

**Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının
Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar**

Semra Yücel

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül 2007

**Studies On Antimicrobial Activity Of Actinomycetes
That Were Isolated From Caves**

Semra Yücel

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

September 2007

**Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının
Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar**

Semra Yücel

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

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yamaç

Eylül 2007

Semra YÜCEL' in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

15/10/2007

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Üye : Dr. Sevil PİLATİN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun/...../..... gün ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

Mağaralardan İzole Edilen Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar

Semra Yücel

ÖZET

Ülkemizin çeşitli illerinde bulunan 19 doğal mağaradan izole edilen toplam 290 aktinomiset izolatının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip madde üretim potansiyelleri araştırılmıştır.

Test mikroorganizması olarak; Gr pozitif ve Gr negatif bakteriler, maya ve küf suşları kullanılarak “Agar Piece” metodu ile antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir.

Gram pozitif bakterilere karşı elde edilen antimikrobiyal aktivitenin, gram negatif bakteriler, mayalar ve küflere oranla daha fazla olduğu saptanmıştır. Test mikroorganizmalarına karşı yüksek aktivite gösteren 7 izolatın, 3 farklı klinik bakteriye karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Daha sonra aktinomiset izolatları numerik taksonomi metodlarıyla tanılanmıştır.

Test mikroorganizmaları ve klinik bakteriler ile yapılan antimikrobiyal aktivite belirleme ve numerik taksonomi ile izolatların tanılanması, çalışmalarının sonuçları ışığında, M1492 kodlu *Streptomyces* izolatı sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Soya unu kullanılarak hazırlanan üretim ortamında, kuru hücre ağırlığı, pH değişimi, glukoz miktarı, antimikrobiyal aktivite tespitleri yapılmıştır. Aktif madde üretiminin 3.gün başladığı ve 5.-6. günlerde en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir.

Streptomyces M1492 tarafından üretilen metabolitler uygun çözücüler ile ekstrakte edilerek ince tabaka kromatografisi ile ayrılmış ve spotların biyoaktiviteleri biyoootografi yöntemiyle belirlenmiştir. Aktif maddenin etkisi Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu verileri ile değerlendirilmiştir.

Aktif maddenin sıcaklık toleransında uygulanan, 30 dk 60 °C sıcaklığa karşı dirençli, 5 dk 100 °C sıcaklığa karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aktinomiset, Antimikrobiyal Aktivite, İTK, Biyootografi, MİK.
**Studies On Antimicrobial Activity Of Actinomycetes
That Were Isolated From Caves**

Semra Yücel

SUMMARY

In this study we investigate potential of production which has antimicrobial activity against the different microorganisms of *Actinomycetes* isolate that were isolated from 19 natural cave in different in Turkey. Antimicrobial activity were determined by using of piece agar method and bacteria, yeast, molds were used as test microorganisms. Antimicrobial activity that was against to gram positive bacteria was more than antimicrobial activity against to gram negative bacteria, yeast and mold. It was investigated of antimicrobial activity against to 3 different kind of multidrug resistant microorganisms of 7 isolat which has high activity against the test microorganisms. *Actinomycetes* isolat was evaluated by numeric taxonomy. In according to reasons of studying *Streptomyces* M1492 isolat was choosed for using on the other steps.

Dry cell weight, change of pH, quantity of glukoz and antimicrobial activity was fixated in a production area which soy meal was used. It was observed that production of active matter was started at 3 th day and it reached the highest point at 5-6 th day.

Metabolits which was produced by *Streptomyces* M1492 were extracted by suitable solvent and it was seperated by TLC and bioactivation of spot was determined by biyootography. Active production effectivation was valuated by MIC and MBC.

It was determined that active production is resistant 30 min 60 °C and it is sensitive to 5 min 100 °C.

Keywords: *Actinomycetes*, Antimicrobial Activity, TLC, Biyootography, MIC.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimin sırasında olduğu gibi yüksek lisans dönemimde de tecrübelerinden, çalışma şeklinden ve hayata bakış tarzından birçok şey öğrendiğim, desteği ve anlayışıyla her zaman yanımda olan değerli hocam ve danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a her şey için teşekkür ederim.

Bu seviyeye gelmemi sağlayan hayatımın her aşamasında özellikle son 7 yıl boyuca lisans ve yüksek lisans dönemlerimde, sevgisini, güvenini, desteğini ve maddi, manevi katkılarını esirgemeyen başta aileme ve tüm yakınlarıma minnettirim. Ayrıca üniversitedeki çalışmalarında zaman zaman pratik katkısını esirgemeyen kardeşim Sibel YÜCEL' e, nişanlım Ufuk BULUT' a, canım kuzenim Sadık Onur KARAÇAM' a, biricik dostum Sinem BAKILAN' a, en yakın ve fedakâr tez arkadaşım M. Said DEMİR' e, yardımsever arkadaşım Nalan ÖZCAN' a çok teşekkür ederim.

Ayrıca Nümerik taksonomi çalışmalarında, laboratuarda yardımlarıyla gecesini gündüzüne katan çalışkan laboratuvar ekip arkadaşlarıma, testlerden elde edilen verileri ilgili bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilen, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN ve Yrd. Doç. Dr. Kamil IŞIK' a, emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Bütün bunları siz olmadan yapamazdım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	4
1.1.1. Antibiyotiklerin Tanımı	4
1.1.2. Antibiyotiklerin Ekolojisi	4
1.1.3. Antibiyotiklerin Ekonomisi	5
1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	6
1.2.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	6
1.2.2. Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması	8
1.2.2.1. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu	8
1.2.2.2. Hücre membranı işlevinin inhibisyonu	9
1.2.2.3. Protein sentezinin inhibisyonu	9
1.2.2.4. Nükleik asit sentezinin inhibisyonu	10
1.2.3. Biyolojik Orjinlerine Göre Sınıflandırılması	10
1.2.3.1. Bakteriler	11
1.2.3.2. Funguslar	12
1.2.3.3. Aktinomisetler	12
1.3. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları	14
1.3.1. Antibiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı	14
1.3.2. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı	15
1.3.3. Antibiyotiklerin Hayvancılıkta Kullanımı	15
1.4. Antibiyotiklere Karşı Mikrobiyal Dirençlilik	16
1.4.1. Doğal Dirençlilik	17
1.4.2. Kazanılmış Dirençlilik	17
1.4.2.1. Mutasyona bağlı kazanılmış direnç	17

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa No</u>
1.4.2.2. Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç	18
1.5. Mağara Ekosistemi ve Bileşenleri	18
1.6. Mağara Mikrobiyolojisi	21
1.7. Mağara Mikroflorasının Korunması	23
2. MATERYAL VE METOD	25
2.1. Materyal	25
2.1.1. Kullanılan Test Mikroorganizmaları	25
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri	26
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Diğer Kimyasallar	33
2.2. Metod	35
2.2.1. Örneklenen Mağaraların Seçilmesi	35
2.2.2. Mağaralardan Aktinomiset İzolasyonu ve Korunması	39
2.2.2.1. Temas yöntemi	39
2.2.2.2. Seyreltme plaka yöntemi	40
2.2.2.3. Mağara örneklerinden izole edilen aktinomisetlerin korunması	40
2.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	41
2.2.4. Aktinomisetlerin Klinik İzolatlarla Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	42
2.2.5. Numerik Taksonomi ile İzolatların Tanınması	42
2.2.5.1. İzolatların Renk Gruplarının Belirlenmesi	43
2.2.5.2. Nümerik Taksonomi Testleri	43
2.2.5.2.1. Degradasyon testleri	44
2.2.5.2.2. Biyokimyasal testler	47
2.2.5.2.3. Beslenme testleri	50
2.2.5.2.4. Fizyolojik testleri	53
2.2.5.2.5. Antimikrobiyal aktivite testleri	56
2.2.5.2.6. Morfoloji ve pigmentasyon	57
2.2.5.2.7. Nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi	61
2.2.6. Aktif Aktinomiset İzolatının Seçimi	62
2.2.7. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi	62
2.2.7.1. Sporulasyon	62
2.2.7.2. İnokulum hazırlanması	64
2.2.7.3. Fermantasyon	64
2.2.7.4. Kuru hücre ağırlığı	67

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa No</u>
2.2.7.5. Fermantasyon sıvısında pH değişimi	67
2.2.7.6. Fermantasyon sıvısında glukoz miktarı tayini	67
2.2.7.7. Fermantasyon sıvısında antimikrobiyal aktivite belirlenmesi	69
2.2.8. Antimikrobiyal Etkili Maddenin İzolasyonu	71
2.2.8.1. Solvent ekstrasyonu seçimi	71
2.2.8.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK)	73
2.2.8.3. Biyootrografi	79
2.2.9. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)	80
2.2.10. Aktif Molekülün Sıcaklık Toleransı	80
3. BULGULAR	82
3.1. Mağaralardan Aktinomiset İzolasyonu ve Korunması	82
3.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	86
3.3. Aktinomisetlerin Klinik İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	95
3.4. Numerik Taksonomi ile İzolatların Tanılanması	96
3.4.1. İzolatların renk guplarının belirlenmesi	96
3.4.2. Nümerik taksonomi testleri	96
3.5. Aktif Aktinomiset İzolatının Seçimi	100
3.6. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi	101
3.7. Antimikrobiyal Etkili Maddenin İzolasyonu ve Biyootrografi	103
3.8. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	107
3.9. Aktif Molekülün Sıcaklık Toleransı	108
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	110
4.1. Mağaralardan Aktinomiset İzolasyonu ve Korunması	110
4.2. Test Mikroorganizmalarına Karşı Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	111
4.3. Aktinomisetlerin Klinik İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	114
4.4. Numerik Taksonomi ile İzolatların Tanılanması	114
4.5. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi	115
4.6. Antimikrobiyal Etkili Maddenin İzolasyonu ve Biyootrografi	117
4.7. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)	119
4.8. Aktif Molekülün Sıcaklık Toleransı	120
5. KAYNAKLAR DİZİNİ	122

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1 Dim (Gavurini) Mağarası (Antalya)	36
2.2 Bulak(Mencilis) Mağarası (Karabük)	36
2.3 Sipahiler Mağarası (Amasra – Bartın)	37
2.4 Yalan Dünya Mağarası (Alanya – Antalya)	37
2.5 Hipoksantin degradasyonu sonucu koloni çevresinde oluşan renk açılımı	46
2.6 İyot solüsyonu ilavesi ile belirlenen nişasta degradasyonu	46
2.7 Koloni çevresinde oluşan opak zon ile belirlenen lesitinaz aktivitesi	47
2.8 Nitrat redüksiyonu testi	48
2.9 Hidrojen sülfür oluşumu testi	49
2.10 Üre hidrolizi testi	49
2.11 Aynı test suşlarının 2 farklı karbon kaynağında büyüme özellikleri	51
2.12 Aynı test suşlarının azot kaynağı olarak Serin' i kullanma özellikleri	52
2.13 Test suşlarının pH 9 da büyüme özellikleri	54
2.14 Test suşlarının besi ortamında fenol varlığında büyüme özellikleri	54
2.15 Test suşlarının besi ortamında potasyum tellürit varlığında büyüme özellikleri	55
2.16 Aynı test suşlarının 2 farklı antibiyotik varlığında büyüme özellikleri	55
2.17 Çeşitli test suşlarının <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ve <i>Rhodotorula rubra</i> ' ya karşı antimikrobiyal aktivitesi	57
2.18 1115 kodlu izolatın İnorganik tuz – Nişasta Agar (ISP 4) ortamında 14 günlük büyümesinde substrat ve havasal misel renkleri	58
2.19 İzolatın (M1492) YEME besiyerlerinde gelişimi	63
2.20 İzolatın (M1492) ISP4 besiyerlerinde gelişimi	63
2.21 İzolatın (M1492) fermentasyon ortamında çalkalamalı etüvdeki gelişimi	61
2.22 24 saat aralıklarla, filtre kağıdından geçirilen fermentasyon sıvısı	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa No</u>
2.23 Filtreden geçirilip şişelere (25 ml lik) alınan kültür sıvıları	66
2.24 Fermantasyon sıvısında glukoz miktarı tayini için hazırlanmış tüpler	68
2.25 Besiyerinde kalan glukoz miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri	69
2.26 Fermentasyon sıvısının filtre ile steril edilmesi	70
2.27 Kanlı agar petripleri üzerine drigalski spatülü yardımı ile yayılan MRSA ve aseptik koşullarda petripler üzerine yerleştirilen 20 µl fermantasyon sıvısı emdirilmiş diskler	71
2.28 Ayırma hunilerinde (100 ml lik) Etil asetat ve Heptan' la muamele edilen kültür sıvısı	72
2.29 İTK çalışmalarında, fermantasyon sıvısının kromatografi kağıdı üzerine emdirilmesi ve havada kurutulması	73
2.30 İTK çalışmalarında, fermantasyon sıvısının kromatografi kağıdı üzerinde yürütülmesi	74
2.31 İTK çalışmalarında, 265-365 nm dalga boyunda incelenen spotlar	75
2.32 Aktif maddenin, huni içindeki cam yününden geçirme işlemi	78
2.33 Çözücünün rotary evaporator' de yoğunlaştırılarak antimikrobiyal etkili maddeden uzaklaştırılması	79
3.1 Çeşitli test suşlarının antimikrobiyal aktivitesi	86
3.2 Aktinomiset izolatlarının (M1492) ve standart antibiyotik disklerin MRSA' ya karşı antibakteriyal aktivitesi	95
3.3 Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve Complete algorithm analizlerine göre, mağaralardan izole edilen <i>Streptomyces</i> suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram	98
3.4 <i>Streptomyces</i> (M1492) kuru hücre ağırlığı, pH değişimi, besiyerinde kalan glukoz miktarı ve antimikrobiyal aktivite zon çapları	103
3.5 Biyootografi çalışmasında, aktif inhibisyon etkisine sahip spotların <i>S. aureus</i> ' a karşı oluşturduğu şeffaf zonlar	106
3.6 Antimikrobiyal etkili madde ile yapılan MIK çalışması	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
1.1 Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	7
1.2 Bakteriler tarafından üretilen antibiyotikler	11
1.3 Funguslar Tarafından Üretilen Antibiyotikler ve Sayıları	12
1.4 Aktinomisetlerin Sınıflandırılması	14
1.5 Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları	16
1.6 Çeşitli mağaralara ait mikrobiota	23
2.1 İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları	25
2.2 İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan klinik izolatlar	26
2.3 Kullanılan Çözeltiler ve Diğer Kimyasallar	33
2.4 İzolasyon için örnekleme yapılmış olan mağaraların genel özellikleri	38
2.5 İzolasyon çalışması yapılan mağaralar	39
2.6 Degradasyon testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları	45
2.7 Karbon kaynağı testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları	50
2.8 Azot kaynağı testlerinde kullanılan substratlar	52
2.9 Fizyolojik testlerde kullanılan inhibitör ve antibiyotikler ile konsantrasyonları	53
2.10 Test suşlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları	56
2.11 İzolatların tanılanması amacı ile kullanılan tip türler	59
2.12 Test hatasını belirlemek için kullanılan duplikatlar	60
2.13 İnce Tabak Kromatografisi (İTK)' de denenmiş çeşitli solvent karışımları	76
3.1 Örneklenen mağaralardan elde edilen izolatlarla ilişkin veriler	82
3.2 İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları	87

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
3.3 Aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotik disklerin <i>MRSA</i> , <i>A. Baumannii</i> karşı antibakteriyal aktivitesi zon çapları	96
3.4 Antibakteriyal aktivite gösteren <i>Streptomyces</i> sp. M1492 kodlu izolatın test mikroorganizmaları ve klinik izolatlar karşı inhibisyon zon çapları	101
3.5 Fermantasyon Sıvısında; pH Değişimi, Kuru Hücre Ağırlığı, Glukoz Miktarı Tayini, Test Mikroorganizmalarına Karşı İnhibisyon Zon Çapları, Hücre Kuru Ağırlığın Kalan Glukoz Miktarının Oranları	102
3.6 <i>MRSA</i> (Metilen Resistant <i>S. aureus</i>) karşı antimikrobiyal etkisi denen çözücü sistemlerine ait zon çapları	104
3.7 İTK ile belirlenen spotların R_f değerleri ve spotların biyolojik aktiviteleri	105
3.8 Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu	107
3.9 Aktif molekülün sıcaklık toleransının “Disk Difüzyon” yöntemiyle belirlenmesi	109
3.10 Aktif molekülün sıcaklık toleransının “Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu” yöntemiyle belirlenmesi	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Atm.	Atmosfer Basıncı
°C	Derece Santigrat
g	Gram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
pH	Ortamdaki Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
$Y_{h/g}$	g hücre kuru ağırlığı / g kalan glukoz
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
DMSO	Dimetilsülfoksit
ESMAD	Eskişehir Mağaracılar Derneği
Et al.	Ve diğerleri
ISP	International <i>Sterptomyces</i> Project
İTK	İnce tabaka kromatografisi
MA	Malt Agar
MEA	Malt Ekstrat Agar
MEA	Malt Ekstrat Broth
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTA	Maden Teknik Arama
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum Klorür
NKM	Nişasta Kazein Agar Medium

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamar</u>
PDA	Potato Dextrose Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
Sp.	Species (Tür)
S _{SM}	Simple matching coefficient
TCA	Trikloroasetik asit
TMB	Türkiye Mağaracılar Birliği
TTC	Tetrazolyumtriklor
UPGMA	<u>U</u> nweighted <u>P</u> air <u>G</u> roup <u>M</u> ethod with <u>A</u> rithmetic averages
VRE	Vancomycin Resistant <i>Enterobacter faecium</i>

1. GİRİŞ

Dr. Jasua Lederberg, 1988' de Nobel Tıp Ödülü' nü aldığı törendeki konuşmasında 'Yaşam için yarıştığımız mikroorganizmalar bu gezegen üzerindeki etkilerini daha da fazla hissettirecekler' demiş ve bu konudaki kaygılarını, yapılması gereken daha çok şeyin olduğunu ifade etmiştir (Anonymus, 2007 b).

Çok eskiden beri insanoğlu, ilk zamanlar nedenini anlayamadığı, daha sonraları ise nedenlerini bildiği ama tedavi edemediği hastalıklarla başa çıkmaya çalışmıştır. İnsan ömrünün çok kısa sürdüğü o zamanlardan günümüze bu konuda, bir çok araştırma yapılmış, bulunan ilaçlar sayesinde pek çok tedavi yöntemi geliştirilmiştir.

Kuzey İtalya' da 1991 yılında, geri çekilen bir buzulun altından mumyalanmış bir ölü bedeni çıkarılmış ve ona “Buz adam” adı verilmiştir. Yaklaşık olarak 5310 yıl önce yaşamış olduğu tahmin edilen “Buz adam” üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki, aslında eski olan sadece bedenin kendisi değil aynı zamanda o bedenin rektumunda saptanan mantarlardır. *Piptoporus betulinus* adındaki bu mikroorganizmaların mikobakterilere karşı antimikrobiyal etkilerinin bulunduğu bilinmektedir ve belki de “mikroorganizmalarla savaşan mikroorganizmalar” kavramının temelleri o zaman, hatta daha da öncesinde atılmıştı (Anonymus, 2007 a).

Bir mikroorganizmanın diğerini yok etmesine dair ilk uygulama Metchnikoff (1889)' un tavsiyesi üzerine denenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları tıp literatürüne zararsız mikroorganizmanın zararlı mikroorganizmayı ortadan kaldırıp onun yerini alması düşüncesinden giderek “yerini alma sağaltımı” olarak geçmiştir. Aynı yıl Vuillemin tarafından “bir mikroorganizmanın diğer bir mikroorganizma üzerinde antogonistik faaliyetlerinin mevcut olduğu ve bu faaliyetlerden bazı insan hastalıklarının sağıtımında yaralanılabileceği” fikri doğmuştur. Bu durum araştırmacı tarafından “Antibiosis” olarak tanımlanmıştır. Sonraki yıllarda Papcostas ve Gate, bu terimi sadece *in vitro* durumlar için sınırlandırmışlar, benzer aktivitenin *in vivo* da gerçekleşmesini ise “antagonizm” olarak tanımlamışlardır (Yıldırım, 2004).

Enfeksiyonları tedavi edecek bir takım “sihirli mermilerin” arayışı içinde olan Alman bakteriyolog Paul Ehrlich, 1909 yılında arsenik bazlı bir madde bulmuş ve sifilizin erken döneminde etkili olduğunu gözlediği bu maddeye “salvarsan” adını vermiş. Bu madde ile birlikte, 19. yüzyılın ortalarında Louis Pasteur' ün “bazı

mikroorganizmaların diğerlerini öldürdüğü” şeklindeki gözlemi, daha sonra 1928 yılında İskoç bilim adamı Sir Alexander Flemming tarafından penisilinin keşfine kadar bu alanda fazla bir ilerleme kaydedilememiştir. Bir küf parçasının tesadüfen bir bakteri kültürünün içine düşmesi antibiyotiklerin keşfine yol açmıştır. Sir Alexander Flemming, küfün, yakınındaki bakterileri öldürdüğünü ve bu küfün çok bulunan *Penicillium* cinsinden olduğunu görmüştür. Daha sonraki araştırmalarda bu küften meydana gelen kimyasal maddelerin insan vücuduna zarar vermediği ortaya çıkmıştır. Antibiyotiklerdeki bu gelişme; zatürre, zatülcenb, frengi gibi çok önemli hastalıkların tedavisinde büyük kolaylıklar sağlamıştır.

Alexander Fleming’ in stafilokokların gelişimini önlediğini tesadüfen fark ettiği ve “*Penicillium notatum*” adını verdiği kültür filtratı, daha sonra 1940’ lı yıllarda Howard Florey ve Ernst Chain’ in Oxford Üniversitesi’ nde bu kültür filtratından izole ettikleri ve ondan milyon kere daha güçlü olan “penisilin tozu” mucizesi ve bunun ardından Alman farmakolog Gerhard Domagk’ in streptokokları öldürdüğünü keşfettiği ve İsveçli bilim adamı Daniel Bovert’ in “sülfonamid” adını verdiği boya maddesi, infeksiyonlarla mücadelede bugüne kadar geliştirilecek olan pek çok antibiyotiğe ilham kaynağı olmuştur.

Pasteur’ ün “dost mikroorganizmalar” la ilgili sıradışı buluşu, antibiyotikler için tam anlamıyla bir altın çağın başlangıcı olmuştur. Penisilin ve sülfonamidlerden sonra özellikle 30-60’ lı yıllar arasında, başta daha geniş spektrumlu penisilinler olmak üzere hızla yeni antibiyotikler geliştirilmeye ve birçok infeksiyon hastalığı başarıyla tedavi edilmeye başlanmıştır.

Daha sonra, antibiyotiklerin “isim babası” olan Selman A. Walksman’ ın bulunduğu ve tüberküloz tedavisinde çığır açan “Streptomisin” de önemli bir keşif olmuştur. Antibiyotik 1942 yılında Walksman tarafından şu şekilde tanımlanmıştır: 'Mikroorganizmalar tarafından üretildiği halde, diğer mikroorganizmaları öldüren veya gelişimini engelleyen maddelere antibiyotiktir. Oysa aynı yıl, güçlü bir mikroorganizma olan *Stapylococcus aureus*, kimi uygulamalar da sonuç vermemiş, penisiline direnmiştir. Direnç, beş yıl sonra 1946’ da İngiltere’ de artık istatistiksel bir veri olarak kabul edilmiştir; “yüz hastadan on dördünde etkisiz”. Barber ve Whitehead adlı doktorlar iki sene sonra 1948’ de, bu sayıyı %53 olarak ölçmüş, antibiyotik direnci artık çözülmesi öncelikli bir sorun haline gelmiştir (Anonymus, 2007 b).

Günümüzde de devam eden ve oldukça hız kazanan teknolojik gelişmeler ve paralelinde devam eden yeni araştırmalar gelecek için büyük umutlar vermektedir. Ancak bu gelişme ve ilerlemeler yıllar öncesinden de insanlık için büyük sorunlar oluşturmuş olan hastalıkların tamamen ortadan kalkmasına engel olmadığı gibi belki de her geçen gün nedeni bilinmeyen teşhisi konulamayan pek çok yeni hastalığa da neden olmaktadır. Bilim adamları bu konuda her geçen gün yeni bir çalışma yapmaktadırlar. Sürekli kendini yenileyen, bulunan yeni ilaçlara ve tedavilere karşı direnç sağlayan bu hastalıklara karşı uygulanan tedavilerin neredeyse temelini oluşturan antibiyotikler özellikle büyük önem taşımaktadır (Anonymus, 2007 a). Bu konudaki çalışmalar hız kazanmış olmasına rağmen enfeksiyon tedavileri için yeni uygun ajanların bulunması giderek azalmaktadır. Dünya çapında, bu çalışmaları takip eden ve onay merci olan, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA), uzun bir süredir bakteriyal hastalıkların tedavisi için hiçbir yeni kimyasal ekstraktı onaylanmamıştır.

Sayıları gittikçe artan antibiyotiklerin varlığına rağmen hastalık yapıcı mikroorganizmalar tamamen mağlup edilememiştir. Mikroorganizmalar, antibiyotiğe doğal olarak dirençli olabildiği gibi, bu direnci sonradan da kazanabilmektedir.

Antibiyotiklerin çok yaygın ve denetimsiz kullanılması, eczaneden istenildiği zaman alınması, kolay ulaşılabilir olması, mikroorganizmalarda antibiyotik ve kemoteröpatiklere karşı giderek artan bir direnç gelişmesi sonucunu doğurmaktadır. İlaçların yetersiz kalması ve buna bağlı ölüm oranlarının, hastalıktan doğan sorunların artması, tedavi başarısızlığına bağlı istenmeyen durumların artması gibi birçok sorun ortaya çıkmaktadır.

İlk antibiyotiğin keşfinden sonra, yeni antibiyotik kaynakları üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. İkinci Dünya Savaşı sırasında bu araştırmalar hız kazanmıştır. Daha sonraki dönemlerde Walksman ve arkadaşlarının *Streptomyces griseus* türünden streptomisin adlı antibiyotiği bulması, antibiyotik üretim kaynağı olarak ilgiyi *Actinomycetes* grubu üzerine çekmiştir.

Özellikle topraktan ve diğer bir çok ortamdan izole edilen aktinomisetlerin ürettikleri antibiyotikler çok çeşitlidir. Ancak mağaralar gibi ekstrem ve birçok mikroorganizma içeren yaşam ortamlarından, karanlık, düşük organik madde içeren, sıcaklık açısından stabil özellikteki yerlerden izole edilen antibiyotiklerle daha etkili sonuçlar almak hedeftir.

Çalışmamızın, farklı ortamlardan izole edilen aktinomisetlerin ürettikleri etken maddeleri, etki ettikleri mikroorganizmaları tespit ederek ve antimikrobiyal aktivitenin ölçümünü yaparak, yeni ve etkili sonuçlara ulaşması, yapılacak araştırmalara alternatif olması beklenmektedir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Antibiyotiklerin Tanımı

Mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen ya da mikroorganizmaları öldüren biyolojik kaynaklı ya da sentetik olarak elde edilen maddelere “antibiyotik” denir. Genel olarak, kimyasal yapıları belli veya yapay olarak elde edilen maddelere kemoterapötik, doğal kaynaklı olanlara ise antibiyotik denmesine karşın günümüzde antibiyotiklerin çoğunun sentetik ya da semisentetik yöntemlerle elde edilmesi mümkün olduğundan, antibiyotik deyimi tedavide kullanılan kemoterapötik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılmaktadır.

Bir antibiyotiğin etkili olduğu mikroorganizma gruplarının tümü "antimikrobiyal spektrum" olarak adlandırılır. Her antibiyotiğin etki spektrumu aynı değildir. Günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğunun etki spektrumu geniştir. Fakat geniş spektrumlu antibiyotik kullanmak bazı yönlerden risklidir. Bu antibiyotikler kullanıldığında, vücudumuzda doğal olarak bulunan flora bakterilerine de etki edebilirler. Bu durum da çeşitli sorunlara neden olabilir. Bu nedenle, bir antibiyotiğin enfeksiyon etkeni olduğu düşünülen mikroorganizmaların tümüne etkili olması beklenirken, diğer mikroorganizmalara, özellikle de sözünü ettiğimiz flora bakterilerine etki etmemesi için, bu antibiyotiğin en ideal spektrumu oluşturulur. Buna da "optimal spektrum" denir.

1.1.2. Antibiyotiklerin Ekolojisi

Mikroorganizmalara denizlerin en derin kısımlarından atmosferin en yüksek tabakalarına kadar çok farklı yaşam çevrelerinde rastlamak mümkündür. Ancak mikroorganizmaların en fazla buldukları habitat, topraktır. Onların yaşamı için toprakta su, hava, mineral madde, karbon ve azot kaynakları, oksijen bulunduğu gibi ısı

da mevsimsel olarak değişir, pH ise topraktan toprağa değişiklik gösterir. Bugün mevcut en kullanışlı antibiyotikleri üreten *Penicillium*, *Streptomyces*, *Bacillus* genuslarına ait türlerin çoğunu topraktan izole etmek mümkündür (Yıldırım, 2004).

Antibiyotik üreten canlıların yaşadığı en ilgi çekici ve araştırmalarda umut verici sonuçların alındığı, genellikle karanlık, organik madde açısından fakir, sıcaklık ve nem açısından nispeten kararlı özellik gösteren yaşam ortamları; “mağaralar”, son yıllarda bu konuda yapılan çalışmaların önemli bölgesini oluşturmaktadır (Yamaç, 2004).

Doğal mağaralar içinde biyolojik açıdan en zengin olanları ise karstik yani yeraltı sularının aşındırması sonucu oluşmuş mağaralardır.

Mağaralarda antibiyotik üreten canlıların başında aktinomisetler gelir. Aktinomisetlerin ekolojik özellikleri, pek çok canlıda da olduğu gibi bazı faktörlere bağlıdır; pH, sıcaklık, C, O, N ihtiyacı, nem, ortamdaki organik madde miktarı gibi. Aktinomisetlerin yaşamsal ihtiyaçlarını karşılayan ve hatta onları dış ortam tehditlerinden koruyan mağaralarda, özellikle önemli bir *Actinomycetes* cinsi olan *Streptomyces*' lere rastlanmakta ve çalışmalar bu yönde devam etmektedir.

1.1.3. Antibiyotiklerin Ekonomisi

Louis Pasteur 1877' de ilk antibiyotik ilaç Penisilin' i keşfettiğinde "Bu ilaçla birçok hastalığın üstesinden geleceğiz. Ancak iyi huylu bakterilerin insan vücudu için hayati öneme sahip olduğunu unutmamamız gerekiyor" demiştir. Pasteur' ün 130 yıl önceki bu uyarısına rağmen, günümüzde en ufak rahatsızlık belirtisinde bile hemen antibiyotik ilaçlar kullanılmaktadır. Dünya genelinde yılda 9 milyar adet antibiyotik hap tüketilmektedir. Yıllık antibiyotik ilaç satış ise 27.6 milyar doları aşmaktadır (Anonymus, 2005 c).

Günümüzde antibiyotikler ticari olarak üretilen ilaçların en önemli ürünler grubu içindedirler ve ilaç piyasasının yaklaşık %15' ini kapsamaktadır. Tedavi etkilerinin yüksek olması ve yüksek ekonomik değere sahip olmaları nedenleriyle ticari olarak fermentasyon yolu ile üretilmektedirler. Bir çok antibiyotik kimyasal olarak sentezlenmektedir, fakat kimyasal açıdan kompleks oluşturmaları ve kimyasal sentezlerinin pahalıya mal olması bu sentezin mikrobiyal fermentasyonun yerine geçmesini önlemektedir (Çolak, 2006).

Türkiye’ de fermantasyon yolu ile antibiyotik üretimi özel sektör tarafından geliştirilmekte olup, gentamisin üretimi 2 ton/yıl ve tetrasiklin üretimi 80 ton/yıl aşmıştır. Ülkemizde fermentasyonla antibiyotik üretiminde başta gelen bir kuruluş olan, ANSA A.Ş. uzun yıllar tetrasiklin ve türevlerini ve 1980’ li yılların başında da, gentamisin üretimini gerçekleştirmiştir. Aynı tesiste Deva Holding A.Ş. 1994 yılından itibaren potasyum klavulanat üretimine başlamıştır. Diğer bir kuruluşumuz olan Eczacıbaşı Holding gentamisin üretimini 1990’ lı yılların başına kadar sürdürmüş olup, tekrar faaliyete geçmiştir. (Çolak, 2006)

Türkiye' nin yıllık ilaç tüketim giderinin yaklaşık 12 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayının, yaklaşık yüzde 20 - 25` ini antibiyotikler oluşturmaktadır. Antibiyotik tüketiminde ülkemiz kimi seneler dünya birincisidir. Ülkemizde yazılan her 10 reçeteden 7' sinde antibiyotik bulunduğu, birçok bakteride antibiyotiklere karşı direncin ülke genelinde çok yüksek olduğu bilinmektedir. Tüm ilaç tüketimi arasında antibiyotiklerin son 6 yıldır ilk sırada olduğu bilinmektedir. Bilinçsiz ve denetimsiz kullanımın göstergesi bu sayı, Avrupa ülkelerinde dördüncü, beşinci sıralardan yukarı çıkmamaktadır (Anonymus, 2007 b).

1.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler, farklı bilim dallarındaki araştırmacılar tarafından değişik özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır. Kimyacılar kimyasal yapısına, tıp uzmanları biyolojik etki spektrumu ve etki mekanizmasına, biyologlar biyolojik orjinlerine ya da biosentez yoluna göre sınıflandırmayı daha etkin bulmaktadırlar (Yıldırım, 2004).

1.2.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler, kimyasal yapılarına göre Berdy (1974) tarafından sınıflandırılmışlardır (Çizelge 1.1). Bu sınıflandırma sistemi ile oluşturulan sistem, bulunacak yeni antibiyotiklerin sisteme girilmesi kolaylığını sağlaması nedeni ile avantajlı görülmektedir (Yıldırım, 2004).

Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Berdy, 1974)

Primer Kod Numarası	Ailesi
1. KARBONHİDRAT ANTİBİYOTİKLER	
1. 1	Saf Sakkaritler
1. 2	Aminoglukozit Antibiyotikler
1. 3	Diğer N-ve C-Glukozitler
1. 4	Çeşitli Şeker Türevleri
2. MAKROSİKLİK LAKTON (LAKTAM) ANTİBİYOTİKLER	
2. 1	Makrolit Antibiyotikler
2. 2.	Polien Antibiyotikler
2. 3	Diğer Makrosiklik Lakton Antibiyotikler
2. 4	Makrolaktam Antibiyotikler
3. KİNON ve BENZER ANTİBİYOTİKLER	
3. 1	Linear Kondanse Polkisiklik Antibiyotikler
3. 2	Naftokinon Türevleri
3. 3	Benzokinon Türevleri
3. 4	Çeşitli Kinon Benzeri Bileşikler
4. AMİNOASİT, PEPTİD ANTİBİYOTİKLER	
4. 1	Aminoasit Türevleri
4. 2	Homopeptidler
4. 3	Heteromer Peptidler
4. 4	Peptolitler
4. 5	Yüksek Molekül Ağırlıklı Peptidler
5. AZOT İÇEREN HETEROSİKLİK ANTİBİYOTİKLER	
5. 1	Kondanse Olmamış (Tek)Heterosiklikler
5. 2	Kondanse Heterosiklikler
5. 3	Antibiyotik (Antitümör) Aktivesi olan Alkoloidler
6. OKSİJEN İÇEREN HETEROSİKLİK ANTİBİYOTİKLER	
6. 1	Furan Türevleri
6. 2	Piran Türevleri
6. 3	Benzopiran Türevleri
6. 4	Küçük Laktonlar
6. 5	Polieter Antibiyotikler
7. ALİSİKLİK ANTİBİYOTİKLER	
7. 1	Siklolakton Türevleri

Çizelge 1.1. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması (Devam)

7. 2	Küçük Terpenler
7. 3	Oligoterpen Antibiyotikler
8. AROMATİK ANTİBİYOTİKLER	
8. 1	Benzen Bileşikleri
8. 2	Kondanse Aromatik Bileşikler
8. 3	Non-Benzoid Aromatik Bileşikler
8. 4	Aromatik Bileşiklerin Çeşitli Türevleri
9. ALİFATİK ANTİBİYOTİKLER	
9. 1	Aklan Türevleri
9. 2	Alifatik Karboksilik Asit Türevleri
9. 3	Kükürt ya da Fosfor İçeren Alifatik Bileşikler
10. MİSELLİ ANTİBİYOTİKLER	

1.2.2. Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Önceleri, antimikrobiyal etki tiplerinin çoğunun, bir “Rekabet Antagonizmi” mekanizması ile açıklanabileceğine inanılmıştı. Oysa günümüzde, antimikrobik maddelerin etkisinde rekabet antagonizminin nadiren rol oynadığı ve en etkili antimikrobik ilaçların, mikroorganizma hücrelerinin büyük moleküllü bileşiklerinin yapımını, birleşmesini veya fonksiyonlarını bozmak suretiyle etki gösterdikleri bilinmektedir. Antibiyotikler, hücre çoğalmasında önemli fonksiyona sahip olan moleküllerin görevini inhibe ederek duyarlı mikroorganizmaların büyümesini engeller (Yıldırım, 2004).

1.2.2.1. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu

Hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotikler, kimyasal yapıları içinde bir beta laktam halkası içerdiklerinden genel olarak "beta laktamlar" olarak adlandırılırlar. Hücre duvarındaki belli proteinlere bağlanarak, hücre duvarının devamlılığı için süregelen sentezi durdururlar. Bunun sonucunda bakteri şeklini kaybederek ölür.

Hücre duvarının görevi bakteri sitoplazmasının içindeki yüksek osmotik basınca (yaklaşık 25 atmosfer) direnmek suretiyle hücrenin bütünlüğünü korumaktır. Eğer bu duvar herhangi bir nedenle zayıflayacak olursa veya oluşmazsa hücre şişer ve parçalanır. Hücre duvar sentezini bozan ilaçlar gelişmesini tamamlamış bakteriler üzerine etkisizdir, çünkü bakteri hücre duvarının oluşumu zaten tamamlanmış durumdadır (Anonymus, 2002 a).

1.2.2.2. Hücre membranı işlevinin inhibisyonu

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

Bakteri için yaşamsal maddeler, zardan pasif difüzyon ve aktif transport ile geçer. Deterjan özelliğine sahip (yüzeyde aktif) antibiyotikler ve bazı antiseptikler sitoplazma membranının permeabilitesini arttırarak sitoplazma içindeki fonksiyonel önemi bulunan nispeten ufak moleküllü bileşiklerin (aa, nükleotidler, K gibi) hücre dışına çıkmasına neden olarak bakterisid etkili olurlar. Duvar sentezi inhibitörlerinden farklı olarak gelişmesini tamamlamış mikroorganizmayada etkilidirler. Bu gruptaki antibiyotiklere örnek polimiksinler, imidazoller, kolistin, nistatin, amfoterisin-B sayılabilir (Anonymus, 2007 c).

1.2.2.3. Protein sentezinin inhibisyonu

Bu antibiyotikler, bakteride protein sentezini sağlayan ribozomların çeşitli bölgelerine bağlanarak, bakterinin büyümesi ve yaşaması için gerekli proteinlerin yapımını engellerler. Ribozomda protein sentezini bozarak etkili olan aminoglukozidler, tetrasiklinler, kloramfenikoller, makrolidler, linkosamidler, bu etkilerini sentezin çeşitli basamaklarında gösterirler (Anonymus, 2002 a; Anonymus, 2007 c).

1.2.2.4. Nükleik asit sentezinin inhibisyonu

Nükleik asitlere etki eden bu antibiyotik grubuna "kinolonlar" denir. DNA giraz adı verilen bir enzimi inhibe ederek DNA' nın üretimini engellerler. Sentez yoluyla elde edilirler. Nükleik asit sentezinin inhibisyonu üç ana yolla mümkündür :

a) RNA polimerazın inhibisyonu : Aktinomisinler ve rifampisinler DNA ya bağımlı RNA polimeraz enzimini inhibe etmek suretiyle genetik materyalden yapılan mRNA sentezini yani transkripsiyonu inhibe ederler (Anonymus, 2007 c).

b) DNA replikasyonunun inhibisyonu : Kinolonlar (nalidiksik asid, oksolinik asid ve fluorokinolonlar) bakterinin DNA giraz enzimini inhibe ederler. DNA giraz iki yönlü etki gösterir. Süpersarmal haldeki DNA' yı replikasyon sırasında açar ve sonrasında süpersarmal hale getirir (Anonymus, 2007 c).

c) Prokürsürlerin inhibisyonu : Sulfonamidler; Para Amino Benzoik Asit (PABA) analoglarıdır. Kimyasal olarak sentezlenebilirler. Ana grup P_Amino gurubu olup yan zincirlerdeki modifikasyonlarla çok çeşitli moleküller üretilebilir (Anonymus, 2007 c).

1.2.3. Biyolojik Orjinlerine Göre Sınıflandırılması

Bu sınıflandırma tipi, antibiyotiği üreten organizmaya göre düzenlenmiştir. Ancak, aynı yapı ve etki mekanizmasına sahip bazı antibiyotiklerin farklı grup mikroorganizmalar tarafından üretilmesi bir dezavantaj ve karışıklık kaynağıdır (Yıldırım, 2004).

1955' te sadece 500 antibiyotik bilinmesine rağmen, 20 yıl sonra bu sayı 5000' i bulmuştur ve bugün 13.000' den fazla doğal antibiyotik bilinmektedir. Bu bileşikleri üretenler arasında, mikroorganizmalar dışında algler, likenler, yüksek bitkiler ve çeşitli hayvan organizmaları vardır. Alçak funguslardan yaklaşık 1500 antibiyotik veya biyoaktif metabolit izole edilmiştir. Bunların 1/3' ü *Penicillium* ve *Aspergillus*

genusuna ait strainlerden izole edilmiştir. Bakterilerden yaklaşık 1200 antibiyotik *Bacillus* ve *Pseudomonas* genusu tarafından üretildiği rapor edilmiştir. En büyük üretici grup olan aktinomisetler tarafından üretilen, rapor edilmiş 6000 antibiyotik vardır. Bunların %75' i *Streptomyces* genusunun strainlerinden izole edilmiştir (Denizci, 1996).

1945 ve 1978 arasında belirlenen antibiyotiklerin % 55' inden fazlası *Streptomyces* genusu kaynaklıdır ve 5000' den fazla bileşiği içerir (Yıldırım, 2004).

1.2.3.1. Bakteriler

Bakteriler tarafından antibiyotik üretimi sınırlıdır (Çizelge 1.2). Birkaç istisna dışında, *Bacillus* genusu tarafından üretilen antibiyotikler, peptid yapıdadır. *Pseudomonas* üyeleri tarafından çok sayıda sekonder metabolit üretilmesine rağmen, sadece *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens* türlerinden büyük hacimlerde iodonin ve pycyanine üretilmektedir.

Çizelge 1.2. Bakteriler tarafından üretilen antibiyotikler (Denizci, 1996)

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

1.2.3.2. Funguslar

Toprak fungusları çok sayıda antibiyotik üretirler. Bunlar arasında en önemlisi penisilin olup, diğerleri mikofenolikasit gliotoksin, klavasin, gladiolik asit, penisillik asit, fumigasindir. Çizelge 1.3’ de funguslar tarafından üretilen bazı antibiyotikler ve sayıları verilmiştir.

Çizelge 1.3. Funguslar Tarafından Üretilen Antibiyotikler ve Sayıları (Denizci, 1996)

Funguslar	Üretilen Antibiyotik sayısı
Phycomycetes	14
Ascomycetes	299
Basidiomycetes	140
Fungi İmperfecti	315

1.2.3.3. Aktinomisetler

Aktinomisetler bakteriler içinde incelenen ancak birçok özellikleriyle funguslara da benzeyen, dallanmış filament yapısı oluşturan, başarılı büyümenin ve dallanmanın sonucunda Mycelium adı verilen kollara ayrılmış ağsı yapılar sayesinde spor oluşturabilen, gram pozitif bakterilerdir.

1875’ de Ferdinand Chon insan göz yaşı kanlında ipliksi bir organizma tespit etmiş ve ona “*Streptothrix foersteri*” olarak isimlendirmiştir. 1890’ da Gasperini ve Lanchner-Sandoval bu organizma grubuna “*actinomycetes*” ismini ilk defa vermiştir.

Aktinomisetlerin morfolojileri; organizmanın yapısına, ortamın yapısına, büyüme şartlarına, özellikle de havalanma ve büyümeyi teşvik edici ve inhibe edici maddelere bağlıdır.

Toprakta bol miktarda bulunurlar. Özellikle alkali ve nötral topraklarda bol miktarda bulunurlar, daha düşük su potansiyeline gereksinim duyarlar. Laboratuar ortamında petri kaplarında aktinomiset kolonileri diğer mikroorganizmalardan ayrılabilirler. Kompakt kuru yüzeyli koloniler oluştururlar ve genelde havasal miselle kaplanırlar. Şekerler, alkoller, organik asitler, aminoasitler ve bazı aromatik bileşikleri karbon kaynağı olarak, kazein ve nitratı azot kaynağı olarak kullanırlar.

Önemli bir aktinomiset olan *Streptomyces* cinsi antibiyotik üretim araştırmalarının odak noktasıdır (Çizelge 1.4.).

Streptomyces oldukça fazla sayıda ve çeşitte türden oluşan geniş bir cinstir. Bergey' in Mikrobiyoloji Kılavuzu' nda beş yüzün üzerinde *Streptomyces* türü tanımlanmaktadır. İplikli yapıdaki bu organizmalarda büyüme, ipliklerin uç noktalarında gerçekleşir ve buna genellikle dallanma eşlik eder. Sonuçta oluşan koloninin aldığı şekle mycelium denir. Koloni yaşlandıkça bu canlılara özgü olan, kolonin üzerine doğru oluşan çıkıntılar görülür ve bunlara sporofor adı verilir. Bu yapılar spor oluştururlar. *Streptomyces* sporlarına konidya (conidia) adı verilir ve bu sporlar *Bacillus*' ta ya da *Clostridium*' da görülen spordan farklıdır. Konidya ve sporoforlar genellikle pigment içerir ve bu pigmentler olgun kolonilere karakteristik bir renk verir. Olgun kolonilerin aynı zamanda pudramsı bir görünümü de vardır ve bu da *Streptomyces*' in tanımlanmasını oldukça kolaylaştırır (Anonymus, 2002 b).

Az sayıda suda yaşayan tür içermesine rağmen *Streptomyces* türleri esas olarak toprakta yaşar. Hatta "toprak kokusu" dediğimiz kokunun sebebi bu canlıların geosmin adı verilen metabolik ürünleridir.

Streptomyces cinsine ait türler zorunlu aeroblardır ve çok çeşitli maddelerle beslenebilirler. Ama bu grubun en önemli dikkat çekici özelliği antibiyotik üretme özelliğidir. Beş yüzün üzerinde antibiyotik maddenin *Streptomyces* tarafından üretildiği saptanmıştır ve bu durum ekonomi ve sağlık açısından bu canlıları oldukça önemli kılmaktadır. 50' den fazla *Streptomyces* antibiyotiği günümüzde tıp, veterinerlik, tarım ve endüstri alanlarında kullanılmaktadır.

Çizelge 1.4. Aktinomisetlerin Sınıflandırılması (Küster, 1963)

FAMİLYA	GENUS
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>
	<i>Nocardia</i>
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Micromonospora</i>
	<i>Thermomonospora</i>
	<i>Microbispora</i>
	<i>Streptomyces</i>
	<i>Microplysora</i>
<i>Actinoplanaceae</i>	<i>Actinoplanes</i>
	<i>Streptosporangium</i>
	<i>Microellobosporia</i>

1.3. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

Genellikle antibiyotikler tedavide kullanılmak üzere antimikrobiyal etkili madde olarak üretilirler. Antibiyotikler tıp alanının yanı sıra, hayvancılık, ziraat ve diğer alanlarda da kullanılmaktadır. Ziraat alanında enfeksiyon, zararlı ve rekabetçilerin kontrolünde, hayvancılıkta ise besicilikte ağırlık artışı için katkı maddesi olarak ve enfeksiyonlara karşı, ayrıca besinlerin muhafazasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin bu ve benzer uygulamalardaki kullanımları, önemlerini daha da arttırmaktadır (Yıldırım, 2004).

1.3.1. Antibiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı

Günümüzde antibiyotikler, klinik tedavide en önemli olan ve en çok kullanılan ilaçlar arasındadır. Temelde bu kullanımın iki amacı vardır, antimikrobiyal ajanla tedavi edilebilecek bir enfeksiyon hastalığının varlığı (tedavi amacı ile kullanım) ve antimikrobiyal ajanla gelişmesi önlenilebilecek bir enfeksiyon olasılığı (proflaksi amacı ile kullanım). Tıpta, antibiyotiklerin yetersiz olduğu kronik hastalıklar, sistemik mikozlar ve hastane kaynaklı fırsatçı türler hala mevcuttur ve yeni antibiyotiklere ihtiyaç artmaktadır (Yıldırım, 2004).

1.3.2. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı

Bazı mikroorganizmalar antibiyotik ve diğer biyoaktif maddelerin üretimi sağladıklarından ziraat alanında kullanılmaktadırlar.

Mikrobiyal teknolojiler, çeşitli tarımsal ve çevresel problemlerin çözümünde son yıllarda kayda değer başarılar elde etmesine rağmen bilimsel çevrelerde yaygın bir kabul görmemiştir. Çünkü, mikroorganizmaların faydalı etkilerini göstermelerinde bir süreklilik yoktur. Mikroorganizmaların etkin çalışmaları, ancak substratlarını metabolize etmeleri için uygun ve optimal koşullar olduğunda gerçekleşmektedir. Bu koşullardan bazıları yeterli su ve oksijen (mikroorganizmaların zorunlu aerob veya fakültatif anaerob olmalarına bağlı olarak değişebilir), pH ve buldukları ortamın sıcaklığı gibi faktörlerdir. Mikroorganizmaların, kimyasal gübreler ve pestisitlerin oluşturduğu problemleri çözmeye alternatif olmaları nedeni ile doğal çiftçilik ve organik tarımda kullanılmaları oldukça yaygınlaşmıştır.

Bu gün çok sayıda antibiyotik, tehlikeli etkileri olan bakteriyal, fungal, viral enfeksiyonlara ve böceklerin, diğer parazitlerin neden olduğu hastalıkların tedavisi ya da bu hastalıklardan korunma amacı ile tarımda kullanılmaktadır (Denizci, 1996).

1.3.3. Antibiyotiklerin Hayvancılıkta Kullanımı

Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotikler büyük ölçüde hastalıkların tedavi ve kontrolünde kullanılmaktadır. 1949 yılında kanatlılar üzerinde yapılan bir deneme sırasında tesadüfen deneme hayvanlarında büyüme artışının gözlenmesi antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında büyütme faktörü olarak kullanılmasını başlatmıştır.

Antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması ile; büyüme ve yemden yararlanmayı arttırmak, hastalıkları önlemek, bazı hastalıklara karşı koruyucu etki oluşturmak, toksinleri engellemek, besin maddelerinin bağırsaklardan emilimini arttırmak amaçlanmaktadır .

Son yıllarda antibiyotiklerin bazı dezavantajlarından dolayı kullanımlarına sınırlamalar getirilmiştir. Antibiyotik ve kemoterapötiklerin özellikle düşük dozlarda kullanımı bakterilerde direnç gelişimine yol açabilmektedir. Ayrıca insan tüketimine

sunulan hayvansal ürünlerde sağlık açısından risk oluşturmaktadır. Yine antibiyotik kullanımı sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmalarla beraber faydalı mikroorganizmaların da ölümüne neden olmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için, yem katkı maddesi olarak kullanılan antibiyotik ve kemoterapötiklerin tedavi amaçlı kullanılmayan ve bağırsaktan emilmeyen özellikte olmasına dikkat edilmesi önerilmektedir. Bununla birlikte antibiyotiklerin kullanımlarındaki çekinceler alternatif uygulamaların araştırılmasına yol açmıştır (Karademir ve Karademir, 2003).

1.4. Antibiyotiklere Karşı Mikrobiyal Dirençlilik

Patojen mikroorganizma veya suşun, kemoterapotik ilacın kullanıldığı doz aralığında, serumda meydana getirdiği konsantrasyon düzeyinde ilaç tarafından etkilenmemesine Rezistant (direnç) denir (Anonymus, 2007 c). Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları Çizelge 1.5’ de sunulmaktadır.

Çizelge 1.5. Antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları (Arda, 2000)

Antibiyotikler	Antibakteriyel etki	Dirençlilik mekanizması
Betalaktamlar: Hücre duvarı sentezine etkili	Hücre duvarı sentezi inhibisyonu	B-laktam halkasının enzimatik hidrolizi (B-laktamase)
Aminoglikozidler: 30 S Ribozomal alt üniteye etkili	Değişik sentezlerin inhibisyonu	Enzim sentezi asetiltransferaz, fosfotransferaz, adeniltransferaz
Kloramfenikol: 50 S Ribozomal alt üniteye etkili	Değişik sentezlerin inhibisyonu	Asetilaz enzimi
Tetrasiklin: 30 S Ribozomal alt üniteye etkili	Değişik sentezlerin inhibisyonu	Antibiyotiklerin aktif atılımı
Makrolitler: 50 S Ribozomal alt üniteye etkili	Değişik sentezlerin inhibisyonu	rRNA’ nın enzimatik metilasyonu, enzimatik inaktivasyonu
Sulfonamidler: Dihidropteroate sentetaz	Folik asit sentezinin inhibisyonu	Hedef enzimin yapılmasında değişim
Trimethoprime: Dihidrofolt redüktaz	Folik asit sentezinin inhibisyonu	Hedef enzimin yapılmasında değişim

1.4.1. Doğal Dirençlilik

Temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması vardır. Bu duruma örnek olarak hücre duvarı olmayan Mycoplasmaların b-laktam antibiyotiklere olan direncidir (Anonymus, 2007 c).

1.4.2. Kazanılmış Dirençlilik

Bu direnç kromozomlardaki mutasyon, plazmit veya transpozon aracılığı ile olmaktadır (Anonymus, 2003 a).

1.4.2.1. Mutasyona bağlı kazanılmış direnç

Bu şekilde rezistanta yol açan mutasyon olayı bakterinin kemoterapötik ilaç ile temasına bağlı değildir (İlacın nadiren mutajenik özelliği olması hali hariç) ve arada bir neden sonuç ilişkisi bulunmaz. Mutasyon bakteride genellikle spontan olarak oluşmaktadır. İlaçla temasta olan ve olmayan iki bakteri popülasyonunda mutasyon sıklığının genellikle aynı olduğunu gösteren gözlemler vardır. Kromozomal mutasyonla oluşan kazanılmış direnç bir aşamada veya çok aşamada oluşabilir (Anonymus, 2007 c; Öztürk, 2002).

Bir aşamalı mutasyonda, antibakteriyel ilaçla bir veya birkaç temastan sonra birden ve ileri derecede bir rezistant oluşur. Buna streptomisin tipi rezistant adı da verilir. Streptomisin ile tedaviye başladıktan 3-4 gün gibi kısa bir süre sonra, üriner kanalda iltihaba neden olan bazı bakterilerin, streptomisine karşı ileri derecede rezistant hale geldiği saptanmıştır. Rifampin' e karşı *E. coli* ve *S. aureus'* ta bu tipte bir rezistant oluşur (Anonymus, 2007 c; Öztürk, 2002).

Çok aşamalı mutasyonda, rezistant yavaş olarak, derecesi gittikçe artan bir biçimde oluşur. Buna penisilin tipi rezistant da denir. Bu tipteki rezistantın gelişmesi için DNA molekülünde farklı yerlerdeki genlerde birbirini izleyen (ardışık) bir dizi

mutasyon olayının meydana gelmesi gerekmektedir. Penisilinlere ve tetrasiklinlere karşı bu tip rezistant oluşabilir (Anonymus, 2007 c; Öztürk, 2002).

1.4.2.2. Direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç (Plazmid veya transpozon aracılı)

Plazmidler, ekstrakromozomal genetik elemanlardır. Sirküler yapıda çift zincirli DNA molekülleridir. Plazmidlerin molekül ağırlığı 1-200 milyon dalton arasında değişir. Geçimlilik durumu uygunsuz bir hücrede birden fazla tipte plazmid bulunabilir. Direnç genleri taşıyan plazmidlere rezistant plazmidleri (R plazmidleri) adı verilir (Anonymus, 2007 c; Öztürk, 2002).

Transpozonlar, rezistantın taşınmasında rol oynayan diğer bir özel DNA parçasıdır. Hem kromozomal DNA üzerine, hem de plazmidler üzerine sokulabilen (rekombine olan) daha ufak ve hareketli DNA parçacıklarıdır (Anonymus, 2007 c; Öztürk, 2002).

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

1.5. Mağara Ekosistemi ve Bileşenleri

Mağaralar, organik madde açısından fakir, sıcaklık açısından nispeten düşük ve stabil özellik gösteren yaşam ortamlarıdır. Bu tanımın içine yapay ve doğal mağaralar girmektedir. İnsanların barınak, sığınak, mezar, ibadet yeri ve hatta madencilik için açtığı oyuklar yapay mağaralardır. Bunun yanında, doğal etkenlerle ana kayanın aşınması sonucunda oluşan boşluklara ise doğal mağaralar denir. Doğal mağaralar

içinde biyolojik açıdan en zengin olanları ise karstik yani yeraltı sularının aşındırması sonucu oluşmuş mağaralardır (Anonymus, 2005 b)

Mağaraların sunduğu bu ekolojik faktörler, bu ortamlarda bulunan mikroorganizma çeşitliliğini de belirlemektedir. Mağaralar, ancak ve sadece sahip olduğu koşullara tolerans gösteren ya da adapte olmuş canlı türlerinin yaşamasına olanak tanır. Mağarada yaşamını devam ettirme yeteneğine sahip olan canlı grupları, “biyospeoloji” adı altında bir alt disiplin oluşumuna neden olacak sayı ve çeşittir (Yamaç, 2003).

Ekosistem tanımı içerisinde canlıların kendi aralarında ve cansız çevreleriyle kurdukları ilişkiler girer. Yer üstündeki bütün ekosistemlerde olduğu gibi mağara ekosistemlerinde de üreticiler, tüketiciler, ayrıştırıcılar ve parazitler gibi temel basamaklar bulunur. Bu basamaklar arasında sürekli madde ve enerji dönüşümleri gerçekleşir (Yamaç, 2003).

Maddenin ve enerjinin dönüşüm halinde bulunduğu ekosistemlerin sürekliliği için kaynaklara, yani organik ve inorganik maddelere, ihtiyacı vardır. Bu noktada ekosistemler ikiye ayrılır: Sürekliliği için başka ekosistemlere ihtiyaç duyan allokton ekosistemler ve kendi kaynaklarıyla sürekliliğini sağlayabilen otokton ekosistemler denir (Yamaç, 2003).

Bugün keşfedilmiş mağaraların çoğu allokton tiptedir çünkü bu tip mağaralarda canlılık ancak dışarıdan gelecek organik ve inorganik maddelerin varlığına bağlıdır. Somut birkaç örnek vermek gerekirse hayvan gübreleri, ölü bitki organları, ölü hayvanlar ve yüzey suları ile taşınan maddeler allokton mağara ekosistemleri için besin kaynağını oluştururlar.

Romanya’ daki Movable Mağarası yaklaşık 5,5 milyon yıldır izole olduğunu, dolayısıyla o dönemden günümüze gelen ve çok az değişim gösteren canlılar olduğunu ortaya koymuştur. Otokton tipteki bu mağaradaki en önemli üretici basamak kemoototrofik (besinini inorganik kimyasal bileşiklerden üreten) bakterilerdir. Bu bakterilerin yapısındaki karbon ve azot işaretlenerek izlendiğinde, bunların mağara içindeki canlıların beslenme ilişkileri içinde temel bir rolü oldukları yani ekosistemin üreticileri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, bu mağaradaki kemolitoototrofik bakterilerden elde edilen veriler Mars’ taki olası yaşam alternatiflerini değerlendirme amacı ile kullanılmaktadır. Eldeki bulgular ışığında, Movable mağarasında olduğu gibi,

toprak altında sıvı formda suyun bulunduğu ortamlarda, Mars' ta yaşamın olabileceğine ilişkin hipotez giderek destek bulmaktadır. (Skindrud, 1996, Young, 1996).

M.Ö. 30,000 yıllarına doğru mağara duvarlarında resimler belirmeğe başlamıştır. Bu «duvar sanatı» Dordogne' daki Lascaux Mağarası' nda, Gonzelez ve arkadaşlarının (1999) İspanya' daki Altamira Mağarası' nda , Herold ve arkadaşlarının (2005) İtalya daki 5000 yıllık antik Grotta dei Cervi mağarasında, buldukları çok güzel duvar resimleri (freskler) sayesinde ün kazandı. Bu duvar resimlerinde hayvanlar görülür: mamutlar, bizonlar, aslan gibi yırtıcı hayvanlar v.b. Mağara insanların resim yapmakta kullandıkları malzeme de çok çeşitliydi: aşiboyası, limonit, manganez oksitleri, tebeşir. Bilim adamları mağara bakterilerini özellikle de binlerce yıllık duvar resimlerine zarar vermeleri nedeniyle araştırmıştır. Texas Üniversitesi jeologları şimdi kükürt bakterilerinde yepyeni bir özellik keşfetmişlerdir. Kükürt bakterileri özümleme sonucunda kireçtaşını alçıya dönüştürebilen sülfürik asit üretmektedirler. Alçı suda çözüldüğü için de suyla yıkandığında zamanla boşluklar oluşmaktadır. Anette Summers Engel yönetiminde çalışan ekip, bakterilerin etkisiyle, Amerika' nın Wyoming eyaletindeki Lower-Kane mağarası gibi büyük mağaraların oluşabileceğine inanmaktadırlar. Bilim adamları bugüne dek sülfürik asidin kükürt bakterileri olmadan oluştuğunu sanıyorlardı. Doğal kaynaklarda kokmuş yumurta kokusuyla kendisini belli eden hidrosülfürik asit yüzeye çıktığında havadaki oksijenle reaksiyona girerek sülfürik asit üretebilir. Bu asit kayanın içindeki kalsiyum karbonatla (kireç) tepki göstererek kalsiyum sülfata (alçı) dönüştürür. Ve böylece kalsiyum sülfat suda çözülür ve zamanla büyüyen küçük boşluklar oluşur. Anette Summers Engel , Lower Kane mağarasında büyük boşlukları oluşturmaya yetecek kadar hidrosülfürik asidin açığa çıkmadığını fark etmiş, ama bunun yerine mağaranın zemininde bakterilerden oluşan beyaz lekeler bulmuştur. Bu bakteriler enerji kazanmak için diğer organizmaların karbondioksitten yararlandıkları gibi hidrosülfürik asitten yararlandığı ve bu şekilde artı ürün olarak büyük mağara yapısından sorumlu olan sülfürik asitin oluştuğu belirtilmiştir (Anonymus, 2005 a).

Araştırmalar aktinomisetlerin mağara mineral depolarının oluşumunda rol oynayabilecekleri görüşünü desteklemektedir. Canaveras ve arkadaşların (1999) yaptığı araştırmada mağaralardan izole edilen *Streptomyces* izolatlarının laboratuvar ortamında kalsiyum karbonatı çöktürme özelliğinde oldukları tespit etmişlerdir.

Mağaralardaki mikroorganizmaların, kireçtaşı ve kalsit oluşumlarının yüzeyindeki su filmlerinde mikroorganizma yoğunlaşma merkezi oluşturarak ya da enzim üretimi yolu ile sarkıt, dikit, perde, mağara incisi gibi oluşumların oluşmasında ve parçalanmasında rol oynadıklarını tespit edilmiştir. (Laiz et al., 2000; Groth et al., 2001; Northup et al., 2000).

Ülkemizde mağara biyolojisi konusundaki çalışmaların azlığı nedeni ile mağara ekosistemi ve onun dinamikleri hakkında da bilgi azdır. Ülkemizde karstik arazilerin bol olarak bulunması nedeni ile, zengin bir mağara biotasının olduğu düşünülmektedir (Yamaç, 2003).

Ülkemizde yapılan ilk biyospeolojik çalışmalar arasında, 1926 yılında jeolog Abdullah Bey ile bazı yabancı araştırmacıların Yarımburgaz mağarasında yaptıkları çalışma görülmektedir. Weirather tarafından 1922 yılında Toroslar' da keşfedilen bazı mağaraların, 1930' lu yıllarda Jeannel tarafından araştırılması; 1954 yılında Jeannel tarafından ülkemizden bilim dünyasına iki yeni cins (*Coiffaitiella* ve *Pisidiella*) ve 1955 yılında bir yeni tür (*Bithyniella* spp.) kazandırılması, konu ile ilgili çalışmalarda önemli adımlardır. Nitekim 1968-1973 yılları arasındaki çalışmaları ile Brignoli, çok sayıda yeni tür; 1973-1990 yılları arasındaki çalışmaları ile Casale, Giachino, Valkiati gibi İtalyan araştırmacılar Orta ve Güney Anadolu' dan çok sayıda yeni cins ve tür; 1987 yılında Amsterdam biyospeoloji grubu, Konya, İzmir, Muğla mağaralarında yaptıkları çalışma sonucunda 3 yeni tür tanımlamışlardır (Yamaç, 2003).

1.6. Mağara Mikrobiyolojisi

Mağaralarda bulunan bakteriler, kalıcı ya da geçici özellikte olabilirler. Çeşitli mağaralara ait mikrobiota Çizelge 1.6' de sunulmuştur.

Geçici olan mikroorganizmaların doğal habitatı mağaralar değildir. Bu mikroorganizmalar rüzgar ve yüzey sularının sürüklenmesi gibi çeşitli etkenler nedeni ile ve ayrıca böcekler, yarasalar ve insanlar gibi taşıyıcılar üzerinde mağaralara ulaşabilirler. Bu grup mikroorganizmalar arasında funguslar daha dikkat çekici durumdadır. Çeşitli bakteri türleri de mağaralarda geçici olarak bulunabilir. Ancak,

bakterilerin mağara mikroorganizmaları arasında daha çok doğal flora üyesi olarak bulunduğu vurgulanmaktadır (Northup, 1997).

Mağaraları doğal yaşam ortamı olarak kullanan kalıcı mikroorganizmalar ise, yaşamlarını sadece mağara içindeki kaynaklara bağlı olarak sürdürürler. Bu canlılardan bazılarının sahip olduğu özellikler, mağara ortamında yaşamını sürdürmesine olanak tanıyabilir. Örneğin, kemosentetik bakteriler ile fungusların çoğu, kaza eseri buldukları mağara ortamının çevresel koşullarına kolayca adapte olabilirler. Ancak, diğer bazı canlılar, mağara ortamında yaşamlarını uzun süre devam ettiremezler. Yeşil bitkiler ve hayvanların çok büyük kısmı bu özellikteki canlılardır. Bu tür mağaralarda alg, protozoa, fungus, bakteriler gibi organizmalar bulunmaktadır. Fungal sporları ve bakteriler kireçtaşı ve kalsit oluşumların yüzeyindeki su filmde de bol miktarda bulunurlar (Groth et al., 2001; Northup et al., 2000).

Mağaralarda yer alan bakterilerin koloni formunda olabildikleri de görülmektedir. Mağara tavan ve duvarları üzerindeki nemli alanlarda kümelenmiş beyaz noktalar biçiminde görülen koloniler genellikle aktinomiset kolonileridir. Bu kolonilerin çapı 1 – 10 mm kadar olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada doğrudan kolonilerden izolasyon yolu ile elde edilen aktinomiset türleri arasında *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Streptomyces* ve *Rhodococcus* cinslerine ait örnekler sayılmaktadır (Groth et al., 1999 b). Bu bakterilerin, fungusların ürettiği küf kokusundan farklı olarak, mağaraların sahip olduğu ayırdedici kokuyu ürettikleri bilinmektedir (Northup, 1997).

Çizelge 1.6. Çeşitli mağaralara ait mikrobiota (Yamaç, 2003)

Takson	Tür sayısı	Mağara / Ülke	Literatür
Myxomycota	3	Rio Camuy /Porto Rico	Nieves-Rivera, 2003
	6	Sittons / USA	Reeves et al. , 2000
Oomycotina	6	Rio Camuy /Porto Rico	Nieves-Rivera, 2003
Zygomycotina	3	Rio Camuy /Porto Rico	Nieves-Rivera, 2003
	2	Kingston Saltpeter / USA	Reeves et al. , 2000
Ascomycotina	2	Rio Camuy /Porto Rico	Nieves-Rivera, 2003
	1	Ramioul / Belçika	Malloch and Hubart, 1987
Basidiomycotina	7	Rio Camuy /Porto Rico	Nieves-Rivera, 2003
	4	Rio Martino / USA	Anonymus, 2003
	1	Ayvaini / Türkiye	Yayınlanmamış Veri
Deuteromycotina	32	Rio Camuy /Porto Rico	Nieves-Rivera, 2003

1.7. Mağara Mikroflorasının Korunması

Doğal mağara biotasının korunması için, insan kaynaklı mikrobiyal etkilerin engellenmesi gerekmektedir. Bu durum, özellikle ilk kez girilecek mağaralar için önemlidir. Bu amaçla keşif ekibi tarafından, mağaralar üzerine insanların etkisini sınırlayacak önlemler alınmalıdır. Mağaracılık etiğinde de yer alan bazı önlemler ise, keşif, bilimsel, spor amaçlı tüm mağara girişlerinde geçerli olmalıdır (Yamaç, 2004).

Mağaralarda yer alan mikroorganizmalar arasında besin maddeleri için yoğun rekabet söz konusudur ve bu özellikleri nedeni ile antibiyotik üretme potansiyelleri, biyolojik mücadele amacı ile kullanılma potansiyeline sahip fungus türlerinin elde edilmesi, otokton ekosistemlerde yer alan kemolitototrofik bakterilerden elde edilen veriler, dünya dışı yaşam olasılıkları açısından önemi, özellikle otokton ekosisteme sahip Movable mağarasının “Mars gezegenine analog bir yaşam ortamı” olarak değerlendirilmesi (Boston et al., 1992), sonraki çalışmalar için oldukça ümit verici çalışmaların yapılması, mağara mikroorganizmaları üzerindeki çalışmalar, sarkıt, dikit,

perde, mağara incisi gibi oluşumların oluşma sürecine katkıları nedeni ile doğal yaşam ortamı olarak mağaralarda bulunan mikroorganizmalar önemlidir.

Northup ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir deneme ile mağarada insan varlığının zararları örneklenmiştir. Lechuguilla mağarasında gerçekleştirilen deneme, ilginç sonuçlar vermiştir. Bu mağarada belirli noktalara idrar ilavesinin topraktaki heterotrof bakteri ve fungus sayısını 100 – 1000 kat arttırdığı belirlenmiştir. İlave edilen ürenin 1 ay kadar ortamda kalabildiği ve daha sonra aynı noktaya yeni bir idrar ilavesinin mikroorganizmaların büyümesini daha hızlı ve etkili biçimde arttırdığı, bu nedenlerle toprak yapısının değiştiği de bulgular arasındadır (Northup et al., 2000). Bu sonuçlar, idrar ilavesinin topraktaki mikrobiyal popülasyonu ciddi biçimde değiştirdiğini ve oluşan değişimin üre ve yan ürünleri ortamdaki tamamen uzaklaştıktan sonra bile kalıcı olabildiğini göstermektedir (Yamaç, 2004).

Çalışmamız için toplam 19 doğal mağara tercih edilmiş, mikrofloranın korunması için gerekli önlemler alınmıştır. İzolasyon titizlikle gerçekleştirilmiş ve çalışma için uygun metotlar takip edilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan test mikroorganizmaları

Çalışmalarda test mikroorganizması olarak 4 bakteri, 2 maya ve 4 küf türü kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Kullanılan mikroorganizmalardan *Bacillus cereus* Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü' den, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi' nden, *Fusarium culmorum*, *Fusarium moniliforme* Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi' nden, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* United States Department of Agricultural Research Service, Peoria, Illinois-USA adresinden temin edilmiştir.

Çeşitli antibiyotiklere karşı dirençliliği bilinen ve çalışmalarda kullanılan Klinik isolatlar (Çizelge 2.2), MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (Vancomycin Resistant *Enterobacter faecium*), Klinik Dirençli *Acinetobacter baumannii* Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi' nden temin edilmiştir.

Çizelge 2.1. İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları

Sıra No	Koleksiyon ve Standart Suş No	Mikroorganizma Türü	Suş Kaynağı
1	ATCC 11778	<i>Bacillus cereus</i>	Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü
2	ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
3	ATCC 2522	<i>Escherichia coli</i>	
4	NRRL B-771	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	United States Department of Agricultural Research Service, Peoria, Illinois-USA
5	NRRL Y-12983	<i>Candida albicans</i>	
6	NRRL Y-552	<i>Geotrichum candidum</i>	
7	NRRL 1957	<i>Aspergillus flavus</i>	
8	NRRL 465	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
9	Doğal İzolat	<i>Fusarium culmorum</i>	
10	Doğal İzolat	<i>Fusarium moniliforme</i>	

Çizelge 2.2. İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan klinik izolatlar

Sıra No	Mikroorganizma Türü	Suş Kaynağı
1	MRSA (Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)	Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
2	VRE (Vancomycin Resistant <i>Enterobacter faecium</i>)	
3	Klinik Dirençli <i>Acinetobacter baumannii</i>	

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri, içeriği distile suda çözülüp, gerektiğinde pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda, 1.1 atmosfer basınç ve 121 °C sıcaklıkta, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

Besiyeri 1: Brain Heart Infusion Broth (Merck)

Ticari besiyerinden 37 g/l oranında tartılarak distile suda çözülmüştür. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin aktiveleştirilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Nutrient Agar (Merck)

Ticari besiyerinden 20 g/l oranında tartılarak distile suda çözülmüştür. Bu besiyeri bakteri kültürlerinin stok tüp olarak muhafazasında kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Malt Extract Broth (Merck)

Ticari besiyerinden 17 g/l oranında tartılarak distile suda çözülmüştür. Bu besiyeri maya kültürlerinin aktiveleştirilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 4: Sabouraud Dextrose Agar (Difco)

Ticari besiyerinden 65 g/l oranında tartılarak distile suda çözülmüştür. Maya ve küf kültürlerinin antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır.

Besiyeri 5: Mueller Hinton Broth (Merck)

Ticari besiyerinden 21 g/l oranında tartılarak distile suda çözülmüştür. Biyootografi yöntemi için bakteri kültürlerinin aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 6: Mueller Hinton Agar (Fluka)

Ticari besiyerinden 34 g/l oranında tartılarak distile suda çözülmüştür. Bakteri kültürlerinin antimikrobiyal aktivite testlerinde ve Biyootografi çalışmasında bakteri ekimi için kullanılmıştır.

Besiyeri 7: Yumuşak Agar

Mueller Hinton Broth	21.00 g.
Agar	7,50 g
Distile su	1000 ml

Biyootografi yönteminde bakteri kültürlerinin inokülasyonu için kullanılmıştır.

Besiyeri 8: İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)

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

*** İz element çözeltisi**

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

Bu besiyeri aktinomiset kültürlerinin geliştirilmesi ve için kullanılmıştır

Besiyeri 9: Yeast Extract - Malt Extract Agar (ISP 2)

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

Bu besiyeri aktinomiset kültürlerinin antimikrobiyal aktivite testlerinde ve stok tüp kültür olarak muhafazasında kullanılmıştır.

Besiyeri 10: Kanlı Agar

Beef Extract	10.00 g
Pepton	10.00 g
Sodyum klorür	5.00 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7,3

Ticari olarak alınan besiyeri bileşimine % 5 kan ilavesi ile hazırlanmıştır. Bu besiyeri klinik izolat (bakteri) kültürlerinin antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır.

Besiyeri 11: Gelişme Ortamı -1

Soy Meal	20.00 g
Glukoz	30.00 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
NaCl	0,50 g
CaCO ₃	6.00 g
pH	6,8

Aktinomiset kültürlerini geliştirerek, Fermantasyon ortamına (Gelişme Ortamı - 2) inokulasyon için kullanılmıştır (Gesheva et al. , 2005).

Besiyeri 12: Fermantasyon Ortamı

Soy Meal	5.00	g
Glukoz	25.00	g
K ₂ HPO ₄	0,60	g
NaCl	5.00	g
CaCO ₃	1.00	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.00	g
pH	6,8	

Aktinomiset kültürlerini geliştirmek ve antibiyotik üretim çalışmasında kullanılmıştır (Gesheva et al. , 2005).

Besiyeri 13: Yeast Extract - Malt Extract Broth

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

Besiyeri 14: Nişasta Kazein Agar

Çözünür nişasta	10.00	g
Vitamin free casein (Difco)	0.30	g
KNO ₃	2.00	g
NaCl	2.00	g
K ₂ HPO ₄	2.00	g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.05	g
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0.01	g
CaCO ₃	0.02	g
Agar	18.00	g
Distile su	1000	ml
pH	7.2	

Besiyeri 15: Oatmeal Agar (ISP 3)

Yulaf unu (Oat Meal)	20.00 g
Shirling and Gottlieb iz element çözeltisi	1.00 ml
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml

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

Besiyeri 16: Pepton – yeast extract – iron agar (ISP 6)

Bacto Pepton	15.00 g
Protease Pepton	5.00 g
Yeast Extract	1.00 g
Ferrik Amonyum Sitrat	0.50 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
Na Tiyosülfat	0.08 g
Agar	15.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0 - 7.2

Besiyeri 17: Modifiye Bennett' s Agar

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

Besiyeri 18: DNase test agar

DNase Agar	39.00 g
Distile su	1000 ml
pH	7.3

Besiyeri 19: Nitrat Redüksiyon Ortamı

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

Besiyeri 20: Üre Redüksiyon Ortamı

KH ₂ PO ₄	9.100 g
Na ₂ HPO ₄	9.50 g
Fenol kırmızısı	0.01 g
Yeast Extract	0.10 g
Distile su	1000 ml
Üre solüsyonu (% 15; g/ml)	133.0 ml
pH	7.2

Besiyeri 21: Nütrient Jelatin Ortamı

Nütrient Broth	13.00 g
Jelatin	40.00 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri 22: Karbon Kaynağı Kullanım Ortamı

Karbon kaynağı	1.00 ya da	10.00	g
(NH ₄) ₂ SO ₄		2.64	g
KH ₂ PO ₄		2.38	g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O		5.65	g
MgSO ₄ .7H ₂ O		1.00	g
Pridham and Gottlieb iz element çözeltisi*		1.00	ml
Agar		15.00	g
Distile su		1000	ml
pH		6.8 - 7.0	

*İz element çözeltisi (27)

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

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

Besiyeri 23: Azot Kaynağı Kullanım Ortamı

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

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

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Diğer Kimyasallar

Çizelge 2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Diğer Kimyasallar

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	Kullanım Amacı
Cycloheximide	İzolasyon
Rifampicin	
Kloramfenikol	Antimikrobiyal aktivite – Pozitif Kontrol
Mikostatin	
Erytromycin (E 15)	
Ceftrizoxime (ZOX 30)	
Gentamycin (CN 30)	
Vancomycin (VA 30)	
Tween 80 % 0.1 lik (Merck)	Antimikrobiyal aktivite denemesinde küf kültürlerinin sayımında seyreltme
Mc Farland (No:0.5) bulanıklık standardı - % 1.175 BaCl ₂ (0,5 ml) - (0,36 N) H ₂ SO ₄ (99,5 ml)	Antimikrobiyal aktivite denemesinde bakteri ve maya kültürlerinin, Biyootografi yönteminde bakteri kültürlerinin standart bulanıklılığının ayarlanması
Fizyolojik Tuzlu Su (% 0.9)	Bakteri kültürlerinin Mc Farland (0.5)' e göre seyreltilmesi
0,1 N NaOH	Besiyeri pH'nın ayarlanması
0,1 N HCl	
Fenol çözeltisi (%5) (Merck)	Glukoz tayini
H ₂ SO ₄ (Sülfürik Asit) % 40 (Merck)	Glukoz tayini ve İnce tabaka kromatografisinde plaklardaki spotların renklendirilmesi
TTC çözeltisi - tetrazolyumtriklor ,125 mg - %96 lık etanol, 50 ml	Biyootografi yönteminde ve MIC çalışmalarında bakteri gelişiminin kırmızı renkle gözlenmesi

Çizelge 2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Diğer Kimyasallar (Devam)

Etanol (Merck)	Antimikrobiyal etkili maddenin izolasyonunda Solvent ekstraksiyonu seçimi ve İTK çalışması
Kloroform (Merck)	
Etil asetat (Rieder de Haen)	
Diklorometan (Fluka)	
Dietil Eter (Merck)	
Heptan (Merck)	
Aseton (Merck)	
Metanol (Merck)	
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)	Antimikrobiyal etkili maddenin belirli konsantrasyonda çözülmesi
Hazır İTK plakları (Camag) (20x20 cm, 0.2 mm)	Biyootografi yönteminde kullanılmak üzere aktif ekstrelerin spotlanarak geliştirilmesi
¼ ringer çözeltisi (Merck)	Nümerik taksonomi
% 3 (v/v) lük Trikloroasetik asit (TCA)	
İyot solüsyonu	
1 M HCl	
Griess-Iloslav Reaktif A (0.8 ml sülfanilik asit, 100 ml 5 N Asetik asitte çözülür)	
Griess-Iloslav Reaktif B (0.6 ml dimetil- ∞ - naftilamin, 100 ml 5 N Asetik asitte çözülür)	
Kurşun asetat (Merck)	
Fenol red (Merck)	

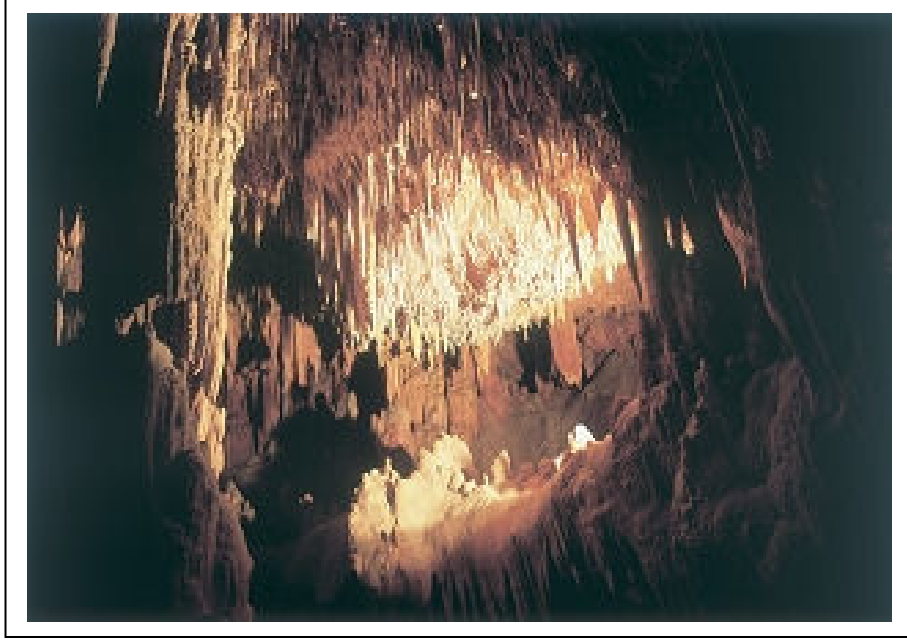
2.2. METOD

Bu çalışmanın mağaralardan örneklenmesi *Streptomyces* cinsi bakterilerin izolasyonu ve numerik taksonomi kısımları, TBAG-2338 (103T149) kodlu ve isimli TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Projesi kapsamında, proje çalışanları tarafından yapılmıştır (Yamaç ve arkadaşları, 2007).

2.2.1. Örneklenen Mağaraların Seçilmesi

Bu çalışmada *Streptomyces* cinsi bakterilerin izolasyonu için örnekleme yapılacak mağaralar MTA tarafından hazırlanan Beyşehir ve Derebucak İlçeleri (Nazik ve ark., 1993), Güney Marmara Bölgesi (Nazik ve ark., 1997) ve Orta Sakarya Havzası (Nazik ve ark., 2001) gibi bölgelerle ilgili literatürlerin incelenmesi, TMB ve ESMAD ilgili birimlerinden elde edilen bilgiler ışığında seçilmiştir (Çizelge 2.4.). Örnekleme yapılacak mağaralara girilmesi ve örnekleme çalışmaları, MTA Karst ve Mağara Etütleri Birimi danışmanlığında, ESMAD mağara araştırma etkinlikleri kapsamında ve dernek üyeleri tarafından gerçekleştirilmiştir. *Streptomyces* cinsi bakterilerin izolasyonu için örnekleme yapılmış olan mağaraların isim, lokalite ve kaydedilen bazı GPS koordinatları Çizelge 2.5.' de sunulmuştur.

Çalışma kapsamında, Türkiye' nin Ankara, Antalya, Bartın, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Eskişehir, İzmir, Karabük ve Konya gibi illerinde bulunan, yatay uzanımlı-dikey uzanımlı, aktif-yarı aktif-pasif özellikli, en uzununu 6052 metre ve en derini 228 metre olan toplam 19 mağaradan örnekleme yapılmıştır. Örnekleme yapılan mağaralardan bazılarının ait fotoğraflar Şekil 2.1., 2.2., 2.3. ve 2.4.' te sunulmuştur.



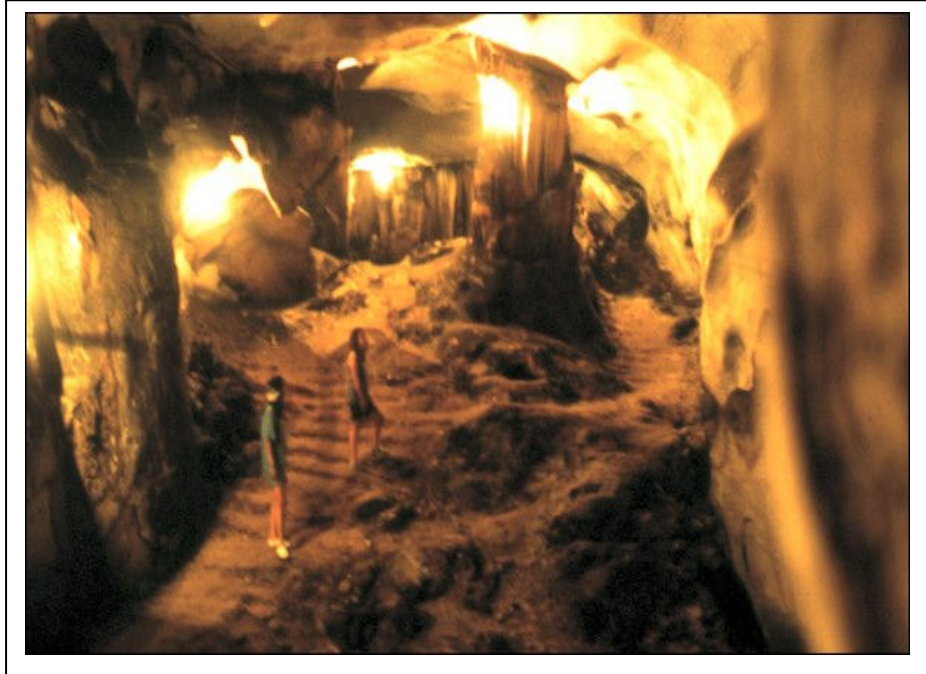
Şekil 2.1. Dim (Gavurini) Mağarası (Antalya)



Şekil 2.2. Bulak (Mencilis) Mağarası (Karabük)



Şekil 2.3. Sipahiler Mağarası (Amasra – Bartın)



Şekil 2.4. Yalan Dünya Mağarası (Alanya – Antalya)

Çizelge 2.4. İzolasyon için örnekleme yapılmış olan mağaraların genel özellikleri (Nazik ve ark. , 1993, 1997, 2001' den)

No	Mağaranın Adı	Bulunduğu Yer			Toplam Uzunluk (m)	Derinlik (± m)	Uzunum	Hidrolojik Durum	Hidrolojik Konum
		İli	İlçesi	Köyü					
1	Dim	Antalya	Alanya		360	-17	Y	A - YA	G
2	Yalan Dünya	Antalya	Alanya	Gazipaşa	250	-27	Y	F	G
3	Mayıslar	Eskişehir	Sarıcakaya	Laçın	356	-102, +5	D - YD	F	Dü
4	Beyyayla	Eskişehir	Sarıcakaya	Beyyayla	438	-26. 5	Y	YA	Dü - K
5	Manasır	Eskişehir	Mihalıççık	Sorkun	368	-368	D	F	Dü
6	Tilkiler	Antalya	Manavgat	Oymapınar	6000	-50, +20	Y	A - YA	G - K
7	Tozman	Eskişehir	Mihalgazi	Tozman	770	-70	D - Y	A - YA	Dü
8	Mencilis	Karabük	Safranbolu	Bulak	6052		YD	A - YA	Dü
9	Sipahiler	Bartın	Amasra	Sipahiler			Y	F	K
10	Oylat	Bursa	İnegöl	Hilmiye	665	126	Y	F	Dü
11	Peynirkuyu	Balıkesir	Manyas	Peynirkuyu	332	-40	Y	YA	Dü
12	Mürtüvetler	Balıkesir	Manyas	Mürtüvetler	204	3	Y	F	K
13	Mürtüvetler Suçkkanı	Balıkesir	Manyas	Mürtüvetler	73	-8. 5	Y	F	G - K
14	Ayvack Düzüdeni	İzmir	Ödemiş	Gölcük	1822	-228	D - Y	A	Dü
15	Hacı Hüsvrev	Eskişehir	İnönü	Merkez	83	+7. 5	Y	F	G - K
16	Demirözü	Ankara	Haymana	Demirözü	974		Y	F	Dü
17	Bahçecik	Bilecik	Merkez	Bahçecik	105	-16	Y	A	Dü
18	Ayvaini	Bursa	M. Kemalpaşa	Ayva	4900	-80	Y	A - YA	Dü - K
19	Balatini	Konya	Derebucak	-	1768	-32	Y	A - YA - F	Dü

A: Aktif, D: Dikey, Dü: Düzden, F: Fosil, G: Geçit, K: Kaynak, Y: Yatay, YA: Yan aktif, YD: Yarı Dikey

Çizelge 2.5. İzolasyon çalışması yapılan mağaralar

Sıra No	Mağaranın Adı	GPS KOORDİNATLARI			Bulunduğu İl ve İlçe
		N	E	Yükseklik (m)	
1	Dim	36° 19' 29. 4' °	32° 22' 36. 0' °	250	Alanya - Antalya
2	Yalan Dünya	36° 21' 97. 8' °	32° 40' 21. 9' °	360	
3	Mayıslar	40° 02' 27. 6' °	30° 42' 42. 8' °	564	Sarıcakaya - Eskişehir
4	Beyayla	40° 08' 15. 6' °	30° 40' 36. 8' °	1229	
5	Tozman	40° 07' 03. 6' °	30° 32' 11. 5' °	1068	Mihalgazi – Eskişehir
6	Manasır	39° 56' 49. 1' °	31° 20' 28. 3' °	1693	Mihalıççık - Eskişehir
7	Tilkiler	36° 92' 48. 0' °	31° 48' 72. 2' °	118	Antalya
8	Mencilis	41° 16' 23. 2' °	32° 37' 30. 8' °	792	Safranbolu - Karabük
9	Sipahiler				Amasra - Bartın
10	Oylat	39° 46' 02. 3' °	30° 31' 21. 6' °	525	İnönü-Bursa
11	Peynirkuyu	39° 58' 30. 9' °	27° 57' 23. 4' °	221	Manyas – Balıkesir
12	Mürüvvetler (İkikat)	39° 59' 35. 0' °	28° 00' 30. 0' °	202	
13	Mürüvvetler Suçkanı	39° 59' 42. 4' °	28° 00' 27. 8' °	120	
14	Ayvacık Düdeni	38° 18' 20. 8' °	27° 57' 33. 9' °	924	Ödemiş - İzmir
15	Hacı Hüsrev	39° 48' 47. 1' °	30° 09' 33. 2' °	910	İnönü - Eskişehir
16	Demirözü	39° 15' . 47. 4' °	32° 18' 98. 5' °	921	Haymana – Ankara
17	Bahçecik	40° 08' 01. 6' °	29° 43' 39. 4' °	700	Merkez - Bilecik
18	Ayvaini	40° 06' 21. 4' °	28° 40' 55. 7' °	370	M. Kemal Paşa - Bursa
19	Balatini	37° 21' 19. 9' °	31° 09' 24. 4' °	1360	Beysşehir - Konya

2.2.2. Mağaralardan Aktinomiset İzolasyonu ve Korunması

2.2.2.1. Temas yöntemi

Kaya ve sarkıt, dikit, mağara incisi, perde gibi oluşum yüzeylerinden örnek alınması amacı ile özel koruyucu kaplarla mağaraya sokulan besiyeri içeren petrilere,

eküviyon aracılığı ile ya da doğrudan temas yolu ile inoküle edilmişlerdir (Groth et al., 1999b).

2.2.2.2. Seyreltme plaka yöntemi

Mağaralardan elde edilen toprak örnekleri için, yöntem olarak seyreltme plaka yöntemi, besiyeri olarak da Nişasta Kazein Agar kullanılmıştır (Groth et al.,1999). Farklı lokalitelerden alınan toprak örneklerinden 1' er g tartılarak önceden deney tüplerinde hazırlanmış 99' ar ml steril Ringer çözeltisi içerisine katılır ve çalkalayıcıda bir süre karıştırılır. Bu süre sonunda deney tüpündeki 1/100 oranında seyreltilmiş toprak süspansiyonundan steril bir pipete 1 ml çekilerek, içinde 9 ml steril ringer çözeltisi bulunan bir deney tüpüne boşaltılarak 1/1000 oranında seyreltme yapılmıştır. Yine aynı yöntem uygulanarak 1/10000 oranında seyreltilmiş toprak süspansiyonları elde edilmiştir. 1/1000 ve 1/10000 oranında seyreltilmiş toprak süspansiyonlarında steril bir pipetle 1' er ml çekilerek iki farklı paralel oluşacak şekilde 3' er petriye koyulmuştur. Üzerlerine 45 °C ye kadar soğutulmuş Rifampicin ve Cycloheximide ilaveli NKM Agar (Nişasta Kazein Medium) konularak elle rotasyon hareketi yaptırılır ve süspansiyonun besiyeri içinde homojen olarak dağılması sağlanır. Ayrıca her lokaliteden alınan toprak örneklerinden bir miktar alınarak daha önceden hazırlanmış ve katılaştırılmış Rifampicin ve Cycloheximide ilaveli NKM Agar üzerine 3' er paralel olacak şekilde direk serpmeye yapılmıştır. Ekim yapılan petri kutuları 27°C etüvde (J.P. Selecta / Memmert) 10-15 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde gelişen aktinomiset kolonileri yine Rifampicin ve Cycloheximide ilaveli NKM Agara iki paralel hale çekilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan aktinomiset izolatları Antibiyotiksiz NKM Agara ekilerek 27°C etüvde 10-15 gün inkübe edilmiştir.

2.2.2.3. Mağara örneklerinden izole edilen aktinomisetlerin korunması

İzolatlar 2 paralel halinde NKM Agar içeren tüplerde +4°C' de, 2' şer ml %20' lik gliserol içeren cryotüplere alınarak -20°C' de muhafaza edilmiştir. Tüplerin ve cryotüplerin üzerlerine ilgili izolat kod ve tarih yazılarak etiketleme yapılmıştır. +4°C' de korunan yatık kültürler, 2-10 hafta aralıklarla yenilenmiştir.

2.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Aktinomiset izolatları, sahip oldukları potansiyel nedeni ile çok sayıda antimikrobiyal aktivite çalışmasına konu olmuştur. Bu çalışmalarda uygulanan farklı antimikrobiyal aktivite deneme – tarama yöntemleri aktif metabolitin besiyerine diffizyonu ilkesine dayalıdır. Çalışmalarımızda elde ettiğimiz aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri, bu ilkeye bağlı olarak, “Agar Piece Method” kullanılarak belirlenmiştir (Yıldırım, 2004).

In vitro antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında kullanılacak test mikroorganizmaları, klinik patojenleri ve standart laboratuvar kontrol suşlarını içerecek biçimde düzenlenmiştir.

“Agar Piece Method” la uygun olarak aktivite belirlenmesi amacı ile aktinomiset izolatları, ISP2 (Yeast Extract Malt Extract Agar) besiyerine ekilerek 28-30°C de 7 gün inkübe edilmiştir.

Test mikroorganizmalarından küfler (*Fusarium moniliforme*, *Fusarium culmorum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*), SDA (Sabouraud Dextrose Agar) besiyerine ekilerek 7 gün 28°C lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen küfler 7 gün sonunda daha önceden hazırlanmış 5’ er ml % 0.1 lik Tween 80 içeren küçük hacimli vidalı kapaklı şişelere aktarılarak spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Sporlar Thoma lamı ile sayılarak yoğunluğu 10⁶ adet/ml ye ayarlanmıştır. Spor süspansiyonundan 0.1 ml alınarak drigalski spatülü ile SDA’ ya inoküle edilmiştir.

Mayalar Malt Broth’ a, bakteriler ise BHIB’ ye (Brain Heart Infusion Broth) ekilmiştir. Bakteriler 35-37 °C lik, mayalar ise 28-30°C lik etüve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, maya ve bakteri kültürlerinin bulanıklıkları, Mc Farland Standardı 0.5’ e ayarlanmıştır. Ayarlama daha önceden belirli hacimlerde hazırlanmış % 0.9 ‘ luk NaCl çözeltisiyle yapılır (Çolak, 2006). Bu yolla hazırlanan test mikroorganizmalarından 0.1 ml alınarak uygun besiyerine inoküle edilmiş ve inokulant daha sonra drigalski spatülü ile besiyerleri üzerine yayılmıştır. Mayalar ve küfler için SDA, bakteriler için ise MHA (Mueller Hinton Agar) kullanılmıştır.

Bir hafta önce ISP2 besiyerine inoküle edilen aktinomiset örneklerinden 5 mm çapında diskler çıkarılmıştır. Çıkarılan diskler, besiyerlerine yayılan kültürlerin üzerine yerleştirilmiştir. Bu işlem, her petriye en çok altı disk olacak şekilde

gerçekleştirilmiştir. Diskler yerleştirildikten sonra tüm petriyeler 2 saat süreyle +4°C’ de bekletilmiştir. Bu süre sonunda petriyeler, uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Denenen aktinomiset izolatlarının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri, bakteri ve mayalar için 24 saat, küfler için ise, 48 saat sonra inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilmiştir (Ouhdouch et al. , 2001).

Toplam olarak 290 adet izolat ile gerçekleştirilen tarama çalışmasında, kullanılan aktinomiset izolatlarından elde edilen inhibisyon sonuçları, antibiyotik ürettiği bilinen standart suşlar ve standart antibiyotik diskleri ile gerçekleştirilen pozitif kontrol çalışmasında elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

2.2.4. Aktinomisetlerin Klinik İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin

Belirlenmesi

Klinik izolatlara karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenme çalışmaları için, test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmalarına en iyi aktif sonuçları veren ve numerik taksonomi testlerine göre belirlenen, 7 aktinomiset izolatı seçilmiştir. Antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmalarında izlenen yöntemin aynısı, klinik izolatlardan MRSA, VRE, *A.baumannii* ile kanlı agarda gerçekleştirilmiştir (Çolak, 2006).

Kontrol olarak 4 farklı antibiyotik; Erytromycin, Coftoizoxime, Gentamycin, Vancomycin, diski kullanılmıştır.

2.2.5. Numerik Taksonomi ile İzolatların Tanınması

Streptomyces izolatlarının numerik taksonomisine yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalar, mağaralardan izole edilen organizmalar ile literatürde yer alan standart türlerin ilişkisini belirlemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, izolatların renk gruplarının belirlenmesi, numerik testlerin uygulanması ve numerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi olmak üzere üç alt başlıkta değerlendirilebilir.

2.2.5.1 İzolatların renk gruplarının belirlenmesi

İzolatların renk gruplaması, oatmeal agar (ISP 3), inorganik tuz – nişasta agar (ISP 4) ve pepton – yeast extract – iron agar (ISP 6) besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmaları ile elde edilen toplam 290 adet izolat, cycloheximide (50 µg / ml) ilave edilen besiyerlerine inoküle edilmiş ve 25 °C’ de 2 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, ISP 3 ve 4 besiyerlerinde büyüyen kolonilerin, havasal misel, substrat miseli ve çözünür pigment renkleri; ISP 6 besiyerinde ise, melanin pigmenti üretme özellikleri belirlenmiştir. İzolatların oluşturdukları pigment renkleri, Inter-Society Colour Council National Bureau of Standards (ISCC-NBS) Colour Name Charts (United States Department of Commerce, Gaithersberg, Maryland, U.S.A.) katalogu kullanılarak saptanmıştır. İzolatlar, ilgili besiyerinde oluşturdukları renklere göre gruplandırılmıştır. Daha sonra, nümerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere test organizması olarak renk gruplarından temsilci izolatlar seçilmiştir.

2.2.5.2. Nümerik taksonomi testleri

Nümerik taksonomik çalışmalar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında ve geniş bir çalışma ekibinin katılımı ile gerçekleştirilmiş olup, elde edilen veriler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN ve Yrd. Doç. Dr. Kamil IŞIK tarafından ilgili bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmalar, aksi belirtilmedikçe konu hakkındaki temel literatürler olan Williams et al. (1983 a,b) ve Langham et al. (1989) da belirlenen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnokulant olarak İnorganik Tuz Nişasta Agar (ISP 4) besiyerinde 14 gün büyütülmüş test organizmalarının ¼ ringer çözeltilisinde hazırlanan spor süspansiyonları kullanılmıştır. Test organizmaları multipoint inokülatör kullanılarak steril plastik petri kaplarında bulunan besi ortamlarına aktarılarak testin gerektirdiği süre inkübe edilmiş ve uygun yöntemler kullanılarak testlerin sonuçları alınmıştır.

Streptomyces türlerinin nümerik metodlarla sınıflandırma / identifikasyonlarını içeren bu literatürlerde önerilen kültürel, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal

karakterler kullanılmıştır. Bu amaçla, denemeye alınan tüm test suşları toplam olarak 134 birim karakter açısından değerlendirilmiştir.

2.2.5.2.1. Degradasyon testleri

Degradasyon testlerine konu olan toplam 11 substrat ve kullanılan konsantrasyonları Çizelge 2.6.' de sunulmuştur. Tirozin, Adenin, Xylan, Xanthine, Hipoksantin ve Guanine degradasyonu için basal ortam olarak Modifiye Bennett Agar ortamı kullanılmıştır. İnkübasyonlar, 25 °C' de 14 gün gerçekleştirilmiştir, koloninin çevresinde ya da altında oluşan renk açılımı, pozitif sonuç olarak belirlenmiştir (Şekil 2.5).

Jelâtin degradasyonu için, modifiye Bennett Agar besi ortamında 25 °C' de 7 gün inkübasyondan sonra % 3 (v/v) lük Trikloroasetik asit (TCA) ilavesi ile saptanmıştır. Protein denatürasyonu sonucu oluşan opak renk jelatin varlığını göstermektedir. Bu nedenle, koloni çevresinde oluşan açık renkli zon, pozitif (+) değer olarak kabul edilmiştir.

Nişasta degradasyonu, aynı ortamda 7 gün inkübasyondan sonra besiyeri yüzeyine iyot solüsyonu ilavesi ile belirlenmiştir. Çevresinde açık renkli zon oluşan test organizmaları pozitif (+), açık renkli zon oluşmayanlar ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.6).

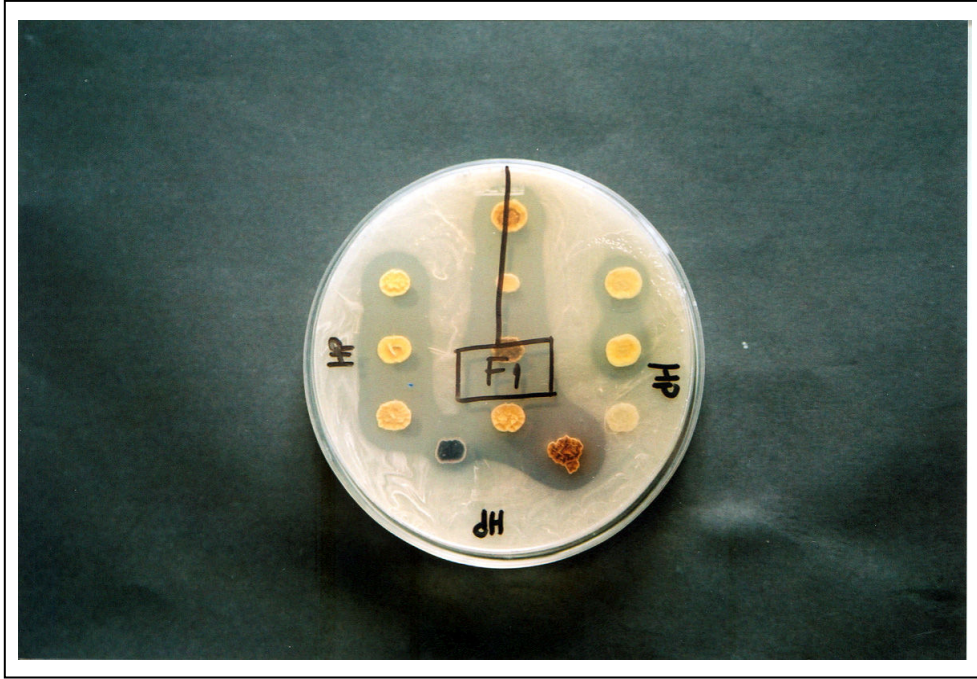
Esculin ve arbutin degradasyonu deney tüplerinde gerçekleştirilmiş olup, bu substratları içermeyen ortam negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Test organizmaları substrat içeren ve içermeyen her iki tüpe de inoküle edilerek 25 °C' de 2 hafta inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda negatif kontrolden farklı olarak oluşan koyu kahverengi - siyah renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.6. Degradasyon testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları

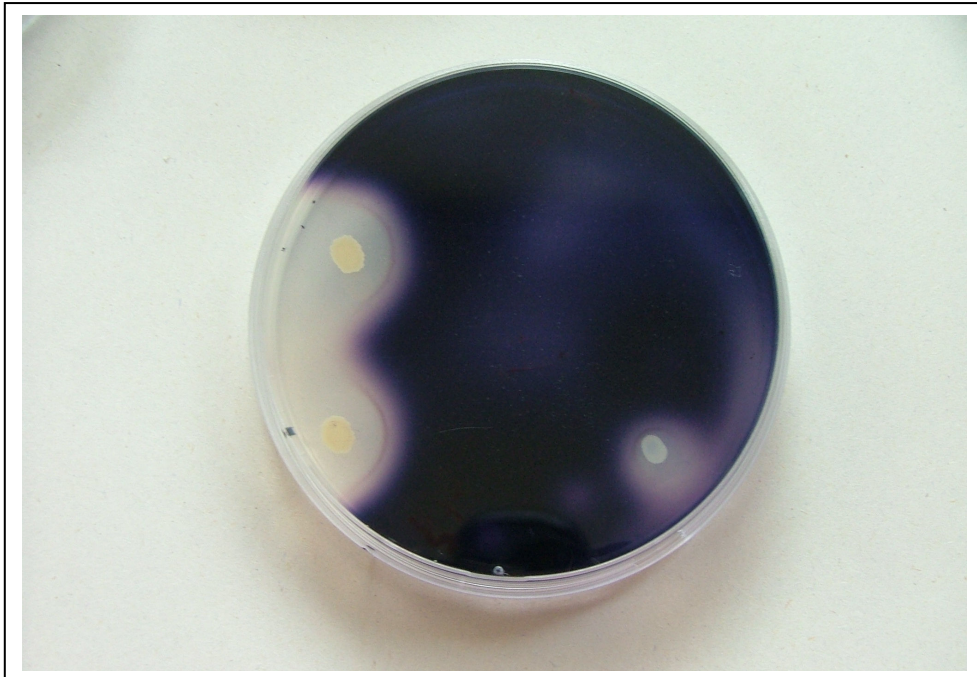
Substrat	İnkübasyon (Gün)	Konsantrasyon (% w/v)
Nişasta	7	1
Tirozin	14	0.5
Adenin	14	
Jelatin	7	0.4
Xylan	14	
Xanthin	14	
Hypoxanthine	14	
DNA	14	0.2
Esculin	14	0.1
Arbutin	14	
Guanine	14	0.05

DNA hidrolizi, DNase test agar da 25 °C' de 7 gün inkübasyondan sonra 1 M HCl ilavesi ile belirlenmiştir. Koloni çevresinde oluşan açık renkli zon pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

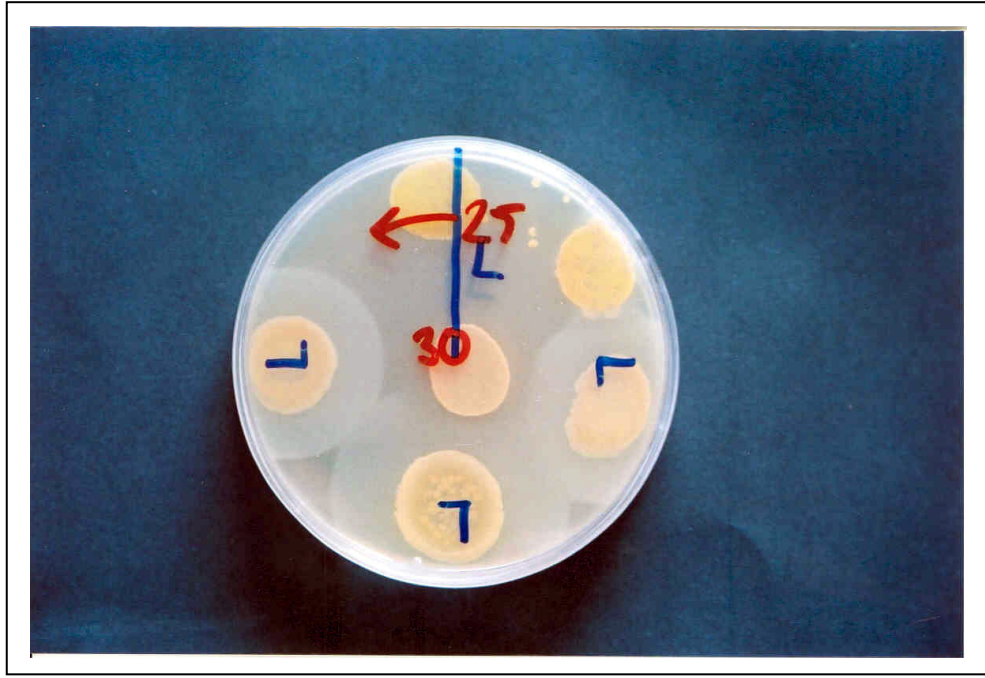
Lesitinaz testi, Nitsch ve Kutzner (1969) tarafından belirlenen yöntem ile egg yolk medium da belirlenmiştir. Test organizmaları her petriye 6 adet olacak biçimde inoküle edilerek 25 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Aktivite, inkübasyonun 2, 4 ve 6. günlerinde göz ile belirlenmiştir. Lesitinaz aktivitesi, yansıtılmış güçlü ışıktaki koloni çevresinde oluşan 5-10 mm çapında opak zon ile belirlenmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.5. Hipoksantin degradasyonu sonucu koloni çevresinde oluşan renk açılımı



Şekil 2.6. İyot solüsyonu ilavesi ile belirlenen nişasta degradasyonu



Şekil 2.7. Koloni çevresinde oluşan opak zon ile belirlenen lesitinaz aktivitesi

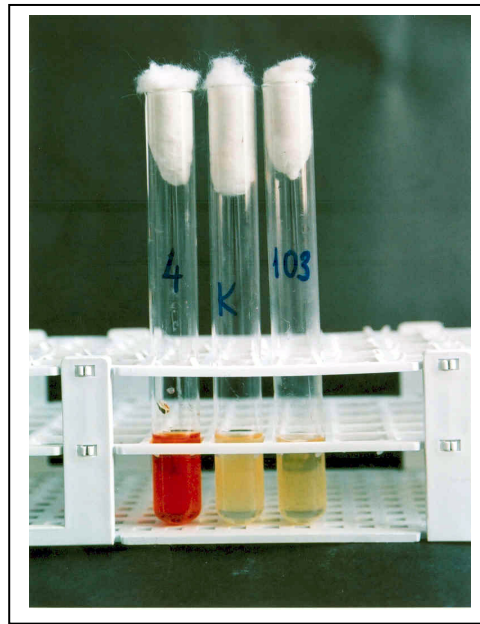
2.2.5.2.2. Biyokimyasal testler

Nitrat redüksiyonu deney tüplerinde dondurulmuş nitrat agar besiyerinde belirlenmiştir. İnkübasyon, 25 ° C de gerçekleştirilmiştir. İnokülasyondan 7 ve 14 gün sonra ortama 0.2 ml Griess-Iloslav Reaktifi A (0.8 ml sülfanilik asit, 100 ml 5 N Asetik asitte çözülür) ve 0.2 ml Griess-Iloslav Reaktifi B (0.6 ml dimetil- ∞ - naftilamin, 100 ml 5 N Asetik asitte çözülür) ilavesi ile belirlenmiştir. B reaktifi ilavesinden sonra kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Negatif olan tüplere çok az çinko tozu ilave edilmiştir. Çinko ilavesi ile oluşan kırmızı renk, ortamda halen var olan nitratın nitrite redüksiyonu nedeni iledir. Bu sonuç ise negatif olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.8).

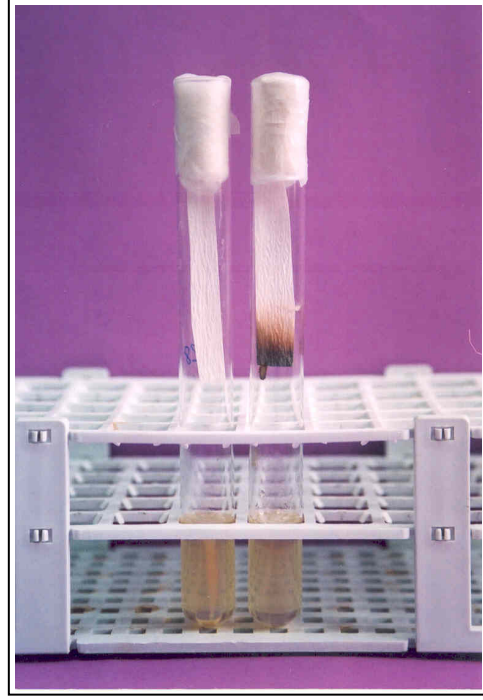
Hidrojen sülfür oluşumunu belirlemek için, nitrat redüksiyonunu belirlemede kullanılan kültür tüplerinin ağız kısmına, kurşun asetat spreyleme yoluyla hazırlanan kılavuz asetat şeritleri takılmıştır. İnokülasyon sonrası tüplerin ağzı parafilm ile

kapatılmıştır, 25 °C de 7 gün inkübasyondan sonra kağıt şeritlerde siyah renk oluşumu pozitif sonuçtur (Şekil 2.9).

Allantoin ve Üre hidrolizi, besiyerinin pH değişimi ilkesine bağlı olarak belirlenmiştir. Deney tüplerinde hazırlanan besiyerleri indikatör olarak fenol red içermektedir. İnkübasyon süresi sonunda, alkali ortam oluşumu nedeniyle besiyerinde oluşan koyu kırmızı-mor renge dönüşüm pozitif sonuçtur (Şekil 2.10).



Şekil 2.8. Nitrat redüksiyonu testi. Solda (4 numaralı tüp) pozitif (+), sağda (103 numaralı tüp) negatif (-) sonuç, ortada kontrol (K)



Şekil 2.9. Hidrojen sülfür oluşumu testi. Solda negatif (-), sağda pozitif (-) sonuç



Şekil 2.10. Üre hidrolizi testi. Solda (94 numaralı tüp) pozitif (+), sağda (93 numaralı tüp) negatif (-) sonuç, ortada kontrol (K). negatif (-) sonuç, ortada kontrol (K)

2.2.5.2.3. Beslenme testleri

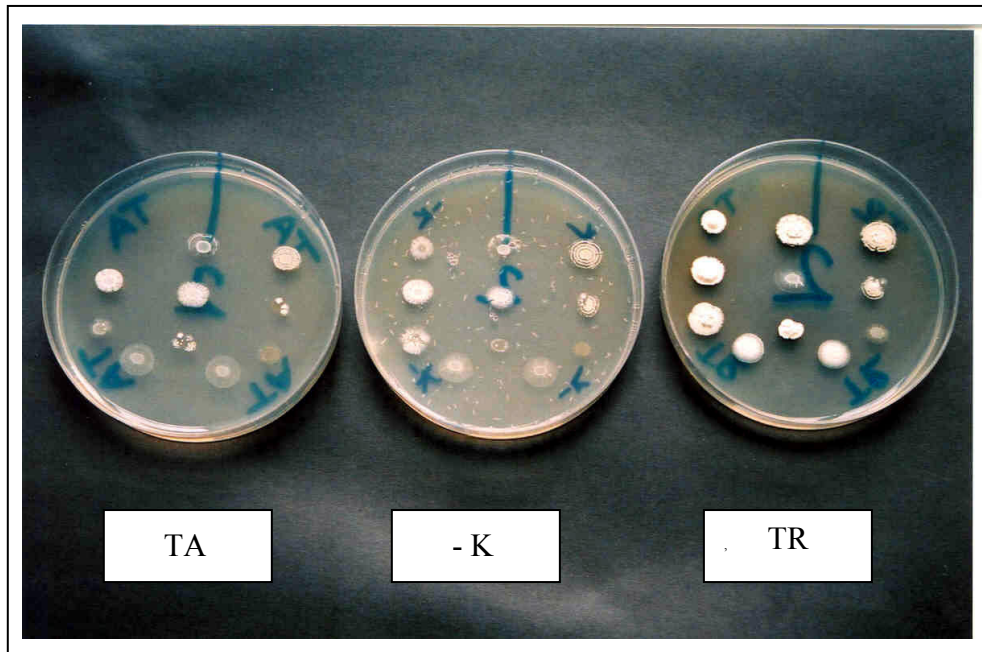
Test suşları, beslenme testleri kapsamında, çeşitli karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme yetenekleri açısından incelenmiştir. Test mikroorganizmaları tarafından kullanılabilme özellikleri araştırılan karbon ve azot kaynakları ile kullanılan substrat konsantrasyonları, sırası ile Çizelge 2.7. ve 2.8. ' da sunulmuştur.

Çizelge 2.7. Karbon kaynağı testlerinde kullanılan substratlar ve konsantrasyonları

Substrat	Konsantrasyon (% w/v)	Substrat	Konsantrasyon (% w/v)
Adonitol	1	Trehaloz	1
D-Fruktoz		Sellobioz	
D-Galaktoz		D-melibiose	
D-Ksiloz		Dekstran	
Laktöz monohidrat		Xylitol	
Maltoz		D-melibiose	
D-Mannoz		L-sorboz	
İnulin		Sodyum Asetat	
L-Arabinoz		Sodyum Piruvat	
L-Ramnoz		Sodyum Sitrat	
D-Mannitol		Sodyum Hıppurat	
Meso-İnositol		SodyumTiyosülfat	
Raffinoz		SodyumPropionat	
Salisin		L-tartarik asit	
Sukroz		Gallik asit	

Test suşlarının enerji ve büyüme gereksinimleri için 30 farklı karbon kaynağını kullanabilme yetenekleri, Shirling ve Gottlieb tarafından önerilen biçimde (1966) denenmiştir. Tindalizasyon ile steril edilen karbon kaynakları, bazal mediuma uygun konsantrasyonda ilave edilmiştir (Çizelge 2.7). Herhangi bir test maddesi içermeyen basal medium negatif kontrol; D-Glukoz (% 1) içeren basal medium ise pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir.

Sonuçlar, 25 °C' de gerçekleştirilen inkübasyonun 7. ve 14. gününde test maddesi içeren mediumdaki büyüme ile pozitif ve negatif kontrollerdeki büyüme karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrolden daha fazla veya pozitif kontrole benzer büyümenin gerçekleşmesi pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir. Negatif kontrol ile eşit ya da daha az büyüme ise, negatif sonuç olarak belirtilmiştir (Şekil 2.11).



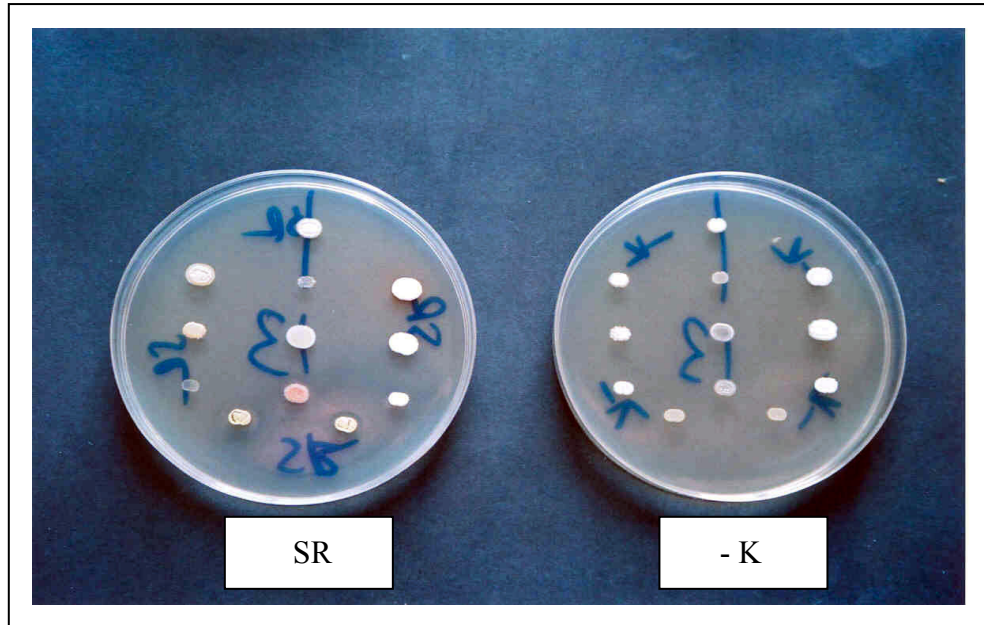
Şekil 2.11. Aynı test suşlarının 2 farklı karbon kaynağında büyüme özellikleri. -K: Karbon kaynağı içermeyen bazal medium, TA: Tartarik asit, TR:Trehaloz

Test suşlarının 14 farklı azot kaynağını kullanabilme yetenekleri, Williams ve arkadaşları tarafından önerilen biçimde (1983a) denenmiştir (Çizelge 2.8). Azot kaynakları tinalizasyon ile sterilize edildikten sonra basal mediaa ilave edilmiştir. Basal mediaa % 0.1 (w/v) oranında test edilen azot kaynağı ilavesi ile hazırlanan test ortamı, test suşları ile multipoint inokülatör kullanılarak inoküle edilmiştir.

Çizelge 2.8. Azot kaynağı testlerinde kullanılan substratlar

Substrat	
L-Arginin	L-metionin
Potasyum Nitrat	L-Histidin
L-Sistein	Hipoksantin
L-Valin	L-izolösin
L-Treonin	L-hidroksiprolin
L-Serin	Safranin
L-Fenilalanin	DL- α -Aminobutirikasit

Herhangi bir test maddesi içermeyen bazal medium, negatif kontrol; L-Asparagin içeren bazal medium ise pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir. Sonuçlar, inkübasyonun 7. ve 15. gününde, test maddesi içeren mediumdaki büyüme ile pozitif ve negatif kontrollerdeki büyüme karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Pozitif sonuç, negatif kontrolden daha fazla büyümenin gerçekleşmesidir. Negatif kontrol ile eşit ya da daha az büyüme negatif sonuç olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Aynı test suşlarının azot kaynağı olarak Serin' i kullanma özellikleri. -K: Azot kaynağı içermeyen bazal medium, SR: Serin

2.2.5.2.4. Fizyolojik testler

İzolatların farklı sıcaklık (4, 10, 37 ve 45 °C), pH (4, 5, 9 ve 10) koşullarında ve çeşitli kimyasal inhibitör ve antibiyotiklerin varlığında büyüme özellikleri Modifiye Bennett' s Agar' da incelenmiştir. Test edilecek kimyasal inhibitör ve antibiyotikler, Modifiye Bennett' s Agar' a uygun konsantrasyonda ilave edilmiştir (Çizelge 2.9). Herhangi bir test maddesi içermeyen medium pozitif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir.

İzolatların 4 ve 10 °C' de büyüme özellikleri 4 haftalık, belirtilen diğer testler için ise 2 haftalık inkübasyon süreci sonunda kaydedilmiştir. Bu koşullarda büyümenin gözlenmesi pozitif sonuç büyümenin gözlenmemesi ise negatif sonuç olarak kaydedilmiştir (Şekil 2.13, 2.14, 2.15, 2.16).

Çizelge 2.9. Fizyolojik testlerde kullanılan inhibitör ve antibiyotikler ile konsantrasyonları

İnhibitör	Konsantrasyon (%, g/ml)	Antibiyotik	Konsantrasyon (µg/ml)
Sodyum Klorid	10	Oleandomisin	100
	13		50
Sodyum Azid	0.01	Streptomisin sülfat	100
	0.02		50
Feniletanol	0.1	Neomisin sülfat	50
	0.3		25
Fenol	0.1	Vancomisin	50
Potasyum Tellürit	0.001		25
		0.01	Penicillin G
Kristal Violet	0.001	10 i.u	
Sodyum Biselenit	0.001	Nalidixic acid	100
	0.005		50
Çinko klorid	0.01	Chloramphenicol	10
			5
		Ampicillin	50
			25

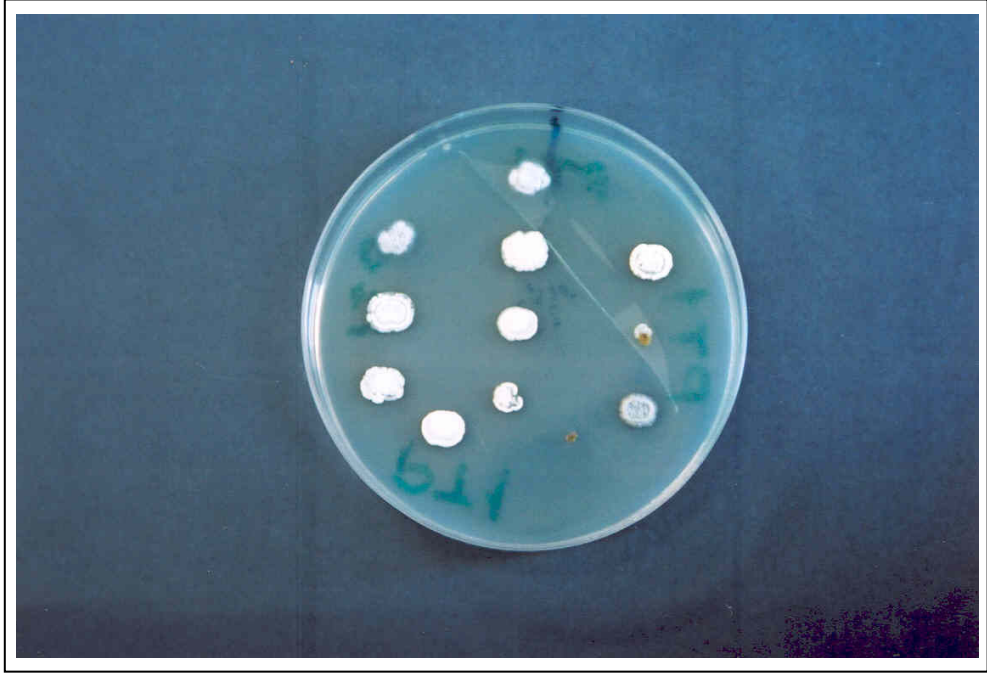
* 1 mg: 1667 unit



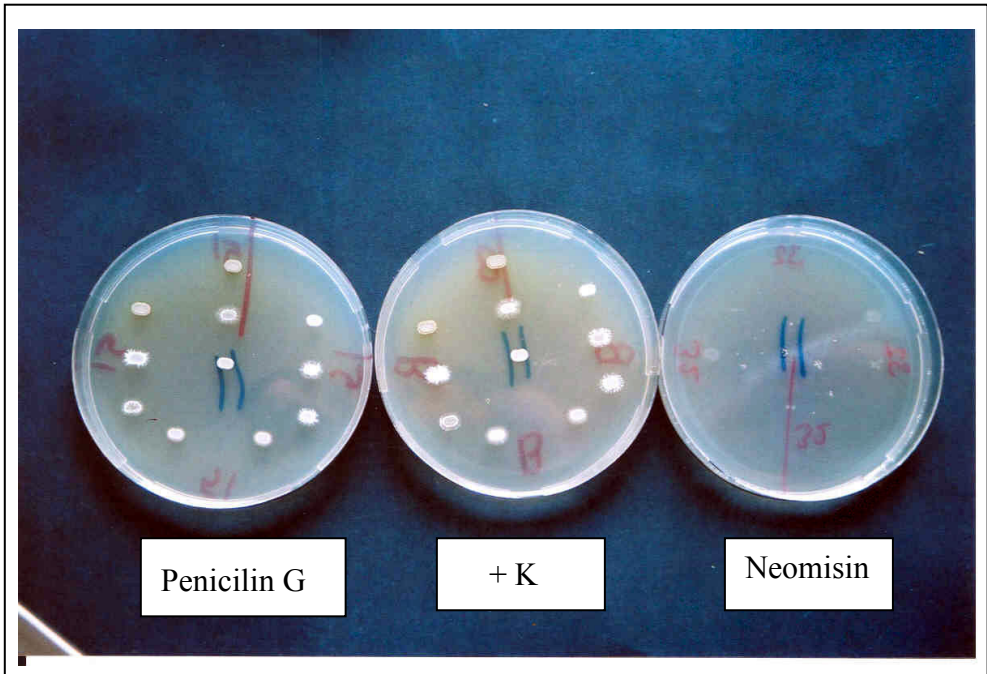
Şekil 2.13. Test suşlarının pH 9 da büyüme özellikleri



Şekil 2.14. Test suşlarının besi ortamında fenol varlığında büyüme özellikleri



Şekil 2.15. Test suşlarının besi ortamında potasyum tellürit varlığında büyüme özellikleri



Şekil 2.16. Aynı test suşlarının 2 farklı antibiyotik varlığında büyüme özellikleri. Solda 20 i.u. /ml Penicilin G içeren besiyeri, ortada antibiyotik içermeyen Bennets Medium, sağda 25 µg/ml Neomisin sülfat içeren besiyeri

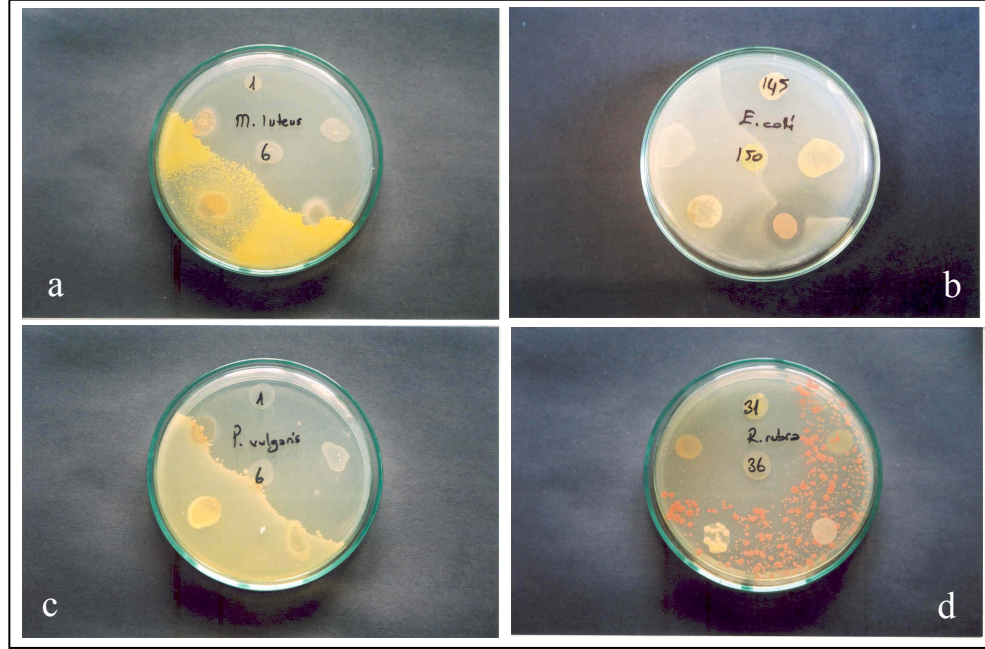
2.2.5.2.5. Antimikrobiyal aktivite testleri

İzolaların çeşitli test mikroorganizmalarına (Çizelge 2.10) karşı olası antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için, test suşları nutrient agar petrilere spot biçiminde inoküle edilmiştir. Her petriye 6 test suşu inoküle edilerek 25 °C’ de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda büyüme içeren petriler, 3 - 5 ml kloroform üstüne ters çevrilip konarak 40 dakika bekletildikten sonra, fazla kloroform buharı steril kabinde uçurulmuştur. Test organizmaları ile inoküle edilmiş olan 5 ml “yumuşak” agar büyümenin üzerine aktarılarak katılaşması sağlanmıştır. Kültürlerin 30 °C’ de 24 saat inkübasyonundan sonra, izolat kolonisi çevresinde belirlenen berrak zon, pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.17).

Çizelge 2.10. Test suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları

Test Mikroorganizması		Suş Numarası
Bakteri	<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL B - 1018
	<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B - 209
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Escherichia coli</i>	ATTC 25922
	<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL B - 123
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NRRL B - 771
	<i>Citrobacter freundii</i>	NRRL B - 2643
	<i>Enterobacter aerogenez</i>	NRRL B - 427
Fungus	<i>Candida utilis</i>	NRRL Y - 900
	<i>Candida tropicalis</i>	NRRL Y - 12968
	<i>Pichia membranifaciens</i>	NRRL Y - 2026
	<i>Rhodotorula rubra</i>	NRRL Y - 2505



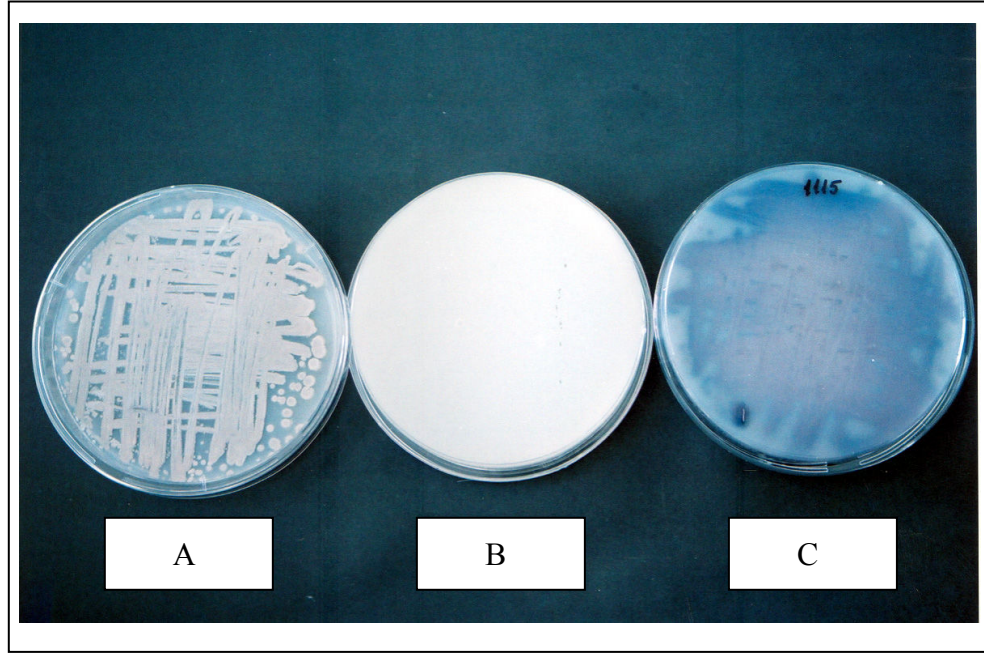
Şekil 2.17. Çeşitli test suşlarının *Micrococcus luteus* (a), *Escherichia coli* (b), *Proteus vulgaris* (c) ve *Rhodotorula rubra* (d) ya karşı antimikrobiyal aktivitesi

2.2.5.2.6. Morfoloji ve pigmentasyon

Test suşlarının morfolojik ve pigmentasyon özellikleri, Shirling ve Gottlieb (1966) tarafından önerilen besiyerlerinin ve yöntemlerin kullanımı ile belirlenmiştir. Pigmentasyon testlerinde test suşlarının ISP4 besiyerinde 25 °C’ de 14 gün inkübasyon sonunda oluşturdukları havasal misel ve spor renkleri, substrat misel renkleri ve çözümlü pigment renkleri belirlenmiştir (Şekil 2.18). Havasal misel ve spor renkleri için, beyaz, gri, kahve, kırmızı, krem, pembe, sarı, siyah, yeşil; substrat misel renkleri için eflatun, gri, kahve, kırmızı, pembe, sarı, siyah, yeşil ve çözümlü pigment renkleri için eflatun, kırmızı, kahve, pembe ve sarı olarak kategorize edilmişlerdir.

Test suşlarının morfolojik özelliği olarak, spor zincir morfolojileri belirlenmiştir. Bu amaçla, ISP4 besiyerinde 25 °C’ de büyütülen test suşları, inkübasyonun 21. gününde ışık mikroskobu ile 400 x büyütmede incelenerek gözlenmişlerdir. Spor zincirleri; düz - dalgalı zincirler (rectiflexibiles), ucu kanca ya da halka ile biten

zincirler (rectinaculiaperti), spiral zincirler ve vertisiller olmak üzere 4 ana grupta değerlendirilmiştir.



Şekil 2.18. 1115 kodlu izolatın ISP4 ortamında 14 günlük büyümesinde substrat ve havasal misel renkleri A. Havasal misel, B. Kontrol petrisi, C. Substrat miseli

Sonuç olarak, nümerik taksonomik çalışmalar toplam 199 taksonomik birim ile gerçekleştirilmiştir. Bunlardan 131 tanesi, izolasyon çalışması ile elde edilen ve renk gruplaması yolu ile tüm izolatlar arasından seçilen test suşlarıdır. Mağara izolatlarının benzerliklerinin belirlenmesi açısından çalışmaya 35 adet *Streptomyces* tip örneği de dahil edilmiştir (Çizelge 2.11). Ayrıca, seçilen testlerin güvenilirliğini ve test hatasının belirlenmesi için izolat ve tip suşlarından rastgele seçilmiş 33 test suşu farklı kod numaraları verilerek çalışmaya duplikat olarak dahil edilmiştir (Çizelge 2.12). Tüm test suşları 134 birim karakter açısından değerlendirilmiştir. Bu aşamada test suşlarına uygulanan testler degradasyon, fizyolojik, biyokimyasal, büyüme, morfolojik ve pigmentasyon özelliklerine ilişkin bilgiler elde edilebilecek biçimde seçilmiştir. Elde edilen test sonuçları, pozitif (+) ya da negatif (-) olarak kodlanmıştır.

Çizelge 2.11. İzolatların tanılanması amacı ile kullanılan tip türler

İzolat No	ISP No	Tür İsmi
1	1990	<i>Streptomyces lavendulae</i>
2	5063	<i>Streptomyces fradiae</i>
3	5073	<i>Streptomyces phoeochromogenes</i>
4	5076	<i>Streptomyces roseus</i>
5	5081	<i>Streptomyces luridus</i>
6	5088	<i>Streptomyces niveus</i>
7	5099	<i>Streptomyces prasinus</i>
8	5109	<i>Streptomyces nodosus</i>
9	5111	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>
10	5112	<i>Streptomyces filipinensis</i>
11	5155	<i>Streptomyces glaurescens</i>
12	5188	<i>Streptomyces matensis</i>
13	5190	<i>Streptomyces goshikiensis</i>
14	5203	<i>Streptomyces fluorescens</i>
15	5229	<i>Streptomyces griseoviridis</i>
16	5230	<i>Streptomyces venezuelae</i>
17	5231	<i>Streptomyces rochei</i>
18	5234	<i>Streptomyces antibioticus</i>
19	5236	<i>Streptomyces griseus</i>
20	5242	<i>Streptomyces umbrosus</i>
21	5260	<i>Streptomyces rimosus</i>
22	5321	<i>Streptomyces kranskii</i>
23	5334	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>
24	5357	<i>Streptomyces natalensis</i>
25	5362	<i>Streptomyces cellulase</i>
26	5381	<i>Streptomyces viridis</i>
27	5438	<i>Streptomyces violaceolatus</i>
28	5445	<i>Streptomyces albidoflavus</i>
29	5454	<i>Streptomyces viridogenes</i>

Çizelge 2.11. İzolatların tanılanması amacı ile kullanılan tip türler (Devam)

İzolat No	ISP No	Tür İsmi
30	5487	<i>Streptomyces lavenduligriseus</i>
31	5496	<i>Streptomyces diastaticus</i>
32	5517	<i>Streptomyces erythraeus</i>
33	5530	<i>Streptomyces pactum</i>
34	5552	<i>Streptomyces omiyaensis</i>
35	5593	<i>Streptomyces fulvissimus</i>

Çizelge 2.12. Test hatasını belirlemek için kullanılan duplikatlar

Test Suşunun Adı	Kodu	Duplikat Kodu
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0105	D 0001
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0205	D 0002
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0206	D 0003
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0320	D 0004
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0401	D 0005
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0603	D 0006
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0608	D 0007
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0712	D 0008
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0715	D 0009
<i>Streptomyces sp.</i>	M 0912	D 0010
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1001	D 0011
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1112	D 0012

Çizelge 2.12. Test hatasını belirlemek için kullanılan duplikatlar (Devam)

Test Suşunun Adı	Kodu	Duplikat Kodu
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1115	D 0013
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1206	D 0014
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1209	D 0015
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1230	D 0016
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1302	D 0017
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1439	D 0018
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1440	D 0019
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1612	D 0020
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1613	D 0021
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1815	D 0022
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1818	D 0023
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1908	D 0024
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1910	D 0025
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1931	D 0026
<i>Streptomyces sp.</i>	M 1934	D 0027
<i>Streptomyces nodosus</i>	T 5109	D 0028
<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	T 5111	D 0029
<i>Streptomyces antibioticus</i>	T 5234	D 0030
<i>Streptomyces griseus</i>	T 5236	D 0031
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	T 5445	D 0032
<i>Streptomyces lavenduligriseus</i>	T 5487	D 0033

2.2.5.2.7. Nümerik testlerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi

Toplam 199 test suşunun 134 birim karakter bakımından elde edilen verileri pozitif (+) ya da negatif (-) olarak kodlandıktan sonra IBM-PC uyumlu bilgisayarda X-Taxon programında kaydedildi. Duplike suşların da dahil olduğu +/- sonuçlar, 1/0 formatına dönüştürüldükten sonra NTSys-pc istatistiksel paket programı (Wishart, 1978) kullanılarak analizleri yapılmıştır. Test hatasının saptanması için test varyansının hesaplanmasından sonra (Si2; Sneath ve Johnson, 1972) duplike olarak seçilmiş suşlar son veri analizlerinden çıkarılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında suşlar arasındaki benzerlik oranları hem + hem de – verileri eşit oranda değerlendiren S_{SM} (Simple matching coefficient; Sokal and Michener, 1958) katsayısı kullanılarak hesaplanmış, kümeleme ise Average-linkage (UPGMA; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages; Sneath and Sokal, 1973) algoritmi ile oluşturulmuştur. Böylece, Türkiye’ nin çeşitli illerinde yer alan mağaralardan elde edilen *Streptomyces* izolatlarının standart tip türler ile benzerlik dereceleri belirlenmiştir.

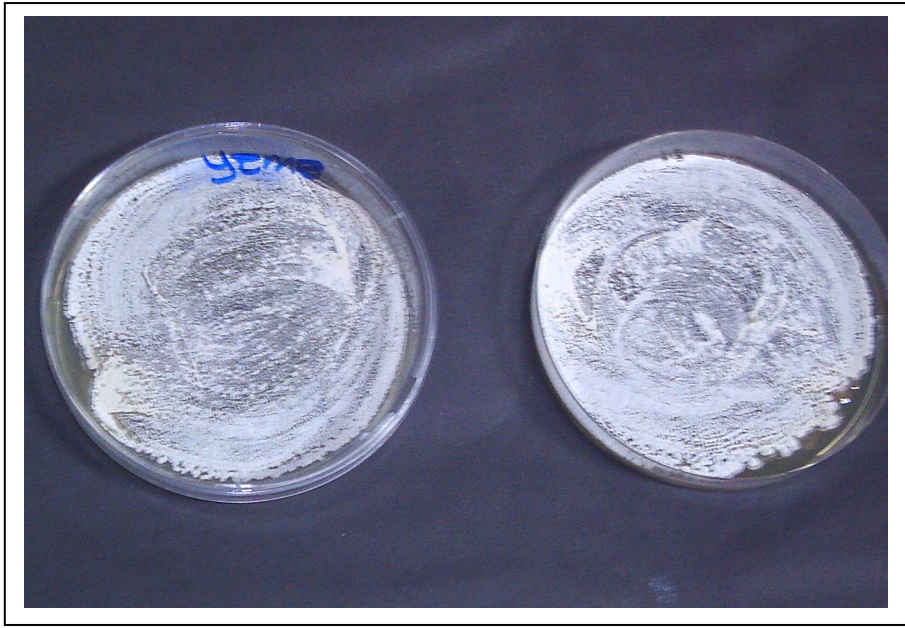
2.2.6. Aktif Aktinomiset İzolatının Seçimi

Agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, nümerik taksonomi ve klinik mikroorganizmalarla yapılan antimikrobiyal aktivite belirlenme çalışmaları sonuçları detaylı olarak incelenmiş ve karşılaştırmalar sonucunda 1492 kodlu aktinomiset izolatı, antimikrobiyal etkili molekül üretimi ve izolasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

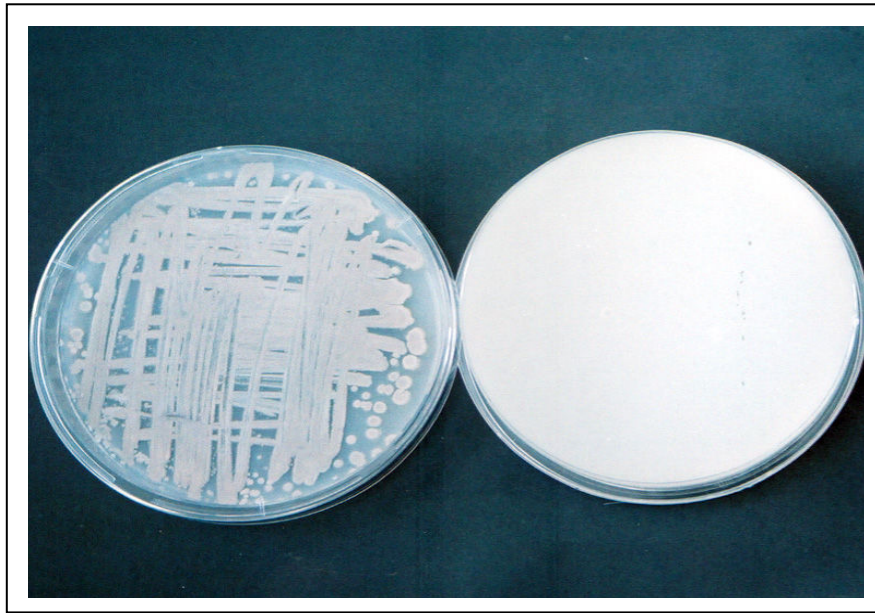
2.2.7. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi

2.2.7.1. Sporulasyon

1492 kodlu izolat, petrilerdeki ISP4 ve ISP2 besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. Petriler 7 gün, 28 °C de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.19, 2.20).



Şekil 2.19. İzolatın (M1492) ISP2 besiyerlerinde gelişimi



Şekil 2.20. İzolatın (M1492) ISP4 besiyerlerinde gelişimi

İnkübasyon sonunda gelişen sporlar, 5 ml steril % 0.9 luk NaCl içeren küçük şişelere, steril kürdan yardımıyla aktarılıp spor çözeltisi hazırlanmıştır. Şişeler tek tek vortekslenmiştir. Daha sonra Thoma Lamı ile spor sayımı yapılmış ve hücre sayısı 1×10^8 ad/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (El-Enshasy et al., 2000).

2.2.7.2. İnokulum hazırlanması

İnokulum ortamı (Seed medium) 3 adet 250 ml' lik erlende 50' şer ml hazırlanmıştır. Hücre miktarı 1×10^8 ad/ml olan spor çözeltisinden her erlene, % 1 oranında inoküle edilmiştir. Daha sonra erlenler 28 °C de 200 rpm hızındaki çalkalamalı etüvde (Edmund Buhler GmbH) 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Gesheva et al., 2005).

2.2.7.3. Fermantasyon

Fermantasyon için 40 adet 250 ml' lik erlende 50' şer ml fermentasyon ortamı hazırlanmıştır (Şekil 2.21). 48 saatlik inkübasyon süresini tamamlamış inokulum ortamından, fermentasyon ortamına % 5 oranında inoküle edilmiştir (Gesheva et al., 2005). Daha sonra erlenler 28 °C de 150 rpm hızındaki çalkalamalı etüvde 10 gün (240 saat) inkübasyona bırakılmıştır.



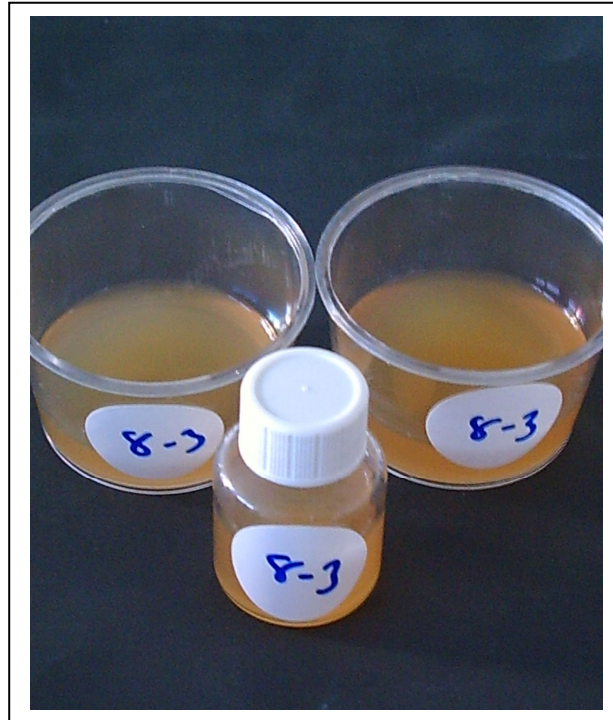
Şekil 2.21. İzolatın (M1492) fermentasyon ortamında çalkalamalı etüvdeki gelişimi

Kontrol grubu için 2 adet erlen hiç spor aktarılmadan inoküle edilmiştir ve sonuçların takibinde “0. gün” olarak ifade edilmiştir. 24 saat aralıklarla 4’ er erlen, inceleme parametrelerinin takibi için hasat edilmiş ve değerlendirilmiştir. Çalışma için, kuru hücre ağırlığı, fermantasyon sıvısında pH değişimi, fermantasyon sıvısında antimikrobiyal aktivite belirlenmesi, fermantasyon sıvısında kalan glukoz miktarı tayini olmak üzere 4 farklı inceleme parametresi değerlendirildi. Fermantasyon sıvıları 24 saat aralıklarla alınmıştır. Her gün alınan 4 erlenden her biri ayrı ayrı filtre kağıdından (Schleicher & Schuell) geçirilmiştir (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. 24 saat aralıklarla, filtre kağıdından geçirilen fermentasyon sıvısı

Filtreden geçmiş kültür sıvısında, pH ve kalan glukoz miktarı tayini yapılmış ve daha sonra antimikrobiyal aktivite belirlenmesi için ekstrakte edilmiştir (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Filtreden geçirilip şişelere (25 ml lik) alınan kültür sıvıları

2.2.7.4. Kuru hücre ağırlığı

Süzme işleminden önce filtre kağıtları kodlanarak , ayrı ayrı tartılmış ve ağırlıkları not edilmiştir. Erlenlerdeki fermentasyon sıvıları (4' er paralel erlen) 24 saat aralıklarla alınıp ayrı ayrı filtre kağıtlarından geçirilmiştir. Üzerlerindeki hücreler ile birlikte filtre kağıtları 105 °C de 18-24 saat kurutulmuştur. Kuruma sonucunda hücre içeren filtre kâğıtları tartılmıştır. Daha önce tartılmış filtre kağıtlarının ağırlıkları toplam ağırlıktan çıkarılarak, elde edilen kuru hücre ağırlıkları not edilmiştir (Farid et al., 2000; Gesheva et al., 2005).

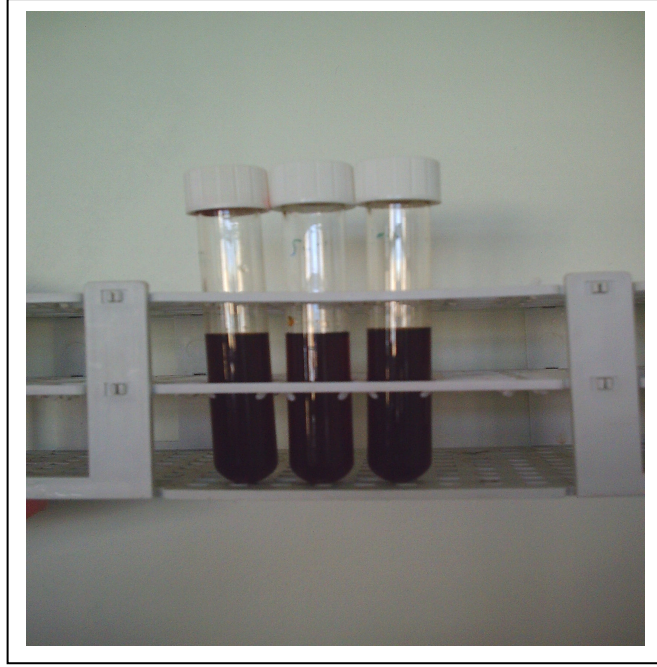
2.2.7.5. Fermentasyon sıvısında pH değişimi

Mikroorganizmaların üremeleri için, besiyerinin pH ' sının optimal sınırlar içinde bulunması gereklidir. Minimal ve maksimal pH limitlerine yanaştıkça üreme azalır ve durur. Bakterilerin optimal pH limitleri oldukça değişiktir. Bir besiyeri hazırlanırken pH' sı da mikroorganizmanın fizyolojik karakterine uygun olarak (optimal pH) ayarlanır, otoklavdan sonra 1-2 diziyem düşeceği hesap edilerek pH iyice saptanır (Arda, 2000).

Bu çalışmada, sıvı besiyerleri hazırlanırken başlangıç pH değeri 6,8 olarak ayarlanmıştır. pH ölçümleri için 24 saat aralıklarla filtre kağıdından geçirilip 15 er ml ler halinde küçük şişelerde – 20 °C de muhafaza edilen kültür sıvıları, oda sıcaklığına geldikten sonra pH metre (İnolab-WTW/ pH-ion-735) ile ölçüm yapılmıştır (Denizci, 1996; Paradkar et al., 1998; Harindran et al., 1999; Kızılcık, 2006).

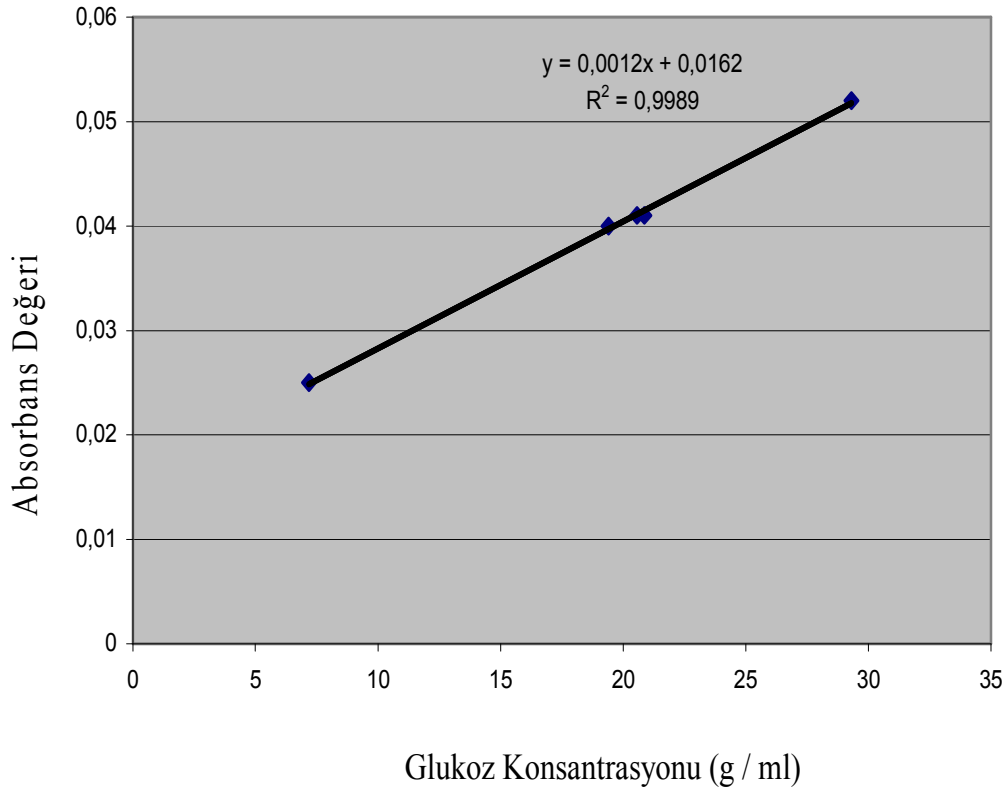
2.2.7.6. Fermentasyon sıvısında glukoz miktarı tayini

Besiyerindeki toplam karbonhidrat değeri “fenol sülfirik asit metodu” ile belirlenmiştir (Dubois et al., 1956). Filtre kağıdından geçirilip 15 er ml ler halinde küçük şişelerde – 20 °C de muhafaza edilen kültür sıvılarından 1 er ml alınmış ve üzerine % 5 fenol çözeltisinden 1 ml ilave edilmiştir. Daha sonra karışımın üstüne yavaşça 5 ml H₂SO₄ (sülfirik asit) eklenmiştir (Şekil 2.24).



Şekil 2.24. Fermantasyon Sıvısında Glukoz Miktarı Tayini için hazırlanmış tüpler

Tüpler, daha sonra 95 °C’ deki su banyosunda (Memmert) 15-20 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan tüpler spektrofotometre (Jasco V-530) yardımı ile 490 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek süzüntünün glukoz değerleri hesaplanmıştır. Büyüme ortamında var olan glukoz miktarı, ölçülen absorbans değerinin standart eğride değerlendirilmesi yolu ile belirlenmiştir (Kızılcık, 2006). Şekil 2.25’ deki besiyerinde kalan glukoz miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri gösterilmektedir. Tüm çalışmalar 4’ er paralel halinde gerçekleştirildiğinden, sonuçlar elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 2.25. Besiyerinde kalan glukoz miktarını belirlemek için kullanılan standart eğri

2.2.7.7. Fermantasyon sıvısında antimikrobiyal aktivite belirlenmesi

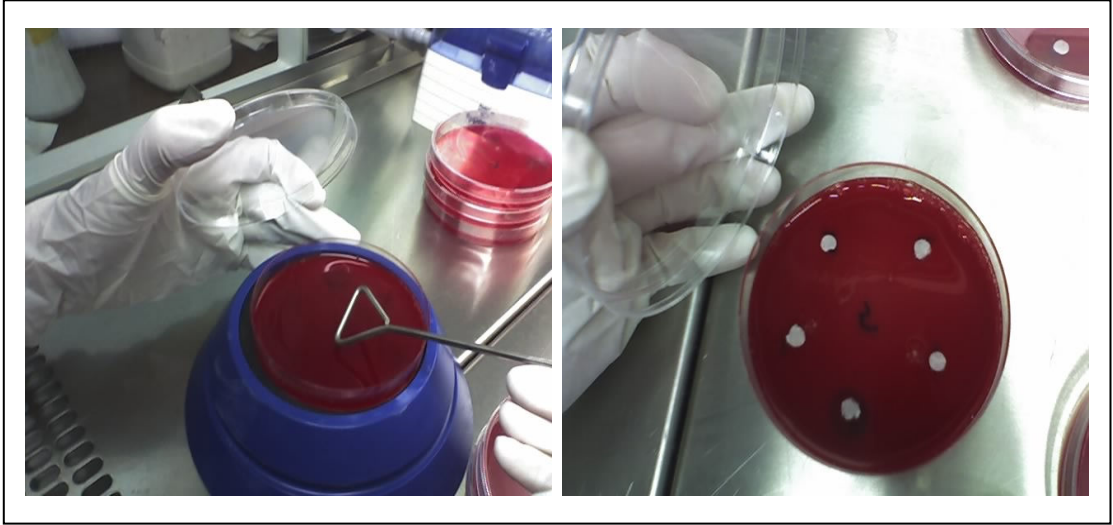
Fermantasyon sıvısında antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir (Denizci, 1996; Çolak, 2006). Denemelerde MRSA klinik izolatu kullanılmıştır. MHB (Mueller Hinton Broth) besiyerine ekilen MRSA 24 saat 35-37 °C’ de inkübe edilmiştir. 24 saatlik MRSA kültürü % 0.9 luk NaCl kullanılarak bulanıklığı Mc farland 0.5’ e ayarlanmıştır. Daha önceden hazırlanmış ve etiketlenmiş kanlı agar petrilere Mc farland 0.5’ e ayarlanmış bakteri kültüründen 0.1 ml aktarılarak drigalski spatülü yardımı ile yayılmıştır. Petriler 1 saat 35-37 °C’ de inkübe edilmiştir. Her güne ait fermantasyon sıvısı 0.22 mikron por çapına sahip tek kullanımlık filtrelerinden (Millex Millipoe) geçirilerek steril edilmiştir. (Şekil 2. 26)



Şekil 2.26. Fermentasyon sıvısının filtre ile steril edilmesi.

Whatman 1 kağıtlarından 6 mm çapında kağıt diskler hazırlanarak, 96 adet kuyucuk içeren plaklar içinde gaz otoklavında steril edilmiştir. Filtrelerden geçirilen fermentasyon sıvısından 20 µl disklere emdirilmiştir (Bilgili, 2004; Çolak, 2006).

Diskler steril pensler yardımıyla, MRSA ekili kanlı agar petrileri üzerine aseptik koşullarda yerleştirilmiştir (Şekil 2.27). Petrilerde, 35-37 °C' de 24 saat inkübasyon sonucunda disk çevresinde oluşan zonların çapları ölçülerek antibakteriyal aktivite incelenmiştir. Kontrol grubu olarak petrinin orta kısmına vancomycin diskleri yerleştirilmiştir.



Şekil 2.27. Kanlı agar petrileri üzerine drigalski spatülü yardımı ile yayılan MRSA ve aseptik koşullarda petriler üzerine yerleştirilen 20 µl fermantasyon sıvısı emdirilmiş diskler.

2.2.8. Antimikrobiyal Etkili Maddenin İzolasyonu

1492 kodlu aktinomiset izolatu tarafından üretilen antimikrobiyal etkili maddenin izolasyonu, solvent ekstraksiyonu, ince tabaka kromatografisi, biyootogram yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

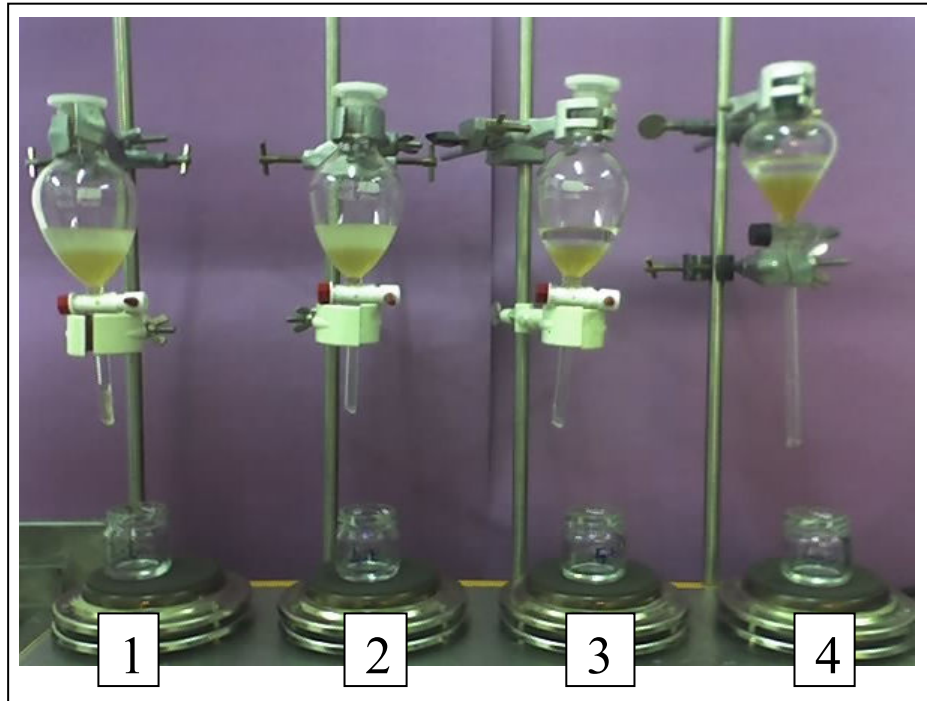
2.2.8.1. Solvent ekstraksiyonu seçimi

Fermantasyon sıvısı hücrelerden ayrıldıktan sonra, Heptan, Dietil Eter, Kloroform, Etil Asetat, Dikloromethan çözücüleri ile ekstraksiyona tabi tutularak her fraksiyonda iki yöntemle antimikrobiyal aktivitelerine bakılmış, buna bağlı olarak aktif maddenin polaritesinin belirlenmesi sağlanmıştır.

Birinci çalışmada, 2 ml kültür sıvısı üzerine, 2 ml çözücü şeklinde hazırlanan tüpler 15 dk vorteksledikten (Velp Scientifica) sonra 15 dk 3000 rpm hızda santrifüjlenmiştir (Peláez et al., 1998). Bu işlem için su ile faz oluşturan 4 farklı çözücü kullanılmıştır. Bunlar sudan daha apolar olan, Dietil Eter, Kloroform, Etil Asetat, Dikloromethan dır. Her çözücü ayrı ayrı tüplerde ve her günün paralelleri için denenmiştir. Vorteks ve santrifüj işlemleri ile antimikrobiyal aktiviteli maddenin

çözücü içerisinde geçmesi sağlanmıştır. Whatman 1 kağıtlarından 6 mm çapında kağıt diskler hazırlanarak steril edilmiştir. Çözücü fazı kısmından 20 µl disklere emdirilmiştir.

İkinci çalışmada ise, 100 ml lik ayırma hunileri (İldam) ile hazırlanan deney düzeneği kullanılmıştır. 15 ml kültür sıvısı üzerine 15 ml Etil asetat eklenerek 5 dk boyunca çalkalanmıştır. 5 dk sonunda ayırma hunisinin musluğu açılmış, sulu faz ve çözücü fazı dikkatli bir şekilde farklı kaplara alınmıştır. Etil asetatla muameleden sonra, kap içerisindeki sulu kısım bu defa Heptan ile aynı işlemi geçirmiştir. Yine sulu faz ve çözücü fazı dikkatli bir şekilde farklı kaplara alınmıştır. (Şekil 2. 28)



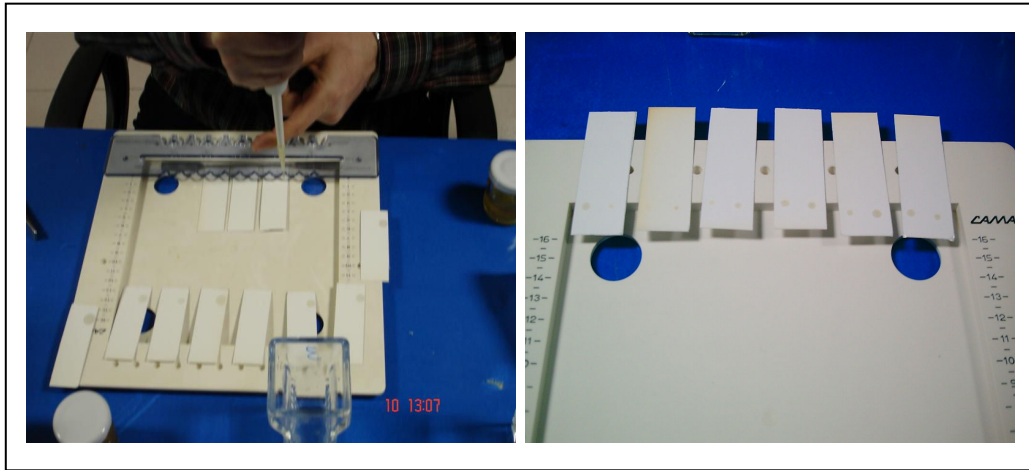
Şekil 2.28. Ayırma hunilerinde (100 ml lik) Etil asetat ve Heptan' la muamele edilen kültür sıvısı. (1.Kap: Etil asetat ile muamele edilmiş sulu faz, 2.Kap: Etil asetat (çözücü faz), 3.Kap: Heptan ile muamele edilmiş sulu faz, 4.Kap: Heptan (çözücü faz))

Kültür sıvıları, 1. ve 3. kaplardan steril koşulların sağlanması amacı ile steril filtrelerinden geçirildikten sonra, 2. ve 4. kaplardan ise direkt olarak 20 µl , Whatman 1 kağıtlarından birinci çalışmadaki gibi hazırlanan diskler emdirilmiştir.

Her iki denemede de disklerin petrilere yerleştirilmesi aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan MRSA klinik izolatu bölüm 2.2.7.7’ de anlatıldığı biçimde kanlı agar petrilere ekildikten sonra diskler, steril pensler yardımıyla, petrilere üzerine aseptik koşullarda yerleştirilmiştir. 35-37 °C’ de 24 saat inkübasyon sonucunda disk çevresinde oluşan zonların çapları ölçülerek antimikrobiyal aktivite incelenmiştir. Kontrol gurubu olarak vancomycin diskleri kullanılmıştır.

2.2.8.2. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

İTK testi için çeşitli solvent sistemleri öncelikle silika gel kromatografi kağıtları (Camag) kullanılarak yapılmıştır. Lam boyunda kesilen silika gel kağıtları üzerine 100 µl lik mikropipet yardımıyla damla şeklinde kültür sıvısı emdirilmiştir (Şekil 2.29).



Şekil 2.29. İTK çalışmalarında, fermantasyon sıvısının kromatografi kağıdı üzerine emdirilmesi ve havada kurutulması

Şaleler içinde çözücü doygunluğu için doygunlaştırma kâğıtları (Camag) ve uygun mesafede kromatografi kâğıtları yerleştirilmiştir (Şekil 2.30). Yürütme işlemi plakanın üst kısmından 0,3 cm kalana kadar devam ettirilmiştir, süre sonunda tankın içinden çıkarılan plaklar havada kurutulmuştur (Çolak, 2006).

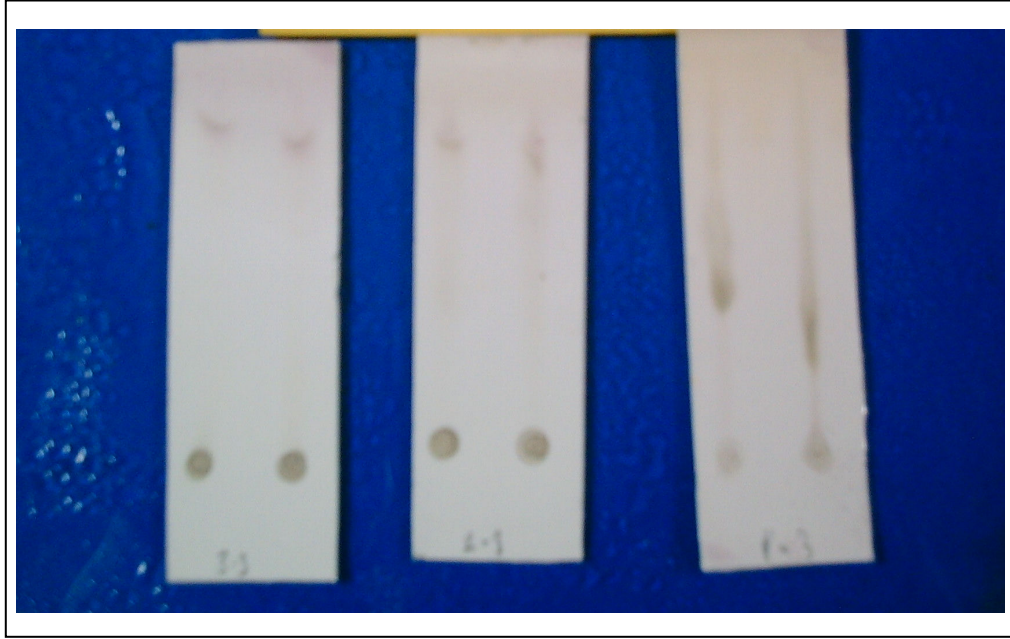


Şekil 2.30. İTK çalışmalarında, fermantasyon sıvısının kromatografi kağıdı üzerinde yürütülmesi.

Daha sonra kağıtlar 265-365 nm dalga boyunda incelenerek spot bölgeler işaretlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonları ve bu zonlara karşılık gelen R_f değerleri ölçülerek kaydedilmiştir.

$$R_f = \text{Maddenin ilerlediği yol} / \text{çözücünün ilerlediği yol}$$

Lekeler % 40 lık H_2SO_4 çözeltisi ile spreylendikten sonra 100-120 °C' deki etüvde yakılarak belirlenmiştir (Denizci, 1996; Moncheva et al., 2002; Çolak, 2006)



Şekil 2.31. İTK çalışmalarında, 265-365 nm dalga boyunda incelenen spotlar

Denemeler sonucunda uygun solvent sistemi seçilmiştir (Çizelge 2.13). Seçilen çözücü sistemi bu kez hazırlanan silika gel (Merck) tabakalarına uygulanmıştır. Tabakalar, 100 g toz silika gel + yeterli miktarda saf su karışımının ince tabaka plakaları hazırlama düzeneği üzerine 0,20 mm kalınlığında dökülmesi şeklinde hazırlanmıştır. Hazırlanan tabakalar 100 °C' de 1 saat kurutulmuştur.

Tabaka üzerine kültür sıvısı bant şeklinde emdirilmiştir. Daha sonra kromatografi tankı içerisindeki çözücü karışımı içinde yürütülmüştür. Kromatografi kağıtları tanktan çıkarılıp havada kuruduktan sonra maddenin absorbe edildiği bant ince bir spatül yardımı ile kazınarak alınmıştır. Silika gel ve aktif maddenin bir arada bulunduğu kazıntı metanolla yıkanmıştır.

Çizelge 2.13. İnce Tabak Kromatografisi (İTK)' de denenmiş çeşitli solvent sistemleri

	Çözücü Sistemleri	Karışım Oranları
APOLAR ↓ POLAR	Dietil Eter : Heptan	95 : 5
	Kloroform : Heptan	95 : 5
	Dietil Eter	100
	Dietil Eter : Metanol	95 : 5
	Dietil Eter : Metanol	70 : 30
	Kloroform	100
	Kloroform : Metanol	95 : 5
	Etil Asetat	100
	Etil Asetat : Heptan	95 : 5
	Etil Asetat : Metanol	95 : 5
	Etil Asetat : Metanol	70 : 30
	Diklorometan	100
	Diklorometan : Etil Asetat	95 : 5
	Diklorometan : Metanol	95 : 5
	Aseton	100
	Aseton : Metanol : Diklorometan	70 : 15 : 15
	Aseton : Metanol : Etanol	70 : 15 : 15
	Aseton : Metanol	95 : 5
	Aseton : Metanol	75 : 25
	Aseton : Metanol	50 : 50
Aseton : Metanol : Su	70 : 15 : 15	
Metanol : Aseton	95 : 5	

Çizelge 2.13. İnce Tabak Kromatografisi (İTK)' de denenen çeşitli solvent sistemleri (Devam)

	Çözücü Sistemleri	Karışım Oranları
APOLAR ↓	Metanol : Su : Etanol : Aseton	70 : 20 : 5 : 5
	Metanol : Su Aseton :	75 : 20: 5
	Metanol : Su : Etanol	80 : 15 : 5
	Metanol : Su : Etanol	75 : 20 : 5
	Metanol : Su : Etanol	70 . 25 : 5
POLAR	Metanol : Su : Etanol	65 : 30 : 5
	Metanol : Su : Etanol	60 : 30 : 10
	Metanol : Su : Etanol	50 : 30 :20
	Metanol : Su : Etanol	50 : 40 : 10
	Metanol : Su : Etanol	40 : 40 : 20
	Metanol : Su	95 : 5
	Metanol : Su	90 : 10
	Metanol : Su	85 : 15
	Metanol : Su	80 : 20
	Metanol : Su	75 : 25
	Metanol : Su	70 : 30
	Metanol : Su	60 : 40
	Metanol : Su	50 : 50
	Su	100

Aktif maddenin silika gel den ayrılması için bir huni içindeki cam yününden geçirme işlemi uygulanmıştır. Cam yünü üzerinde silka gel birikirken, metanol ve aktif madde karışımı huninin altına konulan başka bir kaptan toplanmıştır (Şekil 2.32).



Şekil 2.32. Aktif maddenin, huni içindeki cam yününden geçirme işlemi

İçerisinde antimikrobiyal etkili madde bulunan, Metanol daha sonra rotary evaporatörde (İKA-WERKE RV06) 40 °C’ de yoğunlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Rotary evaporatorün balon joje kısmında kalan aktif madde 40 mg olarak tartılmış ve 10 ml Dimetilsülfoksit (DMSO) ile yıkanarak alınan antimikrobiyal etkili madde ilerideki kullanılmak üzere uygun koşullarda muhafaza edilmiştir (Şekil 2.33) (Bilgili, 2004).



Şekil 2.33. Çözücünün Rotary Evaporator’ de yoğunlaştırılarak antimikrobiyal etkili maddeden uzaklaştırılması

2.2.8.3. Biyootografi

Biyootografi, birden fazla madde içeren ekstratların kromatografik plak üzerinde yürütülmesi sonucu oluşan spotların biyolojik yolla belirlenmesini kapsar. Biyolojik etkiye sahip spotlar, kromatografi kağıdı üzerine yayılan mikroorganizma ile aşılınmış besiyerinde üremeyi engelleyerek varlığını gösterir.

Kültür sıvısı silika gel kağıtları üzerine 100 µl lik mikropipet yardımıyla damla şeklinde emdirilmiş ve daha sonra kağıtlar 265-365 nm dalga boyunda incelenerek spot bölgeler işaretlenmiştir. Test mikroorganizması olarak kullanılan *S. aureus* dan 24 saatlik kültür hazırlanmıştır. Kültür Mc farland 0.5’ e bulanıklığı ayarlanmış ve 10^8 kob/ml olarak ayarlanmıştır. Daha sonra kültür hazırlanan yumuşak agara 0.1 ml ilave edilerek 10^7 kob/ml’ ye ayarlanmıştır. Daha önceden hazırlanan üzerine MHA petrileri üzerine aseptik koşullarda yerleştirilen kromatografi kağıtları üzerine ince bir tabaka halinde bakteri kültürü içeren yumuşak agar dökülmüştür. Petriler 24 saat 37 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır (Bilgili, 2004; Çolak, 2006). 24 saat sonunda petriler üzerine TTC spreylenecek 1-2 saat inkübe edilmiştir

Mikroorganizma gelişiminin olduğu bölgelerde kırmızı renk gözlenmiştir. Gelişme olmayan şeffaf zonlar aktif inhibisyon etkisine sahip spotlar olarak ifade edilmiştir.

2.2.9. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Antimikrobiyal etkili madde, 2 mg / ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma için kullanılacak 96 kuyucuklu plaklarda aktif maddenin yarı yarıya seyreltilmiş bir seri dilüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra önce sıvı besiyerinde 24 saatlik kültürleri hazırlanan ve 24 saat sonunda bulanıkları Mc Farland 0.5'e ayarlanan bakteri çözeltilisinden hücre miktarı 10^5 olacak şekilde MHB da süspansiyon hazırlanmıştır. Plaklardaki konsantrasyon serileri üzerine 100 µl bakteri kültürü içeren MHB aktarılmıştır. Kapakları kapatılan plakalar 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki bulanıklara bakılarak üreme tespiti yapılmıştır. Daha sonra plaklar üzerine TTC ile spreylenecek 1-2 saat daha inkübasyona bırakılmış, mikroorganizma gelişiminin gözlenmesi kolaylaştırılmıştır (Harindran et al., 1999).

İnkübasyondan sonra büyümenin görülmediği en düşük ekstre konsantrasyonu Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) olarak ifade edilmiştir ve sonuçlar not edilmiştir. Kontrol grubu olarak aynı işlem antimikrobiyal madde yerine Streptomycin çözeltilisi kullanılarak yapılmıştır. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) belirlenmesi için, MİK değerinin belirlendiği konsantrasyona kadar olan kuyucuklardan 100 µl alınarak (MİK değerinin belirlendiği kuyucuk dahil olmak üzere), uygun şekilde etiketlenmiş MHA petrilere damlacık halinde aktarılmıştır. 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılan petrilere daha sonra üremenin gözlenmediği endüyük konsantrasyon Minimum Bakterisidal Konsantrasyon olarak ifade edilmiştir.

Çalışmada test mikroorganizması *S. aureus*, klinik mikroorganizmalar MRSA, VRE, *A. baumannii* kullanılmıştır.

2.2.10. Aktif Molekülün Sıcaklık Toleransı

10 ml DMSO içerisinde +4°C' de muhafaza edilen 40 mg antimikrobiyal etkili madde, 2 mg / ml olacak şekilde, 3 ayrı şişede 4' ml çözelti hazırlanmıştır. Şişelerden biri hiçbir işleme tabi tutulmadan aynen, diğeri 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika, bir diğeri 100 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika işleme tabi tutulmuşlardır (Bilgili, 2004). Aktif maddenin sıcaklık toleransı Disk Difüzyon ve MİK çalışmaları yapılarak test edilmiştir.

Her iki çalışma için, test mikroorganizması *S. aureus*, klinik mikroorganizmalar MRSA, VRE, *A. baumannii* 24 saatlik kültürleri kullanılmıştır. 24 saat sonunda kültürler Mc Farland 0.5 bulanıklığına ayarlanmıştır.

Disk Difüzyon çalışmasında ilk önce 2.2.7.7.' de anlatıldığı gibi hazırlanan disklere 15 µl her şişedeki çözeltilerden ayrı ayrı emdirilmiştir. Her mikroorganizma için 3 paralel olacak şekilde önceden hazırlanmış MHA petrilere, Mc Farland 0.5 bulanıklığına ayarlanan kültüründen 0.1 ml aktararak yayılmıştır. Daha sonra her petriye 1., 2. ve 3. şişelerdeki çözeltilerden 15 µl emdirilmiş birer disk yerleştirilmiştir. Petriler 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerde standart kontrol olarak Vancomycin diskleri kullanılmıştır. 24 saat sonunda oluşan inhibisyon zonları belirlenmiştir.

MİK çalışması ise 2.2.9.' da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Plaklarda her mikroorganizma için, işlem görmemiş şişedeki çözelti, 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika bekletilmiş çözelti ve 100 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika bekletilmiş çözelti ile konsantrasyon serileri hazırlanmıştır. 2 paralel halinde hazırlanan plaklar 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuklardaki bulanıklara bakılarak üreme tespiti yapılmıştır. Daha sonra plaklar üzerine TTC spreylenecek ve 1-2 saat daha inkübasyona bırakılarak, mikroorganizma gelişiminin gözlenmesi kolaylaştırılmıştır. İnkübasyondan sonra büyümenin görülmediği en düşük ekstre konsantrasyonu Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) olarak ifade edilmiştir. Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) çalışması için, MİK değerinin belirlendiği konsantrasyona kadar olan kuyucuklardan 100 µl alınarak (MİK değerinin belirlendiği kuyucuk dahil olmak üzere), uygun şekilde etiketlenmiş MHA petrilere damlacık halinde aktarılmıştır. 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılan petrilerde daha sonra üremenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon Minimum Bakterisidal Konsantrasyon olarak ifade edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1.1. Mağaralardan Aktinomiset İzolasyonu ve Korunması

Toplam 19 mağaradan izolasyon çalışmaları sonucunda örnekleme yapılarak elde edilen 290 izolatin; kod, kaynak, izolat numarası ve toplam sayılarına ilişkin veriler, Çizelge 3.1’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Örneklenen mağaralardan elde edilen izolatlara ilişkin veriler

Mağara İsmi	Sıra No	Kod ve Kaynak	İzolot Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Dim	1	1. 1. (Oluşum)	101, 102, 111	11
		1. 2. (Oluşum)	104	
		1. 3. (Oluşum)	106, 107	
		1. 4. (Oluşum)	105	
		1. 5. (Oluşum)	110, 112, 116, 118	
Yalan Dünya	2	2. 1. (Oluşum)	201, 202, 203	8
		2. 2. (Oluşum)	204, 205	
		2. 3. (Oluşum)	206, 207, 208	
Mayıslar	3	3. 1. (Kum çarşak)	301, 302, 303, 304, 305	14
		3. 2. (Asma Göl)	309, 310, 311, 312	
		3. 3. (Dip)	314	
		3. 4. (Toprak)	318, 320	
		3. 5. (Toprak)	313, 324	
Beyyayla	4	4. 1. (Kaya)	401, 402, 403, 404	4
Manasır	5	5.1. (Toprak) – 120 m	501	19
		5.2. (Toprak) – 368 m	502, 503, 504, 506	
		5.3. (Oluşum) – 368 m	508, 510, 512, 513, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 525, 528	

Çizelge 3.1. Örneklenen mağaralardan elde edilen izolatlara ilişkin veriler (Devam)

Mağara İsmi	Sıra No	Kod ve Kaynak	İzolot Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Tilkiler	6	6.1. (Toprak)	601, 602, 603, 604, 605, 607, 608, 609, 610, 612, 613	11
Tozman	7	7.1. (Oluşum)	702, 703, 705, 706	17
		7.2. (Oluşum)	707, 708, 709, 710	
		7.3. (Oluşum)	711, 712, 715	
		7.4. (Oluşum)	717, 718, 719, 720	
		7.5. (Toprak)	704, 716	
Mencilis	8	8.1. (Oluşum)	801	17
		8.2. (Oluşum)	803, 805	
		8.3. (Oluşum)	806, 807, 809, 810	
		8.4. (Oluşum)	812, 813, 814, 815, 816, 817	
		8.5. (Oluşum)	819	
		8.6. (Toprak)	823, 824, 825	
Sipahiler	9	9.1. (Oluşum)	901, 902, 913	6
		9.7. (Toprak)	910, 912, 914	
Oylat	10	10.1. (Toprak)	1001, 1002, 1004, 1005, 1006	9
		10.2. (Toprak)	1008, 1009, 1010, 1011	
Peynirkuyu	11	11.2. (Toprak)	1102, 1103	24
		11.3. (Toprak)	1106, 1107, 1108, 1109	
		11.4. (Oluşum)	1110, 1111, 1112, 1114	
		11.5. (Oluşum)	1115, 1117, 1119, 1121, 1122, 1123, 1124, 1129	
		11.6. (Oluşum)	1125, 1126, 1127, 1128, 1130, 1145	
Mürüvvetler	12	12.1. (Toprak)	1201, 1202, 1203, 1204	24
		12.2. (Toprak)	1205	
		12.3. (Toprak)	1206, 1207, 1208, 1209	
		12.4. (Toprak)	1210, 1211	
		12.5. (Toprak)	1213, 1214, 1228	
		12.6. (Oluşum)	1215, 1216, 1218, 1230, 1231	
		12.7. (Oluşum)	1223, 1224, 1225	
		12.8. (Oluşum)	1220, 1221	

Çizelge 3.1. Örneklenen mağaralardan elde edilen izolatlara ilişkin veriler (Devam)

Mağara İsmi	Sıra No	Kod ve Kaynak	İzolat Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Mürüvvetler Suçukanı	13	13.1. (Oluşum)	1302	9
		13.2. (Oluşum)	1304, 1306, 1308	
		13.3. (Oluşum)	1309, 1311, 1312	
		13.4. (Toprak)	1314, 1315	
Ayvaccık Düdeni	14	14.1. (Toprak)	1401, 1403, 1405, 1407, 1408, 1409, 1412, 1429, 1445	47
		14.2. (Toprak)	1413, 1419, 1420, 1421, 1423, 1425, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1437, 1439, 1440, 1442, 1446	
		14.3. (Toprak)	1453, 1457, 1458, 1460, 1462,	
		14.4. (Toprak)	1463	
		14.5. (Toprak)	1464, 1465, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474	
		14.6. (Toprak)	1478, 1482, 1481, 1483, 1485	
		14.7. (Toprak)	1492, 1496, 1497, 1498	
		15.1. (Oluşum)	1502, 1503	
Hacı Hüsrev	15	15.2. (Oluşum)	1504, 1505, 1515	10
		15.4. (Toprak)	1507, 1509	
		15.5. (Toprak)	1510, 1511, 1512	
		16.1. (Oluşum)	1601, 1602	
Demirözü	16	16.3. (Oluşum)	1605, 1606	11
		16.4. (Oluşum)	1607, 1608	
		16.5. (Oluşum)	1612	
		16.6. (Oluşum)	1613	
		16.7. (Oluşum)	1614, 1615	
		16.9. (Oluşum)	1620	
		17.1. (Oluşum)	1701, 1702, 1703	
Bahçecik	17	17.2. (Oluşum)	1705	7
		17.3. (Oluşum)	1706, 1707	
		17.4. (Oluşum)	1708	

Çizelge 3.1. Örneklenen mağaralardan elde edilen izolatlara ilişkin veriler (Devam)

Mağara İsmi	Sıra No	Kod ve Kaynak	İzolot Numarası	Toplam İzolat Sayısı
Ayvaini	18	18.1. (Oluşum)	1801, 1802, 1803	19
		18.2. (Oluşum)	1804	
		18.3. (Oluşum)	1806, 1807	
		18.4. (Oluşum)	1808	
		18.5. (Oluşum)	1812, 1814, 1815	
		18.6. (Oluşum)	1818, 1819, 1825	
		18.7. (Oluşum)	1820	
		18.9. (Oluşum)	1822, 1823, 1824	
		18.10. (Oluşum)	1827, 1828	
		Balatini	19	
19.2 (Oluşum)	1904, 1907			
19.3 (Oluşum)	1908, 1910			
19.4 (Oluşum)	1912, 1913, 1914, 1915			
19.5 (Oluşum)	1917, 1918			
19.6 (Oluşum)	1921, 1922			
19.7 (Oluşum)	1923			
19.8 (Oluşum)	1925			
19.9 (Oluşum)	1927, 1928			
19.10 (Oluşum)	1931, 1932, 1933, 1935			
TOPLAM İZOLAT SAYISI				290

3.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Bölüm 2.2.3.' te belirtilen biçimde gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmalarında test mikroorganizmalarının çevresinde inhibisyon zonu varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).

Antimikrobiyal aktivitelerinin çalışmalarında kullanılmak üzere izole edilmiş 290 izolattın, % 33'ü sadece gram (+) bakteriler, %27' si sadece gram (-) bakteriler ve % 15,17'si her iki grup üzerinde antibakteriyal etkili oldukları, % 19 unun mayalar, % 14,82 inin küfler üzerinde etkili oldukları; bununla beraber %38'1'inin de etkisiz oldukları saptanmıştır. Çeşitli test suşlarının antimikrobiyal aktivitesi şekil 3.1' de sunulmuştur. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları Çizelge 3.2' de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Çeşitli test suşlarının antimikrobiyal aktivitesi

Çizelge 3.2. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) (Devam)

İZOLAT KODU	BAKTERİ				MAYA		KÜF			
	Gr (+)		Gr (-)		5	6	7	8	9	10
	1 ^a	2	3	4						
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	15,6	-	-	-	-	-
Mikostatin	-	-	-	-	-	11,6	9,3	8,6	8,3	9,3
710	11	-	-	10	-	-	-	-	-	-
711	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
712	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
715	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
716	10,3	14,3	-	10,3	-	-	-	-	-	-
717	13	-	-	10	-	-	-	-	-	-
718	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
719	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
720	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
803	14	12	-	-	-	-	-	-	-	-
805	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
806	-	-	11	9,6	16,6	12,6	-	-	-	-
807	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
809	11	10	-	-	-	-	-	-	-	-
810	-	-	-	-	9,6	12,3	-	-	-	-
812	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
813	10	10,6	11,3	10	-	-	-	-	-	-
814	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
815	10,6	9,6	9,3	8	-	-	-	-	-	-
816	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
817	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
819	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
823	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
824	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
825	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
901	10	10,3	7,6	6,6	34,3	31,3	-	-	-	-
902	-	13	-	-	20	-	25	-	-	-
910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
912	-	20	-	-	-	-	10	-	-	-
913	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-
914	-	16	-	-	-	-	12	-	-	-
1001	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-
1002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1004	-	19	-	-	-	-	-	-	-	20
1005	-	23	-	17	21	-	-	13	-	-
1006	-	19	-	-	-	-	-	-	-	18
1008	-	23	-	-	15	-	15	13	-	18
1009	11,3	12,6	6,6	14,6	-	-	-	10,3	-	-
1010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1011	-	-	-	-	19	-	-	-	-	21
1102	-	-	-	-	12,5	15	-	-	-	-

Çizelge 3.2. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) (Devam)

İZOLAT KODU	BAKTERİ				MAYA		KÜF			
	Gr (+)		Gr (-)		5	6	7	8	9	10
	1 ^a	2	3	4						
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	15,6	-	-	-	-	-
Mikostatin	-	-	-	-	-	11,6	9,3	8,6	8,3	9,3
1103	14,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1107	9	9,6	-	-	16,3	11,3	14,3	-	-	-
1108	15,3	17	-	8,5	-	-	-	-	-	-
1109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1110	-	-	-	13,3	-	-	-	-	-	-
1111	-	-	-	14,3	11,3	12,3	-	-	-	-
1112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1114	9,3	11,3	11,6	12	11	11,3	11,3	-	-	-
1115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1119	14	16	15	-	-	-	-	-	-	-
1121	18	17	15	-	15	-	-	-	-	-
1122	11,3	9,6	12,3	8,6			9,3	9,6	10,3	12
1123	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-
1124	16,3	16,6	16	-	-	-	-	-	-	-
1125	13,6	20	-	12	-	-	-	-	-	-
1126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1127	-	-	-	-	-	-	12,6	-	11	13,6
1128	10	12,5	-	-	19	16	-	-	-	-
1129	13,6	20	-	12	12,3	13	-	-	10	13,3
1130	-	-	-	10	-	15	-	-	-	-
1145	18,5	20	20	17,5	-	-	-	-	-	-
1201	23	25	16	17	13	16	-	-	-	-
1202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1203	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1204	16	20,5	-	-	10	16	13,3	11	9	11,6
1205	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
1206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1207	20,6	18,3	-	-	-	-	16	-	-	-
1208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1213	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1214	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
1215	20	-	-	-	16	-	-	-	-	-

Çizelge 3.2. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) (Devam)

İZOLAT KODU	BAKTERİ				MAYA		KÜF			
	Gr (+)		Gr (-)		5	6	7	8	9	10
	1 ^a	2	3	4						
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	15,6	-	-	-	-	-
Mikostatin	-	-	-	-	-	11,6	9,3	8,6	8,3	9,3
1216	13	13	-	-	15	-	-	-	-	-
1218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1223	-	-	-	-	19,3	17	11,3	12	11,3	16,3
1224	-	15	-	-	17,5	-	-	-	-	-
1225	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1228	-	-	-	10	18	-	-	-	-	-
1230	32,6	24,6	15,3	13	-	-	-	-	-	-
1231	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1302	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1304	20,5	-	12,5	18	-	-	-	-	-	-
1306	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1308	13	10	15	10	12	-	-	-	-	-
1309	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1311	10,3	11	-	-	15,3	8,6	12,3	12,3	-	-
1312	18	17,5	15	20	-	-	-	-	-	-
1314	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1401	-	-	-	-	21	15	-	-	11,2	-
1403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1405	9,3	-	-	-	7,5	-	-	-	-	-
1407	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1408	-	-	-	-	19,6	15,6	-	-	10,6	-
1409	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1413	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1419	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1420	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-
1421	11,6	8,3	-	8	-	-	-	-	-	-
1423	21,3	13,3	10	17	14,6	13	13,3	8	18	-
1425	10	9,3	-	-	-	-	-	-	-	-
1429	17	8,5	-	10	-	-	-	-	-	-
1431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1432	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1433	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1435	12	-	-	8	-	-	-	-	-	-

Çizelge 3.2. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) (Devam)

İZOLAT KODU	BAKTERİ				MAYA		KÜF			
	Gr (+)		Gr (-)		5	6	7	8	9	10
	1 ^a	2	3	4						
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	15,6	-	-	-	-	-
Mikostatin	-	-	-	-	-	11,6	9,3	8,6	8,3	9,3
1437	-	-	-	-	9,6	-	7	-	-	-
1439	9,3	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-
1440	-	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-
1442	-	-	-	-	6	-	16,3	11	-	-
1445	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1446	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1460	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1462	-	-	-	-	17,6	13	-	-	-	-
1463	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1464	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-
1465	-	-	11	-	14	11,6	-	-	9,6	-
1470	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1471	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1472	13	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-
1473	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1474	7,5	-	-	5	-	-	-	-	-	-
1478	-	-	-	10	12,5	-	-	-	-	-
1481	22	22,5	16	-	-	-	-	-	-	-
1482	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1483	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1485	19	16	14	17	-	-	-	-	-	-
1492	24	26	15,3	-	-	-	-	-	-	-
1496	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1497	8,6	9	-	-	8	7	-	-	-	-
1498	13	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1502	10	-	-	-	10	11	-	-	-	-
1503	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1504	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1507	8	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1510	-	-	-	-	20	14	-	-	-	12
1511	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1515	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-

Çizelge 3.2. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) (Devam)

İZOLAT KODU	BAKTERİ				MAYA		KÜF			
	Gr (+)		Gr (-)		5	6	7	8	9	10
	1 ^a	2	3	4						
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	15,6	-	-	-	-	-
Mikostatin	-	-	-	-	-	11,6	9,3	8,6	8,3	9,3
1601	12	10	-	-	-	-	-	-	-	-
1602	13	11	-	8	-	-	-	-	-	-
1605	11	8,6	14,3		10,6	11	13		11,3	9
1606										
1607	-	10	-	8	-	-	-	-	-	-
1608	14	16	-	10	-	-	-	-	-	-
1612	-	-	-	-	-	-	12,6	14	11	11,6
1613	12,6	10,3	10,3	9,3	14,3	15	-	-	-	-
1614	10,6	8,6	10,3	8,6	12	11,6	10,6	13	11,6	9,3
1615	8	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1620	15	19	-	-	-	-	-	-	-	-
1701	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1702	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1703	9	-	12	-	-	-	-	-	-	-
1705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1706	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1708	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1802	11	-	-	8	-	-	-	-	-	-
1803	9	-	8	8	-	-	-	-	-	-
1804	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1806	9	-	9	-	-	-	-	-	-	-
1807	-	13	15	13	-	-	-	-	-	-
1808	-	-	-	-	-	-	8,6	11	12	10,6
1812	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1814	12	13	10	13	-	-	-	-	-	-
1815	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
1818	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
1819	-	-	-	10	9	-	-	-	-	-
1820	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1822	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1823	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1824	-	-	-	-	18	-	-	-	-	11
1825	10	9,3	12,3	11	16,3		11		12,6	11
1827	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1828	8	-	-	9	-	-	-	-	-	-
1902	17	-	-	9	-	-	-	-	10	-

Çizelge 3.2. İzole edilen aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotiklerin denemeye alınan test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zon çapları (mm) (Devam)

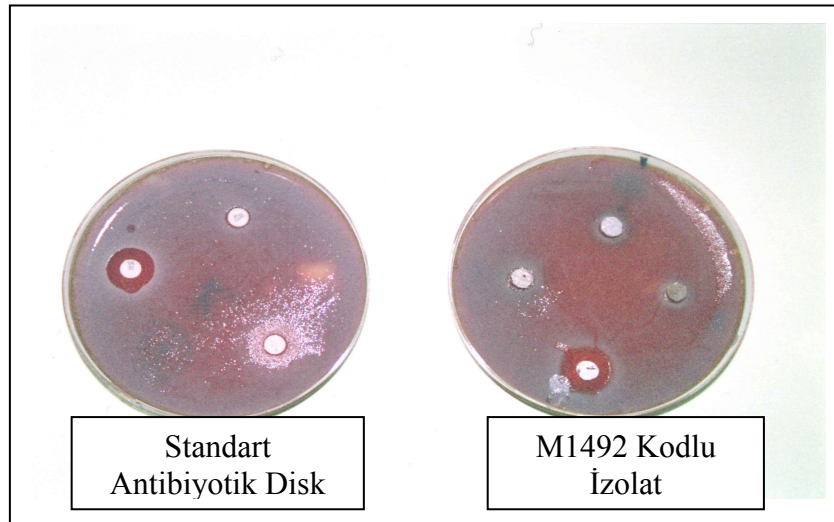
İZOLAT KODU	BAKTERİ				MAYA		KÜF			
	Gr (+)		Gr (-)		5	6	7	8	9	10
	1 ^a	2	3	4						
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	15,6	-	-	-	-	-
Mikostatin	-	-	-	-	-	11,6	9,3	8,6	8,3	9,3
1903	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1904	16	13	-	-	-	-	-	-	-	-
1907	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1912	13	15	-	8	-	-	8	-	10	-
1913	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1914	-	-	-	-	12	-	-	-	-	16
1915	15	14	-	8	-	-	-	-	-	-
1917	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1918	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1921	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
1922	10,3	12,6	-	-	-	-	-	-	-	-
1923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1925	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1927	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-
1928	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1931	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1932	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1934	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1935	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1936	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- ^a1. *Bacillus cereus* 5. *Candida albicans* 8. *Aspergillus flavus*
2. *Staphylococcus aureus* 6. *Geotrichum candidum* 9. *Fusarium moniliforme*
3. *Pseudomonas aeruginosa* 7. *Aspergillus parasiticus* 10. *Fusarium culmorum*
4. *Esherichia coli*

^bKontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin konsantrasyonu, 30 mg/ disk olacak biçimde kullanılmıştır.

3.3. Aktinomisetlerin Klinik İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotik disklerin, MRSA, VRE, *A. baumannii*' ye karşı antibakteriyal aktiviteleri denenmiştir. Gözlenen sonuçlarda özellikle dikkat çekici sonuç veren 1492 kodlu aktinomiset izolatının , standart antibiyotik diskler; Vancomycin ve Gentamycin, düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotik disklerin MRSA, VRE, *A. baumannii*' ye karşı antibakteriyal aktivitesi Çizelge, 3.3.' de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Aktinomiset izolatlarının (M1492) ve standart antibiyotik disklerin Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyal aktivitesi

Çizelge 3.3. Aktinomiset izolatlarının ve standart antibiyotik disklerin MRSA, VRE, *A. baumannii*' ye karşı antibakteriyal aktivitesi zon çapları (mm)

İZOLAT KODU	KLİNİK İZOLATLAR		
	MRSA(Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i>)	VRE (Vancomycin Resistant <i>E. faecium</i>)	<i>A. baumannii</i>
105	10	-	10
320	-	9	10
404	-	-	-
1421	8	-	-
1492	15	12,3	10
1613	-	-	-
1910	8,6	-	-
Erytromycin (E 15)	-	-	-
Ceftrizoxime (ZOX 30)	-	-	-
Gentamycin (CN 30)	-	-	8,5
Vancomycin (VA 30)	14,5	-	8

3.4. Numerik Taksonomi ile İzolatların Tanılanması

3.4.1. İzolatların Renk Gruplarının Belirlenmesi

İzolatlar, besiyerlerinde oluşturdukları belirtilen renkler dikkate alınarak ISP 3 besiyerinde 13 renk grubuna, ISP 4 besiyerinde ise 20 renk grubuna ayrılmıştır. Bu renk gruplarından seçilen 131 adet izolat, numerik taksonomik çalışmalarda kullanılmak üzere test organizması olarak ayrılmıştır.

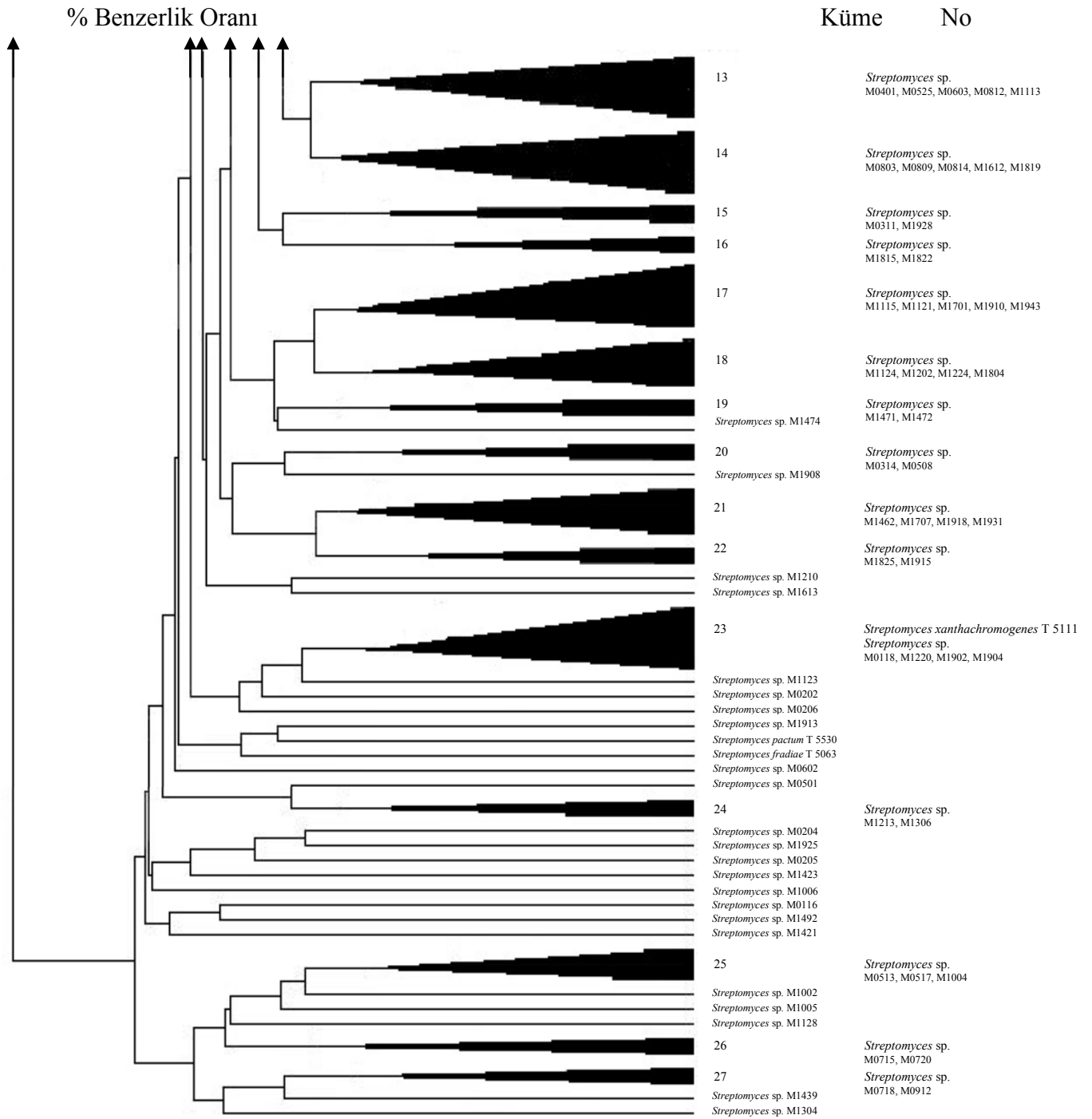
3.4.2. Nümerik Taksonomi Testleri

Nümerik taksonomi testleri, 131 test organizması, 33 duplike suş ve 35 *Streptomyces* tip örneğini kapsayan toplam 199 taksonomik birim ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, degradasyon, fizyolojik, morfolojik ve pigmentasyon

testlerinden oluşan toplam 134 test uygulanmıştır. Toplam 199 test suşunun 134 birim karaktere ilişkin verileri pozitif (+) ya da negatif (-) olarak kodlanmıştır.

Böylece, Türkiye' nin çeşitli ilerinde yer alan mağaralardan elde edilen *Streptomyces* izolatlarının standart tip türler ile benzerlik dereceleri belirlenmiştir. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve Complete algorithm analizlerine göre, mağaralardan izole edilen *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram, Şekil 3.3' de sunulmuştur.





Şekil 3.3. Nümerik verilerin Simple matching coefficient (S_{SM}) ve Compleat algorithm analizlerine göre, mağaralardan izole edilen *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram

Toplam 199 test suşu, simple matching coefficient (S_{SM}) benzerlik katsayısı hesaplandıktan ve UPGMA algorithm analizlerine kümelere dağıtıldıktan sonra elde edilen dendrogram üzerinde % 80 benzerlik düzeyinde tanımlanmıştır. Analiz sonucunda 9 büyük (5-11 suş), 18 küçük (2-4 suş) ve 31 tek üyeli küme oluşmuştur.

3.5. Aktif Aktinomiset İzolatının Seçimi

Agar difüzyon yöntemi ile standart test mikroorganizmaları ve klinik mikroorganizmalarla antimikrobiyal aktivite belirlenme çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonuçlarında 1492 kodlu izolatın gram (+) ve gram (-) bakterilere kontrol olarak kullanılan Kloramfenikol antibiyotiğinden daha fazla ve klinik izolatlara kontrol olarak kullanılan Vancomycin antibiyotiği kadar etki göstermesi dikkat çekici bir sonuçlar olmasının yanı sıra, izolatın seçilmesindeki önemli nedendir.

Antibakteriyal aktivite gösteren *Streptomyces sp.* M1492 kodlu izolatın test mikroorganizmaları ve klinik izolatlar karşı inhibisyon zon çapları (mm) Çizelge 3.4.' te gösterilmektedir. Nümerik taksonomi testleri, 131 test organizması, 33 duplike suş ve 35 *Streptomyces* tip örneğini kapsayan toplam 199 taksonomik birim ile gerçekleştirilmiş ve *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogram incelenmiştir. Analiz sonucunda M1492 kodlu izolatın % 70 benzerlik düzeyin ile tip türlerden ayrılması ve tek üyeli küme oluşturması dikkat çekicidir. Ayrıca M1492 kodlu izolatın, numerik taksonomide antimikrobiyal aktivite belirleme testlerinde denenen 12 (8 bakteri,4 fungus) mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Antibakteriyal aktivite gösteren *Streptomyces sp.* M1492 kodlu izolatın test mikroorganizmaları ve klinik izolatlar karşı inhibisyon zon çapları (mm)

Deneme	Test Mikroorganizmaları						
	Standart Suşlar				Klinik İzolatlar		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	MRSA	VRE	<i>A. baumannii</i>
1492	24	26	15,3	-	15	12,3	10
Vancomycin	-	-	-	-	14,5	-	8
Kloramfenikol ^b	16	18,6	10,6	18,6	-	-	-

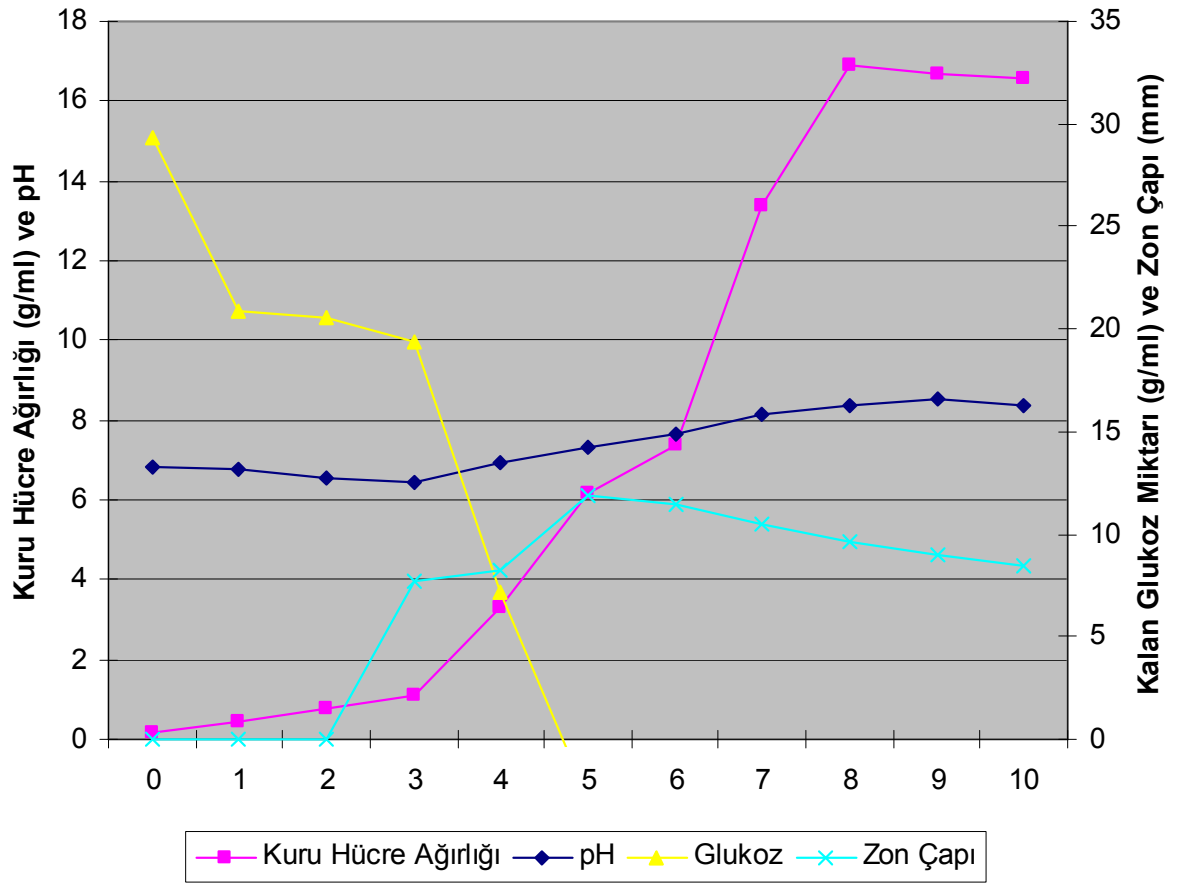
3.6. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi

Aktinomiset izolatı (M1492) sıvı besiyerlerinde 10 gün inkübe edilmiş, analizler için 24 saatte aralıklarla örnek alınmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen, kuru hücre ağırlığı, pH değişimi, glukoz miktarındaki değişim ve filtre kağıdından geçirilerek test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilen fermantasyon sıvısına ait zon çapları sonuçları ve hücre kuru ağırlığın kalan glukoz miktarına oranları Çizelge 3.5’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Fermantasyon Sıvısında; pH Değişimi, Kuru Hücre Ağırlığı, Glukoz Miktarı Tayini, Test Mikroorganizmalarına Karşı İnhibisyon Zon Çapları (mm), Hücre Kuru Ağırlığın Kalan Glukoz Miktarının Oranları ($Y_{h/g} = \text{g hücre kuru ağırlığı} / \text{g kalan glukoz}$)

GÜNLER	pH Ölçümleri	Kuru Hücre Ağırlığı (g/l)	Kalan Glukoz Miktarı (g/l)	Test Mikroorganizmalarına Karşı İnhibisyon Zon Çapları (mm)	$Y_{h/g}$
0	6,81	0,16	29,31	-	0,005
1	6,78	0,46	20,86	-	0,022
2	6,54	0,79	20,56	-	0,038
3	6,43	1,12	19,41	7,70	0,057
4	6,96	3,31	7,18	8,20	0,461
5	7,33	6,19	0	11,90	0
6	7,65	7,35	0	11,50	0
7	8,13	13,38	0	10,50	0
8	8,36	16,89	0	9,60	0
9	8,50	16,67	0	9,00	0
10	8,36	16,59	0	8,50	0

Sıvı besiyerinde geliştirilen *Streptomyces* (M1492) izolatının kuru hücre ağırlığı, pH değişimi, besiyerinde kalan glukoz miktarı ve antimikrobiyal aktivite zon çaplarını gösteren grafik Şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.4. *Streptomyces* (M1492) kuru hücre ağırlığı, pH değişimi, besiyerinde kalan glukoz miktarı ve antimikrobiyal aktivite zon çapları

Streptomyces (M1492), antimikrobiyal etkili madde üretimi 3-4. gün başlamakta ve 5.-6. günler en yüksek dereceye ulaşmaktadır. pH değeri 3-4. gün düşme eğilimi göstermekte ancak daha sonraki günler çok olmasa da yükselme eğilimi göstermektedir. 5. gün kuru hücre ağırlığının hızla arttığı, glukoz miktarının ise tamamen tükendiği görülmektedir.

3.7. Antimikrobiyal Etkili Maddenin İzolasyonu ve Biyootografi

Atinomiset izolatu (M1492) tarafından üretilen antimikrobiyal etkili madde izolasyonu için, solvent ekstraksiyonu, ince tabaka kromatografisi çalışmaları yapılmış ve daha sonra spotların biyolojik aktiviteleri biyootografi yöntemiyle belirlenmiştir.

Polariteleri farklı çeşitli çözücülerle işleme tabi tutulan antimikrobiyal etkili maddenin daha sonra MRSA (Metilen Resistant *S. aureus*) karşı antimikrobiyal etkisi denen çözücü sistemlerine ait sonuçlar Çizelge 3.6' da verilmiştir.

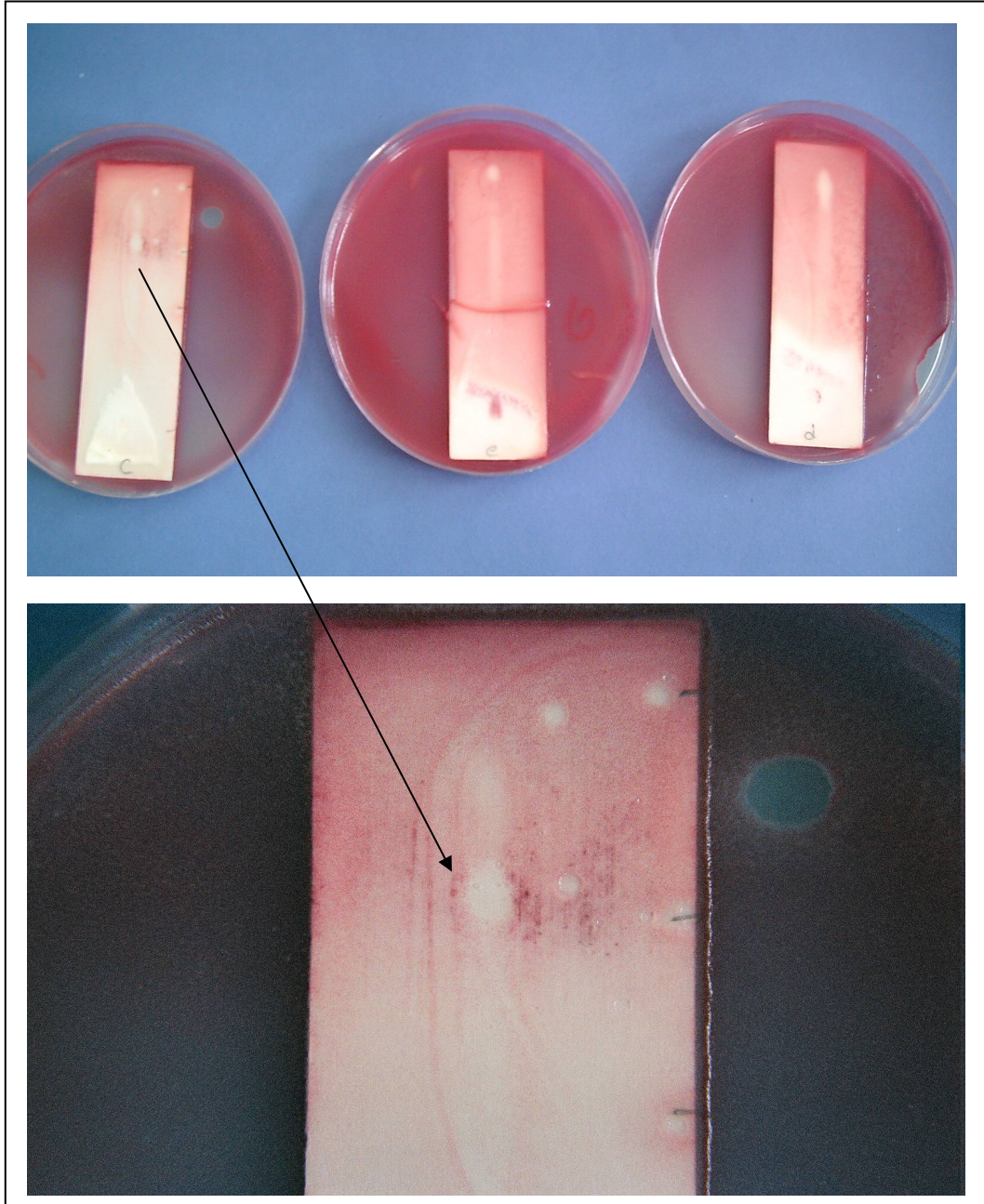
Çizelge 3.6. MRSA (Metilen Resistant *S. aureus*) karşı antimikrobiyal etkisi denen çözücü sistemlerine ait zon çapları (mm)

GÜN	Diklorometan	Etil Asetat	Etil asetatla Muamele edilmiş sulu faz	Kloroform	Kloroform + Methanol	Dietyl Eter	Hegzan	Hegzanla Muamele edilmiş sulu faz
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	7	-	-	-	-	7,6
4	-	-	7,6	-	-	-	-	7,6
5	-	11,6	10	-	-	13,6	-	10,6
6	-	9,6	12,3	-	-	11,3	-	10,6
7	-	9,3	10,6	-	-	10,6	-	9,3
8	-	10	9,3	-	-	11	-	9
9	-	10,6	9,3	-	-	9,6	-	8,3
10	-	9,6	8,6	-	-	9,6	-	7,6

Çeşitli çözücü sistemlerle ince tabaka kromatografi (İTK) çalışması yapılarak antimikrobiyal etkili maddenin yürütülmesiyle belirlenen spotların R_f değerlerine ve spotların biyolojik aktivitelerine ait sonuçlar Çizelge 3.7' de verilmiştir. Spotlarda biyolojik aktivite varlığı pozitif (+), biyolojik aktivite yoksa negatif (-) olarak ifade edilmiştir. Biyootografi çalışmasında, inhibisyon etkisine sahip spotların *S. aureus* ' a karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Şekil 3.5' de verilmiştir.

Çizelge 3.7. İTK ile belirlenen spotların R_f değerleri ve spotların biyolojik aktiviteleri

Çözücü Sistemi	Karışım Oranları	Çözücü Mesafesi (cm)	Spot 1	R_f 1	Spot 2	R_f 2	Spotların Biyolojik Aktiviteleri
Su : Metanol	10 : 90	5,7	4,1	0,71	-	-	-
Su : Metanol	15 : 85	5,7	4,1	0,71	-	-	-
Su : Metanol	20 : 80	5,7	3,1	0,54	4,3	0,75	-
Su : Metanol	25 : 75	5,9	2,9	0,50	4,1	0,69	+
Su : Metanol	30 : 70	5,7	3	0,52	-	-	+
Su : Metanol : Etanol	15 : 80 : 5	5,7	4	0,70	-	-	-
Su : Metanol : Etanol	20 : 75 : 5	5,5	4	0,72	-	--	+
Su : Metanol : Etanol	25 : 70 : 5	5,7	2,9	0,50	4,1	0,71	
Su : Metanol : Etanol	30 : 65 : 5	6	3	0,50	-	-	+
Su : Metanol : Aseton	20 : 75 : 5	5,6	3,7	0,66	-	-	-
Su : Metanol : Aseton	90 : 10	5,5	3,2	0,58	-	-	-
Su : Metanol : Diklorometan	90 : 10	5,8	-	-	-	-	-
Su : Metanol : Etanol : Aseton	20 : 70 : 5 : 5	5,6	3,5	0,62	-	-	-



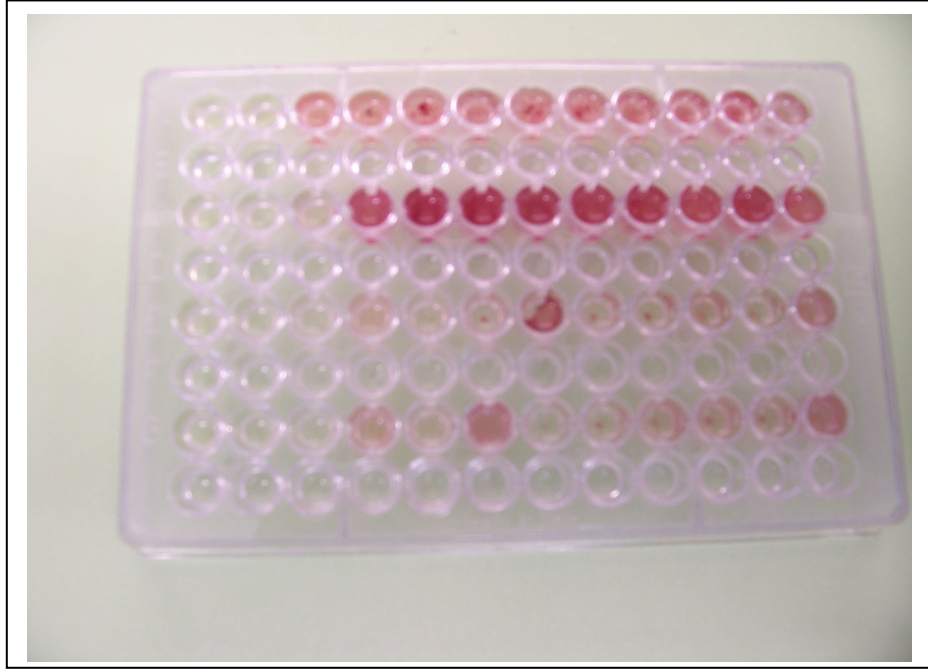
Şekil 3.5. Biyootografi çalışmasında, inhibisyon etkisine sahip spotların *S. aureus*' a karşı oluşturduğu inhibisyon zonları

3.8. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Antimikrobiyal etkili madde (2 mg/ ml) ile farklı konsantrasyon serisi hazırlanarak, 4 farklı bakteri türü ile yapılan MİK testine ait sonuçlar Çizelge 3.8 ve Şekil 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.8. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu, Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu

Kullanılan Mikroorganizmalar	MİK (MBK) µg/ml	
	Streptomycin	Antimikrobiyal Etkili Madde
<i>S. aureus</i>	125 (250)	250 (>1000)
<i>A. baumannii</i>	1000 (>1000)	125 (1000)
MRSA (Methicillin-Resistant <i>S. aureus</i>)	1000 (>1000)	125 (1000)
VRE (Vancomycin Resistant <i>E. faecium</i>)	1000 (>1000)	125 (250)



Şekil 3.6. Antimikrobiyal etkili madde ile yapılan MİK çalışması

3. 9. Aktif Molekülün Sıcaklık Toleransı

Antimikrobiyal etki madde sıcaklık toleransı çalışması için 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika, 100 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika işleme tabi tutulmuştur. Aktif maddenin sıcaklık toleransı Disk Difüzyon (Çizelge 3.9) ve MİK/MBK (Çizelge 3.10) çalışmaları yapılarak test edilmiştir.

Her iki çalışma için, test mikroorganizması *S. aureus*, klinik mikroorganizmalar MRSA, VRE, *A. baumannii* kullanılmıştır.

Çizelge 3.9. Aktif molekülün sıcaklık toleransının “Disk Difüzyon” yöntemiyle belirlenmesi (%)

Sıcaklık (°C)	İşlem Süresi (dk)	Antimikrobiyal aktivite (%)			
		<i>S. aureus</i>	MRSA	VRE	<i>A. baumannii</i>
İşlem yok		100	100	100	100
60	30	67	77	98	70
100	5	58	77	-	-

Çizelge 3.10. Aktif molekülün sıcaklık toleransının “Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu, Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu” yöntemiyle belirlenmesi

Sıcaklık (°C)	İşlem Süresi (dk)	MİK (MBK) µg/m			
		<i>S. aureus</i>	MRSA	VRE	<i>A. baumannii</i>
İşlem yok		250(>1000)	125 (1000)	125 (250)	125 (1000)
60	30	250(500)	500 (1000)	125 (500)	250 (500)
100	5	125 (500)	500 (1000)	500 (1000)	500 (1000)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Mağaralardan Aktinomiset İzolasyonu ve Korunması

Toprak altı yaşam çevrelerinin mikrobiyolojik özellikleri çok ilgi çeken bir konu olsa da, bu ortamlarda bulunan aktinomisetler ile ilgili çalışmalar son 20 yılda önceye uzanmamaktadır. Mağaralardan aktinomiset izolatlarının elde edilmesi amacı ile Groth ve arkadaşları (1999 a,b), klasik seyreltme plaka yönteminin yanı sıra direk örnekleme amacı ile mağara oluşumlarını yüzey sürme yöntemi ile örneklemişlerdir. Bu çalışmalar sonucunda mağaralardan elde edilen yeni aktinomiset türlerinin sayısının giderek arttığı görülmektedir (Groth et al., 1999a, 2002, Lee et al., 2000).

Bu çalışmada, ülkemizin Ankara, Antalya, Bartın, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Eskişehir, İzmir, Karabük ve Konya gibi illerinden toplam 19 mağaradan yapılan örnekleme sonucunda 290 aktinomiset izole edilmiştir. İzolasyon direkt temas ve seyreltme plaka yöntemleri ile gerçekleştirilmiş olup, elde edilen izolatlar nişasta kazein agar içeren tüplerde +4°C’de ve/veya %20’lik gliserol içeren cryotüplerde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Pek çok araştırmacı benzer izolasyon yöntemlerini kullanarak mağaralardaki mikrobiyotayı incelemiş, ilgi çekici sonuçlar elde etmişlerdir.

Laorpaksa ve arkadaşları (1987) Tayland da altı farklı mağara toprağından aktinomiset izolasyonu ve antibiyotik üretimi çalışmalarında, mağaradan izole edilen örnekleri 6 cm derinlikteki kaplarda +4 °C’ de muhafaza etmişlerdir. 10 g toprak örneğı ile hazırlanan dilüsyonları, Patato Dextrose Agar’ a ekmiş 28-30 °C’ de 3-5 gün inkübasyon sonunda oluşan kolonileri PDA tüplerine aktarıp +4 °C’ de muhafaza etmişlerdir.

Gonzelez ve arkadaşları (1999) güney İspanya’ da Atlanterra mağarasında yaptıkları çalışmada, mağara duvarlarındaki tarih öncesi resimlerden bakteri izolasyonu yapmışlardır. İzole edilen 21 bakterinin izolasyonu Hygincult ve Tryptic Soy Agar plaklarında inoküle edilerek sağlanmıştır.

Canaveras ve arkadaşlarının (1999) yaptığı araştırmada mağaralardan izole edilen *Streptomyces* izolatlarının laboratuvar ortamında kalsiyum karbonatı çöktürme özelliğinde oldukları tespit etmiştir. Bu araştırma aktinomisetlerin mağara mineral depolarının oluşumunda rol oynayabilecekleri görüşünü desteklemektedir.

Groth ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada mağara tavan ve duvarları üzerindeki nemli alanlarda kümelenmiş beyaz noktalar biçiminde görülen kolonilerin aktinomiset kolonisi olduğu ve bu aktinomisetlerin önemli kısmının kaya ve oluşum yüzeylerinde göz ile görülebilen büyüklükte koloniler oluşturabildiği tespit edilmiştir. Doğrudan kolonilerden izolasyon yolu ile elde edilen aktinomiset türleri arasında *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Nocardioides*, ve *Rhodococcus* cinslerine ait örnekler sayılmaktadır (Groth et al., 1999 b).

Groth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar (2001), bu mağaradan elde edilen aktinomiset izolatlarının mağaradaki sarkıt, dikit vb. mineral depolarının oluşumunda önemli role sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Annette ve arkadaşları (2001) Virginia Cesspool mağarasında yaptıkları araştırmada, mağaranın hidrojen sülfatça zengin sularından ve duvar su filmlerinden izole ettikleri örnekleri steril tüplere almış ve laboratuarda % 50 (v/v) gliserol içeren tüplerde -80 °C, de muhafaza etmişlerdir.

Herold ve arkadaşları (2005) İtalya' daki antik Grotta dei Cervi mağarasında yaptıkları araştırmada 5000 yıllık (kırmızı ve siyah renkteki boyalarla) mağara resimlerinin, çevresinden izole ettikleri *Streptomyces* türü (*Streptomyces tendae*) tarafından üretilen Cervimycin isimli yeni bir antibiyotiği, fermantasyon ve izolasyon çalışmaları sonucunda bulmuşlar ve analiz etmişlerdir.

4.2. Test Mikroorganizmalarına Karşı Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu çalışmada, 19 doğal mağaradan izole edilen 290 izolatın “agar piece” metodu ile antimikrobiyal aktivite sonuçlarında, kültürlerin bir kısmının mikroorganizmalar karşı aktivite göstermediği, bir kısmının sadece bakterilere, mayalara ya da küflere etkili oldukları tespit edilmiştir. Standart test mikroorganizmalarına karşı geniş spektrumlu etki gösteren, 5 izolat, gram (+), gram (-) bakteriler, mayalar ve küflerden en az birine etkilidir. Bunlar, diğer izolatlara göre çok daha yüksek zon çapları ile dikkat çekici sonuçlar veren aktinomiset izolatlarıdır. Bakterilere karşı 20 mm ve üzerinde zon çapı veren 8, mayalara karşı 4, küflere karşı 2 aktinomiset izolatı tespit edilmiştir.

Uygulamalarda kontrol olarak Kloramfenikol, Mikostatin antibiyotikleri kullanılmıştır. Alınan sonuçlarda bazı aktinomiset izolatları kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerden daha yüksek zon çapı vermişlerdir. Kloramfenikol' den daha yüksek zon çapı veren 22, Mikostatin'den daha yüksek zon çapı veren 16 izolat bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan ve etki mekanizmaları bilinen bu iki antibiyotikten, daha iyi sonuçlar alınması umut vericidir.

Aktinomiset kültürlerinin % 33'ü sadece gram (+) bakteriler, %27' si sadece gram (-) bakteriler ve % 15,17'si her iki grup üzerinde antibakteriyal etkili oldukları, % 19 unun mayalar, % 14,82' sinin küfler üzerinde etkili oldukları; bununla beraber %38,1'inin de etkisiz oldukları saptanmıştır.

Doğal mağaralar biyoaktif metabolit üretme potansiyeline sahip aktinomiset izolatlarının eldesi için ideal ortamlardır. Özellikle son yıllarda bu konu üzerinde pek çok araştırmacı mağaralardan izole edilen aktinomisetlerin özellikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar yapmışlardır.

Laorpaksa ve arkadaşları (1987) Tayland da altı farklı mağara toprağından izole edilen 104 aktinomiset örneğinden, 51 aktif örnek arasından, test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite oranının % 49.04 olarak belirlendiği bu çalışma da var olan potansiyeli ifade etmektedir.

Mallory ve arkadaşları (1994) mağaralardan izole ettikleri mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmalarda kanser kemoterapisinde kullanılabilecek metabolitler üreten mikroorganizmalar rapor etmişlerdir.

Kim ve arkadaşları (1998), doğal mağaralardan bitki patojeni fungusların inhibisyonu amacı ile antagonistik aktinomiset izolatları elde edebilmişlerdir. Bu çalışmada Kore' deki çeşitli doğal mağaralardan elde edilen toplam 136 aktinomiset izolatının 96 kadarının antifungal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Groth ve Saiz-Himenez' in yaptığı çalışmada (1999), mağarada yer alan heterotrof bakteriler arasında aktinomisetlerin dominant olduğu ifade edilmektedir.

Nakhimovskaia' nin (1937), Kuzey Kanada topraklarından izole edilen 600 aktinomisetin antibiyotik aktivitesi üzerine yaptığı çalışmada, izole edilen kültürlerin %47' sinin *S. aureus*, %8.2' sinin *E.coli*, %19.5' inin *Mycobacterium tuberculosis* üzerine etkili oldukları saptanmıştır.

Nedialkova ve arkadaşları tarafından (2004, 2005) Antartica' da yapılan diğer bir çalışmada, topraktan izole edilen 40 aktinomiset ile 7 farklı gram (+), gram (-) bakteri ve 16 farklı fungus test mikroorganizması olarak kullanılmış ve birçok aktinomiset örneğinden olumlu sonuç alınmıştır.

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

Aslan (1999) Çukurova üniversitesi kampüsü toprağından, *Streptomyces* genusuna ait 12 *Streptomyces* türünün izolasyonunu gerçekleştirmiş ve yüksek aktiviteye sahip 4 suş tanımlaması yapılmıştır.

Yıldırım (2004) yaptığı çalışmasında, Eskişehir il sınırları içindeki çeşitli lokalitelerden alınan 390 adet aktinomiset izolatının % 23' ünün bir ya da daha fazla test mikroorganizmasına karşı aktif olduğu, % 40' nün antifungal aktiviteye, % 73' nün antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Gr (-) bakterilerin diğer test mikroorganizmalarına nispeten daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir.

Şahin ve arkadaşları tarafından (2003) yapılan başka bir çalışmada ise, Muğla yöresi topraklarından 74 farklı *Streptomyces* izolatu elde edilmiş, bazı *Streptomyces* izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmıştır. İzolatların %45.9' unda antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. 15 izolat koagülaz-negatif Stafilokoklara (CoNS) karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterilmiştir. Bu izolatların Gram pozitif, Gram negatif bakteriler ve mayalara karşı in vitro antimikrobiyal aktiviteleri kapsamlı olarak çalışılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, 5 izolatın 20 mm inhibisyon zonuyla CoNS ve mayalara karşı yüksek derecede aktiftir. Bu izolatların üçü, *Streptomyces antibioticus* (MU106, MU107) ve *S. rimosus* (MU114) olarak tanımlanmıştır.

Çalışmamız, doğal mağaraların izolasyon ortamı olarak seçilmesi, antimikrobiyal aktivite tespiti için bakteri, maya, küf gibi farklı mikroorganizmalarla çalışılmış olması ve benzer çalışmalardan daha geniş etki alanı araştırılmış olması, dikkat çekici sonuçlar alınması ve tabii ülkemizde alanında yapılan ilk çalışma özelliği taşıması nedeni ile dikkat çekicidir.

4.3. Aktinomisetlerin Klinik İzolatlara Karşı Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmalarında izlenen yöntemin aynısı, klinik izolatlardan MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (Vancomycin Resistant *E. faecium*), *A. baumannii* ile kanlı agarda, 7 aktinomiset izolatı (105, 320, 404, 1421, 1492, 1613, 1910 kodlu) ile gerçekleştirildi. Alınan sonuçlarda özellikle 1492 kodlu izolatın her üç klinik bakteriye karşı etkili olduğu ve kullanılan standart antibiyotiklerden daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda da dirençli bakterilere karşı etkili izolatı bulmak ilk hedeflerdendir. Bu nedenle çalışmamız dikkat çekici sonuçlar vermiştir. Ayrıca 1492 kodlu izolatın yanı sıra, 105, 320, 1421, 1910 kodlu izolatların da bazı klinik izolatlara karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Ülkemizde Çolak (2006) doktora tezinde, İtalya da Herold ve arkadaşları (2005) araştırmalarında, benzer yöntemlerle klinik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapmışlardır. Özellikle son yıllarda klinik izolatlara karşı aktivite gösteren izolatlar ve ürettikleri aktif madde üzerine çalışmalar artmaktadır. Araştırmacıların ortak hedefi antibiyotiklere karşı dirençli olan ve giderek sayıları artan mikroorganizmalara karşı yeni ve etkili antibiyotik keşifleridir. Bu aşamada çalışmamız, özellikle 1492 kodlu izolattan alınan sonuçlar açısından umut vericidir.

4.4. Numerik Taksonomi ile İzolatların Tanınması

Bu çalışmanın hedeflerinden birisi de antimikrobiyal aktivite gösteren *Streptomyces* izolatlarının nümerik metodlarla değerlendirilmesidir. Bu amaçla izolat suşlarla birlikte tanımlanmış *Streptomyces* tip türleri ve duplike suşların ilave edildiği test organizmaları için, standart nümerik testler tasarlanmış ve uygulanmıştır.

Nümerik taksonomi, çok sayıda ve eşit önemde karakterin birlikte değerlendirilmesine dayalı olarak gerçekleştirildiği için, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek görülmektedir. Nümerik taksonomik çalışmalardan elde edilen verilerin güvenilirliğinin artmasını sağlayan diğer bir faktör ise, aynı suşların farklı numara ile kodlanarak duplikat olarak testlere dahil edilmesi ve elde edilen

sonuçların karşılaştırılmasıdır. Bu yolla test hatası hesaplanarak, çalışmanın güvenilirliği de kontrol edilmektedir. Ayrıca, kullanılan her bir karakter, gösterdiği test hatasına bağlı olarak tekrarlanabilmektedir. Bir karaktere ilişkin test hatası yüksek ise, bu testin hesaplamalardan çıkartılması ve bu yolla elde edilen sonuçların doğruluk oranının arttırılması da mümkün olabilmektedir. Bu çalışmada klorid (% 13) te büyüme (AAV), gallik asit kullanımı (ADB), safranin kullanımı (AEA), kahve havasal misel ve spor kitlesi rengi (AEG), kırmızı havasal misel ve spor kitlesi rengi (AEH), siyah havasal misel ve spor kitlesi rengi (AEL), eflatun çözümlü pigment rengi (AEV), kırmızı çözümlü pigment rengi (AEW) ve verticillate tipte spor zinciri (AFD) karakterleri, yüksek test hatası nedeni ile son veri matrisinden çıkarılmıştır. Sonuç olarak elde edilen toplam test hatası değeri % 0.5 olarak hesaplanmıştır. Test hatasının % 10 oranına kadar kabul edilebilir olarak değerlendirildiği göz önüne alınır ise (Sneath and Johnson, 1972), verilerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu düşünülebilir.

290 örnek arasından seçilen 1492 kodlu izolat test mikroorganizmalarından gram (+), gram (-) bakteriler ve klinik bakteriler üzerinde etkili olmuştur. Ayrıca numerik taksonomi ile izolatların tanılanmasında, antimikrobiyal aktivite belirleme testlerinde denenen 12 (8 bakteri, 4 fungus) mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve tip türler ile benzerlik derecesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları ışığında *Streptomyces* M1492 kodlu izolat sonraki aşamalar için seçilmiştir.

4.5. Antimikrobiyal Etkili Maddenin Üretimi

Bu aşamada sporulasyon, üretim ortamları için seçilen besiyeri içeriği, besiyerinin pH' sı, uygun sıcaklık, çalkalama hızı ve üretim süresi aktinomisetin gelişmesi ve antimikrobiyal etkili madde üretimi açısından önemlidir. Bu nedenle daha önceki araştırmalarda kullanılan yöntemler araştırılmış ve araştırmalardan alınan sonuçlar ışığında uygun besiyeri içeriği ve parametreler seçilmiştir.

El-Enshasy ve arkadaşları (2000), Şahin ve arkadaşları (2003) *Streptomyces*' lerin sporulasyonu için ISP2 kullanmışlardır. Yapılan çalışmalar en iyi sporlanmanın

ISP2 ortamında 7 gün 28°C' de inkübasyon ile sağlandığını göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda sporulasyon için ISP2 ve İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) ortamları kullanıldı.

Laorpaksa ve arkadaşları Tayland' da (1987), fermantasyonla üretim aşamalarında sıvı ortam olarak üç farklı ortam kullanmış en iyi sonucu soya unu ortamından almışlardır.

Gesheva ve arkadaşlarının (2004) *Streptomyces hygroscopicus*' in ürettiği antibiyotik üzerine yaptıkları çalışmada, fermantasyonla üretim aşamasında soya unu katkılı besiyeri ortamı kullanmışlar ve besiyerine % 0.5 oranında soya unu ilavesinin antimikrobiyal aktiviteyi etkilediği belirtmişlerdir.

Soya unununun azot kaynağı olarak fermantasyon ortamında mikrobiyal büyüme için uygun bir ortam olduğu pek çok araştırmacı tarafından tespit edilmiş ve birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Denizci, 1996).

Çalışmamızda ISP2 petriyelerinde 7 gün gelişen sporlardan daha sonra soya unu içerikli gelişim ortamına 1×10^8 , daha sonra da gelişme ortamından soya unu içeren fermantasyon ortamına % 5 oranında inokulasyon yapılmıştır.

Çalışma sonuçlarında besiyerinde bulunan glukoz miktarının önemini göstermektedir. Glukoz miktarının 20-30 g/ml arasında olduğu besiyerlerinde gelişimin daha iyi sonuçlar verdiği yine pek çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir; Gupte ve arkadaşları (2002) glukoz miktarını 20-30 g/ml, Harindran ve arkadaşları (1999), 16-41 g/l, Gesheva ve arkadaşlarının (2004), 30 g/l olarak kullanmışlar ve gelişim için uygun olabileceğini araştırma sonuçlarında belirtmişlerdir. Besiyerinde bulunan glukoz miktarının antimikrobiyal aktiviteyi, gelişimi ve dolayısı ile hücre ağırlığını etkilediği düşünülmektedir. Karbon kaynağının 5. günde tamamen tükendiği ve aynı gün antimikrobiyal aktivitenin maksimum seviyede olduğu görülmektedir. Gelişimin ilk gününden itibaren C kaynağını hızla tüketen hücrelerin, maksimum üretimin olduğu 5. -6. günlerde kuru hücre ağırlığının 6,19 - 7,35 g/l olduğu ve bu günlerden itibaren artışın hızla devam ettiği görülmektedir.

pH düzeyinin 6-8 arasında gelişim için uygun olduğu pek çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir; Gesheva ve arkadaşları (2004) pH 6,8, Harindran ve arkadaşları (1999) pH 6,1-7,38, Naik ve arkadaşları (2000-2001) pH 6,6-7,1, bu tespitleri yapan araştırmacılar arasındadır.

Çalışmamızda sıvı besiyerinin pH' sı 6,8 olarak ayarlanmıştır. pH seviyesinin ilk üretimin başladığı 3. güne kadar çok az miktarda düştüğü fakat daha sonra 8,3' e kadar arttığı gözlenmiştir.

Besiyerinin pH 'sının değişmesinde besiyerine katılan ve fermente olabilir karbonhidratların ayrışması sonu oluşan organik asitlerin, nitrojenli veya proteinli maddelerin dekompoze olması neticesinde meydana gelen amonyak veya alkali maddelerinin önemi fazladır. Ayrıca, hücrede oluşan ve dışarı çıkan diğer metabolizma artıkları da pH 'nın değişmesine büyük ölçüde etkilerler. Üremeyi olumsuz yönde etkileyen pH değişmesini önlemek için, besiyerine buffer'ler katılır. Bu amaçla, genellikle, ayrı ayrı veya birlikte K_2HPO_4 veya KH_2PO_4 kullanılır. Bunlar meydana getiren hidrojen (H) ve hidroksil (OH) iyonlarının serbest kalmasının önüne geçer ve onlarla birleşikler oluşturur. Bu nedenle de, ortamın pH 'sı hemen asit veya alkali olmaz bir süre optimal limitler arasında kalır (Arda, 2000).

4.6. Antimikrobiyal Etkili Maddenin İzolasyonu ve Biyootografi

Fermantasyon sonucunda etken maddenin izolasyonu ve aktivite tespiti için özel analizler gerekmektedir.

Aktinomiset izolatının (1492 kodlu) ürettiği antimikrobiyal etkili madde izolasyonu için öncelikle uygun solvent ekstraksiyonu seçimi yapılmıştır. Sonuçta maddenin, etil asetat ve dietil eterde çözüldüğü ve disk difüzyon yönteminde şeffaf zon oluşturduğu belirlenmiştir. Daha sonra maddenin polarite durumu belirlenmiş ve maddenin polar çözücülerde özellikle suda iyi çözüldüğü gözlenmiştir.

Bu sonuç etken maddenin izolasyonu için gerekli en kritik bilgiyi sağlamaktadır. Polaritesi tespit edilen maddenin izolasyonu için bir sonraki aşama İnce tabaka kromatografisi (İTK) sonucunda, maddenin oluşturduğu spotların R_f değeri hesaplanmıştır.

Hazırlanan solvent sistemlerinde, Su : Metanol , 25 : 75 oranında R_f değeri 0,50 olduğu, Su : Metanol, 30 : 70 oranlarında R_f değeri 0,52 olduğu , Su : Metanol : Etanol, 20 : 75 : 5 oranında R_f değerinin 0,72 olduğu, Su : Metanol : Etanol, 25 : 70 : 5 oranında R_{f1} değerinin 0,50 olduğu R_{f2} değerinin 0,71 olduğu belirlenmiştir. Oluşan

spotların biyolojik aktiviteleri biyootografi yöntemiyle belirlenerek, spotların bu çözücü sistemlerde aktif olduğu tespit edilmiştir.

Sıra ile önce maddenin polaritesinin belirlenmesi için solvent sistemi seçilmiştir. Bu şekilde İTK için uygun sistemle denemler yapılmıştır. İTK ile kültür sıvısında varolan maddelerin spotlar oluşturması sağlandı. Kültür sıvısı içeriğindeki maddeler polaritelerine göre farklı noktalarda spotlar oluşturacağından, sıvı içerisinde kaç farklı madde olabileceği tespit edilmiştir. Bu durum antibakteriyal aktivite gösteren iki fraksiyonunun farklı polaritelere sahip olduğunu düşündürmektedir. Kullanılan çözücü sistemine bakıldığında; R_f değeri 0,50 olan maddenin nispeten polar yapıda, R_f değeri 0,71 olan maddenin ise daha apolar yapıda olduğu söylenebilir. Oluşan farklı spotlardan hangisinin antimikrobiyal etkili maddeye ait spot olduğunun tespiti için biyootografi çalışması yapılmıştır. Oluşan zonun ölçülen R_f değeri 0,50 olanının antibakteriyal etkiye de neden olduğunu düşündürmektedir. Burada tespit edilen iki spot, aktinomiset izolatının iki ayrı madde ürettiğini ancak bunlardan sadece birinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

İnce tabaka kromatografisinin etken maddenin eldesi için en ucuz ve basit yol Denizci (1996) tarafından da vurgulanmıştır. Denizci (1996) yaptığı çalışmada, bu yöntemde, birçok örneğin tek bir plakada incelenmesi ve sülfirik asit spreyleneceği sonucu organik fraksiyonların ısıtılarak görülebilir hale geçirilmesinden dolayı, bu tekniğin avantajlı olduğu araştırmacılar tarafından da bildirildiğini belirtmiştir. Bu nedenle aktif molekül izolasyonu ile ilgili yaptığı her basamakta, fermantasyon sıvısından elde edilen ekstrakt ince tabaka kromatografisi ile incelemiştir.

Pelàez ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada antimikrobiyal etkili maddenin izolasyonu çalışmalarında uygun solvent seçimi için 2 ml üretim ortamı, 2 ml çözücü ilavesinin 15 dk çalkalama, daha sonra 15 dk 3000 devirde santrifüj işlemleri uygulanmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle aktivite çalışmaları yapılarak antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan yöntem çalışmamızda da başarı ile kullanılmıştır.

Paradkar ve arkadaşları (1998) *streptovercillium sp* ile yaptıkları çalışmalarda butanol-asetik asit-su (4:1:2) solvent sistemi ile İTK plakları üzerinde 2 biyoaktif spot (R_f 0,41 ve 0,46) tespit etmişlerdir. Aynı solvent sistemi kullanan Şahin ve

arkadaşlarının (2003) bazı *Streptomyces* izolatlarının antimikrobiyal aktivite çalışmalarında İTK plakları üzerinde 2 biyoaktif spot (R_f 0,60 ve 0,80) tespit etmişlerdir.

4.7. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK)

Bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyonu belirleme için izlenen yöntem pek çok araştırmada benzerdir. Ancak alınan sonuçlar açısından çalışmaların önemi değişmektedir.

Çalışmada 4 farklı bakteri ile (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, MRSA, VRE, *Acinetobacter baumannii*) Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu belirlenmiştir. MİK sonuçlarına göre, plaklarda farklı konsantrasyonlardaki kuyuculardan 100 µl alınarak petrilere aktarılmış ve inkübasyon sonunda Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) belirlenmiştir. MİK (MKB) değerleri; *S. aureus* 250 (>1000) µg/ml, MRSA 125 (1000) µg/ml, VRE 125 (1000) µg/ml, *A. baumannii* 125 (250) µg/ml olarak belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan Streptomycin'e yakın sonuçların alınmış olması da dikkat çekici bir bulgudur.

Antimikrobiyal etkili maddenin en düşük hangi miktarda etkili olabildiğinin ve sidal etkisinin tespiti açısından MİK ve MBK değerlerinin belirlenmiş olması önemlidir. Keza bir antibiyotığın etki (veya dirençli olduğu dozun) dozunun belirlenmesi tıbbi açıdan da önemlidir.

Harindran ve arkadaşları (1999) *Streptomyces* CDRIL-312 tarafından üretilen yeni antibiyotik üzerine yaptıkları çalışmalarda, agar dilüsyon metodu ile dilüsyon serileri hazırlayarak "Minimum İnhibisyon Konsantrasyon" belirlemiştir. MİK çalışmaları sonucunda bazı bakteriler, mayalar, ipliksi mantarlar bitki ve klinik patojenlere karşı, test edilen standart antibiyotikler (Hamycin, Aureofungin, Amphotericin B, Griseofulvin) kadar umut verici sonuçlar almışlardır. Bakterilerde 5,0-75 µg/ml, bitki patojenlerine 0,5-1,75 µg/ml, maya ve mantarlara 0,1-2,0 µg/ml, klinik patojenlerde 0,1-5,0 µg/ml aralıklarında etkili olduğunu gözlemlemiştir.

Paradkar ve arkadaşları (1998) *streptovercillium sp* ile yaptıkları çalışmalarda agar dilüsyon metodu ile bazı fungal ve bakteriyel organizmalara karşı MİK

belirlemişlerdir. Bakterilerde 5,0-2,5 µg/ml, bitki patojenlerine 2,0-10,0 µg/ml, maya ve mantarlara 1,0-1,25 µg/ml aralıklarında etkili olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, yöntemin etkinliği açısından fikir vermektedir. Keza, MİK Bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyon olarak tanımlanır (Anonymus, 2007 d). Maddenin çok küçük konsantrasyonların mikroorganizmalar üzerinde etkili olması istenen sonuçtur çünkü bu maddenin etki derecesinin yüksek olduğunu ve mikroorganizmalar üzerinde yüksek duyarlılığa neden olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda belirlediğimiz sonuçlarda bu anlamda umut vericidir.

4. 8. Aktif Molekülün Sıcaklık Toleransı

Bilgili (2005) yaptığı araştırmasında bu çalışma için kullandığı yöntem etkinliği açısından uygun görülmüş ve aynı yöntem araştırmamız içinde son deney olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda 60 °C' de 30 dk ve 100 °C' de 5 dk işlem gören antimikrobiyal etkili maddenin disk difüzyon ve MİK yöntemleri kullanılarak sıcaklık toleransı belirlenmiştir. Disk difüzyon çalışmasında, 4 farklı bakteri sıcaklık uygulamasından önceki aktiviteye göre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) % 33-42 oranında, MRSA % 23 oranında, VRE % 2 oranında, *Acinetobacter baumannii* % 30 oranında düşüş gözlenmiştir.

MİK çalışmasında, bazı bakterilerde % 50 oranında düşüş gözlenmiştir. Ancak, genel olarak bakıldığında antimikrobiyal aktivitenin sıcaklık uygulaması sonucunda da korunmuş olduğu söylenebilir.

Bu çalışma, maddenin protein yapıda ise sıcaklığa duyarlılığının tespiti için önemlidir. Aktiviteye neden olan maddelerin sıcaklık uygulaması sonucunda aktivitelerinde herhangi bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır.

Mağara mikrobiyolojisi konusu ülkemizde her açıdan yeni bir olgudur. Yapılan çalışmalar özellikle mağara mikroflorası konusunda yeterli değildir. Çalıştığımız mağaralar doğal mağaralar olduğundan ayrıca ilgi çekicidir. Bu nedenle izolasyon titizlikle yapılmış ve izolatlar aynı titizlikle muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen 290

izolatın antimikrobiyal aktiviteleri eldeki mikroorganizmalarla denenmiş ve çalışmanın geri kalanına ışık tutacak olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu aşamada özellikle standart antibiyotiklere oranla daha yüksek sonuçlar alınması umut vericidir. Nümerik taksonomi testleri, 131 test organizması, 33 duplike suş ve 35 *Streptomyces* tip örneğini kapsayan toplam 199 taksonomik birim ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları *Streptomyces* suşları ile tip türler arasındaki ilişkiyi gösteren dendrogramda incelenmiştir. Analiz sonucunda M1492 kodlu izolatın % 70 benzerlik düzeyin ile tip türlerden ayrılması ve tek üyeli küme oluşturması dikkat çekicidir. Ayrıca numerik taksonomi ile izolatların tanılanmasında, antibiyotik testlerinde denen 12 antibiyotiğe pozitif sonuç vermesi de bir başka dikkat çekici bulgudur.

Sonuç olarak, nümerik taksonomik çalışmalar sonucunda tip türlerle düşük benzerlik oranına sahip izolatların eldesi ve karakterizasyonu, çalışmanın öncelikli başarı kriterlerinden birisi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca sonuçlar nötrofilik – mezofilik *Streptomyces* türlerine yenilerinin ilavesi yönünde ümit verici bir bulgular vermektedir.

Klinik izolatlarla karşı aktivite denemeleri, özellikle yeni bir antibiyotiğin keşfine yol açabilecek özellikte olan izolatın tespiti için önemli aşamalardandır. Tedavisi en zor bakterilere karşı etkili olan bir madde, direnç konusunda gün geçtikçe ustalaşan mikroorganizmalara karşı önemli bir silahtır. Bu aşamada aldığımız sonuçlar ümit vericidir ve bundan sonraki aşamada maddenin izolasyonu daha da önemli bir hal almıştır. Bu konuda yapılan diğer çalışmalar araştırılmış ve gerekli besiyeri belirlenmiş, aktinomisetin gelişimi için en uygun biyolojik, fizyolojik ortam hazırlanmış, aktinomiset geliştirilmiş ve antimikrobiyal etkili madde üretimi sağlanmıştır. Üretimin ne zaman başladığı, ortamda hangi değişikliklerin nasıl gerçekleştiği rutin aralıklarla yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. Üretilen maddenin izolasyonu yapılarak, maddenin etki derecesi, sıcaklık toleransı belirlenmiştir. Aktif madde hakkında genel olarak elde edilen fikirler sayesinde konusunda ilk olma özelliği taşıyan bu çalışma ile Türkiye mağaralarının mikrobiyal florasının belirlenmesine yönelik bir adım atılması da hedeflenmiştir. Elde edilen antimikrobiyal etkiye sahip metabolitlerin yapısının aydınlatılması; biyoaktif metabolitin mutajenik, karsinojenik, teratojenik etkilerinin olup olmadığının tespiti, çıkacak sonuçlar ışığında pilot çapta üretime yönelik

biyoteknolojik ve ekonomik araştırmalar, konunun gelecekteki olası yönelimleri arasındadır.

Ayrıca belirtmek gerekir ki çalışmamızda bazı izolatların çok ysek derecede (15,20 hatta 30 mm üzerinde zon çapı) antifungal aktivite gösterdikleri belitlenmiştir. Mayalara karşı ysek aktivite gösteren 528, 901, 1005, 1128, 1401, 1408, 1510 kodlu izolatlar tespit edilmiştir. Kflere karşı ysek aktivite gösteren 204, 401, 402, 607, 902 kodlu izolatlar tespit edilmiştir. Maya ve küflerin herikisine aktivite gösteren 203, 603, 1008, 1129, 1204, 1223, 1423, 1605, 1614, 1828 kodlu izolatlar tespit edilmiştir.

Antibakteriyal aktivite gösteren izolatlarala yapılan çalışmaların ve elde edilen sonuçların çoğunlukta olduğu düşünülürse antifungal aktiviteye sahip izolatlarla yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır. Antifungal aktivite üzerine bazı araştırmacıların yaptıkları çalışmalar literatürlerde bulunmaktadır. Çalışmamızda tespit edilen izolatlar üzeride tanılama ve aktif madde izolasyonu, bu çalışmaların ışığında yürütülerek umut verici sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir.

Ouhdouch ve arkadaşları (2001) Moraccan habitatında 320 aktinomiset izolatının antifungal aktivitesini araştırmışlar ve 32 izolatın ysek derecede aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Mukhopadhyay ve arkadaşları (2001) *Actinomyce* sp.Y-8521050 izolatının antifungal aktivitesini araştırmışlardır. İzolatın ürettiği antifungal etkili maddeyi izole etmişler ve bu yeni antibiyotiğin molekül formuln ($C_{46}H_{80}O_{12}$) tespit etmişlerdir.

Gupte ve arkadaşları (2002), *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 izolatu ile yaptıkları optimizasyon (full factorial desing) alışmaları sonucunda, izolatın ysek antifungal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Daha sonra ki çalışmalarda bu konunun göz önüne alınacağını ve antimikrobiyal aktivitesini tespit ettiğimiz izolatların antifungal aktiviteleri, etken maddenin izolasyonu üzerine çalışmalar yapılmasını temenni ediyoruz.

Bu konunun seçilme nedeni, diğer ülkelerde konuyla ilgili az ama başarılı çalışmalar yapılmış olması ve ülkemizde ise bu konuda henüz bir çalışma yapılmamasıdır. Keşfedilen yeni türler ve bunlardan elde edilen yeni aktif maddeler, özellikle antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara karşı geliştirilen yeni antibiyotikler açısından önem taşımaktadır. Konu ile ilgili yabancı kaynaklar, araştırma yöntemleri hakkında bilgi vermektir ancak yapılan çalışmalar da sınırlı sayıdadır.

Çalışmamızın öncelikle, ülkemizde kaynak açısından duyulan açığı kapatacağını, ayrıca yeni keşifler ile uluslararası literatürde yer alacağını temenni ediyoruz. Ülkemiz doğal mağaralar yönünden oldukça zengin olması nedeniyle daha birçok keşfe ev sahipliği edeceğini umut ediyoruz.

5. KAYNAKLAR DİZİNİ

Anonymus, 2002 a, www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/antibiyotik.htm.

Anonymus, 2002 b, www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/canlilar/monera/streptomyces.htm.

Anonymus, 2003 a, www.das.org.tr/tr/dosya/kongre/kong2003/31.htm.

Anonymus, 2003 b, http://digilander.libero.it/enrlana/e_fungi.htm.

Anonymus, 2005 a, www.mad.org.tr/modules.php?name=News&file=article&sid=29.

Anonymus, 2005 b, www.mad.org.tr/modules.php?name=News&file=article&sid=62.

Anonymus, 2005 c, www.thehealthnews.org/tr/news/05/11/1/antibiyotik.html.

Anonymus, 2007 a, www.ankemdernegi.org.tr/?dp=sizdengelenler&yaziID=66.

Anonymus, 2007 b, www.kesfetmekicinbak.com/yazarlar/oructurkerozger.

Anonymus, 2007 c, Türk İnfeksiyon Web Sitesi, Asistan Seminerleri, Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları, www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=188.

Anonymus, 2007 d, <http://www.mikrobiyoloji.org/sozluk/m.htm>.

Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan, Yayın Serisi no 46 Ankara, 548 sayfa kitap.

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

Berdy, I., 1974, Recent developments in antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure, *Adv. Appl. Microbial.*, 18, 309.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bilgili, F., 2004, Bazı Makrofungusların İntrasellular ve Ekstrasellular Ürünlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Aratırmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80 s.
- Boston, P.J., Ivanov, M.V. and McKay, C.P., 1992, On the possibility of chemosynthetic ecosystems in subsurface habitats on Mars, *Icarus*, 95, 300-308.
- Canaveras J.C., Hoyos M., Sanchez-Moral S., Sanz-Rubio E., Bedoya J., Soler V., Groth I., Schumann, P., Laiz L., Gonzalez I. And Saiz-Jimenez C., 1999, Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain), *Geomicrobiol J.*, 16, 9–25.
- Çolak, F., 2006, Çeşitli Habitatlardan İzole Edilen Endosporlu Basillerin Antimikrobiyal Aktivite Açısından Taranarak Metabolitlerin Saflaştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 159 s.
- Denizci, A.A., 1996, Ege Ve Doğu Karadeniz Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antimikrobiyal Aktivitelerin aranması Ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, 55 s.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, Y., Rebers, P. And Smith, F., 1956, Colorometric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- El-Enshasy, H. A., Farid, M.A. and El-Sayed A.E., 2000, Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*, *J. Basic Microbiol.* 40, 5–6, 333–342.
- Engel, A.S., Porter, M.L., Kinkle, B.K. and Kane, T.C., 2001, Ecological Assessment And Geological Significance Of Microbial Communities From Cesspool Cave, Virginia, *Geomicrobiol J.*, 18:259-274.
- Farid, M.A., El-Enshasy, H. A. and El-Sayed A.E., 2000, Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*, *J. Basic Microbiol.* 40, 3, 157–166.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gesheva, V., Ivanova, V. And Gesheva, R., 2005, Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygrosopicus*, Microbiological Research 160, 243-248.
- Gonzalez, I., Laiz, L., Hermosin, B., Caballero, B., Incerti, C., Saiz-Jimenez, C., 1999, bacteria isolated from rock art paintings: the case of atlanterra shelter (South Spain), J. Microbiol Methods, 36, 123-127.
- Groth, I. and Saiz- Jimenez, C., 1999, *Actinomycetes* in hypogean environments, Geomicrobiol. J., 16, 1-8.
- Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., Kramer, I. and Stackebrandt, E., 1999 a, *Beutenbergia cavernae* gen.nov., sp. nov., an L-lysine containing actinomycete isolated from a cave, Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 1733-1740.
- Groth, I., Vetterman, R., Schuetze, B., Schumann, P. And Saiz-Jimenez, C., 1999 b , *Actinomycetes* in karstic caves of Northern Spain (Altamira and Tito Bustillo), J. Microbiol Methods, 36, 115-122.
- Groth, I., Schumann, P., Laiz, L. Sanchez-Moral, S., Canaveras, J.C. and Saiz-Jimenez, C., 2001, Geomicrobiological Study of Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy, Geomicrobiol. J., 18, 241-258.
- Groth, I., Schumann, P., Schuetze, B., Augsten, K., and Stackebrandt, E., 2002, *Knoellia sinensis* gen. nov., sp. nov and *Knoellia subterranea* sp. nov., two novel actinobacteria isolated from a cave, Int. J. Syst. Bacteriol., 52, 77-84.
- Gupte, M.D. and Kulkarni, P.R., 2002, A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design Letters in Applied Microbiology, 35, 22–26.
- Harindran, J., Naik, S.R. and Gupte, T.E., 1999, HA-1-92, A new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* CDRIL-312: Fermentation, isolation, purification and biological activity, World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 425±430.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Herold, K., Gollmick, F.A., Groth, I., Roth, M., Menzel, K.D., Möllmann, U., Grafe, U. and Hertweck, C., 2005, Cervimycin A-D: A polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance, Chem. Eur. J., 11, 5523-5530.
- Karademir, G. ve Karademir, B., 2003, Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler, Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg. 2003, 43 (1) 61-74.
- Kızılcık, M., 2006, Bazı Makrofungus İzolatlarının Farklı Besi Ortamlarında Eksopolisakkarit Üretim Potansiyeli Üzerine Çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 93 s.
- Laiz, L., Groth, I., Schumann, P., Zetta, F., Felske, A., Hermosin, B. and Saiz-Jimenez, C., 2000, Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy, Internatl. Microbiol., 3, 25-30.
- Langham, C.D., Williams, S.T., Sneath, P.H., and Mortimer, A.M., 1989. New probability Matrices for Identification of *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol., 135:121-133.
- Laorpaksa, S., Yingyong, A., Thoongsuwan, S. and Pongsopida, A., 1987, Study of antibiotic-producing *Actinomycetes* from cave soil in central region of Thailand, J. Natl. Res. Council Thailand, 19, 61-79.
- Lee, S.D., Kang, S. and Hah, Y.C., 2000, *Catelatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave, Int. J. Syst. Bacteriol., 50, 1103-1111.
- Malloch, D. and J.-M. Hubart, 1987, An undescribed species of *Microascus* from the Cave of Ramioul., Canad. J. Bot., 65: 2384-2388.
- Mallory, L. M., Bigelow, J and Hacker, M., 1994, Isolation of cancer chemotherapeutic products from cave microorganisms, Cave research foundation newsletter, 22 (2), 5.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S. And Bogatzevska, N., 2002, Characteristics of soil *Actinomycetes* from Antarctica, Journal of culture collections, Volume 3, pp. 3-14.
- Mukhopadhyay, T., Nadkarni S. R., Patel, M. V., Bhat, R. G., Desikan, K. R., Ganguli B. N. and Rupp, R. H., 1998, Macclafungin, a New Antifungal Macrocylic Lactone from *Actinomycete* sp.Y-8521050, Tetrahedron 54 (1998) 13621-13628
- Naik, S.R, Harindran, J., Varde, A.B., 2001, Pimprinine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity, Journal of Biotechnology 88, 1–10.
- Nakhimovskaia, M. I., 1937, The Antagonism Between *Actinomycetes* And Soil Bacteria, Microbiology (USSR.), 6: 131-57.
- Nazik, L., Güldalı, N., Tüfekçi, K., Beydeş, S. ve Aksoy, B., 1993, Beyşehir ve Derebucak İlçelerinin (Konya) Doğal Mağaraları, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Jeoloji Etütleri Daire Başkanlığı, 123 s.
- Nazik, L., Törk, K., Özel, E., Mengi, H., Aksoy, B., 1997, Güney Marmara Bölgesinin (Balıkesir, Bursa ve Bilecik) Doğal Mağaraları, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Jeoloji Etütleri Daire Başkanlığı, 257 s.
- Nazik, L., Törk, K., Acar, C., Özel, E., Mengi, H., Aksoy, B., Tuncer, K., Güner, İ.N., Ekmekçi, M., Başal, A., 2001, Orta Sakarya Havzasının (Eskişehir ve Bilecik Doğusu) Doğal Mağaraları, Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Jeoloji Etütleri Daire Başkanlığı, 179 s.
- Nedialkova D. And Naidenova M., 2004-2005, Screening The Antimicrobial Activity Of *Actinomycetes* Strains Isolated From Antarctica, Journal Of Culture Collections, Volume 4, pp. 29-35.
- Nieves-Rivera, A.M., 2003, Mycological survey of Rio Camuy Caves park, Puerto Rico, Journal of Cave and Karst Studies, 65 (1), 23-28.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Nitsch B., Kutzner HJ., 1969, Egg-yolk agar as a diagnostic medium for *Streptomyces*, *Experientia*, 25, 2, 220–221.
- Northup, D., 1997, Microbes in caves, NSS News.
- Northup., D.E., Reysenbach, A.L. and Pace, N.R., 1997, Microorganisms and speleothems, In Hill, C.A. and Forti, P. (Eds.) *Cave Minerals of the World*, 1nd ed., National Speological Society, Huntsville, Alabama, 261-266.
- Northup., D.E., Dahm, C.N., Melim, L.A., Spilde, M.N. Crossey, L.J., Lavoie, K.H., Mallory, L.M., Boston, P.J., Cunningham, K.I. and Barns, S.M., 2000, Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe Caves, *Journal of Cave and Karst Studies*, 62 (2), 80-90.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance. C., 2001, *Actinomycetes* of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities, *Eur. J. Soil Biol.* 37, 69–74.
- Öztürk, R., 2002, Antibiyotik İlaçlara Karşı Direnç Gelişme Mekanizmaları Ve Günümüzde Direnç Durumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri, Akılcı Antibiyotik Kullanımı Ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No:31, s:83-100.
- Paradkar, V.R., Naik, S.R., Gupte, T.E. and Joshi, A.P., 1998, A novel streptovericillium cinnamoneum var scleroticum producing a polyene antibiotic, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 705-709.
- Pelaez, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Diez Matas, M.T., Garcia, J.B., Gonzalez Del Val, A., Gonzalez, V., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Martin, I. and Vicente, F., 1998, Endophytic Fungi From Plants Living On Gypsum Soils As A Source Of Secondary Metabolites With Antimicrobial Activity, *Mycol. Res.* 102 (6) : 755-761.
- Reeves, W.K., Jensen, J.B. and Ozier, J.C., 2000, nex faunal and fungal records from caves in Georgia, USA, *Journal of Cave and Karst Studies*, 62 (3), 169-179.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Shirling ve Gottlieb, 1966, Methods for characterization of *Streptomyces* species, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16(3), 313-340.
- Skindrud, E., 1996, Romanian cave contains novel ecosystem, *Science*, 149, 405.
- Sneath, P.H.A. and Johnson, R., 1972, The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests, *J. Gen. Microbiol.*, 72, 377-392.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R., 1973, Numerical taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. W. H. Freeman: San Fransisco.
- Sokal, R.R. and Michener, C.D., 1958, A Statistical Method for Evaluating Systematic elationships. *Kansas University Science Bulletin*, 38, 1409-1438.
- Şahin, N. ve Uğur, A., 2003, Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates, *Turk J Biol* 27, 79-84.
- Yamaç, M., 2003, Mağara Mikrobiyolojisi, I. Mağara Ekosistemlerinin Türkiye’de Korunması ve Değerlendirilmesi Sempozyumu, 6-7 Aralık 2003, Alanya-Antalya.
- Yamaç, M., 2004, Mağara Mikrobiyolojisi, Dokuz Eylül Üniversitesi, speleoTURK, DEÜ Mağara Araştırma Kulübü, Karst ve mağara araştırmaları dergisi, sayı 2, s 2-8.
- Yamaç, M. ve arkadaşları, Mart 2007, Mağaralardan *Streptomyces* Cinsi Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu Ve Polifazik Taksonomisi, Proje No: TBAG-2338 (103T149).
- Yıldırım, A., 2004, Topraktan İzole Edilen Bazı Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81 s.
- Young, P., 1996, Life without light, *Earth*, 5 (6), 14-16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

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

Williams, S.T., 1983 a, Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A. and Sackin, M.J., Numerical classification of *Streptomyces* and related genera, J. Gen. Microbiol., 129, 1743-1813.

Williams, S.T., 1983 b, Goodfellow, M., Wellington, E.M.H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J. and Mortimer, A.M., A probability matrix for identification of some *Streptomyces*, J. Gen. Microbiol., 129, 1815 –1830.

Wishart, D., 1978, Clustan user manual. 4th Ed. Computing Laboratory of the University of St Andrews, St Andrews.