

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DENİZEL KAYNAKLARDAN AKTİNOMİSET
GRUBU MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU
VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Özlem ÖNER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 03.06.2011

Bornova-İZMİR

2011

Sayın Özlem ÖNER tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Denizel Kaynaklardan Aktinomiset Grubu Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03.06.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza****Jüri Başkanı**

: Prof. Dr. Erdal BEDİR

Raportör Üye

: Doç. Dr. Elif Esin KOCABAŞ

Üye

: Doç. Dr. Funda Nuray YALÇIN

.....
.....
.....

ÖZET**DENİZEL KAYNAKLARDAN AKTİNOMİSET GRUBU
MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖNER, Özlem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Prof. Dr. Erdal BEDİR

Haziran 2011, 107 sayfa

Ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmaların hayatta kalmak için farklı sınıflara ait bileşikler ürettikleri bilinmektedir. Antibiyotik keşif araştırmaları son yıllarda yeni moleküller elde etmek için bu tür mikroorganizmalara doğru yönelmiştir.

Dünya yüzeyinin %70'ini kaplayan okyanuslar, gezegenimizin biyoçeşitliliğinin büyük bir kısmını içermesine rağmen, sahip olduğu mikrobiyal çeşitliliğin büyük kısmı henüz keşfedilmemiş olarak beklemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki nadir karşılaşılan denizel aktinomiset grupları, yeni doğal ürünlerin ortaya çıkarılması konusunda çok iyi birer adaydırlar. Sürekli gelişen ve etkinleşen kültürasyon metotları ve teknolojileri denizlerin derinliklerinde yaşayan organizmalarla çalışma ve bu çok değerli kaynakların kimyasal çeşitlilik açısından değerlendirilebilmesi olanağını tanımaktadır.

Bu çalışmada Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde farklı derinliklerden (0-35 m) 62 sünger örneği toplanmıştır. Bu sünger örneklerinden 267 tane aktinomiset grubu bakteri izole edilmiş, tüm izolatlar 50 ml deniz suyu ile hazırlanmış besiyerinde erlenler içinde orbital çalkalayıcıda 7 gün boyunca, 28°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerinden ayrılan fermantasyon sıvılarının etil asetat ile ekstraksiyonları yapılmış, ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri *Escherichia coli* O157:H7 (RSKK 234) ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (RSKK 95047)' a karşı disk difüzyon metodu ile test edilmiştir. Yüksek aktivite gösteren 19 izolat seçilerek

fenotipik özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca 16S rDNA sekans ve filogenetik analizleri yapılmış ve tüm izolatların *Streptomyces* cinsine ait olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Denizel aktinomiset, izolasyon, fermantasyon, antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT**ISOLATION OF ACTINOMYCETES GROUP MICROORGANISMS
FROM MARINE SOURCES AND INVESTIGATION OF THEIR
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES**

ÖNER, Özlem

MSc. in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Erdal BEDİR

June 2011, 107 pages

In view of the fact that the microorganisms living in unusual conditions produce different class of molecules to survive, the antibiotic discovery research is headed toward such extraordinary microorganisms in order to obtain novel chemical entities.

Although the seas cover 70% of the Earth's surface and harbor most of the planet's biodiversity, the microbiological component of this diversity remains relatively unexplored. Recent studies have revealed that unusual groups of marine actinomycetes are good candidates for the discovery of new natural products. The continued development of improved cultivation methods and technologies for accessing deep-sea environments promises to provide access to this significant new source.

In this study, 62 sponge samples were collected from defined locations and deepness (0-35 m) of Mediterranean Sea. Two hundred and sixty seven actinomycetes cultures were isolated, and all isolates were inoculated into Erlenmayer flask containing 50 ml nutrient broth in sea water. The cultures were incubated for 7 days at 28 °C in rotary shaker. The supernatants were later extracted with ethyl acetate. The extracts were tested versus pathogenic microorganisms, *Staphylococcus aureus* (RSKK 95047) and *E. coli* O157:H7 (RSKK 234) by using agar well diffusion method. Nineteen isolates showing high antimicrobial activity were chosen to investigate their phenotypic properties.

Furthermore 16S rDNA sequence and phylogenetic analyses were performed for these isolates. All of the samples were found to be a member of *Streptomyces* genus.

Keywords: Marine actinomycetes, isolation, fermentation, antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca bana her konuda destek olan, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Erdal BEDİR ve Doç. Dr. Esin KOCABAŞ'a, başta Deniz KUŐCUOęLU ve Güner EKİZ olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma teŐekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen sevgili babam Kenan ÖNER ve sevgili annem Dilek ÖNER'e, ayrıca tezimin her aŐamasında manevi desteğiyle yanımda olan Onur BİRGIN'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Antibiyotikler	3
2.2.1 Antibiyotik çeşitleri	3
2.2 Yeni Antibiyotik Arayışları	5
2.3 Antibiyotik Direnci	5
2.3.1 Doğal direnç	6
2.3.2 Kazanılmış direnç	7
2.3.2.1 Kazanılmış direnç mekanizmaları	7
2.3.3 <i>Staphylococcus</i> ve <i>E. coli</i> 'nin ülkemizdeki direnç durumu	8
2.3.3.1 <i>Staphylococcus</i>	8
2.3.3.2 <i>E.coli</i> ve diğer enterik bakteriler	9
2.4 Kemoterapötik Ajanlar	10
2.5 Antibiyotiklerin Toksik Etkileri	10
2.6 Aktinomisetler	11
2.6.1 Denizel aktinomisetler	13
2.7 Denizel Aktinomisetlerden Elde Edilen Yeni Metabolitler	20
2.7.1 Abyssomicin C	22
2.7.2 Diazepinomicin	22
2.7.3 Sporolides A ve B	22
2.7.4 Arenimisin	23
2.7.5 Benzoxazine	23
2.7.6 Caboxamycin	24
2.7.7 Dermacozinler	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.7.8 Lipocarbazoles	25
2.7.9 Lysolipin	25
2.7.10 Proximicins A, B ve C	26
2.7.11 Etamisin	27
2.7.12 Lodopyridone	27
2.7.13 Marinopirool A ve B	27
2.7.14 Salinisporamide A	28
2.7.15 Marinomycin A	28
2.7.16 Glyciapyrroles A, B ve C	29
3. MATERYAL	30
3.1 Örneklerin Toplandığı İstasyonlar	30
3.2 Kullanılan Besiyerleri	36
3.3 Test Organizmaları	42
3.4 Ekstraksiyon ve Yoğunlaştırma	42
3.5 Taramalı Elektron Mikroskopu Görüntülemesi	42
3.6 DNA İzolasyonu ve Sekans Analizi	42
4. YÖNTEMLER	44
4.1 Aktinomiset İzolasyonu	44
4.2 Spor Süspansiyonu Hazırlanması	44
4.3 Küçük Çaplı Fermantasyon Çalışmaları	45
4.4 Ekstraksiyon	45
4.5 Disk Difüzyon Yöntemi	45
4.6 İzolatların pH, Tuz ve Sıcaklık Toleranslarının ve Şeker Kullanımlarının Belirlenmesi	46
4.7 DNA İzolasyonu ve Sekans Analizi	47
4.7.1 Genomik DNA izolasyonu	47
4.7.2 Agaroz jel elektroforezi	47
4.7.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	48
4.7.4 DNA dizi analizi ve değerlendirme	48
5. BULGULAR	50
5.1 Aktinomiset İzolasyonu	50
5.2 Aktivite Sonuçları	59

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.3 Fenotipik Özellikler	66
5.4 Sekans Analizi	70
6. SONUÇ VE TARTIŞMA	95
KAYNAKLAR DİZİNİ	101
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>S. aureus</i> 'da penisillinaz üretiminin hızlı artışı.....	9
2.2 Toprakta izole edilen aktinomisetlerin tarama yöntemleriyle karşılaşımla sıklıkları	13
2.3 Denizel aktinomiset grubu mikroorganizmaların taksonomik yakınlığını gösteren radyal filogenetik ağaç.....	19
2.4 Abyssomicin C'nin kimyasal yapısı.....	22
2.5 Diazepinomicin'in kimyasal yapısı.....	22
2.6 Sporolides A ve B'nin kimyasal yapısı.....	23
2.7 Arenimisin'in kimyasal yapısı.....	23
2.8 Benzoxazine'in kimyasal yapısı.....	24
2.9 Caboxamycin'in kimyasal yapısı.....	24
2.10 Dermacozinler'in kimyasal yapıları.....	25
2.11 Lipocarbazole'lerin kimyasal yapısı.....	25
2.12 Lysolipin'in kimyasal yapısı.....	26
2.13 Proximicins A, B ve C'nin kimyasal yapısı.....	26
2.14 Etamisin'in kimyasal yapısı.....	27
2.15 Lodopyridone'un kimyasal yapısı.....	27
2.16 Marinopirolo A ve B'nin kimyasal yapısı.....	28
2.17 Salinisporamide A'nın kimyasal yapısı.....	28
2.18 Marinomycin A'nın kimyasal yapısı.....	29
2.19 Glyciapyrroles A(1), B(2) ve C(3)'nin kimyasal yapısı.....	29
3.1 Toplanan sünger örneklerinin fotoğrafları.....	36
5.1 Bazı izolatların petrideki koloni görüntüleri.....	57
5.2 Bazı izolatların Taramalı Elektron Mikroskopu görüntüleri.....	58
5.3 Örnek bir aktivite petrisi.....	65
5.4 Tuz toleranslarının belirlendiği örnek petriyer.....	66
5.6 İzolatların 16S rDNA sekans analizleri sonucuna dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Klinik uygulamalarda kullanılan antimikrobiyal ajanların zamanla kazandıkları direnç durumları.....	8
2.2 Kaynaklarına göre antibiyotiklerin dağılımları.	12
2.3 Moleküler ve kültürel yöntemlerle tanılanmış denizel aktinomisetler ve kaynakları.	15
2.4 Denizel aktinomisetlerden elde edilen bazı yeni metabolitlerin listesi.	21
3.1 Örneklerin toplandığı lokasyonlar.	30
5.1 İzole edilen aktinomisetlere ait bilgiler.	50
5.2 İzolatların antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	59
5.3 İzolatların tuz toleransları.	67
5.4 İzolatların pH toleransları.	68
5.5 İzolatların sıcaklık toleransları.	69
5.6 İzolatların kullandıkları şekerler.....	70

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından sekonder metabolit olarak üretilen, diğer mikroorganizmaları öldüren veya inhibe eden bileşiklerdir. Çoğunlukla toprak mikroorganizmaları tarafından üretilirler. 20. yüzyılın ortalarında keşfedilmelerinden sonra enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde önemli rol üstlenmişlerdir.

Günümüzde, patojenlerin yüksek mutasyon hızları sebebiyle bilinen antibiyotiklere karşı direnç kazanmaları, bazı antibiyotiklerin toksik etkilerinden dolayı kullanılmamaları ve doğal dirençli bakterilerin varlığı sebebiyle yeni antibiyotiklerin ortaya çıkarılmasına ihtiyaç vardır.

Günümüze kadar ilaç sanayi genelde toprak mikroorganizmalarını ilaç keşfi için değerlendirmiştir ve bugün kullanılan antibiyotiklerin büyük çoğunluğu bakteri veya küf mantarı kökenlidir. Bakteriler arasında özellikle aktinomiset grubu üyeleri, streptomisin, kloramfenikol, klortetrasiklin, eritromisin ve neomisin gibi birçok antibiyotiği üretme potansiyelleri nedeniyle ilaç sanayinde önemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır.

Genelde yeni bir kimyasal sınıfa ait antimikrobiyal bir ajan (antibiyotik) keşfedildiğinde istenen, tedavide kullanılan ilaçlardan farklı bir mekanizma ile etki göstermesi ve sonuçta çapraz direnç oluşmamasıdır. İlaç endüstrisi uzun yıllardır çalışmalarını toprak mikroorganizmaları üzerinde yoğunlaştırdığından, araştırmalar daha önce izole edilmiş ve bilinen etki mekanizmasına sahip bileşiklerin izolasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ekstrem koşullarda hayatlarını sürdürmeyi başaran mikroorganizmaların farklı moleküler iskeletler ürettiklerinin anlaşılması üzerine, antibiyotik keşif çalışmalarının yeni moleküller yakalayabilmek amacı ile ekstrem mikroorganizmalara doğru yöneldiği görülmektedir. Son zamanlarda denizler ve derin denizler gibi az çalışılmış çevreler bilim adamlarının oldukça ilgisini çekmektedir. Bu araştırma alanı birçok yeni türün ve buna paralel olarak antimikrobiyal, antienflamatuar, antiviral, anti-tümör vb etkinlik gösteren biyoaktif moleküllerin keşfine ön ayak olmuştur.

Denizler dünya yüzeyinin %70'ini kaplamasına ve gezegenimiz biyoçeşitliliğinin büyük bir kısmını içermesine rağmen, sahip olduğu mikrobiyal çeşitliliğin büyük kısmı henüz keşfedilmemiş olarak beklemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki nadir karşılaşılan denizel aktinomiset grupları, yeni doğal ürünlerin ortaya çıkarılması için çok iyi birer adaydırlar. Denizlerin derinliklerinde yaşayan organizmaların, sürekli gelişen ve etkinleşen kültürasyon metotları ve teknolojileri ile çalışılabilecek olması bu çok zengin kaynakların kimyasal çeşitlilik açısından değerlendirilebilmesine olanak tanımaktadır.

Bu bilgiler ışığında tezimizin amacı Ege ve Akdeniz Bölgesi'nden toplanan farklı sünger örnekleri üzerinde simbiyoz yaşayan aktinomiset grubu bakterilerin araştırılmasıdır. Çeşitli yöntemler kullanılarak sünger örneklerinden aktinomisetlerin izole edilerek antimikrobiyal aktivitelerinin *Escherichia coli* O157:H7 (RSKK 234) ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (RSKK 95047)'a karşı test edilmesi bu çalışma kapsamında temel hedef olarak belirlenmiştir. Ayrıca yüksek aktivite gösteren izolatların bir takım kültürel testlerle fenotipik özelliklerinin belirlenmesi ve 16S rDNA analizlerinin yapılması ile ait oldukları taksonomik sınıfların ortaya çıkarılması planlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Antibiyotikler

Antibiyotikler bazı mikroorganizmalarca üretilen ve diğer bakterilerin çoğalmasını engelleyen (bakteriyostatik) veya onları öldüren (bakterisidal) doğal bileşiklerdir. Penisilin, sefalosporinler ve makrolidler antibiyotiklere örnektir.

Antibiyotikler yalnız tıp alanında kullanılmamaktadır. Enfeksiyon etmenlerine karşı zirai alanda kullanımının yanında, ağırlık artışı için katkı maddesi olarak hayvancılıkta, besinlerin korunması için gıda sektöründe biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak laboratuvarlarda kullanılmaktadır.

İlaç pazarında çok büyük paya sahip olan antibiyotiklerin klinik tedavide kullanımının iki temel amacı vardır:

1. Herhangi bir enfeksiyon hastalığına karşı
2. Gelişmesi önlenilecek olası bir enfeksiyon hastalığına karşı (proflaksi amaçlı kullanım).

Bu gün çok sayıda antibiyotik, tehlikeli etkileri olan bakteriyel, fungal, viral enfeksiyonlara karşı klinik tedavide ve böceklerin veya parazitlerin neden olduğu hastalıkların tedavisi amacı ile tarımda kullanılmaktadır.

1949 yılında yapılan bir denemede antibiyotiklerin hayvanlarda büyüme artışına sebep olduğu gözlenmiş ve o yıldan beri antibiyotikler çiftlik hayvanlarında hastalıkları önlemenin yanı sıra büyüme faktörü olarak kullanılmaya başlamıştır. Fakat son yıllarda antibiyotiklerin direnç gelişimine sebep olmalarından ötürü kullanımlarına sınırlama getirilmiştir (Yücel, 2007).

2.2.1 Antibiyotik çeşitleri:

Antimikrobiyaller etki mekanizmalarına göre beş sınıfta toplanırlar:

- a. Hücre duvarı sentez inhibitörleri:

1. Beta laktamlar:

Bakterisidal etki gösteren bu moleküller, bakterilerin hücre duvarında yer alan ve peptidoglikan sentezinin son basamağında görev yapan transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerine bağlanarak hücre duvarı sentezinin durdururlar.

Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları.

2. Glikopeptitler:

Bu gruptaki büyük polar moleküller gram negatif bakterilerin hücre duvarlarından penetre olamadıkları için etki spektrumları aerob ve anaerob gram pozitif bakterilerle sınırlıdır.

Vankomisin, teikoplanin.

3. Diğerleri:

Fosfomisin, sikloserin, basitrasin, ristosetin, ramoplanin, mersasidin, moenomisin.

b. Protein sentez inhibitörleri:

Ribozomlara yerleşerek protein sentezini bozarlar. Etki edebilmeleri için bakterilerin üreme döneminde olmaları gerekir.

1. 50S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar: Makrolidler-ketolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, oksazolidinonlar.

2. 30S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar: Aminoglukozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler.

3. Diğerleri: Mupisorin, nitrofurantoin.

c. Nükleik asit sentez inhibitörleri:

Bakterilerde nükleik asit fonksiyonu başlıca 4 şekilde bozulabilir.

1- DNA'nın çift sarmal yapısının bozulması,

2- DNA replikasyonunda rol alan DNA polimeraz veya transkripsiyonda rol alan RNA polimeraz enzimlerinin görevlerinde bozuklukların oluşması,

3- Nükleik asit analogu olan nükleozit antibiyotiklerin nükleik asit sentezine mani olmaları,

4- Nükleik asit yerine girmelerinden dolayı DNA yapısında ve fonksiyonlarında bozuklukların oluşması.

Kinonlar, rifamisinler, metronidazol.

d. Antimetabolitler:

Bakteri hücresi, DNA sentezinde gerekli olan folik asidi kendi sentezler. Folik asit sentezinde görev alan enzimleri inhibe eden antimikrobialler bakterilerde DNA sentezini engeller. Bakteriyostatik etkili bu ajanlar genellikle üriner sistem enfeksiyonlarında öncelikle tercih edilirler.

Trimetoprim-sülfametoksazol, para-amino salisilik asit.

e. Membran bütünlüğünü bozanlar

1. Peptid antibiyotikler: Polipeptid antibiyotikler (basitramisin, gramisidin S, polimiksinler), lineer katyonik peptidler (defensinler, maganinler), ribozomal peptidler (antibiyotikler), diğerleri (pirokorisin, drododoin, apiadesin)

2. Siklik lipopeptidler: Daptomisin (Saran ve Karahan, 2010).

2.2 Yeni Antibiyotik Arayışları

1929'da Alexander Fleming'in penisilini keşfi ile başlayan dönem, Waksman'ın toprak mikroorganizmalarının antibiyotik üretim (streptomisin) potansiyellerini keşfi ile sürmüştür. 1940 ve 1960 yılları arası antimikrobiyal keşif için altın yıllar olarak anılır. Bu yıllarda keşfedilen çok sayıda antibiyotik enfeksiyonlarla başa çıkmak için yeterli görülmüştür. Fakat patojen bakterilerin direnç kazanmalarıyla mevcut antibiyotiklerin bu bakterilerle savaşmak için yeterli olamayacağı anlaşılmıştır (Hughes and Fenical, 2010).

2.3 Antibiyotik Direnci

1981 ile 2005 yılları arasında keşfedilen 98 antimikrobiyal molekülün 74 tanesi satışa çıkmıştır. Bilinen 12 antimikrobiyal sınıfın 9'unu doğal antibiyotikler

oluşturur. Antimikrobiyal ajana maruz kalmak bakteriler üzerinde seçici bir baskı uygulayarak kromozomal düzeyde rastgele mutasyonlar oluşmasına sebep olmaktadır. Böylece bakteri antimikrobiyal bileşik varlığında da yaşayabilir hale gelmektedir. Bu beceriyi genetik düzeyde edinen bakteri kısa sürede bu özelliğini ileriki nesillerine aktarabilme yeteneğine sahiptir. Antibiyotiklerin yanlış kullanımlarının da antimikrobiyal direnç kazanımına katkıda bulunması nedeniyle 2010 yılında bakteriyel enfeksiyonlar epidemik seviyeye ulaşmıştır. Antimikrobiyal maddelere karşı gelişen direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit eden çok önemli bir sorundur. Başta hastanelerde çoklu ilaç dirençli suşlarla gelişen hastane enfeksiyonları hastanede kalışı ve ölüm oranlarını arttırmakta ve oldukça fazla ek mali yük oluşumuna neden olmaktadır. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, vankomisin dirençli *Enterococcus* ve florokinolon dirençli *Pseudomonas* tehlike gösteren birkaç direnç kazanmış patojene örnek olarak verilebilir (Hughes and Fenical, 2010).

Bir antimikrobiyal maddeye karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde bu kemoterapötik maddeye yapıcı veya etki tarzı bakımından yakın diğer antimikrobiyallere karşı da direnç gelişebilir, bu duruma çapraz direnç (cross resistance) denir. Mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antimikrobiyal maddeye karşı dirençli hale gelmesi durumuna ise çoklu ilaç dirençliliği (multiple-drug resistance) denir.

Mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (genotipik, kalıtsal) direnç diye iki ana bölümde ele alınabilir.

2.3.1 Doğal direnç

Kalıtsal özellikte olmayan direnç tipidir. Bir organizmanın yapısı nedeniyle dirençli oluşu anlamına gelir. Burada genellikle antimikrobiyal maddenin bağlanarak etkili olduğu hedef molekülün olmaması ve ilacın hedefe ulaşmasını önleyen doğal engeller bu tip dirençten sorumludur. Bir antimikrobiyal maddeye doğal dirençli olan türün hiç bir türevi o antibiyotikten etkilenmez.

Genellikle ilaçların etkili olması için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Bakteri sporları veya dorman haldeki mikobakteriler gibi metabolik olarak inaktif mikroorganizmalar ilaçlara fenotipik olarak dirençli görülebilir, ama bunlardan oluşan aktif suşlar ilaçlara duyarlıdır. Buna benzer şekilde bakterilerin hücre duvarsız L şekilleri hücre duvarı sentezini bozarak etkili olan antibiyotiklerden etkilenmezler. L şekilleri ana şekle dönüp hücre duvarlarını yeniden kazanınca antibiyotiklere duyarlı hale gelirler.

2.3.2 Kazanılmış direnç:

Kazanılan bir direnç tipidir. Burada bakteri popülasyonu antimikrobiyal madde ile ilk temasta ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobiyal maddeye karşı direnç gelişir. Antimikrobiyal maddelere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli türevler ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik direnç kromozom, plazmid, transpozun kontrolü altındadır. Klinik uygulamalarda kullanılan antimikrobiyal ajanların zamanla kazandıkları direnç durumları Çizelge 2.1’de verilmiştir (Bush, 2004).

2.3.2.1 Kazanılmış direnç mekanizmaları

1. İlacın hedefinde değişiklik olması

a. Reseptörün afinitesinde azalma olması

b. İlaçtan etkilenmeyen farklı bir metabolik yol kullanılması

2. Sentezlenen enzimle ilacın inaktif hale gelmesi

3. Hücreye giren ilaç miktarının azalması

a. Geçirgenliğin (permeabilite) azalması

b. Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması (Öztürk, 1997).

Çizelge 2.1 Klinik uygulamalarda kullanılan antimikrobiyal ajanların zamanla kazandıkları direnç durumları.

Direnç gözlenen ajan	FDA onay tarihi	Direnç rapor ediliş tarihi	Direnç mekanizması
Penisilin G	1943	1940	Penisilinaz üretimi
Streptomisin	1947	1947	Ribozomal proteinde mutasyon
Penisilin	1943	1976	Plazmidde kodlanmış β -laktamaz geniş spektrumu
Tetrasiklin	1952	1980	Tetrasiklin pompası
Metisilin ve tüm β -laktamlar	1960	1961	Mec-A (penisiline bağlanan protein)
Nalidiksik Asit	1964	1966	Topoizomerez mutasyonu
Gentamisin	1967	1969	Aminoglukozidi modifiye eden enzim
Sefotaksim	1981	1983	AmpC β -laktamaz
Linezoid	2000	1999	23S RNA mutasyonu

2.3.3 *Staphylococcus* ve *E. coli*'nin ülkemizdeki direnç durumu

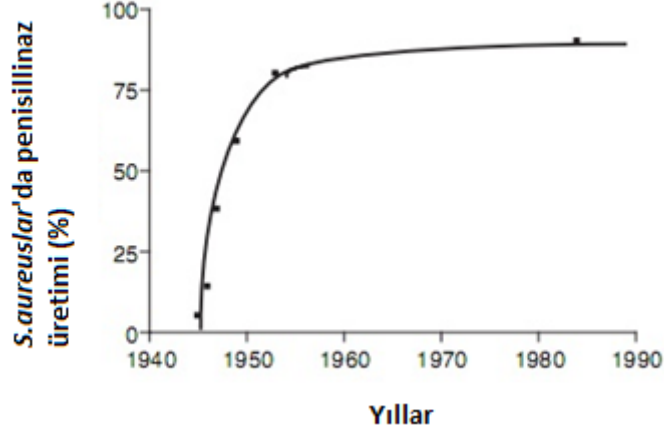
2.3.3.1 *Staphylococcus*

1944'de *Staphylococcus* genellikle penisiline duyarlıydı. Yoğun penisilin kullanımının ardından 1948'de hastaneden izole edilen *Staphylococcus* suşlarının %65-85'inde β -laktamaz üretimi saptandı ve bu suşlar penisiline direnç kazanmışlardı. Metisilin gibi β -laktamaza dirençli penisilinlerin bulunuşu geçici bir rahatlama sağladı. Ardından metisiline dirençli *Staphylococcus*'lar salgınlar oluşturdu. Günümüzde artık *Staphylococcus*'ların %80-90'i penisilinlere dirençlidir. Şekil 2.1'de penisilinaz sentezleyen *Staphylococcus aureus*'ların 1940-1990 yılları arasındaki artışı gösterilmiştir (Bush, 2004).

Hastanelerde 1970'li yıllarda %2 düzeylerinde görülen metisiline karşı direnç 1990'larda %40-50'leri aşmıştır. Ülkemiz hastanelerinde metisiline direnç %20-60 arasında bildirilmektedir. Son yıllarda vankomisine direnci azalmış ve vankomisine dirençli *S.aureus* suşları bildirilmektedir.

Daha tehlikeli durum toplum içinde metisiline karşı direnç gelişiminin varlığıdır. Ülkemizde toplum kökenli metisilin direnci henüz ayrıntılı çalışılmamıştır. Bildirilen toplum kaynaklı MRSA'ların fenotipik özellikleri bir

kısının hastane kaynaklı olacağını düşündürmektedir. *Staphylococcus*'larda aynı zamanda kinolon direncinde hızlı bir artış söz konusudur.



Şekil 2.1 *S.aureus* 'da penisillinaz üretiminin hızlı artışı.

2.3.3.2 *E.coli* ve diğer enterik bakteriler

Toplumdan izole edilen *E.coli* suşlarında ampisiline %30-60, kotrimaksazole %20-50 oranlarında direnç bildirilmekte, aminoglukozitler ve diğer antimikrobiyallere de değişik direnç oranları rapor edilmektedir. Kotrimaksazole karşı bildirilen yüksek orandaki direnç oranları nedeniyle bu antibiyotik idrar yolu enfeksiyonlarında ampirik olarak tercih edilmemelidir.

Özellikle hastane enfeksiyonlarından soyutlanan *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus* suşlarında da çoklu ilaç dirençliliği tüm dünya için olduğu gibi ülkemizde de önemli ve yaygın bir sorundur. Nozokomiyal *Klebsiella* suşlarında GSBL enzimleri sık olarak rastlanmakta (>%50) ve yeni doğan servisleri ile yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olmaktadır. Son yıllarda başta idrar yolu etkenlerinde olmak üzere toplum kökenli, GSBL (geniş spektrumlu beta laktamaz) yapan *E.coli* enfeksiyonlarında artış dikkat çekmektedir. Bu durum riskli kişilerde gelişen ürospeslerde özellikle dikkate alınmaktadır.

Kinolonların yaygın kullanımı toplum kökenli *E.coli* ve diğer gram negatif basillerde kinolon direnci artışına neden olmuş ve %20'lere yaklaşan bu direnç

idrar yolu enfeksiyonlarında ampirik tedavide kinolon seçilmesini zorlaştırmaya başlamıştır (Öztürk, 2008).

2.4 Kemoterapötik Ajanlar:

Antimikrobiyal maddelerin gelişiminde modern farmasötik yaklaşımlar 50 yıl öncesine kadar doğal ürünler üzerinden yapılan yarı sentez çalışmaları üzerine kuruluydu. Bu yöntemle elde edilen kimyasal bileşikler geçici olarak bakterilerin direnç kazanımını önleyebilmektedir. Günümüzde yeni kimyasal iskeletlerin bulunması ve bilinmeyen bakteriyel hedeflere karşı etkili yeni bileşiklerin keşfi yapılarak bakteri direncine karşı uzun dönemli önlemler alınması gerekmektedir (Hughes and Fenical, 2010).

İlaç endüstrisi kimyasal yöntemlerle şimdiye kadar milyonlarca yeni organik bileşik sentezlemiş ancak bunların çok küçük bir kısmı (~%0.001) klinik kullanıma girmiştir. Bilinen yaklaşık 10.000 mikrobiyal metabolitin ise 150-160'ı ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır (~%0.2-%0.3). Bilinen mikrobiyal metabolitler ile sentetik moleküller kıyaslandığında mikrobiyal metabolit kütüphanesinde bulunan yeni ve aktif moleküllerin varlığı ve ekonomik avantajları öne çıkmaktadır. Doğal ürünler yeni terapötik aktivite mekanizmalarıyla genellikle sentetik bileşiklerden daha etkindir (Bérdy, 2004).

2.5 Antibiyotiklerin Toksik Etkileri:

Bilinen 22.500 antibiyotik ve benzer biyoaktif mikrobiyal bileşiğin ancak yüzde birinden daha azı, sadece 150 tanesi insan sağlığında, veterinerlikte ve tarımda kullanılabilir.

Birçok önemli antibiyotiğin toksik etkileri nedeniyle kullanımları sınırlandırılmıştır. Bunun en iyi örneği gentamisin ve diğer aminoglikozidlerdir (Bérdy, 2004; Hughes and Fenical, 2010).

2.6 Aktinomisetler

Aktinomiset terimi aktis (ışın demeti) ve mykes (mantar) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Aktinomisetler gram pozitif, filamentli, G+C oranı oldukça yüksek, toprak kökenli mikroorganizmalardır. Selülaz, kitinaz ve lignin peroksidaz gibi ekstraselüler enzimlere sahip olduklarından dolayı doğada dekompozisyon ve mineralizasyon döngülerinde çok önemli rol oynarlar (Liman, 2007).

Bu organizmalar, antibakteriyel etkili antibiyotiklerin yanı sıra antifungal, antiviral, antitümör ve antiparazitik ajanlar, insektisitler ve herbisitler gibi diğer biyoaktif bileşikler de üretmektedirler. Ürettikleri biyoaktif bileşiklerin yanı sıra oluşturdukları enzimler, enzim inhibitörleri ve bağışıklık sisteminde değişikliğe neden olan ajanlar antibiyotikler kadar endüstriyel ve ekonomik değere sahip olup biyoteknolojik işlemlerde ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Ceylan, 2007).

Mikroorganizmaların sekonder metabolitleri biyoteknolojik açıdan çok önemlidir. Antibiyotikler, pigmentler, toksinler, simbiyozis ve ekolojik yarış efektörleri, feromonlar, enzim inhibitörleri, immünosupresifler, antagonistik ve agonistik ajanlar, pestisitler, antitümör ajanlar ve hayvanlarda ve bitkilerde büyüme faktörleri, alkaloidler gibi önemli bileşikler mikrobiyal sekonder metabolitlerin genel başlıklarını oluşturur.

Sekonder metabolitlerin genellikle alışılmıştın dışında kimyasal profilleri vardır ve bu kimyasal profil besin ortamıyla, büyüme oranıyla, geri besleme kontrolüyle, enzim inaktivasyonu ve indüksiyonuyla yakından ilgilidir. Regülasyon küçük molekül ağırlıklı özel bileşikler tarafından yapılır. Sekonder metabolitlerin sentezi kromozomal DNA'nın cluster genlerinde ve nadir olarak plazmid DNA'sında kontrol edilir (Okaför, 2007).

Primer metabolizmanın tersine sekonder metabolizma yol izleri tam olarak anlaşılmış değildir. Büyüme oranının düşmesiyle, besin azalması veya tetikleyici unsurun ortadan kalkmasıyla sekonder metabolit yol izinin açıldığı en yaygın görüşlerdir. Bu olaylar regülasyon sistemini harekete geçiren sinyaller yollayarak kimyasal (sekonder metabolizma) ve morfolojik (morfogenezis) değişimlere yol açmaktadır.

Değişik kimyasal gruplara ait binlerce sekonder metabolit elde edilmiş ve insanlar üzerindeki etkileri çalışılmış ancak en büyük ilgiyi hep antibiyotikler görmüştür. Henüz keşfedilmemiş etkinliği yüksek antibiyotikler hedefleyen bilim insanları sekonder metabolitler üzerinde yoğun olarak çalışmaya başlamıştır (Okaför, 2007).

Yaklaşık 10.000 farklı mikrobiyal kaynaktan elde edilmiş doğal ürün bilinmektedir. Bunların çoğunu antibiyotikler oluşturmaktadır ve aktinomiset grubu bakteriler antibiyotik üretiminde büyük paya sahiptirler. Antibiyotiklerin yaklaşık %70'i aktinomisetler içinde yer alan *Streptomyces* sınıfından elde edilmiştir. Çizelge 2.2'de kaynaklarına göre antibiyotiklerin dağılımları verilmiştir (Bérdy, 2004).

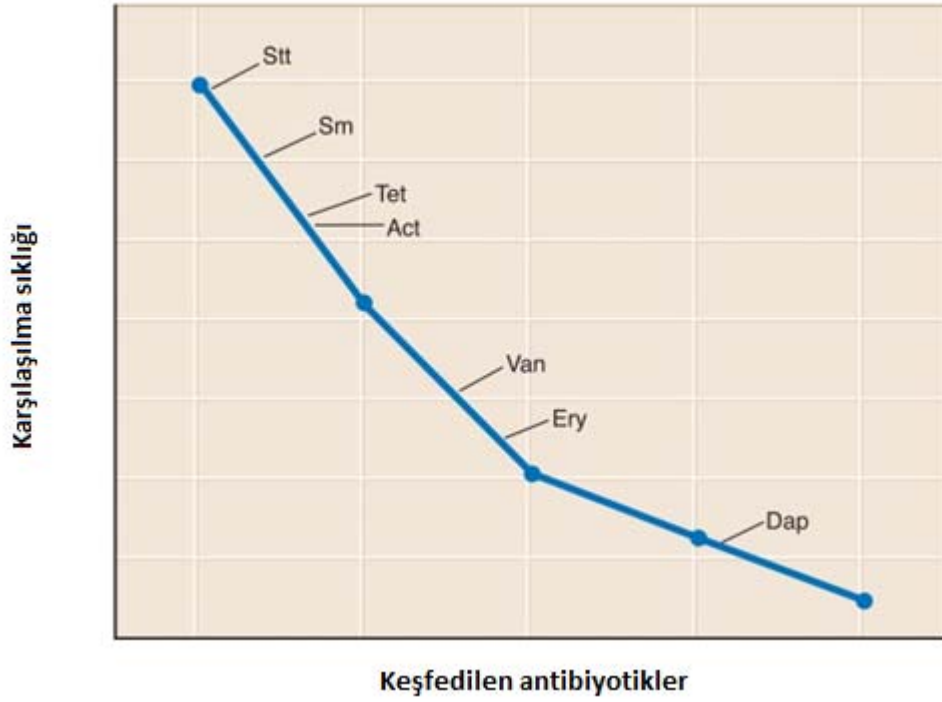
Çizelge 2.2: Kaynaklarına göre antibiyotiklerin dağılımları.

Kaynak	Antibiyotik Sayısı	Klinikte Kullanılan Sayı
Bakteri	2900	10-12
Aktinomiset	8700	100-120
Fungus	4900	30-35
Toplam	16500	140-160

Geçtiğimiz 50 yılda toprak kökenli aktinomisetler üzerinde yapılan çalışmalarda çok iyi sonuçlar elde edilmiş, birçok yeni biyoaktif molekül literatüre geçmiştir. Çalışmaların aynı hızla devam etmesine rağmen toprak kökenli aktinomisetlerden elde edilen yeni bileşiklerin oranı gittikçe düşmektedir.

Toprak aktinomisetleriyle yapılan çalışmalarda yeni bileşiklerin bulunma oranının oldukça düştüğü, yeni çalışmalarda karşılaşılan moleküllerin genellikle bilinen bileşikler olduğu, bu bilinen bileşiklerin %95'iyle tarama çalışmalarında tekrar karşılaşıldığı görülmüştür (Bush, 2004).

Bazı tahminlere göre 10 cm'lik bir toprak alanı, üzerinde 10^{25} - 10^{26} aktinomiset içerirken bunların ancak 10^7 'sinin geçtiğimiz 50 yıl içinde antimikrobiyal aktivite taraması yapılmıştır. Şekil 2.2'de topraktan izole edilen aktinomisetlerin tarama yöntemleriyle karşılaşıma sıklıkları verilmiştir (Baltz, 2007).



Şekil 2.2 Toprakta izole edilen aktinomisetlerin tarama yöntemleriyle karşılaşımla sıklıkları (Act, actinomycin D; Dap, daptomycin; Ery, erythromycin; Sm, streptomycin; Sst, streptothricin; Tet, tetracycline ve Van, vancomycin).

2.6.1 Denizel aktinomisetler:

Yıllarca antibiyotik keşfinde büyük role sahip olan aktinomisetlerin yalnız toprakta yaşadığı zannedilmiştir. Son yıllarda denizel aktinomisetler üzerinde yapılan çalışmalar bilime yeni aktinomiset türleri ve bu türlerden elde edilen yeni biyoaktif molekülleri kazandırmıştır ve kazandırmaya devam etmektedir.

Toprağın birçok mikroorganizmanın yaşaması için çok elverişli bir ortam olduğu biliniyor olsa da en zengin biyoçeşitlilik denizel çevrelerde. Bazı denizel ekosistemler tropik yağmur ormanlarından daha yüksek biyoçeşitliliğe sahiptir (Fenical, 2003).

Açık okyanus suları mililitrede 10^6 bakteriyel, 10^3 fungal hücre içermektedir. Ayrıca mikroorganizmaların denizde yaşayan canlılarla simbiyoz olarak yaşayabildikleri de bilinmektedir (Hughes and Fenical, 2010).

Denizel çevre koşulları içerdiği canlı popülasyonları için toprağa kıyasla çok daha farklı bir ortam sağlarlar. Burada yaşayan canlılar 1100 atmosfere kadar varan yüksek basınca, deniz tabanında 0°C’de anaerobik koşullara, hidrotermal ventlerde 100°C’ye yaklaşan sıcaklıklarda, pH 2.5’larda yaşamaya adapte olmuşlardır (Fenical, 2003).

Bu koşullar altında yaşayan mikroorganizmaların genetik, dolayısıyla metabolik çeşitlilik bakımından toprak kökenli mikroorganizmalardan daha farklı olduğu bilinmektedir (Fenical, 2003). Bu ortamlardan izole edilen aktinomisetler yaşadıkları ekstrem koşullara sentezledikleri farklı sekonder metabolitleriyle adapte olabildikleri için yeni metabolitlerin eldesi amacıyla önemli bir kaynak olarak düşünülmektedir (Lam, 2006).

Deniz tabanında yer alan habitat mineral, hidrokarbon, karbonat ve tuz yığınları, soğuk su sızıntıları ve sıcak su ventleri ile burada yaşayan canlılar için ekstrem bir yaşama alanı oluşturur (Ward and Bora, 2006). Denizel organik agregatların %10’unu oluşturan aktinomisetlerin buradaki varlıklarını sentezledikleri antagonistik moleküllerle devamlı kıldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonunda denizel aktinomisetlerden biyolojik aktivitesi olan yeni moleküller elde edilmiştir (Fenical, 2003).

Denizel aktinomisetler üzerindeki çalışmalar ilk defa 1984’de *Rhodococcus marinonascene*’in tanımlanmasıyla başlamıştır. Ancak o yıllarda denizel çevrelerde yeni aktinomiset türlerinin varlığını araştırmak üzerine ileri çalışmalar yapılmamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda denizel kaynaklardan izole edilmiş önemli birçok yeni mikroorganizma tanımlanmıştır (Fenical, 2003). Çizelge 2.3’te moleküler ve kültürel yöntemlerle tanımlanmış denizel aktinomisetler kaynaklarıyla gösterilmiştir (Jensen et al., 2005).

Çizelge 2.3: Moleküler ve kültürel yöntemlerle tanılanmış denizel aktinomisetler ve kaynakları.

Aktinomiset türü	İzolasyon kaynağı
<i>Actinomadura ormosans</i>	Japonya sub-tropikal sediment
<i>Actinomadura fulvescens</i>	Japonya sub-tropikal sediment
<i>Actinosynnema sp.</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Amycolatopsis sp</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Arthrobacter agilis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Blastococcus sp.</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Brachybacterium arcticum</i>	Barselona su filmi
<i>Corynebacterium ammonigenes</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Corynebacterium appendicis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Corynebacterium striatum</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Dietzia maris</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Frankia sp.</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Frigoribacterium sp.</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Geodermatophilus sp.</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Gordonia</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Kineococcus-like</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Kitasatospora sp</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Micromonospora rhodorangea</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Micromonospora halophytica</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Micrococcus luteus</i>	Barselona su filmi
<i>Microbacterium kitamiense</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Mycobacterium manitobense</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Nocardioides sp</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Kirpi balığı ovaryum
<i>Nonomurea</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Pseudonocardia alaniniphila</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Pseudonocardia aurantiaca,</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Pseudonocardia alnii</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Rhodococcus fascians</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Rhodococcus koreensis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Rhodococcus opacus</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Rhodococcus ruber</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Rhodococcus tsukamurensis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Rhodococcus zopfii</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Saccharopolyspora</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Salinispora arenicola</i>	sub-tropikal sediment
<i>Salinispora tropica</i>	sub-tropikal sediment
<i>Serinicoccus marinus</i>	Doğu denizi, Kore
<i>Solwaraspora</i>	Sediment, Papua Yeni Gine
<i>Streptomyces capensis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Streptomyces griseus (MAR4)</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Streptomyces maritimus</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Streptomyces pallidus</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Streptomyces thermocarboxydovorans</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Streptosporangium</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Tsukamurella inchonensis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Turicella otitidis</i>	Derin deniz sedimenti 3800 m
<i>Verrucosipora sp.</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Williamisia maris</i>	Japonya Canary Havzası
<i>Williamisia marianensis</i>	Japonya Canary Havzası

Goodfellow 1984 yılında toprak kökenli aktinomiset sporlarının denize ulaşmasıyla denizel aktinomisetlerin varlığını açıklamıştır. Fenical ve grubunun yaptığı uzun soluklu çalışmalar sonucu denize adapte olmuş yeni spesifik bir aktinomiset grubu keşfedilmiştir. Taksonomide geniş bir yere sahip olan bu grup iki familya altında toplanmış, birçok cins içermektedir (Jensen et al., 2005).

Fenical bu buluşuyla bilim insanlarının denizel çevrelere yönelmesini sağlamıştır. Yapılan çalışmalar bu yeni denizel bakterilerden elde edilen moleküllerin %35'inin yüksek antimikrobiyal aktivitelerinin olduğunu göstermiştir. %80'inin de kolon kanserini engelleyen bileşikler ürettiği gösterilmiştir. Daha da önemlisi yapılan kimyasal analizler daha önce tanımlanmamış moleküllerin varlığını doğrulamıştır. Bu yeni moleküllerin sodyum iyonuna bir başka deyişle denize bağımlı olarak bilinmeyen biyokimyasal yollarla sentezlendiği düşünülmektedir (Fenical, 2003).

Sekonder metabolitlerin antimikrobiyal etkinlikleri araştırılırken ekolojik koşullarla ilişkilendirmek oldukça önemlidir. Denizel çevrelerden elde edilen moleküllerin antimikrobiyal aktiviteleri çalışılırken denizel patojenlere olan aktiviteleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda bazı Atlantik ve Pasifik deniz bitkilerinin ekstrelerinin *Pseudoalter-monas bacteriolytica*'ya karşı antimikrobiyal etkinliğinin olduğu görülmüştür (Hughes and Fenical, 2010).

Yapılan çalışmalar süngerlerin yeni biyoaktif moleküllerin önemli bir kaynağı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda süngerlerin birçok mikroorganizma ile simbiyoz yaşadığı bilinmektedir. *Micrococceae*, *Dermatophilaceae* ve *Gordoniaceae*, süngerlerden izole edilmiş bazı olağandışı denizel aktinomisetlerin ait oldukları familyalardır (Lam, 2006).

Süngerler en eski metazoanlardandır. 10.000'den fazla sünger türü bilinmektedir. Basit çok hücreli hayvanlar olarak bilinen süngerler, kas ve sinir sistemine sahip değildirler. Hareket edemedikleri için su içinde süspanse olan besin partikülleriyle beslenirler. Özelleşmiş üreme, sindirim, solunum ve boşaltım organları bulunmaz. Çoğu sünger bakterilerle ve diğer tek hücreli canlılarla simbiyoz yaşar (Giamate, 2007).

Süngerler farklı biyoaktif moleküller sentezlerler. Biyoaktif birçok molekül sentezlediği bilinen süngerlerin simbiyontları izole edilip kültüre edildiklerinde benzer bileşikler sentezledikleri görülmüştür. Süngerlerin simbiyoz yaşamları çalışılmaya başlandığından beri bu biyoaktif moleküllerin kökenleri soru işareti oluşturmuştur. Süngerlerin simbiyoz yaşadığı canlı ile aynı metabolitleri sentezlemesi iki şekilde açıklanabilir. Aynı ekosistemde buldukları, aynı besin havuzundan faydalandıkları için benzer molekülleri sentezlemeleri veya yıllar boyu simbiyoz yaşayan sünger ve mikroorganizmalar arasında gen aktarımının gerçekleşmiş olmasıdır (Giamate, 2007).

İlk bakışta süngerlerden yeni moleküller elde etmek denizel çevre tahribatına ve ciddi ekosistem değişikliklerine sebep olacakken, süngerler üzerinde simbiyoz yaşayan bakterilerin izolasyonu ile aynı moleküllerin sentezi oldukça ucuz ve zararsız şekilde büyük ölçek üretime götürecektir (Giamate, 2007).

Lissodendondoryx adlı süngerden elde edilen antimitotik etkinliği olan halochondrin molekülünün klinik denemelerde kullanımı için yeterli sünger örneğinin doğadan elde edilmesi ekosistemde büyük tehlike yaratacak ölçüdedir. Süngerde bulunan etkin madde 1.5 mg/kg düzeyindedir. Kanser tedavisi için gerekli 5 kg halichondrin üretimi 5.000 ton sünger anlamına gelmektedir ki bu doğaya getireceği zarar nedeniyle akla uygun bir seçenek değildir. Halbuki aynı bileşiği sentezleyebilen mikroorganizmaların üretilmesi mümkün görülmektedir (Fiedler et al., 2005).

Doğadan elde edilen bir örnekte var olan bakterilerin yaklaşık %0.01'i ile %12.5'inin izole edilebilmekte olduğu tahmin edilmektedir (Olson et al., 2006). Sediment ve sünger örnekleriyle yapılan moleküler çalışmalarda ribozomal RNA analizleri kültüre edilemeyen denizel aktinomisetlerin varlığını göstermiştir. Bu aktinomisetlerin kültüre edilebilmesi ekolojik rollerinin anlaşılması açısından önem taşır. Bunun yanında bu yeni türlerin yeni bileşiklerin elde edilmesi için önemli bir kaynak oluşturması beklenmektedir (Lam, 2006). Önceleri denizel aktinomisetlerin izolasyon çalışmalarında zayıf sonuçlar elde edilmiştir. Denizel ortamların mikrobiyal çeşitlilik bakımından fakir olduğunun düşünülmesi ve deniz tabanından ve su filminden örneklemeler yapılırken karşılaşılan teknik ve lojistik

problemler izolasyon çalışmalarında başarısızlığa neden olmuştur (Olson et al., 2006).

Mikroorganizmaların doğal ortamlarından alınıp laboratuvar ortamında doğal olmayan ortamlarında üretilmesi mikroorganizmalar üzerinde stres oluşturup koloni oluşturmalarını önlemektedir. Mikroorganizmaların örneklerden yüksek oranda izole edilebilmesi için birçok yöntem denenmiştir (pH, ısıtma, dondurma). Julie Olson ve arkadaşları izolasyon besiyerine değişik oranlarda katalaz ve sodyum piruvat ekleyerek izolasyon oranını arttırmayı başarmışlardır (Olson et al., 2006).

Agogué ve arkadaşları deniz yüzeyinden izole ettikleri örneklerde 16S rDNA dizi analizlerine göre beş filogenetik grubun varlığını tespit etmiştir (Olson et al., 2006).

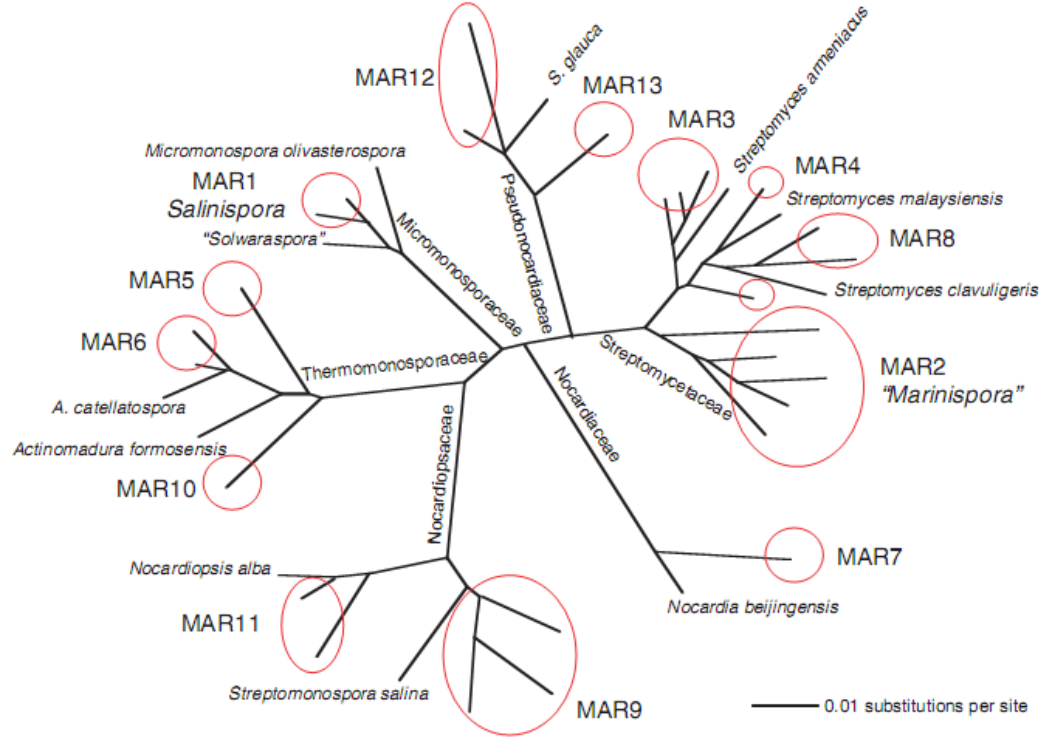
1. a-Proteobacteria
2. g-Proteobacteria
3. Cytophaga-Flavobacter-Bacteriodes (CFGs)
4. Actinobacteria (high G+C Gram-positive bacteria)
5. Firmicutes (low G+C Gram-positive bacteria) (Olson et al., 2006).

Yapılan kültür bazlı ve moleküler bazlı çalışmalar denizel aktinomisetlerin okyanusun her bölgesinde yaşayabildiğini göstermektedir. Derin deniz tabanından mercan kayalıklarına, sedimentlerden denizel bitki ve omurgasızlarına kadar geniş bir yaşama alanı oluşturmuşlardır. *Dietzia maris*, *Rhodococcus erytopolis* ve *Kocuria erythromyxa* Hokkaido'da denizin 1.225 metre derinliğinden izole edilmiştir, ayrıca Jensen Guam Adası'nda 10.923 metreden elde ettiği sediment örneklerinden beş yeni aktinomiset filotipi izole etmiştir (Lam, 2006).

Japonya'da Nankai Trough'da metan hidrat birikiminin olduğu bölgeden elde edilen sediment örneklerinde mikrobiyal popülasyonun %40'ının aktinomisetler olduğu rapor edilmiştir (Olson et al., 2006).

Aktinomiset cinsi üyeleri kültürel ve moleküler tekniklerle tanımlanmış, farklı denizel ekosistem koşullarından izole edilmiş türleri içerir. 13 denizel aktinomiset grubunun taksonomik yakınlığını gösteren radyal filogenetik ağaç Şekil 2.3'te verilmiştir (Solanski et al., 2008).

Yapılan son çalışmalarda denize adapte olmuş yeni spesifik bir aktinomiset grubunun taksonomide geniş bir yere sahip olduğunu göstermektedir. İki familya altında toplanan denizel aktinomisetler birçok cins içermektedir (Jensen and Fenical, 2005).



Şekil 2.3 Denizel aktinomiset grubu mikroorganizmaların taksonomik yakınlığını gösteren radyal filogenetik ağaç.

Salinispora büyümek için denizel ortama özellikle sodyuma ihtiyaç duymaktadır. Bu özelliğiyle denize adapte olmuş gerçek denizel aktinomiset olduğu söylenebilmektedir (Fenical and Jensen, 2006).

Denizel ortama adapte olmuş aktinomisetler ilk defa Jensen tarafından 1999 yılında rapor edilmiş ve büyümede kesin olarak deniz suyuna ihtiyaç duydukları belirtilmiştir. Daha sonraki çalışmalar bu suşları *Salinispora* adlı yeni bir cins taşımıştır. Kapsamlı bir tarama çalışması sonunda sediment örneklerinden izole edilen 2000 tür içinden sadece *Salinispora tropica* ve *Salinispora arenicola* ilgi çekici türler olarak saptanmıştır (Jensen and Fenical, 2005).

Salinispora tropica'dan elde edilen salinisporamid A, multiple myeloma hücrelerine karşı etkinlik gösteren yeni ve önemli bir bileşiktir.

Yeni bir cins olan *Salinispora*'dan yeni bir molekül elde edilmesi filotipik ve kemotipik bir korelasyon olduğunu doğrulamaktadır. Sonuçta yeni türlerin izole edilmesi yeni moleküllerin keşfinde ilk basamak olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Jensen and Fenical, 2005).

Salinispora'nın keşfiyle gerçek denizel aktinomisetlerin yalnız tuzlu suda büyüdüğü, bu yöntemle varlıklarının tespit edilebileceği düşünülürken diğer taraftan bunun gerçek denizel mikroorganizmaları ayırt etmek için doğru bir yöntem olmadığı anlaşılmıştır. Çünkü denizel kaynaklardan izole edilen ancak büyümek için deniz suyuna ihtiyaç duymayan bazı suşların yeni özel taksonomik sınıflara ait olduğu görülmüştür. Ayrıca bazı aktinomisetlerde büyümek için deniz suyuna duyulan ihtiyaç zamanla değişim göstermiştir. *Salinispora* türleri 10 yılı aşkın süredir bu fizyolojik özelliklerini korumuşlardır. *Marinispora* ise ilk izole edildiğinde tuza ihtiyaç duyarken uzun laboratuvar çalışmaları sonunda hala bu özelliğini koruyup korumadığı açık değildir (Jensen and Fenical, 2005).

Denizel kaynaklardan izole edilen aktinomisetler denizel ortamlara adapte olmuş veya denizel ortamda metabolik olarak aktif olabilen suşlardır. Gerçek denizel aktinomisetler dışında denizden izole edilen aktinomisetlerin karadan denize sürüklenip dormant sporlarıyla varlıklarını sürdürdükleri düşünülmektedir. Aradaki fark bu bakterilerin denizel bitkilerle ve omurgasızlarla ilişki formlarının ve besin siklusundaki yerlerinin anlaşılmasıyla gösterilebilecektir (Jensen and Fenical, 2005).

2.7 Denizel Aktinomisetlerden Elde Edilen Yeni Metabolitler

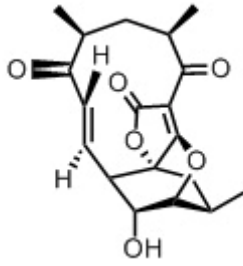
Denizel aktinomisetlerle ilgili uzun yıllardır çalışmalar yapılmasına rağmen yeni metabolitlerin keşfi birkaç yıl öncesine dayanmaktadır. Çizelge 2.4'de denizel aktinomisetlerden elde edilen bazı yeni metabolitlerin listesi verilmiştir (Solanski et al., 2008).

Çizelge 2.4: Denizel aktinomisetlerden elde edilen bazı yeni metabolitlerin listesi.

Kimyasal Grup	Bileşik	Kaynak	Aktivite
Meroterpenoid	Azamerone	<i>Streptomyces sp.</i>	Yok
Pyrroloseskiterpenes	Glaciapyrrole A, B ve C	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibakteriyel
Sesquiterpene	Neomarinone	Strain CNH-099	Sitotoksik
Poliketid	Saliniketal A, Saliniketal B	<i>Salinispora arenicola</i>	Antikanser
Poliketid	Abyssomicin C	<i>Verrucospora</i>	Antibakteriyel
Poliketid	SBR-22	<i>Streptomyces psommoticus</i>	antibakteriyel
Poliketid	Daryamides	<i>Streptomyces sp.</i>	Antikanser, antifungal
Poliketid	Actinofuranones A ve B	<i>Streptomyces sp.</i>	Sitotoksik
Peptid	Mechercharmycin	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	Antitümör
Peptid	Thiocoraline	<i>Micromonospora</i>	Antikanser, antibakteriyel
Peptid	CyclomarinA	<i>Streptomyces sp.</i>	Anti-inflamatuar, antiviral
Peptid	Piperazimycin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antikanser
Peptid	Dehydroxynocardamin ve desmethylenylnocardamin	<i>Streptomyces sp.</i>	B-inhibitörü
Peptid	Urukthapelstatin	<i>Mechercharimyces asporophorigenes</i>	Antikanser
Peptid	Salinamides A ve B	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibakteriyel, anti-inflamatuar
Caprolactone	R-10-methyl-6-undecanolid (6R,10S)-10-methyl-6-dodeconolid	<i>Streptomyces sp.</i>	Fitotoksik, antikanser
Butenolide	Butenolide	<i>Streptoverticillium luteoverticillatum</i>	Antikanser
Polycyclic xanthone	IB-00208	<i>Actinomadura</i>	Antikanser, antibakteriyel
Piericidin	Piericidins C7 ve C8	<i>Streptomyces</i>	Antikanser
Quinone	Resistomycin	<i>Streptomyces corchorusii</i>	Antiviral
Quinone	Tetracenomycin D	<i>Streptomyces corchorusii</i>	Antikanser, antibakteriyel
Quinone	Resistoflavine	<i>Streptomyces corchorusii</i>	Antikanser, antibakteriyel
Quinone	Himalomycins A ve B	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibakteriyel
Quinone	Helquinoline	<i>Janibacter limosus</i>	Antibakteriyel
Quinone	Chlorinated dihydroquinones	CNQ-525	Antikanser, antibakteriyel
Macrolide	Chalcomycin A	<i>Streptomyces sp.</i>	Yok
Macrolide	Arenicolide A	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibakteriyel
Macrolide	Marinomycins	<i>Marinispora</i>	Antikanser, antibakteriyel
Alkaloid	K252c ve arcyriflavin A	Z (2)0392	Antikanser
Ester	Bonactin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibakteriyel, antifungal
Manumycin türevleri	Chinikomycins A ve B	<i>Streptomyces sp.</i>	Antikanser
Kompleks bileşikler	Trioxacarcins	<i>Streptomyces ochraceus</i> ve <i>Streptomyces bottropensis</i>	Antikanser, antimalarial
Methylpyridine	Streptokordin	<i>Streptomyces sp.</i>	Antikanser
Gamma lactam beta lactone	Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Antikanser
Macrocylic lactam	Aureoverticillactam	<i>Streptomyces aureoverticillaris</i>	Antikanser
Enzim inhibitörü	Alpha-amylase inhibitor	<i>Streptomyces corchorusii</i> subsp. <i>rhodomarinus</i> subsp. <i>Nov</i>	Enzim inhibisyonu
Enzim inhibitörü	Pyrostatins A ve B	<i>Streptomyces sp.</i>	N-acetyl-beta
Enzim inhibitörü	Pyrizinostatın	<i>Streptomyces sp.</i>	Pyroglutamyl peptidase inhibisyonu

2.7.1 Abyssomicin C

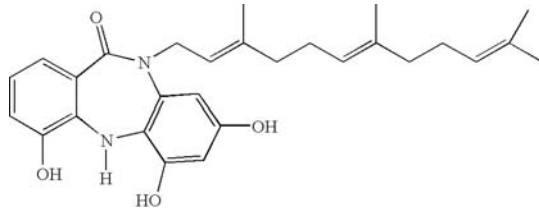
Japon denizinde 289 metre derinlikten alınan sediment örneğinden izole edilmiş bir *Verrucospora* türünden elde edilmiş polisiklik poliketid antibiyotiktir. Bu yüzden abyss (derin) ismi verilmiştir (Baltz, 2007). Para-aminobenzoik asit biyosentezini inhibe etmesiyle bilinen bu molekül, folik asit biyosentezini bilinen ilaçlardan daha erken safhada inhibe etmektedir. Çoklu dirençli ve vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir.



Şekil 2.4 Abyssomicin C'nin kimyasal yapısı.

2.7.2 Diazepinomicin

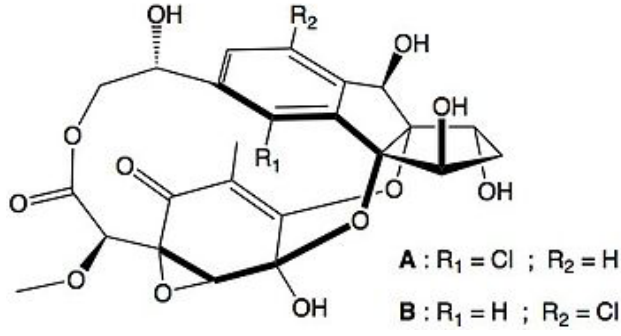
Micromonospora cinsine ait bir türden elde edilmiş bu molekülün antibakteriyel etkisinin yanında, farelerde yapılan in vivo çalışmalarda beyin, göğüs ve prostat kanserine karşı etkinliği gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Diazepinomicin'nin kimyasal yapısı.

2.7.3 Sporolides A ve B

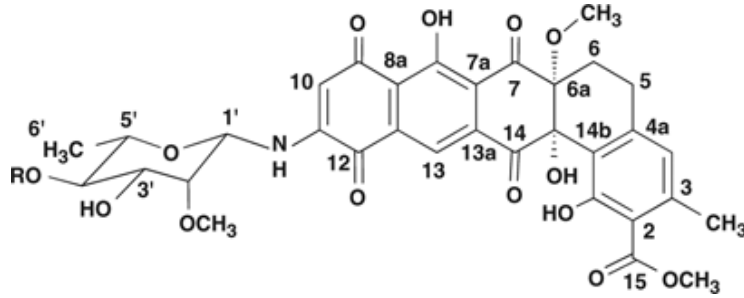
Salinispora tropica'dan elde edilen bu iki yeni makrolid antimikrobiyal ve antikanser denemelerde bir aktivite göstermemiş olsa da yeni molekül yapılarına sahip olmalarıyla önem taşımaktadırlar.



Şekil 2.6 Sporolides A ve B'nin kimyasal yapısı.

2.7.4 Arenimisin

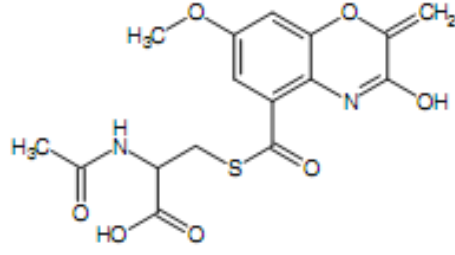
2002 yılında Bahama Adaları'ndan toplanan Ascidianlar'dan izole edilen *Salinispora arenicola*'dan elde edilmiş MRSA ya karşı antimikrobiyal etkin bir moleküldür (Asolkar et al., 2009).



Şekil 2.7 Arenimisin'nin kimyasal yapısı.

2.7.5 Benzoxazine

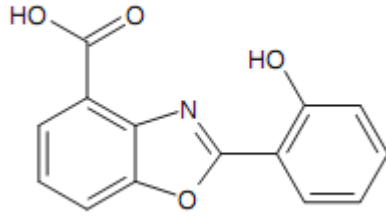
Atlantik okyanusunun 3814 metre derinliğinden izole edilen bir *Streptomyces* türünden elde edilen bu molekül güçlü bir glikojen sentaz kinaz inhibitörüdür (Goodfellow and Fiedler, 2010).



Şekil 2.8 Benzoxazine'nin kimyasal yapısı.

2.7.6 Caboxamycin

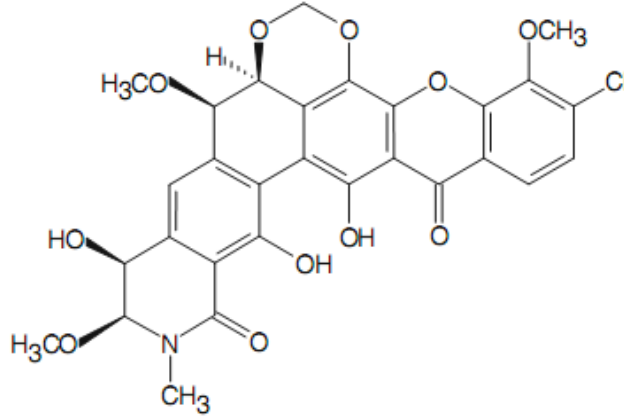
Bu yeni benzoxazole antibiyotiği bir *Streptomyces* türünden elde edilmiş ve gram pozitif bakteriler üzerinde inhibe edici etkisi yanında sitotoksik etkinlik te gösterilmiştir (Goodfellow and Fiedler, 2010).



Şekil 2.9 Caboxamycin'nin kimyasal yapısı.

2.7.7 Dermacozinler:

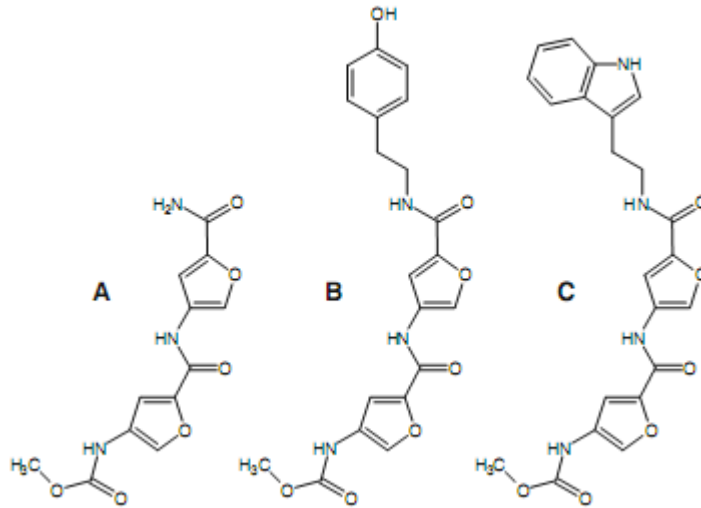
2006 yılında Pasifik okyanusunda bulunan Mariana Çukurunun 10.898 metre derinliğinden izole edilen *Dermacoccus*'tan izole edilen bu yeni metabolitler dermacozinler olarak adlandırılmıştır. Antitümör, antiprotozoal ve serbest radikal süpürücü aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir (Goodfellow and Fiedler, 2010).



Şekil 2.12 Lysolipin'nin kimyasal yapısı.

2.7.10 Proximicins A, B ve C:

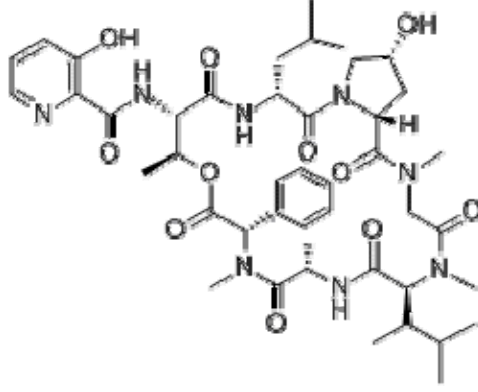
Norveç Raune Körfezi'nde 250 metre derinlikten izole edilen *Verrucospora* cinsine ait bir türden aminofuran tipi antibiyotikler elde edilmiştir. Proximiciner zayıf antimikrobiyal etkinliklerinin yanında insan tümör hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksik aktiviteye sahiptirler (Goodfellow and Fiedler, 2010).



Şekil 2.13 Proximicins A, B ve C'nin kimyasal yapısı.

2.7.11 Etamisin:

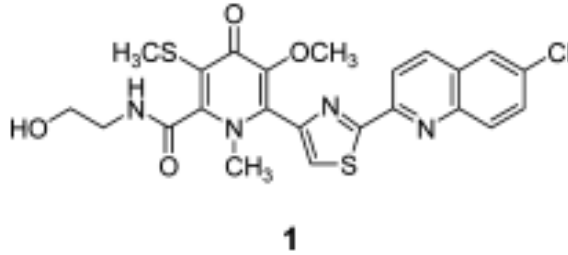
Fiji’de 0.5 metre derinlikten toplanan örneklerden izole edilen *Streptomyces* türünden elde edilen bu bileşik MRSA’ya karşı yüksek antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (Haste et al., 2010).



Şekil 2.14 Etamisin’in kimyasal yapısı.

2.7.12 Lodopyridone:

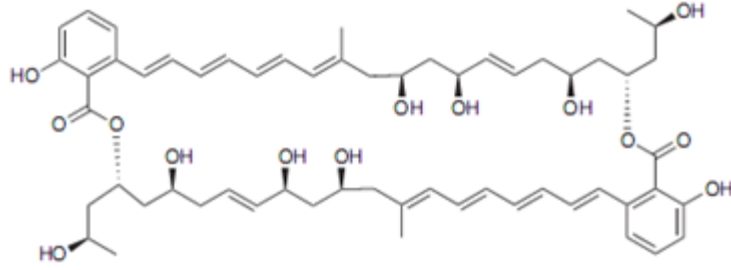
La Jolla’da 45 m derinlikten izole edilen *Saccharomonospora marina sp. nov.*’dan elde edilen bu molekül insan kolon adenokarsinoma hücre hattına karşı sitotoksik aktivite göstermiştir (Maloney et al., 2009).



Şekil 2.15 Lodopyridone’nin kimyasal yapısı.

2.7.13 Marinopirol A ve B

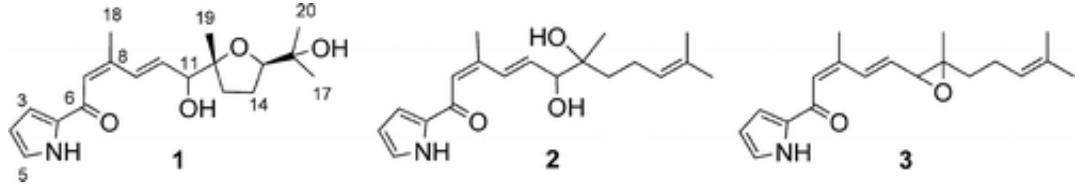
La Jolla’dan denizel sedimentlerden izole edilmiş *Streptomyces sannurensis* MRSA’ya karşı antimikrobiyal etkinliği olan bu metabolitleri sentezlemiştir (Hughes et al., 2007).



Şekil 2.18 Marinomycin A'nın kimyasal yapısı.

2.7.16 Glyciapyrroles A, B ve C

Alaska'da toplanan sediment örneklerinden izole edilen bir *Streptomyces* türünden elde edilen bu üç yeni pirolseskiterpen bileşiğin antimikrobiyal etkinliği bulunmuştur.



Şekil 2.19 Glyciapyrroles A(1), B(2) ve C(3)'nin kimyasal yapısı.

3. MATERYAL

3.1 Örneklerin Toplandığı İstasyonlar

Denizel ortamlarda yaşayan aktinomisetlerden yeni biyoaktif moleküllerin keşfi amacı ile başlatılmış olan TÜBİTAK SBAG 109S361 numaralı proje kapsamında Ege ve Akdeniz Bölgesi'ndeki 7 ayrı istasyonun farklı derinliklerinden 62 sünger örneği SCUBA dalış yapılarak toplanmış, steril kaplar içerisinde +4°C'de muhafaza edilerek laboratuara getirilmiştir. Bu sünger örneklerinden izole edilen 267 mezofilik aktinomiset suşu materyal olarak kullanılmıştır. Sünger örneklerinin toplandığı lokasyonlar Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Örneklerin toplandığı lokasyonlar.

Sünger kodu	Sünger adı	Lokasyon	Tarih	Derinlik (m)
1-1	<i>Axinella polypoides</i>	Bodrum	09.02.10	34
1-2	<i>Agelas oroides</i>	Bodrum	09.02.10	28
1-3	<i>Cacospongia sp.</i>	Bodrum	09.02.10	20
1-4	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Bodrum	09.02.10	12
1-5	<i>Ircinia sp.</i>	Bodrum	09.02.10	8
1-6	<i>Dysidea avara</i>	Bodrum	09.02.10	5
2-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Saros	17.06.10	5
2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	17.06.10	10
2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	17.06.10	5
3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	18.06.10	1.5
4-1	<i>Dysidea avara</i>	Ayvalık	19.06.10	20
42	<i>Oscarella lobularis</i>	Ayvalık	19.06.10	20
4-3	<i>Axinella polypoides</i>	Ayvalık	19.06.10	28
4-4	<i>Axinella cannabina</i>	Ayvalık	19.06.10	28
4-5	<i>Agelas oroides</i>	Ayvalık	19.06.10	28
4-6	<i>Ircinia variabilis</i>	Ayvalık	19.06.10	28
4-7	<i>Aplysina aerophoba</i>	Ayvalık	19.06.10	28
4-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Ayvalık	19.06.10	28
4-9	<i>Axinella damicornis</i>	Ayvalık	19.06.10	20

Çizelge 3.1 (devam)

Sünger kodu	Sünger adı	Lokasyon	Tarih	Derinlik (m)
4-10	<i>Acanthella acuta</i>	Ayvalık	19.06.10	20
5-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Teos	20.06.10	4
5-2	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Teos	20.06.10	4
5-3	<i>Spirastrela cunctatrix</i>	Teos	20.06.10	3
5-4	<i>Hemimycale columella</i>	Teos	20.06.10	3
6-01	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	23.07.10	24
6-02	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	23.07.10	24
6-03	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	23.07.10	24
6-04	<i>Chondrosia reniformis</i>	Kaş	23.07.10	24
6-05	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	23.07.10	24
6-06	<i>Phorbas fictitius</i>	Kaş	24.07.10	24
6-07	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	24.07.10	12
6-08	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	24.07.10	24
6-09	<i>Coco spongia</i>	Kaş	24.07.10	1
6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	25.07.10	20
6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	25.07.10	20
6-12	*	Kaş	25.07.10	12
6-13	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	25.07.10	20
6-14	*	Kaş	25.07.10	20
6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	25.07.10	24
6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	25.07.10	24
6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	29.07.10	26
6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	29.07.10	12
6-19	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	29.07.10	12
6-20	<i>Axinella damicornis</i>	Kaş	29.07.10	24
6-21	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kaş	29.07.10	24
6-22	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	29.07.10	24
6-23	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kaş	30.07.10	27
6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	30.07.10	24
6-25	*	Kaş	30.07.10	24
6-26	*	Kaş	31.07.10	9.5
6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	31.07.10	12

Çizelge 3.1 (devam)

Sünger kodu	Sünger adı	Lokasyon	Tarih	Derinlik (m)
6-28	<i>Dysidea sp.</i>	Kaş	31.07.10	26
6-29	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	31.07.10	24
7-1	<i>Cliona viridis</i>	Kekova	26.07.10	12
7-2	<i>İrcinia variabilis</i>	Kekova	26.07.10	1
7-3	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	26.07.10	1
7-4	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	26.07.10	1
7-5	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	26.07.10	12
7-6	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	26.07.10	12
7-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kekova	27.07.10	24
7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	27.07.10	24
7-9	<i>İrcinia sp.</i>	Kekova	27.07.10	26

*: Tür tayini yapılamayan sünger örnekleri.

Toplanan sünger örneklerinin fotoğrafları Şekil 3.1'de verilmiştir.



Axinella polypoides



Agelas oroides



Cacospongia sp.



Ciocalypta carballoi



Ircinia sp.



Dysidea avara



Chondrosia reniformis



Tethya aurantium



Aplysina aerophoba



Ircinia sp.



Dysidea avara



Oscarella lobularis



Axinella polypoides



Axinella cannabina



Agelas oroides



Ircinia variabilis



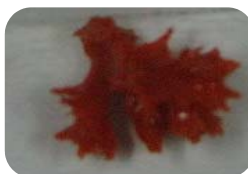
Aplysina aerophoba



Sarcotragus foetidus



Axinella damicornis



Acanthella acuta



Chondrosia reniformis



Sarcotragus foetidus



Spirastrela cunctatrix



Hemimycale columella



Axinella polypoides



Agelas oroides



Axinella polypoides



Chondrosia reniformis



Diridera avara



Phorbast fictitius



Axinella polypoides



Crambe crambe



Coco spongia

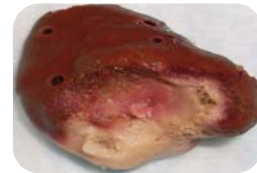


HippoSpongia officinalis



Crambe crambe



*Dysidea avara**Axinella polypoides**Ciocalypta carballo**Chondrilla nucula**Agelas oroides**Axinella polypoides**Axinella damicornis**Petrocia ficiformis**Ciocalypta carballo**Sarcotragus foetidus**Dysidea avara**Dysidea sp.**Ciocalypta carballo**Ircinia sp.**Dysidea sp.**Ciocalypta carballo**Clione viridis*

*Ircinia variabilis**Petrosia ficiformis**Petrosia ficiformis**Petrosia ficiformis**Petrosia ficiformis**Axinella polypoides**Sarcotragus foetidus**Ircinia sp.*

Şekil 3.1 Toplanan sünger örneklerinin fotoğrafları.

3.2 Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri 1: Aktinomiset İzolasyon Ortamı

22g besiyeri (Difco™ Actinomycete Isolation Agar-212168) tartılarak, 5 ml gliserol ile birlikte, 1 L distile suda (%50 deniz suyu) tamamen çözülünceye kadar karıştırılmış, 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri aktinomisetlerin izolasyonu ve kültürlerin devamlılığı için büyüme ortamı olarak kullanılmıştır (Naidenova and Vladimirova, 2000-2002).

Besiyeri 2: Soya Mannitol Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri çalışmamızda spor süspansiyonu hazırlanmasında kullanılmıştır.

Soya Mannitol İçeriği:

Soya unu	20g
Mannitol	20g
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 3: M1

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri izolasyon çalışmalarında ve aktivite belirlenen izolatların fermantasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Mincer et al., 2002).

M1 Besiyeri İçeriği:

Çözünür nişasta	10g
Maya özütü	4g
Pepton	2g
Deniz suyu	1 L

Besiyeri 4: M6

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Webster et al., 2001).

M6 Besiyeri İçeriği:

Et özütü	4g
Pepton	4g
Maya özütü	1g
Glukoz	10g
NaCl	20g
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 5: Gliserol-Maya Özüdü

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri saflık kontrolü çalışmalarında kullanılmıştır (Oskay et al., 2004).

Gliserol Maya Özüdü İçeriği:

Gliserol	5g
Maya özüdü	2g
K ₂ HPO ₄	0.1g
Pepton	25g
Distile su	1 L

Besiyeri 6: R2A

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Hardoim et al., 2009).

R2A İçeriği:

Maya özüdü	0.5g
Glukoz	0.5g
Pepton	0.5g
Kazein hidrolizat	0.5g
Nişasta	0.5g
Sodyum piruvat	0.3g
K ₂ HPO ₄	0.3g
Magnezyum sülfat	0.05g
Agar	18g
Distile su	500 ml
Deniz suyu	500 ml

Besiyeri 7: Mueller-Hinton Agar

21g besiyeri (Oxoid Mueller-Hinton Broth-CM0405, meat infusion 2g, kazein hidrolizat 17.5g, çözümlü nişasta 1.5g, Agar 20g) 1L distile suda tamamen çözümlünceye kadar karıştırılmış, 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (pH 7.5). Bu besiyeri antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında test bakterileri için kullanılmıştır.

Besiyeri 8: LB Broth

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. DNA izolasyonu yapılan izolatlar için kullanılmıştır (Hamaki et al., 2005).

LB Broth Ortam İçeriği:

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

İz Element Solüsyonu

Aşağıda belirtilen tuzlar iyice çözülünceye kadar karıştırılmış ve besiyeri 10, 11, 12 ve 14 için iz element solüsyon stoku olarak kullanılmıştır.

FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.1g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.1g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	01g
Distile su	100 ml

Besiyeri 9: Maya - Malt Özütü Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Maya - Malt Özütü Agar İçeriği:

Maya özütü	4g
Malt özütü	10g
Dekstroz	4g
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 10: Yulaf Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Yulaf Agar İçeriği:

Yulaf ezmesi	20g
Agar	18g
İz element solüsyonu:	1 ml
Distile su	1 L

Besiyeri 11: Nişasta –İnorganik Tuz Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Nişasta –İnorganik Tuz Agar İçeriği:

Nişasta	10g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
NaCl	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
İz element solüsyonu	1 ml
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 12: Gliserol Asparajin Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Gliserol Asparajin Agar İçeriği:

L- Asparajin	1g
Gliserol	10g
K ₂ HPO ₄	1g
İz element solüsyonu	1 ml
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 13: Pepton- Maya Özütü Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Pepton- Maya Özütü Agar İçeriği:

Pepton demir agar	36g
Maya özütü	1g
Distile su	1 L

Besiyeri 14: Tirozin Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Shirling and Gottlieb, 1966).

Tirozin Agar İçeriği:

Gliserol	15g
L-tirozin	0.5g
L- asparjin	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
NaCl	0.5g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01g
İz element solüsyonu	1 ml
Agar	20g
Distile su	1 L

Besiyeri 15: Glukoz Maya Özütü Agar

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Falkow et al., 2006).

Glukoz Maya Özütü Agar İçeriği

Glukoz	4g
Maya özütü	4g
Malt özütü	10g
Agar	20g
Distile su	1 L

3.3 Test Organizmaları

Örneklerden izole edilen aktinomisetlerin antimikrobiyal aktivitelerini saptamak için Refik Saydam Hıfzısıhha Müdürlüğü Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen aşağıdaki test organizmaları kullanılmıştır.

1. *Escherichia coli* O157:H7 (RSKK 232)
2. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (RSKK 95047)

3.4 Ekstraksiyon ve Yoğunlaştırma

Aktinomiset kültürlerinden elde edilen fermantasyon sıvılarının ekstraksiyonunda etil asetat (EtOAc) (Merck) kullanılmıştır. Yoğunlaştırma işlemi 37°C'de rotary evaporatörde yapılmıştır.

3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülemesi

Bazı izolatların mikroskop görüntüleri 15.000, 25.000, 50.000 ve 100.000'lik büyütme yapılarak FEI Quanta 250 FEG model taramalı elektron mikroskobu ile alınmıştır.

3.6 DNA İzolasyonu ve Sekans Analizi

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

Tris baz	242g
Glasiyal asetik asit	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8)	100 ml

242 gram Tris baz 600 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra glasiyel asetik asit, daha sonra da EDTA eklenmiştir. Hacim yine distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanmıştır.

Potasyum Asetat tamponu:

Potasyum asetat 5M:	60 ml
Glasiyel asetik asit:	11.5 ml
Distile su:	28.5 ml

Liziz Tamponu:

Tris (pH 8):	10 mM
EDTA (pH 8):	0.1 M
0.3 % SDS	

Hacmin ayarlanmasında ultra saf su kullanılmıştır.

Elektroforezde kullanılan:

Marker : Gene Ruler 100bp DNA
Yükleme boyası : 6X Loading Dye Solution

Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR) için kullanılan primerler:

27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

1492R: TACGGYTACCTTGTTACGAG

Sekanslama için kullanılan cihaz: ABI 3100 Genetic Analyzer

4. YÖNTEMLER

4.1 Aktinomiset İzolasyonu

Aktinomiset izolasyonu yapılan sünger örnekleri Ege ve Akdeniz Bölgesi'nden toplanmıştır. Elde edilen örneklerden uygun yöntemler kullanılarak aktinomiset izolasyonu yapılmıştır.

Toplanan örnekler laboratuara deniz suyu içerisinde +4°C'de muhafaza edilerek getirilmiştir. Süngerler steril deniz suyuyla 5 kez yıkanarak yüzeysel bakterilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama sonrası sünger örnekleri yaklaşık 1 cm³'lük boyutlarda kesilerek 10 hacim steril deniz suyuyla homojenize edilmiştir. Daha sonra her örneğin 10⁻¹, 10⁻²'lik seyreltmeleri hazırlanarak 1, 3, 4 ve 6 No'lu besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Hazırlanan petriler 28°C'de 21 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerlerine fungal büyümeyi baskılamak amacıyla nistatin (50 µg ml⁻¹) ve hızlı büyüyen Gram negatif bakterileri baskılamak için de nalidiksik asit (20 µg ml⁻¹) eklenmiştir (Ensign, 1992; Song et al., 2001).

İnkübasyon süresi sonunda izolasyon ortamında tespit edilen aktinomiset kolonileri 2 ve 5 No'lu besiyerlerine çizgi ekim yapılarak ekilmiş, 7 gün boyunca 28°C'de inkübasyona kaldırılmıştır. Saflikları kontrol edilen izolatlar yatık olarak hazırlanan 1 No'lu besiyerinde üretilip +4°C'de, ayrıca spor süspansiyonları yapılarak -20°C ve -86°C'de stoklanmıştır (Ensign, 1992; Song et al., 2001).

4.2 Spor Süspansiyonu Hazırlanması

Saf olarak elde edilen izolatlar 2 No'lu besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile inoküle edilmiş ve 28°C'de 5-7 gün olgun sporulasyon aşaması gerçekleşinceye kadar inkübe edilmiştir. Ardından olgun sporlar steril pamuk yardımıyla %20 steril gliserol içerisine alınarak -20°C ve -86°C 'de stoklanmıştır.

4.3 Küçük Çaplı Fermantasyon Çalışmaları

İzole edilip saflaştırılan her bir aktinomiset suşu için 3 No'lu besiyerinden 50 ml içeren 250 ml'lik erlenler hazırlanmış ve 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3 No'lu besiyerinde petri içinde üretilmiş her bir izolattan steril kabin içerisinde bir öze dolusu spor alınmış, steril edilmiş 50 ml besiyeri içeren erlen içerisine aşılanmıştır. 28°C'de rotary çalkalayıcıda 150 devir/dakika çalkalama hızında 7 gün inkübe edilmiştir. Fermantasyon 267 tane 250 ml'lik erlende gerçekleştirilmiştir (Mincer et al., 2002) .

Fermantasyon bitiminde kontaminasyon olup olmadığı 5 No'lu besiyerinde kontrol edilmiş, kontaminasyon tespit edilen üretimlerde stok kontaminasyonu araştırılıp üretime yeniden başlanmıştır.

4.4 Ekstraksiyon

Elde edilen fermantasyon sıvıları düzgün pelletler oluşturduysa süzme işlemi ile aksi durumda santrifüjleme yapılarak hücre ve hücre kalıntılarında arındırılmıştır. Elde edilen berrak süzüntü hacminin 1/2'si kadar EtOAc ile 2 kez partisyona tabi tutulmuştur. Birleştirilen EtOAc fazları rotary evaporatörde 40°C'de vakum altında uçurulmuştur. Elde edilen ekstratlar 300 ml EtOAc'ta çözülerek bunun 30 µl'si disklere yüklenmiş, disk difüzyon yöntemi ile patojenlere karşı test edilmiştir.

4.5 Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yönteminde test mikroorganizmaları deneme öncesi aktif hale getirilerek 24 saatlik genç kültürler denemeye alınmıştır. Aktivasyonda bakteriler için 7 No'lu besiyeri kullanılmıştır. 0.5 McFarland bulanıklık standardına göre hazırlanan test organizmaları (*E.coli* 0157:H7 RSSK 234 ve *S. aureus* (metisilin

dirençli) RSSK 95047), steril eküvyon çubuk yardımıyla petrilere dökülmüş besiyerlerinin üzerine inoküle edilmiştir. Ardından aktivitesi incelenecek ekstreler disklere emdirilmiş ve kontrol antibiyotiği ile birlikte petrilere steril bir pens yardımıyla yerleştirilmiştir. Kontrol antibiyotiği olarak 10 µg gentamisin diske emdirilmiştir. İnkübasyon öncesi 2 saat +4 °C'de bekletilen petrilere daha sonra 37°C'ye alınarak 24 saat inkübasyon sonrası disklerin çevresinde oluşan zonlar mm cinsinden ölçülmüştür (Denizci, 1996; Korkmaz, 2006).

4.6 İzolatların pH, Tuz ve Sıcaklık Toleranslarının ve Şeker Kullanımlarının Belirlenmesi

MRSA ve *E.coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösteren aktinomiset türleri içinden seçilen 19 izolatın pH, tuz ve sıcaklık toleranslarının ve şeker ihtiyaçlarının belirlenmesi için bir dizi test yapılmıştır. Bunun için elde edilen morfolojik ve kültürel karakterlerin karşılaştırılması; *Methods for Characterization of Streptomyces Species* (Shirling ve Gottlieb, 1966) literatürlerine dayanılarak gerçekleştirilmiştir.

İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi için 15 No'lu besiyerine %0, %2.5, %5, %7.5, %10, %12.5, %15 ve %17.5 oranlarında NaCl ilave edilerek petrilere paylaştırılmıştır her bir izolattan bu besiyerlerine çizgi ekim yapılmış, 28°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İzolatların pH toleranslarının belirlenmesi için 15 No'lu besiyeri pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 olacak şekilde hazırlanmış ve petrilere her bir izolattan çizgi ekim yapılarak 28°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İzolatların üredikleri sıcaklık aralıklarının belirlenmesi için her bir izolat 15 No'lu besiyeri içeren 9 petriye çizgi ekim yapılmış, 4°C, 10°C, 20°C, 28°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C ve 60°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İzolatların kullandıkları şekerlerin belirlenmesi için 15 No'lu besiyerine yalnız glukoz, sukroz, rafinoz, selüloz, fruktoz ve mannitol içeren petrilere hazırlanmış, her bir izolattan çizgi ekim yapılmış, 28°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Karbon kaynaklarının kullanımı 15 No'lu besiyerinde 14 gün

sonunda, şeker kaynakları içeren pozitif kontrol ortamı ve karbon kaynaqsız negatif kontrol ortamı ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

4.7 DNA İzolasyonu ve Sekans Analizi

4.7.1 Genomik DNA izolasyonu

Moleküler genomik DNA izolasyonu Liu et al. (2000) tarafından tanımlanan metoda göre gerçekleştirilmiştir. İzolatlar 8 No'lu besiyerinden 4 ml içeren cam tüplere inoküle edilmiş, 28°C'de orbital çalkalayıcıda 150 rpm çalkalama hızında 36-48 saat inkübe edilmiştir.

Fermantasyondan sonra ortamdan 1-1.5 ml fermantasyon sıvısı alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 7.000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler alınmıştır. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri üzerine 0.01 mg lizozim ilave edilmiştir ve 37°C' de 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra karışım üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edilip homojenize edilmiş ve su banyosunda 65°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra pellet üzerine soğuk etanol (%70) ilave edilerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak pellet kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra pellet üzerine 150 µl potasyum asetat solüsyonu eklenip homojenize edilmiş ve ardından 12.000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilmiş ve aynı şekilde santrifüjlenerek DNA çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra soğuk etanol (%70 v/v, 300 µl) ile muamele edildikten sonra etanol uçurulmuştur. Ardından pellet, üzerine 50 µl ultra saf su eklenerek süspanse edilmiş ve genomik DNA, bütünlüğü ve saflığı açısından agaroz jel elektroforezi kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.7.2 Agaroz jel elektroforezi

%1'lik agaroz jel hazırlamak amacı ile 1g agaroz 100 mL 1X TAE elektroforez tamponuna eklenmiş ve mikrodalga fırında çözülmüştür. Karışımın

homojen olması sağlanmıştır. Yaklaşık 40-45°C'ye kadar soğutularak son konsantrasyonu 5µg/100 ml olacak şekilde 10000X GelRed boyası eklenmiş ve jel kasete dökülmüştür. 30-60 dakika süre ile donması beklenmiştir. Taraklar çıkarılmış ve jel, içinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

İzole edilen genomik DNA örneklerinden 8 µl alınarak 2 µl jel yükleme tamponu (6X) ile karıştırılmış ve jel üzerindeki kuyucuklara dikkatlice yüklenmiştir. İlk kuyucuğa DNA standardı yüklenmiş ve yürütme işlemi 100 V altında gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1997).

4.7.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

16S ribozomal RNA dizisini kodlayan gen bölgesini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltmak için Bölüm 3.6'da dizisi verilen 27F ve 1492R primerler kullanılmıştır. PZR karışımı 10X Taq buffer, 0.2 mM dNTP, 0.75 mM MgCl₂, 1.25 U Taq polimeraz (Fermantas), 0.4 pmol/µL primer ve 150 ng DNA içerecek şekilde toplam 50 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PZR programı ise ön denatürasyon için 94°C'de 30 saniye, ardından 30 döngü 94°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye ve 72°C'de 45 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürününün 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütülerek kalitesi ve miktarı kontrol edilmiş ve uygun PZR ürünleri saflaştırılmıştır.

4.7.4 DNA dizi analizi ve değerlendirme

PZR sonrası belirlenen DNA dizilerinin değerlendirilmesi alignment ve filogenetik analiz MEGA Software kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaç Neighbour-joining yöntemi ile 3000 bootstrap değeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaca eklenen referans bakteri dizileri NCBI'a ait gen bankasından elde edilmiştir.

4.8 Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri:

1 No'lu besiyerine ekim filtre kağıdı üzerine yapılmıştır. Üzerleri kapatılan 03-SM-004, 06-SM-126 ve 07-SM-126 kodlu izolatlar 48-72 saat süreyle 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda steril koşullarda pens yardımıyla besiyeri üzerinden alınan filtreler laminar flow içinde kurutulmuştur. Daha sonra SEM için altın kaplanan örnekler Bölüm 3.5'te özellikleri verilen Taramalı Elektron Mikroskobu ile farklı büyütmelemlerde incelenmiştir.

5. BULGULAR

5.1 Aktinomiset İzolasyonu

Bu çalışmada 7 istasyondan toplanan 62 sünger örneğinden aktinomiset izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen 267 mezofilik aktinomiset suşuna ait bilgiler Çizelge 5.1’de sunulmuştur.

Çizelge 5.1 İzole edilen aktinomisetlere ait bilgiler.

İzolat Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
02-SM-001	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
02-SM-002	2-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Saros	M6
02-SM-003	2-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Saros	M1
02-SM-004	2-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Saros	M1
02-SM-005	2-1	<i>Chondrosia reniformis</i>	Saros	AİO
02-SM-006	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M1
02-SM-007	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M1
02-SM-008	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M1
02-SM-009	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M1
02-SM-010	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M1
02-SM-011	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M1
02-SM-012	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	AİO
02-SM-013	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	AİO
02-SM-014	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	AİO
02-SM-015	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	AİO
02-SM-016	2-2	<i>Tethya aurantium</i>	Saros	M6
02-SM-017	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M1
02-SM-018	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M1
02-SM-019	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M1
02-SM-020	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	AİO
02-SM-021	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M1
02-SM-022	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M6
02-SM-023	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M6
02-SM-024	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	AİO
02-SM-025	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	AİO
02-SM-026	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
02-SM-027	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
02-SM-028	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
02-SM-029	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
02-SM-030	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
02-SM-031	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M1

Çizelge 5.1 (devam)

İzolat Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
02-SM-032	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	M1
02-SM-033	2-3	<i>Aplysina aerophoba</i>	Saros	R2A
03-SM-001	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-002	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-003	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-004	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-005	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-006	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-007	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-008	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M1
03-SM-009	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M6
03-SM-010	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M6
03-SM-011	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	M6
03-SM-012	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	AİO
03-SM-013	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	AİO
03-SM-014	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	AİO
03-SM-015	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	AİO
03-SM-016	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	AİO
03-SM-017	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	AİO
03-SM-018	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	R2A
03-SM-019	3-1	<i>Ircinia sp.</i>	Çanakkale	R2A
04-SM-002	4-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Ayvalık	M6
04-SM-003	4-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Ayvalık	M6
04-SM-006	4-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Ayvalık	M1
05-SM-002	5-2	<i>Sarcotragus foeditus</i>	Teos	M6
05-SM-003	5-2	<i>Sarcotragus foeditus</i>	Teos	M6
05-SM-004	5-2	<i>Sarcotragus foeditus</i>	Teos	M6
05-SM-005	5-3	<i>Spirastrela cunctatrix</i>	Teos	M6
05-SM-006	5-3	<i>Spirastrela cunctatrix</i>	Teos	M6
05-SM-007	5-4	<i>Hemimycale columella</i>	Teos	M6
05-SM-008	5-4	<i>Hemimycale columella</i>	Teos	M6
05-SM-009	5-4	<i>Hemimycale columella</i>	Teos	AİO
06-SM-001	6-1	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	AİO
06-SM-002	6-1	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-003	6-2	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M6
06-SM-004	6-2	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	AİO
06-SM-005	6-2	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-006	6-2	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-007	6-2	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-008	6-3	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M6
06-SM-009	6-3	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	AİO
06-SM-010	6-3	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	AİO

Çizelge 5.1 (devam)

İzolat Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
06-SM-011	6-3	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-012	6-3	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-013	6-3	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-014	6-4	<i>Chondrosia reniformis</i>	Kaş	M6
06-SM-015	6-4	<i>Chondrosia reniformis</i>	Kaş	AİO
06-SM-016	6-4	<i>Chondrosia reniformis</i>	Kaş	R2A
06-SM-017	6-4	<i>Chondrosia reniformis</i>	Kaş	M1
06-SM-018	6-4	<i>Chondrosia reniformis</i>	Kaş	MEA
06-SM-019	6-5	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-020	6-5	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-021	6-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M6
06-SM-022	6-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	AİO
06-SM-023	6-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-024	6-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-025	6-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-026	6-8	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	R2A
06-SM-027	6-8	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	M1
06-SM-028	6-9	<i>Coco spongia</i>	Kaş	M6
06-SM-029	6-9	<i>Coco spongia</i>	Kaş	AİO
06-SM-030	6-9	<i>Coco spongia</i>	Kaş	AİO
06-SM-032	6-9	<i>Coco spongia</i>	Kaş	R2A
06-SM-033	6-9	<i>Coco spongia</i>	Kaş	R2A
06-SM-034	6-9	<i>Coco spongia</i>	Kaş	M1
06-SM-035	6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	M6
06-SM-036	6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	AİO
06-SM-037	6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	AİO
06-SM-038	6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	R2A
06-SM-039	6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	R2A
06-SM-040	6-10	<i>HippoSpongia officinalis</i>	Kaş	M1
06-SM-041	6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	M6
06-SM-042	6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	M1
06-SM-043	6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	M1
06-SM-044	6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	R2A
06-SM-045	6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	R2A
06-SM-046	6-11	<i>Crambe crambe</i>	Kaş	M6
06-SM-047	6-12	*	Kaş	M1
06-SM-048	6-12	*	Kaş	M1
06-SM-049	6-12	*	Kaş	M1
06-SM-050	6-12	*	Kaş	AİO
06-SM-051	6-12	*	Kaş	R2A
06-SM-052	6-12	*	Kaş	R2A
06-SM-053	6-12	*	Kaş	M6

Çizelge 5.1 (devam)

İzolot Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
06-SM-054	6-12	*	Kaş	M6
06-SM-055	6-13	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	M6
06-SM-056	6-13	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-057	6-13	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	M1
06-SM-058	6-13	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	MEA
06-SM-060	6-14	*	Kaş	M6
06-SM-061	6-14	*	Kaş	AİO
06-SM-062	6-14	*	Kaş	AİO
06-SM-063	6-14	*	Kaş	R2A
06-SM-064	6-14	*	Kaş	M1
06-SM-065	6-14	*	Kaş	M6
06-SM-066	6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	R2A
06-SM-067	6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-068	6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-069	6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	AİO
06-SM-070	6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M6
06-SM-071	6-15	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M6
06-SM-072	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	M1
06-SM-073	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	M1
06-SM-074	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	R2A
06-SM-075	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	R2A
06-SM-077	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	R2A
06-SM-078	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	R2A
06-SM-079	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	M6
06-SM-080	6-16	<i>Ciocalypta carballo</i>	Kaş	M6
06-SM-081	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	R2A
06-SM-082	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	R2A
06-SM-083	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	AİO
06-SM-84	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	M6
06-SM-85	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	M6
06-SM-86	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	R2A
06-SM-87	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	M1
06-SM-88	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	M6
06-SM-89	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	M6
06-SM-90	6-17	<i>Chondrilla nucula</i>	Kaş	M1
06-SM-91	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	R2A
06-SM-92	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	R2A
06-SM-93	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	M6
06-SM-94	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	AİO
06-SM-95	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	M1
06-SM-96	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	M1
06-SM-97	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	R2A

Çizelge 5.1 (devam)

İzolat Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
06-SM-98	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	R2A
06-SM-99	6-18	<i>Agelas oroides</i>	Kaş	M6
06-SM-100	6-19	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-101	6-19	<i>Axinella polypoides</i>	Kaş	M1
06-SM-102	6-20	<i>Axinella damicornis</i>	Kaş	R2A
06-SM-103	6-20	<i>Axinella damicornis</i>	Kaş	R2A
06-SM-104	6-20	<i>Axinella damicornis</i>	Kaş	AİO
06-SM-105	6-21	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kaş	R2A
06-SM-106	6-21	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kaş	R2A
06-SM-107	6-21	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kaş	R2A
06-SM-108	6-21	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kaş	M6
06-SM-109	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	R2A
06-SM-110	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	AİO
06-SM-111	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	M6
06-SM-112	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	AİO
06-SM-113	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	R2A
06-SM-114	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	AİO
06-SM-115	6-22	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	AİO
06-SM-116	6-23	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kaş	R2A
06-SM-117	6-23	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kaş	R2A
06-SM-118	6-23	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kaş	R2A
06-SM-119	6-23	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kaş	AİO
06-SM-120	6-23	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kaş	M1
06-SM-121	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-122	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-123	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-124	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-125	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	R2A
06-SM-126	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	R2A
06-SM-127	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	M6
06-SM-128	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-129	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	M6
06-SM-130	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	R2A
06-SM-131	6-24	<i>Dysidea avara</i>	Kaş	AİO
06-SM-132	6-25	*	Kaş	AİO
06-SM-133	6-25	*	Kaş	R2A
06-SM-134	6-25	*	Kaş	AİO
06-SM-135	6-25	*	Kaş	M1
06-SM-136	6-25	*	Kaş	M1
06-SM-137	6-25	*	Kaş	M1
06-SM-138	6-26	*	Kaş	R2A
06-SM-139	6-26	*	Kaş	R2A

Çizelge 5.1 (devam)

İzolat Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
06-SM-140	6-26	*	Kaş	M6
06-SM-141	6-26	*	Kaş	M1
06-SM-142	6-26	*	Kaş	AİO
06-SM-143	6-26	*	Kaş	M6
06-SM-144	6-26	*	Kaş	M1
06-SM-145	6-26	*	Kaş	AİO
06-SM-146	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	M6
06-SM-147	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	M6
06-SM-148	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	M1
06-SM-149	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	M1
06-SM-150	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	R2A
06-SM-151	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	M6
06-SM-152	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	AİO
06-SM-153	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	M6
06-SM-154	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	AİO
06-SM-155	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	R2A
06-SM-156	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	R2A
06-SM-157	6-27	<i>İrcinia spp.</i>	Kaş	R2A
06-SM-158	6-28	<i>Dysidea sp.</i>	Kaş	M1
06-SM-159	6-28	<i>Dysidea sp.</i>	Kaş	M6
06-SM-160	6-28	<i>Dysidea sp.</i>	Kaş	R2A
06-SM-162	6-28	<i>Dysidea sp.</i>	Kaş	AİO
06-SM-163	6-29	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	R2A
06-SM-164	6-29	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	R2A
06-SM-165	6-29	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	M6
06-SM-166	6-29	<i>Ciocalypta carballoi</i>	Kaş	M6
07-SM-001	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	M6
07-SM-002	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	AİO
07-SM-003	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	R2A
07-SM-004	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	R2A
07-SM-005	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	M1
07-SM-006	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	M1
07-SM-007	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	M1
07-SM-008	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	AİO
07-SM-009	7-2	<i>İrcinia variabilis</i>	Kekova	M1
07-SM-010	7-2	<i>İrcinia variabilis</i>	Kekova	M6
07-SM-011	7-2	<i>İrcinia variabilis</i>	Kekova	M6
07-SM-012	7-3	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M6
07-SM-013	7-3	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M6
07-SM-014	7-3	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	R2A
07-SM-015	7-3	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	AİO
07-SM-016	7-4	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M1

Çizelge 5.1 (devam)

İzolat Kodu	Sünger kodu	Süngerin adı	Lokasyon	İzolasyon ortamı
07-SM-017	7-4	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	AİO
07-SM-018	7-5	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M6
07-SM-019	7-5	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	R2A
07-SM-020	7-5	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M1
07-SM-021	7-5	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	AİO
07-SM-022	7-6	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	R2A
07-SM-023	7-6	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M1
07-SM-024	7-6	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	AİO
07-SM-025	7-6	<i>Petrosia ficiformis</i>	Kekova	M6
07-SM-026	7-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kekova	M1
07-SM-027	7-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kekova	AİO
07-SM-028	7-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kekova	M1
07-SM-029	7-7	<i>Axinella polypoides</i>	Kekova	M6
07-SM-030	7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	M6
07-SM-031	7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	M1
07-SM-032	7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	AİO
07-SM-033	7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	R2A
07-SM-034	7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	R2A
07-SM-035	7-8	<i>Sarcotragus foetidus</i>	Kekova	M6
07-SM-036	7-9	<i>İrcinia sp</i>	Kekova	R2A
07-SM-037	7-9	<i>İrcinia sp</i>	Kekova	AİO
07-SM-038	7-9	<i>İrcinia sp</i>	Kekova	M6
07-SM-039	7-9	<i>İrcinia sp</i>	Kekova	M6
07-SM-040	7-2	<i>İrcinia variabilis</i>	Kekova	M6
07-SM-041	7-2	<i>İrcinia variabilis</i>	Kekova	AİO
07-SM-042	7-1	<i>Clione viridis</i>	Kekova	R2A

*: Tür tayini yapılamayan sünger örnekleri.

Bazı izolatların 2 No'lu besiyerinde 7 gün sonunda oluşturdukları koloni görüntüleri Şekil 5.1'de gösterilmiştir. 06-SM-126, 07-SM-042 ve 03-SM-004 No'lu izolatların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 5.2'de sunulmuştur.



02-SM-004



02-SM-005



02-SM-028



03-SM-003

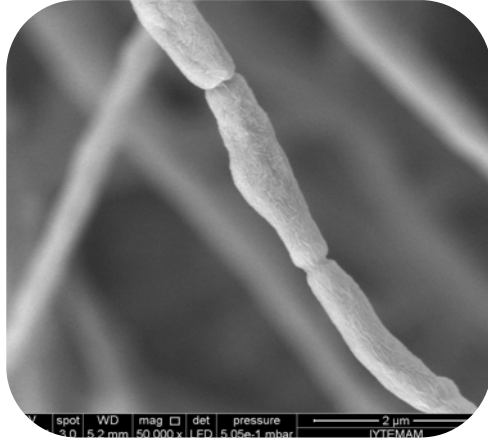


06-SM-126



06-SM-159

Şekil 5.1 Bazı izolatların petrideki koloni görüntüleri.



06-SM-126
50 000 X



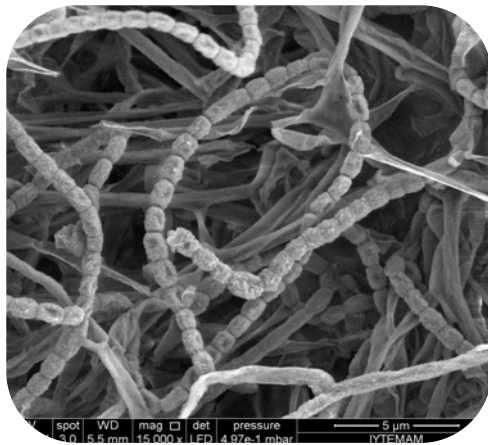
06-SM-126
15 000 X



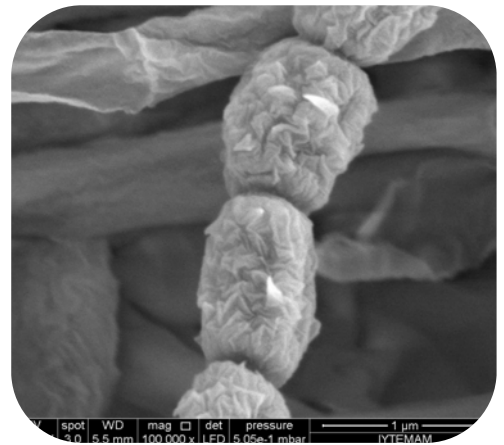
07-SM-042
100 000 X



07-SM-042
25 000 X



03-SM-004
15 000 X



03-SM-004
100 000 X

Şekil 5.2 Bazı izolatların Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüleri.

5.2 Aktivite Sonuçları

İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 4.5'te anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve aktivite testinin yapıldığı örnek petri Şekil 5.3'te gösterilmiştir. Toplam 267 izolatın antimikrobiyal aktivite dağılımları sonuçları Çizelge 5.2'de listelenmiştir.

Çizelge 5.2 İzolatların antimikrobiyal aktivite sonuçları.

İzolat Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
02-SM-001	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	
02-SM-002	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
02-SM-003	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
02-SM-004	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
02-SM-005	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
02-SM-006	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-007	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-008	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-009	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-010	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-011	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-012	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-013	<i>Tethya aurantium</i>	0	14
02-SM-014	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-015	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-016	<i>Tethya aurantium</i>	0	0
02-SM-017	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-018	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-019	<i>Aplysina aerophoba</i>	11	12
02-SM-020	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-021	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-022	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-023	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-024	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-025	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-026	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-027	<i>Aplysina aerophoba</i>	10	10
02-SM-028	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-029	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-030	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-031	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
02-SM-032	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0

Çizelge 5.2 (devam)

İzolot Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
02-SM-033	<i>Aplysina aerophoba</i>	0	0
03-SM-001	<i>Ircinia sp.</i>	9	0
03-SM-002	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-003	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-004	<i>Ircinia sp.</i>	13	12
03-SM-005	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-006	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-007	<i>Ircinia sp.</i>	16	13
03-SM-008	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-009	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-010	<i>Ircinia sp.</i>	12	10
03-SM-011	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-012	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-013	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-014	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-015	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-016	<i>Ircinia sp.</i>	15	0
03-SM-017	<i>Ircinia sp.</i>	9	9
03-SM-018	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
03-SM-019	<i>Ircinia sp.</i>	0	0
04-SM-002	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
04-SM-003	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
04-SM-006	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
05-SM-002	<i>Sarcotragus foeditus</i>	0	0
05-SM-003	<i>Sarcotragus foeditus</i>	15	10
05-SM-004	<i>Sarcotragus foeditus</i>	0	0
05-SM-005	<i>Spirastrela cunctatrix</i>	0	0
05-SM-006	<i>Spirastrela cunctatrix</i>	0	0
05-SM-007	<i>Hemimycale columella</i>	0	0
05-SM-008	<i>Hemimycale columella</i>	0	0
05-SM-009	<i>Hemimycale columella</i>	0	0
06-SM-001	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-002	<i>Axinella polypoides</i>	0	13
06-SM-003	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-004	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-005	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-006	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-007	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-008	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-009	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-010	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-011	<i>Axinella polypoides</i>	12	10

Çizelge 5.2 (devam)

İzolot Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
06-SM-012	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-013	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-014	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
06-SM-015	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
06-SM-016	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
06-SM-017	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
06-SM-018	<i>Chondrosia reniformis</i>	0	0
06-SM-019	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-020	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-021	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-022	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-023	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-024	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-025	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-026	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-027	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-028	<i>Coco spongia</i>	0	0
06-SM-029	<i>Coco spongia</i>	0	0
06-SM-030	<i>Coco spongia</i>	0	0
06-SM-032	<i>Coco spongia</i>	0	0
06-SM-033	<i>Coco spongia</i>	0	0
06-SM-034	<i>Coco spongia</i>	0	0
06-SM-035	<i>HippoSpongia officinalis</i>	0	0
06-SM-036	<i>HippoSpongia officinalis</i>	0	0
06-SM-037	<i>HippoSpongia officinalis</i>	0	0
06-SM-038	<i>HippoSpongia officinalis</i>	0	0
06-SM-039	<i>HippoSpongia officinalis</i>	0	0
06-SM-040	<i>HippoSpongia officinalis</i>	0	0
06-SM-041	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-042	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-043	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-044	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-045	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-046	<i>Crambe crambe</i>	0	0
06-SM-047	*	0	0
06-SM-048	*	0	0
06-SM-049	*	0	0
06-SM-050	*	0	0
06-SM-051	*	0	0
06-SM-052	*	0	0
06-SM-053	*	0	0
06-SM-054	*	0	0

Çizelge 5.2 (devam)

İzolot Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
06-SM-055	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-056	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-057	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-058	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-060	*	0	0
06-SM-061	*	0	0
06-SM-062	*	0	0
06-SM-063	*	0	0
06-SM-064	*	0	0
06-SM-065	*	0	0
06-SM-066	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-067	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-068	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-069	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-070	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-071	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-072	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-073	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-074	<i>Ciocalypta carballo</i>	12	0
06-SM-075	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-077	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-078	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-079	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-080	<i>Ciocalypta carballo</i>	0	0
06-SM-081	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-082	<i>Chondrilla nucula</i>	7	0
06-SM-083	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-84	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-85	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-86	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-87	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-88	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-89	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-90	<i>Chondrilla nucula</i>	0	0
06-SM-91	<i>Agelas oroides</i>	8	0
06-SM-92	<i>Agelas oroides</i>	0	0
06-SM-93	<i>Agelas oroides</i>	0	0
06-SM-94	<i>Agelas oroides</i>	0	0
06-SM-95	<i>Agelas oroides</i>	0	0
06-SM-96	<i>Agelas oroides</i>	0	0
06-SM-97	<i>Agelas oroides</i>	0	0
06-SM-98	<i>Agelas oroides</i>	0	0

Çizelge 5.2 (devam)

İzolot Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
06-SM-99	<i>Agelas oroides</i>	0	12
06-SM-100	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-101	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
06-SM-102	<i>Axinella damicornis</i>	0	0
06-SM-103	<i>Axinella damicornis</i>	0	0
06-SM-104	<i>Axinella damicornis</i>	0	0
06-SM-105	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
06-SM-106	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
06-SM-107	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
06-SM-108	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	16
06-SM-109	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-110	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-111	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-112	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-113	<i>Ciocalypta carballoi</i>	11	0
06-SM-114	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-115	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-116	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
06-SM-117	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
06-SM-118	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
06-SM-119	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
06-SM-120	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
06-SM-121	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-122	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-123	<i>Dysidea avara</i>	9	0
06-SM-124	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-125	<i>Dysidea avara</i>	0	7
06-SM-126	<i>Dysidea avara</i>	14	10
06-SM-127	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-128	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-129	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-130	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-131	<i>Dysidea avara</i>	0	0
06-SM-132	*	0	0
06-SM-133	*	0	8
06-SM-134	*	0	0
06-SM-135	*	0	0
06-SM-136	*	0	0
06-SM-137	*	0	0
06-SM-138	*	0	0
06-SM-139	*	0	0
06-SM-140	*	0	0

Çizelge 5.2 (devam)

İzolat Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
06-SM-141	*	0	11
06-SM-142	*	0	0
06-SM-143	*	0	0
06-SM-144	*	0	13
06-SM-145	*	0	0
06-SM-146	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-147	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-148	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-149	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-150	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-151	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-152	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-153	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-154	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-155	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-156	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-157	<i>İrcinia spp.</i>	0	0
06-SM-158	<i>Dysidea sp.</i>	0	0
06-SM-159	<i>Dysidea sp.</i>	0	0
06-SM-160	<i>Dysidea sp.</i>	0	0
06-SM-162	<i>Dysidea sp.</i>	0	0
06-SM-163	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-164	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-165	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
06-SM-166	<i>Ciocalypta carballoi</i>	0	0
07-SM-001	<i>Clione viridis</i>	0	0
07-SM-002	<i>Clione viridis</i>	0	0
07-SM-003	<i>Clione viridis</i>	0	0
07-SM-004	<i>Clione viridis</i>	0	0
07-SM-005	<i>Clione viridis</i>	0	0
07-SM-006	<i>Clione viridis</i>	9	10
07-SM-007	<i>Clione viridis</i>	10	20
07-SM-008	<i>Clione viridis</i>	0	0
07-SM-009	<i>İrcinia variabilis</i>	0	0
07-SM-010	<i>İrcinia variabilis</i>	0	0
07-SM-011	<i>İrcinia variabilis</i>	0	0
07-SM-012	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-013	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-014	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-015	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-016	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-017	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0

Çizelge 5.2 (devam)

İzolat Kodu	İzole Edildiği Sünger	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>MRSA</i>
07-SM-018	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-019	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-020	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-021	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-022	<i>Petrosia ficiformis</i>	10	12
07-SM-023	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-024	<i>Petrosia ficiformis</i>	8	0
07-SM-025	<i>Petrosia ficiformis</i>	0	0
07-SM-026	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
07-SM-027	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
07-SM-028	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
07-SM-029	<i>Axinella polypoides</i>	0	0
07-SM-030	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
07-SM-031	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
07-SM-032	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
07-SM-033	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
07-SM-034	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
07-SM-035	<i>Sarcotragus foetidus</i>	0	0
07-SM-036	<i>İrcinia sp</i>	0	0
07-SM-037	<i>İrcinia sp</i>	0	0
07-SM-038	<i>İrcinia sp</i>	0	0
07-SM-039	<i>İrcinia sp</i>	0	0
07-SM-040	<i>İrcinia variabilis</i>	15	12
07-SM-041	<i>İrcinia variabilis</i>	0	0
07-SM-042	<i>Clione viridis</i>	21	30

*: Tür tayini yapılamayan sünger örnekleri.



Şekil 5.3 Örnek bir aktivite petrisi.

5.3 Fenotipik Özellikler

Yapılan aktivite testleri sonunda yüksek aktivite gösteren 19 izolat belirlenmiştir. 02-SM-013, 02-SM-019, 02-SM-027, 03-SM-004, 03-SM-007, 03-SM-010, 03-SM-016, 03-SM-017, 06-SM-011, 06-SM-074, 06-SM-099, 06-SM-108, 06-SM-113, 06-SM-126, 06-SM-141, 06-SM-144, 07-SM-007, 07-SM-022 ve 07-SM-040 ileri çalışmalar için seçilmiştir. Bu izolatların DNA sekans analiz çalışmaları, tuz, pH ve sıcaklık toleranslarının belirlenmesi, şeker kaynağı olarak kullandıkları substratların belirlenmesi için Bölüm 4.6'da anlatılan bir dizi testler yapılmıştır.

İzolatların tuz toleransları Çizelge 5.3'te gösterilmiştir. Büyüme durumları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

- : büyüme yok
- + : zayıf büyüme
- ++ : orta büyüme
- +++ : iyi büyüme

Şekil 5.4'de %0 ve %2.5 tuz içeren besiyerlerinde aktinomisetlerin üremeleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.4 Tuz toleranslarının belirlendiği örnek petriler. %0 tuz içeren petri (a), %2.5 tuz içeren petri (b).

Çizelge 5.3 İzolatların tuz toleransları.

Tuz oranı (%) \ İzolat	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	17.5
02-SM-013	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
02-SM-019	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
02-SM-027	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
03-SM-004	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
03-SM-007	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
03-SM-010	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
03-SM-016	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
03-SM-017	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
06-SM-011	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-074	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-099	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-108	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
06-SM-126	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
06-SM-141	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
06-SM-144	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
07-SM-007	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
07-SM-022	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
07-SM-040	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
07-SM-042	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-

İzolatların pH toleransları Çizelge 5.4’te gösterilmiştir. Büyüme durumları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

- : büyüme yok
- + : zayıf büyüme
- ++ : orta büyüme
- +++ : iyi büyüme

Çizelge 5.4 İzolatların pH toleransları.

İzolat	pH											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
02-SM-013	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
02-SM-019	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
02-SM-027	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
03-SM-004	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
03-SM-007	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
03-SM-010	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
03-SM-016	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
03-SM-017	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-011	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-074	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-099	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-108	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-126	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-141	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06-SM-144	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
07-SM-007	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
07-SM-022	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
07-SM-040	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
07-SM-042	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

İzolatların sıcaklık toleransları Çizelge 5.5'te gösterilmiştir. Büyüme durumları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

- : büyüme yok
- + : zayıf büyüme
- ++ : orta büyüme
- +++ : iyi büyüme

Çizelge 5.5 İzolatların sıcaklık toleransları.

Sıcaklık(°C) İzolat	4	10	20	28	37	45	50	55	60
02-SM-013	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
02-SM-019	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
02-SM-027	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
03-SM-004	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
03-SM-007	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
03-SM-010	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
03-SM-016	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
03-SM-017	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
06-SM-011	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-074	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-099	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-108	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
06-SM-126	-	+++	+++	+++	+++	+	+++	-	-
06-SM-141	-	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-
06-SM-144	-	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-
07-SM-007	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
07-SM-022	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
07-SM-040	-	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
07-SM-042	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-

İzolatların büyümek için kullandıkları şekerler Çizelge 5.6'da gösterilmiştir. Büyüme durumları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

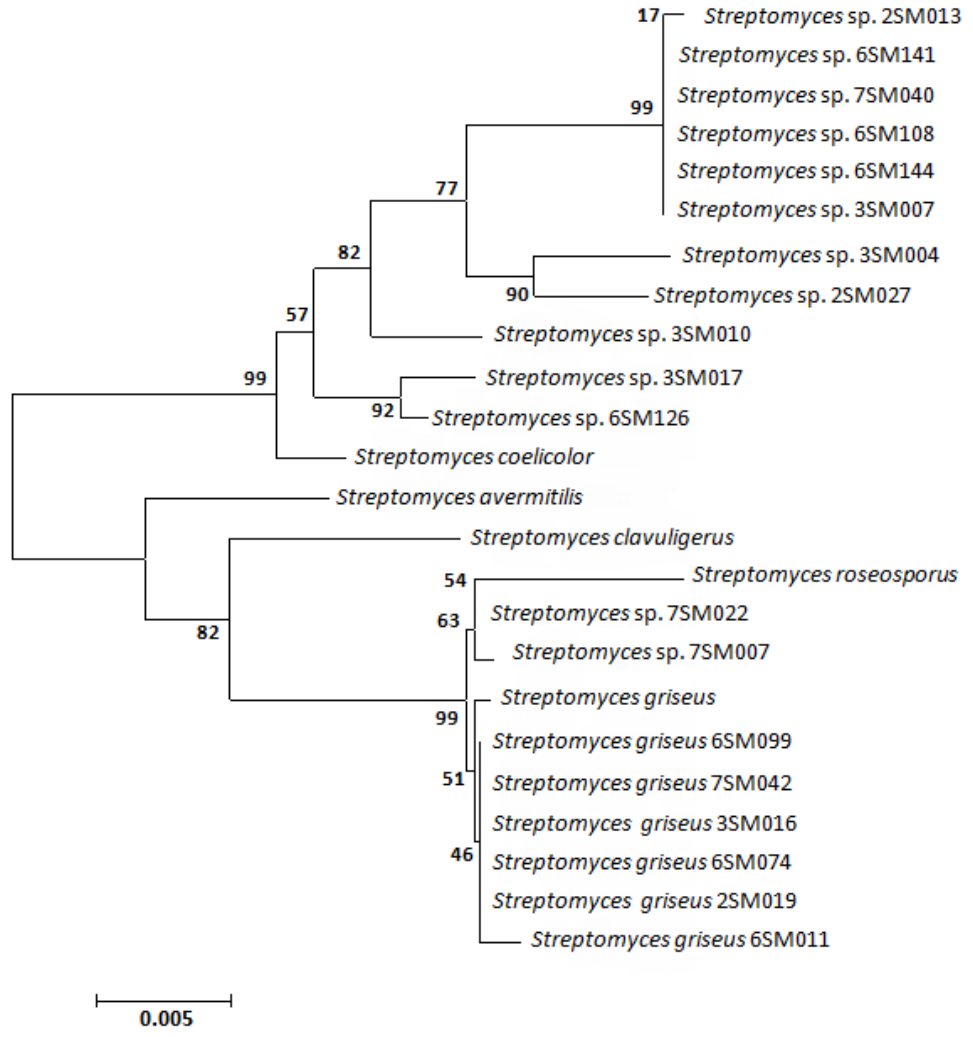
- : büyüme yok
- + : zayıf büyüme
- ++ : orta büyüme
- +++ : iyi büyüme

Çizelge 5.6 İzolatların kullandıkları şekerler.

İzolat \ Şeker	Glu	Suk	Raf	Sel	Fruk	Man
02-SM-013	+++	-	-	-	+++	+++
02-SM-019	+++	-	-	-	+++	+++
02-SM-027	+++	-	++	++	+++	+++
03-SM-004	+++	++	-	-	++	+++
03-SM-007	+++	++	-	-	+++	+++
03-SM-010	+++	-	-	-	+++	+++
03-SM-016	+++	-	-	-	+++	+++
03-SM-017	+++	++	-	-	+++	+++
06-SM-011	+++	-	-	-	+++	+++
06-SM-074	+++	-	-	-	+++	+++
06-SM-099	++	-	-	-	++	++
06-SM-108	+++	-	-	-	+++	+++
06-SM-126	+++	-	-	-	+++	+++
06-SM-141	+++	-	-	-	+++	+++
06-SM-144	+++	-	-	-	+++	+++
07-SM-007	+++	-	-	-	+++	+++
07-SM-022	+++	-	-	-	+++	+++
07-SM-040	+++	-	-	-	+++	+++
07-SM-042	+++	-	-	-	+++	+++

5.4 Sekans Analizi

Şekil 5.6'da seçilen izolatların 16S rDNA sekans analizleri sonucuna dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç gösterilmiştir.



Şekil 5.6 İzolatların 16S rDNA sekans analizleri sonucuna dayanarak oluşturulan filogenetik ağaç.

İzolatların 16S rDNA dizileri

02-SM-013 27F

GCCGGGCCTGGCGCGTGCTTACCATGCAGTCGACGATGACCGCTTTCG
 GGCGGGGATTAGTGGCGAACGCGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGC
 CCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG
 ACCGTCTGCCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATG
 AGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGAGTAGTGGCTCACCAAGGCG
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
 TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA
 CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
 AGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
 CTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAAT
 TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 GGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT
 AACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAA AAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTT
 AATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGG
 GAAC

02-SM-013 1492R

GGGCTCTACTCGCAGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTT
 GGGCCACCGGCTTCGGGTGTCACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGT
 GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGA
 TTAGTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCG
 AACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCACGGTATCGCAGC
 TCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGG
 CATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCG
 GTCTCCCGTGAGTCCCCAGCACCAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGA
 CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
 GCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCGC
 CTGTCTCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCG
 CGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCG
 TCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGGGCA
 CTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACC
 TAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTCG
 CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCC
 TTCGCCACCGGTGTTCTCCTGAAATCTGCGCATTTCACCGCTACACCA

GGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTTTCGACTGCA
 GACCCGGGGTTAAGCCCCCGGGCTTTCAAACCGACGTGACAAGCCGCT
 ACGAGCTCTTACGCCAATAATTCCGGAACACGCTTGCGCCTACGTA
 ATACCGGGGCTGCTGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGTAAC
 CGTCACTTCCCCTTCTTCCCTGCTGAAAAAGTTTACAACCCGGAAGGG
 GGTTCATCCCTCACGGGGGGGGCCTGGAT

02-SM-019 27F

GGGGCCTGGACGGCGTGCTTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCTTTTCG
 GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT
 TCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACT
 CTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAG
 CCCGCGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTAC
 CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
 GGCGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
 GAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTG
 GGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACG
 CATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
 AAGGAAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTTACCAAGGCTTGAAAATACCGGAAAGC
 ATCAGAGATGTGGCCCCCTTGGTGGCCGGTATAACAAGTGGTGCATGG
 CTGTCGTCAGCTCGGTTCCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACCGACC
 CCAACCCTTGTTTCGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTATGGGGA
 ACTCCAGGAAGACTGCCCGGG

02-SM-019 1492R

GGCCCATCGCAGTTCCACCTATACGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTT
 GGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGT
 GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGA
 TTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCG
 AACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGC
 TCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGG
 CATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCA
 GTCTCCTGTGAGTCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGA
 ACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG

AGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGC
 ACCATCTCTGATGCTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTC
 GCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCC
 GTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGA
 ACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACAC
 CTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG
 TTCGCTCCCCACGTTTTGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATC
 CGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTAC
 ACCAGGAATTCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCGTATCGA
 ATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGGCTTTCACATCCGACGTGACAA
 GCCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCCTTGCG
 CCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTC
 TGCAGGTACCGTCCCTTTCGCTTTCCTCCCTGCTGAAAGAGGTTACACC
 CGAAGGCCGTCATCCCCTCACGCGCGTGCCTGCATCAGGCTTTCGCC
 ATTGGTGCATAT

03-SM-004 27F

GCGGCTGCGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCACTTCGGT
 GGGGATTAGTGGCGAACGTGTGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT
 GCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGAT
 CGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAG
 CCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTAC
 CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
 GGCGGCTTGTGCGGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATT
 CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
 GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGG
 TGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTTCGTCCGTGCCGCAGCTAA
 CGCATTAAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCA
 AAGGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTA
 ATTCGACGCACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC

03-SM-004 1492R

GAAGCTCATCGCAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCCACAAGGGGGTT
GGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGA
TTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCG
AACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGC
TCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGG
CATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCG
GTCTCCCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGA
CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGACC
CTGTCTCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCG
CGTTGCGTTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCG
TCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCA
CTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACGACGTGGAATGTCGCCACACC
TAGTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGTTTTCGTCTCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGATCCG
CCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACAC
CAGGAATTCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGATCGACTG
CAGACCCGGGGTTTAAGCCCCGGGCTTTTCACACCGACGCGACAGCCG
CCTACGAGCTTTTTACGCCCAATATTCCGGGACACGCTCGCGCCCTA
GTATTACCGCGCTGCTGGCCGATTAGCCGGGGCTTCTTCTGCAGGTCC
GTCCTTTCTTCTCCTGCTGAAGAGTTACAACCCGAAGCCCATCCCTA
CGCGGTCCCCGCTCAGGT

03-SM-010 27F

CCGGCATGAACGACGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAGCCCTTCG
GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT
GCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACC
GTCCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGC
CCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
GGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCT
GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
CGGCTTGTCACGTGCGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG
CAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGGAGGAACACCGGTGGCG
AAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTAACGGT
GGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCACTAAA

CGCATTTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGGGGCTTT
 AATTCGACGCAACGCGAAAACCTTACCCAAGGCTTGACATACACCGGA
 AAGCATCAAATGGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGG
 CATGGCTGTCCCTCAGCTCGTGTCCCTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCA
 ACCGAGCGCAACCCTTTGTCCCGGGTTGCCAGCAGGCCTTTGTGGGG
 CTGGGGGAACTCCGGGGGAAACCCCGG

03-SM-010 1492R

GGCCAACGCGGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCCACAGGGGGTGGGC
 CACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTAC
 TAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAC
 TACCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAC
 GAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCATT
 GTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATG
 ATGACTTGACGTGTCCTCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTC
 CCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAG
 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACCAT
 CTCTGATGCTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
 GCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTA
 ATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGT
 GCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTC
 CCCACGCTTTCGCTCCTCACGTACGTATCGGCCAAGATCCGCCTTCCG
 CCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGA
 ATTTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTACCTGCCCGTATCGACTGCAACC
 CGGGGTTTTAAGCCCCGGGTTTTCAAACCGACGTGACAGCCGCCTACA
 ACTCTTTACGCCCAATAATTCCGGAAAACGCTTGCGCCCTACTTATTA
 CCGCGGCTGCTGGCACGAAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGAAGGTACC
 GCCCTTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAAAGGTTAAACCCGAAAGGCCG
 ATTTCCCTCAGGCGGGGCCGCTGCATAAGGTTTCGCCCAT

06-SM-074 27F

GCGGGCGGGGGCGGCGTGCTTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCGCTT
 CGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG
 CCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAA
 CACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGAT
 GAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
 GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
 CAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGC
 CTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGT

ACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCG
TAGGCGGCTTGTACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGG
TCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAAT
TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGGAGCGAACAGGATTAATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGT
TGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAACTAA
CGCATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAACAGCGGGACATGTGGTTAATT
CGACGCAACGCGAAAACCTTACCAAGGCTTGACATATACGGAAAGCA
TCCAAGATGGTGCCCCCCTTGGGGTTCGGGATTCAGGTGGTGGCATGG
TTGTCGTCAGCCTCGTGTCTCTGAAAAGA

06-SM-074 1492R

GCCCACTACGCACGGTCCACCTATACGACAGCTCCCTCCCACAAGGGG
TTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCG
GTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGC
GATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATC
CGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCA
GCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGG
GGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGG
CAGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACA
GAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGG
GCACCATCTCTGATGCTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGG
GAACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAAC
ACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGAT
CCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTA
CACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCGTATCG
AATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAG
CCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCT
ACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGC
AGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAGAGGTTTAAACCCGAA
GCCGTCATCCCCTCACGCGGCGTTCGCTGCATCAGGCTTTCG

07-SM-022 27F

GGGGCTGGGCGGCGTGCTTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCCTTCGG
GGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTT
CACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTC

TGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGC
 CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACG
 ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
 GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
 GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCT
 GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
 CGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG
 CATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT
 GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA
 AGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
 GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGG
 AACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCA
 TTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGA
 CGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCAT
 CAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGCTG
 TCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCGCAACGAGCGCA
 ACCTTGTCTGTGTTGCAGCATGCCTTCGGGGTGATGGGGGACTCAAA
 GGAAACTGCCGGGG

07-SM-022 1492R

GGGCGGCGCAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCC
 ACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTA
 CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACT
 AGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTG
 AGACCGGCTTTTTGAGATTTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTCATTG
 TACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT
 GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCT
 GTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGG
 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
 CGACAGCCATGCACCACCTGTATAACCGACCACAAGGGGGGCACCATCT
 CTGATGCTTTCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC
 GTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
 CCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTA TCCCCAGGCGGGGAACTTAAT
 GCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTC
 CCAAAGGTTTACGGGGTGGACTACCAGGGGATCTAATCCTGTTTCGCTC
 CCCAGGCTTTCGCTCCTCAGCGCAGAATGGCCCAGAGATCCCGCCTTC
 GCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGGTACACCAGG
 GAATTCCGATCTCCCTACCAAAATCTAAGTTAGCCCGGATC

02-SM-027 27F

GCGTCATCGCCGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAGGGGTTGGGC
 CACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTAC
 TAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACT
 GAGACCGGCTTTTTGAGATTTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCTCATT
 GTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCGATG
 ATGACTTGACGTGTCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTC
 CCGTGAGTCCCCAGCACCAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAG
 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGACCCTGTC
 TCCAGGGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTG
 CGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
 TCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAA
 TGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTG
 CCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCC
 CCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCG
 CCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAA
 TTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACC
 CGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACG
 AGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCTACGTATTAC
 CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGT
 CACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTAAACCCGAAGGCCGTCA
 TC

02-SM-027 1492R

GCAACCTGGGCGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGACCACTTCG
 GTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT
 GCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGAT
 CCTCGCAGGCATCTGCGAGGTTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAG
 CCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTAC
 CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
 GGCGGCTTGTCACGTGCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCAGTCGATACCGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
 GAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGG
 TGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTTCCACGTTTGTCCGTGCCGCAGCT

AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGCGAGCATGTGGCTTA
 ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAAATACACCGGA
 AAACCCTGGAGACAGGTCCCCCTTGTGTCTGGTGTAAAGGTGTGCATGC
 TGTCGTCAGCTCGTGTCTGAATGTTGGGTAAAGTCCGCAACAACGCA
 ACCTTGTCCCGGTGCCAGCAAGCCCTGTGGTGCTGGGGACCTCAGGGA
 AACCGCCGGGGTCAACTCGAAGAAAGGGTGGGGACGAATCTCAGTC

03-SM-017 27F

GCTCCATCGGCCGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGG
 CCACCGGCTTCGGGTCGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGT
 GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATT
 ACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAA
 CTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTTGCGGTATCGCAGCTCA
 TTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCAT
 GATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCT
 CCCGTGAGTCCCCAACACCCCGAAGGGCTTGCTGGCAACACGGGACA
 AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
 TGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACC
 ATCTCTGATGCTTTCGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCG
 TTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
 AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACT
 TAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTA
 GTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCG
 CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCC
 TTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCA
 GGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGC
 AGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGC
 CTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCTACGT
 ATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCGGCGCTTCTTCTGCAGGTA
 CCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGGAAG
 GCCGTCATCTTG

03-SM-017 1492R

AAAACCTGGGCGGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCACTTC
 GGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC
 CTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTG
 ATCCGCCTGGGCATCCAGGCGGTTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATG
 AGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGTAGGTAGTGGCTCACCAAGGCG
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
 TTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA

CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
 AGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
 CTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAAT
 TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
 GTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTA
 ACGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGCGGAGCATGTGGCTTAA
 TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATACACCGGG
 AAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTG
 CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
 ACGAGCGCAACCCTTGTCCGTGTTGCCAGCAAGCCCTTCGGT

06-SM-011 27F

GGCCTCCGCCCGTCCACCCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTG
 GGCCACCGGCTTCGGGTGCTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGGT
 TGTACAAGGTCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGAT
 TACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGA
 ACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCT
 CATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGC
 ATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGT
 CTCCTGTGAGTCCCCATCACCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAAC
 AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
 CTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGCAC
 CATCTCTGATGCTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGC
 GTTGCCTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGT
 CAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTTCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGAA
 CTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGAATGTCGCCAACACCT
 AGTTCCCAACGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGC
 TCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCTT
 CGCCCCGGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGG
 AATTCGATCTCCCTACCCCTCTAGCTAGGCCGGTATCGAATGCAGA
 CCGGGGTTAAGCCCGGGCTTCAAATCCGACGTGACAAGGCGGCTACG
 AGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGGCCCCTACGTAATAC
 GGGGTGGTGGCAGGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGAGGTACGGCACT
 TCCCTTCTCCTGCGAAAGAGGTTTAAAACCGGGAGGCGGTATCCCTC
 AGGGGGGGTCCGTGATATGGGTTTTTCGCCAATGGGAAAATTCCCACTG
 GGTGCTCCCCGGAAGAATTGGGCCTG

06-SM-011 1492R

TGCAACTGGGCGGGGTGCTTACCATGCAGTCGACGATGAAGCCGCTTC
 GGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGC
 CCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAC
 ACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATG
 AGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCG
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
 TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA
 CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
 AGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
 CTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATT
 CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
 GGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTT
 GGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAAC
 GCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
 AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGCTTAATTC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGC
 ATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGCGTAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGTTTCTGGGTTGCCAGCATGCCCTTC

06-SM-099 27F

CGCCATCGCAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTGGGCC
 ACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTA
 CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACT
 AGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTG
 AGACCGGCTTTTTGAGATTTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTCATTG
 TACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT
 GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCT
 GTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGG
 GTTGCCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
 CGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGCACCATCT
 CTGATGCTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC
 GTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
 CCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGGCGGGAACTTAAT
 GCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTC
 CCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCC
 CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCG
 CCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAA

TTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCGTATCGAATGCAGACC
 CGGGGTAAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAAGCCGCCTACG
 AGCTCTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCTACGTATTAC
 CGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTCTGCAGGTACCGTCA
 CTTTCGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGGTTACAACCCGAAGGCCGTA

06-SM-099 1492R

ACAAATTGGGGCCGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAAGCCTT
 TCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG
 CCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAA
 CACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGAT
 GAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
 GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
 CAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGC
 CTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGT
 ACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCG
 TAGGCGGCTTGTACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGG
 TCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAAT
 TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGT
 TGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAA
 CGCATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCA
 AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAT
 TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAA
 GCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATG
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTGTCTTCTGGTGTGTCAGCATGCCCTTCCGGTGA

06-SM-108 27F

CGCCAATCGAAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGC
 CACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTAC
 TAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACT
 GAGACCGGCTTTTTGAGATTGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCATT
 GTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATG
 ATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTC
 CCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAG
 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTC
 TCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG

TTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCAT
 GATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGGCGGTCT
 CCCGTGAGTCCCAACACCCCGAAGGGCTTGCTGGCAACACGGGACA
 AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
 TGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGCACC
 ATCTCTGATGCTTTCGGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCG
 TTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
 AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACT
 TAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTA
 GTGCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCG
 CTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCC
 TTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCA
 GGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGC
 AGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGC
 CTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTTCCGGACACGCTTTCGCCCCTACG
 TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGT
 ACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAG
 GCCGTCATCCCTCCCGC

06-SM-126 1492R

AGAAAGGTTGGGCGGGGGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCA
 CTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT
 GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATA
 CTGACCCGCTTGGGCATCCTAGCGGTTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGG
 ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG
 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACG
 GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACG
 GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCT
 CGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCG
 GGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGG
 AATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
 GTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAA
 GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
 ACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAG
 CTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGC
 TTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCG
 GAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGTGCGTGTACAGGTGGTGCAT
 GCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTGTCCCGGTGTTGCCAGCAAGG

06-SM-141 27F

CGACATCGACAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGC
 CACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGT
 ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTAC
 TAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACT
 GAGACCGGCTTTTTGAGATTGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCATT
 GTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCGATG
 ATGACTTGACGTGTCCTCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTC
 CCGTGAGTCCCCAGCACCAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAG
 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTC
 TCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
 CGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
 TCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAA
 TGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTG
 CCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCC
 CCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCG
 CCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAA
 TTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACC
 CGGGGTTAAGCCCCGGGCTTCAAACCGACGTGAAAGCCGCCTACGAG
 CTCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCTACGTATTACCG
 CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCA
 CTTTCGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGGAAGGCCGTC
 ATTC

06-SM-141 1492R

GGGGCAAGTGTGCGGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCG
 CTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
 TCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGG
 ATATGACCGTCTGCCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCA
 GGATGAGCCCAGCGCCTATCAGCTTGTGGGTGAGGTAGTGGCTCACCA
 AGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
 TGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGA
 CGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGA
 CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAG
 CTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAAACC
 CGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATC
 GGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC
 CGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGA
 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
 AAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGC

AGGCGGCTTGTCACGTCGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
 CTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAAT
 TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTA AAC
 GGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT
 AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAGCGGCGGAGCATGTGGCTTA
 ATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA
 AACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTTCGTGTACAGGTGGTGCA
 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCACCCCTTGTTCCTGTTGCCAGCAGGCCCTTGGTGGTGCG

7SM40-27F-A06

GCCAATCGAAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCC
 ACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTA
 CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACT
 AGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGA ACTG
 AGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCATTG
 TACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGAT
 GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTCCC
 GTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAGGG
 TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
 GACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTCTC
 CAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCG
 TCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
 CTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGGGCACTTAATG
 CGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTGCC
 CACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCC
 ACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCC
 ACCGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATT
 CCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACCC
 GGGGTAAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAGCCGCCTACGAG
 CTCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCTACGTATTACCG
 CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCA
 CTTTCGCTTCTTCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCAT
 CTCAG

07-SM-040 1492R

CGGGAGGTGTGCCGGTGCTTACCATGCAGTCGTCGATGAACCGCTTTC
 GGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGC
 CCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATG
 ACCGTCTGCCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATG
 AGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAAGTAGTGGCTCACCAAGGCG
 ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCC
 TTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTA
 CCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT
 AGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGT
 CTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAAT
 TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTG
 GCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
 GTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTA
 ACGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGCGGAGCATGTGGCTTAA
 TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAA
 AACGTCTTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGTGCA
 TGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGA
 GCGCAACCCTTGTCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTG

07-SM-42 27F

GGTGCGGTTTCGACACGCGCCTTCTTGGCTCCCTCCCGCAAGGGGTTGG
 ACCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGT
 GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATT
 ACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAA
 CTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTC
 ATTTGACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCA
 TGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTC
 TCCTGTGAGTCCCATCACCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACA
 AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGC
 TGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGCACC
 ATCTCTGATGCTTTCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCG
 TTGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
 AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACT
 TAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTA
 GTTCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGC
 TCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCT
 TCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAG

GAATTCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCGTATCGAATGCA
 GACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAAGCCGCC
 TACGAGCTCTTTACGCCCAAATTCGGACACGCTTGGCCTACGTATT
 ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACC
 GTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAGAGGTTACAACCCGAGGGCCGTC
 ATTCTTCA

07-SM-42 1492R

GGCAAGGGTGCCGGTGCTTTCATGCTAGTCGTCGATGGTGCCTTTCG
 GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT
 TCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACT
 CTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAG
 CCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTAC
 CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
 GGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
 GAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTG
 GGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACG
 CATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
 AAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTC
 GACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATAACGGAAAGC
 ATCAGAGATGGTGGCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGCTG
 TCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGAT

03-SM-007 27F

CCGCCCTGGGCGGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAACCGCTT
 TCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCT
 GCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATA
 TGACCGTCTGCCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGA
 TGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGTAGTGGCTACCAAGG
 CGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACT
 GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
 ACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGATGACGG
 CCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGG
 TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA

ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTC
GTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG
GTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGA
ATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGT
GGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT
AACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC
TCAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTT
AATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGGCTTGACATACACCG
GGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGGTGGTTCGGTGTACAGGTGG
TGCATGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGTCCGTGTTGCCAGCAGCCCTTGTGGTGTGGG
GACTCACGGGAGAACCGCCGGGGTCCACCTCG

03-SM-007 1492R

GCCCCATCGCAGTCCACCTTCGAAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGC
CACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGT
ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTAC
TAGCGACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACT
GAGACCGGCTTTTTGAGATTGCTCCACCTCACGGTATCGCAGCTCATT
GTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATG
ATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCGGTCTC
CCGTGAGTCCCCAGCACCACAAGGGCCTGCTGGCAACACGGGACAAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGCCTGTC
TCCAGACGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
TCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAA
TGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTTGCCACACCTAGTG
CCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCC
CCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCG
CCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAA
TTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGACC
CGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACG
AGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGTACCGTCA
CTTCGCTTCTCCCTGCTGAAGAGTTTACACCCGAGCGTCATCCCTCAC
GCGCGTCGCTGCATCAGGCTTCGCCATTGTGCATATC

03-SM-016 27F

GGGAAGTGGGCGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAGCCTTTTCGG
 GGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTT
 CACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTC
 TGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGC
 CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACG
 ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
 GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTC
 GGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCT
 GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
 CGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG
 CATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT
 GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGA
 AGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
 GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGG
 AACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCA
 TTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG
 AATTGACGGGGGCCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGA
 CGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATAACGGAAAGCAT
 CAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGCTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTACGTCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCATTGTTTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTCGGGGTGATGGGGACTCA
 CAGGAGACTGGCCGGGATCACCTCG

03-SM-16 1492R

CCCCTCCGCCGGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGG
 CCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTG
 TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTA
 CTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAC
 TGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTCAT
 TGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATG
 ATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTC
 CTGTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAA
 GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT
 GACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGCACCA
 TCTCTGATGCTTTCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGT
 TGCGTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA
 ATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACTT
 AATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAG
 TTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCT
 CCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTT

CGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGG
 AATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCGTATCGAATGCAG
 ACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAAGCCGCCT
 ACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACACGCTTGCGCCCTACGTA
 TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTA
 CCGTCACTTTCGCTTCTCCCTGCTGAAAGAGTTTACACCCGAAGCCGT
 CATCCCTCACGCGGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCC

07-SM-007 27F

ACCCCTGGGCGGGCGTGCTTACCATGCAGTCGAACGATGAAGCCCTTCG
 GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCT
 TCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACT
 CTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAG
 CCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGAC
 GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTT
 CGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTAC
 CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTA
 GGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTC
 TGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTC
 CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC
 GAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
 GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTG
 GGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCCGAGCTAACG
 CATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGGCCGCAAGGCTAAAACTCAA
 AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATT
 CGACGCAACCGGAAGAATCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAG
 CATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGGGTGCATGCC
 TGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAGTCCCGCAACGAGCGC
 ATCCTTGTCTGTGTTGCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACA
 GGAGACTGCCGGGTCCACCTCGAG

07-SM-007 1492R

CGCACCATCGCAGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGG
 GCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTG
 TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGAT
 TACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGA
 ACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCT
 CATTGTACCAGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGC
 ATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGT
 CTCCTGTGAGTCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAAC

AAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGCAC
CATCTCTGATGCTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCGTTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGT
CAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGGCCGTA CCCCAGGCGGGGAA
CTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACC
TAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGAACAACCAGGGTATCTAATCCTGTT
CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCACCGTCAGGAAATGAGCCAGAGATC
CGCCTTCGCCACCGGGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTA
CACCAGGAAATTCCGATCTCCCCTACAACACTCTAGCTAGCCCGTAGC
GAAGCGGACCGGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACA
AGCCGCCAACGAGCTCTTTAGACCAAAAATTCAGGAAACGCTTGGCGC
CCTACCGATTACCGGGGGCGGCGGAAGGAATTAGCCCGCCCCTTCTTC
GGCAGGAACTTCCTTTTCCCCTCCTTCCCAGTGAAAGAAGTTTCCAACC
CGAAGGCCCCCTCCCCGAGGGCGGGGGCCCGGAACAGGCTTTGCCCAT
TGGCAA

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Denizel aktinomisetlerden yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfi amacıyla başlatılan TÜBİTAK SBAG 109S361 No'lu projemiz kapsamında Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde 7 lokasyondan toplanan 62 sünger örneğinden 267 aktinomiset izole edilmiştir. Bu izolatlar antimikrobiyal aktivitelerine göre taranmış, yüksek aktivite gösteren 19 izolat, biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmalarına geçmeden önce tezimiz kapsamında incelenmiştir.

Denizel ortamlardan izole edilen aktinomisetler yaşadıkları ekstrem koşullara sentezledikleri farklı sekonder metabolitleriyle adapte olabildikleri için yeni metabolitlerin eldesi amacıyla önemli bir kaynak olarak düşünülmektedir (Lam, 2006). Bu amaçla aktinomiset izolasyonu çalışmalarımızı başlattığımız sünger örnekleri SCUBA dalışı yapılarak en fazla 34 metre derinlikten toplanmıştır. Denizel aktinomiset türlerinin varlığını gösteren birçok çalışmada ileri tekniklerle daha derin lokasyonlardan örnekleme yapıldığı görülmüştür. *Dietzia maris*, *Rhodococcus erytropolis* ve *Kocuria erythromyxa* Hokkaido'da denizin 1.225 metre derinliğinden izole edilmiştir. Ayrıca Jensen ve arkadaşları Guam Adası'nda 10.923 metreden elde ettiği sediment örneklerinden beş yeni aktinomiset filotipi izole etmiştir (Lam, 2006). 2006 yılında Pasifik Okyanusu'nda bulunan Mariana Çukuru'nun 10.898 metre derinliğinden *Dermaococcus sp.* izole edilmiştir (Goodfellow and Fiedler, 2010).

Çalışmalarımız sırasında besiyerlerine fungal büyümeyi baskılamak amacıyla nistatin ve hızlı büyüyen Gram negatif bakterileri baskılamak için de nalidiksik asit eklenmiştir (Ensign, 1992; Song et al., 2001). Toplanan ilk sünger örneklerine bazı ön işlemler uygulanarak ve uygulanmayarak izolasyon ortamlarına inokulasyon yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bölüm 4.1'de anlatılan yöntemden önce sünger örneğindeki yüzeysel bakterileri uzaklaştırmak amacıyla SDS (sodyum dodesil sülfat) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. SDS uygulamanın aktinomiset izolasyon oranına belirgin bir etkisi olmadığı görülmüş, sonraki denemelerde bu ön işlem uygulanmamıştır. İzolasyon çalışmalarında istenmeyen grup mikroorganizmaların bir şekilde elimine edilmesi büyük önem arz etmektedir. Çünkü bu mikroorganizmalar hızlı büyüyerek diğerlerinin

özellikle geç gelişen aktinomisetlerin izole edilmesini engellemektedir. Bu amaçla temelde birçok çalışmada da kullanılan çeşitli antimikrobiyal maddelerin (nalidiksik asit, sikloheksimid) kullanımı, süngerlerin ön yıkama ve seyreltme işlemleri çalışmamız kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 4.1’de anlatılan şekilde örnekleme hazırlanan süngerler ön denemeler sonucu seçilmiş olan dört farklı besiyerine inoküle edilmiştir (1, 3, 4 ve 6 No’lu besiyerleri). Jensen ve arkadaşlarının denizel aktinomisetlerin izolasyonunda denedikleri 8 farklı besiyeri içinde NPS ve NRS (saf agar, rifamisin, sikloheksimid, nistatin, deniz suyuyla ekstre edilmiş deniz kumu) ile alınan sonuçlar ilgi çekicidir. Büyümek için deniz suyuna ihtiyaç duyan aktinomisetler en büyük oranda bu ortamlardan izole edilmişken, aktinomiset izolasyonunda en düşük oran yine bu iki ortamda tespit edilmiştir (Jensen et al., 2005). Gelecekte denizel aktinomisetlerle yapılacak olan çalışmalarda başarının kültüre etme ve izolasyon prosedürlerine bağlı olduğu bilinmekte ve bu alanda yapılan çalışmalarda yeni seçici besiyerlerine ve yöntemlere önem verilmektedir.

Doğadan elde edilen bir örnekte var olan mikroorganizmaların çok küçük bir oranı izole edilebilmektedir. Süngerlerden aktinomiset izolasyonu için birçok araştırmacı farklı yöntemler kullanmıştır. Sediment ve sünger örnekleriyle yapılan moleküler çalışmalarda ribozomal RNA analizleri kültüre edilemeyen denizel aktinomisetlerin varlığını göstermiştir. Alg, sünger ve sediment örneklerinden izole edilebilen aktinomisetler kıyaslandığında en düşük oranın süngerlerden elde edildiği görülmüştür. Olson ve arkadaşları izolasyon besiyerine değişik oranlarda katalaz ve sodyum piruvat ekleyerek süngerlerde izolasyon oranını arttırmayı başarmışlardır (Olson et al., 2006).

Çalışmamızda aktinomiset kolonilerinin oluşması için izolasyon besiyerleri 21 gün inkübasyona bırakılmış ve 7 günde bir koloniler incelenmiştir. Aktinomisetler kendilerine özgü genellikle beyaz, derimsi, rijit, sporlu koloni morfolojileri ve substrat miseli oluşturmaları ile ayırt edilmiş ve saflaştırma işlemlerine geçilmiştir. Jensen ve arkadaşları bazı kolonilerin çıplak gözle görülemediğini, stereo mikroskop yardımı ile inkübasyonun 2-3. haftalarında tespit edilebildiklerini rapor etmiştir (Jensen et al., 2005).

Jensen ve arkadaşları deniz suyu olmadan büyüemeyen *Salinispora* suşlarını diğer izolatlar arasından elemek için deniz suyuyla ve distile su ile hazırlanan besiyerlerinde üremelerini araştırmıştır (Jensen et al., 2005). Çalışmamızda 267 izolat üzerinde yapılan denemelerde 267 izolatın da büyüme için deniz suyuna ihtiyaç duymadıkları belirlenmiştir. Bu da son zamanlarda denizel aktinomisetlerin sınıflandırılmasında belirlenmiş ve MAR I grubu olarak adlandırılan *Salinispora* grubu mikroorganizmaların seçilmiş bu 19 izolat arasında bulunmadığını göstermiştir.

Saflaştırılan izolatların Bölüm 4.2'de anlatılan yöntemle yapılan spor süspansiyonları -20°C ve -86°C 'de saklanmıştır. İzolatların, -20°C 'de stoklandıktan sonra bu spor süspansiyonları kullanılarak tekrarlanan küçük çapta fermantasyon denemelerinde stoklamadan önce aktivite gösteren suşların aktivitelerini kaybettikleri gözlenmiştir. Dondurma işleminin izolatları etkilediği düşünülerek sonraki stoklama işleminde yatık agar şeklinde hazırlanan tüplere ekim yapılmış ve bu tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Fakat bu izolatlarda da aktivite kaybı gözlenmiştir. Doğal ortamlarından alınıp laboratuvar ortamında üretilen mikroorganizmaların sekonder metabolitlerini sentezleyemediği düşünülmüş, doğal ortamlarında birçok mikroorganizma ile aynı habitatı paylaştıkları düşünülerek bazı izolatlar yine süngerlerden izole edilmiş denizel bakterilerle kontamine edilip, tekrar saflaştırılmıştır. Bir grup dondurularak saklanmış izolatın da spor süspansiyonlarından besiyerlerine 3-4 pasaj ekim yapılarak aktiviteleri tekrar kontrol edilmiştir. Bu yöntemlerle bazı izolatların aktivitesi geri kazanılmış gözükse de, ilerleyen zamanlarda tekrarlanan fermantasyon çalışmaları sonucunda oranın gittikçe düştüğü, stabil aktivite gösteren izolat sayısının oldukça az olduğu saptanmıştır.

Laboratuvarımızda bir diğer grup araştırmacının aynı izolatlara uyguladıkları katı ve sıvı fermantasyon işlemleri sonucunda sıvı kültürde aktivitesini kaybeden izolatların katı kültürde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bunun *Streptomyces* türü bakterilerde sekonder metabolit üretimi ve sporulasyon sürecinin pleiotropik genler tarafından kontrol edilmesiyle büyük oranda ilgili olduğu düşünülmektedir. *Streptomyces* cinsi üyelerinin sporulasyon sürecini başlatan genler aynı zamanda sekonder metabolizma yollarını da başlatmaktadır. İzolatların katı kültürde gerçek anlamda sporulasyon süreçleri başlatılarak sekonder metabolit yollarının

da eş zamanlı olarak aktive edildiği düşünülmektedir. Ancak endüstriyel süreçlerde sıvı kültürde de aktif metabolitleri stabil olarak üretebilen suşların belirlenmesi önemlidir. Denizel izolatlardaki aktivite kaybıyla ilgili yapılmış çalışmalar bulunamaması üzerine, yurtdışında benzer çalışmaları yapan gruplarla irtibata geçilmiş, aktivite kaybının ortak sorun olduğu görülmüştür.

İzolatların *E.coli* 0157:H7 RSSK 234 ve *S. aureus* (metisilin dirençli) RSSK 95047'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş, yüksek aktivite gösteren 19 izolat ileri çalışmalar için seçilmiştir. Proje kapsamında büyük çapta üretimlerine geçip, biyoaktif moleküllerin izolasyonu yapılmadan izolatların bazı özellikleri araştırılmıştır.

Besiyerlerine belirli oranlarda NaCl ilave edilmiş (Bkz. Bölüm 4.6) ve üreyebildikleri tuz konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir. Tüm izolatlar % 7.5 NaCl içeren ortamda üremeyi başarmışken, bir kısmı %10'luk ortamda üreyebilmiş, bir izolat da (07-SM-040) %12.5'luk ortamda az da olsa üreme göstermiştir. Tüm izolatların tuz içermeyen ortamda iyi üreme göstermeleri üreme için tuza ihtiyaç duymadıklarını göstermektedir. Ancak %2.5 tuz oranının varlığındaki üreme ve sporulasyon, hiç tuz olmayan aynı besiyerindeki üremeye göre daha iyi olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.4). Benzer şekilde izolatların üreyebildikleri pH aralıklarının belirlenmesinde pH 2 ile 12 arasında üremeleri gözlenmiştir. pH 2 ve 3'te hiç üreme gözlenmezken, birkaç izolat pH 4'te üremiştir. Tüm izolatların pH 12'de üreme göstermesi izolatların alkalifilik özellikte olduğunu göstermektedir (Bkz. Çizelge 5.4). 45°C'de büyüyen aktinomisetler termotolerant, 55°C'de büyüeyebilen aktinomisetler termofil olarak bilinmektedir (Korn-Wenish and Kutzner, 1992). İzolatlar içinde birkaç termotolerant suş olduğu, geri kalan hepsinin 10°C sıcaklıkta bile üreyebildiği görülmüştür (Bkz. Çizelge 5.5). İzolatların şeker kaynağı olarak kullandıkları substratın belirlenmesi amacıyla içinde yalnız glukoz, fruktoz, mannitol, sukroz, selüloz veya rafinoz bulunan ortamlarda büyümeleri kıyaslanmıştır. Şeker kaynağı olmadan hazırlanan besiyeri de kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrielerde oluşan koloniler incelendiğinde tüm izolatların glukoz, fruktoz ve mannitolu şeker kaynağı olarak kullandığı görülmüştür (Bkz. Çizelge 5.6)

Günümüzde 16S rDNA dizi analizi yöntemi özellikle cins düzeyinde ve az sayıda tür içeren cinslere ait izolatların tanımlanmasında değerli bilgiler vermektedir. Tez kapsamında seçilen 19 izolatın da *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. *Streptomyces griseus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces roseosporus* ve *Streptomyces clavuligerus* benzer türler olarak gösterilmiştir (Bkz. Şekil 5.6). Karasal ortamlarda geniş bir yaşama alanı bulmuş olan *Streptomyces* genusu üyelerine denizel ortamlarda da sıklıkla rastlanmaktadır. Denizel *Streptomyces* genusu üyelerinin karasal olanlardan farklı türler içerdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Dharmaraj, 2010; Goodfellow and Fiedler, 2010; Hanse et al., 2010; Hughes et al., 2007).

16S rDNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde aynı türe ait izolatların %97 ve üzeri benzerlik göstermesi beklenmektedir. Ancak günümüzde 500'ün üzerinde türe sahip olan *Streptomyces* cinsi üyelerinin tür düzeyinde tanımlanmaları kesin sonuçlar vermemektedir. Bu durum *Bacillus* gibi çok fazla tür içeren başka cinsler için de geçerlidir. Ayrıca taksonomik sınıflandırmada kullanılan sinonimler ve sürekli gelişen sistematik nedeniyle ileri tanılama çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Okyanusun biyosentetik potansiyellerini anlamak için örneğin omurgasızlarla simbiyoz yaşayan bakterilerin gelişmiş kültüre edilme ve izolasyon yöntemlerinin çalışılması gerekmektedir. Bilinen yöntemlerle biyoçeşitliliğin ancak %5'i veya daha azı kültüre edilebilmektedir (Hughes and Fenical, 2010).

Yapılan genomik çalışmalar ve metabolik yol izlerinin araştırılmasıyla fazla sayıda gizli yolların varlığı tespit edilmiştir. Bu yolların uyarılmasıyla sentezlenecek yeni bileşikler olduğu düşünülmektedir.

Tek bir mikroorganizma farklı fermantasyon koşullarıyla birçok farklı metabolit sentezleyebilir. İzolatların farklı yollara yönlendirilmesi dışında kültüre edilemeyen mikroorganizmaların kültüre edilebilmesi için farklı yaklaşımlar uygulanabilmektedir (Hill and Fenical, 2010). Ancak uygulanacak ön işlem, farklı besiyerleri gibi yöntemlerin dışında farklı yer (okyanus, mangrov, resif, mercan kayalıkları gibi) ve derinliklerden alınan örneklerde farklı sonuçlar elde edildiğine dair birçok çalışma mevcuttur (Goodfellow and Fiedler, 2010;

Jensen and Fenical, 2005; Asolkar et al., 2009; Hughes et al., 2007). Analitik tekniklerin ilerlemesiyle bilinen moleküllerle karşılaştığında ileri çalışmalar yapılmaksızın düşük konsantrasyonlarda molekülü tanımak ve molekül yapısı hakkında bilgi sahibi olmak mümkün olacaktır. Analitik tarama, kültüre etme ve genomiks alanında geliştirilecek yöntemlere ve sekonder metabolitlerin moleküler düzeyde üretimi hakkında kesin bilgilere sahip olduğunda doğal kaynaklardan biyoaktif moleküllerin keşfinde altın çağın başlayacağı öngörülmektedir.

Günümüzde denizel çevrelerden aktinomisetler izole edilebiliyor olsa da uygun seçici moleküler tekniklerle çalışıldığında denizel biyoçeşitliliğin gerçek taksonomik özellikleri ortaya çıkacaktır. Yeni türlerin bulunmasıyla doğal ürün keşfi için yeni kaynaklar oluşacaktır (Jensen and Fenical, 2005).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Asolkar, R. N., Kirkland, T.N., Jensen, P.R. and Fenical, W.,** 2009, Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*, *The Journal of Antibiotics* 63, 37-39pp.
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R.E.,** 1997, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 3rd ed., N. Y
- Baltz, R.H.,** 2007. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future, *Microbe* 2, 125-131pp.
- Bérdy, J.,** 2011, Review article: microscopic colitis - lymphocytic, collagenous and “mast cell” colitis, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 58, 1-26pp.
- Bush, K.,** 2004, Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 10-17pp.
- Denizci, A.A.,** 1996, Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, 149s.
- Dharmaraj, S.,** 2010, Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substance, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2123-2139pp.
- Ensign, J.C.,** 1992, Chapter 35 Introduction to the Actinomycetes in *The Prokaryotes* (eds) Ballows, A., et al., Springer Verlag-NewYork.
- Falkow, S., Rosenberg, E., Schleber, K. and Stackebrandt, E.,** 2006, Proteobacteria: Gamma Subclass, *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Springer, New York, 1248p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fenical, W. and Jensen, P.R.,** 2006, Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria, *Nature Chemical Biology* 2, 12, 666-674pp.
- Fiedler, H., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Potterat, O., Puder, C. and Mihm, G.,** 2005, Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites, *Antonie van Leeuwenhoek*, 37-42pp.
- Goodfellow, M. and Fiedler, H.,** 2010, A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic, *Antonie van Leeuwenhoek*, 119-142pp.
- Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T. and Tabuchi, A.,** 2005, Isolation of Novel Bacteria and Actinomycetes Using Soil-Extract Agar Medium, *Journal Of Bioscience And Bioengineering* 99, 485-492pp.
- Hardoim, C.C.P., Costa, R., Arau, F.V., Hajdu, E., Peixoto, R. and Lins, U.,** 2009, Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters, *Applied And Environmental Microbiology*, 75, 3331-3343pp.
- Haste, N.M., Perera, V.R., Maloney, K.N., Tran, D N., Jensen, P.R. Fenical, W., Nizet, V. and Hensler, M.E.,** 2010, Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *The Journal of Antibiotics* 63, (5):219-224pp.
- Hill, T.,R. and Fenical, W.,** 2010. Pharmaceuticals from marine natural products: surge or ebb?, *Current Opinion in Biotechnology* 21, 777-779pp.
- Hughes, C.C. and Fenical W.,** 2011, Antibacterials from the Sea, *Marine Biotechnology*, 16, 1-27pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hughes, C.C., Prieto-davo, A., Jensen, P.R. and Fenical, W.,** 2008, The Marinopyrroles, Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp., *Il Farmaco*, 4, 4-6pp.
- Jensen, P. R., and Fenical, W.,** 2005, New Natural-Product Diversity From Marine Actinomycetes, *Natural Products: Drug discovery and Therapeutic Medicine*, 315-328pp.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G. and Fenical, W.,** 2005, Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie van Leeuwenhoek*, 43-48pp.
- Korkmaz, A. Ç.,** 2006, Ege Bölgesi Kaplıca Kaynakları ve Çevrelerinden İzole Edilen Termofilik Aktinomisetlerden Yeni Antimikrobiyal Moleküllerin Eldesi, Yüksek Lisans Tezi, 131s.
- Korn-Wendisch F. and Kutzner H.J.,** 1992, the family Streptomycetaceae, *the Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifikation, Application*, 921-995pp.
- Lam, K.S.,** 2006, Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Current Opinion in Microbiology* 9, 245-51pp.
- Liman, R.,** 2007, *Streptomyces Coelicolor*'daki Metabolik Değişiklikler Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 107s.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pederson, J.,** 2000, Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology* 38, 471p.
- Maloney, K.N., Macmillan, J.B., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Dipasquale, A.G., Rheingold, A.L., and Fenical, W.,** 2009, Lodopyridone, a Structurally Actinomycete, *Marine Biotechnology*, 4, 355- 357pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Fenical, W.,** 2002, Widespread and persistent populations of a major new marine actinobacteria taxon in ocean sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5005–5011.
- Naidenova, M. and Vladimirova, D.,** 2000-2004, Isolation and Taxonomic Investigation of *Actinomyces* from Specific Biotopes in Bulgaria, *Journal of Culture Collections*, 3, 15-24pp.
- Olson, J.B., Lord, C.C. and McCarthy, P.J.,** 2000, Improved Recoverability of Microbial Colonies from Marine Sponge Samples, *Limnology & Oceanography*, 10, 139-147pp.
- Oskay, M., Tamer, A.Ü. and Azeri, C.,** 2004, Antibacterial Activity of Some *Actinomycetes* Isolated from Farming Soils of Turkey, *African Journal of Biotechnology*, 3, 441-446pp.
- Öztürk, R.,** 1997, Antibiyotiklerin etki mekanizmaları, antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, 27-51s.
- Öztürk, R.,** 2008, Akılcı antibiyotik kullanımı ve ülkemizde antimikrobik maddelere direnç sorunu, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, 61, 1-16s.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Shuman, H.A.,** 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Saran, B. ve Karahan. Z.,** 2010, Antimicrobial Agents at a Glance, *Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars* 1, 216-220ss.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shirling, E. B. and Gottlieb, E. B.,** 1966, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16, 313-340pp.
- Solanki, R., Khanna, M. and Lal, R.,** 2008, Bioactive compounds from marine actinomycetes, *Molecular Biology*, 12, 410-431pp.
- Ward, A.C. and Bora, N.,** 2006, Diversity and biogeography of marine actinobacteria, *Current Opinion in Microbiology*, 9, 279-286pp.
- Webster, NS., Wilson, KJ., Blackall, LL., Hill, RT.,** 2001, Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*, *Applied and Environmental Microbiology* 67, 434–444
- Wilkes, J.,** 2007, Microbial symbiosis in marine sponges: Overview on ecological aspects Simbiosis microbiana en esponjas marina, *Revisión de aspectos ecológicos*, 15, 182–192pp.

ÖZGEÇMİŞ

ADI-SOYADI: Özlem ÖNER
DOĞUM YILI: 1985
İLETİŞİM: ozlemoners@hotmail.com

EĞİTİM DURUMU:

Yüksek Lisans (2008-2011): Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Lisans (2003-2008): Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Lise (2000-2003): İzmir Atatürk Lisesi