



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

DENİZ ORTAMLARINDAN İZOLE EDİLEN *Actinomycetes*'LERİN
ANTİBAKTERİYEL KARAKTERİZASYONU

Gülrihan SELİM

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

Mayıs, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 15.05.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen- Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, herhangi bir proje ile desteklenmemiştir

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--	--

ÖNSÖZ

Lisans eğitimimden beri öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum, akademik bilgi ve birikimi ile tez sürecimde yaşadığım her türlü zorluğu aşmamda yardımcı olan, her zaman maddi manevi yanımda olan, akademik hayata adım attığım andan beri beni destekleyen ve bana güvenen, hem akademik hayatımda hem de kişisel hayatımda bana çok yardımcı olan ve yol gösteren çok sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya,

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na adım attığım ilk günden beri her zaman yanımda olan, bana güvenen, beni motive eden ve desteklerini esirgemeyen, akademik hayatımda örnek aldığım isimlerden bir tanesi olan, sonsuz saygı duyduğum anabilim dalı başkanımız sevgili Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Tez deneyimde kullandığım örnekleri benim için toplayan sevgili hocam Doç Dr. Cem DALYAN'a,

Tez sürecimin her anında yanımda olan, bana maddi manevi desteğini her anımda hissettiğim ve beraber geçirdiğimiz her anı eğlenceli hale getiren canım arkadaşım Gizem BATTAL'a, TEMA'da yüksek lisansa başladığım günden beri bütün laboratuvar bilgisini benimle paylaşan, beni hiç yalnız bırakmayan Yağmur AVCI'ya,

Tüm hayatım boyunca her daim yanımda olan, aldığım tüm kararlarımda beni destekleyen ve cesaretlendiren, her daim örnek aldığım, kızı olduğum için çok şanslı hissettiğim canım annem Gülten SELİM'e, beni her zaman maddi manevi destekleyen ve bana güvenen sevgili babam Tuncay SELİM'e, hayatımın her anına neşe katan ve yaşadığım tüm zorlukları aşmamı sağlayan biricik kardeşim Bahadır SELİM'e, hayatıma değer katan tüm arkadaşlarıma,

en içten teşekkürlerimi sunarım. |

Mayıs 2023

|Gülrihan SELİM|

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. <i>ACTINOMYCETES</i> GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.2. <i>ACTINOMYCETE'</i> LERİN KEŞFİ	6
2.3. <i>ACTINOMYCETE'</i> LERİN SINIFLANDIRILMASI	7
2.4. <i>ACTINOMYCETE'</i> LERİN YAŞAM ALANLARI	12
2.5. <i>ACTINOMYCETE'</i> LERDEN ELDE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLER	16
2.5.1. <i>ACTINOMYCETES'</i> LERİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİK GÖSTEREN SEKONDER METABOLİTLERİ	17
2.5.2. <i>ACTINOMYCETE'</i> LERİN BİYOAKTİF ÖZELLİK GÖSTEREN DİĞER SEKONDER METABOLİTLERİ	20
2.6. DENİZEL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN <i>ACTINOMYCETE'</i> LERİN BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ	23
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	28
3.2. ÖRNEKLERDEN BAKTERİ İZOLASYONU	29
3.2.1. Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu	29
3.2.2. Sediment Örneklerinden Bakteri İzolasyonu.....	30
3.2.3. İzolatların Seçimi, Saflaştırılması ve Saklanması	32
3.3. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTENİN TESPİTİ.....	34
3.3.1. Birincil Tarama.....	34
3.3.1.1. Çizgi Ekim Yöntemi.....	34
3.3.1.2. Agar Kaplama Yöntemi.....	35

3.3.2. İkincil Tarama	36
3.3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi	38
3.3.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu/ Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MİK/MBK)	38
3.4. İZOLATLARIN ADLANDIRILMASI	39
3.4.1 Genomik DNA İzolasyonu	39
3.4.2. Genomik DNA' ların Agaroz Jelde Görüntülenmesi	40
3.4.3. PZR Yöntemi.....	40
3.4.4. İzolatların Adlandırılması.....	42
3.5. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER	42
3.5.1. ISP2 (International Streptomyces Project- 2) Agar.....	42
3.5.2. M6 Agar.....	43
3.5.3. Gauze Medium 2 Agar	44
3.5.4. Nutrient Agar.....	44
3.5.5. ½ ISP2 Broth	45
3.5.6. Mueller Hinton Broth	45
3.5.7. Mueller Hinton Agar	46
3.5.8. Salın Su.....	46
3.5.9. Fizyolojik Tuzlu Su	46
3.5.10. Nalidiksik Asit.....	46
3.5.11. Siklohekzimit.....	47
3.5.12. Gram Boyama Maddeleri	47
3.5.12.1. Kristal Viyole Çözeltisi	47
3.5.12.2. Gram'ın İyot Çözeltisi	47
3.5.12.3. % 96'lık Etil Alkol	48
3.5.12.4. Sulu Fuksin	48
3.5.13. 10X TBE.....	48
3.5.14. 1X TBE.....	49
3.5.15. Agaroz Jel.....	49
3.5.16. Lizozim Buffer	49
3.5.16.1. EDTA Solüsyonunun Hazırlanması	49
3.5.16.2. Trisma Base Solüsyonunun Hazırlanması	49
3.5.16.3. Lizozim Buffer Solüsyonunun Hazırlanması.....	50
3.5.17. Lizozim Hazırlanması	50
4. BULGULAR.....	51

4.1. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN KAYNAKLARI.....	51
4.2. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN MORFOLOJİK VE PİGMENTASYON ÖZELLİKLERİ	53
4.3. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTENİN TESPİTİ.....	56
4.3.1. Birincil Tarama.....	56
4.3.1.1. Çizgi Ekim Yöntemi.....	56
4.3.1.2. Agar Kaplama Yöntemi.....	58
4.3.2. İkincil Tarama	61
4.3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi	61
4.3.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu/ Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MİK/MBK).....	62
4.4. İZOLATLARIN ADLANDIRILMASI	65
4.5. POZİTİF SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Actinomycete</i> bakterilerinin yaşam döngüsü (Barka ve diğ., 2016)	5
Şekil 2.2: <i>Actinobacteria</i> sınıfının taksonomik ana hatları (Ludwig ve diğ., 2012) (Alt başlıklarda order düzeyinin familyaları yer almaktadır.)	11
Şekil 3.1: Toplanan su ve sediment örneği A: Steril şırınga ile toplanan su örneği, B: Steril falcon ile toplanan sediment örneği	29
Şekil 3.2: Membran filtrasyon sistemi kullanılarak <i>Actinomycetes</i> izolasyonu (A: Membran filtre ile 4 günlük inkübasyon süreci, B: Membran filtre aseptik şartlar altında alındıktan sonra inkübasyon süreci)	30
Şekil 3.3: Marmara Denizi' nden toplanan sediment örneklerine uygulanan çeşitli ön işlemler	31
Şekil 3.4: Sediment örneklerinden izolasyonu yapılan <i>Actinomycete</i> kolonileri.....	32
Şekil 3.5: <i>Actinomycetes</i> şüphesi gözlemlenen çeşitli izolatlar ait Gram pozitif filamentli yapıdaki mikroskop görüntüsü (100x büyütme)	33
Şekil 3.6: Azaltma ekim yöntemi ile besiyerine ekilmiş bir <i>Actinomycete</i> şüpheli izolatin substrat (A) ve hava (B) hifleri görüntüsü.....	33
Şekil 3.7: Sık ekim yöntemi ile besiyerine ekilmiş bir <i>Actinomycete</i> şüpheli izolatin substrat (A) ve hava (B) hifleri görüntüsü.....	34
Şekil 3.8: Agar kaplama yönteminde bakteri süspansiyonlu yumuşak agar dökülmeden önce UV ışık altında <i>Actinomycete</i> şüpheli izolatların öldürülmesi.....	36
Şekil 3.9: Sekonder metabolit eldesi (A: ½ ISP2 besiyerinde 10 gün boyunca çalkalamalı etüvde inkübe edilen S18 izolatu, B: Santrifüj işlemi sonrası dibe çöken S18 bakterileri ve süpernatantı)	37
Şekil 3.10: Çeşitli izolatlar ait süpernatant örnekleri (Soldan sağa doğru A5, S9 ve S18 izolatlarına ait süpernatantlar).....	37
Şekil 3.11: DNA'sı izole edilen çeşitli <i>Actinomycetes</i> izolatlarına ait agaroz jel görüntüsü (M: Marker).....	40
Şekil 3.12: PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (M: Marker).....	42
Şekil 4.1: Çeşitli izolatlar ait çizgi ekim yönteminde gösterdikleri antibakteriyel zon çapları A: Petrinin dıştan görünümü, B: Petrinin içten görünümü (Üreme alanlarındaki siyah çizgiler inhibisyon uzunluğunu göstermektedir.).....	58

Şekil 4.2: Bazı patojen bakteriler üzerine antibakteriyel özellik gösteren <i>Actinomycete</i> izolatları.....	61
Şekil 4.3: S9 bakterisine ait 96 kuyucuklu pleytte MİK/MBK sonuçları (A: <i>E.coli</i> , B: <i>S.aureus</i> , C: <i>S. epidermidis</i> , D: <i>S. enterica</i> , E: <i>P. aeruginosa</i> , F: <i>K. pneumoniae</i> , G: <i>B. subtilis</i>).....	65



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>Actinomycete</i> bakterilerinin hücre duvarı kemotipleri (Lechevalier ve Lechevalier, 1980; Barka ve diğ., 2016)	8
Tablo 2.2: Goodfellow ve Williams (1983) tarafından geliştirilen <i>Actinomycete</i> sınıfları.....	9
Tablo 2.3: Antibiyotiklerin ilk elde edildikleri <i>Actinomycete</i> türleri, antibiyotiğin etki mekanizması ve antibiyotiğin kimyasal sınıfı	18
Tablo 2.4: Antikanser aktivite gösteren bazı <i>Actinomycete</i> 'ler ve etken maddeleri.....	21
Tablo 3.1: Toplanan örneklerle ait bilgiler	28
Tablo 3.2: PZR karışımı	41
Tablo 3.3: PZR Reaksiyon Koşulları.....	41
Tablo 4.1: İzole edilen <i>Actinomycete</i> bakterilerinin izolasyon kaynakları, izolasyon yöntemleri ve izole edildikleri besiyerleri.....	51
Tablo 4.2: İzole edilen <i>Actinomycete</i> bakterilerinin koloni morfolojisi, misel yapıları ve pigment özellikleri	53
Tablo 4.3: Çizgi ekim yöntemi ile elde edilen antibakteriyel zon çapları (mm)	56
Tablo 4.4: Agar kaplama yönteminde elde edilen antibakteriyel zon çapları (mm)	59
Tablo 4.5: Elde edilen süpernatantlara ait MİK/MBK sonuçları.....	62
Tablo 4.6: İzolatların en yakın olduğu mikroorganizma grubu, benzerlik yüzdeleri	66
Tablo 4.7: Pozitif sonuç elde edilen izolatlara ait karşılaştırma tablosu	68

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
-	: Negatif sonuç
µl	: Mikrolitre
bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
kb	: Kilobaz
km	: Kilometre
ml	: Mililitre
rpm	: Dakika devir sayısı (round per minute)

Kisaltmalar Açıklama

16S rRNA	: 16S ribozomal ribonükleik asit
AZM	: Azitromisin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GM2	: Gauze 2 Medium
ISP2	: International Streptomyces Project 2 Medium
NA	: Nutrient Agar
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
MİK/MBK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu/ Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
pH	: Potansiyel hidrojen
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	: Ultraviyole
TBE	: Tris/Borate/EDTA
TE	: Tetrasiklin

ÖZET

DENİZ ORTAMLARINDAN İZOLE EDİLEN *Actinomyces*'LERİN ANTİBAKTERİYEL KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülrihan SELİM

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

Actinomyces bakterileri Gram pozitif, filamentli, sporlu, aerobik bakterilerdir. Toprak, sediment, tatlı ve tuzlu su kaynakları, bitkiler, sünger, böcek ya da balık gibi çeşitli hayvanların dokularında bulunan bu bakteriler ürettikleri biyoaktif bileşiklerle bilinmektedirler.

Actinomyces'ler farklı özellikteki yüksek sekonder metabolit üretme kapasitesine sahip bakterilerdir. Bulundukları ortamda sağladıkları adaptasyonlar bu bakterilerin yeni antibakteriyel madde sentezlemelerini sağlar. Bu sebeple farklı ortamlardan izole edilen *Actinomyces*'ler sahip oldukları sekonder metabolitler açısından mutlaka incelenmelidir. Tez çalışmamızda Marmara Denizi'nin farklı bölge ve derinliklerden su ve sediment örnekleri toplanmış ve bu örnekler soğuk zincirle laboratuvar ortamına taşınmıştır. Laboratuvara getirilen su ve sediment örnekleri *Actinomyces* bakterilerinin izole edilebilmesi amacıyla antibiyotik ve antifungal ile desteklenen ISP2, GM2 ve M6 besiyerlerine farklı izolasyon teknikleri kullanılarak ekilmiştir. Su örnekleri süzme ve direkt ekim yöntemleri ile çalışılırken, çeşitli ön işlemler uygulanan sediment örnekleri seri sulandırma yöntemi ile ekilmiştir. Yapılan makroskopik ve mikroskopik incelemeler sonucunda 35 tane *Actinomyces* şüpheli bakteri kolonisi belirlenmiştir.

Actinomycete bakterilerine ait antibakteriyel etkinlikler birincil ve ikincil tarama olarak adlandırılan yöntemlerle taranmıştır. Tez çalışmamızda *Actinomycetes* izolatlarının antibakteriyel etkinliğini belirlemek için *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* patojenleri seçilmiştir. Birincil taramada çizgi ekim ve agar kaplama yöntemleri denenmiştir. Çizgi ekim yönteminde 13 adet izolat en az bir patojen bakteri üzerine antibakteriyel özellik gösterirken, agar kaplama yönteminde 7 adet izolat en az bir patojen bakteri üzerine antibakteriyel özellik göstermiştir. Birincil tarama yöntemlerinde çeşitli izolatlarımızın günümüzde de kullanılan azitromisin ve tetrasiklin gibi enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere kıyasla *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* ve *S. enterica* bakterilerine karşı çok daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

İkincil tarama yöntemleri için *Actinomycete*'lerden süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant disk difüzyon ve MİK/MBK deneylerinde kullanılmıştır. Disk difüzyon yönteminde sonuç elde edilemezken, MİK/MBK yöntemi ile incelendiğinde 10 adet *Actinomycetes* izolatının süpernatantının denen en az bir patojen üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. MİK/MBK sonuçlarına göre bazı izolatlarımıza ait sekonder metabolitlerin düşük dozlarda bile antibakteriyel bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Actinomycetes izolatlarının adlandırılması için ilk olarak bakterilere ait genomik DNA'larının 9F ve 1509R primerleri ile PZR yöntemi uygulanarak çoğaltılan 16S rRNA gen bölgelerinin sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi sonucunda elde edilen diziler kullanılarak NCBI GenBank'ta izolatlarımıza en yakın *Actinomycetes* türleri belirlenmiştir. Sekans analizi sonuçlarına göre tez çalışmamız kapsamında *Streptomyces* cinsi başta olmak üzere *Nocardiopsis*, *Micromonospora* ve *Nonomuraea* cinslerine ait *Actinomycete*'lerin izolasyonu yapılmıştır.

Mayıs 2023, 110 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Actinomycetes*, Antibakteriyel etki, Marmara Denizi, Biyoaktif madde

SUMMARY

ANTIBACTERIAL CHARACTERIZATION OF *Actinomycetes* ISOLATED FROM SEA ENVIROMENTS

M.Sc. THESIS

G lnihan SEL M

 stanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Elif  zlem ARSLAN AYDO DU

Actinomycete bacteria are Gram-positive, filamentous, spore-forming, aerobic bacteria. These bacteria, which are found in the tissues of various animals such as soil, sediment, fresh and salt water sources, plants, sponges, insects or fish, are known for the bioactive compounds they produce.

Actinomycetes are bacteria with a high capacity to produce secondary metabolites with different characteristics. The adaptations they provide to their environment enable these bacteria to synthesize new antibacterial substances depending on their living environment. For this reason, *Actinomycetes* isolated from different environments should be examined in terms of their secondary metabolites. In our thesis study, water and sediment samples were collected from different depths and parts of the Marmara Sea from and these samples were transported to the laboratory environment by cold chain. Water and sediment samples brought to the laboratory were inoculated on ISP2, GM2 and M6 media supplemented with antibiotics and antifungals using different isolation techniques in order to isolate *Actinomycete* bacteria. While water samples were studied by filtration and direct inoculation methods, sediment samples with various pre-treatments were inoculation with serial dilution method. As a result

of the macroscopic and microscopic examinations, 35 *Actinomycetes* suspicious bacterial colonies were determined.

Antibacterial activities of *Actinomycete* bacteria were screened by methods called primary and secondary screening. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus subtilis* pathogens were selected to determine the antibacterial activity of *Actinomycetes* isolates in our thesis study. Cross streak and agar overlay methods were tried in primary screening. While 13 isolates showed antibacterial properties on at least one pathogenic bacteria in the cross streak method, 7 isolates showed antibacterial properties on at least one pathogenic bacteria in the agar overlay method. In primary screening methods, it was determined that various isolates showed much higher antibacterial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* and *S. enterica* bacteria compared to antibiotics used in the treatment of infections such as azithromycin and tetracycline, which are still used today.

Supernatant was obtained from *Actinomycetes* for secondary screening methods. This supernatant was used in secondary screening methods. The obtained supernatant was used in disk diffusion and MIC/MBK experiments. While no results were obtained in the disk diffusion method, it was determined that the supernatant of 10 *Actinomycetes* isolates had antibacterial activity on at least one of the pathogens tested when examined by the MIC/MBK method. According to the MIC/MBK results, it was determined that the secondary metabolites of some of our isolates showed an antibacterial effect even at low doses.

In order to identify the *Actinomycetes* isolates, firstly, the sequence analysis of the 16S rRNA gene regions of the bacterial genomic DNAs amplified by the PCR method with 9F and 1509R primers was performed. Using the sequences obtained as a result of the sequence analysis, the closest *Actinomycetes* species to our isolates were determined in the NCBI GenBank. According to the results of the sequence analysis, within the scope of our thesis study, *Actinomycetes* belonging to the genus *Nocardiopsis*, *Micromonospora* and *Nonomuraea*, especially the genus *Streptomyces*, were isolated. |

May 2023, |110| pages.

Keywords: |*Actinomycetes*, Antibacterial effect, Marmara Sea, Bioactive substance |

1. GİRİŞ

Actinomycete'ler sahip oldukları biyoaktif bileşik sentezleme yetenekleri ile bilinen bakterilerdir. Bu bakteriler geniş bir filogenetik çeşitliliğe sahipken genel olarak morfolojik olarak sahip oldukları farklılıkları ile diğer bakteri türlerinden ayrılmaktadırlar. *Actinomycete*'ler Gram pozitif, sporlu, aerobik, filamentöz yapıda, agara difüze olmalarını sağlayan substrat hiflerinin yanı sıra hava hiflerine de sahip olan bakterilerdir (Anandan ve diğ., 2016). Toprak, su ya da çeşitli canlı dokularında yaşayan bu bakteriler genellikle yaşadıkları ortama fayda sağlamalarına karşın çok nadir de olsa patojenik türlere de sahiptirler.

Günümüzde mikroorganizmalar tarafından üretildiği bilinen birçok biyoaktif bileşik bulunmaktadır. Bu bileşiklerin büyük çoğunluğu *Actinomycete*'ler tarafından üretilirken en çok biyoaktif madde üretimi *Streptomyces* cinsinde gözlemlenmektedir (Kurtböke, 2012). *Actinomycete*'ler tarafından üretildiği bilinen biyoaktif maddeler çok farklı potansiyelleri içerisinde barındırmaktadır. *Actinomycete*'ler tarafından üretilen biyoaktif maddeler, sekonder metabolit olarak adlandırılan ve bakterilerin üremesi için zorunlu olmayan ancak bakterilere çeşitli özellikler kazandıran çeşitli maddelerden meydana gelmektedir. *Actinomycete*'lere ait sekonder metabolitler antimikrobiyal, antikanser, antidiyabetik, antioksidan, herbisit ya da insektisit özelliklerinin yanı sıra çeşitli endüstrilerde kullanılabilen enzimatik özelliklerde de olabilmektedir (Solanki ve diğ., 2008; ELnahas ve diğ., 2021).

Günümüze kadar *Actinomycete* bakterilerinden birçok farklı biyoaktif madde elde edilmiştir. Bu biyoaktif maddelerden bir tanesi de antibiyotiklerdir. 1940'lı yılların başından beri *Actinomycete* bakterilerinin antibakteriyel özellik taşıyan bileşiklere sahip oldukları bilinmektedir ve buna bağlı olarak bu bakterilerden birçok antibakteriyel maddenin keşfi yapılmıştır (Mahajan ve Balachandran, 2012). 1980'li yıllara kadar yeni antibiyotikler *Actinomycete*'lerden antibiyotik elde edilmiş olmasına rağmen bu keşifler zamanla daha kısıtlı hale gelmiştir. Bunun nedeni bu bakterilerin yoğun olarak bulunduğu toprak ortamlarının yoğun olarak çalışılmış olmasıdır. Yeni antibiyotiklerin ya da biyoaktif maddelerin keşfedilebilmesi için özellikle daha önce çalışılmamış ortamların araştırılması önemlidir çünkü farklı ortamlarda yaşayan *Actinomycete* bakterilerinin farklı özelliklere adapte

olmalarına bağlı olarak sahip oldukları yetenekler de farklılık göstermektedir. Denizel ortamlarda bulunan *Actinomycete*'lerle ilgili yapılan çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen bu çalışmalar toprağa kıyasla çok daha kısıtlı ve başlangıç aşamasındadır. Denizel ortamlarda bulunan *Actinomycete*'lere ait çeşitli biyoaktif maddeler elde edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalar denizel ortamdan izole edilen *Salinispora arenicola*'dan elde edilen antibakteriyel, *Streptomyces* sp. BD21-2'den elde edilen antifungal, *Streptomyces corchorusii* AUBN(1)/7'den elde edilen antiviral, *Streptomyces* sp. M045'den elde edilen antikanser ya da *Streptomyces* sp.'den elde edilen antienflamatuar özellikteki biyoaktif bileşikler örnek olarak vermek mümkündür (Solanki ve diğ., 2008). Bu yüzden de özellikle daha önce çalışılmamış denizlerden *Actinomycete* izolasyonunu ve sahip oldukları biyoaktif bileşiklerin araştırılması yeni birçok önemli maddeyi topluma kazandırma potansiyeline sahiptir.

Özellikle günümüzde Dünya Sağlık Örgütü tarafından da önemli sorunlardan bir tanesi olarak nitelendirilen antibiyotik dirençliliği giderek artan bir sorun haline gelmektedir. Bu durum klinik olarak kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisinin azalmasına neden olmaktadır (Aslam ve diğ., 2018). Giderek artan antibiyotik dirençliliği kullanılan antibiyotiklerin etkisini azaltırken, enfeksiyonlara bağlı olarak ortaya çıkan ölüm oranını da artırma ihtimaline sahiptir. Bu durumun önüne geçmek için yeni antibakteriyel maddelerin sentezine ihtiyaç duyulmaktadır. Ticari olarak satılan birçok antibiyotiğin ana üretici olan *Actinomycete*'ler, üretebildikleri biyoaktif madde çeşitlilikleriyle yeni antibakteriyel ajanların keşfinde önemli bir potansiyele sahiptirler. Ancak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesinde özellikle daha önce çalışılmamış alanlar ya da daha önce çalışılmamış *Actinomycete*'lerin çalışması çok daha önemli sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Tez çalışmamız kapsamında çalışmayı tercih ettiğimiz Marmara Denizi'nin bakteriyel çeşitliliği ile ilgili birçok çalışma mevcut olmasına rağmen *Actinomycete* bakterilerinin çeşitliliği ile ilgili bir çalışma henüz yapılmamıştır. *Actinomycete*'lerin sediment örneklerinde yoğun olarak bulunmalarına karşın suda da bulundukları bilinmektedir (Ghanem ve diğ., 2000). Bu yüzden hem sediment hem de deniz suyu örneklerinden *Actinomycete*'lerin izole edilmesi için tercih edilmiştir. Su ve sediment örnekleri özellikle Marmara Denizi'nde bulunan müsilağlı alanlardan toplanmıştır. Müsilağın bulunduğu alanlarda patojenik bakteriyel yükün artmasına bağlı olarak yine bu alanlarda *Actinomycete* miktarının artmasının yanı sıra

sentezleyebilecekleri antibakteriyel maddelerinde artacağı ihtimalinden yola çıkılarak bu alanlar örnekleme için tercih edilmiştir.

Marmara Denizi'nden izole edilen *Actinomycete*'lerin ve bunların sahip oldukları antibakteriyel aktivitelerin belirlenmesi hem literatüre sunacağı katkı hem de yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için potansiyel kaynakların ortaya konulması açısından önem taşımaktadır.

Bu tezin amacı daha önce *Actinomycete* bakterilerinin çeşitliliği ve sahip oldukları antibakteriyel metabolitlerin belirlenmesi yönünde bir çalışmanın yürütülmediği Marmara Denizi'nde bulunan *Actinomycete*'lerin izole edilmesi ve elde edilen bakterilerin çeşitli patojen bakteriler üzerine gösterdiği antibakteriyel etkinin tespit edilmesidir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. *ACTINOMYCETES* GENEL ÖZELLİKLERİ

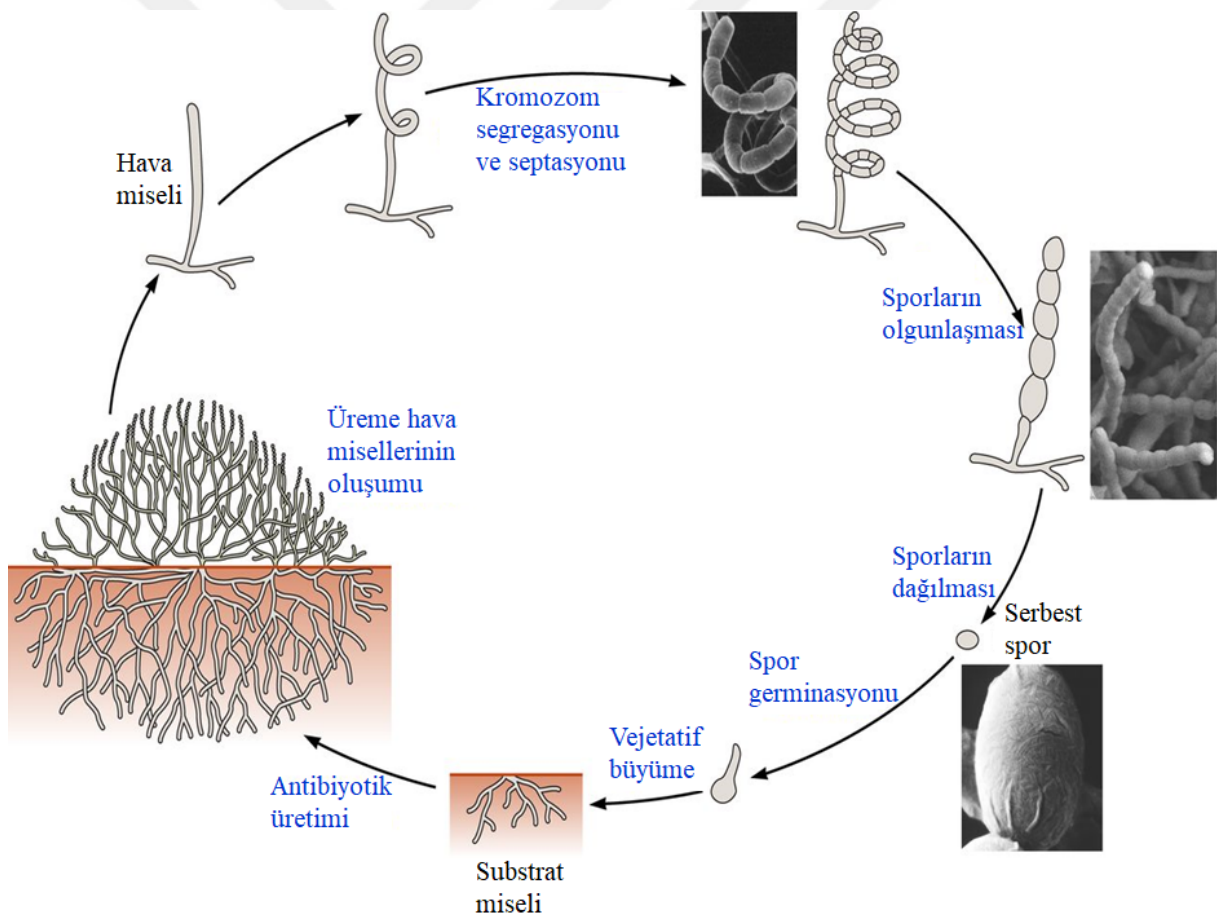
Actinomycete'ler Gram pozitif, aerobik, filamentli ve DNA dizisinde yüksek oranda Guanin (G) ve Sitozin (C) bazları içeren sporlu bakterilerdir. İlk keşfedildikleri zaman sahip oldukları hifli yapılar nedeniyle mantar sanılan bu bakteriler bu yüzden Yunanca ışın anlamına gelen “atkis” ve mantar anlamına gelen “mykes” kelimelerinin bir araya getirilmesiyle adlandırılmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucu bakteri oldukları tespit edilen *Actinomycete*'ler *Actinomycetales* takımının içerisine dahil edilmişlerdir (Bhatti ve diğ., 2017).

Actinomycete'ler toprak mikrobiyolojisinin başlıca bakterileridir. Toprağın kendine has olan ve toprak kokusu ('earthy smell') olarak adlandırılan kokunun açığa çıkmasından *Actinomycete* bakterileri sorumludur. Toprakta yoğun olarak bulunan bu bakteriler geosmin adı verilen bir bileşik üretmektedir ve açığa çıkan madde toprağın karakteristik kokusunu meydana getirmektedir (Gerber ve Lechevalier, 1965; Chaudhary ve diğ., 2013). Bu bakterilerin toprağın yanı sıra deniz, okyanus ya da göl gibi su kaynaklarında, sedimentlerde, bitkilerin yüzeylerinde, böcek gibi canlıların vücut yüzeylerinde, Antarktika ve çöl gibi ekstrem ortamlarda da bulunduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Mahajan ve Balachandran, 2012; Chaudhary ve diğ., 2013; Silva ve diğ., 2020; Selim ve diğ., 2021). *Actinomycete*'ler biyosferdeki karbon döngüsünde önemli bir yere sahip olan çeşitli enzimleri de salgılamaktadırlar. Bu enzimler kompleks yapıdaki organik maddeleri parçalama özelliğinde olabilmektedirler (Edwards, 1993).

Kalakoutskii ve Agre (1976) yaptıkları çalışmada *Actinomycetes* kolonilerini 3 sınıfa ayırmışlardır. Bu çalışmaya göre ilk koloni tipi R ve S tipi koloni morfolojisine sahip ve yumuşak yapısı ile besiyerinden ayrılması daha kolay olan koloni tipidir. İkinci koloni tipi ise hava miselleri yoğunlukta ve substrat miselleri ise neredeyse olmayan koloni tipidir. Son koloni tipi ise substrat miselleri ile besiyerine tutunan, hava misellerine sahip olan sert yapıdaki kolonilerden oluşan koloni tipidir.

Farklı tipte kolonilere sahip olsalar da *Actinomycete*'lerin çoğu besiyeri üzerinde diğer bakteri kolonilerinden ayrılmasını sağlayan miselli yapıda ve sert üreme özelliği ile bilinen

bakterilerdir. Üremeleri esnasında bulundukları besiyerinin substratına nüfuz etme özelliği göstermektedirler (Srinivasan ve diğ., 1991). *Actinomycete* bakterileri substrat ve hava (aerial) miselleri olarak adlandırılan miseller ile karakterize edilir. Substrat miselleri bakterilerin agarın içerisine difüze olması ile ortaya çıkar. Hava miselleri ise substrat misellerine kıyasla daha zayıf yapıda olan, yüzeyde bulunan misellerdir. *Actinomycete*'lerin türüne göre hava misellerinin rengi ve yapısı farklılık göstermektedir. Genellikle *Actinomycete*'lerin hava ve substrat miselleri birbirinden farklı renk ve görünümde olmaktadır (Anandan ve diğ., 2016). Ayrıca hava misellerinin oluşumu ve yapısı *Actinomycete*'lerin yetiştiği besin ortamına, sıcaklığa ya da bazı bileşiklerin varlığı gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Srinivasan ve diğ., 1991). Şekil 2.1' de *Actinomycete*'lere ait yaşam döngüsünün şematize hali verilmiştir.



Şekil 2.1: *Actinomycete* bakterilerinin yaşam döngüsü (Barka ve diğ., 2016)

Actinomycete bakterileri biyoteknolojik açıdan en önemli bakteri gruplarından bir olarak kabul edilir. *Actinomycete*'ler ürettikleri biyoaktif bileşikler sayesinde antibakteriyel, antifungal ya da antiviral gibi antimikrobiyal bileşiklerin elde edilmesinde, antikanser, antikolestrol ya da immünosupresan gibi tıp alanında, çeşitli bitki patojenlerinin üzerinde ya da biyoremediasyon ajanı olarak farklı alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptirler (Bhatti ve diğ., 2017).

Genelde yararlı özellikleri ile bilinen bu mikroorganizmaların bazı türleri patojenik özellik de gösterebilmektedir. Patojenik *Actinomycete* türleri denildiğinde akla ilk gelenler *Actinomyces* generusu üyeleridir. Bu *Actinomyces*'ler enfekte ettikleri vücut bölgesine bağlı olarak servikofasiyal, torasik ve abdominal formlar olarak sınıflandırılmaktadır. Patojenik *Actinomyces*'lerin bazıları sadece hayvanlarda, bazıları sadece insanlarda, bazıları ise hem hayvanlar hem de insanlarda hastalık yapabilmektedir (Schaal ve Lee, 1992). Patojenik *Actinomyces*'ler tarafından meydana gelen enfeksiyonlar aktinomikoz olarak adlandırılan ve ağrısız, yavaş ilerleyen granümatöz bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*, *A. gerencseriae*, *A. graevenitzii*, *A. meyeri*, *A. neuii* ve *A. turicensis* gibi *Actinomycetes* türleri başta olmak üzere çeşitli *Actinomycete*'lerin patojenik özellikleri rapor edilmiştir (Könönen ve Wade, 2015).

2.2. ACTINOMYCETE'LERİN KEŞFİ

Actinomycete'ler ilk olarak Ferdinand Cohn tarafından 1875 yılında *Streptothrix foersteri* türünün izole edilmesi ile keşfedilmiştir. Cohn bu iplikli yapıdaki bakteriyi insan lakrimal kanalında tespit etmiştir. Daha sonra 1878 yılında C.O. Harz tarafından *Actinomyces bovis*'in keşfedilmesi ile hifli yapıları ile bilinen bu bakteriler literatürde yerlerini almaya başlamışlardır (Sowani ve diğ., 2017).

Actinomycete bakterileri daha sonra Salman Waksman'ın toprak mikrobiyolojisi üzerine yaptığı çalışmalar sırasında dikkatini çekmiştir. Waksman mikroskopta incelediğinde mantar gibi miselyumlara sahip olan, ürettiği agarın ise içerisine difüze olan bu mikroorganizma grubunun *Actinomycete* bakterileri olduğunu öğrenmiştir. Daha sonra ekip arkadaşları ile beraber *Actinomycete* bakterilerinin üzerine yaptığı çalışmalar ile bu bakterilere ait biyoaktif sekonder metabolitlerin varlığını keşfetmiştir. Waksman ve arkadaşları 1943 yılında *Streptomyces griseus* bakterisinin sekonder metabolitinden streptomisin adı verdikleri

antibiyotiği izole etmişlerdir. Streptomisin antibiyotiğinin keşfi yeni antibiyotiklerin keşfedilmesinde önemli bir yere sahip olmuştur. Yine Waksman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla streptomisin antibiyotiğinin tüberküloz hastalığının etmeni olan *Mycobacterium tuberculosis* bakterisi üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Böylece streptomisin tüberküloz hastalığının tedavisinde kullanılan ilk antibiyotik olmuştur. 1952 yılında S. Waksman *Actinomycetes*'ten elde ettiği antibiyotik ile Nobel Ödülünün de sahibi olmuştur (Mahajan ve Balachandran, 2012). Waksman ve ekibinin yaptığı bu araştırmaların ardından *Actinomycete* bakterilerine olan ilgi hızla artmıştır.

2.3. ACTINOMYCETE'LERİN SINIFLANDIRILMASI

Actinomycete'lerin ilk keşfedildikleri dönemde nasıl sınıflandırılacakları ile ilgili çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Bazı araştırmacılar bu bakterileri, yüksek bakteri olarak tanımlarken bazı araştırmacılar düşük mantarlar olarak tanımlamışlardır. Günümüzde ise *Actinomycete*'ler *Actinobacteria* sınıfına ait *Actinomycetales* takımının bir üyesi olarak kabul edilmektedirler (Mahajan ve Balachandran, 2012)

Lechevalier ve Lechevalier, 1980 yılında yaptıkları çalışmada *Actinomycete*'leri hücre duvarlarının yapı özelliklerine göre gruplandırmışlardır. Hücre duvarı amino asitleri, lipidler, proteinler, menakinonlar, muramik asit türleri, şekerler ve DNA'nın baz bileşimi gibi özellikleri kullanılarak bakterilerin kimyasal bileşenlerine göre sınıflandırılmasına kemotaksonomi adı verilmektedir. Bu kemotaksonomik özelliklerden bazıları *Actinomycete*'ler hakkında da bilgi vermektedir. Lechevalier ve Lechevalier ise bu sınıflandırmayı 2,6-diaminopimelik asit (DAP) ve amino asitler ile amino şekerlerin hücrede bulunma durumlarına göre yapmışlardır. Bu sınıflandırmayı hücre duvarı kemotiplendirmesi olarak adlandırmak mümkündür (Lechevalier ve Lechevalier, 1980; Barka ve diğ., 2016). Tablo 2.1' de *Actinomycete* bakterilerinin hücre duvarı kemotiplendirmesi verilmiştir.

Tablo 2.1: *Actinomycete* bakterilerinin hücre duvarı kemotipleri (Lechevalier ve Lechevalier, 1980; Barka ve diğ., 2016)

Hücre Duvarı Tip	Majör bileşenler	Cinsler
I	✓ LL- DAP ✓ Glisin içerir ✓ Şeker bulunmaz	<i>Arachnia</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Pimelobacter</i> , <i>Streptomyces</i>
II	✓ Mezo-DAP ✓ Glisin, arabinoz, ksiloz içerir	<i>Actinomyces</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Ampulariella</i> , <i>Catellatosporia</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Pilimelia</i>
III	✓ Mezo-DAP ✓ Maduroz (3-O-metil-d-galaktoz) içerir	<i>Actinocorallia</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Dermatophylus</i> , <i>Frankia</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Maduromyces</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Planotetraspora</i> , <i>Bazı Frankia spp.</i> , <i>Spirillospora</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Thermomonospora</i>
IV	✓ Mezo-DAP ✓ Arabinoz, Galaktoz içerir	<i>Micropolyspora</i> , <i>Nocardioforms</i>
V	✓ DAP bulunmaz ✓ Lizin ve ornitin içerir	<i>Actinomyces</i>
VI	✓ DAP bulunmaz ✓ Aspartik asit varlığı değişkendir ✓ Galaktoz içerir	<i>Arcanobacterium</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i>
VII	✓ DAP bulunmaz ✓ Diaminobütirik asit, glisin, lizin (değişkenli) içerir	<i>Agromyces</i> , <i>Clavibacter</i>
VIII	✓ DAP bulunmaz ✓ Ornitin içerir	<i>Aureobacterium</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Cellulomonas</i>

DAP: 2,6-diaminopimelik asit

1983 yılında *Actinomycete*'lerin ekolojisi üzerine yapılan çalışmalarda ise *Actinomycete*'ler sahip oldukları özelliklere göre 8 gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar Actinobacteria, Actinoplanetes, Maduromycetes, Micropolysporas, Multilocular, Nocardioform, Streptomycetes ve Thermomonosporas olarak belirlenmiştir (Goodfellow ve Williams, 1983). Belirlenen sınıflara ait özellikler ve grubun içerisine dahil edilen cinsler Tablo 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2.2: Goodfellow ve Williams (1983) tarafından geliştirilen *Actinomycete* sınıfları

Sınıf	Özellikler	Cinsler
Actinobacteria	✓ Aerobik, fakültatif aerobik ya da anaerobik ✓ Çomak, kok ya da filamentli formda ✓ Hava miselyumu yok ✓ Hücre duvarı yapısı kemotipleri I, II, V, VI, VII ve VIII içeren değişken yapıda	<i>Actinomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Arachnia</i> , <i>Arcanobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Rothia</i>
Actinoplanetes	✓ Aerobik sporoaktinomisetler ✓ Hava miselyumu yok ✓ Hareketsiz sporlar veziküller içinde olabilir ✓ Hücre duvarı yapısı kemotip II ✓ Organizma hidrolizatları arabinoz ve ksiloz içerir	<i>Actinoplanes</i> , <i>Amorphosporangium</i> , <i>Ampullariella</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Pilimelia</i>
Maduromycetes	✓ Aerobik sporoaktinomisetler ✓ Sporlar hava miselyumu üzerinde ya da vezikül içinde, hareketli veya hareketsiz olabilir ✓ Hücre duvarı yapısı kemotip III ✓ Organizma hidrolizatları maduroz (3-0-metil-D-galaktoz) içerir	<i>Actinomadura</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetrastroma</i> , <i>Planobispora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Spirillostoma</i> , <i>Streptosporangium</i>
Micropolysporas	✓ Aerobik sporoaktinomisetler ✓ Substrat ve hava miselyumunda tekli veya kısa spor zincirleri bulunabilir ✓ Hücre duvarı yapısı kemotipi IV ✓ Mikolik asit içermez	<i>Actinopolyspora</i> , <i>Micropolyspora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i>

Tablo 2.2 (Devam): Goodfellow ve Williams (1983) tarafından geliştirilen *Actinomycete* sınıfları

Sınıf	Özellikler	Cinsler
Multilocular	✓ Aerobik ya da fakültatif anaerobik ✓ Hava miselyumları yoktur ✓ Hücre duvarı yapısı kemotipi III	<i>Dermatophilus</i> , <i>Frankia</i> , <i>Geodermatophilus</i>
Nocardioform	✓ Aerobik ✓ Çomak, kok ve dallanmış filamentli formda ✓ Substrat ve hava miselyumu bulunur ✓ Hücre duvarı yapısı kemotipi IV ✓ Mikolik asitler içerir	<i>Caseobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i>
Streptomyces	✓ Aerobik sporoaktinomisetler ✓ Dallanmış substrat ve hava miselyumu oluşturur ✓ Sporlar hava miselyumunda bazen de substrat miselyumunda taşınır ✓ Hücre duvarı yapısı kemotipi I	<i>Intrasporangium</i> , <i>Kineosporia</i> , <i>Kitasatoa</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Sporichthya</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptoverticillium</i>
Thermomonosporas	✓ Aerobik sporoaktinomisetler ✓ Dallanmış substrat ve hava miselyumu ✓ Hareketli veya hareketsiz sporlar ✓ Hücre duvarı yapısı kemotipi III	<i>Actinosynnema</i> , <i>Nocardioopsis</i> , <i>Streptoalloteichus</i> , <i>Thermomonospora</i>

Günümüzde ise *Actinomycete*'lerin sınıflandırılması için ana kaynak olarak bakterilerin sınıflandırılmasında sıklıkla başvuru yapılan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology kitabının 5. cildi baz alınmaktadır. Burada *Actinomycete*'leri içerisinde barındıran Aktinobakteriler filumu kendi içerisinde *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* ve *Thermoleophilia* olarak 6 sınıfa ayrılmaktadır. *Actinobacteria* sınıfı ise 16 takıma ayrılmaktadır (Ludwig ve diğ., 2012; Anandan ve diğ., 2016). Şekil 2.2' de *Actinobacteria* sınıfının taksonomik ana hatları verilmektedir.



Şekil 2.2: *Actinobacteria* sınıfının taksonomik ana hatları (Ludwig ve diğ., 2012) (Alt başlıklarda order düzeyinin familyaları yer almaktadır.)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology kitabında yer alan sınıflandırma günümüzde hala geçerliliğini devam ettirmektedir. *Actinobacteria* sınıfı, *Streptomyces*, *Nocardia* ve *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Micromonospora* ve *Streptosporangium* gibi çeşitli önemli genusları içermektedir. İçerisinde çok fazla alt takım ve familya bulunması sınıfın çeşitliliğini arttırmaktadır ancak bu durum *Actinobacteria* sınıfı üyelerini biyokimyasal analizlerle tanımlamayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca *Actinomycete*'lerin yavaş büyüyen bakteriler olmaları da biyokimyasal olarak tanımlanmalarını zorlaştırmaktadır. Bu yüzden bu bakteri grubunun tanımlanmasında moleküler teknikler daha yoğun olarak kullanılmaktadır. 16s rRNA'ya bağlı olarak yapılan sekans bazlı yöntemlerin uygulanması *Actinomycete*'lerin sınıflandırılmasında ve adlandırılmasında daha uygun olmaktadır (Patel ve diğ., 2004).

Actinobacteria sınıfına giren *Streptomyces* başta olmak üzere genusların birçoğu ürettikleri biyoaktif maddelerle bilinmektedir. Örneğin; *Streptomyces hygroscopicus* bir antifungal olan rapamisinini, *Streptomyces venezuelae* bir antibakteriyel olan kloramfenikolü, *Nocardia lurida* bir antibakteriyel olan benzantrin A ve B'yi, *Amiclatopsis mediterranei* U-32 yine bir antibakteriyel olan rifamisinini, *Streptomyces nanchangensis* bir insektisit olan nanchangmisini

ve *Streptomyces lavendulae* ise bir antitümör ajanı olan mitomisin C'yi üretmektedir (Solanki ve diğ., 2008).

2.4. ACTINOMYCETE' LERİN YAŞAM ALANLARI

Actinomycete'ler çok çeşitli habitatlarda bulunabilen mikroorganizmalardır. Toprakta yoğun olarak bulunan bu bakteriler göllerden denizlere, çöllerden ekstrem ortamlara kadar çok çeşitli çevrelerde bulunmalarının yanı sıra omurgalı ya da omurgasız canlılarla simbiyotik ilişki kurarak canlılıklarını sürdürebilirler (Mahajan ve Balachandran, 2012; Chaudhary ve diğ., 2013; Ezeobiora ve diğ., 2022).

Goodfellow ve Williams (1983) yaptıkları çalışmada *Actinomycete*'lerin 1 gram toprakta 1 milyonun üzerinde bulunabildiğini belirtmişlerdir. Günümüzde toprağın 1 gramında yaklaşık 10^{10} bakteri hücresi olduğu tahmin edilmektedir (Raynaud ve Nunan, 2014). Toprağın yapısına ve içerdiği besinlere bağlı olarak toprak popülasyonunun 1 gramında 10^6 ile 10^9 arasında değişen miktarda *Actinomycetes* hücresi bulunduğu düşünülmektedir (Takahashi ve Nakashima, 2018). Belirtilen rakamlar toprakta bulunan mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun *Actinomycetes* üyesi bakteriler olduğunu ortaya koymaktadır.

Yeryüzünde çok farklı bölgelerde ve özelliklerde bulunan topraklar vardır. Genelde bu topraklara ait pH dereceleri 5.0 ila 9.0 arasında değişiklik göstermektedir (Goodfellow ve Williams, 1983). Bu durum farklı topraklarda farklı tür *Actinomycete*'lerin bulunmasının yanı sıra aynı tür olan *Actinomycete*'lerin de birbirinden farklı özelliklere sahip olmasına sebep olabilmektedir. Bulundukları farklı ortam koşulları *Actinomycete*'lerin farklı streslere maruz kalmasına, dolayısıyla farklı biyoaktif bileşikler sentezlemesine sebep olabilmektedir. 1500 ila 4380 rakım aralığında değişen yüksekliklerden toplanan toprak örneklerinden *Streptomyces*, *Nocardia* ve *Micromonospora* cinsi (Sapkota ve diğ., 2020), mangrove ormanından toplanan toprak örneklerinden *Actinomyces*, *Nocardia*, *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi (Arifuzzaman ve diğ., 2010), humuslu topraklardan alınan örneklerden *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes* ve *Streptosporangium* cinsi (Seong ve diğ., 2001), tropik topraklardan ise *Amycolatopsis* ve *Streptomyces* cinsi (Semêdo ve diğ., 2001) farklı *Actinomycete*'ler izole edilmiştir.

Actinomycete'lere sucul ortamlarda da sıklıkla rastlanılmaktadır. Sucul ortamlardan sediment başta olmak üzere su örneklerinden ya da çeşitli su canlılarından *Actinomycete*'lerin izolasyonu mümkündür. Tuzlu su olarak adlandırabileceğimiz ve deniz ya da okyanus olarak belirtilen farklı su kütlelerinde *Actinomycete* bakterilerine rastlanılmıştır. Yapılan farklı çalışmalarla Kızıl Denize ait çeşitli sünger örneklerinden *Kocuria*, *Mycobacterium*, *Nocardia* ve *Rhodococcus* cinsi (Abdelmohsen ve diğ., 2014), Japon Denizi sedimentlerinden *Williamsia* cinsi (Stach ve diğ., 2004), Pasifik Okyanusundan *Streptomyces*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora* ve *Gordonia* cinsi (Solano ve diğ., 2009), Güney Okyanusu'ndan ise *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Cryobacterium*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Marisediminicola*, *Rhodococcus*, *Kocuria* (Sivasankar ve diğ., 2018) cinslerine ait *Actinomycetes*'lerin izolasyonu yapılmıştır.

Yapılan çeşitli çalışmalarla tuzlu su ortamlarının yanı sıra akarsu, göl gibi tatlı su ortamlarından da *Actinomycete* bakterileri izole edilmiştir. Cezayir'de bulunan Fetzara Gölü'nden *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Micromonospora* (Benhadj ve diğ., 2019) cinsi *Actinomycete*'ler izole edilirken çeşitli akarsu örneklerinde *Actinoplanetes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Thermoactinomyces* cinslerine (Deshmukh ve Sridhar, 2002) rastlanılmıştır. Ayrıca nehir sedimentlerinden *Streptomyces* ve *Micromonospora* izole edilirken (Hoang ve diğ., 2007), Kore yeraltı sularından *Nocardioides* (Yoon ve diğ., 2004) izole edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar su kaynaklarının tamamında *Actinomycetes* varlığının mümkün olduğunu ortaya koymaktadır.

Derin denizler sahip oldukları yüksek basıncın yanı sıra yer yer düşük veya yüksek sıcaklıkları ile bilinen deniz ortamlarıdır (Horikoshi, 1998). Bu ortamlar ekstrem alanları da içinde barındıran, bu yüzden hem yeni tür hem de bilinen türlerin yeni özellikler kazanmasıyla geniş biyoçeşitliliğe sahip önemli alanlardır. 2013 yılında yapılan bir çalışmada derin denizlerden toplanan sediment örneklerinden biyoaktif madde denilince akla gelen ilk cinslerden olan *Streptomyces* cinsinin bulunduğu *Streptomycetaceae* ve yine önemli biyoaktif bileşikler üretebilen *Micromonosporaceae* ailesine ve *Salinispora* cinsine (Prieto-Davó ve diğ., 2013) ait suşların izolasyonu yapılmıştır. Başka çalışmalarda ise bu cinslerin dışında *Verrucosipora* (Goodfellow ve diğ., 2012) ve *Dermacoccus* cinsi (Pathom-Aree ve diğ., 2006) gibi çeşitli *Actinomycete*'lerin de derin denizlerde yaşayabildiği saptanmıştır. Sadece

derinliğe bağlı olarak değil içerdiği iyon yükü ya da sıcaklık gibi değerlerle de ekstrem ortamlar olarak sayılabilen sucul ortamlardan da *Actinomycete*'ler izole edilmiştir. Örneğin, yüksek tuzluluğun yanı sıra yüksek alkalinitesi ile de bilinen Lonar soda gölünden (Hindistan) *Streptomyces* (Kharat ve diğ., 2009) cinsinin yanı sıra alkalitermofilik bir *Actinomycete* olan *Laceyella sacchari* (Borgave ve diğ., 2012) izolasyonu da yapılmıştır. Ayrıca yüksek sıcaklıklara sahip olmaları ile bilinen hidrotermal bacaların çevresinde bulunan sediment örneklerinden de *Streptomyces* cinsine ait örnekler izole edildiği çalışmalar bulunmaktadır (Shi ve diğ., 2017).

Yüksek basınç ya da sıcaklık gibi ekstrem koşullara sahip olan denizlerin dışında tuzluluk, yüksek pH derecesi, kuraklık, sıcaklık ya da soğukluk gibi koşullarla ekstrem olarak adlandırılan ortamlardan da *Actinomycetes* ailesine ait bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. Yüksek tuzluluğa sahip toprak örneklerinde *Actinopolyspora*, *Microbispora* ve *Amycolatopsis* (Abbas, 2006), elektrik iletkenliğine sahip yüksek tuzluluk oranında topraklarda *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora*, *Streptomonospora* ve *Saccharopolyspora* (Meklat ve diğ., 2011), mevsime göre pH derecesi 6 ila 9 arasında, sıcaklığı ise 10 ila 42°C arasında değişen tuz göllerine ait sedimentlerde *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Micromonospora* ve *Kocuria* (Ballav ve diğ., 2015) gibi ekstrem ortamlarda yaşamaya adapte olmuş *Actinomycetes* cinslerinin varlığı kanıtlanmıştır. Ayrıca yine çok tuzlu ve kurak topraklar, yüksek sodyum ve magnezyum içeren topraklar ve ağır killi topraklarda (Trenozhnikova ve Azizan, 2018), pH derecesi 8.8 ila 9.30 arasında değişen ve tuzlu ve aşırı tuzlu olarak tanımlanan topraklarda (El Karkouri ve diğ., 2019) ekstremofilik *Actinomycete*'ler izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarla Atacama çölü gibi aşırı kuraklığı ile bilinen bir bölgeye ait topraklarda *Amycolatopsis*, *Lechevalieria* ve *Streptomyces* (Okoro ve diğ., 2009), Mısır'da bulunan Doğu ve Batı çöllerine ait topraklarda *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* ve *Nocardia* (Hozzein ve diğ., 2008), Gobi çölüne ait topraklarda ise *Actinomycetales*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura* ve *Streptosporangium* (Kurapova ve diğ., 2012) gibi *Actinomycete*'lerin varlığı bildirilmiştir. Kurak ve sıcak toprakların tam aksi olarak düşük sıcaklığa sahip ortamlarda da *Actinomycete* bakterileri bulunabilmektedir. Örneğin Yunnan bölgesine (Çin) ait 450 ila 3900 m arasında değişen rakımlarda ve 5 ila 23.8°C aralığında sıcaklığa sahip ortamlardan toplanan farklı toprak örneklerinden çeşitli psikrofilik *Streptomyces* türleri (Xu ve diğ., 1996) izole

edilirken 2875 m rakımlı Alp buzullarından ise *Nocardioides* cinsine (Zhang ve diğ., 2012) ait *Actinomycetes* izole edilmiştir.

Mangrove ormanları da *Actinomycetes* çeşitliliğinin yüksek olduğu bölgelerdir. Bu bölgelerde yağış miktarı mevsimler arasında farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarla *Actinomycetes* çeşitliliğinin yağmurlu dönemlerde kurak dönemlere kıyasla daha çok olduğunu ortaya koymaktadır (Suksaard ve diğ., 2017). Bu durum yağışa bağlı olarak çözünmüş madde miktarının artışı kaynaklı olabilir. Çin’de bulunan mangrov ormanlarına ait toprak ve bitki örneklerinden çeşitli *Micromonospora* ve *Streptomyces* bakterileri (Hong ve diğ., 2009), Hindistan’da bulunan mangrov ormanlarına ait sediment örneklerinden ise *Pseudonocardia* cinsi (Mangamuri ve diğ., 2012), yine Hindistan’da bulunan farklı mangrov sedimentlerinden *Streptomyces* cinsi (Naikpatil ve Rathod, 2011) *Actinomycete*’ler izole edilmiştir.

Toprak ve su örneklerinde olduğu gibi diğer organizmalarla bağlantılı olarak da *Actinomycete*’lerin simbiyotik, endofitik ya da patojenik olarak yaşadığı bilinmektedir. *Actinomycete*’ler çok çeşitli bitkilerde endofitik olarak bulunmaktadır. Bitkilerin kök, gövde, yaprak, sürgün, rizosfer gibi farklı dokularında bu bakterilere rastlamak mümkündür. *Actinomycete*’ler endofitik olarak bulundukları bitkiler direkt ya da dolaylı yoldan etkileyebilmektedir. *Actinomycete*’ler bitkilerin büyümelerini destekleyici, bitkilerin hastalıklara direnç kazanmasını, çeşitli patojenlere karşı antibakteriyel madde üretimini destekleyici ya da biyokontrolü sağlayıcı özellikte olabilirler (Hasegawa ve diğ., 2006). *Aquilaria crassna* bitkisinin kök ve sürgünlerinden *Streptomyces*, *Nonomuraea*, *Actinomadura*, *Pseudonocardia* ve *Nocardia* cinsi (Nimnoi ve diğ., 2010), medikal öneme sahip çeşitli bitkilerin rizosferinde *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia* ve *Nonomurea* cinsi (Khamna ve diğ., 2009), çeşitli bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia* ve *Micromonospora* cinsi (Taechowisan ve diğ., 2003) farklı *Actinomycete*’ler tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar birçok farklı bitkide endofitik *Actinomycete* türlerinin bulunduğunu kanıtlamıştır.

Actinomycete bakterileri çeşitli omurgasız ya da omurgalı hayvanlarla mutualistik ya da simbiyotik ilişkilere de sahip olabilir. Böcek, balık ya da kuş gibi canlıların vücut yüzeyinde ya da yaşadıkları alanlarda *Actinomycete*’lere rastlanıldığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. *Apterostigma dentigerum* türü karıncanın kütikülünden *Pseudonocardia* (Oh ve diğ., 2009), soliter yaban arılarına ve kırlangıçlara ait çamurdan yapılmış yuvalardan alınan

örneklerden *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Thermoactinomyces* ve *Nocardia* cinsi (Kumar ve diğ., 2012), *Mugil cephalus* (kefal), *Chanos chanos* (süt balığı) ve *Etroplus suratensis* (yeşil çiklit) türü balıklara ait bağırsak içeriği, solungaç ve deri örneklerinden *Streptomyces* başta olmak üzere çeşitli *Actinomycete*'lerin izole edildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Sahu ve diğ., 2007). Hayvanlarla mutualistik ya da simbiyotik ilişki içerisinde olan *Actinomycete*'lerin sentezledikleri çeşitli metabolitlerle ev sahibi organizmaya direnç kazandırdığı da düşünülmektedir.

2.5. ACTINOMYCETE' LERDEN ELDE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLER

Sekonder metabolitler, mikroorganizmalar tarafından genellikle idiyofaz olarak adlandırılan ve mikroorganizmaların üremelerinin geç evrelerinde ortaya çıkan çeşitli kimyasal maddelerdir. Bu metabolitler mikroorganizmanın büyüme ve gelişmesinde gerekli değildir ancak canlıların yaşadıkları ortamda hayatta kalmalarına yardımcı olurlar (Ruiz ve diğ., 2010). Özellikle *Actinomycetes* gibi sekonder metabolit üretim seviyeleri yüksek olan bakteriler bu metabolitleri sayesinde çevrelerinde bulunan çeşitli stres faktörlerine karşı direnç sağlayabilirler. Bakteriler, yaşadıkları ortama kolaylıkla adapte olabildikleri için ortam şartları değiştiğinde ya da bulundukları ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet halinde olduklarında hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için de çeşitli biyoaktif bileşikler sentezlemektedirler (Zhang ve diğ., 2005).

Actinomycete'ler ürettikleri sekonder metabolitler ile günümüzde biyoteknolojik açıdan sıklıkla çalışılan bakterilerdendir. Ürettikleri çeşitli sekonder metabolitler antibakteriyel ve antifungal etki başta olmak üzere antiparazitik, antitümör, antihelmintik, antiviral ya da antikanser gibi çeşitli etkilere sahiptir (Solanki ve diğ., 2008). Bunların dışında bu bakterilerden elde edilen sekonder metabolitlerin B12 vitamini, bazı enzimler, immün düzenleyici etkiye sahip bazı bileşikler olarak veya herbisidal ve insektisidal ya da enzim inhibitörleri da etki gösterdiği bilinmektedir (ELnahas ve diğ., 2021).

2012 yılı verilerine göre mikroorganizmalardan izole edildiği bilenen 22500 bileşik bulunmaktadır. Bu bileşiklerin yaklaşık 14000 tanesi bakteriyel kaynaklardan elde edilirken 10100 bileşik *Actinomycete* bakterilerinden elde edilmiştir. *Actinomycete* bakterilerine ait bileşiklerin ise büyük çoğunluğu (7600) *Streptomyces* cinsinden elde edilmiştir (Kurtböke,

2012). Diğer biyoaktif bileşikler ise ender *Actinomycetes* türlerine aittir (Solecka ve diğ., 2012). Biyoaktif bileşiklerin büyük çoğunluğunun *Actinomycete*'lerden elde edilmesinin sebeplerinden bir tanesi *Actinomycete* bakterilerinin birçok bakteri grubuna kıyasla daha büyük bir genomu sahip olması olabilir. Özellikle *Streptomyces* bakterilerinin genomu bakteriyel ortalamaya göre çok daha büyüktür. En çok çalışılan tür olan *S. coelicolor*'un genomu, *E.coli* genomunun yaklaşık iki katı kadar baz çiftine sahiptir. Ayrıca *S. coelicolor* türünün sekonder metabolitlerin sentezlenmesinden sorumlu 20'den fazla gen kümesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Solecka ve diğ., 2012). Aradaki bu büyük farklılık *Actinomycete*'lerin sekonder metabolit üretiminin ana grubu olmasının temel sebebi olabilir.

2.5.1. ACTINOMYCETES' LERİN ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİK GÖSTEREN SEKONDER METABOLİTLERİ

Günümüzde ilaç olarak kullandığımız antibiyotiklerin büyük çoğunluğu *Actinomycete*'lerden elde edilmiştir ve birçok enfeksiyonun tedavisine kullanılmaktadırlar. Sahip olduğumuz antibakteriyel ajanların yaklaşık %75' i *Actinomycete*'lerden elde edilirken bu antibiyotikler Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ve funguslar üzerinde geniş bir spektruma sahiptir. *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Amiclatopsis*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, *Streptoalloteichus*, *Dactylosporangium*, *Frankia* ve *Streptosporangium* cinslerinde yer alan *Actinomycete*'ler β -laktamlar, aminoglikozitler, lipopeptitler, glikopeptitler, asamisinler, antrasiklinler, nükleositler, peptitler, polienler, polieterler, tetrasiklinler ve makrolidler gibi önemli antibiyotik gruplarının üretiminden sorumludurlar (Adegboye ve Babalola, 2013; Chaudhary ve diğ., 2013; Mast ve Stegmann, 2019).

Actinomycete bakterileri keşfedildikleri ilk günden beri antibiyotik çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Waksman ve arkadaşlarının 1943 yılında streptomisin antibiyotiğini *S. griseus* türünden izole etmesi ile antibiyotiğin altın çağı olarak adlandırılan dönem başlamıştır. Bazı araştırmacılar bu dönemi 1940-1960 yılları arasında sınırlarken bazı araştırmacılar bu dönemin 1986 yılına kadar sürdüğünü öne sürmüştür. Bu dönemin bu şekilde adlandırılmasının sebebi birçok yeni antibiyotiğin keşfinin yapılmasıdır. Günümüzde kullanılan antibiyotiklerin birçoğunun kaynağı *Actinomycete* bakterileridir. Tablo 2.3' te çeşitli antibiyotiklerin ilk elde edildikleri *Actinomycetes* türleri, antibiyotiğin etki mekanizması ve antibiyotiğin kimyasal sınıfı verilmiştir (Mahajan ve Balachandran, 2012).

Tablo 2.3: Antibiyotiklerin ilk elde edildikleri *Actinomycete* türleri, antibiyotiğin etki mekanizması ve antibiyotiğin kimyasal sınıfı

Antibiyotik	Elde Edilen Bakteri Türü	Elde Edildiği Yıl	Etki Mekanizması	Kimyasal Sınıfı
Streptomisin	<i>Streptomyces griseus</i>	1943	30S ribozomal alt birimine bağlanarak prokaryot protein sentezini inhibe eder.	Aminoglikozit
Klortetrasiklin	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	1945	Aminoasil-tRNA'nın 30S alt birimine bağlanmasını önleyerek protein sentezini inhibe eder	Tetrasiklin
Kloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	1949	50S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eder.	Asetamit
Neomisin	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949	30S veya 50S alt birimine bağlanarak protein sentezinin başlama ve uzamasını inhibe eder.	Aminoglikozit
Eritromisin	<i>Streptomyces erythreus</i>	1952	Transpeptidasyonda uzamayı inhibe eder.	Makrolit
Vankomisin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	1953	Hücre duvarı sentezini inhibe eder.	Glikopeptit
Kanamisin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957	Protein sentezini inhibe eder ve translasyon hatalarını artırır.	Aminoglikozit
Rifamisin	<i>Amycolatopsis mediterranea</i>	1957	RNA polimerazını inhibe eder.	Benzokinon
Gentamisin	<i>Micromonospora purpurea</i>	1963	50S ribozomal alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eder.	Aminoglikozit
Daptomisin	<i>Streptomyces roseosporus</i>	1980'lerin başı	Plazma membran fonksiyonunu bozar.	Lipopeptit

Bilinen antibiyotiklerin yanı sıra *Actinomycete*'lerden elde edilen birçok biyoaktif bileşiğin birden fazla bakteri ve hatta mantar türleri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Endofitik bir izolat olarak *Abrus pulchellus* bitkisinden izole edilen *Mikromonospora* GMKU326 maklamisin adlı bir poliketid içeren sekonder metaboliti ile *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve

Enterococcus faecalis bakterilerine antibakteriyel etki gösterirken, *Candida albicans*'a karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir (Igarashi ve diğ., 2011). Komposttan izole edilen bir *Actinomycete* olan *Actinomadura* TP-A0878 izolatına ait nomimisin olarak tanımlanan poliketidin *M. luteus*, *C. albicans* ve *Kluyveromyces fragilis* üzerine antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu yine yapılan çalışma ile tespit edilmiştir (Igarashi ve diğ., 2012).

Tangkuban Perahu (Endonezya) dağlarına ait toprak örneklerinden izole edilen *Streptomyces galbus* TP2 izolatının metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisiline duyarlı *S. aureus*, metisiline dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus*, vankomisine dirençli *Enterococcus*, *E.coli* ve *Microforum gypseum* mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel ve antifungal özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Andayani ve diğ., 2015). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada Atacama Çölü topraklarından izole edilen *Streptomyces* sp. C34 izolatına ait chaxamisin A-D'nin ise *S. aureus* ve *E. coli* üzerine (Rateb ve diğ., 2011) antibakteriyel etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Toprak örneklerinden izole edilen *Microbacterium mangrovi* MUSC 115^T, *Sinomonas humi* MUSC 117^T ve *Monashia flava* MUSC 78^T izolatlarının MRSA, *P. aeruginosa*, *Salmonella* Typhi, *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu tespit edilirken bu bakterilerin 2,4-di-tert-bütil fenol ve pirazinler gibi bileşikler ürettiği belirlenmiştir. Bu bileşikler başlıca antibakteriyel, antiviral, antienflamatuar, antioksidan, antikanser, antimikrobiyal aktivitelerden sorumlu bileşikler olarak adlandırılmaktadır (Azman ve diğ., 2017).

Halofilik *S. chungwhensis* izolatının ürettiği Xiamisin D ve Xiamisin E bileşiklerinin domuz epidemik diyare virüsüne (Kim ve diğ., 2016), denizel *Nocardia alba* izolatının ürettiği (Z)-1-((1-hidroksipenta-2,4-dien-1-il)oksi)antrasen-9,10-dion bileşiği Newcastle hastalığı virüsü ve bulaşıcı Bursal hastalığı virüsüne (Janardhan ve diğ., 2018) karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca fil dışısından izole edilen *Streptomyces* sp. SMU03 izolatının ise H1N1 (influenza A alt tipi) ve H3N2 (influenza B) (Li ve diğ., 2020) virüslerine karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal özellik gösteren *Actinomycete* 'lerin örneklerini daha da arttırmak mümkündür. Diğer bölümlerde bahsettiğimiz gibi *Actinomycete* 'ler bulundukları ortamın fiziksel, kimyasal ve biyolojik unsurlarına bağlı olarak farklı biyoaktif bileşikler üretme

potansiyeline sahiptirler. *Actinomycete*'ler antibakteriyel ve antifungal gibi farklı antimikrobiyal özellikte çok çeşitli bileşiklerin sentezinden sorumlu oldukları için henüz keşfedilmemiş antimikrobiyal madde üretim potansiyelleri hala devam etmektedir (Genilloud, 2017).

2.5.2. *ACTINOMYCETE*'LERİN BİYOAKTİF ÖZELLİK GÖSTEREN DİĞER SEKONDER METABOLİTLERİ

Günümüzde *Actinomycete*'ler sahip oldukları sekonder metabolitler sayesinde ilaç üretiminde ve geliştirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra bu sekonder metabolitler antikanser, antidiyabetik, antioksidan gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip özellikte olabilmektedir (Chaudhary ve diğ., 2013). Bunlara ek olarak *Actinomycete*'lerin herbisidal ya da insektisidal özelliklerinin yanı sıra bitki büyüme destekleyicisi özellikte oldukları da bilinmektedir (Lee ve diğ., 2003; Kekuda ve diğ., 2010; Shutsrirung ve diğ., 2013). Ayrıca yine bu bakterilerin ürettikleri enzimler de biyoteknolojik öneme sahiptir (Segaran ve diğ., 2017).

Yapılan farklı çalışmalar farklı izolasyon kaynaklarına sahip *Actinomycete*'lerin antikanser özellikte metabolitlere sahip olabildiğini ortaya koymuştur. Actinomisin D, *Actinomycete*'lerden izole edilen ve kanser tedavisinde kullanılan en eski metabolitlerden bir tanesidir (Demain ve Sanchez, 2009). Aktinomisin D'nin dışında *Actinomycete*'lerden antikanser özellikte birçok metabolit elde edilmiştir. Toprak izolatu olan *Streptomyces* MUM256 izolatının sahip olduğu fenolik, pirolpirazin, β -karbolin ve dikarboksilik asit ester bileşikleri sayesinde insan kolon kanseri hücre hatlarına karşı antikanser etkinlik göstermiştir (Tan ve diğ., 2015). Endofitik bir *Actinomycete* olan *S. laceyi* MS53 ise insan meme kanseri hücre hattına karşı sahip olduğu 6-alkilsalisilik asit ile sitotoksik etki gösterirken (Kim ve diğ., 2006) başka bir endofitik *S. aureofaciens* CMUAc130 ise içerdiği arilkumarinler ile antikanser etkinlik göstermiştir (Taechowisan ve diğ., 2007). Ek olarak antikanser aktiviteye sahip olan bazı *Actinomycete*'ler ve etken maddeleri Tablo 2.4' te verilmiştir.

Tablo 2.4: Antikanser aktivite gösteren bazı *Actinomycete*'ler ve etken maddeleri

Bakteri	Etken Madde	Aktivitesi	Referans
<i>Mikromonospora</i> GMKU326	Maklamsin	İnsan rahim ağzı kanseri hücreleri ve insan meme kanseri hücre hattı	Igarashi ve diğ., 2011
<i>M. mangrovi</i> MUSC 115 ^T <i>S. humi</i> MUSC 117 ^T <i>M. flava</i> MUSC 78 ^T	2,4-di-tert-bütil fenol Pirazin	İnsan kolon kanser hattı ve insan servikal karsinom hücre hattı	Azman ve diğ., 2017
<i>Streptomyces</i> <i>coeruleorubidus</i> GRG4	Bis (2-etilheksil) ftalat	Akciğer kanser hücre hattı	Rajivgandhi ve diğ., 2018
<i>Actinomadura</i> TP-A0878	Nomimisin	İnsan rahim ağzı kanseri hücreleri ve insan meme kanseri hücre hattı	Igarashi ve diğ., 2012

Actinomycete'lere ait biyoaktif bileşiklerin antikanser aktivitelerinin yanı sıra diğer önemli aktivitelerinden bir tanesi de antioksidan aktiviteleridir. Endofitik izolatlar olan *S. globosus* ve *Arthrobacter* sp. (Akshatha ve diğ., 2016), toprak izolatları olan *Streptomyces* sp. No. 1 ve No. 2 (Kekuda ve diğ., 2010), yine toprak izolatları olan *S. griseorubiginosus* D5 (Diraviyam ve diğ., 2011) ve *S. rochei* (Naine ve diğ., 2012) gibi farklı *Actinomycete*'lerle yapılan çalışmalarda bu izolatlara ait sekonder metabolitlerin iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sekonder metabolitlerin sahip olduğu bir başka önemli özellik ise antidiyabetik etki gösterebilmeleridir. *S. longisporoflavus* ve *Streptomyces* sp. (Akshatha ve diğ., 2014), *Streptomyces* sp. BWA65 (Pujiyanto ve diğ., 2012), *Streptomyces* sp., *Actinocorallia* sp., *Actinomadura* sp. ve *Nocardia* sp. (Peng ve diğ., 2015) gibi endofitik izolatlarında antidiyabetik açıdan kullanılma potansiyeline sahip bileşikler ürettikleri tespit edilmiştir.

Actinomycete'lere ait sekonder metabolitler doğal herbisitler ya da insektisitler olarak tarımda kullanılma potansiyeline de sahiptir. Toprak izolatı *Streptomyces* sp. KN-0647 ürettiği kinomisin A bileşiği sayesinde *Spodoptera exigua*, *Plutella xylostella*, *Aphis glycines*, *Culex pipiens* ve *Heliothis armigera* gibi böceklere karşı (Liu ve diğ., 2008) etki gösterirken başka bir toprak izolatı olan *Streptomyces* No 2, *Aedes aegypti* türü sineğe karşı antiinsektisidal etki

göstermiştir (Kekuda ve diğ., 2010). Yapılan bir çalışmada *Streptomyces* sp. 8E-12 izolatı *Digitaria sanguinalis* ve *Echinochloa crusgalli*'ye (Lee ve diğ., 2003) karşı herbisidal etki gösterirken başka bir çalışmada izolasyonu yapılan endofitik *Streptomyces*'in de *Echinochloa crusgalli*'ye karşı herbisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Dhanasekaran ve diğ., 2010). *Actinomycete*'lere ait sekonder metabolitler tarım alanında herbisit ya da insektisit etkilerinin dışında bitki büyüme destekleyicisi özellikleri ile de önemlidir. *Cucumis sativus*'tan izole edilen endofitik *Actinoplanes campanulatus*, *Micromonospora chalybeata* ve *Streptomyces spiralis* (El-Tarabily ve diğ., 2009), yine endofitik izolatlar olan *Nocardiopsis* sp., *Nocardia* sp. ve *Streptomyces* sp. (Shutsrirung ve diğ., 2013), toprak izolatları olan *S. nobilis* WA-3, *S. kunmingensis* WC-3 ve *S. enissocaesilis* TA-3 (Anwar ve diğ., 2016) gibi çeşitli izolatların IAA, IPYA ya da GA3 gibi bitki büyümesini destekleyici hormonlar ürettiği ve bu sayede çeşitli bitkilerin büyümesi üzerine etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Deterjan, tekstil, gıda ya da kağıt gibi çeşitli endüstrilerde enzimler büyük önem taşımaktadır. Özellikle farklı ortam şartlarında da aktif olarak çalışabilen enzimlere endüstriyel amaçlarla ihtiyaç duyulmaktadır. Alkalifilik *Nocardiopsis alba* OK-5 izolatının alkalın amilaz enzimi üreticisi (Gohel ve Singh, 2012), tuğla üretim tesisi toprağından izole edilen *S. erumpens* MTCC 7317 izolatının α -amilaz enzimi üreticisi (Kar ve Ray, 2008), komposttan izole edilen *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 izolatının termostabil keratinaz enzimi üreticisi (Habbeche ve diğ., 2014) ve alkalifilik *Nocardiopsis prasina* OPC-131 izolatının kitinaz enzimi üreticisi (Tsujiho ve diğ., 2003) olduğu belirlenirken çeşitli toprak *Actinomycete*'lerinin pH 4 ila 9 arasında değişen aralıklarda aktivite gösteren proteaz enzimi üreticisi (Balachandran ve diğ., 2012) olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu enzimler, sergiledikleri farklı aktivitelerle çeşitli endüstrilerde kullanılma potansiyeline sahiptir (Mukhtar ve diğ., 2017).

Enflamasyon, vücutta çeşitli dokuların patojenlerle karşılaşması ya da çeşitli nedenlerden dolayı hasar alması sonucunda savunma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır. Tedavi edilmeyen enflamasyon daha sonra çeşitli hastalıklara da sebep olabilirken, günümüzde kullanılan antienflamatuar ilaçlar ise sahip oldukları yan etkileri ya da etki düzeyleri nedeniyle tam olarak tüm hastalıklarda etki gösterememektir. (Jayaprakashvel, 2012). *Leptogium trichophorum*'dan izole edilen *S. gramineus*'un ürettiği aktinofuranonlar D-I bileşiklerinin dışında (Ma ve diğ., 2018) denizel bir izolat olan *Streptomyces* sp. CNB-

382'nin ürettiği siklomarın A'nın da (Renner ve diğ., 1999) antienflamatuar etkide olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

2.6. DENİZEL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN *ACTINOMYCETE*'LERİN BİYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ

Denizel ekosistemler karasal ekosistemlere kıyasla daha yüksek mikrobiyal çeşitliliğe sahiptirler. Mikrobiyal çeşitliliğin yanı sıra bu ortamlarda bulunan ekolojik stresin fazla olması denizel ortamlardan elde edilen mikroorganizmaların sahip oldukları sekonder metabolitlerin çeşitliliğini de arttırmaktadır (Donia ve Hamann, 2003). Bu çeşitliliğin fazla olmasının temel sebebi Dünya yüzeyinin 3.6×10^8 km²'sinin sularla kaplı olması olabilir. Bu miktar dünya yüzeyinin %70' inden fazlası anlamına gelmektedir (Munn, 2011). 1998 yılında Whitman ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada dünya yüzeyindeki sucul ortamlarda bulunan prokaryotik hücre miktarının 10^{28} 'den fazla olduğunu belirtmişlerdir (Whitman ve diğ., 1998). Bu seviyede yüksek prokaryotik çeşitlilik bu ortamlarda bulunan biyoaktif bileşiklerin çeşitliliğini de arttırmaktadır.

Denizel ortamlarda ilk *Actinomycetes* araştırmaları yapıldığı sırada sadece kıyı bölgelerden izolasyon yapılabiliştir. Bu durum *Actinomycete* bakterilerinin sadece karasal ortamlarda bulunduğu ve su ortamında bir kontaminant olacağı şeklinde yorumlanmıştır (Weyland, 1969). Sucul bir ortamdan *Actinomycetes* varlığına dair ilk çalışma 1984 yılında yapılmıştır. Helmke ve Weyland (1984) Atlantik Okyanusu' na ait sediment örnekleri üzerine yaptıkları çalışmada denizel ortamdan izole edilen ve *Rhodococcus marinonascens* olarak adlandırdıkları ilk *Actinomycete*' yi bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar hemen hemen tüm sucul ortamlardan *Actinomycetes* izole edilebileceğini ortaya koymuştur. Deniz suyu ve sediment örnekleri (Ghanem ve diğ., 2000), süngerler (Hameş-Kocabaş ve Uzel, 2012), mercan resifleri, deniz omurgasızları ve bitkilerinde (Lam, 2006) dahi *Actinomycete*'lere rastlamak mümkündür.

Sucul ortamlarda yaşayan *Actinomycete*'ler karasal *Actinomycete*'lere kıyasla daha fazla çevresel değişkenle mücadele etmektedir; bu yüzden yaşadıkları ortama adaptasyonları sekonder metabolit üretimlerini de etkilemektedir (Jensen ve diğ., 2005). Sucul ortamlarda yaşayan *Actinomycete*'ler yüksek basınç, yüksek asidite, O₂ eksikliği, düşük sıcaklıklar gibi

zorlu çevresel koşullara maruz kalmaktadırlar. Ayrıca hidrotermal bacalara yakın bölgelerde yaşayan *Actinomyces*'ler neredeyse 100°C'ye yaklaşan sıcaklıklara da maruz kalabilirler. Bu durum hem genetik hem de metabolik olarak farklılıklara yol açmaktadır. Bu yüzden bu organizmaların genomlarında biyoteknolojik öneme sahip birçok sekonder metabolit üretme potansiyeli bulunmaktadır (Lam, 2006). Bahsedilen değişkenlerin yanı sıra deniz ortamlarında besin miktarı karaya göre daha kısıtlıdır. Bu *Actinomyces*'lerin düşük miktarda besin içeren ortamlarda yaşamaya adapte olmaları da onların farklı biyoaktif bileşikler sentezleme potansiyellerini arttırmaktadır (Yaradoddi ve diğ., 2021).

Denizel kaynaklı *Streptomyces* cinsine ait yaklaşık 289 sekonder metabolitin varlığı bildirilmiştir. Bu sekonder metabolitlerin peptitler, makrolidler, laktonlar, indoller, terpenler ve kinonlar gibi kimyasal yapılardan oluşan ve sitotoksik, antibakteriyel, antifungal, antikanser, immünosupresan, antienflamatuar, antihelmintik, herbisit, enzim gibi çeşitli biyoaktif özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Han ve diğ., 2012; Abd-Elnaby ve diğ., 2016).

Denizel ortamdan izole edilen *S. parvus*'un sekonder metabolitinin *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Aeromonas hydrophila* gibi Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı antibakteriyel, insan karaciğer kanseri hücre hattı, fare lenfoma hücre hattı, meme kanseri hücre hattı ve insan kolon kanseri hücre hattı gibi kanser hatlarına karşı antikanser etkinliği tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda sekonder metabolitin etan, 1,1-dietoksi ana bileşenlerinin yanı sıra di-n-oktil ftalat; etanol, 2,2-dietoksi; 9,12-oktadekadienoik asit; metil ester (E,E) ve benzoik asit gibi bileşenlere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bileşenlerden etan ve 1,1-dietoksi antienflamatuar, antipiretik, antitrombotik ve analjezik etkilere sahip bir terapötik ajandır. Metil ester ve 9,12-oktadekadienoik asit (Z,Z)-metil ester gibi bileşiklerin ise antikanser özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca 9,12-oktadekadienoik asit antikanserojenik, antiaterojenik, antioksidan ve antienflamatuar etkilere sahip olan bir bileşiktir (Abd-Elnaby ve diğ., 2016). Bir sediment izolatu olan *S. bingchenggensis* ULS14 izolatının ise staurosporin ve kigamisin bileşiklerine benzerlik gösteren sekonder metabolitin çeşitli insan kanser hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Davies-Bolorunduro ve diğ., 2019).

Dammam kıyı sedimentlerinden elde edilen bir başka *Streptomyces* sp. izolatu olan Al-Dhabi-97 ise, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *S. epidermidis*

ve *Salmonella paratyphi* gibi çeşitli bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterirken ürettiği sekonder metabolitin ana bileşeninin 1-fenantrenmetanol olduğu tespit edilmiştir. Bu fenantren bileşik antibakteriyel, antikanser, antienflamatuar ve antialerjik etkileri ile bilinmektedir. Ayrıca izolatın antikanser özelliği olduğu da tespit edilmiştir (Al- Dhabbi ve diğ., 2020). *Streptomyces* sp. SCSIO 01127 izolatına ait loboforin F bileşiğinin *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterileri üzerine etki gösterdiği tespit edilirken (Niu ve diğ., 2011), başka bir *Streptomyces* türü olan *S. zhaozhouensis* CA-185989 izolatının izoikarugamisin ve 28-N-metilkarugamisin bileşikleri sayesinde *S. aureus*, *C. albicans* ve *Aspergillus fumigatus* patojenlerine (Lacret ve diğ., 2014) karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Turbinaria ornate makroalginden izole edilen endofitik *S. coeruleorubidus* GRG4 *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia* bakterilerine karşı antibakteriyel bir etki göstermesinin yanı sıra insan akciğer kanseri hücre hatlarına karşı da antikanser özellik göstermiştir. İzolattan elde edilen sekonder metabolitin içeriğinde bulunan bis (2-etilheksil) ftalatın antibakteriyel ve antikanser aktiviteye sahip bir ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğu tespit edilmiştir (Rajivgandhi ve diğ., 2018). Yine endofitik bir *Actinomycete* olan ve kahverengi alglerden izole edilen *S. sundarbansensis* WR1L1S8 *E. coli*, *S. aureus*, MRSA, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* gibi patojenlere karşı antibakteriyel etkinlik gösterirken etkinlik gösteren ana bileşen 2-hidroksi-5-((6-hidroksi-4-okso-4Hpiran-2-il)metil)-2-propilkroman-4-one olarak tespit edilmiştir (Djinni ve diğ., 2014).

Çeşitli denizel *Actinomycete*'lerin endüstriyel olarak önemli enzimler sentezledikleri de yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. *Actinopolyspora* VITSDK2 izolatının proteaz enzimi (Suthindhiran ve diğ., 2014), *S. rochei* BTSS 1001 izolatının alkalın amilaz enzimi (Acharyabhatta ve diğ., 2013), *S. hygroscopicus* ve *S. albus* izolatlarının lipaz ve ksilanaz (Priya ve diğ., 2012) enzimi ürettiği belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarla *Streptomyces* sp. VITSTK7 (Thenmozhi ve Kannabiran, 2012), *Nocardiosis alba* GN2 (Janardhan ve diğ., 2014), *Streptomyces* sp. izolat 2 (Rajan ve diğ., 2012) gibi birbirinden farklı denizel *Actinomycetes* izolatlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ravi ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada *S. paradoxus* izolatına ait gancidin W bileşiğinin antioksidan ve antidiyabetik etkinliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yine antioksidan aktivitesi tespit edilen *Micromonospora chalceastrain* HV11.P3 ve *Micromonospora tulbaghiaie* SCA54.P2 izolatlarına ait pigmentlerin 1H-Pürin-

2,6-dion,3,7-dihidro-1,3,7-trimetil ve 5-Metoksipiroolidin-2-on gibi bileşikler içerdiği tespit edilmiştir. Bu bileşikler antioksidan ve antienflamatuar etkinlikleri olduğu bilinen bileşiklerdir (Mesrian ve diğ., 2021).

Bahsedilen tüm özelliklerine ek olarak *Actinomycete*'ler çevre sorunları ile ilgili çalışmalarda da kullanılma potansiyeline sahiptir. *Actinomycete*'lerin sahip oldukları ve çeşitli organik maddeleri parçalayabilecek hücre dışı enzimleri üretmeleri biyoremediasyon ajanı olarak çevre kirliliğinin azaltılmasına yardımcı olabilir. Örneğin yapılan bir çalışmada deniz sedimentlerinden izole edilen *Streptomyces coelicoflavus* (A6), *S. diastaticus* (A44), *Nocardiosis alba* (A55), *S. parvus* (A56) ve *S. champavatii* (R32) izolatlarının biyoremediasyon ajanı olarak kullanılabilecek biyoremediyatör izolatlar oldukları belirlenmiştir (Babu ve diğ., 2018). Çevresel sorunlardan bir tanesi de fosil yakıt kullanılmasıdır. Fosil yakıt kullanımının azaltılması için yenilenebilir biyoenerji ile ilgili çalışmalar artmaktadır. Bu sorunun önüne geçmek için araştırılan alanlardan bir tanesi mikrobiyal yakıt hücreleri kullanımıdır. Yapılan bir çalışmada denizel bir izolat olan *Actinoalloteichus cyanogriseus* MHA15'in mikrobiyal yakıt hücresi voltajını arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum *Actinomycete*'nin elektrik üretiminde kullanım potansiyelini de ortaya çıkarmaktadır (Gobalakrishnan ve Bhuvaneswari, 2019).

Günümüzde birçok hastalığın tedavisi için çeşitli ilaçlara ya da terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır ancak yeni ilaç gelişimine en çok ihtiyaç duyulan alanlardan bir tanesi antibiyotik üretimidir. Çünkü var olan antibiyotik dirençliliği son yıllarda halk sağlığı için büyük tehlike saçıyan küresel bir sorun olmuştur. Bakterilerin zamanla kazandıkları antibiyotik dirençliliği mortalite ve morbiditeye yol açmaktadır ve bu sorun ilerledikçe bu durum daha da artmaktadır. Birçok patojenik bakteri türünün (*M. tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*) çeşitli klinik izolatlarının antibiyotik direncine sahip olduğu bilinmektedir. Bu durum ileriki zaman dilimlerinde basit yaralanma gibi durumlarda bile ölümle sonuçlanma ihtimali olan çok ciddi enfeksiyon problemlerine neden olacaktır. Bu durum Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından küresel halk sağlığı endişesi olarak tanımlanmaktadır. Bakterilerin kazandıkları direcin artması günümüzde kullanılan antibiyotiklerin zamanla daha da etkisini yitirmesine neden olmaktadır. Bu yüzden yeni ve etkili antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Nathan ve Cars, 2014; Aslam ve diğ., 2018). *Actinomycete*'ler başta *Streptomyces* cinsi olmak üzere çeşitli

bireyleri ile antibakteriyel madde üretme potansiyelleri ile bilindikleri için yeni antibiyotiklerin keşfi için umut vaat edici potansiyellere sahiptir. Özellikle yüksek biyoaktif madde üretme potansiyelleri barındıran ve daha az çalışılmış denizel ortamlardan elde edilebilecek doğal ve yeni antibiyotikler hastalıkların tedavisinde kullanılmak için umut verici olabilir. Bugüne kadar denizel ortamlardan keşfedilmiş biyoaktif madde miktarı toplam biyomas içerisinde küçük bir grubu temsil etmektedir. Bu sebeple denizel ortamlardaki *Actinomycete*'lerle ilgili çalışmaların sürdürülmesi oldukça önemlidir. Biz de çalışmamız kapsamında Marmara Denizi'nden izole edilen *Actinomycete* türlerinin antibiyotik olarak kullanılmak üzere sentezlediği çeşitli metabolitlerin tespiti amacıyla antibakteriyel karakterizasyonunu ortaya koymaya çalıştık. |



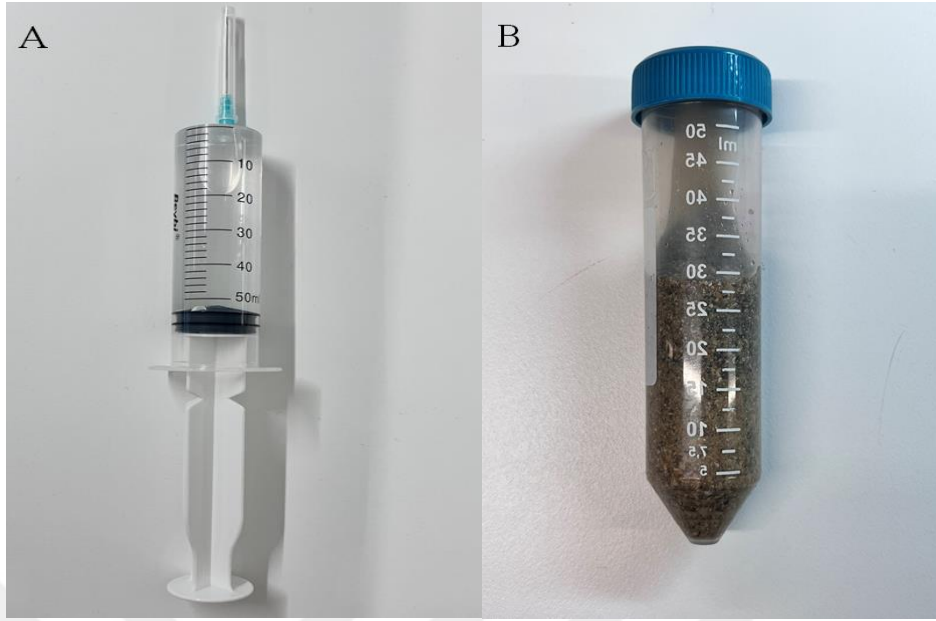
3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Denizel *Actinomyces*'lerin izolasyonunun hedeflendiği çalışmamız kapsamında Marmara Denizi'nin farklı lokasyon ve derinliklerinden sediment ve su örnekleri, tüplü dalış yapılarak toplanmıştır. Su örnekleri steril enjektörlerle, sediment örnekleri ise steril plastik falcon tüpleri (50 ml hacimli) ile toplanarak soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.1). Örneklerin toplandığı bölgelerin derinliklerine ve konumlarına ait bilgiler Tablo 3.1' de verilmiştir.

Tablo 3.1: Toplanan örneklere ait bilgiler

Örnek No	Örnek Tipi	Lokasyon	Derinlik (metre)	Konum
1	Su	Orhangazi Parkı/ Maltepe	4	40°56'28"K- 29°06'25"D
1	Sediment	Orhangazi Parkı/ Maltepe	4	40°56'28"K- 29°06'25"D
2	Su	Orhangazi Parkı/ Maltepe	3.5	40°56'28"K- 29°06'25"D
2	Sediment	Orhangazi Parkı/ Maltepe	3.5	40°56'28"K- 29°06'25"D
3	Su	Heybeliada	4	40°52'40"K- 29°04'59"D
3	Sediment	Heybeliada	4	40°52'40"K- 29°04'59"D
4	Su	Kaşık Adası	4	40°53'07"K- 29°04'47"D
4	Sediment	Kaşık Adası	4	40°53'07"K- 29°04'47"D

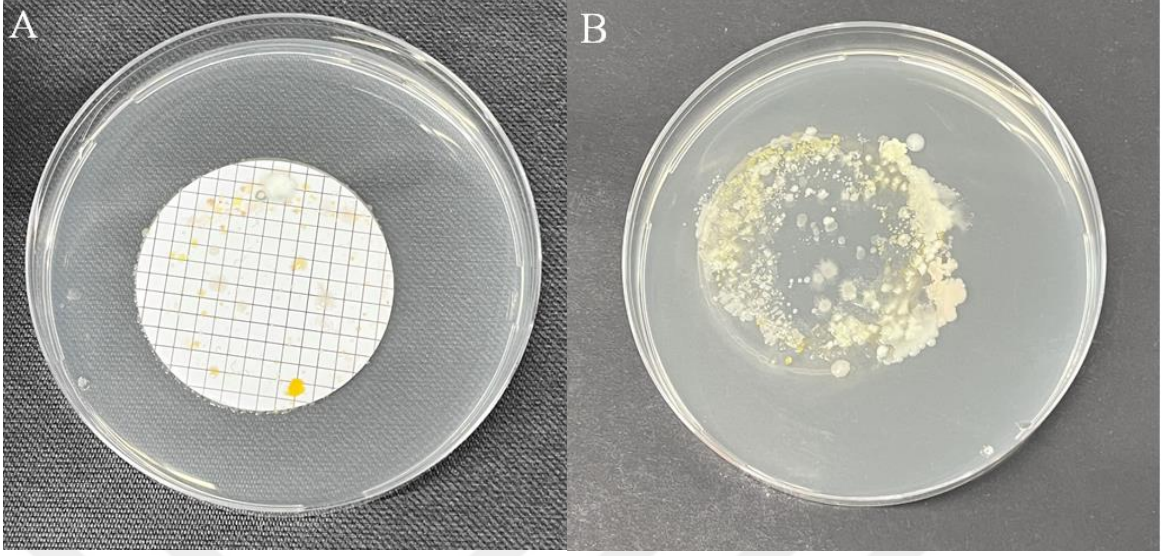


Şekil 3.1: Toplanan su ve sediment örneği A: Steril şırınga ile toplanan su örneği, B: Steril falcon ile toplanan sediment örneği

3.2. ÖRNEKLERDEN BAKTERİ İZOLASYONU

3.2.1. Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

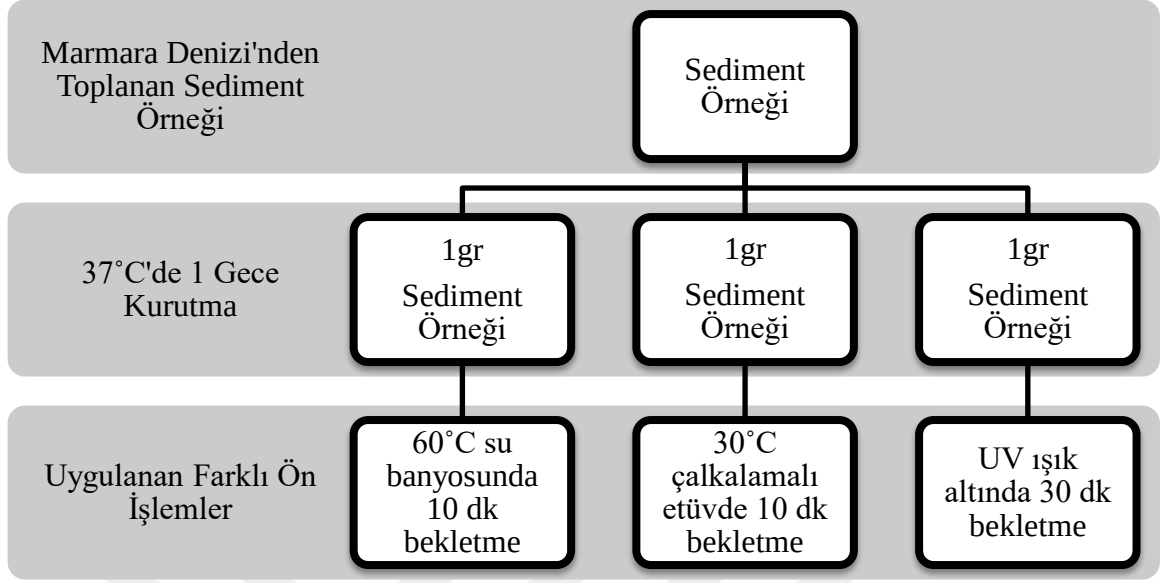
Marmara Denizi'nin farklı bölgelerinden toplanan deniz suyu örnekleri iki farklı yöntemle çalışılmıştır. İlk izolasyon yönteminde yayma ekim metodu kullanılarak su örneği direkt olarak besiyerine ekilmiştir. Diğer izolasyon yönteminde ise vakum manifold filtrasyon sistemi kullanılarak 50'şer ml su örnekleri süzölmüştür. Süzme işlemi için 0.45 µm por çaplı steril selüloz nitrat membran filtreler kullanılmıştır. Süzme işleminin ardından filtreler aseptik şartlar altında steril pens yardımıyla bakteriyel ve fungal üremeyi baskılamak için 75 µg/ml nalidiksik asit ve 100 µg/ml sikloheksimit ile desteklenen International Streptomyces Project-2 Agar (ISP2), Gauze Medium 2 Agar (GM2) ve M6 besiyerlerini içeren petri kutularının üzerine yavaşça bırakılmıştır. Petri kutuları 28°C' de 4 gün inkübe edilmiştir (Şekil 3.2). İnkübasyon süresinin ardından membran filtreler besiyerinin üzerinden steril pens yardımıyla kaldırılarak *Actinomycete*'lerin üremesi için 28 gün inkübasyona devam edilmiştir. *Actinomycete*'ler filamentli yapıda oldukları için filtre üzerinde bulunan *Actinomycete* bakterilerinin filtreden geçerek besiyerine indiği ve burada üremeye devam ettiği bilinmektedir. Su örnekleri her iki yöntemde de üç tekrar olacak şekilde çalışılmıştır (Hirsch ve Christensen, 1983; Kumar ve Jadeja, 2016; Njenga ve diğ., 2017).



Şekil 3.2: Membran filtrasyon sistemi kullanılarak *Actinomyces* izolasyonu (A: Membran filtre ile 4 günlük inkübasyon süreci, B: Membran filtre aseptik şartlar altında alındıktan sonra inkübasyon süreci)

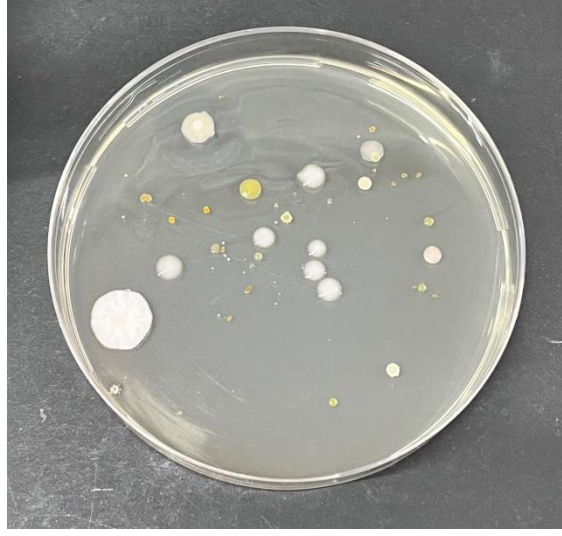
3.2.2. Sediment Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

Toplanan sediment örnekleri seri sulandırma yöntemi uygulanarak çalışılmıştır. *Actinomyces* bakterileri sporlu yapıda olduğu için sediment örneğinde bulunan diğer mikroorganizma gruplarının azaltılması amacıyla seri sulandırma işleminden önce sediment örnekleri çeşitli ön işlemlerden geçirilmiştir. Uygulanan ön işlemler araştırmalarda uygulanan metotların modifiye edilmiş halidir. Her bir sediment örneği ilk olarak 1'er gram olacak şekilde hassas terazide aseptik koşullar altında tartılarak 37°C' lik etüvde 24 saat kurutulmuştur. Ardından sediment örneklerine 60°C' lik su banyosunda 10 dakika, 30°C' lik çalkalamalı etüvde 10 dakika ve UV ışığı altında 30 dakika bekletme gibi 3 farklı ön işlem uygulanmıştır (Şekil 3.3) (Baskaran ve diğ., 2011; Hameş-Kocabaş ve Ataç, 2012; Kumar ve Jadeja, 2016).



Şekil 3.3: Marmara Denizi'nden toplanan sediment örneklerine uygulanan çeşitli ön işlemler

Uygulanan ön işlemlerin ardından daha önce 1'er gram halinde tartılan sediment örnekleri 9 ml steril salin su kullanılarak 10^{-5} değerine kadar seri sulandırılmıştır. Seri sulandırma tüplerinden 100' er µl alınarak antibiyotik ve antifungal ile desteklenen ISP2, M6 ve GM2 besiyerlerini içeren petri kutularına üç tekrarlı olacak şekilde yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Ekimi yapılan petriler 28°C' de 28 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Mohseni ve diğ., 2013). Şekil 3.4' te sediment örneklerinden izolasyonu yapılan *Actinomyces* kolonilerine ait görüntü verilmiştir.

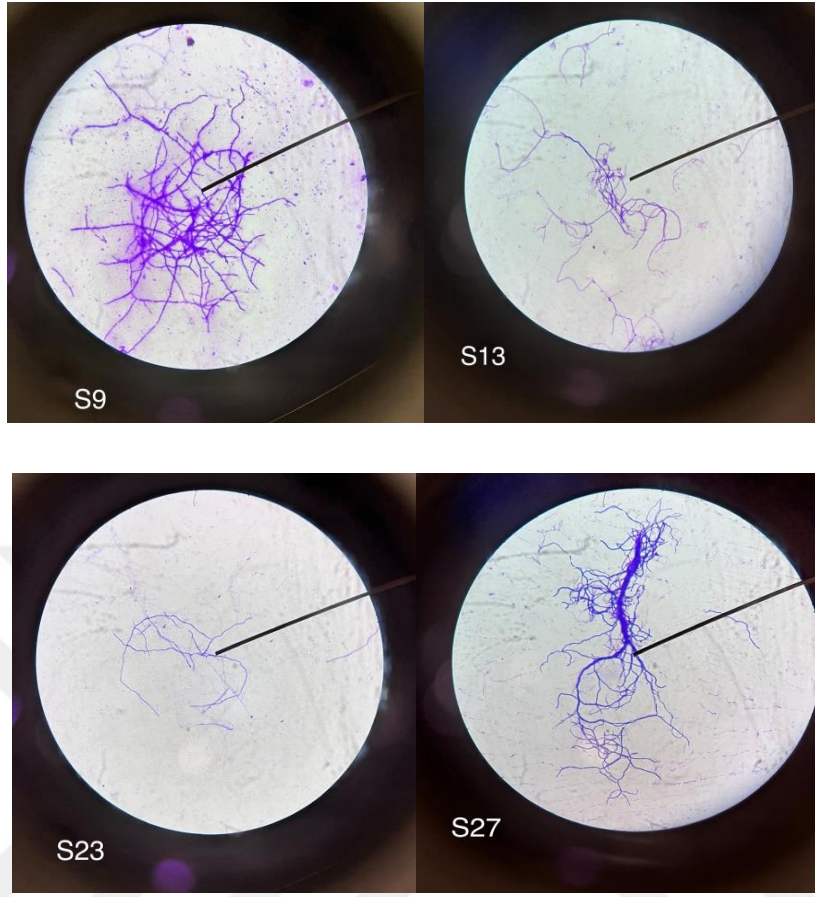


Şekil 3.4: Sediment örneklerinden izolasyonu yapılan *Actinomyces* kolonileri

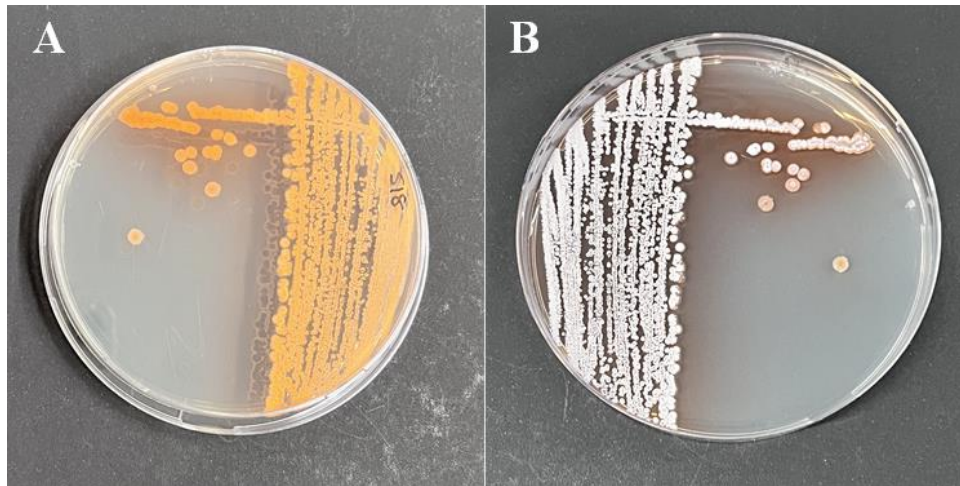
3.2.3. İzolatların Seçimi, Saflaştırılması ve Saklanması

Su ve sediment örnekler kısım 3.2.1 ve 3.2.2’de anlatıldığı gibi ekildikten sonra 28 günlük inkübasyon süresi boyunca petriler her gün kontrol edilmiştir. Koloni morfolojilerine bakılarak *Actinomyces* olarak şüphelenilen kolonilerden Gram boyama preparatları hazırlanmıştır.

Gram boyama preparatları hazırlanırken steril bir lamin üzerine bir öze dolusu fizyolojik tuzlu su (FTS) konulmuş ve *Actinomyces* şüpheli koloniden steril öze yardımıyla alınan bakteriler FTS içerisinde süspanse edilmiştir. Havada kuruması beklenen örnek daha sonra alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Gram boyama işlemi için preparatlar sırasıyla kristal viyole boyası (60 sn), Gram’ın iyot çözeltisi (60 sn), %96’ lık etil alkol (20 sn) ve sulu fuksin boyası (30 sn) ile muamele edilmiştir. Her bir kimyasal maddenin arasında lamlar çeşme suyu ile iyice durulanmıştır. Kurumaya bırakılan lamlar daha sonra ışık mikroskopunda 100x objektifi ile immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Gram boyama preparatlarında Gram pozitif ve filamentli yapıda gözlemlenen (Şekil 3.5) bakteriler saflaştırılmak amacıyla Nutrient Agar (NA) besiyerine azaltma yöntemi ile ekilmiş ve 28°C’ de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 3.6).

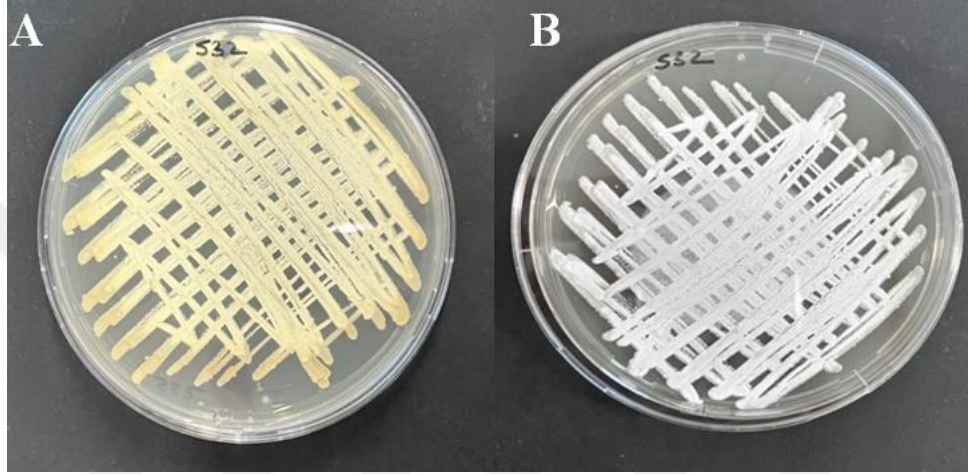


Şekil 3.5: *Actinomycetes* şüphesi gözlemlenen çeşitli izolatlara ait Gram pozitif filamentli yapıdaki mikroskop görüntüsü (100x büyütme)



Şekil 3.6: Azaltma ekim yöntemi ile besiyerine ekilmiş bir *Actinomycete* şüpheli izolatın substrat (A) ve hava (B) hifleri görüntüsü

İnkübasyon süresi sonunda kültürler koloni morfolojileri açısından incelenmiş ve makroskopik olarak saflıklarından emin olunanlardan yeniden Gram boyama yapılmıştır. Mikroskopik açıdan da saf olduğu tespit edilen bakteri kolonileri sık ekim yöntemi ile NA besiyerine ekilerek 28°C’de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda elde edilen taze bakteri kültürlerinden %20’ lik gliserin çözeltisi içerisinde süspansiyonlar hazırlanmış ve sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 ve -86°C’de saklanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Sık ekim yöntemi ile besiyerine ekilmiş bir *Actinomyces* şüpheli izolatın substrat (A) ve hava (B) hüfleri görüntüsü

3.3. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTENİN TESPİTİ

3.3.1. Birincil Tarama

Actinomyces şüpheli suşlara ait antibakteriyel özelliklerinin karakterizasyonu için uygulanan birincil tarama yöntemlerinde çizgi ekim ve agar kaplama yöntemleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerde bakteri/bakteri etkileşimi olarak tanımlayabileceğimiz, *Actinomyces* izolatının patojen bakteriler üzerine inhibisyon etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Tez çalışmamız kapsamında *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 patojenleri kullanılmıştır.

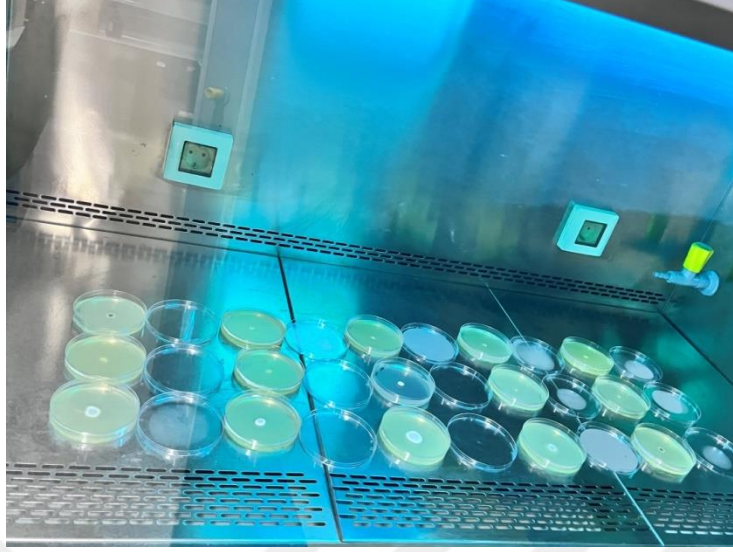
3.3.1.1. Çizgi Ekim Yöntemi

Actinomyces bakterileri NA besiyeri içeren Petri kutularının tam ortasına düz bir çizgi şeklinde ekilmiştir. Ekimi yapılan besiyerleri 28°C’ de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon

süresinin sonunda *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis* bakterilerinin 24 saatlik kültürlerinden 0.5 McFarland standard (10^8 h/ml) tüpüne göre turbidimetrik olarak hazırlanan bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. Bir öze dolusu bakteri süspansiyonu 5 gün boyunca üremiş *Actinomyce* bakterilerine dik olacak şekilde ekim yapılmış ve Petri kapları 37°C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Üç tekrarlı olarak yapılan deneylerde 24 saat sonunda *Actinomyce* bakterileri ile patojen bakteriler arasındaki mesafe ölçülerek zon uzunluğu olarak not edilmiştir (Rahman ve diğ., 2011; Mohseni ve diğ., 2013).

3.3.1.2. Agar Kaplama Yöntemi

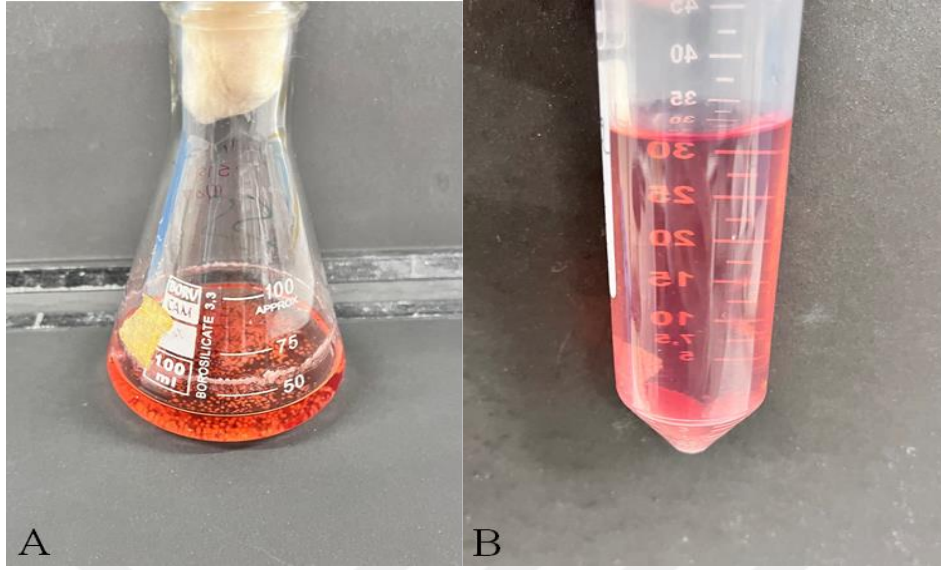
Actinomyce bakterileri NA içeren besiyerlerinin ortasına batırma yöntemi ile ekilmiş ve 28°C' de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda *Actinomyce* bakterilerini içeren Petri kapları kapakları açık şekilde 45 dakika UV ışık altında tutulmuştur (Şekil 3.8). UV ışıkta bekletmenin ardından *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis* bakterilerinin 24 saatlik kültürlerinden McFarland 0.5 standardına (10^8 h/ml) göre bakteri süspansiyonları türbidimetrik olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 1'er ml alınarak kaynatılarak eritildikten sonra 45°C'ye soğutulmuş %0.8 agar içeren NA besiyerlerinin üzerine eklenmiş ve iyice vortekslenerek bakteri süspansiyonun besiyeri içerisinde karışması sağlanmıştır. Bakteri içeren yumuşak agarlar *Actinomyce* bakterilerini içeren Petrilerin üzerine yavaşça dökülerek ikinci bir agar katmanı oluşturulmuştur. Agarlar donduktan sonra petriler ters çevrilmiş ve 37°C' deki etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Bu yöntem üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan zon çapları ölçülerek not edilmiştir (Shetty ve diğ., 2014; Subhan ve diğ., 2015; El Karkouri ve diğ., 2019).



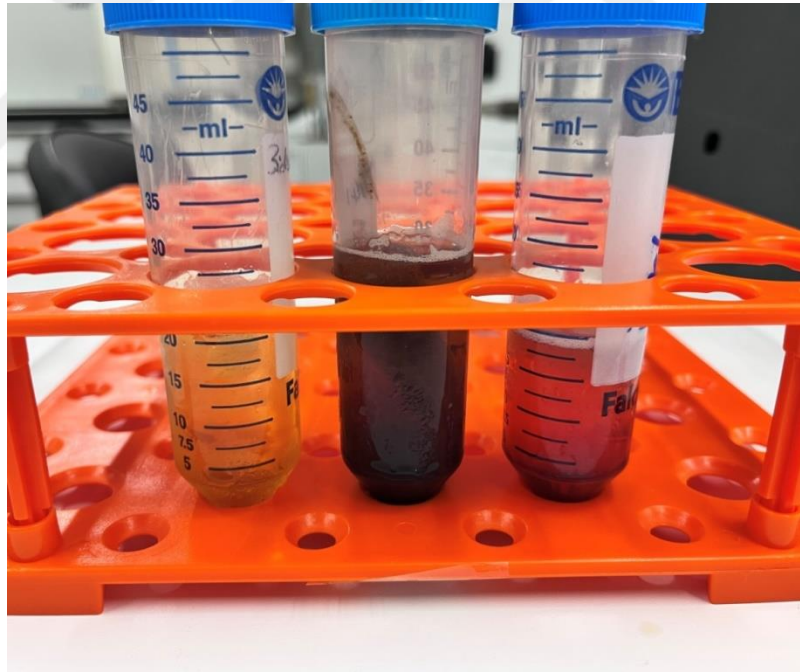
Şekil 3.8: Agar kaplama yönteminde bakteri süspansiyonlu yumuşak agar dökülmeden önce UV ışık altında *Actinomycete* şüpheli izolatların öldürülmesi

3.3.2. İkincil Tarama

Birincil taramanın ardından izolatlar besin miktarı azaltılan $\frac{1}{2}$ ISP2 sıvı besiyerinde inkübe edilmiştir. Besiyerinin içeriğindeki besin miktarı azaltılarak izolatların ürettikleri sekonder metabolit miktarını arttırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla izolatlar antibiyotik içermeyen $\frac{1}{2}$ ISP2 sıvı besiyerinde 28°C’de çalkalamalı inkübatörde 130 rpm hızda 10 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda steril falcon tüplerine aktarılan brothlar yüksek hızda santrifüjlenerek bakteri ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır (Şekil 3.9). Biyoaktif madde içeren süpernatant 0.22 μm por çaplı enjektör ucu filtreler (PES) kullanılarak steril edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar disk difüzyon ve MİK/MBK deneylerinde kullanılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.9: Sekonder metabolit eldesi (A: ½ ISP2 besiyerinde 10 gün boyunca çalkalamalı etüvde inkübe edilen S18 izolatı, B: Santrifüj işlemi sonrası dibe çöken S18 bakterileri ve süpernatantı)



Şekil 3.10: Çeşitli izolatlara ait süpernatant örnekleri (Soldan sağa doğru A5, S9 ve S18 izolatlarına ait süpernatantlar)

3.3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Steril süpernatantlar boş antibiyotik disklerine damlatılmış ve 37°C' de gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Seçili patojen bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden steril çeşme suyu kullanılarak turbidimetrik olarak hazırlanan 10^8 h/ml'lik bakteri süspansiyonlarının 100'er µl'si Mueller Hinton katı besiyerine drigalski çubuğu kullanılarak yayma ekim yöntemi ile ekilmiştir. 30 dakika kurumaya bırakılan Petri kaplarının üzerine süpernatant içeren diskler aseptik şartlar altında yerleştirilmiştir. Petri kapları 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiş, daha sonra oluşan zon çapları ölçülmüş ve not edilmiştir (Mohseni ve diğ., 2013). Pozitif kontrol olarak tetrasiklin (TE) ve azitromisin (AZM) antibiyotikleri kullanılırken negatif kontrol olarak distile su emdirilmiş diskler kullanılmıştır.

3.3.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu/ Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MİK/MBK)

Elde edilen süpernatantların MİK/MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla 96' lı U tabanlı mikropleytler kullanılmıştır. Seçili patojen bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden steril çeşme suyu kullanılarak McFarland 0.5 standardına (10^8 h/ml) göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar 9'ar ml FTS kullanılarak 10^5 h/ml oranına kadar sulandırılmıştır. 10^5 h/ml sulandırma tüpünden 1 ml alınarak 9 ml Mueller Hinton broth besiyerine eklenmiştir.

Mikropleytin ilk kuyucuklarına 200'er µl süpernatant, diğer kuyucuklarına ise 100'er µl steril çeşme suyu eklenmiştir. Süpernatant mikrodilüsyon yöntemi ile sulandırılmıştır. Mueller Hinton broth içerisinde hazırlanan bakteri süspansiyonları kuyucuklara 100'er µl dağıtılmıştır. Böylece süpernatant ve bakteri süspansiyonun kuyucuklardaki oranının 1:1 (v/v) olması sağlanmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarına bakterili Mueller Hinton broth ve FTS eklenmiştir. Mikropleytler 37°C'lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda mikropleytler bulanıklıkları açısından değerlendirilmiş ve bulanıklık görülmeyen kuyulardan NA besiyerine ekim yapılmıştır. Mikropleytte bulanıklık görülmeyen en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyonu Konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirilirken, Petri kaplarında üreme gözlemlenmeyen en düşük konsantrasyon Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) olarak değerlendirilmiştir (Gebreyohannes ve diğ., 2013).

3.4. İZOLATLARIN ADLANDIRILMASI

3.4.1 Genomik DNA İzolasyonu

Denizel ortamlardan izole edilen *Actinomyces* suşlarının DNA izolasyonu GeneALL® Exgene™ Blood/Clinic/Cell SV mini kiti kullanılarak yapılmıştır.

Actinomyces olduğundan şüphelenilen bakteriler ISP2 broth besiyerine ekilerek 28°C'lik çalkalamalı inkübatörde 48 saat inkübe edildikten sonra DNA izolasyonu için uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

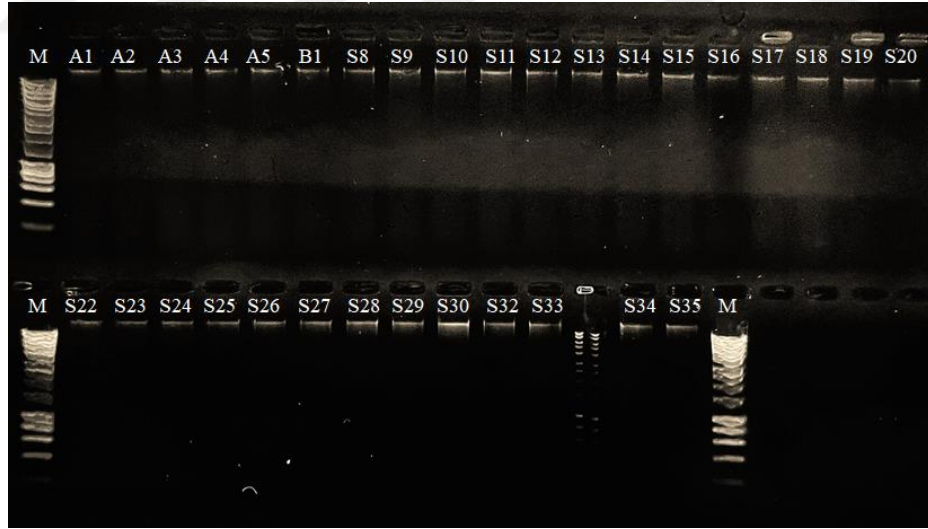
- 1) İnkübasyon süresinin sonunda *Actinomyces* kültürleri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri 14000 rpm' de 2 dk santrifüjlenerek bakteri hücreleri çöktürülmüş ve süpernatant kısmı atılmıştır.
- 2) Ardından pelet için yıkama işlemi uygulanmıştır. Pelet üzerine 1 ml distile su eklenerek 14000 rpm' de 2 dk santrifüjlenerek bakteri hücreleri çöktürülmüş ve üst sıvı atılmıştır. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.
- 3) Pelet kısmının üzerine taze olarak hazırlanan lizozim solüsyonundan 180 µl ilave edilerek vortekslenmiştir. Santrifüj tüpleri kuru termal blok cihazında 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 4) İnkübasyon süresinin sonunda santrifüj tüplerine 20µl Proteinaz K solüsyonu ve 200 µl BL buffer solüsyonu eklenerek vortekslenmiş ve kuru blok cihazında 56°C' de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 5) Şeffaflaşan bakteri süspansiyona 200 µl saf etanol eklenerek pipetaj yapılmış ve süspansiyon kolonlu santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kolonlu santrifüj tüpleri 6000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenmiş ve alt toplama kolonunda biriken sıvı atılmıştır.
- 6) Kolonlu santrifüj tüplerine kitin içerisinde bulunan BW yıkama tamponundan 600 µl eklenmiş ve 6000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Alt toplama kolonunda biriken sıvı atılmıştır.
- 7) Kolonlara TW yıkama tamponundan 700 µl eklenerek 6000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenmiş ve alt tüpte biriken sıvı yine uzaklaştırılmıştır.
- 8) Bu aşamadan sonra DNA'ların toplanması için kolonlar steril santrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. 100 µl AE tamponu ilave edilen kolonlar oda sıcaklığında 5 dk

bekletilmiştir. Daha sonra 13000 rpm’ de 1 dakika santrifüj işlemi ile DNA’lar kolonlardan geri kazanılmıştır.

İzole edilen DNA’ların mikrodrop cihazı (Thermo-scientific, Multiskan Go) ile 230/260 nm absorbands değeri ölçülerek saflık dereceleri ve konsantrasyonları tespit edilmiştir.

3.4.2. Genomik DNA’ ların Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Elde edilen DNA’ lara ait bantların görüntülenmesi için 1X TBE kullanılarak %0.8’ lik agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz çözünene kadar mikrodalgada çözündürülen jel daha sonra 45°C’ye kadar soğutulmuş ve içerisine GelRed boyasından eklenmiştir. Elektroforez yapılabilmesi için taraklı elektroforez kabına dökülen jel katılaşana kadar beklenmiş ve daha sonra taraklar çıkartılmıştır. Elektroforez tankına DNA’ ların yürümesini sağlamak amacıyla 1X TBE solüsyonundan eklenmiştir. İlk kuyucuğa 4 µl 1 kb Ladder konulmuş diğer kuyucuklara ise 1 µl yükleme boyası ile karıştırılan 4 µl DNA örneklerinden konulmuştur. DNA’ lar elektroforez tankında 90 Volttta 30 dakika yürütülmüştür. Elde edilen DNA bantları UV görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: DNA’sı izole edilen çeşitli *Actinomycetes* izolatlarına ait agaroz jel görüntüsü (M: Marker)

3.4.3. PZR Yöntemi

Actinomycetes şüpheli izolatlar 9F (5’- GAGTTTGATYMTGGCTC-3’) ve 1509R (5’- GYTACCTTGTTACGACTT-3’) primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

PZR yönteminin uygulanabilmesi için 0.2 ml hacimli PZR tüpleri kullanılmıştır. PZR karışımı her bir tüpte son hacim 25 µl olacak şekilde Tablo 3.2’ de belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: PZR karışımı

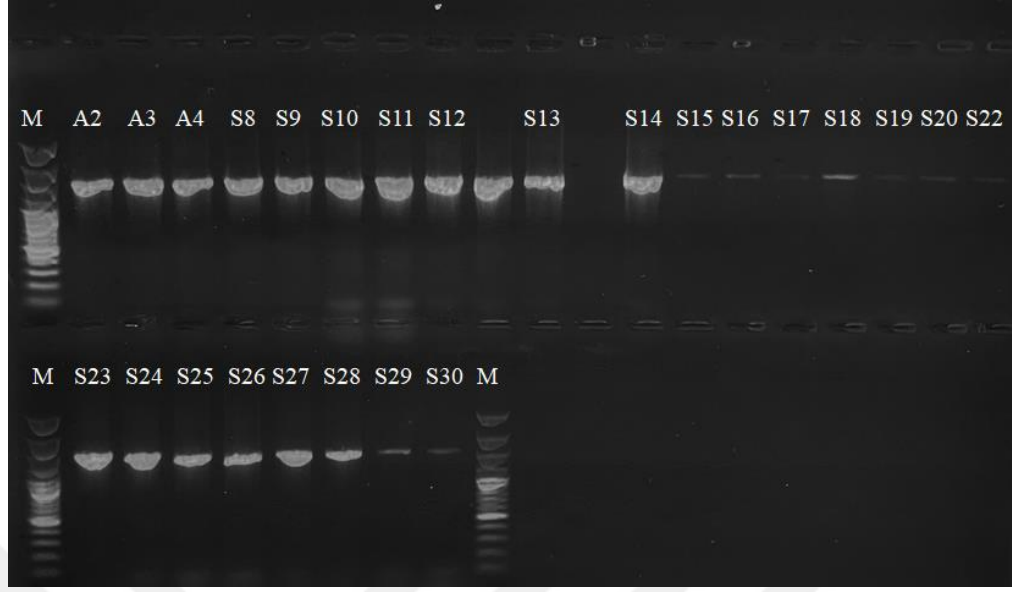
PZR Bileşeni	Miktarı
MyTaq DNA polimeraz (BioLine)	0.25 µl
MyTaq Reaction Buffer (BioLine)	5.00 µl
9F Primeri (20 pmol)	1.00 µl
1509R Primeri (20 pmol)	1.00 µl
Kalıp DNA (20 µM)	1.00 µl
Ultra Saf Su	16.75 µl
Toplam Hacim	25 µl

Hazırlanan PZR karışımı Tablo 3.3’ de verilen koşullarda Termal Cycler (Bio-Rad T100) kullanılarak çoğaltılmıştır.

Tablo 3.3: PZR Reaksiyon Koşulları

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon (1 döngü)	95 °C	2 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	30
Bağlanma	41 °C	30 sn	30
Uzama	72 °C	1 dk	30
Son Uzama	72 °C	10 dk	1

PZR işlemi sonrası ortaya çıkan ürünler 1X TBE ile hazırlanan % 1.2’ lik agaroz jele 100 bç Ladder ile beraber yüklenerek 80 Voltta 45 dakika yürütülmüş ve ortaya çıkan PZR bantları UV görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: PZR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü (M: Marker)

3.4.4. İzolatların Adlandırılması

PZR ürünleri Sanger dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir. Dizi aralıkları için özel bir firmada hizmet alımı yapılmıştır. İzolatların rRNA sekans analizi sonucunda elde edilen nükleotit dizisine NCBI GenBank veri tabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) kullanılarak BLAST analizi yapılmıştır. Veri tabanından elde edilen bilgiler doğrultusunda izolatlarımıza filogenetik olarak yakın bakteri türleri belirlenmiştir. Tür tespiti yapılan bakteri örnekleri için daha sonra erişim numarası alınmıştır.

3.5. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

3.5.1. ISP2 (International Streptomyces Project- 2) Agar

Madde	Miktar (g/L)
Maya özütü	4.0
Malt özütü	10.0
Dekstroz	4.0
Agar	15.0

pH 7.3 ± 0.2

Agar hariç diğer toz maddeler ilk olarak 900 ml su içerisinde çözündürülerek pH'ı ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 1000 ml su hacminin 500 ml'si deniz suyu, 500 ml' si distile su olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra çeşitli bakteri ve mantarların üremesini engellemek amacıyla 75 µg/ml nalidiksik asit ve 100 µg/ml sikloheksimit eklenmiştir. Besiyeri 90 mm steril Petri kutularına yaklaşık 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanan besiyeri *Actinomyces* bakterilerinin izolasyonunda kullanılmıştır (Baskaran ve diğ.,2011).

3.5.2. M6 Agar

Madde	Miktar (g/L)
Et özütü	4.0
Pepton	4.0
Maya özütü	1.0
Glukoz	10.0
NaCl	20.0
Agar	20.0
pH 7.2 ± 0.2	

Agar hariç diğer toz maddeler ilk olarak 900 ml su içerisinde çözündürülerek pH' ı ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 1000 ml su hacminin 500 ml'si deniz suyu, 500 ml' si distile su olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra çeşitli bakteri ve mantarların üremesini engellemek amacıyla 75 µg/ml nalidiksik asit ve 100 µg/ml sikloheksimit eklenmiştir. Besiyeri 90 mm steril Petri kutularına yaklaşık 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanan besiyeri *Actinomyces* bakterilerinin izolasyonunda kullanılmıştır (Özcan ve diğ., 2013).

3.5.3. Gauze Medium 2 Agar

Madde	Miktar (g/L)
Glukoz	10.0
Pepton	5.0
Trypton	3.0
NaCl	5.0
Agar	20.0
pH 7.2 ± 0.2	

Agar hariç diğer toz maddeler ilk olarak 900 ml su içerisinde çözündürülerek pH' ı ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 1000 ml su hacminin 500 ml'si deniz suyu, 500 ml' si distile su olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121°C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra çeşitli bakteri ve mantarların üremesini engellemek amacıyla 75 µg/ml nalidiksik asit ve 100 µg/ml sikloheksimit eklenmiştir. Besiyeri 90 mm steril Petri kutularına yaklaşık 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanan besiyeri *Actinomyces* bakterilerinin izolasyonunda kullanılmıştır (Davies-Bolorunduro ve diğ., 2019).

3.5.4. Nutrient Agar

Madde	Miktar (g/L)
Et kaynaklı pepton	5.0
Sığır eti özütü	3.0
Agar	20.0
pH 7.0 ± 0.2	

Hazır toz besiyeri 1 litre distile su içerisinde çözündürülerek 121°C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 90 mm steril Petri kaplarına yaklaşık 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Hazırlanan besiyeri bakterilerin üretilmesinde kullanılmıştır.

3.5.5. ½ ISP2 Broth

Madde	Miktar (g/L)
Maya özütü	2.0
Malt özütü	5.0
Dekstroz	2.0
pH 7.3 ± 0.2	

Toz maddeler ilk olarak 900 ml su içerisinde çözündürülerek pH' ı ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyeri erlenmeyerlere dağıtılmış ve ağzları kalaycı pamuğu ile kapatılmıştır. Besiyeri 1.5 atm basınçta 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri disk difüzyon yönteminde ve MİK/MBK deneylerinde kullanılmak üzere bakterilerin üretilmesinde kullanılmıştır.

3.5.6. Mueller Hinton Broth

Madde	Miktar (g/L)
Asit kazein pepton	17.5
Et infüzyon	2.0
Nişasta	1.5
pH 7.4 ± 0.2	

Hazır toz besiyeri 1 litre distile su içerisinde çözündürülerek 121°C' de 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri tüplere dağıtılmış ve ağzları kalaycı pamuğu ile kapatılmıştır. Besiyeri 1.5 atm basınçta 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri disk difüzyon yönteminde ve MİK/MBK deneylerinde kullanılmak üzere patojen bakterilerin üretilmesinde kullanılmıştır.

3.5.7. Mueller Hinton Agar

Madde	Miktar (g/L)
Asit kazein pepton	17.5
Et infüzyon	2.0
Nişasta	1.5
Agar	17.0
pH 7.4 ± 0.2	

Hazır toz besiyeri 1 litre distile su ile çözündürüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 90 mm steril Petri kutularına yaklaşık 15 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Besiyeri disk difüzyon yönteminde patojen bakterilerin üretilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.5.8. Salin Su

9 gram NaCl, hassas terazide tartıldıktan sonra 1000 ml distile suyun içerisinde çözündürülüp deney tüplerine 9'ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Deney tüpleri otoklavda 1.5 atm basınçta 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Elde edilen tuzlu su çözeltileri bakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır.

3.5.9. Fizyolojik Tuzlu Su

8.5 gram NaCl, hassas terazide tartıldıktan sonra 1000 ml distile suyun içerisinde çözündürülüp deney tüplerine 9'ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Deney tüpleri otoklavda 1.5 atm basınçta 121°C' de 15 dakika steril edilmiştir. Elde edilen tuzlu su çözeltileri McFarland tüplerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.5.10. Nalidiksik Asit

75 mg nalidiksik asit hassas terazide tartılıp 10 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre (PES) yardımıyla steril edilmiştir. ISP2, M6 ve GM2 besiyerlerine Gram negatif bakterilerin üremesini baskılamak amacıyla 75 µg/ml olacak şekilde eklenmiştir.

3.5.11. Sikloheksimit

100 mg sikloheksimit hassas terazide tartılıp 10 ml etanolde çözündürüldükten sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre (PES) filtre yardımıyla steril edilmiştir. ISP2, M6 ve GM2 besiyerlerine fungal üremeyi baskılamak amacıyla 100 µg/ml olacak şekilde eklenmiştir.

3.5.12. Gram Boyama Maddeleri

3.5.12.1. Kristal Viyole Çözeltisi

1. Çözelti

Kristal viyole, 2.0 g

%96'lık etil alkol, 20 ml

Kristal viyole tartılarak etil alkolde iyice çözündürülür.

2. Çözelti

Amonyum oksalat, 0.8 g

Distile su, 80 ml

Amonyum oksalat tartılıp distile suyun içerisinde çözündürülmüştür.

1. ve 2. çözeltiler karıştırıldıktan sonra 24 saat bekletilmiş ardından filtre kağıdı yardımıyla süzülerek koyu renkli cam şişelerin içerisinde ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.5.12.2. Gram'ın İyot Çözeltisi

Madde	Miktar (g/300ml)
İyot	1.0
Potasyum iyodür	2.0

İyot ve Potasyum iyodür katı maddeleri 20 ml distile su içerisinde iyice çözündürülmüş daha sonra son hacim 300 ml'ye tamamlanmıştır. 24 saat sonra filtre kağıdı yardımıyla süzülerek koyu renkli cam şişelerin içerisinde ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.5.12.3. % 96'lık Etil Alkol

Etil alkol (%100), 96 ml

Distile su, 4ml

96 ml ölçülen saf etil alkolün üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde 4 ml distile su eklenmiştir.

3.5.12.4. Sulu Fuksin

1. Çözelti

Bazik fuksin, 3 g

Alkol (%95), 100 ml

Bazik fuksin tartılıp etil alkol içerisinde çözündürülmüştür.

2. Çözelti

Fenol, 5 g

Distile su, 95 ml

Fenol tartılıp distile su içerisinde çözündürülmüştür.

1. ve 2. çözeltiler karıştırılmış daha sonra elde edilen karışımdan 10 ml alınmış ve üzerine 100 ml distile su eklenmiştir. 24 saat sonra filtre kağıdı yardımıyla süzülerek koyu renkli cam şişelerin içerisinde ışık görmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.5.13. 10X TBE

Madde	Miktar (g/L)
Trisma Base	108.0
Borik asit	55.0
0.5 M EDTA (pH 8)	40.0 ml

Trisma base ve Borik asit katıları tartılır ve yaklaşık 800 ml distile su içerisinde çözündürülerek solüsyonun pH'ı 8'e ayarlanır. 40 ml 0.5 M EDTA eklendikten sonra son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan stok solüsyon 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.5.14. 1X TBE

100 ml 10X TBE solüsyonunun üzerine 900 ml distile su eklenerek son hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır. 1X TBE olarak hazırlanan solüsyon 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 1X TBE solüsyon agaroz jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.5.15. Agaroz Jel

DNA bantlarını görüntülemek için 0.8, PZR bantlarını görüntülemek içinse 1.2 g agaroz tartılmış ve üzerine 100 ml 1X TBE solüsyonu eklenerek mikrodalgada iyice çözünmesi sağlanmıştır. 45°C' ye soğutulan agaroz jelin içerisine GelRed eklenmiş ve jel, taraklı elektroforez tankına dökülerek katılaşıncaya kadar beklenilmiştir.

3.5.16. Lizozim Buffer

3.5.16.1. EDTA Solüsyonunun Hazırlanması

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 0.08 g

Distile su, 10 ml

pH: 8.0

Toz halindeki kimyasal madde tartılarak 10 ml distile su içinde çözündürülüp stok solüsyon hazırlanır.

3.5.16.2. Trisma Base Solüsyonunun Hazırlanması

Trisma base, 0.24 g

Distile su, 10 ml

pH, 8.0

Toz halindeki kimyasal madde tartılarak 10 ml distile su içinde çözündürülüp stok solüsyon hazırlanır.

3.5.16.3. Lizozim Buffer Solüsyonun Hazırlanması

Stok olarak hazırlanan EDTA ve Trisma base solüsyonlarından 1'er ml alınarak üzerine 8 ml distile su eklenmiştir. Solüsyonun üzerine 120 µl Triton-X eklenerek 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre (PES) yardımıyla steril edilmiştir.

3.5.17. Lizozim Hazırlanması

Lizozim enzimi aseptik şartlar altında 1ml lizozim buffer solüsyonu içerisinde 0.2 gram olacak şekilde tartılarak hazırlanmıştır. |



4. BULGULAR

4.1. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN KAYNAKLARI

Marmara Denizi'nin farklı bölgelerinden toplanan su örneklerinden 6 adet, sediment örneklerinden 29 adet olmak üzere toplam 35 adet *Actinomycete* bakterisi izole edilmiştir. İzole edilen bakterilere ait izolasyon yöntemi ve besiyerleri Tablo 4.1' de verilmiştir. Bakteri örneklerinden 16 tanesi ISP2, 14 tanesi GM2 ve 5 tanesi M6 besiyeri kullanılarak izole edilmiştir.

Tablo 4.1: İzole edilen *Actinomycete* bakterilerinin izolasyon kaynakları, izolasyon yöntemleri ve izole edildikleri besiyerleri

Bakteri Kodu	İzole Edilen Örnek	İzolasyon Yöntemi	İzolasyon Besiyeri
A1	1 numaralı su örneği	Membran filtrasyon yöntemi	ISP2
A2	1 numaralı su örneği	Membran filtrasyon yöntemi	ISP2
A3	3 numaralı su örneği	Membran filtrasyon yöntemi	M6
A4	3 numaralı su örneği	Membran filtrasyon yöntemi	GM2
A5	3 numaralı su örneği	Membran filtrasyon yöntemi	ISP2
B1	2 numaralı su örneği	Direkt ekim yöntemi	ISP2
S1	1 numaralı sediment örneği	60°C'lik su banyosunda bekletme	M6
S2	2 numaralı sediment örneği	60°C'lik su banyosunda bekletme	GM2
S4	2 numaralı sediment örneği	60°C'lik su banyosunda bekletme	GM2
S8	3 numaralı sediment örneği	60°C'lik su banyosunda bekletme	M6
S9	3 numaralı sediment örneği	30°C'lik çalkalamalı etüvde bekletme	ISP2
S10	2 numaralı sediment örneği	60°C'lik su banyosunda bekletme	GM2
S11	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	M6

Tablo 4.1 (Devam): İzole edilen *Actinomycete* bakterilerinin izolasyon kaynakları, izolasyon yöntemleri ve izole edildikleri besiyerleri

Bakteri Kodu	İzole Edilen Örnek	İzolasyon Yöntemi	İzolasyon Besiyeri
S12	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S13	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S14	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S15	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S16	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S17	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S18	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S19	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S20	1 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S22	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S23	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S24	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S25	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S26	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S27	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S28	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	M6
S29	2 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2

Tablo 4.1 (Devam): İzole edilen *Actinomycete* bakterilerinin izolasyon kaynakları, izolasyon yöntemleri ve izole edildikleri besiyerleri

Bakteri Kodu	İzole Edilen Örnek	İzolasyon Yöntemi	İzolasyon Besiyeri
S30	3 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S32	4 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S33	4 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	ISP2
S34	4 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2
S35	4 numaralı sediment örneği	UV ışık altında bekletme	GM2

4.2. İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN MORFOLOJİK VE PİGMENTASYON ÖZELLİKLERİ

İzole edilen bakteriler birbirinden farklı morfolojik özellikler göstermektedir. İzole edilen birçok bakteri substrat ve hava miselyumlarının renginin yanı sıra koloni morfolojisi ile de farklılık göstermektedir. Bazı izolatların çözünebilir pigment özelliklerinin de olduğu tespit edilmiştir. Bu bakterilere ait koloni morfolojisi, misel yapıları ve pigment özellikleri Tablo 4.2’ de verilmiştir.

Tablo 4.2: İzole edilen *Actinomycete* bakterilerinin koloni morfolojisi, misel yapıları ve pigment özellikleri

Bakteri Kodu	Gram Boyama	Hava Miseli	Substrat Miseli	Çözünebilir Pigment	Koloni Morfolojisi
A1	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem rengi	-	Pamuksu
A2	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Bej	-	Pamuksu
A3	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem rengi	-	Pamuksu

Tablo 4.2 (Devam): İzole edilen *Actinomycete* bakterilerinin koloni morfolojisi, misel yapıları ve pigment özellikleri

Bakteri Kodu	Gram Boyama	Hava Miseli	Substrat Miseli	Çözünebilir Pigment	Koloni Morfolojisi
A4	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Sarı- Krem rengi	-	Pamuksu
A5	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Kahverengi- Krem rengi	-	Tortulu
B1	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Beyaz	-	Pamuksu
S1	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Krem rengi	-	Kabarık
S2	Gram (+) Filamentli	Turuncu	Turuncu	-	Kabarık
S4	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem rengi	-	Tortulu
S8	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Kahverengi	Kahverengi	Tortulu
S9	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Kızıl - Kahverengi	Kahverengi	Kabarık
S10	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Krem rengi	-	Kabarık
S11	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Sarı- Krem rengi	-	Tortulu
S12	Gram (+) Filamentli	Gri- Yeşil	Asker yeşili	-	Tortulu
S13	Gram (+) Filamentli	Gri- Beyaz	Gri- Krem rengi	-	Tortulu
S14	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem rengi	-	Tortulu
S15	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Sarı	-	Kabarık
S16	Gram (+) Filamentli	Beyaz- Krem rengi	Beyaz- Krem rengi	-	Tortulu
S17	Gram (+) Filamentli	Sarı- Krem rengi	Sarı- Krem rengi	-	Kabarık
S18	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Pembe	Pembe	Tortulu

Tablo 4.2 (Devam): İzole edilen *Actinomycete* bakterilerinin koloni morfolojisi, misel yapıları ve pigment özellikleri

Bakteri Kodu	Gram Boyama	Hava Miseli	Substrat Miseli	Çözünebilir Pigment	Koloni Morfolojisi
S19	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Sarı- Krem rengi	-	Tortulu
S20	Gram (+) Filamentli	Gri- Yeşil	Krem rengi- Yeşil	-	Tortulu
S22	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Gri- Krem rengi	-	Pamuksu
S23	Gram (+) Filamentli	Beyaz- Gri	Sarı- Krem rengi	-	Tortulu
S24	Gram (+) Filamentli	Beyaz- Gri	Gri- Krem rengi	-	Tortulu
S25	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Krem rengi	-	Mukoid
S26	Gram (+) Filamentli	Turuncu	Turuncu	-	Kabarık
S27	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Kahverengi- Krem rengi	-	Tortulu
S28	Gram (+) Filamentli	Kahverengi- Yeşil	Haki yeşil	-	Tortulu
S29	Gram (+) Filamentli	Krem rengi	Krem rengi	-	Kabarık
S30	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem rengi	-	Pamuksu
S32	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Kahverengi- Krem rengi	-	Tortulu
S33	Gram (+) Filamentli	Krem	Kahverengi- Krem rengi	-	Tortulu
S34	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem	-	Pamuksu
S35	Gram (+) Filamentli	Beyaz	Krem	-	Pamuksu

4.3. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTENİN TESPİTİ

4.3.1. Birincil Tarama

4.3.1.1. Çizgi Ekim Yöntemi

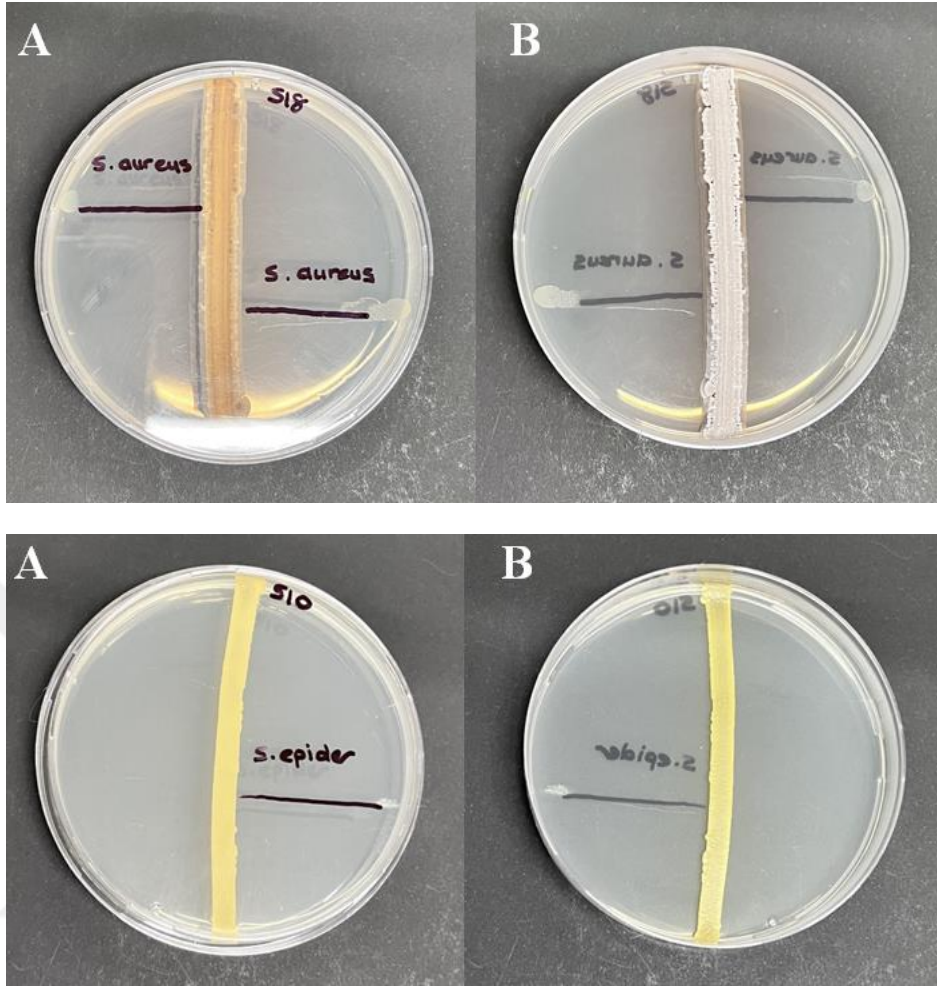
Çizgi ekim yönteminde toplamda 13 bakteri izolatu en az bir patojen bakteri üzerine antibakteriyel etkinlik göstermiştir. En çok sayıda patojene etki eden bakterinin S10 kodlu izolat olduğu tespit edilirken en yüksek zon çapının *S. aureus* bakterisine karşı olduğu belirlenmiştir. *Actinomyces* bakterilerinin patojen bakteriler üzerine etkisinin çizgi ekim yöntemi kullanılarak tespit edilmesine dair sonuçlar Tablo 4.3’ te verilmiştir. Çizgi ekim yönteminde antibakteriyel etkinliği tespit edilen çeşitli izolatlara ait görüntüler Şekil 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4.3: Çizgi ekim yöntemi ile elde edilen antibakteriyel zon çapları (mm)

Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
A1	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	-
A5	-	14.5±0.070	17.5±3.535	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	1.0	1.0	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	4.0	2.5±0.070	-	1.5±0.070	-	5.5±2.121
S9	-	20.5±2.121	18.0±2.828	-	-	-	10±1.414
S10	29.0±1.414	31.5±0.070	32.0	27.5±2.121	29.5±0.070	-	-
S11	-	-	2.0	-	-	-	-
S12	-	4.0±1.414	-	-	-	-	-

Tablo 4.3 (Devam): Çizgi ekim yöntemi ile elde edilen antibakteriyel zon çapları (mm)

Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
S13	-	-	-	-	-	-	-
S14	-	-	-	-	-	-	-
S15		1.0	1.0				
S16	-	-	-	-	-	-	-
S17	-	-	-	-	-	-	-
S18	8.0	26.0±2.828	26.0±1.414	-	-	-	30±2.828
S19	-	-	-	-	-	-	-
S20	-	9.5±2.121	8.0±1.414	-	-	-	-
S22	-	4.0	2.5±0.070	-	-	-	-
S23	-	-	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	-	-	-	-
S25	-	-	-	-	-	-	-
S26	-	-	-	-	-	-	-
S27	-	6.5±0.070	7.0±1.414	-	-	-	-
S28	-	6.0	5.5±0.070	-	-	-	-
S29	-	-	-	-	-	-	-
S30	-	-	-	-	-	-	-
S32	-	-	-	-	-	-	-
S33	-	-	-	-	-	-	-
S34	-	-	-	-	-	-	-
S35	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.1: Çeşitli izolatlara ait çizgi ekim yönteminde gösterdikleri antibakteriyel zon çapları A: Petrinin dıştan görünümü, B: Petrinin içten görünümü (Üreme alanlarındaki siyah çizgiler inhibisyon uzunluğunu göstermektedir.)

4.3.1.2. Agar Kaplama Yöntemi

Agar kaplama yönteminde toplamda 7 bakteri izolatı en az bir patojen bakteri üzerine antibakteriyel etkinlik göstermiştir. En çok sayıda patojen bakteri üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olan bakterinin S10 kodlu izolat olduğu tespit edilirken en yüksek zon çapının *B. subtilis* bakterisine karşı olduğu belirlenmiştir. *Actinomycete* bakterilerinin patojen bakteriler üzerine etkisinin agar kaplama yöntemi kullanılarak tespit edilmesine dair sonuçlar Tablo 4.4' te verilmiştir. Bazı patojen bakteriler üzerine antibakteriyel özellik gösteren izolatlara ait görüntüler Şekil 4.2' de verilmiştir.

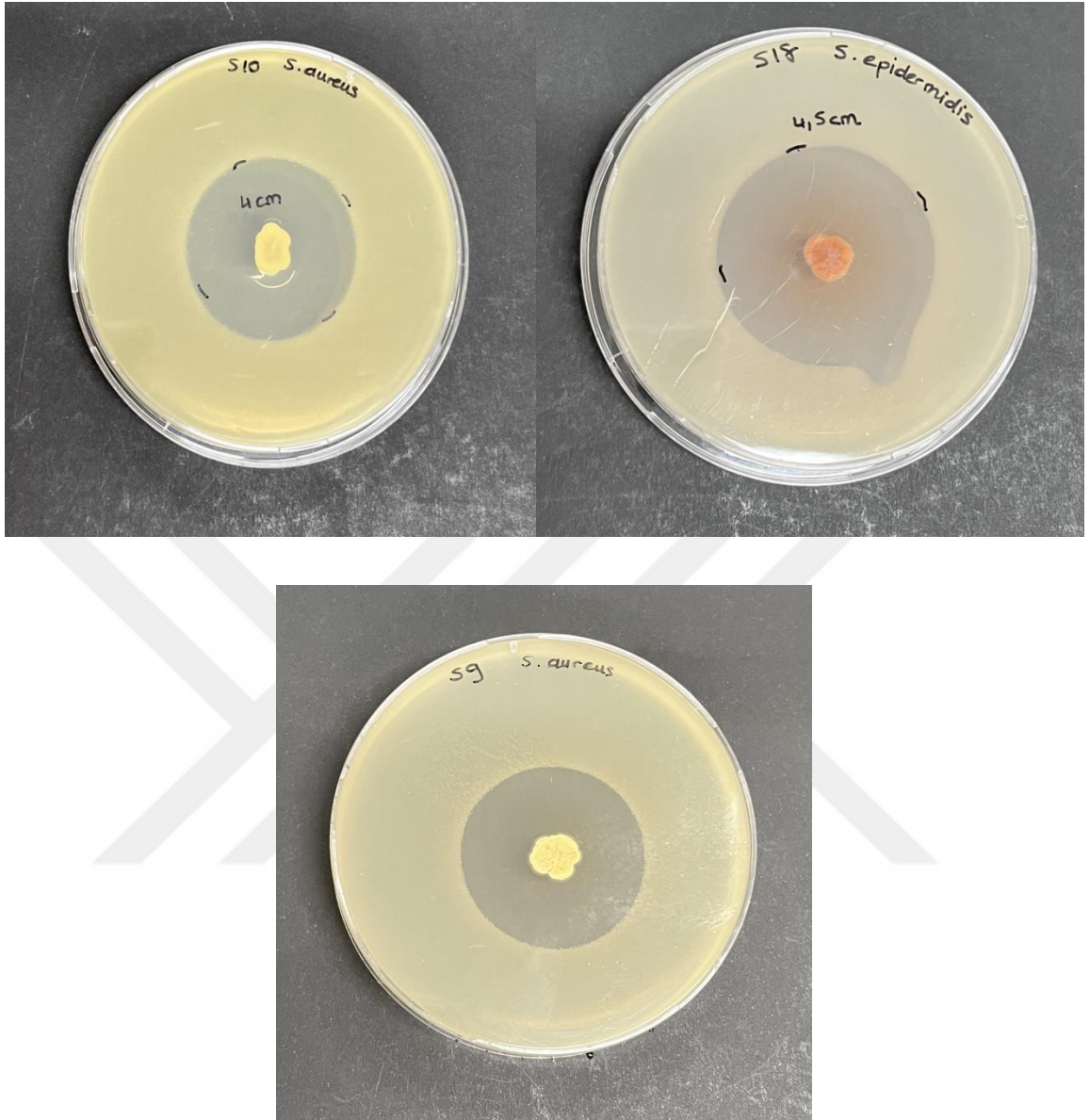
Tablo 4.4: Agar kaplama yönteminde elde edilen antibakteriyel zon çapları (mm)

Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
A1	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	-	-	-
S9	-	40±1.414	-	-	-	-	37.5±3.535
S10	39±1.414	41±1.414	32.0±2.828	17.0±4.242	-	30.0±2.828	53.0±7.071
S11	-	-	-	-	-	-	-
S12	-	-	-	-	-	-	-
S13	-	18.0	18.5±0.070	-	-	-	4.9±1.414
S14	-	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	-	-	-
S16	-	-	-	-	-	-	-
S17	-	-	-	-	-	-	-
S18	-	41.±1.414	41.5±4.949	-	-	-	-

Tablo 4.4 (Devam): Agar kaplam yönteminde ile elde edilen antibakteriyel zon çapları (mm)

Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
S19	-	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	19.5±0.070	-	-	-	-
S22	-	14.0±2.828	18.5±2.121	-	-	-	-
S23	-	-	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	-	-	-	-
S25	-	-	-	-	-	-	-
S26	-	-	-	-	-	-	-
S27	-	-	-	-	-	-	-
S28	-	-	-	-	-	-	-
S29	-	-	-	-	-	-	-
S30	-	-	-	-	-	-	-
S32	-	-	-	-	-	-	-
S33	-	-	-	-	-	-	-
S34	-	21.0±1.414	20.5±0.070	-	-	-	-
S35	-	-	-	-	-	-	-
AZM	12.5±0.070	19.0±1.414	23.5±0.070	12.0±0.070	15.0±1.414	-	21.±1.414
TE	13.0±0.070	19.0±1.414	24.0±1.414	18.0±2.828	22.0	19.0±1.414	30±0.070

AZM: Azitromisin, TE: Tetrasiklin



Şekil 4.2: Bazı patojen bakteriler üzerine antibakteriyel özellik gösteren *Actinomycete* izolatları

4.3.2. İkincil Tarama

4.3.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Actinomycete bakterilerinin $\frac{1}{2}$ oranında hazırlanmış ISP2 sıvı besiyerinde 10 gün üretilmesi sonucunda elde edilen süpernatantlar disk difüzyon yöntemi ile patojen bakteriler üzerinde test edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi sonucunda herhangi bir zon tespiti yapılamamıştır.

4.3.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu/ Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MİK/MBK)

Actinomycete'lere ait sekonder metabolitlerin MİK ve MBK değerleri aynı çıkmıştır. Bu yöntemde 10 izolatın en az bir patojen bakteri üzerinde antibakteriyel etkinliği tespit edilirken en etkili şuşların S9, S13 ve S18 izolatları olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen süpernatantların MİK/MBK yöntemi ile sahip oldukları antibakteriyel etkinliklerine dair sonuçlar Tablo 4.5' te verilmiştir. Bu işlem için kullanılan 96 kuyucuklu pleytlerden bir tanesine ait görüntü Şekil 4.3' te verilmiştir.

Tablo 4.5: Elde edilen süpernatantlara ait MİK/MBK sonuçları

Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
A1	-	-	-	-	-	-	1/2
A2	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	1/8
A4	-	-	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	-	-	-	-	-	-
S4	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	-	-	-	-	-	1/32

Not: Süpernatantlara ait MİK/MBK değerleri eşit çıkmıştır.

Tablo 4.5 (Devam): Elde edilen süpernatantlara ait MİK/MBK sonuçları

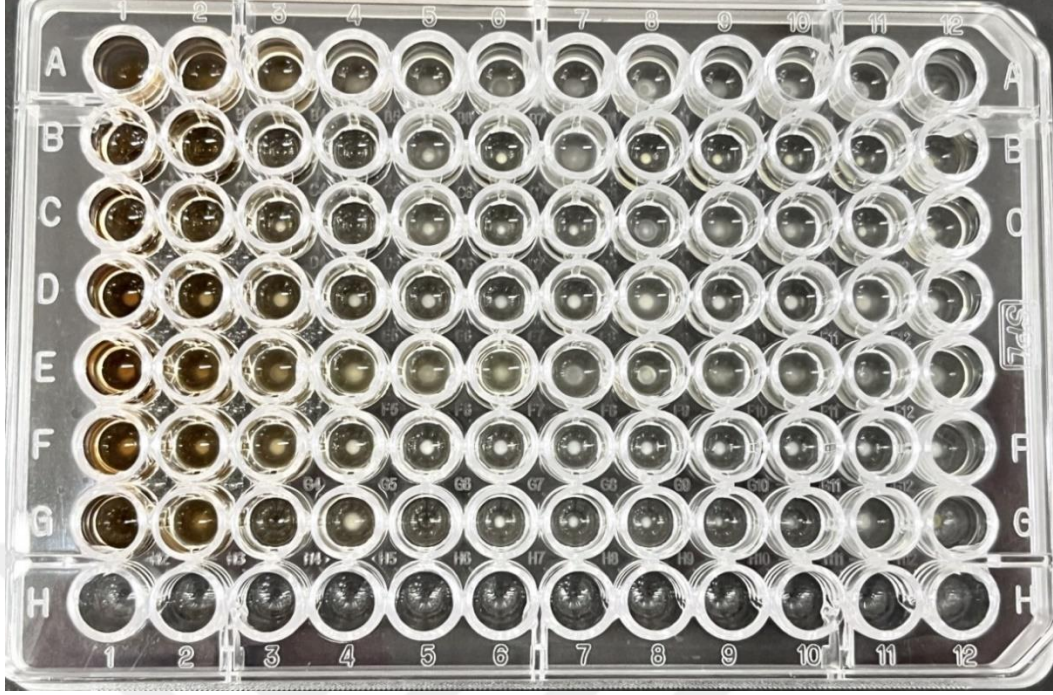
Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
S9	-	1/16	1/16	-	-	-	1/8
S10	-	-	-	-	-	-	-
S11	-	-	-	-	-	-	1/8
S12	-	-	-	-	-	-	-
S13	-	1/2	1/2	-	-	-	1/16
S14	-	-	-	-	-	-	-
S15	-	-	-	-	-	-	-
S16	-	-	-	-	-	-	-
S17	-	1/16	-	-	-	-	1/32
S18	-	1/32	1/32	-	-	-	1/32
S19	-	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	-	-	-	-	1/4
S22	-	-	-	-	-	-	1/8
S23	-	-	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	-	-	-	-
S25	-	-	-	-	-	-	-
S26	-	-	-	-	-	-	-

Not: Süpernatantlara ait MİK/MBK değerleri eşit çıkmıştır.

Tablo 4.5 (Devam): Elde edilen süpernatantlara ait MİK/MBK sonuçları

Bakteri Kodu	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.</i> <i>epidermidis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>
S27	-	-	-	-	-	-	-
S28	-	-	-	-	-	-	-
S29	-	-	-	-	-	-	-
S30	-	-	-	-	-	-	-
S32	-	-	-	-	-	-	-
S33	-	-	-	-	-	-	-
S34	-	-	-	-	-	-	-
S35	-	-	-	-	-	-	-

Not: Süpernatantlara ait MİK/MBK değerleri eşit çıkmıştır.



Şekil 4.3: S9 bakterisine ait 96 kuyucuklu pleytte MİK/MBK sonuçları (A: *E.coli*, B: *S.aureus*, C: *S. epidermidis*, D: *S. enterica*, E: *P. aeruginosa*, F: *K. pneumoniae*, G: *B. subtilis*)

4.4. İZOLATLARIN ADLANDIRILMASI

PZR yöntemi ile çoğaltılan DNA bölgeleri Sanger dizileme metodu ile analiz edilmiştir. Elde edilen DNA dizilerine BLAST analizi yapılarak NCBI veri tabında filogenetik olarak adlandırılmıştır. Elde edilen izolatların tür analizi Tablo 4.6’ da verilmiştir. Elde edilen izolatların büyük çoğunluğunun *Streptomyces* genusuna ait olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.6: İzolatların en yakın olduğu mikroorganizma grubu, benzerlik yüzdeleri

Bakteri Kodu	NCBI GenBank'a Göre En Yakın Mikroorganizma	Benzerlik Yüzdesi
A1	T	-
A2	<i>Nocardiopsis</i> sp.	%98.71
A3	<i>Streptomyces</i> sp.	%98.29
A4	T	-
A5	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.33
B1	T	-
S1	T	-
S2	T	-
S4	T	-
S8	<i>Streptomyces</i> sp.	%98.73
S9	<i>Streptomyces bacillaris</i>	%99.47
S10	<i>Streptomyces xinghaiensis</i>	%99.82
S11	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	%99.56
S12	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.14
S13	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.40
S14	T	-
S15	T	-
S16	<i>Streptomyces heliomycini</i>	%98.11

T: Tanımlanamadı

Tablo 4.6 (Devam): İzolatların en yakın olduğu mikroorganizma grubu ve benzerlik yüzdesi

Bakteri Kodu	NCBI GenBank'a Göre En Yakın Mikroorganizma	Benzerlik Yüzdesi
S17	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.81
S18	<i>Streptomyces griseorubens</i>	%100
S19	<i>Streptomyces lienomycini</i>	%99.81
S20	<i>Streptomyces violascens</i>	%99.54
S22	T	-
S23	<i>Nocardiopsis</i> sp.	%99.72
S24	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.91
S25	<i>Nonomuraea ferruginea</i>	%100
S26	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	%99.91
S27	<i>Streptomyces coelicolor</i>	%99.64
S28	<i>Streptomyces rutgersensis</i>	%99.91
S29	<i>Nonomuraea</i> sp.	%99.17
S30	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.65
S32	<i>Streptomyces</i> sp.	%99.74
S33	<i>Streptomyces</i> sp.	%98.89
S34	T	-
S35	<i>Streptomyces globisporus</i>	%99.63

T: Tanımlanamadı

4.5. POZİTİF SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz 35 *Actinomycete* izolatından farklı yöntemler kullanılarak antibakteriyel etkinlik testlerinin yapıldığı çalışmamızda 18 farklı izolatın antibakteriyel özellik gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmamız kapsamında öncelikle antibakteriyel özelliği tespit edilen suşların adlandırılmasının yapılmasına önem gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların karşılaştırmalı tablosu Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7: Pozitif sonuç elde edilen izolatlara ait karşılaştırma tablosu

Bakteri Kodu	İzolasyon Kaynağı	İzolasyon Yöntemi	Çizgi Ekim Yöntemi	Agar Kaplama Yöntemi	MİK/MBK	Bakterinin Türü
A1	Su (Maltepe)	MF	-	-	+	T
A3	Su (Heybeliada)	MF	-	-	+	<i>Streptomyces</i> sp.
A5	Su (Heybeliada)	MF	+	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.
S2	Sediment (Maltepe)	SB	+	-	-	T
S8	Sediment (Heybeliada)	SB	+	-	+	<i>Streptomyces</i> sp.
S9	Sediment (Heybeliada)	ÇE	+	+	+	<i>Streptomyces bacillaris</i>
S10	Sediment (Maltepe)	SB	+	+	-	<i>Streptomyces xinghaiensis</i>
S11	Sediment (Maltepe)	UV	+	-	+	<i>Micromonospora aurantiaca</i>
S12	Sediment (Maltepe)	UV	+	-	-	<i>Streptomyces</i> sp.

MF: Membran filtrasyon yöntemi, SB: Su banyosunda bekletme yöntemi, ÇE: Çalkalamalı etüvde bekletme yöntemi UV: UV ışık altında bekletme yöntemi, T: Tanımlanamadı, +: Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç

Tablo 4.7 (Devam): Pozitif sonuç elde edilen izolatlara ait karşılaştırma tablosu

Bakteri Kodu	İzolasyon Kaynağı	İzolasyon Yöntemi	Çizgi Ekim Yöntemi	Agar Kaplama Yöntemi	MİK/MBK	Bakterinin Türü
S13	Sediment (Maltepe)	UV	-	+	+	<i>Streptomyces</i> sp.
S15	Sediment (Maltepe)	UV	+	-	-	T
S17	Sediment (Maltepe)	UV	-	-	+	<i>Streptomyces</i> sp.
S18	Sediment (Maltepe)	UV	+	+	+	<i>Streptomyces griseorubens</i>
S20	Sediment (Maltepe)	UV	+	+	+	<i>Streptomyces violascens</i>
S22	Sediment (Maltepe)	UV	+	+	+	T
S27	Sediment (Maltepe)	UV	+	-	-	<i>Streptomyces coelicolor</i>
S28	Sediment (Maltepe)	UV	+	-	-	<i>Streptomyces rutgersensis</i>
S34	Sediment (Kaşık Adası)	UV	-	+	-	T

MF: Membran filtrasyon yöntemi, SB: Su banyosunda bekletme yöntemi, ÇE: Çalkalamalı etüvde bekletme yöntemi UV: UV ışık altında bekletme yöntemi, T: Tanımlanamadı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Actinomyce’ler ürettikleri biyoaktif maddelerle bilinen Gram pozitif, filamentli, çoğunlukla sporlu, genomlarında yüksek G+C oranı içeren bakterilerdir. Bu bakteriler üretildikleri besiyerinde substrat ve hava hifleri olarak bilinen hif yapıları ile ayırt edilebilirler. Sahip oldukları substrat hifleri agarın içerisine difüze olmalarını sağlarken hava hifleri genelde spor yapılarını taşımaktadır. Görünümleri nedeniyle çoğunlukla funguslarla karıştırılan bu bakterileri mikroskopik ve makroskopik incelemelerle ayırt etmek mümkündür. Bu sebeple birçok çalışmada araştırmacıların bu bakterilerin tanımlanmasında makroskopik olarak koloni morfolojisi ve mikroskopik olarak da hif yapılarının tespitini temel aldıklarını görmek mümkündür (Mahajan ve Balachandran, 2012; Bhatti ve diğ., 2017).

Actinomyce’ler doğada toprak ya da sediment gibi çeşitli ortamlarda yoğun olarak bulunan bakterilerdir. Bu bakteriler toprak, sediment, tatlı ve tuzlu su dahil olmak üzere çeşitli ortamlardan, kompostlar, bitki ve hayvanlar gibi organizmaların dokuları gibi çeşitli yerlerden izole edilebilirler (Mahajan ve Balachandran, 2012).

Yaptığımız literatür araştırmalarında Marmara Denizi’nde bulunan *Actinomyce*’lerin varlığına ya da antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma bulunmamıştır. Marmara Denizi’nin mikrobiyal çeşitliliği üzerine çeşitli araştırmalar yapılsa da *Actinomyces* çeşitliliği üzerine yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden Marmara Denizi’nin farklı lokasyonlarından çeşitli su ve sediment örnekleri, tüplü dalış yapılarak toplanmıştır. Danovaro ve diğ. (2009) yaptıkları çalışmada müsilajın bulunduğu ortamda prokaryotik çeşitliliğin arttığını buna ek olarak ortamda bulunan patojenik bakteri miktarının da arttığını bildirmişlerdir. Bu yüzden çalışmamızda topladığımız su ve sediment örnekleri 2021 yılından itibaren Marmara Denizi’nin çeşitli noktalarında gözlemlenen müsilaj oluşumlarının bulunduğu alanlar tercih edilerek yapılmıştır. Müsilaj sorunu sadece denizin yüzeyinde değil deniz ortamının derinliklerinde de bulunmaktadır. Özellikle denizin 3.5 - 4 metre derinliklerinde de yoğun olarak müsilaj problemi gözlemlenmektedir. Bu yüzden örnekler 3.5 - 4 metre derinlikten yapılmıştır. Müsilajın meydana geldiği bölgeden örnekleme yapmamızın en temel sebebi müsilaja bağlı olarak ortamdaki patojenik bakteri miktarı arttıkça

orada yaşayan *Actinomycetes* gibi antibakteriyel madde sentezleme yetenekleri bulunan bakterilerin de artabileceğidir.

Su örnekleri membran filtrasyon yöntemi ve direkt ekim yöntemi kullanılarak çalışılırken sediment örnekleri çeşitli ön işlemler uygulandıktan sonra seri sulandırma yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Membran filtrasyon yönteminde 50 ml su örneği süzülüp filtreler besiyerinin üzerine alınırken direkt ekim yönteminde 100 µl su örneği besiyerine inoküle edilmiştir. Toplanan su örneklerinden 1, 2 ve 3 numaralı örneklerde *Actinomycete* bakterileri elde edilebilmiş, bununla birlikte 4 numaralı su örneğinden *Actinomycete* şüpheli herhangi bir koloni ürememiştir. Su örneklerinden izolasyonu yapılan bakteriler genellikle membran filtrasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Membran filtrasyon yönteminde daha çok bakteri izole edilmesinin temel nedeninin çalışılan su örneği miktarı olduğu düşünülmektedir.

Sediment örneklerinden izole edilen bakterilerin ise büyük çoğunluğu UV ışığı altında bekletme sonucunda elde edilmiştir. İkinci etkili yöntemin ise 60°C'lik su banyosunda bekletme olduğu görülürken 30°C'lik çalkalamalı etüvde bekletmenin en az etkili olduğu tespit edilmiştir. UV ışık, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların birçoğu üzerinde öldürücü bir etkiye sahiptir. Bakterilerin sahip olduğu spor yapılarının bakterilere çeşitli stres koşullarına karşı direnç sağladığı bilinmektedir (Nicholson ve diğ., 2002). *Actinomycete*'lerin de UV ışık altında hayatta kalabilmelerinin sebebi sporlu yapıda olmaları olabilir. Aynı şekilde sporlar sıcaklığa karşı da bakterilerin direnç kazanmalarını sağlamaktadır. Bu yüzden örnekleri UV ışık altında ve sıcak su banyosunda bekletme gibi uygulanan yöntemler çeşitli Gram pozitif ve negatif bakterilerin yanı sıra fungusların da ölmesine neden olarak ortamda bulunan *Actinomycete*'lerin üremesine olanak sağlamış olabilir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalar *Actinomycete*'lerin seçici izolasyonu için çeşitli radyasyon uygulamalarının da kullanılabileceğini belirtmektedir. *Streptosporangium*, *Rhodococcus*, *Nocardiopsis*, *Nocardia* cinsi *Actinomycete*'lerin izolasyonunda yüksek frekanslı ışıma kullanılırken *Nocardiopsis*, *Nocardia* ve *Pseudonocardia* gibi *Actinomycete*'lerin izolasyonunda UV ışığının uygun olduğu belirtilmektedir (Bredholt ve diğ., 2008; Kumar ve Jadeja, 2016). Sediment örneklerinin toplandığı lokasyon göz önüne alındığında en yüksek *Actinomycetes* izolasyonu Orhangazi Parkı/Maltepe bölgesinde yapılmıştır. En az *Actinomycetes* izolasyonu ise Heybeliada örneğinden elde edilmiştir.

Ekimleri yapılan Petri kapları 28°C’de 4 hafta boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca Petri kapları her gün makroskobik olarak incelenmiştir. *Actinomycete* bakterilerinin karakteristik özelliklerinden olan agara difüze olarak üreyen ve hifli yapı gösteren kolonilerden (Srinivasan ve diğ., 1991) hazırlanan preparatlar Gram yöntemi ile boyanıp incelenmiştir. Gram boyama sonucunda Gram pozitif ve filamentli yapıda olduğu gözlemlenen koloniler saf kültür elde edebilmek amacıyla yeni besiyeri ortamına aktarılaraq inkübatöre kaldırılmıştır. 28°C’de üreyen *Actinomycete* şüpheli suşlardan -20 °C ve -86°C’de saklamak üzere %20 gliserin içeren süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu sayede sonraki deney aşamalarında kullanılacak bakterilerin minimum sayıda pasajlanması sağlanmıştır. Laboratuvar ortamında sık pasaj alınması ve bakterilerin yapay ortamda muhafazası izolatların birçok özelliğini kaybetmelerine sebep olabilmektedir. Ayrıca izolatların sık sık pasajlanması istenmeyen mutasyonlara da sebep olabilir. Bu sebeplerle çalışmalarda hazırlanan bu stok kültürler kullanılarak toplam pasaj sayısı sınırlandırılmıştır.

Toplanan su ve sediment örneklerinde *Actinomycetes* izolasyonunu ve çeşitliliğini artırmak amacıyla farklı besin konsantrasyonlarına sahip ISP2, M6 ve GM2 besiyerleri tercih edilmiştir. Bu besiyerlerine çeşitli fungal ve bakteriyel türlerin üremesini baskılamak için antifungal ve antibakteriyel maddeler eklenmiştir. Ayrıca *Actinomycete*’lerin üreme potansiyellerini arttırmak amacıyla besiyerleri ½ deniz suyu ile hazırlanmıştır (Palla ve diğ., 2018). Burada kullanılan deniz suyu, örneklerin toplandığı alanlardan alınmıştır. Çalışmamız kapsamında izole edilen bakteri sayıları göz önünde bulundurulduğunda en etkili besiyeri ortamının ISP2 olduğu, bunu sırasıyla GM2 ve M6 besiyerlerinin takip ettiği tespit edilmiştir. Çeşitli sünger örneklerinden *Actinomycetes* izolasyonu yapılan bir çalışmada benzer olarak bakteri izolasyonu için çeşitli besiyerleri kullanılmış ve en etkili besiyerlerinden bir tanesinin ISP2 besiyeri olduğunu belirlenmiştir. (Cheng ve diğ., 2015).

Actinomycete’lerin ürettiği biyoaktif maddelerle ilgili ilk keşif Waksman ve arkadaşları tarafından *S. griseus*’tan streptomisin antibiyotiğinin keşfi ile başlamıştır. Streptomisinin tüberküloz etmeni bakterilerin üzerinde antibakteriyel etkisinin tespit edilmesi ile antibiyotiğin altın çağı başlamıştır diyebiliriz. Bu dönemin ardından *Actinomycete*’lerden çok sayıda antibakteriyel maddenin elde edilebileceği fark edilmiş ve günümüzde kullandığımız β -laktamlar, tetrasiklinler, rifamisinler, aminoglikozitler, makrolidler ve glikopeptidler gibi

gruplara ayrılan antibiyotiklerin keşfi yapılmıştır (Mahajan ve Balachandran, 2012; Genilloud, 2017).

Tez çalışmamız kapsamında elde edilen izolatların antibakteriyel aktiviteleri birincil ve ikincil yöntemlerle taranmıştır. Birincil tarama yönteminde antibakteriyel etkisi ile patojen mikroorganizma bir araya getirildiği için bu yöntem genelde antibakteriyel etkili izolatları tespit etmek için kullanılmaktadır. İkincil tarama yöntemi ise ileriki çalışmalarda kullanılacak izolatların belirlenmesi ya da antibakteriyel maddenin etki oranı gibi verilerin elde edilmesi açısından önemlidir (Gurung ve diğ., 2009). Çalışmamızda birincil tarama yöntemleri olarak *Actinomycte* bakterileri ile patojen bakterilerin direkt olarak bir araya getirildiği çizgi ekim ve agar kaplama yöntemleri uygulanmıştır. İkincil taramada ise *Actinomycte* bakterilerine ait sekonder metabolitlerin antibakteriyel etkisini tespit etmek için izolatlarımıza ait süpernatant örneklerinin patojen bakteriler üzerine denendiği disk difüzyon ve MİK/MBK yöntemleri uygulanmıştır. Antibakteriyel etkinin sekonder metabolit üretiminden kaynaklandığının tespit edilebilmesi için birincil taramaya ek olarak ikincil taramanın da yapılması gerekmektedir.

Birincil taramada uygulanan çizgi ekim ve agar kaplama yöntemlerinden çizgi ekim yönteminin agar kaplama yöntemine göre antibakteriyel etkiyi tespit etmekte daha etkili olduğu gözlemlenmektedir. Uyguladığımız birincil tarama yöntemlerinden çizgi ekim yönteminde 13 farklı *Actinomyctes* izolatı; agar kaplama yönteminde ise 7 farklı *Actinomyctes* izolatı denenilen Gram pozitif ve Gram negatif patojenlerin en az birine karşı etki göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre izolatlarımız Gram pozitif patojenlere Gram negatif patojenlere olduklarından daha yüksek oranda antibakteriyel etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Gurung ve diğ. 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında *Actinomycte* bakterilerinin Gram pozitif bakteriler üzerinde Gram negatiflere kıyasla daha yoğun antibakteriyel etkiye sahip olduğunu tespit etmişler ve bu durumu Gram negatif bakterilerin sahip oldukları lipopolisakkarit tabakanın bakterilerin antibakteriyel maddeye karşı direnç sağlamasına yardımcı olduğu şeklinde açıklamışlardır.

Çalışmamız sırasında uyguladığımız agar kaplama yöntemi *Actinomycte*'lerin antibakteriyel etkinliklerinin tespit edilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntemde *Actinomycte* izolatı besiyerinin ortasına batırma ekim yöntemi ile ekilmiş ve 28°C' de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda patojen bakteri süspansiyonu içeren yumuşak agar *Actinomycte* içeren Petri kabına dökülmüştür. Bu yöntemi uygularken ortamın

Actinomyces bakterisi tarafından kontamine olmasını engellemek amacıyla ekimi yapılan bakteri öldürülmektedir. Yapılan çalışmalarda genelde *Actinomyces* bakterisini öldürmek için az miktarda kloroform bakteri kolonisinin üzerine damlatılmakta daha sonra ise bu kloroform Petrinin kapağı açılarak uçurulmaktadır (Chougule ve diğ., 2007). Kloroformun toksik bir madde olmasının yanı sıra besiyerinden tam olarak uçmamasının da bakteriler üzerinde antibakteriyel bir etki yaratabileceğini düşünerek çalışmamızda bu yöntemi modifiye ederek uyguladık. Çalışmamız kapsamında *Actinomyces* ektiğimiz Petri kaplarını patojen bakteri süspansiyonu içeren yumuşak agar dökmeden hemen önce 45 dakika UV ışığına maruz bırakarak bakterileri öldürüp agar kaplama yöntemini uyguladık.

Çizgi ekim yönteminde en az bir patojene etki göstermesine rağmen agar kaplama yönteminde pozitif sonuç vermeyen izolatlar bulunmaktadır. Bunun dışında yine çizgi ekim yönteminde birkaç farklı patojen bakteriye karşı etkili olan *Actinomyces* izolatlarının agar kaplama yönteminde daha sınırlı sayıda patojene etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu şekilde sonuç almamızın sebebi, çizgi ekim yönteminde patojen bakteriler ile *Actinomyces* izolatlarının direkt olarak yan yana ekilmesi sebebiyle patojen ile temas eden *Actinomyces* bakterilerinin antibakteriyel aktivite gösteren metabolitlerini sentezleme yönünde indüklenmesi olabilir. Buna ek olarak, *Actinomyces*'ler tarafından salgılanan antibakteriyel metabolit agar kaplama yönteminde kullandığımız yumuşak agarın içerisinde yeteri kadar difüze olamamış ve bu yüzden patojene karşı yeterli etkiyi göstermemiş olabilir. Gebreyohannes ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada su ve sediment örneklerinden izole ettikleri *Actinomyces* suşlarının çizgi ekim ve agar kaplama yöntemi ile antibakteriyel etkinliklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada çeşitli *Actinomyces* suşlarının çizgi ekim yönteminde etki gösterirken agar kaplama yönteminde etki göstermediği, buna ek olarak agar kaplamada pozitif sonuç alınan bazı izolatların çizgi ekim yönteminde etki göstermediğine dair sonuçlara yer verilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle uyurken *Actinomyces* bakterilerinin farklı antibakteriyel etkinlik testleri ile farklı sonuçlar gösterebileceği ortaya çıkmaktadır.

Yukarıdaki sonuçlara ek olarak, çalışmamız sürecinde bazı izolatlarımızın çizgi ekim yönteminde antibakteriyel etki göstermediği suşlara karşı agar kaplama yönteminde antibakteriyel bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum daha önce belirtildiği gibi sekonder metabolitin agarda yeterince iyi difüze olamaması ile açıklanabilir. Çizgi ekim

yönteminde hazırlanan agar standart agar miktarında hazırlanırken agar kaplama yönteminde kullanılan agar standarta göre azaltılarak hazırlanmıştır. Bu yüzden bazı izolatları agar kaplama yönteminde antibakteriyel etki göstermiş olabilir.

Tez çalışmamızda Marmara Denizi'nden toplam 35 *Actinomycete* bakterisi izole edilmiştir. Bu bakterilerden %37.14'ü (13 izolat) çizgi ekim yönteminde en az bir patojen bakteri üzerinde etkili olmuştur. %20'si (7 izolat) ise agar kaplama yönteminde en az bir patojen bakteriye karşı etkinlik göstermiştir. Birincil tarama yönteminde en etkili sonuçları veren izolat S10 kodlu *Streptomyces xinghaiensis* bakterisidir. Daha sonra *Streptomyces* sp. olarak belirlenen S8, *Streptomyces bacillaris* olarak belirlenen S9, *Streptomyces griseorubens* olarak belirlenen S18 ve S22 kodlu bakterilerin en yüksek etkinliğe sahip bakteriler oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında antibakteriyel etkinliklerini test ettiğimiz en çok sayıda patojene etkili olan S10 kodlu *Streptomyces xinghaiensis* bakterisi birincil tarama sonucunda *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. enterica*, *K. pneumonia* ve *B. subtilis* izolatlarının tamamına karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Çizgi ekim yönteminde en yüksek inhibisyon zonu *S. aureus* bakterisine karşı elde edilirken, agar kaplama yönteminde ise en yüksek inhibisyon zonu *B. subtilis*, ardından *S. aureus* bakterisine karşı gözlemlenmiştir. Yüksek oranda etkinlik gösteren izolatlarımızdan bir diğeri S18 izolatıdır ve bu izolatın türü *Streptomyces griseorubens* olarak belirlenmiştir. S18 çizgi ekim yönteminde en yüksek inhibisyonu zonunu *B. subtilis*'e karşı gösterirken, agar kaplama yönteminde en yüksek inhibisyon *S. epidermidis*'e karşı gözlemlenmiştir. S18 izolatının *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı da antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. S9 izolatı ise çizgi ekim yönteminde en yüksek antibakteriyel etkiyi *S. aureus* bakterisine karşı gösterirken agar kaplama yönteminde *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı göstermiştir.

Çizgi ekim yönteminde en etkili izolatların S9, S10 ve S18 bakterileri olduğu tespit edilirken, agar kaplama yönteminde en etkili suşların bu izolatlara ek olarak S13 olduğu belirlenmiştir. S13 bakterisi *B. subtilis*'e karşı önemli oranda antibakteriyel etki göstermiştir.

Pozitif kontrol olarak kullandığımız azitromisin ve tetrasiklin antibiyotikleri ile kıyaslandığında izolatlarımızın bazılarının çok daha yüksek antibakteriyel etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* bakterisine karşı S9, S10, S18 ve S34

kodlu izolatlar, *S. epidermidis* bakterisine karşı S10, S18 kodlu izolatlar, *B. subtilis* bakterisine karşı ise S9, S10 ve S13 izolatları kontrol antibiyotiklerine kıyasla önemli oranda daha etkili olmuşlardır. Gram negatif bakterilerden ise *E. coli*, *S. enterica* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı S10 izolatu kontrol antibiyotiklerine kıyasla önemli oranda daha etkili oldukları belirlenmiştir.

Birincil taramanın ardından izolatların tamamı için ikincil taramalar yapılmıştır. İkincil tarama için *Actinomyces* bakterilerinin en yoğun olarak üredikleri ISP2 besiyerinin sıvı hali tercih edilmiştir. Çalışmamız kapsamında kullandığımız izolatlar denizel ortamdan izole edilmiştir ve yaşamaya adapte oldukları deniz ortamlarında düşük besin miktarı söz konusudur (Yaradoddi ve diğ., 2021). Bu yüzden bakterilerin sekonder metabolit üretimini arttırmak amacıyla ortamın besiyeri miktarı düşürülmüştür. Bununla birlikte bakteriler yine strese girdikleri durumlarda da sekonder metabolit üretimlerini arttırmaktadır. Besiyeri içeriğini yarıya düşürmemizin bir diğer nedeni de bu ihtimali göz önünde bulundurmamızdır. Başka bir deyişle besiyeri miktarı bakterilerin optimum üreme ortamları veya strese bağlı sekonder metabolit üretim aktiviteleri göz önünde bulundurulurken yarı yarıya azaltılmıştır. Tez çalışmamızın ön denemelerinde besin miktarı azaltılmadan hazırlanan ISP2 sıvı besiyerinden elde edilen süpernatantlarda antibakteriyel etkinlik tespiti yapılamazken, besiyeri miktarı azaltıldığında antibakteriyel etkinlik gözlemlenmeye başlanmıştır. Bu durum izolatlarımızın düşük besin miktarı ile sekonder metabolit üretimlerini arttırdıklarını kanıtlar niteliktedir.

Tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz sekonder metabolit içeren süpernatantlar hem disk difüzyon yönteminde hem de MİK/MBK belirlenmesinde kullanılmıştır. Yapılan disk difüzyon deneylerinde bir sonuç elde edilememiştir. Bu durum genellikle sekonder metabolitin içerisinde bulunan antibakteriyel etki gösteren bileşiklerin az miktarda olduğu ve/veya bu yüzden agarda yeterince iyi difüze olamadığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Uygulanan ikincil tarama yönteminde ise disk difüzyon metodunda herhangi bir sonuç alınamazken izolatların % 28.57'si (10 izolat) MİK/MBK deneylerinde pozitif sonuç vermiştir. Sekonder metabolitin aktivitesini tespit etmeye çalıştığımız MİK/MBK yönteminde en etkili sonuçlar S9, S13 ve S18 bakterilerinden elde edilmiştir. 2004 yılında Pandey ve arkadaşları *Actinomyces* izolatlarının ilk olarak çizgi ekim yöntemi ile ardından MİK yöntemi ile antibakteriyel etkinliklerini tespit etmeye çalıştıkları araştırmalarında birincil ve

ikincil tarama arasında farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalar agar kullanılarak yapılan birincil yöntemlerde antibakteriyel etki göstermesine rağmen sekonder metabolitin elde edilmesi ile çalışılan ikincil yöntemlerde etki göstermeyen *Actinomycete*'lerin sahip oldukları filamentli yapının sıvı kültürde daha farklı bir yapıda olmasından dolayı etkinlik göstermiyor şeklinde yorumlanmaktadır (Pickup ve diğ., 1993; Pandey ve diğ., 2004; Gurung ve diğ., 2009). Ayrıca Sapkota ve diğ., (2020) yaptıkları çalışmada da birincil ve ikincil tarama sonuçları arasında farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada birincil tarama yöntemlerinde pozitif sonuç elde edilmesine rağmen ikincil tarama yöntemlerinde pozitif sonuç elde edilmemesinin sıklıkla rastlanılan bir sonuç olduğu vurgulanırken bunun nedeninin *Actinomycete*'ler tarafından sentezlenen biyoaktif bileşiklerin sıvı besiyeri ortamına salınması sırasında inaktif hale gelmesi ya da kimyasal olarak modifiye oluyor olmasının neden olabileceği belirtilmiştir.

Özcan ve diğ. (2013) Karadeniz, Ege Denizi ve Akdeniz'den toplanılan sediment örneklerinden *Actinomycetes* izolasyonu yaptıkları çalışmalarında toplam 261 bakteri izole etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada çeşitli izolatların MRSA, enteropatojenik *E. coli* 0157:H7, vankomisine dirençli *E. faecium*, *C. albicans* ve *P. aeruginosa* gibi çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. İzolatların % 25.6' sının en az bir patojene karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenirken izolatların büyük çoğunluğunun *Streptomyces* cinsi olduğu tespit edilmiştir. *Streptomyces* cinsinin yanı sıra bir tane *Nocardia alba* izolasyonu yapılmıştır. Araştırmacıların izolatlarının arasında yer alan *Streptomyces griseorubens*, *Streptomyces coelicor* ve *Streptomyces rutgersensis* bakterileri tez çalışmamız kapsamında da izole ettiğimiz antibakteriyel etkinliğe sahip türler arasında yer almaktadır.

Mohseni ve diğ. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada Hazar Denizi'ne ait 5-10 metre derinliklerden toplanan sediment örneklerinden elde edilen *Actinomycetes* izolatlarının antibakteriyel etkinlikleri ilk olarak çizgi ekim yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Typhi* ve *K. pneumonia* gibi patojenler kullanılmıştır. İzolatların yarısından fazlası en az bir patojene karşı antibakteriyel özellik gösterirken MN2, MN3, MN38, MN39, MN40, MN41 ve MN44 kodlu izolatlarının en etkili izolatlar oldukları tespit edilmiştir.

Hindistan sahillerinden toplanan çeşitli sediment örneklerinden *Streptomyces*, *Glycomyces*, *Nocardiopsis*, *Nocardiodes*, *Actinopolyspora*, *Nocardia*, *Kibdelosporangium*, *Actinosynnema*, *Actinomadura*, *Thermoactinomyces*, *Kineosporia* ve *Saccharopolyspora* cinslerine ait izolatlar elde edilmiştir. Bu çalışmada da dominant olan cinsin *Streptomyces* olduğu belirlenmiştir. İzole edilen suşların % 30' undan fazlası çizgi ekim yönteminde *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* patojenlerinden bir tanesine karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir. *Streptomyces* sp. RM17 ve *Streptomyces* sp. RM42 izolatları en etkili izolatlar olma özellikler gösterdikleri için bu izolatlara ait çeşitli çözücülerle çözündürülmüş sekonder metabolit ekstraktları denenilen patojenlerin yanı sıra *S. Typhi* ve *Cryptococcus neoformans* üzerinde de antimikrobiyal özellik göstermiştir (Remya ve Vijayakumar, 2008).

Valli ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada izole ettikleri *Streptomyces* cinsine ait izolatların diğer *Actinomycete*' lere kıyasla daha fazla antagonist özellikte olduklarını tespit etmişlerdir. Bu durum *Actinomycete*'lerden elde edilen biyoaktif maddelerin yaklaşık % 75' inin *Streptomyces* cinsi bakterilerden elde edilmesine paralel nitelikte bir çalışmadır (Kurtböke, 2012). Umman Denizi'ne ait sediment örneklerinden *Actinomycetes* izolasyonu yapılan bir çalışmada izole edilen 168 izolatının çoğunluğu *Streptomycetaceae* olmak üzere *Micromonosporaceae*, *Nocardiaceae* ve *Pseudonocardiaceae* ailelerinin üyeleri olduğu tespit edilmiştir. İzolatların yaklaşık % 23.8' inin *S. aureus*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* ve *A. niger* patojenlerinden en az bir tanesine karşı antibakteriyel etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan 16S rRNA gen dizilemesi ile en güçlü aktivite gösteren izolatların *Streptomyces* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir (Gozari ve diğ., 2019). Benzer olarak çalışmamız kapsamında antibakteriyel etkisini tespit ettiğimiz izolatlarında büyük çoğunluğu *Streptomyces* cinsine aittir.

Antibakteriyel etkinlikleri tespit edilen izolatların adlandırmasının yapılması için izolatların ilk olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonunun ardından PZR yöntemi uygulanarak elde edilen DNA ürünleri çoğaltılmıştır. PZR ürünlerine ait sekans sonuçları Sanger dizileme yöntemi ile elde edilmiştir. Elde edilen DNA dizilerine BLAST analizi yapılarak NCBI veri tabanında taranarak izolatlarımızın filogenetik olarak en yakın olduğu türler belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre adlandırılabilen *Actinomycetes* izolatlarının % 76 'sının *Streptomyces*, % 8'inin *Nocardiopsis*, % 8'inin *Micromonospora* cinsine ve % 8'inin *Nonomuraea* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces* cinsine ait izolatların

birçok *Actinomycetes* türüne göre doğada daha yoğun olduğu bilinmektedir. Buna paralel olarak bizler de çalışmamızda yoğun olarak *Streptomyces* cinsine ait izolatların tespitini yapmış bulunmaktayız.

Cheng ve diğ. 2015 yılında yaptıkları çalışmada farklı Yunan adalarından topladıkları sünger örneklerindeki *Actinomycetes* çeşitliliğini belirlemeye çalışmışlardır. En yüksek oranda *Streptomyces* cinsi suş izolasyonu yapılırken *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Dietzia*, *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Geodermatophilus*, *Modestobacter* cinsi *Actinomycete* bakterilerinde izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatların bir kısmının antimikrobiyal etkinliğe sahip oldukları da yapılan çalışmada belirlenmiştir

Farklı denizlerden aynı cinslere ait örneklerin izolasyonu mümkün olsa da tür bazında büyük çeşitlilikler ortaya çıkabilmektedir. Örneğin Tuncer ve Bizsel (2017) Akdeniz ve Ege Denizi'nin Türkiye kıyılarından çeşitli sediment örnekleri topladıkları çalışmalarında çeşitli *Streptomyces* ve *Nocardiopsis* türleri izole etmişlerdir. Ancak izole ettikleri türlerin tamamı bizim Marmara Denizi'nden izole ettiğimiz *Actinomycetes* türlerinden farklıdır. Bu durum denizlerdeki mikrobiyal çeşitliliği ortaya çıkarırken Türkiye sınırlarında yer alsalar da farklı denizlerden farklı türlerin izolasyonunun yapılabileceğini ortaya koymaktadır. İzolasyonu yapılan her farklı tür yeni biyoaktif bileşik keşfedilmesi ihtimali anlamına geldiği için denizlerimizdeki çeşitliliğin tespiti önemlidir.

Antibiyotik dirençliliğinin küresel bir sorun olarak ilan edildiği günümüzde yeni antibakteriyel kaynaklara olan ihtiyaç da artmaktadır (Aslam ve diğ., 2018). Birçok araştırmacı grubu tarafından yeni ve doğal antibakteriyel madde elde edilmesine yönelik çalışmalar hızla devam ederken özellikle denizel ortamlar keşfedilmemiş birçok mikroorganizma türüne ya da biyoaktif maddeye ev sahipliği yapıyor olabilir. Marmara Denizi gibi özellikle endüstriyel ve şehir atıkları bakımından yoğun kirliliğe maruz kalan ve hatta bu kirliliğe bağlı olarak tür çeşitliliğinde ciddi kayıpların söz konusu olduğu veya müsilajın aşırı çoğalması sorunları olan denizlerde patojen mikroorganizma miktarı da artış göstermektedir. Bu durum denizde yaşamaya adapte olmuş *Actinomycetes* gibi bakterilerin ortamda bulunan diğer patojenlerle rekabet etmek amacıyla etkili, yeni ve yüksek oranda biyoaktif bileşik sentezlemesi ile sonuçlanabilir. Bu bilgilere dayanarak çalışmamız için tercih ettiğimiz Marmara Denizi'nden elde ettiğimiz *Actinomycete*'lerin yeni antibakteriyel madde sentezleme potansiyelleri bulunmaktadır.

Chakraborty ve diğ., (2015) sediment örneklerinden izole ettikleri *S. bacillaris* izolatının *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi* ve *Aeromonas hydrophilla* gibi çeşitli balık patojenleri üzerine etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise yine sediment örneklerinden izole edilen *S. bacillaris* türü izolatın çoklu ilaca dirençli *S. aureus*, MRSA, *Acinetobacter baumannii* ve çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Wahaab ve Subramaniam, 2018). Bu çalışmalara ek olarak Marmara Denizi'nden izole ettiğimiz S9 kodlu *S. bacillaris* izolatı ise çalışılan patojenlerden *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis* üzerine antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Bu sonuçlara bakıldığında *S. bacillaris*'in farklı patojen bakterilere karşı etkili antibakteriyel özelliğe sahip bileşikler sentezlediği ortaya konulmaktadır.

En çok sayıda patojene karşı etkili olduğunu belirlediğimiz S10 kodlu *Streptomyces xinghaiensis*'in yapılan farklı çalışmalarda da izole edildiği ve çeşitli patojenlere karşı antibakteriyel özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Zhao ve diğ., (2009) sedimentten izole ettikleri *S. xinghaiensis*'in *E. coli*, *S. aureus* ve *B. subtilis* bakterilerine antibakteriyel aktivite gösterirken *C. albicans* ve *A. niger* mantarlarına karşı da antifungal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan bir çalışmada *S. xinghaiensis*'in, *B. thuringiensis*, *C. albicans* ve flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarına karşı antimikrobiyal bir etki gösterdiği de belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2020).

S. griseorubens türüne ait olduğu belirlenen S18 kodlu izolat *S. aureus* ve *S. epidermidis* patojenleri başta olmak üzere çeşitli bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Paderog ve diğ., (2020) sedimentlerden izole ettikleri *S. griseorubens* izolatının *S. aureus* bakterisine karşı antibakteriyel etki gösterdiğini belirlerken, Yang ve diğ., (2021) yaptıkları bir çalışmada sedimentten elde edilen *S. griseorubens* izolatının *S. aureus*, *K. aerogenes* ve *P. vulgaris* patojenlerine karşı antibakteriyel etkisini belirlemişlerdir.

Günümüze kadar toprakta bulunan ana mikroorganizma gruplarından olan *Actinomycete*'ler ve sahip oldukları biyoaktif maddelerle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu durum zamanla toprakta yaşayan *Actinomycete* bakterilerinden keşfedilen yeni bileşik miktarında azalmaya neden olmuştur. Bu yüzden hem geniş bir bakteriyel popülasyona sahip olan hem de daha sınırlı olarak araştırılmış denizel ekosistemlerden *Actinomycetes* izolasyonu ve

ürettikleri sekonder metabolitler üzerine yapılan çalışmaların çok daha umut vaad edici sonuçlar ortaya koyabileceği de düşünülmektedir (Mincer ve diğ., 2002).

Çalışmamızda izole ettiğimiz ancak antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığını belirlediğimiz çeşitli izolatlarımıza da bulunmaktadır. Bu izolatlardan bir tanesi *Micromonospora aurantiaca* izolatıdır. Yapılan çeşitli çalışmalarda *Micromonospora* cinsine ait bakterilerin biyokontrol ajanı, biyoyakıt üretiminde kullanımı ya da antikanser özellikte ilaç olarak kullanımı potansiyeli olduğu belirtilmektedir (Hirsch ve Valdés, 2010). Bunlara ek olarak nadir bulunan *Actinomycete*'lerden olduğu bilinen *Nonomuraea* cinsine ait suşlarında izolasyonu yapılmış ve bu bakterilere ait antibakteriyel aktivite tespiti yapılamamıştır. *Nonomuraea* cinsine ait çeşitli izolatların antikanser ve antipsikotik özellikte biyoaktif maddeler ürettiği tespit edilmiş (Sungthong ve Nakaew, 2015) olmasına karşın çalışmamız kapsamında izole ettiğimiz *N. ferruginea* türüne ait yeterli çalışma literatürde bulunmamaktadır. Yaptığımız tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz *Actinomycete* izolatları sadece antibakteriyel olarak biyoaktif maddeler sentezleme potansiyellerinin yanı sıra farklı özellikte yeni biyoaktif madde sentezleme potansiyellerinin araştırılması açısından da önemlidir.

Tez çalışmamız kapsamında sekonder metabolitlerinden antibakteriyel etkinin tespit edildiği izolatlar için daha ileri analizlerin yapılması da hedeflenmektedir. Yaptığımız çeşitli literatür araştırmalarında yapılan birçok çalışmada elde edilen metabolitin çeşitli çözücüler içerisinde çözündürülerek antibakteriyel etkisi üzerine çalışıldığı ve bu ekstraktların daha sonra gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi ileri analizler için kullanıldığı tespit edilmiştir (Tan ve diğ., 2015; Rajivgandhi ve diğ., 2018). Bu sebeple, bu yüksek lisans tezinin devamında elde edilen sekonder metabolitlerin ileri analiz yöntemleri ile incelenmesi ve sahip oldukları potansiyellerin belirlenmesi planlanmaktadır. |

KAYNAKLAR

- Abbas, I. H., 2006, A biological and biochemical studies of actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait, *Journal of Applied Science Research*, 2(10), 809-815.
- Abdelmohsen, U. R., Yang, C., Horn, H., Hajjar, D., Ravasi, T., & Hentschel, U., 2014, Actinomycetes from Red Sea sponges: sources for chemical and phylogenetic diversity, *Marine drugs*, 12(5), 2771-2789.
- Abd-Elnaby, H., Abo-Elala, G., Abdel-Raouf, U., Abd-elwahab, A., & Hamed, M., 2016, Antibacterial and anticancer activity of marine *Streptomyces parvus*: optimization and application, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(1), 180-191.
- Acharyabhata, A., Kandula, S. K., & Terli, R., 2013, Taxonomy and polyphasic characterization of alkaline amylase producing marine actinomycete *Streptomyces rochei* BTSS 1001, *International Journal of Microbiology*.
- Adegboye, M. F., & Babalola, O. O., 2013, Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites, *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, Formatex, Badajoz, 8(4), 786-795.
- Akshatha, J. V., Prakash, H. S., & Nalini, M. S., 2016, Actinomycete endophytes from the ethno medicinal plants of southern India: antioxidant activity and characterization studies, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6(2), 166-172.
- Akshatha, V. J., Nalini, M. S., D'souza, C., & Prakash, H. S., 2014, *Streptomyces* endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake, *Letters in applied microbiology*, 58(5), 433-439.
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., & Ponmurugan, K., 2020, Chemical constituents of *Streptomyces* sp. strain Al-Dhabi-97 isolated from the marine region of Saudi Arabia with antibacterial and anticancer properties, *Journal of Infection and Public Health*, 13(2), 235-243.
- Anandan, R., Dharumadurai, D., & Manogaran, G. P., 2016, An introduction to actinobacteria, In *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*. IntechOpen Limited: London, UK.
- Andayani, D. G. S., Sukandar, U., Sukandar, E. Y., & Adnyana, I. K., 2015, Antibacterial, antifungal and anticancer activity of five strains of soil microorganisms isolated from tangkuban perahu mountain by fermentation, *Hayati Journal of Biosciences*, 22(4), 186-190.
- Anwar, S., Ali, B., & 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.

- Arifuzzaman, M., Khatun, M. R., & Rahman, H., 2010, Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity, *African Journal of Biotechnology*, 9(29), 4615-4619.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., ... & Baloch, Z., 2018, Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis, *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645.
- Azman, A. S., Othman, I., Fang, C. M., Chan, K. G., Goh, B. H., & Lee, L. H., 2017, Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare Actinobacteria from mangrove forest soils, *Indian Journal of Microbiology*, 57, 177-187.
- Babu, D. T., Archana, K., Kachiprath, B., Solomon, S., Jayanath, G., Singh, I. B., & Philip, R. (2018). Marine actinomycetes as bioremediators in *Penaeus monodon* rearing system. *Fish and Shellfish Immunology*, 75, 231-242.
- Balachandran, C., Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S., 2012, Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549), *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 1138-1146.
- Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S., & Augustine, N., 2015, Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(3), 323-330.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P., 2016, Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Baskaran, R., Vijayakumar, R., & Mohan, P. M., 2011, Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India, *Malaysian Journal of Microbiology*, 7(1), 26-32.
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K., & Ahmane, Z., 2019, Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities, *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 706-712.
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A., 2017, Actinomycetes benefaction role in soil and plant health, *Microbial Pathogenesis*, 111, 458-467.
- Borgave, S. B., Joshi, A. A., Kelkar, A. S., & Kanekar, P. P., 2012, Screening of alkaliphilic, haloalkaliphilic bacteria and alkalithermophilic actinomycetes isolated from alkaline soda Lake of Lonar, India for antimicrobial activity, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(4), 258-274.
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Jhonsen, G., Zotechev, S. B, 2008, Actinomycetes from sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and biological activity, *Marine Drugs*, 6, 12- 24.

- Chakraborty, R. D., Chakraborty, K., & Thilakan, B., 2015, Isolation and characterization of antagonistic *Streptomyces* spp. from marine sediments along the southwest coast of India, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44(1).
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., & Shrivastava, S., 2013, Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8), S83-S94.
- Cheng, C., MacIntyre, L., Abdelmohsen, U. R., Horn, H., Polymenakou, P. N., Edrada-Ebel, R., & Hentschel, U., 2015, Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges, *PloS ONE*, 10(9), e0138528.
- Chougule, V. V., Jadhav, A. R., & Deshmukh, A. M., 2007, Antagonistic activity of actinomycetes in saline soils of Sangli district, *Nature, Environment and Pollution Technology*, 6(1), 105-108.
- Danovaro, R., Fonda Umani, S., & Pusceddu, A., 2009, Climate change and the potential spreading of marine mucilage and microbial pathogens in the Mediterranean Sea, *PLoS ONE*, 4(9), e7006.
- Davies-Bolorunduro, O. F., Adeleye, I. A., Akinleye, M. O., & Wang, P. G., 2019, Anticancer potential of metabolic compounds from marine actinomycetes isolated from Lagos Lagoon sediment, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(3), 201-208.
- Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A., 2010, Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds, *Natural product research*, 24(6), 521-529.
- Demain, A. L., & Sanchez, S., 2009, Microbial drug discovery: 80 years of progress, *The Journal of Antibiotics*, 62(1), 5-16.
- Deshmukh, M. B., Sridhar, K. R., 2002, Distribution and antimicrobial activity of actinomycetes of a freshwater coastal stream, *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences*, 4(3), 335-340.
- Diraviyam, T., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R., 2011, Antioxidant activity of melanin pigment from *Streptomyces* species D5 isolated from Desert soil, Rajasthan, India, *Drug Invent Today*, 3(3), 12-13.
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M., & Mancini, I., 2014, Metabolite profile of marine-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis* WR1L1S8 by liquid chromatography-mass spectrometry and evaluation of culture conditions on antibacterial activity and mycelial growth, *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 39-50.
- Donia, M., & Hamann, M. T., 2003, Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents, *The Lancet Infectious Diseases*, 3(6), 338-348.
- Edwards, C., 1993, Isolation properties and potential applications of thermophilic actinomycetes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42, 161-179.

- El Karkouri, A., Assou, S. A., & El Hassouni, M., 2019, Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope, *The Pan African Medical Journal*, 33.
- ELnahas, M. O., Elkhateeb, W. A., & Daba, G. M., 2021, Marine actinomycetes the past, the present and the future, *Pharmaceutical Research*, 5(2), 000241.
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. S. J., & 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
- Ezeobiora, C. E., Igbokwe, N. H., Amin, D. H., Enwuru, N. V., Okpalanwa, C. F., & Mendie, U. E., 2022, Uncovering the biodiversity and biosynthetic potentials of rare actinomycetes, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 23.
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S., & Raja, N., 2013, Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(6), 426-435.
- Genilloud, O., 2017, Actinomycetes: still a source of novel antibiotics, *Natural product reports*, 34(10), 1203-1232.
- Gerber, N. N., & Lechevalier, H. A., 1965, Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes, *Applied Microbiology*, 13(6), 935-938.
- Ghanem, N. B., Sabry, S. A., El-Sherif, Z. M., & El-Ela, G. A. A., 2000, Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria, *The Journal of general and Applied Microbiology*, 46(3), 105-111.
- Gobalakrishnan, R., & Bhuvaneswari, R., 2019, Microbial fuel cells potential of marine actinobacteria *Actinoalloteichus* sp. MHA15 from the Havelock island of the Andamans, India *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 144-158.
- Gohel, S. D., & Singh, S. P., 2012, Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis alba* OK-5, *Journal of Chromatography B*, 889, 61-68.
- Goodfellow, M., & Williams, S. T., 1983, Ecology of actinomycetes, *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 189-216.
- Goodfellow, M., Stach, J. E., Brown, R., Bonda, A. N. V., Jones, A. L., Mexson, J., ... & Bull, A. T., 2012, *Verrucosipora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, 185-193.
- Gozari, M., Zaheri, A., Jahromi, S. T., Gozari, M., & Karimzadeh, R., 2019, Screening and characterization of marine actinomycetes from the northern Oman Sea sediments for cytotoxic and antimicrobial activity, *International Microbiology*, 22(4), 521-530.

- Gurung, T. D., Sherpa, C., Agrawal, V. P., & Lekhak, B., 2009, Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region, *Nepal Journal of Science and Technology*, 10, 173-182.
- Habbeche, A., Saoudi, B., Jaouadi, B., Haberra, S., Kerouaz, B., Boudelaa, M., ... & Ladjama, A., 2014, Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(4), 413-421.
- Hameş-Kocabaş, E. E., & Uzel, A., 2012, Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples, *Journal of Microbiological Methods*, 88(3), 342-347.
- Han, Z., Xu, Y., McConnell, O., Liu, L., Li, Y., Qi, S., ... & Qian, P., 2012, Two antimycin A analogues from marine-derived actinomycete *Streptomyces lusitanus*, *Marine Drugs*, 10(3), 668-676.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., & Kunoh, H., 2006, Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants, *Actinomycetologica*, 20(2), 72-81.
- Helmke, E., & Weyland, H., 1984, *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an actinomycete from the sea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2), 127-138.
- Hirsch, A. M., & Valdés, M., 2010, Micromonospora: an important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels, *Soil Biology and Biochemistry*, 42(4), 536-542.
- Hirsch, C. F., & Christensen, D. L., 1983, Novel method for selective isolation of actinomycetes, *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4), 925-929.
- Hoang, K. C., Lee, C. Y., Tseng, M., & Chu, W. S., 2007, Polyester-degrading actinomycetes isolated from the Touchien River of Taiwan, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 201-205.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., ... & Ruan, J. S., 2009, Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China, *Marine drugs*, 7(1), 24-44.
- Horikoshi, K., 1998, Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment, *Current opinion in microbiology*, 1(3), 291-295.
- Hozzein, W. N., Ali, M. I. A., & Rabie, W., 2008, A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1547-1552.
- Igarashi, Y., Iida, T., Oku, N., Watanabe, H., Furihata, K., & Miyanouchi, K., 2012, Nomimicin, a new spirotetronate-class polyketide from an actinomycete of the genus *Actinomadura*, *The Journal of Antibiotics*, 65(7), 355-359.
- Igarashi, Y., Ogura, H., Furihata, K., Oku, N., Indananda, C., & Thamchaipenet, A., 2011, Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp., *Journal of Natural Products*, 74(4), 670-674.

- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigopal, D. V. R., & Narasimha, G., 2014, Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties, *Biotechnology research international*.
- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Gopal, D. V. R., & Narasimha, G., 2018, Antiviral and larvicidal properties of novel bioactive compounds produced from marine actinomycetes, *Russian Journal of Marine Biology*, 44(5), 424-428
- Jayaprakashvel, M., 2012, Therapeutically active biomolecules from marine actinomycetes, *Journal of Modern Biotechnology*, 1(1), 1-7.
- Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G., & Fenical, W., 2005, Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 43-48.
- Kalakoutsii, L. V., & Agre, N. S., 1976, Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes, *Bacteriological Reviews*, 40(2), 469-524.
- Kar, S., & Ray, R. C., 2008, Statistical optimization of α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology, *Polish Journal of Microbiology*, 57(1), 49.
- Kekuda, T. P., Shobha, K. S., & Onkarappa, R., 2010, Potent insecticidal activity of two *Streptomyces* species isolated from the soils of the Western ghats of Agumbe, Karnataka, *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 1(1), 30-32
- Khamna, S., Yokota, A., & 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.
- Kharat, K. R., Kharat, A., & Hardikar, B. P., 2009, Antimicrobial and cytotoxic activity of *Streptomyces* sp. from Lonar Lake, *African Journal of Biotechnology*, 8(23), 6645-6648.
- Kim, N., Shin, J. C., Kim, W., Hwang, B. Y., Kim, B. S., Hong, Y. S., & Lee, D., 2006, Cytotoxic 6-alkylsalicylic acids from the endophytic *Streptomyces laceyi*, *The Journal of Antibiotics*, 59(12), 797-800.
- Kim, S. H., Ha, T. K. Q., Oh, W. K., Shin, J., & Oh, D. C., 2016, Antiviral indolosesquiterpenoid xiamycins C–E from a halophilic actinomycete, *Journal of Natural Products*, 79(1), 51-58.
- Kumar, V., Bharti, A., Gupta, V. K., Gusain, O., & Bisht, G. S., 2012, Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 871-880.
- Kumar, R. R., & Jadeja, V. J., 2016, Isolation of actinomycetes: A complete approach, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 606-618.
- Kurapova, A. I., Zenova, G. M., Sudnitsyn, I. I., Kizilova, A. K., Manucharova, N. A., Norovsuren, Z. H., & Zvyagintsev, D. G., 2012, Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone, *Microbiology*, 81, 98-108.

- Kurtböke, D. I., 2012, Biodiscovery from rare actinomycetes: an eco-taxonomical perspective, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1843-1852.
- Könönen, E., & Wade, W. G., 2015, Actinomyces and related organisms in human infections, *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 419-442.
- Lacret R, Oves-Costales D, Gómez C, Díaz C, de la Cruz M, Pérez-Victoria I, Vicente F, Genilloud O. & Reyes F., 2014, New ika-rugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis*, *Marine Drugs*, 13,128–140.
- Lam, K. S., 2006, Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 245-251.
- Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. A., 1980, Actinomycete taxonomy, *Society for Industrial Microbiology, Virginia*, 227-291.
- Lee, H. B., Kim, C. J., Kim, J. S., Hong, K. S., & Cho, K. Y., 2003, A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E- 12., *Letters in Applied Microbiology*, 36(6), 387-391.
- Li, F., Lu, S., Xie, X., Fan, S., Chen, D., Wu, S., & He, J., 2020, Antiviral properties of extracts of *Streptomyces* sp. SMU 03 isolated from the feces of *Elephas maximus*, *Fitoterapia*, 143, 104600.
- Liu, H., Qin, S., Wang, Y., Li, W., & Zhang, J., 2008, Insecticidal action of Quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2243-2248
- Ludwig, W., Euzéby, J., & Whitman, W. B., 2012, *Taxonomic outline of the phylum Actinobacteria*, In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, NY, 29-31.
- Ma, J., Cao, B., Liu, C., Guan, P., Mu, Y., Jiang, Y., ... & Huang, X., 2018, Actinofuranones DI from a lichen-associated actinomycetes, *Streptomyces gramineus*, and their anti-inflammatory effects, *Molecules*, 23(9), 2393.
- Mahajan, G. B., & Balachandran, L., 2012, Antibacterial agents from actinomycetes-a review, *Frontiers in Bioscience-Elite*, 4(1), 240-253.
- Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., & Kamma, S., 2012, Isolation, identification and molecular characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam, *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2), 83-91.
- Mast, Y., & Stegmann, E., 2019, Actinomycetes: The antibiotics producers. *Antibiotics*, 8(3), 105.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., & Lebrihi, A., 2011, Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6710-6714.

- Mesrian, D. K., Purwaningtyas, W. E., Astuti, R. I., Hasan, A. E. Z., & Wahyudi, A. T., 2021, Methanol pigment extracts derived from two marine actinomycetes exhibit antibacterial and antioxidant activities, *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(10), 4440-4447.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., & Fenical, W., 2002, Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments, *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 5005-5011.
- Mohseni, M., Norouzi, H., Hamed, J., & Roohi, A., 2013, Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2(2), 64.
- Mukhtar, S., Zaheer, A., Aiysha, D., Malik, K. A., & Mehnaz, S., 2017, Actinomycetes: a source of industrially important enzymes, *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 10(12), 316-319.
- Munn, C. B., 2011, *Marine microbiology : ecology and applications*, Garland Science; 2nd edition, ISBN 978-0-8153-6517-4
- Naikpatil, S. V., & Rathod, J. L., 2011, Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar, *Journal of Ecobiotechnology*, ISSN : 2077-0464.
- Naine, J. S., Nasimunislam, N., Vaishnavi, B., Mohanasrinivasan, V., & Devi, S. C., 2012, Isolation of soil actinomycetes inhabiting amrithi forest for the potential source of bioactive compounds, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 189-192
- Nathan, C., & Cars, O., 2014, Antibiotic resistance—problems, progress, and prospects, *New England Journal of Medicine*, 371(19), 1761-1763.
- Nicholson, W. L., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T. A., Riesenman, P. J., Law, J. F., & Xue, Y., 2002, Bacterial endospores and their significance in stress resistance, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 27-32.
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., & Lumyong, S., 2010, Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 193-203.
- Niu, S., Li, S., Chen, Y., Tian, X., Zhang, H., Zhang, G., ... & Zhang, C., 2011, Lobophorins E and F, new spirotetronate antibiotics from a South China Sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 01127, *The Journal of Antibiotics*, 64(11), 711-716.
- Njenga, W. P., Mwaura, F. B., Wagacha, J. M., & Gathuru, E. M., 2017, Methods of isolating actinomycetes from the soils of Menengai crater in Kenya, *Archives of Clinical Microbiology*, 8(3), 1-7.
- Oh, D. C., Poulsen, M., Currie, C. R., & Clardy, J., 2009, Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis, *Nature Chemical Biology*, 5(6), 391-393.

- Okoro, C. K., Brown, R., Jones, A. L., Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Goodfellow, M., & Bull, A. T., 2009, Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 121-133.
- Özcan, K., Aksoy, S. Ç., Kalkan, O., Uzel, A., Hames-Kocabas, E. E., & Bedir, E., 2013, Diversity and antibiotic-producing potential of cultivable marine-derived actinomycetes from coastal sediments of Turkey, *Journal of Soils and Sediments*, 13, 1493-1501.
- Paderog, M. J. V., Suarez, A. F. L., Sabido, E. M., Low, Z. J., Saludes, J. P., & Dalisay, D. S., 2020, Anthracycline shunt metabolites from Philippine marine sediment-derived *Streptomyces* destroy cell membrane integrity of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *Frontiers in Microbiology*, 11, 743.
- Palla, M. S., Guntuku, G. S., Muthyala, M. K. K., Pingali, S., & Sahu, P. K., 2018, Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(2), 250-256.
- Pandey, B., Ghimire, P., & Agrawal, V. P., 2004, Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal, *Journal Biology Science*, 23, 44-53.
- Patel, J. B., Wallace Jr, R. J., Brown-Elliott, B. A., Taylor, T., Imperatrice, C., Leonard, D. G., ... & Nachamkin, I., 2004, Sequence-based identification of aerobic actinomycetes, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2530-2540.
- Pathom-Aree, W., Nogi, Y., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., & Goodfellow, M., 2006, *Dermacoccus barathri* sp. nov. and *Dermacoccus profundus* sp. nov., novel actinomycetes isolated from deep-sea mud of the Mariana Trench, *International journal of systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(10), 2303-2307.
- Pickup, K. M., Nolan, R. D., & Bushell, M. E., 1993, A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotic screens, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(2), 89-93.
- Priya, B. S., Stalin, T., & Selvam, K., 2012, Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the production of ecofriendly alternative energy from waste, *African Journal of Biotechnology*, 11(78), 14320-14325.
- Prieto-Davó, A., Villarreal-Gómez, L. J., Forschner-Dancause, S., Bull, A. T., Stach, J. E., Smith, D. C., ... & Jensen, P. R., 2013, Targeted search for actinomycetes from nearshore and deep-sea marine sediments, *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 510-518.
- Pujiyanto, S., Lestari, Y. U. L. I. N., Suwanto, A., Budiarti, S., & Darusman, L. K., 2012, Alpha-glucosidase inhibitor activity and characterization of endophytic actinomycetes isolated from some Indonesian diabetic medicinal plants, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 327-333.
- Qui, P., Feng, Z. X., Tian, J. W., Lei, Z. C., Wang, L., Zeng, Z. G., ... & Tian Y. Q., 2015, Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from

traditional medicinal plants in Sichuan, China, *Chinese journal of natural medicines*, 13(12), 942-953.

Rahman, M., Islam, M. Z., Islam, M., & Ul, A., 2011, Antibacterial activities of actinomycete isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh, *Biotechnology Research International*.

Rajan, P. C., Priya, A. M., Jayapradha, D., & Devi, S. S., 2012, Isolation and characterization of marine actinomycetes from West coast of India for its antioxidant activity and cytotoxicity, *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 3, 641.

Rajivgandhi, G., Muneeswaran, T., Maruthupandy, M., Ramakritinan, C. M., Saravanan, K., Ravikumar, V., & Manoharan, N., 2018, Antibacterial and anticancer potential of marine endophytic actinomycetes *Streptomyces coeruleorubidus* GRG 4 (KY457708) compound against colistin resistant uropathogens and A549 lung cancer cells, *Microbial Pathogenesis*, 125, 325-335.

Rateb, M. E., Houssen, W. E., Arnold, M., Abdelrahman, M. H., Deng, H., Harrison, W. T., ... & Jaspars, M., 2011, Chaxamycins A–D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp., *Journal of Natural Products*, 74(6), 1491-1499.

Ravi, L., Ragunathan, A., & Krishnan, K., 2017, Antidiabetic and antioxidant potential of GancidinW from *Streptomyces paradoxus* VITALK03., *The Open Bioactive Compounds Journal*, 5(1), 31-42.

Raynaud, X., & Nunan, N., 2014, Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil, *PloS ONE*, 9(1), e87217.

Remya, M., & Vijayakumar, R., 2008, Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India, *Medicine and Biology*, 15(1), 13-19.

Renner, M. K., Shen, Y. C., Cheng, X. C., Jensen, P. R., Frankmoelle, W., Kauffman, C. A., ... & Clardy, J., 1999, Cyclomarins A– C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.), *Journal of the American Chemical Society*, 121(49), 11273-11276.

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... & Langley, E., 2010, Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source, *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146-167.

Sahu, M. K., Sivakumar, K., Poorani, E., Thangaradjou, T., & Kannan, L., 2007, Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes, *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 465.

Sapkota, A., Thapa, A., Budhathoki, A., Sainju, M., Shrestha, P., & Aryal, S., 2020, Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing actinomycetes from soil samples, *International Journal of Microbiology*.

Schaal, K. P., & Lee, H. J., 1992, Actinomycete infections in humans—a review. *Gene*, 115(1-2), 201-211.

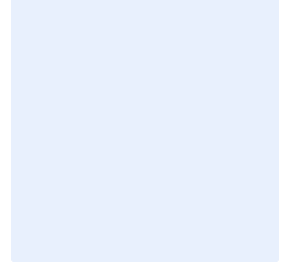
- Segaran, G., Sundar, R. D. V., Settu, S., Shankar, S., & Sathivelu, M., 2017, A review on endophytic actinomycetes and their applications, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(10), 152-158.
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S., 2021, Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 72.
- Semêdo, L. T. A. S., Linhares, A. A., Gomes, R. C., Manfio, G. P., Alviano, C. S., Linhares, L. F., & Coelho, R. R. R., 2001, Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils, *Microbiological Research*, 155(4), 291-299.
- Seong, C. N., Park, J. H., & Baik, K. S., 2001, An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil, *Journal of Microbiology*, 39(1), 17-23.
- Shetty, P. R., Buddana, S. K., Tatipamula, V. B., Naga, Y. V. V., & Ahmad, J., 2014, Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 303-312.
- Shi, Y., Pan, C., Auckloo, B. N., Chen, X., Chen, C. T. A., Wang, K., ... & Wu, B., 2017, Stress-driven discovery of a cryptic antibiotic produced by *Streptomyces* sp. WU20 from Kueishantao hydrothermal vent with an integrated metabolomics strategy, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1395-1408.
- Shutsrirung, A., Chromkaew, Y., Pathom-Aree, W., Choonluchanon, S., & 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.
- Silva, L. J., Crevelin, E. J., Souza, D. T., Lacerda-Júnior, G. V., de Oliveira, V. M., Ruiz, A. L. T. G., ... & Melo, I. S., 2020, Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery, *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
- Sivasankar, P., Priyanka, K., Rekadwad, B., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Poongodi, S., ... & Anilkumar, N., 2018, Actinobacterial community structure in the Polar Frontal waters of the Southern Ocean of the Antarctica using Geographic Information System (GIS): A novel approach to study Ocean Microbiome, *Data in Brief*, 17, 1307-1313.
- Solanki, R., Khanna, M., & Lal, R., 2008, Bioactive compounds from marine actinomycetes, *Indian Journal of Microbiology*, 48, 410-431.
- Solano, G., Rojas-Jiménez, K., Jaspars, M., & Tamayo-Castillo, G., 2009, Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96, 71-78.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., & Rajnisz, A., 2012, Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes, *Open Life Sciences*, 7(3), 373-390.
- Sowani, H., Kulkarni, M., Zinjarde, S., & Javdekar, V., 2017, Gordonia and related genera as opportunistic human pathogens causing infections of skin, soft tissues, and bones, *The microbiology of skin, soft tissue, bone and joint infections*, 2, 105-121.

- Srinivasan, M. C., Laxman, R. S., & Deshpande, M. V., 1991, Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 171-184.
- Stach, J. E., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., & Goodfellow, M., 2004,. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 191-194.
- Subhan, S. A., Wahab, A., Mujahid, T. Y., Abbas, T., Khan, I., & Idrees, S., 2015, Screening of actinomycetes from indigenous soil for production of extracellular metabolites, *International Journal of Current Research*, 7, 12078-12083.
- Suksaard, P., Pathom-aree, W., & Duangmal, K., 2017, Diversity and plant growth promoting activities of actinomycetes from mangroves, *Chiang Mai Journal of Science*, 44(4), 1210-1223.
- Sunghthong, R., & Nakaew, N., 2015, The genus *Nonomuraea*: a review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites, *Journal of basic microbiology*, 55(5), 554-565.
- Suthindhiran, K., Jayasri, M. A., Dipali, D., & Prasara, A., 2014, Screening and characterization of protease producing actinomycetes from marine saltern, *Journal of basic microbiology*, 54(10), 1098-1109.
- Taechowisan, T., Peberdy, J. F., & Lumyong, S., 2003, Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 381-385.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y., & Lumyong, S., 2007, Antitumor activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 3(2), 86-91.
- Takahashi, Y., & Nakashima, T., 2018, Actinomycetes, an inexhaustible source of naturally occurring antibiotics, *Antibiotics*, 7(2), 45.
- Tan, L. T. H., Ser, H. L., Yin, W. F., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H., 2015, Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 isolated from Malaysia mangrove soil, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1316.
- Thenmozhi, M., & Kannabiran, K., 2012, Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7, *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 1(1), 51-57.
- Trenozhnikova, L., & Azizan, A., 2018, Discovery of actinomycetes from extreme environments with potential to produce novel antibiotics, *Central Asian Journal of Global Health*, 7(1).
- Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., & Inamori, Y., 2003, Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardopsis prasina* OPC-131, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 894-900.

- Tuncer, I., & Bizsel, N., 2017, Phylogeny and physiology of Actinomycetes and biogeochemical parameters in sediments of Eastern Mediterranean Sea, *International Journal of Environmental Science and Development*, 8(8), 581-585.
- Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O. S., Nirmala, P., Vinoth, K. P., & Reena, A., 2012, Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 469-473.
- Wahaab, F., & Subramaniam, K., 2018, Bioprospecting marine actinomycetes for multidrug-resistant pathogen control from Rameswaram coastal area, Tamil Nadu, India. *Archives of microbiology*, 200, 57-71.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J., 1998, Prokaryotes: the unseen majority, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Weyland, H., 1969, Actinomycetes in North Sea and Atlantic ocean sediments, *Nature*, 223(5208), 858-858.
- Xu, L., Li, Q., & Jiang, C., 1996, Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 244-248.
- Yaradoddi J. S. & Kontro M.H., Ganachari S. V., 2021, *Actinobacteria: Ecology, Diversity, Classification and Extensive Applications* (Rhizosphere Biology), Springer Nature, Singapore, 1st ed. 2021 Edition
- Yang, W., Liang, G., Sun, Y., & Gong, Z., 2021, Bioactive Secondary Metabolites from Marine *Streptomyces griseorubens* f8: Isolation, Identification and Biological Activity Assay, *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(9), 978.
- Yoon, J. H., Kim, I. G., Kang, K. H., Oh, T. K., & Park, Y. H., 2004, *Nocardioides aquiterrae* sp. nov., isolated from groundwater in Korea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 71-75.
- Zhang, D. C., Schumann, P., Redzic, M., Zhou, Y. G., Liu, H. C., Schinner, F., & Margesin, R., 2012, *Nocardioides alpinus* sp. nov., a psychrophilic actinomycete isolated from alpine glacier cryoconite, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(2), 445-450.
- Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., & Kuai, J., 2005, Exploring novel bioactive compounds from marine microbes, *Current Opinion in Microbiology*, 8(3), 276-281.
- Zhang, S., Gui, C., Shao, M., Kumar, P. S., Huang, H., & Ju, J., 2020, Antimicrobial tunicamycin derivatives from the deep sea-derived *Streptomyces xinghaiensis* SCSIO S15077, *Natural product research*, 34(11), 1499-1504.
- Zhao, X. Q., Li, W. J., Jiao, W. C., Li, Y., Yuan, W. J., Zhang, Y. Q., ... & Bai, F. W., 2009, *Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(11), 2870-2874.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gülnehan Selim
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	17.07.2020

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı