T.C.
HAKKARİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ZAP NEHRİ'NİN BAZI BÖLGELERİNDEN İZOLE EDİLEN *STREPTOMYCES* CİNSİ BAKTERİLERİN TEŞHİSİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

İlter ASLAN

DANIŞMANLAR

Dr. Öğr. Üyesi Metin ERTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Şengal BAĞCI TAYLAN

HAKKARİ

2023

T.C.

HAKKARİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

HAKKARİ

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi İlter ASLAN tarafından hazırlanan "**Zap Nehri'nin Bazı Bölgelerinden İzole Edilen *Streptomyces* Cinsi Bakterilerin Teşhisi ve Antimikrobiyal Aktivitesi"** başlıklı tez, 05.01.2023 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Can YILMAZ	Hakkari Üniversitesi	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Cemil SADULLAHOĞLU	Şırnak Üniversitesi	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Metin ERTAŞ	Hakkari Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu **yüksek lisans** tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ……Sayılı kararıyla ……. tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Can YILMAZ
Enstitü Müdürü

T.C.

HAKKARİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

05.01.2023

İlter ASLAN

ÖZET

Zap Nehri'nin Bazı Bölgelerinden İzole Edilen *Streptomyces* Cinsi Bakterilerin Teşhisi ve Antimikrobiyal Aktivitesi

İlter ASLAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Danışmanlar: Dr. Öğr. Üyesi Metin ERTAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Şengal BAĞCI TAYLAN

2023, 52 Sayfa

Zap Nehri'nin sedimentlerinden seri seyreltme tekniği kullanılarak yirmialtı *Streptomyces* izole edilmiştir. Tüm izolatlar, antibakteriyel aktivite için ilk taramaya tabi tutulmuş ve 2 tanesinin bir grup test bakterisine karşı aktif olduğu bulunmuştur. ZP003 ve ZP010 suşları, orta ila yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları için taksonomik karakterizasyon ve tanımlama için seçilmiştir.

Etkili bulunan izolatların sekonder metabolitleri ekstrakte edilip, inhibisyon zonları ve minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizisi analizi sonucunda ZP003 suşunun % 99,72 *Streptomyces albus* ile, ZP010 suşunun ise % 99,86 *Streptomyces cyaneus* ile benzerlik gösterdiği tespit edildi. Morfolojik, fizyolojik özelliklerine ve 16S rDNA dizisi homoloji verilerine dayalı olarak ZP003 suşu *Streptomyces albus*, ZP010 suşu ise *Streptomyces cyaneus* olarak tanımlandı.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, *Streptomyces*, Zap Nehri

ABSTRACT

Identification and Antimicrobial Activity of *Streptomyces* Bacteria Isolated from Some Areas of the Zap River

İlter ASLAN

Master of Science Thesis, Biology

Supervisors: Assist. Prof. Dr. Üyesi Metin ERTAŞ
Assist. Prof. Dr. Üyesi Şengal BAĞCI TAYLAN

2023, 52 Page

Twenty-six *Streptomyces* were isolated from the sediments of the Zap River using the serial dilution technique. All isolates were first screened for antibacterial activity and 2 were found to be active against a group of test bacteria. ZP003 and ZP010 strains were selected for taxonomic characterization and identification as they have moderate to high antibacterial activity.

Secondary metabolites of effective isolates were extracted and inhibition zones and minimum inhibition concentration (MIC) values were determined. As a result of the comparative 16S rRNA gene sequence analysis, it was determined that the ZP003 strain was similar to 99.72% *Streptomyces albus*, and the ZP010 strain was 99.86% similar to *Streptomyces cyaneus*. Based on its morphological and physiological characteristics and 16S rDNA sequence homology data, ZP003 was identified as *Streptomyces albus* and ZP010 as *Streptomyces cyaneus*.

Key words: Antimicrobial activity, *Streptomyces*, Zap River

ÖNSÖZ

Yüksek lisans araştırma konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için her türlü fedakarlığı yapan danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Metin ERTAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Şengal BAĞCI TAYLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Başta Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN'e göstermiş oldukları iyi niyet ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Zamanını hazırladığım Yüksek Lisans Tezime ayırıp değerlendireceği için ve üniversite hayatımın bu son döneminde bana kattığı her bilgi için Prof. Dr. CAN YILMAZ'a teşekkürü borç bilirim.

Benim bu aşamalara gelebilmemde her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeden her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme başta annem Rahime ASLAN'a, babam Gürcan ASLAN'a ve ablam Bihter ASLAN'a ve beni bir an olsun yalnız bırakmayan üniversite hayatım, öğretmenliğe uzanan yolum ve lisans üstü eğitimimde bilgi ve manevi desteğini esirgemeyen Tuğçe ÇAKIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Hakkari Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, **FM20LTP5** nolu proje ile bu çalışmaya verdiği destekten dolayı teşekkür ederim

İlter ASLAN

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI ii
ÖZET iii
ABSTRACT iv
ÖNSÖZ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELERDİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. *Streptomyces* Cinsi 4
1.2. *Streptomyces*'in Mikrobiyal Dünyadaki Konumu (Taksonomi) 6
1.3. Antibiyotik Kaynağı *Streptomyces* 6
2. KAYNAK ÖZETLERİ 9
3. MATERYAL VE YÖNTEM 12
3.1. Materyal 12
3.1.1. Sediment Örnekleri 13
3.1.2. Kullanılan Çözelti, Besiyeri ve Boyalar 13
3.1.2.1. Kristal viyole boyası 13
3.1.2.2. Safranin boyası 13
3.1.2.3. Lügol çözeltisi 13
3.1.2.4. %3'lük H_2O_2 çözeltisi 13
3.1.2.5. Bennett's agar (Modified after Jones, 1949) 13
3.1.2.6. Medium 65 (GYM Streptomyces Medium) 13
3.1.2.7. Oatmeal agar (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966) 14
3.1.2.8. Fermantasyon ortamı (Biyoaktif metabolit üretim ortamı) 14
3.1.2.9. Trace tuz solüsyonu (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966) 14
3.1.2.10. ISP 9 (Karbon Kaynaklarının Kullanımı; Shirling ve Gottlieb, 1966) 14
3.1.2.11. Azot kaynaklarının kullanımı (Willams vd., 1983a) 15
3.2. Yöntem 15
3.2.1. Örneklerin pH'larının ve Sıcaklığının Ölçümü 15
3.2.2. *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması 15
3.2.3. Bakteri Suşlarının Koloni ve Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi 16

3.2.4. Bakteri Suşlarının Gram Boyama Yöntemi İle Boyanması 16
3.3. Antimikrobiyal Aktivite 16
3.4. Biyoaktif Sekonder Metabolit Üretimi ve Ekstraskiyonu 17
3.5. Agar Disk Difüzyon Yöntemi 18
3.6. Broth Dilüsyon Yöntemi İle Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi..... 18
3.7. Karbon Kaynakları Testi 19
3.8. Azot Kaynakları Testi 20
3.9. Sıcaklık Gelişme Testleri 20
3.10. Moleküler Yöntemler 22
3.10.1. Genomik DNA İzolasyonu 22
3.10.2. 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu 22
3.10.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi 22
4. BULGULAR 24
4.1. Örneklerin pH'larının ve Sıcaklığının Ölçümü 24
4.2. Streptomyces Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması 24
4.3. Antimikrobiyal Aktivite..... 27
4.4. Biyoaktif Sekonder Metabolit Üretimi ve Ekstraskiyonu 28
4.5. Agar Disk Difüzyon Yöntemi ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu 28
4.6. Gram Boyama Yöntemi ve Misellerinin İncelenmesi ve Spor Zincir Morfolojisi 29
4.7. Morfoloji, Gelişme ve Biyokimyasal Testleri 33
4.8. 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu 35
4.9. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi 35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... 37
KAYNAKLAR..... 41
ÖZGEÇMİŞ 52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µ	Mikron
bç	Baz çifti
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nt	Nükleotit
µg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
sp.	Tür (tek)
spp.	Türler
subsp.	Alttür
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RDP	Ribosomal Database Project
ML	Maximum Likelihood
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Sediment örneklerinin toplandığı lokasyonların haritası 12
Şekil 3.2. Çapraz çizgi yönteminin şematik gösterimi 17
Şekil 3.3. Disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi 19
Şekil 4.1. İzolasyon çalışması sonucu Bennet's Agar besi ortamındaki izolatların toplam *Streptomyces* ve Actinobacteria (cfu/gr) sayısının grafiği 25
Şekil 4.2. İzolasyon çalışması sonucu Medium 65 besi ortamındaki izolatların toplam *Streptomyces* ve Actinobavteria (cfu/gr) sayısının grafiği 25
Şekil 4.3. İzolatların izolasyon, saflaştırma ve koloni gelişimlerine ait görüntüler 26
Şekil 4.4. İzolatların antimikrobiyal aktivite sonuçları 27
Şekil 4.5. Antimikrobiyal aktivite (Disk difüzyon) çalışmaları görüntüsü 29
Şekil 4.6. İzolatların havasal misellerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü 30
Şekil 4.7. ZP003 nolu izolatın spor zincir morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü 31
Şekil 4.8. ZP010 nolu izolatın spor zincir morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü 32
Şekil 4.9. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PZR ürünleri 35
Şekil 4.10. İki izolatın ve genebank verilerinden elde edilen türlerin Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre 16S rRNA gen bölgesi filogenetik ağacı 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Sediment örneklerinin toplandığı tarih ve koordinatlar 12
Çizelge 3.2. Test suşları 17
Çizelge 3.3. Suşlara uygulanan testler 21
Çizelge 3.4. PZR bileşenleri 22
Çizelge 4.1. Toplanan sediment numunelerinin pH değerleri ve kaynaktan sıcaklık değerleri 24
Çizelge 4.2. Metabolitlerin zon çapları ve minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri 28
Çizelge 4.3. Suşlara uygulanan testler 34
Çizelge 4.4. İzolatların NCBI'daki BLAST sonucu 35

1. GİRİŞ

Doğal ürünler, ilaç keşfi çalışmalarında yeni tanımlanan moleküller için önemli bir kaynak olmaktadır (Newman vd., 2003). Penisilinin antibiyotik özelliklerinin 1928'de Alexander Fleming tarafından tespit edilmesinden, antibiyotiklerin "altın çağı"na ve yirminci yüzyılın sonlarına kadar, mikrobiyal sekonder metabolitlerden gelen güçlü biyolojik aktivite ve benzeri görülmemiş yapısal çeşitlilik farmasötik keşiflere katkı sağlamıştır. Bununla birlikte 1990'larda, kombinatoriyal kimya ve bilgisayar destekli tasarımda yeni tekniklerin gelişimi ile ilaç keşif stratejileri değişmiştir (Koehn ve Carter, 2005). Öte yandan, mikrobiyal kaynakların ilaç keşif çalışmaları için yeterince araştırılmaması ve muazzam bir biyoçeşitliliğe sahip birçok habitatın henüz örneklendirilmemiş olması araştırmacıları bu alana yönlendirmektedir (Walsh, 2003).

Yeni antimikrobiyal ajanların, tercihen doğal olarak oluşan ve yeni etki mekanizmalarına sahip olanların geliştirilmesi acil bir tıbbi ihtiyaçtır. Özellikle toprak sakinleri klinik açıdan önemli antibiyotikler de dahil olmak üzere birçok yararlı biyolojik olarak aktif doğal ürün üreten, yoğun bir şekilde sömürülen ekolojik bir niştir. Bununla birlikte, ilaca ve çoklu ilaca dirençli patojenlerin ortaya çıkması, güçlü antipatojenik aktiviteye sahip yeni antimikrobiyal bileşikler için sürekli bir araştırmayı gerektirir (Talbot vd., 2006). Daha önce bilinmeyen mikrobiyal suşları aramak, biyolojik olarak aktif yeni maddeler elde etmek için etkili bir yaklaşımdır (Fenical vd., 1999). Antibiyotiğe dirençli patojenlerin yayılmasını kontrol etmek için özellikle antibiyotikler olmak üzere kanser gibi yaşamı tehdit eden hastalıkları tedavi etmek için yeni ilaçların bulunmasına acilen ihtiyaç vardır (Payne, 2007; Spellberg, 2008; Fischbach ve Walsh, 2009).

Mikrobiyal metabolitler, yeni potansiyel terapötik ilaçlar için zengin kaynaklardır (Sanglier vd., 1996). Gram-pozitif, gram-negatif ve filamentli mantar kültürlerinden 5000'den fazla antibiyotik tanımlanmıştır, ancak insan, hayvan ve bitki hastalıklarını tedavi etmek için ticari olarak sadece yaklaşık 100 antibiyotik kullanılmıştır (Bu'Lock ve Kristiansen, 1987). Mevcut antibiyotiklere karşı sergilenen direncin üstesinden gelen, enfektif olmayan organizmalardan daha az toksik, daha güçlü antibiyotiklere duyulan ihtiyaç şiddetle hissedilmektedir. Son

yıllarda aktinomisetler ticari değeri yüksek birçok önemli biyoaktif bileşik sağlamıştır. Sonuç olarak, yeni biyoaktif maddeler için rutin olarak taranmaya devam ediyorlar. Bu araştırmalar oldukça başarılı olmuştur ve doğal olarak oluşan antibiyotiklerin yaklaşık üçte ikisi aktinomisetlerden izole edilmiştir (Dhanasekaran vd., 2009). Antibiyotiklerin üreticileri ve ilaç endüstrisinin önemli tedarikçileri olan aktinomisetler, çok çeşitli ikincil metabolitler üretebilir (Baltz, 2005). Aktinomisetler doğada geniş bir dağılıma sahiptir ve çeşitli kimyasal yapılara ve biyolojik aktivitelere sahip ikincil metabolitler üretmede sınırsız gibi görünen kapasiteleri nedeniyle tipik olarak farmasötik endüstrisinde faydalıdır (Arasu vd., 2008) *Streptomyces*'ten binlerce antibiyotik izole edilmiş olmasına rağmen , bunlar üretilen biyoaktif bileşiklerin repertuarının sadece küçük bir kısmını temsil etmektedir (Watve vd., 2001). Bu nedenle, doğal kaynaklardan yeni *Streptomyces* izolasyonu ve ikincil metabolitlerinin karakterizasyonu değerli bir çabadır. *Streptomyces* türleri, yüksek DNA G + C içeriğine sahip gram pozitif, aerobik mikroorganizmalardır ve bilinen tüm antibiyotiklerin yaklaşık yarısını mikroorganizmalardan üretirler (Miyadoh, 1995). *Streptomyces* cinsine ait türlertoprak aktinomisetlerinin toplam popülasyonunun %50'sini ve ticari ve tıbbi olarak faydalı antibiyotiklerin %75-80'ini oluşturur (Mellouli vd., 2003).

Antimikrobiyal direncin dünya çapında artması ve yayılması ile birlikte ekonomik ve düzenleyici engeller nedeniyle farmasötik endüstrileri tarafından yeni ilaç keşfinin ve geliştirilmesinin zorunlu veya kasıtlı olarak durdurulması, bugün küresel halk sağlığı için en büyük zorluğu oluşturmaktadır. Mikrobiyal doğal ürünler, gelecekteki antibiyotiklerin geliştirilmesi için baskın ve umut verici kaynaklar olarak görünmektedir (Sharma vd., 2011). Yeni aktinomisetler için keşfedilmemiş ortamları aramak, doğal ürün bazlı ilaç keşfine yönelik mevcut antibiyotik tarama programlarının yönelimi olmuştur. Özellikle deniz ortamı, yeni ve kimyasal olarak zengin aktinomiset türleri sunmaktadır (Abdelmohsen vd., 2015). Aktinomisetler arasında *Streptomyces* cinsiyeni biyoaktif bileşiklerin zengin bir kaynağı olmaya devam ediyor ve birçok antibiyotik keşfedilmemiş durumda. Yeni bileşikleri keşfetmeye yönelik aramaların çoğu, daha önce bildirilen türler ve bileşikler tekrar tekrar tanımlandığı için genellikle verimsiz sonuçlanır. Suşların taksonomik ilişkisine rağmen, büyüme ve antibiyotik üretimi

için beslenme gereksinimleri türe özgü olmaktan ziyade suşa bağımlıydı (Genilloud vd., 2011), bu da aynı türün farklı suşlarının aynı bileşikleri daha az sıklıkla üretme olasılığını ima ediyor. Böylece farklı suşlar arasında bileşiklerin yeniliği teorik olarak daha olasıdır. İkincil metabolomlar her yerde bulunan aktinomiset türlerinin keşfedilmemiş gen kümeleri, yeni öncü moleküllerinin keşfini sağlayabilir (Abdelmohsen vd., 2015). Bununla birlikte, *Streptomycetes* tarafından kodlanan gen kümelerinin çoğu normal laboratuvar büyüme koşulları altında ifade edilmediğinden, genleri moleküllere bağlamak için etkili prosedürlerin azlığı nedeniyle bugüne kadar ikincil metabolomların yalnızca küçük bir kısmı araştırılmıştır (Yamanaka vd., 2014). Ortam bileşenlerinin pH'sındaki küçük değişiklikler, mikroorganizmaların genel metabolik profilinin yanı sıra ikincil metabolit üretiminin kalitesi ve miktarı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Özellikle antibiyotikler söz konusu olduğunda, büyüme metabolizması ve ürün salgılanması arasındaki etkileşim, hayatta kalmak için önemli bir yol oluşturan büyümeyi sınırlayan besin konsantrasyonlarından kritik olarak etkilenir (Seipke, 2015; Rajeswari vd., 2015).

Farklı besin ve fermantasyon koşullarının mevcudiyetine bağlı olarak farklı metabolik yollar kullanırlar. Biyosentetik sistemlerin, fermantasyon koşullarının (sıcaklık, pH, ortam bileşimi) uygun şekilde manipüle edilmesi yoluyla mikroorganizmaların potansiyelinden maksimum düzeyde yararlanacak şekilde düzenlenmesi, anahtar enzimleri aktive edebilir ve/veya antibiyotiğe hakim olan sessiz veya zayıf eksprese edilmiş metabolik yolları provoke eden kriptik gen ekspresyonlarını başlatabilir ve sentezi, aktif fermantasyon ekstraktlarından yeni öncü moleküllerin keşfedilme şansını artırabilir. Sekonder metabolit üretimi, ortam bileşenleri ve son derece vazgeçilmez olan optimum seviyeleri sayesinde mikroorganizmaların tür ve suşlarına göre farklılık gösterir. Antibiyotik üretiminin iyileştirilmesi, potansiyelini, yeniliğini değerlendirmek ve üretim maliyetini kolaylaştırmak için yeterli verim elde etmek için zorunludur (Mobeen ve Sankar, 2018).

Bir aktinomiset suşunun fermantasyon süresinin nasıl kısaltılacağı ve fermentasyon verimliliğinin nasıl artırılacağı hala bir zorluktur. Bununla birlikte, her yerde bulunan aktinomiset türlerinden yeni ikincil metabolitlerin üretimi için

uygun bir üretim ortamı (PM) ve fermantasyon koşulları tasarlama çalışmaları yetersizdir (Mobeen ve Sankar, 2018).

1.1. *Streptomyces* Cinsi

Streptomyces sistematiği oldukça uzun ve karmaşık bir tarihe sahiptir. *Streptomyces* cinsinin Streptomycetaceae familyasında sınıflandırılmasını hücre duvarı kimyası ve morfolojisine dayanarak 1943'te Waksman ve Henrici önermiştir. *Streptomyces* cinsi; gram-pozitif ve toprak bakterilerini barındırmakta olup, hayat döngüleri boyunca çeşitli morfolojik değişimlere uğrarlar. Bu cinsteki bakteriler; batık ve havasal olmak üzere 2 tip miselyum oluştururlar. Normalde spor formunda olmalarına rağmen, yeterli nem ve besini bulduklarında sporları çimlenerek batık miselyumu oluşturur. Filamentleri uç uzatma ve dallanma yoluyla büyüdükçe; sonuçta bir substrat miselyum (Dyson, 2011) adı verilen dallanmış filamentlerden oluşan bir ağ oluştururlar. Bu morfolojik değişimlerle beraber pigmentler, antibiyotikler ve sekonder metabolitlerin de üretimi başlar (William, 1989). Streptomyces cinsi kimyasal, moleküler ve nümerik taksonomik metotların uygulanmasıyla oldukça iyi tanımlanmıştır (Williams vd., 1983; Witt ve Stackebrandt, 1990). Cins içerisindeki çoğu tür 25-35 ^{o}C arasında ve pH 6.5-8.0 arasında optimum gelişme göstermektedir. Bazı suşlar termofilik ya da psikrofilik derecelerdeki sıcaklıklarda ve asidik ya da alkali pH değerlerinde gelişme gösterebilmektedirler (Goodfellow vd., 1987). Hücre duvar yapılarındaki peptidoglikan tabakasında LLdiaminopimelikasit ve muramik asidin molekülleri arasında bir glisin-LL-A2 pm içeren A3γ tip bulundurmaları karakteristiktir (Lechevalier ve Lechevalier, 1970). Hücreler iso ve anteiso- yağ asitlerini içermektedir. Streptomyces bakterileri mikolik asit içermezken teikoik asit içermektedir (Minnikin ve O'Donnell 1984). DNA baz kompozisyonlarında %66-78 arasında değişen G+C içeriğine sahiptirler (Pridham ve Tresner, 1974). *Streptomyces* cinsinin üyeleri yeni antibiyotik, alkalin enzimler ve enzim inhibitörleri için büyük bir kaynaktır (Sharma vd., 2016). Yaşam döngülerinin olgunlaşma safhasında havasal miselyumları içerisinde uzun zincirli artrosporlar üretirler. Bu özellik de *Streptomyces* cinsi bakterileri için karakteristiktir (Hayakawa vd., 2004). Bu bakteriler birçok renkte pigment üretme kapasitesine sahiptir. Oluşturdukları pigmentlerle substrat ve havasal miselyumlarına renk

verirler ve bulundukları ortamın renk değişimine sebep olurlar (Goodfellow ve Simpson, 1987).

Streptomyces toprakta bol miktarda yaşar (Yikmis ve Steinbuchel, 2012) ve hayvan ve bitki artıkları gibi birçok farklı organik karbon kaynaklı bileşiği parçalayabilir (Kaneko vd., 2003). Bu bakterinin selülazları ve diğer enzimleri üretebildiğini tespit edilmiştir (Wirth ve Ulrich, 2002). Ayrıca bakteri tarafından amilazlar, keratinazlar ve lipazlar da üretilebilir (Kornillowicz-Kowalska ve Bohacz, 2011). Bakteri toprakta sporlar halinde uzun süre büyüyebilir ve yarı atıl yaşamda kalabilir (Morita, 1985). Mikroçevre, bakteriler için çok küçük bir alanı (mikrometre çapında) ve geniş bir yaşam alanını ifade eden bir yaşam alanıdır. Küçük habitatta bulunan organik bileşikleri bozarlar ve hif büyümesi çevreden besin elde etmelerine yardımcı olabilir (Nazir vd., 2010). *Streptomyces*'in petrol türevleri (Bachoon vd., 2001) ve çayırlık topraklar (Nacke vd., 2011) gibi inorganik bileşikleri kullanabildiği bildirilmiştir. Gundlapally vd. (2006), Colorado Platosu'nun kabuğunda yaptıkları bir çalışmada *Streptomyces* suşlarının bol olduğunu bildirmişlerdir. Babalola vd. (2009) bir metagenomik çalışmada Streptomyces'in yüksek sayıda olduğunu bulmuşlardır. *Streptomyces* tarafından melanin pigmenti üretimi karakterizasyonda önem taşımaktadır. Atalan vd. (2000), izolatların renk gruplandırmasını tanımlamak için kullanmış ve polifazik taksonomi ile renk grupları arasında iyi bir uyum bulunmuştur. Antony-Babu vd. (2010), alkalofilik bakterileri ayırt etmek için renk gruplandırmasını kullanmış ve tanımlanan gruplara farklı türler atanmıştır. *Streptomyces* bir kökte veya başka bir habitatta yaşarken diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilmek için antibiyotik salgılarlar ve bu özellik antibiyotik ve antibiyozun birleşimidir (Laskaris vd., 2010). S*treptomyces*, artrospor oluşturmaları nedeniyle donma koşullarına dayanıklıdır (Schlatter vd., 2009). Ayrıca *Streptomyces*, hayvanların ve omurgasızların iç organlarında yaşayabilir (Seipke vd., 2012). Biyolojik kontrol, bitkilerde enfeksiyonun üstesinden gelmek için popüler tekniklerden biridir. *Streptomyces* tarafından salgılanan bazı metabolitler mantar ve diğer bakteriyel hastalıkları önleyebilir (Schrey vd., 2012). Seipke vd. (2012), endofitik *Streptomyces*'in biyolojik kontrol organizmaları olarak kullanılabileceğini bildirmiştir. Ayrıca birçok aktinobakteri cinsinin temsilcileri nehir, göl ve deniz

gibi sucul habitatlarda yaşarlar. Çoğunlukla, sudan gelen bu izolatlar, yağmurdan sonra nehirlere ve göllere sızan topraktan gelmektedir. Terkina vd. (2002), Baykal gölünden elde edilen izolatların çoğunun *Streptomyces* türü olduğunu saptamıştır. Nakade (2012), Hindistan'ın Kolhapur Şehri, Rankala Gölü'nden izolatların dörtte birinin *Streptomyces* türleri olduğunu bildirmiştir. Weyland ve Helmke (1988), kıyı ve kıyı bölgesi ile Derin deniz seviyesinde *Streptomycetes* bakterisinin varlığını bildirdi. Pathom-Aree vd. (2006) Pasifik okyanusunda barofilik streptomiset bakterilerini izole etmiş olsalar bile, bakteriler bitki, sünger ve salyangoz gibi farklı organizmalarla simbiyotik ilişki içinde yaşarlar (Lin vd., 2010). Patates, pancar, havuç, yer fıstığı ve turp gibi bitkilerde birkaç patojenik *Streptomyces* bakterisi bulunmuştur (Loria vd., 2008). Patateste hastalığa neden olan *Streptomyces scabies* izole edilmiştir (Park vd., 2003). Bunun dışında 7 farklı tür de patates bitkisinde enfeksiyona neden olmaktadır. Ayrıca Trujillo ve Goodfellow (2003), *Actinomadura* ve *Nocardia*'nın birkaç türünün insanlar için patojen olduğunu ve özellikle Sudan ve subtropikal bölgelerde aktinomisetoma neden olduğunu bildirmiştir (Develoux vd., 1999).

1.2. *Streptomyces*'in Mikrobiyal Dünyadaki Konumu (Taksonomi):

Domain: Bacteria

Phylum: Actinobacteria

Order: Actinomycetales

Family: Streptomycetaceae

Genus: *Streptomyces* (Waksman and Henrici, 1943)

1.3. Antibiyotik Kaynağı *Streptomyces*

Streptomyces spp. ortalama 30 sekonder metabolit üretme genetik kapasitesine sahiptirler (Chevrette vd., 2019), bu da onları en üretken antibiyotik üreticileri yapar. Bu cins, Actinobacteria (Grasso vd., 2016) filumu kaynaklı toplam antibiyotiklerin yaklaşık %80'ini üretir ve şu anda halkın kullanımına açık olan doğal kaynaklardan gelen antibiyotiklerin üçte ikisini üretir (Parte vd., 2020). *Streptomycetes* tarafından sekonder metabolitlerin üretimi çok fazladır; kaynaklar sınırlı olduğunda, olumsuz koşullara dayanabilen sporlara bölünen hava hifleri üretirler (Chater, 2016). Bu, normal ve ekstrem ortamlarda *Streptomycetes* tarafından başarılı kolonizasyon için önemli bir faktördür. *Streptomycetes*

sekonder metabolitleri, demir gibi ağır metalleri ayırarak, UV ışınlarına karşı koruyarak, diğer rakipleri inhibe ederek ve çekirdek algılamada önemli bir rol oynayarak vejetatif bakteri hücresini korur (Chevrette vd., 2019; Quinn vd., 2020).

Streptomycetes'in bir antibiyotik kaynağı olarak keşfi, 1940 yılında çeşitli kanserlerin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak yaygın olarak kullanılan ve tüberküloza ve bazı gram-negatif patojenlere karşı etkisiz olan penisilinin bıraktığı boşluğu dolduran antibiyotik aktinomisin keşfedildiğinde başladı (Waksman ve Woodruff, 1940). İki yıl sonra *Streptomyces lavendulae*'den streptotrisin izole edildi (Waksman ve Woodruff, 1942) ve ardından *Streptomyces griseus*'tan streptomisin (Schatz ve Waksman, 1944) izole edildi. Yıllar boyunca klinikte ve tarımda kullanılan yaklaşık 12.400 biyoaktif bileşik, *Streptomyces* cinsi tarafından üretildi. Örneğin *S. tsukubaensis* tarafından üretilen immünosupresif takrolimus, *S. platensis*'ten elde edilen anti-tümör platenolidler ve birkaç tanesi insektisit olan avermectin gibi örnekler bu cins bakterilerden üretilmiştir (Manteca ve Yagüe, 2019). Ancak, 1985'ten 2006'ya kadar bu tür biyoaktif bileşiklerin keşfinde keskin bir düşüş oldu (Demain ve Fang, 2000). Ek olarak, son 30 yılda, sistemik enfeksiyonların klinik tedavisi için sadece iki *Streptomyces* kaynaklı antibiyotik onaylanmıştır (Procópio vd., 2012). Bu, araştırmacıların dikkatlerini, genellikle "nadir Aktinomisetler" olarak adlandırılan diğer aktinobakteri türlerinden biyoaktif bileşiklerin üretimine odaklamalarına yol açmıştır (Manteca ve Sanchez, 2009). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, *Streptomyces spp*. Streptomycetes'ten izole edilen hiçbir bileşiğin 2007 ile 2013 ortası arasında klinik deneylere tabi tutulmaması (Subramani ve Sipkema, 2019) ve nadir deniz Aktinomisetlerinden izole edilen üç bileşiğin şu anda klinik deneylerden geçmesi nedeniyle, artık potansiyel bir yeni antibiyotik kaynağı olarak kabul edilmemektedir (Subramani ve Sipkema, 2019). Bununla birlikte, 2015'ten 2020'ye kadar toplanan veriler, Streptomycetes türlerinden çok sayıda yeni sekonder metabolitin izole edildiğini göstermektedir. 2015 ve 2020 yılları arasında 121 *Streptomyces* türünden farklı biyoaktivitelere sahip toplam 279 yeni doğal ürün keşfedildi (Subramani ve Sipkema, 2019).

Bu çalışmanın amacı, Hakkari ili içerisinden geçen Zap Nehri'nin bazı noktalarından toplanan sediment örneklerinden *Streptomyces* bakterilerini izole etmek ve antimikrobiyal aktivite gösteren türlerin tanımlanmasını yapmaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Baykal Gölü'nden izole edilen Actinomyces üyelerinin diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivitesi araştırılmıştır. İzolatlarından *Micromonospora* ve *Streptomyces* genuslarına ait olanların gösterdikleri antimikrobiyal aktivitelerin daha geniş olduğu gözlemlenmiştir. 17 izolatın *B. cereus* gelişimini inhibe ederken 13 izolatın *E. coli*, 11 izolatın ise *P. aeruginosa* kültürlerine karşı antibakteriyel aktivitesi gözlemlenmiştir. Ayrıca 12 izolatın *S. cereviseae* ve 5 suşun *C. albicans* maya kültürlerine karşı antagonistik aktivitesi belirlenmiş (Terkina vd., 2002).

Muğla yöresi topraklarından 74 farklı *Streptomyces* izolatı elde edilmiş ve izolatların % 45.9' unda antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Onbeş izolat koagulaz-negatif Stafilokoklara (CoNS) karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu izolatların gram-pozitif, gram-negatif bakteriler ve mayalara karşı in-vitro antimikrobiyal aktiviteleri kapsamlı olarak çalışılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, 5 izolat ≥ 20 mm inhibisyon zonuyla CoNS ve mayalara karşı yüksek derecede aktiftir. Bu izolatların üçü, *Streptomyces antibioticus* (MU106, MU107) ve *S. rimosus* (MU114) olarak tanımlanmıştır. Aktif izolatların kültür ekstraktlarının UV spektrumları 212 ve 260 nm arasında değişen absorbans pikleri göstermiştir. TLC plakaları üzerinde iki bioaktif bölge (Rf 0.60 ve 0.80) tespit edilmiştir. Aktif bileşiklerin metanoldeki UV spektrumları 211 ve 215 nm de pikler göstermiştir (Şahin ve Uğur, 2003).

Ağaç ve çalı formundaki baklagillerin rizosferlerinden antimikrobiyal aktivite gösteren *Streptomyces* izole edilmiştir. Toplam 97 izolatı gram(+) *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*; gram(-) *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*; *Candida albicans* ve filametli fungus *Aspergillus niger* olmak üzere 6 test organizmanın gelişmelerini inhibe etme kabiliyetlerine göre yayma plak tekniği kullanarak incelenmiştir. İzolatlardan hiçbirinin *P. aeruginosa* bakterisine karşı antagonistik aktivitesinin olmadığı saptanmıştır (Gürel, 2006).

Deniz ortamları, yüksek tuzluluk ve yüksek basınç gibi kara ortamlarına göre oldukça farklı koşullara sahiptir. Bu durum, ekspresyonu çevre koşullarının kontrolünde olan ikincil metabolizmanın kara canlılarından farklı olmasına neden olur (Lam, 2006). Bu şekilde, çoğu *Streptomyces* olan çok çeşitli aktinobakteriler,

yeni sekonder metabolitler elde etme umuduyla denizden izole edilmiştir (Dharmaraj, 2010).

Afyonkarahisar ilinin topraklarından 52 *Actinomyces* izole edilmiştir. Spektrum Plak Yöntemi kullanılarak antimikrobiyol etkinlikleri belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeuroginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enteriditis* ve *Candida albicans* kullanılmıştır. Elde edilen *Actinomyces* izolatlarının 29'unda (%55,7) antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. İzolatların %44,2'si gram pozitif, %46,1'i gram negatif bakterilere, %9,62'sı *Candida albicans*'a ve %9,6'sının ise her üçüne karşı etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca izolatlardan %44,2 ile en fazla *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e etkili olmuş ve bunu *Salmonella enteriditis* (%23), *Pseudomonas aeuroginosa* ATCC 27853 (%23), *E. coli* (%19,2), *Candida albicans* (% 9,6), *Klebsiella pneumoniae* (%7,6) ve *Proteus vulgaris* (%3,8) takip ettiği ispatlanmıştır (Balkar vd., 2010).

Deniz kaynaklı *Streptomyces*'ten çok sayıda peptit, kinon, makrolid, terpen, poliketid, alkaloid, flavonoid grubu ikincil metabolitler elde edilmiştir (Dharmaraj, 2010). Bunlar arasında antitümör, antimikrobiyal, antidiyabetik, antioksidan ve antiviral aktiviteye sahip umut verici moleküller var. Ayrıca *Salinispora tropica*'dan elde edilen Salinosporamid A, çeşitli kanser türlerinde kullanılmak üzere klinik deneme aşamasındadır (Ghareeb vd., 2020). Deniz kaynaklı *Streptomyces*, doğal bir terapötik kaynak olarak araştırılmaya devam etmektedir. 2018'de deniz kaynaklı *Streptomyces* cinsinden 167 yeni ikincil metabolit elde edildi, bu da bakteriyel metabolitlerin %69' una eşittir (Carroll, 2022).

Tayland'da topraklardan çok sayıda *Streptomyces*, *Micromonospora* ve *Kitasatospora* suşu izole edilmiştir (Sripreechasak vd., 2014; Malisorn vd., 2020). Ek olarak, bitki köklerinden *Micromonospora azadirachtae*'nin yeni türleri ve *Micromonospora globbae* suşları da dahil olmak üzere *Streptomyces* ve *Micromonospora* suşları rapor edilmiştir (Kuncharoen vd., 2019). Bu çalışmada, *S. psammoticus*, *S. sioyaensis*, *S. vietnamensis*, S. *bungoensis*, S, *purpurascens*, *S. Hidrojenans, S. lucensis*; Rizosfer topraklarından alınan ve antimikrobiyal aktivite

gösteren *Micromonospora*, *M. schwarzwaldensis*, *M. chersina*, *M. chersina*, *Micromonospora terminalae, M. rhizosphaerae* ve *K. putterlickiae* ve bunların sekonder metabolitleri ileri çalışmalar için ilgi çekicidir (Malisorn vd., 2020).

Streptomyces aureofaciens, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces humus*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces lydicus*, *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces roseoflavus*, *Streptomyces scabies* ve *Streptomyces violaceusniger* gibi birkaç *Streptomyces* türü çeşitli antimikrobiyal maddelerin üretimi ile yoğun antagonistik aktiviteler göstererek, toprak kaynaklı hastalıkları kontrol etmek için kullanılmıştır (Zheng vd., 2019).

Streptomyces malaysiensis MJM1968 ile ilgili önceki çalışma, *Alternaria mali*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* gibi çeşitli fitopatojenik mantarlar üzerinde çift kültürlü in vitro tahlil yoluyla in vitro güçlü bir inhibe edici aktivite bildirmiştir. Ayrıca antifungal aktivite sergileyen bileşik Azalomisin F kompleksi olarak belirlenmiştir (Cheng vd., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

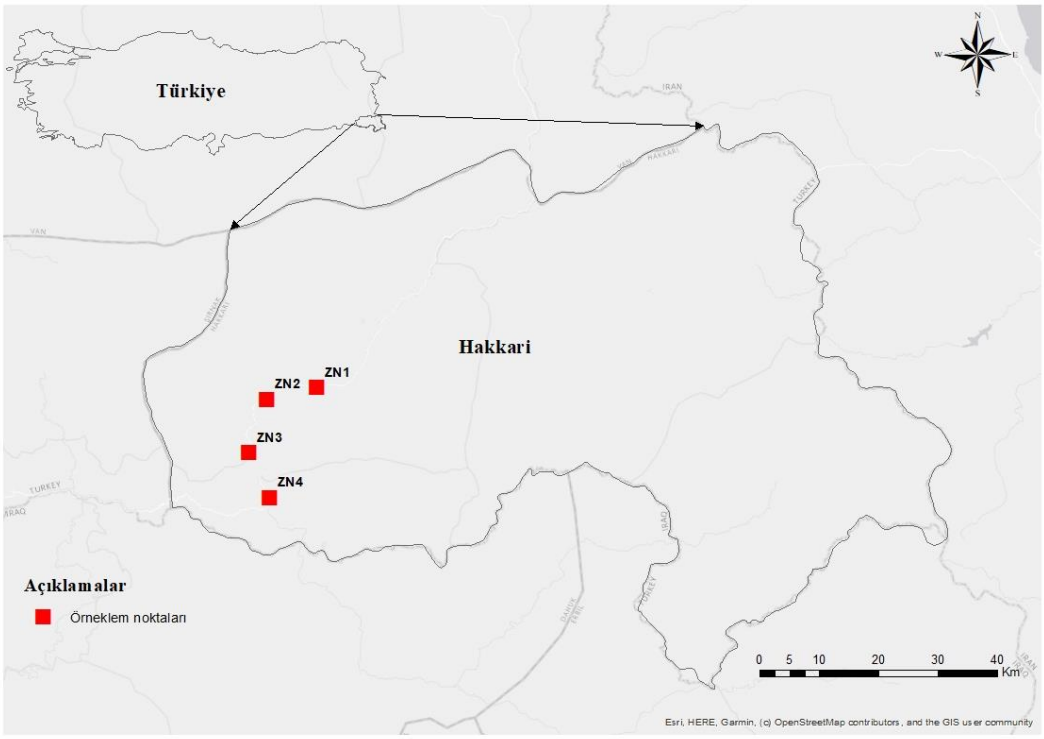
3.1. Materyal

Bu araştırmanın materyalini;

Hakkari İli sınırları içerisinde yer alan Zap Nehri'nden 16.05.2019 tarihinde sediment örnekleri oluşturmuştur. Sediment örneklerinin toplandığı tarih ve koordinatları Tablo 3.1'de lokasyonları, haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sediment örneklerinin toplandığı tarih ve koordinatlar

Kod	Tarih	Koordinat	
ZN1	16.05.2019	37°29'03.6"K	43°38'04.1"D
ZN2	16.05.2019	37°28'28.8"K	43°32'15.8"D
ZN3	16.05.2019	37°23'51.7"K	43°29'38.6"D
ZN4	16.05.2019	37°19'38.0"K	43°31'24.8"D



Şekil 3.1. Sediment örneklerinin toplandığı lokasyonların haritası

3.1.1. Sediment Örnekleri

Zap Nehri'nden alınan sediment örnekleri steril plastik şişeler içerisinde konularak 12 saat içinde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarıına ulaştırılarak saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Çözelti, Besiyeri ve Boyalar

3.1.2.1. Kristal viyole boyası

Kristal Viyole boyası havanda dövülmüş ve üzerine 10ml %96'lık Fenol kristali ve distile su ilave edilmiştir. 24 saat bekletilen ve filtre kağıdından geçirilerek gram Boyama yönteminde kullanılmıştır (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.2. Safranin boyası

Safranin etil alkolde çözülmüş ve distile su ilave edilip iyice karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanılmıştır (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.3. Lügol çözeltisi

Gram boyama yönteminde ve amilaz testinde kullanılmıştır.

3.1.2.4. %3'lük H_2O_2 çözeltisi

%3'lük H_2O_2 çözeltisi katalaz testi için kullanılmıştır.

3.1.2.5. Bennett's agar (Modified after Jones, 1949)

Bileşenler	Gram / Litre
Yeast Ekstrakt	1.0 g/L
Lab Lemco	0.8 g/L
Bacto Casitone	2.0 g/L
Gliserol	10.0 g/L
Agar	18.0 g/L
dH_2O	1 lt

Final pH (25°C 'de) 7.2±0.2 (121 °C 'de 15 dk otoklav edilmiştir).

3.1.2.6. Medium 65 (GYM Streptomyces Medium)

Bileşenler	Gram / Litre
Glukoz	4.0 g/L
Yeast extract	4.0 g/L
Malt extract	10.0 g/L
CaCO3	2.0 g/L
Agar	12.0 g/L
dH_2O	1 L

Final pH (25°C 'de) 7.2±0.2 (121 °C 'de 15 dk otoklav edilmiştir)

3.1.2.7. Oatmeal agar (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bileşenler	Gram / Litre
Oatmeal	20.0 g/L
Trace Tuz Solüsyonu	1 ml
Agar	18.0 g/L
dH_2O	1 L

Final pH (25°C ‘de) 7.2±0.2 (121 °C ‘de 15 dk otoklav edilmiştir)

3.1.2.8. Fermantasyon ortamı (Biyoaktif metabolit üretim ortamı)

Bileşenler	Gram / Litre
Glikoz	4 g
Yeast Ekstrakt	4 g
Malt Ekstrakt	10 g
Kalsiyum Karbonat ($CaCO_{3)}$	2 g
Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4)	1 g
Demir sülfat ($FeSO_4$)	0,001 g
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$)	1 g
Sodyum klorür (NaCl)	1 g
dH_2O	1 L

Final pH (25°C ‘de) 7.4±0.2 (121 °C ‘de 15 dk otoklav edilmiştir).

3.1.2.9. Trace tuz solüsyonu (ISP 3; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bileşenler	Gram / Litre
$FeSO_4. 7H_2O$	0.11g
$CuSO_4. 5H_2O$	0.64 g
$MnCl_2. 4H_2O$	0.79 g
$ZnSO_4. 7H_2O$	0.15 g
dH_2O	0,1 L

3.1.2.10. ISP 9 (Karbon kaynaklarının kullanımı; Shirling ve Gottlieb, 1966)

Bileşenler	Gram / Litre
Amonyum Sülfat	2.64 g
KH_2PO_4	2.38 g
K_2HPO_4	5.65 g
$MgSO_4.7H_2O$	1.0 g
Trace Tuz Solusyonu	1.0 ml
Bacto-agar	18.0 g
dH_2O	1 L

3.1.2.11. Azot kaynaklarının kullanımı (Willams vd., 1983a)

Bileşenler	Gram / Litre
Glukoz	10.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 g
K_2HPO_4	1.0 g
NaCl	0.5 g
Bacto-agar	6.0 g
dH_2O	1 L

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin pH'larının ve Sıcaklığının Ölçümü

pH ölçümü içerisinde 250 ml distile su bulunan balon jojelere sediment örneklerinden 25 g ilave edilerek balon jojeler elle çalkalanarak iyice homojenize edilmiştir. Çözeltilerin çökmesi beklenerek örneklerin pH'sı İnolab wtw marka dijital pH metre ile ölçülmüştür. Sıcaklık ise dijital saplama tipi termometre ile kaynaktan ölçülmüştür.

3.2.2. *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Streptomyces bakterilerinin izolasyonu için klasik dilüsyon ve yüzeye yayma yöntemi kullanıldı. Her örnekten 25 g tartılarak içerisinde 250 mL ringer çözeltisi bulunan 500 mL'lik steril cam şişelere konuldu. Bu şekilde, her bir toprak örneği için hazırlanmış olan 10^{-1} solüsyonlar, toprak kolloidlerine tutunmuş olan mikroorganizma sporlarını ve misellerini ayırmak için 1 saat süre ile çalkalandı. Daha sonra bu 10^{-1} solüsyonlar, vejetatif formların neden olabileceği kontaminasyonları azaltmak için, 65 ^{o}C 'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda 10 dakika bekletildi. Her bir toprak örneği homojen hale getirildi ve otomatik pipet ile aseptik şartlarda 1 mL alınarak içerisinde 9 ml ringer çözeltisi bulunan steril cam tüplere konuldu. Bu şekilde, 10^{-2} lik toprak solüsyonu elde edildi ve aynı işlemler 10^{-3}, 10^{-4} dilüsyonları elde etmek için de tekrarlandı. Bu şekilde dilisyon serileri 10^{-4} seyreltmeye kadar devam edildi. 10^{-3}, 10^{-4} dilüsyonların her birinden otomatik pipet ile 0.1 mL alınan çözeltiler, cycloheximide (50 µg /mL), nystatin (50 µg/mL) ve novobiosin (0.5 µg/mL) ilaveli Medium 65 agar, Bennet's agar yüzeyine steril L şeklindeki eğri cam çubuk kullanılarak yayma plak yöntemiyle ayrı ayrı inoküle edildi (Vickers ve Williams 1987). Her bir dilüsyon için 3 plak hazırlandı ve 27 ^{o}C'de 14 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Cycloheksimid (50

ug/mL), novobiosin (0.5 µg/mL) ve nystatin (50 µg/mL) antibiyotikleri hazırlanan besiyerlerine istenmeyen bakteri ve mikrofunguslarının üremesini inhibe etmek için eklenmiştir. Ekim yapılan petriler 27 ^{o}C 'de 14 gün süre ile inkübe edildi ve gelişen koloniler incelendi. Sayımı Medium 65 agar'da (Rowbotham ve Cross,1977) ve Bennet's agarda 25 ^{o}C'de 14 gün inkübasyona bırakılan izolasyon plaklarındaki olası farklı *Streptomyces* suşları, koloni morfolojileri dikkate alınarak seçildi. İzole edilen bu koloniler, steril kürdanlarla cycloheximide (50 µg/ml), nystatin (50 µg/ml) ve novobiosin (0.5 µg/ml) ilaveli Bennet's Agar besiyeri yüzeyine çizgi plak yöntemiyle transfer edilerek tek koloni düşürülmeye çalışıldı. Saf izolatlar içerisinde % 20'lik gliserol bulunan kriyojenik tüplere konularak buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.3. Bakteri Suşlarının Koloni ve Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi

İzole edilen suşların koloni morfolojisi özellikleri binoküler mikroskop yardımı ile belirlenmiştir. Hücre morfolojisinin belirlenmesi için gram boyama yöntemi uygulanmıştır.

3.2.4. Bakteri Suşlarının Gram Boyama Yöntemi İle Boyanması

Gram boyama yapılacak saf kültürlerden fizyolojik su ile yayma preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulup alevde fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılarak iki dakika beklenmiştir. Fazla boya dökülerek lügol çözeltisi ilave edilerek 1 dakika beklenmiştir. Preparat % 96'lık etil alkol ile 6-10 sn dekolorize edilerek saf su ile yıkanmıştır. Son olarak safranin boyası ilave edilmiştir. 30 saniye kadar beklenerek preparat saf su ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıdı kullanılarak kurutulmuştur. Daha sonra preparatın üzerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelenmiş ve mor-menekşe görülenler gram pozitif, kırmızı-pembe görülenler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

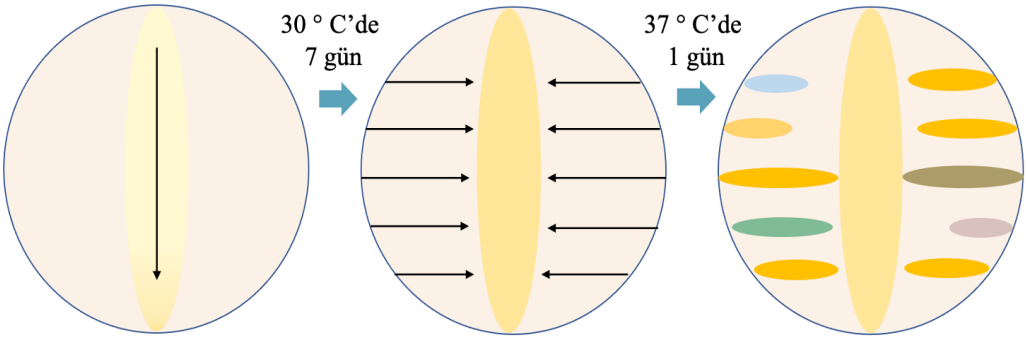
3.3. Antimikrobiyal Aktivite

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin ön değerlendirilmesi için çapraz çizgi yöntemi uygulanmıştır. MHA (Mueller-Hinton Agar) petri plakalarının tam ortasına tek bir çizgi şeklinde *Streptomyces* izolatları ekilmiştir. Petriler 30 °C'de 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyondan alınan plakalara, ortadaki *Streptomyces* çizgisine 90° açıyla gelecek şekilde test mikroorganizmaları düz bir

çizgi olacak şekilde ekilmiştir ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Antimikrobiyal etki, test mikroorganizmasının inhibisyonu ile gözlemlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar seçilerek çalışma bunlarla devam etmiştir. Antimikrobiyal çalışmalarında kullanılan test suşları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Test suşları

Test Suşu	Kod
Staphylococcus aureus	ATTC 29213
Bacillussubtilis	ATTC 11774
Bacillus cereus	ATCC 10876
Escherichia coli	ATCC 25952
Pseudomonas aeruginase	ATCC 27853
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
Candida albicans	ATTC 90028



Şekil 3.2. Çapraz çizgi yönteminin şematik gösterimi

3.4. Biyoaktif Sekonder Metabolit Üretimi ve Ekstraskiyonu

Streptomyces izolatlarından biyoaktif sekonder metabolit üretimi için 0,5 L'lik Erlen Mayer şişeleri içerisinde fermantasyon ortamı hazırlanmıştır. Böylece bakterilerin sekonder metabolit üretimi için gerekli karbon, azot ve tuz gereksinimleri fermantasyon ortamı içeriğindeki bileşenler sağlanmıştır. Hazırlanan besiyerine 2 öze dolusu bakteri izolatı inoküle edilip 37 °C'de 7-8 gün inkübe edilmiştir. Bu işlem en az 3 tane 0,5 L'lik Erlen şişelerinde 2-3 paralel şeklinde yapılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürler Whatmann No:1 kağıdından

filtre edilip, temiz Erlen Mayer şişeleri içerisine aktarılmıştır. Elde edilen fermantasyon sıvılarının üzerine 1:1 oranında etil asetat eklenerek 3 kez ekstrakte edilmiştir. Ayırma hunisi yardımı ile organik (üst) faz alınarak rota evaparatörde 37 °C sıcaklıkta, 80 rpmde ve 187- 230 mbar vakum altında etil asetat uçurularak ham metabolit ekstre eldesi gerçekleştirilmiştir. Rota evaporatör dibine yapışan ekstreler de etil asetat eklenerek çözdürüldü sonra 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak etil asetat etüvde 37 °C'de uçurulmuştur. Elde edilen ekstreler tarama testlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.5. Agar Disk Difüzyon Yöntemi

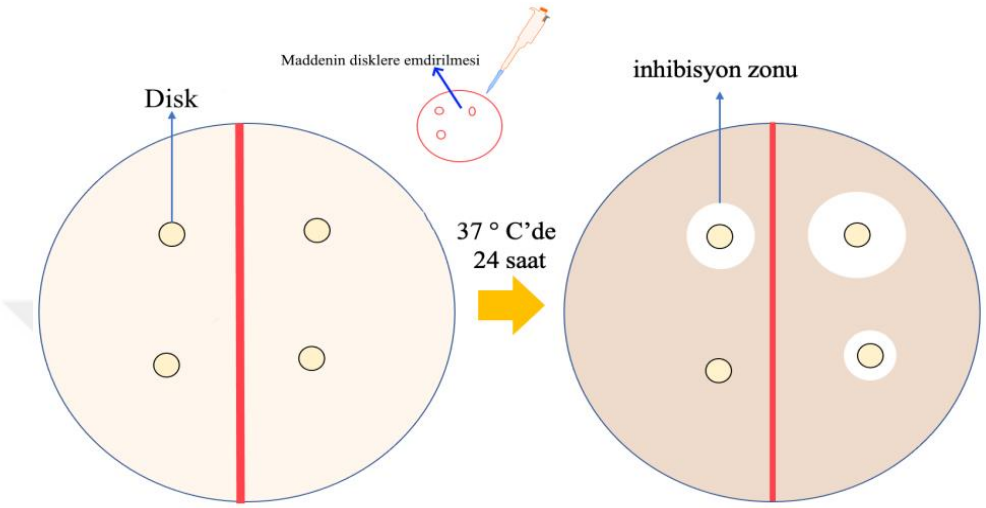
Antimikrobiyal aktivite çalışmaları, Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi'nde (CLSI, 2012) açıklandığı üzere agar disk difüzyon yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Ekstreler dimetil sülfoksid (DMSO) içerisinde çözdürülmüş aynı çözücü kullanılarak seyreltilmiştir. Stok konsantrasyonu 5 mg/ml olarak ayarlanmıştır.

Disk difüzyon yöntemi için Mueller Hinton Agar (HIMEDIA M1084) ve SABOURAUD-2 % Dextrose Agar (Merck 1.07315) hazırlanmıştır. Test suşları Mueller Hinton Broth'da (MHB) 37 °C' de 24-48 saat inkübe edilmiş ve hazırlanan süspansiyonların bulanıklığı 0.5 McFarland'a ayarlanmıştır. Gelişen bakteri ve maya kültürlerinden 50 µl alınarak besiyerlerine yayma tekniği ile ekim yapılmıştır. Her iki ekstreden boş disklere (BIOANALYSE Blank Disc in Cartridge ASD10011) 15 µl emdirilerek kuruması beklenmiş ve petrilerin agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Bakteriler 37 °C'de 16-24 saat, fungus ise 27 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası diskler etrafında oluşan inhibasyon zonları (mm) ölçülmüştür. Her bir test, olası test hatalarını minimuma indirgemek amacıyla üçer defa yapılmıştır (Şekil 3.3).

3.6. Broth Dilüsyon Yöntemi İle Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

MIC değerlerinin belirlenmesi için tüp dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. 5 ml'lik test tüplerinin her birinde 1 ml Mueller Hinton Broth hazırlanmış ve ekimler 0,5 McFarland'a göre yapılmıştır. 1024 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bileşiklerden ilk tüpe 1 ml ilave edilmiştir, karıştırılan çözeltiden 1 ml alınarak bir sonraki MHB içeren kuyucuğa eklenmiştir. Bu şekilde 512 $\mu g/ml^{-2}$

µg/ml aralığında seyreltme yöntemi yapılmıştır. Daha sonra bakteriler 37 °C'de 24 saat, fungus ise 27 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her örnek her bir mikroorganizmada iki tekrarlı çalışılmıştır.



Şekil 3.3. Disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi

3.7. Karbon Kaynakları Testi

Test suşları, gelişme ve enerji gereksinimleri için 14 farklı karbon kaynağını (Çizelge 3.3) kullanabilme kabiliyetleri üzerine test edildi. Karbon kaynaklarında gelişme testi için, bazal ortam olarak ISP 9 besiyeri kullanıldı (ISP 9; Shirling ve Gottlieb, 1966). Her bir karbon kaynağından 0.5 g tartıldı ve 50 ml saf suda çözülüp tindalizasyon tekniği ile sterilize edilerek, steril karbon kaynağı aseptik şartlarda bazal ortama ilave edildi. Negatif kontrol olarak sadece bazal ortam, pozitif kontrol olarak da glikoz (% 1.0, w/v) ilave edilmiş bazal ortamlar kullanıldı. İnokülasyon yapıldıktan sonra, 27 ^{o}C'de inkübasyona bırakıldı ve değerlendirme, inkübasyonun 7. ve 14. günlerinde pozitif ve negatif kontrol plaklarının her ikisi ile karşılaştırılarak yapıldı. Test suşlarının gelişmesi, negatif kontrol plağındaki gelişmelerden daha geniş veya pozitif kontrol plağındaki gelişmelere eşit ya da yakın ise pozitif (+); negatif kontrol plağındaki gelişmelere eşit veya gelişme daha az ise negatif (-) olarak kaydedildi.

3.8. Azot Kaynakları Testi

Test suşları, gelişme ve enerji gereksinimleri için 9 farklı azot kaynağını (Çizelge 3.3) kullanabilme kabiliyetleri üzerine test edilmiştir. Azot kaynaklarında gelişme testi için, bazal ortam olarak Williams vd. (1983) tarafından tanımlanan azot kaynağı kullanım ortamı kullanılmıştır. Uygun miktardaki her bir azot kaynağı 50 ml saf suda çözülüp tindalizasyon tekniği ile steril edilerek aseptik şartlarda steril bazal ortama ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece bazal ortam, pozitif kontrol olarak da L-asparagine (% 0.1, w/v) ilave edilmiş bazal ortamlar kullanılmıştır. İnokülasyon iki kontrol ortamına da yapılmıştır. İnokülasyon yapıldıktan sonra plaklar, 27 ^{o}C'de inkübasyona bırakılmış ve test plaklarının değerlendirilmesi inkübasyonun 7 ve 14'üncü günlerde pozitif ve negatif kontrol plaklarının her ikisi ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Test suşlarının gelişmesi, negatif kontrol plağındaki gelişmelerden daha geniş veya pozitif kontrol plağındaki gelişmelere eşit ya da yakın ise pozitif (+); negatif kontrol plağındaki gelişmelere eşit veya gelişme daha az ise negatif (-) olarak kaydedilmiştir.

3.9. Sıcaklık Gelişme Testleri

Streptomyces suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişme yetenekleri gözlemlenmiştir. Sıcaklıkta gelişme testleri için Bennett's Agar kullanılmıştır. Test izolatları inoküle edildikten sonra 4-10-27-37 ve 45 °C sıcaklığa ayarlanmış etüvlerde inkübe edilmiştir (Çizelge 3.3). Petrilerde gözlenen koloniler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.3. Suşlara uygulanan testler

TESTLER
Morfoloji ve Pigmentasyon
1. Havasal Spor Üretimi
2. Beyaz
3. Gri
Substrat Miselyumu
4. Lacivert
5. Sarı
6. Diffüziye Pigment
7. Kahverengi
Sıcaklık Gelişme Testleri
8. 4 ^{o}C
9. 10 ^{o}C
10. 27 ^{o}C
11. 37 ^{o}C
12. 45 ^{o}C
Azot Kaynakları (0.1 % w/v)
13. L-Asparagin
14. L-Sistein
15. L-Trozin
16. L-Valin
17. L-Fenilalanin
18. L-Histidin
19. L-Arjinin
20. L-Serin
21. L-Metionin
Karbon Kaynakları (1 % w/v)
22. Sukroz
23. Arabinoz
24. Inositol
25. Mannitol
26. Fruktoz
27. Ramnoz
28. Mannoz
29. Laktoz
30. Sellobiyoz
31. Arabitol
32. Traheloz
33. Galaktoz
34. Ksilitol
35. Glikoz

3.10. Moleküler Yöntemler

3.10.1. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır.

DNA izolasyonundan sonra DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.10.2. 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu

Bakterilerin tanımlanması için universal primer olan **27F** (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') primerleri kullanılmıştır. Amplifikasyon için; 95 ˚C 45 sn, 57 ˚C 45 sn ve 72 ˚C 60 sn PZR sıcaklık profili 40 döngü boyunca uygulandı. PZR bileşenleri çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. PZR bileşenleri

Bileşen	**Stok Kons.**	**Reak. Kon.**
PZR Buffer	10X	1X
$MgCl_2$	25mM	1,5 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
F. Primer	10 µM	0,3 µM
R. Primer	10 µM	0,3 µM
Taq DNA Polymerase	5U/ µl	2 U
DNA template	3 µl	
PZR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır.		

3.10.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

16S rRNA bölgesi dizileme işleminden sonra gelen ab1 dosyaları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programı ile her suş için kromatogramlar tek tek incelendi ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani 'N' kodlu birkaç baz) genellikle sekans başları ve sonlarındaki bölgelerinde kesilerek uzaklaştırıldı ve contiqler oluşturuldu. Tüm izolatların 16S rDNA nükleotid baz dizileri filogenetik dendogramların oluşturulması için kullanıldı. NCBI'da blast yapılarak her suşa yakın türlerin giriş kodları alındı. Hem veri tabanındaki yakın türlerle hem de kendi aralarında analiz edildi. MegaX programı ile bu dizilemesi yapılan suşlar ve Gen Banktaki suşların fasta formatları programa çağrıldı. Daha sonra Clustal W yapılarak korunmuş bölgeler kıyaslandı. Bu işlemin ardından MegaX

programındaki bu dosya fasta şeklinde kaydedildi. MegaX JModel test ile uygun algoritma matrisi seçildi. Bu işlemden sonra MegaX paket programı ile Maksimum Olabilirlik algoritması ile filogenetik ağaç oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. Örneklerin pH'larının ve Sıcaklığının Ölçümü

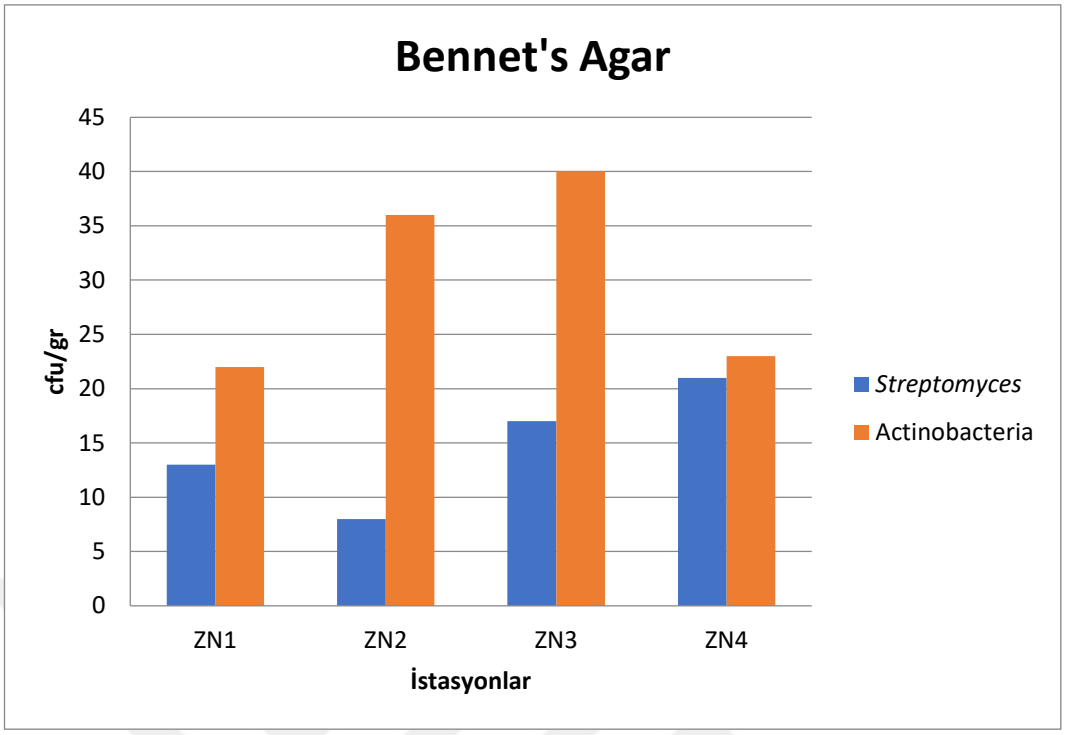
Sediment örneklerinin pH'sı 7.3-7.5 olarak ölçülmüştür. Kaynaktan termometre ile yapılan ölçümde sıcaklık 11.4-12.8 ^{o}C arası olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Toplanan sediment numunelerinin pH değerleri ve kaynaktan sıcaklık değerleri

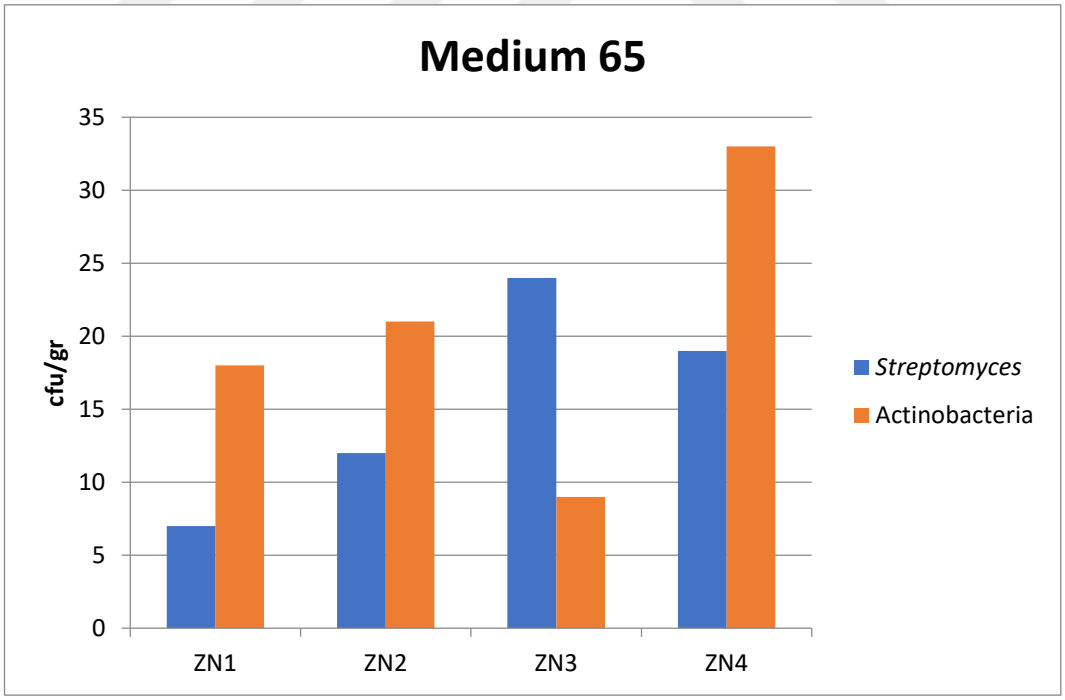
Lab. No	Alınan lokalite	Sıcaklık	pH
ZN1	Çimenli Köyü	11,4	7,3
ZN2	Olgunlar Köyü	11,7	7,3
ZN3	Geçimli Köyü	12,3	7,4
ZN4	Gündeş Köyü	12,8	7,5

4.2. *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

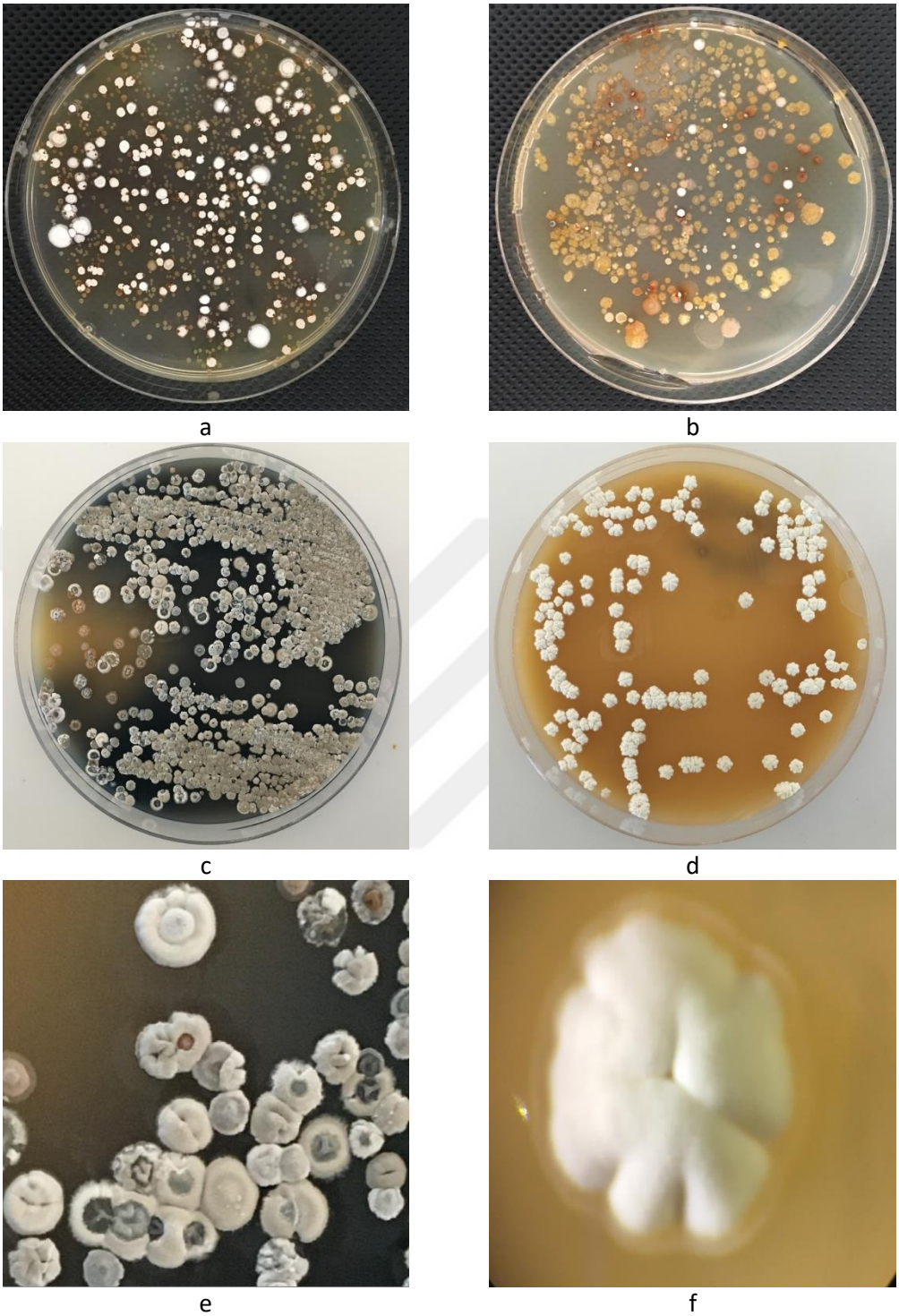
Toplanan 4 sediment numunesinden *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu yapıldı. Cycloheximid (50 µg/ml) ve nystatin (50 µg/ml) antibiyotikleri eklenmiş Bennets Agar ve Medium 65 besiyerinde gelişen olası *Streptomyces* kolonileri oluşturdukları karakteristik misel ve pigment durumlarına göre seçildi ve izole edildi. Ayrıca yapılan tüm izolasyon çalışmaları sonucunda sayılan *Streptomyces* bakterilerinin ve toplam canlı bakterilerin sayım sonuçları her iki besi yeri için ayrı yapılarak grafik şeklinde Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. İzole edilen *Streptomyces* suşları Medium 65 besi ortamında saflaştırıldı ve suşlar %20 gliserol çözeltisi içerisinde -20 ^{o}C'de muhafaza edildi. Toplamda 26 *Streptomyces* suşu izole edildi ve tamamı gliserolde saklandı. *Streptomyces* suşlarının besi ortamında izolasyon, saflaştırma ve koloni gelişimleri Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1. İzolasyon çalışması sonucu Bennet's Agar besi ortamındaki izolatların toplam *Streptomyces* ve Actinobacteria (cfu/gr) sayısının grafiği



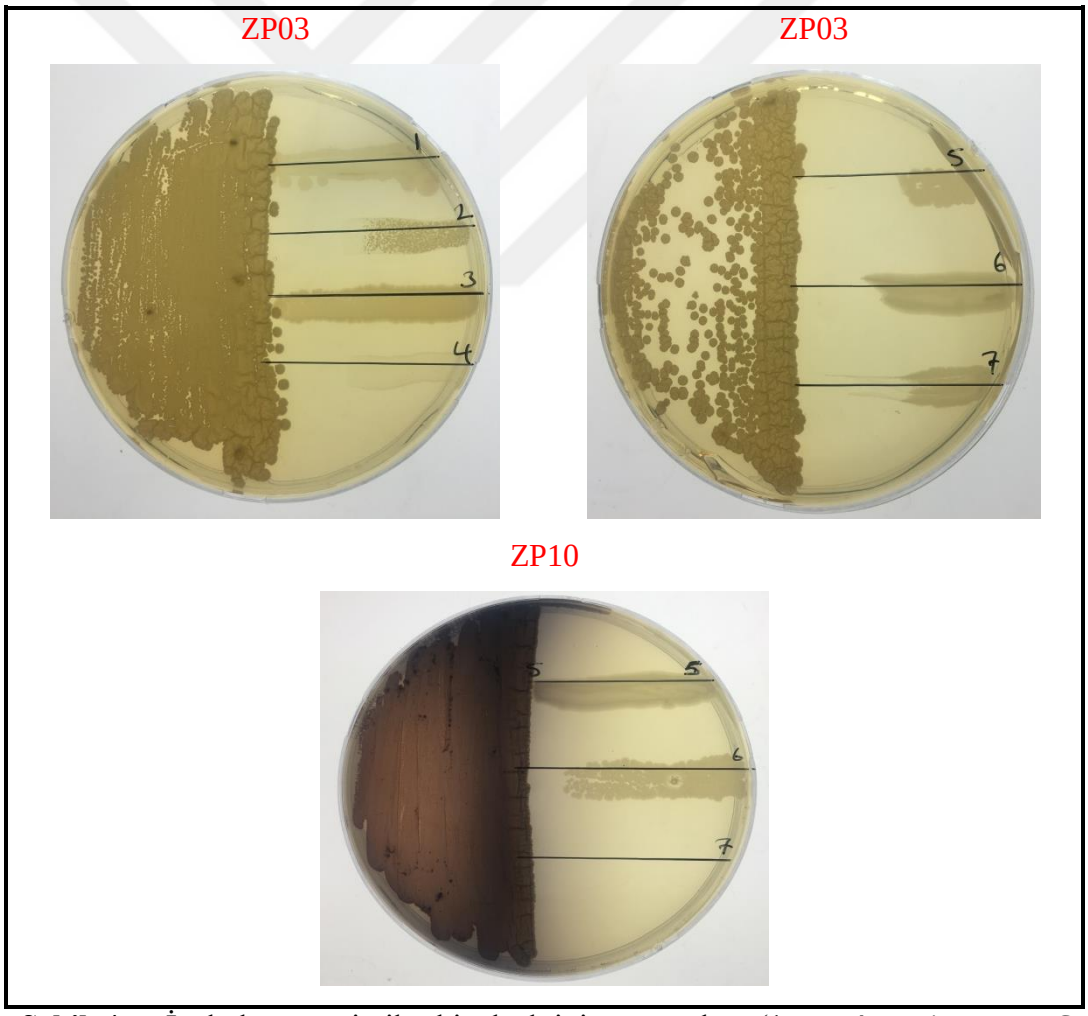
Şekil 4.2. İzolasyon çalışması sonucu Medium 65 besi ortamındaki izolatların toplam *Streptomyces* ve Actinobacteria (cfu/gr) sayısının grafiği



Şekil 4.3. İzolatların izolasyon, saflaştırma ve koloni gelişimlerine ait görüntüler (a ve b izolasyon petrileri, c ve d saflaştırma petrileri, d ve e koloni görüntüleri)

4.3. Antimikrobiyal Aktivite

Saflaştırılmış olan farklı koloni yapısına sahip 17 *Streptomyces* suşu toplamda 7 adet patojen ve nonpatojen test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktivite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Müller Hinton Agar besi ortamına ekildi ve 7 gün 27°C'de inkübasyona bırakıldı. Her izolat için patojen ve nonpatojen test mikroorganizması çizgi şeklinde ekildi. Ekimi yapılan suşların bulunduğu petri kapları 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra türlerin test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi. Suşların arasında ZP03 ve ZP10 nolu izolatlar antimikrobiyal aktivite gösterirken diğer izolatların hiçbiri test suşları üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. İzolatların antimikrobiyal aktivite sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. İzolatların antimikrobiyal aktivite sonuçları (1. *P. Aeruginase*, 2. *S. Aureus*, 3. *E. coli*, 4. *E. faecalis*, 5. *B. subtilis*, 6. *B. cereus*, 7. *C. albicans*)

ZP03 nolu izolat *C. albicans, E. faecalis, B. subtilis, B. cereus* ve S. *Aureus* test suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken *E. Coli* ve *P. Aeruginase* suşları üzerinde aktivite göstermemiştir. ZP10 nolu izolat ise *B. cereus ve C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sonraki çalışmalar için bu iki izolat seçilerek araştırmaya devam edilmiştir.

4.4. Biyoaktif Sekonder Metabolit Üretimi ve Ekstraskiyonu

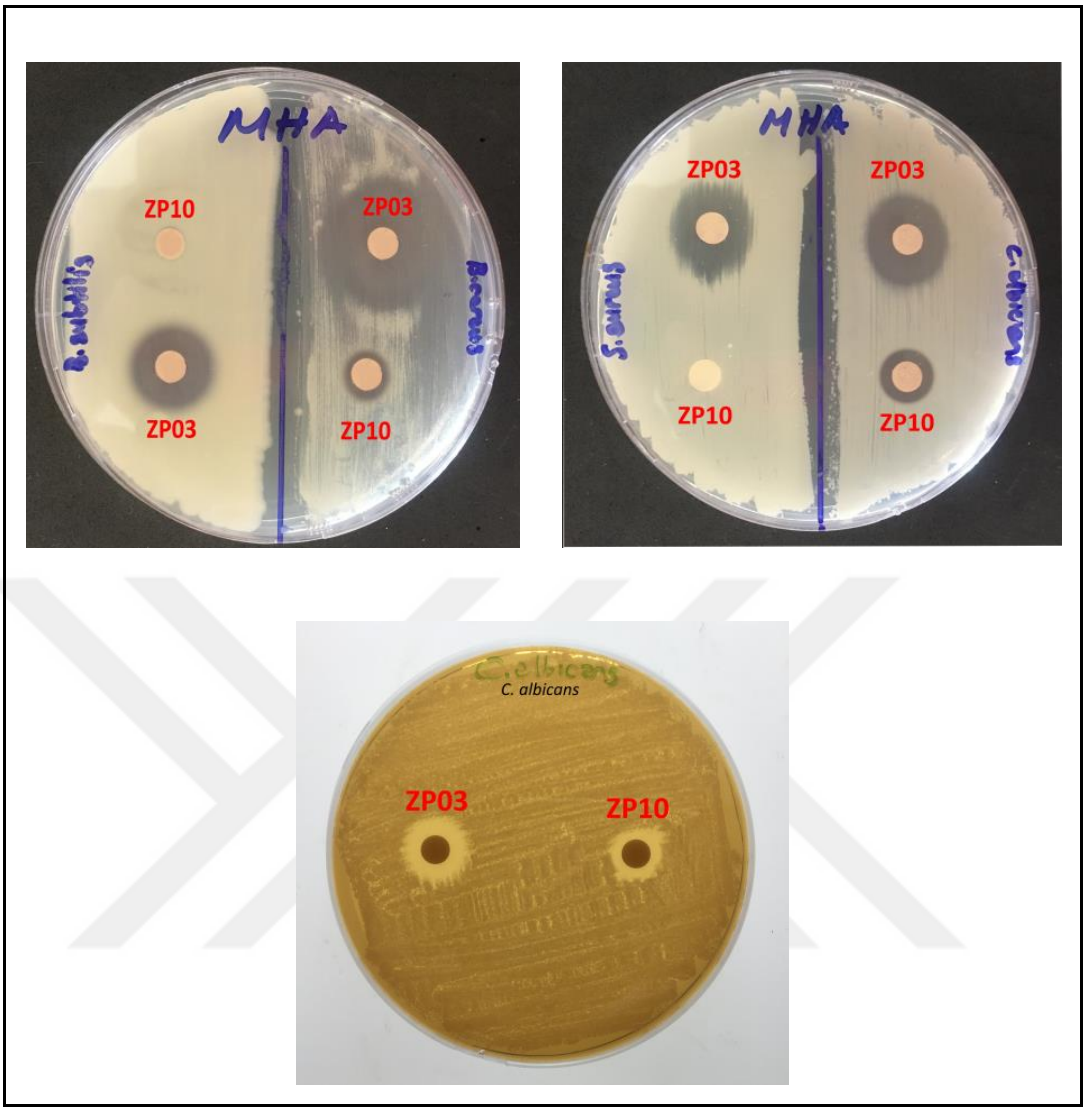
Çalışmada 7-8 günlük fermentasyon ortamı sıvı kültürlerinin filtre edilip üzerine 1:1 oranında etil asetat eklenmiş ve organik faz alınarak evoporatörde etil asetat uçurulmdu. Elde edilen özütler kendi çözücüsü ile çözdürülmüş ve disk difüzyon deneylerinde kulllanıldı.

4.5. Agar Disk Difüzyon Yöntemi ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

Difüzyon yöntemi kullanılarak ZP3 ve ZP10 suşlarına ait sekonder metabolitler 7 farklı indikatör mikroorganizmaya karşı elde edilen biyoaktivite sonuçları incelendi. ZP03 nolu izolata ait sekonder metabolit kullanılan indikatör mikroorganizmalardan S. *aureus* ATTC 29213, *B. subtilis* ATTC 11774, *B. cereus* ATCC 10876 ve *C. albicans* ATTC 90028'e etki etti. ZP10 nolu izolat ise *B. subtilis* ATTC 11774 ve *C. albicans* ATTC 90028 üzerinde antimikrobiyal etki gösterdi. Metabolitlerin disk etrafındaki inhibisyon zonları ve MİK değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Disk difüzyon yöntemi görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Metabolitlerin zon çapları ve minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri.

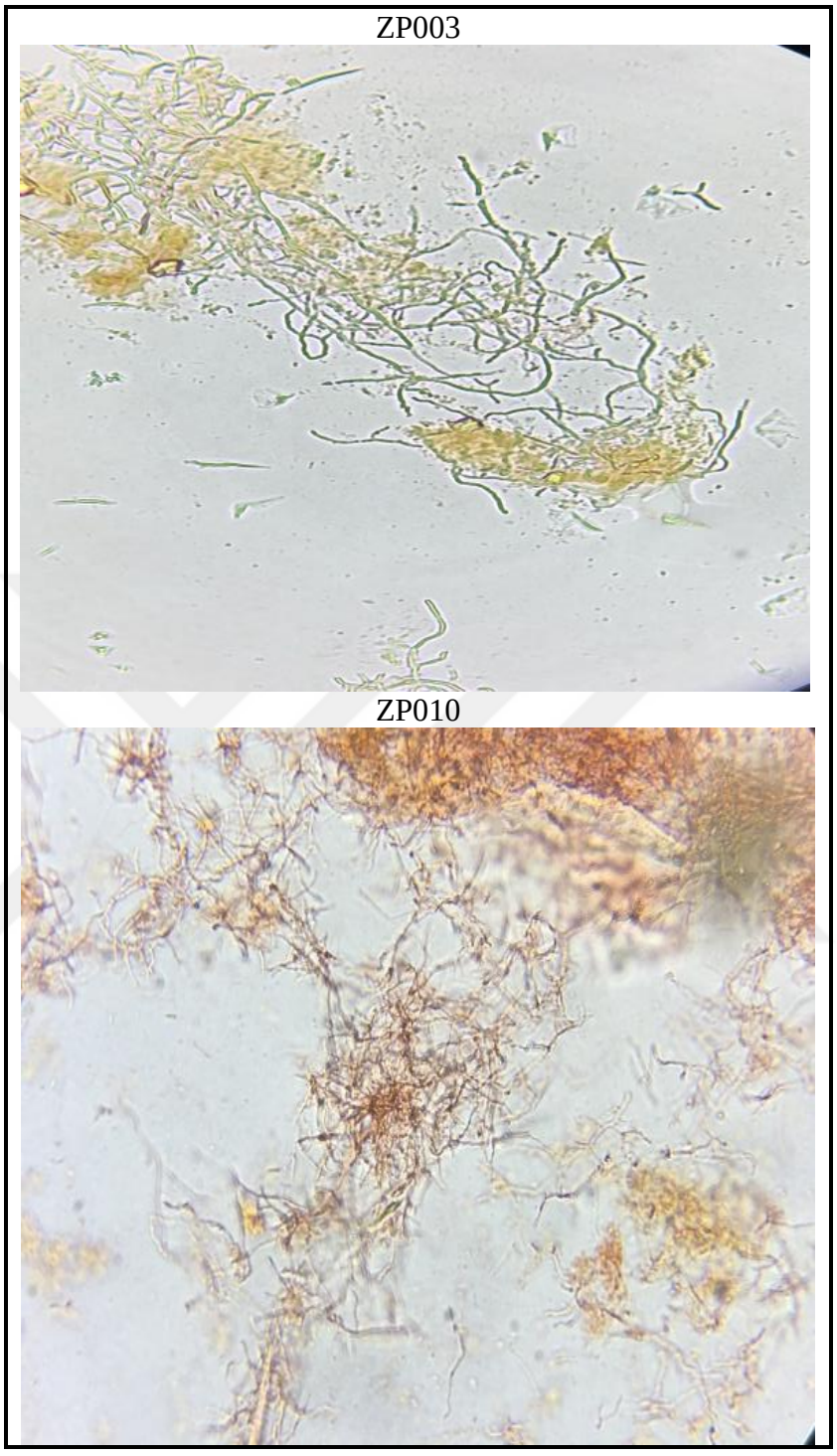
Test Suşu	İnhibisyon Zonu		Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) (µg/ml)	
	ZP03	ZP10	ZP03	ZP10
S. aureus ATTC 29213	14	-	256	-
B. subtilis ATTC 11774	15	-	256	-
B. cereus ATCC 10876	30	9	128	512
E. coli ATCC 25952	-	-	-	-
P. aeruginase ATCC 27853	-	-	-	-
E. faecalis ATCC 29212	-	-	-	-
C. albicans ATTC 90028	14	10	128	512



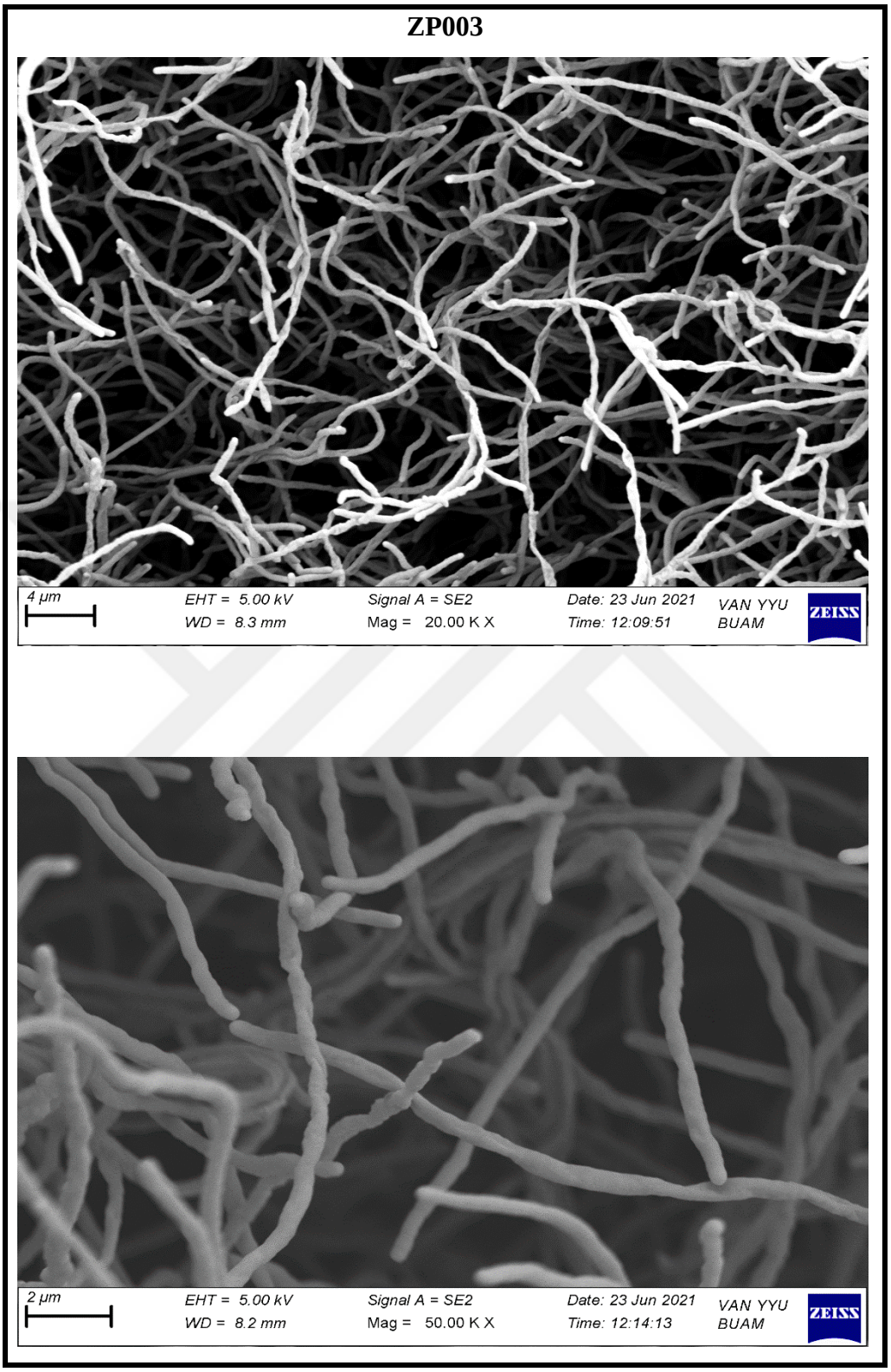
Şekil 4.5. Antimikrobiyal aktivite (Disk difüzyon) çalışmaları görüntüsü

4.6. Gram Boyama Yöntemi ve Misellerinin İncelenmesi ve Spor Zincir Morfolojisi

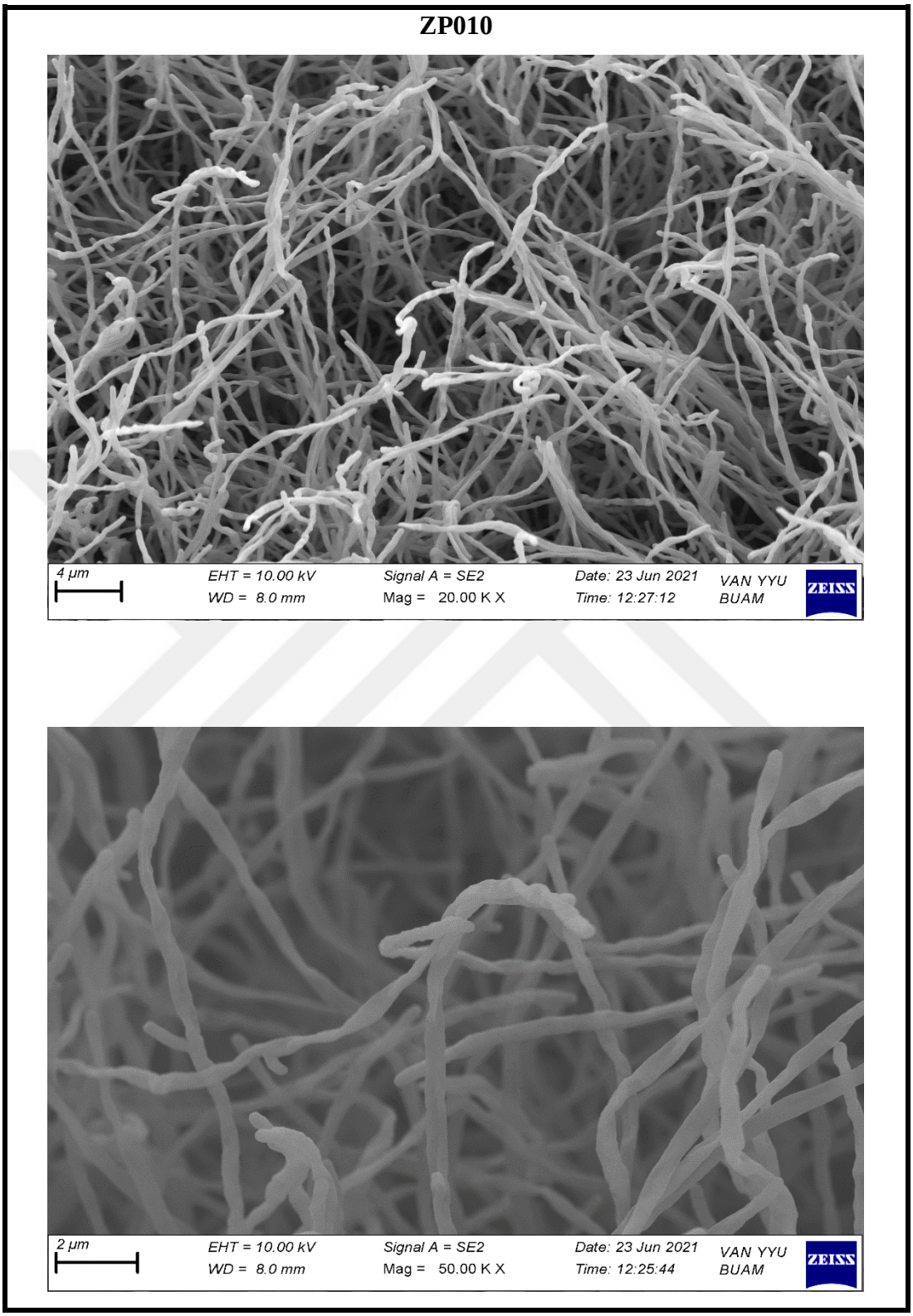
Gram boyama ile boyanan tüm izolatlar ışık mikroskobu ile mor hücreler olarak gözlendiklerinden hepsi gram pozitif hücredir. Miseller ışık mikroskobu 100X büyütme altında inlendi (Şekil 4.6). Spor zincir morfolojisi elektron mikroskobu ile görüntülendi. ZP03 ve ZP10 nolu izolatların spor zincir tipi kıvrımlı ve spor yüzeyi pürüzsüz olarak tespit edildi (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.6. İzolatların havasal misellerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü



Şekil 4.7. ZP003 nolu izolatın spor zincir morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü



Şekil 4.8. ZP010 nolu izolatın spor zincir morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü

4.7. Morfoloji, Gelişme ve Biyokimyasal Testleri

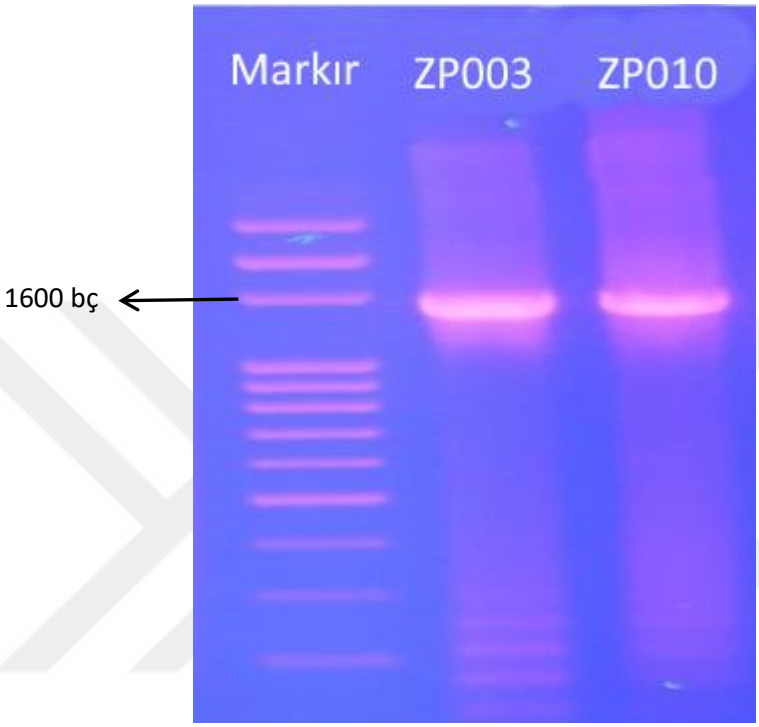
Renk gruplandırması için kullanılan Oatmeal agar (ISP 3) besiyerinde ZP03 nolu izolatın havasal miselyum rengi beyaz, substrat miselyum rengi sarı iken ZP10 nolu izolatın havasal miselyum rengi gri, substrat miselyum rengi ise lacivert olarak tespit edildi. Dört farklı sıcaklık testinde her iki izolat 27 ^{o}C ve 37 ^{o}C'de gelişme gösterirken 4 ^{o}C ve 45 ^{o}C'de gelişme gösterdi. Toplam 9 azot kaynağının 8'ini kullanan ZP03 nolu izolat, sadece L-Sistein'i azot kaynağı olarak kullanmadı. ZP10 nolu izolat ise L-Sistein, L-Fenilalanin ve L-Serin'i azot kaynağı olarak kullanmadı. 14 farklı karbon kaynağının 9'unu kullanan ZP03 nolu izolat Sukroz, Arabinoz, Mannitol, Laktoz ve Sellobiyoz'u kullanmadı. ZP10 nolu izolat ise Sellobiyoz, Arabitol ve Ksilitol'u karbon kaynağı olarak kullanmadı.

Çizelge 4.3. Suşlara uygulanan testler

TESTLER	İZOLATLAR	
	ZP03	**ZP10**
Morfoloji ve Pigmentasyon		
1. Havasal Spor Üretimi	+	+
2. Beyaz	+	-
3. Gri	-	+
Substrat Miselyumu		
4. Lacivert	-	+
5. Sarı	+	-
6. Diffüziye Pigment		
7. Kahverengi	-	+
Sıcaklık Gelişme Testleri		
8. 4 ^{o}C	-	-
9. 10 ^{o}C	-	-
10. 27 ^{o}C	+	+
11. 37 ^{o}C	+	+
12. 45 ^{o}C	-	-
Azot Kaynakları (0.1 % w/v)		
13. L-Asparagin	+	+
14. L-Sistein	-	-
15. L-Trozin	+	+
16. L-Valin	+	+
17. L-Fenilalanin	+	-
18. L-Histidin	+	+
19. L-Arjinin	+	+
20. L-Serin	-+	-
21. L-Metionin	+	+
Karbon Kaynakları (1 % w/v)		
22. Sukroz	-	+
23. Arabinoz	-	+
24. Inositol	+	+
25. Mannitol	-	+
26. Fruktoz	+	+
27. Ramnoz	+	+
28. Mannoz	+	+
29. Laktoz	-	+
30. Sellobiyoz	-	-
31. Arabitol	+	-
32. Traheloz	+	+
33. Galaktoz	+	+
34. Ksilitol	+	-
35. Glikoz	+	+

4.8. 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu

İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin yaklaşık 1500 bç kısmı 27F ve 1492R evrensel primerleri ile çoğaltılmış ve %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PZR ürünleri (Markır: Fluorescent 200 bp DNA Ladder)

4.9. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

Dört izolatın 16S rDNA gen sekanslarını taksonomik hiyerarşiye sokabilmek için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılmıştır. İzolatların BLAST sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

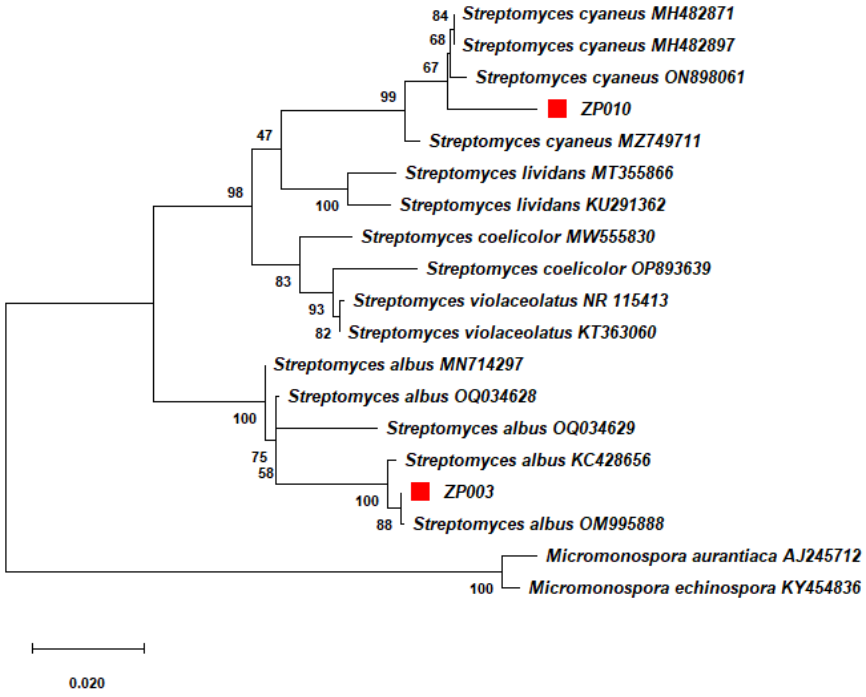
Çizelge 4.4. İzolatların NCBI'daki BLAST sonucu

No	Strain	Benzerlik
ZP03	*Streptomyces albus*	%99,72
ZP10	*Streptomyces cyaneus*	%99,86

Test organizmaları ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Maximum Likelihood algoritması kullanılarak

oluşturulmuştur. Maximum Likelihood algoritması için filogenetik uzaklık matriksi MegaX paket programı ile belirlenen T92+G (Tamura3+ Gama dutribition) metodu izlenerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağacın bootstrap analizi 1000 tekrarlı olarak MEGAX paket programında gerçekleştirildi. Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinde ki polimorfizim oranları yardımı ile türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için bootstrap değeri (1000) hesaplanmıştır. 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen ML analizlinde oluşturulan filogenetik ağaçta dış grup tamamen farklı bir dal oluşturarak kümelenmiştir (Şekil 4.10).

ZP03 izolatı *Streptomyces albus* ve ZP10 izolatı *Streptomyces cyaneus* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.10). ZP003 nolu izolat *Streptomyces albus*'larla, ZP010 nolu izolat ise *Streptomyces cyaneus*'larla sıkı bir şekilde kümelenme göstermiştir.



Şekil 4.10. İki izolatın ve genebank verilerinden elde edilen türlerin Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre 16S rRNA gen bölgesi filogenetik ağacı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma 2019 Mayıs ayında yapılan arazi çalışmalarında Hakkari ili sınırları içerisinde yer alan Zap Nehri'nden toplanan sediment numunelerinden izole edilen bakterilerin morfolojik, biyokimyasal özellikleri, antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi ve 16S rRNA analizine dayalı teşhis çalışmalarını içermektedir. İzolasyonu yapılan 26 *Streptomyces* bakterisinin antimikrobiyal özellikleri belirlenerek aktivite gösteren 2 suşa morfolojik ve biyokimyasal testler uygulandı ve 16S rRNA dizi analizleri ile baktarilerin tanımlanması sağlandı. Son olarak izolatlardan ve genebank veri tabanından elde edilen türlerin 16S rRNA gen dizileri ile filogenetik dendogramları oluşturuldu.

Streptomyces bakterilerin izolasyonu için tavsiye edilen besi ortamları kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda Medium 65 (GYM *Streptomyces* Medium: DSMZ) ve Bennet's agar besiyerleri tercih edildi. Goodfellow ve Simpson (1989), yapmış oldukları çalışmalarda bakterilerinin doğal habitatlarından izolasyonları sırasında uygulanan ön işlemler, inkübasyon şartları gibi etkenlerin selektif izolasyonun için oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Dilüsyonların 65 ^{o}C'de 10 dk bekletilmesi olası kontaminasyonları ve vejetatif formların gelişmesini büyük oranda engelledi. İzolasyon çalışmasında toplam aktinobakteriler ve toplam *Streptomyces* izolatlarının sayımı yapıldı. Toplamda 26 farklı *Streptomyces* izolatı izole edildi.

Streptomyces, Actinobacteria sınıfındaki cinslerden biridir ve kapsamlı ikincil metabolit üretimi yeteneğine sahiptir ve büyük genomlara sahip türleri kapsar. *Streptomyces* bakterileri, pH, nem içeriği ve organik madde içeriğine bağlı olarak topraklarda bol miktarda bulunur (Schlatter vd., 2009). Ayrıca *Streptomyces* bakterilerinin, *Streptomyces*'in dağılımını etkileyen toprağın geniş ikincil metabolizmasını ve fizikokimyasal karakterini ürettiği iyi bilinmektedir. Chater ve diğerleri (2016), antibiyotiklerin %70'inden fazlasının *Streptomyces sp*. tarafından sağlandığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda izole edilen 26 *Streptomyces* suşunun antimikrobiyal aktiviteleri çapraz çizgi metodu ile belirlenerek antimikrobiyal etki gösteren suşlar seçilmiştir. Seçilen ZP03 ve ZP10 nolu izolatların Medium 65 besiyerindeki 15 günlük inkübasyon süresinden sonra

spor zincir morfolojileri elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. Her iki izolatın spor zincir morfolojisi kıvrımlı ve pürüzsüz olarak tespit edilmiştir.

Son yıllarda yeni antibiyotiklerin keşfi için birkaç girişimde bulunuldu. Antimikrobiyal direnç raporlarındaki artış göz önüne alındığında, bu daha acil hale geldi (Hu vd., 2020). Araştırmacılar eski antibiyotik keşif yöntemlerini tekrarlamak yerine yeni yenilikler denediler. Böyle bir yol, geleneksel ilaçların antimikrobiyal üreten bakteriler veya antimikrobiyallerin kendileri için incelenmesidir. Bu, kanser alanında kurşun bileşiklerinin başarılı bir şekilde üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Cordell vd., 1994).

Çeşitli araştırmacılar, aktinobakterilerin özellikle *Streptomyces* cinsinin ve nadir aktinobakterilerin çok sayıda biyoaktif bileşik ürettiğini bildirmiştir (Li vd., 2019). Son 10 yılda, aktinobakterilerin gelişim potansiyelinden yararlanmak için dinamik metabolik kontrol, BGC amplifikasyonu, yolak yeniden düzenlemesi ve genomu en aza indirilmiş *Streptomyces* mutantları dahil olmak üzere bir dizi yeni metabolik mühendislik ve sentetik biyoloji stratejisi oluşturulmuştur (Li vd., 2019). Nepal'in farklı bölgelerindeki su ve toprak sedimanlarından potansiyel antibiyotik üreten aktinomisetlerin araştırıldığı çalışmada yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip suşlar karakterize edilmiştir (Shrestha vd, 2021). Hamed vd. (2018) Mısır'da piramit bölgesinden izole ettikleri suşu *Streptomyces* sp. MER4 olarak adlandırmış ve bu suşa ait metanol özütlerinin antidermatifitik, antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerini raporlamışlardır. Yıldız Gölü sedimentinden izolen edilen 9 adet Aktinobakteri suşunun *C. tropicalis, C. albicans, E. coli, P. aeruginosa,* MRSA*, E. faecium, E. fecalis* indikatör mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, izolatların %55'inin en az bir test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Özcan, 2019).

ZP003 nolu izolat gram pozitif bakteriler olan *S. aureus* ATTC 29213, *B. subtilis* ATTC 11774, *B. cereus* ATCC 10876 ve maya olan *C. albicans* ATTC 90028 üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Özellikle *B. cereus* ATCC 10876 30 mm inhibisyon zonu ve 128 µg/ml MİK değeri ile en iyi antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. ZP010 nolu izolat ise *C. albicans* ATTC 90028 ve *B. cereus* ATCC 10876 üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. ZP003 nolu

izolat daha fazla test suşu üzerinde etkili olmuştur. Her iki izolat antifungal aktivite göstermiştir.

Bakterilerin teşhisinde moleküler çalışmaların doğruluğu ve geçerliliği tartışılmaz bir gerçektir (Laurent vd., 1999). Bu moleküler çalışmalar içerisinde de ribozomal moleküllerin analizi özellikle cins seviyesinde ve cinslerin türleri arasındaki filogenetik benzerliğin ortaya konmasında göz ardı edilemeyecek kadar yararlı tekniklerdir (Cook ve Meyers, 2003). Ribozomal RNA genleri, evrensel ve fonksiyonel olarak yüksek derecede korunmuş yapıya sahip olduğu için filogenetik çalışmalarda en iyi sonuç veren hedef yapılardandır (Woose, 1990).

Moleküler yöntemlerden biri olan 16S rRNA gen dizileme bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin açıklanmasında, herhangi bir ortamdan izole edilen bakterilerin tanımlanmasında kullanılan güçlü bir tekniktir (Busse vd., 1996). 2000'li yıllardan itibaren PZR kullanımının ve DNA dizilemenin yaygınlaşmasının sonucu olarak 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi bakteriyal izolatların doğru şekilde tanımlanmasında ve yeni bakteriyal izolatların literatüre kazandırılmasında büyük öneme sahip olmuştur. 16S rRNA gen bölgesi tüm türlerin tanımlanmasında oldukça faydalı ve korunmuş bölgelerin ise tür için spesifik bilgi verici özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Brown-Elliott, 2006). Korunmuş bölgeler yavaş evrimleştikleri için cins, tür ve alt tür seviyesinde filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. 16S rRNA sekans verileri gen bankalarına deposit edilmekte ve ihtiyaç duyulduğunda bu veri bankalarından kolaylıkla elde edilebilmektedir. Veri bankalarında deposit edilmiş olan sekans dizilerinin kalitesi yapılan moleküler çalışmaların güvenilirliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Son yirmi yılda 1,3 milyon bakterilere ait, 54 bin arkealere ait 16S rRNA gen dizisi RDP'de (Ribosomal Database Project) arşivlenmiştir (Brown-Elliott, 2006; Kim vd., 2011).

Bakteri suşlarının tanımlanması, moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmelere ve piyasada bulunan fenotip tabanlı tanımlama testleri olan kitlerin geliştirilmesine rağmen mikrobiyologlar için hala zor bir konudur. 16S rRNA geni her yerde bulunduğundan, kararlı olduğundan, korunduğundan ve yatay gen transferine zayıf şekilde maruz kaldığından, bakterilerin tanımlanması için etkili bir moleküler işaretleyicidir. Suşların 16S rRNA gen dizisi analizlerinin arkealar

ve bakteriler için temel teknik olduğu ve prokaryotların tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanıldığı iyi bilinmektedir (Stackebrandt vd., 2002). Bu nedenle, 16S rRNA genlerinin dizilimi ve filogenetik analizi, çeşitli taksonomik seviyelerde bakteriyel izolatların sınıflandırılması ve tanımlanması için kolay ve güvenilir bir yöntemdir. Sınıflandırma için kesme değerleri %98,7'dir (Stackebrandt & Ebers 2006).

Çalışmada, türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için filogenetik analizlere uygun formatlara getirilmiş 16S rRNA dizileri, Maksimum Olabilirlik algoritması T92+G (Tamura3 + Gama dutribition) metodu ile filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 4.10).

Oluşturulan filogenetik ağaçta *Streptomyces* cinsi bakterilerin güçlü bir homoloji ile kümelendiği görüldü. Dış grup olarak *Micromonospora echinospora* ve *Micromonospora aurantica* seçildi. İzolatlar filogenetik ağaçta 2 ana soy hattında yer aldı. ZP03 bir soy hattında yer alırken, ZP10 ayrı bir soy hattında yer almıştır. ZP03 nolu izolatın karşılaştırılan 1433 bç'lik bölgesi 4 nükleotit farklılığı ve % 99,71 benzerlik ile *Streptomyces albus* OM995888 türü ile sıkı bir homoloji göstermiştir. ZP10 nolu izolatın karşılaştırılan 1372 bç'lik bölgesi 2 nükleotit farklılığı ve % 99.63 ile *Streptomyces cyaneus* MH482897 ile sıkı bir homoloji göstermiştir.

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

KAYNAKLAR

Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. **Biotechnology advances,** 33(6), 798-811.

Amin, D. H.,Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., Wellington, E. M. (2020). Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. **Bulletin of the National Research Centre**, 44(1), 1-12.

Antony-Babu, S., Stach, J. E., Goodfellow, M. (2010). Computer-assisted numerical analysis of colour-group data for dereplication of streptomycetes for bioprospecting and ecological purposes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 97(3), 231-239.

Arasu, M. V., Duraipandiyan, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S. (2008). Antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**, 18(3), 147-153.

Atalan, E., Manfio, G. P., Ward, A. C., Kroppenstedt, R. M., Goodfellow, M. (2000). Biosystematic studies on novel streptomycetes from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, 77(4), 337-353.

Babalola, O. O., Kirby, B. M., Le Roes-Hill, M., Cook, A. E., Cary, S. C., Burton, S. G., Cowan, D. A. (2009). Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils. **Environmental microbiology**, 11(3), 566-576.

Bachoon, D. S., Araujo, R., Molina, M., Hodson, R. E. (2001). Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. *Journal of Industrial* **Microbiology and Biotechnology**, (2), 72-79.

Balkar, N., Korcan, S. E., Konuk, M. (2010). Afyonkarahisar İlinden İzole Edilen Actinomycet İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. **BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi,** 1(1), 21-26.

Baltz, R. H. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall?. **Sim News**, 55, 186-196.

Brown-Elliot, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S., Wallace, R. J. (2006). Clinical and Laboratory features of the *Nocardia sp*p. Based on current molecular taksonomy. **Clin. Microbiol. Rev.,** 19, 259-282.

Bu'Lock, J. D., ve Kristiansen, B. (1987). **Basic biotechnology/edited by John Bu'Lock, Bjorn Kristiansen**. Academic press.

Busse H.-J., Denner E. B. M., Lubitz W. (1996). Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **J Biotechnol,** 47, 3-38.

Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., Prinsep, M. R. (2022). Marine natural products. **Natural Product Reports**.

Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding Streptomyces. **F1000Research**, 5.

Cheng, J., Yang, S. H., Palaniyandi, S. A., Han, J. S., Yoon, T. M., Kim, T. J., Suh, J. W. (2010). Azalomycin F complex is an antifungal substance produced by Streptomyces malaysiensis MJM1968 isolated from agricultural soil. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 53(5), 545-552.

Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., ... & Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature communications**, 10(1), 1-11.

Cook A. E., Meyers P. R. (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genusspecific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. **Int J Syst Evol Microbiol**, 53, 1907-1915.

Cordell, G. A., Farnsworth, N. R., Beecher, C. W., Soejarto, D. D., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M., ... & Harris, T. J. (1994). Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **In Anticancer Drug Discovery and Development: Natural Products and New Molecular Models** (pp. 63-83). Springer, Boston, MA.

de Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, 16(5), 466-471.

Demain, A. L., Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. **History of modern biotechnology** I, 1-39.

Develoux, M., Ndiaye, B., Kane, A., Diousse, P., & Huerre, M. (1999). Clinical cases-Mycetoma of the scalp and the nape in Dakar, Senegal. **Journal de Mycologie Medicale**, 9(1), 65-67.

Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. (2009). Distribution and ecobiology of antagonistic streptomyces from agriculture and coastal soil in Tamil Nadu, India. **Journal of Culture collections**, 6(1), 10-20.

Dharmaraj, S. (2010). Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26(12), 2123-2139.

Dyson, P. (Ed.). (2011). **Streptomyces: molecular biology and biotechnology**. Horizon Scientific Press.

Fenical, W., Baden, D., Burg, M., De Goyet, C. V., Grimes, J. D., Katz, M., ... & Vena, J. (1999). Marine derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. **From monsoons to microbes: understanding the ocean's role in human health**, 71-86.

Fischbach, M. A., Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. **Science,** 325(5944), 1089-1093.

Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. R., Vicente, F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 38(3), 375-389.

Ghareeb, M. A., Tammam, M. A., El-Demerdash, A., Atanasov, A. G. (2020). Insights about clinically approved and Preclinically investigated marine natural products. **Current Research in Biotechnology**, 2, 88-102.

Goodfellow, M., Labeda, D., P., Vancanneyt, M., Lanoot, B., Kim, S., Liu, Z., Chun, J., Swings, J. (1987). Finally a Phylogeny for *Streptomyces*. **Microbial Genomics and Bioprocessing Research, USDA, ARS, National Center for Agricultural Utilization Research, 1815 N**. University Street, Peoria, IL 61604, USA.

Goodfellow, M., Simpson, K., E. (1989). Ecology of *Streptomyces*. *Frontiers in* **Applied Microbiology** 2*:* 97-125.

Grasso, L. L., Martino, D. C., Alduina, R. (2016). Production of antibacterial compounds from Actinomycetes. **Actinobacteria-basics and biotechnological applications**, 214(11), 272-282.

Gundlapally, S. R., Garcia-Pichel, F. (2006). The community and phylogenetic diversity of biological soil crusts in the Colorado Plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation. **Microbial ecology**, 52(2), 345-357.

Gürel, D. (2006). Rizosferden izole edilen antimikrobiyal aktiviteli Streptomyces' lerin nümerik taksonomisi. **Yük. Lis. Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye.**

Hamed, A.A., Abdel-Aziz, M.S., Fadel, M. et al. (2018). Antimicrobial, antidermatophytic, and cytotoxic activities from *Streptomyces sp*. MER4 isolated from Egyptian local environment. **Bull Natl Res Cent** 42, 22.

Hayakawa, M., Yoshida, Y., Iimura, Y. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. **Journal of Applied Microbiology**, 96(5), 973-981.

Hu, X. Y., Logue, M., Robinson, N. (2020). Antimicrobial resistance is a global problem–a UK perspective. **European journal of integrative medicine**, 36, 101136.

Kaneko, M., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2003). Cinnamate: coenzyme A ligase from the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Journal of bacteriology**, 185(1), 20-27.

Kim, M., Morrison, M., Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. **Journal of Microbiological Methods,** 84, 81-87.

Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, 4(3), 206-220.

Korniłłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. **Waste management**, 31(8), 1689-1701.

Kuncharoen, N., Fukasawa, W., Mori, M., Shiomi, K., Tanasupawat, S. (2019). Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes isolated from plant roots in Thailand. **Microbiology**, 88(4), 479-488.

Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current opinion in microbiology**, 9(3), 245-251.

Laskaris, P., Tolba, S., Calvo-Bado, L., & Wellington, L. (2010). Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. **Environmental microbiology**, 12(3), 783-796.

Laurent, F. J., F. Provost, and P. Boiron. **(**1999). Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. **J. Clin. Microbiol.** 37*:*99–102.

Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 20(4), 435-443.

Li, L., Liu, X., Jiang, W., Lu, Y. (2019). Recent advances in synthetic biology approaches to optimize production of bioactive natural products in actinobacteria. **Frontiers in microbiology**, 10, 2467.

Lin, Z., Antemano, R. R., Hughen, R. W., Tianero, M. D. B., Peraud, O., Haygood, M. G., ... & Schmidt, E. W. (2010). Pulicatins A− E, neuroactive thiazoline metabolites from cone snail-associated bacteria. **Journal of natural products**, 73(11), 1922-1926.

Loria, R., Bignell, D. R., Moll, S., Huguet-Tapia, J. C., Joshi, M. V., Johnson, E. G., ... & Gibson, D. M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus Streptomyces. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 94(1), 3-10.

Malisorn, K., Embaen, S., Sribun, A., Saeng-in, P., Phongsopitanun, W., Tanasupawat, S. (2020). Identification and antimicrobial activities of *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Kitasatospora* strains from rhizosphere soils. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 10(2), 123-128.

Manteca, A., Sanchez, J. (2009). Streptomyces development in colonies and soils. **Applied and environmental microbiology**, 75(9), 2920-2924.

Manteca, Á., Yagüe, P. (2019). Streptomyces as a source of antimicrobials: Novel approaches to activate cryptic secondary metabolite pathways. **Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods**, 119.

Mellouli, L., Ameur-Mehdi, R. B., Sioud, S., Salem, M., Bejar, S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces sp*. US24 strain. **Research in Microbiology**, 154(5), 345-352.

Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G. (1983). **Actinomycete envelope lipid and peptidoglycan composition.** Biology of the actinomycetes/edited by M. Goodfellow, M. Mordarski, ST Williams.

Miyadoh, S. (1993). Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. **Actinomycetologica**, 7(2), 100-106.

Mobeen, S. K., Sankar, G. G. (2018). Bioprocess development employing design of experiments for antibiotic production from Streptomyces parvulus strain sankarensis-A10. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 80(5), 911-920.

Morita, R. Y. (1985). Starvation and miniaturization of heterotrophs, with special reference on the maintenance of the starved viable state. **Bacteria in Natural Environments: The Effect of Nutrient Conditions**, 111-130.

Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., ... & Daniel, R. (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. **PloS one**, 6(2), e17000.

Nakade, D. B. (2012). Studies on actinomycetes in Rankala lake of Kolhapur city and their screening as potential antibiotic producer. *Journal of Pure and* **Applied Microbiology**, 6(2), 945-947.

Nazir, R., Warmink, J. A., Boersma, H., Van Elsas, J. D. (2009). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. **FEMS microbiology ecology**, 71(2), 169-185.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981− 2002. **Journal of natural products**, 66(7), 1022-1037.

Özcan, K. (2019). **Yıldız Gölü Sedimentinden İzole Edilen Aktinobakterilerin Antimikrobiyal ve Enzim Üretim Kapasitelerinin Araştırılması**. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 9(1), 144-151.

Park, D. H., Kim, J. S., Kwon, S. W., Wilson, C., Yu, Y. M., Hur, J. H., Lim, C. K. (2003). *Streptomyces luridiscabiei sp. nov., Streptomyces puniciscabiei sp. nov. and Streptomyces niveiscabiei sp. nov.,* which cause potato common scab disease in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53(6), 2049-2054.

Parte, A. C., Carbasse, J. S., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70(11), 5607.

Pathom-Aree, W., Stach, J. E., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. **Extremophiles**, 10(3), 181-189.

Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature reviews Drug discovery**, 6(1), 29-40.

Pridham, T., G., Tresner, H., D., (1974). Genus I. *Streptomyces Waksman and Henrici.* ***In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8. Edition*****, Baltimore**, 748- 829.

Quinn, G. A., Banat, A. M., Abdelhameed, A. M., Banat, I. M. (2020). Streptomyces from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal of Medical Microbiology**, 69(8), 1040.

Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based Streptomyces sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. **Frontiers in Microbiology**, 5, 753.

Sanglier, J. J., Haag, H., Huck, T. A., Fehr, T. (1996). Section review; anti-infectives: review of actinomycetes compounds 1990–1995. **Expert opinion on investigational drugs**, 5(2), 207-223.

Schatz, A., Waksman, S. A. (1944). Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium tuberculosis and Related Organisms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 57(2), 244-248.

Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S., Kinkel, L. (2009). Resource amendments influence density and competitive phenotypes of Streptomyces in soil. **Microbial ecology**, 57(3), 413-420.

Schrey, S. D., Erkenbrack, E., Früh, E., Fengler, S., Hommel, K., Horlacher, N., ... & Tarkka, M. T. (2012). Production of fungal and bacterial growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes. **BMC microbiology**, 12(1), 1-14.

Seipke, R. F. (2015). Strain-level diversity of secondary metabolism in Streptomyces albus. **PLoS One**, 10(1), e0116457.

Seipke, R. F., Kaltenpoth, M., Hutchings, M. I. (2012). Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS microbiology reviews**, 36(4), 862-876.

Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B. S., Manhas, R. K. (2011). Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 10(6), 801-808.

Sharma, T. K., Mawlankar, R., Sonalkar, V. V., Shinde, V. K., Zhan, J., Li, W. J., ... & Kumar, L. S. (2016). Streptomyces lonarensis sp. nov., isolated from Lonar Lake, a meteorite salt water lake in India. **Antonie van Leeuwenhoek**, 109(2), 225-235.

Shrestha, B., Nath, D. K., Maharjan, A., Poudel, A., Pradhan, R. N., Aryal, S. (2021). Isolation and characterization of potential antibiotic-producing actinomycetes from water and soil sediments of different regions of Nepal. **International journal of microbiology**, *2021*.

Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, W. M., ... & Infectious Diseases Society of America. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, 46(2), 155-164.

Sripreechasak, P., Suwanborirux, K., & Tanasupawat, S. (2014). Characterization and antimicrobial activity of Streptomyces strains from soils in southern Thailand. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 4(10), 024-031.

Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards, **Microbiol.**, 33, 152–155, 2006.

Subramani, R., Sipkema, D. (2019). Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. **Marine drugs**, 17(5), 249.

Şahin, N., Uğur, A. (2003). Investigation of the antimicrobial activity of some Streptomyces isolates. **Turkish Journal of Biology**, 27(2), 79-84.

Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards Jr, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J. G. (2006). Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, 42(5), 657-668.

Terkina, I. A., Drukker, V. V., Parfenova, V. V., Kostornova, T. Y. (2002). The biodiversity of actinomycetes in Lake Baikal. **Microbiology**, 71(3), 346-349.

Trujillo, M. E., Goodfellow, M. (2003). Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, 84(1), 39-68.

Waksman, S. A., Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil Actinomyces. **Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine,** 45(2), 609-614.

Waksman, S. A., Woodruff, H. B. (1942). Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. **Journal of bacteriology**, 44(3), 373-384.

Waksman, S. A., Henrici, A. T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, 46(4), 337-341.

Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from?. **Nature Reviews Microbiology**, 1(1), 65-70.

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?. **Archives of microbiology**, 176(5), 386-390.

Weyland, H., Helmke, E. (1988). Actinomycetes in the marine environment. **Biology of Actinomycetes' 88 (Y Okami, ed) Japan Scientif Soc Press**, Tokyo, 294-299.

Williams, S. T. (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***., *4*, 2452-2492.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., Sackin, M. J. (1983). Numerical classification of Streptomyces and related genera. **Microbiology,** 129(6), 1743-1813.

Wirth, S., Ulrich, A. (2002). Cellulose-degrading potentials and phylogenetic classification of carboxymethyl-cellulose decomposing bacteria isolated from soil. **Systematic and applied microbiology**, 25(4), 584-591.

Witt, D., Stackebrandt, E. (1990). Unification of the genera Streptoverticillum and Streptomyces, and amendation of Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339AL. **Systematic and applied microbiology**, 13(4), 361-371.

Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards natural system of an organism: Proposal for the domains Archeae, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, 87, 4576-4579.

Yamanaka, K., Reynolds, K. A., Kersten, R. D., Ryan, K. S., Gonzalez, D. J., Nizet, V., ... & Moore, B. S. (2014). Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 111(5), 1957-1962.

Yikmis, M., Steinbüchel, A. (2012). Historical and recent achievements in the field of microbial degradation of natural and synthetic rubber. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(13), 4543-4551.

Zheng, X., Wang, J., Chen, Z., Zhang, H., Wang, Z., Zhu, Y., Liu, B. (2019). A Streptomyces sp. strain: isolation, identification, and potential as a

biocontrol agent against soilborne diseases of tomato plants. **Biological Control**, 136, 104004.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

ADI SOYADI :İLTER ASLAN

DOĞUM YERİ VE TARİHİ :

EĞİTİM DURUMU

LİSANS ÖĞRENİMİ: ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ (2006-2012)

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ PEDAGOJİK FORMASYON(2015)

YABANCI DİLLER : İNGİLİZCE