

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**LOKAL *STREPTOMYCES* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİKANSEROJEN ÖZELLİKTE BİYOAKTİF METABOLİT ÜRETİM
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Gizem TERZİ

Danışman

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

II. Danışman

Prof. Dr. Şevki ARSLAN

SAMSUN
2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Gizem TERZİ tarafından, Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN danışmanlığında hazırlanan “Lokal *Streptomyces* Suşlarının Antimikrobiyal ve Antikanserojen Özellikte Biyoaktif Metabolit Üretim Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 04.01.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. XXXX XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi XXXX XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Doç. Dr. XXXX XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Prof. Dr. XXXX XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Prof. Dr. XXXX XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

İmza

28 /02 / 2022

Gizem TERZİ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Lokal *Streptomyces* Suşlarının Antimikrobiyal ve Antikanserojen Özellikte Biyoaktif Metabolit Üretim Potansiyellerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 22.12.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

İmza

28/02/ 2022

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

ÖZET

LOKAL *STREPTOMYCES* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİKANSEROJEN ÖZELLİKTE BİYOAKTİF METABOLİT ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gizem TERZİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Şubat/2022

Danışman: Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Enfeksiyon hastalıkları ve kanserin tedavisinde kullanılan ilaçların etkisiz kalması yeni ilaç keşifleri için yeni biyoaktif bileşiklerin tanımlanmasını gerektirmektedir. Bu anlamda, Aktinomiset grubuna dahil *Streptomyces* sp. antimikrobiyal, antifungal ve antitümör özellikli 7600 bileşiği üreten çok önemli bir cinstir. Çok çeşitli habitatlarda yaşayan bu bakteriler genomlarında sahip oldukları farklı biyosentetik gen kümelerinin varlığı nedeni ile şu an tanımlanan bileşiklere kıyasla çok daha fazla sayıda bileşiği biyosentez potansiyeline sahiptirler. Bununla birlikte, *Streptomyces* genomlarının ancak %10'u standart laboratuvar koşullarında sentezlenebilmektedir.

Bu tez kapsamında, Amasya elma bahçesi toprağından dokuz adet *Streptomyces* sp. suşu izole edilmiştir. 16S rRNA dizi analizleri sonucunda BLAST veritabanında yer alan antimikrobiyal ve antitümör bileşik üreticisi *Streptomyces* sp. suşlarına %99 oranında dizi özdeşliği gösterdikleri belirlenmiştir. İzole edilen lokal *Streptomyces* sp. suşları ISP4 besiyeri kullanılarak katı ve sıvı fermantasyonlarında kültüre alınmıştır. 120 saatlik sıvı fermantasyona ait süpernatantlar ve metanol ile ekstrakte edilen pelletleri biyoaktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca, ISP4 agarda katı fermantasyondan elde edilen miseller metanol ile ekstrakte edilmiştir. Her bir özütün antimikrobiyal aktiviteleri sekiz indikatör suş kullanılarak agar disk difüzyon yöntemi ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Aynı zamanda, ekstraktların sitotoksik etkileri MTT deneyleri ile tespit edilmiştir. Farklı fermantasyon koşullarında suşlara ait özütlerin antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirildiğinde en iyi antibakteriyel etki 256µg/ml MIC değerleri ile özellikle gram pozitif olanlara karşı sıvı kültürlerin hücrelerine ait metanol özütleri ile katı kültürlerin metanol özütlerinden elde edilmiştir. Sitotoksikite ise en iyi sıvı kültürlerin hücrelerine ait metanol özütleri ile özellikle CaCO₂ kanserli hücre hattına karşı elde edilmiştir (GA3 için EC₅₀: 64.02µg/ml, GA2 için EC₅₀:77.2 µg/ml).

Anahtar Sözcükler: *Streptomyces* sp., Ekstraksiyon, Fermantasyon, Antimikrobiyal aktivite, Sitotoksikite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTICARCINOGENIC BIOACTIVE METABOLITE PRODUCTION POTENTIALS OF LOCAL *STREPTOMYCES* STRAINS

Gizem TERZİ

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department Of Agricultural Biotechnology

Master, February/2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslihan KURT KIZILDOĞAN

The ineffectiveness of drugs used in the treatment of infectious diseases and cancer necessitates identification of novel bioactive compounds for new drug discoveries. In this sense, *Streptomyces* sp. is a very important genus producing 7600 compounds with antimicrobial, antifungal, and antitumor activity. Due to the presence of many different biosynthetic gene clusters in their genomes, these bacteria, living in a wide range of habitats, have a greater number of bioactive metabolite production potential compared to the currently identified ones. However, only 10% of *Streptomyces* genomes can be synthesized under standard laboratory conditions.

In this thesis, eight *Streptomyces* sp. strains were isolated from Amasya apple orchard soil. As a result of 16S rRNA sequence analysis, they showed 99% sequence identity to the antimicrobial and antitumor compound producer *Streptomyces* sp. strains deposited in the BLAST database. Local *Streptomyces* sp. strains were cultured in solid and liquid fermentations using ISP4 medium. The supernatants of 120 hours of liquid fermentation and their pellets extracted with methanol were used in bioactivity studies. In addition, micelles obtained from solid fermentation on ISP4 agar were extracted with methanol. Antimicrobial activities of each extract were determined by agar disc diffusion method and broth microdilution methods using nine indicator strains. Also, the cytotoxic effects of the extracts were determined by MTT assays. When the antimicrobial and cytotoxic activities of the extracts of the strains were evaluated it was determined that the best antibacterial effect was obtained from the methanol extracts of the cells of the liquid cultures and the methanol extracts of the solid cultures, especially against the gram positive ones, with MIC values of 256 µg/ml. The best cytotoxic value was obtained using methanol extracts of the cells of liquid cultures, especially against the CaCO₂ cancer cell lines (EC₅₀: 64.02 µg/ml for GA3, EC₅₀: 77.2 µg/ml for GA2).

Keywords: *Streptomyces* sp., Extraction, Fermentation, Antimicrobial activity, Cytotoxicity.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN'a, ikinci danışmanım Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a başta olmak üzere öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım,

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşacağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli araştırma görevlisi hocam Çiğdem OTUR'a, desteğini esirgemeyen Büşra ABANOZ SEÇGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan sevgili aileme ve canım arkadaşlarım N. Esin ARDICI, Aleyna SUYABATMAZ'a ve her zaman yanımda olan araştırma görevlisi hocam İlkay SEVGEN KÜÇÜK'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, PYO.ZRT.1904.17.053 nolu Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Gizem TERZİ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Sekonder Metabolitler	3
2.2. Aktinomisetler (Filum: Aktinobakteriler): <i>Streptomyces</i> sp.	4
2.3. <i>Streptomyces</i> sp. ve Sekonder Metabolit Üretimi	6
2.4. <i>Streptomyces</i> sp. ve Endüstriyel Önemi	7
2.5. <i>Streptomyces</i> sp. ve Yeni Biyoaktif Molekül Keşfi	8
2.6. Mevcut Çalışma.....	9
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. <i>Streptomyces</i> sp. Suşlarının İzolasyonu	10
3.2. <i>Streptomyces</i> sp. Suşlar, Besiyerleri ve Kültür Koşulları	11
3.3. Besiyerleri	11
3.4. Tamponlar ve Çözeltiler	11
3.5. Kimyasallar ve Enzimler	12
3.6. DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi	12
3.7. Genomik DNA İzolasyonu, 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması.....	13
3.7.1. Genomik DNA izolasyonu	13
3.7.2. Genomik DNA izolasyonu	14
3.7.3. Agaroz jel elektroforezi	15
3.7.4. PZR ürünlerinin jelden saflaştırılması	15
3.7.5. Dizi analizi ve hizalama.....	15
3.8. Farklı organik çözücülerle biyoaktif moleküllerin ekstraksiyonu.....	15
3.9. Fermantasyon Deneyleri.....	16

3.9.1. Sıvı <i>Streptomyces</i> sp. kültürlerinin hazırlanması.....	16
3.9.2. Sıvı ISP4 kültürlerinden biyoaktif moleküllerin ekstraksiyonu	16
3.9.3. Katı <i>Streptomyces</i> sp. Kültürlerinin Hazırlanması ve Biyoaktif Moleküllerin Ekstraksiyonu	17
3.10. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	17
3.10.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi	17
3.10.2. Agar disk difüzyon yöntemi	18
3.10.3. Mikrodilüsyon yöntemi ile Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi	18
3.10.4. Minimum bakterisidal ve minimum fungisidal konsantrasyonların (MBC, MFC) belirlenmesi.....	19
3.11. Sitotoksite Deneyleri	20
3.11.1. Tripan mavi boyama testi ile hücre canlılığının saptanması	20
3.11.2. Hücre canlılık testi (MTT).....	20
4. BULGULAR.....	22
4.1. <i>Streptomyces</i> sp. Suşlarının İzolasyonu	22
4.2. Lokal izolatların ISP4 ve TSB Besiyerlerindeki Morfolojileri	22
4.3. Suşların ISP4 ve TSB Besiyerlerindeki Üreme Profilleri	26
4.4. Lokal İzolatların Tanımlanması	28
4.4.1. Genomik DNA izolasyonu	28
4.4.2. PZR amplifikasyonu	29
4.4.3. Blast analizleri	30
4.5. Suşlara Ait Farklı Organik Çözücülerle Elde Edilen Özütlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	34
4.6. Kültür Süpernatantlarında Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	34
4.6.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi	34
4.6.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi	35
4.6.3. Kültür süpernatantlarına ait MBC/MFC değerlerinin belirlenmesi	36
4.6.4. Kültür süpernatantlarına ait sitotoksosite verileri.....	37
4.7. ISP4 Sıvı Kültürlerine Ait Hücrelerin Metanol Özütlerinde Biyoaktivitenin Değerlendirilmesi	41
4.7.1. Agar disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi	42
4.7.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi	43
4.7.3. Pellet özütlerine ait MBC/MFC değerlerinin belirlenmesi.....	44
4.7.4. Pellet özütlerine ait sitotoksosite verileri.....	44

4.8. Katı Fermantasyon Ekstraksiyonlarında Biyoaktivitenin Belirlenmesi	51
4.8.1. Agar disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi	51
4.8.3. ISP4 katı kültürlerine ait metanol özütlerinin MBC/MFC değerlerinin belirlenmesi	53
4.8.4. ISP4 katı kültürlerine ait metanol özütlerinin sitotoksisite verileri	55
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	58
6. KAYNAKÇA.....	61
EK 1- BESİYERLERİN HAZIRLANMASI VE İÇERİKLERİ.....	70
EK 2- TAMPONLAR, ÇÖZELTİLER VE ANTİBİYOTİKLER.....	72
EK 3- KİMYASALLAR VE ENZİMLER.....	74
EK 4- ÖRNEKLEM İZNİ	76
EK 5- SUŞLARIN 16S rRNA GEN DİZİLERİNE AİT NÜKLEOTİT DİZİLERİ	77
ÖZ GEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

bç	Baz Çifti
BLAST	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
dk	Dakika
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
g	Gram
ISP4	Inorganic Salt Starch Medium
mg	Mili Gram
µg	Mikro Gram
L	Litre
ml	Mili Litre
µl	Mikro Litre
mM	Mili Molar
M	Metre
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sn	Saniye
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Streptomyces</i> sp. Morfolojisi (Jan, 2012).....	7
Şekil 2.1. Herring Sperm DNA'ya ait standart eğri.....	14
Şekil 2.2. Thoma lamındaki karelerin genel ve sınırlandırılmış görüşü	21
Şekil 4.1. İlyasköy (Amasya) elma bahçesi toprağından izole edilen ve <i>Streptomyces</i> sp. Morfolojik görünümüne sahip bakteriler (1, 3, 10, 27, 28, 30, 34, 35 ve 40 numaralı suşlar).....	22
Şekil 4.2. Lokal izolat 1'in ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	23
Şekil 4.3. Lokal izolat 3'ün ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	23
Şekil 4.4. Lokal izolat 10'un ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	23
Şekil 4.5. Lokal izolat 27'nin ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	24
Şekil 4.6. Lokal izolat 28'in ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	24
Şekil 4.7. Lokal izolat 30'un ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	25
Şekil 4.8. Lokal izolat 34'ün ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	25
Şekil 4.9. Lokal izolat 35'in ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	25
Şekil 4.10. Lokal izolat 40'ın ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi.....	26
Şekil 4.11. Lokal izolatların ISP4 ve TSB besiyerlerinde zaman bağılı üreme profilleri.....	27
Şekil 4.12. Lokal izolatlara ait genomik DNA'lar. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.....	28
Şekil 4.13. Lokal izolatların 16S rRNA bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.....	29
Şekil 4.14. Jel ekstraksiyonu sonrası elde edilen PZR ampikon fragmentleri M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder.....	29
Şekil 4.15. Suşlara ait filogenetik dendrogram.....	33
Şekil 4.16. Fermantasyon deneylerinde 120. saatte alınan <i>Streptomyces</i> sp. GA1, GA2, GA3 numaralı bakterilere ait süpernatantın indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.....	35
Şekil 4.17. Suşlara ait süpernatantlar kullanılarak elde edilen MBC/MFC değerleri.....	37

Şekil 4.18. <i>Streptomyces</i> sp. GA1 süpernatantlarından elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	38
Şekil 4.19. <i>Streptomyces</i> sp. GA2 süpernatantlarından elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	39
Şekil 4.20. <i>Streptomyces</i> sp. GA3 süpernatantlarından elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	40
Şekil 4.21. <i>Streptomyces</i> sp. GA5 süpernatantlarından elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	41
Şekil 4.22. <i>Streptomyces</i> sp. GA5, GA6, GA7 suşlarına ait pellet özütlerinin indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.....	42
Şekil 4.23. Suşlara ait pellet özütleri kullanılarak elde edilen MBC/MFC değerleri.....	44
Şekil 4.24. <i>Streptomyces</i> sp. GA1 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	45
Şekil 4.25. <i>Streptomyces</i> sp. GA2 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	46
Şekil 4.26. <i>Streptomyces</i> sp. GA3 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	47
Şekil 4.27. <i>Streptomyces</i> sp. GA6 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	48
Şekil 4.28. <i>Streptomyces</i> sp. GA8 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	49
Şekil 4.29. <i>Streptomyces</i> sp. GA10 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	50
Şekil 4.30. Katı ISP4 fermantasyonuna ait metanol özütlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	52
Şekil 4.31. Beş günlük katı fermantasyondan elde edilen metanol özütlerine ait MBC/MFC değerleri.....	54
Şekil 4.32. <i>Streptomyces</i> sp. GA1 katı kültürünün metanol özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	55
Şekil 4.33 <i>Streptomyces</i> sp. GA3 katı kültürünün metanol özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	56
Şekil 4.34, <i>Streptomyces</i> sp. GA8 katı kültürünün metanol özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları.....	57

Şekil 5.1. Çalışmada kullanılan markörler. a) Thermo Scientific-GeneRuler 1 kb DNA Ladder, b) Thermo Scientific-GeneRuler 1 kb Plus DNA77



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. <i>Streptomyces</i> cinsinin biyolojik sınıflandırması (Otur, 2017).....	6
Tablo 2.2. <i>Streptomyces</i> kökenli keşfedilen bazı antibiyotikler.....	7
Tablo 2.2. <i>Streptomyces</i> kökenli keşfedilen bazı antibiyotikler.....	8
Tablo 3.3. Numune alınan yerler ve kodlamaları.....	11
Tablo 3.2. Numune alınan yerler ve kodlamaları.....	15
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan PZR içerik ve koşulları.....	15
Tablo 4.1. İzole edilen genomik DNA'ların nanodrop ölçüm değerleri.....	28
Tablo 4.2. Dizi analizi ve hizalama sonucu çalışılan bakterilerin NCBI veritabanında benzerlik gösterdiği bakteriler ve benzerlik yüzdeleri.....	32
Tablo 4.3. Metanol ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütlerle ait antimikrobiyal aktivite sonuçları (mm cinsinden).....	34
Tablo 4.4. Kültür süpernatantlarının Agar-Well Difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite değerleri (mm cinsinden).....	35
Tablo 4.5. Suşlara ait süpernatantlar kullanılarak elde edilen MIC değerleri.....	41
Tablo 4.6. ISP4 sıvı kültürlerine ait hücrelerin metanol özütlerinde Agar Disk Difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (mm cinsinden).....	42
Tablo 4.7. Suşlara ait pellet özütleri kullanılarak elde edilen MIC değerleri.....	43
Tablo 4.8. Katı ISP4 fermantasyonuna ait metanol özütlerinden elde edilen zon ölçümleri (mm).....	51
Tablo 4.9. 5 günlük katı fermantasyondan elde edilen 3'er tane petrilerin 1'er tane petriye ekiminden elde edilen örneklerin metanol ekstraksiyonundan elde edilen ekstratlara ait minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri.....	53

1. GİRİŞ

Doğal ürünler, yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde baskın bir role sahiptir (Newman ve Cragg, 2016). Doğal ürünler olarak da adlandırılan sekonder metabolitler, farklı organizmalar tarafından üretilen küçük organik bileşiklerdir. Sekonder metabolitler genel olarak dört sınıfa ayrılır; düzenleyici işlemler, antagonist ajanlar, agrobiyolojikler (böcek ilaçları), herbisit, farmakolojik ajanlar, bunlara nörolojik ajanlar, immünomodülatörler, antitümörler ve enzim inhibitörleri dahildir (Harir, 2018).

Mikroorganizmalarca antibiyotik üretimi ile ilişkili genler üzerindeki çalışmalar 1980'li yılların başlarında başlamıştır. Bu çalışmalar sırasında büyük miktarda antibiyotik üretme yeteneğine sahip olan toprak bakterileri izole edilmiştir (Aminov, 2010). Antibiyotik üretim genleri, yapısal ve düzenleyici genler grubu olarak mikrobiyal genomlarda yerleşiktirler. Bu özellik ilk kez *Streptomyces coelicolor*'dan aktinorhodin gen gruplarının izolasyonu sonucunda ortaya çıkarılmış olup, bunu *Streptomyces*'den plazmidler ve fajların izolasyonu, transformasyon ve transfeksiyon metodlarının geliştirilmesi ve özellikle antibiyotik üretimini engelleyen mutantların izolasyonu gibi çalışmalar izlemiştir. Günümüzde özellikle sekonder metabolit genlerinin keşfi ve antibiyotik üretiminin belirlenmesi/arttırılması ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (Ventola, 2015).

Streptomyces sp. antimikrobiyal, antifungal, ve antitümör özellikli çoğu poliketid (PK) ve nonribozomal peptid (NRP) tipinde 7.600 bileşiği üreten çok önemli bir cinstir. Farklı habitatlarda yaşayan bu bakteriler genomlarında sahip oldukları farklı biyosentetik gen kümelerinin varlığı nedeni ile şu an tanımlanan bileşiklere kıyasla ki *Streptomyces* genom kapasitesini oluşturan biyoaktif bileşiklerin ancak %10'u standart laboratuvar koşullarında sentezlenebilmektedir, çok daha fazla sayıda bileşiği biyosentez potansiyeline sahiptirler (Ravikumar vd., 2012). Bu muazzam potansiyelin ortaya çıkarılması, özgün kimyasal yapıdaki ve antimikrobiyal, antikanser, antitümör özellikli yeni moleküllerden yararlanılması için rasyonel yaklaşımlar gerekmektedir Bununla birlikte, doğadan yeni mikroorganizmaların keşfi ve bunların biyoaktif molekül sentez kapasitelerinin belirlenmesi çalışmaları gerek yeni ortaya çıkan gerekse de görülme sıklığı artan hastalıklara ve antibiyotiğe dirençli patojenlere karşı yarışta kritik öneme sahiptir (Selim vd, 2021). Klasik veya rasyonel tüm çabalar neticesinde elde edilecek potansiyel antimikrobiyal, sitotoksik, ya da diğer

zellikte sekonder metabolit ürünler enfeksiyon hastalıkları ve kanser ile mücadelede mevcut ilaçlarla tedavi güçlüklerinin giderilmesinde dünyamızın karşı karşıya olduğu problemlerin çözümlenmesinde oldukça önemlidir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler; proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi canlılık faaliyetleri için birinci dereceden metabolik işlemlerde, büyümede gerekli olmayan, organizmanın bulunduğu ortama daha iyi adapte olmasını sağlayan moleküllerdir. Bu metabolitler canlı sistemlerdeki birçok biyolojik olayın gerçekleşmesini sağlarlar. Sekonder metabolitler; savunma, farklılaşma, düzenlenme, morfogenez, taşıma, hücrel haberleşme gibi olayların gerçekleşmesinde etkin rol oynayan önemli bileşiklerdir. Sekonder metabolitler, primer metabolizma sonucu oluşan ara metabolitlerden sentezlenirler. Bu yüzden sekonder metabolitler primer metabolizma orjinli bileşiklerdir. Ayrıca, çeşitli hücrel stres koşulları sekonder metabolit sentezinin başlamasında önemli sinyallerdir (Ozakın, 2010).

Sekonder metabolitlerin eski zamanlardan beri bitkiler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Mikrobiyal kaynaklı ilk sekonder metabolit olarak değerlendirilen mikofenolik asitin, bir fungus olan *Penicillium glaucoma* tarafından sentezlendiği, 1896'da Gosio tarafından tespit edilmiştir (Bali, 2011). İlk gerçek mikrobiyal sekonder metabolit olan penisilin ise 1928'de Fleming tarafından keşfedilmiştir. 1940'lı yıllara gelindiğinde penisilinin ilaç öncü molekülü olarak kullanılması mikrobiyal sekonder bileşikler için dönüm noktasıdır (Fair, 2014). Penisilinin hastalıkları iyileştirmedeki başarısı diğer mikroorganizmaların potansiyellerinin araştırılmasına zemin hazırlamıştır. Karasal mikroorganizmalar ile ilgili çalışmaların değerlendirilmesiyle penisilin gibi önemli biyolojik aktiviteye sahip sefalosporin, aminoglikozit, tetrasiklin ve poliketidleri içeren önemli antibakteriyel ajanlar keşfedilmiştir (Bali, 2015).

Mikrobiyal sekonder metabolitler arasında; antibiyotikler, pigmentler, toksinler ve simbiyozda etkili maddeler, enzim inhibitörleri, feromonlar, bağışıklık sistemine etki yapan bileşikler, reseptör antagonist ve agonistleri, pestisitler, antitümöral ajanlar ile bitki ve hayvan büyüme promotörleri bulunmaktadır. Üretimlerini; büyüme ortamındaki besinler, büyüme oranı, geri-besleme kontrolü (feed-back control), enzim inaktivasyonu ya da aktivasyonu etkileyebilmektedir (Bali, 2015). Mikroorganizmalarda sekonder metabolizmadan sorumlu olan gen kümeleri kromozomal DNA ve plazmitler üzerinde konumlanmışlardır (van Wezel ve McDowall, 2011).

Bugüne kadar 100.000’den fazla mikrobiyal metabolit olduğu tespit edilmiş fakat bunlardan oldukça az bir kısmı uygulama alanı bulmuştur (Mammadov, 2014). Mikrobiyal sekonder metabolitler, çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve hormon, antibiyotik, toksin, anti-migren ajanı, anti-kanser ajanı olarak veya insektisit olarak işlev görmektedirler (Singh, 2017).

Mikrobiyal sekonder metabolitlerin en iyi bilinen üreticileri Akinobakteri grubu içerisinde yer almaktadır. Bu grubun temsilcileri, tıp, veterinerlik uygulamaları ve tarımda kullanılan tüm doğal olarak türetilmiş antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisinin sentezinden sorumludurlar. Özellikle, *Streptomyces* sp. bu doğal moleküllerin birçoğunun üreticisidir (Barka vd, 2016; Jakubiec-Krzesniak vd, 2018).

2.2. Aktinomisetler (Filum: Aktinobakteriler): *Streptomyces* sp.

Filogenetik açıdan, Bakteri domaini içinde tanınan ana soylar arasında en büyük taksonomik birimlerden biri olan *Actinobacteria* filumu hem karasal hem de su (deniz dahil) ekosistemlerinde geniş çapta dağılmış serbest yaşayan organizmalar olup, genomlarında %70’e varan oranda yüksek G+C içeriğine sahip Gram-pozitif filamentli bakterilerdir (Segaran vd, 2017). Saprofitik özellikte olmaları sebebiyle çeşitli organik bileşikleri parçalayarak ayrıştırmakta ve besin döngüsüne yardımcı olmaktadır. Hiflerin uç uzantısı ve dallanmasının bir kombinasyonu ile büyürler. *Actinobacteria* kelimesi; Yunanca ışın (aktis veya aktin) ve mantar (mukēs) kelimelerinden türetilmiştir. Geleneksel olarak, aktinomisetler; funguslar ve bakteriler arasında geçiş formları olarak kabul edilmektedirler. Gerçekten de filamentli funguslar gibi, birçok Aktinobakteri miselyum üretir ve bu miselyal aktinomisetlerin çoğu sporulasyon yoluyla çoğalırlar. Aktinobakterilerde üreme ya miselin parçalanması yoluyla vejetatif mod ya da aseksüel mod ile gerçekleşir. Hava veya substrat miselyum üzerinde tek bir spor (monosporik), bir çift spor (bisporik) veya birçok spor (oligosporik) üretirler (Shivlata, 2015). Hava misellerinin çoğunlukla substrat misellerinden kalın, pamuksu, kadife veya toz halinde olup olmaması gibi farklı yapısal özellikleri *Streptomyces* cinsinin sınıflandırılmasında çok önemli bir özelliktir (Ranjani vd, 2016). *Streptomyces* sp. hava miselleri besin yetersizliği gibi stres koşullarında spor zincirleri oluşturmaktadır (Kumar, 2015).

Aktinomisetlerin çeşitliliği ve yeni molekülleri üretme kapasiteleri bu sınıfı diğer gruplar içerisinde fark edilir bir konumda bulundurmaktadır. Keşfedilen biyoaktif ikincil metabolitlerin, dikkat çekici şekilde antibiyotiklerin, antikanser

ajanların, anti-inflamatuar ajanların ve enzimlerin yaklaşık %50'sinin üretilmesinden sorumludurlar (Mohan ve Rajamanickam, 2018). Bu bağlamda, son 50 yıldır ilaç tarama programları çeşitli kaynaklardan yeni aktinomisetlerin verimli bir şekilde izole edilmesine odaklanmıştır (Dewi vd, 2017; Selim vd., 2021).

Patojenik bakterilerin, sıkça kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanması etkili ilaçların doğal ya da yapay yolla acilen üretilmeleri gerektiği konusunda bilim adamları hem fikirdir. Enfeksiyon hastalıkları ve kanserin tedavisinde kullanılan ilaçların etkisiz kalması yeni ilaç keşifleri için yeni biyoaktif bileşiklerin tanımlanmasını gerektirmektedir. Tümör dünya çapında insan ve bitki sağlığı için önemli bir ölümcül etkidir. Bununla birlikte, antitümör ajanların elde edilmesi ile ilgili çalışmalar günümüzde de devam edilmektedir. Mevcut araştırmacılar, on yıldan uzun süredir antitümör maddelerle ilgili temel araştırmalar yapmış ve yeni yöntemlerin aranmasının özellikle yeni antitümör maddesinin keşfi için önemli bir anahtar olduğunu kabul etmişlerdir (Ventola, 2015).

Antitümör özellikli sekonder metabolitlerin önemli birçoğu aktinobakterilerden izole edilmiştir. Klinik kullanımda olan doğal olarak türetilmiş antibiyotiklerin %70'inden fazlası toprak aktinomisetlerinden türetilir (Elardo vd., 2010). Her türlü ekosistemde bulunan bir prokaryot grubu olan Aktinomisetlerin en verimli sekonder metabolit üretici cinsi *Streptomyces* sp.'dir.

Streptomyces cinsi ilk kez 1943 yılında Walksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır (Williams vd, 1983). *Actionobacteria* ordosuna ait bir cins olan *Streptomyces*, *Streptomycetaceae* ailesinin bir üyesidir (Arai, 1997). Bergey'in Sistematik Biyoloji kitabına göre yapılan sınıflandırma Çizelge 2.1'de verilmektedir (Garrity vd, 2004).

Streptomyces cinsleri tıbbi ve tarımsal uygulamalarda ticari önemi olan sekonder metabolitlerin ve enzimlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan mikroorganizma grubudur (Harir, 2018). *Streptomyces*, genellikle su ve toprak dahil olmak üzere her türlü ekosistemde yaşayabilir. *Streptomyces* cinsi ilk kez 1943 yılında Walksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır.

Tablo 2.1. *Streptomyces* cinsinin biyolojik sınıflandırması (Garrrity vd, 2004).

Domain	Bacteria	Takım I	Actinomycetales
Şube BXIV	Actinobacteria	Alttakım XIV	Streptomycineae
Sınıf I	Actinobacteria	Aile I	Streptomycetaceae
Altsınıf V	Actinobacteria	Cins I	Streptomyces

Streptomyces sp. hücre yapıları bakımından bakteri özelliği göstermekle birlikte dallanmış miselli bir yapı oluşturmaları sebebiyle funguslar ile benzerlik gösterirler (Sharma, 2014). Günümüze kadar 900'ün üzerinde tanımlanmış türü bulunan *Streptomyces*'lerin genom büyüklüğü yaklaşık olarak 8-10 Mb'dir. *Streptomyces* sp. suşlarının kolonileri diğer bakteri kolonilerine benzese de daha kuru, üzerleri tozlu görünümlü ve opak olmayışlarıyla ayrılırlar (Kızıloğlu, 2015) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Streptomyces* sp. morfolojisi (Jan, 2012)

2.3. *Streptomyces* sp. ve Sekonder Metabolit Üretimi

Antibiyotiklerin tedavide ilk kez kullanımı Alexander Fleming'in penisilini tesadüfen keşfetmesinden sonraki yıllara dayanır. 1940 yıllarında az miktarda üretilen ham penisilin, stafilokok ve streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Antibiyotik araştırmaları 1943 yılında Waksman ve arkadaşları tarafından, streptomisin bulunmasıyla hız kazanmıştır. O yıllarda *Streptomyces griseus*'dan elde edilen streptomisin, tüberküloz tedavisinde kullanılan etkili ilk antibiyotik olmuştur. 1950 ve 1960' lı yıllarda çok sayıda antibakteriyal ve antifungal antibiyotikler bulunmuş (Çizelge 2.2), ve bu dönem antibiyotik keşiflerinin "Altın Çağı" olarak nitelendirilmiştir (Burns, 2020). Sekonder metabolitlerin ekolojik rolleri; büyüme inhibisyonu, sporulasyon faktörleri üretimi ve stimülasyonu, bitki büyüme faktörleri üretimi, çeşitli sinyaller üreterek farklılaşma sağlanması, hareket ve biyofilm oluşturmayı teşvik ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi şeklindedir (Tyc vd., 2017).

Aktinomisetler çok çeşitli fazla miktarda farmasötik sekonder biyoaktif metabolit üretimleri ile bilinirler. Sentezi yapılan sekonder metabolitler immün düzenleyici, fungusit ve antikanser ajanlarıdır (Lima ve Melo, 2017; Huang vd., 2015). Aktinomisetler ayrıca antibakteriyel, antifungal (Zarandi vd., 2009), antibiyofilm, antitümör (Hong vd., 2009), insektisit (Pimentel-Elardo vd., 2010), antioksidan (Janardhan vd., 2014), 8 anti-biofoling (doğal ortamlarda oluşan karışık mikroorganizma tabakasını önleyen) (Xu vd., 2010), antiparazitikler (Pimentel-Elardo vd., 2010), bitki büyüme promotörleri ve herbisit maddeler (Sousa vd., 2008), enzim inhibitörleri (Hong vd., 2009) ve endüstriyel alanda önemli enzimler gibi çeşitli görevlerde ve yapılarda olabilirler.

Tablo 2.2. *Streptomyces* kökenli keşfedilen bazı antibiyotikler

Antibiyotik	Üretici Organizma	Yıl	Referans
Kloramfenikol	<i>Streptomyces venezualae</i>	1947	(Ehrlich vd.,1947)
Oksitetrasiklin	<i>Streptomyces rimosus</i>	1953	(Burns, 2020)
Oleandomisin	<i>Streptomyces antibioticus</i>	1956	(Garrod, 1957)
Kanamisin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1952	(Maeda vd., 1957)

2.4. *Streptomyces* sp. ve Endüstriyel Önemi

Streptomyces, *Actinobacteria* filumunun en büyük cinsi olup ilaç endüstrisi için en önemlisidir. Bu Gram pozitif bakteri grubunun üyeleri, antibiyotik, antitümör, antimalaryal ve immünosupresif ajanlar dahil olmak üzere aktif sekonder metabolitler üretme konusundaki olağanüstü kapasiteleriyle iyi karakterize edilmişlerdir (Planckaert, 2021). Bu tür biyolojik özellikler, 900'den fazla *Streptomyces* türü tarafından üretilen yapısal olarak farklı bileşiklerin büyük çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Dalisay vd, 2013). Cins, özellikle tetrasiklinler, kloramfenikol ve streptomisin gibi klinik kullanımda olan bileşiklerle birlikte, bilinen tüm antibiyotiklerin yarısından fazlasının üretiminden sorumlu olan üretken bir antibiyotik kaynağıdır. Ayrıca, antrasiklin doksorubisin ve glikopeptid bleomisin gibi antitümör antibiyotikler de *Streptomyces* türevli bileşiklerdir (Tangeria vd., 2020) (Çizelge 2.3). Şu anda klinik kullanımda olan bu ilaçlar, bu cinsin suşları tarafından üretilen yeni terapötik ajanların araştırılmasının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Tablo 2.3. *Streptomyces* kökenli keşfedilen bazı antibiyotikler

Antibiyotik	Üreten Mikroorganizma	Etki mekanizması	Referans
Tigesiklin	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Antibakteriyel için tetrasikline dirençli organizmalar	Zhanel, 2004
Ertapenem	<i>Streptomyces cattleya</i>	Antibakteriyel aktivite	(Perry, 2002);(Keating, 2005)
Amrubisin	<i>Streptomyces peuceticus</i>	Antitümör aktivitesi	Sugiura, 2005
Miglustat	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Tip 1 Gaucher hastalığı	Pastores, 2005
Daptomisin	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Cilt yapısı enfeksiyonu	Fenton, 2004

2.5. *Streptomyces* sp. ve Yeni Biyoaktif Molekül Keşfi

Günümüzde mikroorganizmaların antibiyotik direnci, küresel sağlık, gıda güvenliği ve gelişimi için en büyük tehditlerden biridir. Antimikrobiyal direncin gözetimine ilişkin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Küresel Raporu, enfeksiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlara karşı bakteriyel direncin dünyanın birçok yerinde endişe verici seviyelere ulaştığını ortaya koymuştur (WHO 2014). 2017'de DSÖ, insan sağlığı için en çok ilgili olan ve yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan on iki bakteri ailesinden oluşan bir katalog şeklinde "öncelikli patojenler" in ilk listesini yayınlamıştır (WHO 2017). O'Neill'in bağımsız incelemesine (2016) göre, dünya çapında yılda yaklaşık 700.000 kişi ilaca dirençli enfeksiyonlar nedeniyle ölmektedir. Mevcut eğilimler devam ederse, bu tür enfeksiyonlar 2050 yılına kadar yılda 10 milyon insanın ölümüne neden olabilir (O'Neill 2016). Bu bağlamda, özellikle yeni etki biçimlerine sahip yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi, yalnızca modern tıp için değil, gelecekteki salgınlardan kaçınmak için de kesinlikle gereklidir (Ward ve Allenby, 2018).

Doğal ürünler, birkaç on yıldır ilaç keşfinin başlangıç noktaları olmuştur. Klinik deneylere giren başlıca antimikrobiyaller ve kemoterapötikler genellikle doğal moleküllerdir. Başta *Streptomyces*, sp. olmak üzere miksobakteriler ve kültürlenmemiş bakteriler gibi farklı mikroorganizmalar, bu tür faydalı doğal biyoaktif bileşiklerin ana kaynaklarıdır. Ayrıca, sistem biyolojisini veya sentetik biyolojiyi

kullanan farklı metabolik mühendislik yaklaşımları ve karmaşık teknikler, üretkenlik veya çeşitli ürünler elde edilmesi açısından bu bakterilerin tüm potansiyelinden yararlanmaya yardımcı olabilir. Bu nedenle, etkili antibiyotikler, antikanser ajanlar ve zirai kimyasallar geliştirmek için başlangıç noktaları olarak mikrobiyal sekonder metabolitler oldukça önemlidir (Antoraz vd., 2015; Nyugen vd., 2020).

Çeşitli araştırmacılar, aktinobakterilerin özellikle *Streptomyces* cinsinin ve nadir aktinobakterilerin çok sayıda biyoaktif bileşik ürettiğini bildirmiştir (Barka vd., 2016; Genilloud, 2018; Li vd., 2019). Son 10 yılda, aktinobakterilerin gelişim potansiyelinden yararlanmak için dinamik metabolik kontrol, BGC amplifikasyonu, yolak yeniden düzenlemesi ve genomu en aza indirilmiş *Streptomyces* mutantları dahil olmak üzere bir dizi yeni metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji stratejisi oluşturulmuştur (Beites ve Mendes, 2015; Tan ve Liu, 2017; Li vd., 2019). Güçlü heterolog ekspresyon platformları ile birlikte tüm biyosentetik yolların yeniden düzenlenmesi ve büyütülmesiyle doğal biyoaktif bileşiklerin keşfi ve geliştirmesinin hızla hızlandırılacağı ön görülmektedir. Bu açıdan, kriptik/sessiz BGC'leri tetiklemek veya ikincil metabolitlerin üretimi için çeşitli heterolog konakçıları ve evrensel yeniden düzenleme yöntemlerini araştırmak çok önemlidir (Onaka, 2017) (Singh vd., 2021).

2.6. Mevcut Çalışma

Streptomyces sp. suşları enfeksiyonlar ve kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için umut vaat eden biyoaktif metabolitlerin üreticisi olarak ilgi çekmektedirler. Çalışmamızın amacı toprak kökenli *Streptomyces* suşlarının farklı lokasyonlarda Amasya elma bahçesi topraklarından izolasyonu, moleküler karakterizasyonu ve bu yeni izolatların ISP4 sıvı ve katı fermantasyonlarında antimikrobiyal aktivite ve sitotoksosite çalışmalarıyla potansiyel biyoaktif bileşik üretim kapasitelerinin araştırılmasıdır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. *Streptomyces* sp. Suşlarının İzolasyonu

Doğadan lokal *Streptomyces* suşlarının izolasyonu amacıyla, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünden gerekli izinler alındıktan sonra (21264211-288.04), İlyasköy (Amasya) elma bahçelerinden 10-15 cm derinlikteki farklı lokasyonlardan toprak örnekleri steril kavanozlar içerisine alınmıştır. Daha sonra numuneler 4 °C’de muhafaza edilerek hemen laboratuvara ulaştırılmıştır. Çizelge 3.1’te örneklem yapılan lokasyonlar ve kodları verilmektedir (Ek-4).

Tablo 3.1. Numune alınan yerler ve kodlamaları

KOD	NUMUNE ALINAN YERLER	KOORDİNATLAR
A	Amasya İlinin İlyasköy’ünden Alınan 10 Yıllık Elma Bahçesi Toprak Örneği (A1, A2, A3)	Amasya elma bahçesi toprağı [40°15’38.13"N 58°26’20.39"E]
B	Amasya İlinin İlyasköy’ünden Alınan 20 Yıllık Elma Bahçesi Toprak Örneği (B1, B2, B3, B4)	Amasya elma bahçesi toprağı [40°15’39.13"N 58°26’21.39"E]
C	Amasya İlinin İlyasköy’ünden Alınan 30 Yıllık Elma Bahçesi Toprak Örneği (C1, C2, C3, C4)	Amasya elma bahçesi toprağı [45°15’39.13"N 58°26’21.39"E]
D	Amasya İlinin İlyasköy’ünden Alınan Hastalık Taşıyan Elma Bahçesi Toprak Örneği (D1, D2, D3, D4)	Amasya elma bahçesi toprağı [40°15’39.13"N 58°26’21.39"E]

Topraktan alınan numunelerden *Streptomyces* sp. izolasyonu için üç farklı metot uygulanmıştır (Herbert, 2006). İlk olarak 4 °C’de muhafaza edilen numunelerden üç replika halinde 1’er g tartılmıştır. Bu replikalardan ilk gruba herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. İkinci gruptaki numuneler laboratuvar ortamında üç gün oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuştur. Üçüncü grup replikada yer alan numuneler ise ikinci gruptakiler gibi 3 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 saat boyunca su banyosunda 100 °C’de inkübe edilmişlerdir. Ardından, tüm numuneler falkonlara alınmış, üzerlerine 9 ml steril distile su ilave edilmiştir. Toprak numunelerinde örneklerin içindeki toprağın çökmesi için 10 dk bekletilmiştir. Numunelerin süpernatant kısımları alınıp kodları yazılmış Eppendorf tüplerine aktarılmışlardır. Bu numunelerden %0.85 konsantrasyonunda NaCl kullanılarak 10^{-2} - 10^{-6} oranında seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltme işlemi yapıldıktan sonra seyreltme tüplerinden 100 µl alınarak, *Bacillus* ve fungus kontaminasyonunun engellenmesi amacıyla, sırasıyla 5 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonundaki nalidiksik asit ve ketokonazol (Ek 3)

antibiyotiklerinden 50'şer µl eklenmiş Triptone Soya Agar (TSA) (Oxoid) ile İnorganik Tuz Agar (ISP4) besi yerlerine yayıcı ile ekim yapılmıştır (Ek 1). Tüm ekimler 10 gün boyunca statik inkübatörde ve 28 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 3., 5., 7., ve 10. günlerinde bakteri gelişimi incelenmiştir. Kültürlerde *Streptomyces* sp. morfolojisine sahip koloniler numaralandırılmış ve ISP4 katı besiyerine çizgi ekim tekniği ile alınarak 28 °C'de inkübasyonlarının ardından saf kültürleri elde edilmiştir.

3.2. *Streptomyces* sp. Suşlar, Besiyerleri ve Kültür Koşulları

İzole edilen tüm suşlar ISP4 (Ek 1) sıvı veya agarlı besiyerinde 28 °C'de 5-10 gün boyunca inkübasyona bırakılarak üretilmiştir. Sıvı kültürler 28°C'de ve 500 ml hacimli çentikli erlenlerde 220 rpm'de çalkalanarak üretilmiştir. Uzun süreli muhafaza için, sıvı ISP4 besiyerinde üretilen bakterilerden 600'er µl alınarak içinde 600'er µl %85'lik gliserol bulunan Eppendorf tüplere transfer edilmiştir. Pipetleme ile homojen hale getirilen bakteri: gliserol (1:1) karışımı -86 °C'de muhafaza edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde bakteri ve fungal mikroorganizmalar kullanılmıştır. Fungusların gelişimi için Sabouraud Dextrose Broth (SDB) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Ek 1), bakteriler için Mueller Hinton Broth (MHB) ve Mueller Hinton Agar (MHA) (Ek 1) kullanılmıştır. Broth mikrodilüsyon deneyinde bakterilerin üremeleri için Katyon Ayarlı-MHB (Ek 1) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan indikatör suşlar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edilmiştir. Bu suşlar; dört Gram-pozitif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341), üç Gram-negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) bakteriler ile maya (*Candida albicans* ATCC 10231) ve *Aspergillus niger* ATCC 16404 fungal suşlarıdır.

3.3. Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri Ek 1'de verilmiştir.

3.4. Tamponlar ve Çözeltiler

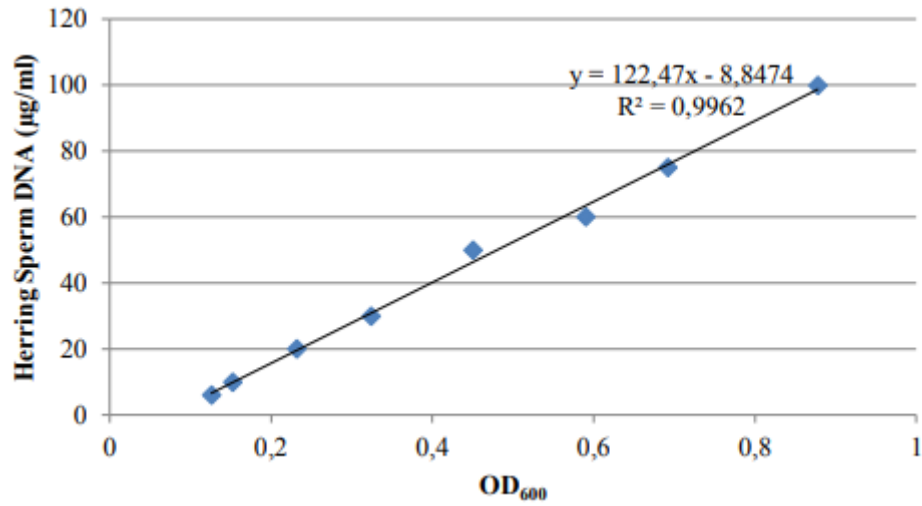
Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin içerik ve hazırlanış şekilleri Ek 2'de verilmiştir.

3.5. Kimyasallar ve Enzimler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzimler Ek 3'te verilmiştir.

3.6. DNA kuantifikasyonu yardımıyla üremenin belirlenmesi

Burton (1968) tarafından tanımlanan metod kullanılarak DNA kuantifikasyonu yardımıyla saf kültürleri elde edilen izolatların dinamik üreme profilleri oluşturulmuştur. Suşlar ISP4 ve TSB sıvı besiyerinde 28 °C'de 5-10 gün boyunca inkübasyona bırakılarak üretilmiştir. Sıvı kültürler 28°C'de ve 500 ml hacimli çentikli erlenlerde 220 rpm 'de çalkalanarak üretilmiştir. Fermantasyon süresince kültürlerden 12 saat aralıklarla toplanan 2 ml hacmindeki örneklerden elde edilen ve -20°C de muhafaza edilen pelletler üremenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Pelletler 2 ml hacimli %0.85'lik NaCl çözeltisinde çözülüp vortekslenmiştir. Standart olarak 5 mM NaOH içinde çözülmüş 0.3 mg/ml stok konsantrasyonlu Herring Sperm DNA (Ek 2) (Sigma)'sı kullanılmış ve bu standarda ait 6, 10, 20, 30, 50, 60, 75 ve 100 µg/ml'lik çalışma konsantrasyonları hazırlanmıştır. 5 mM NaOH (Ek 2) (kör örneği), standartlar ve seyreltilmiş örneklerden 400 µl hacimde alınmıştır. Üzerlerine 1 N HClO₄ (Ek 2)'den 400 µl ilave edilmiştir. Tüpler ters çevrilip karıştırılmış, 70°C'de 20 dk. inkübe edilmişlerdir. Her bir karışımın üzerine 800 µl difenilamin belirteci (Ek 2, 3) eklendikten sonra ters çevrilerek karıştırılan solüsyonlar 30°C'de ve 15 -17 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler yeniden karıştırılmış ve 13.200 rpm (19.515 rcf)'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantların 600 nm absorbansta spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1800 Spectrophotometer) ölçümleri yapılmıştır. Herring sperm DNA kullanılarak yapılan ölçümlerden elde edilen standart eğriye ait formül kullanılarak her bir örnekteki DNA konsantrasyonu µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Herring Sperm DNA'ya ait standart eğri

3.7. Genomik DNA İzolasyonu, 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

3.7.1. Genomik DNA izolasyonu

Streptomyces sp.' den genomik DNA izolasyonu Pospiech ve Neumann (1995)'e ait prosedür kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 28 °C'de ve 200 rpm'de 48 saat boyunca inkübe edilen bakteri kültüründen 30 ml çöktürülerek elde edilen pellet 5 ml SET tamponunda (Ek 2) çözdürülmüştür. 100 µl lizozim eklenerek 1 saat süresince 37 °C'de inkübe edilen çözeltiye 140 µl proteinaz K (Ek 2, 3) ve 600 µl % 10'luk SDS (Ek 2, 3) ilave edilmiştir. Devamında, sırasıyla 2 ml NaCl (5 M) (Ek 2,3) ve 5 ml kloroform (Ek 3) karışım içerisine eklenip oluşan çözelti 20 °C'de 30 dk. karıştırılarak inkübe edilmiştir. 6.000 rpm (4.032 rcf)'de ve oda sıcaklığında 15 dk. santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 0,6X hacminde izopropanol (Ek 3) eklenip 3 dk. sonra gözle görülür hale gelen DNA yeni tüpe alınarak 5 ml hacmindeki %70'lik etanolle (Ek 3) yıkanmıştır. Etanolün uzaklaşması için kendiliğinden kurumaya bırakılan DNA'ya 1 ml TE tamponu (Ek 2) ilave edilmiştir. 55 °C'de 1 saat inkübasyon sonrasında DNA'nın TE tamponunda çözünmesi sağlanmıştır.

3.7.2. Genomik DNA izolasyonu

Çalışmamızda lokal *Streptomyces* izolatlarının belirlenmesi amacıyla bakterilerde 16S rRNA bölgelerinin çoğaltılması amacıyla tasarlanmış AIIR ve BactF universal primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Tablo 3.2. Numune alınan yerler ve kodlamaları

İsim	Primer dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)	Tm (°C)	Amplikon Büyüklüğü (bç)	Referans
AIIR	GGTTACCTTGT ACGACTT	19	46.77	1492-1510	(Lane vd., 1985)
BactF	AGAGTTTGATC ATGGCTCAG	20	49.73		(Zwick, 2012)

Streptomyces suşlarına ait genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, universal primerler (AIIR-BactF) ve *Taq* DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific) enzimi yardımıyla 16S rRNA bölgeleri PZR ile BioRad T100 Thermal Cycler (U.S) cihazında çoğaltılmıştır (Çizelge 3.3).

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan PZR içerik ve koşulları

Reaksiyon içeriği	Miktar (µl)	PZR Koşulları
Taq DNA buffer (10X)	2,5	95 °C 3 dk 95 °C 30 sn } 35 döngü 55°C 40 sn } 72 °C 1 dk } 72 °C 5 dk 4 °C ∞
Kalıp DNA (100 ng)	1	
İleri primer (10 µM)	1,25	
Geri primer (10 µM)	1,25	
dNTP (10 mM)	0,5	
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,2	
dH ₂ O	18,3	

3.7.3. Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA'lar ve PZR ampikonları %0,8 derişiminde hazırlanan agaroz jele (Ek 2) yüklenmiş ve 80 voltta 45 dk. yürütölmüştür. Jel hazırlamada ve yürütmede kullanılan tampon 1X TAE (Ek 2)'dir. Çalışmada GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) belirteç olarak kullanılmıştır (Ek 3).

3.7.4. PZR ürünlerinin jelden saflaştırılması

Elektroforez sonrası agaroz jelde yürütölen PZR ürünleri jelden kesilip NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) kiti kullanılarak saf halde elde edilmiştir.

3.7.5. Dizi analizi ve hizalama

Elde edilen PZR ürünlerinin Sanger dizi analizi için Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi (GENOKS) aracılığı ile BGI (Hong Kong) firmasından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) programında yer alan veritabanındaki dizilerle karşılaştırılmıştır (BLASTn). Clustal W (Thompson vd., 1994) kullanılarak çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. MEGAX 10.1 yazılım paketindeki Neighbor-Joining algoritması ve Kimura iki parametrelili testler kullanılarak ise filogenetik ağaclar oluşturulmuştur (Kumar vd., 2018).

3.8. Farklı organik çözücülerle biyoaktif moleküllerin ekstraksiyonu

Her bir izolat için gliserol stoklarından 500 µl alınıp ISP4 agara yayıcı yardımıyla ekimi yapılmış ve 28 °C'de beş gün boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Bu katı kültürlerden 40 mg tartılıp içinde 100 ml sıvı ISP4 besiyeri olan 500 ml'lik çentikli erlenlere ekim yapılmıştır. 28 °C'de ve 220 rpm'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. 24 saat aralıklarla 500 µl kültür örnekleri alınarak falkonlara konulmuştur. Üzerine 500 µl 2,5 M HCl (Ek 2) ve 3 ml dH₂O eklenmiştir ve bu şekilde HCl ile muamale edilerek 595 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800 Spectrophotometer) ile ölçölerek üreme profilleri elde edilmiştir (Özcengiz vd, 2010). OD₅₉₅ değeri 0,700-0,800 aralığına ulaşan kültürlerden 100 ml hacimde alınarak, 500 ml'lik çentiksiz erlenlere aktarılmıştır. Üzerine 1:1 oranında etil asetat, metanol, kloroform, hekzan, benzen, bütanol, dimetil eter (Ek 3) eklenmiştir. Kültür-

organik çözücü karışımları oda sıcaklığında 1 saat 100 rpm'de çalkalanmıştır. Daha sonra, numunelerden klorofom için alt faz, etil asetat, metanol, hekzan, benzen, bütanol ve dimetil eter organik çözücülerin kullanıldığı karışımların ise üst fazı alınmıştır ve Eppendorf tüplerine konulmuştur. Numunelerdeki organik çözücüler evaporatör cihazında (CHRIST- RVC 2-18 CDplus, U.S.) 40°C'de uçurulmuştur. Elde edilen ekstraktlar antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmek üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.9. Fermantasyon Deneyleri

3.9.1. Sıvı *Streptomyces* sp. kültürlerinin hazırlanması

Gliserol stoklarından ISP4 katı besiyerine 500 µl ekim yapıldıktan sonra 28°C'de beş gün inkübe edilen *Streptomyces* sp. kültürlerinden 40 mg alınıp, 100 ml'lik ISP4 sıvı besiyeri içeren 500 ml'lik çentikli erlenmayerlere 3'er replika olacak şekilde ekim yapılmıştır. 28°C'de ve 220 rpm'de gerçekleşen fermantasyon kültürlerinden 96 ve 120. saatlerde örnekler alınıp Bölüm 3.8'de açıklanan şekilde HCl ile muamele edilerek OD₅₉₅ değerleri ölçülmüştür. OD₅₉₅ değeri 0,8'e ulaşan kültürler (100 ml) 50 ml'lik falkonlara konulmuştur.

3.9.2. Sıvı ISP4 kültürlerinden biyoaktif moleküllerin ekstraksiyonu

Sıvı kültürlerden biyoaktif moleküllerin ekstraksiyonu hem süpernatant kısmı hem de pellet kullanılmıştır. Gerekli OD₅₉₅ değerine ulaşan kültürler falkonlara alınarak 3000 rpm (1008 rcf) 'de 20 dk. oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında elde edilen süpernatantlar 24 saat -86 °C'de dondurulmuştur. Donmuş olan süpernatantlar Liyofilizatör (Elektromag M2815) cihazında kurutulmuştur ve toz haline gelmesi sağlanmıştır. Bu numuneler gerekli hacimlerde tartılarak +4 °C de karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Sonrasında antimikrobiyal aktivite ve sitotoksiste çalışmalarında metanol veya %0.85 NaCl içerisinde çözündürülerek (5 mg/ml) kullanılmıştır.

Sıvı fermantasyondan elde edilen pelletlerin darası alınarak 4 g olacak şekilde tartılmıştır. 4 gram pellet üzerine 10 ml metanol eklenmiştir. Karışım 70 amplitudda, buz içerisinde sonikatörde (Sonics Vibra Cell VCX130 PB, U.S.) 3×10 sn sonike

edilerek misellerin kırılması sağlanmıştır. Sonikasyon sonrasında, hücre: metanol karışımı 30°C’de ve 100 rpm’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 8 saat aralıklarla iki kez metanol değişimi yapılmıştır. Metanol ekstraktları bir araya getirilmiş ve steril kurutma kâğıdı ile filtre edilmiştir. Elde edilen metanol özütleri 2 ml’lik Eppendorflara dağıtılmış ve evaporatör cihazında (CHRIST- RVC 2-18 CDplus) 40 °C’de uçurulmuştur. -20 °C’de saklanan özütler 5 mg/ml final konsantrasyonunda metanol %0.85 NaCl’de çözündürülerek biyoaktivite deneylerinde kullanılmıştır.

3.9.3. Katı *Streptomyces* sp. Kültürlerinin Hazırlanması ve Biyoaktif Moleküllerin Ekstraksiyonu

Gliserol stoklarından 500 µl ekim yapılan ve 5 gün boyunca 28 °C de inkübe edilen lokal *Streptomyces* sp. suşlarına ait 10’ar replika ISP4 katı kültürü elde edilmiştir. Beş günün sonunda 5 replika ISP4 katı kültürü 1 adet ISP4 agar petriye pasajlanmıştır. Her bir suşa ait 2’şer petrideki miseller öze ile sıyrılarak darası alınmış falkonlara konulmuştur. Sıvı kültür ekstraksiyonunda olduğu gibi, 4 g kültüre 10 ml metanol eklenmiş ve Bölüm 3.9.2’de belirtildiği şekilde metanol ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.10. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Elde edilen tüm ekstraktların *in vitro* antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından belirlenen kriterler dikkate alınmıştır.

3.10.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

Test mikroorganizmalardan 100 µl alınmıştır ve ayrı ayrı 50 ml falkonlara 10 ml TSB ortamına konulmuştur. Test mikroorganizmalar 37°C’de ve 220 rpm de 16 saat inkübatöre konulmuştur. Büyüyen 10 ml lik test mikroorganizma kültürlerinin her birinden 2’şer ml alınmıştır ve 500 lük çeltiksiz erlenmayere 100 ml TSB ortamına ekimi yapılmıştır. 37°C’de ve 220 rpm de inkübatöre konulmuştur. Spektrotometre ile belli aralıklarla OD600 değeri ölçülmüştür ve OD600 değeri yaklaşıklık olarak 0,9 a geldiğinde 4 °C’ye kaldırılmıştır. Her bir bakteri için ayrı ayrı TSA besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan TSA besiyerlerinin sıcaklığı termometre ile ölçülmüştür ve

sıcaklık 45°C'ye düştüğünde her bir besiyerinin içine 100 ml'ye 3,3 ml test mikroorganizmalar konulmuştur. Petrilere 25 ml dökülmüştür. Soğuduktan sonra agara 4 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucukların her birine -86°C de saklanan süpernatantlardan yüklenmiştir. Daha sonra, difüzyonu kolaylaştırmak için petriler 2 saat 4°C'ye konulmuştur. Patojen bakteriler 37°C'de, funguslar ise 26°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları (mm) ölçülmüştür.

3.10.2. Agar disk difüzyon yöntemi

Kalitatif antimikrobiyal aktivite tayini için agar disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Desai vd., 2008). Sonuçlar; diskler etrafında oluşan temiz zonların mm cinsinden çapı olarak değerlendirmeye alınmıştır. Bu değerlendirme metanol kontrollerinin oluşturduğu zon çapları dikkate alınarak yapılmıştır. Agar disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde indikatör suşlar MHA ya da SDA besiyerlerine çizgi ekim tekniği ile ekilip elde edilen taze koloniler %0,85'lik NaCl çözeltisi içerisinde çözdürülmüştür. McFarland standardına uygun olarak (0,5 McFarland $\cong$ 1-4 $\times 10^8$ Kob/ml), bu karışımların OD₆₀₀ değeri 0,085-0,1 aralığına getirilmiştir. Uygun gelişimdeki kültürlerden 100'er µl alınarak MHA katı besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Yirmişer µl özüt emdirilen standart steril boş diskler mikroorganizma ekimi yapılan katı besiyerlerine dikkatle yerleştirilmiştir. Antibiyotik kontrolleri bakteriler için amikasin (30 µg), funguslar için ketokonazol (30 µg) ve metanol emdirilmiş boş diskler (Ek 3) de çalışmada kontrol olarak kullanılmıştır. Petriler önce 4 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra bakterilere ait olanlar 37 °C'de 16-20 saat, funguslar ise 26 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları (mm) ölçülmüştür. CLSI standartlarına (CLSI_M100-S24, M44A2, M51A) göre değerlendirilmiştir.

3.10.3. Mikrodilüsyon yöntemi ile Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi

MIC; mikrobiyal üremeyi engellemek için gerekli minimum madde derişimini ifade etmektedir. CLSI standartları baz alınarak (CLSI, M07-A9, M27-A2, M38-A2) Katyon-ayarlı Mueller-Hinton besiyerinde (KA-MHB) (Ek 1) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalaklar (Ek 3) kullanılarak MIC deneyi

gerçekleştirilmiştir (Gu ve Wang, 2010). İlk olarak, kuyucuklara 100 µl KAMHB eklenmiştir. Metanol içerisinde 1024 µg/ml derişiminde hazırlanan ekstrakt çözeltilisinden ilk kuyucuğa 100 µl ilave edilmiştir, karıştırılan çözeltiliden 100 µl alınarak bir sonraki KAMHB içeren kuyucuğa eklenmiştir. Bu şekilde 512 µg/ml–0,125 µg/ml aralığında iki kat seyreltme yöntemi ile gerek ekstrakt gerekse de antibiyotikler seyreltilmiştir. Ardından, besiyeri-ekstrakt veya antibiyotik karışımına $1-5 \times 10^5$ Kob/ml yoğunluğunda mikroorganizmadan 100 µl eklenerek karıştırılmıştır. Mikroorganizmalar agar disk difüzyon yönteminde hazırlandığı gibi, taze çizgi ekimlerinden %0,85'lik NaCl çözeltisi içerisinde OD₆₁₂ değeri 0,085-0,1 aralığında (0,5 McFarland $\cong$ $1-4 \times 10^8$ Kob/ml) ayarlanarak taze hazırlanmış KAMHB içersine 1:10 oranında eklenmiştir. Elde edilen bu mikroorganizma solüsyonu MIC deneylerinde kullanılmıştır. Funguslar için standart olarak ketokonazol, bakteriler için standart olarak amikasin antibiyotikleri kullanılmıştır. Plaklar önce 4 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra aynı indikatör mikroorganizmalar için agar disk difüzyon yönteminde uygulanan sıcaklık ve inkübasyon süresi boyunca bekletilmiştir. Sonuçlar kuyucuk diplerinde bulanıklık gözlemi ile değerlendirilmiştir. Üremenin olmadığı en düşük derişim o ekstraktın MIC değeri olarak kaydedilmiştir. Mikroorganizmanın ya da ekstraktın dahil edilmediği kuyucuklar kontrol olarak kullanılmıştır. Her deney üç kopya halinde gerçekleştirilmiş ve ortalama değerler (mm $\pm$ SD) elde edilmiştir.

3.10.4. Minimum bakterisidal ve minimum fungisidal konsantrasyonların (MBC, MFC) belirlenmesi

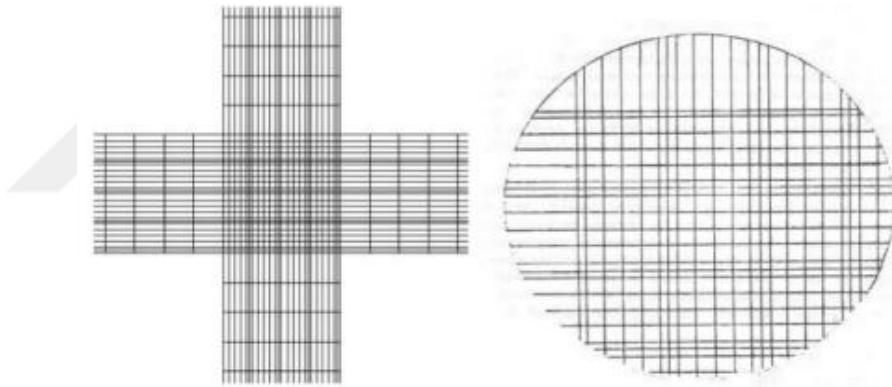
Daha ileri antimikrobiyal aktivite değerlendirilmesi için Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBC) ve Minimum Fungusidal Konsantrasyon (MFC) belirlenmiştir. MBC, belirli bir mikroorganizmayı öldürmek için gerekli olan en düşük madde konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. MBC ve MFC testi uygulanırken, MIC plaklarında bulunan ve üremenin gerçekleşmediği kuyucuk ile bunun çevresindeki kuyucuklardan 1 µl alınarak MBC testi için MHA katı besiyeri, MFC testi için SDA katı besiyerine nokta ekimi yapılmıştır. Bakterilere ait olan ekimler 37 °C'de 16-20 saat, funguslara ait olanlar ise 26 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon süresi sonrasında, büyümede %99.9 azalmaya yol açan en düşük konsantrasyon bakteriler için MBC olarak belirlenmiştir (Pfaller vd, 2004). Funguslar için MFC'yi belirlemede, MIC plaka kuyucuklarından pasajlama sonrası üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon seçilmiştir (Espinell-Ingroff vd, 2002).

3.11. Sitotoksite Deneyleri

İzole edilen lokal *Streptomyces* sp. suşlarına ait metanol özütlerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için hücre canlılığı ve MTT testleri uygulanmıştır.

3.11.1. Tripan mavi boyama testi ile hücre canlılığının saptanması

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla Tripan mavi boyası (Ek 2,3) kullanılmıştır. Bu boya negatif yüke sahip bir boyadır ve hücrelerin canlı ya da cansız olup olmadığının belirlenmesini sağlamaktadır. Tripan mavi boyasının çalışma ilkesi şu şekildedir; hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girememektedir. Ancak, cansız hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi olarak görünmektedirler. Thoma lamına yüklenen hücrelere tripan mavi boyası eklenerek ışık mikroskopunda sayım işlemi gerçekleştirilmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Thoma lamındaki karelerin genel ve sınırlandırılmış görüşü (Dikici, 2021).

Toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır: Toplam hücre sayısı = Thoma lamında sayılan hücreler x 10,000 (x seyreltme faktörü) (Dikici, 2021).

3.11.2. Hücre canlılık testi (MTT)

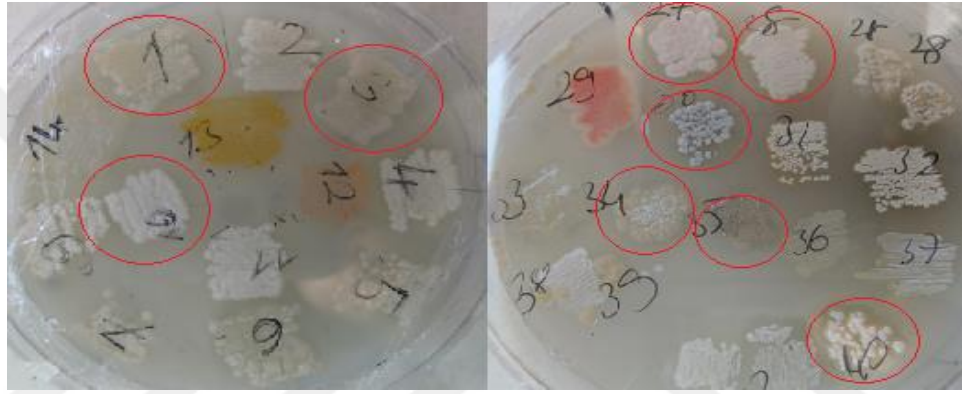
Kontrol hücresi olarak insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293), kanser hücre hatları olarak insan kolon epidermal adenokarsinoma hücreleri (CaCO-2), insan prostat karsinoma (LnCap) ve insan meme adenokarsinoma (McF-7) hücreleri kullanılmıştır. % 10 Fetal sığır serumu (FBS) (Ek 2,3) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Ek 1, 3) veya RPMI (Roswell Park Memorial Institute

Medium) (Ek 1, 3) besi ortamı içerisinde 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında inkübatör içinde çoğaltılmışlardır. Elde edilen ekstraktların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipenyltetrazolium bromide] (Ek 3) yöntemiyle belirlenmiştir (Mosmann, 1983). Bu amaçla, 96'lık plakada her kuyucukta 5-10x10³ hücre olacak şekilde ekilen hücelere 0,2 mikronluk filtrelerden geçirilen ekstraktların değişik konsantrasyonları (1-1000 µg/ml) 24, 48 ve 72 saat süresince uygulanmıştır. Bu süre sonunda, besi yeri çekilip yerine yeni besi yeri ve MTT solüsyonu (Ek 2) uygulanmıştır ve 4 saat 37 °C inkübasyona bırakılmıştır. Canlı hücreler tarafından MTT'nin metabolik olarak değiştirilmesi sonucunda oluşan formazon kristellerinin DMSO (Ek 3) içinde çözülmesi sonunda oluşan renk 590 nm'de mikropilaka okuyucuda (Allsheng AMR-100, U.S.) ölçülmüştür ve bu absorpsiyon değerleri kullanılarak hücrelerin EC₅₀ (yarı azami etkili konsantrasyon, belirli bir maruz kalma süresinden sonra taban çizgisi ile yarı arasında bir yanıt oluşturan bir ilaç konsantrasyonu) konsantrasyonları belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Streptomyces* sp. Suşlarının İzolasyonu

Çalışmamızda, Amasya İline bağlı İlyasköy mevkiindeki elma bahçelerinden alınan toprak örneklerinden Aktinomiset ve diğer mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. En çok D toprağı olarak isimlendirilen hastalık taşıyan toprakta mikroorganizma gelişimi gözlemlenmiştir. ISP4 besiyerinde TSA besiyerine kıyasla daha iyi gelişim gösteren koloniler morfolojik bakımdan incelenmiş, 42 farklı koloni içerisinde *Streptomyces* sp. morfolojisine yakın olduğu düşünülen 9 adet mikroorganizma ile çalışmaya devam edilmiştir (Şekil 4.1).

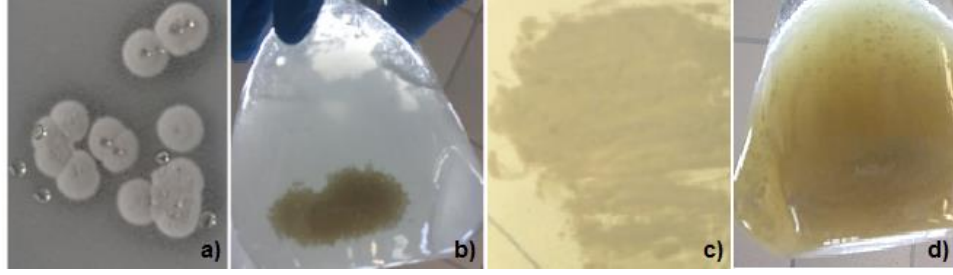


Şekil 4.1. İlyasköy (Amasya) elma bahçesi toprağından izole edilen ve *Streptomyces* sp. Morfolojik görünümüne sahip bakteriler (1, 3, 10, 27, 28, 30, 34, 35 ve 40 numaralı suşlar).

4.2. Lokal izolatların ISP4 ve TSB Besiyerlerindeki Morfolojileri

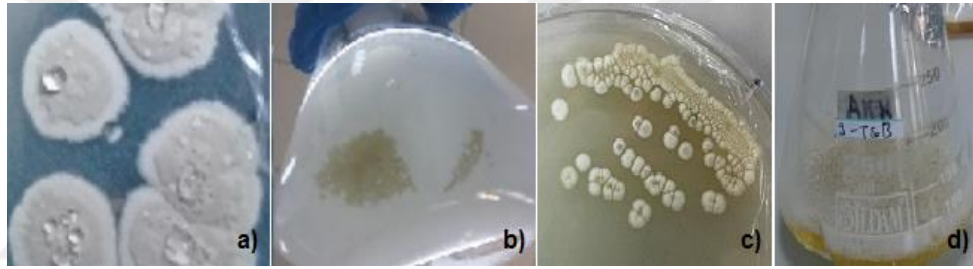
Çalışmada izole eden 9 adet lokal izolat TSB ve ISP4 sıvı ve agarlı besiyerlerinde 28°C’de 5-10 gün boyunca inkübe edilmiş ve koloni morfolojileri gözlemlenmiştir.

Amasya (Türkiye) ili İlyasköy mevkiindeki 20 yıllık B grubu elma bahçesi toprak örneğinden izole edilen 1 numaralı lokal izolatı ISP4 agar kültürlerinde beyaz-grimsi renkte sporlanmış ve oluşan kolonilerinin üzerinde şeffaf renkte madde üretimi tespit edilmiştir (Şekil 4.2a). ISP4 sıvı kültürlerinde de misellerin oluşumu beyazımsı-sarı renktir (Şekil 4.2b). TSB katı ve sıvı kültürlerinde ise sarımsı renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.2c,d).



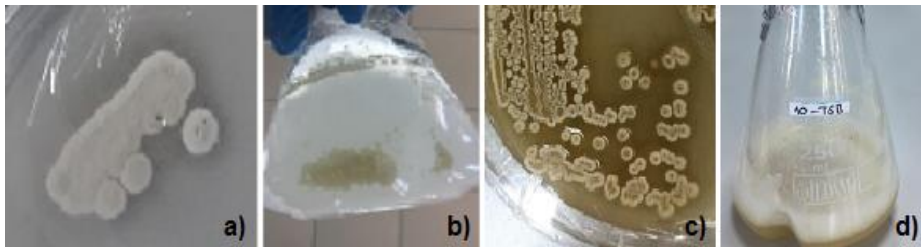
Şekil 4.2. Lokal izolat 1'in ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

Lokal izolat 3'e ait ISP4 kültürlerinde 1 numaralı izolattakine benzer morfoloji kaydedilmiştir (Şekil 4.3a,b) ISP4 agar kültürlerindeki kolonilerinin üzerinde şeffaf renkte madde üretimi Şekil 4.3a'da görülmektedir. 3 numaralı lokal izolatin TSB kültürlerine ait morfoloji Şekil 4.3c.d'de görüldüğü üzere TSB katı ve sıvı kültürlerinde beyazımsı renk oluşumu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. Lokal izolat 3'ün ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

10 numaralı lokal izolata ait ISP4 kültürlerinde de 1 ve 3 numaralı suşlara benzer morfolojik gelişim tespit edilmiştir (Şekil 4.4a,b). TSB ve TSA'da kahverengi kültürler oluşturmuştur (Şekil 4.4c,d).



Şekil 4.4. Lokal izolat 10'un ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA katı kültür d) TSB kültürü.

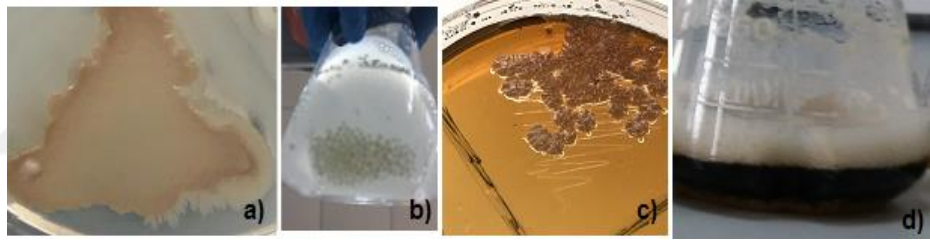
Lokal izolat 27'nin ISP4 katı kültüründeki koloni rengi kremdir, ISP4 sıvı kültürleri bahsedilen diğer 3 izolat gibi beyazımsı-sarı'dır (Şekil 4.5a,b). TSB katı

kültüründe pamukçuk şeklinde ve beyaz renktedir, ayrıca TSB sıvı kültürleri beyazımsı renk oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5c,d).



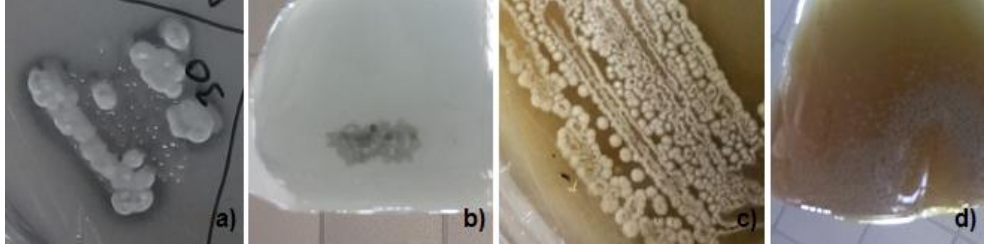
Şekil 4.5. Lokal izolat 27'nin ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

Lokal izolat 28 ISP4 agar besiyerinde turuncu renkte koloni oluşturmuştur (Şekil 4.6a). Ancak, ISP4 sıvı kültürlerinde herhangi bir pigment üretimi gözlenmemiştir (Şekil 4.6b). TSB sıvı besiyerinde besiyerinde siyah renk oluşumu gözlemlenmiştir. TSB katı besiyerinde ise kahverengimsi renkte koloni oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6c,d).



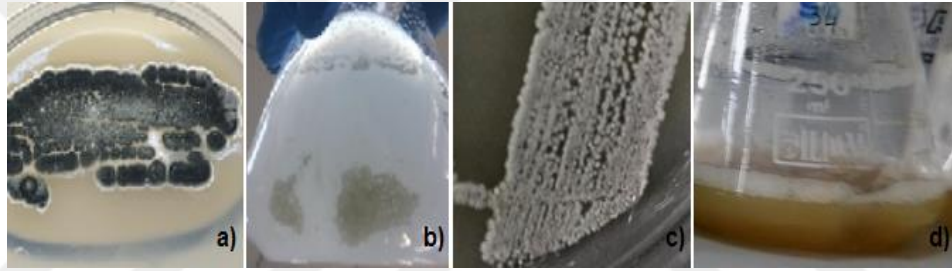
Şekil 4.6. Lokal izolat 28'in ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü

1, 3, 10, 27 ve 28 numaralı izolatlar B kodlu toprak örneğinden izole edilmişken, lokal izolat 30, Amasya (Türkiye) ili İlyasköy mevkiindeki hastalık taşıyan elma bahçesi toprak örneği olan D kodlu topraktan izole edilmiştir. ISP4 katı kültürlerinde beyaz renkte sporlanmış koloni oluşumu gözlemlenirken, kolonilerin etrafında temiz bir zon oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.7a). Aynı zamanda, ISP4 sıvı kültürlerinde beyaz-grimsi renkte misel oluşumu kaydedilmiştir (Şekil 4.7b). TSB kültürleri ise hem katı hem sıvıda beyamsımsı şeklindedir (Şekil 4.7c,d).



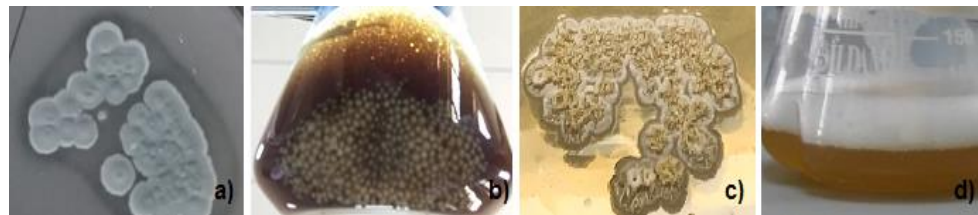
Şekil 4.7. Lokal izolat 30'un ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

C kodlu topraktan izole edilen lokal izolat 34'ün ISP4 agar kültürlerinde 3. günde koyu gri/siyah renkte koloni oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8a). ISP4 sıvı kültürlerinde kültür renginde aynı renk değişimi tespit edilememiştir (Şekil 4.8b). TSA besiyerinde ise bu izolat beyazımsı renkte koloni oluştururken, TSB sıvı besiyerinde ise sarımsı renk oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8c,d)



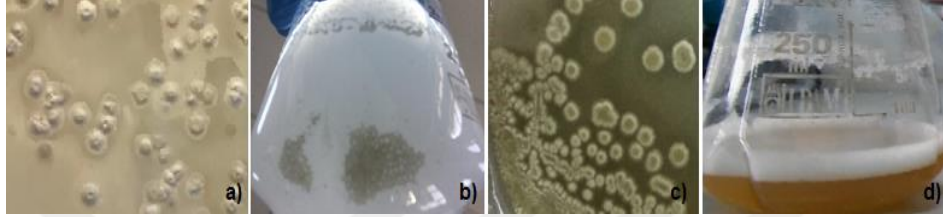
Şekil 4.8. Lokal izolat 34'ün ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

C kodlu bölgeden izole edilen 35 numaralı örnek, ISP4 katı kültüründen 28 numaralı izolat gibi beyaz-grimsi renkte koloni oluşumuna sahip olup aynı zamanda koloni etrafında temiz zon oluşumu söz konusudur (Şekil 4.9a). Öte yandan, ISP4 sıvı kültürlerinde renk beyaz-griden kahverengiye dönmüştür (Şekil 4.9b). TSA besiyerinde beyaz/sarımsı renkte ve 34 numaralı lokal izolattan farklı bir morfolojide koloni oluştururken, TSB sıvı kültürlerinde sarımsı renk oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9c,d).



Şekil 4.9. Lokal izolat 35'in ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

ISP4 katı besiyerinde A kodlu bölgeden izole edilen 40 numaralı izolata ait koloniler krem renkte ve yumuşak olup üremeye devam ettikçe yuvarlak şeklinde koloniler daha da belirgin hale gelmektedir (Şekil 4.10a). ISP4 sıvı kültürlerinde ise grimsi pigment oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10b). TSB ve TSA kültürleri incelendiğinde, 34 ve 35 numaradaki gibi TSA besiyerinde beyaz/sarımsı renkte fakat farklı morfolojide koloni oluşumu, TSB sıvı besiyerinde ise sarımsı renkte kültür elde edilmiştir (Şekil 4.10c,d).

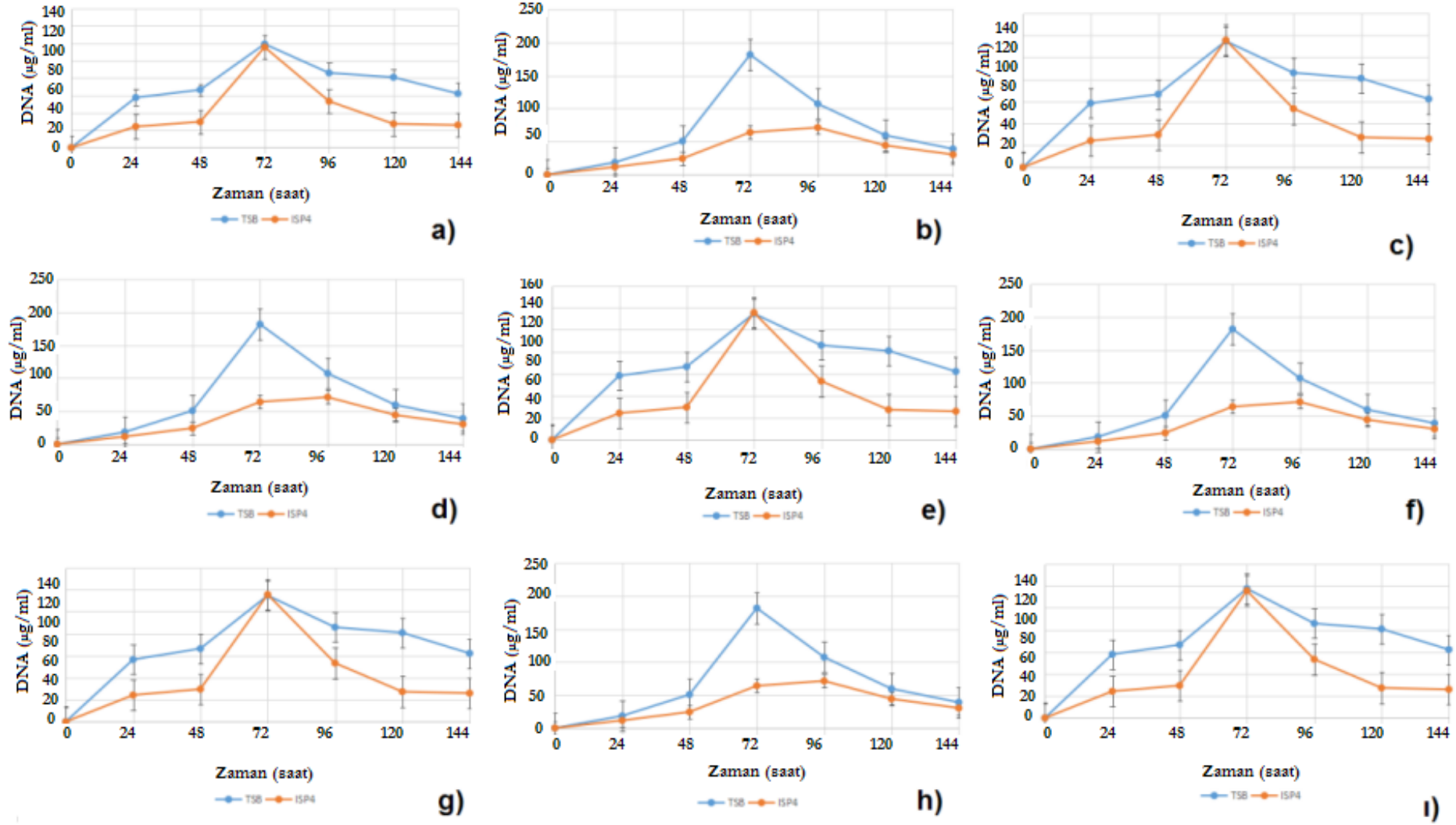


Şekil 4.10. Lokal izolat 40'ın ISP4 ve TSB kültürlerindeki morfolojisi. a) ISP4 katı kültürü, b) ISP4 sıvı kültürü, c) TSA kültürü d) TSB kültürü.

4.3. Suşların ISP4 ve TSB Besiyerlerindeki Üreme Profilleri

Saf kültürleri elde edilen izolatların DNA kuantifikasyonu (Burton, 1968) yardımıyla 595 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800 Spectrophotometer) ile ölçülerek dinamik üreme profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.11).

Üreme eğrisi grafikleri incelendiğinde; dokuz lokal izolatın TSB besiyerinde daha iyi ürediği ve bu besiyerinde en iyi üreme saatinin T_{72} olduğu görülmüştür. ISP4 kültürleri incelendiğinde, 1, 10, 28, 30, 34 ve 40 numaralı suşlarda da maksimum üremenin 72. saatte ve TSB kültürlerindeki ile aynı miktarda olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatlarda (3, 27 ve 35) ISP4 kültürlerinde T_{96} 'da çok hafif daha yüksek olmakla birlikte, genel olarak 72-96. saatlerde üremede durgunluk fazına benzer bir yavaşlama söz konusudur. Bu üç izolatın T_{96} 'ya kadar yükselen üreme eğrisi bu saat sonrasında düşüşe geçmiştir. Diğer taraftan, diğer izolatların her iki besiyerindeki kültürlerindeki ve aynı zamanda 3, 27 ve 35 numaralı izolatlara ait TSB kültürlerinde üremede T_{72} 'de en üst seviye gerçekleşirken bu saatten sonra hızlı bir düşüş görülmektedir.

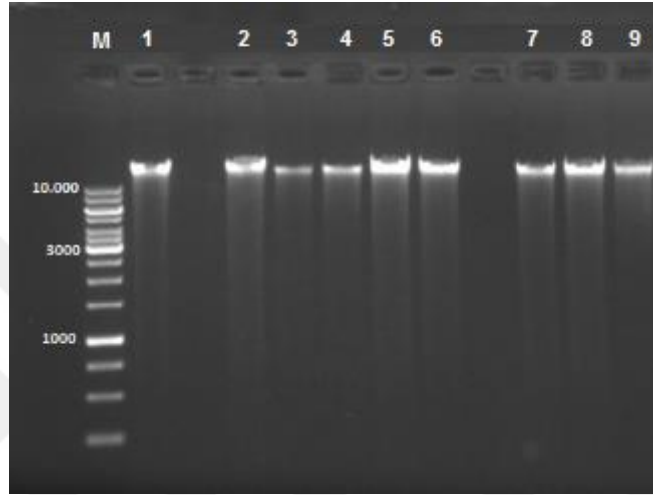


Şekil 4.11. Lokal izolatların ISP4 ve TSB besiyerlerinde zaman bağılı üreme profilleri. a) 1 numara, b) 3 numara, c) 10 numara, d) 27 numara, e) 28 numara, f) 30 numara, g) 34 numara, h) 35 numara, i) 40 numara (Mavi renk TSB kültürleri mavi, ISP4 kültürleri turuncu renkte çizgilerle gösterilmiştir).

4.4. Lokal İzolatların Tanımlanması

4.4.1. Genomik DNA izolasyonu

Lokal izolatlara ait 16S rRNA bölgelerinin PZR amplifikasyonunu gerçekleştirmek için QIAamp DNA (Qiagen) genomik DNA izolasyon kiti ile izole edilen genomik DNA %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek derişimi ve kalitesi nanodrop ölçümü ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.12) (Tablo 4.1).



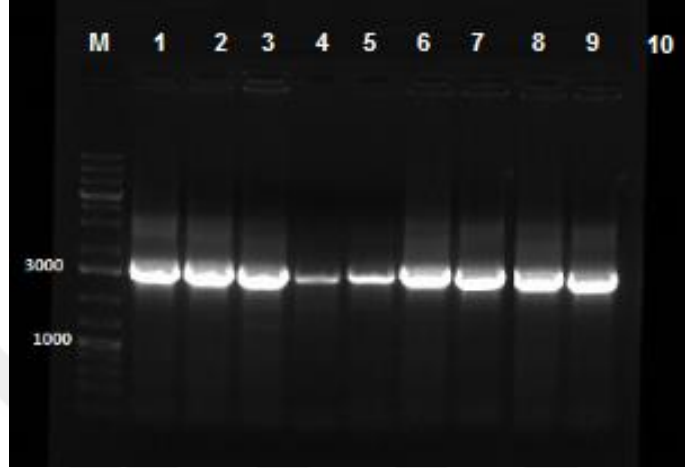
Şekil 4.12. Lokal izolatlara ait genomik DNA'lar. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Lokal izolat 1, 2: Lokal izolat 3, 3: Lokal izolat 10, 4: Lokal izolat 3, 5: Lokal izolat 27, 6: Lokal izolat 28, 7: Lokal izolat 30, 8: Lokal izolat 34, 9: Lokal izolat 35, 9: Lokal izolat 40.

Tablo 4.1. İzole edilen genomik DNA'ların nanodrop ölçüm değerleri

Lokal izolat No	Derişim (ng/μl)	A _{260/280} (nm)
1	940	2,00
3	920	1,96
10	900	1,99
27	752	2,00
28	520	2,00
30	825	2,01
34	840	1,98
35	1165	1,89
40	623	2,04

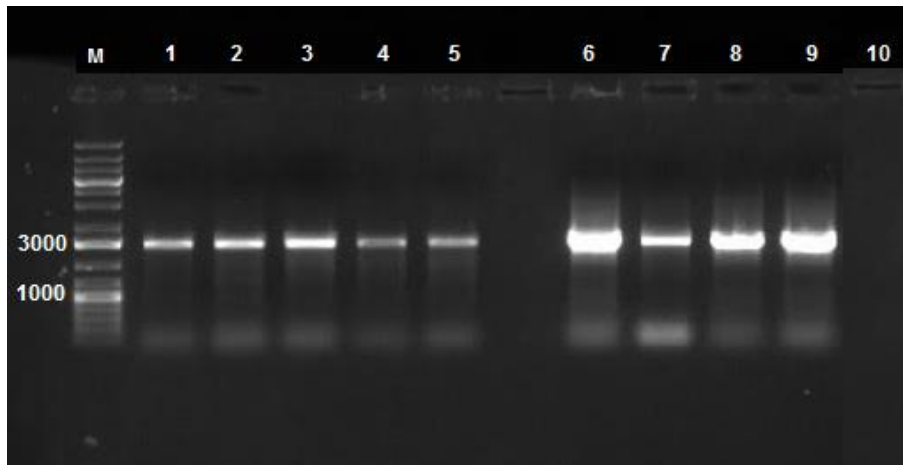
4.4.2. PZR amplifikasyonu

Dokuz adet lokal izolattan elde edilen genomik DNA'lar kalıp olarak ve BactF-AIIR primer çifti kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 4.13. Lokal izolatların 16S rRNA bölgelerinin PZR ile amplifikasyonu. M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder. PZR ampliconları; 1: Lokal izolat 1, 2: Lokal izolat 3, 3: Lokal izolat 10, 4: Lokal izolat 27, 5: Lokal izolat 28, 6: Lokal izolat 30, 7: Lokal izolat 34, 8: Lokal izolat 35, 9: Lokal izolat 40, 10: Kalıp DNA yerine suyun kullanıldığı negatif kontrol reaksiyonu.

PZR ile elde edilen PZR ampliconlarına ait bantlar jelden kesilerek NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) ile ekstraksiyonları yapılmıştır. Ekstraksiyonu gerçekleştirilen örnekler agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Jel ekstraksiyonu sonrası elde edilen PZR amplicon fragmentleri M: O'GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, 1: Lokal izolat 1, 2: Lokal izolat 3, 3: Lokal izolat 10, 4: Lokal izolat 27, 5: Lokal izolat 28, 6: Lokal izolat 30, 7: Lokal izolat 34, 8: Lokal izolat 35, 9: Lokal izolat 40, 10: Kalıp DNA yerine suyun kullanıldığı negatif kontrol reaksiyonu.

4.4.3. Blast analizleri

Sanger dizileme ile PZR ampliconlarından elde edilen nükleotit dizileri (Ek 5) BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) yardımıyla kullanılarak hizalanmış, ardından veritabanındaki diğer 16S rRNA dizilerine olan benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir (Tablo 4.2).

1 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces misionensis* ile %98,1 *Streptomyces sp.* strain NSC12 ile %98,5 *Streptomyces pratensis* strain WSZ051 ile %98,9, *Streptomyces sp.* strain DGS3-15 ile %89,3, *Streptomyces lavendulae* strain T10 ile %89,4 oranında benzerlik göstermektedir. 3 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces griseoplanus* strain Ca314 2e ile %98,1, *Streptomyces lavendulae* strain MP512 ile %98,5 *Streptomyces pratensis* strain WSZ051 ile %98,5, *Streptomyces sp.* strain DGS3-15 ile %96,3, *Streptomyces lavendulae* strain T10 %89,4 oranında benzerlik göstermektedir. 10 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces misionensis* %99, *Streptomyces lavendulae* strain MP512 ile %99, *Streptomyces pratensis* strain WSZ051 ile %98,5, *Streptomyces sp.* strain DGS3-15 ile %96,3, *Streptomyces lavendulae* strain T10 %89,6 oranında benzerlik göstermektedir. 27 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces mediolani* ile %99, *Streptomyces pluricologens* ile %99, *Streptomyces sporovirgulis* ile %99, *Streptomyces pratensis* ile %98,1, *Streptomyces badius* ile %98,5, oranında benzerlik göstermektedir. 28 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces misionensis* %98,5 oranında benzerlik göstermektedir. 30 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces sp.* strain QZGY ile %98, *Streptomyces vinidochromaeagenes* ile %98,1, *Streptomyces griseochromogenes* ile %98,8 oranında benzerlik göstermektedir. 34 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces bellus* ile %98,1, *Streptomyces coeruleorubidus* ile %98,5, *Streptomyces coeruleus* ile %98,9 oranında benzerlik göstermektedir. 35 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces bellus* ile %98,1, *Streptomyces galileus* ile %99, *Streptomyces chartreusis* ile %98,9, *Streptomyces pseudovenezuelae* ile %98,5, oranında benzerlik göstermektedir. 40 numaralı lokal izolat 16S rRNA gen dizilemesine göre *Streptomyces chartreusis*

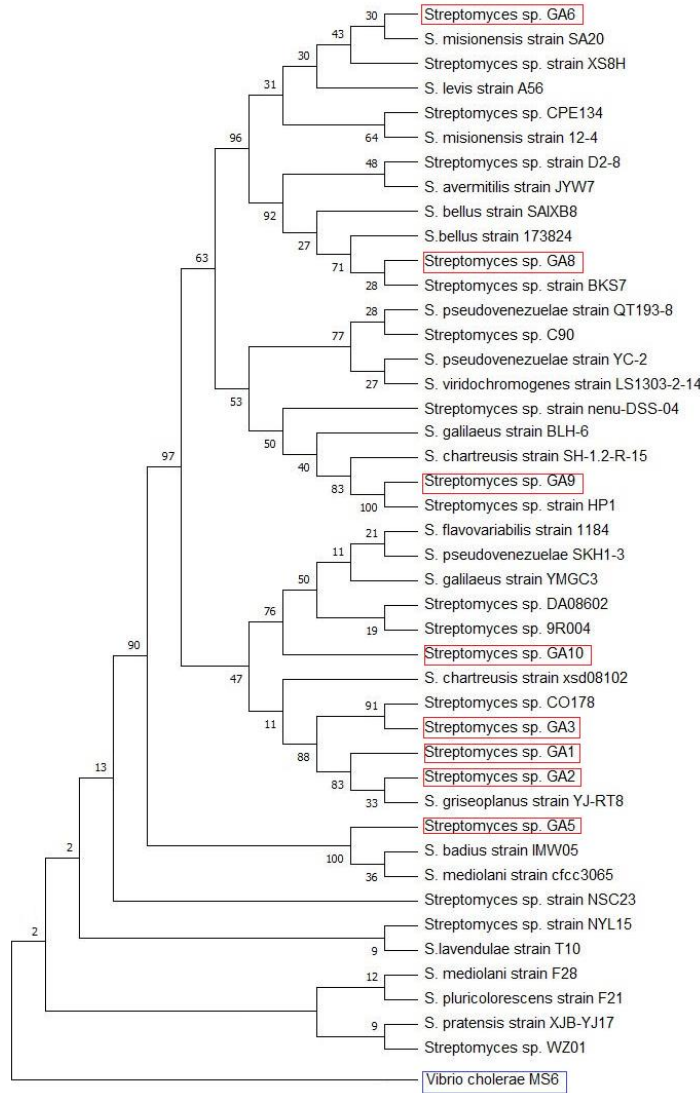
%99 oranında benzerlik göstermektedir. Lokal izolatlar Tablo 4.2’de verildiği şekilde isimlendirilmiş ve nukleotit dizileri GenBank’a yüklenmiştir. Erişim numaraları aynı tabloda verilmektedir.



Tablo 4.2. Dizi analizi ve hizalama sonucu çalışılan bakterilerin NCBI veritabanında benzerlik gösterdiği bakteriler ve benzerlik yüzdeleri

No	Suşların isimleri ve GenBank erişim numaraları	Benzerlik gösterdikleri suşlar	Erişim numaraları	Benzerlik yüzdeleri
1	<i>Streptomyces</i> sp. GA1 (OK639167)	• <i>Streptomyces misionensis</i> • <i>Streptomyces</i> sp. strain NSC12 • <i>Streptomyces pratensis</i> strain WSZ051 • <i>Streptomyces</i> sp. strain DGS3-15 • <i>Streptomyces lavendulae</i> strain T10	• MG833389.1 • MG833363.1 • KM186629.1 • KT183568.1 • KY213666.1	• %98,1 • %98,5 • %98,9 • %89,3 • %89,4
3	<i>Streptomyces</i> sp. GA2 (MN865828)	• <i>Streptomyces griseoplanus</i> strain Ca314 2e • <i>Streptomyces lavendulae</i> strain MP512 • <i>Streptomyces pratensis</i> strain WSZ051 • <i>Streptomyces</i> sp. strain DGS3-15 • <i>Streptomyces lavendulae</i> strain T10	• KF876852.1 • MW132941.1 • KM186629.1 • KT183568.1 • KY213666.1	• %98,1 • %98,5 • %98,5 • %96,3 • %89,4
10	<i>Streptomyces</i> sp. GA3 (OK639168)	• <i>Streptomyces misionensis</i> • <i>Streptomyces lavendulae</i> strain MP512 • <i>Streptomyces pratensis</i> strain WSZ051 • <i>Streptomyces</i> sp. strain DGS3-15 • <i>Streptomyces lavendulae</i> strain T10 %89,6	• MG833389.1 • MW132941.1 • KM186629.1 • KT183568.1 • KY213666.1	• %99 • %99 • %98,5 • %96,3 • %89,6
27	<i>Streptomyces</i> sp. GA5 (OK639169)	• <i>Streptomyces mediolani</i> • <i>Streptomyces pluricologrescens</i> • <i>Streptomyces sporovirgulis</i> • <i>Streptomyces pratensis</i> • <i>Streptomyces badius</i>	• FJ792545.1 • KU324442.1 • MN647548.1 • MH482882.1 • MF958508.1	• %99 • %99 • %99 • %98,1 • %98,5
28	<i>Streptomyces</i> sp. GA6 (OK639170)	• <i>Streptomyces misionensis</i>	• MT515826.1	• %98,5
30	<i>Streptomyces</i> sp. GA7 (OK639171)	• <i>Streptomyces</i> sp. strain QZGY • <i>Streptomyces vinidochromeagenes</i> • <i>Streptomyces griseochromogenes</i>	• MT083995.1 • KT597549.1 • MK967002.1	• %98 • %98,1 • %98,8
34	<i>Streptomyces</i> sp. GA8 (MN865829)	• <i>Streptomyces bellus</i> • <i>Streptomyces coeruleorubidus</i> • <i>Streptomyces coerulescens</i>	• EU570431.1 • NR_115381.1 • NR_114821.1	• %98,1 • %98,5 • %98,9
35	<i>Streptomyces</i> sp. GA9 (OK639172)	• <i>Streptomyces bellus</i> • <i>Streptomyces galileus</i> • <i>Streptomyces chartreusis</i> • <i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	• EU570431 • KJ020686.1 • MN784207.1 • LC425853.1	• %98,1 • %99 • %98,9 • %98,5
40	<i>Streptomyces</i> sp. GA10 (OK639173)	• <i>Streptomyces chartreusis</i>	• FJ481059.1	• %99

Suşlara ait 16S rRNA nükleotit dizilerinin çoklu dizi hizalamaları Clustal W (Woudenberg vd, 2017) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulması için MEGAX 10.1 yazılımı (Kumar vd, 2018) yardımıyla Neighbor Joining algoritması ve Kimura iki parametre testi kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Suşlara ait filogenetik dendrogram. Filogenetik ağaç, 1000 tekrarlı bootstrap testi ile Neighbour-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. *Vibrio cholerae* MS8 dış grup olarak kullanılmıştır.

4.5. Suşlara Ait Farklı Organik Çözücülerle Elde Edilen Özütlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ön çalışmalarda 120 saatlik ISP4 sıvı kültürlerinin üzerine 1:1 oranında etil asetat, metanol, kloroform, hekzan, benzen, bütanol, dimetil eter çözeltileri eklenmiş, 1 saat 100 rpm’de inkübasyon sonrasında oluşan fazın ayrılıp evaporatörde uçurulması ile elde edilen özütler kendi çözücüsü ile çözdürülmüş ve antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılmıştır. Sonuç olarak, Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile organik çözücü olarak metanol kullanılan deneylerde antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiş, diğer organik çözücü ekstraktlarında sonuç elde edilememiştir (Tablo 4.3). Bu nedenle, çalışmanın devamında ekstraksiyon aşamalarında organik çözücü olarak metanol kullanılmıştır.

Tablo 4.3. Metanol ekstraksiyonu sonucunda elde edilen özütlere ait antimikrobiyal aktivite sonuçları (mm cinsinden)

<i>Streptomyces</i> sp.	GA1	GA2	GA3	GA7	GA8
İndikatör Suşlar					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	6	6	ND*	6	ND*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	ND*	ND*	ND*	ND*	6
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ND*	ND*	6	ND*	ND*

ND*: Belirlenmedi

4.6. Kültür Süpernatantlarında Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Dokuz lokal *Streptomyces* suşuna ait 120 saatlik ISP4 sıvı kültürlerinin santrifüjü sonrasında elde edilen süpernatantlar kullanılarak biyoaktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi

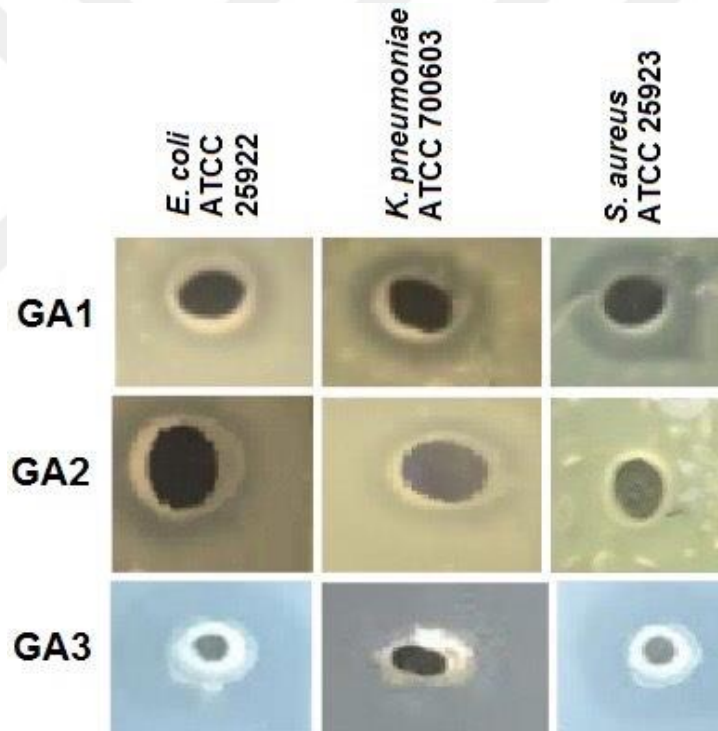
Agar Kuyucuk Difüzyon yöntemi kullanılarak *Streptomyces* sp. GA1, *Streptomyces* sp. GA2, *Streptomyces* sp. GA3, *Streptomyces* sp. GA5, *Streptomyces* sp. GA6, *Streptomyces* sp. GA7, *Streptomyces* sp. GA8, *Streptomyces* sp. GA9 ve *Streptomyces* sp. GA10 suşlarına ait ISP4 kültür süpernatantlarının 8 farklı indikatör mikroorganizmaya karşı elde edilen biyoaktivite sonuçları incelendiğinde zon

oluşumlarının sadece *Streptomyces* sp. GA1, GA2 ve GA3 suşlarına ait süpernatantlarla elde edildiği tespit edilmiştir. En belirgin zon oluşumu, 10 mm’lik zon çapı ile, *S. aureus* ATCC 25923 indikatör suşuna karşı *Streptomyces* sp. GA1 ve GA3 suşlarından elde edilmiştir (Tablo 4.4) (Şekil 4.16).

Tablo 4.4. Kültür süpernatantlarının Agar Kuyucuk Difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite değerleri (mm cinsinden).

<i>Streptomyces</i> sp.	GA1	GA2	GA3
İndikatör Suşlar			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	7,5	7,5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	7,5	7,5	7,5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10	ND*	10

ND*: Belirlenmedi



Şekil 4.16. Fermantasyon deneylerinde 120. saatte alınan *Streptomyces* sp. GA1, GA2, GA3 numaralı bakterilere ait süpernatantın indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.

4.6.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi

Broth mikrodilüsyon deneyi sonucunda Agar disk difüzyon deneyi ile zon

ölçümü alınamayan *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. niger* ATCC 16404 indikatör mikroorganizmalarına karşı bazı suşların süpernatantlarıyla kantitatif değerler elde edilebilmiştir. *Streptomyces* sp. GA2, GA3 ve GA5 suşlarına ait süpernatantlarda *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı, *Streptomyces* sp. GA2, GA3, GA5, GA6 ve GA10 suşlarına ait süpernatantlarda ise *E. coli* ATCC 25922'e karşı MIC değeri elde edilememiştir. Bunlar dışında, kalan süpernatantlar ile diğer tüm indikatör suşlara karşı 512 µg/ml değerinde MIC sonucu elde edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Suşlara ait süpernatantlar kullanılarak elde edilen MIC değerleri

Suşlar	GA1	GA2	GA3	GA5	GA6	GA7	GA8	GA9	GA10	Amikasin/ Flukanazol MIC (µg/mL)	CLSI S//R
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512	ND*	ND*	ND*	ND*	512	512	512	ND	64/32	≤16/32≤ 64
<i>K. pneumo niae</i> ATCC 700603	512	512	512	512	512	512	512	512	512	64/32	≤4/- /≤64
<i>P. aeru ginosa</i> ATCC 27853	512	ND*	ND*	ND*	512	512	512	512	512	64/32	≤16/32/ ≤64
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/8	≤16/32/ ≤64
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/8	≤64/128 /≤256
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/16	≤16/32/ ≤64
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/8	≤14≤19
<i>A. niger</i> ATCC 16404	512	512	512	512	512	512	512	512	512	8/8	4-16

ND*: Belirlenmedi

4.6.3. Kültür süpernatantlarına ait MBC/MFC değerlerinin belirlenmesi

ISP4 kültür süpernatantlarına ait MBC ve MFC sonuçları Şekil 4.17'de verilmektedir. *C. albicans* ATCC 10231 ve *E. faecalis* ATCC 29212 indikatör suşlarına karşı denenen konsantrasyonlarda MFC ve MBC değerleri elde edilememiştir. Ayrıca, MIC sonuçlarını doğrulayıcı bir şekilde, *E. coli* ATCC 25922'e karşı GA2, GA3, GA5, GA6 ve GA10 suşlarında MBC değerleri bulunmamaktadır. Kalan diğer süpernatantların indikatör suşlara karşı göstermiş oldukları MBC/MFC

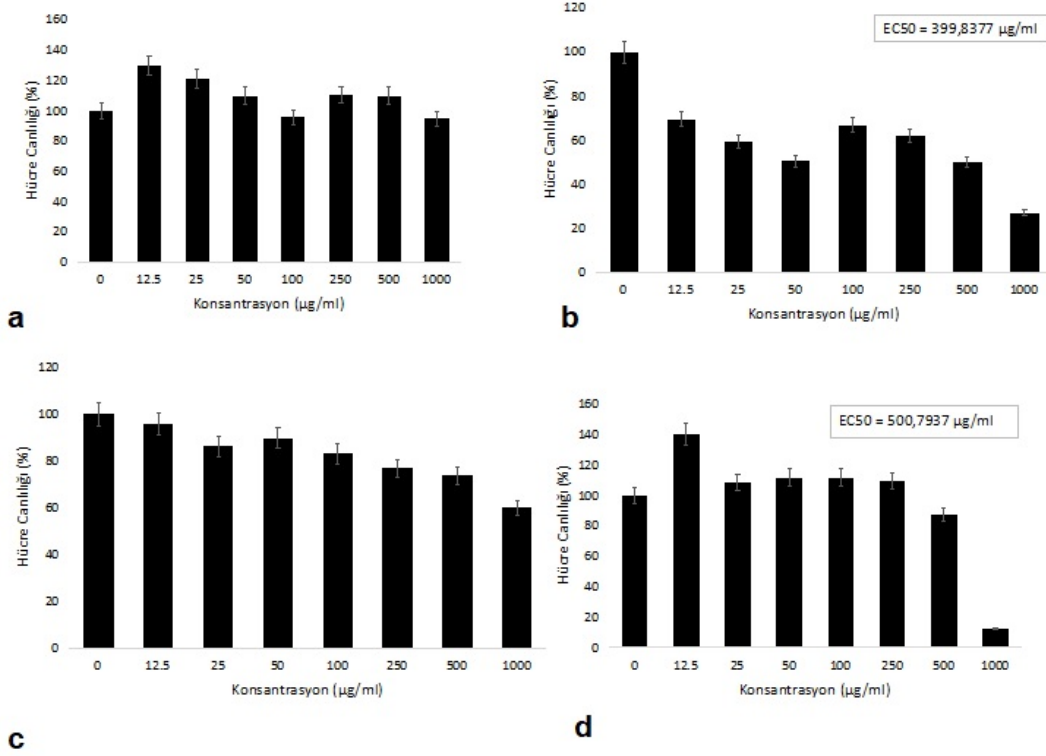
değerleri MIC değerleri ile aynı olup MIC testi sonucunda elde edilen 512 µg/ml konsantrasyonunun “sidal aktivite” gösteren konsantrasyon olduğunu açıkça görülmektedir.

<i>Streptomyces</i> sp.	GA1			GA2			GA3			GA5			GA6			GA7			GA8			GA9			GA10		
	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128
<i>E. coli</i> ATCC 25922																											
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 70603																											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853																											
<i>S. aureus</i> ATCC 25923																											
<i>E. subtilis</i> ATCC 6633																											
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212																											
<i>C. albicans</i> ATCC 10231																											
<i>A. niger</i> ATCC 16404																											

Şekil 4.17. Suşlara ait süpernatantlar kullanılarak elde edilen MBC/MFC değerleri

4.6.4. Kültür süpernatantlarına ait sitotoksosite verileri

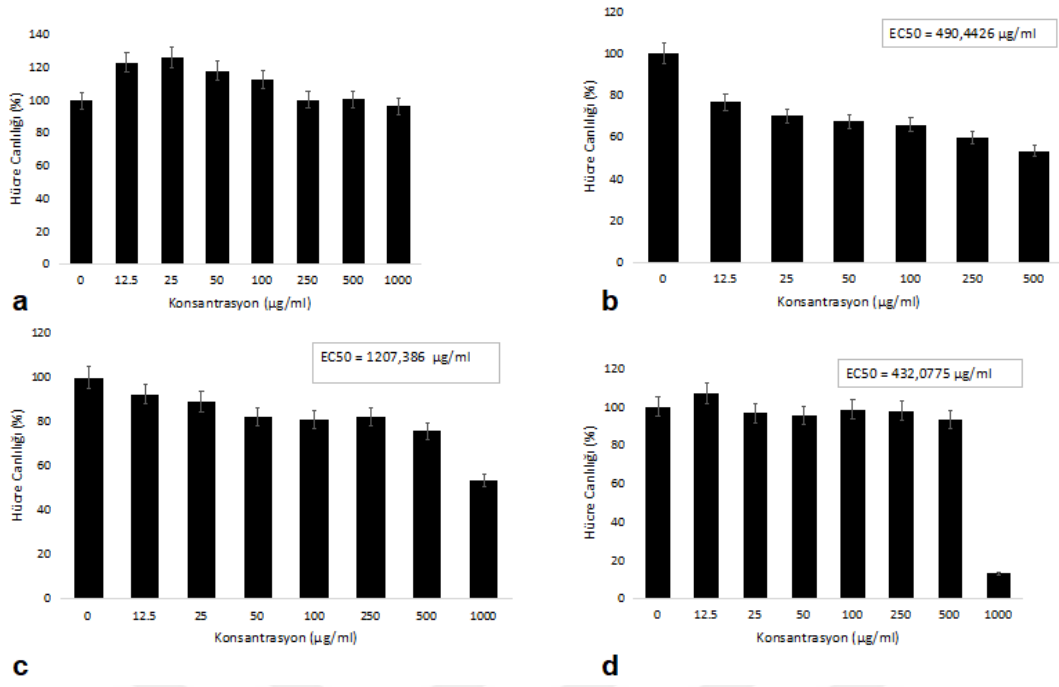
Kültür süpernatantlarıyla yapılan sitotoksosite deneyleri ile *Streptomyces* sp. GA1, GA2, GA3 ve GA5 suşlarından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21).



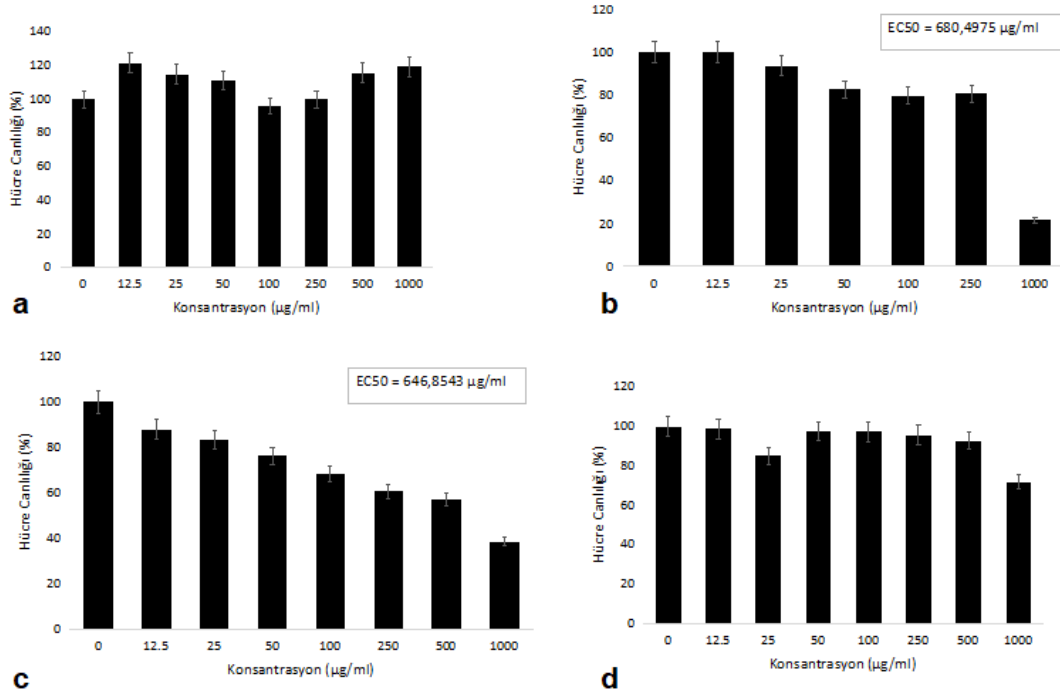
Şekil 4.18. *Streptomyces* sp. GA1 süpernatantlarından elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) İnsan prostat kanser hücre hattı (LNCaP), c) İnsan kolon epidermal adenokarsinom kanserli hücre hattı (CaCO₂), d) İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF7).

Şekil 4.18 incelendiğinde, *Streptomyces* sp. GA1 süpernatantlarında EC₅₀ değerleri 399.84 µg/ml ve 500.79 µg/ml olmak üzere sırasıyla LNCaP ve MFC7 kanser hücrelerine karşı zayıf sitotoksosite elde edildiği görülmektedir.

Streptomyces sp. GA2 süpernatantlarından elde edilen MTT verilerine göre en iyi EC₅₀ değeri MFC7 hücrelerine karşı (EC₅₀:432.07 µg/ml) elde edilmiş olup, bunu sırasıyla LNCaP (EC₅₀:490.44 µg/ml) ve CACO2 (EC₅₀:1207.38 µg/ml) hücre hatları izlemektedir (Şekil 4.19).

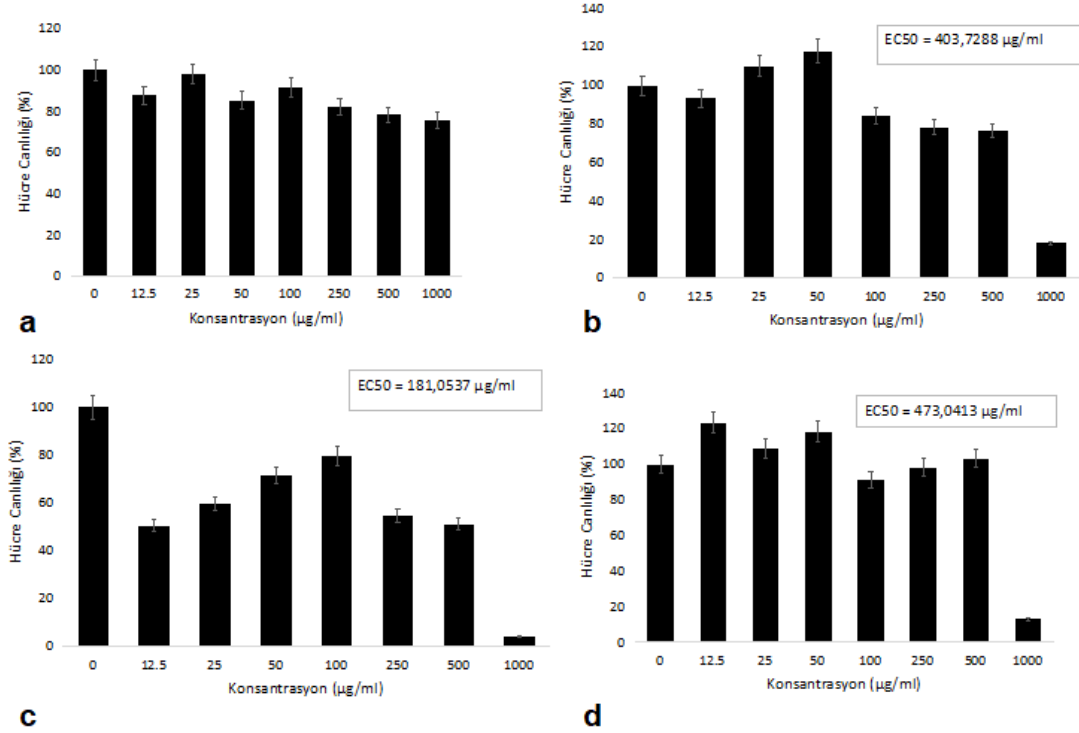


Şekil 4.19. *Streptomyces* sp. GA2 süpernatantlarından elde edilen sitotoksikite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) İnsan prostat kanser hücre hattı (LNCaP), c) İnsan kolon epidermal adenokarsinom kanserli hücre hattı (CaCO2), d) İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF7).



Şekil 4.20. *Streptomyces* sp. GA3 süpernatantlarından elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) İnsan prostat kanser hücre hattı (LNCaP), c) İnsan kolon epidermal adenokarsinom kanserli hücre hattı (CaCO2), d) İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF7).

Streptomyces sp. GA3 süpernatantlarında ise CACO2 hücrelerine karşı 646.85 µg/ml ve LNCaP'ye karşı 680.49 µg/ml EC₅₀ değerine sahip biyoaktif bileşikler olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.20).



Şekil 4.21. *Streptomyces* sp. GA5 süpernatantlarından elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) İnsan prostat kanser hücre hattı (LNCaP), c) İnsan kolon epidermal adenokarsinom kanserli hücre hattı (CaCO2), d) İnsan meme kanseri hücre hattı (MCF7).

Kültür süpernatantları kullanılarak yapılan sitotoksosite deneylerinde en iyi sonuç *Streptomyces* sp. GA5 süpernatantı kullanılarak, 181.05 µg/ml EC₅₀ değeri ile CACO2 hücre hattına karşı elde edilmiştir (Şekil 4.21). LNCaP ve MFC7'ye karşı sırasıyla 403.72 µg/ml ve 473.04 µg/ml EC₅₀ değerleri elde edilmiştir.

4.7. ISP4 Sıvı Kültürlerine Ait Hücrelerin Metanol Özütlerinde Biyoaktivitenin Değerlendirilmesi

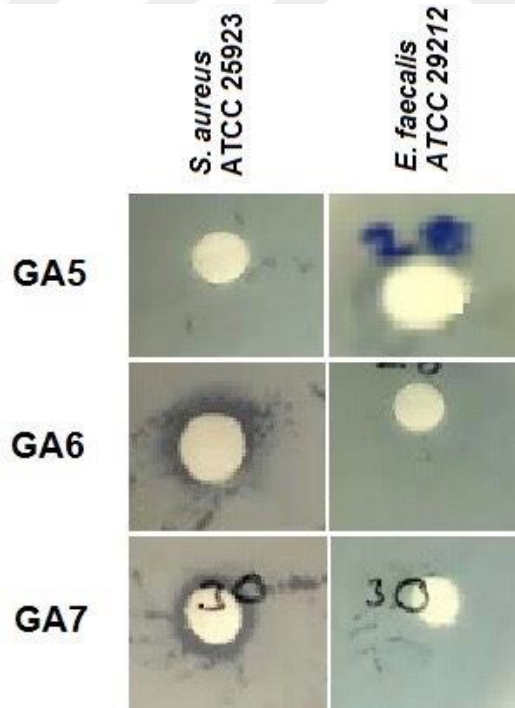
Dokuz lokal *Streptomyces* suşuna ait 120 saatlik ISP4 sıvı kültürlerinin santrifüjü sonrasında elde edilen hücre peletleri metanolla ekstrakte edilmiş ve metanol özütleri kullanılarak biyoaktivite aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.7.1. Agar disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi

Lokal *Streptomyces* sp. suşlarının ISP4 sıvı kültürlerinden elde edilen pelletlerin metanol ekstaksiyonundan elde edilen özütler ile antimikrobiyal altiviteri Agar Disk Difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, *Streptomyces* sp. GA5 suşuna ait metanol özütüne karşı en yüksek duyarlılık *E. faecalis* ATCC 29212 indikatör suşundan elde edilmiştir (zon çapı 9 mm) (Tablo 4.6) (Şekil 4.22).

Tablo 4.6. ISP4 sıvı kültürlerine ait hücrelerin metanol özütlerinde Agar Disk Difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (mm cinsinden)

Suşlar	GA5	GA6	GA10
İndikatör Suşlar			
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ND*	7	7,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	9	ND*	ND*



Şekil 4.22. *Streptomyces* sp. GA5, GA6 ve GA7 suşlarına ait pellet özütlerinin indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.

4.7.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi

ISP4 sıvı kültürlerine ait hücrelerin metanol özütleri kullanılarak yapılan mikrodilüsyon deneyi sonucunda elde edilen MIC verileri incelendiğinde en yüksek duyarlılık *E. faecalis* ATCC 29212 suşuna karşı 256 µg/ml’lik MIC değeri ile *Streptomyces* sp. GA2, GA3, GA5, GA6, GA7, GA8, GA9 ve GA10 suşlarında elde edilmiştir. *Streptomyces* sp. GA3, GA5, GA8, GA9 ve GA10 suşlarında da aynı MIC değeri (256 µg/ml) *S. aureus* ATCC 25923’a karşı elde edilmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan gram negatif bakterilerden biri olan *P. aeruginosa* ATCC27853’e karşı, *Streptomyces* sp. GA9 ve GA10 suşlarına ait özütlerden 256 µg/ml MIC değeri tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Diğer tüm suşlara ait pellet özütlerinden sağlanan MIC değerleri 512 µg/ml’dir.

Tablo 4.7. Suşlara ait pellet özütleri kullanılarak elde edilen MIC değerleri

Suşlar	GA1	GA2	GA3	GA5	GA6	GA7	GA8	GA9	GA10	Amikasin/ Flukanazol MIC (µg/ml)	CLSI S//R
İndikat ör Suşlar											
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512	512	512	512	512	512	512	512	512	64/64	≤16/32≤ 64
<i>K. pneumo niae</i> ATCC 700603	512	512	512	512	512	512	512	512	512	64/32	≤4/- /≤64
<i>P.aerug inosa</i> ATCC 27853	512	ND*	ND*	ND*	512	512	512	256	256	64/32	≤16/32/ ≤64
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	512	512	256	256	512	512	256	256	256	8/8	≤16/32/ ≤64
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/16	≤64/128 /≤256
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	512	256	256	256	256	256	256	256	256	16/16	≤16/32/ ≤64
<i>C. albican s</i> ATCC 10231	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/8	≤14≤19
<i>A.niger</i> ATCC 16404	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/16	4-16

ND*: Belirlenmedi

4.7.3. Pellet özütlerine ait MBC/MFC değerlerinin belirlenmesi

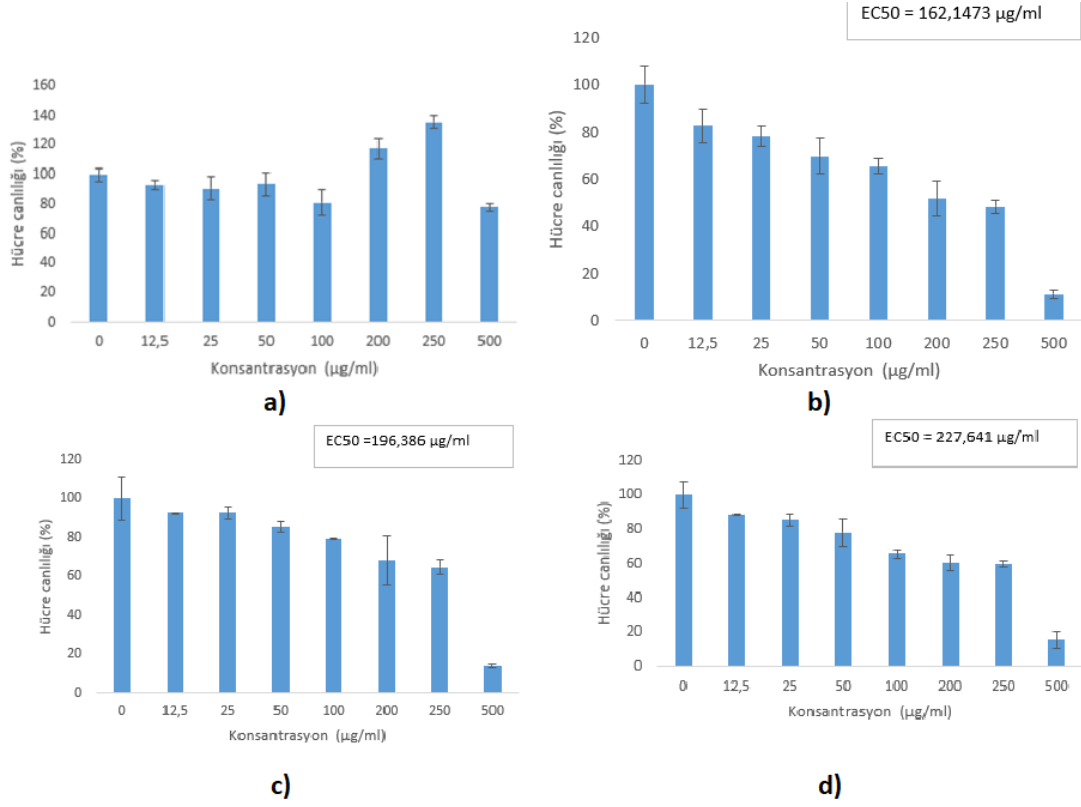
ISP4 sıvı kültür pelletlerinin metanol özütlerine ait MBC ve MFC sonuçları Şekil 4.23’de verilmektedir. GA1, GA2, GA3, GA7, GA8 ve GA9 süpernatatlarında *E. coli* ATCC 25922’ye karşı MBC değeri MIC ile aynı değer olmak üzere 512 µg/ml’dir. *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *B. subtilis* ATCC 6633’e karşı süpernatantlarla elde edilen MIC ve MBC ile *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. niger* ATCC16404 suşlarına karşı MFC ve MIC değerleri aynı olup 512 µg/ml’dir. *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853’e ait MBC değerleri MIC ile aynıdır.

<i>Streptomyces</i> sp.	GA1			GA2			GA3			GA5			GA6			GA7			GA8			GA9			GA10		
	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128
<i>E. coli</i> ATCC 25922																											
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603																											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853																											
<i>S. aureus</i> ATCC 25923																											
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633																											
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212																											
<i>C. albicans</i> ATCC 10231																											
<i>A. niger</i> ATCC 16404																											

Şekil 4.23. Suşlara ait pellet özütleri kullanılarak elde edilen MBC/MFC değerleri

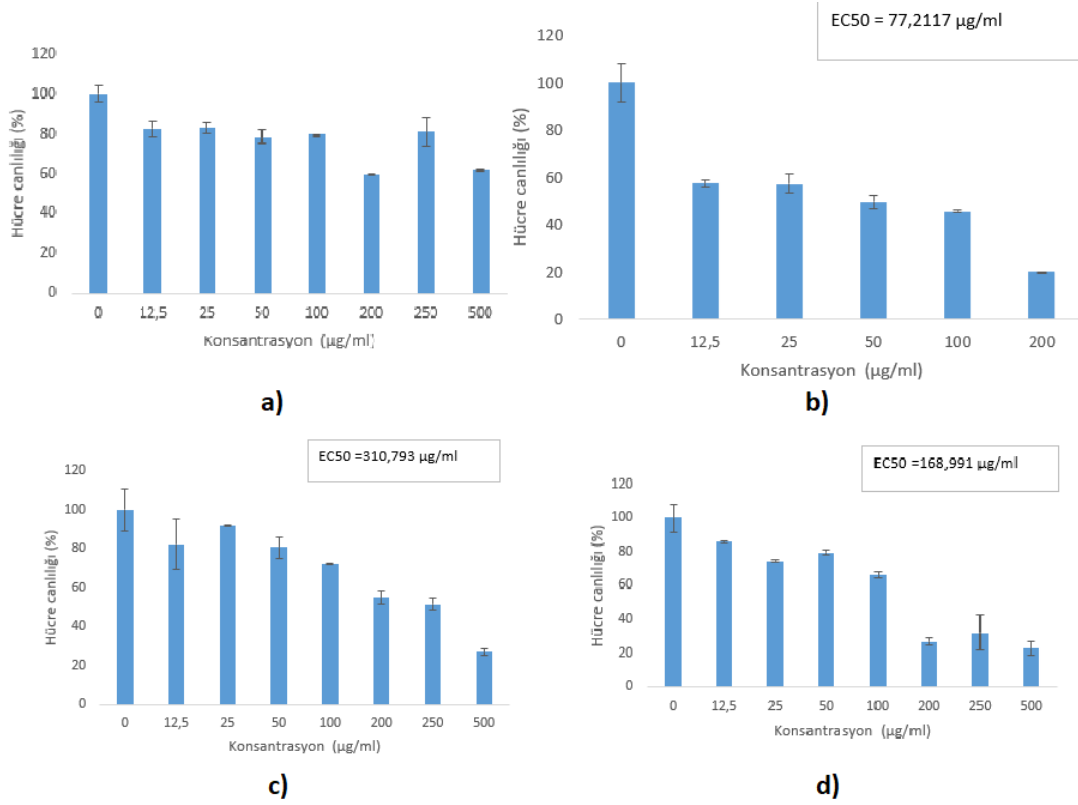
4.7.4. Pellet özütlerine ait sitotoksosite verileri

Kültür süpernatantlarıyla yapılan sitotoksosite deneyleri ile *Streptomyces* sp. GA1, GA2, GA3, GA6, GA8 ve GA10 suşlarından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28 ve 4.29).



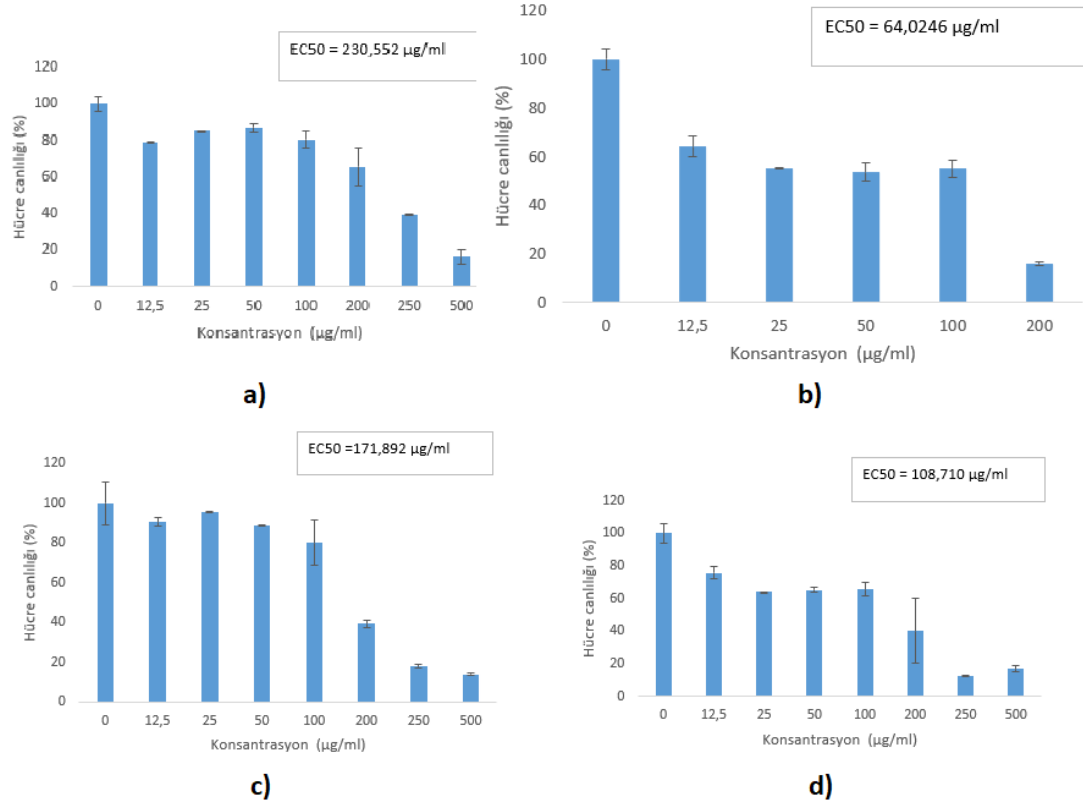
Şekil 4.24. *Streptomyces* sp. GA1 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksiste sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

Şekil 4.24’de görüldüğü gibi, *Streptomyces* sp. GA1 pellet özütlerinin kullanıldığı MTT deneyleri sonucunda üç kanserli hücre hattında da artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı azalmıştır. Sağlıklı insan embriyonik böbrek hücresine göre diğer üç kanserli hücre hattında 500 µg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığının %20 oranında düşürmüştür. *Streptomyces* sp. GA1 pellet özütü kullanılarak, 162.14 µg/ml EC₅₀ değeri ile CACO2 hücre hattına karşı elde edilmiştir (Şekil 4.24). MFC7 ve LNCaP’ye karşı sırasıyla 196.38 µg/ml ve 227.64 µg/ml EC₅₀ değerleri elde edilmiştir.



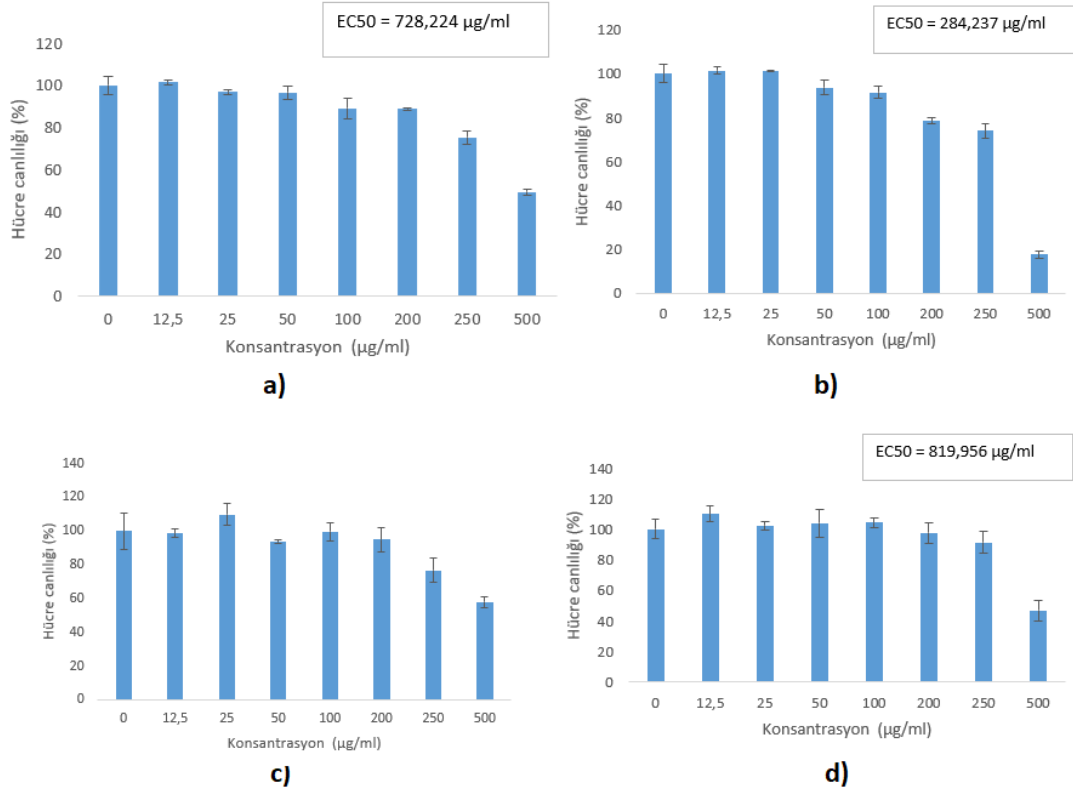
Şekil 4.25. *Streptomyces* sp. GA2 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

Üç kanserli hücre hattında da artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı azalmıştır. Bu da proliferizasyonunun düşük olduğunu göstermektedir (Şekil 4.25). *Streptomyces* sp. GA2 pellet özütleri kullanıldığında en iyi EC₅₀ değeri 77.21 µg/ml CaCO2 kanserli hücre hattına karşı elde edilirken, LNCaP ve MCF7 kanser hatlarına karşı elde edilen EC₅₀ değerleri sırasıyla 168.99 ve 310.79 µg/ml'dir.



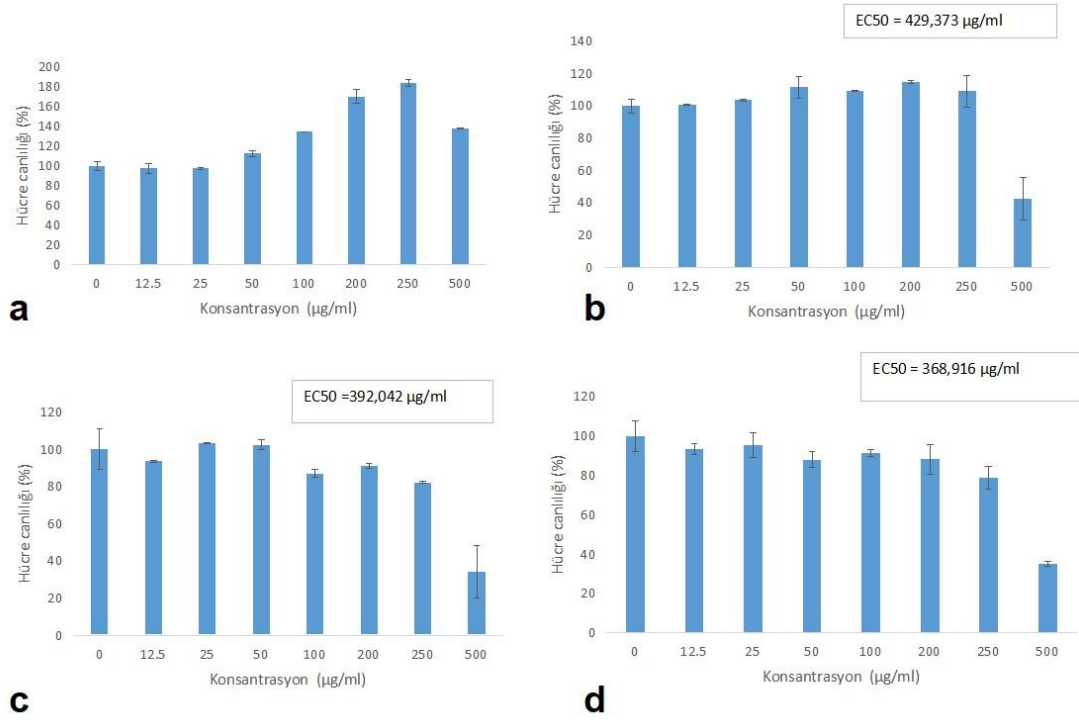
Şekil 4.26. a) *Streptomyces* sp. GA3 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksisite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO₂, c) MCF7, d) LNCaP.

Streptomyces sp. GA3 pellet özütleri varlığında, üç kanserli hücre hattında da artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı azalmıştır. Hem MCF7 hem de LNCaP hattında 500 µg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığının %20 oranında düşürmüştür (Şekil 4.26). Bu pellet özütü HEK293 kontrol hücrelerinin canlılığını da azaltmaktadır (EC₅₀: 230.55 µg/ml). *Streptomyces* sp. GA3 pellet özütleri kullanıldığında en iyi EC₅₀ değeri 64.02 µg/ml CaCO₂ kanserli hücre hattına karşı elde edilirken, LNCaP ve MCF7 kanser hatlarına karşı elde edilen EC₅₀ değerleri sırasıyla 108.71 ve 171.89 µg/ml'dir.



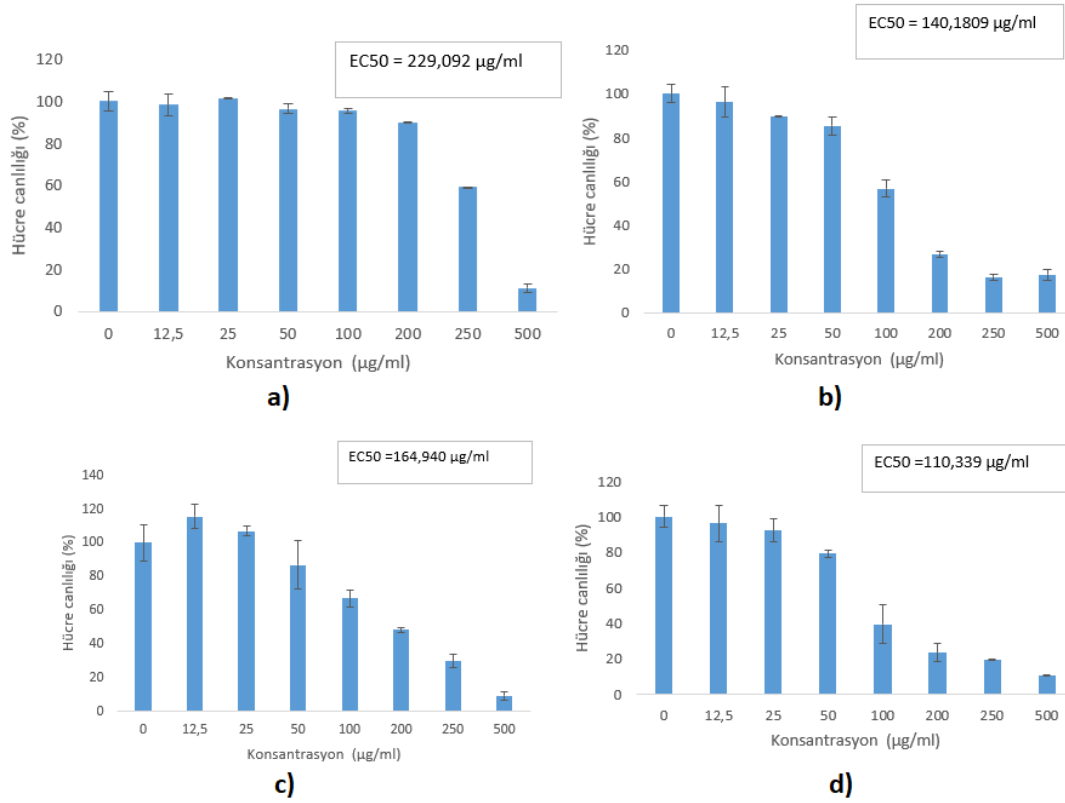
Şekil 4.27. *Streptomyces* sp. GA6 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

Şekil 4.27’de görüldüğü gibi, *Streptomyces* sp. GA6 pellet özütleri kullanıldığında üç kanser hattında da hemen hemen artan konsantrasyonlarda azalma mevcuttur. Özellikle, CaCO2 kanserli hücre hattında 500 µg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığını %20 oranına kadar düşürmüştür (EC₅₀: 284.23 µg/ml).



Şekil 4.28. *Streptomyces* sp. GA8 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

MTT verileri incelendiğinde, *Streptomyces* sp. GA8 pellet özütleri varlığında, CaCO2, MCF7 ve LNCaP kanserli hücre hatlarına karşı 429.37, 392.04 ve 368.91 µg/ml EC₅₀ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.29. *Streptomyces* sp. GA10 pellet özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

MTT verileri incelendiğinde, *Streptomyces* sp. GA10 pellet özütleri varlığında, her üç kanserli hücrede de artan konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı görülmektedir (Şekil 4.29). Aynı zamanda her üç kanserli hücre hattında da 250 µg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığı yaklaşık %25 oranına düşmüştür. HEK293 kontrol hücrelerinde 229.09 µg/ml, CaCO2, MCF7 ve LNCaP kanserli hücre hatlarına karşı ise 140.18, 164.94 ve 110.33 µg/ml EC₅₀ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.29).

4.8. Katı Fermantasyon Ekstraksiyonlarında Biyoaktivitenin Belirlenmesi

Lokal *Streptomyces* sp. suşlarının 120 saatlik ISP4 katı kültürlerinin metanol ile ekstraksiyonu sonrasında elde edilen özütler kullanılarak biyoaktivite değerlendirmeleri yapılmıştır.

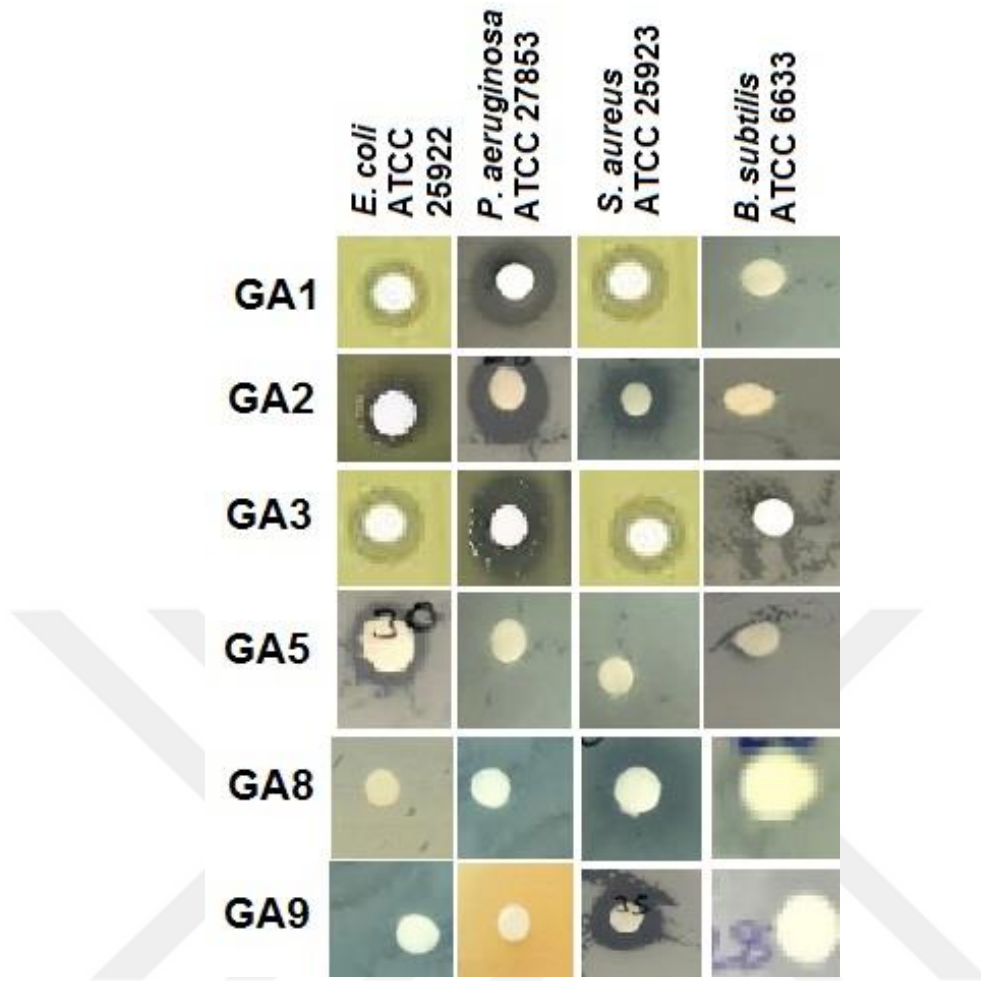
4.8.1. Agar disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi

Biyoassay çalışmaları ile en yüksek antibakteriyel aktivite *Streptomyces* sp. GA3 suşuna ait metanol özütlerinden *P. aeruginosa* ATCC 27853'a karşı (zon çapı 12 mm) elde edilmiştir (Tablo 4.8) (Şekil 4.30).

Tablo 4.8. Katı ISP4 fermantasyonuna ait metanol özütlerinden elde edilen zon ölçümleri (mm)

Suşlar	GA1	GA2	GA3	GA5	GA8	GA9
İndikatör Suşlar						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	7	7	7,5	ND*	ND*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	9,5	8,5	12	ND*	ND*	ND*
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7	8	7	ND*	8,5	9
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	ND*	ND*	ND*	ND*	7,5	8

ND*: Belirlenmedi



Şekil 4.30. Katı ISP4 fermantasyonuna ait metanol özütlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları.

4.8.2. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MIC değerlerinin belirlenmesi

Örneklerin metanol ekstraksiyonundan elde edilen özütler için MIC değerleri incelendiğinde sekiz indikatör mikroorganizmaya karşı da sonuç elde edilmiştir. Tüm suşların katı fermantasyonuna ait metanol özütlerine karşı en yüksek duyarlılık *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan elde edilmiştir (MIC: 256 µg/ml). Ayrıca, *Streptomyces* sp. GA1'e ait özütler dışında diğer tüm özütlerde *E. faecalis* ATCC 29212'e karşı 256 µg/ml'lik MIC tespit edilmiştir. Bu iki indikatör suştan sonraki en yüksek duyarlılık (MIC: 56 µg/ml) *S. aureus* ATCC 25923 tarafından *Streptomyces* sp. GA3, GA5, GA8, GA9 ve GA10 metanol özütlerine karşı sağlanmıştır. Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı *Streptomyces* sp. GA9 ve GA10 özütleri ile aynı MIC değeri elde edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. niger* ATCC 16404 indikatör

mikroorganizmalarına karşı tüm özütlerle 512 µg/ml MIC sonucu alınmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Katı ISP4 fermantasyonlara ait metanol özütlerinden elde edilen MIC değerleri

Suşlar	GA1	GA2	GA3	GA5	GA6	GA7	GA8	GA9	GA10	Amikasin/ Flukanazol MIC (µg/ml)	CLSI S//R
İndikat ör Suşlar											
<i>E. coli</i> ATCC 25922	512	512	512	ND*	ND*	512	512	512	ND*	64/64	≤16/32/ 64
<i>K. pneumo niae</i> ATCC 700603	512	512	512	512	512	512	512	512	512	64/32	≤4/-/≤64
<i>P. aerugin osa</i> ATCC 27853	512	512	ND*	ND*	512	512	512	256	256	64/32	≤16/32/ ≤64
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	512	512	256	256	512	512	256	256	256	8/8	≤16/32/ ≤64
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	256	256	256	256	256	256	256	256	256	16/16	≤64/128 /≤256
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	512	256	256	256	256	256	256	256	256	16/16	≤16/32/ ≤64
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/8	≤14≤19
<i>A. niger</i> ATCC 16404	512	512	512	512	512	512	512	512	512	16/16	4-16

ND*: Belirlenmedi

4.8.3. ISP4 katı kültürlerine ait metanol özütlerinin MBC/MFC değerlerinin belirlenmesi

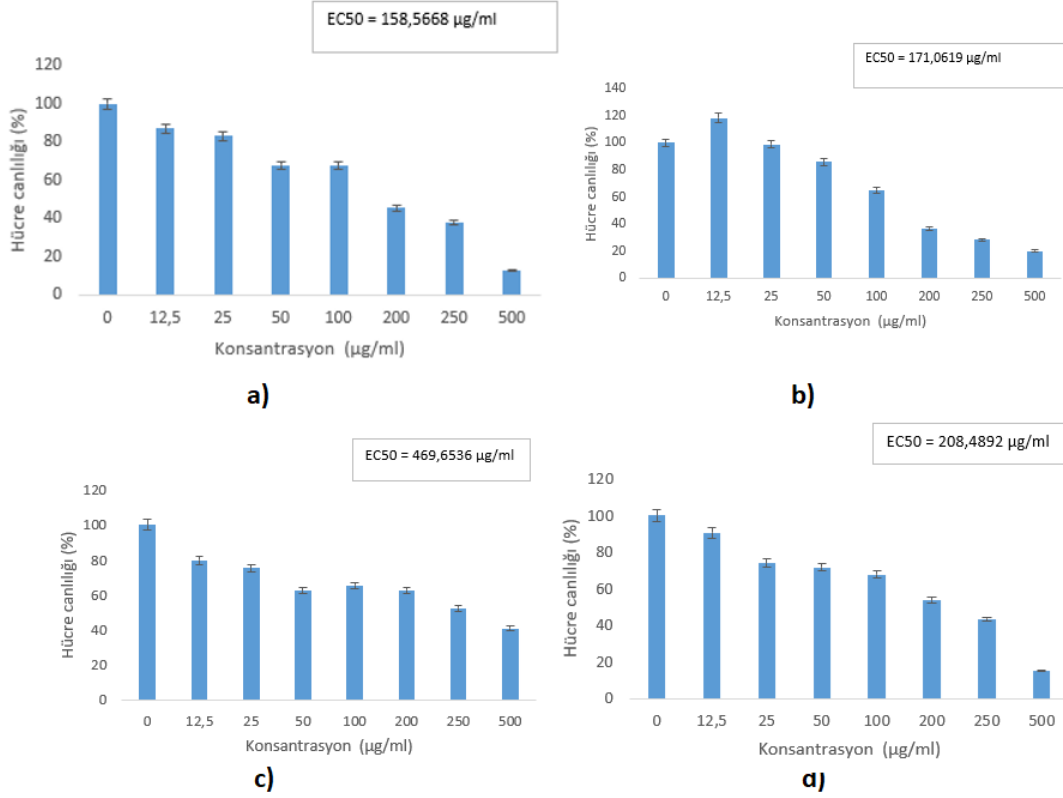
ISP4 katı kültürlerinden elde edilen metanol özütlerinin MBC ve MFC sonuçları Şekil 4.31’de verilmektedir. *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853’ya karşı elde edilen MIC değerleri ile MBC değerleri, *C. albicans* ATCC 10231 ve *A. niger* ATCC 16404’e karşı elde edilen MIC değerleri ile MFC değerleri aynıdır. *B. subtilis* ATCC 6633 suşuna karşı tüm metanol özütlerinin MIC değerleri 256 µg/ml iken MBC değerleri 512 µg/ml’dir.

<i>Streptomyces</i> sp.	GA1			GA2			GA3			GA5			GA6			GA7			GA8			GA9			GA10		
	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128	512	256	128
<i>E. coli</i> ATCC 25922																											
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603																											
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853																											
<i>S. aureus</i> ATCC 25923																											
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633																											
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212																											
<i>C. albicans</i> ATCC 10231																											
<i>A. niger</i> ATCC 16404																											

Şekil 4.31. Beş günlük katı fermantasyondan elde edilen metanol özütlerine ait MBC/MFC değerleri.

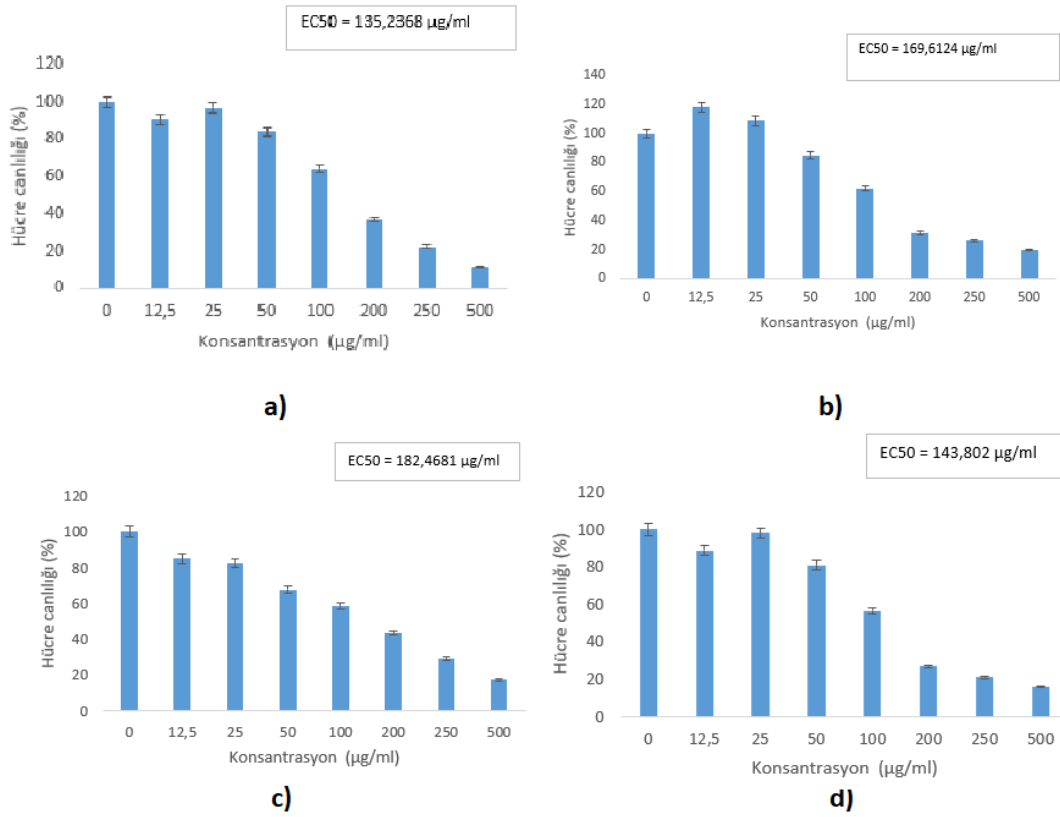
4.8.4. ISP4 katı kültürlerine ait metanol özütlerinin sitotoksosite verileri

Suşlara ait katı fermantasyonlardan elde edilen metanol özütlerinden özellikle *Streptomyces* sp. GA1, GA3 ve GA8 suşlarına ait olanlarda test edilen kanserli hücre hatlarına karşı sitotoksik etki tespit edilmiştir (Şekil 4.32, 4.33, 4.34).



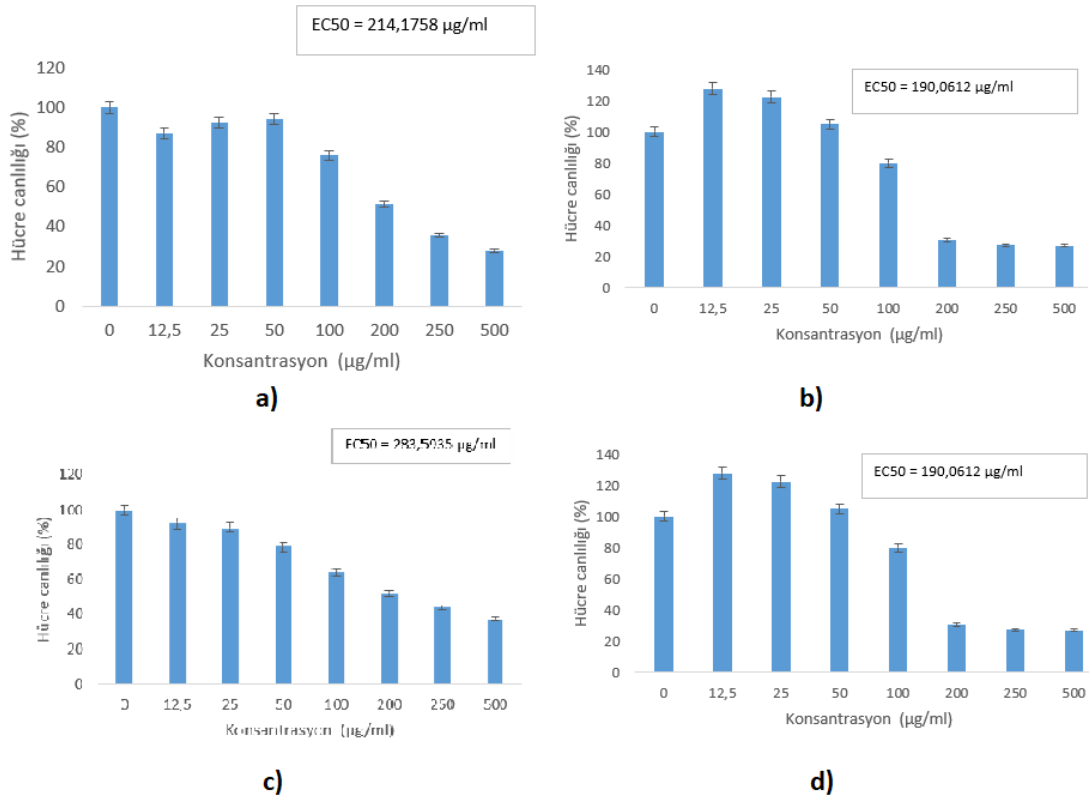
Şekil 4.32. *Streptomyces* sp. GA1 katı kültürünün metanol özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

Sağlıklı insan embriyonik böbrek hücre hattında proliferizasyonun düşük olduğu belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı azalmıştır. *Streptomyces* sp. GA1 özütlerinde hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücre hatlarında artan konsantrasyonlarda hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir. HEK293 kontrolüne karşı EC₅₀ değeri 158.56 µg/ml iken CaCO2 kanserli hücre hatlarına karşı bu değer 171.06 µg/ml'dir (Şekil 4.32).



Şekil 4.33. *Streptomyces* sp. GA3 katı kültürünün metanol özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO₂, c) MCF7, d) LNCaP.

Sağlıklı insan embriyonik böbrek hücre hattında proliferizasyonun düşük olduğu belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda hücre canlılığı azalmıştır. *Streptomyces* sp. GA3 suşuna ait katı kültürlerde buluna biyoaktif madde hem sağlıklı hücrede hem de kanser hücre hatlarında artan konsantrasyonlarda hücre canlılığını azaltmaktadır (Şekil 4.33).



Şekil 4.34. *Streptomyces* sp. GA8 katı kültürünün metanol özütlerinden elde edilen sitotoksosite sonuçları. a) HEK293 kontrol hücreleri, b) CaCO2, c) MCF7, d) LNCaP.

Sağlıklı insan embriyonik böbrek hücre hattında proliferizasyon düşüktür. HEK293 kontrol hücreleri için EC₅₀ değeri 214.17 µg/ml olup, bu değer CaCO2 ve LNCaP kanserli hücreleri için 190.06'dır.

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Patojenlerde antibiyotik direncinin ciddi sonuçları, potansiyel tarım, farmasötik ve endüstriyel uygulamalar nedeniyle yeni biyoaktif bileşiklere duyulan ihtiyaç büyüktür (Aslam vd, 2018). Özellikle mevcut antibiyotiklerin tedavi etme potansiyellerini kaybetmesi ve *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* gibi patojenlerin tehdit olmaya devam etmesi yeni ilaçların keşfini zorunlu kılmaktadır (Mulani vd, 2019). Modernize edilmiş tıbbın, söz gelimi, organ nakli, kanser tedavisi, prematüre bebeklerin iyileştirilmesi veya büyük kapsamlı ameliyatların başarısı, bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmede etkili antibiyotik tedavisi olmaksızın mümkün olmayabilir (Aslma vd, 2018). Dünya çapında kanser insidansı artmaya devam ettiği için yeni ve etkili antikanser bileşiklerine de çok ihtiyaç duyulmaktadır (Tan vd, 2019). Biyolojik aktiviteye sahip ve ilaç keşfi için önemli kaynaklar olan biyoaktif bileşiklerin araştırılması bu sorunların çözümü için başvurulacak bir yaklaşımdır.

Yeni biyoaktif bileşikler için yapılan araştırmalar esas olarak karasal organizmalara dayanmaktadır. Söz gelimi, 2020 yılına ait bir çalışmada, Hindistan toprağından izole edilen *Streptomyces* sp. SM01 suşunun çoklu ilaç direnci gösteren bakterilere karşı etkinliğe sahip olduğu ve özgün pikolinamisin antibiyotiğini ürettiği bildirilmiştir. İlgili çalışmada yeni tanımlanan pikolinamisin sitotoksik aktivitesi belirlenmemiştir (Maiti vd, 2020). Aynı tarihli bir diğer çalışmada, izole edilerek tanımlanan *Streptomyces* sp. VN1 suşunun antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri değerlendirilerek kanser hücre hatlarına karşı aktivite elde edilmiştir (Nyugen vd, 2020). Yine, Kormanec vd. (2020), *Streptomyces* sp. suşundan elde edilen mithramycin isimli antibiyotiğin antitümör aktivitesini değerlendirmiştir. Nepal'in farklı bölgelerindeki su ve toprak sedimanlarından potansiyel antibiyotik üreten aktinomisetlerin araştırıldığı çalışmada yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip suşlar karakterize edilmiştir (Sapkota vd, 2020; Shrestha vd, 2021). Hamed vd. (2018) Mısır'da piramit bölgesinden izole ettikleri suşu *Streptomyces* sp. MER4 olarak adlandırmış ve bu suşa ait metanol özütlerinin antidermatifitik, antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerini raporlamışlardır.

Baltacı (2021)'ya ait çalışmada Palandöken Dağı'ndan izole edilen AO1 ve AO3 suşlarının *Streptomyces ambofaciens*'e % 99 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde, bu suşların *Escherichia coli* O157:H7

suşuna karşı yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği ve en düşük antimikrobiyal etkinin *S. aureus* şuşuna karşı elde edildiği belirlenmiştir.

Yıldız Gölü sedimentinden izolen edilen 9 adet Aktinobakteri şuşunun *C. tropicalis*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *MRSA*, *E. faecium*, *E. fecalis* indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, izolatların %55'inin en az bir test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Özcan, 2019).

Malezya'da mangrov toprağından izole edilen *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 şuşunun antioksidan ve sitotoksik özelliklerinin belirlendiği bir çalışmada yüksek antioksidan aktivite ve özellikle MCF7 kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksosite (IC₅₀: 61.33 µg/ml) elde edilmiştir (Ser vd, 2015). Ayrıca, Malezya'dan bir mangrov toprağı izolatu olan *Streptomyces* sp. MUM256 şuşunun kolon kanser hücre hattına karşı yüksek apoptotik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Tan vd, 2019).

Mevcut çalışmada, Amasya elma bahçesi topraklarından dokuz farklı *Streptomyces* sp. şuşunun izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. *Streptomyces* sp. GA1, GA2, GA3, GA5, GA6, GA7, GA8, GA9 ve GA10 olarak adlandırılan şuşların 16S rRNA dizileri, diğer *Streptomyces* sp.'ere %99 oradında dizi özdeşliği göstermiştir. Şuşların biyoaktivitelerinin değerlendirilmesi için, ISP4 besiyeri kullanılarak bu şuşlara ait sıvı ve katı fermantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sıvı kültürlerden elde edilen süpernatant, yine sıvı kültürle ait hücrelerin metanol özütleri ile katı fermantasyona ait kültürlerin metanol özütleri antimikrobiyal aktivite ve sitotoksosite deneylerinde kullanılmıştır.

Biyoassay, MIC ve MBC verileri baz alınarak, antimikrobiyal aktivite sonuçları incelenmiştir. ISP4 sıvı fermantasyonlara ait hücrelerden elde edilen metanol özütleri kullanılarak en iyi antibakteriyel aktivite *S. aureus* (*Streptomyces* sp. GA3, 5, 8, 9 ve 10' a ait metanol özütlerinden) ve *E. faecalis* (*Streptomyces* sp. GA2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10' a ait metanol özütlerinden) indikatör şuşlarına karşı 256 µg/ml'lik MIC ve MBC değerleri şeklinde elde edilmiştir. Kültür süpernatantlarından elde edilen MIC değerleri 512 µg/ml'dir. Katı fermantasyondan elde edilen metanol özütleri ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları ile *S. aureus* ATCC 25923 (*Streptomyces* sp. GA3, 5, 8, 9 ve 10), *B. subtilis* ATCC 6633 (tüm *Streptomyces* sp. GA şuşları), *E. faecalis* ATCC 29212 (*Streptomyces* sp. GA2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) ve *P. aeruginosa* ATCC

27853 (*Streptomyces* sp. GA9 ve 10) indikatörlerine karşı 256 µg/ml’lik MIC değerleri tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite değerlerinin nispeten düşük olması, özütler içerisinde aktiviteden sorumlu biyoaktif moleküllerin konsantrasyonlarının düşük olmasıyla bağlantılı olabilir.

MTT verileri göz önünde bulundurularak sitotoksikite sonuçları incelendiğinde, sıvı kültürlerle ait süpernatantların kullanıldığı deneylerde en iyi sonuç CaCO₂-kolon epidermal adenokarsinoma hücrelerine karşı 181.05 µg/ml’lik EC₅₀ değeri ile *Streptomyces* sp. GA5 suşundan elde edilmiştir. Aynı kültürlerden alınan hücrelerin metanol özütlerinde üç farklı ekstraksiyon örnekleri arasında en yüksek sitotoksik aktivite değerleri gözlemlenmiştir. Özellikle, *Streptomyces* sp. GA1 suşuna ait metanol özütünün CaCO₂ kolon kanser hücre hattına (EC₅₀:162.15 µg/ml), GA2 suşuna ait özütün CaCO₂ (EC₅₀:77.2 µg/ml) ve LnCaP-insan prostat karsinoma (EC₅₀:168.9 µg/ml), GA3 özütlerinin ise CaCO₂ (EC₅₀:64.02 µg/ml), MCF7-insan meme adenokarsinoma (EC₅₀:171.8 µg/ml) ve LnCaP (EC₅₀:108.7 µg/ml) hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitesi tespit edilmiştir. Katı fermantasyona ait metanol özütlerinin HEK293 kontrol hücrelerinin canlılığını da olumsuz yönde etkilediği, bu bağlamda kanserli hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerinin yetersiz olduğu görülmektedir.

Biyoaktivite değerlendirme çalışmalarında ham özütlerin kullanılması, elde edilen aktivite değerlerinin nispeten düşük olmasına neden olmuştur. Bu bağlamda, çalışmanın devamında, biyoaktif moleküllerin saflaştırılması, moleküler yapının karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirilecektir. Böylelikle, yüksek biyoaktiviteye sahip özgün/yeni biyoaktif bileşiklerin ortaya konulması mümkün olabilecektir.

6. KAYNAKÇA

- Abdel-Razek, S. A., El-Naggar, E. M., Allam, A., Morsy, M. O., Othman, I. S. (2020). Microbial Natural Products in Drug Discovery. *Processes*, 8(4), 470; doi:10.3390/pr8040470.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1. doi:10.3389/fmicb.2010.00134.
- Antoraz, S., Santamaria, R. I., Diaz, M., Sanz, D., Rodriguez, H. (2015). Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front. Microbiol.* 6,461, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00461>.
- Arai, T. (1997). What are Actinomycetes? Atlas of Actinomycetes, The Society for Actinomycetes Japan (SAJ), Asakura Publishing Co., Ltd., 176-191 Japan.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Bali, R., Sharma, P., Gaba, S. (2015). Use of metronidazole as part of an empirical antibiotic regimen after incision and drainage of infections of the odontogenic spaces. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53(1), 18–22. doi:10.1016/j.bjoms.2014.09.002.
- Bali, B. (2020). Karasal ortamlardan izole edilen *Streptomyces* türlerinin sekonder metabolit biyosentez genlerinin taranması. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, yüksek lisans tezi.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 80:1–43.
- Battistuzzi, F. U., Hedges, S. B. (2009). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Molecular biology and evolution*, 26(2), 335–343.
- Beites, T., Mendes, M. V. (2015). Chassis optimization as a cornerstone for the application of synthetic biology-based strategies in microbial secondary metabolism. *Front. Microbiol.* 6:906.10.3389/fmicb.2015.00906.

- Boone, R., Castenholtz, R., Garrity, G. (2001). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer-Verlag. New York, Berlin Heidelberg. 1, 163-164.
- Burton, K. (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods in enzymology*, 12, 163-166.
- Dalisay, DS., Williams, DE., Wang, XL., Centko, R., Chen, J, Andersen, RJ. (2013). Marine sediment-derived *Streptomyces* bacteria from British Columbia, Canada are a promising microbiota resource for the discovery of antimicrobial natural products. Ganesan A, editor. *PLoS One*. 2013;8:e77078. pmid:24130838
- Dewi, T. K., Agustiani, D., Antonius, S. (2017). Secondary metabolites production by Actinomycetes and their antifungal activity. *Kn E Life Sci*:256–264. <https://doi.org/10.18502/cls.v3i4.713>.
- Dikici-Kaya, N. (2021). Fenolik asitlerin DNA metilasyonu üzerine etkilerinin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, yüksek lisans tezi.
- Fair, R. J., Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*, 6, PMC.S14459. doi:10.4137/pmc.s14459.
- Fenton, C., Keating, G. M., Curran, M. P. (2004). Daptomycin. *Drugs* 2004, 64, 445–455.
- Flårdh, K., Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.
- Geçibesler, İ. H. (2015). *Stachys byzantina* (Dağ çayı) bitki ekstresinin antikanserojen ve insektisit aktivitelerinin incelenmesi ve aktif bileşenlerin izolasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Kimya Ana Bilim Dalı, yüksek lisans tezi.
- Genilloud, O. (2018). Mining Actinomycetes for novel antibiotics in the omics era: are we ready to exploit this new paradigm? *Antibiotics (Basel)* 7:85. 10.3390/antibiotics7040085.
- Güneş, A. (2018). Çocukluk çağı pnömokok enfeksiyonlarında penisilin direnci. Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, tıpta uzmanlık tezi.

- Hamed, A.A., Abdel-Aziz, M.S., Fadel, M. et al. (2018). Antimicrobial, antidermatophytic, and cytotoxic activities from *Streptomyces* sp. MER4 isolated from Egyptian local environment. *Bull Natl Res Cent* 42, 22. <https://doi.org/10.1186/s42269-018-0022-5>
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Pogni, R., Pogni, F. (2018). *Streptomyces* secondary metabolites. Basic biology and applications of Actinobacteria. doi:10.5772/intechopen.79890.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs.*, 7, 24– 44.
- Huang Y., Lu, Z., Laura, T., Vining, L.C., Hua H.W. (2015). Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front. Microbiol.*, 6(914), 1- 7
- Grinyer J, Hunt S, Mckay M, Herbert BR, Nevalainen H (2005) Herbert, B. R., Grinyer, J. 2006. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 47:381–388.
- Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., Solecka, J. (2018). Secondary metabolites of Actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 259–272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>.
- Jan, D. V., Janet, K., Jansson, J., Trevors, T. (2007). Modern soil microbiology, Books in Soils Plants and the Environment. Boca Raton : CRC Press, 646.
- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D.V.R., Narasimha, G. (2014). Production of bioactive compounds by Actinomycetes and their antioxidant properties. *Biotechnol. Res. Int.*, 217030, 1-9
- Keating, G. M., Perry, C. M. (2005). Ertapenem. *Drugs*. 65, 2151–2178.
- Kızıloğlu, F. T. (2015). Toprak mikrobiyolojisi ve biyokimyası. Erzurum : Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi. VI, 216-223.
- Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K., Hopwood, D. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, John Innes Centre, Norwich

Research Park, Colney, Norwich, NR47UH, United Kingdom.

- Kormanec J, Novakova R, Csolleiova D, Feckova L, Rezuchova B, Sevcikova B, Homerova D. (2020). The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Sep;104(18):7701-7721. doi: 10.1007/s00253-020-10782-x
- Kumar, A., Vandana, R. S., Singh, M., Pandey, K. D. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach for disease management. *Microbes and Environmental Management*. Studium Press; New Delhi, pp. 195–209.
- Lane, D. J. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.82, p.6955-6959.
- Laport, M., Santos, O., Muricy, G. (2009). Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 86–105. doi:10.2174/138920109787048625.
- Li, L., Liu, X., Jiang, W., Lu, Y. (2019). Recent advances in synthetic biology approaches to optimize production of bioactive natural products in Actinobacteria. *Front. Microbiol.* 10:2467. 10.3389/fmicb.2019.02467.
- Lima, S.M.A. and Melo, J.G.S. (2017). Characterization of the biochemical, physiological and medical properties of *Streptomyces hygrosopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil), *Appl. Microb. Cell Physiol.*, 101, 711-723.
- Maiden, M. C., Frosch, M. (2001). Molecular techniques for the investigation of meningococcal disease epidemiology. *Mol Biotechnol* 18: 119–134.
- Maiti, P.K., Das, S., Sahoo, P. et al. (2020). *Streptomyces* sp SM01 isolated from Indian soil produces a novel antibiotic picolinamycin effective against multi drug resistant bacterial strains. *Sci Rep* 10, 10092. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66984-w>
- Mammadov, R. (2014). Tohumlu bitkilerde sekonder metabolitler. 1. basım, Nobel Kitabevi. ISBN: 978-605-133-743-2.
- Mohan, K. D., Rajamanickam, U. (2018). Biodiversity of *Actinomycetes* and secondary metabolites. *Inn Orig Inter J Sci* 5(1):21–27.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65(1), 55-63.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Nguyen, H.T., Pokhrel, A.R., Nguyen, C.T. (2020). *Streptomyces* sp. VN1, a producer of diverse metabolites including non-natural furan-type anticancer compound. *Sci Rep* 10, 1756 (2020).<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58623-1>.
- Özakın, S. (2010). Lokal *Streptomyces* izolatlarının biyoaktif sekonder metabolitlerinin kimyasal olarak taranması. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, yüksek lisans tezi.
- Özcengiz, G., Okay, S., Ünsaldı, E., Taşkın, B., Liras, P., Piret J. (2010). Homologous expression of aspartokinase (ask) gene in *Streptomyces clavuligerus* and its hom-deleted mutant: effects on cephamycin C production. *Bioengineered bugs*, 1(3): 191-197.
- Özkaya, F. C. (2015). Sünger ilişkili bakterilerin izolasyonu, antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi ve seçilen suşun metabolitlerinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, yüksek lisans tezi.
- Paradkar, A., Trefzer, A., Charaburtt, R., Diane, S. (2003). *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (1): 1-27.
- Pastores, G. M., Barnett, N. L., Kolodny, E. H. (2005). An open-label, noncomparative study of miglustat in type I Gaucher disease: Efficacy and tolerability over 24 months of treatment. *Clin. Ther.*, 27, 1215–1227.
- Patzer, S. I., Volkmar, B. (2010). Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974.

- J Bacteriol.192: 426–435.
- Perry, C. M., Ibbotson, T. (2002). Biapenem. *drugs* 2002, 62, 2221–2234.
- Pimentel-Elardo, S. M., Kozytska, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H., Hentschel, U. (2010). Antiparasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Marine drugs*, 8(2), 373- 380.
- Planckaerta, S. (2021). Identification of novel Rotihibin analogues in *Streptomyces scabies*, including discovery of its biosynthetic gene cluster.<https://doi.org/10.1128/Spectrum.00571-21>.
- Pospiech, A., Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11(6), 217-218.
- Rangseekaew, P., Pathom-aree, W. (2019). Cave Actinobacteria as producers of bioactive metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00387.
- Ranjani, A., Dhanasekaran, D., Gopinath, P. M. (2016). An introduction to Actinobacteria. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological. Applications*. Doi: 10.5772/62329.
- Ravikumar, S., Fredimoses, M., Gnanadesigan, M. (2012). Anti cancer property of sediment Actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2 (2):92-96.
- Sapkota A, Thapa A, Budhathoki A, Sainju M, Shrestha P, Aryal S. (2020). Isolation, Characterization, and Screening of Antimicrobial-Producing Actinomycetes from Soil Samples. *Int J Microbiol.* 2020 Mar 26;2020:2716584. doi: 10.1155/2020/2716584. PMID: 32300363; PMCID: PMC7139855.
- Segaran, G. (2017). A review on endophytic Actinomycetes and their applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 9(10):7.
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A. Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of Actinomycetes. *J Genet Eng Biotechnology* 19, 72. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156->.
- Ser Hooi-Leng, Ab Mutalib Nurul-Syakima, Yin Wai-Fong, Chan Kok-Gan, Goh Bey-Hing, Lee Learn-Han. Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of

- Streptomyces pluripotens* MUSC 137 Isolated from Mangrove Soil in Malaysia .
Frontiers in Microbiology, 10.3389/fmicb.2015.01398.
- Sharma, A., Gautam, S., Saxena, S. (2014). *Streptomyces*. Encyclopedia of food microbiology, 560–566. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00326-8.
- Shrestha B, Nath DK, Maharjan A, Poudel A, Pradhan RN, Aryal S. (2021). Isolation and Characterization of Potential Antibiotic-Producing Actinomycetes from Water and Soil Sediments of Different Regions of Nepal. Int J Microbiol. 2021 Mar 3;2021:5586165. doi: 10.1155/2021/5586165. PMID: 33763135; PMCID: PMC7946463.
- Shivlata, L., Satyanarayana, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. Frontiers in microbiology, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01014.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K., (2017). Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. 3 Biotech, 7(1). doi:10.1007/s13205-016-0586-4.
- Singh, T. A., Passari, A. K., Jajoo, A., Bhasin, S., Gupta, V. K., Hashem, A., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2021). Tapping Into Actinobacterial Genomes for Natural Product Discovery. Frontiers in microbiology, 12, 655620. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655620>.
- Sousa, C.S., Soares, A.C.F., and Garrido, M.S. (2008). Characterization of Streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. Sci. Agric., 65, 50–55.
- Sugiura, T., Ariyoshi, Y., Negoro, S., Nakamura, S., Ikegami, H., Takada, M., Yana, T., Fukuoka, M. (2005). Phase I/II study of amrubicin, a novel 9-aminoanthracycline, in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Investig. New Drugs, 23, 331–337.
- Tan, G. Y., Liu, T. (2017). Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in Actinobacteria. Metab. Eng. 39 228–236. doi:10.1016/j.ymben.2016.12.006
- Tan LT, Chan CK, Chan KG, Pusparajah P, Khan TM, Ser HL, Lee LH, Goh BH. (2019). *Streptomyces* sp. MUM256: A Source for Apoptosis Inducing and Cell

- Cycle-Arresting Bioactive Compounds against Colon Cancer Cells. *Cancers* (Basel). 2019 Nov 6;11(11):1742. doi: 10.3390/cancers11111742. PMID: 31698795; PMCID: PMC6896111.
- Tangerina, MMP., Furtado, L.C., Leite, VMB., Bauermeister, A., Velasco-Alzate, K., Jimenez, P.C. (2020). Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. *PLoS ONE* 15(12): e0244385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244385>.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J.S., Vos, M., Garbeva, P. (2017). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trend. Microb.*, 25(4), 280–292.
- Onaka, H. (2017). Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in Actinomycetes. *J. Antibiot.* 70, 865–870, <https://doi.org/10.1038/ja.2017.51>.
- O'Neill, J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. http://amr-review.org/sites/default/files/160525_Finalpaper_with%20cover.pdf.
- Wang, L., Tahlan, K., Kaziuk, T. L., Alexander, D. C. (2004). Transcriptional and translational analysis of the *ccaR* gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, 150(12), 4137-4145.
- Ward, A. C., Allenby, N. E. E. (2018). Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: the *Streptomyces* paradigm, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 365, Issue 24, December fny240, <https://doi.org/10.1093/femsle/fny240>.
- Wilkinson C.J., Hughes-Thomas, Z.A., Martin C.J., Bohm I., Mironenko T., Deacon M., Wheatcroft M., Wirtz G., Staunton J., Leadlay P.F. (2002). “Increasing the efficiency of heterologous promoters in Actinomycetes”. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 417-426.
- Williams S, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E, Sneath P & Sackin M (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*, 129(6): 1743-1813.
- Van Wezel, G. P. McDowall, K. J. (2011). The regulation of the secondary metabolism

of *Streptomyces*: new links and experimental advances. Natural Product Reports, 28:7, 1311-1333.

Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: Part 1, Causes and Threats. Pharmacy and Therapeutics, 40, 277-283.

Yılmaz, M. M. (2015). Türkiye'deki işlenmiş soya ürünlerinde kalitatif ve kantitatif GDO tanısı ve transgen analizi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, yüksek lisans tezi.

Xu, Y., He, H., Schulz, S., Liu, X., Fusetani, N., Xiong, H., (2010). Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. Bioresour. Technol., 101, 1331–1336.

Zarandi, M.E., Bonjar, G.H.S., Dehkaei, F.P., Moosavi, S.A.A., Farokhi, P.R., Aghighi, S. (2009). Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. Am. J. Appl. Sci., 6, 194–199.

Zhanel, G. G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A., Vercaigne, L., Embil, J., Gin, A., Karlowisky, J. A., Hoban, D. J. (2004). The glycyclines. Drugs , 64, 63–88.

EKLER

EK 1- BESİYERLERİN HAZIRLANMASI VE İÇERİKLERİ

ISP4 Sıvı Besiyeri

Inorganic Salt (ISP4)	g/l
Nişasta	10
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1
NaCl	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
CaCO ₃	2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,001
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,001
<u>ZnSO₄ . 7H₂O</u>	0,001
pH: 7.2 olarak ayarlanır.	
121 °C'de 15 dk otoklavlanır.	

ISP4 Katı Besiyeri

Inorganic Salt Agar (ISP4)	g/l
Nişasta	10
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1
NaCl	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
CaCO ₃	2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,001
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,001
<u>ZnSO₄ . 7H₂O</u>	0,001
pH: 7.2 olarak ayarlanır.	
Agar	20
121 °C'de 15 dk otoklavlanır.	

MHB (Mueller Hinton Broth) Sıvı Besiyeri

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
MHB	21 g
dH ₂ O	1000 ml
121'de 15 dk otoklavlanır.	

MHA (Mueller Hinton Agar) Katı Besiyeri

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
MHA	38 g
dH ₂ O	1000 ml
121'de 15 dk otoklavlanır.	

SDB (Sabouraud Dextrose Broth) Sıvı Besiyeri

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
SDB	30 g
dH ₂ O	1000 ml
121'de 15 dk otoklavlanır.	

SDA (Sabouraud Dextrose Agar) Katı Besiyeri

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
SDA	65 g
dH ₂ O	1000 ml
121 °C'de 15 dk otoklavlanır.	

Tryptone Soya Broth (TSB)(Oxoid)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tryptone Soya Broth	30 g
dH ₂ O	1000 ml
121 °C'de 15 dk otoklavlanır.	

Tryptone Soya Agar (TSA)(Oxoid)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Tryptone Soya Broth	30 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml
121 °C'de 15 dk otoklavlanır.	

EK 2- TAMPONLAR, ÇÖZELTİLER VE ANTİBİYOTİKLER

Genomik DNA İzolasyonu

SET Tamponu

NaCl	75 mM
EDTA (pH 8,0)	25 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM

TE Tamponu

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

Kullanılan 0.02 M Tris-HCl tampon çözeltisi litresinde 3.152 g Trizma-HCl içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7.0 değerine ayarlanır, 0.1 M NaOH ve / veya 0.1 M HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir. Kullanılan 0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1.576 g Trizma-HCl ve 0.372 g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8.0 değerine ayarlanır, 0.1 M NaOH ve / veya 0.1 M HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

CTAB/NaCl Çözeltisi (10 % CTAB/0,7 M NaCl)

80 ml distile su içerisine 4,1 g NaCl eklenir. Sonrasında 10 g CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) eklenerek 65 °C'de çözündürülür. Son hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Agaroz Jel Elektroforezi

Tris-Asetat-EDTA Tamponu (TAE) (50X)

Tris Bazı	242 g
Glasiyal Asetik Asit	57.1 ml
EDTA (0,4 M, pH 8,0)	125 ml
Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanır.	

Etidyum Bromür Çözeltisi

Etidyum Bromür (10 mg/ml)	100 µl/l
TAE Buffer (1X)	1l

5 mM NaOH

20 g NAOH tartılır. 80 mL suda çözündürülür. Üzeri 100 mL ye saf su ile tamamlanır.

5 M NaCl

NaCl=23+35,5=58,5 g/mol. (1 mol için)

$58,5 \text{ g/mol} \cdot 5 = 292,5 \text{ g/mol}$ NaCl tartılır ve 1000 mL'ye saf su ile tamamlanılıp çözündürülür.

Difenilamin belirteci

Difenilamin	1.5 g
Glasiyal asetik asit	100ml
Aliminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunur.	
Kullanılmadan önce eklenmesi gerekenler	
Konsantre H ₂ SO ₄	1.5 ml/100 ml
Asetaldehit(%1.6)	0.1 ml/20 ml

Antibiyotik Stokların Hazırlanışı

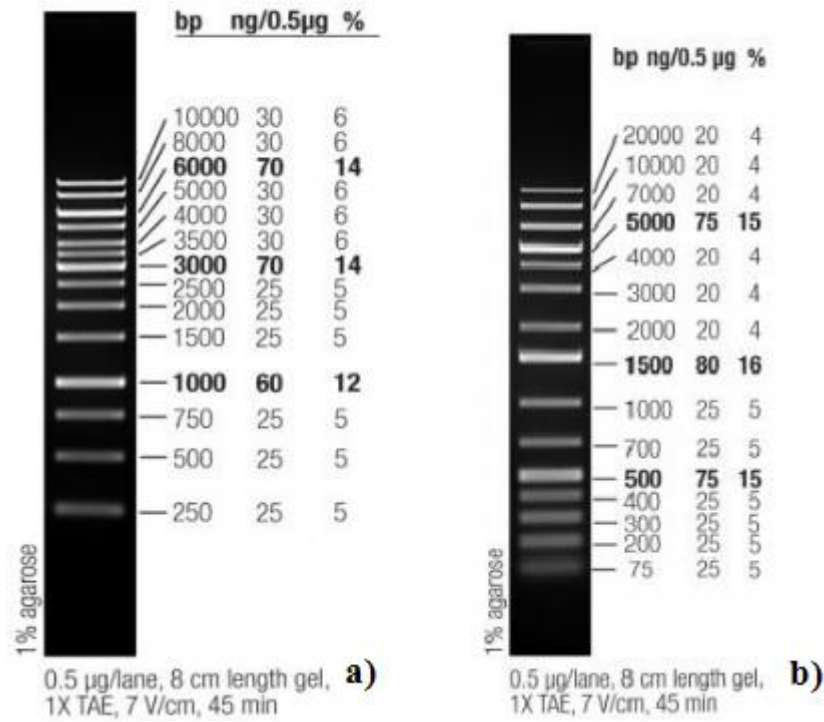
	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon
Amikasin	100 mg/ml dH ₂ O	100 µg/ml
Apramisin	50 mg/ml dH ₂ O	50 µg/ml
Flukanazol	1000 mg/ml dH ₂ O	1280 µg/ml
Ketokonazol	150 mg/ml dH ₂ O	150 µg/ml

EK 3- KİMYASALLAR VE ENZİMLER

	Marka	Katalog numaraları
Kimyasallar		
Agar	Merck	214010
Agaroz	Sigma	A9539
Amikasin	Merck	101217
Benzen	Aldrich	156302
Bütanol	Merck	1.01990
CaCO ₃	Sigma	12010
DMSO	Merck	1.16743
dNTP	Thermo Scientific	CA BNN-0003
Dimetil eter	Merck	1,00921
EDTA	Sigma	E-5134
Etanol	Sigma	920.026
Etidyum bromür	Sigma	
Etilasetat	Isolab	920.013
Fenol	Sigma	108-95-2
FeSO ₄ . 7H ₂ O	Sigma	1.03965
Glasiyal Asetik Asit	Merck	1.00063
Gliserol	Sigma	1552-R
HCl	Isolab	932-103
Hekzan	Merck	1,0436
İzoamilalkol	Merck	1.00979
İzopropanol	Merck	1.00995
K ₂ HPO ₄	Sigma	04243
Ketokonazol	European pharmacoporia reference standarts	65277-42-1
Kloroform	Merck	1.02445
Lizozim	Sigma	12650-88-3
Metanol	Sigma	947.046
MgSO ₄ . 7H ₂ O	Sigma	63140

MgCl ₂	Merck	1.05833
MHA	BD-Difco	225250
MHB	BD-Difco	275730
NaCl	Isolab	969.033
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma	1.01217
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL	740609
SDA	Oxoid	CM0041
SDB	Oxoid	CM0147
SDS	Merck	8.17034
Starch	Merck	1.01253
TSB	Oxoid	CM0129
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sigma	14455-R

GeneRuler 1 kb DNA Ladder GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder



Şekil 5.1. Çalışmada kullanılan markörler. **a)** Thermo Scientific-GeneRuler 1 kb DNALadder, **b)** Thermo Scientific-GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

Kitler

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up MACHEREY-NAGEL

EK 4- ÖRNEKLEM İZNİ



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü



Sayı : 21264211-288.04[Biyçeşitlilik
Araştırma İzinleri]-E.1163827
Konu : Araştırma İzinleri

10.04.2019

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN tarafından yürütülecek olan "Amasya İli sınırları içerisindeki elma bahçesi topraklarından Aktinobakteri grubu bakterilerin izolasyonu ve sekonder metabolit üretim potansiyellerinin belirlenmesi" başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

- Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
- Arazi çalışması öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma için ilgili Bölge Müdürlüğüne bilgi verilmesi,
- Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
- Çalışmalara yabancı araştırmacıların katılmaması,
- Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze gönderilmesi,

şartıyla bahse konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır

Hasan KANCA

Bakan a.

Genel Müdür Yardımcısı V.

EK 5- SUŞLARIN 16S rRNA GEN DİZİLERİNE AİT NÜKLEOTİT DİZİLERİ

***Streptomyces* sp. GA1 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639167)**

TGGGCTGGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG
GGGTCTAATAACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGG
TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGC
TTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGC
TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTTCCTCTGTAAACGTTG
GGAAGTAGGTGTGCGCGACATTCCACGTGCTCGGTGCCGCAGTTAACGCATTAAGTTC
CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCA
CAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATATAACGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTG
CATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGAGGACTCACAGGAGACTGC
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTT
GGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGC
GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
CGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAGCCGGTGGCCCAACCCC
TTGTGGGAGGGAGCTTCAAGGTGACGGGG

***Streptomyces* sp. GA2 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (MN865828)**

TGGGCTGGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG
GGGTCTAATAACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGG
TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGC
TTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGC
TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTTCCTCTGTAAACGTTG
GGAAGTAGGTGTGCGCGACATTCCACGTGCTCGGTGCCGCAGTTAACGCATTAAGTTC
CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCA
CAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATATAACGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTG
CATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGAGGACTCACAGGAGACTGC
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTT
GGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGC

GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
CGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAGCCGGTGGCCCAACCCC
TTGTGGGAGGGAGCTTCGAAGGTGACGGGG

***Streptomyces* sp. GA3 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639168)**

TGGGCTGGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACG
GGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGG
TGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGA
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAG
CGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGC
TTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGC
TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTTCCTCTGTAAACGTTG
GGAAGTAGGTGTGCGCGACATTCCACGTGCTCGGTGCCGAGTTAACGCATTAAGTTC
CCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG
ACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTG
CATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGC
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTT
GGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGC
GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT
CGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAGCCGGTGGCCCAACCCC
TTGTGGGAGGGAGCTTCGAAGGTGACGGGG

***Streptomyces* sp. GA5 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639169)**

GCTTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG
TAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATA
CCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGA
GCCCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAG
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGAC
GGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTC
GGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGT
GTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGA
ACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGT
GTTGGCGACATTCCACGTGCTCGGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGG
GAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGG
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCG
GAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCCACTAGCGCAACCCCTTGTCT

GTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGGG

***Streptomyces* sp. GA6 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639170)**

GGGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTA
ATACCGGATATGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGA
TGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGG
TAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCG
CGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGT
GACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGGCGCGAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCAC
GTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAG
AGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTA
GGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGG
CGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACA
CCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT
CCCGTGTTCAGCAGGCCCCCTTGTGGTGTCTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCA
CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATAACGCGAGGTGGAGCGAATCTCA
AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCG
CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGG
AGAGCTTCGAAGGGG

***Streptomyces* sp. GA7 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639171)**

TGCAGTCGANCGATCGNACCANTTCAGTGGCGGATTAGTGGCGTAACGGGTGAGTAAT
CCATGGGCTATCTGCCCTTCCCTCTGGGACAATGCCTGAAAACCGGGTCAACTACCGG
ATACCACCTTCACTGGCTTCTGTGAAGGTTGAAAGCTCCAGCGGTGAAGGATGAGCCC
ACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGG
CCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACCGGAGG
CAGCAATGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCCTCGACACCGCGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCACAAGAAGAACCAGAAAGTGACGGTA
CCTGCACAACAATCGCCCGCTAGCTACTTGCCATCATCCGCGTTAATACGTANGGCGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCNGCTTGTACGTCNNGT
GTGAAAGCCCGGGCTTAACCCNNGTCTGCATTCAATACGGNCTANCTAGANTGTGG
TGANGGAGATCGGAATTCCTGGTGTANCGGTGAAATGCGCAGATATCTGGAGGAACA
CCGGTGGCTGAANGCGCGATCTCTGNNGCCATTACTGACGCTNANGANCGAANGCGTG
TCGGAGCGAACANGATTANATACCCTGGTAGTCCACGCCNTACTNNNGTGGNGAACTA
NGTGTTGGCTACATTCTCNCGTCNTCGGTGACNACAGCTAACNCATTAANTTCTCCCN
CCAGTTGACTACGGCCCCAACGCTAANACTCAANATGAATTNACAGNTNGCCCCNCAC
ACGCANNAGATCATGTGGCCTTNNATTCTACCNCNAATCGCGAATAACCNNTNANNNA
NNNNTTNGNACATANNACCGCTANNANCAGTTAGACNATNNTCGTCCCCGGTTGTNNG
TCCAGTGACAGGTNGTGCATGGTNNGNNTCATC

***Streptomyces* sp. GA8 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (MN865829)**

GCTAACCATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGA
GTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAAT
ACCGGATACTGACCGCCTTGGGCATCCAAGGCGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGAT
GAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTA
GGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACG
TCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGA
GTTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGACGAAAGCGT
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTAGG
TGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGCG
GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC
GGAAACGTCTGGAGACGGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGT
CGTCACCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCC
CGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAAC
TCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACA
CGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAA
AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCT
AGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGG
AGGAGCTTCGAAGGGGA

***Streptomyces* sp. GA9 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639172)**

TAACCATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATAC
CGGATAACACTTCCACTCTCCTGGGTGGAGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAG
CCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTG
AGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACG
GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG
CGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCG
GGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTG
TGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
CACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAAGTAGGTG
TTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCAGCGGA
GCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG
AAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTG
TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCTG
TGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACT
CGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACAC
GTGCTACAATGGCAGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAA
AGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTA
GTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGG

GAGCTTCGAAGGGGGC

***Streptomyces* sp. GA10 suşuna ait 16S rRNA kısmi nükleotit dizisi (OK639173)**

GGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTG
AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAA
TACCGGATAACACTCCTGTCTCCTGGACGGGGGTAAAGCTCCGGCGGTGAAGGAT
GAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGC
GTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTG
ACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTA
GGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACG
TCGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGA
GTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAG
GAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAG
GTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCAGC
GGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC
CGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTT
CTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCA
ACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCA
CACGTGCTACAATGGCAGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCA
AAAAGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTG
CTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCCCGTACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGG
AGGGAGCTTCGAAAGGGGG

ÖZ GEÇMİŞ

Amasya Anadolu Lisesini bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden 2019 yılında mezun oldu. 2019 yılında OMÜ Tarımsal Biyoteknoloji Yüksek Lisans programına girdi.

İletişim Bilgileri

Öğrenci no :19210127

ORCID ID : 0000-0002-0173-3105

Yayınlanmış çalışmalar:

1. Terzi, G., Kurt-Kızıldoğan, A. Investigation of Antimicrobial and Anticarcinogenic Bioactive Metabolite Production Potentials Of Local *Streptomyces* Strains. International Congress on Multidisciplinary Natural Sciences and Engineering. 01-02 Dec., Ankara/Turkey. ISBN: 978-605-71156-0-7.