8.06	8.82	8.45	8.40	8.92	8.64	8.70
KEH23	KA	0	0.1	0.3	0.6	0.8	0.7	0.8	0.9	0.6	1.3	1.2	0.8	0.4
	pH	7.3	7.02	6.94	7.04	7.47	7.65	8.70	8.36	8.92	8.70	8.45	8.90	9.08
KVK11	KA	0	0.3	0.5	0.6	0.4	0.5	0.7	0.9	0.8	0.4	0.5	0.4	0.5
	pH	7.3	7.65	7.94	8.20	8.50	8.20	7.95	8.65	8.93	8.85	8.92	9.05	9.39

İzolat KGG13 ile yaptığımız fermentasyon denemelerinde besiyeri 39 (FO1)' da antibiyotik üretimi 24. saatte başlamıştır. En yüksek antibiyotik üretimi yine aynı besiyerinde 64. saatte 18 mm ile en yüksektir. Ayrıca fermentasyon sıvısında antimikrobiyal etkili molekülün üretiminin belirlenmesi için kullanılan indikatör test organizmalarından sadece Gr (+) bakteri *S. aureus*' a karşı inhibisyon gözlenmiştir. Bu izolatın besiyeri 42 (FO4) ile fermentasyonun da antibiyotik üretimi saptanamamıştır. En yüksek biyomass ağırlığını besiyeri 39' da 1.4 g/100 ml ile 72. saatte oluşturmuştur. Fermentasyon ortamlarında pH değişim aralığı ortalama olarak 7.0-9.30' dur.

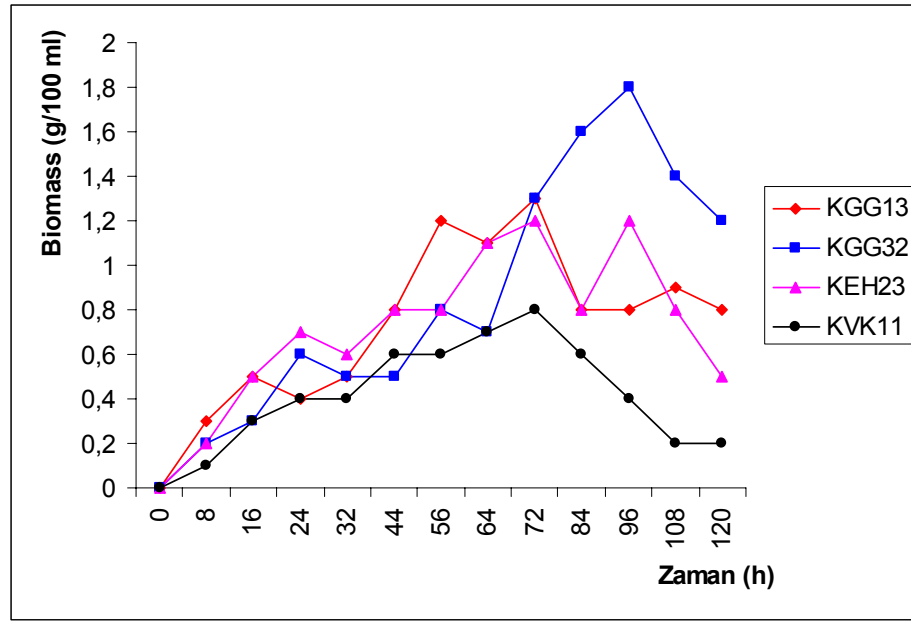


Şekil 4.19. Aktif İzolatların Besiyeri 39' de Büyüme Eğrileri.

Çizelge 4.21. Fermentasyon Ortamı 2 (Besiyeri 40)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri.

		Zaman (saat)												
İzolatlar		0	8	16	24	32	44	56	64	72	84	96	108	120
KGG13	KA		0.3	0.5	0.4	0.5	0.8	1.2	1.1	1.3	0.8	0.8	0.9	0.8
	pH	7.5	7.65	8.50	8.60	8.80	9.10	8.78	8.94	8.88	8.66	9.25	8.85	8.92
KGG32	KA	0	0.2	0.3	0.6	0.5	0.5	0.8	0.7	1.3	1.6	1.8	1.4	1.2
	pH	7.5	7.35	7.47	7.43	7.33	7.60	7.70	8.05	8.30	8.18	8.35	8.62	8.59
KEH23	KA	0	0.2	0.5	0.7	0.6	0.8	0.8	1.1	1.2	0.8	1.2	0.8	0.5
	pH	7.5	7.65	7.78	7.84	8.04	8.25	8.40	8.38	8.88	9.26	8.58	9.08	9.34
KVK11	KA	0	0.1	0.3	0.4	0.4	0.6	0.6	0.7	0.8	0.6	0.4	0.2	0.2
	pH	7.5	7.45	7.89	8.08	8.60	8.96	9.37	9.78	9.60	9.48	9.36	9.05	9.45

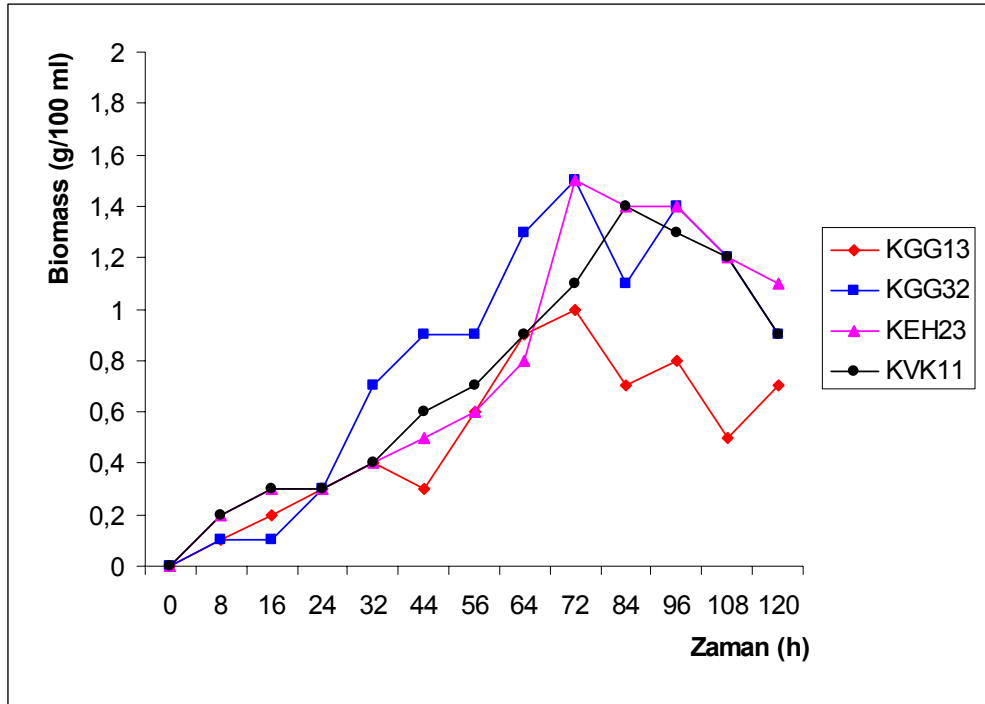
İzolat KGG32 en yüksek biyomass ağırlığına 1.8 g/100 ml ile fermentasyon ortamı olarak seçilen besiyeri 40' da 96. saatte ulaşmıştır. Her 4 fermentasyon ortamında da test organizmalarına karşı inhibisyon görülmüş, 120. saatte 32 mm ile *S. aureus*, 26 mm ile ise *E. coli*' ye karşı en yüksek inhibisyon besiyeri 42' de saptanmıştır. Antibiyotik üretimi 16. saatte besiyeri 40' da en yüksektir. Ortalama olarak en düşük antibiyotik verimi besiyeri 39' da görülmüştür. Diğer taraftan antibiyotik üretiminin en düşük gözlemlendiği besiyeri 39' da biyomass ağırlığı 0.9 g/100 ml ile en düşüktür. pH değişim aralığının (7.0-8.10) en düşük gözlemlendiği fermentasyon ortamı besiyeri 42 olup, en yüksek 7.3-8.92 besiyeri 39' da ölçülmüştür.



Şekil 4.20. Aktif İzolatların Besiyeri 40' da Büyüme Eğrileri.

Çizelge 4.22. Fermentasyon Ortamı 3 (Besiyeri 41)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri.

Zaman (saat)														
İzolatlar		0	8	16	24	32	44	56	64	72	84	96	108	120
KGG13	KA		0.1	0.2	0.3	0.4	0.3	0.6	0.9	1.0	0.7	0.8	0.5	0.7
	pH	6.95	7.25	7.43	7.55	8.46	8.33	8.65	8.73	8.96	9.34	8.93	8.54	8.03
KGG32	KA	0	0.1	0.1	0.3	0.7	0.9	0.9	1.3	1.5	1.1	1.4	1.2	0.9
	pH	6.95	7.08	7.26	7.68	7.54	7.87	8.46	8.30	8.25	8.36	7.65	8.64	8.39
KEH23	KA	0	0.2	0.3	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.5	1.4	1.4	1.2	1.1
	pH	6.95	7.12	7.48	7.76	8.20	8.64	8.70	8.35	8.80	8.82	8.73	8.37	8.33
KVK11	KA	0	0.2	0.3	0.3	0.4	0.6	0.7	0.9	1.1	1.4	1.3	1.2	0.9
	pH	6.95	7.02	6.55	5.30	5.98	6.18	6.33	6.22	6.48	5.95	6.82	7.89	8.30



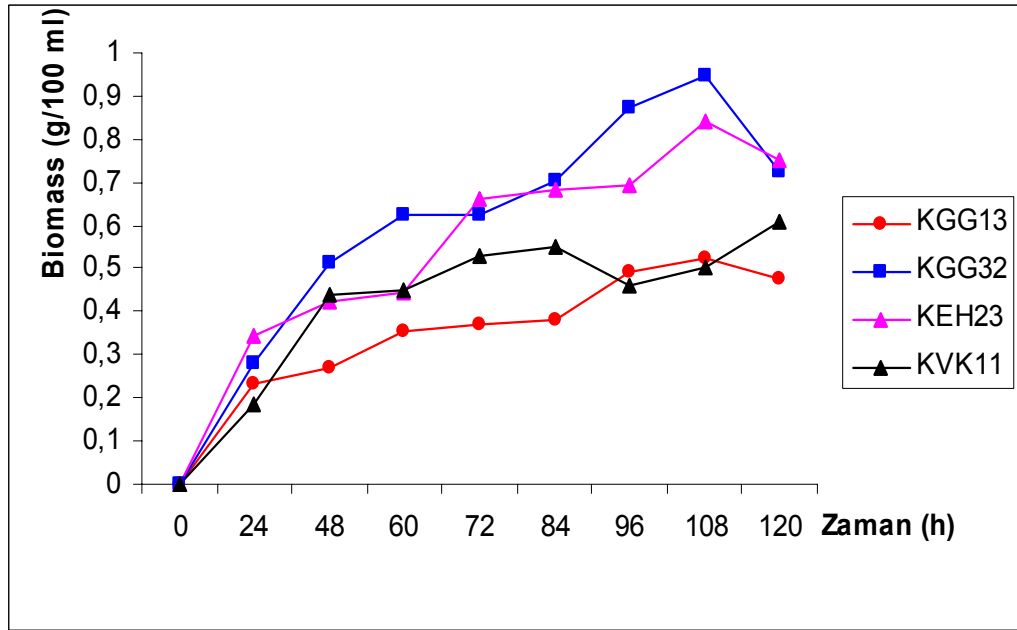
Şekil 4.21. Aktif İzolatların Besiyeri 41' de Büyüme Eğrileri.

İzolat KEH23 ile yaptığımız fermentasyon denemelerinde besiyeri 41 (FO3)' de antibiyotik üretimi 16. saatte başlamıştır. Fermentasyon ortamı besiyeri 39,40. ve 41.' de antibiyotik üretimi hemen hemen aynı olup; ortalama olarak 6-16 mm arasında değişen değerlerle, *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus* ve *C. albicans* test organizmalarına karşı gözlenmiştir. Bu izolatın besiyeri 42 (FO4) ile fermentasyonunda antibiyotik üretimi en düşüktür ve 72. saatte başlamıştır. En yüksek biyomass ağırlığını besiyeri 41' de 1.5 g/100 ml ile 72. saatte oluşturmuştur. Fermentasyon ortamlarında pH değişim aralığı ortalama olarak 7.3-9.34' dür.

Çizelge 4.23. Fermentasyon Ortamı 4 (Besiyeri 42)' de Kuru Ağırlık ve pH Değişimleri.

		Zaman (saat)								
İzolatlar		0	24	48	60	72	84	96	108	120
KGG13	KA ^a		0.232	0.272	0.352	0.372	0.380	0.492	0.522	0.477
	pH	7.0	6.38	6.75	7.10	6.71	6.80	6.79	6.67	6.70
KGG32	KA	0	0.280	0.515	0.625	0.625	0.705	0.875	0.945	0.725
	pH	7.0	6.53	7.20	7.67	7.31	7.60	8.05	8.10	7.90
KEH23	KA	0	0.342	0.422	0.442	0.662	0.682	0.692	0.842	0.752
	pH	7.0	6.26	6.77	7.39	6.93	7.05	7.55	7.65	7.90
KVK11	KA	0	0.185	0.441	0.451	0.531	0.552	0.461	0.501	0.611
	pH	7.0	6.65	7.55	7.78	7.44	7.70	7.97	8.18	8.06

^a KA; kuru ağırlık.



Şekil 4.22. Aktif İzolatların Besiyeri 42' de Büyüme Eğrileri.

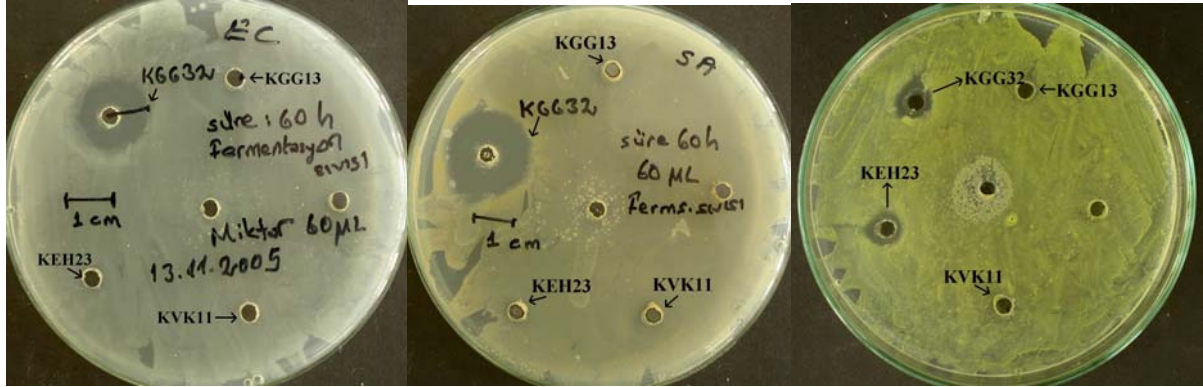
İzolat KVK11 en yüksek biyomass ağırlığına 1.4 g/100 ml ile fermentasyon ortamı olarak seçilen besiyeri 41' de 84. saatte ulaşmıştır. Antibiyotik üretimi 44. saatte besiyeri 41' de başlamış, 16 mm ile 84. ve 96. saatlerde *S. aureus*' a karşı gözlenmiştir. *C. albicans*' a karşı en yüksek inhibisyon değeri 108. saatte 14 mm' dir. Bu izolatın besiyeri 42 (FO4) ile fermentasyonunda antibiyotik üretimi saptanamamıştır. Ortalama olarak en düşük antibiyotik verimi besiyeri 39' da görülmüştür. pH değişim aralığının (7.0-8.06) en düşük gözleendiği fermentasyon ortamı besiyeri 42 olup, en yüksek 7.5-9.78 ile besiyeri 40' da ölçülmüştür.

Çizelge 4.24. İzolatların Fermentasyon Esnasında Zamana Bağlı İnhibisyon Zonları (mm).

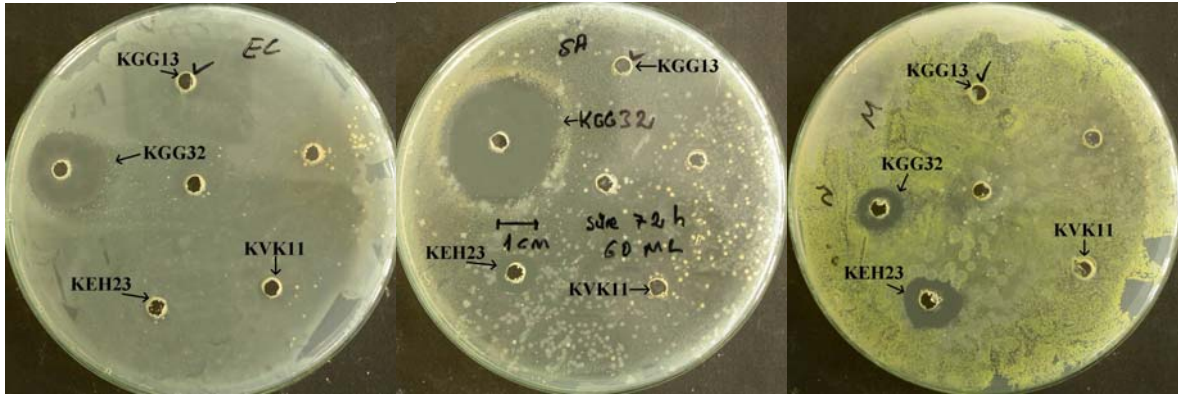
İzolatlar		KGG13				KGG32				KEH23				KVK11			
Fermentasyon Ortamları		FO1	FO2	FO3	FO4	FO1	FO2	FO3	FO4	FO1	FO2	FO3	FO4	FO1	FO2	FO3	FO4
Zaman (sa)	İTO*																
0	SA	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
	EC	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND
	CA	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
8	SA	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
	EC	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND
	CA	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
16	SA	-	-	-		-	8	-		-	-	6		-	-	-	
	EC	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND
	CA	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
24	SA	4	-	-		-	14	12		-	-	10		-	-	-	
	EC	-	-	-	ND	-	-	6	ND	-	-	-	ND	-	-	-	ND
	CA	-	-	-		-	-	-		-	-	10		-	-	-	
32	SA	10	4	6		10	14	14		10	8	16		-	-	-	
	EC	-	-	-	ND	-	12	10	ND	8	6	8	ND	-	-	-	ND
	CA	-	-	-		-	-	-		12	10	12		-	-	-	
44	SA	16	8	8		6	12	15		14	14	16		-	-	4	
	EC	-	-	-	ND	10	10	12	ND	10	10	10	ND	-	-	8 ^k	ND
	CA	-	-	-		-	10 ^k	-		12	10	12		-	-	-	
56	SA	16	10	10		14	18	16		12	10	14		-	-	4	
	EC	-	-	-	ND	10	12	15	ND	10	-	10 ^k	ND	-	-	10 ^k	ND
	CA	-	-	-		-	12 ^k	-		10	10	12		-	-	-	
64	SA	18	-	10		10	12	14		16	12	14		-	-	6	
	EC	6 ^k	-	-	ND	12	14	16	ND	6	-	-	ND	-	-	10	ND
	CA	-	-	-		-	-	-		10	10	10		-	-	-	
72	SA	14	16	12	-	10	16	16	18 ^m	16	12	16	8	4	6	8	-
	EC	-	-	-	-	12	14	15	16	12 ^k	10	10 ^k	-	6	12	14	-
	CA	-	-	-	-	-	-	-	8 [*]	8	4	12	-	-	-	-	-
84	SA	14	14	6	-	-	10	14	25	10	10	16	10	8	10	12	-
	EC	-	-	-	-	8	12	12	18	-	-	-	-	10 ^k	12	16	-
	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8	12	-	-	-	-	-
96	SA	12	10	-	-	10	18	18	22	10	8	14	7	8	10	12	-
	EC	-	-	-	-	12	14	15	20	-	-	12 ^k	8	8 ^k	10	16	-
	CA	-	-	-	-	-	10 ^k	-	-	12	10	13	-	-	-	-	-
108	SA	10	10	-	-	14	18	16	22	14	10	14	13	6	10	12	-
	EC	-	-	-	-	6	10	12	22	10 ^k	6	10 ^k	15	-	4	12	-
	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	12	-	-	12 ^k	14	-
120	SA	12	10	-	-	10	10	12	32	10	8	12	14	-	-	10 ^k	-
	EC	-	-	-	-	-	10	10	26	8	4	10 ^k	16	2	6	12	-
	CA	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8	10	-	-	-	12	-

* Semboller; İTO: İndikatör Test Organizmaları; SA: *S. aureus*, EC: *E. coli*, CA: *C. albicans*. ^k: kısmi inhibisyon. FO1: Fermentasyon Ortamı 1, FO2: Fermentasyon Ortamı 2, FO3: Fermentasyon Ortamı, FO4: Fermentasyon Ortamı 4. sa: Saat, -; İnhibisyon Yok, ND: denenmedi, ^m: inhibisyon zonları milimetre olarak verilmiştir.

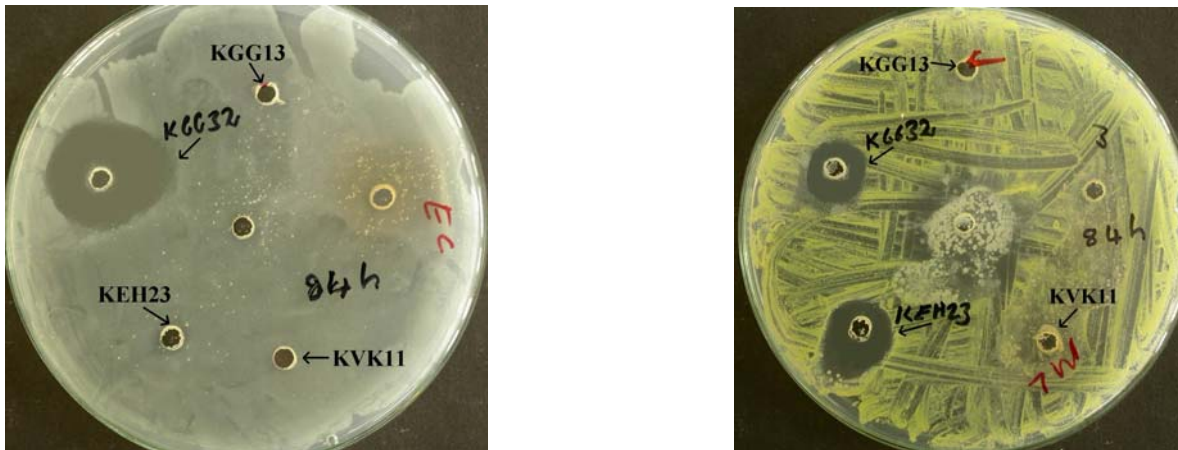
Aktif izolatların fermentasyon sırasında zamana bağlı olarak test organizmalarına karşı etkileri; Şekil 4.23., 24., 25., 26., 27. ve 28.' de gösterilmektedir.



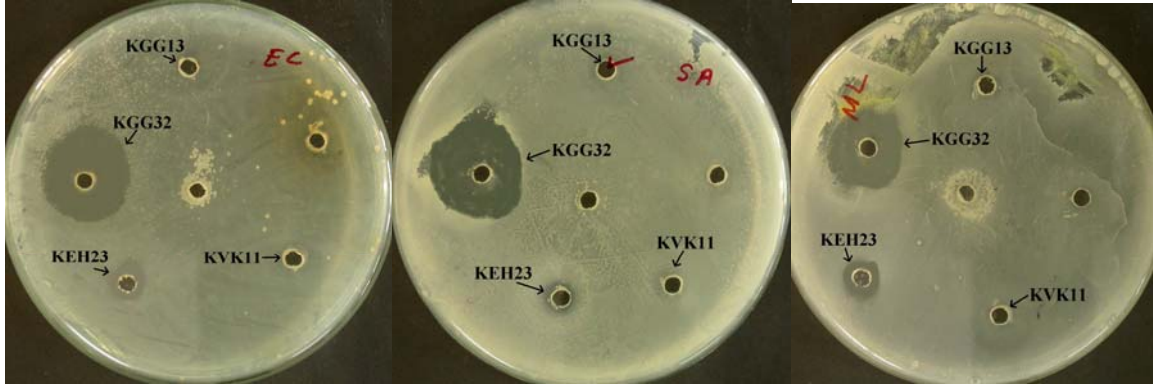
Şekil 4.23. Aktif İzolatların 60 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına (Soldan Sağa Sırasıyla; *E. coli*, *S. aureus* ve *M. luteus*) Karşı Etkisi (Aktarılan Miktar 60 µl, Ortam: FO4, İzolat no'ları ok işareti ile gösterilmiştir).



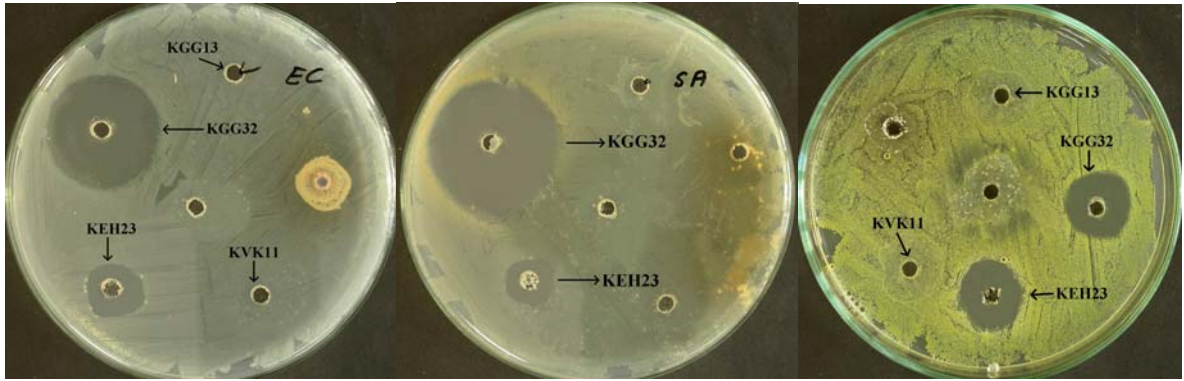
Şekil 4.24. Aktif İzolatların 72 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına (Soldan Sağa Sırasıyla; *E. coli*, *S. aureus* ve *M. luteus*) Karşı Etkisi (Aktarılan Miktar 60 µl, Ortam: FO4, İzolat no'ları ok işareti ile gösterilmiştir).



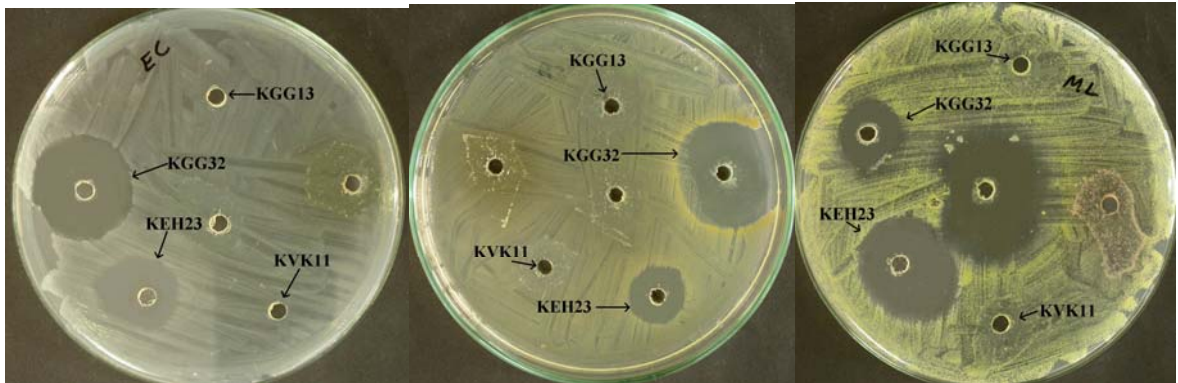
Şekil 4.25. Aktif İzolatların 84 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına (Soldan Sağa Sırasıyla; *E. coli* ve *M. luteus*) Karşı Etkisi (Aktarılan Miktar 60 µl, Ortam: FO4, İzolat no'ları ok işareti ile gösterilmiştir).



Şekil 4.26. Aktif İzolatların 96 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına (Soldan Sağa Sırasıyla; *E. coli*, *S. aureus* ve *M. luteus*) Karşı Etkisi (Aktarılan Miktar 60 µl, Ortam: FO4, İzolat no'ları ok işareti ile gösterilmiştir).



Şekil 4.27. Aktif İzolatların 108 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına (Soldan Sağa Sırasıyla; *E. coli*, *S. aureus* ve *M. luteus*) Karşı Etkisi (Aktarılan Miktar 60 µl, Ortam: FO4, İzolat no'ları ok işareti ile gösterilmiştir).

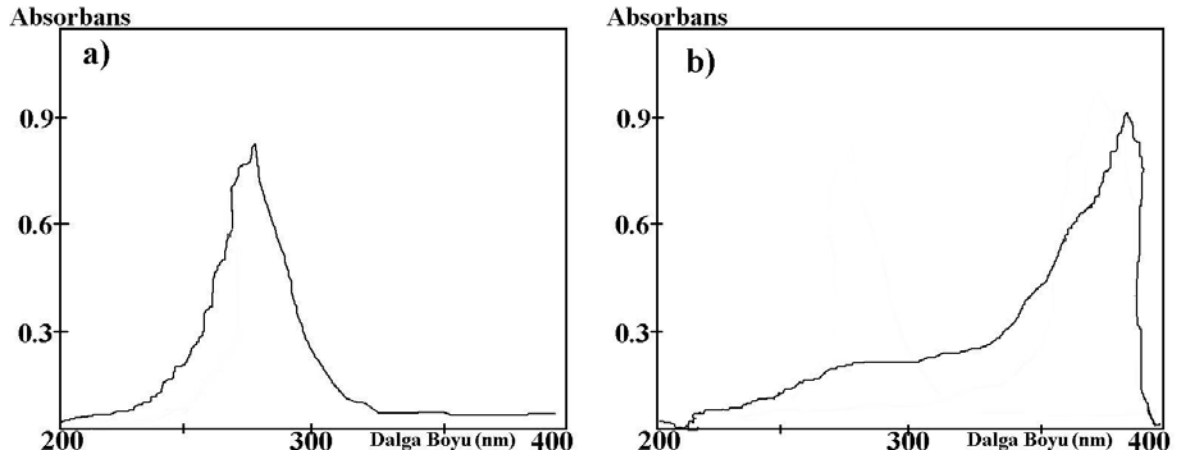


Şekil 4.28. Aktif İzolatların 120 Saatlik Fermentasyon Sıvısının İndikatör Test Organizmalarına (Soldan Sağa Sırasıyla; *E. coli*, *S. aureus* ve *M. luteus*) Karşı Etkisi (Aktarılan Miktar 60 µl, Ortam: FO4, İzolat no'ları ok işareti ile gösterilmiştir).

4.5. *Streptomyces* sp. KGG32 nolu İzolattan Aktif Maddenin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Kısmi Karakterizasyonu

Her maddenin kendine özgü gösterdiği bir UV dalga boyu aralığı vardır. Bu aralıkta ölçülen maksimum absorbands değeri, maddenin çözündüğü solvante göre değişir. Antibiyotikler genellikle 200-400 nm dalga boyları arasında maksimum absorbands gösterirler. UV spektroskopisi ile herhangi bir maddenin kalitatif ve kantitatif analizi yapılabildiği gibi, bilinmeyen bir maddenin yapı tayininde IR, NMR (Nükleer Magnetik Rezonans) gibi daha ileri işlemlerle beraber de kullanılır. Çalışmada IR analiz sonuçlarıyla beraber değerlendirilmiştir.

KGG32-A aktif maddesinin UV spektroskopisinde maksimum absorbands gösterdiği pik dalga boyu 275 ve 286,5 nm, KGG32-B' nin ise 396 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.29.).

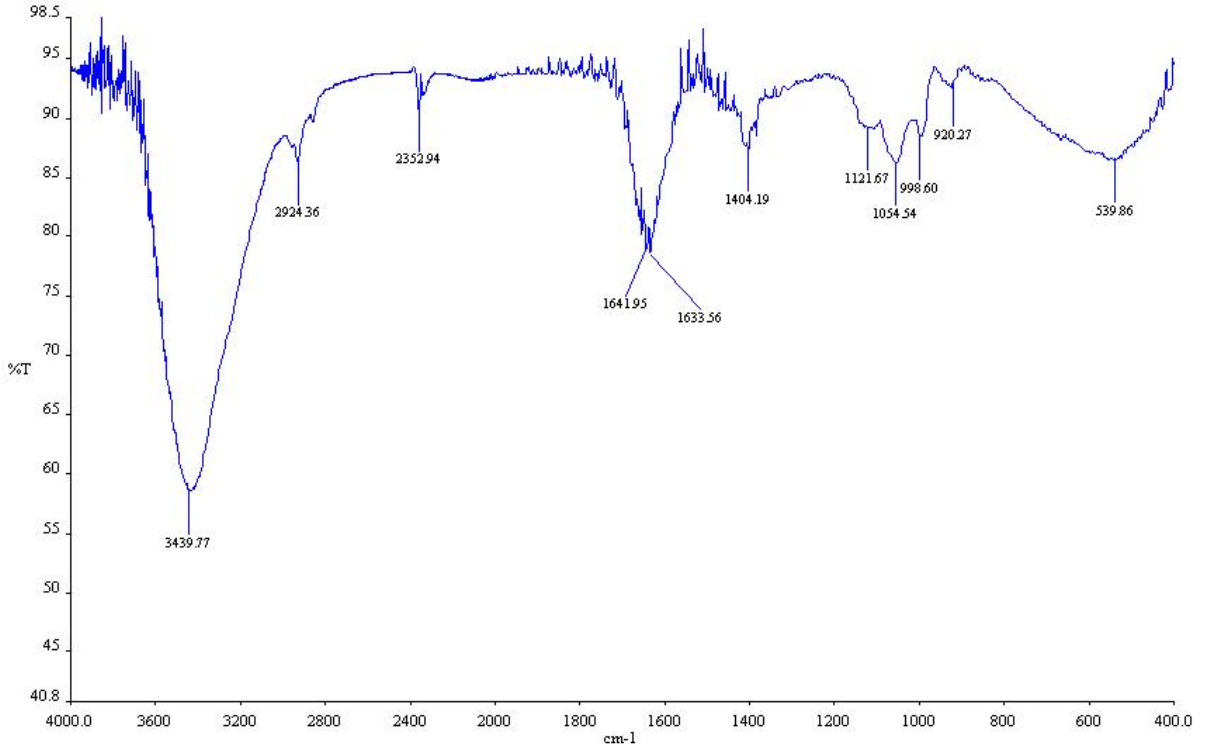


Şekil 4.29. İzole Edilen İki Aktif maddenin UV Spektrumları (a= KGG32-A, b=KGG32-B).

İnfrared (kızıl ötesi) spektroskopisi, maddenin infrared ışınlarını absorplaması üzerine kurulmuş olan bir spektroskopidir. IR' de ışınlar dalga boylarıyla değil, daha çok dalga sayılarıyla verilir. Dalga boyları aralığı; $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ dir. IR spektrumu kabaca 4 spektral bölgeye ayrılır. 1.' si; $3700-2700 \text{ cm}^{-1}$ (X-H), 2. $2700-1850 \text{ cm}^{-1}$ (Üçlü bağlar), 3. $1950-1550 \text{ cm}^{-1}$ (Çift bağlar) ve 4.' sü; $1550-600 \text{ cm}^{-1}$ (X-H hariç, tek bağlar)' dır.

KGG32-A aktif maddesinin IR spektrumu (Şekil 4.30.)' na bakıldığında; 3439.77 cm^{-1} de görülen büyük pik O-H ya da N-H grubunun gösterebileceği titreşim olup; N-H grubu daha küçük titreşim gösterdiğinden, O-H grubuna aittir. 2924.36 cm^{-1} de genelde C-H, 2352.94 cm^{-1} de ise genellikle P-H grubuna ait pik olup, son açıklanan P-H grubu bölgesi üçlü bağ bölgesidir. 1641.95 cm^{-1} de C=N ve 1633.56 cm^{-1} de C=C gruplarının oluşturabileceği titreşim olup, yakın olmalarından dolayı incelenen maddenin aromatik halka içerdiğini gösterir. 1404.19 cm^{-1} piki fenol benzeri bileşiklerin IR spektrum analizlerinde ortaya çıkan C-O grubunun gösterdiği bir titreşimdir. 1121.67 cm^{-1} de alifatik C-N grubu, 1054.54 cm^{-1} de C-O ve son olarak 539.86 cm^{-1}

de ise C-Br grubu titreşimleri görülmektedir. Ancak son açıklanan gruptaki karbona bağlı "Br" aktif maddenin hazırlandığı KBr' den ileri geldiğini düşünmek doğru olacaktır. 998.60 ve 920.27 cm^{-1} bölgelerinde titreşim yapan gruplar belirlenememiştir. KGG32-A aktif maddesinin yapısında bulunan ve açıklanabilen gruplara dayanarak kabaca formülünü $\text{C}_{7n}\text{H}_{3n}\text{N}_{2n}\text{O}_{3n}\text{P-R}$ (R değişken olup; bilinmeyen grup/grupları göstermektedir) olarak gösterebiliriz.



Şekil 4.30. KGG32-A' nın IR spektrumu (KBr).

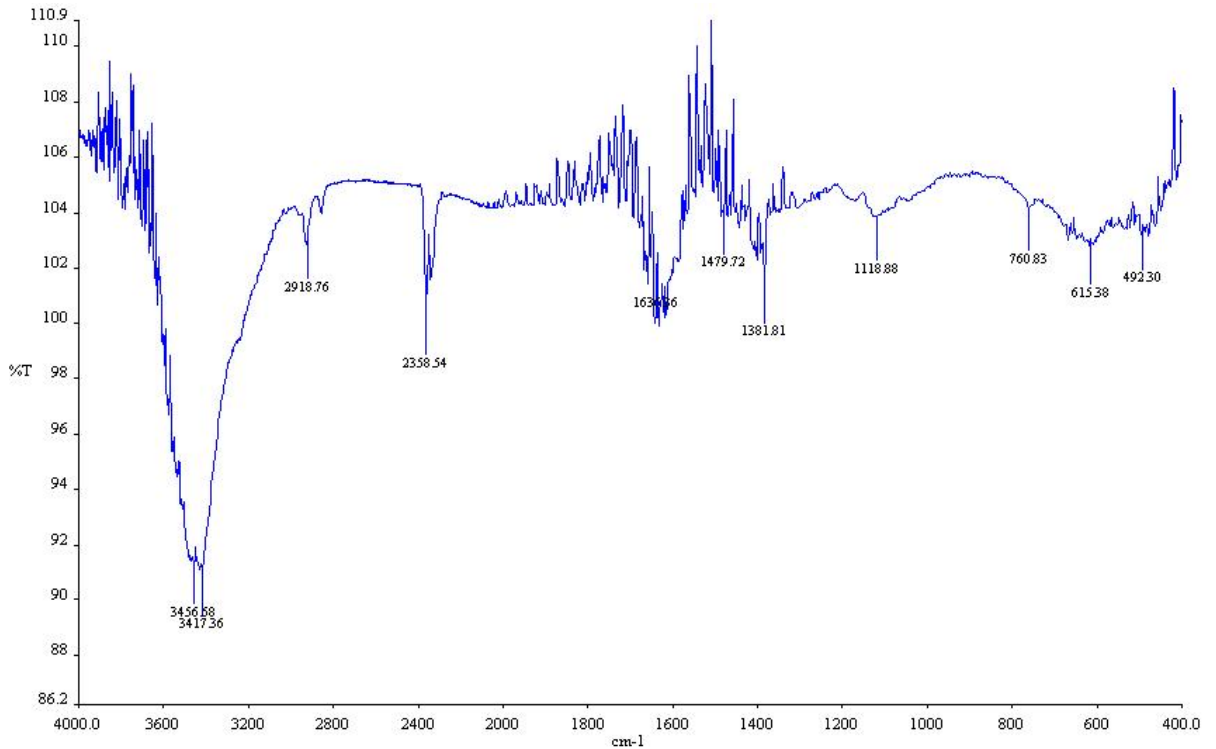
KGG32-B aktif maddesinin IR spektrumu (Şekil 4.31.)' na bakıldığında; 11 tane pik veren grup görülmektedir. 3456.58 cm^{-1} ' de görülen pik O-H, 3417.36 cm^{-1} ' deki N-H, 2918.76 cm^{-1} ' deki C-H, 2358.54 cm^{-1} ' deki P-H, 1636.36 cm^{-1} ' deki $-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{O}$, 1479.72 cm^{-1} ' deki $-\text{C}-\text{H}_2-$, 1381.81 cm^{-1} ' deki $-\text{CH}_3$ (Alkan, simetrik dimetil), 1118.88 cm^{-1} ' deki C-N, 760.83 cm^{-1} ' deki C-Cl, yine 615.38 cm^{-1} ' deki C-Cl gruplarının göstermiş olduğu titreşimlere bağlı piklerdir. KGG32-B aktif maddesinin yapısında bulunan ve açıklanabilen gruplara dayanarak kabaca formülünün $\text{C}_{7n}\text{H}_{11n}\text{N}_{3n}\text{O}_{2n}\text{P-R}$ (R değişken olup; bilinmeyen grup/grupları göstermektedir) olarak gösterebiliriz.

KGG32-A, sarı renkli olup; metanol ve suda iyi çözünmekte, diğer organik solventlerde (Bütanol, Metilen Klorid, Petrol Eteri v.b.) zayıf çözünmektedir. Pozitif renk reaksiyonları ninhidrin (sarı-kahve spot), sülfirik asit (kahve spot) ve anisaldehit ile negatif olanlar demir klorürle gerçekleşmektedir. Maksimum UV spektrumu, 275-286 nm olup, aromatik ve konjuge

çift bağ olduğunu göstermektedir. Ninhidrin ile gösterdiği reaksiyondan serbest amino grubuna sahip olduğunu söyleyebiliriz. Çok sayıda Gr (+) ve Gr (-) bakterilere ve *C. albicans*' a karşı aktivite göstermektedir. Polar olmasına rağmen çoğu organik solventte çözünmemekte ancak, nötral ya da amfoterik karakterde olabileceği düşünülmektedir. IR spektrumuna dayanarak alifatik zincirlerin, çift bağların ve asidik grupların (-C-O-) bulunabileceğini, anisaldehit ile verdiği reaksiyona bakarak glikosidik grupları içerdiğini söylemek mümkündür. Elde edilen verilere göre glikopeptit yapıda olabileceğini düşünmekteyiz.

KGG32-B, beyaz renkli olup; etanol ve suda iyi çözünmekte, diğer organik solventlerde (Metanol, Bütanol, Metilen Klorid, Petrol Eteri v.b.) zayıf çözünmektedir. Pozitif renk reaksiyonları ninhidrin (sarı-kahve spot), olup; sülfirik asit ve demir klorürle negatif reaksiyon vermektedir. Maksimum UV spektrumu, 386 nm' dir. Ninhidrin ile gösterdiği reaksiyondan serbest amino grubuna, sülfirik asitle negatif reaksiyon verdiğiinden doymamış yan gruplara sahip olabilir. Çok sayıda Gr (+) ve Gr (-) bakterilere ve *C. albicans*' a karşı aktivite göstermektedir. Polar olmasına rağmen çoğu organik solventte çözünmemekte ancak, nötral ya da amfoterik karakterde olabileceği düşünülmektedir. IR spektrumuna dayanarak alifatik zincirlerin, çift bağların ve asidik grupların (-C-O-) bulunabileceğini söylemek mümkündür. Elde edilen verilere göre peptit yapıda olabileceğini düşünmekteyiz.

Streptomyces sp. KGG32 nolu izolattan elde edilen aktif madde KGG32-A ve KGG32-B' nin bazı fizikokimyasal özellikleri Çizelge 4.25. ' de özetlenmiştir.



Şekil 4.31. KGG32-B' nin IR spektrumu (KBr).

Çizelge 4.25. İzole Edilen Aktif Maddelerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri.

	KGG32-A	KGG32-B
Renk	Sarı	Beyaz
Çözünürlük	Organik solventlerin çoğunda (Bütanol, Etil Alkol, Petrol Eteri, Metilen Klorid, Benzen) Zayıf, Suda iyi	Su, Etil Alkol
Fonksiyonel Grup		
1) Ninhidrin	Pozitif (Serbest Amino Grubu Var)	Pozitif (Serbest Amino Grubu Var)
2) Sülfirik Asit	Pozitif (Doymamış Grup Yok)	Negatif (Doymamış Grup Var)
3) Demir Klorür	Negatif (Fenolik –OH Yok)	Negatif (Fenolik –OH Yok)
4) Anisaldehit	Negatif	ND
UV λ Maks. (nm)	275, 286.5 (Metanol)	396 (Saf Etil Alkol)
IR ν Maks. (cm⁻¹)	3439-2924-2352-1641-1633-1404-1121-1054	3456-3417-2918-2358-1636-1479-1381-1118-760-615
Rf	(a)* 0.22 (b) 0.40	(c) 0.64 (d) 0.78
Antimikrobiyal	Sa ^m , Bs, Bc, Ml, Ec, Kp, Ef, Ca, MRSA, Styp.	Sa, Bs, Ec, Ef, Ca, Ml.
Spektrum		

***Solvent Sistemi:** a) Metanol:Distile Su (3:1 v/v), b) Metanol:Kloroform:Distile Su (10:2:1 v/v), c) Saf Etanol:Distile Su (3:1 v/v), d) Etanol:Amonyak:Distile Su (8:1:1 v/v). ND; Belirlenmedi.

^m Mikroorganizmalar: Sa; *Staphylococcus aureus*, Bs; *Bacillus subtilis*, Bc; *Bacillus cereus*, Ml; *Micrococcus luteus*, Ec; *Escherichia coli*, Kp; *Klebsiella pneumoniae*, Ef; *Enterococcus faecalis*, MRSA; Metisilin Dirençli *S. aureus*, Styp; *Salmonella typhimurium*, Ca; *Candida albicans*.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda elde edilen kültüre edilebilir toplam 251 streptomiset izolatından 67 tanesi kullanılan test organizmalarının en az birine karşı etkili olmuştur. Bunlardan %52.23' ü sadece Gr (+) bakteriler, %5.97' si sadece Gr (-) bakteriler, %25.37' si hem Gr (+) hem de Gr (-) bakteriler, %16.41' inin ise sadece mayalar üzerine etkili oldukları belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. KGG13 nolu izolat en yüksek antibakteriyal etkiyi 26 mm ile *M. luteus* (Gram pozitif) a, sonra sırasıyla 16 mm ile *K. pneumoniae* (Gr -), 14 mm ile *S. aureus* (Gr +) ve 8 mm ile *B. cereus* (Gr +)' a karşı; *Streptomyces* sp. KGG32 nolu izolat 34 mm ile *S. aureus*, 30 mm ile *M. luteus*, 26 mm ile *E. coli* (Gr -)' ye, 24 mm ile *B. cereus*, ve son olarak 14 mm ile *K. pneumoniae*' ya karşı etkili olmuştur. *Streptomyces* sp. KVK11 nolu izolat ise *K. pneumoniae* haricinde bütün gram pozitif ve gram negatif bakterilerin büyümesini 10-30 mm arasında değişen değerlerde etkilemiştir. *Streptomyces* sp. KEH23 nolu izolat ise bütün bakterilere karşı 6-26 mm arasında değişen değerlerde inhibisyon göstermiştir. Mayalara karşı aktiviteleri karşılaştırıldığında ise *Streptomyces* sp. KEH23 nolu izolat 26 mm ile *Yarrowia lipolytica*' ya karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Aynı izolatın *Candida albicans*' a karşı etkisi 22 mm ile en yüksektir. Seçilen 4 izolatın 10 test organizmasına karşı birincil aktivite sonuçları karşılaştırıldığında *Streptomyces* sp. KGG32 nolu izolatın en yüksek aktivite ve spektruma sahip olduğu görülmüştür.

251 *Streptomyces* izolatından test organizmalarına karşı en fazla antibakteriyal etki 35 (%13.94) izolat ile Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*' a karşı belirlenmiştir. Sonra sırasıyla 31 (%12.35) izolat ile *M. luteus*, 30 (%11.95) izolat ile *B. cereus*' a karşı gerçekleşmiştir. Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyal etkisi bulunan en yüksek izolat sayısı 12 (%4.78) ile *E. coli*' ye karşı, en düşük olarak ise 4 (%1.59) izolat tarafından *P. fluorescens*' e karşı belirlenmiştir. Mayalara karşı etkili bulunan en yüksek izolat sayısı 23 (%9.16) ile *Y. lipolytica*, en düşük ise 7 (%2.78) ile *G. penicillatum*' a karşı görülmüş olup, *C. albicans*' a karşı aktif izolat sayısı 19 (%7.56)' dur. Yukarıdaki açıkladığımız değerlere baktığımızda, streptomisetlerin Gr (+) bakteriler üzerine etki gösterenlerin, Gr (-) bakteriler üzerine etki edenlerin sayısından çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bundan dolayı Gr (+) bakteriler üzerine etkili yeni antibiyotik araştırmalarının kapalı bir alan olduğu, Gr(-) bakteriler, funguslar ve mayalara etkili antibiyotik araştırmaların incelemeye açık oluşu görüşü, çalışmamız ile de doğrulanmış olmaktadır.

Bir Rus araştırmacı olan Nakhimovskaia (1937) topraktaki antagonistik aktinomisetleri ilk defa incelemiş ve incelediği 80 kültürden 47 tanesinin antagonistik madde çıkardığını; hepsinin Gr (+) bakteriler üzerine etkili olduğunu belirlemiştir. Linder ve Wallhauser (1955) antagonizm yönünden 2500 *Streptomyces* straini izole etmişler ve bunların %77' sinin Gr (+) bakterilere (*S. aureus*), % 40' inin Gr (-) bakteriler (*E. coli*), %32' sinin *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*) ve %18' inin de funguslar (*A. niger*) üzerine etkili olduklarını saptamışlardır. Kuzey Kanada topraklarından izole edilmiş 600 aktinomisetin antibiyotik aktivitesi üzerine yapılan çalışmada,

izole edilen kültürlerin %47' sinin *S. aureus*, %8.2' sinin *E. coli*, %19.5' inin *M. tuberculosis* üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Çeşitli ortamlardan izole edilen toplam 10.000 kültürün incelenmesinde, bunların %25' inin bakteriler üzerine etkili antibiyotikler ürettikleri saptanmıştır (Öner, 1989). Denizci 1996 yılında Ege ve Doğu Karadeniz topraklarından izole ettiği 356 aktinomiset kültüründen 114 tanesinin Gr (+) bakterilere, 13 tane izolatin hem Gr (+) hem de Gr (-) bakterilere 1 tanesinin ise sadece Gr (-) bakterilere karşı etkin olduklarını saptamıştır. Aynı araştırmacı izole ettiği aktif izolatların hepsinin *Streptomyces* türleri olduğunu çalışmasında göstermiştir. Ayrıca aktinomisetler ile ilgili yapılan çalışmalarda incelenen çeşitli genurler arasında *Streptomyces* genuru üyelerinin hem daha fazla oranda oldukları hem de en yüksek sayıda antibiyotik üreticileri oldukları bir çok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (Lechevalier 1989, Locci 1989, Öner 1989, McCarthy and Williams 1990, Schlegel 1995, Jongsik et al. 1997, Li 1997, Al-Tai et al. 1999). Şahin ve Uğur (2003), Muğla yöresi topraklarından 74 farklı *Streptomyces* izolatu elde etmişler ve bunların % 45.9' unda antimikrobiyal aktivite olduğu sonucuna varmışlardır. Aynı araştırmacılar bu çalışmalarında onbeş izolatin koagulaz-negatif Stafilokoklara (CoNS) karşı aktivite gösterdiğini ve izolatların çoğunluğunun Gram-pozitif bakterilere etkili olduklarını belirtmişlerdir. Diğer taraftan diğer bir araştırmada (Oskay et al. 2004), tarım yapılan arazilerden elde edilen 50 aktinomiset izolatinın, %16' sı Gr (+), %6' sı Gr (-) bakterilere karşı etkili bulunmuş, toprak streptomisetlerinin *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* ve *Pseudomonas viridiflova* gibi fitopatogen bakterilere karşı da etkili oldukları belirtilmiştir. Kültür mantarlarında kahverengi leke hastalığına yol açan *Pseudomonas tolaasi* ye karşı da *Streptomyces* türleri etkin olabilmektedir (Şahin 2005).

Birincil antimikrobiyal aktivite tarama işlemleri sonucunda elde edilen 13 izolat ikincil antimikrobiyal aktivite tarama işlemlerine tabi tutulmuş olup; bunlardan 11 tanesi MRSA başta olmak üzere kullanılan Gr (+) ve Gr (-) bakterilere karşı aktivite göstermiştir. En iyi aktivite gösteren izolatlarımız arasında fermentasyon denemelerine alınan *Streptomyces* sp. KGG32, *Streptomyces* sp. KGG13, *Streptomyces* sp. KEH23 ve *Streptomyces* sp. KVK11, bulunmakta olup, antibakteriyal aktivitelerinin yüksek oluşu doğrulanmıştır.

Antifungal aktivite gösteren çok sayıda saprofitik ve insan patojeni mikroorganizma mevcuttur. Bunlar arasında; *Actinomyces*, *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Aureobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Clostridium* ve *Fusobacterium* genurlarına ait türler bulunmaktadır (Kerr 1999). İn vitro da antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde farklı metotlar kullanılmaktadır. Temel prensip olarak özel bir alandaki mikroorganizma popülasyonunun diğer türlerle arasındaki rekabete dayanmaktadır. Bu önemli ekolojik olaydan esinlenerek; yeni

terapötik antifungal ve antibakteriyal ilaçların, bitki koruma ajanlarının geliştirilmesi sağlanmaktadır.

Diğer taraftan antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla birincil antimikrobiyal aktivite sonuçlarına dayanarak seçtiğimiz 16 izolattan 5 tanesi test organizması olarak denenen *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma hamatum*, *Cladosporium oxysporum* ve *Penicillium* sp.' ye karşı etkili bulunmuştur. Fermentasyon denemeleri için seçilen 4 izolattan sadece *Streptomyces* sp. KEH23, 5-28 mm arasında değişen oranlarda antifungal aktivite göstermiştir.

Kitin n-asetilglukozamin polimerlerinin β -1.4 bağlarıyla oluşturduğu çözünmez bir madde olup, toprak organizmalarından artropodların dış iskeleti ile fungusların hücre duvarı bileşenidir. Birkaç istisna dışında prokaryotlarda bulunmaz (Gooday 1990a).

Doğal ortamda bulunan kitin çok sayıda bakteri ve fungus türleri tarafından parçalanabilir. Kitinolizis basit bir ifadeyle kitinazlar tarafından kitinin glikosidik bağlarının hidrolizidir (Cheng and Li 2000). Topraktaki kitinin filamentöz mikroorganizmalar tarafından parçalanması, filamentöz olmayanlara göre çok daha hızlı ve etkilidir (Gooday 1990a,b). Bu farklılık büyük ihtimalle organizmaların katı substratlara penetre olmasıyla ilgilidir. Filamentöz organizmalardan kültüre edilebilir aktinomisetlerin kitini hidroliz etmesi funguslardan çok daha iyi olduğu düşünülmektedir. Yaklaşık olarak aktinomisetlerin %1-40' ı kitini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadır.

Streptomyces türlerinin antifungal aktiviteleri kitinolitik enzimlerinden dolayıda olabilmektedir (Hoster et al. 2005). Bu özellik; kitinaz üretimi, litik sistemin bir parçası olabilmekte, büyümesi için gerekli substrat olan kitin yerine fungus hifleri kullanılmaktadır. Çünkü kitin fungus misellerinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Canlı fungus hiflerinin kitinolitik bakteriler tarafından parçalanmasına ilişkin çok sayıda araştırma mevcuttur, ama bunların büyük bir bölümü mikolitik özelliklerini yansıtmaktadır. Ancak kitinaz enzimi dolayısıyla sözkonusu *Streptomyces* sp.' nin fungus hücre duvarlarını parçalaması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Boer et al. 1998). Çalışmamızda elde ettiğimiz ve seçtiğimiz *Streptomyces* sp. KEH23 nolu izolat, çok sayıda Gr (+) ve Gr (-) bakteriye karşı yüksek aktivite göstermektedir. Bunun yanında sentetik ortamda kitinolitik aktivitesi bulunamamıştır. Dolayısıyla, küflere karşı etkisinin ürettiği antifungal metabolitten kaynaklandığını düşünmek yerinde olacaktır.

Streptomyces türlerinin antifungal etkileri laboratuvar koşullarında yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen, toprakta ya da rizosfer çevrelerinde yapılan çok az çalışma vardır. Yapılan çalışmalar bu genus üyelerinin rizosferde dağılışına fungal ve bakteriyal patojenlerle ilgisine dayanmamıştır. Yuan ve Crawford (1995) bitki köklerine zengin toprak örneklerinden izole ettikleri 83 aktinomiset izolatının antifungal etkilerini saptamışlar, bu izolatlardan bir tanesinin *Pythium ultimum*' a karşı kuvvetli antagonizm gösterdiğini, daha sonra bunun *Streptomyces lydicus* olduğunu saptamışlardır.

Aktinomisetlerin rizosferde rekabet güçlerinin diğer mikroorganizmalara göre yüksek oluşu, iyi kolonize olmaları ve etkili metabolit (antibiyotikler; hemiselülaz, selülaz, kitinaz, glukonaz ve amilaz gibi enzimler)' ler üretmeleri onların biyokontrol ajanları olarak kullanılmasına neden olmuştur. Pridham ve arkadaşları (1950)' li yıllarda *Streptomyces* kültür filtratlarının bitki hastalıklarına karşı antagonistik etkileri olduğunu saptamışlardır. Reddi ve Rao *Streptomyces ambofaciens*' in *Fusarium* sp. ve *Pythium* sp.' ye karşı etkili olduğunu in vitroda belirlemişlerdir (Turhan 1981a). Maalesef ülkemizde aktinomisetlerin biyolojik mücadelede kullanım olanakları üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır. Turhan (1981a) İzmir ve civarındaki topraklardan izole ettiği bir antagonist (*Streptomyces ochraceiscleroticus*)' in in vitroda; kök hastalığına sebep olan toprak kaynaklı fungal patojenlere karşı etkisini incelemiştir. Turhan bu çalışmasında bu antagonistin patojenlerin büyümesini ortalama olarak 10.8-18.2 mm engellediğini göstermiştir. Turhan (1981b)' in yaptığı ikinci bir çalışma ile *Streptomyces ochraceiscleroticus* (C/2-9)' u önce in vitroda fungal patojenlere karşı, daha sonra in vivo çalışmasıyla bazı önemli toprak kaynaklı patojenlere karşı etkisini incelemiştir. C/2-9' un yapay yolla patojenlerin inoküle edildiği toprakta büyüyen bitkileri bütün hastalıklara karşı etkili bir şekilde koruduğunu göstermiştir. Bazı bitki tohum (pamuk, karpuz, kavun, salatalık, domates, biber)' larını ekimden önce C/2-9 filtratı ile karıştırmış, sonuçta bu bitkilerin hastalıklardan korunduğunu belirlemiştir ve C/2-9' un toprak kaynaklı patojenlerin biyolojik mücadelesinde kullanılabileceğine işaret etmiştir. Turhan ve Grossmann (1986) Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole ettikleri 300 aktinomiset izolatının sekiz farklı fungal kökenli patojenlere karşı etkilerini incelemişlerdir. Teste tabi tutulan aktinomiset izolatlarının %90' ının *Sclerotinia sclerotiorum*' un, %17' sinin *Rhizoctonia solani*' nin ve %14' ününde *Alternaria alternata*' nın büyümesini inhibe ettiğini saptamışlar; *Rhizoctonia solani* ve *Alternaria alternata*' ya karşı güçlü antagonistik etki gösteren aktinomiset izolatlarının, teste tabi tutulan diğer fungal patojenlere karşı da etkili olduklarını saptamışlardır. Turhan ve Turhan (1989) *Streptomyces nobilis* ve *Streptomyces scleroticus*' u biyolojik mücadelede güçlü bir antagonist olarak kullanılan *Trichoderma harzianum* ile beraber *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*' ye karşı etkilerini in vitroda saksı denemeleriyle karşılaştırmışlardır. Sonuçta kullanılan *Streptomyces* türlerinin patojenlere karşı antagonistik etkilerinin *Trichoderma harzianum*' dan çok daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Streptomyces genusu üyelerinin kültür filtratlarının bitki hastalıklarına karşı kullanılması Pridham ve arkadaşları tarafından 1950' li yıllarda başlatılmıştır. Onlar, sera denemelerinde 10 *Streptomyces* kültür filtratından 9' unun antagonistik etkilerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Reddi ve Rao *Streptomyces ambofaciens*' in domates bitkilerinin kurumasına yol açan *Pythium* sp. ve pamuklarda patojen *Fusarium* sp.' ye karşı etkili olduğunu laboratuvar denemeleriyle kanıtlamışlardır. Kök hastalıklarına karşı *Streptomyces* türlerinin metabolit, spor, misel ya da bunların kombinasyonu kullanılabilmektedir. Rothroch ve Gottlieb fasulyelerde kök çürüklüğüne neden olan *Rhizoctonia* sp.' nin *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ile kontrol

edilebileceğini kanıtlamışlardır. Steril toprağı *Rhizoctonia* sp. ile aşılamışlar ve *S. hygroscopicus* var. *geldanus*' dan elde edilen geldanamisin antibiyotiğini 1 gram toprak başına yaklaşık olarak 20 µg vermişler ve sonucun bu patojene karşı etkili olduğunu görmüşlerdir. Benzer çalışmalar *Streptomyces* üyelerinin rizosferde hem nicel hem de nitel açıdan önemli; bitki kök çevresinde iyi kolonize olup, bitki büyüme hormonları gibi görev yaptıklarını ispatlamışlardır. Diğer taraftan Milus ve Rothrock spesifik *Streptomyces* strainlerinin rizosfer (buğdayla ekili araziler)' de sayılarının diğer bakterilere oranla daha az (10^2 - 10^5 cfu/g) olduğunu açıklamışlardır (Yuan and Crawford 1995). Aynı araştırmacılar bitki köklerinde fungal çürüklüğe sebep olan patojenler (*Pythium ultimum*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* ve *Phymatotrichum omnivorum*)' e karşı yaptıkları bir çalışmada *Streptomyces lydicus*' u oldukça etkili bir antagonist olarak belirlemişlerdir.

Lechevalier ve Lechevalier (1970,1980) aktinomisetleri morfolojik ve kimyasal karakterlere dayanarak geniş gruplara ayırmışlardır. Bu görünüm hala genus düzeyinde tanılama için en iyi ve basit olanıdır. Özel bir aktinomisetin genus düzeyinde tanılanabilmesi için en çok kullanılan kimyasal karakter; hangi tip dibazik amino asitin hücre çeperinde bulunup bulunmadığı ve bütün hücre hidrolizatında hangi tip ayırt edici karakteristik şekerin bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Lechevalier and Lechevalier 1970,1980, Williams et al. 1983). DAP' in hiçbir formunu içermeyen organizmalar; *Agromyces*, *Actinomyces*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* olarak; DAP' in L izomerini (Tip I) içerenler; *Streptomyces*, *Streptovertisillum*, *Elytrosporangium*, *Microellobosporia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium*, *Chania*, *Kitasatoa*, *Kitasatosporia*, *Nocardioidea* olarak Lechevalier ve Lechevalier (1985) tarafından bildirilmiştir. DAP' in mezo formunu içeren aktinomisetler birçok araştırmacı tarafından incelenmiş ve bu grup hücre çeperi karakteristik şekerlerin varlığına göre TipII, TipIII ve TipIV olmak üzere ayrılmışlardır (Lechevalier and Lechevalier 1970,1980, Lechevalier 1985, Williams et al.1989, Prescott et al. 1990). Yapılan bu çalışmada fermentasyon denemelerine alınan aktif dört izolatin hücre çeperi kimyasal analizi yapılmış ve hepsinde ana bileşen L-DAP bulunduğundan hepsi de hücre çeperi TipI içine sokulmuştur. Hücre çeperi hidrolizatı karakteristik şeker analizleri yapılmış, sonuçta hepsinin karakteristik şeker içermediği belirlenmiştir. Tanılama için bu bilgilere ek olarak; makroskopik, mikroskopik incelemeler, biyokimyasal testler, kültürel özellikler ve fizyolojik özelliklerden yararlanılmıştır. İzolatlarımızın kültür ortamlarında başlangıçta derimsi yumuşak; sonraları sert-sıkı, tekstürlü, koloni görünüşlerinin pamuksu-yünsü oluşları; kültürlerin toprak kokusu vermeleri ile *Streptomyces* genusu üyeleri olduğu düşünülmüş ve bu mikroskopik incelemeler ile doğrulanmıştır. Şöyleki; izolatlarımız substrat, havasal misel ve hareketsiz sporlar içermelerinin yanında, havasal misel üzerinde uzun spor zincirleri oluşturmaktadırlar. Ayrıca bu 4 izolatımız substrat miselde sporangium ve hareketli sporların gözlenmeyişi nedeniyle *Kineosporia*' dan; spor zincirlerinin KEH23 nolu izolatda spiral, KGG13, KGG32 ve KVK11 nolu izolatlarda Rektifleksıbıls olması

nedeniyle *Streptoverticillum*' dan; substrat miselyumlarının bulunması nedeniyle de *Sporichthya* genuslarından ayırt edilmişlerdir.

Aktif izolatların tanımlanması için elde edilen minimum karakterler, *Streptomyces* major ve tekil-üye gruplarının standart değerleri ile minitab 13.20 programı yardımıyla % benzerliklerinin belirlenmesi amacıyla karşılaştırılmıştır. KGG13 nolu izolat melanin üretmemekte, *S. cerevisiae*' ye karşı aktivite göstermemekte, *A. niger*' e karşı göstermemektedir. Lesitinaz aktivitesi görülmekte, H₂S üretmemekte, hippurate, elastin hidroliz edilmekte, ksantin ve arbutin degradasyonu negatif, DL- α -n-Butirik asitten yararlanmamakta, D-melibiozdan yararlanmakta, ksilitol kullanılmaktadır. Buna rağmen *Streptomyces exfoliatus* olarak belirlenen 61 strain melanin üretmekte, 39 strain üretmemekte; *S. cerevisiae*' ye karşı 99 strain aktivite göstermemekte 1 strain göstermekte; *A. niger*' e karşı ise 6 strain aktivite gösterip 94 strain göstermemektedir. 50 strain lesitinaz pozitif, 50 strain negatif; 89 strainde H₂S üretimi görülmesine rağmen 11 strainde görülmemekte; hippurate 44, elastin 89 strain, ksantin 88, arbutin 99 strain ile hidroliz edilmekte; DL- α -n-Butirik asitten 39 strain yararlanamamakta, D-melibiozdan 28 strain, ksilitol ise 1 strain tarafından kullanılmaktadır. KGG13 nolu izolatın yüzde benzerliği en yüksek major tür grubunda bulunan *S. exfoliatus* %54.56 benzerlik seviyesi (Similarity level; S_{SM}), 0.909 uzaklık seviyesi (Distance level; D_{DL}) ile 8. gruptaki *Streptomyces exfoliatus* tür grubuna daha yakın bulunmuştur. KGG32 nolu izolatın spor kütleleri rengi gri olup, *S. cerevisiae* ve *A. niger*' e karşı aktivite göstermemektedir. H₂S üretmemekte, arbutin hidroliz edilmemekte, sistein ve D-melezitoz kullanılmamaktadır. Buna rağmen $S_{SM} = 60.19$ ve $D_{DL}=0.796$ ile en yüksek benzerlik gösterdiği major tür grubunda bulunan *Streptomyces albidoflavus* ' un 1 straininin spor kütleleri rengi gri, 99' unun değildir. *S. cerevisiae*' ye karşı 80 strain aktivite göstermekte, 20 strain göstermemekte; *A. niger*' e karşı ise 55 strain aktivite gösterip 45 strain göstermemektedir. 85 strainde H₂S üretimi görülmesine rağmen 15 strainde görülmemekte; arbutin 99 strain ile hidroliz edilmekte; sisteini 60 strain kullanmakta, 40 strain kullanmamakta, D-melezitozdan 55 strain yararlanmakta, 45 strain yararlanamamaktadır. KEH23 nolu izolatımız diffuse pigment üretmekte, *S. cerevisiae*' ye karşı aktivite göstermemekte, hippurate hidrolizi ile elastin ve arbutin degradasyonu negatif, 45 °C' de büyüme göstermekte; Adonitol, ksilitol ve D-melibiozdan yararlanamamakta, dekstran kullanılmaktadır. Buna rağmen $S_{SM} = 59.41$ ve $D_{DL}=0.812$ ile en yüksek benzerlik gösterdiği major tür grubunda bulunan *Streptomyces lydicus*' un 1 straini diffuse pigment üretilip, 99 strain üretmemekte; *S. cerevisiae*' ye karşı 27 strain aktivite göstermekte, 73 strain göstermemekte; 30 strain tarafından hippurate hidroliz edilirken 70 strain negatif; elastin 36, arbutin 99 strain tarafından degradasyona uğratılmakta; 1 strain 45 °C' de büyümekte; adonitol ve D-melibiozdan 82 strain yararlanırken, 18 strain yararlanamamakta; ksilitol ise 55 strain tarafından kullanılmaktadır. Son olarak; KVK11 nolu izolat, sarı-kahve diffuse pigment üretmekte; peptone yeast ekstraktı agarda melanin oluşturmamakta; lipolizis aktivitesi göstermemekte; elastin ve

arbutin degradasyonu negatif; potasyum tellüritli ortamda büyüme göstermemekte; valinden azot kaynağı olarak yararlanamamakta; rafinoz ve adonitolden karbon kaynağı olarak yararlanamamaktadır. Buna rağmen $S_{SM} = 63.64$ ve $D_{DL}=0.727$ ile en yüksek benzerlik gösterdiği major tür grubunda bulunan *Streptomyces fulvissimus* olarak belirlenen 99 strain sarı-kahve diffuse pigment üretmekte 1 strain üretmemektedir; 67 straini peptone yeast ekstrakt agarda melanin oluştururken, 33 strain oluşturamamakta; 99 straini lipolizis aktivitesi göstermekte; 67 strainde elastin ve arbutin degradasyonu pozitif, 33 strainde ise negatiftir. 56 straini potasyum tellüritli ortamda büyürken 44 straini büyümemektedir. Valinden 44 strain, rafinozdan ve adonitolden ise 89 strain yararlanırken, 11 strain yararlanamamaktadır.

Dört aktif izolatın tekil-üye grubunda bulunan *Streptomyces* strainleri ile % benzerliklerine baktığımızda; KGG13 nolu izolat $S_{SM} = 60.27$ benzerlik seviyesi ile *Streptomyces finlayi*; KGG32 nolu izolat $S_{SM} = 60.59$ ile *Streptomyces prunicolor*; KEH23 nolu izolat $S_{SM} = 77.41$ ile *Streptomyces glaucescens* ve KVK11 nolu izolat, $S_{SM} = 61.25$ ile *Streptomyces badius* grubuna daha yakın % benzerlik göstermektedir.

Yukarıda özelliklerini açıkladığımız aktif izolatlar ile tanılanmaları için karşılaştırma yaptığımız *Streptomyces* major ile tekil-üye gruplarını oluşturan strainler arasındaki % benzerliklerinin düşük görülmesi nedeniyle; aktif izolatlarımız; *Streptomyces* sp. KGG13, *Streptomyces* sp. KGG32, *Streptomyces* sp. KEH23 ve *Streptomyces* sp. KVK11 şeklinde kendi verdiğimiz orijinal numaralandırma ile anılmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz.

Fermentasyon denemeleri için; glukoz, nişasta, gliserol ya da sukroz karbon kaynağı içeren dört farklı ortam belirlenmiştir. Bu tür ortamlar farklı araştırmacılar (Raatikainen 1995, Harindran 1999) tarafından streptomisetlerin aktif maddelerinin üretmek amacıyla kullanılmıştır. Ancak seçilen dört farklı *Streptomyces* izolatının bu ortamlardaki antibiyotik verimleri değişmektedir. Şöyleki; *Streptomyces* sp. KGG13 ile yaptığımız fermentasyon denemelerinde glukozlu besiyerinde antibiyotik üretimi 24. saatte başlamıştır. En yüksek antibiyotik üretimi yine aynı besiyerinde 64. saatte 18 mm ile en yüksektir. Ayrıca fermentasyon sıvısında antimikrobiyal etkili molekülün üretiminin belirlenmesi için kullanılan indikatör test organizmalarından sadece *Gr (+)* bakteri *S. aureus*' a karşı inhibisyon gözlenmiştir. Bu izolatın sukrozlu besiyeri ile fermentasyonun da antibiyotik üretimi saptanamamıştır. En yüksek biyomass ağırlığını yine glukozlu besiyerinde, 1.4 g/100 ml ile 72. saatte oluşturmuştur. *Streptomyces* KGG32 en yüksek biyomass ağırlığına 1.8 g/100 ml ile fermentasyon ortamı olarak seçilen nişastalı besiyerinde 96. saatte ulaşmıştır. Her 4 fermentasyon ortamında da test organizmalarına karşı inhibisyon görülmüş, 120. saatte 32 mm ile *S. aureus*, 26 mm ile ise *E. coli*' ye karşı en yüksek inhibisyon sukrozlu besiyerinde saptanmıştır. Ortalama olarak en düşük antibiyotik verimi glukozlu besiyerinde görülmüştür. pH değişim aralığının (7.0-8.10) en düşük gözleendiği fermentasyon ortamı sukrozlu besiyerinde ölçülmüştür. Biyomass ağırlığının düşük gözleendiği sukrozlu ortamdaki antibiyotik verimi en yüksektir. Aktif metabolit üreten

mikroorganizmaların büyüme ortamındaki karbon ve azot kaynaklarının sınırlandırılması ya da kolay asimile ettiği maddelerin yerine daha zor asimile edilen maddelerin eklenmesi ile antibiyotik verimi artabilmektedir. Ayrıca ortam şartlarının kötüye gitmesi, organizmanın rekabet gücünü artırabilmesi için sekonder metabolitleri aşırı üretmesine neden olmakta ve bu doğal bir ekolojik olaydır. *Streptomyces* sp. KEH23 ile yaptığımız fermentasyon denemelerinde gliserollü besiyerinde antibiyotik üretimi 16. saatte başlamıştır. Glukoz, nişasta ve gliserollü besiyerlerinde antibiyotik üretimi hemen hemen aynı olup; ortalama olarak 6-16 mm arasında değişen değerlerle, *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus* ve *C. albicans* test organizmalarına karşı gözlenmiştir. Bu izolatın sukrozlu besiyerindeki fermentasyonunda antibiyotik üretimi en düşüktür ve 72. saatte başlamıştır. *Streptomyces* sp. KVK11 en yüksek biyomass ağırlığına 1.4 g/100 ml ile fermentasyon ortamı olarak seçilen nişastalı besiyerinde 84. saatte ulaşmıştır. Antibiyotik üretimi 44. saatte aynı besiyerinde başlamış, 16 mm ile 84. ve 96. saatlerde *S. aureus*' a karşı gözlenmiştir. *C. albicans*' a karşı en yüksek inhibisyon değeri 108. saatte 14 mm' dir. Bu izolatın sukrozlu besiyeri ile fermentasyonunda antibiyotik üretimi saptanamamıştır. Ortalama olarak en düşük antibiyotik verimi glukozlu besiyerinde görülmüştür.

Fermentasyon sonunda oluşan antibiyotiklerin, ortamdaki başlanğıç maddeleri, diğer metabolizma ürünlerinin, artan nutrientin; ayrılması, temizlenmesi ve sonunda tanınması için; basit ve güvenilir olan fizikokimyasal, biyolojik ve kromatografik yöntemler uygulanmaktadır (Houchuli 1992). Bazı durumlarda fermentasyon ürünlerinin ayrıştırılması ve tanınmasında özel analizler gerekebilmektedir. Genelde izole edilen molekül, amino asitlerde olduğu gibi ince tabaka kromatografisi (TLC) ile kolayca tanınabilir. Bu yöntem hem basit hemde çok ucuzdur. Bu yöntemde bir çok örneğin tek bir plakada incelenmesi ve sülfirik asitle muamelesi sonucu oluşan organik fraksiyonların ısıtılmasıyla görünür kılınması sağlanmaktadır. Çalışmamızda TLC' den antimikrobiyal aktif maddenin biyootogramla yerlerinin tespiti, uygun solvent sisteminin belirlenmesi, saflık kontrollerinde, ninhidrin, sülfirik asit, anisaldehit ve demir klorür ile reaksiyonlarının belirlenmesinde yararlanılmıştır.

Herhangi bir ürünün izolasyonu için kolon kromatografisi ve uygun solvent sistemi ile fraksiyonlara ayırma işlemi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. İyonik bileşikler solvent ekstraksiyonu sonucu suda, iyonik olmayanlardan daha çok çözünmektedir. Metilen klorid, n-bütanol, hegzan, petrol eteri, etil asetat gibi solventlerin ekstraksiyonu ile elde edilen bileşikler; yüksek polar bileşikler, zayıf polar bileşikler ve polar olmayan bileşikler olarak üçe ayrılır. Bu şekilde yapılan sınıflandırmaya göre; aminoasitler, proteinler ve organik asitler yüksek polar bileşiklere; penisilin ve sefalosporinler zayıf polar bileşiklere; tetrasiklin ve griseofulvin gibi antibiyotikler ise polar olmayan bileşiklere dahil edilmektedir. Antibiyotikler kimyasal olarak düşük moleküler ağırlıkta organik yapıda bileşikler (Lancini et al. 1995) olduklarından, genellikle organik maddelerin organik çözügenlerle çözünme özelliğini (Gündüz 1999) göz önüne alarak, fermentasyon denemelerine alınan izolatlardan antimikrobiyal etkili madde/maddelerin

saflaştırılmasında, hücrelerin ve diğer nutrientin fermentasyon sıvısından ayrılmasından sonra solvent ekstraksiyonu uygulanmıştır. Sadece KGG32 nolu izolattan aktif madde kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. İzolatın aktif maddesinin ileri işlemleri yapıldıktan sonra KGG32-A ve KGG32-B olarak iki aktif madde ürettiği saptanmıştır. Aktif maddelerle ilgili olarak yapılan ön işlemler (UV, IR, Çözünürlük ve Reaktiflerle reaksiyon) her iki maddenin de polar özellik göstermesine rağmen, organik solventlerde zayıf çözündüğünü, KGG32-A' nın glikopeptit, KGG32-B' nin peptit yapıda olduğunu göstermiştir. Bu maddeler polar özellik göstermesine rağmen penisilin ve sefalosporin grubu antibiyotiklere dahil edilememiştir

Aktinomisetler biyo-degradasyon gibi ekolojik önemlerinin (Williams et al. 1983), yanında antibiyotikler (Reis et al. 2006) ve enzimler (Roy et al. 2006) gibi endüstriyel açıdan faydalı metabolitleri de üretmektedirler. *Streptomyces* aktinomisetler arasında topraktan en fazla izole edilen ve çok sayıda önemli metaboliti üretmelerinden dolayı en fazla çalışılan cinstir. Bu yoğun çalışmalar sonucunda yeni strainler ve buna bağlı olarak yeni sekonder metabolitler özellikle de antibiyotikler keşfedilmiştir. Bundan dolayıda günümüzde henüz taksonomik pozisyonları tartışmalı olsa bile *Streptomyces* cinsi üyeleri güncelliğini korumaktadır.

Antibiyotikler son 50 yılda özellikle enfeksiyöz hastalıklardan ölümleri ve rahatsızlıkları büyük oranda azaltmış, insan hayatında en önemli maddeler arasına girerek, hayat beklentisi anlamında en büyük rolü üstlenmiştir. Modern antibiyotiğin hayatımıza girişi, 20. yüzyıla beraber Dr. Fleming' in 1928' de penisilini bulmasıyla başlamıştır. Bu buluş, petride gelişen *Penicillium notatum*' un kendisine yakın stafilokokları inhibe etmesiyle gözlemlenen doğal bir olaydır. Dr. Fleming bu olaya dayanarak, küfün ürettiği metabolitin bakteriyi öldürdüğü hipotezini benimsedi ve savundu. Ancak küfün tanımlanmasından sonra penisilin olarak isimlendirilen antibiyotiğin ilk defa kullanımı 1940' ılı yıllarda gerçekleşmiştir. Diğer taraftan reçetelerde yer alan ilaçlar arasına girmesi 1950' li yılların ortalarına doğru gerçekleşmiştir. İlk senelerde kullanımı penisilini en mükemmel ilaç olarak algılanmasına, daha da kötüsü bakteriyel hastalıklardan ziyade çok sık görülen soğuk algınlığı ve virüslere de etkili olduğu düşüncesinin yaygın olmasıydı (Roberts 2000).

Penisilin kullanıma başladığı zamanlarda ilk tehlike sıkca enfeksiyon tedavilerinde uygulandığı Londra hastanelerinde penisilin dirençli-stafilokokların görülmesiyle patlak verdi. Bir araştırmaya göre 1946' da %14 olan penisilin-dirençli stafilokoklar, 1950' de %59' a yükselmiştir. Bu ve buna benzer araştırmaların önemi çoğul-direnç kazanmış mikroorganizmaların gündeme gelmesine kadar göz ardı edilmiş, benimsenmemiştir. Antibiyotiklerin insanlardaki hastalıklara yol açan bakterilere uygulanmasından kısa bir süre sonra hayvanlardaki hastalıkların iyileştirilmesinde de kullanılmaya başlandı. Hatta düşük dozlarda yemlere karıştırılarak, daha kısa zamanda hızla ağırlık almaları için uygulandı, sonraları bu tür uygulamalar rutin bir hal aldı. Günümüzde antibiyotikler bitki hastalıklarının sağıtımında da kullanılmaktadır. Son zamanlarda özellikle endüstriyel açıdan gelişmiş

lkelerdeki antibiyotik kullanım oranının %50 insanlar, %50 ise hayvanlar için olduğu vurgulanmaktadır (Levy 1992).

1970' li yılların ortalarına doğru antibiyotik-dirençli bakteriler hastanelerde azaltılmış, epidemik hastalıklar gündem konusu dışında kalmıştı. Açıkcası doktorlar ve konuyla ilgili araştırıcılar antibiyotik-dirençli bakterilerin yol açtığı hastalıkların tedavisinin zor olmayacağını kolayca başa ıkılabilceğini düşünmekteydi. Uygulanan terapiler başarılı oluyor, hastalık etmeninin belirlenmesine gerek duyulmuyordu. Bütün bu düşünceler, çocuklarda menenjite neden olan ampicillin-dirençli *Haemophilus influenzae* ile ona yakın penisilin-dirençli *Neisseria gonorrhoeae*' nın izole edilmesiyle değişti. Her iki patojende toplumda salgın hastalıklara yol açabiliyordu (Roberts 2000). Bu olay, hastalığa yol açan organizma ile uygulanan tedavi yöntemi arasındaki ilişkiyi esas alan yeni bir konunun doğmasına sebep oldu. Toplumda yaygın hastalıklara neden olan bakteriler ilk uygulanan antibiyotiğe karşı dirençli olmuş, alternatif tedavilere de yanıt vermemişlerdir.

Son yıllarda çok sayıda antibiyotik streptomisetler ve diğer mikroorganizmalardan izole edilmiş, tıp ve ziraat alanındaki önemleri çok iyi anlaşılmıştır (Spiewack 2001). Özellikle patojenik bakterilerin sıkca kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanması, etkili ilaçların doğal ya da sentetik yolla acilen üretilmeleri gerektiği konusunda bilim adamlarını bir araya getirmiştir. Tam zamanlı antibiyotik klasik tarama programlarına ek olarak, mikrobiyal genetiğe dayanan yeni kombine metotlar devreye sokulmuştur. Bunlar arasında daha çok, genetik ve biyosentezis teknolojisi ön plana çıkmaktadır. Bu teknoloji antibiyotik üretiminden sorumlu bilinen uygun gen biyosentetik yol izlerinin değiştirilmesi ile yeni ya da modifiye metabolitlerin keşfini hedeflemektedir. Diğer bir yol ise, kültüre edilemeyen, ilginç doğal metabolitleri üretebilen mikroorganizmalara ait DNA (Ekolojik DNA) ' nın direk topraktan PCR tekniklerini kullanarak izole edilmesidir. Bu konuda başarılı birkaç çalışma mevcut olup, bilinmeyen bir çevreden fonksiyonel bilinmeyen DNA izolasyonunda halen çok fazla zorluklar mevcuttur.

Streptomyces ve yakın ilişkili genuserlardan yeni ilaçların elde edilmesi çok yoğun bir şekilde sürmektedir. *Streptomyces coelicolor* ve *Streptomyces avermitilis*' in genom projeleri tamamlanmış, sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu biyosentetik enzim gen grupları belirlenmiştir. Bu iki türden daha önceden belirlenen metabolitlerin yanında, belirlenmeyen hatta doğadan ilk kez izole edilen ürünlerde gün ışığına çıkarılmıştır. Matematiksel bir modellemeye göre henüz streptomisetler tarafından üretilen biyolojik aktif metabolitlerin ancak %3'  belirlenebilmiştir (Watve et al. 2001). Bu genus tarafından üretilen antibiyotiklerin çoğu henüz belirlenmemiştir. Bundan dolayı son zamanlardaki çalışmalar özellikle streptomisetlerden yeni antibiyotiklerin izole edilmesi DNA sekans bilgilerine dayanmaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz ve kültürel, morfolojik, fizyolojik, kemotaksonomik ve biyokimyasal özelliklerini belirlediğimiz aktif *Streptomyces* izolatlarının gliserol ve toprak kültürleri yapılmış ve niversitemiz Biyoloji bölümü mikroorganizma kültür koleksiyonunda

saklanmaktadır. Daha sonraki çalışmalarımızla; faj duyarlılık testleri, 16S rRNA sekans analizleri yapılacaktır. Diğer taraftan ön işlemleri tamamlanan, antimikrobiyal aktif madde ürettiği saptanan izolatlarımızın; fitopatogen bakteriler ve funguslara karşı; saksı ve tarla denemelerine geçilerek, doğal ortamlardaki etkinliği araştırılacaktır. Ayrıca kromatografik yöntemlerle saflaştırılan, spektroskopik analizler ile kısmı olarak karakterize edilen KGG32-A ve KGG32-B antibiyotiklerin, kalan fizikokimyasal özellikleri tespit edilecek, NMR ve ilave analizler ile de tam olarak kimyasal yapıları aydınlatılacaktır.

Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Tıbbın dışında hayvancılık, ziraat ve çeşitli araştırma alanlarında kullanılmaları önemlerini daha da artırmaktadır. Antibiyotiklerin özellikle az gelişmiş toplumlarda bilinçsizce kullanımı ve patojen mikroorganizmaların bunlara karşı hızla direnç kazanmaları sorun olmaktadır. Her ne kadar yan etkilerinin bulunması bir gerçek olsada, onlar olmadan çoğu hastalıkların tedavisi mümkün olmamaktadır. Görünüşe göre mikroorganizmalar bizlerden her zaman bir adım önde bulunmakta, antibiyotik tarama programlarından daha hızlı olarak, alternatif direnç mekanizmalarını geliştirmektedirler. Aynı zamanda virüslerle ortaklık kurarak kalkanlarını sağlamlaştırmakta ve güçlerini artırmaktadırlar. Diğer taraftan patojen organizmalar patojen olmayan ancak antibiyotiklere direnç geni taşıyan organizmalardan da bu direnç genlerini kolayca alabilmekte, doğal ortamlarında özellikle toprakta bulunan ve henüz keşfedilmemiş antibiyotiklerle insanlardan önce tanışmaktadırlar. Durum böyle iken ve epidemik salgınlar başlamadan önce yeni ve hızlı etkili antibiyotik aktif maddelerinin bir an önce keşfedilmesi yerinde olacaktır. Bunun için de bu tür çalışmalara öncelik verilmesi, siyasi düşüncelerden kurtulup; din, dil, ırk ayrımı gözetmeden gerekli kaynağın ayrılması, ilgili teknolojilerin ülkemize getirilmesi gereklidir.

6. KAYNAKLAR

1. Aharonowitz, Y. and Demain A.L., 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother., 14: 159-164.
2. Aharonowitz, Y., 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. Annu. Rev. Microbiol., 34: 209-33.
3. Ahmed, A.J., Ali, S.T., Weinbaum, D. and Goldberg, E., 1996. *Streptomyces* infection in AIDS presenting with pneumonia and monoarthritis. Infec. Dis. in Clin. Prac., 5: 207-208.
4. Alsan, S., 1999. Yarının Antibiyotikleri. TÜBİTAK, Bilim ve Teknik Dergisi. Sayı: 376.s.42.
5. Al-Tai, A., Kim, B., Kim, S.B., Manfio, G.P. and Goodfellow, M., 1999. *Streptomyces malaysiensis* sp. nov., a new *streptomycete* species with rugose, ornamented spores. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 1395-1402.
6. Andersson, M.A., Weiss, N., Rainey, F. and Salkinoja-Salonen, M.S., 1999. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centers. J. Appl. Microbiol., 86:622-634.
7. Anderson, A.S. and Wellington, M.H.E., 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 797- 814.
8. Anonim. Antibiotics on the Farm. From the New York Times. January 9, 2001.
9. Anonim. Post Penicillin Antibiotics. 2006a.
<http://www.ucl.ac.uk/histmed/PDFS/Publications/Witness/wit6.pdf>
10. Anonim. Novel Antibiotics Database. <http://www.nih.go.jp/~jun/NADB/search.html>. 2006b
11. Athalye, M., Lacey, J. and Goodfellow, M., 1981. Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes using Rifampicin. J. Appl. Bacteriol., 51: 289-297.
12. Becker, B., Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A., 1965. Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic *Actinomycetes*. Applied Microbiology, Vol. 13, No:2. Printed in U.S.A.

13. Bentley, R. and Meganathan, R., 1981. Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in *streptomycetes*. FEBS lett., 125: 220-222.
14. Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tárraga, A..M., Challis, G.L., Thomson, N.R. and James, K.D., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 417: 141-147.
15. Brenner, D.J., Staley, J.T. and Krieg, N.R., 2001. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. Boone DR, Castenholz RW (Eds.), Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, Volume 1, pp.27-48.
16. Boer, W.D. Paulien, J.A., Gunnewiek, K., Lafeber, P., Janse, J.D., Bendien, E. and Woldendorp, J.W., 1998. Anti-Fungal Properties of Chitinolytic Dune Soil Bacteria. Soil Biol. Biochem., 30:193-203.
17. Boucek-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P. and Jouan, B., 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S.europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S.reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 91-99.
18. Cheng, CY. and Li, YK., 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. Biotechnol. Appl. Biochem., 32:197-203.
19. Cross, T., 1981. Aquatic *actinomycetes*: a critical survey of the occurrence, growth and role of *actinomycetes* in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol., 50: 397-423.
20. Cross, T. Growth and Examination of *Actinomycetes* Some Guidelines. In Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Vol:4 p. 2340-2343. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
21. Demain, A.L., 1998. Induction of microbial secondary Metabolism. Int. Microbiol., 1:259-264.

22. Demain, A.L., 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 455-463.
23. Denizci, A.A. Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma. Doktora tezi. Kod no: 10 0600 0000 014. EÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü Bornova-İzmir. 1996.
24. Doering-Saad, C., Kämpfer, P., Manulis, S., Kritzman, G., Schneider, J. and Zakrzewska-Czerwinska, J., 1992. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3932-3940.
25. Durham, S., 2005. Detectives Search for Antimicrobial-Resistant Organisms. Agric. Res., 53:3, p.18.
26. Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D. and Wellington, E.M.H., 1998. Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within *streptomyces* isolated from soil. Appl. Environ. Microbiol., 64: 5061-5063.
27. Gladek, A., Mordarski, M., Goodfellow, M. and Williams, S.T., 1985. Ribosomal ribonucleic acid similarities in the classification of *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Lett., 26: 175-180.
28. Gooday, G. W., 1990a. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. Biodegradation 1: 177-190.
29. Gooday, G. W., 1990b. The ecology of chitin degradation. In Adv. Microb. Ecol., (K. C. Marshall, Ed.), Vol. 11, pp. 387-430. Plenum Press, New York.
30. Goodfellow, M. and Board, R. G. Microbiological classification and identification. Society for Applied Bacteriology, Symposium series, No: 8. Academic Press, London, New York. 1980.
31. Goodfellow, M. and Williams, S. T., 1983. Ecology of *Actinomycetes*. Annu. Rev. Microbiol., 37: 189-216.
32. Goodfellow, M., Lacey, J. and Todd, C., 1987. Numerical classification of thermophilic *streptomyces*. J. Gen. Microbiol., 133: 3135-3149.

33. Goodfellow, M. and Simpson, K.E., 1987. Ecology of *streptomycetes*. Front. Appl. Microbiol., 2: 97-125.
34. Goodfellow, M. Suprageneric Classification of *Actinomycetes*. In Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Vol:4 p. 2333-2339. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
35. Goodfellow, M., Ferguson, E. V., and Sanglier J. J., 1992. Numerical Classification and identification of *Streptomyces* species. Gene. 115: 225-233.
36. Gündüz, T. İnstrümental Analiz. 5. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara. 1999.
37. Hagedorn, C., 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. Appl. Environ. Microbiol..32: 368-375.
38. Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. and Rainey, F.A., 1997. Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 202-206.
39. Hamby, M.K. and Crawford, D.L., 2000. The enhancement of plant growth by selected *Streptomyces* species. Abstracts of the 100th General Meeting of the ASM, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 567.
40. Harindran, J., Gupte, T.E. and Naik, S.R., 1999. HA-1-92, A new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* CDRIL-312: Fermentation, isolation, purification and biological activity W. J. Microbiol. Biotech., 15: 425-430.
41. Hatano, K., 1999. Replacement of ATCC 21273, the current type strain of *Streptomyces rameus* Shibata 1959, with IFO 3782: Request for an Opinion. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 931-932.
42. Healy, F.G. and Lambert, D.H., 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. Int. J. Syst. Bacteriol., 41: 479-482.
43. Hirvonen, M.R., Nevalainen, A., Makkonen, N., Mönkkönen, J. and Savolainen, K., 1997a. *Streptomyces* spores from moldy houses induce nitric oxide, TNF α and IL-6 secretion from

- RAW264.7 macrophage cell line without causing subsequent cell death. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 3: 57-63.
44. Hirvonen, M.R., Ruotsalainen, M., Savolainen, K. and Nevalainen, A., 1997b. Effect of viability of *actinomyce* spores on their ability to stimulate production of nitric oxide and reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Toxicol.* 124: 105-114.
 45. Hochuli, E., 1992. Purification Techniques for Biological Products. *Pure Appl. Chem.*, 64:169-184.
 46. Hopwood, D., 2004. New Drugs by Manipulating *Streptomyces* genes *Microbiology Today*. May, vol: 34.
 47. Horinouchi, S. and Beppu, T., 1992. Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene*, 115: 167-172.
 48. Hoster, F., Schmitz, J.E. and Daniel, R., 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66: 434-442.
 49. Hsieh, C.J. and Jones, G.H., 1995. Nucleotide Sequence, Transcriptional Analysis, and Glucose Regulation of the Phenoxazinone Synthase Gene (*phsA*) from *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.*, 22: 5740-5747.
 50. Huddleston, A.S., Cresswell, N., Neves, M.C.P., Beringer, J.E., Baumberg, S., Thomas, D.I. and Wellington, E.M.H., 1997. Molecular detection of streptomycin-producing *streptomycetes* in Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1288-1297.
 51. Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A. and Nevalainen, A., 2002. Fungi and *actinobacteria* in moisture-damaged building materials - concentrations and diversity. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 49: 27-37.
 52. Jendrossek, D., Tomasi, G. and Kroppenstedt, R.M., 1997. Bacterial degradation of natural rubber. A privilege of *actinomycetes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 150: 179-188.

53. Jongsik, C., Hong-Duk, Y., Yang-Ig, Y., Hongkum, L., Min-Young, K., Yung-Chil, H. and Sa-Ouk, K., 1997. *Streptomyces seoulensis* sp. nov.. J. Syst. Bacteriol., 47:492-498.
54. Jussila, J., Ruotsalainen, M., Komulainen, H., Savolainen, K., Nevalainen, A. and Hirvonen, M.R., 1999. *Streptomyces anulatus* from indoor air of moldy houses induce NO and IL-6 production in a human alveolar epithelial cell-line. Environ. Toxicol. Pharmacol., 7: 261-266.
55. Kämpfer, P., Kroppenstedt, R.M. and Dott, W., 1991. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. J. Gen. Microbiol., 137: 1831-1891.
56. Kataoka, M., Ueda, K., Kudo, T., Seki, T. and Yoshida, T., 1997. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Lett., 151: 249-255.
57. Kerr, J.R., 1999. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. Microbial Ecol. Heal. Dis., 11: 129–142.
58. Khan, M.R. and Williams, S.T., 1975. Studies on the ecology of *actinomycetes* in soil-VIII. Distribution and characteristics of acidophilic *actinomycetes*. Soil Biol. Biochem., 7: 345-348.
59. Kim, D., Chun, J., Şahin, N., Hah, Y.C. and Goodfellow, M., 1996. Analysis of thermophilic clades within the genus *Streptomyces* by 16S ribosomal DNA sequence comparisons. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 581-587.
60. Kim, B., Şahin, N., Minnikin, D.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M. and Goodfellow, M., 1999. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalkalitolerans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 7-17.
61. Korn-Wendish, F. and Schneider, J., 1992. Phage-typing - a useful tool in *actinomycete* systematics. Gene, 115: 243-247.
62. Kotimaa, M., 1990. Spore exposure arising from stored hay, grain and straw. J. Agric. Sci. Fin. 62: 285-291.

63. Kutzner, K.J., 1986. The family *Streptomycetaceae*. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, vol. 2, Springer-Verlag, New York, pp. 2028-2090.
64. Labeda, D.P. and Lyons, A.J., 1991a. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the *Streptomyces cyaneus* cluster. *Syst. Appl. Microbiol.*, 14: 158–164.
65. Labeda, D.P. and Lyons, A.J., 1991b. The *Streptomyces violaceusniger* cluster is heterogeneous in DNA relatedness among strains: emendation of the descriptions of *S. violaceusniger* and *Streptomyces hygroscopicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 398–401.
66. Labeda, D.P. and Lyons, A.J., 1992. DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 532-535.
67. Labeda, D.P., 1992. DNA-DNA hybridisation in the systematics of *Streptomyces*. *Gene*, 115:249-253.
68. Labeda, D.P., 1993. DNA relatedness among strains of the *Streptomyces lavendulae* phenotypic cluster group. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 822–825.
69. Labeda, D.P., Lechevalier, M.P. and Testa, R.T., 1997. *Streptomyces stramineus* sp. nov., a new species of the verticillate streptomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 747–753.
70. Lacey, J. *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*. Edited by G. Sykes and F. Skinner. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No: 2. Academic Press London-New York. 1973.
71. Lacey, J. and Crook, B., 1988. Fungal and *actinomycete* spores as pollutants of the work place and occupational allergens. *Anna. Occup. Hyg.*, 32: 515-533.
72. Langham, C.D., Williams, S.T., Sneath, P.H.A. and Mortimer, A.M., 1989. New Probability Matrices for Identification of *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.*, 135:121-133.
73. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F., 2000. Rare genera of *actinomycetes* as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 399-405.

74. Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A., 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic *actinomycetes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20: 435-443.
75. Lechevalier, M. P., Bievre, C. D. and Lechevalier, H. A., 1977. Chemotaxonomy of Aerobic *Actinomycetes*: Phospholipid Composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5: 249-260.
76. Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A., 1980. The chemotaxonomy of *actinomycetes*. In *Actinomycete Taxonomy*, Special publication, 6:111-112.
77. Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A., 1985. Biology of *actinomycetes* not belonging to the genus *Streptomyces*. In *Biology of Industrial Microorganisms*. 315-348. Ed. by A.L. Demain and N.A. Solomon, Butterworths.
78. Lechevalier, H.A. The *Actinomycetes* III, A Practical Guide to Generic Identification of *Actinomycetes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 4: 2344-2347. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
79. Levy, S.B. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle. New York: Plenum Press, 1992.
80. Li, X., 1997. *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a New Cellulolytic Member of the Genus *Streptomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 443-445.
81. Locci, R. *Streptomyces* and related Genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 4: 2451-2508. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
82. McCarthy, A.J. and Williams, S.T. Methods for Studying the Ecology of *Actinomycetes*. *Methods In Microbiology*. Vol.: 22. 533-363. Ed. by R. Grigorova and J.R. Norris Academic Press Limited, London. 1990.
83. McDowall, K.J., Thamchaipenet, A. and Hunter, I.S., 1999. Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at the level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. *J. Bacteriol.*, 181: 3025-3032.

84. McNeil, M.M. and Brown, J.M., 1994. The medically important aerobic *actinomycetes*: epidemiology and microbiology. Clin. Microbiol. Rev., 7: 357-417.
85. Mehling, A., Wehmeier, U.F. and Piepersberg, W., 1995. Nucleotide sequences of *streptomycete* 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for *streptomycetes* using PCR. Microbiol., 141: 2139-2147.
86. Mishra, S.K., Gordon, R.E. and Barnett, D.A., 1980. Identification of *nocardiae* and *streptomycetes* of medical importance. J. Clin. Microbiol., 11: 728-736.
87. Moran, M.A., Rutherford, L.T. and Hodson, R.E., 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3695-3700.
88. Morosoli, R., Shareck, F. and Kluepfel, D., 1997. Protein secretion in *streptomycetes*. FEMS Microbiol. Lett., 146: 167-174.
89. Murtoniemi, T., Nevalainen, A., Suutari, M., Toivola, M., Komulainen, H. and Hirvonen, M.R., 2001. Induction of cytotoxicity and production of inflammatory mediators in RAW264.7 macrophages by spores grown on six different plasterboards. Inhal. Toxicol., 13: 233-247.
90. Navarro, F., 2006. Acquisition and horizontal diffusion of β -lactam resistance among clinically relevant microorganisms. Int. Microbiol., 9:79-81.
91. Nielsen, M.N. and Winding, A., 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute, Denmark. Technical Report No. 388.
92. Ochi, K., 1995. A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30. Int. J. Syst. Bacteriol., 45: 507-514.
93. Ojanen, T.H., Katila, M.L., Mäntyjärvi, R., Seppänen, H., Muittari, A., Kuusisto, P. and Virtanen, P., 1983. Exposure of water consumers to mesophilic *actinomycetes*. J. Hyg., 91:535-541.
94. Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C. and Shinose, M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the

- ability of producing secondary metabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 12215-12220.
95. Oskay, M., Tamer, A.Ü. and Azeri, C., 2004. Antibacterial activities some *actinomycetes* isolated from farming soils of Turkey. Afr. J. Biotechnol., 3 : 441-446.
 96. Öner, M., Tamer, A. Ü. ve Bursalıoğlu, M., 1987. Rifamisin Kompleksinin Üretimi. Mikrobiyoloji Bülteni, 21: 296-300.
 97. Öner, M. *Actinomycetes* (Selman A. Waksman 1967' den çeviri). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 89. EÜ. Basımevi, Bornova-İzmir. 1989.
 98. Pandza, K., Pfalze, G., Cullum, J. and Hranueli, D., 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. Microbiol., 143:1493-1501.
 99. Parkinson, D., Gray, T.R.G. and Williams, S.T. Methods for Studying Ecology of Soil Microorganisms. IBP handbook No: 19. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. 1971.
 100. Pissowotzki, K., Mansouri, K. and Piepersberg, W., 1991. Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes strELMB2N. Mol. Gen. Genet., 231: 113-123.
 101. Prescott, L.M., Harely, J.P., and Klein, D.A. Microbiology W.C. Brown Publishers, New York, p. 491. 1990.
 102. Raatikainen, O., 1995. Analysis and characterization of antifungal antibiotics from *Streptomyces* strains antagonistic to plant pathogenic fungi. Dissertation. Kuopio University Publications C/36. Kuopio University Printing Office.
 103. Rachev, R., Gesheva, V., Tewfike, T., Bojkova, S. and Zvetkova, R., 2003. A new antibiotic, TH818, and its properties. Biotechnol. Appl. Biochem., 37: 21–26.
 104. Reis, S.A., Moussatche, N. and Damaso, C.R.A., 2006. FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopoxvirus infection in cell culture. J. Appl. Microbiol., doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02855.x.

105. Ridell, M., Wallerström, G., Williams, S.T., 1986. Immunodiffusion analysis of phenetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptoverticillium* and *Nocardia*. Syst. Appl. Microbiol., 8: 24-27.
106. Roberts, M.C., 2000. Antibiotic Toxicity, Interactions and Resistance Development Periodontology, 28: 280-297.
107. Roberts, M.A. and Crawford, D.L., 2000. Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. Appl. Environ. Microbiol., 66: 2555-2564.
108. Roponen, M., Toivola, M., Meklin, T., Ruotsalainen, M., Komulainen, H., Nevalainen, A. and Hirvonen, M.R., 2001. Differences in inflammatory responses and cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages induced by *Streptomyces anulatus* grown on different building materials. Indoor Air, 11:179-184.
109. Rosselló-Mora, R. and Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev., 25: 39-67.
110. Roy, R.N., Laskar, S. and Sen, S.K., 2006. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. Microbiol. Res. 161: 121-126.
111. Ruiz-Arribas, A., Fernandez-Abalo, J.M., Sanchez, P., Garda, A.L., and Santamaria, R.L., 1995. Overproduction, Purification, and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. Appl. Environ. Microbiol., 48: 2414-2419.
112. Sadowsky, M.J., Kinkel, L.L., Bowers, J.H. and Schottel, J.L., 1996. Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. Appl. Environ. Microbiol., 62: 3489-3493.
113. Schlegel, H.G. General Microbiology. Translated by M. Korgut. Seventh Edition. Cambridge University Press, Cambridge. 1995.
114. Sembiring, L., Ward, A.C. and Goodfellow, M. 2000. Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*. Antonie van Leeuwenhoek, 78: 353-366.

- 115.Sheldon, P.J., Johnson, D.A., August, P.R., Liu, H.W. and Sherman, D.H., 1997. Characterization of a Mitomycin-Binding Drug Resistance Mechanism from the Producing Organism, *Streptomyces lavendulae*. J. Bacteriol., 38: 1796-1804.
- 116.Sheldon, P.J., Mao, Y., He, M. and Sherman, D.H., 1999. Mitomycin Resistance in *Streptomyces lavendulae* Includes a Novel Drug-Binding-Protein-Dependent Export System. J. Bacteriol., 40: 2507-2512.
- 117.Shimizu, M., Nakagawa, Y., Sato, Y., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, Y. and Kunoh, H., 2000. Studies on Endophytic *Actinomycetes* (I) *Streptomyces* sp. Isolated from *Rhododendron* and Its Antifungal Activity. J. Gen. Plant Pathol., 66: 360-366.
- 118.Shirling, E. B. and Gottlieb, D., 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. Int. J. Syst. Bacteriol., 16: 313-340.
- 119.Spiewack, R., Gora, A. and Dutkiewicz, J., 2001. Work-related skin symptoms and type I allergy among eastern-Polish farmers growing hops and other crops. Anna. Agric. Environ. Med., 8: 51-56.
- 120.Stackebrandt, E., Liesack, W. and Witt, D., 1992. Ribosomal RNA and rDNA sequence analysis. Gene, 115: 255-260.
- 121.Stackebrandt, E. and Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 846-849.
- 122.Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 479-491.
- 123.Staneck, J. L. and Roberts, G. D., 1974. Simplified Approach to Identification of Aerobic *Actinomycetes* by Thin-Layer Chromatography. Appl. Microbiol., 22: 226-231.
- 124.Steingrube, V.A., Wilson, R.W., Brown, B.A., Jost, K.C., Blacklock, Z., Gibson, J.L. and Wallace, R.J., 1997. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic *actinomycetes*, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*,

- and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. J. Clin. Microbiol., 35: 817-822.
- 125.** Suutari, M., Lignell, U., Hirvonen, M.R. and Nevalainen, A., 2000. Growth pH ranges of *Streptomyces* spp. ASM News, 66: 588.
- 126.** Şahin, N. and Uğur, A., 2003. Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates. Turk. J. Biol., 27: 79-84.
- 127.** Şahin, N., 2005. Antimicrobial activity of *Streptomyces* species against mushroom blotch disease pathogen. J. Basic Microbiol., 45: 64–71.
- 128.** Tabarez, M.R. Discovery of the new antimicrobial compound 7-O-malonyl macrolactin A Doctoral Thesis, Faculty of Natural Sciences, University of Carolo-Wilhelmina. 2005.
- 129.** Taddei, A., Jose-Rodriguez, M., Ernesto Marquez-Vilchez, E. and Castelli, C., 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies I. Microbiol. Res., 161:222-231.
- 130.** Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Kumazawa, Y., Kohriyama, H., Suzuki, M., Miura, K.I. and Momose, H., 1997. Molecular phylogenetic characterisation of *Streptomyces* protease inhibitor family. J. Mol. Evol., 44: 542-551.
- 131.** Takeuchi, T., Sawada, H., Tanaka, F. and Matsuda, I., 1996. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 476-479.
- 132.** Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. 3. ve 4. Sınıflar için Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu. T.C. Anadolu Üniversitesi, Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları No: 74 Eskişehir, 260 sayfa. 1989.
- 133.** Tresner, H.D. and Backus, E.J., 1963. System of color wheels for *streptomycete* taxonomy. Appl. Microbiol., 11: 335-338.
- 134.** Turhan, G. A., 1981a. New race of *Streptomyces ochraceiscleroticus* in the biological control of some soil-borne plant pathogens I. Effects of isolate C/2-9 on some of the most important soil-borne fungi in vitro. J. Plant Dis. Protec., 88:373-381.

135. Turhan, G. A., 1981b. New race of *Streptomyces ochraceiscleroticus* in the biological control of some soil-borne plant pathogens II. In vivo studies on the possibilities of using C/2-9 against some important diseases. J. Plant Dis. Protec., 88: 422-434.
136. Turhan, G. and Grossmann, F., 1986. Investigation of a Great Number of *Actinomycete* Isolates on Their Antagonistic Effects against Soil-Borne Fungal Plant Pathogens by an Improved Method. J. Phytopathol., 116: 238-243.
137. Turhan, G. and Turhan K., 1989. Suppression of Damping-off on Pepper caused by *Pythium ultimum* Trow and *Rhizoctonia solani* Kühn by Some New Antagonists in Comparison with *Trichoderma harzianum* Rifai. J. Phytopathol., 126: 175-182.
138. Usuki, Y., Adachi, N., Fujita, K., Ichimura, A., Lioa, H. and Taniguchi, M., 2006. Structure-activity relationship studies on UK-2A, a novel antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. 517-02. Part 5: Roles of the 9-membered dilactone-ring moiety in respiratory inhibition Bioorg. Med. Chem. Lett., 16: 3319-3322.
139. Xu, L.H., Li, Q.R. and Jiang, C.L., 1996. Diversity of soil *actinomycetes* in Yunnan, China. Appl. Environ. Microbiol., 62: 244-248.
140. Wang, Y., Zhang, Z.S., Ruan, J.S., Wang, Y.M. and Ali, S.M., 1999. Investigation of *actinomycete* diversity in the tropical rainforests of Singapore. J. Ind. Microbiol. Biotech., 23: 178-187.
141. Wassenaar, T.M., 2005. Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and Implications for Human Health. Cri. Rev. Microbiol., 31:155-169.
142. Watve, M.G., Tickoo, R., Maithili, M., Jog, B. and Bhole, D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch. Microbiol., 176: 386-390.
143. Wellington, E.M.H., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J. and Jorgensen, N.O.G., 1992. Taxonomic status of *Kitasatosporia* and proposed unification with *Streptomyces* on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of *Streptomyces* Waksman and Henrici1943AL. Int. J. Syst. Bacteriol., 42: 156-160.
144. Wendisch, F.K. and Kutzner, H.J. The family *Streptomycetaceae*. In Prokaryotes. Second edition. Vol. 1. p. 922-995. Ed. by A. Ballows et.al, Springer Verlag. 1991.

145. Williams, S. T. *Streptomyces* in the Soil Ecosystem. Edited by M. Mordarski, W. Kuryeowicz and J. Jeljaszewicz. Proceedings of the International Symposium on *Nocardia* and *Streptomyces*. Warsaw, 1976.
146. Williams, S.T., Goodfellow, M., Wellington, E.M.H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J. and Mortimer, A.M., 1983. A probability matrix for identification of some *streptomyces*. J. Gene.Microbiol., 129: 1815-1830.
147. Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943.339^{AL}. In Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Vol:4, 2452-2492. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
148. Witt, D. and Stackebrandt, E., 1990. Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943, 339AL. Syst. Appl. Microbiol., 13: 361-371.
149. Woese, C.R., 1987. Bacterial Evolution. Microbiol. Rev., 51: 221-271.
150. Wood, S., Williams, S.T. and White, W.R., 1985. Potential sites of geosmin production by *streptomyces* in and around reservoirs. J. Appl. Microbiol., 58: 319-326.
151. Vining, L.C., 1990. Functions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol., 44:395-427.
152. Volff, J.N. and Altenbuchner, J., 1998. Genetic Instability of the *Streptomyces* chromosome. Mol. Microbiol., 27: 239-246.
153. Yamamura, H., Hayakawa, M. and Iimura, Y. 2003. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. J. Appl. Microbiol., 95: 677-685.
154. Yuan, W.M. and Crawford, D.L., 1995. Characterisation of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol., 61: 3119-3128.
155. Zhang, Z., Wang, Y. and Ruan, J., 1997. A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Lwai and Tanaka 1982). Int. J. Syst. Bacteriol., 47:1048-1054.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Mustafa OSKAY
Doğum Tarihi	03.03.1975
Doğum Yeri	Sivaslı/Uşak
Mezun Olduğu İlkokul	Kökez İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Ortaokul	Kökez İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Lise	Sivaslı Lisesi
Okuduğu Fakülte	E.Ü. Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Fakülte Bitirme Tarihi	1997
Aldığı Ünvan	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ağırlıklı Biyolog
Yüksek Lisans	CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Bitirme Tarihi	Ocak-2002
Yabancı Dil	İngilizce
Yazışma Adresi	CBU/Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye Kampüsü, 45030, Manisa
Telefon	236 241 2151/122
Faks	236 241 2158
e-mail	mustafa.oskay@bayar.edu.tr, oskaymustafa@hotmail.com
Çalıştığı Kurum	CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi, Araştırma Görevlisi.