

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RİZOSFERİK AKTİVİTE İZOLATLARI
TARAFINDAN ÜRETİLEN AGROAKTİF VE
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN TARANMASI VE
ÜRETİM ORTAMI OPTİMİZASYONU**

Hüseyin EVLAT

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 03.01.2019

Bornova-İZMİR

2019

Hüseyin EVLAT tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Rizosferik Aktinomiset İzolatları Tarafından Üretilen Agroaktif ve Biyoaktif Bileşiklerin Taranması ve Üretim Ortamı Optimizasyonu**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.01.2019...tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Aslı KAÇAR

.....

Üye : Doç. Dr. Tansel YALÇIN

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / ~~Doktora Tezi~~ olarak sunduğum “**Rizosferik Aktinomiset İzolatları Tarafından Üretilen Agroaktif ve Biyoaktif Bileşiklerin Taranması ve Üretim Ortamı Optimizasyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03 / 01 / 2019



Hüseyin EVLAT

ÖZET**Rizsoferik Aktinomiset İzolatları Tarafından Üretilen Agroaktif ve Biyoaktif Bileşiklerin Taranması ve Üretim Ortamı Optimizasyonu**

EVLAT, Hüseyin

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

Ocak 2019, 171 sayfa

Bu tez çalışmasında, karasal ve sucul habitatlardaki farklı bitkilerin rizosfer bölgelerinden izole edilen aktinomisetlerden agroaktif ve biyoaktif bileşik üretimi kalitatif ve kantitatif olarak taranmış olup, en yüksek üretimlerin gerçekleştiği besiyerleri belirlenmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen 42 aktinomiset arasından, farklı aktiviteler açısından en yüksek üretimleri gerçekleştiren 6 izolat moleküler olarak tanımlanmıştır. Biyoaktif bileşik üretiminin birincil ve ikincil taramalarında, izolatların antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri 6 bakteriyel (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* ve *Salmonella typhimurium*) ve 2 fungal patojene (*Aspergillus niger* ve *Candida albicans*) karşı gösterdikleri inhibisyon zonları ile belirlenmiştir. Bu taramalar sonucunda en iyi antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip izolatlar, sırasıyla *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642) ve *Streptomyces* sp. izolat CYP30 (Accession No: MK254643) olarak belirlenmiş ve optimizasyon aşamaları için seçilmiştir. Optimizasyon aşamasında etil asetat ekstraktları ile yapılan taramalarda, *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642), en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *S. aureus*'a karşı (18 mm) Aktinomiset İzolasyon sıvı besiyerinde (AİB) göstermiştir. *Streptomyces* sp. izolat CYP30 (Accession No: MK254643) ise, en yüksek antifungal aktiviteleri, *C. albicans* (60 mm) ve *Alternaria* sp. (52 mm) izolat D21'e karşı Glikoz Soya Unu (GSUB) sıvı besiyerinde ve *A. niger*'e karşı (16 mm) ise ISP-3 (International Streptomyces Project-3) sıvı besiyerinde göstermiştir. İzolatlar, agroaktif bileşik üretimi açısından kalitatif ve kantitatif

olarak taranmıştır. IAA (indol asetik asit) üretimi taramalarında, en yüksek üretimi *Nocardiosis* sp. izolat CYP39 (Accession No: MK254645) (51,04 µg/ml) gerçekleştirmiştir. Bu izolat ile IAA üretiminin optimizasyon aşamasında farklı L-triptofan konsantrasyonları kullanılarak yapılan denemelerde en yüksek üretim (76,5 µg/ml) % 0,9 g L-triptofan içeren ortamda 13. günde gerçekleşmiştir. 42 izolattan 32'si Chrome azurol S (CAS) indikatör boyasını içeren katı besiyerindeki taramalar sonucunda siderofor üreticisi olarak belirlenmiştir. Glisin ile desteklenmiş ISP-2 katı besiyerinde gerçekleştirilen denemelerde, en iyi HCN (hidrojen siyanür) üreticisi *Nocardiosis* sp. izolat CYP15 (Accession No: MK254640) olmuştur. Fosfat çözünürlüğünün kalitatif taramalarında, en yüksek halo-zon çapını oluşturan iki izolat (*Streptomyces moderatus* izolat CYP35 (Accession No: MK254644), *Streptomyces chartreusis* izolat CYP19 (Accession No: MK254641)) kantitatif taramalara tabi tutulmuştur. Bu denemelerde ise, 9. günde elde edilen 196,4 µg/ml değeriyle en yüksek aktiviteyi *Streptomyces moderatus* izolat CYP35 (Accession No: MK254644) gerçekleştirmiştir.

Anahtar kelimeler: Rizosfer, aktinomiset, agroaktif bileşik, biyoaktif bileşik

ABSTRACT**Screening of Agroactive and Bioactive Compounds Produced by
Rhizospheric Actinomycetes Isolates and Production Medium
Optimization**

EVLAT, Hüseyin

MSc in Biology Department

Supervisor: Associate Professor Ali KOÇYİĞİT

January 2019, 171 pages

In this thesis, agroactive and bioactive compounds production from actinomycetes isolated from rhizosphere regions of different plants in terrestrial and aquatic habitats were screened qualitatively and quantitatively. Among the 42 actinomycetes isolated from the study, 6 isolates that showed the highest production for different activities were identified by using molecular methods. In the primary and secondary screening of bioactive compound production, antibacterial and antifungal activities of the isolates were determined by inhibition zones against 6 bacterial (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli* and *Salmonella typhimurium*) and 2 fungal pathogens (*Aspergillus niger* and *Candida albicans*). According to these screening results, *Streptomyces labedae* isolate CYP25 (Accession No: MK254642) and *Streptomyces* sp. isolate CYP30 (Accession No: MK254643) selected as the best isolates for antibacterial and antifungal activities respectively for optimization studies. *Streptomyces labedae* isolate CYP25 (Accession No: MK254642) showed the highest antibacterial activity in screening with ethyl acetate extracts on Actinomycetes Isolation Broth (AIB) against *S. aureus* (18 mm) at the optimization step. *Streptomyces* sp. isolate CYP30 (Accession No: MK254643) showed the highest antifungal activities against *C. albicans* (60 mm) and *Alternaria* sp. isolate D21 (52 mm) in Glucose Soy Bean Meal Broth (GSB) and showed the highest antifungal activity against *A. niger* (16 mm) in ISP-3 (International Streptomyces Project-3) Broth. The isolates were screened qualitatively and quantitatively during the screening of agroactive compound

production. In screening of IAA production, the highest production was performed by *Nocardiopsis* sp. isolate CYP39 (Accession No: MK254645) (51,04 µg/ml). In the optimization of production media of IAA performed at different concentrations of L-tryptophan, this isolate produced the highest amount of IAA (76.5 µg/ml) on the 13th day of incubation at 0.9 g % L-tryptophan-containing medium. Among the 42 rhizospheric actinomycetes isolates, 32 were identified as siderophore producers as a result of qualitative screenings made on Chrome azurol S (CAS) agar. In experiments performed on ISP-2 agar with glycine, the best HCN producer was *Nocardiopsis* sp. isolate CYP15 (Accession No: MK254640). In the qualitative screening of phosphate solubility, the two isolates (*Streptomyces moderatus* isolate CYP35 (Accession No: MK254644), *Streptomyces chartreusis* isolate CYP19 (Accession No: MK254641)) constituting the highest halo-zone diameter were selected for quantitative screenings. In this experiments, *Streptomyces moderatus* isolate CYP35 (Accession No: MK254644) has showed with the highest activity of 196.4 µg / ml on the 9th day of incubation.

Key words: Rhizosphere, actinomycetes, agroactive compounds, bioactive compounds

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimde değerli bilgi birikimini, yardımlarını, tecrübelerini ve manevi desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT'e, arazi çalışmalarında, uygulamalarım ve yazım aşamalarım bana destek olan Uzman Mikrobiyolog Sultan Kübra TOKER'e, laboratuvar çalışmalarım bana destek olan tüm 147 Lab. ekibine, hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de desteklerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi aileme ve hep yanımda olan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası:18-FEN-028. Bu nedenle Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürü bir borç biliriz.

Hüseyin EVLAT



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	6
2.1 Aktinomisetler	6
2.1.1 Aktinomisetlerin genel özellikleri	8
2.1.1.1 Substrat miselyum	9
2.1.1.2 Aerial miselyum	10
2.1.1.3 Spor zinciri	11
2.1.1.4 Spor	11
2.1.1.5 Sporangia	12
2.1.2 Aktinomisetlerin Doğal Habitatları	12
2.1.2.1 Karasal çevreler	13
2.1.2.2 Sucul çevreler	14
2.1.2.3 Kompost ve benzeri çevreler	16

2.2 Çalışma Kapsamında Tanımlanan Rizosferik Aktinomiset İzolatlarının Ait Oldukları Genusların Genel Özellikleri	17
2.2.1 Genus: <i>Streptomyces</i>	17
2.2.2 Genus: <i>Nocardiopsis</i>	19
2.3 Rizosfer	19
2.4 Bitki – Mikroorganizma Etkileşimleri ve Bitki Gelişimini Destekleyici Rizobakteriler (BGDR)	22
2.5 Bitki Gelişimi Destekleyici Rizobakterilerin Rollerini	25
2.6 Bitki Rizosferinde Aktinomisetler ve Rollerini	27
2.7 Aktinomisetler Tarafından Üretilen Biyoaktif Bileşikler	30
2.7.1 Antibakteriyel bileşikler	32
2.7.2 Antifungal bileşikler	33
2.7.3 Antiviral bileşikler	34
2.7.4 Antikanser (antitümör) bileşikler	35
2.7.5 Antiparazitik bileşikler	36
2.8 Aktinomisetler Tarafından Üretilen Agroaktif Bileşikler (Bitki Gelişimini Destekleyici Bileşikler)	37
2.8.1 Bitki gelişimini destekleyici bileşiklerin doğrudan etki mekanizmaları	38
2.8.1.1 Azot Fiksasyonu	40
2.8.1.2 Fitohormonların sentezi	41
2.8.1.3 Fosfat Çözünürlüğü Aktivitesi	46
2.8.1.4 Siderofor Üretimi	51

2.8.2 Bitki gelişimini destekleyici bileşiklerin dolaylı etki mekanizmaları	57
2.8.2.1 Antimikrobiyallerin üretimi ve litik enzimler.....	57
2.8.2.2 Siderofor Üretimi.....	59
2.8.2.3 Amonyak Üretimi	59
2.8.2.4 Hidrojen Siyanür (HCN)Üretimi	60
2.8.2.5 Habitat ve besin için rekabet.....	60
2.8.2.6 İndüklenmiş Sistemik Direnç	60
2.8.3 BGDR'nin tarım alanındaki uygulamaları.....	61
2.9 Aktinomisetlerin Diğer Uygulama Alanları	62
2.9.1 Enzimler.....	62
2.9.2 Vitaminler	63
2.9.3 Pigmentler.....	64
2.9.4 Nanopartikül sentezi	65
2.9.5 Biyoherbisitler	66
2.9.6 Biyosüpfektanlar	66
2.9.7 Probiyotikler	67
2.9.8 Biyoremidasyon	67
2.9.9 Nematod kontrolü	68
3. MATERYAL VE METOD	69
3.1 Materyal.....	69
3.1.1 Örnekleme alanları.....	69

3.1.2 Mikrobiyolojik analizler	70
3.1.2.1 Kullanılan besiyerleri	70
3.1.2.2 Kullanılan çözeltiler ve kimyasal maddeler	75
3.1.2.3 Kullanılan başlıca cihazlar	79
3.1.2.4 Kullanılan kitler ve içerikleri	79
3.2 Metod	80
3.2.1 Rizosferik toprak örneklerinin alınması ve muhafazası	80
3.2.2 Rizosferik aktinomisetlerin izolasyonu ve saflaştırılması	81
3.2.3 Biyoaktif bileşik üretiminde birincil taramalar	82
3.2.3.1 Antibakteriyel aktivite taramaları	82
3.2.3.2 Antifungal aktivite taramaları	83
3.2.4 Biyoaktif bileşik üretiminde ikincil taramalar	84
3.2.4.1 Fermentasyon sıvısı (supernatant) ile antibakteriyel ve antifungal aktivite taramaları	84
3.2.5 Biyoaktif bileşik üretimi için ortam optimizasyonu	85
3.2.6 Agroaktif bileşik üretiminin taranması	85
3.2.6.1 Fosfat çözünürlüğü aktivitesi	85
3.2.6.2 Asit ve alkali fosfataz aktivitesi	87
3.2.6.3 İndol asetik asit üretimi	88
3.2.6.4 Siderofor üretimi	90
3.2.6.5 Hidrojen siyanür üretimi	90

3.2.7 Rizosferik aktinomiset izolatlarının moleküler tanılanması	90
3.2.7.1 DNA izolasyonu	90
3.2.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	92
3.2.7.3 16S rRNA bölgesi baz dizilerinin belirlenmesi	93
3.2.7.4 Filogenetik dendogramlar ve Gen Bankası kabul numaraları	93
4. BULGULAR.....	94
4.1 Rizosferik Aktinomisetlerin İzolasyonu	94
4.2 Biyoaktif Bileşik Üretiminde Birincil Taramaların Sonuçları.....	97
4.2.1 Birincil antibakteriyel aktivite taramalarının sonuçları	97
4.2.2 Birincil antifungal aktivite taramalarının sonuçları	99
4.3 Biyoaktif Bileşik Üretiminin İkincil Taramalarının Sonuçları.....	101
4.4 Biyoaktif Bileşik Üretimi İçin Ortam Optimizasyonu.....	104
4.5 Agroaktif Bileşik Üretimi Taramalarının Sonuçları	114
4.5.1 İndol asetik asit üretimi taramalarının sonuçları	114
4.5.2 Fosfat çözünürlüğü aktivitesi taramalarının sonuçları.....	119
4.5.3 Asit ve alkali fosfataz aktivite taramalarının sonuçları	123
4.5.4 Siderofor üretimi.....	124
4.5.5 Hidrojen siyanür üretimi taramalarının sonuçları.....	125
4.6 Rizosferik Aktinomiset İzolatlarının Moleküler Tanılanması.....	127
4.6.1 DNA İzolasyonu ve PZR	127
4.6.2 16S rRNA gen bölgesi baz dizilerinin belirlenmesi	128

4.6.3 Filogenetik dendogram ve Gen Bankası kabul numaraları	129
5. TARTIŞMA	131
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	145
KAYNAKLAR DİZİNİ	147



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Aktinomiset kolonilerinin toz halindeki yapısı.	6
Şekil 2.2. Aktinomisetlerin substrat miselyum ve aerial miselyum yapıları.	9
Şekil 2.3. Aktinomisetlerin oluşturduğu substrat miselyum yapısı.	10
Şekil 2.4. Bitki kökleri ile ilişkili mikrobiyolojik ekosistem içeren kök bölgesi veya rizosfer görüntüsü.....	20
Şekil 2.5. Rizosfer ve rhizoplane	21
Şekil 2.6. Filosfer ve rizosfer	22
Şekil 2.7. Rizosfer / bakteri etkileşimleri. Bitki kökleri ve yararlı toprak bakterileri arasındaki farklı ilişki türleri	25
Şekil 2.8. Rizosfer, mercan resifleri ve sünger komünitelerindeki temsili aktinomisetler ve ürettikleri doğal ürünler.	28
Şekil 2.9. Günümüze kadar keşfedilmiş biyoaktif bileşiklerin kökenlerine göre dağılımı.	31
Şekil 2.10. Her bir siderofor sınıfının örnekleri	54
Şekil 2.11. Aktinomisetlerde pigment üretimi.....	65
Şekil 3.1. Sucul bitki rizosferinden örnekleme yapılan Çakalburnu Lagünü, İzmir.	69
Şekil 3.2. <i>Heracleum sp.</i> (Öğrek otu) bitkisi ve örnek alınımının yapıldığı rizosfer bölgesi.....	80
Şekil 3.3. Sucul bitkiden toprak örneğinin alındığı rizosfer bölgesi.	81
Şekil 3.4. Cross streak metodu	82

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.5. Agar Plug Metodu.....	83
Şekil 3.6. KH ₂ PO ₄ Standart Grafiği.	86
Şekil 3.7. pH 5,5 da p-nitrofenol standart grafiği.	88
Şekil 3.8. pH 9,0 da p-nitrofenol standart grafiği	88
Şekil 4.1. Dut bitkisi rizosferinden alınan toprak örneklerinden gerçekleştirilen aktinomiset izolasyonu sonucunda elde edilen seyreltme petrilerinin görüntüsü. .	94
Şekil 4.2. CYP25 izolatının saflaştırma aşamasındaki görüntüsü.	95
Şekil 4.3. CYP-35 izolatının 6 patojen bakteriyel test organizmasına karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etki ve aktivitesi saptanmayan CYP-21 izolatı...	97
Şekil 4.4. CYP-9 İzolatının <i>C. albicans</i> (C.a) ve <i>A. niger</i> (A.n)'e karşı gösterdiği antifungal aktivite zonları.	99
Şekil 4.5. <i>A. niger</i> (A.n) ve <i>C. albicans</i> (C.a)'a karşı antifungal aktivite göstermeyen CYP-19 izolatı.	99
Şekil 4.6. CYP-30 izolatının ISP-3 besiyerinde 7 günlük inkübasyon sonucunda supernatantı ile yapılan denemeler sonucu <i>A. niger</i> (A.n) ve <i>C. albicans</i> (C.a)'a karşı gösterdiği antifungal aktivite zonları.....	101
Şekil 4.7 CYP-25 izolatının ISP-2 besiyerinden elde edilen supernatantının bakteriyel patojen <i>S. aureus</i> 'a karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite zon çapı. .	102
Şekil 4.8 CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktları ile yapılan 6 farklı bakteriyel patojene karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite denemeleri sonucu elde edilen zon çapları.	105
Şekil 4.9. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktları ile yapılan antibakteriyel aktivite denemelerinin sonuçları.	107

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.10. Negatif (etil asetat) ve pozitif kontrolün (streptomisin) 6 farklı bakteriyel patojene karşı gösterdiği anibakteriyel aktivite sonuçları.	108
Şekil 4.11. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraları ile yapılan antifungal aktivite denemelerinin sonuçları.....	110
Şekil 4.12. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktlar ile yapılan antifungal denemelerin sonuçları.....	112
Şekil 4.13. Negatif ve pozitif kontrollerin antifungal etki sonuçları.	113
Şekil 4.14. Indol asetik asetik üretimine bağlı olarak gerçekleşen kırmızı-pembe renk oluşumunun görüldüğü bazı izolatlar.	115
Şekil 4.15. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarında üretilen IAA miktarlarının günlere göre değişimi.	118
Şekil 4.16. CYP-35 izolatının, PVKA üzerinde fosfat çözünürlüğü aktivesi sonucu oluşturduğu berrak zon.	119
Şekil 4.17. İndirgenmiş-klorostannous-molibdofosforik asit yöntemi sonucu oluşan mavi renk.....	121
Şekil 4.18. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının günlere göre oluşturdukları çözülmüş fosfat miktarları.	122
Şekil 4.19. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının fosfat çözünürlüğüne bağlı pH değişimleri.	123
Şekil 4.20. Siderofor üretimi gerçekleştiren bazı izolatların oluşturduğu turuncu renkli halo-zonlar.....	125
Şekil 4.21. CYP-15 izolatının HCN üretimi sebebiyle, filtre kağıdında meydana getirdiği renk değişimi (kırmızı-kahveregi) ve kontrol (sarı).....	126

ŞekilSayfa

Şekil 4.22. İzolatların genomik DNA'larının DNA izolasyonu sonucunda yapılan % 0,8 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	127
Şekil 4.23. İzolatların PZR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.....	128
Şekil 4.24. Mega 6,0 programı kullanılarak oluşturulan tanılanan tüm izolatları içeren filogenetik dendogram.....	130



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Rapor edilmiş bitki gelişimini destekleyici bazı aktinomisetler ve gerçekleştirdikleri bitki gelişimi destekleyici özellikler.....	38
Çizelge 3.1. PZR Koşulları.....	92
Çizelge 3.2. PZR Reaksiyon Karışımı.....	92
Çizelge 4.1. Tüm izolatların izole edildikleri bitkiler, habitatları ve bu bitkilerin lokasyonları.....	96
Çizelge 4.2. Cross Streak Metodu kullanılarak gerçekleştirilen birincil antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.....	98
Çizelge 4.3. Aktinomiset izolatlarının <i>C. albicans</i> ve <i>A. niger</i> 'e karşı gösterdikleri antifungal aktivite zon çaplarının milimetre cinsinden değerleri.	100
Çizelge 4.4. Supernatant ile yapılan antifungal aktivite tarama sonuçları.	101
Çizelge 4.5. ISP-2 ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.....	103
Çizelge 4.6. ISP-3 ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.....	103
Çizelge 4.7. GSUB ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.....	103
Çizelge 4.8. NKB ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.....	104
Çizelge 4.9. AİB ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.....	104
Çizelge 4.10. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktları ile yapılan antibakteriyel aktivite taramalarında bakteriyel test organizmalarına karşı gösterdiği zon çapları.....	106
Çizelge 4.11. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktlarının 3 farklı fungal patojene karşı gösterdiği antifungal aktivite zon çapları.	110

Çizelge 4.12. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktlarının 3 farklı fungal patojene karşı gösterdiği antifungal aktivite zon çapları.....	113
Çizelge 4.13. Ekstraksiyon işlemlerinin gerçekleştirildiği beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyon süresi sonunda CYP25 ve CYP30 izolatlarının oluşturduğu kuru ağırlık miktarları.	114
Çizelge 4.14. İzolatların 14. gün sonunda oluşturdukları IAA miktarları, kırmızı-pembe renk oluşum düzeyleri ve kuru ağırlıkları.	116
Çizelge 4.15. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarında IAA üretiminin gerçekleştiği günler ve günlere göre üretilen IAA miktarları.	117
Çizelge 4.16. CYP-39 izolatının farklı L-triptofan konsantrasyonlarındaki ortamlarda 14. Günlük inkübasyon süreleri sonundaki üremelerinin kuru ağırlık cinsinden miktarları.....	118
Çizelge 4.17. İzolatların belirli günlerdeki halo-zon çapları.	120
Çizelge 4.18. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının günlere göre oluşturduğu çözünmüş fosfat miktarları ve pH değerleri.....	123
Çizelge 4.19 Tüm izolatların siderofor oluşturma düzeyleri.	124
Çizelge 4.20. Tüm izolatların HCN üretim düzeyleri.	126
Çizelge 4.21. İzolatların yüzde benzerlik oranları ve eşleşme sonuçları	128
Çizelge 5.1. Beş farklı bitki rizosferinden izole edilen aktinomisetlerin sayıca ve yüzdesel dağılımı.	132
Çizelge 5.2. Hindistan’da yapılan bir çalışmada henüz keşfedilmemiş bölgelerdeki bitkilerin rizosfer bölgelerindeki topraklardan izole edilen aktinomiset sayısı ve yüzdesi	133

1.GİRİŞ

Bitkiler, bir dizi yararlı mikroorganizmalar tarafından geniş ölçüde kolonize edilmektedir ve çeşitli bitki-mikroorganizma etkileşimlerini kazanmaktadır. Bu etkileşimlerin bazıları bitki için faydalıdır, bazıları ise zararlıdır. Mikroorganizmalar, bitkileri besin kaynağı olarak kullanarak veya habitat, niş olarak kullanarak büyürler. Böyle bir simbiyotik etkileşimde, birçok bitkinin kökleri bitkinin topraktan besin elde etmesine yardımcı olan spesifik funguslar (mikorizal ilişki), *Rhizobia* ve aktinomisetler (özellikle *Streptomyces*) ile enfekte olmaktadır (Vurukonda et al., 2018).

Bitki büyümesini hızlandıran bakteriler, rizosferde, kök yüzeyinde veya köke bağlı olarak bulunabilen ve bitkilerin büyümesini arttırabilen, onları hastalıktan ve abiyotik streslerden koruyabilen faydalı ve heterojen bir mikroorganizmalar grubudur (De Souza et al., 2015).

Rizosfer, yeryüzündeki en karmaşık ekosistemlerden bir tanesidir ve nematodlar, funguslar, bakteriler ve eklembacaklılar dahil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından kolonize edilmiştir. Yığın toprağa (rizosfer dışındaki bitki biyokütlesi içermeyen toprak bölgesi) kıyasla rizosfer, bakteri bolluğu ve aktivitesi ile daha fazla ilişkilidir. Bitkilerin rizosferde bulunan mikrobiyal topluluk üzerinde seçici bir baskı oluşturduğu bilinmektedir ve bunun komünite düzeyinde analiz edilmesi farklı bitki türleriyle ilişkili farklı mikrobiyal toplulukları ortaya çıkarmıştır. Bu, rizosferdeki mikrobiyom topluluğunda bitki kaynaklı metabolitlerin kesin bir rolünü ortaya koymaktadır (Mhlongo et al., 2018).

Rizosfer, kolayca ayrışabilen karbon kaynaklarının çok yüksek konsantrasyonlarına sahiptir. Bu durum, bu toprak bölgesinde yığın toprağa göre 50 kata kadar daha yüksek olabilen bir mikrobiyal aktivite hızını tetiklemektedir. Böylelikle, bakteri, fungus, protozoa, alg ve nematod gibi makro ve mikroorganizmaları birbirine bağlayan rizosferde kompleks gıda ağları gelişmektedir. Rizosfer bu nedenle niceliksel olarak olduğu kadar niteliksel olarak

da son derece kompleks bir mikrobiyal komünite barındırmaktadır ve birçok yararlı mikroorganizmanın yanı sıra saprofitleri, epifitleri, endofitleri ve patojenleri içermektedir. Rizosferik mikrobiyal yük, toprağın gramı başına 10^{10} ile 10^{12} arasında değişmekte olup, genellikle yığın toprakta 10^8 'den daha azdır. (Prashar et al., 2014).

Tarımsal üretim, günümüzde kimyasal gübrelerin büyük ölçekli kullanımına bağlıdır. Bu gübreler, modern tarımın temel bileşenleri haline gelmiştir. Çünkü azot, fosfor ve potasyum gibi temel bitki besinlerini sağlamaktadırlar. Bununla birlikte, gübrelerin aşırı kullanımı beklenmedik çevresel etkilere neden olabilmektedir. Gübre tasarrufu ve daha iyi büyüme açısından maksimum fayda sağlamak için bitki büyümesini destekleyici bakteri tabanlı aşılama teknolojileri, uygun gübreleme seviyeleriyle birlikte kullanılmalıdır (De Souza et al., 2015).

Günümüzde etkili tarım uygulamaları, bitki büyümesini ve verimini arttırmak için kimyasal gübrelerin yaygın şekilde kullanılmasına dayanmaktadır. Bununla birlikte, bu kimyasal gübrelerin gıda zincirine dahil edilmesinden kaynaklanan maliyet, çevresel endişeler ve sonuçta ortaya çıkan insan sağlığı tehlikeleri başlıca sınırlayıcı faktörlerdir. Mikroorganizmalar, agroaktif öneme sahip önemli doğal bileşiklerin kaynağı olarak görülmüştür. Kimyasal gübrelerin, pestisitlerin ve ilgili tarım ilaçlarının uygulanmasında azaltma amaçlı biyogübreler şeklinde mikrobiyal konsorsiyumların kullanımı, bitkisel verimden ödün vermeden günümüzde tarım, mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanında önemli bir araştırma alanıdır (Anwar et al., 2016).

Rizosferik bakteriler ve mikorizal funguslar, bitki büyümesinin ve dolayısıyla ekin veriminin artırılmasında en yüksek etkinlik gösteren mikroorganizmalar arasındadır. Rizosferik bakteriler, rizosfer toprağında kolonize ettikleri bitkilerin besin alımını arttırabilmektedirler. Bu nedenle, verimli biyogübreler olarak kabul edilebilmektedirler. Çoğu durumda, bu tür büyümeyi destekleyen rizosfer bakterileri aşağıdaki türlere aittir: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Serratia* (Vurukonda et al., 2018).

Aynı zamanda aktinomisetler içerisindeki önemli genoslardan olan *Streptomyces* spp. de rizosferik mikrobiyal topluluklara aittir, ancak son zamanlardaki çalışmalarda bitki büyüme destekleyicileri olarak daha fazla vurgulanmıştır. Bu nedenle, mikoriza ve *Rhizobia*, doğal olarak çevre kirliliğine neden olan sentetik kimyasal gübrelere kıyasla ekonomik ve güvenli bir bitki besin kaynağı olan doğal minyatür gübre fabrikalarıdır. Bu mikroorganizmalar tarımsal üretimi ve toprak verimliliğini artırabilmektedir ve bu nedenle ek, yenilenebilir ve çevre dostu bitki besin kaynağı olarak büyük potansiyele sahiptir (Vurukonda et al., 2018).

Sentetik agrokimyasallar, aynı zamanda insan sağlığı ve ekosistem için ciddi riskler arz etmektedir ve bu, mikrobiyal biyo-fermente edici maddeler ve biyokontrol ajanları gibi bitki büyümesinin geliştirilmesi ve hastalık kontrolü için biyoinokulantların kullanımı gibi alternatif yaklaşımların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (Ningthoujam et al., 2016).

Bunların yanı sıra, tüm mikroorganizma grupları arasında aktinomisetler çeşitli biyoaktif bileşiklerin üretilmesinde en çok çalışılan gruptur. Bu açıdan ele alındığında; aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli biyoaktif bileşiklerin üretiminin taranması da çalışmanın sağlık alanında literatüre kaynak olabilecek önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

Bu alandaki bilimsel araştırmalar, yeni antimikrobiyal ajanların keşfinin çoğunlukla doğal kaynaklardan geldiğini göstermiştir. Bu yeni doğal ürünlerin, önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve tüm dünyada klinikte önemli sayıda terapötik ajan ürettiği bulunmuştur. Hatta sentetik ve yarı sentetik ilaçların sentezi için şablon görevi görmektedirler. Bu keşifler, çeşitli teknikler kullanılarak doğadan mikroorganizma ve bitkilerin taranmasını içermektedir. Yıllar geçtikçe mikroorganizmaların, özellikle ilaç endüstrileri için önemli doğal ürünlerin kaynağı oldukları kanıtlanmıştır. Yeni doğal ürünlerin keşfedilmesi için mikroorganizmaların ürettiği bileşiklerin bir ilaç potansiyeline sahip olmasının önemi, son on yıldır dikkate alınmıştır ve çeşitli incelemelerle vurgulanmıştır. Mikrobiyal doğal ürünler, yüksek terapötik indeksleri ve arzu edilen farmakolojik aktiviteleri için dikkate değerdir (Adegboye and Babalola, 2013).

Mikrobiyal hastalıklar her geçen yıl artmaktadır ve halk sağlığı için büyük bir tehdit haline gelmektedir. İnsanlara bakteri, mantar, virüs, prion, riketsiya ve diğer mikroorganizmalar tarafından bulaşan 200'den fazla hastalık vardır. Farklı mikrobiyal patojenler arasında virüslerin veya prionların hastalıkların % 37-44'üne, bakterileri veya riketsiyaların % 10-30'una, protozoanın % 10,7'sine, fungusların % 6,3'üne ve helmintlerin ise hastalıkların % 3,3'üne neden oldukları bilinmektedir. Buna ek olarak, her yıl milyonlarca ölüme de neden olmaktadır. Birçok bakteri dışkı yoluyla çevreye salınarak; sağlık ve çevre açısından istenmeyen etkilere neden olabilmektedir. İlaç ve multi ilaç dirençli patojenlerin ortaya çıkışı sağlık için en büyük tehditlerden birini oluşturmaktadır. Dolayısıyla, yeni etki mekanizmalarına sahip doğal kaynaklardan elde edilen yeni antimikrobiyal ajanlar, tıp ve ilaç sektörlerinde acil olarak gereklidir (Ganesan et al., 2017).

Patojenleri kontrol etmek ve yeni antimikrobiyal maddeleri belirlemek için birçok araştırma yapılmaktadır. Toprakta izole edilen mikroorganizmalar, geniş ölçekteki patojenlere karşı güçlü biyolojik aktivite sergileyen en önemli doğal kaynaklardır. Genel olarak mikroorganizmalar, savunma mekanizmaları için yararlı ancak büyümeleri ve gelişimleri için gerek duymadıkları biyoaktif moleküller üretmektedir. Özellikle toprak mikroorganizmaları yoğun bir şekilde bu amaçlar için kullanılmış ve kullanılmaya devam edilmektedir (Ganesan et al., 2017).

Yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan antibiyotik dirençli patojenlerin yayılmasını durdurmak ve tersine çevirmek için yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulması ve sağlık hizmeti sistemlerinin uygulanabilirliğinin yetersiz hale gelmesi riski tartışılmazdır. Mikrobiyal doğal ürünlerin taranması, yeni terapötik ajanlar geliştirilmesi ve daha az bilinen ve/veya yeni bakteri taksonlarının potansiyelinin değerlendirilmesi için önemli kimyasalların keşfedilmesine yönelik bir rota olmaya devam etmektedir. Doğal olarak bulunan antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisinin aktinomisetlerden elde edildiği tahmin edilmektedir (Sudha and Hemalatha, 2015).

Aktinomisetler, yapısal olarak çeşitlilik gösteren sekonder metabolitlerin verimli bir kaynağıdır; bunların çoğu farmasötik olarak ilgili biyolojik faaliyetlere sahiptir. Mikroorganizmalardan yaklaşık 23000 biyoaktif sekonder metabolit rapor edilmiş olup bunların 10000'den fazlası aktinomisetlerdendir ve tüm biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin % 45'ini oluşturmaktadır. Dolayısıyla, son yıllarda yeni aktinomiset türleri tanılamak, doğal ürün bazlı ilaç keşfinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (Sudha ve Hemalatha, 2015).

Özellikle ulusal platfromlarda, bu çalışma da olduğu gibi aktinomisetlerin zirai alanda bitki gelişimini destekleyici etkilerinin ve sağlık alanında önem arz edebilecek antimikrobiyal etkilerinin bir arada çalışılması yok denecek kadar azdır. Dolayısıyla bu çalışma, eş zamanlı olarak bu iki birbirinden bağımsız alanı ilgilendiren konuları barındırdığı için ayrıca önem taşımaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Aktinomisetler

Aktinomiset filumu, şu anda *Bacteria* domaini içerisinde yer alan temel soylar arasındaki en büyük taksonomik birimlerden biridir. Aktinomisetler, genomlarında yüksek guanin-sitozin (G-C) içeriğine sahip olan gram pozitif filamentöz bakteri grubudur. Hiflerin uç uzaması ve dallanması kombinasyonu ile büyürler. İsimlerini, Yunanca kelimeler olan aktin veya aktis (ışın) ve mukes (mantar)'den almaktadırlar. Geleneksel olarak, aktinomisetler funguslar ve bakteriler arasında geçiş formu olarak kabul edilir (Barka et al., 2015).

Nitekim filamentöz funguslar gibi, birçok aktinomiset de miselyum üretir ve bu miseliyal aktinomisetlerin birçoğu sporulasyon ile çoğalır (Barka et al., 2015). Aktinomiset kolonileri, toz halinde bir yapı gösterirler (Şekil 2.1) ve agar yüzeyine sıkıca yapışır, kültür ortamında funguslarınkine benzer hif ve konidya/sporangia üretirler (Anandan et al., 2016). Bununla birlikte, funguslarla karşılaştırmaları yalnızca yüzeyseldir. Tüm bakteriler gibi, aktinomiset hücreleri, bir prokaryotik nükleoid ve bir peptidoglikan hücre duvarı içerisinde düzenlenmiş bir kromozoma sahiptir. Ayrıca hücreler antibakteriyel ajanlara da duyarlıdır (Anandan et al., 2016).



Şekil 2.1. Aktinomiset kolonilerinin toz halindeki yapısı.

Aktinomisetlerin çoğu (özellikle *Streptomyces*) saprofitik, toprakta yaşayan organizmalardır ve yaşam döngülerinin büyük kısmını semi-dormant sporlar olarak, özellikle de besin açısından kısıtlı koşullar altında geçirirler. Bununla birlikte, filum çok çeşitli ekolojik çevreye adapte olmuştur: toprakların yanı sıra, tatlı, tuzlu suda ve havada da bulunurlar. Aktinomisetler toprak ya da su ortamlarında bulunabildiği gibi (örneğin *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* ve *Salinispora* sp.), bitki simbiyotları (örneğin *Frankia* spp.), bitki ya da hayvan patojenleri (örneğin *Corynebacterium*, *Mycobacterium* ya da *Nocardia* sp.) ya da hayvanların gastrointestinal kommensalleri (örn., *Bifidobacterium* spp.) olabilirler (Anandan et al., 2016).

Fizyolojik ve ekolojik olarak çoğu aktinomiset aerobiktir, fakat istisnalar mevcuttur. Heterotrofik veya kemoototrofik olabilirler, ancak çoğu kemoheterotrofik olup çeşitli kompleks polisakaritler de dahil olmak üzere çok çeşitli beslenme kaynaklarını kullanabilirler (Barka et al., 2015). Aktinomisetler, selüloz ve kitin gibi organik maddelerin ayrışmasında önemli bir role sahiptirler. Böylece organik madde devri ve karbon döngüsünde hayati bir rol oynarlar. Aynı zamanda, topraktaki besin maddelerinin varlığı ve humus oluşumunun önemli bir parçası oldukları bildirilmiştir (Anandan et al., 2016).

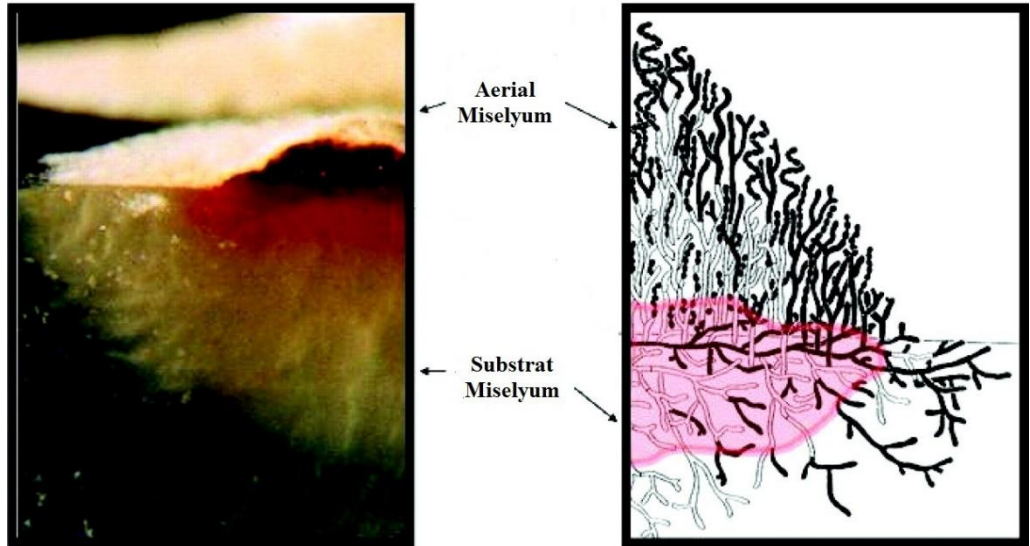
Sıcaklık, pH ve toprak nemi gibi diğer faktörler de aktinomisetlerin büyümesini etkiler. Diğer toprak bakterileri gibi, aktinomisetler de çoğunlukla mezofiliktir ve 25°C ile 30°C arasındaki sıcaklıklarda optimum gelişim gösterir. Bununla birlikte, termofilik aktinomisetler 50°C ile 60°C arasında değişen sıcaklıklarda gelişebilir. Altı ile dokuz arasında değişen pH değerlerinde optimum büyüme gösteren aktinomisetler, maksimum büyümeyi ise nötr pH'da göstermektedirler. Bununla birlikte, birkaç *Streptomyces* türü asidik topraklardan (pH 3,5) izole edilmiştir (Barka et al., 2015).

İklimin aktinomisetlerin dağılımı üzerindeki etkisine ilişkin ilk çalışma ise, Hiltner ve Strömer (1903) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, araştırmacılar bu bakterilerin, baharda toprak mikrobiyal florasının % 20'sini ve sonbaharda ise, yılın bu zamanında mevcut olan büyük miktardaki bitki artıkları dolayısıyla % 30'dan fazlasını oluşturduğunu göstermişlerdir (Barka et al., 2015).

Aktinomisetler doğada her yerde bulunmaktadır ve önemli bir metabolik çeşitlilik ile enzim üretim potansiyeli içermektedirler. Bunlar, tarımsal, endüstriyel ve farmasötik amaçlar için değerli olabilen sekonder metabolitleri ve oldukça önemli enzimleri de üretmektedirler. Aktinomisetlerin birçok türü, çok çeşitli bitkiler üzerinde simbiyontlar ya da bitkiler içerisinde endofitler olarak bulunur. Endofitik aktinomisetler artık yeni antibiyotikler ve fizyolojik aktivatörlerin potansiyel kaynağı olarak kabul edilmektedir. Toprak ve rizosferden izole edilen birçok aktinomiset fungal, kök ve tohum patojenlerinin biyokontrolü için önerilmiştir. Aktinomisetler ticari olarak önemli antibiyotik üreticileri olarak da bilinir (Kataria, 2012).

2.1.1 Aktinomisetlerin genel özellikleri

Aktinomisetler, gram pozitif bakteriler arasındaki en büyük morfolojik farklılaşmayı gösteren gruptur. Bununla birlikte, aktinomisetlerin hücre yapısı, tipik prokaryotik hücre yapısı olup funguslardan tamamen farklıdır. Bir hücrenin tüm yapısı, bakteri organizasyonuna karşılık gelir: genomik DNA bölgeleri, ribozomlar ve çeşitli inklüzyonları içeren sitoplazma, polifosfatlar, lipidler veya polisakaritler gibi depo bileşikler de içerir. Klasik aktinomisetler radyal miselyum geliştirmişlerdir. Morfoloji ve fonksiyon farklarına göre, miselya, substrat miselyum ve aerial miselyum şeklinde ikiye ayrılabilir (Şekil 2.2). Bazı aktinomisetler, spor, spor zinciri, sporangia ve sporangiospor gibi kompleks yapılar oluşturabilir. Substrat miselyumun büyüme ve kırılma biçimleri, sporun konumu, spor sayısı, sporun yüzey yapısı, sporangia şekli, sporangiosporun ve flajelin olup olmadığı aktinomisetlerin sınıflandırılmasında önemli morfolojik özelliklerdendir (Li et al., 2016).

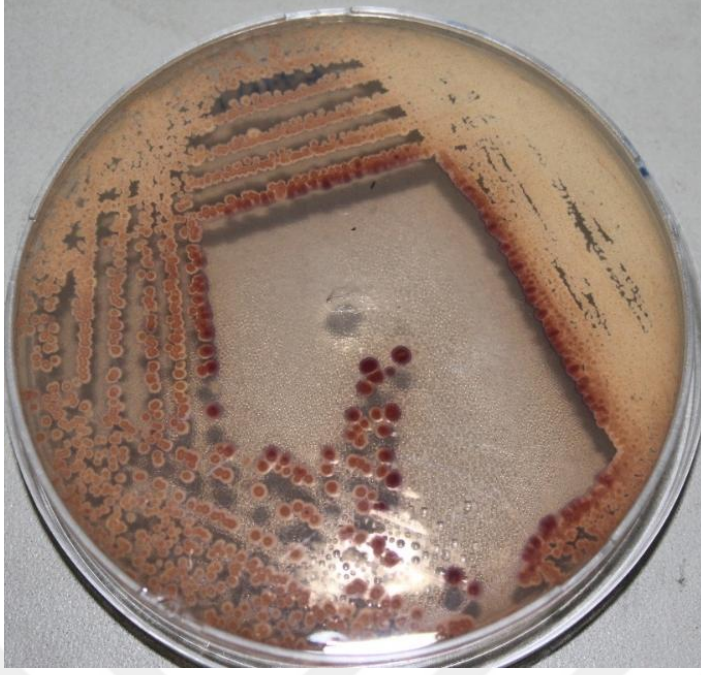


Şekil 2.2. Aktinomisetlerin substrat miselyum ve aerial miselyum yapıları (Chater, 2006).

2.1.1.1 Substrat miselyum

Vejetatif miselyum veya birincil miselyum olarak da bilinen, substrat miselyum, ortamın içerisine veya yüzeyine kadar büyür (Şekil 2.3). Substrat miselyumun temel işlevi, aktinomisetlerin büyümesi için besin maddelerinin emilmesi ile ilgilidir. Mikroskop altında, ince, şeffaf, faz-karanlıktır ve aerial hiflere göre daha fazla dallanmıştır (Li et al., 2016).

Substrat miselyum, beyaz, sarı, turuncu, kırmızı, yeşil, mavi, mor, kahverengi, siyah ve diğer renklerde olabilmektedir. Ve burada bazı hifler suda çözünen veya yağda çözünen pigmentler üretebilir. Suda çözünen pigmentler, ortama sızabilir ve böylelikle ortamı pigmente karşılık gelen renge dönüştürebilir. Suda çözünmeyen (veya yağda çözünen) pigment ise koloni rengine karşılık gelen renktir. Substrat miselyumun, rengi ve çözünebilir pigmentlerin bulunup bulunmaması, yeni türlerin belirlenmesinde önemli referanslar sağlamaktadır (Li et al., 2016).



Şekil 2.3. Aktinomisetlerin oluşturduğu substrat miselyum yapısı.

2.1.1.2 Aerial miselyum

Aerial miselyum, substrat miselyumun belli bir aşamaya gelmesi ve havaya çıkması ile oluşmaktadır. Bazen aerial hifleri substrat miselyumdan ayırt etmek zordur. Işık mikroskopuyla kuru bir sistemde, kaplama kağıdına bir izlenim hazırlaması ile ayırt etmek kolaydır. Substrat hifleri ince, şeffaf ve faz-karanlıktır; aerial hifler ise kaba, refraktif ve faz-parlaktır. Aerial miselyumun hifleri, *Pseudonocardia* ve *Amycolata* cinsleri haricinde bir fibröz kılıfla karakterizedir (Li et al., 2016).

Her tür aktinomiset tarafından oluşturan aerial hifler, tür özelliklerine, beslenme koşullarına veya çevresel faktörlere bağlıdır. Bazı genusların aerial miselyumları, spor üretilmesini sağlayan üretici hifler olan üst form spor zincirinde belli bir aşamaya kadar gelişir (Li et al., 2016).

2.1.1.3 Spor zinciri

Aktinomisetler, aerial hiflerinden farklılaşan, spor taşıyan miselyum olarak adlandırılan üreme hiflerini oluşturabilirler. Nitekim, bu tür spor oluşumu çoğu aktinomiset genusunda görülür. Lechevalier ve ark., (1989)'ın yaptığı gözlemlere göre, spor zincirleri, uzunlukları ve spor sayılarına göre; iki spora sahip di- veya bisporöz, birkaç spora sahip oligosporöz ve birçok spora sahip polisporöz şeklinde morfolojik olarak ayrılabilirler. Aktinomisetlerin spor zinciri uzunluğu, şekli, konumu ve rengi sınıflandırmanın önemli parametreleridir. Monosporöz, tek spor üretim tipidir. Bu form, *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora* ve *Thermoactinomyces* gibi birkaç iyi bilinen genus tarafından temsil edilen çeşitli gruplarda bulunur. Disporöz zincir, uzunlamasına bir spor çifti içermektedir. *Microbispora* genusu bu tür sporülasyonu temsil eder. Oligosporöz aktinomisetler kısa spor zincirleri geliştirir. *Nocardia brevicatena* 2 ile 7 sporun kısa zincirlerini oluşturur ve spor zincirleri dallanmış olabilir. *Streptomyces* genusu, sıklıkla 50'den fazla sporu olan uzun zincirler oluşturan klasik polisporöz zincirlere sahiptir. *Streptomyces* ve diğer polisporöz aktinomiset sporlarına genellikle artrosporlar denir (Li et al., 2016).

2.1.1.4 Spor

Hiflerin bölünmesi ve spor oluşması, bir çapraz duvarın oluşturulmasıyla başlar. Aktinomiset sporülasyon sürecinde genel olarak üç yöntem vardır; (i) substrat hifleri parçalandığında, bölünmüş septum olarak bilinen septum oluşabilir ve *Micromonospora* genusunda olduğu gibi spor oluşturabilir. (ii) Sporlar, önceden var olan hifal elementlerin ince bir fibröz kılıfla bölünmesi ve parçalanması ile oluşur. Spor duvarı, kısmen ana hifin duvar katmanlarından oluşur; bu, holotallik gelişme olarak adlandırılır ve *Streptomyces* genusu gibi birçok aktinomiset için tipik olarak görülür. (iii) Globoz sporlar, *Thermoactinomyces*'in bazı suşlarındaki gibi aerial ve substrat miselyumda oluşur ve spor duvarı oluşturur. Spor oluşumunda bir takım farklı genlerin bulunduğu bilinmektedir ve farklı kültürasyon koşullarının spor oluşumu üzerinde etkili olabileceği bilinmektedir (Li et al., 2016).

Tek tek veya kısa zincirler halinde üretilen sporlar genellikle hiflerden daha kalın; ancak uzun zincirlerde geliştirilmiş olanlar hifler ile aynı çapa sahiptir. Sporlar yaklaşık 1 ila 2 µm kalınlığındadır, şekil ve yüzey özellikleri açısından farklılık göstermektedirler. Ortak spor morfolojisi globoz, ovoid, koliform, çubuk şeklinde, allantoid ve reniform olabilmektedir. Hareketli sporlar, aktif hareketleri sağlayan flajeller ile kaplıdır (Li et al., 2016).

2.1.1.5 Sporangia

Filogenetik açıdan farklı gruplardan birçok genus sporangia tarafından çevrelenmiş sporlar oluştururlar. Sporangium, çuvala benzer bir yapıdadır ve burada sporlar serbest kalana kadar birlikte geliştirilir ve tutulur, genellikle boş bir sporangial zarf bırakır. Sporangia boyutu ve şekli bakımından oldukça değişkenlik göstermektedir. Çapı 2 ile 50 µm arasında değişmekle birlikte, en yaygın boyut 10 µm'dir. Silindirik, klavatl, boru şekilli, şişe şekilli, kampanülatlı, sayısal, düzensiz, loblu, umbelliform, piriform veya globoz olabilirler. Sporangia, substrat veya aerial hiflerden kaynaklanır. Sporangia oluşumu büyük oranda iki biçimde gerçekleşir, bazı genoslarda sporangia, spor filament sarımıyla oluşurken bazı genoslarda sporangia sporangioforlarla genişletilir (Li et al., 2016).

2.1.2 Aktinomisetlerin Doğal Habitatları

Aktinomisetler, toprak, tatlı su ve deniz ekosistemleri gibi çok çeşitli habitatlarda bulunabilen prokaryotlardır. Çeşitli çalışmalar bu filumun ekolojisine odaklanmış olsa da veriler, bağırsak, bitki, alkalın tuzlu toprak, derin deniz sedimentleri, kaplıcalar vb. özel ve ekstrem çevrelere özgü aktinomisetlerin çeşitliliği, bolluğu ve ekolojisi konusunda hala yetersizdir (Qin et al., 2016).

2.1.2.1 Karasal çevreler

Aktinomisetler, çoğu toprakta mikrobiyal popülasyonun önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Aktinomisetlerin yaygın olarak gram başına 1 milyondan fazla sayısının topraktan elde edildiği tahmin edilmektedir (Anandan et al., 2016).

Çeşitli raporlara göre, *Streptomyces*'in her çalışmada en bol izole edilen genus olduğu tespit edilmiştir. Karasal aktinomisetlerin çeşitli antimikrobiyal potansiyelleri vardır. Oskay ve ark. (2005), yüksek antibakteriyel etkinliğe ve yeni antibiyotik üretme kabiliyetine sahip olan aktinomisetleri izole etmişlerdir. Gelgit etkisi nedeniyle ekilebilir arazilerden 1000 ile 10000 kat daha küçük olan anoksik mangrov rizosfer bölgelerinde, *Streptomyces*, *Micromonospora* ve *Nocardioform* gibi aktinobakteriyel türlerin bol olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, mangrov topraklarından izole edilen *Nocardia*, gastrik adenokarsinoma gibi insan hücre hatlarını güçlü bir şekilde inhibe eden yeni sitotoksik metabolitler ürettiği görülmüştür (Anandan et al., 2016).

Kumlu toprak (Cario, Mısır, Falmouth, MA), siyah alkali toprak (Karnataka, Hindistan), kumlu verimli toprak (Keffi Metropolis, Nijerya, Presque Isle, PA), alkalın çöl toprakları (Wadi El Natrun, Mısır, Wadi Araba, Mısır) ve subtropikal çöl toprakları (Thar, Rajasthan) gibi çeşitli yerlerde bulunan aktinomisetlerin dağılımını gösteren çeşitli raporlar bulunmaktadır. Burada *Streptomyces* sp. baskın olmakla birlikte, bunları *Nocardia*, *Nocardiopsis* ve diğer aktinomisetler takip etmektedir. Nithya ve ark.'nın (2015) çalışmasında, morfolojik olarak ayırt edilen 134 kültüre edilebilir aktinomiset, 10 değişik çöl toprak örneğinden izole edilmiş ve izolatların bakteriyel patojenlere karşı değişen antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde, aktinobakteriler rizosfer mikrobiyal topluluğunda, rekalsitrant bitki organik maddesinin döngüsü içerisinde önemli bir rol oynamaktadır ve bu nedenle rizosfer bölgesi, bu mikroorganizmaların izolasyonu için en iyi habitatlardan biri olarak kabul edilmektedir (Anandan et al., 2016).

2.1.2.2 Sucul çevreler

Aktinobakteriler, zaman zaman çevredeki karasal habitatlardan çeşitli çevresel koşullarla taşınarak su habitatlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Aktinobakterilerin sayı ve çeşitlerinin, suda ve sedimentlerde aktinobakteriyal yayılımların karasal bileşeninin iyi göstergeleri olduğu bilinen *Thermoactinomyces* ve *Rhodococcus coprophilus* gibi organizmalara ilişkin bilgiler ışığında yorumlanması önemlidir (Anandan et al., 2016).

-Tatlı Su

Cross (1981), aktinomisetlerin tatlı su bölgelerinden kolaylıkla izole edilebileceğini kanıtlamıştır. Tatlı suda yaşayan başlıca aktinomiset genusları *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* ve endospor oluşturan *Thermoactinomyces*'tir. *Actinoplanes* genellikle topraklarda, nehirlerde ve göllerde bulunur ve bu organizmaların spor vezikülleri, uzun süre kurumaya dayanma yeteneğine sahiptir, ancak rehidre edildiğinde yayılmak için hareketli sporlarını serbest bırakırlar. *Micromonospora*, en çok bilinen tatlı su aktinomiset cinsi olarak kabul edilir ve selüloz, kitin ve lignin içeren habitatlarda çok fazla yer aldığı görülür. Akarsular, nehirler ve nehir çökeltlerinde *Micromonospora*'nın varlığını doğrulayan birçok rapor, bunları su mikroflorasının ayrılmaz bir parçası olarak göstermektedir. *Streptomyces* sporları sürekli olarak tatlısu ve deniz yaşam alanlarına taşınmasına rağmen, bu gibi ortamlarda aktif olabileceklerine dair çok az kanıt vardır. Sucul ekosistemlerde *Streptomyces*'lerin varlığı iddia edilmiştir, ancak Al-Diwany ve ark. (1978), *Streptomyces*, fekal Streptokoklar ve *Rhodococcus* sayıları arasında yüksek bir korelasyon bulmuşlardır. Tatlı suyun diğer üyeleri arasında, *Actinomadura madurae*, *Mycobacterium kansasii* ve *Arthrobacter*, *Corynebacterium* ve *Nocardia* türleri bulunur. Su/ hava ara yüzeyinde hidrofobik sporların ve hiflerin konsantrasyonu, nehir suyundaki köpükte *Streptomyces*, *Micromonosporae* ve *Rhodococci* sayısını artırabilir. Kanıtlar, aktinomisetlerin tatlı su ekosisteminde, kendilerini böyle bir ortamda yaşamak için özel olarak adapte edilmek yerine uygun substratlar ve büyüme koşulları varlığında aktifleştirebileceğini açıkça göstermektedir (Anandan et al., 2016).

-Tuzlu Su

Denizel çevreler, yüksek hidrostatik basınç, yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük organik madde konsantrasyonu gibi karasal alanların sahip olmadığı spesifik özellikleri olan bir yaşam alanını oluşturmaktadır. Bu nedenle hem deniz hem de karasal çevrede yaşayan mikroorganizmaların tamamen farklı olması beklenmektedir. Bu, deniz suyu ve deniz sedimentlerindeki mikroorganizmaların çeşitliliği nedeniyle, deniz canlılarının önemli bir numune alma noktası olacağı görüşünü ortaya çıkarmaktadır. Karasal ortamdaki aktinobakteriyal çeşitliliği karşılaştırırken, en büyük biyolojik çeşitliliğin okyanuslarda olduğu görülmektedir. Denizel çevreler, yeni aktinomiset çeşitliliğinin ve dolayısıyla yeni metabolitlerin keşfedilmemiş bir kaynağını oluşturur. Ekstrem koşullarda bulunan denizel aktinomisetler, karasal olanlara kıyasla farklı biyoaktif bileşikler üretmektedirler (Anandan et al., 2016).

Denizel aktinomisetler, okyanus ortasındaki sırtlarda, hidrotermal bacaların yakınında, 8-100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, derin deniz tabanında 0 – 8°C'nin biraz altındaki sıcaklıklardaki aşırı yüksek basınç ve anaerobik koşullardan yüksek asidik koşullara uyum sağlamak zorunda kalmıştır. Özellikleri belirlenen ilk denizel aktinomiset türü olan *Rhodococcus marinonascence* denizel aktinomisetlerin varlığını desteklemektedir. *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Verrucosipora* genusu üyeleri ve *Williamsia maris*, doğal denizel aktinomisetler olarak belirlenmiştir (Anandan et al., 2016).

Denizel aktinomisetlerin okyanuslardaki varlığı ve farklı denizel çevre ve habitatlardaki dağılımı çeşitli yeni araştırmalar ile doğrulanmaktadır. Inagaki ve ark. (2003), Hokkaido'da 1225 metre derinlikten toplanan derin deniz taban sedimentlerinde *Dietzia maris*, *Rhodococcus erythropolis* ve *Kocuria erythromyxa* gibi çeşitli denizel aktinomisetleri izole etmiştir. Grossart ve ark. (2004), deniz organik birikintilerini kolonize eden bakterilerin yaklaşık % 10'unu aktinomisetlerin oluşturduğunu ve bunların organik maddenin bozunmasını ve mineralizasyonunu etkileyen antagonistik aktivitelerinin, varlıklarını korumak açısından oldukça önemli olabileceğini göstermiştir. Jensen ve ark. (2005), Guam

adasından toplanan denizel tortullardan beş yeni aktinomiset filotipi izole etmiştir. Benzer şekilde, dünyanın en derin noktası olan Mariana Çukuru'ndan (10,923 metre) toplanan örneklerden aktinomisetler izole edilmiştir (Anandan et al., 2016).

Derin deniz tabanı, deniz omurgasızları ve deniz buzulları, deniz kıyısı toprakları ve derin deniz sedimentleri gibi deniz ortamlarından izole edilen, yukarıda adı geçen tüm aktinomisetler çeşitli ekosistemleri temsil eder (Anandan et al., 2016).

Günümüzde denizel aktinomisetler, konu alan sınırlı tarama çalışmalarıyla bile, denizel aktinomisetlerden yeni sekonder metabolitlerin keşfi, karasal eşdeğerlerini aşmıştır; ki bu durum, denizel aktinomisetlerden birçok yeni kimyasal maddelerin izole edilmesiyle açıkça görülmektedir (Anandan et al., 2016).

2.1.2.3 Kompost ve benzeri çevreler

Kompost materyalleri geleneksel olarak tarım ve bahçe topraklarına, toprak verimliliği ve ekin gelişimini iyileştirme araçları olarak ve özellikle de toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini artırma konusunda etkili bir şekilde uygulanmaktadır. Bu organik değişiklikler, aynı zamanda toprağın biyolojik özelliklerinin iyileştirilmesine katkıda bulunmakta ve genellikle toprak kaynaklı hastalıkların etkili bir şekilde kontrol edilmesini sağlamaktadır (Cuesta et al., 2012).

Kompostun toprak kaynaklı bitki patojenlerini baskılama yeteneği, fungusidlerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için bir strateji olarak ele alındığında önemli bir konudur. Rekabet, hiperparazitizm, hastalık direnç genlerinin aktivasyonu veya faydalı mikroorganizmalar tarafından antibiyotik üretimi gibi çeşitli mekanizmalar, kompost ile bitki hastalıklarının kontrolünü açıklamak için önerilmiştir. Bu bağlamda, aktinomisetler biyokontrol ajanları (özellikle *Streptomyces* türleri) olarak büyük ilgi görmüştür (Cuesta et al., 2012).

Birçok mezofilik aktinomiset, bozulmanın başlangıç evrelerinde kompostlarda aktiftir. Bununla birlikte, dekompozisyon sırasında kendiliğinden ısıtma kapasitesi, zorunlu veya fakültatif termofilik aktinomisetler için ideal koşullar sağlamaktadır. *Thermoactinomyces* ve *Saccharomonospora* gibi bazı genuslar kesinlikle termofiliktir. Termofilik aktinomisetler hayvan gübresinde iyi bir şekilde gelişir. Domuz dışkısının fermentasyonu, saman ve domuz dışkısının koku giderme işlemlerinde aktif olarak yer alırlar (Chavan et al., 2013).

2.2 Çalışma Kapsamında Tanımlanan Rizosferik Aktinomiset İzolatlarının Ait Oldukları Genusların Genel Özellikleri

2.2.1 Genus: *Streptomyces*

Streptomyces genusu, ilk kez 1943'te Waksman ve Henrici tarafından tanımlanmıştır. Genus *Streptomyces*, Streptomycetaceae ailesine aittir. Streptomycetaceae familyası, Actinobacteria filumu ve Actinomycetales takımındadır ve *Streptomyces* genusu bu ailenin tek üyesidir. Tanımlanan türlerin sayısı ve çeşitliliği açısından, *Streptomyces*, bilinen aktinomisetlerin en büyük taksonomik birimlerinden birini temsil etmektedir. *Streptomyces*'in 500'den fazla türü tanımlanmıştır. *Streptomyces* türleri kemoorganotrofik, filamentli gram-pozitif bakterilerdir fakat asit-alkol fast değil, fungus olmamalarına rağmen funguslarla aynı habitatlarda bulunmakta ve sadece fenotipik olarak benzerlik göstermektedir (Hasani et al., 2014).

Yüksek G-C içeriğine (% 69-78) sahip genomları vardır. Filamentleri ve sporlarının çapları genellikle 1 µm veya daha küçüktür. Sporlar, filamentlerin parçalanmasıyla oluşur ve düz, dalgalı veya sarmal zincirlerde taşınır. Koloniler yavaş büyümektedir ve uçucu bir metabolit olan geosmin üretimi nedeniyle genellikle toprak benzeri bir kokuya sahiptir. Koloniler nispeten pürüzsüz bir yüzeye sahip olup, daha sonra, flokoz, granül, toz veya kadife gibi görünebilen bir aerial miselyum geliştirirler. Vejetatif ve aerial misellerin renginden sorumlu çok çeşitli pigmentler üretirler. *Streptomyces* türleri hareketsiz, katalaz pozitif, nitrati nitrite indirgeme yeteneğine sahip ve adenin, eskülin, kazein, jelatin, hipoksantin, nişasta ve L-tirosizini parçalayabilmektedirler. Peptidoglikan içeren hücre

duvarları büyük miktarlarda L-diaminopimelik asit (L-DAP) içerir (Hasani et al., 2014).

Streptomyces toprak, su ve diğer doğal ortamlarda yaygın olarak dağılışı göstermektedir. Bir ekosistemdeki popülasyonları, çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler tarafından belirlenmektedir. Bu nedenle yeni ekolojik sistemlerin tanımlanması, yeni *Streptomyces* türlerinin keşfinde çok önemlidir (Hasani et al., 2014).

Streptomyces genusu, toprak bakterilerinin % 40'ını oluşturmaktadır. Kuru ve alkali koşullar altında *Streptomyces* sp. toprağın önemli mikrobiyal popülasyonlarından ve lifli formları nedeniyle, toprak dokusunun kuvvetli bir yapı oluşturmaya neden olurlar; toprağı rüzgar ve yağmurun sebep olduğu arınmadan korumaktadırlar. *Streptomyces* sp.'nin su ve topraktaki dağılımı, gıda stresi, sıcaklık, pH, nem, tuzluluk, toprak dokusu ve iklime bağlıdır. Toprak, en önemli *Streptomyces* habitatı olmasına rağmen, tuzlu ve tatlı sular ve organik materyaller gibi diğer habitatlarda bu cins açısından zengindir (Hasani et al., 2014).

Streptomyces'in en önemli özelliğı, antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antitümör özellikleri olan sekonder metabolitlerin üretilmesidir. *Streptomyces griseus* ve *Streptomyces coelicolor* olmak üzere iki tür *Streptomyces* streptomisin ve endüstriyel üretimi ve dihidrograntin gibi yeni antibiyotikler için kullanılmaktadır. İmmünomodülatör ajanlar olarak rapamisin ve antikanser ajan olarak doksorubisin, *Streptomyces* tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir (Hasani et al., 2014).

Faydalı bitki-mikroorganizma etkileşimlerinin temel ve uygulamalı çalışmalarının çoğı gram negatif bakterilerle ilgilidir. Daha az çalışılsa da, birçok gram pozitif bakteri grubu, özellikle *Streptomyces*'e ait olanlar, farklı mekanizmalar kullanarak bitki gelişimini artırabilecek bir dizi özellik sergilemektedirler. *Streptomyces*-bitki etkileşimleri ile ilgili bitki büyümesini destekleyici etkiler, biyogübre, biyostimülasyon ve biyokontrol olarak ayrılabilir (Sousa and Olivares, 2016).

2.2.2 Genus: *Nocardiosis*

Nocardiosis genusu ilk olarak 1976 yılında Meyer tarafından tanımlanmıştır. Bu cins, aerobik, gram pozitif, non-asit fast ve katalaz-pozitif aktinomisetleri içermektedir. Organik katı ortamlarda, koloniler iri, buruşuk veya katlanmış morfoloji göstermektedir. Kolonileri, *Nocardia* ve *Actinomadura* cinslerine benzemektedir. Substrat ve aerial miselyum iyi gelişmiş ve ikinci fragmentler spora dönüşmektedir. Genomları yüksek miktarda guanin ve sitozin içermektedir (Bennur et al., 2015).

Bu aktinomiset genusu, pendolmisin (antifungal ve tümör destekleyici ajan), apoptolidinler (selektif antikanser ajanlar), griseusinler (antimikrobiyal ve antikanser bileşikler), lipopeptidler (yüzey aktif maddeleri), tiyopeptidler (antibiyotik) ve naftospirononlar (antimikrobiyal ve antikanser bileşikler) gibi çok çeşitli biyoaktif bileşikler üretmektedir (Bennur et al., 2015).

Organizma ayrıca bir dizi yeni hücre dışı enzimi de salgılamaktadır. Dolayısıyla bu aktinomiset, önemli biyoteknolojik öneme sahiptir. *Nocardiosis* türlerinin farklı biyolojik sistemlerle, karasal bölgeler, deniz ortamları ve hipersalin alanlarından izole edilmiştir. *Nocardiosis* sp.'nin bitkilerle ve rizosferleri ile ilişkili olarak tropik bölgelerden izolasyonu hakkında bazı raporlar da vardır (Bennur et al., 2015).

2.3 Rizosfer

Kök salgılarından etkilenen dar toprak zonu olan rizosfer, gram kök başına 10^{11} mikrobiyal hücreye kadar ve 30.000'den fazla prokaryotik tür içerebilir (Şekil 2.4). Bu mikrobiyal topluluğun toplam genomu, bitkinin toplam genomundan çok daha büyüktür ve ayrıca bitkinin ikinci genomu olarak da adlandırılır (Berendsen et al., 2012).

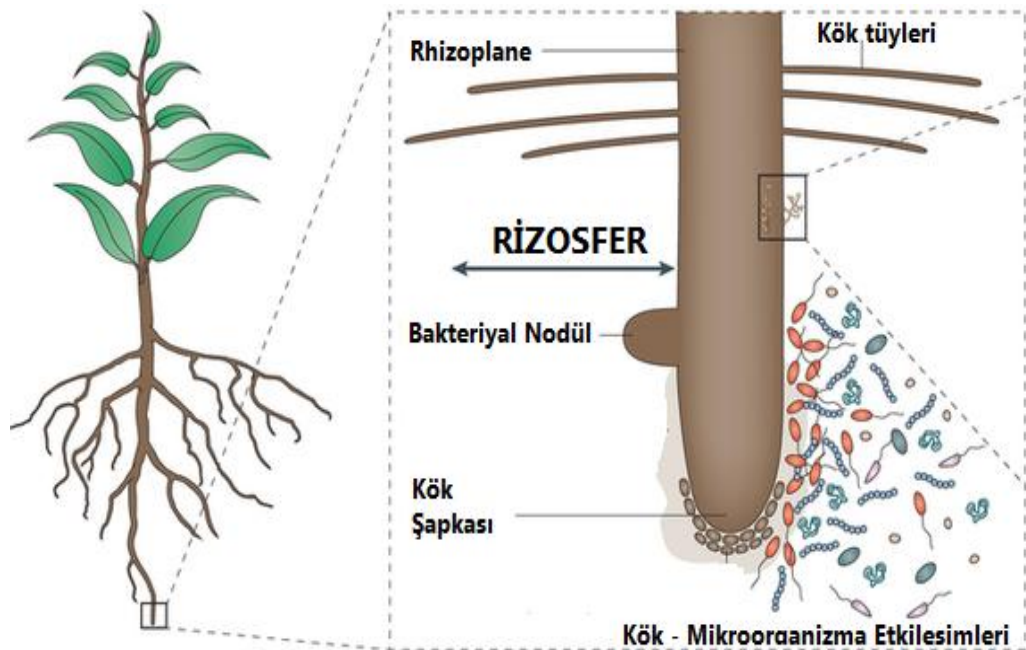


Şekil 2.4. Bitki kökleri ile ilişkili mikrobiyolojik ekosistem içeren kök bölgesi veya rizosfer görüntüsü (<https://www.cropscience.bayer.us/learning-center/articles/help-almond-crops-thrive-against-pests>, Erişim Tarihi: 26.11.2018)

Kök sistemini doğrudan çevreleyen dar zon bölgesine rizosfer denirken, rizobakteriler ise kök ortamının kolonize edilmesinde etkili olan Rhizobacteria grubunu anlatmaktadır. Mekanik destek sağlamanın yanı sıra, su ve besin alımını kolaylaştıran bitki kökleri ayrıca çeşitli bileşikler dizisi sentezler, biriktirir ve salgırlar. Bitki kökleri tarafından salgılanan bu bileşikler, çok sayıda heterojen, çeşitli ve aktif olarak metabolize olan toprak mikrobiyal toplulukları için kimyasal çekici maddeler olarak görev yapar. Köklerden topraklara salınan kimyasallara genellikle kök salgısı denir. Çok çeşitli kimyasal bileşiklerin salgılanması, toprağın kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirir ve böylece kök yüzeyinin hemen yakınındaki toprak mikrobiyal topluluğunun yapısını düzenler. Aslında, bazı salgılar mikroorganizmalara karşı itici olarak hareket ederken, bazıları mikroorganizmaları çekmek için cezbedici olarak hareket eder. Bu salgının kompozisyonu, bitki ve mikroorganizmaların fizyolojik durumuna ve türüne bağlıdır. Dahası, bu salgılar, bitki-yararlı simbiyotik etkileşimleri de teşvik eder ve rakip bitki türlerinin büyümesini engeller. Ayrıca, rizosferdeki mikrobiyal aktivite, köklenme şekillerini ve bitkiler için mevcut besin maddelerinin varlığını etkiler ve böylelikle kök salgılarının kalitesini ve miktarını değiştirir. Bu bitki

kökenli küçük organik moleküllerin bir kısmı, karbon ve azot kaynakları olarak yakınlarda bulunan mikroorganizmalar tarafından daha fazla metabolize edilir ve bazı mikroorganizma kaynaklı moleküller, daha sonra büyüme ve gelişme için bitkiler tarafından yeniden alınır. Sonuç olarak, karbon akışları, rizosfer işlevinin kritik belirleyicileri arasındadır. Fotosentetik olarak sabitlenmiş karbonun yaklaşık % 5-21'inin kök salgısı ile rizosfere taşındığı bildirilmektedir. Bundan dolayı, rizosfer, bitki kökleri ve/veya kök tüylerinden ve bitki tarafından üretilen materyallerden etkilenen herhangi bir toprak hacmi olarak tanımlanabilir (Ahemad and Kibret, 2014).

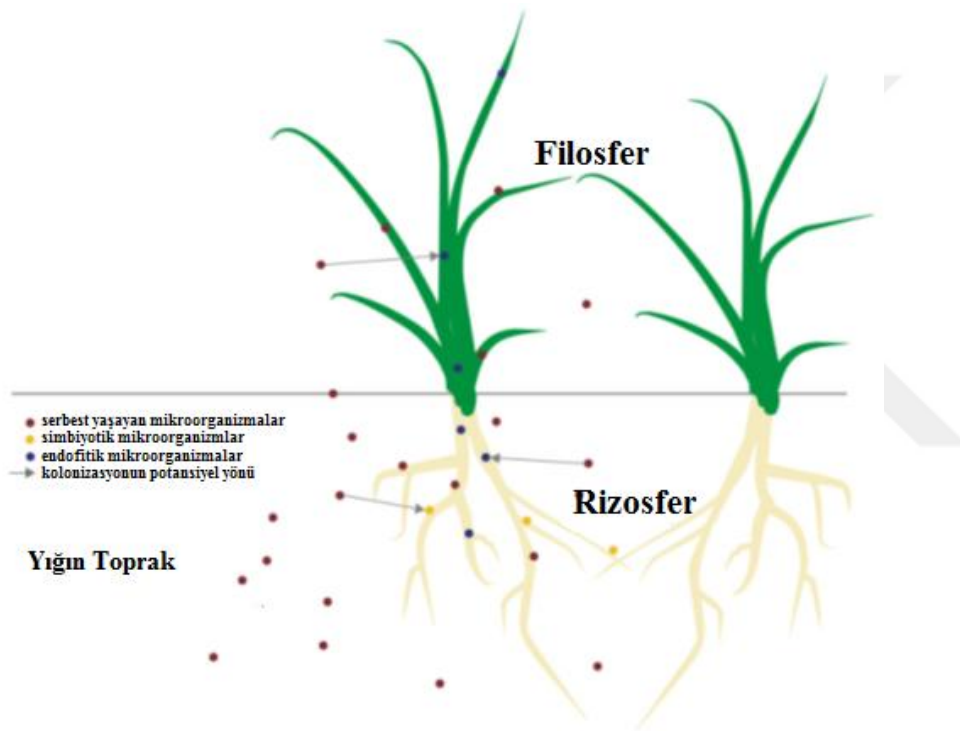
Büyük ölçüde, rizosferde üç farklı etkileşim bileşeni görülür: rizosfer (kök çevresi), rhizoplane ve kökün kendisi (Şekil 2.5). Bunlardan rizosfer, köklerin mikrobiyal aktiviteyi etkileyen substratların serbest bırakılması yoluyla etkilenen toprak zonudur. Öte yandan rhizoplane, kuvvetle yapışan toprak parçacıklarını içeren kök yüzeyidir. Kökün kendisi ise sistemin bir parçasıdır, çünkü endofitler gibi birçok mikroorganizma kök dokularını kolonize etmektedir. Rhizoplane ve/veya kök dokularının mikrobiyal kolonizasyonu, kök kolonizasyonu olarak bilinirken, bitki hacminin kökün etkisi altındaki kolonizasyonu, rizosfer kolonizasyonu olarak bilinir (Ahemad and Kibret, 2014).



Şekil 2.5. Rizosfer ve rhizoplane (Philippot et al., 2013).

2.4 Bitki – Mikroorganizma Etkileşimleri ve Bitki Gelişimini Destekleyici Rizobakteriler (BGDR)

Bitki-mikroorganizma etkileşimleri filosfer, endosfer ve rizosferde oluşabilir (Şekil 2.6). Filosfer, bitkilerin hava ile ilişkili bölümlerini ifade ederken; endosfer, iç transport sistemleri ile ilgilidir. Rizosfer terimi ise, bitki köklerinden özel olarak etkilenen veya kökler ve bitki kaynaklı materyaller ile bağlantılı olan herhangi bir toprak hacmi olarak tanımlanabilir (Bhattacharyya and Jha, 2012).



Şekil 2.6. Filosfer ve rizosfer (Kaiser, 2016).

Rizosfer, kök yüzeyinden birkaç milimetre uzayan bitki köklerine bağlı toprak bölgesini içerir. Toprağın bu bölgesi, bakteri bakımından kökü çevreleyen kütle toprağa göre daha zengindir. Moleküler tekniklere dayanan çalışmalar, her gram toprak için 4000'den fazla mikrobiyal türün tahminini yapmıştır. Filamentöz aktinomisetler, aynı zamanda bitki köklerini fitopatojenlere karşı korumak için bitki gelişimini etkileyebilen rizosfer mikrobiyotasındaki önemli topluluklardan biri olarak kabul edilmektedir. Amino asitler ve şekerler gibi bitki salgıları,

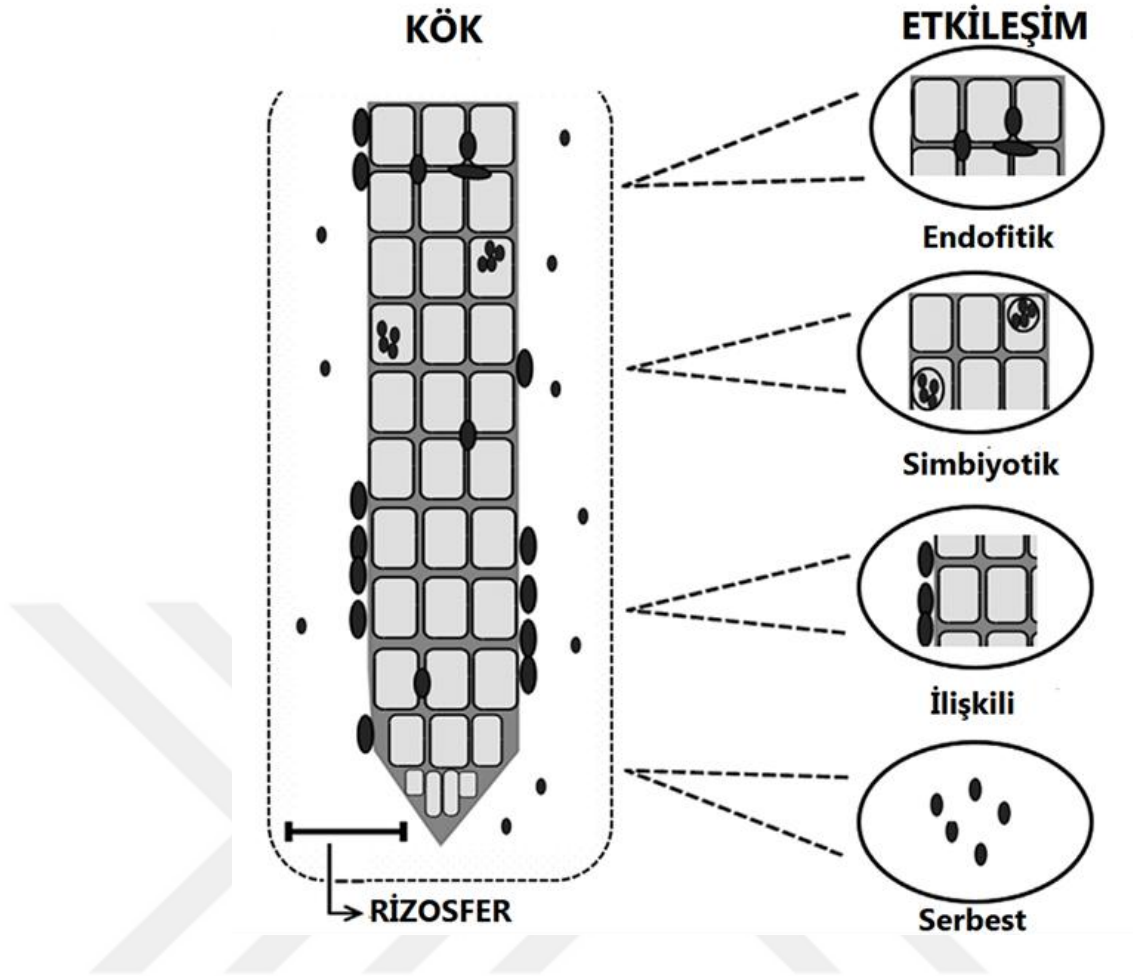
rizosferdeki bakteriler için zengin bir enerji ve besin kaynağı sağlar ve dolayısıyla da mikrobiyal popülasyonun bölgede daha fazla olmasına neden olur (Bhattacharyya and Jha, 2012).

Rizosfer, bitki-kök, kök-kök, kök-böcek ve kök-mikroorganizma etkileşimlerini içerebilir, bu da ekolojik olarak önemli olan bu bölgede maksimum mikrobiyal popülasyonları (rizosfer mühendisliği) en fazla destekleyen kök salgılarının üretimine neden olur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGJE) ile rizobakteriyel topluluk yapısındaki değişiklikler bildirilmiştir (Bhattacharyya and Jha, 2012).

Bununla birlikte, bitki üzerinde faydalı etkilerini gösterebilmek için, bitki kök saplarında bitki gelişimini destekleyici rizobakterilerin (BGDR), başarılı bir kök kolonizasyonu ve bunun devamlılığı gerekmektedir. Rizosferde, bitkiler ve çevre arasındaki yakınlık, bitkilerin su ve besin maddelerinin daha iyi alması ve toprak kaynaklı mikroorganizmalarla bitkilerin yararlı etkileşimleri için gereklidir. Cardoso ve Freitas'a (1992) göre, rizosfer mikrobiyal toplulukları C, P, N ve S gibi besin maddelerinin biyojeokimyasal döngüsü, toksinlerin uzaklaştırılması ve fitohormonların veya antibiyotiklerin üretimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Rizobakteriler, besin kaynakları için diğer mikroorganizmalara bağlı olabilmektedir. Örneğin, bir mikroorganizma, bitki salgılarını başka bir mikroorganizmanın kullanabileceği bir forma dönüştürebilir. Bu nedenle, kök kolonizasyon süreci, bakteriyel özellikler, kök salgıları ve diğer bazı biyotik ve abiyotik faktörler gibi çeşitli parametrelerin etkisi altında olmasına rağmen, rizosfer, bitki büyümesini etkileyen temel mikro ve makro besinlerden yararlanan yoğun bitki-mikroorganizma etkileşimlerinin çok yönlü ve dinamik bir ekolojik ortamı olarak ortaya çıkmıştır. Birçok rizosferik ilişkide, BGDR'lerin bitki kökünü kolonize ettiği ve bitki büyümesini teşvik ettiği bilinmektedir. Bitki rizosferinin *Azospirillum* sp., *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas* sp. tarafından kolonizasyonu iyi bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca, serbest yaşayan formlara kıyasla BGDR inokulantlarının immobilize formunun hayatta kalmada ve bitki kök kolonizasyonunda daha büyük yetenekleri vardır. Son zamanlarda, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas* gibi cinslere ait

olan, serbest yaşayan ve aynı zamanda ilişkili ve simbiyotik rizobakterileri içeren toprak mikroorganizmalarının, özellikle *Rhizobium*, *Serratia* ve *Xanthomonas* sp., başarılı rizosfer kolonizasyonu gösteren rizosfer biyotasının ayrılmaz parçalarıdır. Etkili rizosfer kolonizasyonundan sorumlu olarak çok sayıda hücre yüzey molekülü bildirmiştir. Rizosferik kolonizasyon, bu nedenle, mikroorganizmaların biyofertilizasyon, fitostimülasyon, biyokontrol ve fitomodifikasyon gibi faydalı amaçlar için uygulanmasında çok önemli bir adım olarak kabul edilir. Bununla birlikte rizosferin BGDR'ler tarafından kolonizasyonu tekdüze bir işlem değildir. Örneğin, *Kluyvera ascorbata* kanola bitkisinin köklerinin yüzeyinin üçte ikisini kolonize ederken, kök uçları etrafında hiçbir bakteri tespit edilmemiştir (Bhattacharyya and Jha, 2012).

Bitkiler ve bakteriler arasındaki etkileşimler, kökler ve çevreleyen toprakla belirgin yakınlık derecesine göre simbiyotik, endofitik veya ilişkili süreçler aracılığıyla meydana gelir (Şekil 2.7). Endofitik BGDR iyi inokulasyon adaylarıdır, çünkü kökleri kolonize eder ve gelişim ve işlev için uygun bir ortam yaratırlar. Non-simbiyotik endofitik ilişkiler ise, yüksek seviyelerde karbonhidratlar, amino asitler ve inorganik besinler içeren bitki dokularının hücre içi alanları içinde görülür (De Souza et al., 2015).



Şekil 2.7. Rizosfer / bakteri etkileşimleri. Bitki kökleri ve yararlı toprak bakterileri arasındaki farklı ilişki türleri (De Souza et al., 2015).

2.5 Bitki Gelişimi Destekleyici Rizobakterilerin Roller

Bitki büyümesini teşvik etmek ve mahsul verimini artırmak için potansiyel olarak yararlı olan, bitkiye faydalı bakteriler olarak değerlendirilen bitki gelişimini destekleyici Rizobakterilerin (BGDR) tanınması, günümüzde araştırmacıların bunları sürekli olarak deneylerde başarılı bir şekilde kullanabildikleri son birkaç yılda gelişmiştir (Saharan and Nevra, 2011).

Patates, şeker pancarı, turp ve tatlı patatesten, artan büyüme ve verim bildirilmiştir. BGDR'nın ticari uygulamaları test edilmekte ve sıklıkla başarılı olmaktadır. Bununla birlikte, bitki büyümesinde artışa neden olan mikrobiyal etkileşimlerin daha iyi anlaşılması, saha uygulamalarının başarı oranını büyük ölçüde artıracaktır. BGDR, kök kolonize edici bakterilerin, bitki büyümesini

çeşitli doğrudan veya dolaylı mekanizmalarla etkilediği bilinmektedir. Topraktaki bazı kimyasal değişiklikler BGDR ile ilişkilidir. BGDR'nın bir dizi mekanizma ile büyüme, verim ve besin alımını etkilediği bildirilmiştir. Bazı bakteriyel suşlar, bitki hormonlarının sentezini taklit ederek bitki fizyolojisini doğrudan düzenlerken, diğerleri, büyümeyi arttırmanın bir yolu olarak toprağın mineral ve azot mevcudiyetini arttırır. İzolatlar, bitki büyümesini doğrudan veya dolaylı veya sinerjik olarak destekleyebilen iki veya üç bitki gelişimini destekleyici özelliğinden daha fazlasını gösterebilir (Saharan and Nevra, 2011).

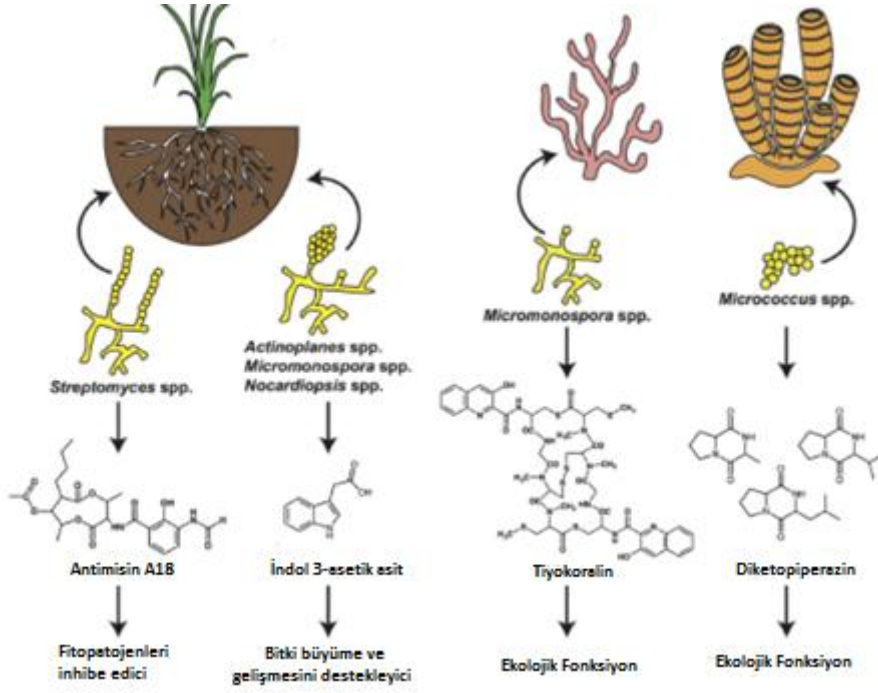
Bakteriyel aşılama bitki büyümesini uyarıcı etkisi, toprak besin koşullarından etkilenir. Bakteriyel inokülasyon, besin açısından eksik topraktaki bitki büyümesinde, besin açısından zengin toprağa göre çok daha iyi bir uyarıcı etkiye sahiptir. Gnotobiyotik koşullar (Mikroorganizma bulaşması olmadan canlılar üzerinde, mikroorganizmaların bulunmadığı veya sadece bilinen ya da belirtilen mikroorganizmalar ile ilişkili olan organizmalar ya da koşullar) altında büyümenin desteklenmesi için rizobakteriler eşzamanlı taranması ve oksinlerin *in vitro* üretimi, etkin BGDR'nin seçilmesi için yararlı bir yaklaşımdır. Bazı BGDR, *Arabidopsis thaliana*'nın büyümesini destekleyen 2,3-butanediol ve aseton gibi uçucu bileşenlerin bir karışımını sunar. Diazotrof bakteriyel inokülasyon, topraktaki pamuk verimini, bitki boyunu ve mikrobiyal popülasyonu önemli ölçüde artırır (Saharan and Nevra, 2011).

IBA (indol-3-bütirik asit), bakteri ve karbonhidratların çift ve üçlü kombinasyonu, köklenme kapasitesini ve elmada daha kaliteli köklenmeyi arttırmakta daha etkili olduğu bildirilmiştir. Kompostlarla birlikte uygulandığında çiftlik çöpü kompostu, pirinç samanı kompostu, *Gliricidia* haşarat kompostu ve çiftlik çöpü kompostu ile ilişkili makrofauna içeren kompostlardan izole edilen bakteriler, inci darının büyümesi üzerindeki sinerjik etkisini göstermektedir. Fosfat açısından zenginleştirilmiş kompost ile BGDR'nın entegre bir şekilde kullanılması nohutta büyüme, verim ve nodülasyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (Saharan and Nevra, 2011).

2.6 Bitki Rizosferinde Aktinomisetler ve Roller

Rizosferde bulunan aktinomisetlerin, patojenik bakterilere ve funguslara karşı savunmaya katkıda bulunabilecek ve bitki besinlerinin temizlenmesine yardımcı olabilecek geniş bir doğal ürün yelpazesini salgıladıkları gösterilmiştir (El-Tarabily et al., 2009; Solans et al., 2011; Harikrishnan et al., 2014; Behie et al., 2017). Rizosfer toprakları nispeten yüksek seviyelerde aktinobakteriler içerir ve toprak aktinomisetleri ile bitki kökleri arasındaki ilişki bitki sağlığı üzerinde önemli etkilere sahip olabilir (Behie et al., 2017).

Kök-kolonize edici *Streptomyces*'in, staurosporin, 3-asetoniliden-7-prenilindolin-2-one, diastafenazin, antimisin A18 gibi çeşitli antifungal ve antimikrobiyal bileşikler ürettiği bulunmuştur (Yan et al., 2010; Behie et al., 2017). Bu in situ analizler rizosferin doğal içeriğindeki biyoaktif bileşik üretimini anlamaya başlamak için kritik bir mercek sunmaktadır. Rizosfer aktinomisetlerinin büyük ölçekli etkisini inceleyen çalışmalar, bitki sağlığı ve hastalık direncine göre yapılmıştır. Örneğin, salatalık bitkileri (*Cucumis sativus*) bir veya daha çok endofitik aktinomiset, (*Actinoplanes campanulatus*, *Micromonospora chalcea* veya *Streptomyces spiralis*) kombinasyonu ile inokule edildiğinde, toprak kaynaklı bir fitopatojen olan fungus *Pythiumaphani dermatum*'un genel etkileri hafifletilmiştir. Özellikle, konak bitkiler önemli ölçüde daha az kök ve taç çürümesi gösterip ve daha sağlıklı oldukları gözlenmiştir (El-Tarabily et al., 2009; Behie et al., 2017). Birkaç başka çalışma da, kök bölgesine inoküle edilen aktinomisetlerin, çeşitli bitki sistemlerinde bitkiyi zararlı patojen invazyonundan koruyabildiğini benzer sonuçlar ile göstermiştir. Önemli bir örnek olan, *Streptomyces lividans*'ın, *Arabidopsis thaliana*'nın kökleri üzerinde, özellikle de zararlı fungal patojenlerden biri olan *Verticillium dahlia*'yı antagonize eden prodigininler ürettiği gösterilmiştir. Rizosferde bulunan aktinomisetlerin, fitopatojenlere karşı antagonist olan ve daha sonra koruma sağlayan çok çeşitli metabolitleri üretme kabiliyeti, bitki sağlığı ve birincil üretiminin sağlanmasında toprak aktinomisetleri için önemli bir role işaret etmektedir (Şekil 2.8) (Behie et al., 2017).



Şekil 2.8. Rizosfer, mercan resifleri ve sünger komünitelerindeki temsili aktinomisetler ve ürettikleri doğal ürünler (Behie et al., 2017).

Toprak aktinomisetlerinin aynı zamanda, bitkilerin büyüme ve gelişimini teşvik ederek bitki sağlığını geliştirdikleri bilinmektedir (Solans et al., 2011; Harikrishnan et al., 2014; Behie et al., 2017). *Nocardiosis*, *Actinoplanes* spp. ve *Micromonospora* gibi endofitik aktinomisetlerin, koordine hücre büyümesi ve gen regülasyonu da dahil birtakım önemli fonksiyonlarda görevli bileşikler olan, indol-3 asetik asit (IAA) ve indol 3-pirüvik asit (IPA) gibi fitohormonları ürettiği bulunmuştur (Behie et al., 2017).

Bu bileşikler grubunun, buğday, marul, çavdar ve domateste büyüme ve gelişmeyi teşvik ettiği gösterilmiştir (Bonaldi et al., 2015; Abbamondi et al., 2016; Toumatia et al., 2016; Behie et al., 2017). Konak bitki tarafından üretilen fitohormonların aksine, mikrobiyal olarak üretilen fitohormonları doğrudan tarif etmek teknik olarak zordur. Bununla birlikte, bu bileşiklerin kök kolonizasyonu veya rizosfer yetkinliği ile in vitro üretimi, aktinomisetleri toprak mikrobiyomunun, bitki sağlığını etkileyebileceği potansiyel araçlar olarak önermektedir (Behie et al., 2017).

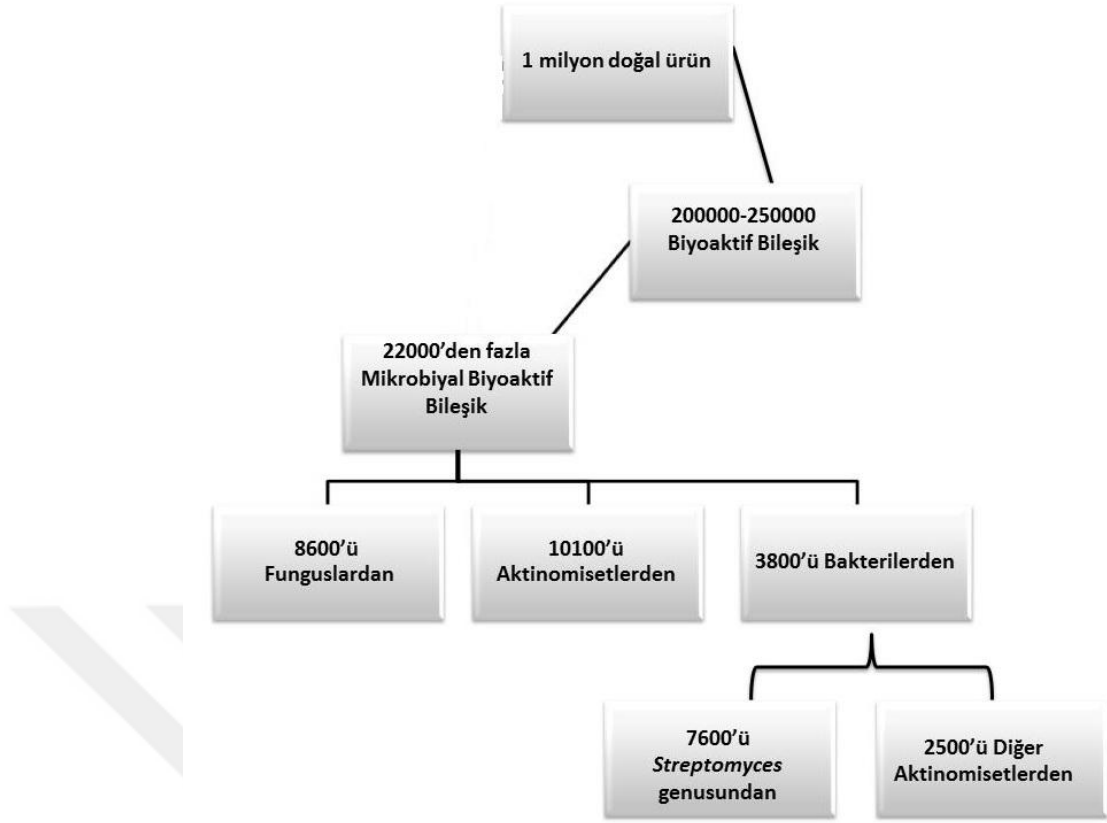
Toprak *Streptomyces*'leri ayrıca, *Rhizobia* gibi kritik simbiyotik azot fikse edicilerinin büyümesini teşvik ederek ve kök besin artıklarını temizlemeye yardımcı olarak bitkilerin genel besin alım verimliliğini arttırabilir. Baklagiller, bakteriye ev sahipliği yapan bir kök nodülü üretmesi için, bakterinin bitkiyi uyardığı *Rhizobiales* kladı bakterileri ile bir simbiyoz içine girer. Buna karşılık bakteri, atmosferik azotu fikse ederek bitkinin alabileceği forma dönüşmesini sağlar. Nohut bitkileri *Streptomyces* ile inokule edildiğinde, nodül sayısının ve nodül büyüklüğünün artması, bitkinin azot fikse etme kapasitesi üzerinde genel bir uyarıcı etki olduğunu düşündürmektedir. Bu fikse edilmiş azotun, tüm sistemlerde bitkiler için sınırlayıcı bir kaynak olduğu dikkate alınmalıdır. Rizosferde veya doğrudan kök üzerinde bulunan aktinomisetler tarafından gerçekleştirilen siderofor üretimi, özellikle bitkiyi çevreleyen topraklardan gelen demiri temizlemede yardımcı olabilir. Bitkiler, kendi sideroforlarının üretimi sayesinde toprağı çözünür demir için temizleyebilirler. Bununla birlikte, bitkiler aynı zamanda, aktinomisetler tarafından üretilmiş demir-bağılı sideroforları da alıp, toplam demir alım verimlerini arttırabilirler (Behie et al., 2017).

Yukarıda vurgulanan örnek çalışmalar, rizosferdeki aktinomisetler ve bitki kökleri arasındaki olumlu bağlantıya işaret etmektedir. Büyük ölçüde, bu ilişki bitkiler için yararlıdır, çünkü bunlar, sideroforlar, fitohormonlar ve potansiyel patojenleri inhibe eden antifungal ve antibiyotikler de dahil olmak üzere aktinomisetlerden çoklu kimyasal girdiler alabilirler (Solans et al., 2011; Harikrishnan et al., 2014; Behie et al., 2017). Araştırmaların çoğu, buğday, sorgum, çavdar, mısır ve pirinç gibi bazı otları içeren gıda ürünleri bakımından, aktinomiset/bitki ilişkilerini incelemiştir (Harikrishnan et al., 2014; Toumatia et al., 2016; Behie et al., 2017). Bunun haricinde, ot ve çayır içeren bölgelerden elde edilen rizosfer toprağının metagenomik ve kültüre dayalı çalışmaları, çok sayıda bitki ile ilişkili aktinomiseti ortaya çıkarmıştır (Delmont et al., 2012; Behie et al., 2017). Bu kollektif kanıtlara dayanarak, aktinomisetler ve bitkiler (özellikle odunsu olmayan bitkiler) arasındaki kimyasal etkileşimlerin, özellikle ot, çayır vb. bitkilerin rizosferinde, ekosistem ölçeğinde bitki sağlığını etkilemesinin muhtemel olduğu görülmektedir. Her aktinomiset tarafından üretilen doğal ürünlerin, *in situ* rolü tam olarak anlaşılmamış olsa da, aktinomisetlerin varlığının, bitkinin patojenlere, besin alımına ve büyümeye karşı duyarlılığını değiştirdiği açıktır.

Diğer mikroorganizmalar da bu karmaşık etkileşim ağlarında önemli bir rol oynamaktadır, ancak aktinomisetler tarafından üretilen çok sayıda doğal ürün, aktinomisetlerin rollerini benzersiz kılmaktadır (Behie et al., 2017).

2.7 Aktinomisetler Tarafından Üretilen Biyoaktif Bileşikler

Biyoaktif metabolitler, farklı organizmaların (bitkiler, hayvanlar, funguslar ve bakteriler) primer ve sekonder metabolizmasının ürünleridir. Genellikle biyolojik aktivite göstermektedirler (Demain and Sanchez, 2009; Solecka et al., 2012). Sekonder metabolitler, çok çeşitli kimyasal yapılara sahip olmakla birlikte; genellikle düşük moleküler kütleye sahiptir (Donadio et al., 2002; Berdy, 2005; Solecka et al., 2012). Sekonder metabolitler, birincil metabolitlerden farklı olarak, hücrelerin yaşam döngüsünde hiçbir işleve sahip olmayıp, spesifik organizma gruplarını karakterize ederler (Berdy, 2005; Solecka et al., 2012). Genetik yöntemler ve yüksek verimli tarama (YVT) teknikleri, bir milyondan fazla doğal bileşiğin tanımlanmasını sağlamıştır. Bu ürünlerin yaklaşık olarak 500000–600000'i bitkiler tarafından üretilirken (genellikle alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler, steroidler, sakkaritler vb.), 50000'i ise mikrobiyal kökenli üretilmektedir (Berdy, 2005; Lam, 2007; Solecka et al., 2012). 22000'den fazlası mikroorganizmalar tarafından üretilen yaklaşık 200000–250000 metabolit çok yoğun biyolojik aktiviteler göstermektedir (Demain and Sanchez, 2009; Berdy, 2005; Solecka et al., 2012). 22500 mikrobiyal metabolitin yaklaşık % 17'si (3800) tek hücreli bakterilerin (özellikle *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp.) metabolitleri iken % 45'i (10100) aktinomisetlerin fermantasyon ürünleridir ve yaklaşık % 38'i ise (8600) fungus kökenlidir (Şekil 2.9) (Demain and Sanchez, 2009; Berdy, 2005; Solecka et al., 2012). Filamentöz aktinomisetler arasında, yaklaşık % 75 (7600) metabolit, *Streptomyces* genusuna ait türler tarafından üretilmektedir (Berdy, 2005; Lam, 2007; Solecka et al., 2012).



Şekil 2.9. Günümüze kadar keşfedilmiş biyoaktif bileşiklerin kökenlerine göre dağılımı (Solecka et al., 2012).

Bugüne kadar 140'dan fazla aktinomiset cinsi tanılanmış olup, bunlardan birkaçı bilinen temel bileşiklerin çoğunun üretiminden sorumludur (Jensen, 2005; Pimentel-Elardo et al., 2010; Solecka et al., 2012). *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* ve *Actinoplanes* gibi diğer aktinomisetler de daha düşük bir ölçekte olsa da biyoaktif metabolitler üretmektedir. Aktinomiset suşları genellikle karasal topraklarda bulunur, fakat deniz sedimentleri ve deniz süngerlerinden de izole edilmiş olanlar mevcuttur (Penesyan, 2010; Solecka et al., 2012). 2008 yılında, 1000'den fazla deniz kökenli metabolit tanımlanmıştır (Blunt et al., 2010; Penesyan, 2010; Solecka et al., 2012). Bu deniz metabolitleri yüksek yapısal çeşitlilik ve çok çeşitli aktiviteler göstermektedir. Bu aktiviteler, antimikrobiyal, antiprotozoal, antiparazitik, antitümör ve antimalaryal olabilmektedir (Blunt et al., 2010; Bhatnagar and Kim, 2010; Solecka et al., 2012). 30'dan fazla deniz türevi bileşik, şu anda antikanser aktiviteleri için klinik veya klinik öncesi çalışmalarda kullanılmıştır (Simmons et al., 2005; Solecka et al., 2012).

Streptomyces genomu, bir bakteri için olağandışı büyüktür. En çok çalışılan *Streptomyces* suşunun, *Streptomyces coelicolor* A3(2)'nin genomu, 8.66 mega baz çiftine (Mbç) sahiptir ve 7800'den fazla putatif gen içerir. *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12'nin genomu ile karşılaştırıldığında, 4,6 Mb ve 4 400 putatif gen içerir. *S. coelicolor*'un genomu, sekonder metabolitlerin oluşumunda rol oynayan enzimleri kodlayan 20'den fazla gen kümesi içerir (Bentley et al., 2002; Solecka et al., 2012).

Günümüzde kullanılan metabolitlerin büyük bir kısmı mikrobiyal fermentasyon işlemlerinde üretilmekte veya mikrobiyal ürünlerin kimyasal modifikasyonlarından türetilmektedir. *Streptomyces*'in fermentasyon ürünleri, yeni ilaçlar olarak uygulanabilecek zengin bir bileşik kaynağıdır (Solecka et al., 2012).

Birçok sekonder mikrobiyal metabolit antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör, antiprotozoal, hipokolesterolemik ve diğer aktiviteleri göstermektedir. Yaygın olarak tıp, veterinerlik, tarım ve endüstride kullanılmaktadırlar. Yaklaşık 14000 mikrobiyal kökenli bileşik, antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal) aktivite sergilemektedir. Bunların % 66'sının gram pozitif bakterilere, % 30'unun gram negatif bakterilere karşı ve % 5'i de mikobakterilere karşı etkinlik göstermektedir. Bileşiklerin % 34'ü antifungal aktivite göstermektedir. Bunların ise, % 21'i mayalara, % 11'i fitopatojen funguslara ve % 24'ü diğer funguslara karşı aktivite göstermektedir (Berdy, 2005; Solecka et al., 2012).

2.7.1 Antibakteriyel bileşikler

Günümüzde, sekonder metabolitlerin antibakteriyel aktivitesi oldukça ilgi çekmektedir. Yeni antibiyotiklerin keşfine duyulan yoğun ihtiyaç, multi ilaç dirençli klinik suşların yaygınlığına ve sonuçta ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisindeki terapötik başarısızlığa dayandırılmaktadır. Kimyasal ve fonksiyonel çeşitlilikleri nedeniyle biyoaktif metabolitler, yeni ve etkili antimikrobiyal ilaçların keşfine yol açabilecek bilimsel araştırmaların odağındadır (Demain and Sanchez, 2009; Newman and Cragg, 2007; Solecka et al., 2012). Bilinen tüm

antibiyotiklerin yaklaşık % 70'i aktinomisetlerden elde edilir ve bunların çoğunun üreticisi *Streptomyces* spp. suşlarıdır (Solecka et al., 2012).

Aktinomisetler içerisinde keşfedilen ilk antibiyotikler, hepsi Waksman ve arkadaşları tarafından keşfedilen, 1940 yılında *Streptomyces antibioticus*'tan aktinomisin, 1942'de *Streptomyces lavendula*'dan streptotrisin (Waksman and Woodruff, 1942) ve 1944'te *Streptomyces griseus*'tan streptomisindir (Barka et al., 2015). *Streptomyces*'ten elde edilen bir grup antimikrobiyal bileşik olan streptograminler, peptidil transfer aşamasında bakteriyel ribozomal protein sentezini inhibe eden bileşiklerdir. Streptogramin tip bir antibiyotik olan etamisin, 1960'larda *S. griseus*'un karasal suşundan elde edilmiştir. Ancak antimikrobiyal özellikleri yakın zamanda değerlendirilmiştir ve etamisinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı kuvvetli aktivite gösterdiği saptanmıştır. Yeni keşfedilen antibakteriyel etki mekanizmalarından biri de, bakteriyel yağ asidi biyosentezinin inhibisyonudur. Yağ asitleri bakteriyel enerji depolaması için gereklidir ve hücre bileşiminin bir parçasıdır. Güney Afrika'da bulunan East Cape'den izole edilen toprak kaynaklı *S. platensis* MA 7327, platensimisin üretmektedir. İspanya topraklarından izole edilen *S. platensis* MA 7339'un platensin ürettiği keşfedilmiştir. Bakteriyel yağ asidi sentezinin selektif inhibisyonunu sağlayan her iki bileşiğin, gram pozitif bakterilere, metisiline dirençli *S. aureus* suşlarına ve vankomisine dirençli *E. faecium*'a karşı kuvvetli aktivite gösterdiği saptanmıştır (Solecka et al., 2012).

2.7.2 Antifungal bileşikler

Antibiyotik üreten tüm mikroorganizmalar arasından, aktinomisetlerin antifungal ajanların kaynağı olarak en büyük potansiyeli sundukları gösterilmiştir. Listelenen antibiyotiklerden altı tanesi ise daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bunlar, fungisidin (şimdi nistatin olarak bilinmektedir), fradisın, sikloheksimid (Actidione), antimisin A ve C381 ve C135. Antibiyotik C135 daha sonra kandisidin olarak adlandırılmıştır. Bunların hiçbirisi, bakteri veya aktinomisetleri inhibe etmezken, fungusların, özellikle de maya formlarının büyümesi üzerinde belirgin bir etki yaptıkları saptanmıştır (Waksman et al., 1965).

En bilinen aktinomiset metabolitlerinden biri olan amfoterisin B, 1955 yılında *Streptomyces nodosus*'dan izole edilen bir makrolid polien antibiyotiktir. Geniş bir aktivite ölçeğine sahip antifungal bir antibiyotiktir, ancak birçok yan etkisi bulunması nedeniyle klinik uygulaması sınırlanmaktadır (Trejo and Bennet, 1962). Fungal patojenlere karşı antagonistik aktivite, genellikle *Streptomyces* spp. tarafından üretilen çeşitli antifungal maddelerin yanı sıra ekstraselüler hidrolitik enzimler (kitinaz, β -1,3-glukanaz) ile de ilgilidir. Kitinaz ve β -1,3-glukanaz, fungal hücre duvarının (örn., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia minor*) parçalanmasında rol oynar. *Candida* spp.'ye karşı antifungal aktivite sergileyen rapamisin, ilk olarak Easter adasındaki toprak orjinli aktinomisetlerden izole edilmiştir. Rapamisin üretimini gerçekleştirilen önemli türlerden bir tanesi *S. higroscopicus*'dur (Solecka et al., 2012).

2.7.3 Antiviral bileşikler

Son zamanlarda, herpes virüsü veya insan immün yetmezlik virüsü (HIV) için etkili olan ve aktinomisetler tarafından üretilen yeni antiviral ajanlar bulunmuştur: Siklovirasin B1 ve B2 ve fattivirasinler. Siklovirasin üreten suş, *Kibdelosporangium albatum* No. R761-7 (ATCC 55061), Filipinler Mindanao adasından toplanan bir toprak örneğinden izole edilmiştir. Test edilen yaklaşık 2500 aktinomiset suşundan dört yeni antiherpetik ajan bulunmuştur: AH-135Y (*Streptomyces albovinaceus* strain No. 1358 tarafından üretilen yeni bir glutarimid antibiyotik), AH758 (*Streptomyces rochei* strain No. 75810) tarafından üretilen yeni makrolid antibiyotikler), AH-1763IIa (*Streptomyces cyaneus* strain No. 176312 tarafından üretilen yeni bir antibiyotik) ve fattivirasinler (*Streptomyces microflavus* strain 2445 tarafından üretilen şeker-yagli asit laktonuna ait antibiyotikler) (Uyeda, 2003).

Tunikamisinler, 1971'de, *S. lyososuperficus* nov. sp.'dan izole edilen urasil içeren yağlı açıl nükleosit ürünleridir. Tunikamisinlere benzer bileşikler, streptovirudin ve Corynetoxin daha sonralarda aktinomiset suşlarından ayrıca izole edilmiştir. Streptovirudin, *S. griseoflavus* subsp. *thuringiensis*'ten izole edilmiştir ve her iki bileşik de zarflı virüslere karşı benzer faaliyetlere sahiptir (Solecka et al., 2012).

Yeni İrlanda (Papua Yeni Gine) sahilinden izole edilen bir denizel aktinomiset suşu olan *Streptomyces kaviengensis* ile yapılan çalışmada, önemli antiviral aktiviteye sahip yeni bir metabolit tanımlanmıştır. Bileşik, antimisin A1a, bir antimisin A türeği olarak bulunmuş ve Western equine ensefalitis virüsüne karşı yüksek potansiyel göstermiştir. Etki mekanizmasının analizi, mitokondriyal elektron transportunun ve pirimidin biyosentezinin bozulmasını ortaya çıkarmıştır (Jakubiec-Krzesniak et al., 2018).

HIV-1 proteazı, HIV'in yaşam döngüsünde gereklidir ve AIDS tedavisi için umut verici bir hedef olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda bu proteazın birçok yeni güçlü inhibitörü bildirilmiştir. 2013 yılında, yeni bir HIV-1 proteaz inhibitörü olan 4862F, *Streptomyces albosporus* I03A-04862'nin kültür besiyerinden izole edilmiştir. N, N, N- (trimetillenmiş) -Tyr-L-LeuL-Val-L-Leu- (dehidre edilmiş) -His olarak tanımlanmış ve HIV-1 proteazına karşı inhibitör aktivite sergilediği belirlenmiştir (Jakubiec-Krzesniak et al., 2018).

2.7.4 Antikanser (antitümör) bileşikler

Kemoterapi, kanserle mücadelede kullanılan başlıca tedavilerden biridir. Çok sayıda antitümör bileşiği, esas olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen doğal ürünler veya bunların türevleridir. Özellikle aktinomisetler, antitümör özellikleri de dahil olmak üzere, farklı biyolojik aktivitelere sahip çok sayıda doğal ürünün üreticisidir. Bu antitümör bileşikler, antrasiklinler, enediyenler, indolokarbazoller, izoprenoidler, makrolitler, ribozomal olmayan peptitler ve diğerleri gibi çeşitli yapısal sınıflara aittir ve topoizomera I veya II inhibisyonu, mitokondri permeabilizasyonu, inhibisyonunun aracılık ettiği DNA bölünmesi yoluyla apoptozu indükleyerek, hücrel metabolizma veya proteazlar gibi sinyal transdüksiyonunda rol oynayan anahtar enzimlerin ve bazı durumlarda tümör kaynaklı anjiyogenezin inhibe edilmesi ile antitümör aktivite gösterirler (Olano et al., 2009).

Aktinomisin D, tümör tedavisinde kullanılan ilk doğal metabolitlerden biridir ve *S. antibioticus*'dan izole edilmiştir. Aktinomisin D, transkripsiyon başlatıcı kompleksin DNA'sını bağlanarak ve transkriptin RNA polimeraz ile uzamasını önleyerek hareket etmektedir. Aktinomisin D, çocuklarda Wilms tümörlerinin tedavisinde halen kullanılmaktadır, ancak birçok yan etkisi olması, uygulamasını sınırlandırmıştır (Demain and Sanchez, 2009; Waksman and Woodruff, 1941; Solecka et al., 2012). *S. caespitosus* tarafından üretilen mitomisinler yüksek antitümör aktivitesi göstermektedir. Ancak, toksisiteleri nedeniyle tedavide kullanımları sınırlıdır. Denizel aktinomiset, *S. chibaensis* AUBN1/7, resitoflavin, bir kuinon ile ilişkili antibiyotiktir. HMO2 (gastrik adenokarsinom) ve HePG2 (hepatik karsinom) hücre hatlarına karşı sitotoksositeye sahiptir. Ayrıca, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *S. aureus* ve *Proteus vulgaris*'e karşı zayıf antibakteriyel aktivite gösterir (Gorajana, 2007 ;Solecka et al., 2012). Başka bir bileşik JBIR-69'un, bir toprak örneğinden izole edilen *Streptomyces* sp. OG05 tarafından üretildiği ve antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Solecka et al., 2012).

2.7.5 Antiparazitik bileşikler

Milbemisiner, *S. hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*'tan izole edilen 16 üyeli makrolidlerdir. Güçlü, geniş spektrumlu antihelmintik, insektisit ve akarisidal özellikler sergilemektedirler (Mishima et al., 1983; Solecka et al., 2012). Avermektinler antiparazitik bileşiklerdir ve toprak orjinli *S. avermitilis* tarafından üretilmektedir. Bu makrosiklik laktonlar evcil hayvanların artropod parazitlerine karşı aktiftir (Solecka et al., 2012).

Valinomisin, staurosporin ve butenolid, *Streptomyces* spp.'den izole edilen antiparazitik bileşiklerdir. Valinomisin, *S. fulvissimus*, *S. roseochromogenes* veya *S. griseus* var. *flexipartum* gibi birçok toprak aktinomisetinden ve deniz türlerinden izole edilen bir siklodepsipeptiddir. Sinefungin VA ve dehidrosinefungin V olarak adlandırılan iki yeni nükleotid antibiyotik, yakın zamanda *Streptomyces* sp. K05-0178'den izole edilmiştir ve antitripanozomal aktiviteye sahiptirler (Solecka et al., 2012).

2.8 Aktinomisetler Tarafından Üretilen Agroaktif Bileşikler (Bitki Gelişimini Destekleyici Bileşikler)

Aktinomisetler, farklı toprak koşullarında gelişebildikleri ve besin maddesi döngüsünde ekolojik bir rol oynadıkları için ilgi görmektedir. Bunun yanında, son zamanlarda da bitki gelişimini destekleyici rizobakteriler olarak öngörülmektedir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016; Franco-Correa et al., 2010).

BGDR, tarımda önem taşıyan serbest yaşayan yararlı bakterilerdir. BGDR'nin varlığı, hastalığa neden olan mikroorganizmaları baskılayarak ve besin maddesi bulunabilirliğini ve asimilasyonunu hızlandırarak bitki sağlığı ve büyümesi üzerinde faydalı etkiler yaratmaktadır. Dolayısıyla, toprak verimliliğini ve ürün verimini artırma ve kimyasal gübrelerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerini azaltma arayışında, faydalı tarımsal kullanımlar için BGDR'yı kullanmaya ihtiyaç vardır. Bu bağlamda, aktinomisetlerin BGDR olarak karakterize edilmesi önerilmektedir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

BGDR aracılı bitki büyüme teşviki, çeşitli maddelerin üretimi yoluyla rizosfer bölgesindeki tüm mikrobiyal topluluğun değişmesi sonucu oluşur (Kloepper and Schroth, 1981; Ahemad and Kibret, 2014). Genellikle, BGDR doğrudan kaynak alımını (azot, fosfor ve esas mineraller) kolaylaştırarak veya bitki hormonu seviyelerini düzenleyerek (IAA, giberellin), dolaylı olarak ise bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde çeşitli patojenlerin zararlı etkilerini azaltarak biyolojik kontrol ajanları olarak iş görmektedir ve bitki büyümesini teşvik etmektedir (Glick, 2012; Ahemad and Kibret, 2014). Yakın geçmişte bildirilmiş olan bitki büyüme desteği özelliklerine sahip aktinomisetlerin ve gerçekleştirdikleri bitki gelişimi destekleyici özelliklerin bir listesi Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Rapor edilmiş bitki gelişimini destekleyici bazı aktinomisetler ve gerçekleştirdikleri bitki gelişimi destekleyici özellikler (Selvakumar et al., 2014).

Aktinomiset	Bitki Gelişimini Destekleyici Özellik
<i>Streptomyces</i> sp.	Kitinaz aktivitesi
<i>S. thermoautotrophicus</i>	Azot fiksasyonu
<i>Streptomyces griseoviridis</i> strain K61	Çiçekler, saksı bitkileri ve sera salatalıklarının büyüme besinleri ile tedavisi
<i>Rhodococcus</i> sp. strain EJP75	<i>Pinus sylvestris</i> - <i>Lactarius rufus</i> ektomikorizal simbiyozunda sekonder mikorizal yan kökleri destekler.
<i>Frankia</i>	Hidrojenazlar
<i>S. padanus</i> AOK-30	Gelişmiş kuraklık toleransı
<i>Arthrobacter</i> sp. strain EZB4	ACC deaminaz aktivitesi
<i>Kitasatospora</i> sp.	IAA üretimi
<i>Streptomyces</i>	Fosfat çözünürlüğü
<i>Kitasatospora</i>	Bitki gelişimine destek
<i>Thermobifida</i>	Bitki gelişimine destek
<i>Micrococcus</i> sp.	ACC deaminaz aktivitesi
<i>Rhodococcus</i> sp.	ACC deaminaz aktivitesi
<i>S. canus</i>	IAA, GA3 üretimi
<i>Streptomyces</i> strain AzR-051	IAA üretimi
<i>Streptomyces</i> sp.	Siderofor (ferulik asit) üretimi
<i>Streptomyces</i> sp. AcM29	Siderofor (Desferrioksamin B) üretimi
<i>Streptomyces</i> sp. 5 strain	Çavdar bitkisinde gelişim desteği
<i>Streptomyces</i> sp. AcM 20	Artmış fotosentetik verim
<i>Streptomyces</i> sp. DH6	Siderofor üretimi
<i>Streptomyces</i> sp. DH32	Fosfat çözünürlüştürme
<i>Streptomyces</i> sp. P2-3	Azot fiksasyonu
<i>Streptomyces</i> sp. MR-1	Proteaz aktivitesi

BGDR, bitki büyüme ve gelişimindeki bu aktivitelerini, doğrudan ya da dolaylı mekanizmalar ile gerçekleştirebilmektedir (Glick et al., 2007; Glick, 2012; Alsedeeri, 2016)

2.8.1 Bitki gelişimini destekleyici bileşiklerin doğrudan etki mekanizmaları

BGDR tarafından bitki büyümesinin doğrudan teşvik edilmesi, doğrudan bakteri tarafından sentezlenen ya da bu bakterilerin, besin maddelerinin çevreden bitkiler tarafından alınmasını kolaylaştıran bir bileşik sağlamasıyla gerçekleşmektedir (Alsedeeri, 2016).

Bitki büyümesinin doğrudan olarak teşvik edilmesi birkaç farklı şekilde gerçekleşebilir. BGDR (1) atmosferik azotu fiksedebilir ve bitkilerin alabilceği formlarda bitkilere sunabilir (Dobbelaere et al., 2003; Alsedeeri, 2016); (2) bitki

büyümesi için gerekli olan fosfor gibi önemli mineralleri çözündürerek bitkinin daha kolay alabileceği formlara çevirir (Rodriguez ve Fraga, 1999; Alsedeeri, 2016); (3) bitki gelişiminin çeşitli aşamalarını doğrudan artıran oksinler, poliaminler, gibberellinler ve sitokininler gibi birçok farklı fitohormonları veya bitki büyüme düzenleyicilerini sentezleyebilir (Nassar et al., 2003; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Alsedeeri, 2016); (4) demiri şelatlayabilen ve topraktan ayırıp, bitki hücrelerinin almasını sağlayabilen sideroforları sentezleyebilir ve salgılayabilirler (Matthijs et al., 2007; Alsedeeri, 2016); (5) bitki etilen seviyelerini düzenleyebilen 1-aminosiklopropan-1 karboksilik asit (ACC) deaminaz enziminin sentezleyebilir (Glick et al., 2007; Alsedeeri, 2016); ve (6) bitkilerde iyon alımının veya taşıma sistemlerini uyarabilirler (Mantelin and Touraine, 2004; Alsedeeri, 2016).

Belirli bir bakteri, bu mekanizmaların herhangi birini veya daha fazlasını kullanarak bitki büyümesini ve gelişimini etkileyebilmektedir. Ayrıca, birçok BGDR bitki büyümesini kolaylaştırmak için birkaç özelliğe sahip olduğundan, bir bakteri bitkinin yaşam döngüsü boyunca farklı zamanlarda farklı özellikler kullanabilmekte ve konakçısı olduğu bitkiye ve toprak bileşimine bağlı olarak etkinliğinde önemli ölçüde değişimler olabilmektedir (Glick et al., 2007; Alsedeeri, 2016).

Bitkiler besin açısından zengin topraklarda yetiştirildiği ve stres olmadan optimal koşullar altında yetiştirildiği zaman BGDR'nın bitki büyümesi üzerinde çok az veya hiç bir etkisi yoktur (Glick et al., 2007; Alsedeeri, 2016).

2.8.1.1 Azot Fiksasyonu

Azot (N) bitki büyümesi ve gelişimi için en önemli besin maddelerinden biridir. Atmosferde yaklaşık % 78 oranında N₂ vardır, ancak bu formdaki azot, bitkiler tarafından kullanılamaz. Biyolojik N₂ fiksasyonu, atmosferik N₂'nin, mikroorganizmaların nitrojenaz olarak bilinen kompleks bir enzim sistemini kullanarak bitkinin yararlanabildiği form olan amonyağa (NH₃) dönüştürüldüğü süreçtir (Kim and Rees, 1994; Alseederi, 2016). Bu işlem diazotropik mikroorganizmalarda, esas olarak bakteriler ve arkelerde gerçekleşmektedir. Azotlu kimyasal gübre kullanmak yerine, BGDR'nin biyolojik N₂ fiksasyonu, tarım için ekonomik olarak yararlı ve çevreye duyarlı bir alternatifi temsil etmektedir (Ladha et al., 1997; Alseederi, 2016).

Azot fikse edici organizmalar, simbiyotik azot fikse ediciler, örneğin legüminöz bitkilerle ile simbiyotik ilişkili Rhizobiaceae familyası üyesi Rhizobia ve simbiyotik olmayan, serbest yaşayan, endofitler ya da azot fiksasyonu ile ilişkili türler (Örneğin *Frankia*, siyanobakteriler (*Anabaena* ve *Nostoc*), *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Diazotrophicus*, *Azocarus* ve *Gluconoacetobacter*) olmak üzere farklı kategorilerde gruplandırılabilir. Ek olarak, az miktarda fikse edilmiş azot sağlayan simbiyotik olmayan azot fikse edici bakteriler de vardır (Glick, 2012; Alseederi, 2016). Diazotroflar, baklagil olmayan bitkilerde N₂'yi fikse edebilen ve konakçı bitkilerle zorunlu olmayan bir etkileşim oluşturan BGDR'nin türüdür. Azot, nükleik asitler ve proteinler gibi biyomoleküllerin sentezlenmesi için gerekli olan; tüm organizmaların ihtiyaç duyduğu bir elementtir (Franche et al., 2009; Alseederi, 2016).

Frankia sp., hem serbest halde hem de simbiyotik durumda azotu fikse edebilmektedir. Nitrojenazın esas olarak serbest yaşayan *Frankia* KB5'in veziküllerinde lokalize olduğu ve aynı zamanda hidrojenaz alımının da olduğu tespit edilmiştir. *Frankia* sp. Bacteria domaini içinde bugüne kadar tanımlanan 18 soy arasında en büyük taksonomik birimlerden biri olan aktinomisetlere aittir (Sellstedt and Richau, 2013).

Rizosferle ilişkili azot fikse edici bakteriler, şeker kamışı, pirinç, buğday, mısır ve şeker pancarı gibi baklagiller üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Sahin et al., 2004). Hububat ürünlerinde *Bacillus* türleri ile yapılan deneylerde verim artışları gözlenmiştir. Tahıl bitkileri (Cakmakci et al., 2001) ve mısır mahsullerinde (Pal, 1998) verim artışı ve büyüme artışı göstermiştir. Brezilya'da iyi bir örnek olarak, *B. elkanii* ve *B. japonicum* gibi farklı türlerde *Bradyrhizobium* sp. kullanılarak soya fasulyesi (*Glycine max* L.) üretiminin arttırılması, bu yararlı bakteriler tarafından azot fiksasyon mekanizmasının etkinliğini göstermiştir (Alsedeeri, 2016).

2.8.1.2 Fitohormonların sentezi

Rizosferde bulunan çok çeşitli mikroorganizmalar, oksin, sitokininler, gibberellik asit gibi doğrudan büyümeyi uyarıcı ve 1-aminosiklopropan-1-karboksilat deaminaz enziminin bakteriyel üretimi ile üretilen stres etileninin parçalanmasını sağlayan maddeler üretebilir (Gupta et al., 2015; De Souza et al., 2015).

Rizobakteriler bitki gelişimini fitohormon üretimi ile uyarabilir (Kudoyarova et al., 2014). En yaygın ve en çok çalışılan oksin olan indol-3-asetik asit (IAA) gibi bir fitohormon, normal ve stresli çevre koşullarında bitki büyümesinde ve gelişmesinde önemli rol oynar (Alsedeeri, 2016).

Oksin, büyütme veya büyüme anlamına gelen bir Yunanca kökenli bir kelimedir. Bitki hücre döngüsü boyunca, bitki büyümesinin ve gelişiminin birçok yönünü düzenleyen önemli bitki hormonu kategorisidir. Bunlar hücre bölünmesini, hücre uzamasını ve vasküler farklılaşmayı içerir. Ayrıca kök uzaması başlangıcı, somatik embriyogenez, apikal baskınlık, çiçeklenme, meyve olgunlaşması, yaşlanma, partenokarpi, dormansi ve polen olgunlaşmasına yardımcı olur (Alseeder, 2016).

İndol asetik asit (IAA) bir bitki büyüme düzenleyicisi ve oksin hormonunun aktif formudur. Bitki gelişiminde yaşam döngüsü boyunca önemli bir rol oynamaktadır (Vessey, 2003; Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016). IAA,

kök uzamasında bulunan apikal meristemin yanal köklerinin ve bölünmelerinin gelişimi sayesinde kök sisteminin gelişmesiyle birlikte radiküler sistemin büyümesini uyarmaktadır (Nicolas et al., 2004; Garrido et al., 2002). Bu, toprak besin maddelerinin bitkiye erişimini artırmaktadır (Vessey, 2003, Manulis et al., 1994). IAA'nın diazotropik bakteri aktivitesine bağlı azot fiksasyonu üzerinde, bitki büyümesinin teşvik edilmesinden sorumlu olan en önemli etken olduğu bildirilmiştir (Malhotra and Srivastava, 2009; Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

IAA, bitkilerde bulunan en yaygın doğal oksindir ve kök büyümesi üzerindeki olumlu etkiye sahiptir (Miransari and Smith, 2014). Tohum veya kök yüzeylerini kolonize etmiş Rizobakterilerin % 80'ine kadarı, indol asetik asidi sentezleyebildiği belirtilmiştir ve hücre proliferasyonunu uyarmak ve konakçının toprağın mineral ve besin maddelerini alımını arttırmak için endojen IAA ile birlikte hareket etmesi önerilmektedir (Vessey, 2003). İndol asetik asit, bitki hücre bölünmesini, uzamasını ve farklılaşmasını etkilmektedir. Aynı zamanda tohum ve yumru çimlenmesini uyarır, ksilem ve kök gelişimini artırır, vejetatif büyüme süreçlerini kontrol eder, yanal ve adventif kök oluşumunu başlatır; ışık, yerçekimi ve floresan tepkilerine aracılık eder; fotosentezi, pigment oluşumunu, çeşitli metabolitlerin biyosentezini ve stresli koşullara direnci etkiler (Spaepen and Vanderleyden, 2011; Gupta et al., 2015).

Triptofan, kök salgılarında yaygın olarak bulunan bir amino asit olup, bakterilerde IAA'nın biyosentezi için ana haberci molekülü olarak tanımlanmaktadır (Etesami et al., 2009). Bitki büyümesini destekleyici Rizobakteriler, indol asetik asidin biyosentezini, indol-3 piruvik asit ve indol-3-asetik aldehit yol izleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Gupta et al., 2015).

Ara bileşiklerin karakterizasyonu, ana prekürsör olarak L-triptofan kullanan farklı yolların tanımlanmasına yol açmıştır. Bakterilerdeki IAA sentezinin farklı yolları, bitkilerde IAA biyosentez yollarıyla yüksek derecede benzerlik göstermektedir (Spaepen et al., 2007). Faydalı bakteriler, ağırlıklı olarak, L-triptofan bağımlı bir alternatif yol olan indol-3-piruvik asit yol iziyle IAA sentezler. Fitopatojenik bakterilerde IAA, L-triptofandan indol-asetoamid yol izi

ile üretilir. *Azospirillum brasilense*'de, IAA üretimi için en az üç biyosentez yolu tanımlanmıştır. İki L-triptofan bağımlı (indol-3-piruvik asit ve indol-asetoamid yolları) ve bir L-triptofandan bağımsızdır. İndol-3-piruvik asit yolu ile aralarında en önemli olanıdır (De Souza et al., 2015). Bu, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* ve *Klebsiella* gibi bakterilerde en yaygın mekanizmadır. Serbest yaşayan BGDR, örneğin, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* genuslarına ait türlerin ve *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus* türlerinin, düşük düzeyde IAA salgılanması ile ilişkili oldukları bulunmuştur. Bununla birlikte, mikrobiyal olarak üretilen fitohormonlar, kimyasal olarak üretilen hormonların inhibitör ve uyarıcı seviyeleri arasındaki eşiğin düşük olmasından dolayı ve mikrobiyal hormonlar ise sürekli ve yavaş salınımları sayesinde daha etkilidir (Gupta et al., 2015).

Toprak mikroorganizmaları IAA sentezleme ve katabolizme yeteneğine sahiptir. Katabolize edilmiş IAA'nın kapasitesi, *B. japonicum* (Jensen et al., 1995) ve *Pseudomonas putida* 1290 (Leveau and Lindow, 2005)'da iyi karakterize edilmiştir. *P. putida* 1290, IAA'yı tek karbon (C), azot (N) ve enerji kaynağı olarak kullanır. IAA'nın kullanılmasına ek olarak, 1290 suşu ayrıca L-triptofan ile desteklenmiş kültür ortamında IAA üretmiştir. Bu suşun, turp bitkisi (*Raphanus sativus* L.) köklerinde, birlikte aşılama deneylerinde patojenik bakteriler *Rahnella aquaticus* ve *P. syringae* tarafından üretilen yüksek IAA konsantrasyonlarının olumsuz etkilerini en aza indirdiği bildirilmiştir. Bu bağlamda, IAA'yı katabolize eden mikroorganizmalar da bitkilerin büyümesini olumlu yönde etkileyebilmekte ve patojen atağını önleyebilmektedir (Leveau and Lindow, 2005; De souza et al., 2015).

IAA üretimi aktinobakterilerde yaygın olarak çalışılmıştır (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2009; Sousa et al., 2008). Bazı araştırmacılar, IAA'nın *Streptomyces atroolivaceus*'in, spor çimlenmesi için endojen düzenleyici rol oynayabileceğini ve aktinobakterinin farklılaşmasında rol oynayabileceğini öne sürmektedir (Manulis et al., 1994; Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

Streptomyces sp. (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2009; Sousa et al., 2008), *Frankia* sp. (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2009; Flores et al., 2003),

Nocardia sp. (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2009, Flores et al., 2003), *Kitasatospora* sp., IAA üreticileri olarak geniş çapta çalışılmıştır. Franco-Correa and Chavarro-Anzola (2016) tarafından yapılan çalışmalar, *Streptomyces* sp. ve *Thermobifida* sp. IAA üretme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. IAA üretimi için en önemli mikroorganizmanın *Streptomyces sannanensis* MCR14 olduğunu doğrulanmıştır (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

Birçok çalışma, birçok toprak bakterisinin, özellikle BGDR'nin, sitokininler üretebildiğini göstermiştir (Williams and De Mallorca, 1982; Glick, 2012). Örneğin, *Azotobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* sp., *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ve *Paenibacillus polymyxa* ve diğer bazı suşlar, üretim ortamlarında sitokininler üretmiştir. Bunlar, sitokinin veya gibberellin üretebildiği gibi, her ikisini de üretebilirler ve her ikisi de bitki büyümesi için teşvik edicidir (Kang et al., 2010). Bazı fitopatojen suşları sitokininleri sentezleyebilir, ancak BGDR fitopatojenlere kıyasla daha düşük sitokinin seviyeleri üretir. Bu durumda, BGDR'nin bitki büyümesi üzerindeki etkisi uyarıcı düzeyde olurken, patojenlerin ürettiği sitokininlerin etkisi inhibe edicidir (Gupta et al., 2015; Alsedeeri, 2016). Bitki hormonu olan sitokininler, bitkilerde birçok önemli büyüme ve gelişim sürecinin kontrolünde etkileşirler. Bu temelde kök ve sürgün gelişimi ve apikal hakimiyettir. *Bacillus megaterium* suşlarının sitokininler ürettiği ve hıyar büyümesini desteklediği bulunmuştur (Alsedeeri, 2016).

Aktinomisetlerin de IAA, sitokininler ve gibberellin benzeri maddeler ürettiği bulunmuştur (Shutsrirung et al., 2013). Ruanpanun ve ark., (2010) *Aspergillus* ve *Streptomyces* gibi yüksek IAA üreten fungal izolatları ve nematofaj aktinomiseti keşfetmişlerdir (Egamberdieva et al., 2017).

Etilen, solgunluğun daha az olmasını sağlamak, kök oluşumunu, kök uzamasını, meyve olgunlaşmasını, tohum çimlenmesini, yaprak absisyonunu teşvik etmek ve diğer bitkisel hormonların sentezini aktive etmek dahil olmak üzere bitki büyümesini ve gelişimini etkileyebilen çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip temel bir fitohormondur (Glick et al., 2007). Etilenin yüksek konsantrasyonu yapraksızlaştırmaya ve diğer hücresel süreçleri azaltarak ürün

performansında azalmaya neden olur (Bhattacharyya and Jha, 2012). 1-aminosiklopropan-1 karboksilik asit (ACC) deaminaz enzimi, ACC oksidaz tarafından katalize edilen etilen üretimi için bir ön koşuldur (Gupta et al., 2015). Bu enzim daha yüksek bitkilerde etilen biyosentezinin ara prekürsörü olan 1-aminosiklopropan-1 karboksilik asidi, α -ketobutirat ve amonyak haline getirerek metabolize eder (Jha and Saraf, 2015). Bu bakteriyel enzim ACC'yi tersinmez bir şekilde parçalayabilir (Alsedeeri, 2016).

ACC deaminaz içeren *Pseudomonas* sp.'nin bitki büyümesini teşvik eden suşlarının *Rhizobium leguminosarum* ile birlikte inokülasyonu yoluyla etilen üretiminin düşürülmesi sonucu nodül sayısı, nodül kuru ağırlığı, taze biyokütle, tane verimi, saman verimi ve azot içeriğinin arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirmiştir. Günümüzde, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia* ve *Rhizobium* gibi birçok cinsten ACC deaminaz aktivitesi gösteren bakteriyel suşlar tanımlanmıştır (Kang et al., 2010; Gupta et al., 2015).

Son zamanlarda, aktinomisetlerin, ACC deaminaz etkisi ile tuzluluk ve ozmotik stres dahil olmak üzere çeşitli abiyotik stresleri hafifletmesinin yanı sıra bitki büyümesini teşvik ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, ACC deaminaz üreten endofitik aktinomisetin stres koşullarında bitki büyümesini desteklemedeki rolü, sistematik olarak henüz araştırılmamıştır (Jaemsaeng et al., 2018).

Bu araştırmacıların yaptığı çalışmadaki sonuçlar, *Streptomyces* sp. strain GMKU 336, tuza duyarlı Tay yasemin pirinci Khao Dok Mali 105 çeşidinin (KDML105) fizyolojisi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Tuzsuz koşullar altında, KDML105 ACC deaminaz üreten *Streptomyces* sp. strain GMKU 336, gövde ve kök biyokütlesini önemli ölçüde artırmıştır, ancak belirgin olarak uzatılmış filiz ve kök uzaması gerçekleşmemiştir. Bunun nedeni, bu suşun IAA üretimindeki eksikliğe bağlı olabildiği bildirilmiştir. Elde ettikleri diğer sonuçlara göre ise, GMKU 336 suşu, *Oryza sativa* L. KDML105' de iyon dengesinin korunmasına yardımcı olmuştur (Jaemsaeng et al., 2018).

ACC deaminaz üreten *Streptomyces*, domates, *Arabidopsis*, halofitik *Limonium sinense* ve şeker kamışı büyümesini artırabilmektedir (Jaemsaeng et al., 2018).

2.8.1.3 Fosfat Çözünürlüğü Aktivitesi

Fosfor, bitkinin azottan sonra ihtiyaç duyduğu ikinci en önemli makrobesin olup, bitki büyümesi ve gelişimi için gerekli besin maddelerinden biridir (Aslantas et al., 2007). Bununla birlikte, fosfor rezervleri sınırlıdır ve dünya çapında kademeli olarak tükenmektedir (Alseederi, 2016).

Temel makrobesinler, bitkilerin hayatta kalması ve büyümesi için hayati bir fonksiyona sahiptir. Bu besinler, toprakta çözünür formlarda bulunurlar. Büyüme, verim, gelişme ve tohum oluşumu için fosfor gereklidir. Fosfor, fotosentez, enerji transferi, sinyal iletimi, makromolekülerin biyosentezi ve solunum gibi birçok mekanizmada yer alır (Sashidhar and Podile, 2010; Kaur and Reddy, 2015). Ek olarak, nükleik asitlerin, fosfolipitlerin yapısal bileşenine katıldığı için bitkiler için önemli bir besin maddesidir. Ayrıca, adenosin trifosfat (ATP) oluşumuna katıldıklarında biyolojik azot fiksasyonu ile fotosentez gibi metabolik ve biyokimyasal yollarda da rol oynamaktadır (Richardson and Simpson, 2011; Alseederi, 2016).

Fosfor, toprakta organik ve inorganik formlarda bulunur. Bitkiler için bu mevcut formlardaki fosfor miktarı, büyük miktarlarda bile düşük sayılmaktadır. Topraklarda fosforun mevcudiyeti, 1 $\mu\text{mol/L}$ civarındadır. Oysa bitkilerin maksimum üretkenlik için ihtiyaç duyduğu fosfor miktarı yaklaşık 30 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Bunun nedeni, bulunan toprak fosforunun çoğunluğunun çözünmez formlarda bulunması ve bitkilerin bu çözünmez formdaki fosforu absorbe edememesidir. Fosforun iki çözünebilir şekli monobazık (H_2PO_4) ve dibazık (HPO_4^{2-}) iyonlarıdır (Bhattacharyya ve Jha, 2012; Alseederi, 2016).

Fosfor, büyük miktarlarda kimyasal gübreler olarak uygulanmaktadır (Aslantas et al., 2007). Bu kimyasallar ciddi çevresel etkilere ve yüksek maliyete sahiptir. Ayrıca toprak yapısını, bileşimini, mikroflorayı ve diğer toprak

özelliklerini de etkilemektedir (Sashidhar and Podile, 2010; Kaur and Reddy, 2015). Topraktaki fosfor eksikliğinin üstesinden gelmek için fosfatlı gübreler uygulanmaktadır. Ancak az miktarda gübre bitki tarafından emilmekte ve geri kalan kısım hızla toprakta çözünmez komplekslere dönüştürülmektedir. Fosfat gübrelerin uygulanması çevresel olarak zararlı ve maliyetlidir. Düşük fosfatlı topraklarda ekin üretimini iyileştirmek için ekonomik ve ekolojik açıdan iyi bir seçenek için sürekli araştırmalar yapılmaktadır (Alseederi, 2016).

Fosfor eksikliğinden dolayı dünya çapında 2 milyar hektardan fazla tarım arazisinin verimliliğinde azalma gerçekleşmiştir (Kaur and Reddy, 2015). Bu nedenle fosfor çözücü bakterileri içeren agronomik muamele, fosfor alımını artırarak bitki beslenmesi için önemlidir. BGDR, kimyasal gübre ihtiyacını azaltır ve olumsuz çevresel etkileri azaltır (Aslantas et al., 2007; Sashidhar and Podile, 2010; Alseederi, 2016).

BGDR, inorganik çözünmez fosfatları biyolojik olarak uygun fosfat formlarına dönüştürme yeteneğine sahiptir. Fosfatın çözünmeyen formlarının, bitkinin fayda sağlayabileceği ve besinsel hareketlilik olarak adlandırılacak çözülebilir formlara dönüştürülmesi için fosfat çözünürleştirici bakteriler (FÇB) tarafından kullanılan farklı mekanizmalar vardır. Bunun, bitki büyümesini ve dolayısıyla ürün verimi ile üretkenliğini arttırdığı bildirilmiştir (Liu et al., 2015; Alseederi, 2016).

Tipik olarak, inorganik fosfor, çeşitli toprak bakterileri tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı organik asitlerin etkisi ile çözülür. Ayrıca, organik fosforun mineralizasyonu, çeşitli farklı fosfatazların sentezi ve fosforik esterlerin hidrolizini katalize ederek oluşur (Glick, 2012; Alseederi, 2016).

Mineral fosfor çözünmesi, FÇB'in çözünmeyen fosfat formlarını çözünebilir forma dönüştürdüğü bir süreçtir ve bitkiler ancak bu fosfat formlarını kullanabilmektedir. FÇB, şelatlama, asitleştirme, iyon değişimi ile glikonik, keto-glukonik, laktik asit ve sitrik asit gibi organik asitlerin üretimini gerçekleştirerek toprak asiditesini artırmaktadır (Pereirra ve Castro, 2014; Kaur and Reddy, 2015; Liu et al., 2015; Alseederi, 2016).

Organik asitler vasıtasıyla, mikroorganizmalar, çözünmeyen fosfat bileşiklerinden fosfatların salınması ile birlikte iki değerlikli Ca^{2+} kationlarını şelatlama maddeleri olarak iyi çalışırlar. Metal iyonlarıyla birlikte bulunan çözünebilir kompleksler, çözünmez fosfat ile ilişkili olarak organik asitlerden de oluşabilir ve böylece yine fosfat açığa çıkmaktadır. Fosfat çözünürleştirici mikroorganizmaların (FÇM) ortamın pH'ını düşürme şekilleri ya H^+ ekstrüzyonu ya da asetik, malik, laktik, tartarik, süksinik, glukonik, 2-ketoglukonik, sitrik, oksalik asitler ve benzeri organik asitlerin salgılanmasıdır. 1903'ten beri, inorganik fosfatların çözündürülmesinde mikroorganizmaların varlığı bilinmektedir (Alseeder, 2016).

Bir başka mekanizma, organik fosfatların organik fosfatazlar ve fitazlar gibi çeşitli enzimlerin üretilmesi ile mineralleştirilmesidir. Fitaz aktivitesine sahip toprak bakterileri, organik fosfat formunu serbest bırakmaya katkıda bulunur. Bu nedenle, çözünmez fosfor formlarının bitki tarafından alınabilir formlara dönüştürülmesini kolaylaştıran ortak mekanizmalar organik asit üretimi ve fosfat enzimleri salgılanmasıdır (Pereirra ve Castro, 2014; Alseederi, 2016).

Organik fosforlu bileşiklerin çoğunun mineralizasyon işlemi fitaz, fosfataz, fosfonoasetat hidrolaz, D- α -gliserofosfataz ve C-P liyaz gibi enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Arpa, mısır ve buğday gibi farklı bitkilerin rizosferindeki çeşitli fosfatazların aktiviteleri çalışılmıştır. Bu çalışmalar, fosfataz aktivitesinin, nötr ve asidik toprak pH'ında, iç rizosfer bölgesinde önemli olduğunu göstermiştir. Toprak bakterileri, *Rhizobium*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter* ve *Klebsiella* türlerinin yanı sıra *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri önemli seviyelerde asit fosfataz üretmektedirler (Alseederi, 2016). Bu tür fosforlu biyofertilizatörlerin bakteri biçiminde uygulanması, bitki büyümesi ve gelişimi için çözünme yoluyla birikmiş fosfatların mevcudiyetini kolaylaştıracaktır (Alseederi, 2016).

Çeşitli fosfat çözücü bakteriler, farklı bitkilerin köklerinden ve rizosferik toprağından izole edilmiştir. Pirinç bitkileri ile ilişkili 336 suş arasında, De Souza ve ark., (2013), trikalsiyum fosfatı çözüdürebilen *Burkholderia*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* ve *Pseudomonas* cinslerine ait 101 izolatu

tanımlamışlardır. Ambrosini ve ark., (2012), ayçiçeği bitkileri ile ilişkili *Burkholderia* suşlarının trikalsiyum fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) çözündürülmesinde baskın olduğunu göstermiştir. Chen ve ark., (2006), daha önce *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium* ve *Delftia* cinslerine ait birkaç fosfat çözücü bakteri suşunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca, sitrik, glukonik, laktik, süksinik ve propionik asitler gibi bakteriyel suşlar tarafından üretilen çeşitli organik asitleri de tanımlamışlardır (De Souza et al., 2015).

Qin ve ark., (2011), *Rhizobia*'nın inorganik fosfatı çözündürme yeteneğinin rizosfer asitleşmesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca, *Rhizobium* ile aşılama, özellikle $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 'nin birincil fosfor kaynağı olduğu soya fasulyesi bitkileri tarafından fosfor alımını arttırmıştır. Fosfor çözücü diazotrofik endofitler olan, *Herbaspirillum* ve *Burkholderia* ile pirinç bitkisini aşılama $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ve 15-N etiketli gübre ile toprakta yetiştirilen bitkilerde tane verimi ve besin alımını arttırmış, bu da fosfat çözücü diazotrofik bakterinin seçiminin ve kullanılmasının fosfat çözündürme için etkili bir strateji olduğunu göstermiştir (De Souza et al., 2015).

Çeşitli çalışmalar fosfat çözücü bakterilerin, topraklardan veya rizosferlerden izole edildiğini bildirmiştir. Endofitlerin, fosfat çözündürme için önemli olduğu doğrulanmış, manyok (*Manihot esculenta* C.) köklerinden izole edilen endofit *Pantoea dispersa*'nın, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 ve AlPO_4 'ü etkin bir şekilde çözündürdüğünü, salisilat, benzen-asetik ve diğer organik asitleri ürettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, *P. dispersa*'nın toprağa aşılama bir mikrobiyal popülasyonda çözünebilir fosfor konsantrasyonunu arttırmıştır, bu da toprak mikrobiyal çeşitliliğini arttırmıştır. Bu ise bir endofitin toprak ortamına uyum sağladığını ve fosforun salınmasını teşvik ettiğini göstermiştir (De Souza et al., 2015).

Toprak ayrıca bitki büyümesi için bir fosfor kaynağı olabilen çok çeşitli organik substratlar içerir. Organik fosfor formları, özellikle fitatlar çoğu toprakta baskındır (toplam fosfatın % 10-50'si) ve fitazlar tarafından mineralize edilir. Fitaz aktivitesine sahip bakteriler, rizosferden izole edilmiş ve yüksek organik

içeriğe sahip topraklarda kullanılmak üzere BDGR olarak önerilmiştir. *Advenella* olarak tanımlanan bakteriyel izolatlar, fitaz üretimi için pozitifdir ve Hint pirinci (*Brassica juncea*) fosfor içeriğini ve büyümesini arttırmıştır (De Souza et al., 2015).

Başka bir çalışmada, Hint hardalı büyümesini destekleyen ve fosfor içeriğini önemli ölçüde arttıran *Tetratiobacter* ve *Bacillus* genusuna ait fitaz üreten bakteriler rapor edilmiştir (De Souza et al., 2015). Idriss ve ark., (2002), *B. amyloliquefaciens* FZB45'den elde edilen ekstrasellüler fitazın mısır fidelerinin büyümesini desteklediğini bildirmişlerdir. Fitaz üretimi diğer rizosfer bakterilerinde, örneğin *Bacillus* sp., *Cellulosimicrobium* sp., *Acetobacter* sp., *Klebsiella terrigena*, *Pseudomonas* sp., *Paenibacillus* sp. ve *Enterobacter* sp.'de saptanmıştır. Ayrıca, her iki aktiviteye sahip bakteriler, inorganik fosfatı çözündürmek için organik asit üretimi ve fitatın mineralleştirilmesi için fitaz üretimi, uzun ömürlü çim (*Lolium perenne* L.), beyaz yonca (*Trifolium repens* L.), buğday, yulaf (*Avena sativa* L.) ve sarı lupin (*Lupinus luteus* L.) gibi farklı bitkilerin rizosferlerinden izole edilmiştir (De Souza et al., 2015).

Aktinomisetlerin fosforu çözündürmek için kullandıkları mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da, çözündürme işleminde, inorganik fosfor ve bazı organik asitlerin (esas olarak oksalik ve sitrik) yer aldığı bilinmektedir (Gyaneshwar et al., 2002; Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

Salcedo ve ark., (2014), fosforun çözündürülme miktarları ve fosforun çözündürülmesiyle ilişkili organik asitleri bildirmiştir. Benzer şekilde diğer bazı araştırmacılar, organik asitlerden farklı bazı bileşiklerin (viridomiken ve siderofor ailelerinin metabolitleri) fosfatın çeşitli kaynaklardan çözünmesini sağlayabildiğini bilmişlerdir. Bu durum ise, araştırmacıları bu organizma grubu tarafından üretilen inorganik fosforun çözündürülmesi işlemi hakkında daha fazla araştırmaya itmektedir. Bu da, bu organizmalar tarafından oluşturulan fosforun, inorganik çözünme süreciyle ilgili daha fazla bilgiye sahip olunmasına neden olmuştur (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

Streptomyces MCR26'nın asit fosfatazları salgılama kapasitesine ve dolayısıyla organik fosfor kaynaklarının mineralizasyon kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Franco-Correa et al., 2010; Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016). Ek olarak, daha önce fosfat-mineralize edici mikroorganizmalar olarak rapor edilmeyen aktinobakteriler tanımlanmış ve *Saccharopolyspora*, *Thermobifida* ve *Thermonospora* cinsleriyle ilişkili oldukları bulunmuştur. *Micromonospora* sp., *Nocardia* sp., *Actinomadura* sp., *Rhodococcus* sp., *Actinoplanes* sp., *Microbispora* sp. ve *Streptosporangium* sp. reaksiyon koşullarına bağlı olarak alkalın veya asit aktivitelerine göre sınıflandırılmış fosfataz enzimleri üretmektedir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

Rizosfer toprağından izole edilen FÇB'nin, toprağıın kültüre edilebilir mikroorganizma popölasyonunun yaklaşık % 20 ile 40'ı oluşturduğu tahmin edilmektedir. Farklı bitkilerden izole edilen rizosfer FÇB'nin, rizosfer dışındaki kaynaklardan izole edilenlere göre metabolik olarak daha dinamik olduğu bilinmektedir (Alseederi, 2016).

Çevre dostu ve sürdürülebilir tarım uygulamalarına ihtiyaç olduğu için BGDR, tarımsal sürdürülebilirliğe yardımcı olan ve mahsul verimliliğini artıran önemli bir mikrobiyal aşılarda grubudur. Bu nedenle, kimyasal gübrenin yararlı bakterilerle birleşimi, besinsel kayıp olmadan tarımsal verimi arttırmanın yollarından biridir (Alseederi, 2016).

2.8.1.4 Siderofor Üretimi

Demir (Fe), neredeyse tüm canlı mikroorganizmaların büyümesi için temel bir elementtir. Enzimatik süreçlerde, oksijen metabolizmasında, elektron transferinde ve DNA, RNA sentezlerinde katalizör görevi görmektedir. Demir, biyofilm oluşumu için de gereklidir çünkü yüzey hareketliliğini düzenlemektedir ve polisakkarit matriksini stabilize etmektedir. Demir eksikliği olan büyüme koşulları altında, yüzey protein bileşimini değıştiren ve biyofilm oluşumunun sınırlandırılmasına yol açan mikrobiyal yüzey hidrofobikliği azalmaktadır. Dolayısıyla, ortamdaki demirin düşük biyolojik mevcudiyeti nedeniyle,

mikroorganizmalar, siderofor üretimi gibi spesifik alım stratejileri geliştirmiştir (Ahmed and Holmström, 2014).

Sideroforlar (Yunanca: “demir taşıyıcılar”), düşük demir stresi altında büyüyen bakteriler ve funguslar tarafından geliştirilmiş nispeten düşük moleküler ağırlıklı, spesifik ferrik demir iyonu şelatlama ajanları olarak tanımlanır (Neilands, 1995). Sideroforlar, mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından, özellikle demir açısından fakir koşullar altında üretilen düşük molekül kütleli (200-2000 Da) metal şelatlama maddeleridir. Fitoplankton ve siyanobakteriler gibi deniz organizmaları da siderofor üretebilmektedir (Ahmed and Holmström, 2014).

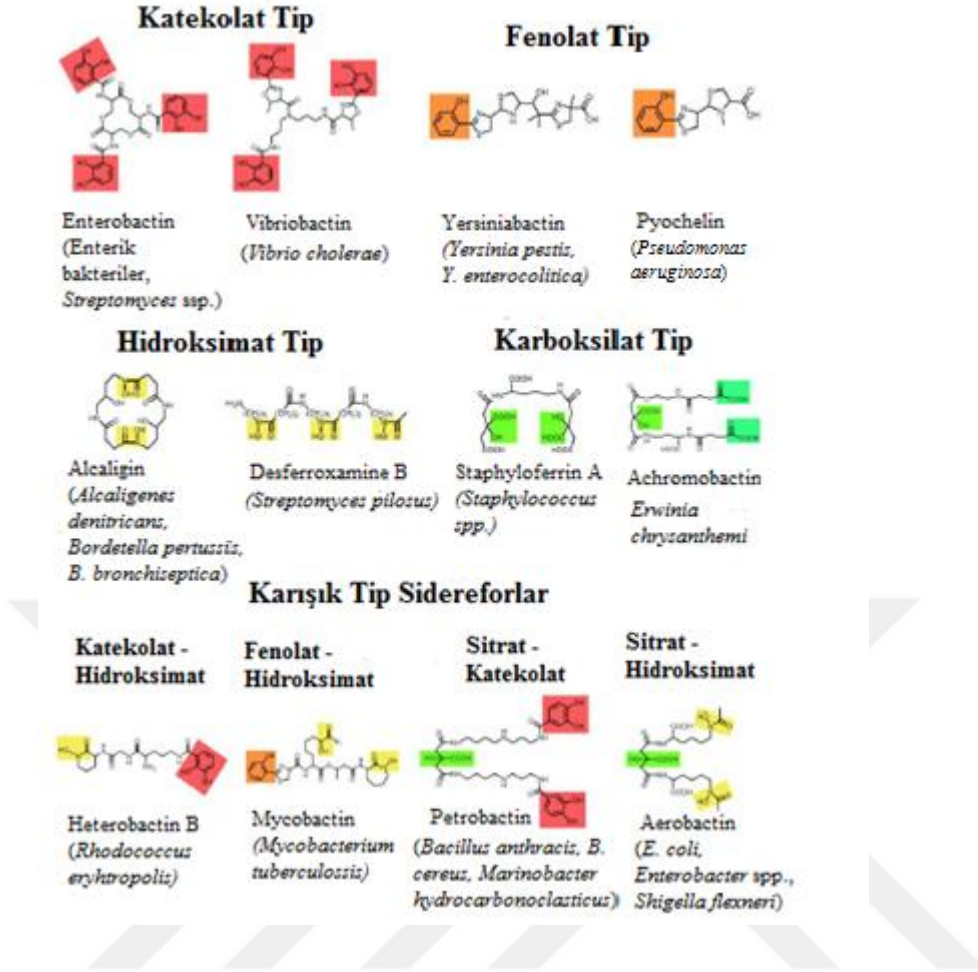
Dünyanın aerobik atmosferi, yüzey demirinin, çok sınırlı bir çözünürlüğe sahip oksihidroksit polimerlerine dönüştürülmesine neden olmuştur. Nötr pH'ta serbest ferrik iyon konsantrasyonu, ferrik hidroksitin çözünürlük ürün sabiti tarafından belirlenmektedir. Bu sabit için seçilen değere bağlı olarak, biyolojik pH'ta çözelti içinde kompleks olmayan ferrik iyonun maksimum miktarı muhtemelen 10-18 molardan daha büyük olmamaktadır. Aerobik koşullar altında büyüyen mikroorganizmaların ATP sentezi için oksijenin azaltılması, DNA'nın ribotid prekürsörlerinin azaltılması, hem oluşumu ve diğer önemli amaçlar ile çeşitli işlevler için demir ihtiyacı vardır. Optimum büyüme için en az bir mikromolar demir seviyesi gereklidir. Bu çevresel kısıtlamalar ve biyolojik zorunluluklar, mikroorganizmaların demirin ferrik hali için hidroksil iyonu ile etkin bir şekilde rekabet edebilecek spesifik moleküller (siderofor) oluşturmalarını gerektirmiştir (Neilands, 1995).

Tüm mikroorganizmaların demire ihtiyaç duymadıkları ve bu gibi durumlarda sideroforların görülebileceği vurgulanmalıdır. Bazı laktik asit bakterileri demir ile daha fazla büyümeye teşvik edilemezler, hiçbir hem enzimi içermezler ve önemli miktarda demir içeren ribotid redüktaz enzimi yerine, radikal jeneratör olarak bilinen adenosilkobalamin içermektedir. Diğer mikroorganizmalar demire ihtiyaç duyarlar ancak Fe (II) üzerinde anaerobik olarak büyüebilirler. Neredeyse tüm funguslar siderofor üretirken, tomurcuklanan mayalar ve fisyon mayalarının istisnalar olduğu görülmektedir (Neilands, 1995).

Sideroforların rolü öncelikle demiri şelatlamaktır ama aynı zamanda çevrede diğer temel elementlerle de (Mo, Mn, Co ve Ni) kompleksler oluşturur ve bunları mikrobiyal hücreler için kullanılabilir hale getirirler (Ahmed and Holmstörn, 2014).

Anabolizmine ilişkin en büyük bilgiye sahip olduğumuz siderofor ilk olarak *Aerobacter aerogenes*'den izole edilen aerobaktindir. Daha sonra, *Escherichia coli*'nin klinik izolatları tarafından yaygın olarak taşınan bir plazmid olan pColV-K30'un bir ürünü olarak tespit edilmiştir (Neilands, 1995).

Sideroforlar, Fe (III) koordinasyonu için kullanılan fonksiyonel grubun veya grupların kimyasal yapısına bağlı olarak üç ana sınıfa ayrılabilir. Bu sınıflar, katekolatlar, hidroksimatlar ve α -hidroksi-karboksilatlardır. “Karışık tip” olarak adlandırılan bir dördüncü grup, yukarıdaki tiplerden herhangi birinin kombinasyonunu demiri şelatlamak için kullanmaktadır. Vurgulanan fonksiyonel gruplar ile her bir siderofor sınıfının örnekleri Şekil 2.10'da gösterilmektedir. Funguslar, bakteriler ve bitkilerin hepsinin, siderofor üretebilen temsilcileri olduğu bilinmektedir (Wright, 2010).



Şekil 2.10. Her bir siderofor sınıfının örnekleri (Wright, 2010).

Sideroforların hidroksamat familyası, bazı açılardan, ferrokromun, mikrobiyal kaynaklardan elde edilen doğal bir demir ürünü olarak kabul edilen serilerinin ilk üyesi olması nedeniyle, klasik siderofor çeşitliliğini göstermektedir. Ekzoşelin, aerobaktin, rizobaktin 1021, şizokinen ve alkaligin dahil olmak üzere bu sideroforların birçoğu, demir bağlamak için iki hidroksamat grubu kullanır. Bunlar, dihidroksamat sideroforları olarak bilinir ve hem gram-pozitif (ekzoşelin) hem de gram-negatif bakteriler tarafından üretildiği bildirilmiştir (alkaligin). Ayrıca memeli konakçıların (aerobaktin) fırsatçı patojenleri ve toprak kaynaklı bitki simbiyontları (rizobaktin 1021 ve şizokinen) tarafından da üretilirler (Wright, 2010).

Katekolat ya da katekol tipi sideroforlar, bakteriler tarafından şimdiye kadar üretilmiş olan, en yaygın ikinci sınıftır. Ferrik demiri şelatlamak için kullanılan ve dihidroksibenzoik asitten türetilmiş bir monofil dihidroksibenzoik asit rezidüsü

içerdiği bulunmuştur. Çalışılan en iyi katekol tipi siderofor örneği, *E. coli* tarafından üretilen, enteroklin olarak da adlandırılan enterobaktin'dir (Wright, 2010).

1985'te rizobaktin DM4'ün keşfinden bu yana, karboksilat tip siderofor sınıfının birinci temsilcisi olarak, her üç domainde de (Bacteria, Archaea ve Eukarya) üretilen tek siderofor olduğu bilinmektedir. Bu gruba ait diğer sideroforların örnekleri arasında *Staphylococci*'den staphyloferrin A ve B, *Vibrio parahaemolyticus*'tan vibrioferrin, Mucorales funguslarından fungal rizoferrin ve *Ralstonia pickettii* tarafından üretilen bakteriyel rizoferrin yer almaktadır (Wright, 2010).

Mikrobiyal sideroforların demirin biyolojik varlığının düşük olduğu durumlarda, büyümelerini arttırmak için bitkilere demir sağladığı bilinirken, tam mekanizma pek fazla bilinmemektedir. Bitkilerin demiri mikrobiyal sideroforlardan alabildiği iki olası mekanizma önerilmiştir: (i) mikrobiyal sideroforlar yüksek redoks potansiyelini azaltarak, Fe (II) 'nin bitkinin taşıma sistemine bağlanmasını sağlayabilmektedir. Bu mekanizmada, mikrobiyal Fe (III) -sideroforlarının, siderofor indirgemesinin gerçekleşebileceği yer olan bitki kökünün apoplastına taşındığı hipotezi ortaya atılmıştır. Sonuç olarak, Fe (II) apoplastta tutulur ve bu da kökte yüksek Fe konsantrasyonlarına yol açar. (ii) Mikrobiyal sideroforlar demiri topraktan şelatlayabilir ve daha sonra fitosideroforlarla bir ligand değişimi yapabilirler. Bu mekanizma çeşitli parametrelere, yani hem mikrobiyal hem de fitosideroforların kararlılık sabitleri ve konsantrasyonlarına ve kök ortamın pH ve redoks koşullarına bağlıdır. (Ahmed and Holmstörn, 2014).

Çeşitli çalışmalar, sideroforların büyük ölçüde bitkilerle ilişkili bakteriyel suşlar tarafından üretildiğini göstermiştir. Bu özellik, ayçiçeği (*Helianthus annuus* L., Ambrosini et al., 2012) ve pirinç ile ilgili izolatlarda bulunan en yaygın özelliktir. Özellikle, pirinç köklerinde, *Enterobacter* ve *Burkholderia* genuslarına ait izolatlar en yüksek düzeyde siderofor üretimini gerçekleştirmiştir. Costa ve ark., (2014) eş zamanlı olarak, biyoprospeksiyon için benzer metodolojileri kullanan yedi bağımsız çalışmadan BGDR veri kümelerini analiz etmiş ve tüm

izolatların % 64'ünün ve tüm bakteri türlerinin ise % 100'ünün siderofor üreten suşları içerdiğini gözlemlemiştir. Bakteriyel cinsler arasında, *Burkholderia*, *Enterobacter* ve *Grimontella*, yüksek siderofor üretimi gerçekleştiren, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum* ve *Citrobacter* türleri, düşük siderofor üretimi gerçekleştiren suşlardır (De Souza et al., 2015).

Bakterilerin siderofor salgısı, bitki büyümesini teşvik edebilmekte, böylece beslenmeyi (doğrudan etki) artırabilmektedir veya demirin ortamdan ayrılması yoluyla fitopatojenlerin (dolaylı etki) varlığını engelleyebilmektedir. Mikrobiyal patojenlerin aksine, bitkiler bakteriyel aracılı Fe tükenmesinden etkilenmez ve bazı bitkiler Fe(III)-siderofor bakteriyel kompleksleri bile yakalayabilir ve kullanabilirler. Endofitik siderofor üreten bakterilerin rolü nadiren incelenmiştir. Bununla birlikte, siderofor üretme yeteneği bitki dokularının kolonizasyonu için endofitik bakterilere ve aynı ekolojik nişten diğer mikroorganizmaların dışlanmasına karşı rekabet avantajları sağlamaktadır. Bu araştırmacılar, pirinç bitkisinin kökleri ile ilişkili olan endofitik siderofor üretici bakteriler topluluğunun, tohum doldurma aşamalarındaki toprağa göre daha zengin olduğunu gözlemlemiştir. *Burkholderia* genusuna ait endofitik bakteriyel suşlar pirinç bitkileri içinde öncelikli lokalizasyon göstermiştir ve rollerinin *Sclerotium oryzae* ve *Rhizoctonia oryzae* fungusları tarafından genç bitkilerin enfeksiyonunu önlemek için uygun olduğu görülmüştür (De Souza et al., 2015).

Mısır bitkisinde, *Bacillus* genusuna ait endofitik suşlar, siderofor üretimi ile bitki büyümesi teşvik edici özellikler gösterir ve bu etki, *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris maydis* ve *Cercospora zea-maydis* funguslarına karşı bir çeşit antifungal etkidir. *Azospirillum brasilense* (REC2, REC3) tarafından üretilen sideroforlar, *Colletotrichum acutatum*'a (antraknozün nedensel ajanı) karşı in vitro antifungal aktivite göstermiştir. Ayrıca daha önce *A. brasilense* ile rizosferi aşılantı olan çilek (*Fragaria vesca*) bitkilerinde hastalık semptomlarında azalma gözlenmiştir (De Souza et al., 2015).

Siderofor üreten aktinomisetler, *Actinomadura madurae*, *Nocardia asteroides* ve *Streptomyces griseus*'u içerir. Aktinomisetler, hem hidroksimat hem de salisilat tiplerinde siderofor üretmektedir (Kannahi and Senbagam, 2014).

En yüksek siderofor üretimi, *Streptomyces* MCR24 tarafından gerçekleştirilmektedir. En düşük kaydedilen seviyedeki siderofor üretimi ise, *Streptomyces* MCR30'da gözlenmiştir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016). *Streptomyces* MCR3 ve *Thermobifida* gibi aktinobakteri suşlarının, tek başına karbon kaynağı olarak glikoz kullanarak hidroksamat tipinde siderofor sentezini gerçekleştirdiklerini kanıtlanmıştır. *Streptomyces* sp.'de bu mikroorganizma ile hidroksamat tip siderofor, desferrioksamin B'nin üretimi iyi belgelenmiştir. Öte yandan, *Thermobifida*, yakın zamanda fuscachelin A olarak bilinen bir siderofor çeşidinin üreticisi olarak bildirilmiştir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

2.8.2 Bitki gelişimini destekleyici bileşiklerin dolaylı etki mekanizmaları

Bitki büyümesinin BGDR ile desteklenmesinin dolaylı etki mekanizmaları, çeşitli metabolitlerin üretimiyle ilgilidir. Bunlar, (1) antifungal ve antibakteriyel metabolitlerin üretimi ile patojenik fungus ve bakterilerin aktivitelerini azaltarak bitki büyümesini arttıran hücre duvarı parçalayıcı enzimler (örn. kitinazlar, β -1, 3 glukanazlar) (2) patojenlerin büyümesi için gerekli olan demiri tutabilen sideroforlar (3) amonyak ve hidrojen siyanür(HCN) üretimi, (4) habitat ile besin için rekabet ve (5) indüklenmiş sistematik direnç (ISD)'tir (Alsedeeri, 2016).

2.8.2.1 Antimikrobiyallerin üretimi ve litik enzimler

Bakteriler, genellikle bir dizi farklı antibiyotiklerin sentezi ile bitki patojenlerinin çoğalmasını önleme yeteneğine sahiptir (Compant et al., 2005). Bu antibiyotiklerin birçoğu detaylı bir şekilde incelenmiş ve bazı biyokontrol suşları ticarileşmiştir. Bu tür antibiyotik üreten bakterilerin biyokontrol ajanları olarak artan kullanımının, bazı fitopatojenlerin spesifik antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmesi ise bir problemdir. Bu yüzden araştırmacılar, hidrojen siyanürü bir veya daha fazla antibiyotikle birlikte sentezleyen biyokontrol suşlarını

kullanmaktadır. Hidrojen siyanürün, bakteriyel olarak kodlanmış antibiyotiklerle sinerjik olarak etki ettiği anlaşılmaktadır. Diğer biyokontrol bakterileri, selülaazlar, kitinazlar, proteazlar, β -1,3 glukanazlar ve lipazlar dahil olmak üzere çeşitli enzimler üretmektedir. Bu enzimler, birçok patojen fungusun hücre duvarlarının bir bölümünü parçalama yeteneğine sahiptir. Bu enzimlerin bir veya daha fazlasını sentezleyen BGDR'nin, *Sclerotium rolfsi*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* sp., *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani* dahil olmak üzere geniş yelpazedeki patojenik funguslara karşı biyokontrol aktivitesi olduğu bulunmuştur (Alseeder, 2016).

Fusarium oxysporum, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* ve *Verticillium dahliae*'ye karşı yedi aktinobakteri türünün kitinolitik aktivitesini değerlendirmek amacıyla bir dizi deney yapılmıştır (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016). Ek olarak, bitki büyüme düzenleyicisi olarak yeteneği de dikkate alınmıştır. Suşların fitopatojenik mantarlara karşı antagonizma testlerinde yüksek, orta veya düşük düzeyde inhibisyon gösterdiği, ancak *F. oxysporum*'un en dirençli fungus suşu olduğu gözlemlenmiştir. Farklı aktinomisetler, antibiyotik (antibiyosis) üreterek *F. oxysporum*'un antagonistik mikroorganizmaları olarak hareket edebilmektedir. Bu bileşikler, ortam boyunca yayılarak, fitopatojenik fungusların büyümesini engeller. Bazı araştırmacılar *Nocardia* sp. (rizosfer toprak numunesi likeninden (Mosquera, Kolombiya) izole edilen suş) tarafından üretilen bir antibiyotik olan aktinomisin ile *Fusarium oxysporum*'ın büyümesinin in vitro inhibisyonunu belirlemişlerdir. Bu tür sekonder metabolitlerin üretimi, fitopatojenik funguslar için toksik etki göstermiştir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

Streptomyces cinsine ait olan aktinomisetler, bitki hasarlarını kontrol etmek için ticari olarak kullanılmıştır. Bu cins, *Alternaria* sp., *Pythium aphanidermatum*, *Colletotrichum higginsianum*, *Acremonium lactucum* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı antagonistik aktivite göstermiştir. Ek olarak, aktinomisetlerde bulunan antibakteriyel aktivite kanıtlanmıştır. *Streptomyces* MCR26, *Bacillus cereus* tarafından tamamen inhibe edilen *Thermobifida* MCR24 suşunun tersine, *Bacillus cereus* ve *Escherichia coli*'ye karşı test edildiğinde tam inhibisyon gözlenmiştir (Franco-Correa and Chavarro-Anzola, 2016).

2.8.2.2 Siderofor Üretimi

BGDR'nın siderofor salgısı, doğrudan ya da dolaylı olarak iki farklı şekilde çalışır. Doğrudan etkisi bitkinin büyümesini teşvik ederek ve beslenme koşullarını artırarak gerçekleşirken, dolaylı etkisi Fe^{3+} 'in ortamdan uzaklaştırılması yoluyla fitopatojenlerin yaklaşmasını engelleyerek gerçekleşir. Bazı bakteri suşlarında, sideroforlar biyokontrol maddeleri olarak davranmaktadır. Bu nedenle, BGDR'den elde edilen sideroforlar, bazı fitopatojenlerin yeterli miktarda demir almalarını ve böylelikle çoğalma kabiliyetlerini sınırlandırmasını sağlayabilir. Biyokontrol ajanları olarak BGDR, demir için çok daha büyük bir afiniteye sahip olan sideroforların üretiminde fungal patojenlerden daha etkilidir (Alseederi, 2016).

2.8.2.3 Amonyak Üretimi

Amonyak üretimi azot fiksasyonu ile ilişkilidir ve çoğunlukla legüminöz rizobakterilerde gözlenmektedir. Biyolojik azot fiksasyonunun önemli biyokimyasal reaksiyonları, temel olarak azot fikse edici mikroorganizmaların atmosferik elementel azotu (N_2) amonyağa (NH_3) dönüştüren baklagillerle simbiyotik olarak birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Birçok bitkinin büyümesini destekleyen rizobakteriler, C3 ve C4 bitkileri (örn., Pirinç, buğday, mısır, şeker kamışı, *Jatropha* ve pamuk) ile etkileşime katılmaktadır ve bitkisel büyüme ile tane verimini önemli ölçüde arttırmaktadır. *Azospirillum* türleri, mikroaerobik koşullar altında N_2 'yi fikse eden ve tahıl bitkilerinin rizosferlerinde yaygın olarak büyüyen aerobik heterotroflardır (Kennedy et al., 2004). *Azospirillum* sp. ile yapılan aşılama, sera deneylerinde şeker kamışı yapraklarının azot miktarını da önemli ölçüde arttırmış ve bu da *Azospirillum* tarafından amonyak üretimini yansıtmaktadır (Jha and Saraf, 2015).

2.8.2.4 Hidrojen Siyanür (HCN)Üretimi

Hidrojen siyanür, bitkinin erken büyüme aşamalarında oluşan ikincil bir metabolittir. Büyüme, primer metabolizma veya enerji depolanmasını içermez. BGDR olarak *Pseudomonas*'ın yaklaşık % 88,89'u HCN üretmektedir (Ahmad et al., 2008). Major metabolik süreçlerde yer alan enzimleri inhibe eden ve zararlı rizobakteriyal izolatların tipik özelliklerinden biri olarak kabul edilen fitotoksik ajan olarak kabul edilmektedir. BGDR tarafından üretilen HCN, daha önce yabancı otların biyolojik kontrolünde kullanılmıştır (Alseederi, 2016; Jha and Saraf, 2015).

2.8.2.5 Habitat ve besin için rekabet

Doğrudan veya dolaylı olarak patojenler ve patojen olmayanlar arasındaki rekabetin hastalık insidansını (belirtilen nüfusta belirli bir sürede ortaya çıkan yeni vakaların görülme hızı) ve şiddetini sınırlandırabileceğini göstermek zordur. Bu, patojenik olmayan toprak mikropları bitki yüzeylerini hızla kolonize eder ve mevcut besinlerin çoğunu kullanır ve patojenlerin büyümesini zorlaştırır (Glick, 2012; Alseederi, 2016).

2.8.2.6 İndüklenmiş Sistemik Direnç

BGDR, bitkilerde indüklenmiş sistemik direnç (ISD) olarak bilinen bir fenomeni tetikleyebilmektedir (Glick, 2012). Bu fenomen, bitkilerin patojenik ajanlarla enfeksiyona yanıt olarak savunma mekanizmalarını aktive ettiğinde ortaya çıkan sistemik kazanılmış direnç fenotipik olarak benzerdir. ISD-pozitif olan bitkiler, savunma mekanizmalarını tetikleyerek daha hızlı ve daha güçlü bir şekilde patojen saldırısına tepki gösterir. ISD, farklı patojenlerin neden olduğu hastalıkları kontrol etmede etkilidir ve spesifik patojenleri hedeflememektedir (Glick, 2012; Alseederi, 2016).

2.8.3 BGDR'nin tarım alanındaki uygulamaları

Sürdürülebilir tarım için BGDR'nın kullanımı dünyanın çeşitli yerlerinde kayda değer bir şekilde artmaktadır. BGDR ile inokülasyona yanıt olarak tarımsal açıdan önemli bitkilerin büyüme ve verimindeki dikkate değer artışlar birçok kez bildirilmiştir (Aloni et al., 2006, Canbolat et al., 2006). Çalışmalar ayrıca bazı bakterilerin büyümeyi hızlandırma kabiliyetinin bazı bitki türlerine, varyetelere ve genotipe özgü olabileceğini göstermiştir (Alseederi, 2016).

Azospirillum, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Serratia* genuslarına ait bir dizi bakteri türü bitki rizosferi ile ilişkilidir ve bitki gelişimi üzerinde yararlı bir etki gösterebilmektedir (Shahzad et al., 2008; Alseederi, 2016).

Azot fikse eden bakteriler ve faydalı diğer mikroorganizmalar gibi biyoenerji ve biyolojik arttırıcıların kullanımı, kimyasal gübre uygulamalarını azaltabilir ve sonuç olarak üretim maliyetini düşürebilir. Verimliliği artırmak için BGDR'nın kullanılması, ekolojik tarımda çevrenin korunmasına ve kirliliğin azaltılmasına yardımcı olan organik gübrelelere uygulanabilir bir alternatif olabilir (Alseederi, 2016).

Bu nedenle, rizosferik bakterilerin tarımda bitki büyümesini destekleyici etkisi umut verici bir kaynak olabilir (Shrivastava and Kumar, 2014); tarım ürünlerinin büyümesini ve verimini artırmak için yaygın olarak kullanılan aşı maddeleri olarak kullanılabilirler. BGDR veya BGDR-mikorizal mantarların kombinasyonları, gübrelerin besin kullanım verimliliğini artırabilir ve kimyasal gübrelerin azaltılmış uygulama oranlarını sağlayabilir (Alseederi, 2016).

Başarılı mikrobiyal aşılama, toprakta hayatta kalma, ürünlere uyum, diğer flora ve diğer çevresel faktörlerle etkileşimler gibi etkenlere bağlıdır. BGDR'nin etkin ticari uygulaması aşağıdakilere bağlıdır: BGDR seçimi için en önemli özelliklerin belirlenmesi, çevrenin güvenlik sorunları, rizosferik ve endofitik bakterilerin kullanımının avantaj-dezavantajları, uygulama için daha etkili yolların

geliştirilmesi ve BGDR arasında daha iyi etkileşimler için daha etkili yollar geliştirilmesi, toprak fungusları ve konakçı. BGDR, yüksek rizosfer yeterliliğine, gelişmiş bitki büyüme kapasitesine, kütle çoğalmasının kolaylığına, geniş etki spektrumuna, güvenilir biyolojik kontrol etkinliğine sahiptir. Ayrıca, çevre açısında güvenli, diğer rizobakteriler ile ilişkili olabilmek için uygun, kurumaya, sıcaklığa, oksitleyici ajanlara ve UV radyasyonuna karşı toleransa sahiptir (Alseederi, 2016).

BGDR, pazarlanabilir biyogübreleri üretmek için kullanılmıştır. Ticari başarıya ulaşan BGDR, *Azospirillum*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Serratia*'dır (Alseederi, 2016).

Ticari olarak geliştirilen çoğu biyolojik gübre, *Bacillus* spp.'ye aittir. Populasyon dengesi için ürünlerin formülasyonu ve depolanması sırasında yardımcı olan endosporlar oluştururlar. *B. subtilis* suşları hastalıkları azaltma ve antibiyotik üretme yeteneklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Alseederi, 2016).

2.9 Aktinomisetlerin Diğer Uygulama Alanları

2.9.1 Enzimler

Çok çeşitli, biyolojik açıdan aktif enzimler hem denizel hem de karasal aktinomisetler tarafından üretilmektedir. Hücre dışına, ekstraselüler parçalamayı gerçekleştiren amilaz enzimlerini salgırlar. Bu enzim tipi, nişastanın parçalanmasını sağlaması nedeniyle gıda endüstrisi, fermantasyon ve tekstil-kağıt sanayi gibi biyoteknolojik uygulamalarda büyük öneme sahiptir (Anandan et al., 2016).

Aktinobakterilerin bir diğer önemli yönü selülozların ve ilgili selodigosakarit türevlerinin glikosidik bağlarını hidroliz eden hidrolitik enzimlerin bir grubu olan selülazları üretmesidir. Aynı zamanda lipaz da çeşitli aktinomisetler, bakteri ve funguslardan üretilir ve deterjan endüstrileri, gıda maddeleri, oleokimyasal ve farmasötik alanların endüstrisinde kullanılmaktadır (Schmid and

Verger, 1998; Anandan et al., 2016). Aktinomisetler, özellikle *Streptomyces*, kültür ortamında çoklu proteaz salgılanmasıyla bilinmektedir (Sharmin et al., 2005). Benzer şekilde, Aktinomisetlerin, özellikle *Streptomyces griseus*, *S.karnatakensis*, *S. albidoflavus* ve *Nocardia sp.* gibi topraklardan izole edilmiş aktinomisetler tarafından üretilen L-asparaginaz için mükemmel bir kaynak olduğu birçok çalışma ile ortaya çıkarılmıştır (Dejong, 1972; Narayana et al., 2008; Anandan et al., 2016). Limon otu (*Cymbopogon citratus*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) gibi birçok Tayland endemiği tıbbi bitkinin kökleri ve rizosferleri, Tayland tıbbında mide ağrısı ve astım tedavisi için uzun süredir kullanılmaktadır. Bu bitkilerin rizosfer toprağı da, yeni ikincil metabolitler üretme kabiliyetine sahip aktinomisetler için bir kaynak olabilir (Anandan et al., 2016).

Katalaz, kitinaz ve üreaz gibi enzimler de aktinomisetler tarafından üretilmektedir. İlginç bir şekilde, tavuk tüyü parçalayabilen bir enzim olan keratinaz, *Nocardiopsis sp.* SD5, tarafından üretilmekte ve Hindistan'ın Tamil Nadu kentinde tüy atıklarından izole edilmiştir (Saha et al., 2013; Anandan et al., 2016). Benzer şekilde, tavuk ve keçi gibi hayvanların bağırsağından izole edilen aktinomisetlerin, amilaz, proteaz, fitaz ve lipaz gibi çeşitli enzimleri ürettiği gösterilmiştir (Latha and Dhanasekaran, 2013; Anandan et al., 2016).

2.9.2 Vitaminler

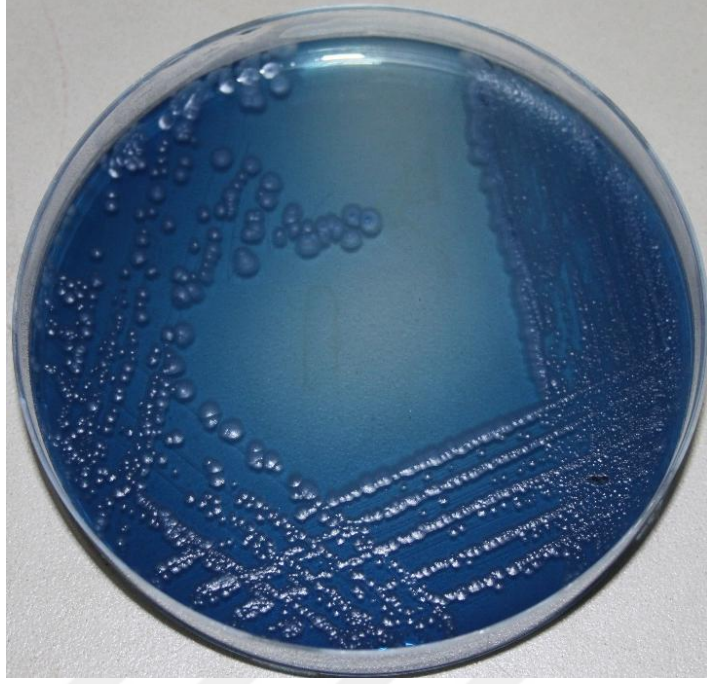
Doğada bulunan B₁₂ vitamini bakteriler veya aktinobakteriler tarafından üretilir. Aktinomiset fermentasyon sıvılarından vitamin B₁₂ izolasyonu, mikrobiyal fermentasyonlar yoluyla olası vitamin üretimine büyük ilgi oluşturmuştur. Ortama kobalt tuzlarının eklenmesi tüm aktinomisetlerin vitamin üretme öncüsü olarak işlev gördüğünü göstermiştir. Kobalt oldukça etkili bir bakterisidal ajan olduğundan, bu öncül dikkatlice eklenmelidir. Streptomisin, aureomisin, grisein ve neomisin gibi antibiyotiklerin üretildiği fermentasyonlarda, eğer ortama, antibiyotik maddelerin verimi bariz bir şekilde etkilemeden kobalt ilave edilebilirse, bir miktar B₁₂ vitamini de üretilibilmektir. Bazı diğer araştırmalarda, antibiyotik üreticisi bazı aktinomisetlerin antibiyotik üretmekten daha fazla vitamin ürettiğini ileri sürülmüştür. Aktinomisetlerin, diğer suda çözünen vitaminler ve koenzim A ürettiği; bazı *Leuconostoc sitrovorum* suşlarının

büyümesini desteklemede aktif olan tiamin ve pteroilglutamik asit türevlerini ürettiğine dair özel çalışmalar olduğu gösterilmiştir (Anandan et al., 2016).

2.9.3 Pigmentler

Sentetik boyaların üretiminde tehlikeli kimyasalların kullanımı, işçi güvenliği endişeleri ve tehlikeli atıklar yaratması gibi bazı kısıtlamaları olduğu için, mikroorganizma kaynaklı pigmentler büyük ilgi çekmektedir. Özellikle, aktinomisetler, doğal veya sentetik ortamda çeşitli pigmentlerin üretilmesi ile karakterize edilir (Şekil 2.11) ve organizmaları tanımlamada önemli bir kültürel özellik olarak kabul edilir. Bu pigmentler genellikle mavi, menekşe, kırmızı, sarı, yeşil, kahverengi ve siyahın çeşitli tonlarında bulunur; bunlar ortam içine yayılabilir veya miselyumda tutulabilir. *Streptomyces* tarafından üretilen pigmentler, endopigmentler (belirli hücre yapılarına bağlanan) veya ekzopigmentler (çevreleyen ortama salgılanan) olabilir. Bazen aktinomisetler tarafından üretilen farklı antibiyotikler pigment olarak kabul edilmektedir (Anandan et al., 2016).

Pigment oluşumu, ortamın pH'ı, havalandırma, büyüme sıcaklığı, karbon ve azot kaynaklarından etkilenebildiğinden, pigmentlerin tam kimyasal doğası hakkında çok az şey bilinmektedir. Oluşumu ayrıca solunum mekanizmaları, savunma mekanizmaları ve UV ışınlardan korumayla da bağlantılıdır. Bu mikroorganizmaların ayrıca taksonomik çalışmalar için yararlı bir kriter olduğu düşünülen koyu pigmentler olan melanin veya melanoidleri sentezleme ve salgılama yeteneği vardır (Anandan et al., 2016).



Şekil 2.11 Aktinomisetlerde pigment üretimi.

2.9.4 Nanopartikül sentezi

Nanopartiküller, hacimsel malzemelerle atomik veya moleküler yapılar arasındaki boşluğu doldurduğu için bilimsel açıdan büyük ilgi görmektedirler. Genellikle, kimyasal yöntemler yüksek hacim için düşük maliyetlidir; ancak bunların dezavantajları öncü kimyasallardan kaynaklanan kirlilik, toksik solventlerin kullanımı ve tehlikeli yan ürünlerin üretilmesidir. Bu nedenle, metalik nanopartiküllerin sentezi için yüksek verimli, düşük maliyetli, toksik olmayan ve çevre dostu prosedürler geliştirme ihtiyacı giderek artmaktadır. Bundan dolayı, nanopartiküllerin sentezi için biyolojik yaklaşımlar önem kazanmaktadır (Anandan et al., 2016).

Aslında, aktinomisetler; antibakteriyel, antifungal, antikanser, antibiyotik, antimalaryal, antiparazitik ve antioksidan gibi çeşitli biyolojik özellikleri gösteren nanopartiküllerin etkili üreticisidir. *Streptomyces* ve *Arthrobacter* genusları, gümüş ve altın nanopartiküllerinin sentezinde temiz ve toksik olmayan yöntemlerin geliştirilmesi için olası "nanofabrikalar" olarak çalışılmıştır (Anandan et al., 2016).

Ranjani ve ark., (2016), gümüş nanopartikül, sentezleyen denizel aktinomisetlerin çeşitliliğini gözlemlemiş ve 49 izolattan 25'inin bu nanopartikülleri sentezlediğini göstermiştir. Bu izolatları içeren genuslardan bazıları; *Streptomyces* sp., *Nocardiopsis* sp., *Kitasatosporia* sp., *Actinopolyspora* sp., *Thermoactinomyces* sp., *Actinomadura* sp., *Kibdelosporangium* sp., *Saccharopolyspora* sp. ve *Thermomonospora* sp.'dir (Anandan et al., 2016).

2.9.5 Biyoherbisitler

Aktinomisetlerin bir diğer uygulama alanı, sekonder metabolitlerinin, istenmeyen bitkiler ve yabancı otlara karşı herbisitler olarak kullanılmasıdır. *Streptomyces saganonensis*, monokotiledon ve dikotiledon yabancı otları kontrol eden herbisidin ve herbimisinleri üretir. *Streptomyces* sp. tarafından üretilen anizomisin, tek yıllık otsu yabancı bitkiler için kullanılan büyüme önleyicisinin bir türüdür; anizomisin, bitkilerin klorofil sentezleme yeteneğini yok edebilir. Benzer şekilde, *Streptomyces viridochromogenes*'in bir metaboliti olan bialaphos, glutamin sentezini inhibe ederek tek yıllık ve çok yıllık otsu yabancı bitkileri ve geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Anandan et al., 2016).

2.9.6 Biosüpfektanlar

Biosüpfektanlar, yüzey-aktif, hidrofilik ve hidrofobik kısımları paylaşan mikrobiyal kökenli bileşiklerdir. Kimyasal kaynaklı yüzey-aktif bileşiklerle karşılaştırıldığında, biosüpfektanlar hammadde olarak mineral yağdan bağımsızdır; biyolojik olarak parçalanabilirler ve düşük sıcaklıklarda üretilebilirler (Anandan et al., 2016).

Biosüpfektanlar, besin, kozmetik, tekstil, vernik, ilaç, maden ve yağ geri kazanım endüstrileri gibi çeşitli alanlarda uygulanabilir (Marchant and Banat, 2012). Lipopeptid antibiyotik daptomisin, piyasaya girmiş ve gram pozitif patojenlerden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde kullanılan ve Cubist Pharmaceuticals tarafından Cubicin olarak pazarlanan bir aktinomiset biosüpfektanıdır (Anandan et al., 2016).

2.9.7 Probiyotikler

Probiyotikler, örneğin; konak ile ilişkili veya ortamdaki mikrobiyal topluluğu değiştirerek, besinin iyileştirilmiş kullanımını sağlamak veya besin değerini arttırmak, hastalığa karşı konak yanıtını arttırmak veya çevresel ortamının kalitesini arttırmak gibi çeşitli yollarla konak üzerinde yararlı bir etkiye sahip olan canlı mikrobiyal yardımcı maddelerdir. Birkaç önemli diğer uygulamaya rağmen, denizel aktinomisetlerin probiyotik olarak kullanımı, dikkatleri toplamıştır (Anandan et al., 2016).

2.9.8 Biyoremediasyon

Aktinomisetler, organik kirleticilerle kontamine olmuş topraklarda yapılan biyoremediasyonda, onları bu uygulama için iyi birer aday yapan birçok özelliğe sahiptir. Kontamine olmuş bazı alanlarda, parçalayıcılar arasında en baskın grup da aktinomisetlerdir (Ranjani et al., 2016). Organik karbonun geri dönüşümünde önemli bir rol oynarlar ve kompleks polimerleri degrede etme yeteneğine sahiptirler (Anandan et al., 2016).

Sanscartier ve ark., (2009)'a göre günlük yaşamımızda yaygın olarak kullanılan kimyasal hidrokarbonların, kimyasal bileşikler ve yakıt olarak kullanılmasının büyük toprak yüzeylerinin en yaygın kirleticilerinden biri haline getirdiğini ve bununda sonuçta büyük bir çevresel sorun olarak değerlendirilmiştir. Bazı raporlar, *Streptomyces* grubunun hidrokarbonların bozunmasında çok önemli bir rol oynayabileceğini önermektedir (Anandan et al., 2016).

Birçok aktinomiset suşu, selüloz ve hemiselülozu indirgeyici enzimler ve hücre dışı peroksidaz üreterek lignini çözünür hale getirme ve lignin ile ilişkili bileşikler parçalama yeteneğine sahiptir (Mason et al., 2001). Aktinomiset türleri yağlı bir çevrede yaşama kabiliyetine sahiptir ve bu nedenle de yağ içerikli kirleticileri azaltmak için bioremediasyonda kullanılabilirler (Saha et al., 2013; Anandan et al., 2016).

2.9.9 Nematod kontrolü

On yıllardır, bitki paraziti nematodların etkili bir şekilde kontrol edilmesinin kimyasal nematisitlere bağımlı olduğu bilinmektedir. Tehlikeli nematisidler çevresel tehlikelere ilişkin kötü etkileri nedeniyle, nematodları kontrol etmek için yeni yöntemlerin gerekliliği çarpıcı bir şekilde göz önündedir. Günümüzde çok sayıda mikroorganizma, bitki paraziti nematodların antagonistleri olarak bilinmektedir. Özellikle, antibiyotik ürettiği bilinen aktinomisetler, biyolojik mücadelede kullanım potansiyeline sahiptir. Bir tür *Streptomyces*'in avermektin üretimi, toprak kaynaklı organizmaların oldukça nematisidal bileşikler üretebildiğini göstermiştir. *S. avermitilis*, *Wucheria bancroftii*'ye karşı yüksek bir etkinliğe sahip ivermektini üretmektedir (Ikeda and Omura, 1995). Benzer şekilde, milbemisin, antimisin A9, ferverulin, bafilolidler, valinomisin, salinosporamid A, kalafungin, thiamisinler ve aksenomisinler gibi çeşitli farklı antiparazitik bileşikler, *Streptomyces* sp., *Salinispora* sp. ve *Marinactinospora* sp. gibi farklı aktinomisetlerden üretilmektedir (Anandan et al., 2016).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Örnekleme alanları

Örnekleme alanı olarak İzmir ilinden 2 farklı bölge ve 3 farklı bitki rizosferi seçilirken, Aydın ilinden de bir bölge ve 2 farklı bitkinin rizosfer bölgeleri seçilmiştir.

İzmir ilindeki örnekleme alanlarından alınan örneklerden ikisi karasal örnekler olup, Bornova ilçesinde, *Heracleum sp.* ve *Morus sp.*, bitkilerinin rizosfer bölgelerinden alınmıştır. İzmir ilindeki diğer bir örnekleme alanı ise sucul örneklerin alındığı Balçova ilçesinde yer alan Çakalburnu Lagünü'dür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sucul bitki rizosferinden örnekleme yapılan Çakalburnu Lagünü, İzmir.

Aydın ilçesinden alınan iki örnek ise aynı bölgeden ancak iki farklı bitki rizosferinden alınmıştır. Örneklerin ikisi de karasal örnekler olup örnekleme yapılan alanlar, *Cucumbis sp.* ve *Lycopersion sp.* rizosferleridir. Örnekleme yapılan tarihler, Haziran 2017 – Eylül 2017 arasında değişmektedir.

3.1.2 Mikrobiyolojik analizler

3.1.2.1 Kullanılan besiyerleri

Tez çalışması sırasında, izolasyon, saflaştırma, izolatların muhafazası, biyoaktif bileşik üretimlerinin birincil, ikincil taramaları ile optimizasyon aşamasında ve agroaktif bileşik üretiminin kalitatif ve kantitatif taramaları için aşağıdaki besiyerleri kullanılmıştır:

Besiyeri 1: Aktinomiset İzolasyon Agar (Difco, 212168) ve Broth

Sodyum kazeinat	2 g/L
L-Asparajin	0,1 g/L
Sodyum propiyonat	4 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
MgSO ₄	0,1 g/L
FeSO ₄	0,001 g/L
Gliserol	5 g/L
Agar	15 g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında, katı olarak kullanılması istenildiğinde petrilere eşit bir şekilde bölüştürülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Aktinomiset İzolasyon Agar, izolasyon, saflaştırma, izolatların stoklanması ve sıvı besiyeri olarak ise biyoaktif bileşik üretiminin ikincil taramalarında ve optimizasyon aşamasında kullanılmıştır. Denizel sucul örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 2: Mueller Hinton Agar (Merck, 1.025437.0500)

Meat infusion	2 g/L
Kazein hidrolizat	17.5 g/L
Nişasta	1,5 g/L
Agar	13 g/L

Distile su	1 L
------------	-----

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Mueller Hinton Agar, biyoaktif bileşik üretiminin birincil ve ikincil tarama ile optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 3: ISP (International Streptomyces Project) – 3 Broth

Yulaf ezmesi tozu	20 g/L
İz element solüsyonu	1 ml/L
Distile su	1L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. ISP-3 Broth, biyoaktif bileşik üretiminin ikincil taramalarında ve optimizasyon aşamasında kullanılmıştır. Denizel sucul örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 4: Glukoz Soya Unu Broth

Glukoz	10 g/L
Soya unu	10 g/L
NaCl	10 g/L
CaCO ₃	1 g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Glukoz Soya Unu Broth, biyoaktif bileşik üretiminin ikincil taramalarında ve optimizasyon aşamasında kullanılmıştır. Denizel sucul örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 5: ISP-2 Broth

Maya özütü	4 g/L
Malt özütü	10 g/L
Dekstroz	4 g/L
Pepton	5g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. ISP-2 Broth, biyoaktif bileşik üretiminin ikincil taramalarında ve optimizasyon aşamasında kullanılmıştır. Denizel sucul örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 6: Nişasta Kazein Broth

Nişasta	10 g/L
Kazein	0,3 g/L
CaCO ₃	0,02 g/L
Fe ₃ SO ₄ .7H ₂ O	0,01 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g/L
KNO ₃	2 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
NaCl	2 g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Nişasta Kazein Broth, biyoaktif bileşik üretiminin ikincil taramalarında ve optimizasyon aşamasında kullanılmıştır. Denizel sucul örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 7: Glisin ile desteklenmiş ISP-2 Agar

Maya özütü	4 g/L
Malt özütü	10 g/L
Dekstroz	4 g/L
Glisin	4,4 g/L
Agar	15 g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1.1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında, besiyeri petrilere eşit olarak bölüştürölüp katılaşmaya bırakılmıştır. Agroaktif bileşik üretimi taramalarından olan, hidrojen siyanür (HCN) üretiminin kalitatif denemelerinde kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Pikovskaya's Agar (PVKA) ve Broth

Maya özütü	0,5 g/L
Dekstroz	10 g/L
Ca ₃ PO ₄	5 g/L
NH ₄ SO ₄	0,5 g/L
KCl	0,2 g/L
MgSO ₄	0,1 g/L
MnSO ₄	0,0001 g/L
FeSO ₄	0,0001 g/L
Agar	15 g/L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1.1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında, besiyeri petrilere eşit olarak bölüştürölüp katılaşmaya bırakılmıştır. PVKA, agroaktif bileşik üretimi taramalarından olan, fosfat çözünürlüğünün kalitatif denemelerinde PVK Broth kantitatif fosfat çözünürlüğü denemelerinde kullanılmıştır. Denizel sucul örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 9: L-triptofan ile desteklenmiş ISP-2 Broth

Maya özütü	4 g/L
Malt özütü	10 g/L
Dekstroz	4 g/L
Pepton	5 g/L
L-triptofan	2 g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra, 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. Triptofan ile desteklenmiş ISP-2 Broth, agroaktif bileşik üretimi taramalarından olan, indol asetik asit üretiminin, kalitatif ve kantitatif taramalarında kullanılmıştır. Denizel sucül örnekler için yapılan çalışmalarda, bu ortam % 50 deniz suyu % 50 distile su kullanılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 10: Luria Bertani (LB) Broth (Difco, 244620)

Tripton	10 g/L
Maya özütü	5 g/L
NaCl	10 g/L
Distile su	1 L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra öncelikle tüplere eşit miktarlarda bölüştürülmüş ve daha sonra 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril edilmiştir. LB Broth, biyoaktif bileşik üretimi denemeleri sırasında, bakteriyal test organizmalarının üretilmesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 11: Sabaroud Dekstroz Broth (SDB)(Sigma, S3306)

Dekstroz	20 g/L
Özel pepton	10g/L
Distile su	1L

Bu besiyeri, hazırlandıktan sonra öncelikle tüplere eşit miktarlarda bölüştürülmüş ve daha sonra 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk boyunca steril

edilmiştir. SDB, biyoaktif bileşik üretimi denemeleri sırasında, fungal test organizmalarının üretilmesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 12: Chrome Azurol S (CAS) Agar

CAS çözeltisi	100 ml
LB Broth	25g/L
Agar	15g/L
Distile Su	900 ml

Bu besiyeri ve CAS çözeltisi ayrı ayrı hazırlandıktan sonra 121°C 1,1 atm basınçta 15 dk. boyunca steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında petrilere eşit miktarlarda bölüştürülmüştür ve katılaşmaya bırakılmıştır. CAS agar, siderofor üretiminin kalitatif taramalarında kullanılmıştır.

3.1.2.2 Kullanılan çözeltiler ve kimyasal maddeler

Bu tez çalışmasında; izolasyon, biyoaktif bileşik üretiminin birincil, ikincil taramaları, üretim ortamının optimizasyonu aşaması ve agroaktif bileşik üretiminin kalitatif, kantitatif taramaları için aşağıdaki çözeltiler kullanılmıştır:

Çözelti 1: Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

FTS, 8,5 g/L NaCl olarak distile su içerisinde hazırlanmıştır. Rizosferik aktinomiset izolasyonu aşamasında 121 °C 1,1 atmosfer basınçta 15 dk boyunca steril edildikten sonra seyreltme plaka yöntemi uygulanırken kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Çözelti 2: Sikloheksimid Stok Çözeltisi (Sigma, C7698-1G)

0,5 g sikloheksimid, 10 ml % 96 etanol içerisinde çözündürülerek 50 mg/ml sikloheksimid stok çözeltisi hazırlanmıştır. Rizosferik aktinomiset izolasyonu sırasında fungus büyümesinin engellenmesi amacıyla besiyerine eklenmek için ve antifungal aktivite taramaları sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Çözelti 3: Streptomisin Stok Çözeltisi (Sigma, S0774)

0,5 g streptomisin, 10 ml distile su içerisinde çözündürülerek 50 mg/ml konsantrasyondaki streptomisin stok çözeltisi hazırlanmıştır. Biyoaktif bileşik üretiminin optimizasyon aşamalarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çözelti 4: Pikrik Asit Çözeltisi

0,5 g pikrik asit ve 2 g sodyum karbonat 100 ml distile su içerisinde çözündürülmüş ve pikrik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti daha sonra şırınga filtre ile steril edilmiştir ve HCN üretiminin kalitatif olarak taranması aşamalarında kullanılmıştır.

Çözelti 6: Salkowski Reaktifi

Salkowski reaktifi, 50 ml % 35'lik perklorik asit (Merck,1.00519.2501) içerisine 1 ml 0,5 M FeCl_3 (Rielsen-Haen, 12319) ilave edilerek hazırlanmıştır. Indol asetik asit üretimini saptamak için ve IAA standart grafiğinin hazırlanması aşamalarında kullanılmıştır.

Çözelti 7: Kloromolibdik asit çözeltisi

Kloromolibdik asit çözeltisi, 400 ml distile su içerisinde çözündürülen 15 g ammonyum molibdatın (Himedia, GRM307-500G), 400 ml 10 N hidroklorik asit (Merck, GRM307-500G) içerisine karıştırılması ve 1L'ye tamamlanması ile elde edilmiştir. Bu çözelti fosfat çözünürlüğü aktivitesinin kantitatif taramaları sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 8: Klorostannous asit çözeltisi

Klorostannous asit stok çözeltisi, 10 g $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Himedia, GRM6390-500G)'ın 25 ml konsantre hidroklorik asit içerisinde çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Bu stok çözeltiden 1 ml alınıp, 132 ml distile su içerisine eklenerek ise çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Bu çözelti, kantitatif fosfat çözünürlüğü aktivitesi taramalarında kullanılmıştır.

Çözelti 9: Indol asetik asit stok çözeltisi (0,1 mg/ml) ve standart çözeltileri (0,01-0,1 mg/ml)

0,001 g IAA (Merck, 104086431), 100 ml distile su içerisinde çözülerek stok IAA çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, bu stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak 0,01 ile 0,1 mg/ml konsantrasyonları arasında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, IAA standart grafiğinin hazırlanması için kullanılmıştır.

Çözelti 10: KH_2PO_4 stok ve standart çözeltileri

0,01 g KH_2PO_4 (Rielsen-Haen, 04248) 100 ml distile su içerisinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra, stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak 0,01 ile 0,1 mg/ml konsantrasyonlar arasında standart çözeltiler hazırlanmıştır ve KH_2PO_4 standart grafiğinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 11: Tris-borik asit-EDTA Tamponu (TBE) stok solüsyonu (5X/L pH:8)

27,5 g Borik asit (Fluka 15670), 2,92 g EDTA (Sigma, E5134), 54,0 g Tris-base'in 1L distile su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. DNA izolasyonu sonunda DNA saflığının tayini ve PCR ürünlerinin elektroforezi aşamasında kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 12: Tris-borik asit-EDTA Tamponu (TBE) 1X

TBE 5X çözeltisinin $\frac{1}{4}$ oranında seyreltilmesiyle elde edilmiştir. % 0,8'lik ve % 1'lik agaroz jellerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 13: % 0,8'lik agaroz

0,8 g agarozun 100 ml 1X TBE tamponunda çözünmesiyle elde edilmiştir. DNA izolasyonundan sonra elektroforez aşamasında kullanılmıştır.

Çözelti 14: % 1'lik agaroz

1 g agarozun 100 ml 1X TBE tamponunda çözünmesiyle elde edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında elektroforez aşamasında kullanılmıştır.

Çözelti 15: 5X MUB (Modified Universal Buffer)

12,1 g Tris (hidroksil metil) amino metan (Merck, 1.08387.0500), 11,6 g Maleik asit (Fluka, 63180), 14 g Sitrik asit (,141018) ve 6,28 g Borik asi (Fluka, 15670)t, 1N NaOH (Tekkim, TK.1070510.01000) içerisinde çözündürülmüştür ve distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin 200 ml'si 0,5 N HCl ile pH 5,5'e, diğer 200 ml'si ise 0,5 N NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır. Alkali ve asit fosfataz aktivitesi taramalarında tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

Çözelti 16: 0.115 M p-nitrofenil fosfat çözeltisi

4,268 g p-nitrofenil fosfat (Himedia, MB12-25G), 100'er ml pH 5,5 ve pH 9 MUB içerisinde çözündürülerek ayrı ayrı iki pH'da hazırlanmıştır. Alkali ve asit fosfataz aktivitesi taramalarında substrat olarak kullanılmıştır.

Çözelti 17: p-nitrofenol stok ve standart çözeltileri

1,39 mg/ml konsantrasyondaki p-nitrofenol (Sigma, N7660-100ML) ticari olarak temin edilmiş olup, içerisinde 0,719 ml alınarak distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır. pH 5,5 ve pH 9 için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, alkali ve asit fosfataz aktivitesi denemelerinde standart grafik hazırlanması için kullanılmıştır.

Çözelti 18: CAS (Chrome Azurol S) Çözeltisi

60,5 mg CAS boyası (Himedia,RM336-10G) 50 mL distile su içerisinde çözülmüş ve 10 ml demir (III) çözeltisi (1 mM FeCl₃, 6H₂O, 10 mM HCl) ile karıştırılmıştır. CAS-FeCl₃ çözeltisi yavaşça karıştırılmaya devam edilerek, 40 ml su içinde çözülerek hazırlanmış hekzadesiltrimetilamonyum (72,9 mg) (HDTMA)

ile karıştırılmıştır ve daha sonra 1,1. atm'de 121°C'de steril edilmiştir. Bu çözelti, siderofor üretiminin kalitatif taramalarında kullanılmıştır.

3.1.2.3 Kullanılan başlıca cihazlar

- Spektrofotometre (VARIAN)
- Santrifüj (Hettich ROTINA 35R)
- Otoklav (HIRAYAMA)
- İnkübatörler (SANYO, BINDER)
- Çalkamalı inkübatör (İNNOVA 4340)
- PCR cihazı (PE Applied Biosystem)
- Elektroforez tankı (Thermo Fisher)
- Jel görüntüleme cihazı (UVP)
- Otomatik pipetler (BRAND)
- Hassas terazi (Denver Instrument)
- pH ölçüm cihazı (WTW)
- Vorteks (VWR INTERNATIONAL)
- Buzdolabı (REGAL-BOSCH)
- Evaporatör(Heidolph)

3.1.2.4 Kullanılan kitler ve içerikleri

-Fungal/Bakteriyal DNA Kiti (Zymo Research, D6005)

- ZR Bashingbead liziz tüpleri
- Liziz Solusyonu
- DNA ön yıkama tamponu
- DNA yıkama solusyonu
- DNA elusyon tamponu
- Zymo-Spin™ IV Spin Filtreleri
- Zymo-Spin™ IIC Kolonları
- Toplama tüpleri

-Q5 High Fidelity Hot start DNA Polimeraz kiti (New England Biolabs, M0493S)

- Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polimeraz
- 5X Q5 reaksiyon tamponu
- Q5 High GC Enhancer

3.2 Metod

3.2.1 Rizosferik toprak örneklerinin alınması ve muhafazası

Rizosferik toprak örnekleri, farklı 4 karasal ve 1 sucul bitkinin, 5-15 cm derinlikteki ve köke yaklaşık 3 cm uzaklıktaki rizosfer bölgelerinden aseptik koşullarda, önceden steril edilmiş kavanozlar içerisine alınmış ve soğuk zincir korunarak laboratuvara getirilmiştir (Kaur et al., 2013). İzolasyon işlemi, örneklerin alındığı gün içerisinde tamamlanmıştır. Örnekleme yapılan bazı bitkiler ve örnekleme bölgelerinin fotoğrafları Şekil 3.1. ve 3.2’de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. *Heracleum sp.* (Öğrek otu) bitkisi ve örnek alınımının yapıldığı rizosfer bölgesi.



Şekil 3.3. Sucul bitkiden toprak örneğinin alındığı rizosfer bölgesi.

3.2.2 Rizosferik aktinomisetlerin izolasyonu ve saflaştırılması

Beş farklı bitki rizosferinden alınan, 10'ar gramlık rizosferik toprak numuneleri, 90 ml steril edilmiş FTS içerisine eklenmiş ve 10^{-6} 'ya kadar olacak şekilde seyreltme serileri hazırlanmıştır. Dökme plaka yöntemi uygulanmış olup, her bir seyreltmeden petrilere 1'er ml aktarılmıştır. Daha sonra, fungal büyümeyi engellemek amacıyla, antifungal ajan olarak 50 mg/ml konsantrasyondaki sikloheksimid çözeltisi eklenmiş AİA ortamı, tüm seyreltme örneklerini içeren petrilere eşit bir şekilde dağıtılmıştır (Kaur et al., 2013). Petriler 28°C 'de 4-7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Gopalakrishnan et al., 2014).

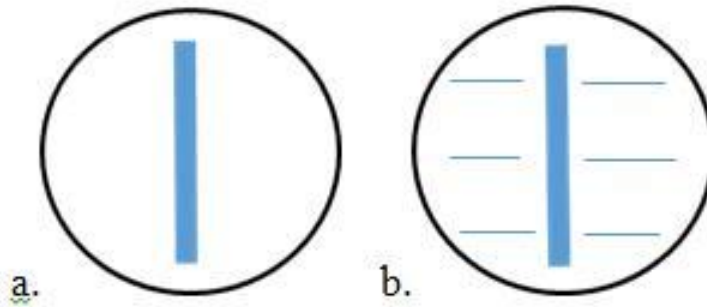
İnkübasyondan sonra, farklı renk ve koloni şekli gibi morfolojik özellikler dikkate alınarak farklı aktinomiset kolonileri seçilmiştir. Bu aktinomiset kolonileri, AİA'da saflaştırılıp daha sonraki çalışmalar için $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Biyoaktif bileşik üretiminde birincil taramalar

3.2.3.1 Antibakteriyel aktivite taramaları

Birincil taramada, saf izolatların antibakteriyel aktivitesi Mueller Hinton Agar (MHA) üzerinde çapraz çizgi yöntemi (Cross Streak Method) ile belirlenmiştir (Chaudhary et al., 2013).

Aktinomiset izolatları MHA plakalarının ortasında uzun bir çizgi şeklinde ekilmiş ve ardından 27°C’de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. 10 günün sonunda, test bakterileri aktinomiset izolatlarının büyümesine dik olacak şekilde inoküle edilmiştir (Şekil 3.4). Daha sonrasında 37°C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda inhibisyon derecesine bakılmıştır (Rakesh et al., 2013).



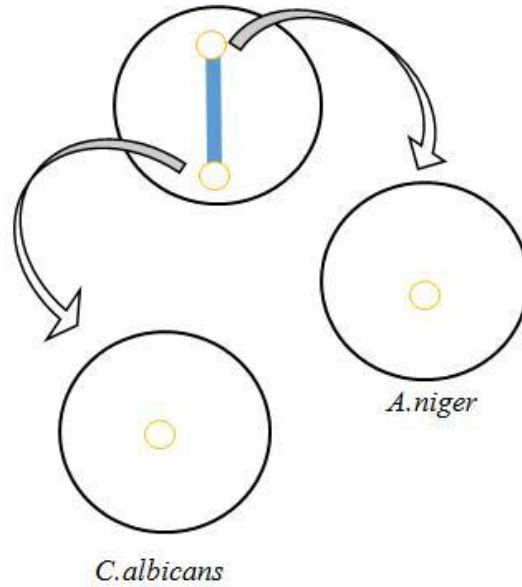
Şekil 3.4. Cross streak metodu (a. Aktinomiset kolonilerinin, b. Bakteriyal test organizmalarının inokülasyon şekli).

Aktinomiset izolatlarının yakınında üreme görülmemesi veya test bakterilerinin daha az yoğunlukta üremesi, izolatların antibakteriyel metabolit üretimi ve salgılaması için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Rakesh et al., 2013).

Antibakteriyel aktivite taramalarında, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 29998, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538/P insan patojeni bakteriyel test organizmaları olarak kullanılmıştır (Chaudhary et al., 2013).

3.2.3.2 Antifungal aktivite taramaları

Antifungal aktiviteler belirlenirken, birincil tarama yöntemi olarak Agar Plug Metodu kullanılmıştır (Şekil 3.5). MHA ortamına, 0,1 ml patojen fungal test organizmaları (*Candida albicans* ve *Aspergillus niger*) yayılarak ekilmiştir. Daha sonra 7 gün boyunca MHA ortamında inkübe edilmiş aktinomiset izolatlarından 1cm'lik diskler alınarak test organizmalarının bulunduğu ortama bırakılmıştır. Aktinomiset izolatlarının ürettikleri antimikrobiklerin, patojen fungal test organizmalarını etkileyip etkilemedikleri ve etki düzeyleri belirlenmiş olup sonuçlar mm cinsinden kaydedilmiştir (Mohanraj et al., 2011).



Şekil 3.5. Agar Plug Metodu.

3.2.4 Biyoaktif bileşik üretiminde ikincil taramalar

3.2.4.1 Fermentasyon sıvısı (supernatant) ile antibakteriyel ve antifungal aktivite taramaları

Birincil taramalarda, umut verici antimikrobiyal aktivite gösteren aktinomiset izolatları, 100'er ml'den oluşan beş farklı sıvı besiyeri (AİB, NKB, ISP-2, IPS-3 ve GSB) kullanılarak 150 rpm'de sürekli çalkalama ile 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve antimikrobiyal bileşik üretmeleri sağlanmıştır (Gopinath et al., 2013; Mohseni et al., 2013; Singh et al., 2014; Duddu and Guntuku, 2016; Chandrakar and Gupta, 2017).

İzolatların hücresiz süpernatantının, birincil taramada kullanılan aynı test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi, disk difüzyon yöntemi kullanılarak gösterilmiştir (Singh et al., 2014).

Aktinomiset izolatlarının gelişip, antimikrobiyal bileşik ürettikleri bu ortamlar, 10000 rpm'de 10 dk. santrifüje tabi tutulmuştur (Silambarasan et al., 2012). Denemelerin yapıldığı 7. günde, 24 saatlik bakteriyel test organizma kültürleri, steril FTS ile birkaç kez yıkanıp seyreltilmiştir. Bakteriyel patojen süspansiyonları, spektrofotometre kullanılarak 600 nm'de 0,5 McFarland türbidite standardındaki tüpe eşdeğer olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu da, $1,5 \times 10^8$ kob/ml (koloni oluşturan birim/ml)'ye eşittir (Jobim et al., 2014). Fungal test organizmaları ise, thoma lamı yardımı ile sayılarak $3,0 \times 10^7$ cfu/ml'ye ayarlanmıştır. Ve her bir test organizmasından 0,1 ml alınarak MHA ortamı üzerine yayılmıştır.

Test organizmalarını içeren MHA ortamı üzerine, önceden steril edilmiş 6 mm çapındaki diskler aseptik koşullarda eklenmiştir ve bu diskler üzerine her bir izolatın süpernatantından 10 µl aktarılmıştır. Petriler, daha sonra antimikrobiyalın difüzyonu için 30 dakika süreyle oda sıcaklığında tutulmuş ve sonrasında 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda ise, disk çevresindeki inhibisyon zonları kaydedilmiştir (Rajan and Kannabiran, 2014).

3.2.5 Biyoaktif bileşik üretimi için ortam optimizasyonu

Supernatant ile yapılan taramalar sonucunda seçilen izolat ve/veya izolatlar, çalkalamalı inkübatörde 150 rpm dönme hızında, 28°C’de 7 gün boyunca beş farklı sıvı besiyerinde inkübe edilmiştir (Gopinath et al., 2013; Mohseni et al., 2013; Singh et al., 2014; Duddu and Guntuku, 2016; Chandrakar and Gupta, 2017). Daha sonra, kültür sıvısı 20 dakika boyunca 5000 rpm dönme hızında santrifüjlenmiştir. Farklı sıvı kültür ortamlarında üretilen biyoaktif metabolit/metabolitler, ayırma hunisi içerisinde eşit hacimde etil asetat (1:1) ile iki kez 15 dk. süreyle çalkalanarak supernatanttan ekstrakte edilmiştir. Bu işlem sonucunda oluşan iki tabakadan biri olan çözücü tabaka ayrılmış olup bu işlemden sonra evaporatörde 40°C’lik su banyosunda vakum altında buharlaştırılmıştır (Singh et al., 2014).

İzolatların farklı besiyerlerinde üretilmesi ve sonrasında gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde elde edilen ekstraktlar, etil asetat içerisinde çözündürülmüş ve supernatant ile yapılan denemelerdeki test organizmaları burada da kullanılmıştır ve prosedür aynen uygulanmıştır. Önceki aşamalardan farklı olarak kullanılan fungal patojenlerin sayısı üçe çıkarılmıştır ve eklenen fungal patojen bitkileri enfekte eden *Alternaria* genusuna ait *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120) (Toker, 2018) olarak seçilmiştir. Etil asetat negatif kontrol olarak, streptomisin ve sikloheksimid çözeltileri ise sırasıyla antibakteriyel aktivite denemeleri ve antifungal aktivite denemelerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

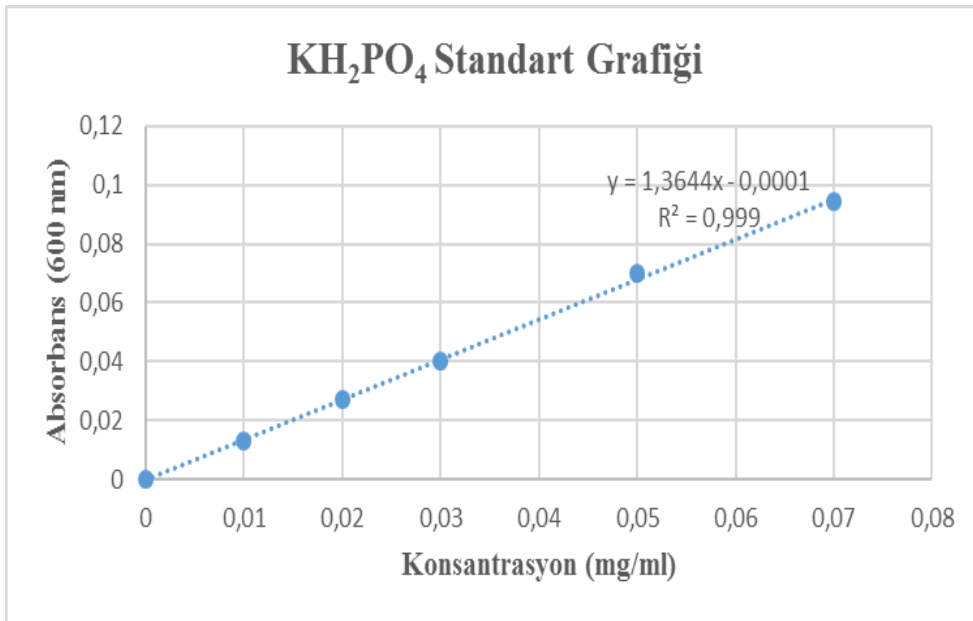
3.2.6 Agroaktif bileşik üretiminin taranması

3.2.6.1 Fosfat çözünürlüğü aktivitesi

Aktinomiset izolatları, Pikovskaya tarafından geliştirilen Pikovskaya’s agar (PVKA) üzerinde büyütülmüştür. Petri üzerindeki koloninin $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ’ı çözündürerek, koloni çevresinde berrak bir zon oluşturması, fosfat çözünürlüğünün bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Fosfat çözünürlüğü belirlenirken, halo-zon ve koloni çapları, 27°C’de 14 gün inkübasyondan sonra

ölçülmüştür. Halo-zon çapı, toplam çaptan koloni çapının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır (Franco-Correa et al., 2010). 14 gün sonunda, halo-zon çapı ≥ 9 mm olan izolatlar, fosfat çözünürlüğü açısından pozitif olarak kabul edilmiş ve kantitatif taramalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Dastager and Damare, 2013).

Çözündürülmüş fosfatın kantitatif ölçümü için, 0,1 g trikalsiyum fosfat içeren 100 ml Pikovskaya broth'a, 7 günlük aktinomiset kültürlerinden 1 cm'lik agar diskler inokule edilmiştir. Örnekler, 9 gün boyunca, 150 rpm'de 28°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Her bir erlenden, 20 ml'lik kültür sıvıları alınmış ve 30 dk. boyunca santrifüjlenmiştir (15000 rpm) ve supernatanta salınan suda çözünür fosfat miktarı, indirgenmiş-klorostannous-molibdofosforik mavi asit metodu ile 3., 5., 7. ve 9. günlerde belirlenmiştir. 10 ml supernatant, 10 ml kloromolibdik asit ve 1 ml klorostannous asit karıştırılmış ve hacim, distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Aynı günler içerisinde alınan kültür sıvılarının pH değerleri de kaydedilmiştir. İnokülasyon gerçekleştirilmeyen steril ortam ise kör olarak kullanılmıştır. Daha sonra oluşan mavi renk, spektrofotometre ile 600 nm'de okunmuştur. Çözünmüş fosfat miktarı, KH_2PO_4 'ün standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6). Aynı zamanda, inkübasyon süresi sonunda izolatların kuru ağırlıkları da belirlenmiştir (Wani and Irene, 2014; Kaur, 2014).



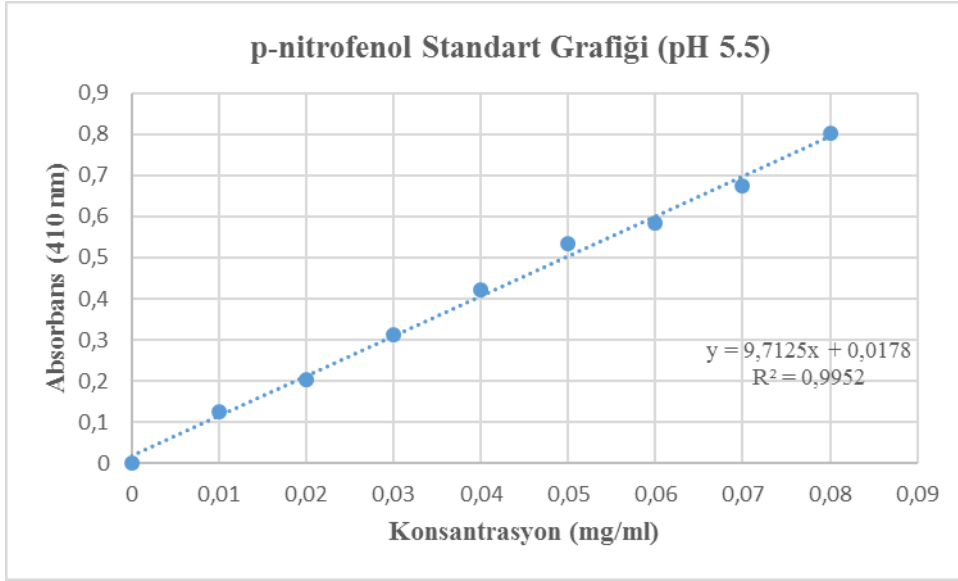
Şekil 3.6. KH_2PO_4 Standart Grafiği (0 - 0,07 mg/ml).

3.2.6.2 Asit ve alkali fosfataz aktivitesi

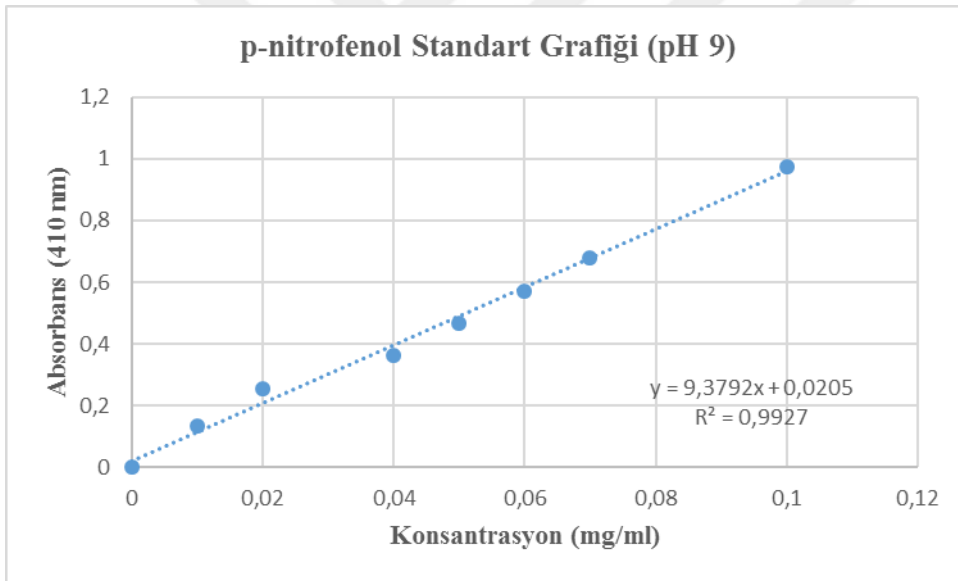
Kalitatif fosfat çözünürlüğü aktivitelerinde 9 mm'den büyük berrak zon oluşumu gerçekleştiren izolatlar asit ve alkali fosfataz enzimlerinin varlığı açısından da taranmıştır.

Seçilmiş izolatlardan 1 cm'lik agar diskler, % 0,1 g trikalsiyum fosfat içeren PVKB besiyerlerine inoküle edilmiştir. Her bir izolat, 10 gün boyunca 24 saatlik aralıklarla alkali ve asit fosfataz aktivitesi için belirlenen prosedür ile taranmıştır. Prosedür aşağıda yazıldığı şekilde uygulanmıştır (Kaur, 2014):

- Enzim örneğinden (bu denemede supernatant) 0,5 ml alınmıştır.
- Üzerine 5 ml MUB ilave edilmiştir. (Asit fosfataz için pH 5,5 ve alkali fosfataz için pH 9)
- Filtre ile steril edilmiş 0,115 M p-nitro fenil fosfattan (her bir pH'ta ayrı ayrı hazırlanmıştır) 1 ml ilave edilmiştir.
- Bu karışım 37°C'de 1 saat boyunca karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 5ml 0,5 N NaOH çözeltisi, reaksiyonu durdurmak için karışıma ilave edilmiştir.
- Oluşan sarı renk yoğunluğu spektrofotometre ile 410 nm'de ölçülerek fosfataz aktivitesi belirlenmiştir.
- Fosfataz enzim aktivitesi, süpernatantın ml'si başına p-nitro fenil substratından filtrat içinde p-nitrofenol oluşum miktarı olarak belirtilmiştir. p-nitrofenol içeriği, 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında p-nitrofenol içeren standartlardan elde edilen sonuçlarla oluşturulmuş standart grafik (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8) referans alınarak hesaplanmıştır.
- Kontrole de aynı prosedür uygulanmış olup sadece p-nitro fenil substratı NaOH çözeltisinden sonra eklenmiştir.



Şekil 3.7. pH 5,5 da p-nitrofenol standart grafiği(0,01-0,08 mg/ml).



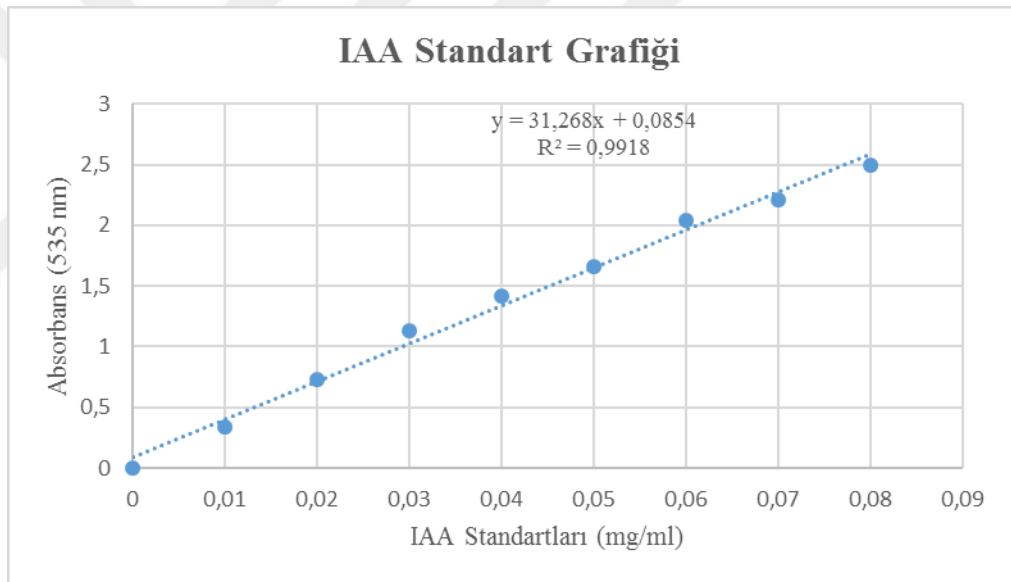
Şekil 3.8. pH 9,0 da p-nitrofenol standart grafiği (0,01-0,1 mg/ml).

3.2.6.3 İndol asetik asit üretimi

Aktinomiset izolatları ile IAA üretimi Gordon ve Weber (1951)'e göre modifiye edilerek denenmiştir. Aktinomiset izolatları, 7 gün boyunca 30°C'de ISP-2 agar ortamında üretilmiştir. 1 cm çaplı agar diskleri steril aparatlar kullanılarak kesilip, % 0,2 L-triptofan içeren 100 ml ISP-2 broth içerisine inokulasyon gerçekleştirilmiştir. İzolatlar bu ortamda, 30°C'de 14 gün boyunca

150 rpm'de sürekli çalkalama ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler, 15 dakika boyunca 11,000 rpm'de santrifüjlenmiştir ve 1 ml supernatant, 2 ml Salkowski's reaktifi ile karıştırılmıştır. İnokülasyon gerçekleştirilmemiş steril ortam kör olarak kullanılmıştır. Daha sonra, karanlık ortamda 30°C sıcaklıkta, 25 dakika boyunca inkübe edilmiştir. IAA üretimi pembe-kırmızı bir rengin gelişimi olarak gözlemlenmiştir (Passari et al, 2015).

Aktinomiset izolatları arasından, kırmızı-pembe rengi gösterenler, spektrofotometre kullanılarak absorbans değerleri 535 nm'de ölçülmüştür. Buradan elde edilen absorbans değerleri, IAA standart eğrisi (Şekil 3.9) ile karşılaştırılarak, IAA miktarı µg/ml cinsinden ifade edilmiştir (Passari et al., 2015).



Şekil 3.9. 535 nm'de IAA Standart grafiği (0-0,08 mg/ml).

Daha sonra, en yüksek üretimi gerçekleştiren izolat, inkübasyon süresinin ve L-triptofan miktarının IAA üretimi üzerindeki etkisini göstermek üzere, % 0-1 arasında değişen L-triptofan konsantrasyonlarında hazırlanan ISP-2 ortamına 1 cm'lik agar diskler şeklinde inokule edilmiştir. İnokülasyon gerçekleştirilmeyen, steril ortam kör olarak kullanılmıştır. IAA miktarı daha önceden de belirtilen metod kullanılarak 14 gün boyunca ölçülmüştür. Sonuçlar IAA standart grafiği kullanılarak belirlenmiş ve yine µg/ml cinsinden ifade edilmiştir (Abd-Alla et al.,2013; Patel and Patel, 2014).

3.2.6.4 Siderofor üretimi

Rizosferik izolatların siderofor üretimi, indikatör boya, krom azurol S (CAS) kullanılarak Schwyn ve Neilands tarafından tarif edilen protokol modifiye edilerek belirlenmiştir. 28°C’de 5 gün inkübasyondan sonra sarımsı-turuncu bir halo-zon sergileyen izolatlar, siderofor üretimi için pozitif olarak kabul edilmiştir (Lakshmanan et al., 2015).

3.2.6.5 Hidrojen siyanür üretimi

Aktinomiset izolatları ile hidrojen siyanür (HCN) üretimi, Lorck (1948)’un metodu uyarlanarak değerlendirilmiştir. Whatmann No.1 filtre kağıdı, bir dakika boyunca % 0,5’lik pikrik asit içindeki % 2’lik sodyum karbonat içine batırılmıştır. Sonrasında, bu çözeltiye batırılmış filtre kağıtları petri plakalarının altına yerleştirilmiştir. Daha sonra, 4,4 g/L glisin ile desteklenmiş ISP-2 ortamı petrilere eşit bir şekilde dağıtılmış ve katılaşmaya bırakılmıştır. Aktinomiset izolatları bu ortama ekildikten sonra ise, petrilere, parafilm ile kapatılarak 7-12 gün boyunca 28°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Filtre kağıdındaki kırmızı-kahve renk HCN üretiminin göstergesi olmuştur (Anwar et al., 2016).

3.2.7 Rizosferik aktinomiset izolatlarının moleküler tanımlanması

3.2.7.1 DNA izolasyonu

Rizosferik aktinomisetlerin DNA izolasyonu, Zymo Research Fungal/Bakteriyal DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. İzolatlar, AİB besiyerinde, 30°C sıcaklıkta, 150 rpm dönme hızında çalkalamalı inkübasyon ile 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda aktinomiset kültürleri eppendorflara alınmıştır. 10,000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra supernatant kısmı atılmıştır. 1000 µl ultra saf su kullanılarak pelletler iki kez yıkanmıştır. Sonrasında, DNA izolasyon prosedürü, kullanılan kitin içeriğine uygun bir şekilde aşağıdaki talimatlar takip edilerek uygulanmıştır:

- 50-100 mg aktinomisit hücreleri 200 µl izotonik tampon ya da ultra saf su içerisine eklenmiş ve daha sonra karıştırılmıştır.
- Hücre solüsyonunun tamamı BashingBead™ lizis tüpüne eklenmiş ve 5 dk. boyunca vorteks işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Lizis tüpleri 10,000 g'de 1 dk. süreyle santrifürlenmiştir.
- Sonrasında lizis tüpleri içerisindeki supernatantlardan 400 µl'ye kadar alınarak, toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş Zymo-Spin™ IV spin filtre (turucu kapaklı)'ye aktarılmış ve 7,000 g'de 1 dk. boyunca santrifürlenmiştir.
- Önceki aşamada toplama tüpü içerisinde toplanan filtrat üzerine 1200 µl Fungal/bacterial DNA bağlanma tamponu eklenmiştir.
- Yeni bir toplama tüpü içerisindeki Zymo-Spin™ IIC kolonuna, bu karışımdan 800 µl eklenmiştir. 10,000 g'de 1 dk. boyunca santrifürlenmiştir.
- Aynı işlem 1 kez daha tekrarlanmış ve sonrasında Zymo-Spin™ IIC kolonu yeni bir toplama tüpü içerisine alınmıştır. Bu aşamadan sonra 200 µl DNA ön yıkama tamponu eklenmiştir. Daha sonra, 10000 g'de 1 dk. santrifürlenmiştir.
- 500 µl DNA yıkama tamponu Zymo-Spin™ IIC kolonuna aktarılmıştır ve 10,000 g'de 1 dk. boyunca santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.
- Zymo-Spin™ IIC Kolonu 1,5 ml'lik steril bir ependorf tüpüne aktarılmış ve doğrudan kolon matrisine 100 µl DNA elüsyon tamponu eklenmiştir.
- Son olarak, 10,000 g'de 30 sn. santrifüj gerçekleştirildikten sonra saf DNA elde edilmiştir.

Elde edilen DNA'ların saflık kontrolünü yapmak amacıyla elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için % 0,8'lik agaroz jel hazırlanmış ve işlem 90V'da 80dk. süreyle gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, 1X TBE tamponu kullanılmıştır.

3.2.7.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzole edilen DNA'ların PZR'ı için Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polimeraz kiti kullanılmıştır. 16S rRNA amplifikasyonu için 8-27 F (Forward, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ve 14492-1510 R (Reverse, 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT) universal primerleri (Alpha DNA) kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir (Koçyiğit, 2009). PZR koşulları ve PZR reaksiyon karışımı sırasıyla Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de belirtilmiştir:

Çizelge 3.1. PZR Koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denaturasyonu	98 °C	30 sn	1
Denaturasyon	98 °C	5 sn	30
Yapışma	65 °C	20 sn	
Uzama	72 °C	20 sn	
Son Uzama	72 °C	2 dk	1

Çizelge 3.2. PZR Reaksiyon Karışımı.

Bileşenler	Miktar
5X Q5 Reaksiyon Tamponu	5 µl
10 Mm dNTPs	0,5 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
5X Q5 High Fidelity GC Enhancer	5 µl
Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polimeraz	0,25 µl
Genomik DNA	1 µl
Ultra Saf Su	12,75 µl

Elde edilen PZR ürünlerinin, saflık ve bütünlük kontrolünü gerçekleştirmek amacıyla agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için % 1'lik agaroz ile jel hazırlanmış ve PZR ürünleri 90V'da 60 dk. boyunca yürütülmüştür.

3.2.7.3 16S rRNA bölgesi baz dizilerinin belirlenmesi

PZR ürünleri REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi (Ankara)'ne gönderilmiş olup, baz dizileri belirlenerek e-posta yoluyla tarafımıza ulaştırılmıştır.

REFGEN, Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi tarafından her bir DNA ipliği için belirlenen baz dizileri, Mega 6,0 (Tamura et al., 2007) programı kullanılarak Gen Bankası'nda yer alan, daha önce girişleri yapılmış diğer dizilerle karşılaştırılabilmesi için uygun formata getirilmiştir. Daha sonra ise, Gen bankası veri tabanında yer alan diğer dizilerle karşılaştırmalar gerçekleştirilerek tanımlamaları yapılmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3.2.7.4 Filogenetik dendogramlar ve Gen Bankası kabul numaraları

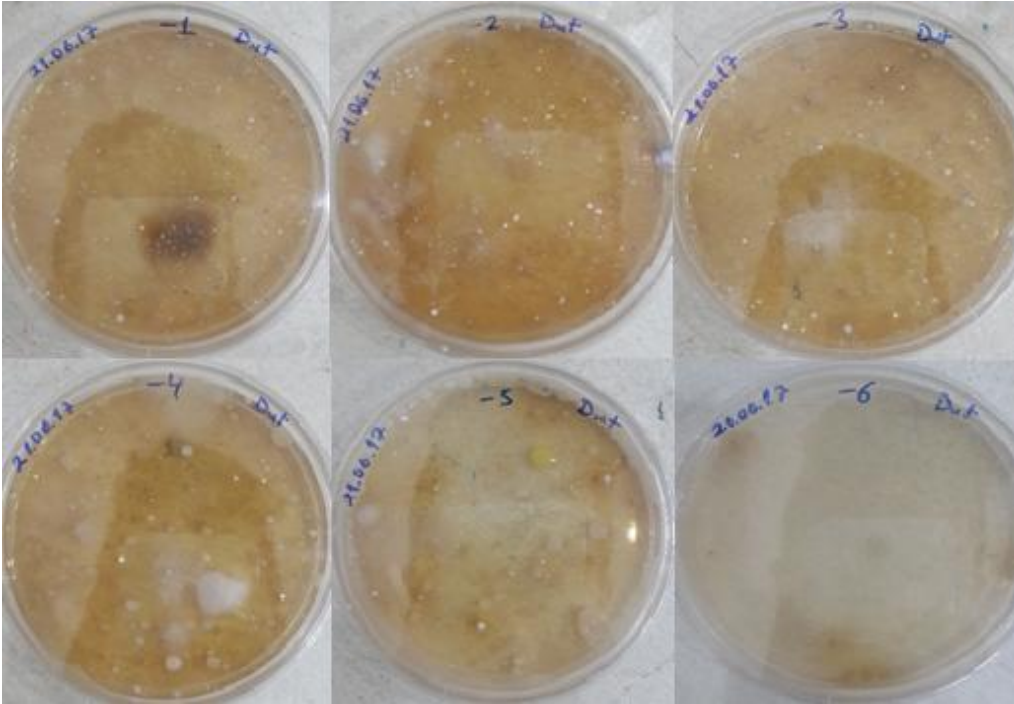
Mega 6,0 programı filogenetik dendogramın oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. NCBI Gen Bankası'ndan referans türlerin 16S rRNA bölgesini içeren baz dizilerinin Mega 6,0 programına girişleri yapılmıştır. Clustal W programı kullanılarak benzerlik bölgelerine göre hizalanan ve Neighbor-joining metodu ile (1000 tekrarlı) dizilere göre filogenetik dendogram oluşturulmuştur (Saitou and Nei., 1987).

Gen Bankası'na ait BankIt programı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi?tool=genbank>) üzerinden izolatlara ait çeşitli bilgiler ve baz dizileri girilerek kabul numaralarının alınması için başvuru yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Rizosferik Aktinomisetlerin İzolasyonu

Birbirinden farklı 4 karasal ve 1 sucul bitkinin rizosfer bölgelerinden toplanan toprak örneklerinden yapılan izolasyon sonucu, tüm seyreltme petrilerinde (Şekil 4.1) morfolojik özellikleri farklılık gösteren 42 adet aktinomiset kolonisi seçilmiştir.



Şekil 4.1. Dut bitkisi rizosferinden alınan toprak örneklerinden gerçekleştirilen aktinomiset izolasyonu sonucunda elde edilen seyreltme petrilerinin görüntüsü.

AİA'da her seferinde yakarak çizgi ekim yöntemiyle saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). Yapılan seyreltme işlemi sonrasında elde edilen izolatların izole edildikleri bitkiler, bitkilerin habitatları ve bu bitkilerin yer aldığı lokasyonlar Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. CYP25 izolatının saflaştırma aşamasındaki görüntüsü.

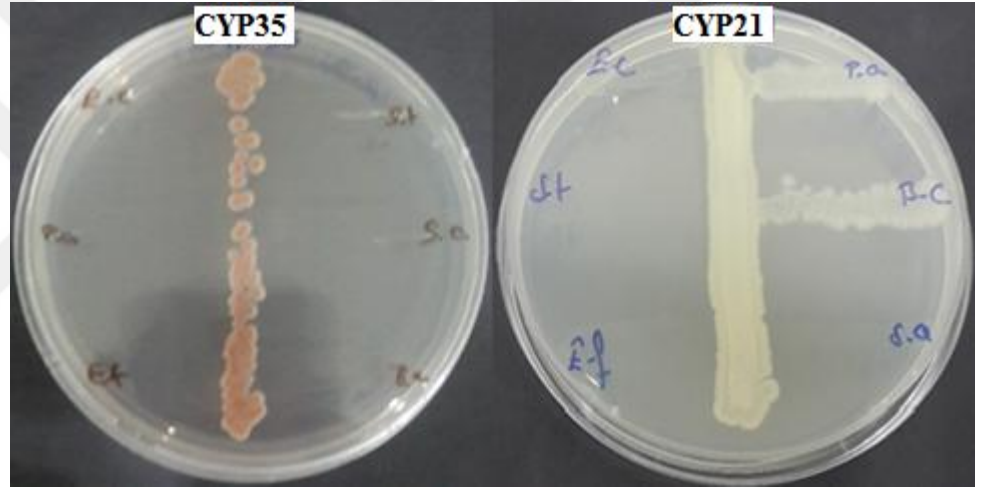
Çizelge 4.1. Tüm izolatların izole edildikleri bitkiler, habitatları ve bu bitkilerin lokasyonları.

İzolatlar	Örnekleme yapılan bitki toprağı	Habitat	Bölge
CYP-1	<i>Heracleum sp.</i> rizosferi (Öğrek otu)	Karasal	İzmir
CYP-2			
CYP-3			
CYP-4			
CYP-5			
CYP-6			
CYP-7			
CYP-8			
CYP-9			
CYP-10			
CYP-11			
CYP-12	<i>Morus sp.</i> rizosferi (Dut ağacı)	Karasal	İzmir
CYP-13			
CYP-14			
CYP-15			
CYP-16			
CYP-17			
CYP-18			
CYP-19			
CYP-20			
CYP-21			
CYP-22			
CYP-23	Sucul bitki rizosferi	Sucul	İzmir
CYP-24			
CYP-25			
CYP-26			
CYP-27	<i>Lycopersicon sp.</i> rizosferi (Domates bitkisi)	Karasal	Aydın
CYP-28			
CYP-29			
CYP-30			
CYP-31			
CYP-32			
CYP-33	<i>Cucumis sp.</i> rizosferi (Salatalık bitkisi)	Karasal	Aydın
CYP-34			
CYP-35			
CYP-36			
CYP-37			
CYP-38			
CYP-39	Sucul bitki rizosferi	Sucul	İzmir
CYP-40			
CYP-41			
CYP-42			

4.2 Biyoaktif Bileşik Üretiminde Birincil Taramaların Sonuçları

4.2.1 Birincil antibakteriyel aktivite taramalarının sonuçları

Cross streak metodu kullanılarak yapılan denemeler sonucunda, 42 aktinomiset izolatı içerisinde, 6 patojenik test organizmasının tümünde de etki gösterebilen 4 izolat (CYP9, CYP19, CYP25, CYP35) tespit edilmiştir. Diğer izolatlar ise ya hiçbir patojene karşı aktivite gösterememiştir ya da çok az sayıda patojene karşı düşük aktiviteler göstermiştir (Şekil 4.3). Sonuçlar milimetre cinsinden ölçülerek, Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Tüm patojenlere karşı aktivite gösteren bu 4 izolat ikincil taramalar için seçilmiştir.



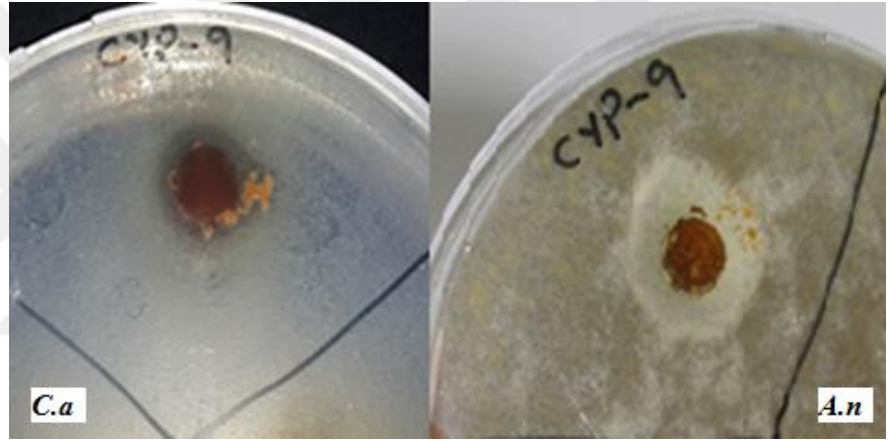
Şekil 4.3. CYP-35 izolatının 6 patojen bakteriyel test organizmasına karşı göstermiş olduğu antibakteriyel etki ve aktivitesi saptanmayan CYP-21 izolatı.

Çizelge 4.2. Cross Streak Metodu kullanılarak gerçekleştirilen birincil antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.

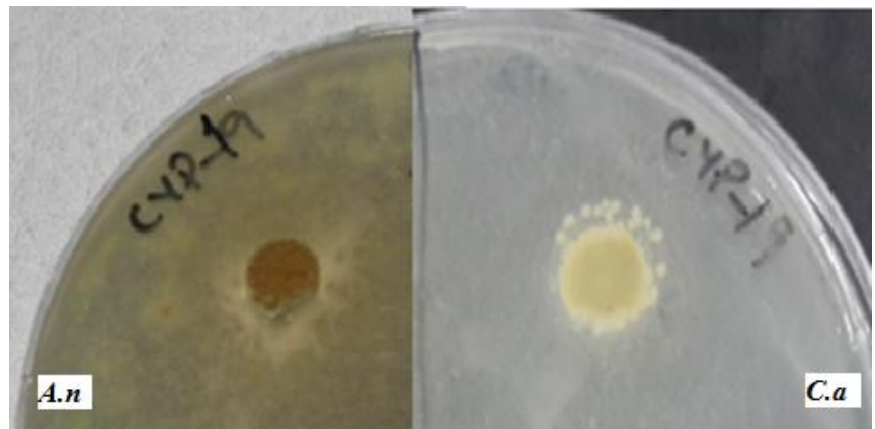
İzolat	Bakteriyel test organizmaları ve inhibisyon zonları (mm)					
	<i>S.aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
CYP-1	5	6	-	6	-	5
CYP-2	10	10	2	-	12	16
CYP-3	-	-	-	-	-	-
CYP-4	12	11	12	11	-	13
CYP-5	-	-	-	-	-	5
CYP-6	-	2	2	-	14	-
CYP-7	-	-	-	-	-	-
CYP-8	-	-	-	-	-	-
CYP-9	30	23	26	32	20	30
CYP-10	-	-	-	-	-	-
CYP-11	-	-	-	-	-	-
CYP-12	-	-	-	-	-	7
CYP-13	-	-	-	5	-	23
CYP-14	-	-	-	-	-	-
CYP-15	-	-	-	-	-	-
CYP-16	-	-	-	-	-	-
CYP-17	16	6	3	14	3	-
CYP-18	-	-	-	-	-	-
CYP-19	13	12	12	6	9	5
CYP-20	-	-	-	-	-	-
CYP-21	-	-	-	-	-	-
CYP-22	-	-	-	-	4	-
CYP-23	-	-	-	-	-	5
CYP-24	-	-	-	-	-	7
CYP-25	8	12	7	11	6	6
CYP-26	-	5	-	-	-	12
CYP-27	-	-	-	-	-	-
CYP-28	-	-	-	-	30	3
CYP-29	-	-	-	-	-	-
CYP-30	-	-	-	-	-	-
CYP-31	-	-	-	-	-	-
CYP-32	-	-	3	-	-	8
CYP-33	-	3	-	-	-	8
CYP-34	-	6	-	4	-	7
CYP-35	30	30	30	20	30	30
CYP-36	-	-	-	-	-	-
CYP-37	-	-	-	-	-	-
CYP-38	-	-	-	-	20	16
CYP-39	-	-	-	-	-	-
CYP-40	-	-	-	-	-	-
CYP-41	-	-	-	-	-	-
CYP-42	-	-	-	-	-	-

4.2.2 Birincil antifungal aktivite taramalarının sonuçları

Agar Plug Metodu kullanılarak gerçekleştirilen antifungal aktivite taramalarında, 42 aktinomiset izolatı arasından 5 izolat her iki fungal patojene karşı antifungal aktivite gösterirken, diğer 37 izolat ya hiç sonuç vermemiştir ya da oluşturdıkları zon çaplarının daha düşük olduğu saptanmıştır. Pozitif sonuç veren bu izolatlar, CYP3, CYP6, CYP9, CYP29 ve CYP30'dur. Sonuçlar mm cinsinden ölçülerek, Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Antifungal aktiviteye sahip olduğu saptanan ve bu aktivitenin saptanmadığı izolatlar birer örnek, sırasıyla, Şekil 4.4 ve 4.5 de gösterilmektedir. En yüksek aktiviteyi gösteren izolatlar ile ikincil antifungal aktivite taramalarına geçilmiştir.



Şekil 4.4. CYP-9 İzolatının *C. albicans* (C.a) ve *A. niger*(A.n)'e karşı gösterdiği antifungal aktivite zonları.



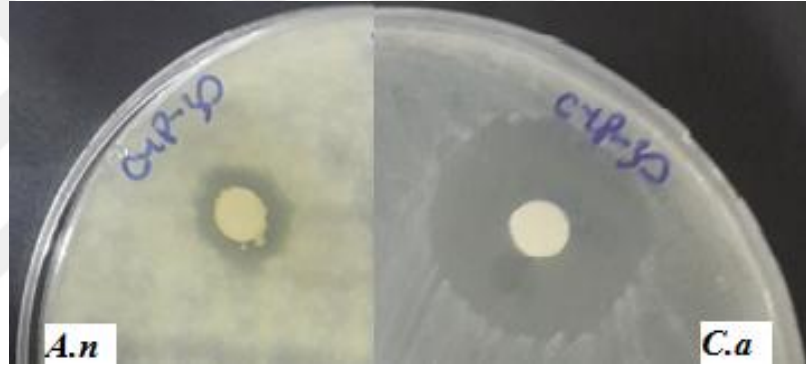
Şekil 4.5. *A. niger*(A.n) ve *C. albicans* (C.a)'a karşı antifungal aktivite göstermeyen CYP-19 izolatı.

Çizelge 4.3. Aktinomiset izolatlarının *C. albicans* ve *A. niger*'e karşı gösterdikleri antifungal aktivite zon çaplarının milimetre cinsinden değerleri.

İzolat	Antifungal aktivite zon çapları (mm)	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
CYP-1	-	-
CYP-2	-	-
CYP-3	16	22
CYP-4	-	-
CYP-5	-	-
CYP-6	20	22
CYP-7	-	-
CYP-8	-	-
CYP-9	14	18
CYP-10	-	12
CYP-11	-	16
CYP-12	-	-
CYP-13	-	-
CYP-14	-	-
CYP-15	-	-
CYP-16	-	-
CYP-17	-	-
CYP-18	-	-
CYP-19	-	-
CYP-20	-	-
CYP-21	-	-
CYP-22	-	-
CYP-23	-	-
CYP-24	-	-
CYP-25	-	25
CYP-26	-	-
CYP-27	-	-
CYP-28	-	-
CYP-29	23	25
CYP-30	25	30
CYP-31	-	-
CYP-32	-	-
CYP-33	-	-
CYP-34	-	-
CYP-35	-	27
CYP-36	-	-
CYP-37	-	-
CYP-38	-	-
CYP-39	-	-
CYP-40	-	-
CYP-41	-	-
CYP-42	-	-

4.3 Biyoaktif Bileşik Üretiminin İkincil Taramalarının Sonuçları

İkincil antifungal aktivite taramaları sonucunda, ISP-2 sıvı besiyeri dışında diğer 4 sıvı besiyerinde antifungal aktivite saptanmıştır. CYP30 izolatu bu besiyerlerinde en yüksek antifungal aktiviteyi gösteren izolat olarak belirlenmiştir. *C. albicans*'a karşı en yüksek antifungal aktiviteyi 26 mm ile GSUB besiyerinde gösterirken, *A. niger*'e karşı en yüksek aktiviteyi yine aynı besiyerinde 19 mm olarak göstermiştir (Şekil 4.6). Belirtilen 4 besiyerinde en düşük antifungal aktiviteyi ise CYP3 izolatu göstermiştir. CYP9 izolatu iki patojen organizmaya karşı besiyerlerinin hiçbirinde aktivite göstermemiştir. Tüm izolatların beş farklı besiyerindeki supernatant ile yapılan antifungal aktivite taramaları Çizelge 4.4'te gösterilmektedir.



Şekil 4.6. CYP-30 izolatının ISP-3 besiyerinde 7 günlük inkübasyon sonucunda supernatantı ile yapılan denemeler sonucu *A. niger* (A.n) ve *C. albicans* (C.a)'a karşı gösterdiği antifungal aktivite zonları.

Çizelge 4.4. Supernatant ile yapılan antifungal aktivite tarama sonuçları.

	Besiyerleri									
	GSUB		ISP-3		NKB		AİB		ISP-2	
	Fungal Test Organizmaları ve Antifungal aktivite zon çapları (mm)									
İzolatlar	<i>C.a</i>	<i>A.n</i>	<i>C.a</i>	<i>A.n</i>	<i>C.a</i>	<i>A.n</i>	<i>C.a</i>	<i>A.n</i>	<i>C.a</i>	<i>A.n</i>
CYP3	17	12	10	-	17	10	-	20	-	-
CYP6	27	20	12	-	12	10	-	10	-	-
CYP9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP29	20	15	21	12	19	19	-	25	-	-
CYP30	26	19	25	17	18	20	-	20	-	-

C.a: *Candida albicans*, A.n: *Aspergillus niger*

Belirlenen bu aktiviteler arasından 4 besiyerinde ve her iki fungal patojen organizma için antifungal aktivitesi olduğu saptanan CYP-30 izolatu, ekstraksiyon aşamasında elde edilen ekstraktlarla yapılan antifungal aktivite denemeleri için seçilmiştir.

İkincil antibakteriyel aktivite taramaları sırasında, beş farklı besiyerinde de antibakteriyel aktivite saptanmıştır. Ancak en iyi sonuçlar GSUB besiyerinde, en düşük aktiviteler ise NKB besiyerinde saptanmıştır. CYP-25 izolatu, besiyerlerin tamamında patojenlerin bir kısmına karşı antifungal aktivite göstermemesine rağmen etki ettiği patojenler için diğer izolatlarla kıyasla en yüksek aktivite saptanmıştır. CYP-25 izolatu en yüksek aktivitesini 16 mm ile ISP-2 besiyerinde *S. aureus*'a karşı göstermiştir (Şekil 4.7). Ancak, *B. cereus*'a karşı hiçbir besiyerinde aktivite gösterememiştir. Tüm besiyerlerinde en düşük aktiviteyi gösteren izolat ise CYP-35 izolatu olmuştur. Tüm izolatların beş farklı besiyerindeki supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite taramaları sonucunda elde edilen zon çapları Çizelge 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da gösterilmektedir. Supernatant ile yapılan denemeler sonucunda CYP-25 izolatu, tüm besiyerlerinde bakteriyel patojenlerin çoğuna karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi göstermiş olduğundan, optimizasyon aşamasında kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 4.7 CYP-25 izolatının ISP-2 besiyerinden elde edilen supernatantının bakteriyel patojen *S. aureus*'a karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite zon çapı.

Çizelge 4.5. ISP-2 ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.

ISP-2						
Antibakteriyel aktivite zon çapları (mm)						
İzolatlar	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>B.c</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>S.t</i>
CYP9	-	-	9	-	9	10
CYP19	-	-	9	-	9	9
CYP25	9	16	-	12	9	10
CYP35	-	-	9	-	9	-

(*P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.c*: *Bacillus cereus*, *E.f*: *Enterococcus faecalis*, *E.c*: *Escherichia coli*, *S.t*: *Salmonella typhimurium*)

Çizelge 4.6. ISP-3 ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.

ISP-3						
Antibakteriyel aktivite zon çapları (mm)						
İzolatlar	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>B.c</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>S.t</i>
CYP9	10	10	-	-	-	-
CYP19	-	-	-	-	-	-
CYP25	-	9	-	-	10	10
CYP35	12	-	-	-	10	-

(*P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.c*: *Bacillus cereus*, *E.f*: *Enterococcus faecalis*, *E.c*: *Escherichia coli*, *S.t*: *Salmonella typhimurium*)

Çizelge 4.7. GSUB ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları

GSUB						
Antibakteriyel aktivite zon çapları (mm)						
İzolatlar	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>B.c</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>S.t</i>
CYP9	9	11	-	11	-	-
CYP19	12	15	-	17	-	11
CYP25	-	9	-	10	9	10
CYP35	-	-	-	9	-	9

(*P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.c*: *Bacillus cereus*, *E.f*: *Enterococcus faecalis*, *E.c*: *Escherichia coli*, *S.t*: *Salmonella typhimurium*)

Çizelge 4.8. NKB ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.

NKB						
Antibakteriyel aktivite zon çapları (mm)						
İzolatlar	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>B.c</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>S.t</i>
CYP9	-	-	-	9	9	9
CYP19	-	-	-	9	9	9
CYP25	-	15	-	-	9	9
CYP35	-	-	-	-	9	9

(*P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.c*: *Bacillus cereus*, *E.f*: *Enterococcus faecalis*, *E.c*: *Escherichia coli*, *S.t*: *Salmonella typhimurium*)

Çizelge 4.9. AİB ortamından elde edilen supernatant ile yapılan antibakteriyel aktivite tarama sonuçları.

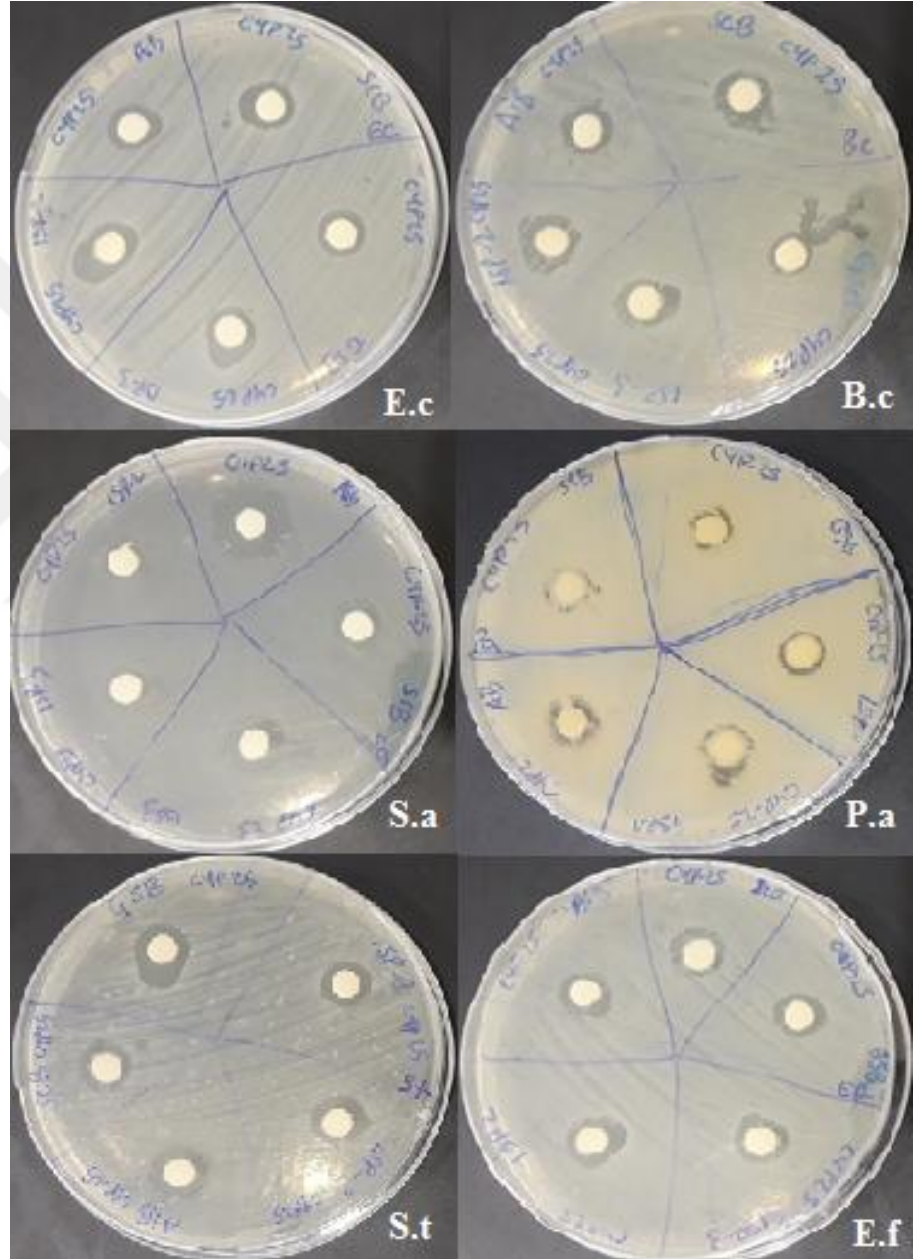
AİB						
Antibakteriyel aktivite zon çapları (mm)						
İzolatlar	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>B.c</i>	<i>E.f</i>	<i>E.c</i>	<i>S.t</i>
CYP9	-	-	-	-	-	10
CYP19	-	-	-	-	-	10
CYP25	10	-	-	11	-	9
CYP35	-	-	-	-	-	-

(*P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.c*: *Bacillus cereus*, *E.f*: *Enterococcus faecalis*, *E.c*: *Escherichia coli*, *S.t*: *Salmonella typhimurium*)

4.4 Biyoaktif Bileşik Üretimi İçin Ortam Optimizasyonu

Supernatant ile yapılan denemelerde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösteren CYP25 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyon süresi sonunda ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş olup, ekstraktlar ile yapılan denemelerde 6 farklı bakteriyel patojene karşı göstermiş olduğu antibakteriyel aktivite sonuçları Şekil 4.8’de gösterilmektedir. En yüksek aktivite, AİB besiyerinden elde edilen ekstrakt ile yapılan denemeler sonucunda bakteriyel patojen *S. aureus*’a karşı 18 mm olarak belirlenmiştir. Diğer test organizmaları için AİB besiyerinde gösterdiği antibakteriyel aktivite zon çapları ise sırasıyla; *Pseudomonas aeruginosa* 13 mm, *Bacillus cereus* 15 mm, *Escherichia coli* 14 mm, *Enterococcus faecalis* 14 mm, *Salmonella typhimurium* 15 mm olarak saptanmıştır. AİB besiyeri haricinde diğer tüm besiyerlerinden elde edilen

ekstraktlar *P. aeruginosa*'ya karşı 10 mm zon çapı oluşturarak en düşük aktiviteyi göstermiştir. Dolayısıyla, CYP-25 izolatu için antibakteriyel bileşik üretimi açısından en iyi besiyeri AİB olarak söylenebilmektedir. CYP-25 izolatının kullanılan tüm besiyerlerinde 6 farklı bakteriyel test organizmasına karşı göstermiş olduğu antibakteriyel aktivite zon çapları milimetre cinsinden ölçülmüştür ve Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

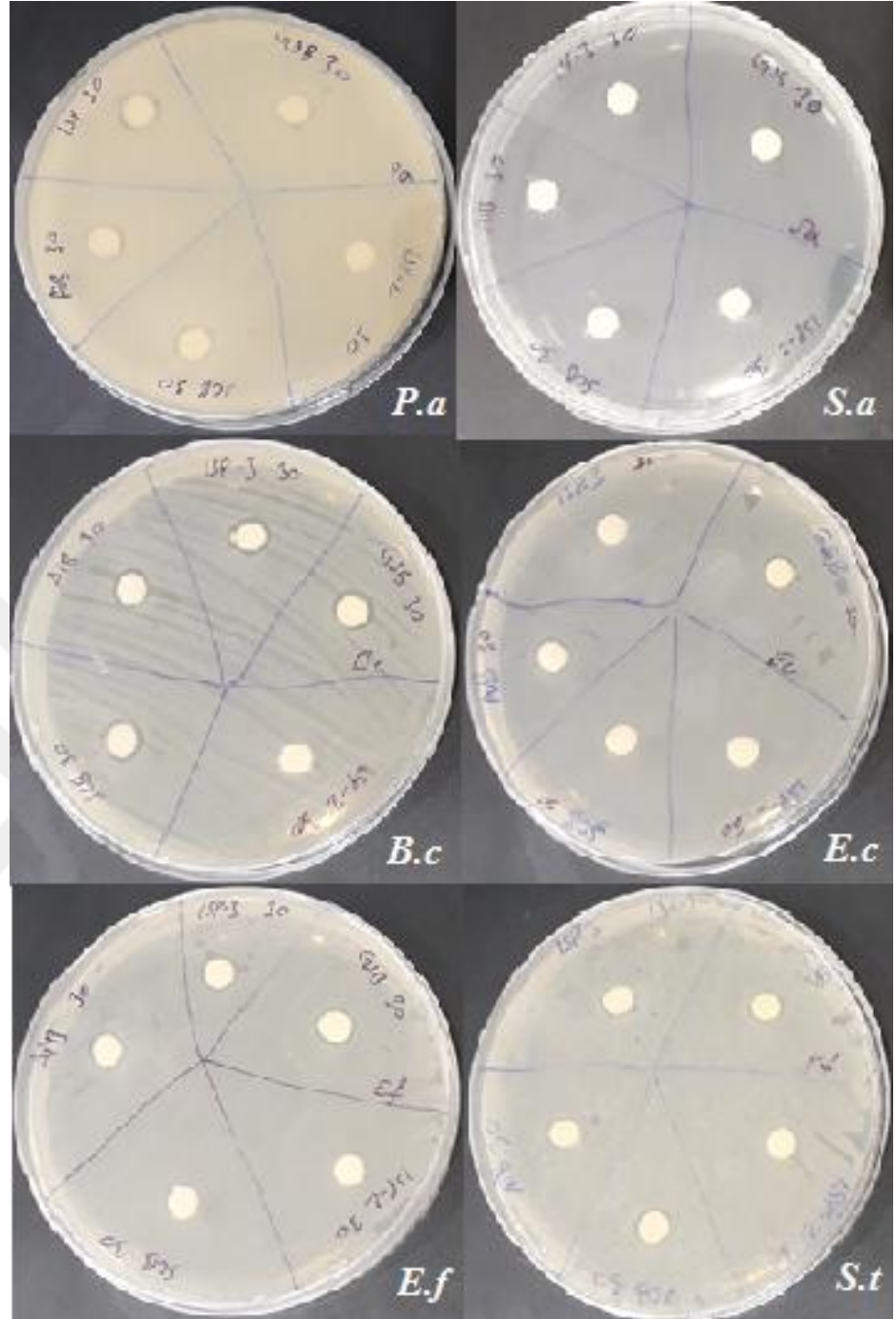


Şekil 4.8. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktları ile yapılan 6 farklı bakteriyel patojene karşı gösterdiği antibakteriyel aktivite denemeleri sonucu elde edilen zon çapları.

Çizelge 4.10. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktları ile yapılan antibakteriyel aktivite taramalarında bakteriyel test organizmalarına karşı gösterdiği zon çapları.

Test Organizmaları	Besiyerleri ve Antibakteriyel Aktivite Zon Çapları				
	ISP-3	GSUB	ISP-2	NKB	AİB
<i>P. aeruginosa</i>	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm	13 mm
<i>S. auerus</i>	10 mm	12 mm	12 mm	12 mm	18 mm
<i>B. cereus</i>	13 mm	11 mm	14 mm	13 mm	15 mm
<i>E. coli</i>	12 mm	11 mm	14 mm	12 mm	14 mm
<i>E. faecalis</i>	12 mm	12 mm	14 mm	12 mm	14 mm
<i>S. typhimurium</i>	13 mm	12 mm	15 mm	12 mm	15 mm

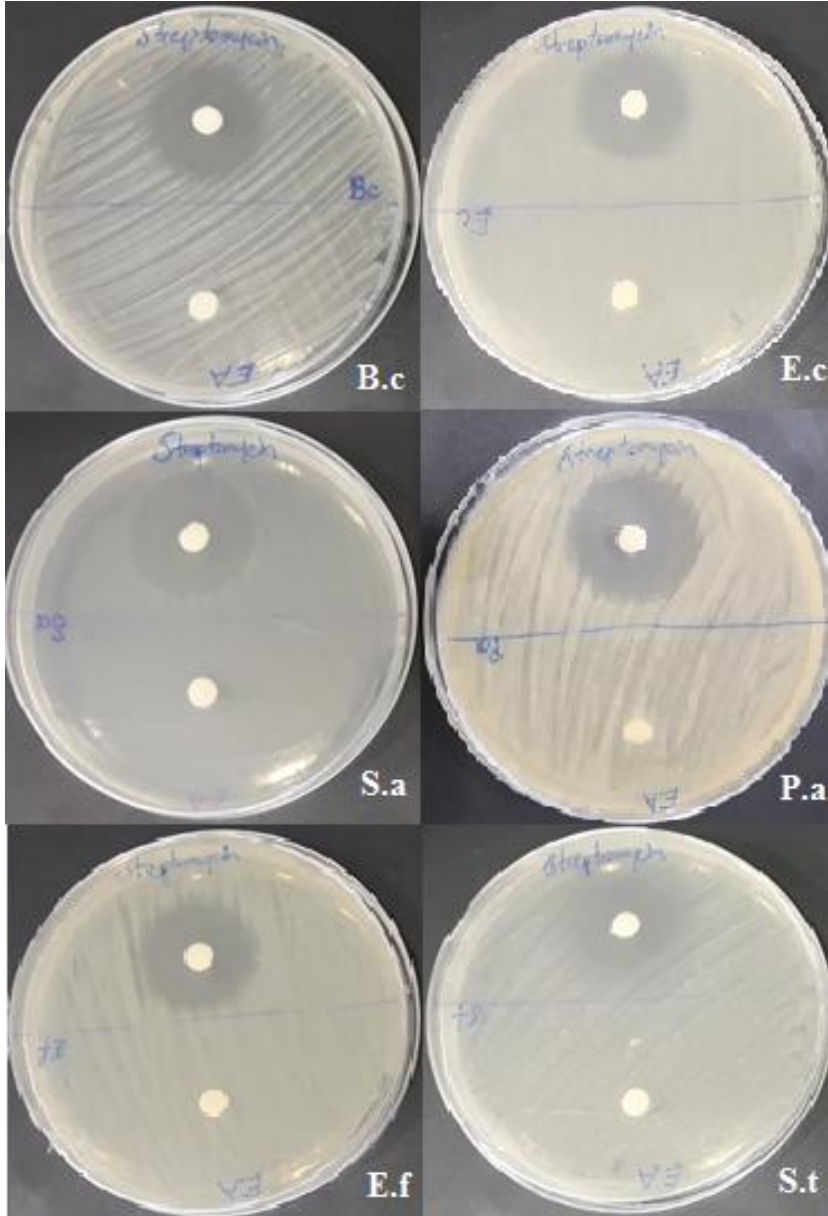
İkincil taramalar sırasında en yüksek antifungal aktiviteyi gösteren CYP-30 izolatının, antibakteriyel aktivite potansiyelinin de belirlenmesi açısından, elde edilen ekstraktlar antibakteriyel aktivite denemelerine tabi tutulmuştur. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktlar ile yapılan antibakteriyel aktivite denemelerinin sonuçları Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktları ile yapılan antibakteriyel aktivite denemelerinin sonuçları.

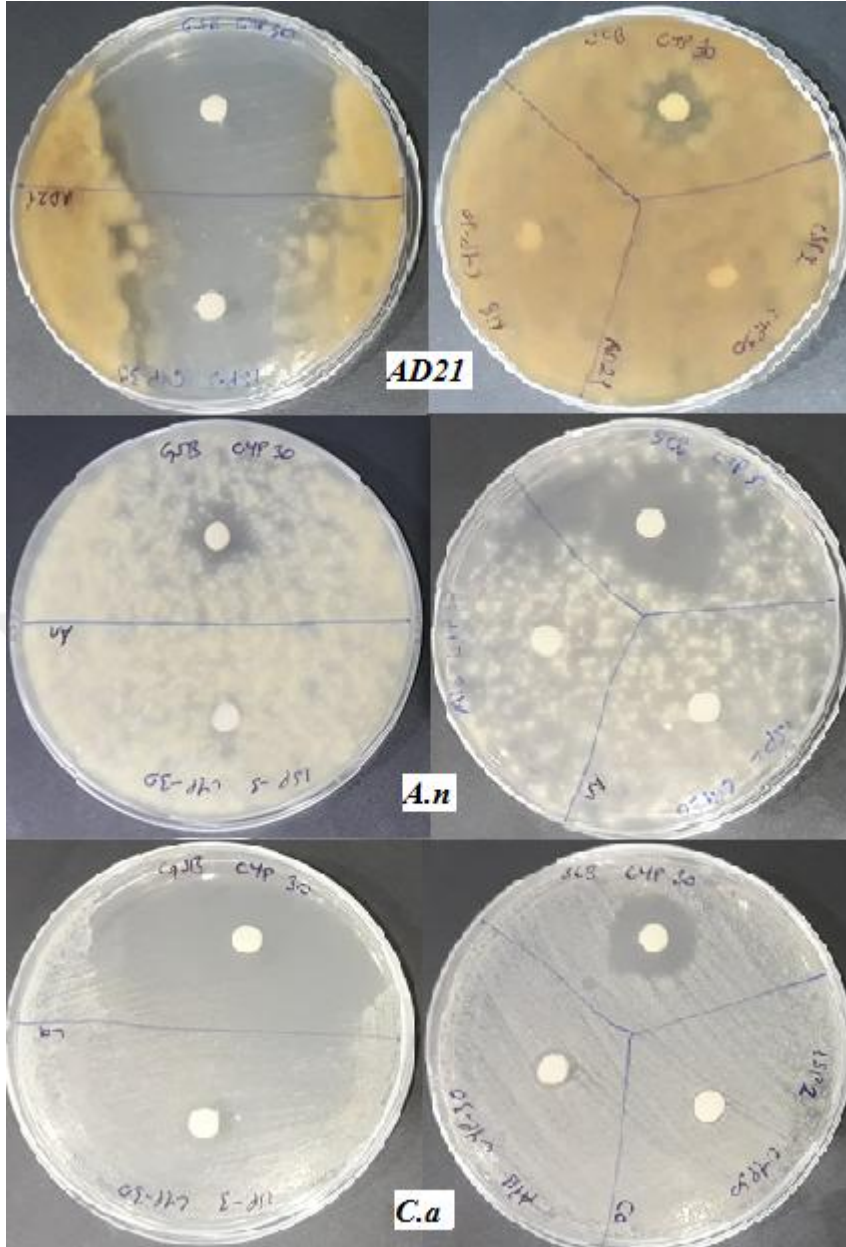
CYP-30 izolatının ekstraktları, neredeyse hiçbir bakteriyel izolata karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Sadece GSB ve AİB besiyerlerinden elde edilen ekstraktlar bakteriyel patojen *B. cereus*'a karşı 10 mm çapında zonlar oluşturmuştur.

Bu denemelerde negatif kontrol olarak kullanılan etil asetat, hiçbir bakteriyel test organizmasına karşı antibakteriyel etki göstermemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan streptomisin antibiyotığı ise, *P. aureginosa* ve *S. aureus*'a karşı 27 mm, *E. faecalis*'e karşı 25 mm, *S. typhimirium*, *B. cereus* ve *E. coli*'ye karşı 24 mm zon çapında antibakteriyel etki göstermiştir. Negatif ve pozitif kontrollerin anibakteriyel aktivite sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Negatif (etil asetat) ve pozitif kontrolün (streptomisin) 6 farklı bakteriyel patojene karşı gösterdiği anibakteriyel aktivite sonuçları. (EA: etil asetat)

CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktlar ile yapılan antifungal denemelerin sonuçları Şekil 4.11’de gösterilmektedir. Bu izolat, en yüksek antifungal aktiviteyi *C. albicans* ve *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120)’e karşı GSB besiyerinden elde edilen ekstraktlar ile yapılan denemelerde göstermiştir. İzolatın GSB besiyerinden elde edilen ekstraktları kullanılarak en yüksek aktivitesi *C. albicans*’a karşı saptanmış olup; elden edilen zon çapı 60 mm’dir. Yine aynı besiyerinde, 52 mm ve 16 mm zon çapları ile sırasıyla, *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120) ve *Aspergillus niger*’e karşı antifungal aktivite göstermiştir. *Aspergillus niger*’e karşı en yüksek aktivite GSB besiyerinin aksine NKB besiyeri kullanılarak elde edilen ekstraktlarla yapılan antifungal aktivite denemelerinde de saptanmıştır. ISP-2 ve AİB besiyerlerinde ise hiçbir fungal patojene karşı aktivite göstermemiştir. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktlarının 3 farklı fungal patojene karşı gösterdiği antifungal aktivite zon çapları Çizelge 4.11’de gösterilmektedir.

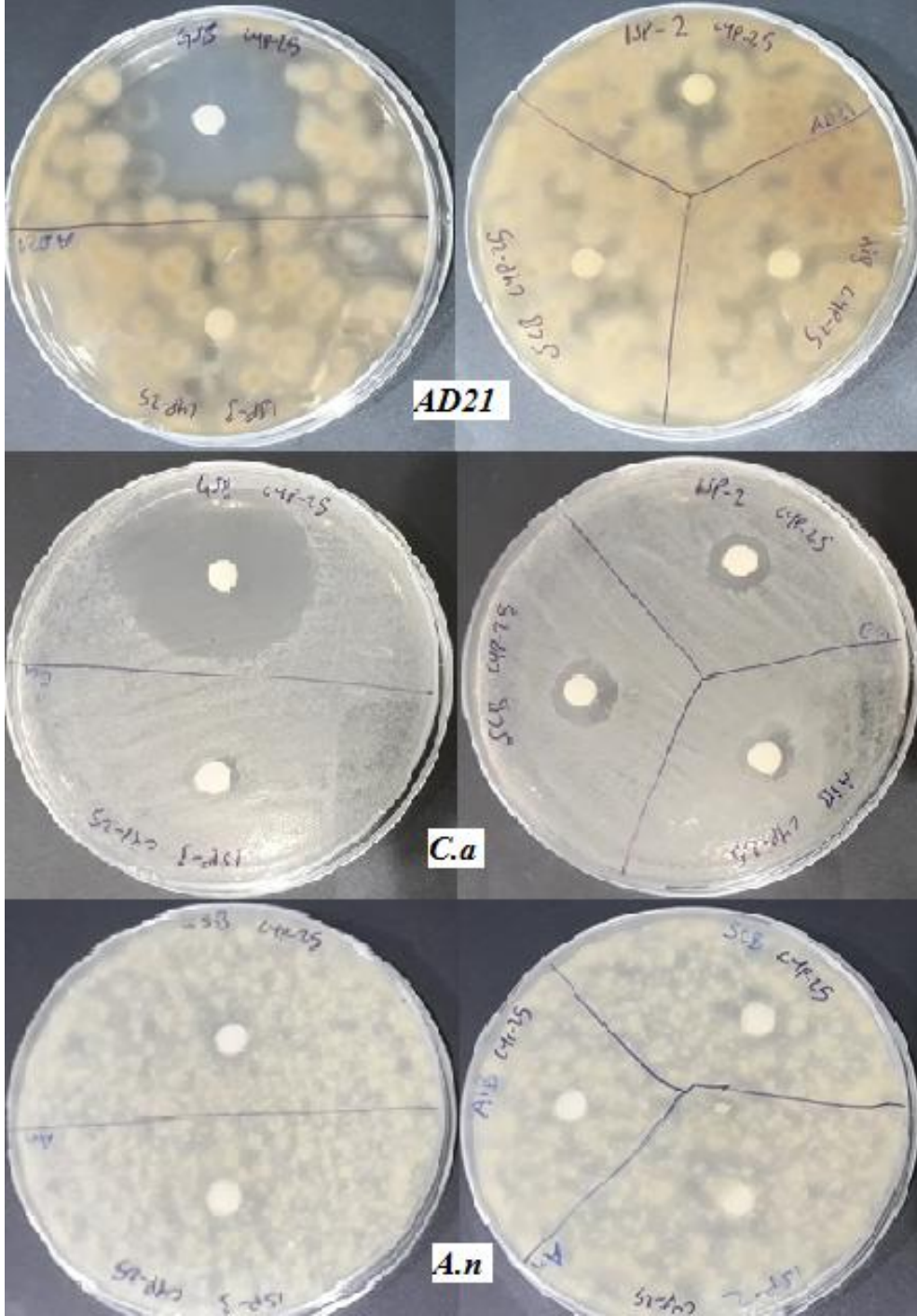


Şekil 4.11. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraları ile yapılan antifungal aktivite denemelerinin sonuçları (C.a: *Candida albicans*, A.n: *Aspergillus niger*, AD21: *Alternaria sp.* izolat D21 (Accession No. MH029120)).

Çizelge 4.11. CYP-30 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktlarının 3 farklı fungal patojene karşı gösterdiği antifungal aktivite zon çapları.

	Besiyerleri ve Antifungal Aktivite Zon Çapları				
Test Organizmaları	ISP-3	GSUB	AİB	NKB	ISP-2
<i>C. albicans</i>	13 mm	60 mm	11 mm	20 mm	-
<i>A. niger</i>	11 mm	16 mm	-	25 mm	-
<i>Alternaria sp. D21</i>	40 mm	52 mm	-	16 mm	-

İkincil taramalar sırasında en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösteren CYP-25 izolatının, antifungal aktivite potansiyelinin de belirlenmesi açısından, elde edilen ekstraktları antifungal aktivite denemelerine tabi tutulmuştur. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktlar ile yapılan antifungal denemelerin sonuçları Şekil 4.12’de gösterilmektedir. Bu izolat, en yüksek antifungal aktiviteyi GSUB besiyerinden elde edilen ekstraktlar ile yapılan denemelerde göstermiştir. En yüksek aktiviteyi GSUB besiyerinden elde edilen ekstraktlar ile *C. albicans*’a karşı 40 mm zon çapı oluşturarak göstermiştir. Yine aynı besiyerinde 25 mm zon çapı ile *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120)’e antifungal aktivite gösterirken, *Aspergillus niger*’e karşı antifungal aktivite göstermemiştir. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktlarının 3 farklı fungal patojene karşı gösterdiği antifungal aktivite zon çapları Çizelge 4.12’de gösterilmektedir.

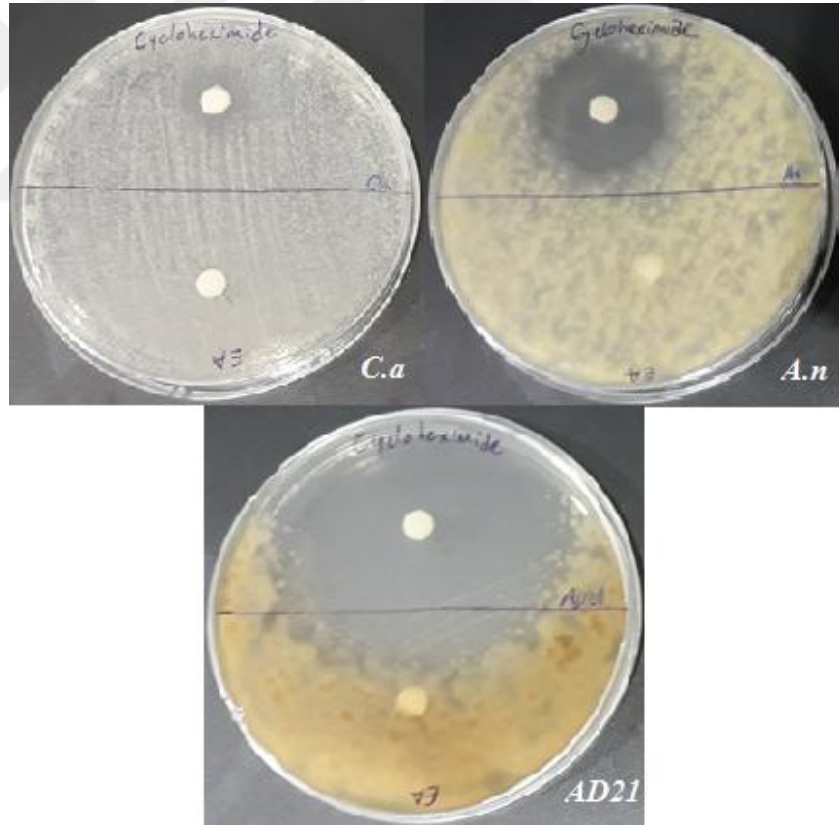


Şekil 4.12. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyonu sonucunda elde edilen ekstraktlar ile yapılan antifungal denemelerin sonuçları (C.a: *Candida albicans*, A.n: *Aspergillus niger*, AD21: *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120)).

Çizelge 4.12. CYP-25 izolatının beş farklı besiyerinden elde edilen ekstraktlarının 3 farklı fungal patojene karşı gösterdiği antifungal aktivite zon çapları.

Test Organizmaları	Besiyerleri ve Antifungal Aktivite Zon Çapları				
	ISP-3	GSUB	AİB	NKB	ISP-2
<i>C.albicans</i>	13 mm	40 mm	11 mm	15 mm	14 mm
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp. D21	-	25 mm	-	-	-

Bu denemelerde negatif kontrol olarak kullanılan etil asetat, hiçbir fungal test organizmasına karşı antifungal etki göstermemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan sikloheksimid ise, *C. albicans*'a karşı 13 mm, *A. niger*'e karşı 27 mm, *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120)'e karşı ise 50 mm zon çapında antibakteriyel etki göstermiştir. Negatif ve pozitif kontrollerin antifungal etki sonuçları Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Negatif ve pozitif kontrollerin antifungal etki sonuçları (C.a: *Candida albicans*, A.n: *Aspergillus niger*, AD21: *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120)).

Ekstraksiyon işlemlerinin gerçekleştirildiği beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyon süresi sonunda CYP 25 ve CYP 30 izolatlarının oluşturduğu kuru ağırlık miktarları belirlenmiştir ve Çizelge 4.13'te gösterilmektedir.

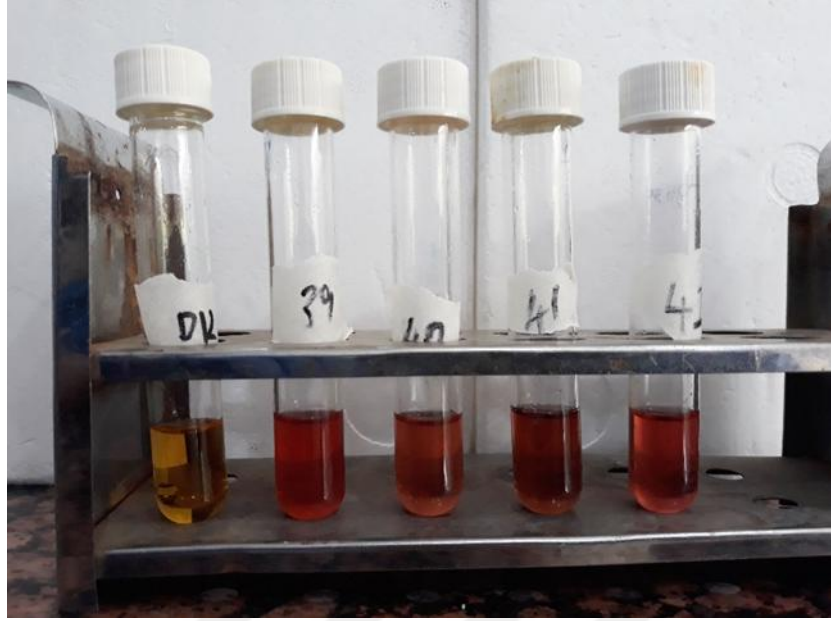
Çizelge 4.13. Ekstraksiyon işlemlerinin gerçekleştirildiği beş farklı besiyerinde 7 günlük inkübasyon süresi sonunda CYP25 ve CYP30 izolatlarının oluşturduğu kuru ağırlık miktarları.

Besiyerleri	İzolatların Kuru ağırlıkları	
	CYP25	CYP30
AİB	0.50 g	0.38 g
SCB	0.75 g	0.02 g
ISP-2	0.69 g	0.01 g
ISP-3	1.05 g	1.55 g
GSUB	2.68 g	1.61 g

4.5 Agroaktif Bileşik Üretimi Taramalarının Sonuçları

4.5.1 İndol asetik asit üretimi taramalarının sonuçları

Triptofan ile desteklenmiş ISP-2 ortamında 14 gün süre ile gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda 42 aktinomiset izolatı arasından 12 tanesi IAA üretimi gerçekleştirmiştir. IAA üretimi kırmızı-pembe renk oluşumu ile saptanmaktadır. Pozitif sonuç veren bu 12 izolat, kantitatif taramalar için seçilmiştir. İndol asetik asetik üretimine bağlı olarak gerçekleşen kırmızı-pembe renk oluşumunun görüldüğü bazı izolatlar Şekil 4.14'te görülmektedir.



Şekil 4.14. Indol asetik asetik üretimine bağlı olarak gerçekleşen kırmızı-pembe renk oluşumunun görüldüğü bazı izolatlar.

Önceki aşamalarda kırmızı pembe rengin gözlemlendiği izolatlar spektrofotometre ile 535 nm’de okunmuştur. İzolatların oluşturmuş oldukları IAA miktarı, IAA standart eğrisi ile karşılaştırılarak $\mu\text{g/ml}$ cinsinden belirtilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan rizosferik aktinomiset izolatlarının oluşturdukları IAA miktarları 5,0 - 51,04 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişmektedir. Renk değişimi gözlemlenen izolatlardan en düşük üretimi 5,0 $\mu\text{g/ml}$ ile CYP-25 izolatı gerçekleştirirken, en yüksek üretimi 51,04 $\mu\text{g/ml}$ ile CYP-39 izolatı gerçekleştirmiştir. İzolatların 14. gün sonunda oluşturdukları IAA miktarları, kırmızı-pembe renk oluşum düzeyleri ve kuru ağırlıkları Çizelge 4.14’te görülmektedir.

Çizelge 4.14. İzolatların 14. gün sonunda oluşturdukları IAA miktarları, kırmızı-pembe renk oluşum düzeyleri ve kuru ağırlıkları.

İzolatlar	Kırmızı Renk Oluşumu	Kuru ağırlık(g)	IAA(μ g/ml)
CYP-17	+	0,36	9,7
CYP-20	+	0,21	5,2
CYP-25	+	1,41	5,0
CYP-33	+	0,01	7,4
CYP-35	++	0,53	12,24
CYP-36	++	0,24	10,6
CYP-37	+	0,34	9,6
CYP-38	+	0,57	7,7
CYP-39	++++	0,05	51,04
CYP-40	+++	0,25	21,4
CYP-41	+++	0,36	23,7
CYP-42	+++	0,53	24,7

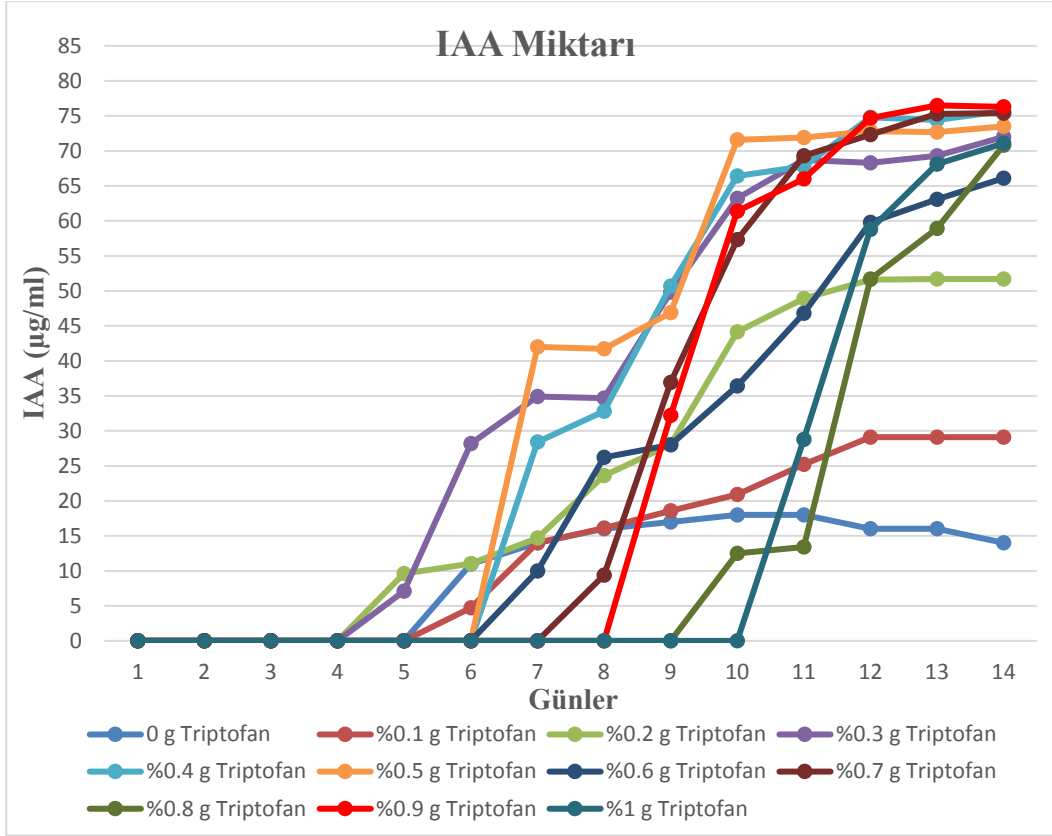
En yüksek üretimi gerçekleştiren CYP-39 izolatı, IAA üretim miktarının farklı L-triptofan konsantrasyonlarına ve günlere göre değişimini belirlemek için kullanılmıştır. L-triptofan içermeyen ortamda çok düşük miktarlarda olsa da IAA üretimi saptanmıştır. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarında yapılan denemelerde ise, inkübasyon sürecinin ilk 4 gününde kullanılan L-triptofan konsantrasyonlarının hiçbirinde üretim gerçekleşmemiştir. IAA üretim süreci 5.gün başlayıp artarak devam etmiştir. Buna istisna olarak sadece triptofan içermeyen ortamda gerçekleşen IAA üretiminde küçük miktarlarda dalgalanmalar mevcuttur. Üretim miktarı 4,7- 76,5 μ g/ml arasında değişmektedir. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarındaki günlere göre üretilen IAA miktarı Çizelge 4.15'te gösterilmektedir. En düşük üretim (4,7 μ g/ml) % 0,1 g L-triptofan içeren ortamda 6. gün gerçekleşirken, en yüksek üretim (76,5 μ g/ml) ise % 0,9 g L-triptofan içeren ortamda 13. gün gerçekleşmiştir.

En erken üretim % 0,2 ve % 0,3 g L-triptofan içeren ortamlarda 5. günde gerçekleşmiştir. En geç üretim ise % 1 g L-triptofan içeren ortamda 11. günde gerçekleşmiştir. Tüm L-triptofan konsantrasyonlarında inkübasyon sürecinin sonlarına doğru üretim miktarı sabitlenmiş ya da çok az artış göstermiştir. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarında üretilen IAA miktarlarının günlere göre değişimi Şekil 4.15'de gösterilmektedir. CYP-39 izolatının farklı L-triptofan

konsantrasyonlarındaki ortamların 14. gün sonundaki kuru ağırlık miktarları Çizelge 4.16’da gösterilmektedir.

Çizelge 4.15. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarında IAA üretiminin gerçekleştiği günler ve günlere göre üretilen IAA miktarları.

	Tryptofan Konsantrasyonları ve IAA miktarları (µg/ml)										
Gün	0%	%0.1	%0.2	%0.3	%0.4	%0.5	%0.6	%0.7	%0.8	%0.9	1%
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	9,6	7,1	0	0	0	0	0	0	0
6	11	4,7	11	28,2	0	0	0	0	0	0	0
7	14	14	14,7	34,9	28,4	42	10	0	0	0	0
8	16	16,1	23,6	34,7	32,8	41,7	26,2	9,4	0	0	0
9	17	18,6	28,1	49,8	50,7	46,9	28	36,9	0	32,2	0
10	18	20,9	44,2	63,2	66,4	71,6	36,4	57,3	12,5	61,4	0
11	18	25,2	48,9	68,7	67,8	71,9	46,8	69,3	13,4	66	28,8
12	16	29,1	51,6	68,3	74,8	72,8	59,8	72,3	51,7	74,7	58,8
13	16	29,1	51,7	69,3	74,4	72,7	63,1	75,3	58,9	76,5	68,1
14	14	29,1	51,7	72	75,7	73,5	66,1	75,4	70,8	76,3	71,08



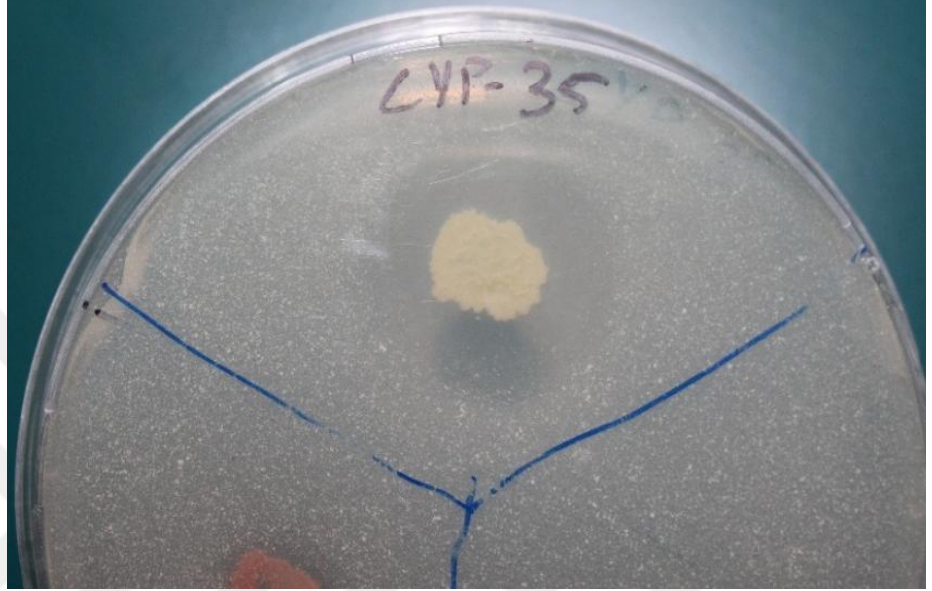
Şekil 4.15. Farklı L-triptofan konsantrasyonlarında üretilen IAA miktarlarının günlere göre değişimi.

Çizelge 4.16. CYP-39 izolatının farklı L-triptofan konsantrasyonlarındaki ortamlarda 14. Günlük inkübasyon süreleri sonundaki üremelerinin kuru ağırlık cinsinden miktarları.

L-triptofan Konsantrasyonları	Kuru Ağırlık
%0 g	0,54 g
%0.1 g	0,30 g
%0.2 g	0,17 g
%0.3 g	0,13 g
%0.4 g	0,39 g
%0.5 g	0,15 g
%0.6 g	0,06 g
%0.7 g	0,41 g
%0.8g	0,42 g
%0.9 g	0,41 g
%1 g	0,53 g

4.5.2 Fosfat çözünürlüğü aktivitesi taramalarının sonuçları

PVKA ortamına ekilen izolatların, petri üzerindeki koloni çevresinde berrak bir bölge oluşturması (Şekil 4.16) fosfat çözünürlüğünün bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.16. CYP-35 izolatının, PVKA üzerinde fosfat çözünürlüğü aktivesi sonucu oluşturduğu berrak zon.

Bu çalışmada kullanılan, 42 izolattan 15 tanesinin fosfat çözünürlüğü aktivitesini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. İzolatların 14. gün sonunda halo-zon çapları 3 mm ile 11 mm arasında değişmektedir. En düşük halo-zon çapını CYP-7 izolatı, en yüksek halo-zon çapını ise CYP-35 izolatı oluşturmuştur.

14. gün sonunda, halo-zon çapı ≥ 9 mm olan 2 izolat kantitatif taramalar için seçilmiştir. Tüm izolatların, belirli günlerdeki halo-zon çapları Çizelge 4.17’de görülmektedir.

Çizelge 4.17. İzolatların belirli günlerdeki halo-zon çapları.

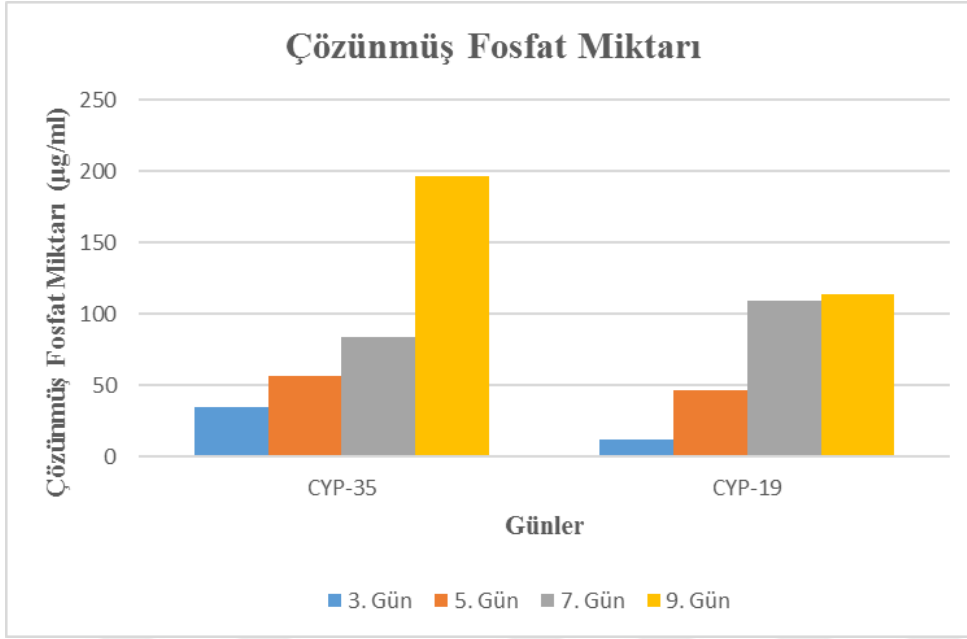
[illegible]

Kalitatif taramalar sonucunda seçilen izolatların, supernatanta salınan suda çözünür fosfat miktarı, indirgenmiş-klorostannous-molibdofosforik asit yöntemi ile belirlenmiş ve bu aşamada oluşan mavi renk Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



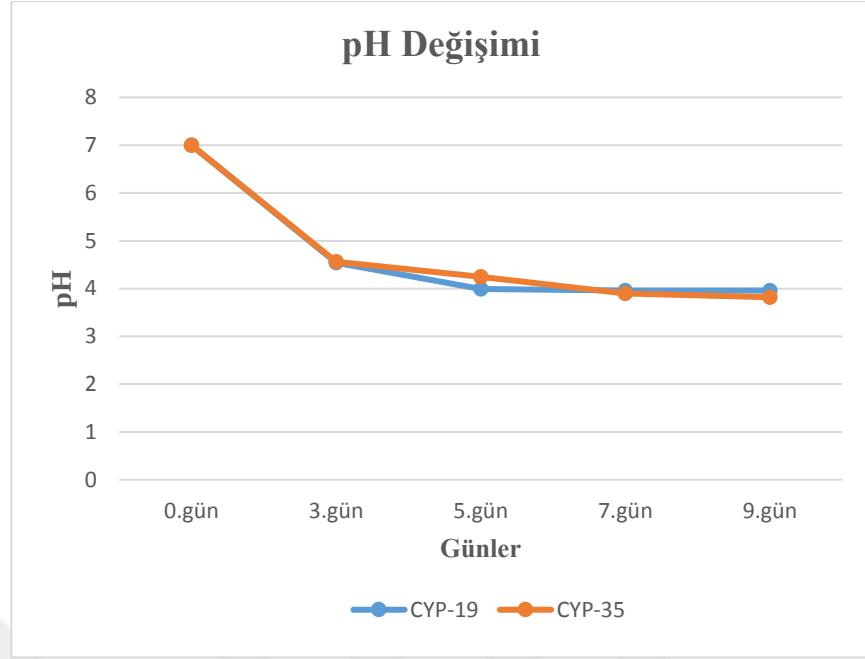
Şekil 4.17. İndirgenmiş-klorostannous-molibdofosforik asit yöntemi sonucu oluşan mavi renk.

Kantitatif fosfat çözünürlüğü taramaları gerçekleştirilen her iki izolat da, en yüksek çözünmüş fosfat üretimini inkübasyon sürecinin 9. gününde gerçekleştirmiştir. En yüksek fosfat çözünürlüğü aktivitesine sahip izolat CYP-35 olarak saptanmıştır. CYP-19 izolatı, 114,2 $\mu\text{g/ml}$ üretim gerçekleştirirken, CYP-35 izolatı 196,49 $\mu\text{g/ml}$ üretim gerçekleştirmiştir. İki izolatın günlere göre oluşturdukları çözünmüş fosfat miktarları Şekil 4.18’de görülmektedir.



Şekil 4.18. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının günlere göre oluşturdukları çözünmüş fosfat miktarları.

Fosfat çözünürlüğünün artışıyla birlikte, ortamın pH'ında düşüş gerçekleşmiştir. CYP-35 izolatı pH'ı 7'den 3,82'ye, CYP-19 izolatı ise 7'den 3,96'ya düşürmüştür (Şekil). En düşük pH değerleri her iki izolat için de, inkübasyon sürecinin 9. gününde saptanmıştır. İki izolatın günlere göre oluşturduğu çözünmüş fosfat miktarları ve pH değerleri Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının fosfat çözünürlüğüne bağlı inkübasyon süresinin sonunda oluşturdukları kuru ağırlık miktarları ise sırasıyla 0,30 g ve 0,39 g'dır.



Şekil 4.19. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının fosfat çözünürlüğüne bağlı pH değişimleri.

Çizelge 4.18. CYP-19 ve CYP-35 izolatlarının günlere göre oluşturduğu çözünmüş fosfat miktarları ve pH değerleri.

Günler	CYP-35		CYP-19	
	pH	Çözünür Fosfat (µg/ml)	pH	Çözünür Fosfat (µg/ml)
3. Gün	4,54	12,2	4,56	35,2
5. Gün	3,99	56,6	4,25	46,7
7. Gün	3,96	84	3,9	109
9. Gün	3,96	196,4	3,82	114,2

4.5.3 Asit ve alkali fosfataz aktivite taramalarının sonuçları

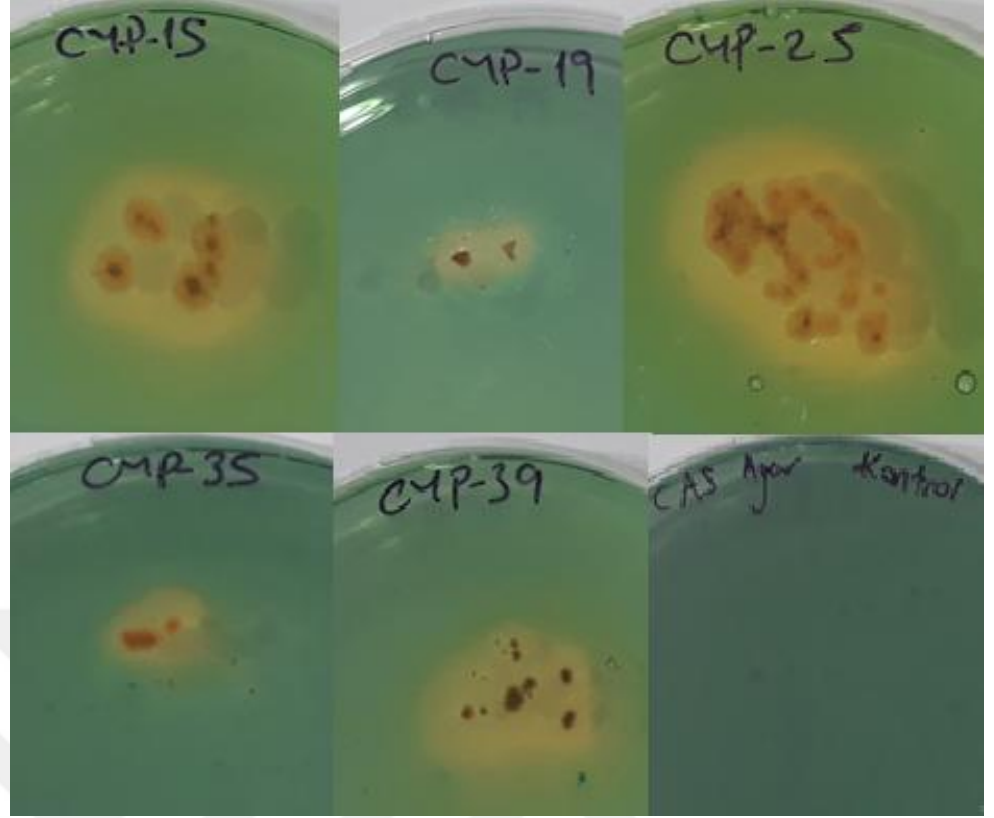
CYP-19 ve CYP-35 izolatları, belirlenen prosedür ile alkali ve asit fosfataz aktivitesi açısından taranmıştır. Ancak iki izolatta da aktivite saptanamamıştır ya da saptanacak düzeyin altındadır.

4.5.4 Siderofor üretimi

CAS agarda taramaları yapılan 42 aktinomiset izolatı arasında, 34 tanesi siderofor üretimini gerçekleştirmiştir. En yüksek halo-zon çapları, CYP-11, CYP-14 ve CYP-25 izolatları tarafından oluşturulmuştur. Tüm izolatların siderofor oluşturma düzeyleri Çizelge 4.19’da, siderofor üretimi gerçekleştiren bazı izolatların oluşturduğu turuncu renkli halo-zonlar Şekil 4.20’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.19 Tüm izolatların siderofor oluşturma düzeyleri.

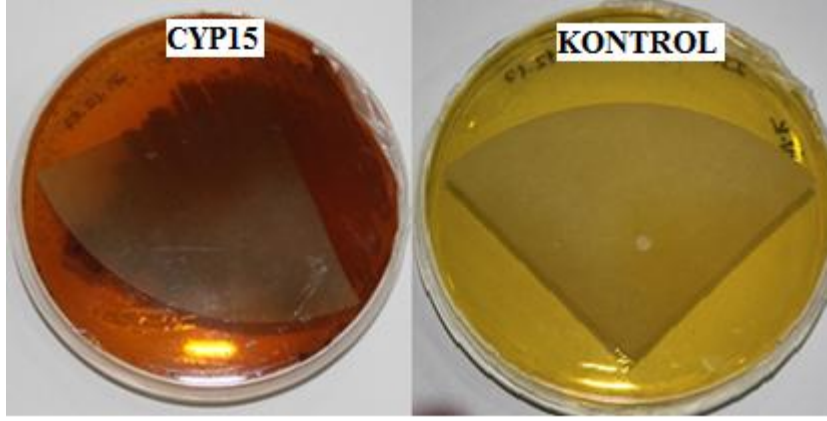
İzolat	Siderofor Üretimi	İzolat	Siderofor Üretimi	İzolat	Siderofor Üretimi
CYP-1	-	CYP-15	+++	CYP-29	++
CYP-2	-	CYP-16	++	CYP-30	-
CYP-3	-	CYP-17	+	CYP-31	-
CYP-4	+	CYP-18	+	CYP-32	+++
CYP-5	++++	CYP-19	+	CYP-33	++
CYP-6	++	CYP-20	++++	CYP-34	-
CYP-7	+++	CYP-21	+	CYP-35	+
CYP-8	+	CYP-22	+	CYP-36	+
CYP-9	+	CYP-23	-	CYP-37	-
CYP-10	+	CYP-24	-	CYP-38	+
CYP-11	+++++	CYP-25	+++++	CYP-39	+++
CYP-12	+	CYP-26	-	CYP-40	+++
CYP-13	++++	CYP-27	++++	CYP-41	+
CYP-14	+++++	CYP-28	++	CYP-42	+++



Şekil 4.20. Siderofor üretimi gerçekleştiren bazı izolatların oluşturduğu turuncu renkli halozonlar.

4.5.5 Hidrojen siyanür üretimi taramalarının sonuçları

İzolatların, glisin ile desteklenmiş ISP-2 agar ortamında 12 günlük inkübasyonu sonucunda, filtre kağıtlarındaki renk değişimleri incelenmiştir. 42 adet aktinomiset izolatından, 9 tanesinin HCN üretimini gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. En iyi HCN üreticisinin CYP-15 izolatı olduğu belirlenmiştir. HCN üretimi sonucu filtre kağıdında meydana gelen renk değişimi Şekil 4.21’de, tüm izolatların HCN üretim düzeyleri ise Çizelge 4.20’de görülmektedir.



Şekil 4.21. CYP-15 izolatının HCN üretimi sebebiyle, filtre kağıdında meydana getirdiği renk değişimi (kırmızı-kahveregi) ve kontrol (sarı).

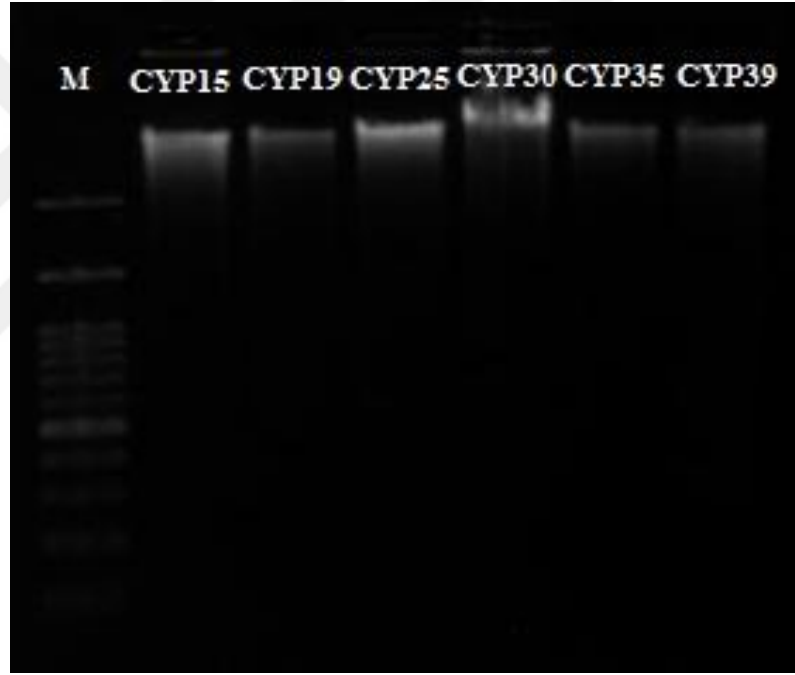
Çizelge 4.20. Tüm izolatların HCN üretim düzeyleri.

İzolat	HCN Üretimi	İzolat	HCN Üretimi	İzolat	HCN Üretimi
CYP-1	-	CYP-15	+++	CYP-29	-
CYP-2	-	CYP-16	-	CYP-30	-
CYP-3	-	CYP-17	-	CYP-31	-
CYP-4	+	CYP-18	-	CYP-32	-
CYP-5	+	CYP-19	-	CYP-33	-
CYP-6	-	CYP-20	-	CYP-34	-
CYP-7	-	CYP-21	-	CYP-35	++
CYP-8	+	CYP-22	-	CYP-36	-
CYP-9	+	CYP-23	-	CYP-37	-
CYP-10	-	CYP-24	-	CYP-38	-
CYP-11	-	CYP-25	++	CYP-39	++
CYP-12	+	CYP-26	-	CYP-40	-
CYP-13	-	CYP-27	-	CYP-41	-
CYP-14	-	CYP-28	++	CYP-42	-

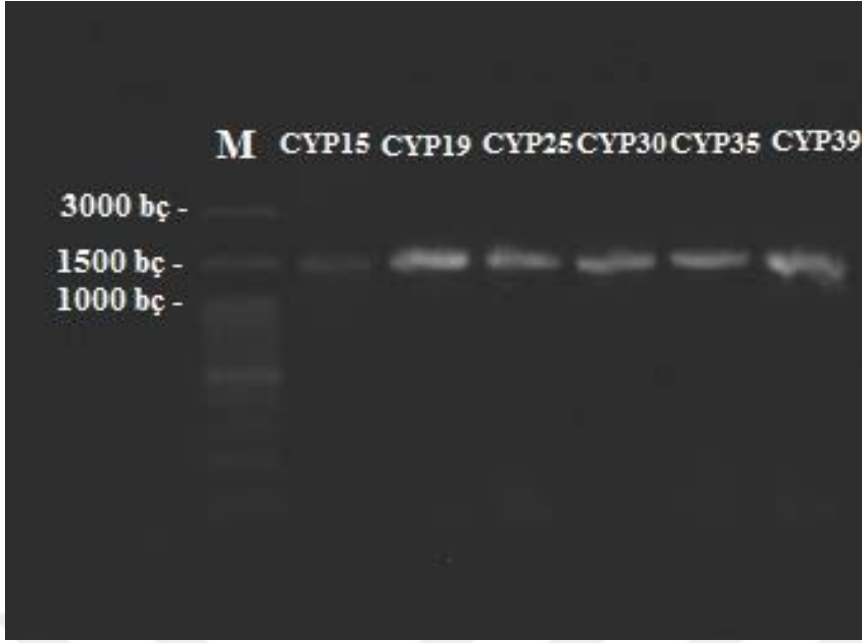
4.6 Rizosferik Aktinomiset İzolatlarının Moleküler Tanılanması

4.6.1 DNA İzolasyonu ve PZR

İzolatların DNA izolasyonu, Zymo Research Fungal/bakteriyal DNA izolasyon kitindeki prosedür aynen uygulanarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar, 8-27 F ve 1492-1510 R evrensel 16S rDNA primerleri kullanılarak, PZR işlemini gerçekleştirmek için kullanılmıştır. DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'ların ve PZR reaksiyonu sonrasında oluşan ürünlerin saflık ve bütünlük kontrolünü yapmak amacıyla gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezlerinin görüntüleri Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de gösterilmektedir.



Şekil 4.22. İzolatların genomik DNA'larının DNA izolasyonu sonucunda yapılan % 0,8 agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (M: marker).



Şekil 4.23. İzolatların PZR ürünlerinin % 1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü (M: marker).

4.6.2 16S rRNA gen bölgesi baz dizilerinin belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünlerin baz dizilerinin belirlenmesinden sonra Gen bankası veri tabanında yer alan (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) diğer baz dizileri ile karşılaştırmaları yapılmıştır. İzolatların % benzerlik oranları ve eşleşme sonuçları Çizelge 4.21'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.21. İzolatların yüzde benzerlik oranları ve eşleşme sonuçları

İzolat	% Benzerlik	Tür	Accession No.
İzolat CYP15	% 99	<i>Nocardiosis</i> sp. 13-33-15	KM886200
İzolat CYP19	% 99	<i>Streptomyces chartreusis</i> strain xsd08102	FJ481059
İzolat CYP25	% 99	<i>Streptomyces labedae</i> strain NHF7	KU500360
İzolat CYP30	% 99	<i>Streptomyces</i> sp. 620F	KP998448
İzolat CYP35	% 99	<i>Streptomyces moderatus</i> strain N19	KX149095
İzolat CYP39	% 99	<i>Nocardiosis</i> sp. 13-33-15	KM886200

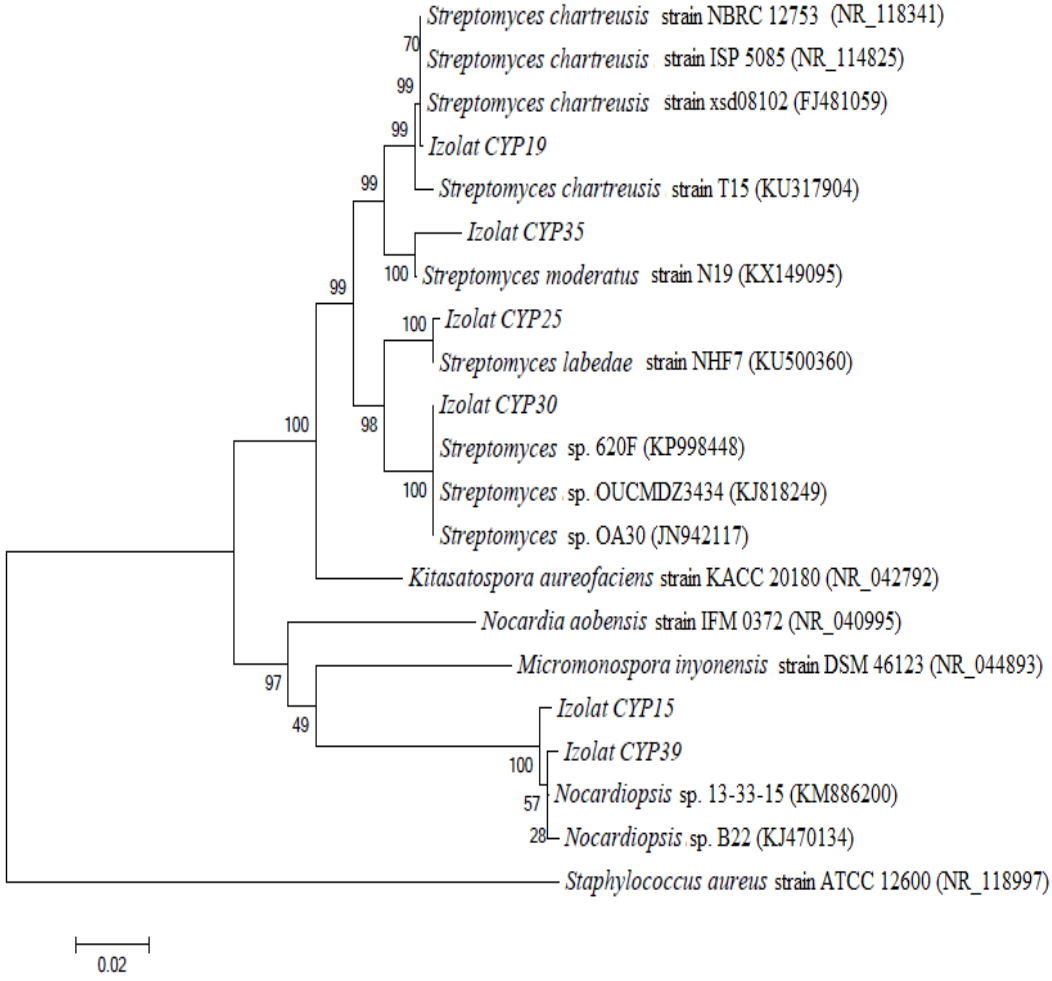
İzolatların taksonomik hatları ise aşağıdaki gibidir:

- **İzolat CYP15** : Bacteria, Actinobacteria, Streptosporangiales, Nocardiopepsaceae, *Nocardiopepsis*.
- **İzolat CYP19** : Bacteria, Actinobacteria, Streptomycetales, Streptomycetaceae, *Streptomyces*.
- **İzolat CYP25** : Bacteria, Actinobacteria, Streptomycetales, Streptomycetaceae, *Streptomyces*.
- **İzolat CYP30** : Bacteria, Actinobacteria, Streptomycetales, Streptomycetaceae, *Streptomyces*.
- **İzolat CYP35** : Bacteria, Actinobacteria, Streptomycetales, Streptomycetaceae, *Streptomyces*.
- **İzolat CYP39** : Bacteria, Actinobacteria, Streptosporangiales, Nocardiopepsaceae, *Nocardiopepsis*.

4.6.3 Filogenetik dendogram ve Gen Bankası kabul numaraları

Mega 6,0 programı ile izolatların dendogramı yapılmış olup (Şekil 4.24), Genbank'a başvuru sonucunda tarafımıza iletilen kabul numaraları (Accession No.) aşağıdaki gibidir:

- İzolat CYP15: MK254640
- İzolat CYP19: MK254641
- İzolat CYP25: MK254642
- İzolat CYP30: MK254643
- İzolat CYP35: MK254644
- İzolat CYP39: MK254645



Şekil 4.24. Mega 6,0 programı kullanılarak oluşturulan tanılanan tüm izolatları içeren filogenetik dendrogram.

5. TARTIŞMA

Rizosfer, yani bitki köklerini çevreleyen ve onlardan etkilenen dar bölge, çok sayıda organizma için sıcak bir noktadır ve dünyadaki en karmaşık ekosistemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Rizosferde bulunan organizmalar arasında bakteri, aktinomiset, mantar, oomiset, nematod, protozoa, alg, virüs, archaea ve eklembacaklılar bulunmaktadır. Rizosfer mikrobiyomunun çoğu üyesi, bitki tarafından salgılanan çok miktarda besin maddesini kullanan karmaşık bir gıda ağının parçasıdır. Bu rizodepozitlerin (örn. kök salgıları, sınır hücreleri, müsilaaj) mikrobik çeşitliliğin düzenlenmesinde ve bitki kökleri üzerindeki aktivitesinde önemli bir itici güç olduğu göz önüne alındığında, bitkilerin rizosfer mikrobiyomunu, bitki büyümesi ve sağlığına yararlı özellikleri olan mikroorganizmaları seçici olarak uyararak yararlarına modüle edebildikleri ileri sürülmüştür. Bitki büyümesi ve sağlığı üzerinde yararlı etkileri için iyi çalışılmış olan rizosfer organizmaları azot fikse edici bakteriler, mikorizal funguslar, bitki büyümesini destekleyici Rizobakteriler, biyokontrol mikroorganizmaları, mikoparazitik funguslar ve protozodur. Rizosferde bulunabilen üçüncü bir mikroorganizma grubu da insan patojenleridir. Son yıllarda, insan patojeni bakterilerin bitki dokularında ve üzerinde çoğalmasını tanımlayan artan sayıda rapor bulunmaktadır (Mendes et al., 2013).

Rizosferdeki mikroorganizmalar, bitkilerin büyümesine önemli derecede destek olmaktadır ve bitki verimine de yardımcı olmaktadır. Aktinomisetler rizosfer mikrobiyal populasyonlarının ana bileşenlerinden bir tanesidir. Topraktaki besin döngüsündeki etkilerinin yanısıra bitki büyüme desteğinde de çok önemli etkileri vardır. Aktinomisetler, litik enzimler, agroaktif bileşikler ve antibiyotikler gibi sekonder metabolitler üretmektedirler (Sreevidya et al., 2016).

Bu bilgilerin ışığında, bu tez çalışmasında rizosferden izole edilen aktinomisetlerin biyoaktif ve agroaktif bileşik üretim potansiyelleri araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında agroaktif ve biyoaktif bileşik üretim potansiyelleri saptanan 42 farklı aktinomiset izolatu; dut, domates, salatalık, öğrek otu, denizel sucul bitki olmak üzere beş farklı bitkinin rizosfer bölgelerinden izole edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Beş farklı bitki rizosferinden izole edilen aktinomisetlerin sayıca ve yüzdesel dağılımı.

Rizosferik Toprak Örnekleri	Aktinomiset Sayısı	%
Domates	6	14,3
Salatalık	6	14,3
Öğrek otu	11	26,2
Dut	11	26,2
Sucul bitki	8	19
Toplam	42	100

Etiyopya’da yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla çiftlik arazilerindeki bahçe topraklarından ve farklı bitki rizosferlerinden toplanan toprak örneklerinden toplam 30 farklı aktinomiset izole edilmiştir ve bu aktinomisetlerin % 67’si bitkilerin rizosfer bölgesindedir (Muleta and Assefa, 2018). Pakistan’da yapılan bir çalışmada ise benzer şekilde, buğday ve domates bitkilerinin rizosferik topraklarından bitki gelişimini destekleyici aktivitelerini saptamak üzere toplam 98 aktinomiset suşu izole edilmiştir (Anwar et al., 2016). Kıyisal bölgelerdeki mangrov habitatlarının araştırılması, antimikrobiyal maddeler ve yararlı enzimler üreten bol fakat yeterli düzeyde araştırılmamış olan aktinomiset popülasyonlarını ortaya koymuştur ve bunlar aynı zamanda bitki büyümesini destekleyici aktiviteler de sergilemektedir. Çin’de yapılan bir çalışmada, kıyıda halofilik bataklık bitkilerinin rizosferinden bitki gelişimini destekleyici özelliklerin taranması amacıyla 98 aktinomiset suşu izole edilmiştir (Gong et al., 2018). Benzer şekilde bu çalışmada elde edilen 42 izolattan 8 tanesi, sucul bitkilerin habitatlarından izole edilmiştir ve bu izolatların çoğu antagonistik aktivite sergilemekte olup aynı zamanda da bitki gelişimini destekleyici birçok bileşiğin üretimini gerçekleştirmiştir. Henüz keşfedilmemiş kaynaklardan yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi, insan ve bitki hastalıklarıyla mücadeleye olan talebin artarak devam etmesinden dolayı önem arz etmektedir. Bu bulgular, toprak (çeşitli toprak ve rizosfer toprağı) ve ek olarak endofitik aktinomisetlerin izolasyonuna ve antifungal ile bitki büyümesini destekleyici maddelerin *in vitro* üretimi için çeşitli taramalarına odaklanan çalışmalar yürütmeye teşvik etmektedir.

Hindistan’da yapılan farklı bir çalışmada ise, henüz keşfedilmemiş bölgelerden, toplam 321 aktinomiset izole edilmiştir. Bunların 156 tanesi ise

çeşitli bitkilerin rizosfer bölgelerindeki topraklardan izole edilmiştir. Rizosfer topraklarından izole edilenler (156), rizosferik olmayan topraklardan izole edilenlerle (103) ve endofitik olanlarla karşılaştırıldığında daha yüksek sayıdadır ve bunlar tüm izolatların % 60,2'sini oluşturmaktadır (Çizelge 5.2). Bu bulgular, rizosferin; bitki köklerindeki salgıların neden olduğu yüksek oranda organik madde girdisi nedeniyle çeşitli saprofitik mikroorganizmalar için biyolojik niş oluşturduğunu göstermektedir (Kaur et al., 2013).

Çizelge 5.2. Hindistan'da yapılan bir çalışmada henüz keşfedilmemiş bölgelerdeki bitkilerin rizosfer bölgelerindeki topraklardan izole edilen aktinomiset sayısı ve yüzdesi (Kaur et al., 2013).

Rizosferik Toprak Örnekleri	Aktinomiset Sayısı	%
Pirinç	20	7,7
Hardal	28	10,8
Lahana	24	9,3
Patates	46	17,7
Domates	20	7,7
Buğday	18	6,9
Toplam	156	60,2

Tez çalışmasında, cross-streak metodu kullanılarak gerçekleştirilen birincil antibakteriyel tarama sonucuna göre, 42 aktinomiset izolatından 4 tanesi, üçü gram negatif (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*) üçü gram pozitif (*B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*) olmak üzere, 6 patojenik bakteriyel test organizmasının tamamına karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Hindistan'da aynı metod kullanılarak gerçekleştirilen taramalarda ise, 15 izolatın çoğunun sadece gram pozitif test organizmalarına karşı aktivite gösterdiği saptanmıştır (Singh et al., 2016). Benzer şekilde, Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada, 11 izolat arasından sadece bir denizel izolat antibakteriyel aktivite açısından umut vadeci olarak belirlenmiştir (Dholakiya et al., 2017). Bu tez çalışmasında da, birincil taramalarda antibakteriyel aktivite sergileyen izolatlardan bir tanesi denizel bir kaynaktan izole edilmiştir. İran'da yapılan bir çalışmada ise, aynı metod kullanılarak gerçekleştirilen taramalar sonucunda, 21 denizel aktinomiset izolatından 3 tanesi, bakteriyel test organizmalarının en az bir tanesine karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir (Norouzi et al., 2018). Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada, pirinç rizosferinden izole edilen 121 aktinomisetten 61 tanesi

bir veya daha fazla bakteriyel patojene karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bunlardan 2 tanesi ise deneme de kullanılan tüm patojenlere karşı aktivite gösterebilmiştir (Srivastav and Pofali, 2018). Yukarıda sıralanan literatür örneklerinde ve bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanarak, karasal bitkilerin rizosferinden izole edilen aktinomisetlerin hem sayı olarak daha fazla olduğu hem de daha fazla bakteriyel patojene karşı antibakteriyel aktivite sergilediği görülmektedir. Deniz sistemlerinden izole edilen aktinomisetlerin de antibakteriyel aktivite açısından önemli bir kaynak olduğu hem bu çalışma hem de uluslararası çalışmalarla desteklenmektedir (Dholakiya et al., 2017).

Bu çalışmada, ikincil antibakteriyel aktivite taramalarında kullanılan 4 izolatın tümü, en az bir patojene karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Ancak en fazla sayıda patojene karşı yüksek aktivite gösteren bir izolat ileri çalışmalar için seçilmiştir. Hindistan'da yapılan benzer bir çalışmada, ikincil taramalar sırasında, farklı bakteriyel patojenlere karşı aktivite gösteren beş farklı izolat saptanmış ve bunlardan bir tanesinin maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kumar et al., 2012). Mangrov bitkisi *Avicennia marina* rizosferinden izole edilen aktinomisetler ile Hindistan'da yapılan bir başka çalışmada, 2 aktinomiset izolatının benzer patojen bakteriyel test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite sergileyip sergilemediği taranmış ve pozitif sonuçlar bildirilmiştir (Janaki et al., 2016). Bu tez çalışması kapsamında da benzer şekilde, maksimum aktivite sergileyerek optimizasyon aşamasında taranmak üzere seçilen bir aktinomiset izolatı sucul bitki rizosferinden izole edilmiştir. Elde edilen verilerin ve incelenen kaynakların ışığında, gerek denizel bitkilerin gerekse karasal bitkilerin rizosfer bölgelerinden ve diğer toprak kaynaklarından izole elde edilen aktinomisetlerin bir çok patojene karşı aktivite gösterebildiği söylenebilmektedir.

İkincil antibakteriyel aktivite çalışmaları sonucunda umut vadeci olarak seçilen izolatın türü, *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642) olarak belirlenmiştir ve denizel kaynaktan izole edilmiştir. Ekstraktlar ile yapılan denemelerde *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642), bakteriyel test organizmalarının tamamına karşı kullanılan tüm besiyerlerinde antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Ancak bu izolat en yüksek zon çapını *S. aureus*'a karşı 18 mm olarak, AİB besiyerinde

oluşturmuştur. En iyi ikinci besiyeri ise her bakteriyel patojene karşı belirgin aktiviteler sergileyen ekstraktların elde edildiği ISP-2'dir. İran'da yapılan bir çalışmada, tanılanmamış deniz orjinli MN39 kodlu bir aktinomiset izolatı, AİB besiyerinde *S. aureus*'a karşı 20,5 mm zon çapı oluşturmuştur (Mohseni et al., 2013). Hindistan'da yapılan bir çalışma'da ise, en iyi besiyeri ISP-2 broth olarak belirlenmiştir. Toprak izolatı *Streptomyces rimosus* FM-20'nin ISP-2 besiyerinde inkübe edilerek elde edilen ekstraktından bu çalışmada kullanılandan 10 katı kadar fazla ekstrakt kullanılarak antibakteriyel aktivite denemesi gerçekleştirilmiş ve bu suş *S. aureus*'a karşı 16 mm zon çapı oluşturmuştur. Aynı çalışmada *A. niger* ve *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite potansiyeli de denenmiş ve sırasıyla 0 ve 15 mm zon çapları saptanmıştır (Ganesan et al., 2017). Bu çalışmada ise, *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642), *A. niger*'e (0 mm) ve *C. albicans*'a (14 mm) karşı, aynı besiyerinden elde edilen ekstraktlar ile benzer antifungal aktiviteler sergilemiştir. Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde, deniz orjinli veya denize uyum sağlamış izolatların belirli patojenlere karşı antibakteriyel aktivitelerinin toprak orjinli olanlara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Tüm bunların yanında bitkiler; karbonhidratlar, amino asitler, organik asitler ve diğer salgıların salgıları ile aktinomisetlere rizosfer bölgesinde besin sağlarken aktinomisetler de antagonistik aktiviteleri aracılığıyla biyokontrol ajanları olarak önemli bir rol oynamaktadır (Ng and Amsaveni, 2012). Bu bilgilere bağlı olarak bu çalışma, rizosferden izole edilen aktinomisetlerin antimikrobiyal maddelerin üretimindeki rolünün oldukça yüksek olduğunu desteklemektedir.

Kathiresan et al., (2005), bakterilerin antimikrobiyal maddeler üretme kabiliyetlerinin farklı kültür koşulları altında arttırılabileceğini veya kaybedilebileceğini bildirmişlerdir (Khattab et al., 2016). Birçok raporda, etil asetat, ham ekstraktların aktinomisetlerden izole edilmesi için bir ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanılmıştır. Daha önce yapılan birkaç çalışma, aktinomisetlerden hücre dışı antimikrobiyal sekonder metabolitlerin elde edildiğini bildirmiştir (Ganesan et al., 2017; Kavitha et al., 2010). Literatürdeki bu çalışmalar dikkate alınarak ekstraksiyon çözücüsü olarak etil asetat seçilmiştir.

Bu tez çalışması dahilinde gerçekleştirilen antifungal aktivite taramaları sonucunda, 42 aktinomiset izolatı arasından 9 tanesi *A. niger*'e karşı aktivite göstermiştir. Bu 9 tane içerisinde ise sadece 5 tanesi hem *A. niger*'e hem de *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermiştir. Bu sonuçlar diğer birçok çalışma ile benzerlik göstermektedir ve antibakteriyel aktivite taramalarıyla kıyaslandığında daha fazla sayıda antifungal aktiviteye sahip izolat olduğu saptanmıştır. Hindistan'da yapılan benzer bir çalışmada, topraktan izole edilen 47 aktinomiset izolatı arasından 11 izolat *A. niger*'e karşı antifungal aktivite göstermişken, bunlardan sadece 6 izolat hem *A. niger* hem de *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermiştir (Saxena et al., 2013). Hindistan'da yapılan başka bir çalışmada ise, 15 toprak izolatı arasından 6 tanesi *A. niger*'e, 6 tanesi de *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermiş olup, bu 15 izolatı arasından da sadece 2 tanesi her iki fungal patojene de karşı da aktivite sergilemiştir (Singh et al., 2016). Hindistan'daki farklı bir çalışma'da mangrov bitkisi *Bruguiera cylindrica*'nın rizosferinden izole edilen 20 aktinomisetten 8 tanesi *C. albicans*'a karşı antibakteriyel aktivite sergilemiştir (Janaki, 2016). Antifungal aktiviteye sahip izolat sayısı açısından benzerlik gösteren ve antibakteriyel aktivite gösterenlere kıyasla daha yüksek olan bu çalışmalar ele alındığında; toprak orijinli aktinomisetlerin özellikle rizosfer bölgesinde bitkiler açısından büyük sorun oluşturan fitopatojen funguslara karşı bu mekanizmayı geliştirmiş olabilecekleri düşünülmektedir. Bu kapsamda değerlendirildiğinde toprak aktinomisetlerinin biyoaktif bileşiklerinin tarım ve gıda alanında kullanılabilirliğinin de umut vaadedici olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında ikincil antifungal aktivite taramalarında kullanılan 5 izolattan 4 tanesi, hem *C. albicans*'a hem de *A. niger*'e karşı aktivite göstermiştir. Ancak en yüksek antifungal aktiviteyi gösteren bir izolat optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir. Hindistan'da yapılan bir çalışma'da, *Heracleum candicans* rizosferinden izole edilen 8 aktinomiset izolatından hiçbirisi *A. niger*'e karşı aktivite sergilememiş diğer fungal patojenlere karşı ise sınırlı aktivite göstermiştir. (Kaur et al., 2015). Malezya'da yapılan bir çalışma'da, benzer şekilde ikincil taramalarda kullanılan mangrov rizosferlerinden izole edilen 25 izolatların sadece 3 tanesi *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite sergilemiştir (Malek et al., 2015). Hindistan'da denizel kaynaklardan izole edilen izolatların

supernatantları ile yapılan ikincil taramalarda, 5 izolattan 2 tanesi *C. albicans*'a ve *A. niger*'e karşı aktivite gösterirken bir tanesi sadece *A. niger*, diğer ikisi ise sadece *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermiştir (Mohan et al., 2014). Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde gerek rizosfer topraklarının yapı farklılıklarından gerekse izolasyon işleminin gerçekleştirildiği bitkilerin farklılığından ve bu bitkilerin kök salgılarının rizosferdeki floraya etkilerinden dolayı, antimikrobiyal aktivitelerin farklılık gösterebildiği göze çapmaktadır.

İkincil antifungal aktivite çalışmaları sonucunda umut vadeci olarak seçilen izolatın türü, *Streptomyces* izolat CYP30 (Accession No: MK254643) olarak belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. izolat CYP30 (Accession No: MK254643), en yüksek antifungal aktiviteyi GSUB besiyerinde, denemede kullanılan tüm fungal patojen organizmalara karşı göstermiştir. En yüksek zon çapını *C. albicans*'a karşı oluşturmuştur ve zon çapı 60 mm'dir. Yine aynı besiyerinde sırasıyla, 52 mm ve 16 mm zon çapları ile *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120) ve *Aspergillus niger*'e karşı antifungal aktivite göstermiştir. Hindistan'da yapılan benzer bir çalışmada da, birçok besiyeri arasından en iyisi GSUB seçilmiştir. Yapılan bu çalışmada *Streptomyces rimosus* Y8, *C. albicans*'a karşı 28,6 mm, *Alternaria alternata*'ya karşı 37 mm ve *A. niger*'e karşı 32 mm zon çapı oluşturmuştur (Singh and Rai, 2012). Bu çalışma ile kıyasladığımızda, *C. albicans* ve *Alternaria* sp.'ye karşı oluşturduğu zon çapı belirgin bir şekilde daha yüksektir ancak *A. niger*'e karşı daha düşük aktivite sergilemiştir. Bu farklılığın sebebi olarak, her organizmanın ürettiği biyoaktif maddenin özgülüğünden ve etki mekanizmasının belirgin değişiklikler göstermesinden kaynaklanabildiği üzerinde durulmaktadır. Farklı besiyerleri kullanılmasına rağmen ürettiği düşünülen biyoaktif maddenin spesifikliğinden dolayı *Streptomyces* sp. izolat CYP30 (Accession No: MK254643) genel olarak tüm besiyerlerinde en düşük aktiviteyi *A. niger*'e karşı sergilemiştir.

GSUB besiyeri kullanılarak saptanan yüksek antifungal zon çapları, bu ortamın soya unu içermesi kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Buna örnek olarak soya unu, *Streptomyces capoamus*'dan antimikrobiyal üretimi için uygun bir besiyeri maddesi olarak kabul edilmiştir (Ueki et al., 1996). Soya unu, karmaşık bir azot kaynağıdır ve bir dizi amino asit içerir (lisin, metiyonin, treonin, triptofan,

aspartik asit, glutamin, prolin, alanin, valin, izolösin, vb.). Soya unu içerisindeki triptofan varlığı, antibiyotik üretimini belli bir seviyeye kadar arttırmaktadır (Singh and Rai, 2012). Tüm bunların yanında, *Streptomyces* sp. izolat CYP30 (Accession No: MK254643) etkin bir antibakteriyel aktivite gösterememiştir.

Günümüzde, çoklu ilaca dirençli mikroorganizmaların insidansı giderek artmaktadır ve artan sayıda enfeksiyöz hastalığın tedavisini tehlikeye atmaktadır. Bu nedenle mevcut antimikrobiyallere dirençli patojenlere karşı etkili olan yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Aktinomisetler, potansiyel bir biyoaktif bileşik kaynağı ve zengin ikincil metabolit kaynağı olarak uzun yıllardır kanıtlanmış durumdadır (Varalakshmi et al., 2014). Sağlık alanında insan patojenleri ile devam eden savaşın yanısıra zirai alanda da sorun oluşturan ve buna bağlı olarak gıda alanında da problemler yaratabilecek çeşitli patojen mikroorganizmaların önlenmesi açısından rizosfer bölgesinden bu denli yüksek ve belki de yeni biyoaktif bileşikleri üreten aktinomisetlerin izole edilip çalışılması büyük önem arz etmektedir.

Mikroorganizmaların, farmasotik ve diğer endüstriler için çekici doğal bileşikler kaynağı oldukları gösterilmiştir. Tarımda, fitopatojenik funguslar bitki hastalıklarına ve bitkilerden elde edilen ürünlerin veriminde çok fazla kayıba neden olabilmektedir. Bitki hastalıklarını kontrol etmek için genellikle pestisitler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, zirai ilaç tedavisi çevre kirliliğine ve hedef olmayan organizmaların çeşitliliğinin azalmasına neden olmaktadır. Tüm bunların yanında, biyolojik kontrol ajanları olarak mikroorganizmaların bitki patojenlerini kontrol etme potansiyeli vardır ve çevre veya diğer hedeflenmeyen organizmalar üzerinde etkisi yoktur. Agrokimyasallar yerine biyokontrol ajanlarının potansiyel kullanımı konusunda çok sayıda rapor bulunmaktadır (Khamna et al., 2009). Tüm bu bilgilerin ışığında, rizosfer mikrobiyomunda yer alan, çok çeşitli agroaktif ve biyoaktif bileşiklerin üreticileri olarak gösterilen aktinomisetler, yukarıda sıralanan sorunların önüne geçmek adına agroaktif bileşik üretim potansiyelleri açısından taranmıştır. Bu bağlamda izole edilen 42 aktinomiset izolatı; indol asetik asit üretimi, fosfat çözündürme kapasitesi, siderofor üretimi, HCN üretimi, alkali ve asit fosfataz aktivitesi ve amonyak üretimi gibi bitki gelişimini destekleyici özellikler açısından araştırılmıştır.

Bitki gelişimini destekleyici aktinomisetlerinin büyük bir çoğunluğu, yüksek miktarlarda besin maddelerinin alınmasına ve suyun emilmesine yardımcı olan, kök salgılarının artmasıyla da bakterilerin yararlandığı adventif köklerin sayısının artmasından sorumlu olan IAA'yı sentezlemektedir (Anwar et al., 2016). Bu çalışmada kullanılan 42 aktinomiset izolatı arasında 12 tanesi, ekzojen L-triptofan varlığında 5,0 – 51,04 µg/ml arasında değişen miktarlarda IAA üretimi gerçekleştirmiştir. Cezayir'de yapılan bir çalışma'da, rizosferik topraklardan izole edilen 6 aktinomiset izolatı, ekzojen L-triptofan varlığında 0,38 – 18,45 µg/ml arasında değişen miktarlarda IAA üretimi gerçekleştirmiştir (Aouar et al., 2016). Hindistan'da, bitki gelişimini destekleyici aktinomisetler üzerine yapılan başka bir çalışma'da ise, 5,0 - 12 µg/ml arasında değişen miktarlarda IAA üretimi saptanmıştır (Mohandes et al., 2013). Brezilya'da yapılan bir çalışma'da 12 izolattan 9 tanesi, 3,13 – 50,45 arasında değişen miktarlarda IAA üretimi gerçekleştirmiştir (Rodrigues et al., 2018). Hindistan'da tıbbi bitkilerin rizosferinden izole edilen aktinomisetlerle yapılan bir çalışma'da ise, 0,008 – 2,50 µg/ml arasında değişen miktarlarda IAA üretimi saptanmıştır (Damam et al., 2016). Literatürdeki çalışmalarla kıyasladığında bu çalışmadaki üretim miktarlarının daha yüksek veya yaklaşık olarak benzer olduğu görülmektedir.

Yine Hindistan'da yapılan bir başka çalışmada, rizosferik aktinomiset izolatlarının yanı sıra endofitik aktinomisetlerde yer almaktadır. Endofitik aktinomisetler, 14 – 45 µg/ml arasında IAA üretirken, rizosferik izolatlar tarafından üretilen miktarlar, endofitlerden üretilenlere göre anlamlı derecede daha yüksek tespit edilmiştir ve 27-81 µg/ml arasında üretim saptanmıştır (Bhosale and Kadam, 2015). Bu sonuçlar göz önüne alındığında rizosferdeki aktinomisetlerin, kök salgılarından kaynaklanan çeşitli besinler (özellikle de L-triptofan) sayesinde endofitiklerden daha fazla üretim sergilemiş olabileceği düşünülmektedir (Anwar et al., 2016).

En yüksek IAA üretimi, denizel sucul bitki rizosferinden izole edilen, *Nocardiopsis* sp. izolat CYP39 (Accession No: MK254645) tarafından gerçekleştirilmiştir ve üretim miktarı 51,04 µg/ml'dir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada en yüksek üretimi (31 - 81 µg/ml) *Streptomyces* cinsi üyeleri gerçekleştirirken, burada çalışılan 3 *Nocardiopsis* cinsi üyesinden bir tanesi üretim

dahi gerçekleştirmemiştir. Diğer iki *Nocardiosis* sp. 29 ve 31 µg/ml IAA üretimi gerçekleştirmiştir (Bhosale and Kadam, 2015). Literatür taramalarına istinaden, IAA üretimiyle ilgili çalışmalarda, *Nocardiosis* cinsi üyesi rizosferik aktinomisetlerle yapılan çalışmalar var olmasına rağmen oldukça sınırlı sayıda olduğu görülmektedir bu anlamda bu çalışmada elde edilen bulgular literatüre önemli yeni bilgilerin girdisi açısından öne çıkmaktadır.

Ortamdaki arttırılan L-triptofan konsantrasyonu, Kanada ve Cezayir’de yapılan çalışmalarla da uyum içerisinde olup, *Nocardiosis* sp. izolat CYP39 (Accession No: MK254645)’da da IAA üretimini olumlu yönde etkilemiştir (Aouar et al., 2016; Legault et al., 2011). Cezayir’de yapılan çalışmada, *S. scabiei* EF-35’de in vitro IAA üretiminin büyüme ortamında L-triptofan mevcudiyetine bağlı olduğunu göstermiştir. Aksine, L-triptofanın yokluğunda rizosferik aktinomisetlerin in vitro IAA üretme kapasitesi gösterilmiştir (De Oliveira et al., 2010). Bunun nedeni, aktinomisetlerde IAA sentezi için bir öncü olarak L-triptofana bağlı olmayan alternatif bir yol izi kullanmasından kaynaklanmaktadır (Aouar et al., 2016). Burada bahsedilen çalışmaları destekler şekilde, bu tez çalışmasında da, ekzojen L-triptofan yokluğunda sınırlı miktarlarda olsa da IAA üretimi saptanmıştır. Literatürdeki ve bu tez çalışmasındaki bilgiler göz önüne alındığında; rizosferden izole edilen aktinomisetlerin, diğer izolasyon bölgelerinden izole edilenlere göre hem miktar olarak hemde L-triptofan yokluğunda da IAA üretebilmeleri açısından belirgin bir şekilde ayrıldığı görülmektedir.

Fosfor, bitkilerde en önemli besin gereksinimlerinden biridir. Toprakta fosfor, esas olarak bitkiler için erişilemeyen çözünmez formlarda bulunur. Fosfat çözündürme yeteneği bu nedenle bitki verimini arttırmak için BGDR’nın önemli bir özelliğidir (Aouar et al., 2016). Bu tez çalışmasında, 42 izolattan 15 tanesi PVK agardaki kalitatif taramalarda fosfat çözünürlüğü aktivitesi sergilemiştir. Cezayir’de yapılan bir çalışma’da, PVK agarda yapılan kalitatif taramalarda 20 aktinomiset izolatı arasından 5 tanesinde fosfat çözünürlüğü aktivitesi saptanmıştır (Aouar et al., 2016). Kolombiya’da yapılan bir çalışmada yabancı bitkilerin rizosferlerinden izole edilen 57 aktinomiset izolatından 36 tanesi, fosfat çözünürlüğü aktivitesi gerçekleştirmiştir. Brezilya’da yapılan bir çalışma’da ise,

12 izolat arasından, 7 tanesi benzer şekilde fosfat çözündürme aktivitesi sergilemiştir.

Tez çalışması kapsamında, en yüksek fosfat çözünürlüğü aktivitesi *Streptomyces moderatus* izolat CYP35 (Accession No: MK254644) tarafından gerçekleştirilmiştir ve üretim miktarı 196,49 µg/ml'dir. İkinci en yüksek fosfat çözücü aktinomiset ise, *Streptomyces chartreusis* izolat CYP19 (Accession No: MK254641) olarak belirlenmiştir. Cezayir'de yapılan bir çalışmada, *Streptomyces champavatii* Pru16 ve *Streptomyces rochei* Lac3 en yüksek fosfat çözünürlüğü aktivitesini gerçekleştirirken, *Streptomyces griseus* Lac1 aktivite göstermemiştir (Aouar et al., 2016). Tunus'ta yapılan bir çalışmada ise, *Streptomyces* sp. CTM396, 214 µg/ml çözünebilir fosfat üretimi gerçekleştirmiştir (Farhat et al., 2015). Hindistan'da yapılan benzer bir çalışma ise, en yüksek fosfat çözünürlüğü *Streptomyces* R₁₁ tarafından gerçekleştirilmiştir (Bhosale and Kadam, 2015). Brezilya'da yapılan bir çalışmada, *Streptomyces* sp. ANC48, 8,92 µg/ml çözünebilir fosfat üretimi gerçekleştirmiştir ve bu literatürdeki çalışmalar ve bu çalışma ile kıyaslandığında oldukça düşüktür (Rodrigues et al., 2018). Hindistan'da yapılan bir başka çalışma'da, en düşük çözünebilir fosfat konsantrasyonu (89,3 µg/ml) *Streptomyces* sp. NII-1002 tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki diğer aktinomiset cinslerinde ise daha yüksek konsantrasyonlar saptanmıştır (Dastager and Damare, 2013). Bu durum, genel olarak en yüksek fosfat çözünürlüğü aktivitesi sergileyen cinsin *Streptomyces* sp. olması nedeniyle literatürdeki diğer çalışmalar ile ters düşmektedir.

FÇM, çözünmez inorganik fosfat formlarını çözünebilir formlara dönüştürmek için farklı mekanizmalar kullanır. En iyi karakterize edilen mekanizma, organik asitlerin ya da yüksek şelatlama gücüne sahip siderofor benzeri maddelerin salgılanmasını içerir (Farhat et al., 2015). Hindistan'da yapılan bir çalışma'da yine benzer şekilde pH'daki düşüş (pH 7'den 3,6'ya düşmüştür) kaydedilmiştir (Dastager and Damare, 2013). Bu tez çalışması kapsamında, fosfat çözünürlüğü denemeleri sırasında, bu aktiviteye bağlı olarak organik asitlerin üretimi nedeniyle gerçekleşen pH değerlerindeki düşüş (pH 7'den 3,82'ye düşmüştür) de ölçülmüş olup, yukarıda verilen ve aynı zamanda literatürde yer alan bilgiler desteklenmiştir. Tüm bunların yanında, fosfat

çözünürlüğü aktivitesini gerçekleştiren organizmaların çoğunluğu siderofor üretimi de gerçekleştirdiği için, fosfat çözündürme aktivitesinde siderofor veya siderofor benzeri maddelerin salgılanmasının etkisi de desteklenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, kalitatif taramalarda fosfat çözünürlüğü açısından yüksek aktivite gösteren 2 izolat, alkali ve asit fosfataz aktivitesi açısından da taranmıştır. Ancak 2 izolatta da aktivite saptanamamıştır. Bunun sebebi olarak bu izolatlarda aktivitenin olmadığı veya saptanabilecek düzeyin altında olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanısıra, bu enzimlerin aktivitesi kullanılan prosedür ile saptanamamış da olabilir. İran’da yapılan bir çalışmada ise aktinomiset izolatlarından düşük miktarlardada olsa alkali ve asit fosfataz aktivitesi saptanabilmiştir (Ghorbani-Nasrabadi et al., 2013).

Bitki hastalıklarının baskılanmasında rol oynayan HCN üretimini bu tez çalışmasında 42 aktinomiset izolatı arasından 9 tanesi gerçekleştirebilmiştir. Brezilya’da yapılan bir çalışmada ise 12 izolattan hiçbirisi HCN üretimi gerçekleştirememiştir (Rodrigues et al., 2018). Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise, rizosferik izolatların % 40’ında HCN üretimi saptanmıştır (Bhosale and Kadam, 2015).

Bu tez çalışmasında, en yüksek HCN üreticisi olarak *Nocardiopsis* sp. izolat CYP15 (Accession No: MK254640), ikinci en iyi üretici olarak ise, *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642) olarak belirlenmiştir. Pakistan’da yapılan bir çalışmada ise, tüm HCN üreten izolatların, *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Anwar et al., 2016). Benzer şekilde, Endonezya’da yapılan bir çalışmada, güçlü bir HCN üreticisi olarak *Streptomyces* sp. LSW05 suşu bildirilmiştir (Husen et al., 2011). Hindistan’da yapılan bir çalışma’da, diğer tüm bitki gelişimini destekleyici özellikleri sergileyen *Nocardiopsis* S₁, S₂ ve S₃ suşlarının, HCN üretimi gerçekleştirmedeği saptanmıştır. Ancak yine aynı çalışmada *Streptomyces* sp.’nin çoğunluğu HCN üretimi gerçekleştirmiştir (Bhosale and Kadam, 2015). Literatürde yer alan ve yukarıda sıralanan çalışmalarda, *Nocardiopsis* cinsi HCN üreticisi organizmalara pek fazla rastlanamamıştır. Bu açıdan bakıldığında, bu çalışmadaki en iyi HCN üreticisi olarak belirlenen *Nocardiopsis* sp. izolat CYP15 (Accession No:

MK254640) literatüre dahil edilen sayılı *Nocardiosis* cinsi HCN üreticilerinden olması nedeniyle önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, ikinci en iyi HCN üreticisi olarak belirlediğimiz *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642), çalışma kapsamında hem en iyi antibakteriyel madde üreticisi hem de bitki patojeni olan *Alternaria* sp. izolat D21 (Accession No. MH029120)'i ve *C. albicans* güçlü bir şekilde inhibe etmesinden dolayı antifungal üreticisi olarak da belirlenmiştir. Bu yukarıda bahsedilen, HCN üretiminin bitki patojenlerini ve dolayısıyla da bitki hastalıklarını baskılamadaki rolünü destekler niteliktedir.

Sideroforlar, birçok mikroorganizma tarafından ferrik demiri yüksek afinite ile şelatlamak için üretilen düşük moleküler ağırlıklı demir şelatlayıcılardır ve bunun sonucunda elde edilen ferrik-siderofor kompleksleri, aktif taşıma mekanizmaları yoluyla hücrelerin içine geri gönderilir (Jog et al., 2012). Bazı aktinomiset cinsleri, oligotrofik ortamlarda demir alımı için verimli bir şekilde rekabet edebilmek adına, sideroforları sentezleme ve salgılama yetenekleri bakımından iyi bilinmektedir. Bu özellik aynı zamanda bitkiler için de yararlıdır, çünkü rizosferik aktinobakteriler tarafından salgılanan sideroforlar demir alımını arttırarak bitki büyümesini önemli ölçüde destekleyebilmektedir (Mohandas et al., 2013; Aouar et al., 2016).

Bu tez çalışmasında, 42 rizosferik aktinomiset izolatından 32 tanesi siderofor üretimi gerçekleştirmiştir. Bu izolatlar arasından, siderofor üreticisi olup tanılanmış olan türler, *Nocardiosis* sp. ve *Streptomyces* sp.'ye (*Nocardiosis* sp. izolat CYP15 (Accession No: MK254640), *Nocardiosis* sp. izolat CYP39 (Accession No: MK254645), *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642), *Streptomyces moderatus* izolat CYP35 (Accession No: MK254644), *Streptomyces chartreusis* izolat CYP19 (Accession No: MK254641)) aittir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada siderofor üretimi açısından taranan 19 rizosferik aktinomiset izolatı arasından sadece 9 tanesi üretim gerçekleştirmiştir ve çoğu siderofor üreticisi aktinomiset *Streptomyces* cinsine aitken, taranan bir *Nocardiosis* cinsi üyesi siderofor üretimi gerçekleştirmemiştir (Bhosale and Kadam, 2015). Pakistan'da yapılan bir çalışmada ise rizosferik aktinomiset izolatlarının % 87,5'i siderofor üretimi gerçekleştirmiştir. Bunun yanında siderofor üreticisi olan türler, *Streptomyces* cinsi üyeleridir (Anwar et al., 2016).

Hindistan’da yapılan bir başka çalışmada, 66 izolat arasından 8 tanesi iyi siderofor üreticileri olarak belirlenmiştir ve bu izolatların tamamı *Streptomyces* sp.’ye ait olduğu saptanmıştır (Shrivastava et al., 2015). Yine Hindistan’da yapılan benzer bir çalışmada, yüksek siderofor üretimi *Streptomyces rochei* IDWR19 tarafından gerçekleştirilmiştir (Jog et al., 2012). Siderofor üretimi, fitopatojen antagonizması ve bitkinin gelişmesi için önemli bir faktördür (Anwar et al., 2016). Dolayısıyla bu çalışmada ve rizosferik aktinomiset izolatları ile yapılan literatürdeki diğer çalışmalarda yüksek oranda siderofor üreticisinin saptanması, rizosferin bitki gelişimini destekleyici aktinomisetler açısından ne kadar önemli ve değerli bir kaynak olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde zirai alanlarda yoğun olarak kullanılan, bitki verimini ve büyümesini amaçlayan kimyasallar hem çevre hem de insan sağlığı açısından büyük bir sorun haline gelmiştir. Bu kullanılan kimyasalların yerini biyolojik ve çevre dostu bileşiklerin alması için yapılan çalışmalar henüz başlangıç aşamasında olup, geliştirilmesi için öncü araştırmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmada örnekleme alanı olarak seçilen bitki kök çevrelerindeki toprak numunelerinden bu agroaktif bileşiklerin varlığının ve potansiyellerinin taranması ve böylelikle bu bileşiklerin üretimi için bir kaynak kazandırılması çalışmanın birincil önemini oluşturmaktadır. Buna ek olarak sağlık alanında küçümsenemeyecek bir öneme sahip olan biyoaktif bileşik varlığının da bu aktinomisetler açısından eş zamanlı olarak taranması hedeflenmiş olup, günümüzde hem insan sağlığını tehdit eden zirai kimyasalların geri plana atılması hem de insan sağlığı için bir potansiyelin ortaya konulması için referans sağlanmış olacaktır.

Bu tez çalışmasında, gerek karasal gerekse sucul sistemlerdeki çeşitli bitkilerin rizosfer bölgelerinden aktinomisetlerin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bu aktinomisetler tarafından üretilen çeşitli agroaktif ve biyoaktif bileşiklerin saptanması ve bu bileşiklerin yüksek miktarlarda üretimi için ortam optimizasyonu da amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, agroaktif ve biyoaktif bileşik üretimi açısından umut vadecici altı farklı rizosferik aktinomiset izolatu moleküler olarak tanımlanmıştır. Bunlar *Nocardiopsis* sp. izolat CYP15 (Accession No: MK254640), *Nocardiopsis* sp. izolat CYP39 (Accession No: MK254645), *Streptomyces labedae* izolat CYP25 (Accession No: MK254642), *Streptomyces moderatus* izolat CYP35 (Accession No: MK254644), *Streptomyces chartreusis* izolat CYP19 (Accession No: MK254641), *Streptomyces* sp. izolat CYP30 (Accession No: MK254643) olarak belirlenmiştir. Organik sistemlerde mikroorganizmalar ve bitkiler arasındaki bu gibi dinamikler tam olarak anlaşılamamıştır. Dolayısıyla, bu bileşiklerin üretimi için ileriye dönük araştırmaların son derece gerekli olduğu düşünülmektedir. Rizosferik aktinomisetlerin seralarda ve tarlalarda uygulanmasına ilişkin gelecekteki çalışmalar, bitki üretimindeki gelişmeleri nicel olarak doğrulamak için gereklidir.

Ayrıca organik sistemlerde biyogübreler olarak birlikte kullanılması da önerilmektedir. Bunun yanısıra, bu aktinomisetler kullanılarak gerçekleştirilebilecek ileri çalışmalar ile çok çeşitli ve farklı agroaktif ve biyoaktif bileşiklerin tanımlanması ve yüksek miktarlarda saf olarak elde edilmesi ile endüstriye kazandırılması önerilmektedir.

Tüm bunların yanında, biyoaktif bileşik üretme potansiyeli de taşıyan çalışma kapsamında izole edilen aktinomisetlerin, hem fitopatojenlere hem insan patojenlerine karşı antifungal ve antibakteriyel aktivite göstermesi; yani hem bitki sağlığı hem de insan sağlığı açısından eş zamanlı olarak çalışılmış olması ise çalışmanın diğer bir önemli kısmını oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın sonucunda, rizosfer mikrobiyomunun bileşimini ve dinamiğini şekillendiren ve harekete geçiren süreçleri anlamak, sadece bitki verimliliğini korumak için değil, aynı zamanda insan sağlığını korumak için de önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbamondi, G. R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., Iodice, C., Range, W. M., Nicolaus, B., and Vangronsve, J.,** 2016, Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1): 1-10 pp.
- Abd-Alla, M.H., El-Sayed, E.A., and Rasmey, A.M.,** 2013, Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt, *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(2): 182-193 pp.
- Adegboye, M., and Babalola, O.,** 2013, Actinomycetes: A Yet Inexhaustive Source of Bioactive Secondary Metabolites, In: *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, Mendez-Vilas, A., (Eds.), Formatex, Badajoz, 786-795 pp.
- Ahemad, M., and Kibret, M.,** 2014, Mechanisms and applications of plant growth promoting Rhizobacteria: Current perspective, *Journal of King Saud University – Science*, 26(1): 1-20 pp.
- Ahmed, E., and Holmström, S.J.M.,** 2014, Siderophores in environmental research: roles and applications, *Microbial Biotechnology*, 7(3): 196–208 pp.
- Al-Diwany, L.J., Unsworth, B.A., and Cross, T.,** 1978, A comparison of membrane filters for counting *Thermoactinomyces* endospores in spore suspensions and river water. *Journal of Applied Bacteriology*, 45(2): 249-258 pp.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., and Ullrich C.I .,** 2006, Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance, *Annals of Botany*, 97(5): 883–893 pp.

- Alseederi, A.H.M.**, 2016, Growth Promotion of Tomato By The Implementation of Phosphate Solubilizing Bacteria and Plant Growth Regulators -Producing Bacteria In Calcareous Saline Soil In The United Arab EMIRATES, Master of Science Thesis, Department of Biology, College of Science, United Arab Emirates University, 191pp.
- Ambrosini, A., Beneduzi, A., Stefanski, T., Pinheiro, F.G., Vargas, L.K., and Passaglia, L.M.P.**, 2012, Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Plant Soil*, 356(1-2): 245–264 pp.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., and Manogaran, D.P.**, 2016, An Introduction to Actinobacteria, In: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dhanaskeran, D., and Jiang, Y., (Eds.), Bharathidasan University, India, *INTECHOpen*, 3-37 pp.
- Anwar, S., Basharat, A., and Sajid, I.**, 2016, Screening of rhizospheric actinomycetes for various in vitro and in vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds, *Frontiers in Microbiology*, 7(1334): 1-11 pp.
- Aslantas, R., Cakmakci, R., and Sahin, F.**, 2007, Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions, *Scientia Horticulturae*, 111(4): 371–377 pp.
- Aouar, L., Lerat, S., Boulahrouf, A., and Beaulieu, C.**, 2016, Bacterial antagonism and plant growth promoting traits of actinobacterial strains previously selected for their antifungal properties, *Transylvanian Review*, 24(10): 2408-2417 pp.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and Van Wezel, G.P.**, 2015, Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1): 1-43 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Behie, S.W., Bonet, B., Zacharia, V.M., McClung, D.J., and Traxler, M.F.,** 2017, Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ, *Frontiers in Microbiology*, 7(2149): 1-11 pp.
- Bennur, T., Kumar, A.R., Zinjarde, S., and Javdekar, V.,** 2015, *Nocardiosis* species: Incidence, ecological roles and adaptations, *Microbiological Research*, 174: 33–47 pp.
- Berdy, J.,** 2005, Bioactive Microbial Metabolites, *Journal of Antibiotics*, 58(1): 1–26 pp.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, Peter, A.H.M.,** 2012, The rhizosphere microbiome and plant health, *Trends in Plant Science*, 17:8, 478-486pp.
- Bhattacharyya, P.N., and Jha, D.K.,** 2012, Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327–1350 pp.
- Bhatnagar, I, and Kim, S.K.,** 2010, Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds, *Marine Drugs*, 8(10): 2673-2701 pp.
- Bhosale, H.J., and Kadam, T.A.,** 2015, Generic diversity and a comparative account on plant growth promoting characteristics of actinomycetes in roots and rhizosphere of *Saccharum officinarum*, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1): 230-244 pp.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., and Prinsep, M.R.,** 2009, Marine natural products, *Natural Product Reports*, 27(2): 165-237 pp.
- Bonaldi, M., Chen, X., Kunova, A., Pizzatti, C., Saracchi, M., and Cortesi, P.,** 2015, Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*, *Frontiers in Microbiology*, 6(25): 1-10 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cakmakci, R., Kantar, F., and Sahin, F.,** 2001, Effect of N₂ fixing bacterial inoculation on yield of sugar beet and barley, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164: 527-231 pp.
- Canbolat, M.Y., Bilen, S., Çakmakçı, R., Şahin, F., and Aydın, A.,** 2006, Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora, *Biology and Fertility of Soils*, 42 (4): 350-357 pp.
- Chandrakar, S., and Gupta, A.K.,** 2017, Production and Characterization of Actinomycin D from *Streptomyces parvulus* Isolated from *Aloe vera* (l.) Burm. F. and its Antimicrobial Activity, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 46(1): 169-175 pp.
- Chater, K.F.,** 2006, *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 361: 761-768 pp.
- Chaudhary, H.S., Yadav, J., Shrivastava, A.R., Singh, S., Singh, A.K., and Gopalan, N.,** 2013, Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India), *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 4(2): 118-123 pp.
- Chavan D.V., Mulaje S.S., and Mohalkar R.Y.,** 2013, A review on actinomycetes and their biotechnological application, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(5): 1730-1742 pp.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., and Young, C.C.,** 2006, Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities, *Applied Soil Ecology*, 34(1): 33–41 pp.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E.A.,** 2005, Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 4951–4959 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cross, T.**, 1981, Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats, *Journal of Applied Bacteriology*, 50(3): 397-423 pp.
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., and Fornes, F.**, 2012, Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents, *Journal of Environmental Management*, 95: 280- 284 pp.
- Damam, M., Moinuddin, M. K., Kausar, R.**, 2016, Isolation and screening of plant growth promoting actinomycetes from rhizosphere of some forest medicinal plants, *International Journal of ChemTech Research*, 9(5): 521-528 pp.
- Dastager S.G., and Damare, S.**, 2013, Marine Actinobacteria Showing Phosphate-Solubilizing Efficiency in Chorao Island, Goa, India, *Current Microbiology*, 66(5): 421–427 pp.
- De Souza, R., Ambrosini, A., and Passaglia, L.M.P.**, 2015, Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils, *Genetics and Molecular Biology*, 38:(4), 401-419 pp.
- De Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Da Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L.K., Schoenfeld, R., and Passaglia, L.M.P.**, 2013, The effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields, *Plant Soil*, 366: 585-603 pp.
- De Oliveira, M.F., Da Silva, M.G., and Der Sand, T.V.**, 2010, Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent, *Research in Microbiology*, 161(7): 565-572 pp.
- Dejong, P.J.**, 1972, L-Asparaginase Production by *Streptomyces*, *Applied Microbiology*, 23(6): 1163-1164 pp.

- Delmont, O.T., Prestat, E., Keegan, K.P., Faubladier, M., Robe, P., Clark, I.M., Pelletier, E., Hirsch, P.R., Meyer, F., Gilbert, J.A., Le Paslier, D., Simonet, P., and Vogel, T.M.,** Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome, *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 6: 1677–1687 pp.
- Demain, A.L., and Sanchez, S.,** 2009, Microbial drug discovery: 80 years of progress, *The Journal of Antibiotics*, 62: 5–16 pp.
- Dholakiya, R.N., Kumar, R., Mishra, A., Mody K.H., and Jha, B.,** 2017, Antibacterial and antioxidant activities of novel actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat, *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-16 pp.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y.,** 2003, Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2): 107-149 pp.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., and Sosio, M., Puglia, A.M.,** 2002, Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites, *Journal of Biotechnology*, 99: 187-198 pp.
- Duddu, M.K., and Guntuku, G.,** 2016, Isolation, screening and characterization of antibiotic producing actinomycetes from Kapuluppada plastic waste dumping yard, Visakhapatnam, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(11): 221-229 pp.
- Egamberdieva, D., Wirth, S.J., Alqarawi, A.A., Abd-Allah, E.F., and Hashem, A.,** 2017, Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness, *Frontiers in Microbiology*, 8(2104): 1-14 pp.
- El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E.St.J., and Sivasithamparam, K.,** 2009, Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes, *Journal of Applied Microbiology*, 106(1): 13–26 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K.,** 2006, Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1505–1520 pp.
- Etesami, H., Alikhani, A.H., and Akbari, A.A.,** 2009, Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes, *World Applied Sciences Journal*, 6(11): 1576-1584 pp.
- Farhat, M.F., Boukhris, I., and Chouayekh, H.,** 2015, Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids, *FEMS Microbiology Letters*, 362(5): 1-8 pp.
- Flores, F.J., Rincón, J., and Martín, J.F.,** 2008, Characterization of the iron-regulated desA promoter of *Streptomyces pilosus* as a system for controlled gene expression in actinomycetes, *Microbial Cell Factories*, 2(5): 1-10 pp.
- Franché, C., Lindström, K., and Elmerich, C.,** 2009, Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants, *Plant Soil*, 321(1-2): 35–59 pp.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodriguez, M.X., and Barea, J. M.,** 2010, Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities, *Applied Soil Ecology*, 45: 209–217 pp.
- Franco-Correa, M., and Chavarro-Anzola, V.,** 2016, Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dhanaskeran, D., and Jiang, Y., (Eds.), Bharathidasan University, India, *INTECHOpen*, 249-270 pp.
- Ganesan, P., Reegan, A.D., David, R.H.A., Gandhi, M.R., Paulraj, M.G., Al-Dhabi, N.A., and Ignacimuthu, S.,** 2017, Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India, *Alexandria Journal of Medicine*, 53(2): 101–110 pp.

- Garrido, G., Guerreroa, J.R., Canob, E.A., Acosta, M., and Bravo, J.S.,** 2002, Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings, *Physiologia Plantarum*, 114: 303–312 pp.
- Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H. A., Hamed, J., and Yakhchali, B.,** 2013, Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1): 223-236 pp.
- Glick, B.,R.,** 2012, Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications, *Scientifica*, 2012: 1-15 pp.
- Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., and McConkey, B.,** 2007, Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26(5-6): 227-242 pp.
- Gong, Y., Bai, J., Zhang, H.W., Xiong, Y., Ding, P., Qin, S.,** 2018, Phylogenetic diversity and investigation of plant growth-promoting traits of actinobacteria in coastal salt marsh plant rhizospheres from Jiangsu, China, *Systematic and Applied Microbiology*, 41(5): 516–527 pp.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., Kudapa, H., Katta, K., and Varshney, R.K.,** 2014, Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice, *Microbiological Research*, 169(1): 40–48 pp.
- Gopinath, B.V., Vootla, P.K., Jyothi, R., and Redd, K.S.,** 2013, Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated From Coal Mine Soils of Godavari Belt Region, A.P, India, 4(4): 518-523 pp.
- Gordon, S.A, and Weber, R.P.,** 1951, Colorimetric estimation of indole acetic acid, *Plant Physiology*, 26(1): 192-195 pp.

- Gorajana, A., Ma, V., Vinjamuri, S., Kurada, B.V.V.S.N., Peela, S., Jangam, P., Poluri, E., and Zeeck, A.,** 2007, Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7, *Microbiological Research*, 162 (4): 322—327 pp.
- Grossart, H.P., Schlingloff, A., Bernhard, M., Simon, M., and Brinkhoff, T.,** 2004, Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea, *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3): 387-396 pp.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., and Singh, V.,** 2015, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(2): 96-102 pp.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., and Poole, P. S.,** 2002, Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants, *Plant and Soil*, 245: 83–93 pp.
- Harikrishnan, H., Shanmugaiah, V., and Balasubramanian, N.,** 2014, Optimization for production of indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting *Streptomyces* sp. VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(8): 158-171 pp.
- Hasani, A., Kariminik, A., and Issazadeh, K.,** 2014, Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities, *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(1): 63-75 pp.
- Hiltner L., and Störmer K.,** 1903, Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache, *Arb Biol Reichsanst Land-Forstwirtsch*, 3: 443–545 pp. (In German)
- Husen, E., Wahyudi, A.T., Suwanto, A., and Giyanto,** 2011, Growth Enhancement and Disease Reduction of Soybean by 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase-Producing *Pseudomonas*, 2011, *American Journal of Applied Sciences*, 8(11): 1073-1080 pp.

- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., and Borriss, R.,** 2002, Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect, *Microbiology*, 148: 2097–2109 pp.
- Ikeda H., and Omura, S.,** 1995, Control of Avermectin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* for the Selective Production of a Useful Component, *The Journal of Antibiotics*, 48(7): 549-562 pp.
- Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K., Nealson, K.H., and Horikoshi, K.,** 2003, Microbial communities associated with geological horizons in coastal sub seafloor sediments from the Sea of Okhotsk, *Appl Environ Microbiol.*, 69(12): 7224-7235 pp.
- Jaemsaeng, R., Jantasuriyarat, C., and Thamchaipenet, A.,** 2018, Molecular interaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)-producing endophytic *Streptomyces* sp. GMKU 336 towards salt-stress resistance of *Oryza sativa* L. cv. KDML105, *Scientific Reports*, 8(1950): 1-15 pp.
- Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., and Solecka, J.,** 2018, Secondary metabolites of Actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties, 67(3): 259–272 pp.
- Janaki, T., Nayak, B.K., and Ganesan, T.,** 2016, Antibacterial activity of soil actinomycetes from the mangrove *Avicennia marina*, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(1): 267-271 pp.
- Jensen, J.B., Egsgaard, H., Onckelen, H.V., and Jochimsen, B.U.,** 1995, Catabolism of indole-3-acetic acid and 4- and 5-chloroindole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*, *Journal of Bacteriology*, 177(20): 5762–5766 pp.
- Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J., and Fenical, W.,** 2005, Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments, *Environmental Microbiology*, 7(7): 1039-1048 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jha, C.K., and Saraf, M.,** 2015, Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review, *E3 Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2): 108-119 pp.
- Jobim, M.L., Santos, R.C.,V., Alves, C.F.S., Oliveira, R.M., Mostardeiro, C.P., Sagrillo, M.R., Filho, O.C.S., Garcia, L.F.M., Manica-Cattani, M.F., Ribeiro, E E., and Da Cruz, I.B.M.,** 2014, Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism, *Microbiological Research*, 169(4): 314– 323 pp.
- Jog, R., Nareshkumar, G., and Rajkumar, S.,** 2012, Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere, *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1154—1164 pp.
- Kaiser, K.,** 2016, Dependence of soil microbial community structure and function on land use types and management regimes, Doctor of Philosophy, Department of Microbiology and Biochemistry, Georg-August University, 281 p.
- Kang, B.G., Kim, W.T., Yun, H.S., and Chang, S.C.,** 2010, Use of plant growth-promoting Rhizobacteria to control stress responses of plant roots, *Plant Biotechnology Reports*, 4(3): 179–183 pp.
- Kannahi, M., and Senbagam, N.,** 2014, Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4): 1142-1145 pp.
- Kataria, H.,** 2012, Screening and characterization of actinomycetes from rhizospheric soil of medicinal plants, Master of Science Thesis, Department of Microbiology, College of Basic Sciences and Humanities, Punjab Agricultural University, 75 pp.
- Katiresan, K., Balagurunathan, R., and Selvam, M.M.,** 2005, Fungicidal activity of marine actinomycetes against phytopathogenic fungi, *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 271-276 pp.

- Kaur, G.,** 2014, Studies on microbial phosphate solubilization and development of inoculum formulations, Doctor of Philosophy, Department of Biototechnology, Thapar University, Patiala, India, 469 p.
- Kaur, G., and Reddy, M.S.,** 2015, Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics, *Pedosphere*, 25(3): 428–437 pp.
- Kaur, M., Rana, S., and Sharma, R.,** 2015, Screening and evaluation of antimicrobial activity of actinomycetes isolated from rhizosphere of *Heracleum candicans*, *International Journal of Farm Sciences*, 5(1) : 83-89 pp.
- Kaur, T., Sharma, D., Kaur, A., and Manhas, K.R.,** 2013, Antagonistic and plant growth promoting activities of endophytic and soil actinomycetes, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(14): 1756-1768 pp.
- Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., and Venkateswarlu, Y.,** 2010, Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333, *Research in Microbiology*, 161(5): 335-345 pp.
- Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., and Kecskes, M.L.,** 2004, Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited?, *Soil Biology & Biochemistry*, 36(8): 1229–1244 pp.
- Khamna, S., Yokota, A., and Lumyong, S.,** 2009, Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 649–655 pp.
- Khattab, A.I., Babiker, E.H., and Saeed, H.A.,** 2016, *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites, *International Current Pharmaceutical Journal*, 5(3): 27-32 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, J., and Rees, D.C.,** 1994, Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation, *Biochemistry*, 33(2): 389-397 pp.
- Kloepper, J.W., and Schroth, M.N.,** 1981, Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting Rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora, *Phytopathology*, 71: 1020-1024 pp.
- Koçyiğit, A.,** 2009, Termofilik Bakterilerden Lipaz Üretimi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü, Ege Üniversitesi, 190 s.
- Kudoyarova, G.R., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Timergalina, L.N., Arkhipova, T.N., Shendel, G.V., Kuzmina, L.Y., Dodd, I.C., and Veselov, S.Y.,** 2014, Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 83: 285-291 pp.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., and Azevedo, J.L.,** 2004, Environmental Microbiology 6(12): 1244–1251 pp.
- Kumar, P.S., Raj, J.P.P., Duraipandiyan, V., and Ignacimuthu, S.,** 2012, Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(12): 936-943 pp.
- Ladha, J.K., De Bruijn, F.J., and Malik, K.A.,** 1997, Introduction: Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice - a frontier project, *Plant and Soil*, 194: 1–10 pp.
- Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth, A.L., Sherrier, D.J., and Bais, H.P.,** 2015, A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.), *Planta*, 242(4): 1037–1050 pp.
- Lam, K.S.,** 2007, New aspects of natural products in drug discovery, *TRENDS in Microbiology*, 15(6): 279-289 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Latha, S., and Dhanasekaran, D.,** 2013, Antibacterial and extracellular enzyme activities of gut actinobacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* and *Capra hircus*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(11): 379-385 pp.
- Lechevalier, M.P., and Lechevalier, H.A.,** 1989, Genus *Sporichthya*, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G., (Eds.), Williams & Wikins, Baltimore, 4(250): 7-8 pp.
- Legault, G.S., Lerat, S., Nicolas, P., and Beaulieu, C.,** 2011, Tryptophan Regulates Thaxtomin A and Indole-3-Acetic Acid Production in *Streptomyces scabiei* and Modifies Its Interactions with Radish Seedlings, *Bacteriology*, 101(9): 1045-1051 pp.
- Leveau, J.H.J., and Lindow, S.E.,** 2005, Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2365–2371 pp.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C.,** 2016, Morphological Identification of Actinobacteria, In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dhanaskeran, D., and Jiang, Y., (Eds.), Bharathidasan University, India, *INTECHOpen*, 59-86 pp.
- Liu, P., Yin, L., Wang, S., Zhang, M., Deng, X., Zhang, S., and Tanaka, K.,** 2015, Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt-induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L, *Environmental and Experimental Botany*, 111: 42–51 pp.
- Lorck, H.,** 1948, Production of Hydrocyanic Acid by Bacteria, *Physiologia Plantarum*, 1: 142-146 pp.

- Malek, N.A., Zainuddin, Z., Chowdhury, A.J.K., and Abidin, Z.A.Z.,** 2015, Diversity and antimicrobial activity of mangrove soil actinomycetes isolated from Tanjung Lumpur, Kuantan, *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 77(25): 37–43 pp.
- Malhotra, M., and Srivastava, S.,** 2009, Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth, *European Journal of Soil Biology*, 45(1): 73 – 80 pp.
- Mantelin, S., and Touraine, B.,** 2004, Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake, *Journal of Experimental Botany*, 55(394): 27-34 pp.
- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., and Barash, I.,** 1994, Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp., *Microbiology*, 140: 1045-1050 pp.
- Matthijs, A., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., and Cornelis, P.,** 2007, Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity, *Environmental Microbiology*, 9(2): 425–434 pp.
- Marchant, R., and Banat, I.M.,** 2012, Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation, *Trends in Biotechnology*, 30(11): 558-565 pp.
- Mason, M.G., Ball, A.S., Reeder, B.J., Silkstone, G., Nicholls, P., and Wilson, M.T.,** 2001, Extracellular Heme Peroxidases in Actinomycetes: a Case of Mistaken Identity, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4512–4519 pp.
- Mendes, R., Garbeva P., and Raaijmakers, J.M.,** 2013, The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms, *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 634-663 pp.

- Mhlongo, M.S., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N., and Dubery, I.A.,** 2018, The Chemistry of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance, *Frontiers in Plant Science*, 9(112): 1-17 pp.
- Miransari, M., and Smith, D.L.,** 2014, Plant hormones and seed germination, *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110–121 pp.
- Mishima, H., Ide, U., Muramatsu, S., and Ono, M.,** 1983, Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics structure determination of milbemycins D, E, F, G, H, J AND K, *The Journal of Antibiotics*, 36(8): 980-990 pp.
- Mohan, Y.S.Y.V.J., Sirisha, B., Prathyusha, K., and Rao, P.S.,** 2014, Isolation, Screening and Characterization of Actinomycetes from Marine Sediments for their Potential to Produce Antifungal Agents, *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences*, 3(4): 131-137 pp.
- Mohandas, S., Poovarasan, S., Panneerselvam, P., Saritha, B., Upreti, K.K., Kamala, R., Sita, T.,** 2013, Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes, *Scientia Horticulturae*, 150: 371–376 pp.
- Mohanraj, D., Bharathi, S., Radhakrishnan, M. , and Balagurunathan, R.,** 2011, Bioprospecting of actinobacteria from Yelagiri hills with special reference to antibacterial activity, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(3): 439-446 pp.
- Mohseni, M., Norouzi, H., Hamed, J., and Roohi, A.,** 2013, Screening of Antibacterial Producing Actinomycetes from Sediments of the Caspian Sea, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2(2): 64-71 pp.
- Muleta, A., and Assefa, F.,** 2018, Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from rhizosphere and agricultural soils, *African Journal of Biotechnology*, 17(22): 700-714 pp.

- Narayana, K.J.P., Kumar, K.G., and Vijayalakshmi, M.,** 2008, L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*, *Indian Journal of Microbiology*, 48(3): 331–336 pp.
- Nassar, A.H., El-Tarabily, K.A., and Sivasithamparam, K.,** 2003, Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*, *Plant Growth Regulation* 40: 97–106 pp.
- Neilands, J. B.,** 1995, Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds, *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45): 26723–26726 pp.
- Newman, D.J., and Cragg, G.M.,** 2007, Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *Journal of Natural Products*, 70(3): 461-477 pp.
- Ng, Z.Y., and Amsaveni, S.,** 2012, Isolation, Screening and Characterization of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Rhizosphere Region of Different Plants from a Farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia, *Journal of Advanced Biomedical and Pathobiology*, 2(3): 96-107 pp.
- Nicolas, J.I.L., Acosta, M., and Sanchez-Bravo, J.,** 2004, Role of basipetal auxin transport and lateral auxin movement in rooting and growth of etiolated lupin hypocotyls, *Physiologia Plantarum*, 121(2): 294–304 pp.
- Ningthoujam, D.S., Chanu, S.B., Tamreihao, K., Lynda, R., Devi, K.A., and Jeeniita, N.,** 2016, Plant Growth Promotion and Biocontrol Potential of a *Streptomyces* sp. strain N3-3b isolated from the rhizosphere of Chakhao, a Black Rice Variety of Manipur, India, *British Microbiology Research Journal*, 16(2): 1-11 pp.
- Nithya, K., Muthukumar, C., Duraipandiyan, V., Dhanasekaran, D., and Thajuddin, N.,** 2015, Diversity and antimicrobial potential of culturable Actinobacteria from desert soils of Saudi Arabia, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(3): 117-122 pp.

- Norouzi, H., Danesh, A., Mohseni, M., and Khorasgani, M.R.,** 2018, Marine Actinomycetes with Probiotic Potential and Bioactivity against Multidrug-resistant Bacteria, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 7(1): 44-52 pp.
- Olano, C., Méndez, C., and Salas, J. A.,** 2009, Antitumor compounds from marine Actinomycetes, *Marine Drugs*, 7(2): 210-248 pp.
- Oskay, M., Usame, T., and Cem, A.,** 2005, Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3(9): 441-446 pp.
- Pal, S.S.,** 1998, Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops, *Plant and Soil*, 198: 169–177 pp.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Gupta, V.K., Yadav, M.K., Saikia, R., and Singh, B.P.,** 2015, In Vitro and In Vivo Plant Growth Promoting Activities and DNA Fingerprinting of Antagonistic Endophytic Actinomycetes Associates with Medicinal Plants, *PLoS ONE*, 10(9): 1-18 pp.
- Patel, M.V., and Patel, R.K.,** 2014, Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline dessert, The Little Runn of Kutch, *CIBTech Journal of Microbiology*, 3(2): 17-28 pp.
- Penesyan, A., Kjelleberg, S., and Egan, S.,** 2010, Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms, *Marine Drugs*, 8(3): 438-459 pp.
- Pereira, S.I.A., and Castro, P.M.L.,** 2014, Phosphate-solubilizing Rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils, *Ecological Engineering*, 73: 526–535 pp.
- Philippot, L., Raaijmakers J.M., Lemanceau, P., and Van der Putten, W.H.,** 2013, Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere, *Nature Reviews Microbiology*, 12: 789-799 pp.

- Pimentel-Elardo, S.M., Kozytska, S., Bugni, T., Ireland, C.M., Moll. H., and Hentsche, U.,** 2010, Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges, *Marine Drugs*, 8(2): 373-380 pp.
- Prashar, P., Kapoor, N., and Sachdeva, S.,** 2014, Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13(1): 63–77 pp.
- Qin, L., Jiang, H., Tian, J., Zhao, J., and Liao, H.,** 2011, Rhizobia enhance acquisition of phosphorus from different sources by soybean plants, *Plant Soil*, 349: 25–36 pp.
- Qin, S., Li, W., Dastager, S.G., and Hozzein, W.N.,** 2016, Actinobacteria in special and extreme habitats: diversity, function roles and environmental adaptations, *Frontiers in Microbiology*, 1-231 pp.
- Rajan, B.M., and Kannabiran, K.,** 2014, Extraction and Identification of Antibacterial Secondary Metabolites from Marine *Streptomyces* sp. VITBRK2, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(3): 130-137 pp.
- Rakesh, K.N., Junaid, S., Dileep, N., Kekuda T.R.P.,** 2013, Antibacterial and antioxidant activities of *Streptomyces* species SRDP-H03 isolated from soil of Hosudi, Karnataka, India, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(4): 47-53 pp.
- Ranjani, A., Gopinath, P.M., Rajesh, K., Dhanasekaran, D., Priyadharsini, P.,** 2016, Diversity of silver nanoparticle synthesizing actinobacteria isolated from marine soil, Tamil Nadu, India, *The Arabian Journal for Science and Engineering*, 41(1): 25-32 pp.
- Richardson, A.E., and Simpson, R.J.,** 2011, Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability, *Plant Physiology*, 156: 989–996 pp.

Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde, K.D., and Lumyong, S., 2010, Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(9): 1569–1578 pp.

Rodrigues, A.A., Araujo, M.V.F., Soares, R.S., De Oliveira, B.F.R., Sibov, T.D., and Vieira, J.D.G., 2018, Isolation and Screening for Multi-trait Plant Growth Promoting Actinobacteria From Organic Sugarcane Rhizosphere, *International Journal of Microbiology Research*, 10(5): 1193-1198 pp.

Rodriguez, H., and Fraga, R., 1999, Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology Advances*, 17: 319–339 pp.

Saha, S., Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., and Latha, S., 2013, *Nocardiopsis* sp. SD5: A potent feather degrading rare actinobacterium isolated from feather waste in Tamil Nadu, India, *Journal of Basic Microbiology*, 53(7): 608–616 pp.

Saharan, B.S., and Nehra, V., 2011, Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review, *Life Sciences and Medicine Research*, 2011(21): 1-30 pp.

Sahin, F., Cakmakci, R., and Kantar, F., 2004, Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria, *Plant and Soil*, 265: 123–129 pp.

Saitou, N. and Nei, M., 1987, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425 pp.

Salcedo, P.L.D., Prieto, C., and Correa, M.F., 2014, Screening phosphate solubilizing actinobacteria isolated from the rhizosphere of wild plants from the Eastern Cordillera of the Colombian Andes , *African Journal of Microbiology Research*, 8(8): 734-742 pp.

- Sanscartier, D., Zeeb, B., Koch, I., and Reimer, K.,** 2009, Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates, *Cold Regions Science and Technology*, 55(1):167-173 pp.
- Sashidhar, B., and Podile, A.R.,** 2010, Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase, *Journal of Applied Microbiology*, 109(1): 1-12 pp.
- Saxena, A., Upadhyay, R., Kumar D., and Kango, N.,** 2013, Isolation, antifungal activity and characterization of soil actinomycetes, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72: 491-497 pp.
- Schmid, R.D., and Verger, R.,** 1998, Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 37: 1608-1633 pp.
- Sellstedt, A., and Richau, K. H.,** 2013, Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*, *FEMS Microbiology Letters*, 342(2): 179–186 pp.
- Selvakumar, G., Panneerselvam, P., and Ganeshamurthy, A. N.,** 2014, Diversity Utility and Potential of Actinobacteria in the Agro-Ecosystem, In: Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture, Sustainable Development and Biodiversity First Edition, Maheshwari, D.K., (Eds.), 23-32 pp.
- Shahzad, S.M., Khalid, A., Arshad, M., Khalid, M., and Mehboob, I.,** 2008, Integrated use of plant growth promoting bacteria and p-enriched compost for improving growth, yield and nodulation of chickpea, *Pakistan Journal of Botany* 40(4): 1735-1441 pp.
- Sharmin, S., Hossain, Md.,T., and Anwar, M.N.,** 2005, Isolation and characterization pf protease producing bacteria, *Bacillus amovivorus*, and optimization of some factors of culture conditions for protease production, *Journal of Biological Sciences*, 5(3): 358-362 pp.

- Shrivastava, P., and Kumar, R.,** 2015, Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2): 123–131 pp.
- Shrivastava, P., Kumar, R., Yandigeri, M.S., Malviya, N., and Arora, D.K.,** 2015, Isolation and Characterization of *Streptomyces* with Plant Growth Promoting Potential from Mangrove Ecosystem, *Polish Journal of Microbiology*, 6(4): 339–349 pp.
- Shutsrirung, A., Chromkaew, Y., Pathom-Aree, W., Choonluchanon, S., and Boonkerd, N.,** 2013, Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity, *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(3): 322-330 pp.
- Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., and Gerwick, W.H.,** 2005, Marine natural products as anticancer drugs, *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2): 333-342 pp.
- Silambarasan, S., Kumar, E.P., Murugan, T., Saravanan, D., and Balagurunathan, R.,** 2012, Antibacterial and antifungal activities of Actinobacteria isolated from Rathnagiri hills, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (10): 099-103 pp.
- Singh, V., Haque, S., Singh, H., Verma, J., Vibha, K., Singh, R., Jawed, A., and Tripathi, C.K.M.,** 2016, Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications, *Frontiers in Microbiology*, 7(1921): 1-9 pp.
- Singh, N., and Rai, V.,** 2012, Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4): 94-101 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, L.S., Sharma, H., and Talukdar, N.C.,** 2014, Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India, *BMC Microbiology*, 14(278): 1-13 pp.
- Solans, M., Vobis, G., Cassan, F., Luna, V., and Wall, L. G.,** 2011, Production of phytohormones by root-associated saprophytic actinomycetes isolated from the actinorhizal plant *Ochetophila trinervis*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9): 2195–2202 pp.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., and Rajnisz, A.,** 2012, Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes, *Central European Journal of Biology*, 7(3): 373-390 pp.
- Sousa, J.A.J., and Olivares, F.L.,** 2016, Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(24): 1-12 pp.
- Sousa, C.S., Soares, A.C.F., and Garrido, M.S.,** 2008, Characterization of *Streptomycetes* with potential to promote plant growth and biocontrol, *Scientia Agricola*, 65(1): 50-55 pp.
- Spaepen, S., and Vanderleyden, J.,** 2011, Auxin and Plant-Microbe Interactions, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4): 1-13 pp.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Remans, R.,** 2007, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425–448 pp.
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H., and Varshney, R.K.,** 2016, Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea, *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1): 85-95 pp.
- Srivastav, A., and Pofali, P.,** 2018, Screening of antimicrobial activity and polyketide synthase gene identification from the Actinomycetes isolate, *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1-18 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sudha, S.S.K., and Hemalatha, R.,** 2015, Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from garden soil of Sathyabama University, Chennai, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(6): 1210-114 pp.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.,** 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4,0, *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599 pp.
- Toker, S.K.,** 2018, Sucul Çevrelerden Lignolitik Enzim Üretici Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanılanması ve Endüstriyel Atıkların Parçalanması için Ortam Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü, Ege Üniversitesi, 152 s.
- Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudja, Y., Sabaoua, N., Mathieud, F., Sessitsch, A., Zitouni, A.,** 2016, Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization, *South African Journal of Botany*, 105: 234-239 pp.
- Trejo, W.H., and Bennett, R. E.,** 1962, *Streptomyces nodosus* sp. N., the amphotericin-producing organism, *Journal of Bacteriology*, 85: 436-439 pp.
- Ueki, M., Abe, K., Hanafi, M., Shibata, K., Tanaka, T., and Taniguchi, M.,** 1996, UK-2A, B, C and D, Novel Antifungal Antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02 - I. Fermentation, Isolation, and Biological Properties, *The Journal of Antibiotics*, 49(7): 639-643 pp.
- Uyeda, M.,** 2003, Fattiviracins, antiviral antibiotics produced by an Actinomycete, *Actinomycetologica*, 17(2): 57-66 pp.
- Varalakshmi, T., Sekhar, K.M., and Charyulu, P.B.B.,** 2014, Taxonomic studies and phylogenetic characterization of potential and pigmented antibiotic producing actinomycetes isolated from rhizosphere soils, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6): 511-519 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vessey, J.K.**, 2003, Plant growth promoting Rhizobacteria as biofertilizers, *Plant and Soil*, 255: 571–586 pp.
- Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., and Stefani, E.**, 2018, Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1-26 pp.
- Waksman, S.A., and Woodruff, H.B.**, 1941, *Actinomyces antibioticus*, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria, *Journal of Bacteriology*, 42(2): 231-249 pp.
- Waksman, S.A., Lechevalier, A.H., and Schaffner, C.P.**, 1965, Candicidin and other polyenic antifungal antibiotics, *Bull. Wid Hith Org.*, 33: 219-226 pp.
- Wani, A.P., and Irene, O.I.**, 2014, Screening of microbes for their metal, antibiotic resistance and plant growth promoting activity, *Current Research in Bacteriology*, 7(1): 22-31 pp.
- Williams, P.M., and De Mallorca, M.S.**, 1982, Absciscic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of *Glycine max*, *Plant and Soil*, 65: 19-26 pp.
- Wright, W. H.**, 2010, Isolation and Identification of the Siderophore "Vicibactin" Produced by *Rhizobium leguminosarum* ATCC 14479, Master of Science in Biology, Faculty of the Department of Health Sciences East Tennessee State University, 81 p.
- Yan, L.L., Han, N.N., Zhang, Y.Q., Yu, L.Y., Chen, J., Wei, Y.Z., Li, Q.P., Tao, L., Zheng, G.H., Yang, S.E., Jiang, C.X., Zhang, X.D., Huang, Q., Habdin, X., Hu, Q.B., Li, Z., Liu, S.W., Zhang, Z.Z., He, Q.Y., Si, S.Y., and Sun, C.H.**, 2010, Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant, *The Journal of Antibiotics*, 63: 259–261 pp.