

152959

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAZI AKTİNOMİSET
İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ayşen YILDIRIM

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
2004**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ACTINOMYCETE
ISOLATES FROM SOILS**

Ayşen YILDIRIM

**Master Thesis
Biology Main Science Branch
2004**

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAZI AKTİNOMİSET
İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Ayşen YILDIRIM

**Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Tez Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

**Danışman:
Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ**

**Eskişehir
Temmuz 2004**

Ayşen YILDIRIM' ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Topraktan izole edilen bazı aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

.. / .. /

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ



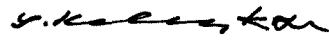
Üye: Yrd. Doç. Dr. Semra İLHAN



Üye: Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 20./9../2004gün ve 2004-14/5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. M. Selami KILIÇKAYA

Enstitü Müdürü V.

ÖZET

Bu çalışmada, Eskişehir il sınırları içindeki çeşitli lokalitelerden alınan toprak örneklerinden izole edilen aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip madde üretim potansiyelleri araştırılmıştır.

Tarama çalışmasında test organizması olarak; 7 bakteri (*Staphylococcus aureus* NRRL B-767, *S.epidermitis* NRRL B-4377, *Bacillus subtilis* NRRL B-558, *Escherichia coli* NRRL B-3008, *Enterobacter aerogenes* NRRL B-3567, *Shigella sp.* (Hastane izolatu), *Salmonella typhimurium* NRRL B-4440) ve 3 maya türü (*Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229, *Candida albicans* NRRL Y-12983, *Saccharomyces cerevisiae*) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları “agar piece” metodu ile gerçekleştirilmiştir.

Toplam olarak 396 adet izolat ile gerçekleştirilen tarama çalışmasında, kullanılan aktinomiset izolatlarından elde edilen inhibisyon sonuçları, antibiyotik ürettiği bilinen standart suşlar ve standart antibiyotik diskleri ile gerçekleştirilen pozitif kontrol çalışmasından elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

Sonuçta, izole edilen aktinomiset izolatlarından antimikrobiyal aktiviteye sahip olanlar tespit edilmiş ve bu izolatların kullanılan test mikroorganizmalarından, gram negatif bakterilere olan antimikrobiyal etkisinin, gram pozitif bakterilere ve mayalara oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Son olarak, aktivite ve spektrum durumları dikkate alınarak seçilen 33.13, 59.07, 108.03 ve 118.05 kodlu izolatların tanılama çalışması yapılmıştır.

ABSTRACT

In this study, it was investigated to antimicrobial activity of actinomycetes isolates from the soils of different localities of Eskişehir province.

Seven bacteria (*Staphylococcus aureus* NRRL B-767, *S.epidermitis* NRRL B-4377, *Bacillus subtilis* NRRL B- 558, *Escherichia coli* NRRL B-3567, *Shigella sp* (Hospital isolat), *Salmonella typhimurium* NRRL B-4440) and 3 yeast (*Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229, *Candida albicans* NRRL Y-12983, *Saccharomyces cerevisiae*) were used as test organism in screening study. Antimicrobial activaty studies were carried by “agar piece” method. Results from total 396 isolates compared with standart antibiotic discs and standart strain which known produce antibiotic.

As a result, it was determined isolates have antimicrobial activity and their activity on gram negative bacteria is more than gram positive bacteria and yeasts.

Finally, it was studied on identification of four isolates 33.13, 59.07, 108.03 and 118.05 that were choosen for activity degrees and spectrums.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden tamamlanma aşamasına kadar her an ilgi ve desteğini esirgemeyen, danışmanım olmasından gurur duyduğum hocam, sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç'a çok teşekkür ederim.

Numerik Taksonomik tanılama çalışmalarımızın yürütülmesindeki yardım ve desteklerinden dolayı sayın Yrd. Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN ve Yrd. Doç. Dr. Kamil IŞIK'a teşekkür ederim.

Tezin uygulama aşamasındaki sağladıkları maddi destekleri nedeniyle Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Arastırma ve Uygulama Merkezi (FBAM) yönetici ve çalışanlarına, tezimin tarama çalışması sırasındaki özveriyle ve içtenlikle çalışması nedeniyle lisans öğrencisi sevgili arkadaşım Zerrin Tetik'e, tezim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anne ve babama, tezimin tamamlanması için gösterdikleri ilgi ve çaba için değerli müdürüm Alican Özçetin ve sevgili şefim Gülben Çağlayanlar'a teşekkürlerimi kelimelerle ifade edemem. Güveniniz, ilginiz ve destekleriniz için hepinize çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.	i
ABSTRACT..	ii
TEŞEKKÜR..	iii
İÇİNDEKİLER.	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.	viii
1. GİRİŞ.	1
1.1. Antibiyotikler.	2
1.1.1. Antibiyotiklerin Tanımı.	2
1.1.2. Antibiyotiklerin Tarihçesi.	3
1.1.3. Antibiyotik Ekolojisi.	4
1.1.4. Antibiyotiklerin Ekonomisi.	4
1.2. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları..	5
1.2.1. Antibiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı.	5
1.2.2. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı.	5
1.2.3. Antibiyotiklerin Hayvancılıkta Kullanımı.	6
1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.	7
1.3.1. Biyolojik Orjinlerine Göre Sınıflandırma.	7
1.3.2. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma.	7
1.3.3. Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma.	9
1.3.3.1. Üremenin, Temel Metabolitlerin Analogları Tarafından Önlenmesi.	9
1.3.3.2. Hücre Çeperi Yapımının Engellenmesi.	9
1.3.3.3. Hücre Zarı Fonksiyonunun Önlenmesi.	10
1.3.3.4. Protein Yapımının Önlenmesi.	10
1.3.3.5. Nükleik Asit Yapımının Önlenmesi.	11
1.4. Antibiyotiklere Karşı Mikrobiyal Dirençlilik.	11
1.4.1. Doğal Dirençlilik.	12
1.4.2. Kazanılmış dirençlilik.	12
1.4.2.1. Mutasyon ve Seleksiyon..	12
1.4.2.2. Tür ya da Strainler Arasında Gen Değişimleri.	13

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa No
1.4.3. İlaçlara Dirençliliğin Biyokimyasal Mekanizmaları.	13
1.5. Antibiyotik Üreten Mikroorganizmalar.	15
1.5.1. Bakteriler.	16
1.5.2. Funguslar.	17
1.5.3. Aktinomisetler.	18
1.5.3.1. Streptomyces.	18
1.5.3.2. Diğer Aktinomisetler.	21
1.6. Antibiyotik Araştırma Yöntemleri.	23
1.7. Araştırma İzlencesi.	24
2. MATERYAL VE METOD.	28
2.1. MATERYAL.	28
2.1.1. Kullanılan Test Mikro.(Bakteri ve Mayalar).	28
2.1.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.	28
2.1.3. Kullanılan Besiyerleri.	28
2.2. METOT.	34
2.2.1. Topraktan Aktinomiset İzolasyonu.	34
2.2.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.	35
2.2.3. Aktif İzolatların Tanılanması.	36
2.2.3.1. Kemotaksonomik Metotlar.	37
2.2.3.2. Kültürel ve Morfolojik Metotlar	38
2.2.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Metotlar.	39
3. BULGULAR.	42
3. 1. Aktinomiset İzolasyonu.	42
3. 2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.. . . .	42
3. 3. Aktif İzolatların Tanılanması.	51
3.3.1. Kemotaksonomik Özellikler.	51
3.3.2. Kültürel ve Morfolojik Özellikler.	51
3.3.3. Nümerik Taksonomi.	56

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa No
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.	61
5. KAYNAKÇA.	65
Ek 1.	68



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. 33.13 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 14 günlük büyümesi	52
Şekil 2. 33.13 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü	52
Şekil 3. 59.07 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 21 günlük büyümesi	53
Şekil 4. 59.07 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü	53
Şekil 5. 108.03 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 21 günlük büyümesi	54
Şekil 6. 108.03 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü	54
Şekil 7. 118.05 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 21 günlük büyümesi	55
Şekil 8. 118.05 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü	55
Şekil 9. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (SSM) ve UPGMA algorithm analizlerine göre, <i>Streptomyces</i> suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram	58
Şekil 10. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve COMPLETE algorithm analizlerine göre, <i>Streptomyces</i> suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	7
Çizelge 2. Bakteriler Tarafından Üretilen Antibiyotikler	17
Çizelge 3. Funguslar Tarafından Üretilen Antibiyotik Sayısı.	17
Çizelge 4. Toprak Aktinomiset'lerinin Hücre Çeperlerinin Ana Bileşenleri	18
Çizelge 5. <i>Streptomyces</i> genusu tarafından 1982-1986 yıllarında üretilen antibiyotikler	20
Çizelge 6. <i>Streptomyces</i> genusu tarafından 1987-1992 yıllarında üretilen antibiyotikler	21
Çizelge 7. 1975-1982 yılları arasında aktinomisetlerden rapor edilen antibiyotik ve tiplerinin sayısı	22
Çizelge 8. Az rastlanan aktinomisetlerden üretilen antibiyotikler	23
Çizelge 9. Karakteristik Hücre Duvarı bileşenleri	24
Çizelge 10. Denemede kullanılan test mikroorganizmaları	28
Çizelge 11. Kullanılan pozitif kontrol mikroorganizmaları	28
Çizelge 12. Çalışmada kullanılan çözelti ve diğer kimyasal maddeler.	33
Çizelge 13. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve pozitif kontrol mikroorganizmalarının denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm)	42
Çizelge 14. 33.13, 59.07, 108.03 ve 118.05 numaralı izolatların bazı kültürel ve morfolojik özellikleri	51
Çizelge 15. İzolatların tanılanması amacı ile kullanılan tip türler	56

1. GİRİŞ

Günümüzde hız kazanan teknolojik gelişmeler ve paralelinde devam eden yeni araştırmalar gelecek için büyük umutlar vermektedir. Ancak bu gelişme ve ilerlemeler yıllar öncesinde de insanlık için büyük sorunlar oluşturmuş olan hastalıkların tamamen ortadan kalkmasına engel olamadığı gibi belki de her geçen gün nedeni bilinmeyen teşhisi konulamayan pek çok yeni hastalığa da neden olmaktadır. Nedeni teknolojiye doğrudan ya da dolaylı olarak bağlı olan bu hastalıkların tedavisi için bilim adamları yıllardır devam eden çalışmalarına yenilerini eklemektedirler. Günümüzde bulaşıcı hastalıkların tedavisinin neredeyse temelini oluşturan antibiyotikler özellikle büyük önem taşımaktadır.

Bakteriyal enfeksiyonların tedavisi için yeni uygun ajanların bulunması gittikçe azalmaktadır. Uzun bir süredir bakteriyal hastalıkların tedavisi için hiçbir yeni kimyasal ekstrakt Amerikan Gıda ve İlaç kurumu (FDA) tarafından onaylanmamıştır. Bilimsel ve bilimsel olmayan yayınlar, eski ilaçların enfeksiyonların yayılmasını önlemede fazla etkili olmadığına dikkat çekmektedir. Akut tıbbi zaruretin olduğu bu zamanda, bulaşıcı hastalık ilaçların keşfinde yeni bir dönem oluşmaktadır. İlaç keşfi için yenilikçi yaklaşımların ortak noktaları son yıllarda meydana gelmiştir. Modern ilaç keşfindeki ilk başarılarından biri olan bakteriyal bulaşıcı hastalıklardaki yaklaşımlar rönesans için önemli bir adım oluşturmaktadır. Antibakteriyal ilaç keşfi sahası, artan seri bakteriyal genom sayısı ve analizler için uygunlukları sebebiyle genetiğin avantajlarından yararlanmadaki ilk alanlarından biri olacaktır (Gordon and Trias,1997).

Artan seyahatler, değişen sosyal hayat ve doğal çevreye insan müdahalesi, bakteriyal enfeksiyonların insanlara bulaşmasındaki faktörlerdir. Bu yüzyılda insan popülasyonlarının demografik modellerindeki dönüşümler enfeksiyonların doğasını ve sıklığını belirlemede önemli bir rol oynadı. Örneğin, yaşlı insan nüfusunun artması, kanser kemoterapisindeki ilerlemeler, AIDS'in yayılması, bağışıklık uyusurluğu olan insan sayısını ve onlarla beraber immünodepresyonla ilgili hastalıkların frekansını arttırdı .

Önceleri bakteriyal enfeksiyon olmadığı düşünülen hastalıklara sonradan bakterilerin neden olduğu anlaşıldı. Bu hastalıklar enfeksiyonun tedavisi için özel terapilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyabilir. Bu hastalıkların örnekleri; mide ülseriyle ilgili olan *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu enfeksiyonlar, *Cylamydia pneumoniae* ile ilgili kalp hastalıklarıdır. Büyük bir olasılıkla gelecekte arterid (mafsal iltihabı) ve

damarların tıkanması gibi yaygın hastalıkları da içerecek şekilde yeni bulaşıcı hastalıklar rapor edilecektir.

1.1. Antibiyotikler

1.1.1. Antibiyotiklerin Tanımı

Bir organizmanın diğer bir organizmanın gelişimini engelleme ve dolayısıyla onun hastalığa sebep olma etkilerini ortadan kaldırması ile ilgili ilk uygulama Metchnikoff (1889) un tavsiyesi üzerine denenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları tıp literatürüne zararsız mikroorganizmanın zararlı mikroorganizmayı ortadan kaldırıp onun yerini alması düşüncesinden giderek “yerini alma sağaltımı” olarak geçmiştir. Aynı yıl Vuillemin tarafından “bir mikroorganizmanın diğer bir mikroorganizma üzerinde antogonistik faaliyetlerinin mevcut olduğu ve bu faaliyetlerden bazı insan hastalıklarının sağıtımında yararlanılabileceği” fikri doğmuştur. Bu durum araştırmacı tarafından “Antibiosis” olarak tanımlanmıştır (Öner, 1996). Sonraki yıllarda Papcostas ve Gate, bu terimi sadece *in vitro* durumlar için sınırlandırmışlar, benzer aktivitenin *in vivo* da gerçekleşmesini ise “antagonizm” olarak tanımlamışlardır.

Antibiyotik terimi ise, 1942 yılında Waksman tarafından “mikroorganizmaların büyümelerini inhibe edici özelliğe sahip mikrobiyal kaynaklı kimyasal madde” leri tanımlamak için kullanılmıştır (Waksman, 1967). Günümüzde ise, bu tanıma etkisini düşük konsantrasyonlarda göstermesi ve düşük moleküler ağırlığa sahip olması gibi gereklilikler ilave edilmiştir (Öner, 1989; Lancini et al., 1995)

Antibiyotiklerin en fazla birkaç bin dalton kütle içermesi beklenir. Bu anlamda antibakteriyal etkiye sahip olan lizozim ve kolisin gibi kompleks protein molekülleri antibiyotik olarak değerlendirilmemektedirler. Benzer olarak, sahip oldukları antibakteriyal etkiyi ancak yüksek konsantrasyonlarda iken gösterebilen glisin, lösin gibi aminoasitler ve etanol, butanol gibi ürünler antibiyotik tanımına dahil edilmezler.

Antibiyotikler, metabolizmanın ara ürünü değil, son ürünü olarak değerlendirilirler. Keşiflerinden ve tanımlanmalarından sonraki yıllarda bu ürünlerin etkinlikleri kimyasal modifikasyonlarının eldesi ile arttırılmaya çalışılmıştır. Bu yolla önce semisentetik daha sonra ise sentetik antibiyotiklerin eldesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

1.1.2. Antibiyotiklerin Tarihçesi

Antibiyotiklerin keşfi mikrobiyal hastalıkların kontrolünde büyük çığır açmış olsa da ilk çağlara dönüp bakıldığında insanların tedavi amacıyla bitkiler ve bitki özlerinden yararlandığı; mikroorganizmaların bile farkında olunmadan sağıtımda kullanıldığı görülür (Denizci,1996). Bu doğal maddelerin tedavi edici olduğu, antibiyotik olarak adlandırılmalarından çok önce bilinmekteydi. Asırlar önce Çinliler, çibanları ve ayakta oluşan enfeksiyonları tedavi etmek için, küflü soya ile kaplı sandaletler giymişler; Hipokrat'ta dahil olmak üzere eski Yunanlılar ise şarap ve bazı tuzları yara enfeksiyonlarına karşı kullanmışlardır. Küflerin antibakteriyal özellikleri, İngiliz biyoloğu John Tyndall tarafından, 1881 yılında tarif edilmiştir ve bulanık olan kültür ortamının yüzeyinde küf üremesi ile berraklaştığını gözlemlemiştir. Bu konu ile ilgili ilginç diğer bir olgu Pasteur ve Joulbert'in gözlerinden kaçmamıştır. Onlar şarbon basillerinin idrar içersinde iyi bir büyüme gösterdiklerini ancak idrar içersine diğer organizmalarında girmesi halinde onların ortamda görünmez hale geldiklerini yani kaybolduklarını saptamışlardır. Emmerick ve Low (1901) tarafından yapılan bir çalışmada da; *Pseudomonas aeroginosa*'nın sıvı kültürlerini tavşanlara enjekte ettiklerinde tavşanların şarbona yakalanmadıklarını saptamışlardır. Onlar hayvanın kazandığı dirençliliğin sebebini de incelemişler ve bunu organizmadan çıkan piyasinaz enzimine bağlamışlardır. Tavşana aşılanan organizmaya o zaman *Bacillus pyocyaneus* deniliyordu. Enzimin ismi de organizmanın tür ismine dayanarak verilmiştir(Aslan, 1999).

1928'de Fleming tarafından keşfedilen ve 1940'lı yılların başlarında, Chain ve grubu tarafından Oxford'da izole edilen ve klinik olarak denenilen penisilin bilinen ilk antibiyotik değildir. İlk antibiyotik, mikofenolik asit, 1896'da Gosio tarafından bir *Penicillium*' dan izole edilmiş ve 1913'de Alsberg ve Black tarafından 1948'de bulunmuştur. Bu grup aynı zamanda, *Pellegra* üzerine yaptıkları çalışmalarda, küflü mısırdan penisilik asit elde etmişlerdir (Aslan, 1999).

1940'larda Waksman, *Actinomycetes*'ler tarafından üretilen antibiyotikler konusunda sistemik tarama programını başlatmıştır. Actinomisin, *Actinomycetes*'den elde edilen ilk antibiyotik olup, 1941 yılında izole edilmiş, bunu 1942'de streptotrisin takip etmiştir. Çalışma Eylül 1943'de, *Streptomyces griseus*'dan streptomisinin izolasyonu ile doruk noktasına ulaşmıştır (Aslan, 1999).

Bir *Trichoderma lignorum* metaboliti olan gliotoksin, Weindling ve Emerson tarafından 1936'da keşfedilmiş ve izole edilmiştir (Denizci, 1996).

Dubos ve grubu 1939'da toprak izolatu olan *Bacillus brevis* türünü keşfetmişler ve bunun daha sonra, gramisidin ve tiroisidin olmak üzere iki peptid antibiyotik karışımı olduğu bulunmuştur (Denizci, 1996).

Geçmişteki tarama programları, esas olarak, *Streptomyces* genusunun türleri üzerinde yoğunlaşmış olmasına rağmen, *Micromonospora purpurea* ve diğer *Micromonospora* türleri tarafından üretilen gentamisin; *Nocardia mediterranei* tarafından üretilen rifamisin; *Nocardia uniformis* tarafından üretilen rifamisin ve *Nocardia uniformis* tarafından üretilen nocardisin gibi değerli olan antibiyotikleri üreten diğer potansiyel genuslar keşfedilmişlerdir (Denizci, 1996).

1.1.3. Antibiyotik Ekolojisi

Mikroorganizmalara denizlerin en derin kısımlarından atmosferin en yüksek tabakalarına kadar çok farklı yaşam çevrelerinde rastlamak mümkündür. Ancak mikroorganizmaların en fazla bulundukları habitat, topraktır. Onların yaşamı için toprakta su, hava, mineral madde, karbon azot kaynakları, oksijen bulunduğu gibi ısı da mevsimsel olarak değişir, pH ise topraktan toprağa değişiklik gösterir. Her toprak tipine uygun bir toprak florası mevcuttur. Bir gram toprak analiz edildiğinde içinde sayısı milyonlarla ifade edilen mikroorganizmanın yer aldığı görülür. Bir gram gibi bir toprakta milyonlarca mikroorganizma bir arada yaşarken onların topraktan istedikleri besin elementleri yeterli olmadığından aralarında toprağın organik maddesi, toprağın suyu, toprağın mineral maddesi, vb. faktörler için rekabete girerler. Bu rekabetin aracı olarak sıklıkla kullanılan etken, ürettikleri toksik maddelerdir. Böylece daha fazla yer, organik madde, su, vb. faktörlere sahip olmaya çalışırlar.

Bu nedenle antibiyotik araştırmaları için toprak en sık başvurulacak materyali oluşturur. Yeni toprak örneklerinden izole edilen organizmalar, antibiyotik üretimi açısından tarama testine tabi tutulduklarında yeni antibiyotikler bulmak olanaklıdır. Bugün elimizde, mevcut en kullanışlı antibiyotikleri üreten *Penicillium*, *Streptomyces*, *Bacillus* genuslarına ait türlerin çoğunu topraktan izole etmek mümkündür (Öner, 1996).

1.1.4. Antibiyotiklerin Ekonomisi

Antibiyotikler günümüzde, Dünya çapında en fazla kullanılan ilaçlar arasındadır. Dünyadaki yıllık antibiyotik üretimi, 1991 yılı verileri ile, yaklaşık 100.000 ton olup, bu miktarın yaklaşık satış değerinin 5 milyar dolar olduğu bildirilmektedir

(Brock and Madigan, 1991). Oldukça yüksek bir ekonomik değere sahip olması nedeni ile, dünya ölçeğinde fermentasyon yolu ile antibiyotik üretimi yapan çok sayıda kuruluş bulunmaktadır. Ülkemizde bazı özel sektör kuruluşları yurtdışı bağlantılı çalışmayı ve üretim yapmamayı tercih ederken, ANSA A.Ş., Deva Holding A.Ş., Abdi İbrahim A.Ş. ve Eczacıbaşı Holding gibi bazı özel sektör kuruluşları ise, birçok antibiyotiğin üretimini gerçekleştirmektedir.

1.2. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

Genellikle antibiyotikler tedavide kullanılmak üzere antimikrobiyal etkili madde olarak üretilirler. Antibiyotikler tıp alanının yanı sıra, hayvancılık, ziraat ve diğer alanlarda da kullanılmaktadır. Ziraat alanında enfeksiyon, zararlı ve rekabetçilerin kontrolünde, hayvancılıkta ise besicilikte ağırlık artışı için katkı maddesi olarak ve enfeksiyonlara karşı, ayrıca, besinlerin muhafazasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak kullanılmaktadır (Arai et al., 1976, Lancini et al., 1995; Denizci, 1996). Antibiyotiklerin bu ve benzer uygulamalardaki kullanımları, önemlerini daha da arttırmaktadır.

1.2.1. Antibiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı

Günümüzde antibiyotikler, klinik tedavide en önemli olan ve en çok kullanılan ilaçlar arasındadır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi, antibiyotik veya diğer antimikrobiyal ajanların sistemik şekilde ilaç olarak verilmesiyle gerçekleştirilir (Denizci, 1996). Temelde bu kullanımın iki amacı vardır; antimikrobiyal ajanla tedavi edilebilecek bir enfeksiyon hastalığının varlığı (tedavi amacı ile kullanım) ve antimikrobiyal ajanla gelişmesi önlenilebilecek bir enfeksiyon olasılığı (proflaksi amacı ile kullanım). Tıpta, antibiyotiklerin yetersiz olduğu kronik hastalıklar, sistemik mikozlar ve hastane kaynaklı fırsatçı türler hala mevcuttur ve yeni antibiyotiklere ihtiyaç artmaktadır (Aslan, 1999).

1.2.2. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı

Bugün çok sayıda antibiyotik, tehlikeli etkileri olan bakteriyal, fungal, viral enfeksiyonlara ve böceklerin, diğer parazitlerin neden olduğu hastalıkların tedavisi ya da bu hastalıklardan korunma amacı ile tarımda kullanılmaktadır (Denizci, 1996) Antibiyotiklerin tarımdaki önemli uygulamaları şu şekilde özetlenebilir (Lancini et al., 1995).

1. Bakteriyal enfeksiyonların kontrolünde: Bu amaçla genellikle insanlar için geliştirilmiş olan ve kullanılan streptomisin, özellikle *Erwinia* sp. ve *Xanthomonas* sp. enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır.
2. Fungal enfeksiyonların kontrolünde: Bunların birçoğu, *Piricularia oryzae* türüne karşı etkili olan blastisidin S gibi nükleosid ve polioksinlere aittirler. Diğer önemli antifungal antibiyotikler ökaryotlarda protein sentezi inhibitörü olarak bilinen sikloheksimid ve kasugamisinidir.
3. Yabancı ot kontrolünde: Antibiyotik özellikler gösteren çok sayıda sentetik bileşiklerin bazıları bitki zararlılarının kontrolünde herbisit olarak kullanılır (Denizci, 1996).

1.2.3. Antibiyotiklerin Hayvancılıkta Kullanımı

Günümüzde antibiyotikler, besicilikte ağırlık artışı için besin katkı maddesi olarak ve ayrıca hayvanların çeşitli enfeksiyonlara karşı korunması amacı ile kullanılmaktadır.

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

Yemlerde 50 – 250 g/ton klortetrasiklin, oksitetrasiklin ya da tilosin kullanımının hayvanlarda hastalığa yakalanma dönemlerinde, korunmaya yardımcı olduğu gözlenmiştir. Özellikle süten kesme, aşılama ya da yolculuktan sonra antibiyotiklerin profilaktik kullanımı, önemli ekonomik katkı sağlamaktadır.

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

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

Antibiyotiklerin hayvancılıkta kullanılmaya başlamasının ilk yıllarında medikal amaçlı olarak, penisilin, tetrasiklin, eritromisin, streptomisin; besin katkısı olarak da, medikal amaçlı kullanılan antibiyotiklerden klortetrasiklin, eritromisin birçok ülkede

kullanılmışlardır. Fakat 17 Avrupa ülkesi ve Japonya’da bu tip antibiyotiklerin besin katkısı olarak kullanımı yasaklanmıştır. Özellikle coccidiostatik ajanlar ve besin katkı maddesi olarak polietir antibiyotikleri, her yıl artan ve yaklaşık 100 ton/yıl olan üretimleri ile bu alanda önemli kullanılış yeri bulmuşlardır. Bunlar genel olarak Aktinomiset’lerden ve özellikle *Streptomyces*, *Actinomadura* genuslarından, birkaç bileşik ise *Nocardia* ve *Dactylosporangium* türlerinden elde edilmişlerdir (Denizeci, 1996).

1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler, farklı bilim dallarındaki araştırmacılar tarafından değişik özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır. Kimyacılar kimyasal yapısına, tıp uzmanları biyolojik etki spektrumu ve etki mekanizmasına, biyologlar biyolojik orjinlerine ya da biyosentez yoluna göre sınıflandırmayı daha etkin bulmaktadırlar.

1.3.1. Biyolojik Orjinlerine Göre Sınıflandırma

Bu sınıflandırma tipi, antibiyotiği üreten organizmaya göre düzenlenmiştir. Ancak, aynı yapı ve etki mekanizmasına sahip bazı antibiyotiklerin farklı grup mikroorganizmalar tarafından üretilmesi bir dezavantaj ve karışıklık kaynağıdır.

1.3.2. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma

Antibiyotikler, kimyasal yapılarına göre Berdy (1974) tarafından sınıflandırılmışlardır (Çizelge 1). Bu sınıflandırma sistemi ile oluşturulan sistem, bulunacak yeni antibiyotiklerin sisteme girilmesi kolaylığını sağlaması nedeni ile avantajlı görülmektedir.

Çizelge 1. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Berdy, 1974)

Primer Kod Numarası	Ailesi
1. KARBONHİDRAT ANTİBİYOTİKLER	
1.1	Saf Sakkaritler
1.2	Aminoglikozit Antibiyotikler
1.3	Diğer N- ve C- Glikozitler
1.4	Çeşitli Şeker Türevleri
2. MAKROSİKLIK LAKTON (LAKTAM) ANTİBİYOTİKLER	
2.1	Makrolit Antibiyotikler

Çizelge 1. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Devam)

2.2	Polien Antibiyotikler
2.3	Diğer Makrosiklik Lakton Antibiyotikler
2.4	Makrolaktam Antibiyotikler
3. KİNON ve BENZER ANTİBİYOTİKLER	
3.1	Linear Kondanse Polkisiklik Antibiyotikler
3.2	Naftokinon Türevleri
3.3	Benzokinon Türevleri
3.4	Çeşitli Kinon Benzeri Bileşikler
4. AMİNOASİT, PEPTİD ANTİBİYOTİKLER	
4.1	Aminoasit Türevleri
4.2	Homopeptidler
4.3	Heteromer Peptidler
4.4	Peptolitler
4.5	Yüksek Molekül Ağırlıklı Peptidler
5. AZOT İÇEREN HETEROSİKLİK ANTİBİYOTİKLER	
5.1	Kondanse Olmamış (Tek) Heterosiklikler
5.2	Kondanse Heterosiklikler
5.3	Antibiyotik (Antitümör) Aktivitesi Olan Alkoloidler
6. OKSİJEN İÇEREN HETEROSİKLİK ANTİBİYOTİKLER	
6.1	Furan Türevleri
6.2	Piran Türevleri
6.3	Benzopiran Türevleri
6.4	Küçük Laktonlar
6.5	Polieter Antibiyotikler
7. ALİSİKLİK ANTİBİYOTİKLER	
7.1	Siklolakton Türevleri
7.2	Küçük Terpenler
7.3	Oligoterpen Antibiyotikler
8. AROMATİK ANTİBİYOTİKLER	
8.1	Benzen Bileşikleri
8.2	Kondanse Aromatik Bileşikler
8.3	Non-Benzoid Aromatik Bileşikler
8.4	Aromatik Bileşiklerin Çeşitli Türevleri
9. ALİFATİKANTİBİYOTİKLER	
9.1	Alkan Türevleri
9.2	Alifatik Karboksilik Asit Türevleri
9.3	Kükürt ya da Fosfor İçeren Alifatik Bileşikler
0. MİSELLİ ANTİBİYOTİKLER	

1.3.3. Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma

Önceleri, antimikrobiyal etki tiplerinin çoğunun, bir “Rekabet Antagonizmi” mekanizması ile açıklanabileceğine inanılıyordu. Oysa günümüzde, antimikrobik maddelerin etkisinde rekabet antagonizminin nadiren rol oynadığı ve en etkili antimikrobik ilaçların, mikroorganizma hücrelerinin büyük moleküllü bileşiklerinin yapımını, birleşmesini veya fonksiyonlarını bozmak suretiyle etki gösterdikleri bilinmektedir (Eltem, 1999). Antibiyotikler, hücre çoğalmasında önemli fonksiyona sahip olan moleküllerin görevini inhibe ederek duyarlı mikroorganizmaların büyümesini engellerler.

1.3.3.1. Üremenin, temel metabolitlerin analogları tarafından önlenmesi (Rekabet Antagonizmi)

Birçok mikroorganizma için, Para aminobenzoik asid (PABA), purinlerin yapımında önemli bir adım oluşturan folik asidin yapımı için temel bir metabolittir. Bu işlemde muhtemelen önce PABA ile ATP’ ye bağlı bir pteridine birleşerek, daha sonra folik aside dönüşürler. Sulfanomidler yapı bakımından PABA’nın analoglarıdır. Sulfanomidler bu yapı benzerliğinden ötürü reaksiyonda PABA’nın yerini alarak, enzimin aktif merkezi ile birleşme bakımından PABA’ ya rakip olurlar. Sonuç olarak folik asidin iş göremeyen analogları oluşur ve bakterinin bundan sonraki üremesi engellenmiş olur. Bu olay, antimikrobik ilaçların rekabet antagonizmi için en iyi bilinen örneklerdendir.

1.3.3.2. Hücre çeperi yapımının engellenmesi

Hücre çeperi, peptidoglukan denilen karmaşık bir mukopeptid polimer ihtiva eder. Penicillinler, bakteri hücre çeperi yapımını seçici şekilde önlerler. Fonksiyonları penicillinle önlenen hücrelerde, hücre çeperinin ön maddeleri olan nükleotidler birikirler. Halbuki, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapımı, yavaşlamaksızın devam eder.

Diğer birçok ilaçlar da, aynı şekilde hücre çeperi sentezini engellemek suretiyle etki yaparlar; ancak bu yol, bu antibiyotiklerin tek veya temel etki mekanizmaları değildir. Bu tip antibiyotikler arasında, basitrasın, vankomisin, novobiosin ve sikloserin sayılabilir. Yapıları bakımından D-alanin’in analogu olan D-sikloserine, polimerde

alanin'in bulunduğu peptid bölümüne onun yerine girmek suretiyle hücre çeperi yapımının bozulmasına sebep olur (Ural ve Ünver, 1988).

1.3.3.3. Hücre zarı fonksiyonunun önlenmesi

Bütün canlı hücrelerin sitoplazması, bir sitoplazmik zarla çevrilmiştir. Bu zar, seçici geçirgenlik özelliği nedeni ile, hücrenin iç yapısını kontrol eden bir baraj görevi yapar. Eğer sitoplazmik zarın fonksiyonel bütünlüğü bozulacak olursa, purin ve pirimidin nükleotidleri ile proteinler hücreden dışarı çıkabilirler; bu ise, hücrenin zarara uğramasına ya da ölümüne sebep olur. Bazı bakterilerle fungusların sitoplazmik zarları, belirli etkenler tarafından, hayvan hücrelerinin zarlarından daha kolay bozulabilir. Bu fark, seçici etkili kemoterapi uygulanmasına olanak yaratır.

Bu etki mekanizmasının en iyi bilinen örnekleri, polimiksinlerin gram-negatif bakterilere etkileri ve polyene antibiotiklerin funguslar üzerine olan etkileridir. Bununla beraber, polimiksinler funguslara ve polienler de bakterilere etki yapmazlar. Bunun nedeni, fungusların hücre zarlarındaki bir sterol ile etkileşmek zorundadırlar. Bakterilerin hücre zarlarında bu sterol mevcut değildir; bu nedenle bakteriler polien'in etkisine dirençlidirler. Bu durum, hücrelerin kişilik farklarına ve seçici toksik etkiye iyi bir örnektir.

1.3.3.4. Protein yapımının önlenmesi

Chloramphenicol, tetracyclinler, streptomycinler ve erythromycinler, bakterilerdeki protein yapımını önleyebilirler. Chloramphenicol, hücre çeperinin ya da nükleik asitlerin yapısını bozmaz; bakteri ribozomlarının 50 S birimlerini etkileyerek, aminoasitlerin oluşmakta olan polipeptid zincirlerine eklenmesini belirli şekilde bozar. Muhtemelen peptidil transferaz enziminin iş görmesini önleyebilir. Bu antibiotik, birçok bakteriler için bakteriyostatik etkilidir ve etkisi kaldırılıp ters yöne dönüşebilir.

Tetracyclinler, amino-acyl transfer RNA (tRNA)'nın, ribozomların 30 S birimine bağlanmasını bloke etmek suretiyle, bakterilerin protein yapımını önlerler. Macrolideler (erythromycin grubu) ve lincomycin de, ribozoma bağlanacak olan amino asitlerin yerini alarak ve amino-acyl reaksiyonlarını bloke ederek, protein yapımını önlerler.

Streptomycin, bakterilerin protein yapımını, etkili şekilde önler. Bu antibiotik, ribozomların 30 S birimlerinin bir proteinine bağlanır ve mRNA' nın taşıdığı bilginin yanlış okunmasına sebep olur. Bu olay, hücre içinde, iş göremeyen proteinlerin

oluşmasına yol açar. Diğer aminoglycosidler (kanamycin, neomycin ve gentamycin), streptomycininkine benzer bir mekanizma ile etki yaparlar (Ünver ve Ural, 1988).

1.3.3.5. Nükleik asit yapımının önlenmesi

Actinomycin gibi ilaçlar, DNA sentezini önleyen, etkili inhibitörlerdir. Bu maddeler, deoksiguanozinlere bağlanmak suretiyle, DNA ile bileşikler yaparlar. Böylece oluşan DNA-actinomycin kompleksleri, DNA'ya bağlı olan RNA polimerazı inhibe ederek, mRNA oluşumunu önlerler. Actinomycin ayrıca DNA viruslarının replikasyonunu da önler.

Halogenlenmiş pirimidinler (örneğin, 5-iodo-2'-deoksiuridin, idoxuridin, IDU), fonksiyon bakımından sağlam DNA sentezini bloke ettiklerinden, enfektif DNA viruslerinin replikasyonunu bozabilirler. IDU, thyrimidine'in viral DNA'ya birleşmesini engelleyebilir ve bunun yerine bizzat kendisi DNA yapısına girerek, iş göremeyen bir DNA molekülü yapılmasına sebep olabilir.

Çoğunlukla idrar yolu antiseptiği olarak kullanılan nalidixic acid, kuvvetli bir DNA sentezi önleyicisidir; fakat antibakteriyal etkisinin bu önlenime bağlı olup olmadığı bilinmemektedir (Ünver ve Ural, 1988).

1.4. Antibiyotiklere Karşı Mikrobiyal Dirençlilik

Günümüzdeki antibiyotik sınıflarının keşfi tıbbi bir mucize olarak görülse de bulaşıcı hastalıkların tedavi problemleri daima bizimle beraber olacaktır. Bakteriyal popülasyonlardaki antibiyotik direnci, antimikrobiyal ilaçların kullanımıyla zamanla dramatik bir şekilde artmıştır. Antibiyotik öncesi devirde, *Staphylococcus aureus* ya da *Streptococcus pneumonia* suşlarıyla olan enfeksiyonlar, zatüre ya da sepsis gibi genelde öldürücüydü. Penisilin tedavi için bulunduğu bakterinin tüm izolatları çok hassastı ve bu mikroorganizmanın yol açtığı enfeksiyonlar kontrol altına alınabildi. Antibiyotiklerin kullanımından yıllar sonra, *S.aureus*'un klinik izolatlarının yaklaşık % 90'ının laktamaz üreterek ve başta penisilin olmak üzere çoğu laktamlara dirençli olduğu tespit edildi. Methisilinin ortaya çıkmasından sonra, ilk methisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları izole edildi. Bu antibiyotik ve diğer mikrobiyal ajanların yıllar boyunca yaygın olarak kullanılmasının bir sonucu olarak, MRSA suşları, çoğu antibiyotik sınıflarına dirençli markerlar biriktirdi. Vankomisin tedavisine dirençli MRSA suşları izole edildi. Glikopeptid direncinin yayılması durumunda, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde toplum yeniden antibiyotik öncesi döneme dönebilir.

MRSA enfeksiyonları genellikle hastane ortamlarıyla sınırlıdır, fakat antibiyotik direnci tehdidi hastanelerin ötesine gitmektedir. *S. pneumonia*'ların penisilinlere ve sefalosporinlere dirençlerinin frekansı toplumda kazanılmış enfeksiyonlarda artmaktadır ve bu dirençli fenotipler, farklı orjinli dirençli suşların klonal popülasyonlarının yayılmasıyla çeşitli durumlarda bağımsız olarak oluştu.

1.4.1. Doğal Dirençlilik

Bakteriler doğal olarak, antibiyotiklere karşı dirençli olabilirler. Örneğin streptomisetler kendi ürettikleri antibiyotiklere karşı dirençlilikten sorumlu bazı genlere sahip iken, gram-negatif bakterilerin sahip olduğu dış membran antibiyotiklerin geçişine karşı bariyer görevi yapar. Bazı organizmalarda ise antibiyotikleri taşıyıcı sistem yer almazken, bazılarında da antibiyotiklerin hedef aldığı reaksiyon ya da hedefler bulunmaz.

İlaçların, bunlarla karşılaşan mikroorganizma popülasyonunun tümünün dirençli hale gelmesi için gerekli bir uyarı (stimulus) olarak iş görebilecekleri ile sürülmüştür. Bu tip bir “uyum” mekanizması, eğer mümkün olabilirse, muhtemelen pek seyrek olarak önemli bir direnç oluşumundan sorumlu tutulabilir. Fakat çevre koşulları, organizmanın genotipinden bağımsız olarak ilaca dirençlilik nedeni olabilirler. Örneğin metabolizmaları durgun olan mikroorganizmalar, ilaç etkilerine dayanabilirler. Fenotip bakımından “dayanıklı” olan bu tip mikroorganizmalar, devam eden enfeksiyonlarda ve ilaçla tedavinin başarısızlığında önemli olabilirler.

1.4.2. Kazanılmış Dirençlilik

Bakteriler antibiyotiklere karşı dirençlilik geliştirebilir, örneğin bakteriyal popülasyonlar önceden duyarlı oldukları antibiyotiklere karşı dirençli olabilirler. Bakteriyal genomun değişmesi bu tip dirençlilikle sonuçlanır. Kazanılmış dirençlilik bakterilerde, iki genetik işlemle yürütülür: (1) Mutasyon ve Seleksiyon (vertical evrim); (2) Tür ya da Strainler Arasında Gen Değişimleri (horizontal evrim)

1.4.2.1. Mutasyon ve seleksiyon

Bakteriyal kromozomdaki doğal mutasyon bakteriyal popülasyonun bir üyesine dirençlilik kazandırır. Antibiyotiklerin seçici ortamında yabani tip olanlar (mutant olmayanlar) ölür ve dirençli mutantlar büyüme ve gelişmesine devam eder.

1.4.2.2. Tür ya da strainler arasında gen değişimleri

Diğer organizmalardan dirençli genlerin kazanılmasıdır. Bir bakteri popülasyonunda bir defa ilaca dirençli mutantlar belirince, bu mutasyon, bu bakteri türü için söz konusu olan genetik madde aktarımı mekanizmasına bağlı olmak üzere, transformasyon, transdüksiyon ya da konjugasyon yolu ile popülasyondaki diğer hücrelere de geçebilir. Doğa’da, bu mekanizmalar aracılığı ile kromozomal genlerin transferi, muhtemelen çok seyrek meydana gelmektedir. Fakat bu şekilde, 2 ayrı ilaca dirençli olan 2 bakteri arasındaki yeni bileşim (rekombinasyon) olayları, her iki ilaca da dirençli olan bir hücre meydana getirebilir.

İlaça dirençlilik özelliği, genetik olarak, epizomların ya da plazmidlerin transferi suretiyle de bir bakteriden diğerine geçebilir. Bunun en iyi bilinen örnekleri, konjugasyon yolu ile gram negatif bakteriler arasında birçok ilaca birden direnç özelliğini taşıyabilen Direnç Aktarıcı Faktörler (=Resistance Transfer Factors =RTF) ve stafilokoklar arasında, bakteriyofaj aracılığı ile (transdüksiyonla) taşınan ve penisilinaz yapımını yöneten plazmidlerdir.

1.4.3. İlaçlara Dirençliliğin Biyokimyasal Mekanizmaları

İlaçlara dirençli hale geliş mekanizmasına ait çeşitli düşünceler yer almaktadır. Bu mekanizmaların başlıcaları şu biçimde özetlenebilir:

1. İlacın tahribinin artması; örneğin penisiline dirençli olan birçok organizma, penisilini parçalayan “Penisilinaz” enzimi meydana getirirler.
2. Organizmanın ilaca olan geçirgenliğinin azalması. Membranın veya onun geçirgenlik özelliğinin değişikliğe uğramasıyla artık hücre o ilaca geçirgen değildir. Bu durum, çoğunlukla bir ilacın düşük molekül ağırlıklı bir metabolitin rekabetli inhibitörü iken görülür (örneğin; argininin bir analogu olan canavanine direnç, genellikle bir arginine permease’in mutasyonel kaybıyla kazanılır).
3. Bir enzim için ilaçla rekabete girebilecek yapıda olan bir metabolitin yapımının artması. Örneğin, sulfanomide dirençli bazı suşlarda PABA (para-amino-benzoik asit) yapımı artmaktadır.
4. İlacın önlediği enzimin yapımının artması.
5. Önlenime uğrayan reaksiyonun yerini tutabilen yeni bir metabolik yolun geliştirilmesi.
6. Bir enzimin, metabolik fonksiyonlarını devam ettirebilecek, buna karşılık ilaçtan zarar görmeyecek şekilde değişikliğe uğraması.

7. Ribozomal proteinin, streptomisine dirençte olduğu gibi, yapımının değişmesi.

Bir ilaca dirençli olan ve bu ilacın kullanılması suretiyle popülasyondaki diğer bakterilerden seçilen varyantlar, daha önce karşılaşmadıkları diğer bir ilaca karşıda dirençli olabilirler. Buna, çapraz direnç (cross-resistance) adı verilmektedir. Bu gibi ilgiler, temel olarak kimyasal yapıları bakımından aralarında yakınlık bulunan tetrasiklinler, eritromisin - karbomisin – spiramisin - oleandomisinler, streptomisin - dihidrostreptomisin, neomisin – kanamisin - paramomisin, polimiksin - kolistin gibi ilaçlar arasında görülür.

Antibiyotik dirençliliğine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır ve antibiyotik dirençliliği bakterilerce oluşturulan bulaşıcı hastalıkların tedavisinde en sık rastlanılan hatalara neden olmaktadır. Antibiyotiğe dirençli bakterinin neden olduğu bulaşıcı hastalıklar kaçınılmaz olarak pahalı ve daha toksik ilaçların kullanımına, daha sonra hastanede yatmaya ve doğal olarak maliyet yükselmesine neden olmaktadır. Belirtmek gerekir ki, enfeksiyonların büyük bölümü ve özellikle tehlikeli patojenlerce oluşturulanları, hala antibiyotik tedavisine cevap vermektedir. Fakat bu durum bir rahatlamaya ve antimikrobiyal kemoterapide karşılaşılan gittikçe artan problemleri göz ardı etmeye neden olmamalıdır.

Bakterilerin antibiyotik direnç genlerini verme ve kazanma yetenekleri antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında büyük bir etkidir, fakat direnç genlerinin devamında ve evriminde yer alan faktörlerde göz önünde bulundurulmalıdır. En önemli neden sürekli antibiyotik kullanımından kaynaklanan seçici baskıdır. Fazla ya da yanlış kullanım, problemi kesinlikle arttırmaktadır. Örneğin, antibiyotik kullanımında sıkı sınırlamalar olan ülkelerde, daha yumuşak yaklaşımları olan ülkelere göre direnç oranları daha düşüktür. Sağlık kuruluşlarında dirençli organizmaların daha fazla görülmesi antibiyotik uygulamasının bu çevrelerde sürekli olmasıdır ve sonuçta hastane ortamında kazanılmış dirençliliğe sahip olan zincirler toplum içinde kazanılmış dirençliliğe sahip zincirlere göre daha dirençli olmaktadır. Hastanelerde antibiyotik kullanımının kontrolü zordur çünkü, enfeksiyonla karşı karşıya gelen bir medikal uygulayıcı hastayı kendine göre en uygun araçlarla tedavi edecektir. Bununla birlikte gereksiz ya da yanlış tahmin edilen antibiyotik kullanımını azaltmak için belirli ölçümler uygulanabilir. Bunlara, lokal antibiyotik tedavi tedbirleri, mikrobiyologlar ya da enfeksiyon hastalıkları hekimi gibi antimikrobiyal kemoterapi uzmanlarıyla

konsültasyon, lokal durumlar için uygun ve sınırlı antibiyotikleri içeren lokal reçete ve etkili enfeksiyon kontrol tedbirleri dahildir.

Bakteriyal patojenler, antibiyotiklere karşı çeşitli şekillerde dirençlilik geliştirebilir ya da kazanabilirler. Bu durum kullanımda olan antibiyotiklerin giderek yarasız olmasına neden olduğu gibi araştırmacıları da çözümler üretmeye mecbur bırakır. Mikrobiyal genetik alanında yapılacak çalışmalar ilk sırayı alır. Antibiyotik üretici organizmalar mutasyon-seleksiyon çalışmaları, genetik manipulasyonlar veya rekombinant DNA teknolojisi yoluyla en etkili ve en verimli antibiyotik üreticilerine dönüştürülebilir. İkinci çözüm ise mikrobiyologların yürüteceği çalışma olan, yeni antibiyotik tarama ve keşfetme çabalarıdır. Bu da eski hastalıklara karşı yeni antibiyotiklerin bulunması avantaj sağlarken, keşfedilen her antibiyotiğinde yeni hastalıkların ortaya çıkmasına neden olması dezavantajdır.

Antibiyotikler günümüzde dünya çapında en fazla kullanılan ilaçlar arasındadır. Ticari açıdan önemli oranda getirilerinin olması ve en önemlisi tıp alanının yanında, diğer birçok alanda da kullanım yerinin olması gibi nedenler önemlerini arttırmaktadır. Enfeksiyonlara karşı etkin bir şekilde kullanılan antibiyotiklere karşı mikroorganizmalarca direnç kazanılması, bu hastalıklarla mücadeleyi gün geçtikçe zorlaştırıyor olması toplum sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Birey ve toplum sağlığının korunabilmesi bilinçli ve düzenli bir antibiyotik kullanımı konusunda duyarlılık ve eğitimin yanı sıra yeni antibiyotiklerin kullanıma sunulmasına da bağlı görülmektedir. Antibiyotiklerle ilgili temel yayın organlarından birisi olan “Journal of Antibiotics” dergisinde 1947-1997 yılları arasında 4384 adet yeni antibiyotiğin bulunduğu belirtilmektedir. Dolayısıyla antibiyotik üreticisi olan mikroorganizmaların tarama çalışmaları yeni antibiyotiklerin keşfine açacak olan başlangıç noktalarıdır.

1.5. Antibiyotik Üreten Mikroorganizmalar

1955'te sadece 500 antibiyotiğin bilinmesine rağmen, 20 yıl sonra, bu sayı 5000'i bulmuştu ve bugün 13 000'den fazla doğal antibiyotik bilinmektedir. Bu bileşikler üretenler arasında, mikroorganizmalar dışında algler, likenler, yüksek bitkiler ve çeşitli hayvan organizmaları vardır.

Bilinen antibiyotik üreticilerinin taksonomilerine ve kimyasal yapılarına bakıldığında, bazı düzenler ve sınırlamalar görülebilir.

Eubakteriler tarafından üretilen birçok antibiyotik peptidik bileşiklerdir. Filamentöz bakterilere ait prokaryotlardan olan *Actinomycetes*'ler çok büyük kimyasal

çeşitlilik gösterir. Peptidler şeker türevleri, makrosiklik, quinoid veya heterosiklik bileşikler vs. mikrosiklik mantar tarafından üretilen antibiyotikler arasında peptidler azdır fakat, depsi-peptidler, alisiklik, aromatik, heterosiklik bileşikler veya quinonlarla birlikte bilinmektedir.

Yeni antibiyotiklerin büyük bir çoğunluğu topraktan veya öteki doğal habitatlardan izole edilen “yabani” izolatların taranması ile belirlenmişlerdir.

Geniş bir taksonomik aralıktaki mikroorganizmaların antibiyotik üretme kapasitesi olmasına rağmen bu evrensel değildir. 1945 ve 1978 arasında belirlenen antibiyotiklerin % 55’den fazlası *Streptomyces* genusu kaynaklıdır ve 5000’den fazla bileşiği içerir (Aslan, 1999).

Antibiyotik üretme kabiliyeti doğada geniş olarak görülmesine rağmen, çok farklı mikroorganizma gruplarında benzer ve tesadüfi olarak dağılmamışlar; sadece birkaç genus ile sınırlanmışlar; fakat bu sınırlı genuslar içinde aktinomisetler antibiyotiklerin esas üreticileri olarak görülmüşlerdir. Alçak funguslardan yaklaşık 1500 antibiyotik veya biyoaktif metabolit izole edilmiştir. Bunların 1/3’ü *Penicillium* ve *Aspergillus* genusuna ait strainlerden izole edilmiştir. Bakterilerden yaklaşık 1200 antibiyotik gerçek *Baillus* ve *Pseudomonas* genusu tarafından üretildiği rapor edilmiştir. En büyük üretici grup olan Aktinomisetler tarafından üretilen, rapor edilmiş 6000 antibiyotik vardır. Bunların % 75’i *Streptomyces* genusunun strainlerinden izole edilmiştir. Diğer taraftan son 10 yılda GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) laboratuvarlarında yapılan çalışmalarda *Myxobacterial* kökenli yaklaşık 100 farklı yapıda bileşik izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Böylece çok az sayıda strain taranmasına rağmen, *Myxococcus*, *Sorangium* çok üretken bir grup olarak ortaya çıkmıştır (Denizci, 1996).

1.5.1. Bakteriler

Bakteriler tarafından antibiyotik üretimi sınırlı olmakla beraber, özellikle *Bacillus* genusu tarafından gerçekleştirilmektedir. Ayrıca *Pseudomonas* ve *Enterobacteriaceae* üyeleri de antibiyotik üretiminde rol alan organizma gruplarıdır. Birkaç istisna dışında, *Bacillus* genusu tarafından üretilen antibiyotikler, peptit yapıda olup, bunlar Çizelge 2’de diğer antibiyotik üreten bakteri genuslarıyla verilmiştir. *Pseudomonas* üyeleri tarafından çok sayıda sekonder metabolit üretilmesine rağmen, sadece *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens* türlerinden büyük hacimlerde iodonin ve pycyanine üretilmektedir. Ayrıca peptidoglikan inhibitörleri, sikloserin ve fosfomisin,

antiprotozoal olarak da azomisin, antifungal olarak pyrrolnitrin ve deri enfeksiyonları için kullanılan mupirosin bu grup organizmalardan üretilmektedirler.

Çizelge 2. Bakteriler Tarafından Üretilen Antibiyotikler (Denizci, 1996).

Bakteriler	Antibiyotik
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacidrasin
<i>B.brevis</i>	Gramisidin
<i>B.polymyxa</i>	Polimiksin B
<i>B.polymyxa</i>	Kolitsin (Polimiksin E)
<i>B.circulans</i>	Butirosin ^a
<i>B.megaterium</i>	Glukomikotrienin
<i>B.megaterium</i>	Ansamisin
<i>B.subtilis</i>	Basidrasin ^b
<i>B.subtilis</i>	Subtilin ^b
<i>Pseudomonas pyrolnitrica</i>	Pirolnitrin
<i>P.fluorescens</i>	Pirolnitrin
<i>P.fluorescens</i>	Mupirosin
<i>P.acidophila</i>	Sülfazesin
<i>P.mesoacidophila</i>	İzosülfazesin
<i>Myxococcus fulvus</i>	Althiomisin
<i>M.fulvus</i>	Pirolnitrin
<i>M.corallodites</i>	Korallopironin
<i>Sorangium cellulosum</i>	Ambutirisin
<i>S.cellulosum</i>	Soraphen

a: Klinik Olarak Kullanılıyor

b: Besin Katkı Maddesi Olarak Kullanılıyor

1.5.2. Funguslar

Toprak fungusları çok sayıda antibiyotik üretirler. Bunlar arasında en önemlisi penisilin olup, diğerleri mikofenolikasit gliotoksin, klavasin, gladiolik asit, penisillik asit, fumigasindir. Çizelge 3’de funguslar tarafından üretilen antibiyotik sayısı verilmiştir.

Çizelge 3. Funguslar Tarafından Üretilen Antibiyotik Sayısı (Denizci,1996).

Funguslar	Üretilen Antibiyotik Sayısı
Phycomycetes	14
Ascomycetes	299
Basidiomycetes	140
Fungi Imperfecti	315

1.5.3. Aktinomisetler

Aktinomisetler, doğada geniş olarak dağılmış, dallanan filamentli olarak büyüyen bakterilerin geniş bir grubudur. Onlar iki dar grup altında toplanabilir;

1. Genel olarak insan ve hayvanlarla birlikte yaşayan fermentatif olanlar
2. Toprakta yaşayan aerobik olanlar

Birinci grup özel morfolojik özellikler ve diaminopimelikasit (DAP) içermez, ikinci grup DAP içerir. Toprak Aktinomiset'lerinin hücre çeperlerinin ana bileşenleri Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Toprak Aktinomiset'lerinin Hücre Çeperlerinin Ana Bileşenleri.^a (Denizci, 1996).

Hücre Çeperi Tipi	Ana Bileşenler
<i>Streptomyces</i> veya Tip 1	L-DAP ^b , Glisin
<i>Mikromonospora</i> veya Tip 2	meso-DAP ^c , Glisin, hidroksi DAP bulunabilir
<i>Actinomadura</i> veya Tip 3	meso-DAP
<i>Nocardia</i> veya Tip 4	meso-DAP, Arabinoz, Galaktoz
<i>Oerskovia</i>	Lisin, Aspartik asit, Galaktoz
<i>Agromyces</i>	DAB ^d -Glisin
<i>Mycoplana</i> ^e	meso-DAP, Birçok aminoasit

a: bütün hücre çeperi preparasyonları alanin, glutamik asit, glukozamin ve muramik asiti yüksek miktarda içerir

b: DAP=2,6 Diaminopimelik asit

c: meso-DAP ve D-DAP arasında farklılaşma yok

d: DAB=2,4 Diaminobütrik asit

e: Bu organizmalar Gr(-)'tir

Aktinomisetlerin, antibiyotik üreticileri olarak medikal ve endüstriyel öneme sahip mikroorganizma grubu oldukları birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir.

1.5.3.1. Streptomyces

Bu güne kadar aktinomisetlerden izole edilen antibiyotiklerin büyük çoğunluğu *Streptomyces* genusu tarafından üretilmektedir ve endüstriyel öneme sahip en önemli organizma grubudur.

Streptomyces genusu kimyasal, moleküler ve nümerik taksonomik metot uygulamaları ile şekillenmiştir. Onlar gram pozitif, non-asit fast, nadiren fragment olan vegetatif hiflere (0,5-2 µm) sahip ve üremeleri arial hifin ucunda taşınan hareketsiz

sporlarla olan organizmalardır. Birçok türde aerial miselyumda 3 veya daha çok olgun spor bulunur; sadece birkaç tür substrat miselyumda spor zinciri oluşturur; sclerotium, piknidium, sporangium ve synema gibi yapılar oluşabilir; büyümenin başlangıcında koloniler, gerçekte düzdür fakat aerial hifin geliştiği sonraki dönemde pamuksu, flokkoz, granüllü, pudramsı veya kadifemsi görülebilir. Vegetatif veya aerial miselin renginden sorumlu pigmentler üretilebilir ve renk oluşturan diffüze pigment oluşturulabilirler; kemoorganotrafik oksidatif tip metabolizmaya sahiptirler; enerji ve büyümeleri için çok sayıda organik bileşikleri kullanabilirler; çoğunlukla optimum sıcaklık istekleri 25-30°C ve pH 6.5-8 arasındadır, bunun dışında termofilik, psikrofilik ve asidofilik ve alkalofilik olanlarda mevcuttur.

Onlar hücre çeperi peptidoglikan yapısında esas olarak LL-diaminopimelikasit (LL-A₂pm) içerirler ve kemotaksonomik olarak hücre çeperi **Kemotip I** içinde sınıflandırılır. Hücre çeperi kemotip olan diğer Aktinomycetes ile *Streptomyces* genusu arasındaki farklar çizelge’de verilmiştir. Mikolik asit içermezler ve doymuş izo ve anteizo yağ asitleri predominant izoprenolok olarak dokuz izopiren birimi ile hekza ve okta dehidrojene menaquinon; ayrıca, difosfatidilgliserol, fosfatidilinositol içeren kompleks polar lipid içerirler; bu lipid karakterleri ile **Fosfolipid tip 2** grubuna dahildirler. DNA da % G+C oranı 69-78 arasında değişir. Özetle *Streptomyces*’lerin karakteristik özellikleri şunlardır;

- a- *Streptomyces* türleri aerobik ve mezofilik, non asit-fast ve gram pozitifler.
- b- Aşağı yukarı dallı, septasız misel sıkı, ekseriya devrimsi durumda, agar veya jelatin ortamlarında bir yığın ve koloni oluştururlar.
- c- Sıvı ortamlarda bulanıklık oluşturmaz, bir istisna olarak lizi halinde, büyüme tanecikler veya sıkı yığınlar oluşturduğunda bulanıklık olur.
- d- Yüzey büyümesi, giderek havasal miselin ortam yüzeylerini örtmesi şeklinde gelişir. Misel sporogenik hifler veya sporoforlar oluşturur.
- e- Sporlar tek hücreli sporlardan (veya konidya) oluşan zincirlere sahiptir. Sporlar şekilce ve yüzey görünüşü bakımından farklılıklar gösterir.
- f- Türler ekseriya çözünen veya çözünmeyen bir pigment oluşumu ile karakterize edilir.

Çizelge 5’de *Streptomyces* genusu tarafından 1986 yılına kadar üretilen çeşitli seçilmiş antibiyotikler, Çizelge 6’de aynı genus tarafından 1987-1992 yıllarında üretilen antibiyotikler verilmiştir.

Çizelge 5. *Streptomyces* genusu tarafından 1982-1986 yıllarında üretilen antibiyotikler (Denizci, 1996).

Aktivite	Antibiyotik	Yapısal sınıf	Üreticiler
Antibakteriyel	Streptomisin	Aminoglikozid	<i>S.griseus</i>
	Kanamisin A,B	Aminoglikozid	<i>S.kanamyceticus</i>
	Higromisin B	Aminoglikozid	<i>S.hygroscopicus</i>
	Sefamisin A,B	B-Laktam	<i>S.chartreusis</i>
	Tienamisin	B-Laktam	<i>S.cattleya</i>
	Klavulanik asit	B-Laktam	<i>S.clavuligerus</i>
	Oleandomisin	Makrolid	<i>S.antibioticus</i>
	Lankasidin	Makrolid	<i>S.violaceoniger</i>
	Pristanimisin	Peptolipid	<i>S.pristinaespiralis</i>
	Oksitetrasiklin	Tetrasiklin	<i>S.rimosus</i>
	Linkomisin	Tanımlanmamış	<i>S.lincolnensis</i>
	Kloramfenikol	Tanımlanmamış	<i>S.venezuelae</i>
	2-OH-		
Antifungal	metilklavam	B-Laktam	<i>S.clavuligerus</i>
	Nistatin	Polien(tetraen)	<i>S.noursei</i>
	Amfoterisin B	Polien(Heptaen)	<i>S.nodosus</i>
	Candisin/levorin	Polien(Heptaen)	<i>S.griseus(canescens)</i>
Antiviral	Ara-A	Nukleosid	<i>S.antibioticus</i>
Antitümoral	Tunikamisin	Nukleosid	<i>S.chartreusis</i>
	Daunorubisin	Antrasiklin	<i>S.peuceticus</i>
			<i>S.coeruleoribidus</i>
			<i>S.peuceticus</i>
	Doxorubisin	Antrasiklin	var.caesius
	Ditrisarubisin	Antrasiklin	<i>S.cyaneus</i>
	Mitomisin C	"Diğer Kinonlar"	<i>S.caespitosus</i>
	Aktinomisin	Kromopeptit	<i>S.antibioticus</i>
	Sarkomisin	Tanımlanamamış	<i>S.erythrochromogenes</i>
	Higromisin B	Aminoglikozid	<i>S.hygroscopicus</i>
Antiparazitik	Avermektin	Makrolit	<i>S.avermitilis</i>
	Milbemisin	Makrolit	<i>S.hygroscopicus</i>
			spp. aureolacrimosus
	Monensin	Polieter	<i>S.cinnamomensis</i>
İnsektisidal	Salinomisin	Polieter	<i>S.albus</i>
	Avermektin	Makrolid	<i>S.avermitilis</i>
	Milbemisin	Makrolid	<i>S.hygroscopicus</i>
			ssp.aureolacrimosus
Herbisidal	Bialaphos	Tanımlanamamış	<i>S.hygroscopicus</i>
	Fosfinotirisin	Tanımlanamamış	<i>S.viridochromogenes</i>

Çizelge 6. Streptomyces genusu tarafından 1987-1992 yıllarında üretilen antibiyotikler (Denizci, 1996).

Antibiyotik	Üretici Organizma	Etki Spektrumu	Referans
Aktiketal	<i>S. pulvareseus</i> <i>ssp.epiderstagenes</i>	Antitümoral Anaerobik Gr (+) ve	Sonoda et al. 1991
PA-46101 A	<i>Streptomyces sp.</i>	Gr (-) Bakteriler Anaerobik Gr (+) ve	Matsumoto et al.1990
PA-46101 B	<i>Streptomyces sp.</i>	Gr (-) Bakteriler Gr (+, -)Patojen ve	Matsumoto et al.1990
Abbemisin	<i>Streptomyces sp.</i>	Obligat anaerob	Hochlowski et al. 1987
Jietasin A	<i>Streptomyces sp.</i>	Nematod ve Fungus	Omura et al. 1987
Jietasin B	<i>Streptomyces sp.</i>	Nematod ve Fungus	Omura et al. 1987
MM 47755	<i>Streptomyces sp.</i> <i>S.griseus var.</i>	Gr (+) ve Fungus	Gilpin et al. 1989
Valinomisin	<i>flexipertum</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Gr (+) Bakteriler Gr (+) Bakteriler ve	Komori et al. 1985
Pirroksamisin	<i>S46506</i>	Dermatofitler Antifungal	Yano et al. 1987
Sültriesin	<i>S. roseiscleroticus</i>	Antitümoral Patojenik anaerob	Ohkuma et al. 1992
Tirandalidigin	<i>S. tirandis ssp</i> <i>umidis</i>	ve Gr (+) Bakteriler Gr (+) Bakteriler ve	Karwowski et al. 1992
Lidikamisin	<i>S. lydicus</i>	Bazı Mayalar Gr (+) Bakteriler ve	Hayakawa et al. 1991
SF 2575	<i>Streptomyces sp</i>	Murin LösemiaP388	Hatsu et al. 1992
TA-3037A	<i>S. sp TA-303</i>	Antikanser Bakteriler ve	Komagata et al. 1992
B14106	<i>S. spheroides</i>	Antitümoral	Kojiri et al. 1992
Juglomisın	<i>S. tendae</i>	Gr (+,-) Bakteriler Fungus ve	Treskatis et al. 1992
Nikkomisin	<i>S. tendae</i>	Sitotoksik	Treskatis et al. 1992

1.5.3.2. Diğer Aktinomisetler

Streptomyces dışında toprak popülasyonu genelde *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Actinomadura* ve *Nocardia* strainleri bakımından oldukça zengindir. Bu nedenle bu gruplarında birçoğunun antibiyotiklere sahip olması sürpriz değildir. Çizelge 7’de *Streptomyces* dışındaki Aktinomisetler’den 1975-1982 yılları arasında saptanan antibiyotikler, Çizelge 8’de az rastlanan Aktinomisetler’den elde edilen önemli antibiyotikler verilmiştir.

Çizelge 7. 1975-1982 yılları arasında aktinomisetlerden rapor edilen antibiyotik ve tiplerinin sayısı (Denizci, 1996).

Genus	Antibiyotik Sayısı	Rapor Edilen Antibiyotiklerin Ana Tipi
<i>Actinomadura</i>	16	4 Antrasiklin 3 Polieteter
<i>Actinoplanes</i>	43	5 Vankomisin 4 Polien 18 Peptit
<i>Actinosporangium</i>	6	6 Antrasiklin
<i>Actinosynnema</i>	7	2 Ansamisin
<i>Ampullariella</i>	2	
<i>Chainia</i>	3	
<i>Dactylosporangium</i>	3	2 Aminoglukozid
<i>Kitasatosporia</i>	1	
<i>Kitasatoa</i>	1	Quinilon Türevi
<i>Microellobosporia</i>	1	Tiazol peptit
<i>Micromonospora</i>	65	36 Aminoglukozid 5 Makrolit 8 Peptit 4 Nükleosid
<i>Microtetrastroma</i>	1	Açiltetramikası Türevi
<i>Nocardia</i>	15	5 Ansamisin
<i>Nocardiopsis</i>	2	
<i>Pseudonocardia</i>	2	2 Peptit
<i>Rhodococcus</i>	2	
<i>Saccharomonospora</i>	1	Vankomisin-tip
<i>Saccharopolyspora</i>	3	2 Aminoglukozid
<i>Streptoalloteichus</i>	2	
<i>Streptosporangium</i>	9	5 Peptit
<i>Streptoverticillum</i>	22	3 Aminoglukozid 5 Polien 4 Peptit
<i>Thermoactinomyces</i>	1	1 Alkoloid
<i>Thermomonospora</i>	1	
Tanımlanmamış	2	
Toplam	211	
Streptomyces	Yaklaşık 600	

Çizelge 8. Az rastlanan aktinomisetlerden üretilen antibiyotikler (Denizci, 1996).

Genus	Yapı	Önemli Antibiyotikler
Micromonospora	Aminoglukozid Ansa makrolitler Makrolit Peptit	Gentamisin, Sagamisin 3-Tiometilrifamisin S Rosamisin
Actinomadura	Ansa makrolit Antrasiklin Peptit	Rifamisin O Karminomisin 1,2,3
Actinoplanes	Depsipeptit Peptit Polien	
Streptosporangium	Bleo-Phleomisin Kloramfenikol	Platomisin A,B Kloramfenikol
Nocardia	Aminoglukozid Ansamakrolit Kloramfenikol B-Laktam Makrolid Nukleosid Tetrasiklin Vankomisin	Kasugamisin Rifamisin Kloramfenikol Nokardisin Proaktinomisin Formisin
Antibiyotik üreten diğer genuslar: <i>Kitasatua</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> (Sporarisin A,B), <i>Saccharomonospora</i> , <i>Micropolyspora</i> , <i>Microbiospora</i> , <i>Chainia</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinosporangium</i> , <i>Streptoalloteichus</i> (Nebramisin), <i>Streptoverticillum</i> , <i>Thermomonospora</i> , <i>Microellobospora</i> , <i>Waksmania</i>		

1.6. Antibiyotik Araştırma Yöntemleri

Mikroorganizmalardan izole edilen penisilin, streptomisin, aktinomisin gibi antibiyotiklerin rutin olarak kullanımı, mikroorganizmalar arasında antibiyotik üretenlerin taranma ve izolasyonuna olan ilgiyi büyük oranda arttırmıştır. Sonraki yıllar boyunca yapılan çalışmalarda benzer çalışmalar ile birçok antibiyotiğin belirlenmesi ve giderek rutin olarak kullanımı mümkün olabilmektedir.

Bu biyoaktif metabolitleri üreten mikroorganizmaların taranması, mikrobiyoloji, kimya, farmakoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, genetik, beslenme gibi bir çok bilim dalından uzmanların koordinasyonu ve yakın işbirliği ile gerçekleşmektedir. Bu işlemlerin akışı sırası genellikle, izolat eldesi, fermentasyon, birincil tarama, aktif

madde izolasyonu, aktif maddenin saflaştırılması, fizikokimyasal testler, saflaştırma, *in vitro* ve *in vivo* testler, yapı belirlenmesi, klinik öncesi araştırmalar ve klinik denemeler biçiminde gerçekleşmektedir (Berdy, 1989).

1.7. Araştırma İzlenesi

Küster ve Williams (1964) *Streptomyces* izolasyonu için çeşitli besiyerleri denemişler ve bakteri büyümesini baskılayan, fakat *Streptomyces* gelişimini destekleyen üç adet besiyeri bulmuşlardır. Bunlar karbon kaynağı olarak, nişasta veya gliserol, nitrojen kaynağı olarak ise kazein, arjinin veya nitrat bulundurmuşlardır (Aslan, 1999).

Streptomyces lerin spor yüzeylerinin tür ayrımında önemli bir morfolojik ayıraç olduğu belirtilmiştir. Kriss ve arkadaşları (1945) *Streptomyces* sporlarını elektron mikroskopunda ilk defa incelemişler ve daha sonra yapılan çalışmalarda, düz, siğilli, dikenli, tüylü ve rugoz olmak üzere 5 spor yüzey tipi bulunmuştur (Aslan, 1999).

Topraktaki *Actinomycetes*lerin taksonomik ayrımında hücre duvarı kompozisyonlarının kullanılabileceği belirtilmiştir.

Çizelge 9. Karakteristik Hücre Duvarı bileşenleri (Denizci,1996).

Hücre duvarı tipi	Glisin	LL-DAP	Meso-DAP	arabinoz	Galaktoz
I	+	+			
II	+		+		
III			+		
IV			+	+	+

Birkaç yüz *Streptomyces* türünün gruplandırılması için yapılan çalışmalar, genellikle birkaç subjektif kritere (morfolojik, pigmentasyon vs.) bağlı kalmıştır. Bu çeşit çalışma ile tanımlamalar yanılgıya çok açıktır. *Streptomyces*'lerde ilk numerik sınıflandırma için alınan veriler olasılıklı tanımlama anahtarı oluşturmak için kullanılmıştır (Aslan, 1999).

Toprakta sıkça rastlanan *Streptomyces* ve *Nocardia*'nın değişik formlarını birbirinden ayırmak için, 58 suşun hücre lizatları kağıt kromatografisinde incelenmiş ve *Nocardia* türlerinde peptidoglikan yapısında çoğunlukla meso-diaminopimelik asit'e, *Streptomyces* türlerinde ise LL-diaminopimelik asit'e rastlanmıştır (Aslan, 1999).

Suriye topraklarından izole edilen 55 *Actinomycetes* suşu incelenmiş ve çoğunluğu *Streptomyces antimycoticus*, *S.rubiginosohelvolus*, *S.macrosporeus* ve *S.coerulescens* olarak tespit edilmiştir (Aslan, 1999).

Streptomyces alboniger ATCC 12461 tarafından üretilen pamamisinin Gram (+) bakterilere etkili olduğu gibi *Streptomyces* farklılaşım etkeni olduğu, üretici organizmada hava miselinin oluşumunu stimule ettiği bulunmuştur (Aslan, 1999).

Streptomyces galbus tarafından üretilen yeni esktraselüler antifungal antibiyotik için gerekli besin ve kültür koşullarının araştırıldığı çalışmada gliserol ve glikoz en iyi karbon kaynağı bulunmuş ve nitrojen kaynağı olarak nitrat tercih edilmiştir. Kazein hidrolizati üretimi attırırken maya özütü inhibe etmiştir.

Brana ve arkadaşları (1985) *Streptomyces clavuligerus*'ta B-laktam antibiyotiklerinin üretimini incelemişler ve amonyum klorürün sefalosporin üretimini azalttığını, bunun sebebinin ise antibiyotiğin yapısını oluşturan siklaz ve ekspandaz enzimlerinin oluşmasını baskıladığını bulmuşlardır (Aslan, 1999).

Streptomyces peucetius için optimum besiyeri olarak 0,5 mM Mg, 1 mM fosfat, 75-125 mM glikoz, 10 mM nitrat ve mikroelementler tanımlanmıştır. Antrasiklin üretiminde glikozdan başka fruktoz, maltoz ve çözünür nişasta iyi sonuç vermiştir.

Glutamat sınırlaması koşullarında büyütülen *Streptomyces thermoviolaceus* kültürlerinde ısı, pH ve büyüme hızının sekonder metabolizma üzerine etkisi incelenmiş ve granatisin üretiminin çoğunlukla büyüme hızına ve ısıya bağlı olduğu görülmüştür. Granatisin sentezi, pH 5,5 de az ve pH 6,5-7,5 arası en üst değerlere yükselmiştir.

Streptomyces ambofaciens'de spiramisin biyosentezi, ortamda ya valin bulunması veya nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzları bulunan kültür ortamına, bazı kısa zincirli yağ asitlerinin eklenmesi ile arttırılmaktadır.

Actinomycetes 'lere ait 30 tür Mısır'da nişasta-nitrat agarında izole edilmiş ve bu organizmaların spor oluşturmaları, Gram pozitif olmaları, misellerinde L-DAP (diaminopimelik asit) bulundurmaları sebebi ile *Streptomyces* olarak tanımlanmışlardır. İzole edilen organizmaların, bitki büyüme regülatörü ve indol-3-pirüvik asit üretimi incelenmiştir (Aslan, 1999).

Streptomyces hygroscopicus'un rapamisin 35 karbon kaynağı test edilmiş, 8 tanesi üretimi destekleyememiş, 7 tanesinin ise rapamisin oluşumunu baskıladığı gözlenmiştir. En iyi karbon kaynağı kombinasyonu, % 2 fruktoz ve % 0,5 mannoz olarak saptanmıştır.

Kromogenik bir tür olan *Streptomyces galbus* SME-13 üzerinde ağır metallerin büyüme, melanoid pigmenti ve kültürde antibiyotik üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve bütün metallerin bu durumlarda baskılayıcı etkisi gözlenmiştir.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de Williams ve arkadaşları tarafından listelenen 81 *Streptomyces* türünün ribozomal AT-L30 proteinleri incelenmiş ve genellikle belli bir cluster içinde yer alan türlerin AT-L30 terminal aminoasit diziliminin aynı olduğu bulunmuştur.

Quirs ve Salas (1995) oleandomisin (OM) üreticisi olan *Streptomyces antibioticus*'ta, antibiyotiğin intrasellüler inaktivasyonunun glukoz molekülünün antibiyotiğe transferi ve ekstrasellüler reaktivasyonunda glukozun antibiyotikten ayrılması ile gerçekleştiğini bulmuşlardır (Aslan, 1999).

Su aktivitesinin, sekonder metabolitlerin üretilmesi etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, B-laktam antibiyotikleri üreten *Streptomyces clavuligenes* kullanılmış ve su stresi durumunda antibiyotik üretiminin azaldığı saptanmıştır.

Sanchez ve Brana (1996) *Streptomyces clavuligerus* tarafından sefamisin C ve klavulanik asit üretiminin eksponansiyel fazda gerçekleştiğini ve her iki biyosentetik yolun spor çimlenmesinden sonra aktif hale geldiğini fakat aktivasyon zamanının ve kinetiğinin inokulum yoğunluğundan etkilendiğini belirtmişlerdir (Aslan, 1999).

Kore toprağından izole edilen bir *Actinomycete* türü incelenmiş ve morfolojik ve kemotaksonomik verilere bakılarak *Streptomyces* genusuna ait olduğu bulunmuştur. Langham ve arkadaşları (1989) tarafından oluşturulan belirleyici matris kullanılmış, 16 S rRNA gen sekansı incelenmiş ve yeni bir tür olarak *Streptomyces hygroscopicus* NRRL-B 1865 tarafından nigericin üretimi, kültürlerle teknik metil olat (TMO) eklendiği takdirde artış göstermiştir. Metil olat (%1) ile desteklenmiş *S.hygroscopicus* kültürlerinde tween 80 (% 0,1) veya siklodestrin (% 0,1) bulunması, valin alımını ve antibiyotik üretimini arttırmıştır (Aslan, 1999).

Ara metabolitlerin üretiminin antibiyotik biyosentezine etkisi üzerine yapılan çalışmada, klavulanik asit öncülü olan C3'ün üretici *Streptomyces clavuligerus* kültür besinine eklenmesi bu antibiyotiğin üretimini arttırmıştır.

Hayes ve arkadaşları (1997) *Streptomyces coelicolor* A3 (2) tarafından metilneomisin üretiminin, alanin büyüme sınırlaması koşullarında ve/veya bir asidik pH şoku olmak üzere iki çevre faktörü ile ateşlenebileceğini bulmuşlardır (Aslan, 1999).

Steingrube ve arkadaşları (1997), klinik öneme sahip aerobik *Actinomycetes*'lere ait türlerin ve taksonların hızlı identifikasyonu için PCR-RFLP metodunu önermişlerdir.

Çalışmada 28 referans (ATCC) türü ve 198 klinik izolat denenmiş ve 188 tür bu metodla birbirinden ayrılabilmiştir.

Streptomyces rugosporus LL-42 D005 tarafından piroindomisin birikimi besiyerindeki glikoz konsantrasyonunun artmasıyla artmış ve maksimum titreye 5 gr/L glikozda ulaşılmıştır. Vitaminsiz besiyerinde büyüme ve piroindomisin üretimi gecikmiş fakat biotin eklenerek bu gecikme önlenmiştir (Aslan, 1999).

Demir ile desteklenmiş veya demirsiz ortamda, *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin aktinorhodin üretimi incelenmiş ve demirin sınırlamasının intraselüler üretime ve pigmentli antibiyotiğin dışarı atılmasını desteklediği görülmüştür (Aslan, 1999).



2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Test Mikroorganizmaları (Bakteri ve Mayalar)

Çalışmada test mikroorganizması olarak Gram pozitif ve negatif bakteriler ile mayalar kullanılmıştır. Kullanılan bakteri ve mayalar Çizelge 10'da verilmiştir.

Çizelge 10. Denemede kullanılan test mikroorganizmaları

BAKTERİ		MAYA
Gram (+)	Gram(-)	
<i>Staphylococcus aureus</i> B-767	<i>Escherichia coli</i> B-3008	<i>Candida albicans</i> Y-12983
<i>S. epidermitis</i> B – 4377	<i>Enterobacter aerogenes</i> B-3567	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacillus subtilis</i> B-558	<i>Shigella</i> sp.	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> Y-229
	<i>Salmonella typhimurium</i> B-4440	

2.1.2. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal aktivite tayininde, antibiyotik ürettiği bilinen suşlar, pozitif kontrol mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar ve ürettiği antibiyotikler Çizelge 11'de verilmiştir.

Çizelge 11. Kullanılan pozitif kontrol mikroorganizmaları

Tür adı	Standart suş numarası	Ürettiği antibiyotik
<i>Streptomyces fradiae</i>	NRRL ISP-5063	Neomycin, fradycin
<i>Streptomyces griseus</i> subspecies <i>griseus</i>	NRRL ISP-5236	Streptomycin
<i>Streptomyces rimosus</i> subspecies <i>rimosus</i>	NRRL ISP-5260	Oxytetracycline, rimocidin
<i>Streptomyces</i> ssp <i>venezuelae</i>	NRRL ISP-5230	Chloramphenicol
<i>Micromonospora</i> ssp <i>echinospora</i>	NRRL 2985	Gentamycin

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan besiyeri içerikleri distile suda çözülerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Aktinomiset izolasyonunda kullanılan besiyerleri içerisine

sterilizasyondan sonra 50 mg/lt siklohegzimid ve nistatin isimli antibiyotikler ilave edilmiştir.

Trypton Yeast Extract Agar

Trypton	5.00 g
Yeast Extract	3.00 g
Agar	15.00 g
Distile su	1.000 ml

Yeast Extract - Malt Extract Agar (ISP 2)

Yeast extract	4.00 g
Malt extract	10.00 g
Glukoz	4.00 g
Agar	20.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.3

İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)

Çözünür Nişasta	10.00 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.00 g
NaCl	1.00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00 g
CaCO ₃	2.00 g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi*	1.00 ml
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 - 7.4

* İz element çözeltisi

FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.10 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.10 g
ZnSO ₂ . 7H ₂ O	0.10 g
Distile su	100 ml

½ Tripton Yeast Extract Agar

Trypton	2.50	g
Yeast extract	1.50	g
Agar	10.00	g
Distile su	1000	ml

Nutrient Broth

Ticari olarak alınan besiyerinden 8 g / l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Malt Broth

Ticari olarak alınan besiyerinden 17 g / l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Nutrient Agar

Ticari olarak alınan besiyerinden 23 g / l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Malt Agar

Ticari olarak alınan besiyerinden 48 g / l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Tryptone-Yeast Extract Broth (ISP 1)

Trypton	5.00	g
Yeast Extract	3.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.0 - 7.2	

Oatmeal Agar (ISP 3)

Yulaf unu (Oat Meal)	20.00	g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi	1.00	ml
(ISP 4 besiyerinde verildiği şekilde hazırlanmıştır)		
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml

Ortaman hazırlanması için, 20.00 g yulaf unu, 1000 ml distile suda 20 dakika kaynatıldıktan sonra, bir tülbent ile filtre edilmiştir. Filtratın kalan hacmi, distile su ile, 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra 1 ml iz element çözeltisi ilave edilmiştir. Besiyeri, pH sı 7.2'ye ayarlandıktan sonra, 100 °C'de, buhar altında tutularak sterilize edilmiştir.

İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)

Çözünür Nişasta	10.00 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.00 g
NaCl	1.00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00 g
CaCO ₃	2.00 g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi	1.00 ml
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 - 7.4

Nişasta, az miktarda soğuk distile su ile çözüldükten sonra, hacim 1000 ml'ye tamamlanarak üzerine diğer besiyeri içerikleri ilave edilmiştir. Ortam, pH'sı ayarlandıktan sonra sterilize edilmiştir.

"Sloppy " Agar

Nutrient Broth	13.00 g
Agar	7.00 g
Distile su	1000 ml

Nitrat Redüksiyon Ortamı

Nutrient Broth	13.00 g
KNO ₃	2.00 g
Agar	6.00 g
Distile su	1000 ml

Üre Redüksiyon Ortamı

KH ₂ PO ₄	9.10	g
Na ₂ HPO ₄	9.50	g
Fenol kırmızısı	0.01	g
Yeast Extract	0.10	g
Distile su	1000	ml
Üre solüsyonu (% 15; g/ml)	133.0	ml
pH	7.2	

Modifiye Bennett's Agar

Gliserol	20.00	g
L-Alanin	2.50	g
NaCl	1.00	g
CaCO ₃	0.10	g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.10	g
Agar	15.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.0	

Nutrient Jelatin Ortamı

Nutrient Broth	13.00	g
Jelatin	40.00	g
Distile su	1000	ml

Karbon Kaynağı Kullanım Ortamı

Karbon kaynağı	1.00 ya da 10.00	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	g
KH ₂ PO ₄	2.38	g
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	5.65	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.00	g
Pridham and Gottlieb iz element çözeltisi*	1.00	ml
Agar	15.00	g

Distile su	1000 ml
pH	6.8 - 7.0

*İz element çözeltisi

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.64 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.11 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.79 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.15 g
Distile su	100 ml

Bu besiyeri, karbon kaynakları tinalizasyon ile steril edildikten sonra, otoklavda steril edilmiş diğer besiyeri bileşenlerinin ilavesi ile hazırlanmıştır.

Azot Kaynağı Kullanım Ortamı

Azot kaynağı	1.00 g
D-Glukoz	10.00 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.50 g
NaCl	0.50 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml

Bu besiyeri, azot kaynakları tinalizasyon ile steril edildikten sonra, otoklavda steril edilmiş diğer besiyeri bileşenlerinin ilavesi ile hazırlanmıştır.

Çizelge 12. Çalışmada kullanılan çözelti ve diğer kimyasal maddeler

Kimyasal Maddenin Adı	Kullanım Amacı	Firma ve Katalog No
Tween 80 (% 0.1)	İnokülat hazırlanması	Merck
HCl (6 ve 10 N)	DAP analizi	Merck
Mikrokristal selüloz	DAP analizi	Merck 2330
DL- α - ϵ -diaminopimelik asit	DAP analizi	Sigma 1377
Metanol	DAP analizi	Merck
Piridin	DAP analizi	Merck

Çizelge 12. Çalışmada kullanılan çözelti ve diğer kimyasal maddeler (Devam)

Maddenin Adı	Kullanım Amacı	Firma ve Katalog No
Asetonik ninhidrin (% 0.2)	DAP analizi	Merck
<u>A çözeltisi</u> NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O (% 2.26)	Elektron mikroskopisi	Merck
<u>B çözeltisi</u> NaOH (% 2.52)	Elektron mikroskopisi	Merck
<u>C çözeltisi</u> CaCl ₂ (0.5 M)	Elektron mikroskopisi	Merck
<u>D çözeltisi</u> Glutaraldehit (% 25)	Elektron mikroskopisi	Merck
Alkol (% 10, 25, 50, 75, 90, 96)	Elektron mikroskopisi	Tekel
Kloroform	Antimikrobiyal aktivite	Merck
<u>Sülfanilik asit çözeltisi</u> 8 g sülfanilik asit, 1000 ml 5 N asetik asitte çözülür	Nitrat redüksiyonu	Merck
<u>α-naftol çözeltisi</u> 5 g α-naftol, 100 ml % 95' lik etanolde çözülür.	Nitrat redüksiyonu	α-naftol: Merck Etanol: Tekel
Kurşun asetat	H ₂ S üretimi	Merck

2.2. Metodlar

2.2.1. Toprakten Aktinomiset İzolasyonu

Toprak örneklerinden izolasyon çalışmaları, seyreltme plaka tekniğı ve direkt serpmek tekniğı ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmalarına geçilmeden önce, toprak örneklerinin ön işlemden geçirilmesi izolasyon verimini artırması göz önünde tutularak, örnekler, % 1 (g/g) CaCO₃ ilave edilerek 25 ° C' de, 1 hafta süre ile inkübe edilmiştir (Williams and Cross, 1971; Korn-Wendish and Kutzner, 1992). Böylece, vejetatif bakteri sayısı düşürülen ve aktinomisetlerin zenginleştirilen örnekler ile, izolasyon çalışmalarına geçilmiştir. Kullanılan besiyerlerine (Yeast Extract Malt Extrakt Agar, İnorganik Tuz Nişasta Agar, ½ Tripton Yeast Extract Agar) aktinomiset grubu bakteriler açısından seçiciliğini arttırmak için, sikloheksimid ve nistatin antibiyotikleri (50 µg /ml) ilave edilmiştir.

1. Seyreltme Plaka Tekniği

Seyreltme plaka tekniği ile toprak örneklerinden aktinomiset izolasyonu, Crawford (1978)'un, Phelan et al. (1979) tarafından modifiye edilen yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre, 10 g toprak örneğinin steril, distile su kullanılarak seyreltilmesi ile hazırlanan 10^3 - 10^6 oranlarındaki seyreltme serisi, 60 °C' de 5 dakika muamele edilmiştir. Bu muamele ile içerdii spor oluşturmeyen bakterilerin sayıları düşürülen seyreltmelerden 1 er ml alınarak steril petri kaplarına aktarılmış ve üzerine 45 °C' ye kadar soğutulan besiyerleri ilave edilmiştir. İnkübasyon sırasında ve/veya sonrasında (27 ° C , 7-14 gün) elde edilen aktinomiset kolonilerinden, renk ve morfolojik özelliklerine göre temsilci örnekler seçilerek saflaştırılmış ve uygun biçimde korunmuştur.

2. Direkt Serpme Yöntemi

Williams ve Cross (1971) tarafından önerilen bu yöntem uygulanırken, toprak örnekleri por çapı 1.0, 0.5 ve 0.25 mm olan 3 elekten geçirildikten sonra, besiyeri içeren petrilere direkt olarak serpilmiştir. İnkübasyon sırasında ve/veya sonrasında (27 ° C , 7-14 gün) elde edilen aktinomiset kolonilerinden , renk ve morfolojik özelliklerine göre temsilci örnekler seçilerek saflaştırılmış ve uygun biçimde korunmuştur.

3. Toprak Örneklerinden İzole Edilen Aktinomisetlerin Korunması

Değişik izolasyon yöntemleri ile elde edilen aktinomiset izolatları, izole edildikleri lokaliteler, izolasyon yöntemleri ve lokalitedeki izolat numarasını içerecek biçimde kodlanmışlardır. Elde edilen izolatlar, Phelan et al. (1979) tarafından önerilen biçimde, ½ Tripton Yeast Extract Agar içeren tüplerde sporlanmış kültürler halinde korunmuştur. Buzdolabında, 4 °C' de korunan kültürler, 2-10 hafta aralıklarla yenilenmişlerdir (Groth et al., 1999b).

2.2.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Aktinomiset izolatları, sahip oldukları potansiyel nedeni ile çok sayıda antimikrobiyal aktivite çalışmasına konu olmuştur. Bu çalışmalarda uygulanan farklı antimikrobiyal aktivite deneme – tarama yöntemleri aktif metabolitin besiyerine

diffüzyonu ilkesine dayalıdır.Çalışmamızda elde ettiğimiz aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri, bu ilkeye bağlı olarak, “Agar Piece Method” kullanılarak belirlenmiştir.

In vitro antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında kullanılacak test mikroorganizmaları, klinik patojenleri ve standart laboratuvar kontrol suşlarını içerecek biçimde düzenlenmiştir. Antibakteriyal aktivite test organizması olarak Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri temsil edecek biçimde standart bakteri suşları seçilmiştir. Antifungal aktivite ise, çeşitli araştırmacılar tarafından önerildiği biçimde standart maya suşları ile denenmiştir. Denemede kullanılan test mikroorganizmaları (Çizelge 4) United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Peoria, Illinois – USA adresinden temin edilmiştir.

İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri, “Agar Piece Method” (Ichikawa et al., 1971) kullanılarak belirlenmiştir. Bu metotta, bakteriler için nutrient agar, mayalar için ise malt agar kullanılmış ve bu besiyerleri petrilere 20 ml aktarılmıştır. 27 °C de 7 gün inkübe edilen aktinomiset kültürleri, silindir biçiminde kesilerek, test organizması olarak kullanılan mikroorganizmaların kültürlerinin bulunduğu ortama aktararak kültürler inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminde, inhibisyon zonları ölçülerek, kültürlerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri pozitif kontroller kullanılarak karşılaştırılmıştır.

2.2.3. Aktif İzolatların Tanılanması

Sadece en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olan izolatların tanılanmasına yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışmada, kemotaksonomik, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler uygulanmıştır.

İzolatların cins seviyesinde tanılanması için, kemotaksonomik çalışmalar ile bakterilerin hücre çeperinde bulunan diaminopimelikasit tipi belirlenmiş; morfolojik çalışmalar ile makroskobik ve mikroskobik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Işık ve elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen morfolojik çalışmalardan elde edilen verilerin kemotaksonomik veriler ile birlikte değerlendirilmesi ile, izolatlar cins seviyesinde tanılanmıştır. Tür seviyesinde tanılama için ise, kültürel, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal 61 birim karakter ve 37 tip türün kullanımı ile nümerik taksonomik bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Antimikrobiyal aktiviteye sahip izolatlar, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, degradasyon, karbon ve azot gibi besinsel kaynak kullanımı gibi testlerle elde edilen veriler, X-Taxon ve NTSYS-pc programlarında gerçekleştirilecek nümerik analizler ile dendrograma dönüştürülmüştür. Böylece, aktif izolatların standart tip türler ile benzerlik ve farklılıkları incelenmiştir.

2.2.3.1. Kemotaksonomik Metotlar

İzolatların tanılanması amacıyla hücre çeperi diaminopimelik asit tipi belirlenmiştir. Bu amaçla, izolatlar, çoğaltılıp analiz için hazırlandıktan sonra, ince tabaka kromatografisi ile standarda karşı incelenmiştir.

a. Hücrelerin çoğaltılması ve analize hazırlanması

Hücre çeperi diaminopimelik asit tipi belirlenecek olan 4 izolat, Tryptone-Yeast Extract Broth (ISP 1) içeren erlenlerde, 37 °C' de, 100 rpm çalkalama hızında 1-2 hafta süre ile çoğaltılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda MSE Mistral 2000 tip santrifüjde, 1600 rpm'de santrifüjleme yolu ile toplanan hücreler, hatalı sonuca neden olabilecek partiküllerin uzaklaştırılması amacı ile, steril distile su ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatant' ın uzaklaştırılması ile elde edilen hücreler, kurutularak hidroliz aşamasında kullanılmıştır.

Hücrelerin hidrolizi amacı ile, kurutulmuş hücrelerden 50 mg kadarının aktarıldığı cam tüplere, 1 ml 6 N HCl ilave edilerek tüpün ağzı alev ile eritilerek kapatılmıştır. Hücreler, 100 °C' de, 18 saat süre hidrolizlendikten sonra, hidrolizat Schiecher & Schuell 589 filtre kağıdı ile filtre edilmiş ve iki kez 1 ml distile su ile yıkanmıştır. Bu yolla elde edilen filtrat, 65 °C' de, rotary evaporatörde, vakum altında kurutulmuş ve elde edilen kuru ekstrakt, tekrar 1 ml distile suda çözülmüştür. Bu işlemin HCl kokusu uzaklaşmaya kadar tekrarlanması ile elde edilen kuru ekstrakt, 0.3 ml distile suda çözülerek eppendorf tüplerine aktarılmış ve hidrolizat, partiküllerinin uzaklaştırılması için 5000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek analize hazır hale getirilmiştir.

b. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Örneklerin diaminopimelik asit tipi, ince tabaka kromatografisi kullanılarak, standart ile karşılaştırılma yolu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, analize hazırlanan

örneklerden 5 µl kadarı, mikrokristal sellüloz (Merck 2330) ile 0.3 mm kalınlığında 20 x 20 cm boyutlarında hazırlanan tabakalara emdirilmiştir. Referans olarak, 5 µl DL- α -diaminopimelik asit (Sigma 1377) kullanılmıştır. Çözücü olarak, metanol: su: 10 N HCl: piridin (80: 17.5: 2.5: 10; ml/ml) kullanılarak, tabakalar 3-4 saat gelişmeye bırakılmıştır. Süre sonunda kurutulan plakalar, % 0.2 lik asetonik ninhidrin ile spreylenecek 100 °C'de 5 dakika süre ile kurutulmuştur. Diaminopimelik asitler, diğer aminoasitlerden, oluşan grimsi yeşil renk ve bu rengin 24 saat sonra sarıya dönüşümü ile ayırt edilmiştir.

2.2.3.2. Kültürel ve Morfolojik Metotlar

Denemeye alınan tüm kültürler için inokulat olarak, yeterince sporlanmış stok kültürlerden % 0.1 (ml/ml) Tween 80 ile hazırlanan spor süspansiyonları kullanılmıştır.

a. Kültürel metotlar

İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) da büyütülen kültürler, izolatların renk gruplaması amacı ile kullanılmıştır. Havasal spor kitlesi ve substrat misel renklerinin belirlenmesi, çıplak göz ile gerçekleştirilmiştir.

b. Morfolojik metotlar

İzolatların spor zinciri morfolojisi, substrat miselinin fragmentasyonu, sklerot oluşumu gibi morfolojik özellikleri, 14 günlük kültürlerin Prior B 3000 ışık mikroskopunda incelenmesi ile belirlenmiştir. Spor zinciri morfolojisi, scanning elektron mikroskopisi ile desteklenmiştir. Spor zincirleri, Pridham et al. (1958)' a göre önerilen ve Shirling and Gottlieb (1968) tarafından terminolojisi belirlenen kategorilere ayrılmıştır.

Spor yüzey süslemelerinin belirlenmesi ise düz, sığilli, dikenli, tüylü ve buruşuk olmak üzere 5 kategoride incelenmiştir. Bu amaçla, İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde geliştirilen 14 günlük kültürlerden steril bir jilet yardımı ile alınan parçalar fiksatif ile 4 saat muamele edilmiştir. Kullanılan fiksatifin hazırlanması için öncelikle, 41.5 ml A ve 8.5 ml B çözeltilerinin karışımına, pH sı 7.4' e ayarlandıktan sonra, 0.1 ml C çözeltisi aktarılmıştır. Daha sonra, elde edilen bu karışımın 42 ml' sine 8 ml D çözeltisi ilave edilmiştir. Bu fiksatifte işlem süresi olan 4 saatin sonunda, fikse edilen kültürler, sırasıyla, % 10, % 25, % 50, % 75, % 90, % 96 lık alkol serisinden 10 ar dakika süre ile geçirilerek dehidre edilmiştir. Daha sonra taşıyıcılara yapıştırılan

kültürler, 1 gün desikatörde tutularak kurutulmuş ve Edwards Sputtur Coater S150B kaplayıcı yardımıyla altın ile kaplanmıştır. Bu yolla scanning elektron mikroskopisi çalışmalarına hazırlanan preparatlar, Jeol JXA-840 A scanning elektron mikroskobu kullanılarak 10-20 kV voltajda incelenmiş ve mikrografları alınmıştır.

2.2.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Metotlar

Denemeye alınan izolatlar, Williams et al. (1983 a, b) ve Langham et al. (1989) tarafından önerilen; belirli test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite, enzim aktiviteleri, bazı substratların yıkımı, antibiyotiklere direnç, büyüme özellikleri, azot ve karbon kaynaklarının kullanımı gibi özellikler açısından incelenmiştir.

İzolatların test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için, nutrient agar petrilere spot biçiminde inoküle edilmiş olan izolatlar 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda petriler, 1.5 ml kloroform üstüne ters çevrilip konarak 40 dakika bekletildikten sonra, fazla kloroform buharı steril kabinde uçurulmuştur. Test organizmaları ile inoküle edilmiş olan 5 ml “sloppy” agar büyümenin üzerine aktarılarak katılaşması sağlanmıştır. Kültürlerin 30 °C' de 24 saat inkübasyonundan sonra, izolat kolonisi çevresindeki berrak zon, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların nitrat redüksiyonu özelliği, nitrat redüksiyon ortamında 25 °C' de, 2 hafta inkübasyon sonucu belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda ortama sülfanilik asit ve α -naftol çözeltilerinin ilavesi ile oluşan kırmızı renk, nitrat redüksiyonu ve nitrit oluşumunun göstergesi olması nedeniyle, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Hidrojen sülfid üretimi, nitrat redüksiyonunun belirlendiği besiyeri içeren tüplere kurşun asetat ile spreyleneş Whatman filtre kağıtları daldırılarak, 25 °C' de 7 günlük inkübasyonla saptanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, asetat şeritlerinde siyah rengin oluşumu, serbest hale geçen kükürtün kurşun ile birleşimini işaret etmesi nedeniyle, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Üreaz aktivitesi, Üre Redüksiyon Ortamı kullanılarak, 25 °C' de, 5 günlük inkübasyon sonunda belirlenmiştir. Modifiye Bennett's Agar içeren petrilere büyütülen izolatlar, Üre Redüksiyon Ortamı içeren tüpleri inoküle etmek için kullanılmış, inkübasyon süresi sonunda, amonyak oluşumu nedeni ile koyu kırmızı-mor renge dönüşüm, pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Tirozin (% 0.5; g/ml) ve nişasta (% 1, g/ml) nın parçalanması, Modifiye Bennett's Agar' da incelenmiştir. Tirozin' in parçalanması, 25 °C' de, 7, 14 ve 21. günlerde, büyümenin çevresinde ve altında renk açılımı ile belirlenmiştir. Nişastanın parçalanması ise, 7 günlük inkübasyon süresi sonunda, nişastanın iyot solüsyonu ilavesi ile mor renge dönüşüm özelliğinden yararlanılarak belirlenmiş, renk oluşumunun gözlenmemesi, pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir.

DNA hidrolizi DNase Agar (Oxoid-CM 321)' da 25 °C' de, 7 günlük inkübasyon sonunda ortama 1 M HCl ilave edilmesi ile incelenmiştir. Ortamın bulanık olan diğer kısımlarının aksine, koloni çevresinde oluşan berrak zon, DNA hidrolizini göstermesi nedeniyle, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların belirli antibiyotiklere karşı dirençlerinin belirlenmesi, izolatların 0.1 ml spor süspansiyonu ile inoküle edilen Modifiye Bennett's Agar içeren petrilere gerçekleştirilmiştir. Denemede kullanılan antibiyotikler, 5 mm çapında Whatman (No: 1) filtre kağıtlarına emdirildikten sonra kurutularak inoküle edilen petrilere yerleştirilmiştir. İnkübasyon, 25 °C' de gerçekleştirilmiş olup, inkübasyonun 1., 2., 3. ve 7. günlerinde gerçekleştirilen incelemeler sırasında ortaya çıkan ilk değerlendirilebilir sonuç kaydedilmiştir. Disk çevresinde büyüme varlığı ile belirlenen antibiyotiklere rezistans olma durumu, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

İzolatların farklı sıcaklık, pH koşullarında ve kimyasal inhibitör varlığında büyüme özellikleri, Modifiye Bennett's Agar da incelenmiştir. İzolatların, 37 °C' de, pH: 4.3 te ve kimyasal inhibitör varlığında büyümesi, 7 ve 14 gün sonra; 4 °C' deki büyüme ise, 2 ve 4 hafta sonra belirlenmiştir. Bu koşullarda büyümenin gözlenmesi, pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir.

İzolatların kullanıp kullanmadığı belirlenecek olan karbon ve azot kaynakları, tındalizasyon ile steril edildikten sonra basal ortamlara ilave edilmiştir. İzolatların karbon kaynaklarının kullanımı, karbon kaynağı kullanım ortamında % 0.1 ya da % 1 (g/ml) oranında test edilecek karbon kaynağı ilavesi ile hazırlanan ortamda belirlenmiştir. Sonuçlar, 25 °C' de, 7, 14 ve 21 gün sonra, test maddesi içeren mediumdaki büyüme ile D-Glukoz ilaveli pozitif ve karbon kaynağı içermeyen negatif kontrollerdeki büyüme karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Azot kaynaklarının kullanımı, azot kaynağı kullanım ortamına % 0.1 (g/ml) oranında test edilecek azot kaynağı ilavesi ile hazırlanan ortamda belirlenmiştir. Test ortamı, izolat ile inoküle edilerek 25 °C' de 15 gün süre ile inkübe edilmiştir. Herhangi

bir test maddesi içermeyen besiyeri, negatif kontrol; % 0.1 (g/ml) L-Asparagin içeren besiyeri ise pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir. Sonuçlar, test maddesi içeren mediumdaki büyüme ile pozitif ve negatif kontrollerdeki büyüme karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



3. BULGULAR

3.1. Aktinomiset İzolasyonu

Bu çalışmada, Eskişehir il sınırları içindeki çeşitli lokalitelerden alınan toprak örneklerinden 2.2.1’de belirtilen, seyreltme plaka tekniği ve direk serpme tekniği ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sırasında aynı lokaliteye ait makro ve mikromorfolojik özellikleri benzer olan izolatlar, bir tek suş numarası ile kodlanmıştır. Sonuç olarak, birbirinden izolasyon lokaliteleri, makro ve mikromorfolojileri açısından farklı olan toplam 396 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar, biyoaktif metabolit üretimi açısından taranıncaya kadar, ½ Tripton Yeast Extract Agar içeren tüplerde sporlanmış kültürler halinde +4⁰C’de korunmuştur.

3. 2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

396 izolat ile gerçekleştirilen tarama çalışmasında, 93 izolat bir yada daha fazla test organizmasına karşı aktif olarak belirlenmiştir. Bu isolatların ve pozitif kontrol mikroorganizmalarının test mikroorganizmalarına karşı gösterdikleri aktivite dereceleri çizelgede verilmiştir.

Çizelge 13. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve pozitif kontrol mikroorganizmalarının denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm)

48 - 01	10	11	-	15	-	11	11	-	-	-
48 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 - 04	10	10	-	14	10	12	10	-	-	-
48 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50 - 01	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
50 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51 - 02	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-
51 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51 - 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51 - 06	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
52 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56 - 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 15	09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57 - 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 07	09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58 - 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 - 01	-	-	09	-	-	-	-	-	-	-
59 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 - 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59 - 07	17	20	16	18	20	21	21	-	-	-

80 - 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80 - 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81 - 01	-	-	-	-	-	-	-	17	10	-
81 - 03	-	-	-	-	-	-	-	11	11	12
88 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88 - 02	-	-	-	-	-	-	-	22	-	22
88 - 04	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-
88 - 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88 - 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88 - 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89 - 16	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
90 - 01	12	-	-	-	-	13	-	11	-	-
90 - 03	14	-	-	-	-	12	-	-	10	-
90 - 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90 - 08	16	-	-	-	-	16	-	11	09	-
91 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91 - 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91 - 07	-	-	-	-	-	10	-	13	-	-
93 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94 - 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95 - 01	-	13	14	12	12	-	11	-	-	-
95 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95 - 05	09	-	-	-	-	10	-	-	-	-
95 - 06	-	-	-	-	-	09	-	-	-	-
96 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96 - 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97 - 03	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
97 - 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98 - 04	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-
98 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98 - 06	-	-	-	-	-	14	-	12	-	-
98 - 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99 - 03	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
100 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101 - 01	-	09	10	-	-	10	-	-	-	-
101 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102 - 03	-	-	-	-	-	-	-	09	-	-
102 - 05	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-

126 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126 - 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127 - 01	11	-	-	-	-	11	-	13	-	-
127 - 03	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-
127 - 06	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
127 - 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127 - 08	09	-	-	-	-	09	-	-	-	-
128 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128 - 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
129 - 01	12	-	-	-	-	14	-	-	-	-
129 - 03	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
129 - 04	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-
129 - 05	09	-	09	-	-	-	-	-	-	-
129 - 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130 - 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130 - 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130 - 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131 - 01	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
131 - 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131 - 04	-	-	-	-	-	-	-	20	-	20

1. Staphylococcus aureus B-767

2. S. epidermitis B – 4377

3. Bacillus subtilis B-558
4. Escherichia coli B-3008

5. Enterobacter aerogenes B- 3567

6. Shigella sp.

7.Salmonella typhimurium B- 4440
8. Zygosaccharomyces rouxii Y - 229

9. Candida albicans Y - 12983

10. Saccharomyces cerevisiae

3.3. Aktif İzolatların Tanılanması

3.3.1. Kemotaksonomik özellikler

Denemeye alınan aktinomiset izolatlarının hücre çeperi diaminopimelik asit (DAP) analizi, bölüm 2.2.3.1’de belirtilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda izolatların diaminopimelik asit tipleri L tipi olarak belirlenmiştir.

3.3.2. Kültürel ve morfolojik özellikler

Antimikrobiyal aktiviteleri bakımından seçilen, 33.13, 59.07, 108.03 ve 118.05 numaralı aktinomiset izolatlarının, ISP 3 besiyeri üzerindeki kültürel ve morfolojik özellikleri Çizelge 14’de sunulmuştur. İzolatların ISP 3 besiyerinde belirlenen havasal misel ve substrat miseli renkleri Şekil 1,3,5 ve 7’de, spor zincir morfolojileri ise Şekil 2,4,6 ve 8’de görsel olarak sunulmuştur.

Çizelge 14. 33.13, 59.07, 108.03 ve 118.05 numaralı izolatların bazı kültürel ve morfolojik özellikleri

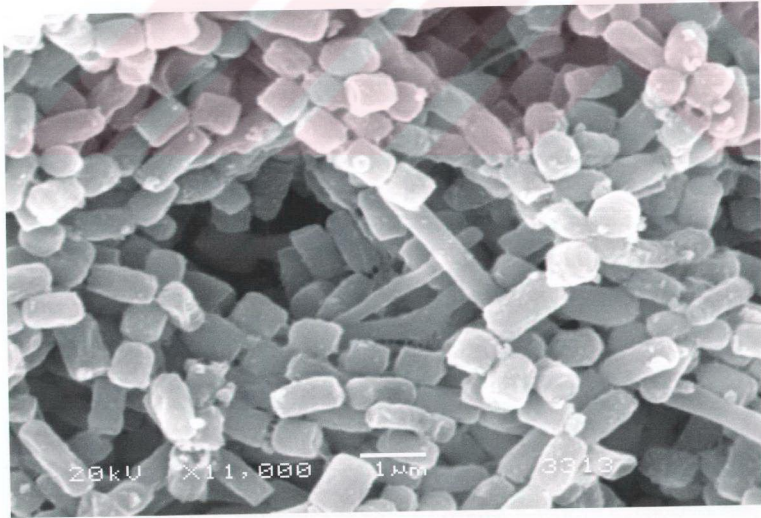
Özellik	Besiyeri	Büyüme*	Havasal Misel Rengi	Substrat Miseli Rengi	Çözünür Pigment Rengi	Spor Zinciri Şekli**
İzolat Numarası						
33.13	ISP 3	İyi	Beyaz	Sarı-Kahve	Kahve	R
59.07	ISP 3	İyi	Gri	Sarı-Kahve	Kahve	R
108.03	ISP 3	İyi	Krem	Koyu Kahve	Kahve	R
118.05	ISP 3	İyi	Krem	Sütlü Kahve	Kahve	R

* iyi ya da zayıf

**S: Spiral; R: Rectiflexibles; Ra: Rectinaculiaperti



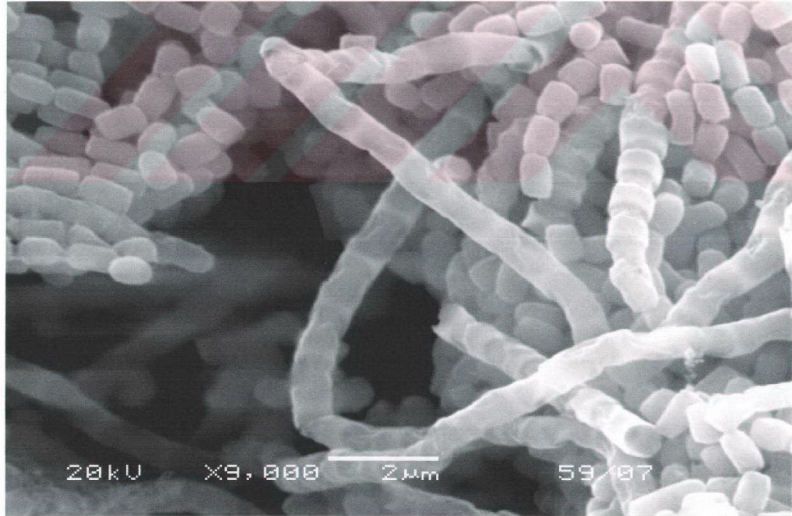
Şekil 1. 33.13 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 14 günlük büyümesi, A. Substrat Miseli, B. Havasal Spor Kitlesi, C. Kontrol



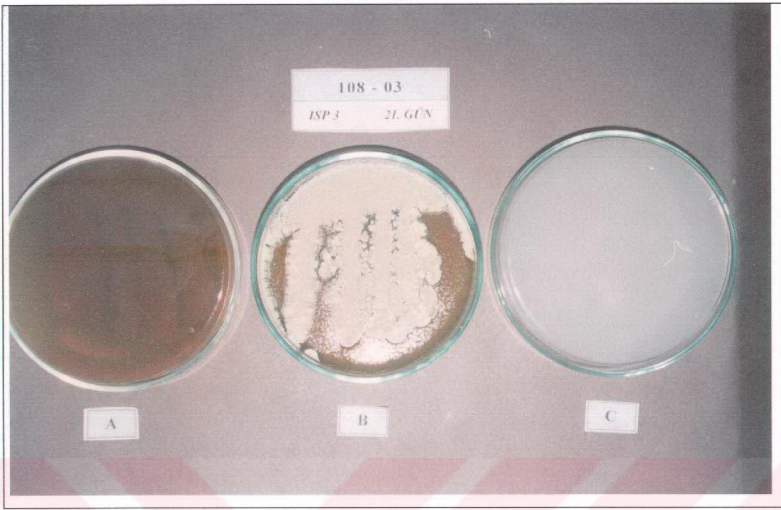
Şekil 2. 33.13 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü



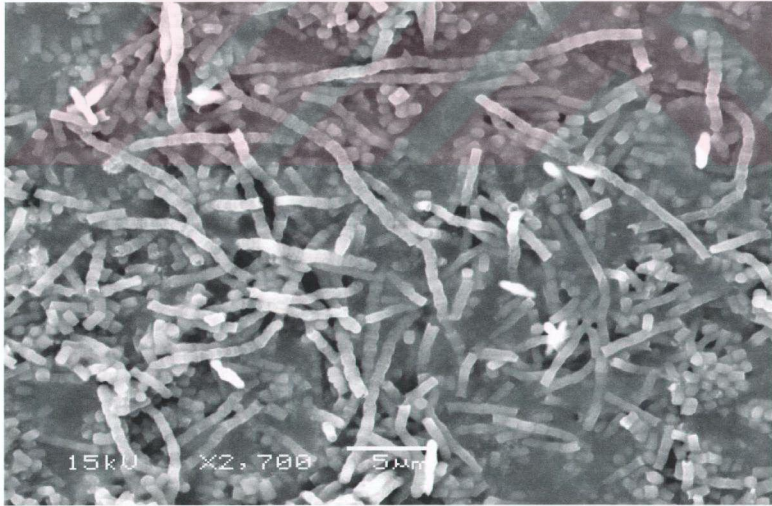
Şekil 3. 59.07 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 21 günlük büyümesi, A. Substrat Miseli, B. Havasal Spor Kitlesi, C. Kontrol



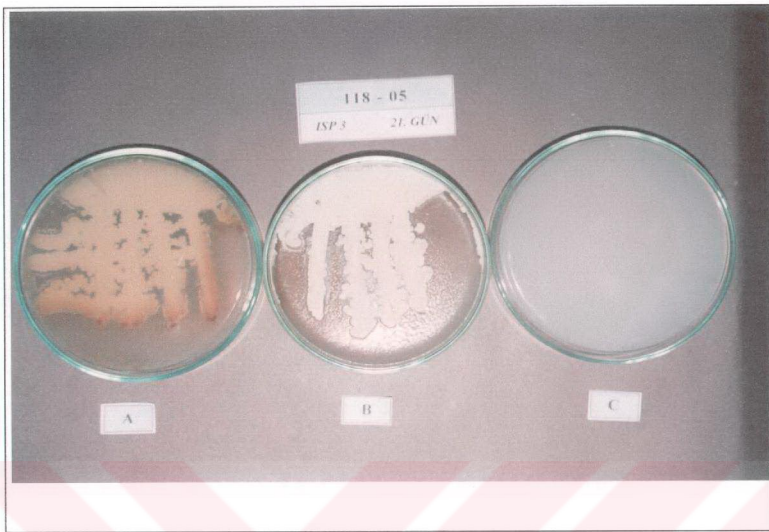
Şekil 4. 59.07 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü



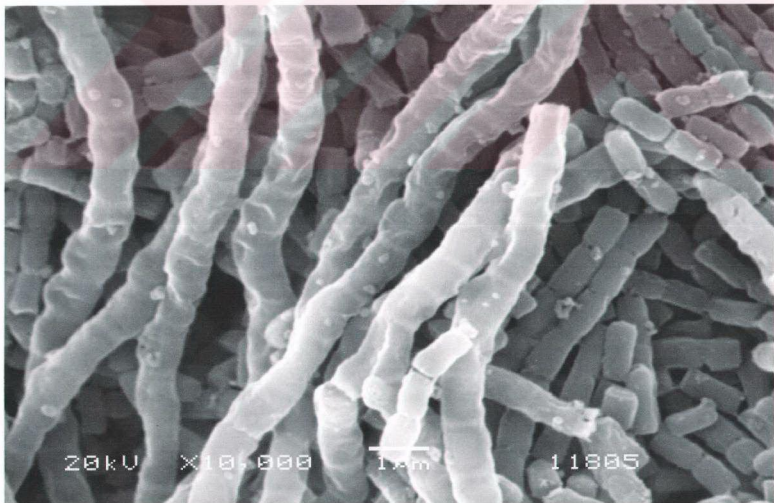
Şekil 5. 108.03 numaralı izolatın ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 21 günlük büyümesi, A. Substrat Miseli, B. Havasal Spor Kitlesi, C. Kontrol



Şekil 6. 108.03 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü



Şekil 7. 118.05 numaralı izolatin ISP 3 (Oat Meal Agar) besiyerinde 21 günlük büyümesi, A. Substrat Miseli, B. Havasal Spor Kitlesi, C. Kontrol



Şekil 8. 118.05 numaralı izolata ait sporların elektron mikroskopundaki görünüşü

Elde edilen kemotaksonomik ve morfolojik verilerin ve konu ile ilgili literatürlerin incelenmesi sonucunda izolatlarımızın tümünün *Streptomyces* cinsine ait olduklarını belirlemiş bulunmaktayız.

3.3.3. Nümerik Taksonomi

Sadece en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olan izolatların tanınmasına yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışmada, kemotaksonomik, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler uygulanmıştır.

İzolatların cins seviyesinde tanınması için, kemotaksonomik çalışmalar ile bakterilerin hücre çeperinde bulunan diaminopimelikasit tipi belirlenmiş; morfolojik çalışmalar ile makroskobik ve mikroskobik incelemeler gerçekleştirilmiştir. Işık ve elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen morfolojik çalışmalardan elde edilen verilerin kemotaksonomik veriler ile birlikte değerlendirilmesi ile, izolatlar cins seviyesinde tanınmıştır. Tür seviyesinde tanılama için ise, kültürel, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal 61 birim karakter ve 37 tip türün kullanımı ile nümerik taksonomik bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmaya ait veriler EK 1’de çizelge halinde verilmiştir.

Kullanılan tip türler Çizelge 15’de sunulmuştur. Kullanılan birim karakterler ve test sonuçları ise Ek 1’de çizelge halinde sunulmuştur.

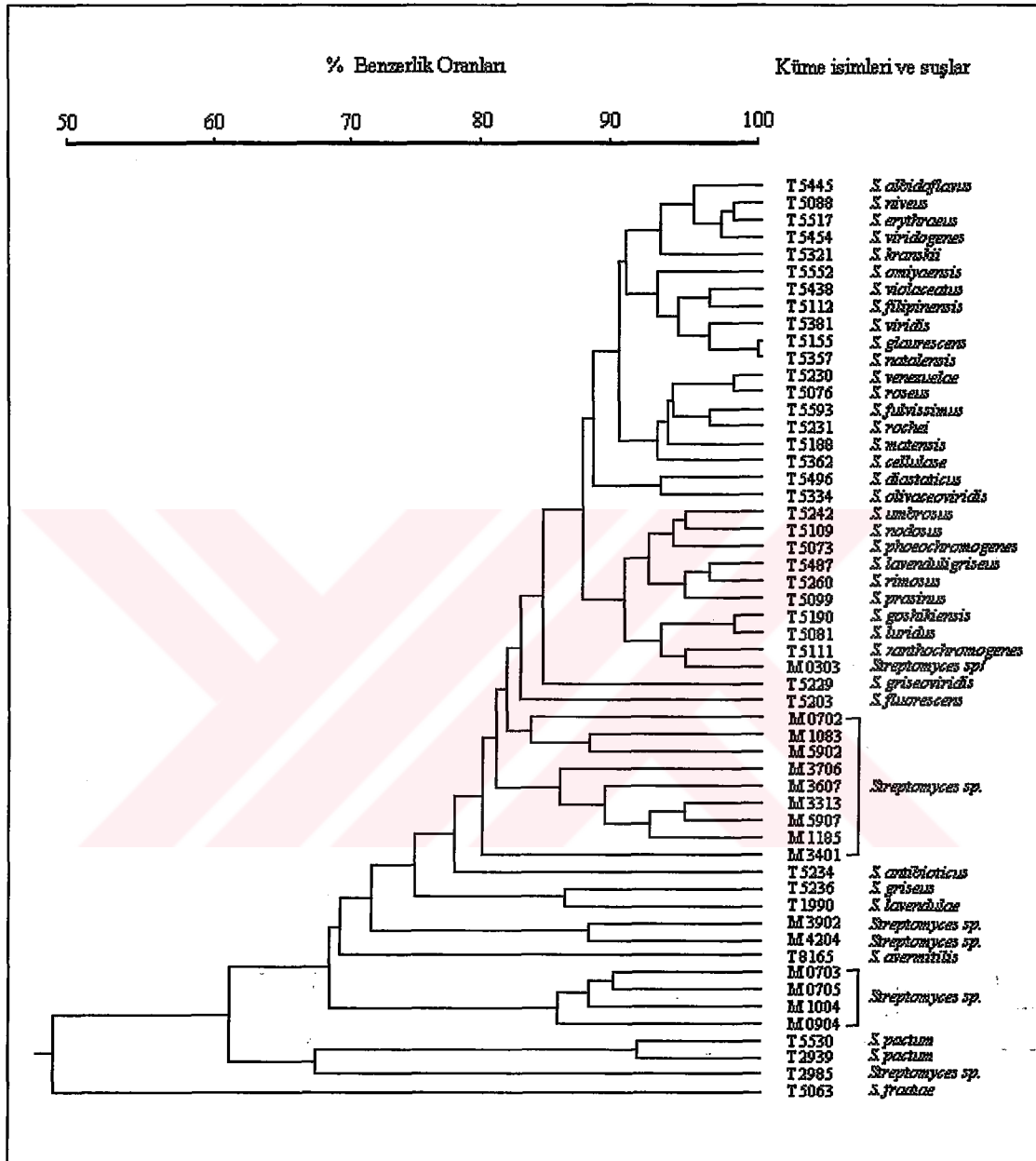
Çizelge 15. İzolatların tanınması amacı ile kullanılan tip türler

İzolat No	ISP No	Tür İsmi
1	5445	<i>Streptomyces albidoflavus</i>
2	5321	<i>S. kranskii</i>
3	5236	<i>S. griseus</i>
4	5088	<i>S. niveus</i>
5	5203	<i>S. fluorescens</i>
6	5517	<i>S. erythraeus</i>
7	5454	<i>S. viridogenes</i>
8	5552	<i>S. omiyaensis</i>

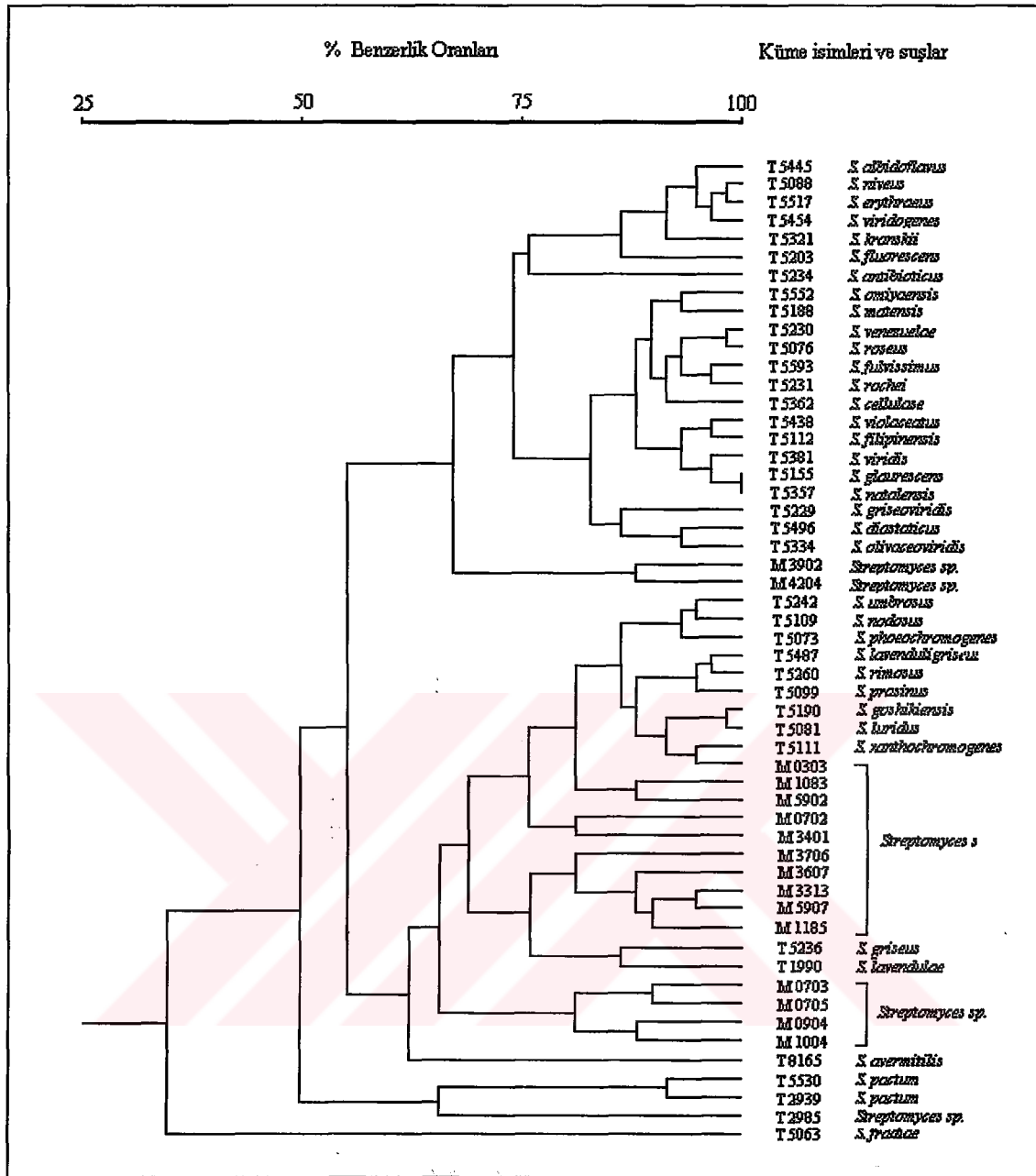
9	5230	<i>S. venezuelae</i>
10	5076	<i>S. roseus</i>
11	5593	<i>S. fulvissimus</i>
12	5231	<i>S. rochei</i>
13	5188	<i>S. matensis</i>
14	5362	<i>S. cellulase</i>
15	5229	<i>S. griseoviridis</i>
16	5496	<i>S. diastaticus</i>
17	5334	<i>S. olivaceoviridis</i>
18	5438	<i>S. violaceolatus</i>
19	5381	<i>S. viridis</i>
20	5155	<i>S. glaurescens</i>
21	5357	<i>S. natalensis</i>
22	5112	<i>S. filipinensis</i>
23	5234	<i>S. antibioticus</i>
24	5242	<i>S. umbrosus</i>
25	5487	<i>S. lavenduligriseus</i>
26	5109	<i>S. nodosus</i>
27	5099	<i>S. prasinus</i>
28	5073	<i>S. phoeochromogenes</i>
29	5260	<i>S. rimosus</i>
30	5190	<i>S. goshikiensis</i>
31	5081	<i>S. luridus</i>
32	5111	<i>S. xanthochromogenes</i>
33	5063	<i>S. fradiae</i>
34	5530	<i>S. pactum</i>
35	2939	<i>S. pactum</i>
36	8165	<i>S. avermitilis</i>
37	1990	<i>S. lavendulae</i>

Ek 1' de sunulan test sonuçları, IBM-PC uyumlu bilgisayarda X-Taxon (Chun, 1994) programına yüklenerek analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere göre elde edilen S_{SM} ile UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic averages) ve

COMPLETE algoritmeleri (Sneath. and Sokal, 1973) NTSYS-pc istatistiksel paket programı kullanılarak dendrograma dönüştürülmüştür. UPGMA ve COMPLETE algoritmeleri için elde edilen dendrogramlar sırası ile Şekil 9 ve 10'da sunulmuştur.



Şekil 9. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve UPGMA algorithm analizlerine göre, *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram



Şekil 10. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve COMPLETE algorithm analizlerine göre, *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram

Streptomyces suşlarımızın tip türlerle olan ilişkilerini belirten Şekil 7 ve 8'in incelenmesi sonucu, iki izolatımızın analiz için test edilen tip türlere benzerlik oranının yaklaşık % 60 civarında olduğu görülmektedir.. Buna karşın *Streptomyces* suşlarımızın denemeye alınan tip türlere göre birbirlerine daha yüksek benzerlik

oranına sahip olduğu.anlaşılmaktadır. Bu izolatlarımızdan 33.13 ve 59.07 aynı kümede yer almış ve % 95 in üzerinde benzerlik göstermiştir. 118.05 kodlu izolatımız da benzer olarak bu grubun hemen yanında yer almıştır. İzolatlarımız arasında diğerlerinden ayrılan izolatımız 108.03 kodlu olandır. Bu izolatımızın diğer izolatlarımıza benzerlik oranının ise % 80 civarında olduğu görölmektedir.



4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir Rus araştırmacı olan Nakhimovskaia (1937), topraktaki aktinomisetleri ilk defa incelemiş ve incelediği 80 kültürden 47 tanesinin antogonostik bir madde çıkardığını; 27 tanesinin ise aktif madde çıkardığını saptayarak bunların hepsinin Gr (+) bakteriler üzerine etkili olduğunu belirlemiştir. Linder ve Wallhauser (1955) antogonizm yönünden 2500 *Streptomyces* kültürünü izole etmişler ve bunların % 77'sinin Gr (+) bakterilere (*S. aureus*), % 40'ının Gr (-) bakteriler (*E. coli*), % 32'sinin *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*) ve % 18'inin de funguslar (*A. niger*) üzerine etkili olarak saptamışlardır. Kuzey Kanada topraklarından izole edilmiş 600 Aktinomisetin antibiyotik aktivitesi üzerine yapılan çalışmada izole edilen kültürlerin % 47'sinin *S. aureus*, % 8,2'sinin *E. coli*, % 19,5'inin *M. tuberculosis* üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Çeşitli ortamlardan izole edilen 10000 kültürün incelenmesinde, bunların %25'inin bakteriler üzerine etkili antibiyotik ürettikleri saptanmıştır. Ayrıca aktinomisetler ile ilgili yapılan çalışmalarda incelenen çeşitli genuslar arasında *Streptomyces* genusunun en yüksek sayıda antibiyotik üreticileri oldukları çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Denizci, 1996).

Ülkemizde, *Streptomyces* genusuna ait detaylı bir çalışmada (Denizci,1996), Ege ve Doğu Karadeniz bölgesinde çeşitli istasyonlardan izole edilen suşların genel antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve 4 ayrı tür Williams'ın (1983a) yöntemine göre tanımlanmıştır.

Yapılan bir diğer çalışmada ise Çukurova Üniversitesi kampüs toprağından, *Streptomyces* genusuna ait 12 *Streptomyces* türünün izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Matiden programı ve matris kullanılarak, yüksek aktiviteye sahip 4 suşun tanımlanması yapılmıştır.

Bu çalışmada, Eskişehir il sınırları içindeki çeşitli lokalitelerden alınan toprak örneklerinden 396 adet aktinomiset izolatu elde edilmiş ve test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi taranmıştır. Sonuç olarak, çalışma kapsamında antimikrobiyal aktivitesi açısından taranan 396 aktinomiset izolatından 90 kadarının (% 23) bir ya da daha fazla test mikroorganizmasına karşı aktif olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal açıdan aktif izolatlar arasında

36 tanesinin (% 40) antifungal aktiviteye, 66 tanesinin ise (% 73) antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Benzer çalışmaların aksine, izolatlarımızın Gr (-) bakterilere karşı olan aktivite oranının nispeten yüksek (% 57) olduğu görülmektedir. Gr (-) bakterilerin bir çok antibiyotiğe olan dirençlilikleri nedeni ile bu veri, oldukça önemli görülmektedir. İzolatlardan 31.17, 33.01, 33.13, 59.07, 108.03 kodlu olanların denemeye alınan Gr (+) ve (-) tüm bakterilere karşı, 118.05 kodlu olanın ise tüm test mikroorganizmalarına karşı aktivite göstermeleri nedeni ile geniş spektrumlu bir etkiye sahip oldukları söylenebilir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında pozitif kontrol olarak tıpta rutin olarak kullanılan neomisin, frasidin, streptomisin, oksitetrasiklin, rimosidin ve kloramfenikol gibi antibiyotikleri üreten tip türler kullanılmıştır. Aktiviteye sahip izolatlarımızın etki derecesinin, pozitif kontrollere oranla genellikle eşit ya da yüksek görülmesi, dikkat çekici bir bulgu olarak görülmektedir.

Aktivite ve spektrum durumları dikkate alınarak seçilen 33.13, 59.07, 108.03 ve 118.05 kodlu izolatların tanılama çalışması yapılmıştır.

Yapılan morfolojik ve kemotaksonomik çalışmalar ile, antimikrobiyal aktiviteye sahip olan bu izolatların, antibiyotik üreten en büyük cins olduğu belirtilen, *Streptomyces* genusuna ait oldukları belirlenmiştir. Denemeye alınan izolatlarımızın tümü, L-DAP içermeleri nedeniyle, hücre çeperi Tip I içerisine alınmışlardır. Birçok araştırmacı, hücre çeperi Tip I grubu içinde yer alan aktinomiset cinslerinin birbirinden ayırımında morfolojik özellikler kullanmaktadırlar (Lechevalier and Lechevalier; 1985; Lechevalier, 1989; Locci, 1989).

Çalışmamızda hücre çeperi Tip I olduğunu belirlediğimiz izolatlarımızın, cins seviyesinde tanılanması aynı ilkeye göre gerçekleştirilmiştir. İzolatlarımızın tümü, substrat ve havasal misel içermeleri, substrat miselinin fragmente olmaması, havasal miselde uzun spor zincirleri bulundurması, sporangium ve hareketli spor içermemesi gibi özellikleri nedeniyle, *Streptomyces* cinsi olarak tanılanmışlardır. İzolatlarımız, *Nocardioide*'den substrat miselinin fragmente olmaması özelliği ile; *Intrasporangium*' dan

havasal misel içirme özelliği ile; *Kineosporia*'dan havasal misel içirme ve sporangium ve hareketli spor içermemesi özellikleri ile ayırdedilmişlerdir. Gruptaki diğer cinsler olan *Sporichthia*'dan substrat miseli içermesi, *Streptoverticillium*' dan ise sporların vertisil oluşturmaması ile ayrılmışlardır.

Streptomyces genusu Waksman ve Henrici (1943) tarafından, aerobik, spor oluşturan *Actinomycetes*' ler olarak adlandırılmışlardır. Genus yüksek derecede oksidatif, substrat ve havasal miselyumunda yaygın dallanma gösteren ve hücre duvar yapısında LL-diaminapimelik asit (LL-DAP) ve glisin bulunduran aerobik gram pozitif *Actinomycetes*' ler içerir. Substrat miselyumunun fragmentasyonuna fazla rastlanmaz ve havasal miselyum, genellikle uzun spor zincirleri barındırır (>50 spor) (Aslan, 1999).

Kemotaksonomik ve morfolojik verilerin kombinasyonu ile cins seviyesinde tanılanan bu izolatların tür seviyesinde tanılanmaları için, nümerik taksonomiye dayalı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Toplam 61 birim karakterin 37 tip tür ve çeşitli *Streptomyces* izolatları üzerinde denendiği bu çalışmadan elde edilen veriler, IBM-PC uyumlu bilgisayarda X-Taxon programında analiz edilmiştir. Analizler ile elde edilen S_{SM} ile UPGMA ve COMPLETE algoritmeleri, NTSYS-pc istatistiksel paket programı kullanılarak dendrograma dönüştürülmüştür. Hem UPGMA hem de COMPLETE algoritmeleri için elde edilen dendrogramlarında, 33.13, 59.07, 108.03 ve 118.05 kodlu izolatlarımızın kullanılan tip türlerle benzerlik düzeyinin düşük olması, sonraki polifazik taksonomik çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar ışığında, çalışmanın sonraki yönelimlerinden bir diğeri, tip türlerden farklı kümelerde yer aldığı görülen aktif izolatlarımız üzerinde moleküler taksonomik çalışmalar (16 S rDNA baz dizilimi gibi) ile bu izolatların yeni tür olup olmadığının belirlenmesi olacaktır. Ayrıca, aktif olduğu belirlenen metabolitlerin yapısının aydınlatılmasına ihtiyaç vardır. Kimyasal yöntemler ile identifikasyon konusunda uzman araştırmacıların katkısı ile aktif maddelerin yapısı aydınlatılabilecektir.

Sonuç olarak, izolatlarımızın ürettikleri antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitlerin yapılarının aydınlatılması, mutajenik, karsinojenik, teratojenik etkilerinin olup olmadığının tespiti gibi testlerin gerçekleştirilmesi ve takiben üretimine yönelik kimyasal, toksikolojik, fizyolojik, biyoteknolojik ve ekonomik araştırmalara ve endüstriyel boyutta uygulama denemelerine konu olmasını umuyoruz.



5. KAYNAKÇA

Anonymus, 2000, <http://www.antibiotics.or.jp/journal/database/database-top.htm>

Arai, T., Kuroda, S. and Mikami, Y., 1976, Classification of Actinomycetes with reference to antibiotics production, In: Actinomycetes, The Boundary Microorganisms, Ed. Arai, T., Toppan Company Limited, Tokyo-Singapore. 543-651.

Aslan, B., 1999, *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Antibiyotik Üretimi Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi, Adana.

Bakteria Resistance to Antibiotics, 1995.

<http://www.bact.wish.edu/bact330/bact330homepage>

Berdy, J. 1989. The Discovery of New Bioactive Microbial Metabolites from Microorganisms. In Bioactive Metabolites from Microorganisms. Elsevier Science Publishers., Amsterdam pp:3-25.

Brock, T.D. and Madigan, M.t., 1991, Biology of Microorganisms, Prentice-Hall International Inc., 361-370.

Denizci, A.A., 1996, Ege Ve Doğu Karadeniz Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması Ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi.

Eltem, R., 1999, Mikrobiyal Fizyoloji Ders Notları, E.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D.

Goodfellow, M. and Williams, S.T. 1983, Ecology of Actinomycetes, Ann. Rev. Microbiol., 37, 189-216.

Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., Kramer, I. and Stackebrandt, E., 1999b, *Beutenbergia cavernae* gen.nov., sp. Nov., an L-lysine containing actinomycete isolated from a cave, Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 1733-1740.

Ishikawa, T., Date, M., Ishikura, T. and Ozaki, A., 1971, Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method, Folia microbiologica, 16, 218-224.

Korn-Wendish, F. and Kutzner, H.J., 1992, The family Streptomycetaceae, In: Prokaryotes (Eds. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H.), 921-995, Springer-Verlag, New York

Lancini, G. Parenti, F. and Gallo, G.G., 1995, Antibiotics: A multidisciplinary approach, Plenum press, New York and London.

Langham, C.D., Williams, S.T., Sneath, P.H., And Mortimer, A.M., 1989. New probability Matrices for Identification of *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol., 135:121-133.

Lechevalier, M.P., & Lechevalier, H.A., 1985. Biology of *Actinomycetes* not belonging to the genus *Streptomyces*. In Biology of Industrial Microorganisms 315-348. Ed. By A.L.Demain&N.A. Solomon, Butterworths.

Locci, R., 1989. *Streptomyces* and Related Genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 4: 2451-2508. Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Öner, M., 1996, Genel Mikrobiyoloji, E.Ü. Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Pridham, T.G., Hesseltine, C.W. and Bennedict, R.G., 1958. A guide for the classification of *Streptomyces*. According to the selected groups. Appl. Microbiol. 6,52-79

Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from the first study. Int. J. Syst. Bacteriology, 18, 69-189.

Ural, U. R., Ünver, E., 1988, Mikrobiyal Fizyoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Tezleri No:33, İzmir.

Waksman, S.A., 1967. *Actinomycetes*. The Ronald Press Company. New York.

Williams, S.T. and Cross, T., 1971, Actinomycetes, Methods in Microbiol. (Ed. Booth, C.), 4, 295-334.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. And Sackin, M. J. 1983a, Numerical Classification of *Streptomyces* and Related Genera, Journal of Microbiology. 129: 1743-1813.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P. H. A. Sackin M. J. And Mortimer, A.M. 1983b. A probability Matrix for Identification of some *Streptomyces*. Journal of General Microbiology. 129: 1815-1830.

Özellikler	Sıra No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	Standart tip tür no		5445	5321	5088	5203	5517	5454	5552	5230	5076	5593	5231	5188	5362	5530	2939	5229	5496	5334	5438
	(w/v)																				
Antimikrobiyal Aktivite	B. subtilis		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P. fluorescens		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E. coli		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. murinus		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
	A. niger		+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Biyokimyasal	H ₂ S Üretimi		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	Tirozin	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	DNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	Tween 80		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nişasta	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antibiyotiklere Direnç (µg/ml)	Üre		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	Gentamisin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Streptomisin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tobramisin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rifampicin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vancomisin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Linkomisin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Penicillin G	10 i.u	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-

Özellikler	Sıra No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	Standart tip tür no	(w/v)																			
Büyüme (Sıcaklık;)	4		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	37		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Büyüme (pH)	pH: 4		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	pH: 5		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pH: 9		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pH: 10		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NaCl	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	NaCl	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
	Sodyum Azid	0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Sodyum Azid	0.02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fenol	0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pot. Tellürit	0.001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Pot. Tellürit	0.01	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Kristal Violet	0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Çinko klorid	0.01	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Sıra No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Standart tip tür no		5445	5321	5088	5203	5517	5454	5552	5230	5076	5593	5231	5188	5362	5530	2939	5229	5496	5334	5438
Özellikler		(w/v)																		
Azot Büyüme (% I; w/v)	L-Arginin	1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Valin	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	L-Treonin	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-Serin	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-Fenilalanin	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Azot Büyüme (% I; w/v)	L-Histidin	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KNO ₃	%0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Safranin	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Karbon Büyüme (% w/v)	D-Fruktoz	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	D-Galaktoz	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-Ksiloz	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	Laktozmonohd	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	Maltoz	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-Mannoz	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	L-Arabinoz	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Ramnoz	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Mannitol	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
L-tartarik asit	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	

[illegible]

Özellikler	Sıra No	(w/v)	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
			5381	5155	5357	5112	5234	5242	5487	5109	5099	5073	5260	5190	5081	5111	5063	8165	5236	1990	3902	4204
Antimikrobiyal Aktivite	<i>B. subtilis</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	<i>E. coli</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	<i>S. murinus</i>		+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
	<i>A. niger</i>		+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Biyokimyasal	H ₂ S Üretimi		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	Tirozin	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	DNA		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
	Tween 80		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	Nişasta	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Antibiyotiklere Direng (µg/ml)	Üre		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	Gentamisin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Streptomisin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Tobramisin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Rifampicin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Vancomisin	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Linkomisin	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	Penicilin G	10 i.u	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Özellikler	Sıra No	5381	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
(Sıcaklık)		4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
Büyüme		10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
		37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		45	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
pH: 4			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
pH: 5			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
pH: 9			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
pH: 10			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
NaCl		10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
NaCl		13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
Sodyum Azid		0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Sodyum Azid		0.02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Fenol		0.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Pot. Tellürit		0.001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Pot. Tellürit		0.01	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Kristal Violet		0.001	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Çinko klorid		0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	

[illegible]

[illegible]