

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LOKAL *STREPTOMYCES* İZOLATLARININ
BİYOAKTİF SEKONDER METABOLİTLERİNİN
KİMYASAL OLARAK TARANMASI**

Süleyman ÖZAKIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİYARBAKIR
TEMMUZ 2010**

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LOKAL *STREPTOMYCES* İZOLATLARININ
BİYOAKTİF SEKONDER METABOLİTLERİNİN
KİMYASAL OLARAK TARANMASI**

Süleyman ÖZAKIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İKİNCİ DANIŞMAN: Doç. Dr. Murat KIZIL

**DİYARBAKIR
TEMMUZ 2010**

ÖZ

Yeni hastalıkların gelişmesi ve patojenlerde mevcut antibiyotiklere karşı direncin artmasından dolayı yeni mikrobiyal metabolitlere sürekli ihtiyaç duyulmaktadır. Mikrobiyal sekonder metabolitler, potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin kaynaklarından birini teşkil ederler. *Actinomycetales* ordusuna dahil olan *Streptomyces* türleri, çoğu biyolojik olarak aktif olan sekonder metabolitleri üretme yeteneğine sahip olan mikroorganizma grubudurlar. Bu sekonder metabolitlerden başlıcaları; antibakteriyel, antifungal ve antitümör ajanlarıdır. Yeni biyoaktif metabolitlerin keşfi için temel strateji *Streptomyces* gibi iyi bilinen ve yetenekli organizmalardan yeni bileşiklerin taranmasıdır.

Bu amaçlar doğrultusunda daha önce 3 farklı endemik bitkinin kök çevresi (rizosfer) topraklarından izole edilmiş olan 12 lokal izolatın, 16S rRNA genleri kullanılarak yapılan moleküler teşhis çalışmalarında bu izolatların *Streptomyces* cinsine dahil oldukları bulundu. Moleküler teşhisi yapılan 12 izolatın Benett + Glukoz besiyerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması sonucunda bu izolatlardan 9'unun antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi.

Moleküler teşhis çalışmaları sonucunda daha önce *Streptomyces* sp. CAH29 olarak adlandırılan izolatın ürettiği sekonder biyoaktif bileşiklerinin kimyasal tarama yöntemi ile belirlenmesi amaçlandı. İzolat öncelikle antimikrobiyal bileşik üretme kapasitesi açısından 5 farklı besiyerinde üretildi. Elde edilen filtratlar farklı polarite özelliklerine sahip 3 farklı çözücü sistemi ile ekstrakte edildi. Elde edilen organik ekstraktların antifungal ve antibakteriyel

aktiviteleri belirlendi. Bu şekilde elde edilen ekstraktların test organizmaları üzerine farklı inhibisyon etkileri gözlemlendi. En güçlü ve geniş spektrumda antimikrobiyal aktivite elde edilen Benett + Glukoz besiyerinde daha geniş ölçekte üretilen *Streptomyces* sp. CAH29'un sekonder metabolitleri, en iyi aktivitenin gözlemlendiği etilasetat çözücüsü ile ekstrakte edildi. Ekstraktların içerdiği bileşikler, ince tabaka kromatografisinde (TLC) farklı çözücü sistemleri ile birbirinden ayrıldı. Bileşiklerin en iyi olarak diklorometan – metanol (9:1) çözücü sisteminde birbirinden ayrıldığı tespit edildi. TLC ile birbirinden ayrılmış bileşiklere ait spotlar biyootografi yöntemi ile test organizmaları üzerine denendi. Rf değeri yaklaşık 0,69 olan spot bölgesinin hem antifungal hem de Gram (+) organizmalara karşı antibakteriyel etkisinin olduğu tespit edildi. Bu spot bölgesindeki biyoaktif bileşiğin saflaştırılması amacıyla nonpolar karakterdeki hekzan – etilasetat ile polar karakterdeki etilasetat ve metanol çözücü sistemlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen kolon kromatografisinden 4 temel fraksiyon elde edildi. İkinci bir kolon kromatografisi ve sonrasında uygulanan yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) sonucunda hedeflenen bileşik saf halde 2 mg olarak elde edildi. Saf olarak elde edilen bileşik farklı özellikteki TLC reaktifleri ile muamele edilerek olası fonksiyonel grupları belirlendi. Ayrıca HPTLC sonucu saf bileşiğin 270 nm'de maksimum absorbanans verdiği görüldü. Son olarak bileşiğin *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Candida albicans* üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. Bileşiğin yapı aydınlatma çalışmaları devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces*, 16S rRNA genleri, antimikrobiyal aktivite, sekonder metabolit.

ABSTRACT

New microbial metabolites are permanently needed due to the increase in resistant pathogens and evolution of novel disease. Microbial secondary metabolites represent a large source of compounds endowed with ingenious structure and potent biological activities. *Streptomyces* strains which are belonging to the order *Actinomycetales* are superior to other actinomycete strains in their ability to produce large number and varieties of bioactive metabolites. The main compounds of these secondary metabolites are antibacterial, antifungal and antitumor agents. To explore new bioactive drug, the main strategy is to search for new compounds from well known and talented microorganism, such as *Streptomyces*

For this purpose, 12 local strains were isolated from rhizospheric soils of three endemic plants. 16S rRNA genes of isolates were amplified. According to 16S rDNA sequence analyses, we conclude that these local strains belong to member of *Streptomyces* genus. Nine isolates were found to have antimicrobial activity.

In this study, our aim is to describe the bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. CAH29 using chemical screening methodology. The isolate was grown at five different culture medium to determine the best antimicrobial metabolite production. Culture supernatants were extracted with organic solvents which have different polarity. The in vitro antimicrobial activities of the extracts were applied to a panel of bacteria and *C. albicans*. Then, *Streptomyces* sp. CAH29 was grown in large scale in the Benett + Glucose

medium which was the best for antimicrobial metabolite production. It was determined that antimicrobial metabolites of CAH29 isolate were best obtained by ethylacetat. Also, The compounds produced by isolates were separated using dichloromethane-methanol (9:1) solvent system.

Compounds separated with TLC were applied to agar to test the inhibition effects of spots to microorganisms by using bioautography methods. The spot with Rf value about 0.69 have both antibacterial and antifungal activity. To purify this compound, extracts loaded on columns and elution was carried out with different combinations of solvents such as hexane-ethylacetate, ethylacetate and methanol. Active fractions obtained from first column were combined and loaded to second column. Active fractions eluted from second column were applied to high performance thin layer chromatography (HPTLC) plates to purify target compound. 2 mg pure compound was obtained from the last step of prurification. Compound was treated with different chemical reagents to highlighths its possible functional groups Pure compound was showed maximum absorbance at 270 nm. Finally, it was determined that the compound have antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*. The studies on structure elucidation of pure compound are on going.

Keywords: *Streptomyces*, 16S rRNA genes, antimicrobial activity, secondary metabolite

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bilimsel araştırmalarda uygulanacak yöntem ve strateji, karşılaşılan sorunlara yönelik çözümleyici yaklaşım, verilerin çok yönlü değerlendirilmesi çalışmalarda başarı sağlanmasında rol oynayan önemli etkenlerdir. Öte yandan bilimsel çalışma etiği ve problemlere bilimsel metodoloji temelinde yaklaşılması gibi özellikler araştırıcılarda bulunması gereken niteliklerdir.

Tüm bu ilkeler doğrultusunda tüm çalışmam boyunca tecrübesini, yardımını, bilgisini esirgemeyen ve danışmanım olmasından dolayı şanslı olduğum çok değerli hocam Doç. Dr. Ebru İNCE YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Aynı şekilde çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve tecrübesini esirgmeden yakın ilgi ve desteğini gördüğüm ikinci danışman hocam olan çok kıymetli Doç. Dr. Murat KIZIL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın farklı aşamalarında çeşitli analiz yöntemlerinin uygulanmasında desteğini gördüğüm Uzman Mehmet ÇOLAK ve Araştırma Görevlisi Ersin KILINÇ'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım Bülent BALI'ye, İsmail ACER'e, ve İlknur PORSUK'a teşekkür ederim.

Çok değerli dostlarım Ahmet GÜNEŞ, Hatip POLAT, Recep POLAT, Hüseyin POLAT, Serhat YILDIZ, Ömer AKARSU, Cenk KAYRO, İsmail ERDEM, Yusuf AVCIOĞLU, Taşkın ÖLMEZ, Fedrullah ZÜMRÜT, Ercan ASLAN, Yeliz YAŞAR, Hacire ARIN, Besi SERİN ve Didem KISTIR'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yardımlarını ve desteklerinden ötürü teknisyen İhsan ZEYREK'e teşekkür ederim.

Araştırma Görevlisi Bircan ÇEKEN ve Sevil EMEN başta olmak üzere tüm Biyoorganik Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı ve Kimyasal Analiz Laboratuvarı çalışanlarına yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemedi her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sevgi ve saygıyla en içten şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na (DÜBAP) ve TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xv
SİMGE ve KISALTMALAR	xviii
1. GİRİŞ	1
KAYNAKLAR	5
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	
2.1. Genel Bilgiler	8
2.1.1. <i>Streptomyces</i> Türlerinin Özellikleri	8
2.1.2. Sekonder Metabolitler	11
2.1.3. Sekonder Metabolitlerin Tarihsel Süreci	13

2.4.1. Antibiyotikler	14
2.1.5. Doğal Ürünelerin Farmakolojik Önemi	16
2.1.6. Kimyasal Tarama Yöntemi	19
2.1.7. Biyootografi Yöntemi	20
2.2. Önceki Çalışmalar	20
KAYNAKLAR	37
3. MATERYAL ve METOD	
3.1. MATERYAL	52
3.1.1. Biyolojik Materyal	52
3.1.1.1. Lokal Türlerin Toprakta İzolasyonu ve Karakterizasyonu	52
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	52
3.1.2.1. Organik Çözücüler	52
3.1.2.2. Antibiyotikler	53
3.1.2.3. Kullanılan Diğer Kimyasallar ve Malzemeler	53
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri	53
3.1.3.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Araştırılmasında Kullanılan Besiyeleri	53

3.1.3.2. Kromozomal DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri	54
3.1.3.3. Test Organizmaları İçin Kullanılan Besiyerleri	54
3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.1.5. Kullanılan Enzimler	55
3.1.6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu İçin Gerekli Kimyasallar	55
3.1.7. Jelden DNA'nın Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler	55
3.1.8. TLC Tabakasındaki Bileşikler Spotlarını Görüntülemek İçin Kullanılan Renklendirici Reaktifler	56
3.1.9. Renklendirici Reaktiflerin Hazırlanması	56
3.1.10. Kullanılan Cihazlar	57
3.2. METOD	59
3.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonu	59
3.2.2. 16S rRNA Genlerinin PCR İle Amplifikasyonu	60
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	60
3.2.4. Jelden DNA'nın Geri Kazanılması	61
3.2.5. DNA Sekans Analizi	61

3.2.6. Biyoinformatik İncelemeler	61
3.2.7. Lokal <i>Streptomyces</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivite Tayini	
İçin Üretilmesi	62
3.2.7.1. Lokal İzolat <i>Streptomyces</i> sp. CAH29'un Farklı Besiyerinde Üretilmesi	62
3.2.8. Filtrasyon	62
3.2.9. Liyofilizasyon	63
3.2.10. Farklı Besiyerlerinde Üretilen <i>Streptomyces</i> sp. CAH29	
Filtratlarının Ekstraksiyonu	63
3.2.11. Disk Difüzyon Yöntemi İle Antimikrobiyal Etkinin Tespiti	63
3.2.12. Bileşiklerin İnce Tabaka Kromatografisi İle Ayrılması	64
3.2.13. TLC Spotlarına Çeşitli Renklendirici Ajanların Püskürtülmesi	64
3.2.14. Biyootografi Yöntemi İle Biyoaktif Spotların Tespit Edilmesi	65
3.2.15. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)	66
3.2.15.1. Bileşiklerin HPTLC Tabakalarından Geri Kazanılması	66
3.2.16. Kolon Kromatografisi İle Bileşiklerin Ayrılması	67
3.2.16.1. Organik Ekstraktın Kolon Kromatografisi İle Ayrılması	67
3.2.16.2. F3 Fraksiyonunu İkinci Kolon Kromatografisi İle Ayrılması	67

KAYNAKLAR	70
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	
4.1.1. Toprakta İzole Edilen <i>Streptomyces</i> Türlerinin Moleküler Teşhisi	71
4.1.2. Lokal İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi	72
4.1.2.1. <i>Streptomyces</i> sp. CAH29'un Farklı Besiyerlerindeki Antimikrobiyal Aktivitesi	73
4.1.3. <i>Streptomyces</i> sp. CAH29 Sekonder Bileşiklerinin Kimyasal Taraması	74
4.1.3.1. Geniş Ölçekte Üretilen Bakterilerin Antimikrobiyal Aktivitesi	74
4.1.3.1.1. pH'ya Bağlı Antimikrobiyal Aktivite	74
4.1.3.2. Etilasetat İle Ekstrakte Edilen Bileşiklerin TLC İle Birbirinden Ayrılması ve Biyootografi	75
4.1.4. Sekonder Biyoaktif Metabolitlerin HPTLC İle Belirlenmesi	76
4.1.4.1. HPTLC Tabakalarında Geri Kazanılan Spotların Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması	76
4.1.5. Hedef Bileşiğin Kolon Kromatografisi İle Ayrılması	77
4.1.5.1. HPTLC İle Hedef Bileşiğin Saflaştırılması	78

4.1.5.2. Hedef Bileşimin Farklı Renklendirici Ajanlarla Muamele Edilmesi	78
4.1.5.3. Hedef Bileşimin Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması	78
4.2. TARTIŞMA	80
4.3. TABLO ve RESİMLER	91
KAYNAKLAR	111
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	117
ÖZGEÇMİŞ	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Amfoterisin B

Şekil 1.2. Daunomisin

Şekil 1.3. Avermektin

Şekil 1.4. FK-506

Şekil 2.1. *Streptomyces*'ların Yaşam Döngüsü

Şekil 2.2. Yıllara Göre Antibiyotiklerin Keşfedilmesi

Şekil 2.3. Mikrobiyal Doğal Ürünlerden Antibiyotik Keşfinin Stratejisi

Şekil 3.1. Biyootografi Yönteminin Şematik Gösterimi

Şekil 3.2. Kültür Ortamında Üretilen *Streptomyces* İzolatlarının Sekonder Metabolitlerinin Taranma İşlemleri

Şekil 3.3. Kolon Kromatografisi Yöntemiyle Hedef Bileşiğin Saflaştırılma Aşamaları

Şekil 4.1. *Streptomyces* İzolatlarının Filogenetik Ağacı

Şekil 4.2. HPTLC Tabakalarından Ayrılan Antimikrobiyal Etkili Bileşiklerin Kromatogramı

Şekil 4.3. HPTLC Tabakalarından Ayrılan Antimikrobiyal Etkili Bileşiğin UV Absorbans Değeri

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Etki Mekanizmalarına Göre Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Tablo 4.1. Benett + Glukoz Besiyerinde Üretilen Lokal *Streptomyces* İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Tablo 4.2. *Streptomyces* sp. CAH29 İzolatının Farklı Besiyerlerindeki Antimikrobiyal Aktivitesi

Tablo 4.3. *Streptomyces* sp. CAH29 İzolatının Benett + Glukoz Kültür Ortamından Elde Edilen pH Ayarlanması Yapılan ve Yapılmayan Ekstraktların Antimikrobiyal Aktiviteleri

Tablo 4.4. Çözücülerin Test Organizmaları Üzerine İnhibisyon Etkileri

Tablo 4.5. Saflaştırılan Biyoaktif Bileşiğin Farklı TLC Reaktifleri İle Reaksiyonları

Tablo 4.6. Farklı TLC Reaktiflerinin Belli Fonksiyonel Gruplar İle Reaksiyonları

Tablo 4. 7. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Spot Bölgeleri ve Maksimum Absorbans Değerleri

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1. *Streptomyces* sp. CAH29'un M2 Katı Besiyerindeki Görünümü

Resim 4.2. Amplifiye Edilmiş 16S rRNA Geni

Resim 4.3. HPTLC Tabakalasından Geri Kazanılan Antimikrobiyal Etkili Spot Bölgeleri

Resim 4.4. AR9 İzolatının Organik Ekstraktının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.5. CS41 İzolatının Organik Ekstraktının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.6. BS32 İzolatının *S. aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.7. BA12 İzolatının *C. albicans* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.8. BA12 İzolatının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.9. BA14 İzolatının *C. albicans* ve *E. coli* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.10. BA14 İzolatının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4. 11. BS29 İzolatının *C. albicans* ve *S.aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.12. BS29 İzolatının *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4. 13. CAH29 İzolatının Benett + Glukoz Besiyeri Etilasetat Ekstraktının *C.albicans* Üzerine Antifungal Etkisi

Resim 4.14. CAH29 İzolatının Benett + Gliserol Besiyeri Etilasetat Ekstraktının *S. pyogenes* Üzerine Antibakteriyel Etkisi

Resim 4.15. CAH29 İzolatının Benett + Glukoz Besiyeri Etilasetat Ekstraktının *S. aureus* Üzerine Antibakteriyel Etkisi

Resim 4.16. CAH29 İzolatının Benett + Nişasta Besiyeri Hekzan Ekstraktının *S. pyogenes* Üzerine Antibakteriyel Etkisi

Resim 4.17. CAH29 İzolatının *C. albicans* Üzerine pH'sız Ekstraktının Antifungal Aktivitesi

Resim 4.18. CAH29 İzolatının *C. albicans* Üzerine pH'lı Ekstraktının Antifungal Aktivitesi

Resim 4.19. CAH29 İzolatının *E. coli* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi

Resim 4.20. CAH29 İzolatının *S. aureus* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi

Resim 4.21. CAH29 İzolatının *S. pyogenes* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi

Resim 4.22. CAH29 İzolatının *S. pyogenes* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi

Resim 4.23. CAH29 İzolatının *S. aureus* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi

Resim 4.24. CAH29 İzolatının *E. coli* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi

Resim 4.25. *S. aureus*'a Etkili Biyoaktif Spotun Biyootografisi

Resim 4.26. *S. pyogenes*'e Etkili Biyoaktif Spotun Biyootografisi

Resim 4.27. *C. albicans* Üzerine Etkili Spotun Biyootografi Yöntemi İle Tespiti

Resim 4.28. F3 Fraksiyonun *S. aureus* Üzerine Biyootografi İle İnhibisyon Etkisi

Resim 4.29. Saf Bileşiğin *S. pyogenes* ve *C. albicans* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.30. Saf Bileşiğin *S. aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi

Resim 4.31. *E. coli* Üzerine Etkili Pozitif Kontroller

Resim 4.32. *C. albicans* Üzerine Pozitif Kontrol

Resim 4.33. *S. pyogenes* Üzerine Pozitif Kontroller

Resim 4.34. *S. aureus* Üzerine Pozitif Kontroller

Resim 4.35. Hedef Bileşiğin TLC Reaktifleri İle Reaksiyonları

Resim 4.36. Diklorometan-Metanol (9:1) Çözücü Sistemi İle Birbirinden Ayrılan Spot Bölgeleri

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMC	: Amoksisilin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
EtOAc	: Etilasetat
DCM	: Diklorometan
MeOH	: Metanol
EtOH	: Etanol
NB	: Nutrient Broth
NA	: Nutrient Agar
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
IR	: Infrared (Kızıl ötesi)
M	: Molarite
TSB	: Tryptone Soya Broth
SAR	: Yapı Aktivite İlişkisi

L	: Litre
mm	: Milimetre
HTS	: Yüksek Çıktılı Tarama
EDTA	: Etilendiamintetrasetik asit
Rf	: Alıkonma Faktörü
UV	: Ultraviyole ışık
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
μ l	: Mikrolitre
g	: Gram
nm	: Nanometre
μ g	: Mikrogram
EtBr	: Etidyumbromür
BFB	: Brom fenol blue
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
mg	: Miligram
OFX	: Ofloksasin
NET	: Netilmisin
AFB	: Amfoterisin B

FDA : Amerika Gıda ve İlaç Dairesi

NDA : Yeni İlaç Adayı

E : Eritromisin

IPM : Imipenem

1. GİRİŞ

Doğal ürün terimi genel anlamda biyolojik moleküller için kullanılan bir terimdir. Doğal ürünlerin en önemli grubunu teşkil eden sekonder metabolitler kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı diğer makromoleküllerden ayrılırlar¹.

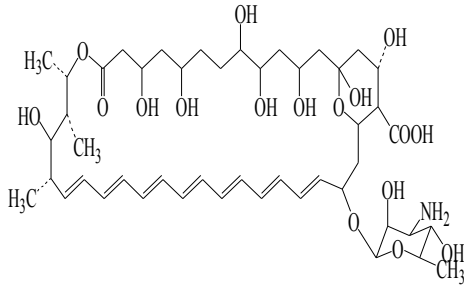
Bitkiler ve mikroorganizmalar önemli sekonder metabolit üreticileridirler. Her iki organizma grubunun sentezlemiş olduğu bileşikler karşılaştırıldığında mikroorganizmalarca sentezlenen sekonder metabolitler, kimyasal yapıları bakımından daha kompleks olup, daha fazla çeşitlilik gösterir. Sekonder metabolitler sahip oldukları özel kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı ilaç araştırmalarında öncül madde olma niteliğine sahiptirler. Tıbbi amaçlı kullanılan ilaçların % 25'i bitki orjinlidir. Dünya Sağlık Örgütüncce (WHO) belirlenmiş başlıca 252 ilacın % 11'i bitki kökenlidir². 1983-1994 yılları arasında keşfedilen 520 yeni ilacın, yaklaşık % 39'u mikrobiyal kaynaklıdır³. 23.000'in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin % 42'si aktinomisetler, % 42'si funguslar, % 16'sı ise diğer bakteri türlerince üretilmektedir³.

İnsanlar doğal ürünleri terapötik özelliklerinden dolayı çok eski zamanlardan beri kullanmaktadır⁴. Günümüzde ise dünya nüfusunun % 80'inden fazlası geleneksel tıbbi tedavi yöntemlerini kullanmaktadır⁵. Geleneksel tıbbi yöntemlerin en fazla kullanıldığı ülkeler arasında başta Çin olmak üzere birçok doğu ülkesi bulunmaktadır⁶.

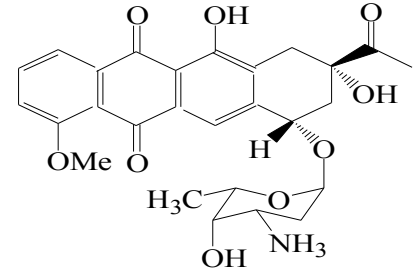
1928 yılında Alexander Fleming'in tesadüf sonucu penisilini keşfetmesiyle mikrobiyal kaynaklı doğal ürün araştırmaları başlamıştır. Bu tarihten sonra mikroorganizmalardan yeni antimikrobiyal bileşiklerin elde edilmesi amacıyla

yapılan çalışmalar hız kazanmıştır³. Bu çalışmalar sonucu yeni sekonder metabolitler keşfedilmiştir.

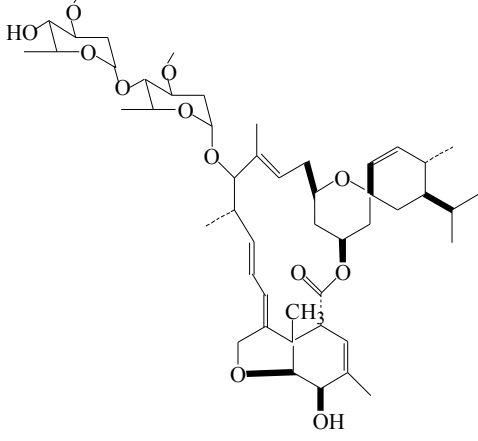
Aktinomisetler antibakteriyel sekonder metabolitlerin üretimi bakımından önemli bir mikroorganizma grubudur.⁷Ticari ve medikal açıdan kullanışlı antibiyotiklerin % 75'i aktinomisetlerin *Streptomyces* cinsine dahil organizmalarca üretilmektedir⁸. Antimikrobiyallerin dünya marketlerindeki yıllık pazarı 25 milyar dolardan fazladır⁹. Antibakteriyel özellikte olan; vankomisin, sefalosporin, eritromisin, antifungal etkili; Şekil 1.1'deki amfoterisin B ve nistatin, antitümör özellikleri olan; aktinomisin D, doksorubisin , bleomisin, Şekil 1.2'deki daunomisin, antidiyabetik; akarboz, antihelmitik; Şekil 1.3'teki avermektin, immünbaskılayıcılar; rapamisin ve Şekil 1.4'teki FK-506, *Streptomyces* cinsine dahil türlerin ürettiği biyoaktif bileşiklerin en bilinen örnekleridir.



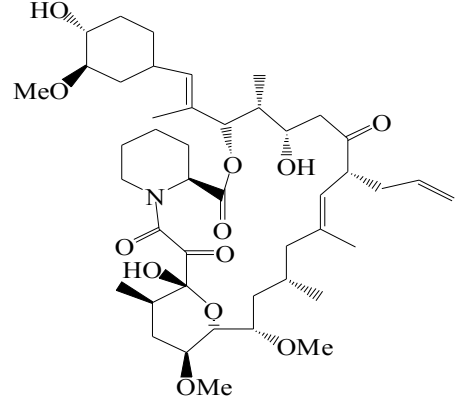
Şekil 1.1 Amfoterisin B



Şekil 1. 2. Daunomisin



Şekil 1.3. Avermektin



Şekil 1.4. FK-506

Antimikrobiyallerin tedavi amaçlı aşırı miktarda ve gelişigüzel kullanımı birçok bakteri türünün mevcut ilaçlara karşı dirençlilik geliştirmesine yol açmaktadır¹⁰. Son yıllarda hızlı bir şekilde antibiyotiklere dirençli türlerin ortaya çıkmasından dolayı, bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmektedir¹¹. Özellikle hastane enfeksiyonlarında, *Enterococcus faecalis*'den *Staphylococcus aureus*'a kadar birçok patojenik bakterinin şu anda kullanılan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği rapor edilmiştir¹². *Myobacterium tuberculosis* enfeksiyonu dünya çapında ölümlere ve kitlesel sağlık problemlerine neden olan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 verilerine göre 9.200.000 hastadan 1.700.000'ü tüberkülozdan ölmektedir¹³. *M. tuberculosis* rifampisin, isoniazid, ethambutol gibi ilaçlara karşı dirençlilik kazanmıştır¹⁴. 1980 yılından önce methisilin dirençli *S. aureus* oranı % 3'ten azken bu oran son

zamanlarda % 40'ın üzerine çıkmıştır¹⁵. Amerika Birleşik Devletleri'nde hastalardan izole edilen *Streptococcus pneumoniae*'lerin % 34'ünün penisiline, *Hemophilus influenzae*'lerin % 32'sinin ampisiline, *Moraxella catarrhais*'lerin ise % 92'sinin penisilin ve eritromisine dirençli olduğu bulunmuştur¹⁶. Bakteri enfeksiyonlarına ek olarak fungal enfeksiyonların ölüme sebebiyet veren en büyük faktör olduğu saptanmıştır¹⁷. Amerika Birleşik Devletleri'nde kan kültürlerinden üçüncü olarak en fazla izole edilen türler *Candida* türleridir¹⁸. Ayrıca immünbaskılayıcı kemoterapi alan ve doku transferi yapılmış hastalarda; *Candida*, *Aspergillus* ve *Fusarium* enfeksiyonlarından ölüm oranları oldukça yüksektir. Kan yoluyla vücut içinde organlara yayılan fungal patojenler çeşitli organ nakillerinde alıcının ölümüne neden olmaktadır¹⁹. Fungal enfeksiyonlardan kaynaklanan mortalite oranı % 50'nin üzerinde olup, oranın % 95 olduğu kemik iliği nakillerinde *Aspergillus* patojenlerinden kaynaklanan enfeksiyon belirtilmiştir²⁰. Antifungal ajanlar insan ve hayvan hastalıklarının yanısıra, bitki ve ekinlerin korunmasında, gıda endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Tüm bu sebeplerden ötürü hem çeşitli patojenitelere neden olan mikroorganizmaların mevcut ilaçlara dirençlilik kazanmasından hem de toksitesi daha az antifungal tedavilerin geliştirilmesi için yeni ilaçlara ve ilaç öncü maddelerine ihtiyaç vardır.

Son yıllarda doğal ürün tarama programlarıyla, aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif metabolitlerin keşfi üzerine yoğun çaba sarf edilmektedir. Yeni biyoaktif sekonder metabolitlerin taranması doğrultusundaki çalışmalar farklı habitatlardan yeni *Streptomyces* türlerinin izolasyonu ve değişik tarama stratejilerine doğru yönelmektedir. Özellikle endemik bitki rizosferi toprakları antimikrobiyal aktiviteye sahip aktinomisetler açısından zengin bir kaynaktır²¹.

KAYNAKLAR

1. Cannell, R.J.P. *How to Approach the Isolation of a Natural Product*, Humana Press, Totowa, **1998**, 1-51.
2. Rates, S.M.K. *Plants as Source of Drugs, Toxicon*, **2000**, 39, 603-613.
3. Oskay, M.; Tamer, A. *Streptomyces Kökenli Antibiyotiklerin Dünyü, Bugünü ve Yarını, Journal of New World Science Academy*, **2009**, 4, 48-60
4. De Pasquale, A. *Pharmacognosy: The Oldest Modern Science, Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, 11, 1-16.
5. *World Health Organization, Traditional Medicine*, Geneva, **2002**, 1-6.
6. Strobel, G.; Daisy, B. ; Castillo, U. ; Harper, J. *Natural Products from Endophytic Microorganisms, Journal of Natural Products*, **2004**, 67, 257-268.
7. Boudjella, H. ; Bouti, K. ; Zitouni, A. ; Mathieu, F. ; Lebrihi, A. ; Sabaou, N. *Isolation and Partial Characterization of Pigment-Like Antibiotics Produced By a New Strain of Streptosporangium Isolated From an Algerian Soil, Journal of Applied Microbiology*, **2007**,1-9
8. Newman, D.J. ; Cragg, G.M. ; Snader, K.M. *Natural Product as Source of New Drugs Over Period 1981-2002, Journal of Naural Products*, **2003**, 66, 1022-1037.
9. Weber, T. ; Wenzel, S. ; Pelzer, A. *Exploiting The Genetic Potential of Polyketide Producing Streptomycetes, Journal of Biotechnology*, **2003**, 106:221
10. Berkowitz, F.E. *Antibiotic Resistance in Bacteria, Southern Medical Journal*, **1995**, 88, 797-804.
11. Pfefferle, C. ; Theobald, U. ; Gürtler, H. ; Fiedler, H.P. *Improved Secondary Metabolite Production in the Genus Streptosporangium by Optimization of the Fermentation Conditions, Journal of Biotechnology*, **2000**, 80, 135.

12. Sieradzki, K. ; Tomasz, A. *A Highly Vancomycin-Resistant Laboratory Mutant of Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiology Letters*, **1996**, 142, 161-166.
13. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control-Surveillance, Planning, Financing*, WHO Report **2008**, Geneva.
14. Morlock, G.P. ; Plikaytis, B.B. ; Crawford, J.T. *Characterization of Spontaneous, In Vitro Selected, Rifampin-Resistant Mutants of Mycobacterium tuberculosis Strain H37Rv*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **2002**, 44, 3298-3301.
15. Şahin, N. ; Uğur, A. *Investigation of Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates*, *Turkish Journal of Biology*, **2003**, 27, 79-84.
16. Sutcliffe, J.A. *Antibacterial Agents: Solution for the Evolving Problems of Resistance*, *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, **2003**, 13, 4159-4161.
17. Kitouni, M. ; Boudemagh, A. ; Oulmi, L. ; Reghioua, S. ; Boughachiche, F. *Isolation of Actinomycetes Producing Bioactive Substance From Water, Soil and Tree Bark Samples of the North-East of Algeria*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2005**, 15, 45-51.
18. Pfaller, M.A. ; Wenzel, R. *Impact of the Changing Epidemiology of Fungal Infections in the 1990s*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **1992**, 11, 287-291.
19. Nosanchuk, J.D. *Current Status and Future of Antifungal Therapy for Systemic Mycoses, Recent Patents on Anti-Infective Drug. Discovery*, **2006**, 1, 75-84.
20. Singh, D.N. ; Verma, N. ; Raghuwanshi, S. ; Shukla, P.K. ; Kulshreshtha, D.K. *Antifungal Anthraquinones from Saproscia fragrans*, *Bioorgan. Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16, 4512-4515.

21. Barakata, M.; Ouhdouch, Y. ; Oufdou, K.H. ; Beaulieu, C. *Characterization of Rhizospheric Soil Streptomyces from Moroccan Habitats and Their Antimicrobial Activities, World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2002**, 18, 49-54.

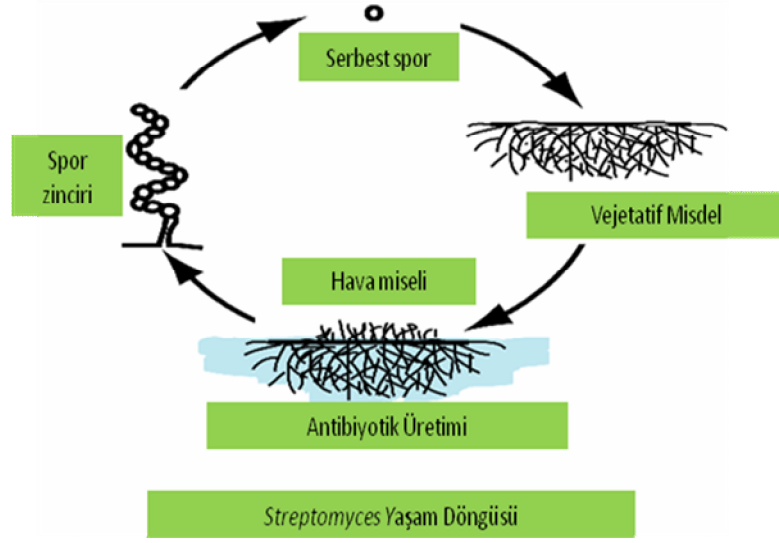
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. *Streptomyces* Türlerinin Özellikleri

Actinobacteria sınıfı, *Actinomycetales* ordosuna dahil olan *Streptomyces* cinsi üyesi organizmalar; Gram (+), aerobik, filamentli saprofit bakterilerdir. Doğada farklı habitatlarda geniş yayılım gösterirler. İyi üreme koşullarında *Streptomyces*'lar mantarlardaki gibi çok hücreli geniş misel yapıları oluştururlar¹. Koloni morfolojilerinde yoğun olarak vejetatif (substrat) miselleri, hava miselleri ve spor yapısı gösterirler². Kompleks bir yaşam döngüleri vardır. Besin yetersizliği gibi stres koşullarında vejetatif miseller farklılaşarak hava misellerini meydana getirirler¹. Farklılaşmanın bir sonraki adımında ise hava misellerinden bölmelerin oluşması ile karakteristik uzun artrospor zincirleri meydana gelir^{1,3}. Oluşan bu spor yapıları enzimatik hidrolize, yüksek sıcaklık ve sonikasyon gibi çeşitli etkilere karşı dayanıklıdır⁴. Henüz tanımlanamayan bir sinyal yardımıyla sporlar yeniden germine olmaya başlar¹. Bu farklılaşma olayı üst seviyede düzenleyici bir sistemle sıkı şekilde kontrol edilmektedir⁶. *Streptomyces antibioticus*'la yapılan bir çalışmada divalent katyonların germinasyonun başlamasıyla ilgili olduğu belirtilmiştir⁵.

Streptomyces'ların üremeleri hava misellerinin ucundaki sporlarla gerçekleşmektedir⁷. Hücre çeperindeki peptidoglikan, yapısında fazla miktarda L-Diaminopimelik asit içerirler. Optimum pH istekleri 6.5-8.0 arasında değişim gösterir. En uygun büyüme sıcaklık aralığı 25-35 °C arasında olup ayrıca termofilik veya psikrofilik olabilirler⁷.



Şekil 2.1. *Streptomyces*'lerin Yaşam Döngüsü

Streptomyces türleri topraktaki mikrobiyal populasyonun önemli bir bileşenini oluştururlar^{8,13}. Ekonomik öneme sahip bu organizmalar topraktaki aktinomiset populasyonun % 50'sini oluşturmaktadır⁹. Ayrıca *Streptomyces*'ler toprakta bulunan biyopolimerlerin dönüşümünde ve degradasyonunda çok önemli göreve sahip olmalarından ötürü toprak ekolojisinde çok önemli rol oynamaktadırlar^{1,10}. Bu sebeplerden dolayı endüstriyel öneme sahip ekstrasellüler karakterdeki; ksilanaz, sellülaz ve lipaz gibi birçok enzimin sentezinden sorumludurlar^{1,11,12}. Bu açıdan da endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahip organizma grubundadırlar.

Streptomyces coelicolor ve *Streptomyces avermitilis* genom projeleri tamamlanmıştır^{14,15}. 8,7-9 Mb genom büyüklükleriyle *S. coelicolor* ve *S. avermitilis*, genom projesi tamamlanan bakteriler arasında en büyük genoma sahip

organizmalardır¹. *Streptomyces*'lar lineer kromozom yapısına sahiptirler ve kromozomun sonunda terminal proteinlerin bağlandığı terminal ters tekrar bölgeler bulunmaktadır¹⁶. Yaşamsal öneme sahip proteinleri kodlayan genler kromozomun merkezi kısmında, sekonder metabolit ve transpozon ile ilgili genler ise kromozomun sonuna yakın bölgelerde bulunmaktadır¹⁷. Genetik materyal olarak ana kromozomun dışında sekonder metabolit biyosentezi ile ilgili genleri taşıyan lineer plazmitler içerebilmektedirler¹⁸. *S. coelicolor*'da 7825 gen, *S. avermitilis*'te ise 7574 gen bulunmaktadır^{1,16}. Bu sayı *E. coli* K12'de bulunan gen sayısının (4289) hemen hemen 2 katına denk gelmektedir¹⁹. Bu organizma grubunun üyeleri 65 farklı sigma faktöre sahiptirler. 9 mb'lık *S. avermitilis* genomun % 70,7'sini guanin ve sitozin baz çiftleri oluşturmaktadır¹⁶. *S. coelicolor*'da direk sekonder metabolit üretiminden sorumlu tahmini olarak 23 gen kümesinin olduğu bununda tüm genomun % 5'ne denk geldiği belirtilmektedir¹. *S. avermitilis*'te ise yine sekonder metabolit üretiminden sorumlu 594 kb uzunluğunda 30 farklı gen kümesinin olduğu, bununda 9 mb'lık genomun % 6,6'sını oluşturduğu belirtilmiştir^{20,23}. Sekonder metabolit üretiminden sorumlu bu gen kümelerinin büyüklüğü en küçük genoma sahip (580 kb) *Mycoplama genitalium*'dan daha büyük olduğu görülmektedir²¹. *Streptomyces* türleri sekonder metabolit üretimi açısından büyük genetiksel potansiyele sahiptirler. Her bir aktinomiset türü genetiksel olarak 10-20 sekonder metabolit üretebilme kapasitesine sahip olduğu düşünülmektedir²².

Streptomyces cinsi organizmalar deniz suyu, çöl ve toprak gibi çeşitli habitatlarda yaşayabilmektedirler. Özellikle endemik bitki rizosferi bölgesinde ve yüksek yapılı bitkilerde epifitik ve endofitik olarak kolonize olmuş *Streptomyces* türleri üretmiş oldukları sekonder metabolitlerle bitkileri çeşitli patojen

organizmalara karşı korumaktadırlar^{24,25}. Endofitik olarak bitkilerle birlikte yaşayan organizmalarla bitki arasında simbiyotik ilişkiler söz konusudur²⁶.

2.1.2. Sekonder Metabolitler

Genel anlamda biyolojik olarak aktif moleküller için doğal ürün terimi kullanılır. Sekonder metabolitlerde doğal ürünlerin en önemli grubunu teşkil eder. Kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri bakımından hücrel makromoleküllerden ayrılırlar²⁷. Sekonder metabolitler, proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve nükleik asitler vb makromoleküller gibi canlılık faaliyetleri için birinci dereceden metabolik işlemlerde ve büyümede gerekli olmayan, organizmanın bulunduğu ortama daha iyi adapte olmasını sağlayan moleküllerdir. Bitkiler ve mikroorganizmalar sekonder metabolit üretiminden sorumlu en önemli canlı gruplarıdır. Canlı sistemlerdeki birçok biyolojik olayın gerçekleşmesini sağlarlar. Bu açıdan biyolojik kontrol ajanlarıdır. Sekonder metabolitler savunma, farklılaşma, düzenlenme, morfogenez, taşıma, hücrel haberleşme gibi olayların gerçekleşmesinde etkin rol oynayan bileşiklerdir²⁷.

Molekül ağırlıkları 3000 dalton küçük olup kimyasal yapı olarak oldukça çeşitlilik gösterirler. Primer metabolizma sonucu oluşan ara metabolitlerden sentezlenirler. Bu sebepten dolayı sekonder metabolitler primer metabolizma kökenli bileşiklerdir¹². Sentezleri ile ilgili metabolik yollar henüz tam olarak bilinmemektedir⁷. Genel olarak sekonder metabolitler ekstrasellüler olarak sentezlenmektedir. Antimikrobiyaller, çeşitli pigmentler, toksinler, reseptör agonist/antagonistleri, enzim inhibitörleri, antitümör ajanları sekonder metabolit orjinli moleküllerdir⁸. Çeşitli hücrel stres koşulları sekonder metabolit sentezinin

başlamasında önemli sinyallerdir. Sekonder metabolizma, kromozomal DNA veya plazmit üzerindeki sekonder metabolit sentezinden sorumlu genlerce kontrol edilmektedir¹.

Mikrobiyal kaynaklı sekonder metabolitler potansiyel olarak sahip oldukları özel yapıları ve biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin zengin bir kaynağını oluştururlar. Sekonder metabolitler hem biyolojik aktivitelerinden hem de oldukça değişik kimyasal yapılarından dolayı farmakolojik çalışmalarda ilaç öncü maddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle değişik hastalıkların tedavisi için yeni ilaçların keşfedilmesi amacıyla sekonder metabolit kökenli bileşikler taranmaktadır. İlaç endüstrisi dışında tarım, tıp ves veterinerlik gibi alanlarda kullanılmaktadır.

Sekonder metabolitler organizmalar arasındaki simbiyotik, sinerjistik ve antagonistik gibi değişik biyolojik etkileşimlerin gerçekleşmesinde de rol oynamaktadır. Bitkiler ve onunla simbiyotik ilişki içinde olan mikroorganizmalar bu etkileşimi sekonder metabolit üretimi ile gerçekleştirmektedir²⁶. Öte yandan yine aynı ortamı paylaşan farklı mikroorganizmaların çeşitli stres koşullarında antagonist etkiye neden olan sekonder metabolitleriyle mikrobiyal popülasyonda daha avantajlı hale gelmektedirler.

2.1.3. Sekonder Metabolitlerin Tarihsel Süreci

İnsanoğlu doğal ürün olarak sekonder metabolitleri hastalıkların tedavisinde çok eski zamanlardan beri kullanmaktadır²⁸. Tarihsel gelişimini incelediğimizde eski dönemlerde özellikle tıbbi önemi olduğu düşünülen bitkilerin çeşitli hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılması bugünkü etnobotanik temelli tedavi yöntemlerinin temelini oluşturmuştur. O dönemlerde mikroorganizmalar halen bilinmediğinden

dolayı çalışmalar bitkiler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunun sonucunda tıbbi öneme sahip bitkiler belirlenmiştir.

Bundan yaklaşık 3000 yıl önce Maya'ların bazı tahılları sindirim yolu rahatsızlıklarının tedavisinde kullandığı, Çin imparatoru Shen Nung'un sıtma tedavisinde bitkileri kullanması, eski yunanda *Papaver somniferum*'un acıların dindirilmesinde ve anestetik olarak kullanılması önemli tarihsel kayıtlardır²⁶. Bugün bile Avustralya'da yaşayan Aborjin kabilelerindeki yerlilerin çeşitli yaraların tedavisinde, bağırsak rahatsızlıklarında, baş ağrısı gibi sorunların iyileştirilmesinde bazı bitkileri kullanmaktadır²⁹. Ayrıca bugün Çin dünya genelinde bitki temelli geleneksel tıbbi tedavi yöntemlerinin en fazla kullanıldığı ülke konumundadır²⁶. 1806 yılına gelindiğinde Afyon bitkisinden izole edilen analjezik özelliğe sahip Morfin ticari olarak saflaştırılan ilk doğal üründür.

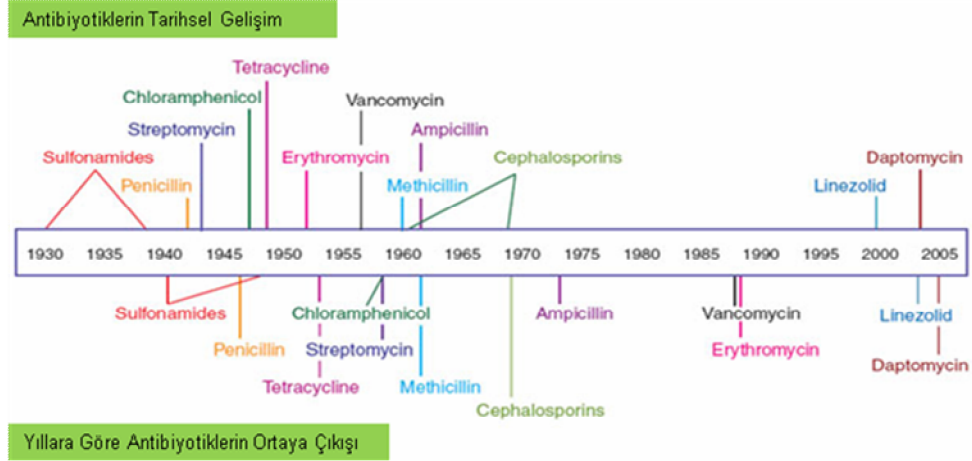
1928 yılında A. Fleming'in *Penicillum notatum* tarafından üretilen penisilini keşfetmesi mikrobiyal kaynaklı doğal ürün araştırmalarının başlaması açısından dönüm noktasıdır. Daha sonra penisilinin izolasyonu, saflaştırılması, yapısının belirlenmesi ve tıp alanında kullanımı ile ilgili çalışmalarından dolayı 1945 yılında Alexander Fleming, Howard Florey ve Ernst Chain adlı araştırmacılar Nobel tıp dl almıştır. Bu tarihten itibaren mikrobiyal kökenli sekonder metabolitlere yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Birçok araştırmacı tarafında değişik mikrobiyal kaynaklardan yeni biyoaktif sekonder metabolit elde edilmeye çalışılmıştır. Penisillinin keşfinden sonra Selman Waksman'ın *Streptomyces griseus* tarafından üretilen streptomisini bulmasıyla bu alandaki çalışmalar aktinomiset grubu mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Birçok araştırmacının yoğun çalışmaları sonucunda 1940-1970 yıllara arasında birçok yeni sekonder metabolitin bulunması

bu dönemin antibiyotiklerin altın çağı olarak adlandırılmasına neden olmuştur^{28,30}. Bu dönemde birçok yeni antibiyotik keşfedilmesine rağmen sonraki yıllarda patojenlerin antibiyotiklere direnç geliştirmesinden dolayı sürekli yeni antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle son yıllarda yeni biyoaktif sekonder metabolit çalışmalarında farklı tarama stratejilerinin kullanılmasında yönelik çalışmalar uygulanmaktadır.

2.1.4. Antibiyotikler

Antibiyotikler prokaryot ve ökaryot organizmaların belli hücresel hedef bölgeleriyle etkileşime girerek etki gösteren düşük molekül ağırlığına sahip mikrobiyal kökenli sekonder metabolitlerdir. Mikroorganizmalarca sentezlenen bu sekonder metabolitler organik kökenli doğal ürünlerdir. Genel olarak antibiyotikler insan ve hayvanlardaki çeşitli bakteriyel ve fungal enfeksiyonların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır³⁰. Ayrıca tarımda bitkilerin çeşitli patojenlerin etkisinden korumak amacıyla kullanım alanına sahiptir.

Antibiyotikler etki mekanizmalarına (bakteriyostatik), etki ettikleri hedef bölgeye (hücre duvarı), kimyasal yapılarına (aminoglikozit)) ve etki spektrumu (geniş spektrum) gibi çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Penisillin, tetrasiklin, makrolit, sefalosporin, aminoglikozit, kloramfenikol, glikopeptitler antibiyotiklerin önemli gruplarıdır. Antibiyotikler biyoaktif sekonder metabolitlerin sayıca en geniş grubunu oluştururlar. 2002 yılına kadar mikroorganizmalardan elde edilen 22.500 biyoaktif bileşikten 20.000'i antibiyotiktir³⁰. Antibiyotik sentezi ile ilgili önemli ölçüde kabul gören teorilerden biri, organizmanın besin yetersizliğinde antibiyotik sentezine başladığıdır¹¹.



Şekil 2.2. Yıllara göre antibiyotiklerin keşfedilmesi

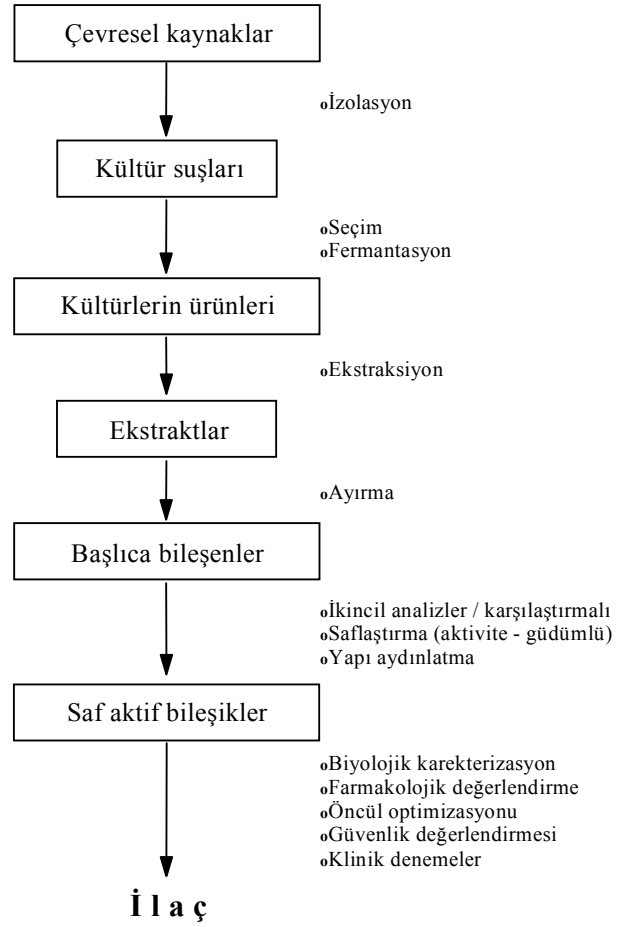
Penisilin keşfinden önce enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sentetik sülfamidler kullanılmaktaydı. Penisilin keşfinden sonra 1970'lere kadar olan süreçte yeni antibiyotiklerin bulunmasıyla bu dönem antibiyotiklerin altın çağı olarak adlandırıldı. Bu süreçte yeni antibiyotiklerin bulunmasıyla patojen mikroorganizmalara karşı verilen mücadelede başarı kazanıldığı düşünülse de dirençli türlerin ortaya çıkmasıyla bunun o kadar da basit olmadığı görüldü. Doğal yollarla sentezlenen antibiyotiklerin yanı sıra yarı sentetik ve kimyasal sentez yolu ile elde edilen tam sentetik antibiyotiklerde bulunmaktadır.

Tablo 2.1. Etki mekanizmalarına göre antibiyotiklerin sınıflandırılması

Etki Mekanizması	Antibiyotik Grubu	Örnek
Hücre duvarı sentezi inhibisyonu	Beta laktamlar, non poliyenler, glikopeptitler	Penisilin, sefalosporin, vankomisin,
Protein sentezi İnhibisyonu	Aminoglikozitler, makrolidler, tetrasiklinler	Eritromisin, streptomisin, oksitetrasiklin
Genetik materyal sentezi inhibisyonu	Kinonlar	Nalidiksik asit, oksolinik asit, Florokinonlar
Antimetabolitler	Sülfoamidler	Sülfasetamid, sülfametizol
Membran geçirgenliğini bozanlar	Poliyenler	Amfoterisin B, nistatin

2.1.5. Doğal Ürünlerin Farmakolojik Önemi

Doğal ürünler sahip oldukları özel kimyasal yapıları ve biyolojik aktivitelerinden dolayı önemli ilaç öncü maddeleridirler. Doğal ürünler bu özelliklerinden dolayı ilaç araştırmalarında çok sık kullanılmaktadırlar³¹. Bu açıdan çoğu doğal ürün anti infektif özellikteki ajanlardır. Özellikle mikroorganizmalarca sentezlenen doğal ürünler oldukça geniş nitelikteki biyolojik aktivitelere sahip bileşiklerdir. Antibakteriyeller, antifungallar, antitümör ajanları, antidiyabetikler, antihelmintikler, antiviraller, enzim inhibitörleri, reseptör agonist-antagonistleri, immunbaskılayıcılar, antihipertansifler, antiparazitikler, antimigren, antiülser ajanları doğal ürün orjinli ilaç veya ilaç öncüsü moleküllerdir³¹. Doğal ürünlerin biyoaktivitelerinin sahip oldukları kimyasal yapılarının bir sonucu olduğu düşünüldüğünde bu bileşiklerin kimyasal yapı olarak oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Mikrobiyal fermentasyonla üretilen bu ürünler veya bunların kimyasal modifikasyonları birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilir olmasından dolayı farmakolojik endüstrinin en önemli araştırma alanını teşkil etmektedir.



Şekil 2.3. Mikrobiyal doğal ürünlerden antibiyotik keşfinin yöntemleri

Kanser ve enfeksiyon hastalıklarında kullanılan terapötik ajanların % 60-75'i doğal orjinli ilaçlardır³². Yine 1989-1995 yılları arasında ilaç onayı alan bileşiklerin % 60'ı, 1983-1994 yılları arasında NDA onayı alan kanser ilaçlarının % 60'ı antibakteriyel ajanların % 78'i doğal orjinlidir^{33,34}. 1981-2002 yılları arasında anti tümör, anti migren, anti hipertansiyon ajanı olarak FDA onayı alan yeni bileşiklerin

% 50'sinden fazlası doğal kökenli ilaçlardır³⁵. Bu istatistiki sonuçlardan da açıkça görülmektedir ki doğal ürünler yeni ilaçların keşfi açısından oldukça önemli kaynaklardır.

Antimikrobiyallerin farmakolojik endüstride çok önemli ekonomik değere sahip ilaç grubudurlar. Dünya çapında 2001 yılında antibiyotiklerin pazar payı 32 milyar dolardır³⁶. Antifungal ilaçların 2002 yılındaki pazar payları ise 4 milyar dolardır³⁷. Öte yandan poliketid yapısındaki ilaçların yıllık piyasa değerleri 15 milyar doları aşmaktadır³⁸. 2007 yılında antibiyotiklerin pazar payının 66 milyar dolar olduğu bildirilmiştir³⁹.

Son yıllarda özellikle aşırı miktarda ve gereksiz yere antimikrobiyallerin kullanılmasından dolayı hızlı bir şekilde antibiyotiklere dirençli türler ortaya çıkmıştır. Özellikle bakteriyel enfeksiyonlar dünya çapında halk sağlığını ciddi olarak tehdit etmektedir. Bu sebepten dolayı dirençli türlere etkili yeni antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç vardır. Son yıllarda yeni biyoaktif bileşiklerin keşfinde bir azalma olmasından ilaç araştırmalarında farklı stratejilere yönelilmiştir. Bu stratejilerin en önemlilerinden olan 'Yüksek Çıktılı Tarama' (HTS) yöntemi kısa sürede ve hızlı bir şekilde robotik olarak tarama yapılması temeline dayanır²⁸. Ayrıca Yapı Aktivite İlişisine (SAR) dayalı diğer bir metotla doğal ürünlerin temel kimyasal yapısındaki bazı fonksiyonel grupların değiştirilmesiyle hedefle en iyi şekilde etkileşime girebilecek değişik kimyasal yapıda bileşikler elde edilir. Bu uygulamaların dışında kombinatoriyal kimya ile kimyasal senteze dayalı yarı sentetik, tam sentetik veya doğal ürünlerin mimiği olan bileşiklerin sentezlenmesiyle de biyoaktif bileşikler elde edilmeye çalışılmaktadır³². İlaç keşfine yönelik yapılan

çalışmalarda değişik yöntem ve uygulamalar olmasına rağmen doğal olarak sentezlenen bileşikler araştırmaların temelini oluşturur.

2.1.6. Kimyasal Tarama Yöntemi

Yeni biyoaktif bileşiklerin taranmasında üç temel faktör vardır. Bunlardan ilki organizmanın seçimi, ikincisi kültür metotları, sonuncusu ise bileşiklerin tarama yöntemleriyle tespit edilmesidir. Biyolojik aktif moleküllerin ekstraktlardan izole edilip saflaştırılmasında uygulanacak olan tarama yöntemi oldukça önem arz etmektedir. Biyoaktif sekonder metabolitlerden ilaç elde edilmesi sürecinde biyolojik aktiviteye, fizikokimyasal ve kimyasal tarama yöntemlerine dayalı stratejiler uygulanmaktadır.

Kimyasal tarama yöntemi bir ekstraktaki bileşiklerin TLC ile ayrılması sonucu ortaya çıkan spot bölgelerinin değişik renklendirici ajanların muamelesi sonucunda vermiş oldukları spesifik renk değişimlerine bağlı olarak kimyasal yapıları hakkında bilgi edinilmesi temeline dayanır⁴⁰. Bu tarama yöntemi ucuz ve basit bir yöntem olmasında dolayı çok sık kullanılan bir metottur. Bu tarama yöntemiyle sineromisin ve muskasin gibi birçok biyoaktif sekonder metabolit tespit edilebilmektedir^{41,42,43,44}.

2.1.7. Biyootografi Yöntemi

Biyootografi yöntemi biyolojik aktiviteye dayalı tarama yöntemlerinin en önemlilerinden biridir. Bu yöntem TLC tabakası üzerinde birbirinden ayrılmış değişik spotların biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ilkesine dayanır. Biyootografi yöntemi, belli bir ekstrakta bulunan bileşiklere ait spotların agar üzerine yayılmış test

organizmaları üzerine biyolojik aktivitelerinin belirlenmesini sağlar. Bu yöntem biyoaktif spotların biyolojik inaktif spotlardan ayırılması açısından da önemli bir stratejidir.

2.2. Önceki Çalışmalar

Etienne ve ark⁴⁵. (1991) Aktinomisetlerin aminoglikozit üretiminin araştırıldığı bir çalışmada taranan 2238 aktinomisetten % 63'lük oranla en fazla *Streptomyces*'lerin aminoglikozit üretimi yaptığı tespit etmişlerdir.

Imamura ve ark⁴⁶. (1993) Antibakteriyel özellikteki uramamisin sekonder metaboliti *Streptomyces* sp. Ni-80'nin kültür filtratının metanol ekstraksiyonu sonucu elde edilmiştir.

Burkhardt ve ark⁴⁷. (1996) *Streptomyces griseoviridis* (FH-S1832) türü ile yapılan bir çalışmada organizmanın gliserol-kazopeptonlu besiyerinde yeni sineromisin ve musacin sekonder metabolitlerini ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca anisaldehit/H₂SO₄, orcinol, ehrlich gibi TLC renklendiricilerin kullanılmasına dayalı kimyasal tarama yöntemiyle; musasin, anisaldehit/H₂SO₄'in ile kahverengi, orcinol ile yeşil-gri, ehrlich ile mor, öte yandan sineromisinin ise anisaldehit/H₂SO₄ ile mavi-gri, orcinol ile kahverengi, ehrlich ile mavi renk oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Wadkins ve ark⁴⁸. (1998) *Streptomyces* cinsine dahil organizmalarca üretilen aktinomisin D antibiyotiğinin DNA molekülünde interkalasyona yol açarak biyolojik aktivite gösteren bir antitümör ajan olduğu saptanmıştır.

Birber ve ark⁴⁹. (1998) Yeni bir antibiyotik olan naphthoquinone bir kızıl ağaç türü olan *Alnus glutinosa*'nın nodüllerinden izole edilen bir *Streptomyces* türünden elde edilmiş olup, Gram (+) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Harindran ve ark⁵⁰. (1999) Araştırmacıların *Streptomyces* CDRIL-312 izolatıyla yaptıkları çalışmada butanol ekstraksiyonu ile elde edilen yeni antifungal HA-1-92 bileşimini kolon kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleriyle saflaştırmışlardır. Polien yapısındaki bu bileşiğin *C. albicans* da dahil bazı patojen funguslara karşı güçlü antifungal aktiviteye, Gram (-) *E. coli* ve *P. aeruginosa* organizmaları üzerine ise zayıf antibakteriyel etkiye neden olduğunu bulmuşlardır.

Cruz ve ark⁵¹. (1999) *Streptomyces griseocirneus* tarafından gerçekleştirilen pirazolizokinolin biyosentezinde en iyi karbon kaynağının glukoz olduğunu rapor etmişlerdir.

Zeng ve ark⁵². (2000) Deniz organizmaları ile beraber yaşayan aktinomisetlerin antitümör ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada; izole etmiş oldukları aktinomisetler içerisinde en fazla antimikrobiyal aktivitenin *Streptomyces* cinsine ait türlerin olduğunu ortaya çıkarmışlar.

Chu ve ark⁵³. (2001) Bir *Streptomyces* türünden, yalnızca prokaryotlarda bulunan ve görevi yeni sentezlenen proteinin N-terminalinden formil grubunu uzaklaştırmak olan ‘bakteriyel peptid deformilaz (PDF)’ enzimini inhibe eden yeni iki metabolit elde etmişlerdir. *Streptomyces* fermentasyon kültüründe izole edilip yapıları aydınlatılarak biyolojik aktiviteleri tespit edilen bu yeni derformilaz inhibitörleri Sch382582 ve Sch382583 olarak isimlendirilmiştir.

Adinarayana ve ark⁵⁴. (2001) Antimikrobiyal bileşiklerin üretiminde besiyerinin bileşimi ve kültür koşullarının etkisinin araştırıldığı çalışma sonucunda sekonder metabolit üretiminin; sıcaklık, pH, ve inkübasyon süresinin yanısıra besiyerinde bulunan karbon ve azot kaynakları ile yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Ouhdouch ve ark⁵⁵. (2001) Fas’tan farklı habitatlardan (endemik bitki kökleri, Atlas dağı, Sahara kumu, nehir, göl, deniz suyu ve sediment) izole edilen 320 aktinomiset türünden 32’sinin maya, mantar ve bakteriler üzerine güçlü antimikrobiyal etkileri olduğu gösterilmiştir. Aktif türlerin % 40’nın iki endemik bitkinin rizosferindeki topraklardan olduğu tespit edilmiştir. Özellikle poliyenik olmayan antifungal metabolitler üzerine gidilerek bunların sferoplast rejenerasyonu, ergosterol inhibisyonu ve UV absorbanları araştırılmıştır. Bu strateji kullanılarak seçilen 10 izolatın *Streptomyces* cinsine dahil olduğu bulunmuş olup, aktivite spektrumlarına bakıldığında tüm izolatlar tarafından üretilen aktif bileşiklerin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

Won ve ark⁵⁶. (2002) *Aspergillus repens* K42 türü ile yapılan bir çalışmada organizmadan elde edilen metanol ekstraktının uygulanan biyootografi yöntemiyle biyolojik aktif spot bölgelerinin Gram (-), Gram (+) organizmalara karşı inhibisyon etkisinin olduğunu ayrıca insan kolon ve akciğer kanseri tümör hücrelerine karşı da antitümör aktivitesinin olduğunu belirtilmiştir.

Asolkar ve ark⁵⁷. (2002) Değişik analitik saflaştırma ve spektroskopik analiz yöntemleri kullanılarak *Streptomyces* sp. B7064 izolatından elde edilen makrolid yapısındaki yeni bir antibiyotik olan chalcomisin B'nin *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *C. albicans*'a karşı inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bu yeni bileşiğin anisaldehit/H₂SO₄ reaktifinin püskürtülmesi ile koyu kahverengi bir renk verdiği gözlemlenmiştir.

Pullen ve ark⁵⁸. (2002) Bitkilerle endofitik olarak yaşayan bir *Streptomyces* türünün biyoaktif sekonder metabolitleri araştırılmıştır. *Celastraceae* familyasına dahil bir bitkiden *Streptomyces* MaB-QuH8 izole edilmiştir. Bu izolattan TLC ve kolon kromatografisi tekniklerine dayalı yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda Gram (+) organizmalara karşı etkili celastramisin A ve B olarak isimlendirilmiş iki yeni antibiyotik izole edilmiştir.

Uğur ve ark⁵⁹. (2002) Antimikrobiyal aktivitelerinin taranması amacıyla Muğla yöresinden izole edilen 74 farklı *Streptomyces* izolatından % 45'nin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan *Streptomyces* sp. MU106, *Streptomyces* sp. MU107 ve *Streptomyces* sp. MU114'ün maya ve Gram

(+) organizmalara 20 mm'den fazla inhibisyon zon çapıyla güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir.

Lemriss ve ark⁶⁰. (2003) Aktinomisetlerin biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise 110 aktinomiset izolatından 54'nün antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. *Streptomyces* cinsine dahil olan 91 izolattan 5'nin ise patojen özellikteki tüm fungal test organizmalarına karşı biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Li ve ark⁶¹. (2003) Çalışma grubunun *Streptomyces* sp. M045 izolatından elde edilen metabolitlerin etilasetat ekstraktlarının kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılmasıyla antitümör aktiviteye sahip chinikomisin A ve B olmak üzere 2 yeni bileşik izole edilmiştir. Bileşiğin yapı analizi öncesi NaOH ile kırmızı-pembe renk vermesine bağlı olarak kinon yapısında olduğu düşünülmüş, ve bu bulgu daha sonra yapılan NMR ve IR sonuçları ile doğrulanmıştır.

Taechowisan ve ark⁶². (2003) Araştırmacılarca bitki dokularından endofitik aktinomisetlerin izolasyonun hedeflendiği bir çalışmada izolatların yaygın olarak *Streptomyces* cinsine dahil olduğu ve iki bitki patojeni fungus olan *Colletotrichum musae* ve *Fusarium oxysproum*'un üremelerini büyük ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Maskey ve ark⁶³. (2003) *Streptomyces* sp. B6921 deniz izolatından kloroform-metanol gradiyentli kolon kromatografisi ile kinon yapısındaki yeni bir

antibiyotik olan himalomisın izole edilmiştir. Uygulanan biyolojik testler ile bu antibiyotiğin *S. aureus*, *S. viridochromogenes*, *B. subtilis*, *E. coli* organizmalarına karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Mellouli ve ark⁶⁴. (2003) Topraktan izole edilen ve 16S rRNA genleri kullanılarak teşhis edilen *Streptomyces* sp. US24'ün Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı güçlü inhibisyon etkisi gösteren iki bileşik ürettiği tespit edilmiştir. En yüksek antibakteriyel aktiviteye tek karbon kaynağı olarak % 1 nişasta içeren besiyerinde rastlanmıştır. Bu izolatin, niddamisin ve celestisetin üreten *Streptomyces caelestis* ile % 98 homoloji göstermesine rağmen, ürettiği iki biyoaktif molekülün bu antibiyotiklerden farklı olduğu bulunmuştur. NMR spektrumlarına bağlı olarak poliketid yapısındaki bileşikler olabileceği düşünülmüştür.

Fguria ve ark⁶⁵. (2004) Araştırmacılar topraktan izole ettiklerin yeni bir aktinomiset türü olan *Streptomyces* sp. US80'in ürettiği antibakteriyel ve antifungal bileşikleri incelemişlerdir. En iyi antimikrobiyal aktiviteyi besiyerinde tek karbon kaynağı olarak % 1 konsantrasyonunda glukoz kullandıklarında elde etmişlerdir. Bu organizmadan irumamisin, X-14952B ve 17 hidroksi venturisidin A olarak isimlendirilen üç bileşik saflaştırılıp yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin *V. dahliae*, *C. albicans* ve *Fusarium* sp. filamentli mantarlarının üremelerini inhibe ettiği, bunun yanı sıra bileşiklerin Gram (+) bakteriler olan *M. luteus*, *B. subtilis* ve *S. aureus* üzerine inhibisyon aktivitelerinin olduğu bulunmuştur.

Hayakawa ve ark⁶⁶. (2004) Toprakta izole edilen *Streptomyces violaceusniger*'in fenotipik grubuna giren tüm üyelerinin denen tüm Gram (+) bakterilere, mayalara karşı geniş spektrumda bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Daha da fazlası bu izolatların antitümör aktivitesin kolon karsinoma hücrelerine karşı da % 68 olduğu bulunmuştur.

Sobolevskaya ve ark⁶⁷. (2004) Bir başka deniz izolatı *Streptomyces* sp. 6167 ile yapılan çalışmada makrolid yapısındaki feigrisolide A, B, D ve dinaktin sekonder metabolitleri izole edilmiştir. Feigrisolid makrolidlerinin karsinoma tümör hücrelerine potent sitotoksik ve *B. cereus*, *E. coli* hücrelerine antibakteriyel etkisinin olduğu kayıt edilmiştir. Ayrıca makrolid yapıdaki feigrisolid biyoaktif bileşiğinin anisaldehit/H₂SO₄ renklendiricisiyle etkileşimi sonucu koyu kahverengi tonunda bir renk oluşumu gözlenmiştir.

Cao ve ark⁶⁸. (2004) Domatesten izole ettikleri *Streptomyces* türlerinin antimikrobiyal aktivitelerini test etmişler elde ettikleri türlerin % 21'nin antibakteriyel % 41'nin ise antifungal metabolitler ürettiklerini tespit etmişlerdir. Özellikle *Streptomyces* sp. S30'un domates fidelerini *Rhizoctonia solani* patojenine karşı koruduğunu bulmuşlardır.

Hossain ve ark⁶⁹. (2004) Toprak izolatı *Streptomyces hygrosopicus* kültür filtratı etilasetat ekstraktlarından üç yeni amidin izolasyonu yapılmıştır. NMR ve MS spektrumu verilerinin yorumlanmasıyla yapıları aydınlatılan bu bileşiklerin hem

Gram (+) hem de Gram (-) bakterilere karşı çok güçlü antibakteriyel etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Aghighi ve ark⁷⁰. (2004) Antifungal aktivitelerinin araştırılması amacıyla İran'ın Kerman bölgesinden izole edilen 110 izolattan 14 tanesinin *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora megasperma*, *Saccharomyces cerevisiae* organizmalarından en az birine karşı antifungal aktivitesinin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu izolatlardan olan *Streptomyces* sp. 44, *Streptomyces* sp. 101'in ise geniş spektrumda antifungal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Sujatha ve ark⁷¹. (2005) Yeni bir tür olarak karakterize edilen *Streptomyces psammoticus*'un SBR-22 olarak isimlendirilen ve methisillin dirençli *S. aureus*'lara karşı antibakteriyel etki gösteren bir poliketid antibiyotik ürettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada antibiyotik üretimi için kültür koşulları optimize edilerek üreme ve antibiyotik üretimi için glukozun en iyi karbon, amonyum nitratın en iyi azot kaynağı olduğu tespit edilmiştir.

Kitouni ve ark⁷². (2005) Mısır'da yapılan bir çalışmada su, toprak ve ağaç kabuğundan izole edilen 25 aktinomiset türünün çeşitli bakteri ve mantarlar üzerine antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. İzolatlardan 14'ünün test edilen bakterilerden en az birinin üzerine antibakteriyel, izolatlardan ikisinin ise antifungal aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA genleri kullanılarak yapılan teşhis çalışmalarında izolatların % 93'ünün *Streptomyces* cinsine dahil olduğu bildirilmiştir.

Taddei ve ark⁷³. (2005) Kimyasal tarama yöntemine dayalı renklendirici reaktiflerin kullanılmasında TLC tabakaları üzerinde bileşik spotlarının en iyi ayrımının diklorometan-metanol (9:1) çözücü sistemiyle elde edildiği belirtilmiştir.

Chen ve ark⁷⁴. (2005) Bir toprak izolatu olan *Streptomyces* sp. GAAS7310'ın aseton ekstraktının 12 fungal tür üzerine güçlü antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Değişik analitik ve spektroskopik yöntemlerin kullanılmasıyla saflaştırılıp yapı tayini yapılan molekülün makrolid yapısındaki yeni bir fungusit olan antimisin A olduğu bulunmuştur.

Takahashi ve ark⁷⁵. (2005) Japonya'da yapılan bir çalışmada topraktan izole edilen *Streptomyces* sp. IUK-102 izolatından makrolid yapısında yeni bir immunbaskılayıcı ajan olan ushikulid isimli sekonder metaboliti elde edilmiştir.

Augustine ve ark⁷⁶. (2005) Farklı toprak ve su örneklerinde izole edilen 312 aktinomiset izolatının patojen funguslara karşı antifungal etkilerinin araştırıldığı araştırmada tüm aktinomisetlerin % 72'sinin bu etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu aktinomisetlerden biri olan ve en güçlü antifungal aktiviteye sahip *Streptomyces albidoflavus* PU23'ün sekonder metabolitleri hekzan, petrol eteri, etilasetat, butanol ve kloroform ile yapılan ekstraksiyon işleminde en iyi antibiyotik veriminin hekzan ile elde edildiği bildirilmiştir. Yapı analizleri ve ergosterol inhibisyonundan dolayı antifungal etkili bileşiğin non poliyen yapıda olduğu öngörülmüştür.

Shiomi ve ark⁷⁷. (2005) Çin Yunnan bölgesinden izole edilen *Streptomyces* sp. K01-0031'den saflaştırılmasıyla yeni bir antibiyotik olduğu anlaşılan antimisin A₉ metabolitinin nematosidal ve insektisidal biyolojik aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Iliç ve ark⁷⁸. (2005) Yine topraktan izole edilen *Streptomyces* izolatların ürettiği sekonder metabolitlerden çeşitli test organizmalarına karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip 0,70 ve 0,88 Rf değerli iki biyoaktif bileşiğin maksimum UV absorbans değerlerinin 217 ve 221 nm olduğu rapor edilmiştir.

Dong ve ark⁷⁹. (2005) Çin Yunnan bölgesinde yapılan bir başka çalışmada topraktan izole edilen yeni bir aktinomiset türü olan *S. diannanensis*'ten N99-596 olarak isimlendirilmiş yeni bir aldoz redüktaz enzim inhibitörü olan bileşik belirlenmiştir.

Igarushi ve ark⁸⁰. (2005) *Parthenocissus tricuspidata* bitkisinin yaprağından izole edilen *Streptomyces* sp. TP-A0625 izolatından TPU-0043 poliyen yapısındaki makrolid antifungal ajanı saflaştırılmıştır.

Geshava ve ark⁸¹. (2005) *Streptomyces hygroscopicus* 111-81'de makrolid antibiyotik AK-111-81 biyosentezinde fermentasyon ortamında kullanılan fruktoz, sükroz, laktoz, gliserol gibi karbon kaynaklarının ve çeşitli azot kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmada en iyi antibiyotik üretiminin laktoz ve amonyum suksinatta olduğu görülmüştür.

Castillo ve ark⁸². (2006) Avustralya’da yapılan bir araştırmada yerli halk tarafından yaraların temizlenmesinde kullanılan *Kennedia nigriscans* bitkisinin kullanıldığı ve bu bitkide endofitik olarak yaşayan *Streptomyces* NRRL 3052 tarafından üretilen munumbicins E-4 ve E-5 bileşiklerinin antimikrobiyal etkilerinin yanında antimalariyal etkisinde olduğu tespit edilmiştir.

El Naggat ve ark⁸³. (2006) Mısır’da yapılan bir çalışma sonucunda 16S rDNA dizi analizine dayalı moleküler teşhis yöntemiyle *Streptomyces* cinsine dahil olduğu belirlenen *Streptomyces* sp. MAR01 izolatından meroparamycin antibiyotiği elde edilmiştir.

Kurosawa ve ark⁸⁴. (2006) Moleküler yöntemlerle tanımlanmış *Streptomyces* sp. MITKK-103 izolatının yeni bir sitotoksik aktinomisin türevi aktinomisin X₂ antibiyotiğini ürettiği tespit edilmiştir.

Roy ve ark⁸⁵. (2006) *Streptomyces* cinsine dahil yeni bir tür olan *S. albidoflavus* 321.2’den prolin aminoasidi antimetaboliti olan dibutilfitalat biyoaktif sekonder metaboliti elde edilmiştir.

Mehdi ve ark⁸⁶. (2006) Antimikrobiyal etkinin üzerine besiyeri bileşiminin araştırıldığı bu araştırmada nişasta, sükröz, glukoz, fruktoz ve gliserol gibi karbon kaynaklarının kullanıldığı kültür ortamlarında *Streptomyces* sp. TN97’inin en yüksek

antimikrobiyal aktiviteyi gliserol içeren TSB besiyerinde gösterdiği bildirilmiştir. Nişasta içeren TSB besiyerinde ise antimikrobiyal etkinin azaldığı belirtilmiştir.

Thakur ve ark⁸⁷. (2007) Hindistan'da farklı toprak örneklerinden izolasyonları yapılan 110 *Streptomyces* izolatından % 30'nun hem antibakteriyel hem de antifungal aktivite gösterdiği, ayrıca 65 izolatın antibakteriyel, 47 izolatın antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. İnhibisyon zonları karşılaştırıldığında ise en fazla zon oluşumun Gram (+) organizmalara karşı olduğu görülmüştür.

Iliç ve ark⁸⁸. (2007) *S. hygroscopicus* SH100'den izole edilen 0,70 ve 0,78 Rf değerli iki farklı bileşiğin biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada her iki bileşiğin de geniş spektrumlu antibakteriyel ve antifungal etkisinin yanısıra antiviral aktiviteye de sahip olduğu gözlenmiştir. Bileşiklerin butanol ekstraktlarının 217-221 nm'de maksimum absorbans vermesinden dolayı bunların poliyen yapısında olduğu düşünülmüştür.

Sarah ve ark⁸⁹. (2008) Toprak izolatı *Streptomyces* sp. IMD 2703'in TSB besi ortamında en iyi antibiyotik üretimi yaptığı ve izolatların antimikrobiyal etkilerinin belirlendiği çalışmada kültür süpernatantının methisillin dirençli *S. aureus*'a karşı oldukça etkili inhibisyon etkisi olduğu bulunmuştur.

Arasu ve ark⁹⁰. (2008) Moleküler ve çeşitli biyokimyasal yöntemler ile tanımlanmış *Streptomyces* sp. ERI-26 metanol ekstraktının *C. albicans*, *A. niger*, *A. flavus* organizmalarına karşı antifungal aktiviteleri bildirilmiştir.

Narayana ve ark⁹¹. (2008) *S. albidoflavus*'un sekonder metabolit üretimi üzerine maltoz, arabinoz, dextrose, fruktoz, galaktoz, gliserol, laktoz, sükroz, trehaloz ve mannoz gibi karbon kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmada en fazla antibiyotik üretiminin maltoz ile elde edildiğini bildirilmiştir.

Saadoun ve Muhana⁹². (2008) *Streptomyces* Ds-104 izolatının *C. albicans* patojenine karşı antifungal aktivitesine değişik besi ortamlarının etkisinin çalışıldığı araştırmada denenen kültür ortamlarından en iyi inhibisyon zonunun nişasta-kazein-nitrat (SCNB) besiyeri ile elde edildiği tespit edilmiştir. En iyi karbon kaynağının ise 15 g/L konsantrasyonunda glukoz, en iyi azot kaynağı olarak 2,5 g/L konsantrasyonunda KNO₃ olduğu görülmüştür.

Vijayalakshmi ve ark⁹³. (2008) *Streptomyces* sp. ANU 6277'den etilasetat ile elde edilen ekstraktın kolon kromatografisiyle fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen fraksiyonların birinde 8 hidrosikinolin yapısındaki bileşik saf olarak izole edilmiştir. Bu bileşiğin özellikle çeşitli patojen funguslara karşı oldukça etkili inhibisyon etkisi gözlenmiştir.

Szabo ve ark⁹⁴. (2008) *S. tubercidicus*'tan bir başka immunbaskılayıcı ajan olan FK-520 izole edilmiştir.

Yılmaz ve ark⁹⁵. (2008) Üç farklı endemik bitkinin kök bölgesi topraklarından izole edilen farklı *Streptomyces* izolatlarının antimikrobiyal etkili sekonder metabolitlerinin üretiminin üzerine TSB ve M2 besiyerlerinin etkisinin karşılaştırıldığı çalışmada M2 kültür ortamında antimikrobiyal aktivitenin TSB ye göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. İzolatların % 40'nın antibakteriyel, % 14'ünün ise antifungal aktivitesinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Arasu ve ark⁹⁶. (2009) *Streptomyces* ERI-3'ün sekonder metabolitlerinin farklı çözücü sistemlerdeki biyolojik aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmada etilasetat ekstraktı değişik patojenik bakteri ve *C. albicans* üzerine, hekzan ve eter ekstraktlarının *Xanthomonas* ve *C. albicans* üzerine, kloroform ekstraktının ise *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* organizmalarına karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca değişik karbon kaynaklarının kullanılmasına bağlı olarak en fazla antibakteriyel aktivitenin glukozlu ortamda olduğu gözlenmiştir.

Thakur ve ark⁹⁷. (2009) *Streptomyces* sp. 201 sekonder metabolit üretiminde en iyi karbon kaynağının 1,5 g/L konsantrasyonunda manitol, en iyi azot kaynağının ise 0,9 g/L konsantrasyonunda asparajin aminoasidi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca disk difüzyon yöntemiyle sekonder metabolitlerinin *R. solani* patojeni üzerine aktivitesinin olduğu bildirilmiştir.

Xu ve ark⁹⁸. (2009) Pasifikten izole edilen *Streptomyces albidoflavus* türüyle yapılan bir çalışmada çürüme olaylarına neden olan organizmalara karşı etkili, anti

larval özellik gösteren ve toksik olmayan çürüme önleyici sekonder metabolitler izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerden bazıları yapı aktivite ilişkisinden (SAR) yararlanılarak daha potent hale getirilmiştir.

Ko ve ark⁹⁹. (2010) *Streptomyces* sp. TKA-5 ile yapılan bir başka çalışmada ise *Phytophthora capsici* ve *Alternaria brassicicola* gibi çeşitli bitki patojenitelerine neden olan organizmalara karşı fungusidal ve fungustatik özellikteki metabolitler ürettiği bildirilmiştir. İnhibisyona neden olan bu metabolitlerin yapılan çalışmalar sonucunda etanol ve metanol gibi çözücülerde çözünebildiği, aseton, su, eter ve kloroformda ise çözünmediği tespit edilmiştir.

Kumar ve ark¹⁰⁰. (2010) Hindistan'ın Bengal bölgesinden izole edilen ve fenotopik ve filogenetik analizler sonucu yeni bir tür olduğu düşünülen *Streptomyces* VITSVK5 alt türünün çoklu ilaç dirençli ve patojen özellikteki farklı *Aspergillus* cinsi organizmalara karşı antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Wang ve ark¹⁰¹. (2010) *Streptomyces nanchangensis* türünde anti parazitik özellikteki meilingmisin biyoaktif sekonder metabolitinin biyosentez metabolik yolunda amonyum iyonunun önemli etkisinin olduğu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada amonyum iyonunun, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, sitrat sentetaz, suksinat dehidrogenaz, valin dehidrogenaz ve metilmalonil-CoA karboksi transferaz gibi biyosentez yolu üzerinde bulunan enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirtiliyor.

Saha ve ark¹⁰². (2010) Toprakta izolasyonu yapılan *Streptomyces* sp. MNK7'in biyoaktif sekonder metabolit üretiminde karbon ve azot kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmada en iyi karbon kaynağının inositol, azot kaynağının ise L-asparajin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca etilasetat ekstraktlarının Gram (+) ve Gram (-) organizmalara karşı antibakteriyel ve sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Akhand ve ark¹⁰³. (2010) Bangladeş'in Kustia bölgesinden topraktan *Streptomyces* izolasyonu yapılmıştır. Yapılan 16S rDNA dizi analizi sonucunda izolatanın % 99,3 oranından bir benzerlikle *Streptomyces parpurascens* türüne yakın olduğu ama morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri bu türden farklı olmasından dolayı *Streptomyces lalonnensis* ismiyle yeni bir tür olarak adlandırılmıştır. Bu türden izolasyonları yapılan (E)-1-(3 hidroksiazetin-1-yl) undec-7-ene-1,5-dion bileşiklerin ratlar üzerinde sub akut toksitesi araştırılmış, 14 gün boyunca ratlara 300 µg dozunda metabolit verilmiş, uygulama sonunda ratlarda gözle görülen herhangi bir yan etkiye rastlanılmamış. Daha sonra 1., 7. ve 14. Günlerinde ratlardan alınan kan örneklerinin hematolojik analizinde parametrelerin normal olduğu, biyokimyasal test sonuçlarının kontrollere göre çok az değişim gösterdiği ve karaciğer, akciğer, kalp, böbrek gibi organlardan alınan örneklerde histopatolojik bir bulguya rastlanmadığı rapor edilmiştir. Bunun sonucunda *Streptomyces* türlerinden izole edilen antimikrobiyal bileşiklerin toksitelerin az olmasından dolayı yeni ilaç araştırmaları açısından önemli olduğu belirtilmiştir.

Yang ve ark¹⁰⁴. (2010) Çin’de yapılan bir çalışmada *Streptomyces* sp. ECO 00047 toprak izolatının filogenetik analizler sonucunda % 99,4 oranında *Streptomyces diastaticus* türüne benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu izolattan elde edilen oligomisin A-C sekonder metabolitlerinin *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici* gibi bitki patojenlerine karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda *S. diastaticus*’tan daha önce oligomisin izolasyonunun rapor edilmediği açıklanmıştır.

Elleuch ve ark¹⁰⁵. (2010) *Streptomyces* sp. TN262 topraktan izole edilmiştir. Moleküler teşhis sonrası izolatın % 97-98 oranında *Streptomyces flavogriseus*’a benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Peptonlu modifiye Benett besiyerinde; nişasta, fruktoz, gliserol, glukoz ve sakkaroz gibi karbon kaynaklarının antimikrobiyal aktivite üzerinde etkisinin araştırılmasıyla, maksimum biyolojik aktivitenin % 1’lik gliserollü modifiye Benett besiyerinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu besiyerinde büyük ölçekte yapılan üretim sonucunda heksandionik asit, benzensülamid, asetil β karbonil, 3- hidroksi asetil indol, sineromisin B, 2,3-dihidro sineromisin sekonder metabolitleri izole edilmiştir.

Elardo ve ark¹⁰⁶. (2010) Hırvatistan’da üç farklı sünger türünden izole edilen 11 (GU214750), 34 (GU214751), 22 (GU214752), TO3 (GU214749) kodlu izolatların *Streptomyces* cinsine dahil olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 22 ve 34 kodlu deniz izolatlarından ilk kez valinomisin seonder metaboliti izole edilmiştir. Bu bileşiğin biyolojik aktivitesi araştırıldığında *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* parazitlerine karşı etkili anti parazitik aktiviteye sahip olduğu

belirlenmiştir. Diğer izolatlardan izole edilen staurosporin ve butenolid metabolitlerindeki antiparazitik etki gösterdiği gözlenirken öte yandan valinomisin ve staurosporin'in ise sitotoksik aktivite sahip olduğu rapor edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Weber, T.; Wenzel, K.; Pelzer, S.; Vente, A.; Wohlleben, W. *Exploiting the Genetic Potential of Polyketide Producing Streptomyces*, *Journal of Biotechnology*, **2003**, 106, 221-232.
2. Taddei, A.; Valderrama, M.; Giarrizzo, J.; Rey, M.; Castelli, C. *Chemical Screening: A Simple Approach to Visualizing Streptomyces Diversity for Drug Discovery and Further Research*, *Research in Microbiology*, **2005**, 157, 291-297.
3. Williams, S.T.; Goodfellow, M.; Aderson, G. *Genus Streptomyces In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1989**, 4, 2452-2492.
4. McBride, M.J.; Ensing, J.C. *Effect of Intracellular Trehalose Content on Streptomyces griseus Spore*, *Journal of Bacteriology*, **1987**, 169, 4995-5001.
5. Quiros, L.M.; Hardisson, C.; Salas, J.A. *Isolation and Properties of Streptomyces Spore Membranes*, *Journal of Bacteriology*, **1985**, 165, 923-928.
6. Chater, K.F. *Regulation of Sporulation in Streptomyces coelicolor A3(2): a Checkpoint Multiplex*, *Current Opinion Microbiology*, **2001**, 4, 667-673.
7. Oskay, M.; Tamer, A. *Streptomyces Kökenli Antibiyotiklerin Dünyü, Bugünü ve Yarını*, *e Journal of New World Science Academy*, **2009**, 4, 48-60.
8. Iliç, S.B.; Konstantinovic, S.S.; Todorovic, Z.B.; Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Jokovic, N.; Radovanovic, B.C. *Characterization and Antimicrobial Activitiy of Bioactive Metabolites in Streptomyces Isolates*, *Mikrobiologiya*, **2007**, 76, 421-428.

9. Prabavathy, V.R.; Mathivanan, N.; Murugesan, K. *Control of Blast and Sheath Blight Diseases of Rice Using Antifungal Metabolites Produced by Streptomyces sp. PM5, Biological Control*, **2006**, 39, 313-319.
10. Sosio, M.; Bossi, E.; Bianchi, A.; Donadio, S. *Multiple Peptide Synthetase Gene Clusters in Actinomycetes, Molecular and General Genetics*, **2000**, 264, 213-221.
11. Aghighi, S.; Bonjar, G.H.; Rawashdeh, R.; Batayneh, S.; Saadoun, I. *First Report of Antifungal Spectra of Activity of Iranian Actinomycetes Strains Against Alternaria solani, Alternaria alternate, Fusarium solani, Phytophthora megasperma, Verticillium dahliae and Saccharomyces cerevisiae, Asian Journal of Plant Sciences*, **2004**, 3, 463-471.
12. Mehdi, R.B.A.; Sioud, S.; Fguira, L.F.B.; Bejar, S.; Mellouli, L. *Purification and Structure Determination of Four Bioactive Molecules From a Newly Isolated Streptomyces sp. TN97 Strain, Process Biochemistry*, **2006**, 41, 1506-1513.
13. Hwang, B.K.; Ahnn, S.J.; Moon, S.S. *Production, Purification, and Antifungal Activity of the Antibiotic Nucleoside, Tubercidin, Produced by Streptomyces violaceoniger Canadian Journal of Botany*, **1994**, 72, 480-485.
14. Bently, S.D.; Chater, K.F.; Cerdeno, A.M.; Challis, G.L.; Thomson, N.R.; James, K.D.; Harris, D.E.; Quail, M.A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Hopwood, D.A.; Barrell, B.G.; Warren, T.; Sharp, S.; Seeger, K. *Complete Genome Sequence of the Model Actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2), Nature*, **2002**, 417, 141-147.
15. Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S. *Complete Genome Sequence and Comparative*

Analysis of the Industrial Microorganism Streptomyces avermitilis, *Nature Biotechnology*, **2003**, 21, 526-531.

16. Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Omura, S. *Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Industrial Microorganism Streptomyces avermitilis*, *Nature Biotechnology*, **2003**, 21, 526-531.

17. Hopwood, D.A. *Forty Years of Genetics with Streptomyces : from in Vivo Through in Vitro in silico*, *Microbiology Uk*, **1999**, 9, 2183-2202.

18. Mochizuki, S.; Hiratsu, K.; Suwa, M.; Ishii, T.; Sugino, F.; Yamada, K.; Kinashi, H. *The Large Linear Plasmid pSLA2-L of Streptomyces rochei has an Unusually Condensed Gene Organization for Secondary Metabolism*, *Molecular Microbiology*, **2003**, 48, 1501-1510.

19. GOLD Database: <http://www.wit.integratedgenomics.com/GOLD/> (Bernal ve ark. 2001).

20. Omura, S.; Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Takahashi, C.; Shinose, M.; Takahashi, Y.; Horikawa, H.; Nakazawa, H.; Kikuchi, H.; Hattori, M.; Osonoe, T. *Genome Sequence of industrial Microorganism Streptomyces avermitilis: Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites*, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A*, **2001**, 98, 12215-12220.

21. Fraser, C.M.; Gocayne, J.D.; White, O.; Adams, M.D.; Clayton, R.A.; Fleischmann, R.D.; Bult, C.J.; Kerlavage, A.R.; Sutton, G.; Kelley, J.M. *The Minimal Gene Complement of Mycoplasma genitalium*, *Science*, **1995**, 270, 175-190.

22. Donadino, S. *Multiple Peptide Synthetase Gene Cluster in Actinomycetes*, *Mol. Gen. Genet.*, **2000**, 264, 213-221.
23. Baltz, R.H.; *Renaissance in Antibacterial Discovery from Actinomycetes*, *Current Opinion in Pharmacology*, **2008**, 8, 557-563.
24. Koch, E.; Löffler, I. *Partial Characterization of Antimicrobial Activity of Streptomyces antimycoticus FZB53*, *Journal of Phytopathology*, **2008**, 157, 235-242.
25. Shoda, M. *Bacterial Control of Plant Diseases*, *J. Biosci. Bioeng.*, **2000**, 89, 515-521.
26. Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. *Natural Product from Endophytic Microorganism*, *Journal of Natural Products*, **2004**, 67, 257-268.
27. Cannell, R.J.P. *How to Approach the Isolation of a Natural Product*, Humana Press, Totowa, **1998**, 1-51.
28. Berdy, J. *Bioactive Microbial Metabolites*, *Journal of Antibiotics*, **2005**, 58, 1-26.
29. Castillo, U.F.; Strobel, G.A.; Mullenberg, K.; Condron, M.M.; Teplow, D.B.; Folgiano, V.; Gallo, M.; Ferracane, R.; Mannina, L.; Viel, S.; Codde, M.; Robinson, R.; Porter, H.; Jensen, J. *Munumbicins E-4 and E-5 : Novel Broad-Spectrum Antibiotics From Streptomyces NRRL3052*, *FEMS Microbiology Letters*, **2006**, 255, 296-300.
30. Demain, A.L. *Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health*, *Medicinal Research Reviews*, **2009**, 29, 821-842.
31. Butler, M.S. *Natural Products to Drugs: Natural Product Derived Compounds in Clinical Trials*, *Natural Product Reports*, **2005**, 22, 162-195.

32. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Natural Products as Source of New Drugs Over the Period 1981-2002*, *Journal of Natural Products*, **2003**, 66, 1022-1037.
33. Grabley, S.; Thiericke, R. *In Drug Discovery From Nature*, Springer Verlag: Berlin, **1999**, 3-33.
34. Concepcion, G.P.; Lazaro, J.E.; Hyde, K.D. *In Bio Exploitation of Filamentous Fungi Pointing*, Fungal Diversity Press: Hong Kong, **2001**, 93-130.
35. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Natural Products as Source of New Drugs Over the Period 1981-2002*, *Journal of Natural Products*, **2003**, 66, 1022-1037.
36. Projan, S.J.; Youngman, P.J. *Antimicrobials: New Solutions Badly Needed*, *Current Opinion Microbiology*, **2002**, 5, 463-465.
37. Connors, N.; Pollard, D. *Pneumocadin B0 Production by Fermentation of the Fungus Glare lozoyensis : Physiological and Engineering Factor Affecting Titer and Structural Analogue Formation*, *Handbook of Industrial Mycology* New York, **2004**, 515-538.
38. Borchardt, J.K. *Combinatorial Biosynthesis Panning for Pharmaceutical gold*, *Modern Drug Discovery*, **1999**, 2, 22-29.
39. Demain, A.L.; Sanchez, S. *Microbial Drug Discovery: 80 years Progress*, *The Journal of Antibiotics*, **2009**, 62, 5-16.
40. Maier, A.; Maul, C.; Zerlin, M.; Sattler, I.; Grabley, S.; Thiericke, R. *Biomolecular Chemical Screening A Novel Screening Approach for the Discovery of Biologically Active Secondary Metabolites*, *The Journal of Antibiotics*, **1999**, 52, 945-951.

41. Zeeck, A.; Fiedler, H.P.; Grabley, S. *New Cineromycin and Musacins Obtained by Metabolite Pattern Analysis of Streptomyces griseoviridis*, *The Journal of Antibiotics*, **1996**, 49, 432-437.
42. Grabley, S.; Zeeck, A. *The Chemical Screening Approach Drug Discovery from Nature*, Springer-Verlag, **1999**, 124-148.
43. Koch, C.; Neumann, R.; Thiericke, S.; Grabley, S. *A Central Natural Product Pool: New Approach in Drug Discovery Strategies*, Springer-Verlag, **1999**, 51-55.
44. Zahner, H.; Drautz, H.; Weber, W. *Novel Approach to Metabolite Screening in Bioactive Microbial Products Search and Discovery*, Academic Press London, **1982**, 51-70.
45. Etienne, G.; Armau, E.; Dassain, M.; Tiraby, G. *A Screening Method to Identify Antibiotics of the Aminoglycoside Family*, *The Journal of Antibiotics*, **1991**, 44, 1357-1366.
46. Imamura, N.; Nishijima, M.; Adachi, K.; Sano, H. *Novel Antimycin Antibiotics Marine Actinomycete*, *J. Antibiot.*, **1993**, 46, 241-246.
47. Burkhardt, K.; Fiedler, H.P.; Zeeck, A. *New Cineromycin and Musacins Obtained Pattern Analysis of Streptomyces griseoviridis FH-S 1832*, **1996**, 49, 432-437.
48. Wadkins, R.M.; Vladu, B.; Tung, C.S. *Actinomycin D Binds to Metastable Hairpins in Single Stranded DNA*, *Biochemistry*, **1998**, 37, 11915-11923.
49. Birber, B.; Nuske, J.; Ritzau, M.; Grafe, U. *Alnumycin a New Naphthoquinone Antibiotic Produced by an Endophytic Streptomyces sp.*, *The Journal of Antibiotics*, **1998**, 51, 381-382.

50. Haridran, J.; Gupte, T.E.; Naik, S.R. HA-1-92, *A New Antifungal Antibiotic Produced by Streptomyces CDRIL-312: Fermentation, Isolation, Purification and Biological Activity*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **1999**, 15, 425-430.
51. Cruz, R.; Arias, M.E.; Soliveri, J. *Nutritional Requirement for the Production of Pyrazoloisoquinolinone Antibiotics by Streptomyces griseocirneus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1999**, 53, 115-119.
52. Zeng, W.; Zheng, Z.; Huang, Y.; Yang, Z.; Li, J.; Cai, H.; Su, W. *Detection of Antitumor and Antimicrobial Activities in Marine Organism Associated Actinomycetes Isolated from the Taiwan Strait, China*, *FEMS Microbiology Letters*, **2000**, 188, 87-91.
53. Chu, M.; Mierzwa, R.; He, L.; Gentile, F.; Terracciano, J. *Isolation and Structure Elucidation of Two Novel Deformylase Inhibitors Produced by Streptomyces sp.*, *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 3549-3551.
54. Adinarayana, K.; Prabhakar, T.; Srinivasulu, V.; Rao, A.M.; Jhansi, L.P.; Ellaiah, P. *Optimization of Process Parameter for the Cephalosporin C Production Under Solid State Fermentation from Acremonium chrysogenum*, *Process Biochemistry*, **2001**, 39, 171-177.
55. Ouhdouch, Y.; Barakate, M.; Finance, C. *Actinomycetes of Moroccan Habitats: Isolation and Screening for Antifungal Activities*, *European Journal of Soil Biology*, **2001**, 37, 69-74.
56. Won, P.J.; Song, S.B.; Ryu, S.D.; Lee, C.; Kim, Y.B. *In Vitro Bactericidal and Anticancer Activity of New Metabolite, ARK42 Isolated from Aspergillus repens K42*, *Journal of Microbiology Biotechnology*, **2002**, 12, 1017-1021.

57. Asolkar, R.N.; Maskey, R.P.; Helmke, E.; Laatsch, H. *Chalcomycin B, A New Macolide Antibiotic from the Marine Isolate Streptomyces sp. B7064*, *The Journal of Antibiotics*, **2002**, 55, 893-898.
58. Pullen, C.; Schmitz, P.; Daniel, K.M.; Groth, I.; Leister, E.; Grafe, U.; Gollmck, F.; França, S.Z.C.; Lohmann, S. *New and Bioactive Compounds from Streptomyces Strains Residing in the Wood of Celastraceae, Planta*, **2002**, 216, 162-167.
59. Uğur, A.; Şahin, N. *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates*, *Turkish Journal of Biology*, **2002**, 27, 79-84.
60. Lemriss, S.; Laurent, F.; Couble, A.; Casoli, E.; Lancelin, J.M.; Bonaccio, D.; Rifai, S.; Fassouane, A.; Boiron, P. *Screening of Nonpolyenic Antifungal Metabolites Prdoduced by Clinical Isolates of Actinomycetes*, *Canadian Journal of Microbiology*, **2003**, 49, 669-674.
61. Li, F.; Maskey, R.P.; Qin, S.; Sattler, I.; Fiebig, H.H.; Maier, A.; Zeeck, A.; Laatsch, H. *Chinikomycin A and B: Isolation Structure Elucidation and Biological Activitiy of Novel Antibiotics from a Marine Streptomyces sp. Isolate M045*, *Journal of Natural Products*, **2003**, 68, 349-353.
62. Taechowisan, T.; Peberdy, J.F.; Lumyong, S. *Isolation of Endophytic Actinomycetes from Selected Plants and Their Antifungal Activity*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2003**, 19, 381-385.
63. Maskey, R.P.; Helmke, E.; Laatsch, H. *Himalomycin A and B: Isolation and Structure Elucidation of New Fridamycin Type Antibiotics from a Marine Streptomyces Isolate*, *The Journal of Antibiotics*, **2003**, 11, 942-949.

64. Mellouli, L.; Mehdi, A.; Sioud, S.; Salem, M.; Bejar, S. *Isolation , Purification and Partial Characterization of Antibacterial Activities Produced by a Newly Isolated Streptomyces sp. US24 Strain , Research in Microbiology*, **2003**, 154, 345-352.
65. Fguira, L.F.B.; Fotso, S.; Mehdi, A.; Mellouli, L.; Laatsch, H. *Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities of Newly Isolated Streptomyces sp. Strain US80, Research in Microbiology*, **2004**, 156, 341-347.
66. Hayakawa, M.; Yoshida, Y.; Limura, Y. *Selective Isolation of Bioactive Soil Actinomycetes Belonging to the Streptomyces violaceusniger Phenotypic Cluster, Journal of Applied Microbiology*, **2004**, 96, 973-981.
67. Sobolevskaya, M.P.; Fotso, S.; Havash, U.; Denisenko, V.A.; Helmke, E.; Prokofeva, N.G.; Kuznetsova, T.A.; Laaatsch, H.; Elyakov, G.B. *Mebolites of the Isolate of Bacteria Streptomyces sp. 6167, Chemistry of Natural Compounds*, **2004**, 40, 282-285.
68. Cao, L.; Qui, Z.; You, J.; Tan, H.; Zhou, S. *Isolation and Characterization of Endophytic Streptomyces Strain from Surface Sterilized Tomato (Lycopersicon esculatum) Roots, Letters in Applied Microbiology*, **2004**, 39, 425-430.
69. Hossain, S.M.; Hossain, A.M.; Rahman, M.M.; Mondol, M.A.M.; Bhuiyan M.S.A. *Amides from the Streptomyces hygrosopicus and Their Antimicrobial Activity, Phytochemistry*, **2004**, 65, 2147-2151.
70. Aghighi, S.; Bonjar, G.H.; Rawashdeh, R.; Batayneh, S.; Saadoun, I. *First Report of Antifungal Spectra of Activity of Iranian Actinomycetes Strains Aganist*

Alternaria solani, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Asian Journal of Plant Sciences*, **2004**, 3, 463-471.

71. Sujatha, P.; Bapi, K.; Ramana, T. *Studies on a New Marine Streptomycete BT408 Producing Polyketide Antibiotic SBR-22 Effective Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, *Microbiological Research*, **2005**, 160, 119-126.

72. Kitouni, M.; Boudemagh, A.; Oulmi, L.; Reghioua, S.; Boughachiche, F. *Isolation of Actinomycetes Producing Bioactive Substances from Water, Soil and Tree Bark Samples of the North-East of Algeria*, *Journal of de Mycologie Medicale*, **2005**, 15, 45-51.

73. Taddei, A.; Valderrama, M.; Giarrizzo, J.; Rey, M.; Castelli, C. *Chemical Screening: A Simple Approach to Visualizing Streptomyces Diversity for Drug Discovery and Further Research*, *Research in Microbiology*, **2005**, 157, 291-297.

74. Chen, G.; Lin, B.; Xie, F.; Lu, W.; Fong, W.F. *A New Fungicide Produced by a Streptomyces sp. GAAS7310*, *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58, 519-522.

75. Takahashi, K.; Yoshihara, T.; Kurosowa, K. *Uslikulides A and B, Immunosuppressants Produced by a Strain of Streptomyces sp.* *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58, 420-424.

76. Augustine, S.K.; Bhavsar, S.; Kapadnis, B.P. *A Non Polyene Antifungal Antibiotic from Streptomyces albidoflavus PU 23*, *Journal of Bioscience*, **2005**, 30, 201-211.

77. Shiomi, K.; Hatae, K.; Hatano, H.; Matsumoto, A.; Takahashi, Y.; Jiang, C.L.; Tomoda, H.; Kobayashi, S.; Tanaka, H.; Omura, S. *A New Antibiotic, Antimycin*

A, Produced by Streptomyces sp. K01-0031, The Journal of Antibiotics, 2005, 58, 74-78.

78. Ilić, S.B; Konstantinovic, S.S; Todorovic, Z.B. *UV/VIS Analysis and Antimicrobial Activity of Streptomyces Isolates, Facta Universitatis Medicine and Biology, 2005, 12, 44-46.*

79. Dong, Y.; Yang, J.; Ren, X.; Zhang, H.; He, J. *New Aldose Reductase Inhibitors N99-596 A and B from Streptomyces, The Journal of Antibiotics, 2005, 58, 737-739.*

80. Igarashi, Y.; In, Y.; Ishida, T.; Fujita, T.; Yamakawa, T.; Onaka, H.; Furumai, T. *Absolute Configuration of TPU-0043, a Pentaene Macrolide from Streptomyces sp., The Journal of Antibiotics, 2005, 58, 5235-525.*

81. Geshava, V.; Ivanova, V.; Geshava, R. *Effect of Nutrients on the Production of AK-111-81 Macrolide Antibiotic by Streptomyces hygroscopicus, Microbiological Research, 2005, 160, 243-248.*

82. Castillo, U.; Strobel, G.A.; Mullenberg, K.; Condrón, M.M; Teplow, B.D.; Folgiano, V.; Gallo, M.; Ferracane, R.; Mannina, L.; Viel, S.; Codde, M.; Robinson, R.; Porter, H.; Jensen, J. *Munumbicins E-4 and E-5: Novel Broad Spectrum Antibiotics from Streptomyces NRR13052, FEMS Microbiology Letters, 2006, 255, 296-300.*

83. El Naggar, M.Y.; El Assar, S.A.; Abdul Gawad, S.M. *Meroparamycin Production by Newly Isolated Streptomyces sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structure Elucidation, The Journal of Microbiology, 2006, 44, 432-438.*

84. Kurosowa, K.; Bui, V.P.; Van Essendelft, J.L.; Willis, L.B.; Lessard, P.A.; Ghiviriga, I.; Sambandan, T.G.; Rha, C.K.; Sinskey, A.J. *Characterization of Streptomyces MITKK-103, a Newly Isolated Actinomycin X₂ Producer*, *Applied Microbial and Cell Physiology*, **2006**, 72, 145-154.
85. Roy, R.N.; Laskar, S.; Sen, S.K. *Dibutyl Phthalate the Bioactive Compound Produced by Streptomyces albidoflavus 321.2*, *Microbiological Research*, **2006**, 161, 121-126.
86. Mehdi, R.B.A.; Sioud, S.; Fguira, L.F.B.; Bejar, S.; Mellouli, L. *Purification and Structure Determination of Four Bioactive Molecules From a Newly Isolated Streptomyces sp. TN97 Strain*, *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 1506-1513.
87. Thakur, D.; Yadav, A.; Gogoi, B.K.; Bora, T.C. *Isolation and Screening of Streptomyces in Soil of Protected Forest Areas from the States of Assam and Tripura, India, for Antimicrobial Metabolites*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2007**, 17, 242-249.
88. Ilić, S.B.; Konstantinovic, S.S.; Todorovic, Z.B.; Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Jokovic, N.; Radovanovic, B.C. *Characterization and Antimicrobial Activity of Bioactive Metabolites in Streptomyces Isolates*, *Mikrobiologiya*, **2007**, 76, 421-428.
89. Sarah, J.; Murphy, C.D. *Identification and Characterization of a Streptomyces sp. Isolate Exhibiting Activity Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, *Microbiological Research*, **2008**, 165, 82-86.
90. Arasu, M.V.; Duraipandiyar, V.; Agastian, P.; Ignacimuthu, S. *Antimicrobial Activity of Streptomyces sp. ERI-26 Recovered from Western Ghats of Tamil Nadu*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2008**, 18, 147-153.

91. Narayana, K.J.P.; Vijayalakshmi, M. *Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by Streptomyces albidoflavus*, *Research Journal of Pharmacology*, **2008**, 2, 4-7.
92. Saadoun, I.; Muhanna, A. *Optimal Production Condition, Extraction, Partial Purification and Characterization of Inhibitory Compounds Produced by Streptomyces Ds-104 Isolate Against Multi Drug Resistant Candida albicans*, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **2008**, 2, 402-420.
93. Narayana, K.J.P.; Vijayalakshmi, M. *Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by Streptomyces albidoflavus*, *Research Journal of Pharmacology*, **2008**, 2, 4-7.
94. Szabo, Z.; Konya, A.; Lang, I.; Barta, I.; Salat, J. *Production of FK520 by Streptomyces tubercidicus*, *Microbiological Research*, **2008**, 163, 624-632.
95. Yılmaz, E.İ, Kızıl, M.; Yavuz, M. *Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomycetes Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity*, *World Journal of Microbiology Biotechnology*, **2008**, 24, 1461-1470.
96. Arasu, M.V; Duraipandiyan, V.; Agastian, P.; Ignacimuthu, S. *In Vitro Antimicrobial Activity of Streptomyces sp. ERI-3 Isolated from Western Ghats Rock Soil*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2009**, 19, 22-28.
97. Thakur, D.; Bora, T.C.; Bordoloi, G.N.; Mazumdar, S. *Influence of Nutrition and Culturing Conditions for Optimum Growth and Antimicrobial Metabolite*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2009**, 19, 161-167.

98. Xu, Y.; He, H.; Schulz, S.; Liu, X.; Fusetani, N.; Xiong, H.; Xiao, X. *Potent Antifouling Compound Produced by Marine Streptomyces*, *Bioresource Technology*, **2009**, 101, 1331-1336.
99. Ko, W.H.; Tsou, Y.J.; Lin, M.J.; Chern, L.L. *Activity and Characterization of Secondary Metabolites Prdoduced by a New Microorganism for Control of Plant Diseases*, *New Biotechnology*, **2010**, 27, 169-276.
100. Kumar, S.; Kannabiran, K. *Antifungal Activity of Streptomyces VITSVK5 sp. Aganist Drug Resistant Aspergillus clinical Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2010**, 20, 101-107.
101. Wang, Y.; Zhuang, Y.P.; Wang, P.; Chu, J.; Zhagng, S.L. *Regulation of Meilingmycin in Streptomyces nanchangensis: Effect of Ammonium Ion*, *Korean Journal of Chemical Engineering*, **2010**, 27, 910-914.
102. Saha, M.R.; Ripa, F.A.; Islam, M.A.; Khondkar, P. *Optimization of Condition and in Vitro Antibacterial Activity of Secondary Metabolite Isolated from Streptomyces sp. MNK7*, *Journal of Applied Science Research*, **2010**, 6, 453-459.
103. Akhand, M.M.; Bari, M.A.; Islam, M.A.; Khondkar, P. *Sub Acute Toxicity Study of an Antimicrobial Metabolite from Streptomyces lalonnensis sp. On Long Evan's Rats*, *Middle East Journal of Scientific Research*, **2010**, 5, 34-38.
104. Yang, P.W.; Li, M.G.; Zhao, J.Y.; Zhu, M.Z.; Shang, H.; Li, J.R.; Cui, X.L. *Oligomycin A and C Major Secondary Metabolites Isolated from the Newly Isolated Strain Streptomyces diastaticus*, *Folia Microbiology*, **2010**, 55, 10-16.
105. Elleuch, L.; Shaaban, M.; Smaoui, S.; Mellouli, L.; Rebai, I.K.; Fguria, L.F.B.; Shaaban, K.A.; Laatsch, H. *Bioactive Secondary Metabolites from a New*

Terrestrial Streptomyces sp. TN262, Applied Biochemistry Biotechnology, **2010**, 162, 579-593.

106. Ellardo, S.M.P.; Kozytska, S.; Bugni, T.S.; Ireland, C.M.; Moll, H.; Hentschel, U. *Antiparasitic Compounds from Streptomyces sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges, Marine Drugs*, **2010**, 8, 373-380.

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Biyolojik Materyal

3.1.1.1 Lokal Türlerin Toprakdan İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Ayaş-Bey pazarı (Ankara) civarında *Aethionema dumanii*, *Salvia aytachii* ve *Achillea ketenoghui* endemik bitkilerinin, sırasıyla pH=8,8, pH=7,7 ve pH=7,7 olan alkali özellikteki kök çevresi topraklarından aktinomiset izolasyonları yapıldı¹.

Yukarıda bahsedilen bitkilerin kök çevresi topraklarından daha önceden izolasyonları yapılmış olan izolatların¹ 12'sinin, bu çalışmada moleküler teşhisleri yapılarak biyolojik aktiviteleri tarandı. Bu izolatlar; *Streptomyces* sp. AR4, *Streptomyces* sp. AR6, *Streptomyces* sp. AR9, *Streptomyces* sp. AS28, *Streptomyces* sp. AS36, *Streptomyces* sp. BA12, *Streptomyces* sp. BA14, *Streptomyces* sp. BS29, *Streptomyces* sp. BS32, *Streptomyces* sp. CA12, *Streptomyces* sp. CAH29, *Streptomyces* sp. CS41, *Streptomyces* sp. CS42.

Disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinin araştırılmasında *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) test organizmaları kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.2.1. Organik Çözücüler

Etilasetat, hekzan, diklorometan, etil alkol, asetik asit; sırasıyla; Riedel de Haën, Metanol; Sigma-Aldrich, kloroform, petrol eteri, butanol, döteryum kloroform; Merck, fenol, izoamiloalkol Sial'dan temin edildi.

3.1.2.2. Antibiyotikler

İmipenem, Ofloksasin, Netilmisin, Amoksisilin, Eritromisin, Amfoterisin B ve 6mm'lik boş antibiyotik diskler Oxoid'ten temin edildi.

3.1.2.3. Kullanılan Diğer Kimyasallar ve Malzemeler

Sodyum sülfat, trietilamin (Sigma-Aldrich), silika jel [(0,04-0,063 mm partikül büyüklüklü) Fluka], ince tabaka kromatografisi tabakası [TLC (20x20 cm) Merck], agaroz, etidyum bromür (AppliChem), brom fenol blue (Fermentas), TLC tabakaları Macherey-Nagel'den temin edildi.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

3.1.3.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Araştırılmasında Kullanılan Besiyerleri

M2 sıvı besiyeri; 10 g malt özütü (Merck), 4 g maya özütü (Oxoid), 3 g glukoz (Merck) tartılarak çeşme suyu ile 1 L'ye tamamlanıp steril edildi (pH=7,8). Katı M2 besiyeri hazırlamak için ise 15 g/L olacak şekilde agar (Fluka) eklendi.

Benett + Glukoz sıvı besiyeri; 1 g maya özütü, 1 g et özütü (Acumedia), 2 g kazeinin (Bacto, Difco) tartılarak 1 L'ye tamamlanmasıyla Benett besiyeri hazırlandı. Ayrı olarak steril edilen glukoz, final konsantrasyonu 10 g/L olacak şekilde besiyerine eklendi.

Yukarıdaki gibi hazırlanan Benett besiyerine 10 g/L olacak şekilde gliserolün eklenmesiyle Benett + Gliserol besiyeri elde edildi.

Benett + Nişasta besiyerinde 10 g/L olacak şekilde çözünür nişasta (Sigma) önceden kaynatılmak suretiyle Benett besiyerine eklendi.

AT sıvı besiyeri; 1 g maya özütü, 10 g tripton (Sigma), 10 g nişasta, 0,5 g dipotasyum hidrojen fosfat (Merck), saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı.

Tüm besiyerleri 121 °C'de 15 dakika 1,2 atm basıncı altında steril edildi.

3.1.3.2. Kromozomal DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri

Triptik Soy Broth (TSB, Oxoid) 30 g TSB tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanarak steril edildi.

Maya özütü-Malt özütü sıvı besiyeri (YEME); 3 g maya özütü, 3 g malt özütü, 5 g pepton (Bacto,Oxoid), 10 g glukoz, 340 g sükröz (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Sterilizasyon sonrası 1 L YEME besiyerine filtre (Sartorius 0,2µm) ile steril edilmiş 2,5 M MgCl₂. 6 H₂O'dan 2 ml ve % 20'lik glisinden (Sigma) 25 ml eklendi.

3.1.3.3. Test Organizmaları İçin Kullanılan Besiyerleri

Gram (+) ve Gram (-) bakteriler için Nutrient Broth (NB, Fluka) sıvı besiyeri ve Nutrient Agar (NA) katı besiyeri kullanıldı. NB 8 g/L olacak şekilde saf su ile hazırlanıp steril edildi. Buna 15 g/L agar eklenmesiyle NA besiyeri elde edildi.

C. albicans üretimi için olarak Sabouraud % 4 Dextrose Agar (SDA, Merck) kullanıldı (65 g/L). Sıvı besiyeri olarak ise Sabouraud % 2 Dextrose Broth (SDB, Merck) kullanıldı (30 g/L).

3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Maltoz, sodyum dosesil sülfat (SDS), sükröz, glisin, sodyum asetat, sükröz, Tris-HCl (Merck), EDTA (Merck) kimyasalları kullanıldı.

Tris-asetik asit-EDTA tamponu (TAE 50X); 0,05M EDTA (pH=8), % 5,71 asetik asit , 242g tris baz olacak şekilde saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı. Tris baz ve EDTA Merck'ten, asetik asit ise Carlo Erba Reagents'tan temin edildi.

3.1.5. Kullanılan Enzimler

Taq polimeraz (Fermentas), RNaz (Fermentas), Lizozim (Fluka) enzimleri kullanıldı.

3.1.6. Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu (PCR) İçin Gerekli Kimyasallar

Bakteriyel 16S rRNA geninin PCR ile amplifikasyonu için ileri; STF (F8, pozisyon 8-28) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), geri; STR (R1492, pozisyon 1492-1509) (5'- GTTACCTTGTTACGACTT-3') ve ileri; BSF 8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') geri; BSR 1541/20 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') primerleri kullanıldı. Primerler dışında reaksiyon için gerekli olan Taq polimeraz, PCR tamponu, deoksinükleotittrifosfatlar ve MgCl₂ içeren Qiagen Proof-Start Taq Polimeraz kiti (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı.

3.1.7. Jelden DNA'nın Ekstraksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler

PCR ürünlerinin jelden geri kazanılması için ekstraksiyon kiti kullanıldı (GeneMark).

3.1.8. TLC Tabakasındaki Bileşik Spotlarını Görüntülemek İçin Kullanılan Renklendirici Reaktifler

Anisaldehit, sülfürik asit, *p*-dimetilaminobenzaldehit, vanillin, tartarik asit, Fluka'dan; glasiyel asetik asit, hidroklorik asit (HCl), potasyum iyodür, Etanol Riedel de Haën'den, Metanol Sigma-Aldrich'ten; bizmut nitrat Merck'ten; Demir klorür Sigma'dan; orcinol BHD Chemical Ltd'den temin edilmiştir.

3.1.9. Renklendirici Reaktiflerin Hazırlanması

Anisaldehit/ Sülfürik asit (H₂SO₄) reaktifi; 1 ml anisaldehit, 100 ml glasiyel asetik asit, 1 ml derişik sülfürik asidin karıştırılmasıyla hazırlandı.

Ehrlich reaktifi; 1 g *p*-dimetilaminobenzaldehit'e, 25 ml derişik hidroklorik asit (HCl) ve 75 ml metanolun eklenmesiyle hazırlandı.

Potasyum permanganat reaktifi; 3 g potasyum permanganat (KMnO₄), 20 g potasyum karbonat (K₂CO₃), 5 ml sodyum hidroksit (NaOH, % 5), 300 ml saf suyun karışımıyla elde edildi.

İyot reaktifi; 2 g iyot (I₂), 100 g silika jel ile karıştırılarak hazırlandı.

Vanillin/ H₂SO₄ reaktifi; 0,5 g vanillin, 80 ml derişik sülfürik asit, 20 ml etilalkol eklenerek hazırlandı.

Orcinol reaktifi; 0,1 g orcinol, 40,7 ml derişik HCl, 1 ml demir klorür (FeCl₃), 100 ml saf su ile hazırlandı.

Dragendorff reaktifi; iki ayrı çözelti grubunun 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Çözeltilerden ilki 1,7 g bizmut nitrat [Bi(NO₃)₃], 20 g tartarik asit (C₄H₆O₆), 80 ml saf su ile hazırlanırken, ikincisi ise 16 g potasyum iyodüre (KI) 40 ml saf suyun eklenmesiyle hazırlandı.

Ninhidrin reaktifi; 0,2 g ninhidrinin etil alkolde çözülmesiyle hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi; Reaktif olarak kullanılmak üzere 3 M sodyum hidroksit çözeltisi hazırlandı.

Sülfürik asit çözeltisi; Derişik H₂SO₄ çözeltisi de reaktif olarak kullanıldı.

3.1.10. Kullanılan Cihazlar

Otoklav (Hirayama)

Jel Görüntüleyici (UVP Dual Intensity Transiluminatör)

UV Lambası (Camag)

Evaporatör (Heidolph)

Liyolifizatör (Christ Alpha)

PCR Cihazı (Ependorf)

Elektroforez (Scie-Plas)

Hassas Tartı (GEC Avery)

pH Metre (Mettler MP220)

Etüv (Heraeus)

Sterilizatör (Heraeus)

Derin Dondurucu (Ugur)

HPTLC Cihazı (Camag Linomat, Camag Scanner III)

Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-Rad)

Laminar Kabin (Telstar AV 100)

Orbital Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B)

Mini Santrifüj (E.S-6)

Magnetik Karıştırıcı (Stuart)

Spektrofotometre (Varian)

Vorteks (VWR)

Güç kaynağı (Bio-Rad)

+4 °C dolap (Sanyo)

28 °C etüv (Velp Scientifica FTC 90 I)

Su banyosu (Grant LTD 66)

Isıtıcı (Heildoph)

NMR cihazı (Varian Unity 300 MHz)

Mikropipet (Pipetman)

3.2. METOD

Üç farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarından izolasyonu yapılan 12 aktinomiset izolatının moleküler olarak teşhis edilmesi amacıyla kromozomal DNA izolasyonları, PCR ile 16S rRNA gen amplifikasyonları, 16S rDNA dizi analizleri ve biyoinformatik incelemeleri yapıldı.

3.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

İzolatlar % 0.5 maltoz eklenmiş TSB besiyerinde orbital çalkalamalı inkübatörde (230 rpm) 28 °C'de 48 saat üretildi. TSB'li besiyerinde üreyen kültürün 2 ml'si 2/3 oranında TSB-YEME içeren sıvı besiyerine aktarılıp orbital çalkalamalı inkübatörde 28 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1,5'lik ependorf tüplere kültür örnekleri alınıp 2 dakika maksimum rpm'de santrifüjlenerek pelet kısmı izolasyon için kullanıldı. Pelet iki kez %10.3 sükröz çözeltisi ile yıkandıktan sonra 6 mg/ml lizozim ve 75 µg/ml RNaz eklenmiş olan, 500µl TSE tamponunda [25 mM Tris HCl (pH 8.0), 0,3 M sükröz, 25mM EDTA (pH 8.0)] çözüldü. 37 °C'de 45 dakika inkübasyondan sonra, 300µl % 2 SDS eklenerek 20 saniye vortekslendi. İlk olarak fenol:kloroform:izoamiloalkol (25:24:1) ve sonrasında da kloroform:izoamiloalkol (24:1) ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası 10 dakika maksimum rpm'de santrifüjleme ile supernatant kısmı alındı. Üst faz temizleninceye kadar ekstraksiyona devam edildi. Sonuç olarak temiz üst faz alınarak 3 M sodium asetat ve mutlak etanol eklenmesiyle DNA'nın çökmesi için -20 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Kromozomal DNA'nın tamamen çözülmesi için pelete uygun miktarda saf su eklenerek 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

3.2.2. 16S rRNA Genlerinin PCR İle Amplifikasyonu

Saflaştırılan genomik DNA'dan, ileri; STF, BSF ve geri; STR, BSR primerleri kullanılarak 16S rRNA genleri amplifiye edildi. PCR amplifikasyonu Qiagen Proof-Start Taq Polymerase kiti (Qiagen, Hilden, Germany) ile yapıldı. Total hacim 50 µl olmak üzere; 100 ng template DNA, 5 µl 10× PCR tamponu, 1 µl Taq DNA polimeraz, 2 µl dNTP mix, 1,5 µl ileri ve geri primerler, 5 µl MgCl₂ ve 29 µl saf su eklendi. Reaksiyon PCR cihazında termal döngü : 95°C'de 5 min (başlangıç denatürasyonu), sonrasında 30 döngü 94°C 1 dakika, 55°C 1 dakika, 72°C 2 dakika ve final uzama adımı olarak 72°C'de 10 dakika uygulandı. BSF ve BSR primerleri ile yapılan PCR amplifikasyonunda primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması için gerekli olan 55 °C'lik sıcaklık 50 °C'ye indirildi.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Kromozomal DNA'nın tespiti için % 0,7'lik, PCR ile amplifiye edilen 16S rRNA genlerinin görüntülenmesi amacıyla ise % 1'lik agaroz jel hazırlandı. TAE tamponu içerisinde çözünen agaroz jele % 1'lik etidyum bromür stok çözeltisinden 5µl eklendi. 50µl PCR ürününe karşılık 5µl brom fenol blue boyası eklenerek kuyucuklara yükleme yapıldı. Daha sonra güç kaynağından 90 voltluk akım verilerek yürümeye bırakıldı.

3.2.4. Jelden DNA'nın Geri Kazanılması

PCR sonrası yaklaşık 1,5 kb uzunluğundaki fragmentler jelden kesilerek DNA jel ekstraksiyon kiti (Gene Mark) kullanılarak ekstrakte edildi.

3.2.5. DNA Sekans Analizi

Saflaştırılan PCR ürünleri 16S rRNA gen dizi analizine tabii tutuldu. DNA dizi analizleri İontek Şirketine (İstanbul) yaptırıldı.

3.2.6. Biyoinformatik İncelemeler

İzolatların 16S rDNA dizilimleri ilk olarak NCBI web sayfasında: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Blast programında incelendi. Buradan elde edilen 16S rDNA dizilimleri ve bizim lokal izolatlarımızın 158-277 pozisyonlarına denk gelen 120 baz çiftlik bölgeleri, *Streptomyces* cinsinin farklı kümelerini temsil eden türlerle CLUSTALW (Mega 3.1) programı kullanılarak align edildi^{2,3}. Mesafe matrisleri Kimura-2-parameter algoritması kullanılarak hesaplandı⁴. Filogenetik ağaç MEGA 3.1 programı kullanılarak neighbor-joining yöntemi ile çizildi⁵. *Amocolatopsis mediterranei* grup dışı organizma olarak seçildi. 16S rRNA gen dizilimleri tanımlanmış 12 izolatın gen dizilimleri GenBank veri tabanına sunuldu.

3.2.7. Lokal *Streptomyces* İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivite Tayini İçin Üretilmesi

Moleküler teşhisleri tamamlanan 12 *Streptomyces* izolatının Benett+Glukozlu besiyerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için 250 ml'lik erlenlerde 50 ml Benett+Glukoz besiyerine *Streptomyces* izolatlarının katı kültürlerinden ön inkübasyon ekimi yapıldı. Ön inkübasyon süresi sonunda yine 50 ml'lik besiyerlerine sıvı kültürlerinden 500 µl ekim yapıldıktan sonra 3 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.2.7.1. Lokal İzolat *Streptomyces* sp. CAH29'un Farklı Besiyerlerinde Üretilmesi

Streptomyces sp. CAH29 antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amacıyla; M2, Benett + Glukoz, Benett + Gliserol, Benett + Nişasta ve AT gibi değişik içerikteki besiyerlerinde üretildi. M2 katı besiyerinden alınan koloniler içerisinde 50 ml sıvı besiyeri bulunan 250 ml'lik erlenlere ön inkübasyon için aktarıldı. 28 °C'de 230 rpm'de 72 saat üretimden sonra 150 ml besiyeri içeren 500 ml'lik erlenlere 1,5 ml inokülasyon yapıldı.

3.2.8. Filtrasyon

İnkübasyon süresi sonrasında kültür ortamındaki misellerin ve süpernatantın birbirinden ayrılması için filtrasyon işlemi yapıldı. Misellerden ayrılan süpernatanttan ekstraksiyon öncesi örnek alınarak 'filtrat' olarak isimlendirildi.

3.2.9. Liyofilizasyon

Süpernatantlar sıvı azot ile dondurulduktan sonra liyoflizatör cihazında yaklaşık 15 saat liyofilize edilen filtratın hacmi 1/3 oranında indirilmiş oldu.

3.2.10. Farklı Besiyerlerinde Üretilen *Streptomyces* sp. CAH29 Filtratlarının Ekstraksiyonu

Filtratlar farklı polarite özelliğine sahip etilasetat, hekzan ve diklorometan gibi organik çözücülerle ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Filtratlar her 3 organik çözücü ile 1:1 oranında ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonunda elde edilen fazlardan bileşiklerin çoğunun geçtiği düşünülen organik faz, bundan geriye kalan su fazı disk

difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal bileşik taraması için muhafaza edildi. Organik ekstraktların etilasetat, hekzan, diklorometan çözücülerini rotary evaporator cihazıyla uçurularak bileşikler kurutulmuş halde elde edildi. Madde miktarlarının tespiti amacıyla yapılan tartım işlemi sonrası ekstraktlar kendi çözücülerine uygun hacimlerde çözüldü.

3.2.11. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Tespiti

Antimikrobiyal aktivite, “National Committee for Clinical Laboratory standards (NCCLS)” tarafından önerilen disk difüzyon yöntemine göre yapıldı⁶. Yapılan antimikrobiyal aktivite taramalarında kullanılan mikroorganizmalar; *E. coli* ATCC (25922), *S. aureus* ATCC (25923), *S. pyogenes* ATCC (19615), *P. aeruginosa* ATCC (27853) ve *C. albicans* ATCC (10231)’dir .

Disk difüzyon testinde, bakteriler için bir gece öncesinden katı besiyerinde üretilmiş taze bakteri ve *Candida* kolonileri sırasıyla 20 ml’lik NB ve SDB besiyerlerine inoküle edildi. Daha sonra çalkalamalı orbital inkübatörde 37 °C’de 600 nm’de absorbansları 0,5 olana kadar yaklaşık 4-6 saat arasında üremeye bırakıldı. Kültürlerden 100 µl örnek alınarak her bir katı besiyerine steril plastik özelerle yayma yapıldı. Mikroorganizma yayma işlemi sonrasında agar üzerine 6 mm çapındaki antibiyotik diskleri ve boş diskler yerleştirildi. Boş disklere sırasıyla elde edilmiş filtrat, su fazı ve organik ekstrakt örneklerinden 20’şer µl emdirildi. Katı kültürler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra zon yarıçapları ölçüldü.

3.2.12. Bileşiklerin İnce Tabaka Kromatografisiyle (TLC) Ayrılması

Araştırmalarımızda 20x5 cm boyutlarında silika kaplı pleytler kullanıldı. TLC tabakası üzerinde başlangıç ve bitiş noktaları belirlendikten sonra ekstraktın spot işlemi yapıldı. Ekstraktta bulunan bileşiklerin spotlar halinde birbirinden ayrılması ve birbirinden ayrılan bu spotların renklendirici ajanlarla fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla diklorometan-metanol (95:5), diklorometan-metanol (90:10), diklorometan-metanol (97:3) gibi değişik çözücü sistemleri kullanıldı. TLC sonunda kurutulan tabakalar UV ışığı altında 254 ve 366 nm'lerde görüntülenerek renkli spotlar işaretlendi.

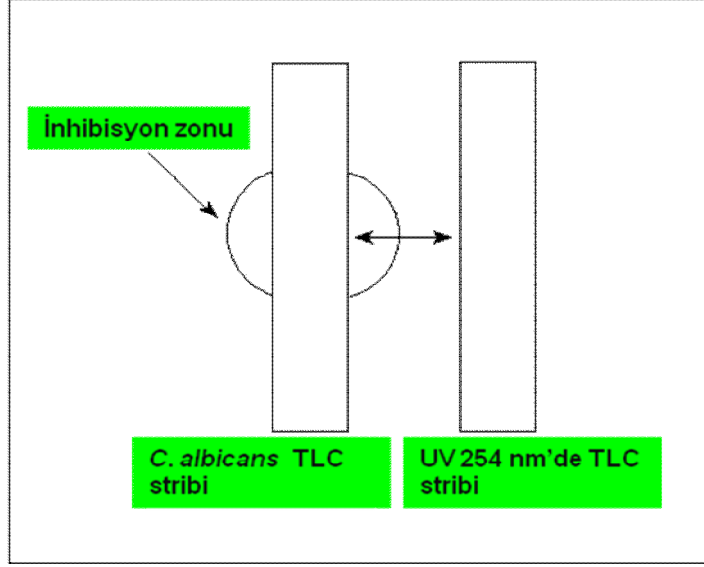
3.2.13. TLC Spotlarına Çeşitli Renklendirici Ajanların Püskürtülmesi

TLC ile birbirinden ayrılan değişik Rf değerlerine sahip spot bölgelerinde bulunan bileşik veya bileşiklerin farklı kimyasal reaktiflerle etkileşimi sonucu vermiş olduğu renk ile hangi fonksiyonel gruplara sahip olduğunun belirlenmesi amacıyla anisaldehit/H₂SO₄, vanillin/H₂SO₄, orcinol, Ehrlich, iyot, potasyum permanganat, ninhidrin, dragendorff, sodyum hidroksit ve sülfürik asit ile püskürtme yapıldı.

3.2.14. Biyootografi Yöntemi İle Biyoaktif Spotların Tespit Edilmesi

TLC ile birbirinden ayrılmış spotların antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti amacıyla biyootografi yöntemi uygulandı. UV ışığı altında steril edilen TLC tabakaları biyootografi yöntemi için hazırlanırken eşit olan iki noktadan 10'ar µl ekstrakt ile yüklendi. Disk difüzyon yöntemindeki gibi katı besiyerlerine yayılmış olan test mikroorganizmalarına, TLC tabakasındaki spotların antimikrobiyal

aktivitelerini belirlemek için ayırım yapılmış tabakalar katı kültürler üzerine aktarıldı.



Şekil 3.1. Biyootografi yönteminin şematik gösterimi

Diklorometan-metanol (9:1) çözücü sisteminde yürütüldükten sonra çözücüyü uçurmak için 15 dakika laminar kabin içinde beklemeye alındı. Bu süre sonunda tabakalar steril makas ile eşit boyutlarda iki parçaya ayrıldı. Bu parçalardan biri daha önce ekim yapılmış katı besiyerlerine bastırılarak 30 dakika bu şekilde bekletildi. Süre sonunda tabaka petriden uzaklaştırılarak katı besiyeri 37° C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kesimden kalan diğer parça ise spotların inkübasyon süresi sonrasında katı kültürlerde spotların oluşturduğu zonlar ile kıyaslandı.

3.2.15. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

TLC ile belirlenen spotların daha detaylı analiz edilmesi için HPTLC yapıldı. Organik ekstraktlar HPTLC cihazıyla 20x20 cm pleytlere 30 µl hacminde düz bir bant şeklinde spot edildi. Diklorometan-metanol (9:1) çözücü sistemi ile yapılan yürütme işlemi sonrası tabaka üzerindeki spotların Rf değerleri, UV taraması sonucu bileşiklerin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyları belirlendi.

3.2.15.1. Bileşiklerin HPTLC Tabakalarından Geri Kazanılması

HPTLC tabakasında ilgili bileşiklere karşılık gelen spotlar silikadan kazılarak ependorf tüplerine alındı. Ependorf tüplerine 1000 µl metanol eklendikten sonra kısa bir süre vorteks ile karıştırıldı. Sonrasında 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjleme ile süpernatant ile spottaki maddeler geri kazanıldı.

3.2.16. Kolon Kromatografisi İle Bileşiklerin Ayrılması

3.2.16.1. Organik Ekstraktın Kolon Kromatografisi İle Ayrılması

Kolon kromatografisi çalışmalarında 40 cm uzunluğunda, 2,5 cm çapında ve 45 cm uzunluğundan 3 cm çapında iki farklı kolon kullanıldı. Kolon dolgu maddesi olarak silika jel kullanıldı. Kolon hazırlandıktan sonrasında 500 µl ham ekstraktın kolona yüklenmesiyle değişik oranlarda hekzan-etilasetat, etilasetat ve metanol çözücülerinin yardımıyla ekstraktın içindeki bileşikler kolondan elüye edildi.

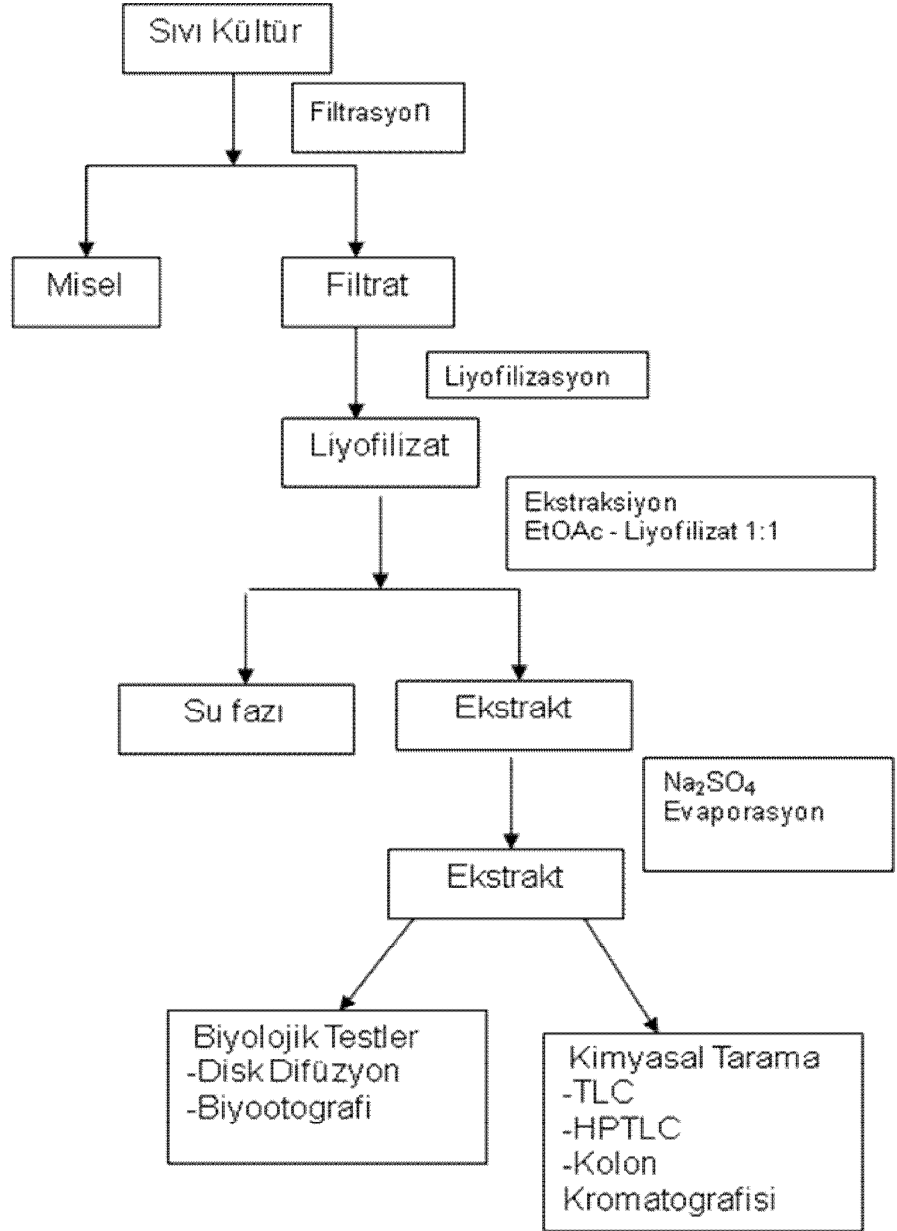
Elde edilen elüyerler farklı hacimlerde fraksiyonlandırılarak TLC tabakalarında analiz edildi. TLC profillerine göre de taranan tüm fraksiyonlar F1, F2, F3, F4 şeklinde 4 temel fraksiyon halinde birleştirildi. Biyolojik aktivitesinin

belirlediğimiz bileşik F3 fraksiyonunda olduğundan dolayı sonraki işlemlere bu fraksiyon üzerinden devam edildi.

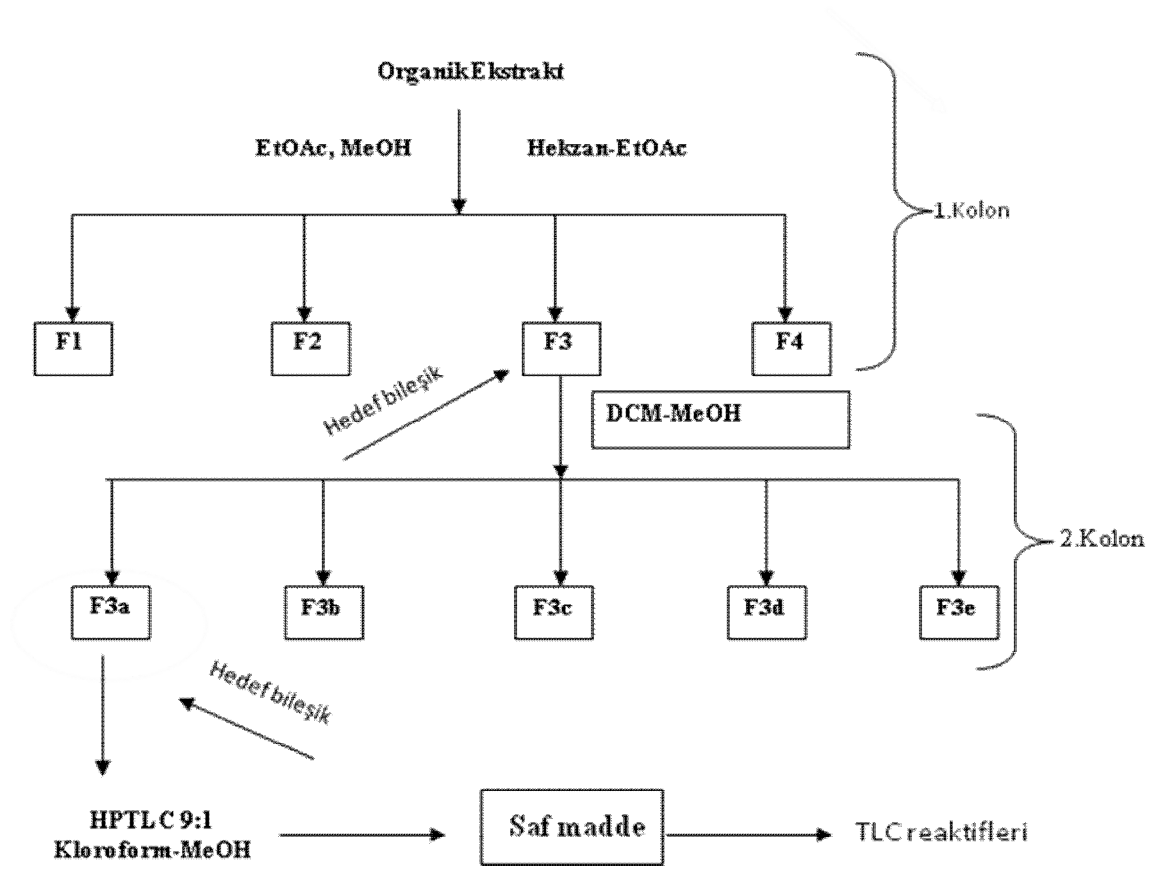
3.2.16.2. F3 Fraksiyonun İkinci Kolon Kromatografisi İle Ayrılması

İlgilenilen biyoaktif bileşik veya bileşikleri içeren F3 fraksiyonu 2. bir kolona uygulandı. Kolon hazırlandıktan sonra F3 fraksiyonu kolona yüklendi. Değişik oranlarda diklorometan-metanol çözücü sistemleriyle bileşikler elüye edildi. Yapılan elüsyonlar sonucunda elde edilen fraksiyonlar TLC profilleri incelenerek F3a, F3b, F3c, F3d, F3e gibi 5 farklı fraksiyon şeklinde birleştirildi.

Bileşiklerin izolasyon işlemi, izole edilecek bileşiğin polarite özelliğine ve bunun yanında kolon için doğru çözücü sistemlerinin kullanılmasına bağlıdır. Bunun belirlenmesi amacıyla her iki kolon kromatografisi öncesinde değişik polaritede ve oranlarda TLC uygulamaları yapıldı.



Şekil 3.2. Kültür ortamında üretilen *Streptomyces* izolatlarının sekonder metabolitlerinin tarama işlemleri



Şekil 3.3. Kolon kromatografisi yöntemiyle hedef bileşiğin saflaştırma aşamaları

KAYNAKLAR

1. Yılmaz, E.İ, Kızıllı, M.; Yavuz, M. *Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomycetes Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 24, 1461-1470.
2. Williams, S.T.; Goodfellow, M.; Alderson, G.; Wellington, E.M.H.; Sneath, P.H.A.; Sackin, M.J. *Numerical Classification of Streptomyces and Related Genera*, *Journal of General Microbiology*, **1983**, 129, 1743-1813.
3. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. *Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice*, *Nucleic Acid Research.*, **1994**, 22, 4673-4680.
4. Kimura, R. *A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequence*, *Journal of Molecular Evolution*, **1980**, 16, 111-120.
5. Saitou, N.; Nei, M. *The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*, *Molecular Biology and Evolution*, **1987**, 4, 406-425.
6. Clark, C.L.; Jacobs, M.R.; Appelbaum, P.C. *Antipeumococcal Activities of Levofloxacin and Clarithromycin as Determined by Agar Dilution, Microdilution, E – Test, and Disk Diffusion Methodologies*, *Journal of Clinical Microbiology*, **1998**, 36, 3579-3584.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. 1.Topraktan İzole Edilen *Streptomyces* Türlerinin Moleküler Teşhisi

Grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmalarda üç farklı endemik bitkinin kök çevresi topraklarında bulunan aktinomisetler; raffinöz-histidin agar, nişasta-kazein agar ve aktinomiset izolasyon agar katı besiyerlerindeki karakteristik koloni ve pigment özellikleri bakımından diğer bakteri kolonilerinden ayrıldı. Koloniler; kuru, pürtüklü, renkli veya renkli olmayan, agara yapışıp yapışmayan ve hava/substrat miselleri açısından değerlendirilmiştir⁷.

Üç endemik bitkinin rizosfer topraklarından elde edilen 12 izolattan *Streptomyces* sp. CS42 ve *Streptomyces* sp. CA12 izolatlarının 16S rRNA genleri BSF ve BSR primerleriyle, diğer izolatların ise STF ve STR primerleri ile amplifiye edildi.

Genler sekanslandıktan sonra NCBI web sayfasından BLASTN programı kullanılarak yapılan homoloji analizlerine göre AR4, AR6, AR9, AS28, CS41, CA12, CS42, BA14, BS29, BS32, BA12, AS36, CAH29 kodlu izolatların *Streptomyces* cinsine dahil türlerle yüksek homoloji gösterdiği bulundu.

Moleküler olarak teşhis edilmiş bu izolatların filogenetik ağaçları çizildi. Bu filogenetik ağaç 16S rRNA genlerinin değişken bölgesini içeren kısımlarının (158-277 pozisyonları arasında kalan 120 baz çiftlik bölge) kıyaslanmasıyla oluşturuldu.

Teşhisleri tamamlanan izolatların filogenetik ağaç incelemelerinde *Streptomyces* cinsinin üyeleri ile yüksek oranda homoloji gösterdiği tespit edildi. AR4'ün, 25 *Streptomyces* türünü temsil eden grupların üyeleriyle herhangi bir küme oluşturmadığı gözlemlendi.

AR6'nın *S. fulvissimus* ile, AR9'un ise *N. umidischolae* ile yakın ilişkili olduğu gözlemlendi. AS36'nın *S. purpureus* ile kümeleştiği tespit edildi. Güçlü ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivitesinden dolayı kimyasal tarama için seçtiğimiz CAH29'un da kullandığımız temsili grup üyeleriyle akrabalığı tespit edilemedi. Bu sebeplerden ötürü bu türlerin yeni tür olabilme potansiyelleri vardır.

4.1.2. Lokal İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi

Moleküler teşhisi yapılan 12 izolatın Benett + glukozlu besiyerindeki antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 4.1'de görülmektedir. İzolatlardan 9 tanesinin etilasetat ekstraktlarının farklı test organizmaları üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu tespit edildi. CS41 izolatının elde edilen organik ekstraktlarının Gram (+) organizmalar üzerine güçlü inhibisyon etkisi saptandı. BS29, BA14, BA12 izolatlarından elde edilen ekstraktların hem antifungal hem de antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görüldü. En güçlü antifungal aktiviteye 7 mm'lik zon yarı çapı ile BS29 izolatının ekstraktında, en zayıf antibakteriyel aktiviteye ise 4 mm'lik zon yarı çapı ile CS42 izolatının ekstraktında rastlanıldı. İzolatların filtrat ve su fazı örneklerinde herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye rastlanmadı.

4.1.2.1. *Streptomyces* sp. CAH29'un Farklı Besiyerlerindeki Antimikrobiyal Aktivitesi

Endemik bitki rizosferinden izole edilen ve moleküler olarak teşhis edilmiş *Streptomyces* sp.'ler içerisinde en iyi antimikrobiyal aktivite gösteren CAH29 farklı besiyerlerinde üretildi. İzolatın M2, Benett + Glukoz, Benett + Gliserol,

Benett + Nişasta ve AT besiyerlerinde üretilmesinden diklorometan, etilasetat, hekzan organik ekstraktları elde edildi. Bu ekstraktlarla birlikte su fazı ve filtrat örneklerinin test organizmalarına karşı değişik oranlarda antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri belirlendi.

Tablo 4.2’de de görüldüğü üzere en iyi antimikrobiyal aktiviteye Benett + Glukoz besiyerinde etilasetat ekstraktı ile rastlandı. Örneğin Benett + Glukoz besiyeri etilasetat ekstraktının *S. aureus*’a karşı 11 mm’lik inhibisyon yarıçapına sahip olduğu belirlendi. Tüm besiyerlerinden hekzan ile elde edilen ekstraktların ve filtrat örneklerinin *S. aureus*’a karşı inhibisyon etkisinin olmadığı tespit edildi. Hem Benett + Glukoz hem de Benett + Gliserol etilasetat ekstraktlarının *S. pyogenes* üzerine güçlü antimikrobiyal etkisinin olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte hekzanla ekstraksiyonu yapılan tüm besiyerleri içerisinde, Benett + Gliserol besiyerinden elde edilen ekstraktın *S. pyogenes*’e karşı 14 mm’lik inhibisyon zonu ile en güçlü antibakteriyel etki olduğu saptandı. M2 besiyerinde hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen su fazında zayıf antimikrobiyal aktiviteye rastlandı.

Streptomyces sp. CAH29 lokal izolatının yukarıda bahsedilen 5 farklı besiyerinde üretmiş olduğu sekonder metabolitlerin organik ekstraktları *P.aeruginosa* üzerine denendi. Kullanılan organik çözücüler içerisinde etilasetat ekstraktlarının *P. aeruginosa* hücrelerini düşük oranda inhibe ettiği gözlemlendi. Diklorometan ekstraktlarında ise buna göre daha düşük zonlar izlendi. Kullanılan diğer çözücü olan hekzan ile yapılan ekstraksiyonlarda herhangi bir inhibisyona rastlanmadı. *P. aeruginosa* gibi Gram (-) karakterde olan *E.coli* test organizması üzerine hekzan ve bazı etilasetat ekstraktlarının zayıf inhibisyon etkisine neden olduğu görüldü. Filtrat ve su fazı örneklerinin herhangi bir antibakteriyel etki göstermediği belirlendi.

Streptomyces sp. CAH29'un farklı besiyerlerinde antifungal aktiviteye sahip bileşikler üretilip üretilmediğini saptamak amacıyla da 5 farklı besiyerinde üretilen hücrelerin farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlar *C. albicans* üzerine denendi. Buna göre M2, Benett + Glukoz, Benett + Gliserol kültürlerinden elde edilen etilasetat ekstraktlarının *C. albicans* üzerine güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği bulundu. Bununla birlikte 16 mm'lik inhibisyon zon yarı çapıyla en fazla antimikrobiyal aktiviteye Benett + Glukozlu besiyeri etilasetat ekstrakt ile elde edildiği görüldü. AT besiyerinde düşük bir antifungal aktiviteye rastlanırken Benett + Nişasta besiyerinde herhangi bir aktivite gözlenmedi. Aynı besiyerlerinden elde edilen süpernatantların hekzan ve DCM çözücüler ile elde edilen ekstraktların M2, Benett + Glukoz ve Benett + Gliserol besiyerlerinden elde edilenlere göre antifungal aktivitesinin daha düşük olduğu kaydedildi.

4.1.3. *Streptomyces* sp. CAH29 Sekonder Bileşiklerinin Kimyasal Taranması

4.1.3.1. Geniş Ölçekte Üretilen Bakterilerin Antimikrobiyal Aktivitesi

4.1.3.1.1. pH'ya Bağlı Antimikrobiyal Aktivite

Birçok sekonder metabolit zayıf asidik özelliğe sahip olmasından dolayı suda çözülebilen, organik çözücülerde ise çözünemeyen tuzları halinde kültür süpernatantında bulunurlar. Bu sebepten dolayı tuz formunun asidik forma dönüşmesini ve organik çözücülerle ekstraksiyonu sırasında organik faza geçmelerini sağlamak amacıyla kültür filtratlarında pH 3-4 ayarlaması yapılmaktadır. Bu nedenden dolayı ekstraksiyon sırasında su fazında pH 4.0 ayarlaması yapıldı.

Ekstraktın pH'sına bağılı antimikrobiyal aktivite, gerek pH'sı 4.0'a düşürülen gerekse pH'sında bir değişiklik yapılmayan liyofilizatların etilasetat ekstraktlarının, test organizmalarına karşı inhibisyonları ölçülerek tespit edildi. pH ayarı yapılan ve yapılmayan ekstraktların inhibisyon etkileri karşılaştırıldığında Tablo 4.3'te görüldüğü gibi en fazla antimikrobiyal etkinin *C. albicans* üzerine olduğu ve her iki ekstrakta da inhibisyon zonunun değişmediğı gözlemlendi. Gram (+) organizmalar açısından bir kıyaslama yapıldığında *S. pyogenes*'e karşı pH değişikliği yapılmayanda zon yarıçapının hemen hemen 2 kat arttığı, bu durumun aksine Gram (-) ise azaldığı gözlemlendi.

4.1.3.2. Etilasetat İle Ekstrakte Edilen Bileşiklerin TLC İle Birbirinden Ayrılması ve Biyootografi

Değişik oranlarda ve çözücü sistemleriyle yapılan TLC denemeleri sonucunda sekonder metabolitlere karşılık gelen spotların birbirinden en iyi Diklorometan-metanol (9:1) çözücü sistemiyle ayrıldığı gözlemlendi. Uygulanan biyootografi yöntemiyle yaklaşık 0,6-0,7 Rf değeri civarındaki spotların *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. albicans* üzerine güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Daha aşağıda bulunan ve Rf değeri yaklaşık 0,2 olan bölgenin ise *E.coli* üzerine inhibisyon etkisi gözlemlendi.

4.1.4. Sekonder Biyoaktif Metabolitlerin HPTLC İle Belirlenmesi

20x20 cm boyutlarındaki TLC tabakaları ile yapılan HPTLC sonucunda antimikrobiyal etkisi olduğunu düşündüğümüz ve yaklaşık Rf değeleri 0.54, 0.60, 0.64 ve 0.69 olan bölgelerdeki spotların UV absorbans değerleri belirlendi. Şekil

4.3'te görüldüğü gibi 0.69 Rf değerli bölgenin tek pik'e karşılık geldiği ve 270 nm'de maksimum absorbans gösterdiği görüldü.

4.1.4.1. HPTLC Tabakalarından Geri Kazanılan Spotların Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması

HPTLC tabakasından geri kazanılan 4 farklı spot bölgesinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkileri belirlendi. Yaklaşık Rf değeri 0.54 ve 0.60'ı bulan bölgedeki bileşik veya bileşiklerin Gram (+) organizmalara karşı inhibisyon etkisinin olduğu belirlendi. Tablo 4.7'de de görüldüğü gibi Rf değerleri 0.64 ve 0.69 olarak belirlenen spot bölgelerinin hem antibakteriyel hem de antifungal etkilerinin olduğu tespit edildi. Spektrumlarda da görüldüğü üzere; gerek geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olması gerekse tek bir pik şeklinde HPTLC tabakasından ayrılmış olmasından dolayı gözle görülebilen açık sarı renge sahip, 0,69 Rf değerli madde spotunun üzerinde çalışmalara devam edildi.

HPTLC tabakasından geri kazanılan hem antibakteriyel hem de antifungal etkili spotta bir veya daha fazla bileşik olup olmadığını anlamak üzere farklı çözücü sistemlerinde yürütme yapıldı. Diklorometan-metanol (9:1) çözücü sisteminde tek bir spot gibi görülen 270 nm'de maksimum absorbans veren bu spotun, petrol eteri-etilasetat (9:1) çözücü sistemiyle yapılan TLC uygulaması sonucunda gözle görülebilen bir başka bileşik daha içerdiği tespit edildi. HPTLC sonunda yapılan UV taraması sonucunda tek bir pik vermesine rağmen TLC sonucunda saf olmadığı anlaşıldı. Bu bulgu sayesinde anlaşılan HPTLC tabakalarında tek spot görünen bileşiklerin beraberinde başka bileşik içermeye olasılıkları olmasından dolayı

organizma yeniden üretilerek, kolon kromatografisi ile saflaştırılma işlemine başlandı.

4.1.5. Hedef Bileşiğin Kolon Kromatografisi İle Ayrılması

1,8 L'lik üretim sonrası elde edilen 100 mg ham ekstrakt kolona yüklendi. Daha sonra hekzan-etilasetat, etilasetat ve metanol çözücü sistemleriyle kolondan eluye edildi. Yapılan TLC analizleri sonucunda kolondan elde edilen örnekler 4 temel fraksiyonda toplandı. Biyootografi çalışmaları sonucunda antimikrobiyal etkisi gözlemlenen ve gözle görülebilen sarı renkli spot etilasetat ile kolondan elüye edilmiş olan F3 fraksiyonunda tespit edildi. Daha sonra aynı fraksiyonda bu maddenin yanısıra TLC tabakalarında gözle görülmeyen fakat 254 nm UV altında görülebilen 2 farklı spota daha rastlandı. Yapılan biyootografi testlerinde UV'ce aktif bu iki spotun antimikrobiyal aktivitesine rastlanmadı.

Hedeflenen biyoaktif bileşiği beraberinde bulunan diğer 2 spottan ayırmak amacıyla ikinci bir kolon hazırlandı. Farklı oranlarda diklorometan-metanol çözücü sistemi solvent olarak kullanıldı. Kolondan elde edilen örnekler TLC tabakaları üzerinde incelenerek temel 5 farklı fraksiyon şeklinde kombine edildi. Saflaştırmayı hedeflediğimiz biyoaktif bileşik F3a fraksiyonunda tespit edildi. Yapılan TLC incelemelerinde hem gözle hem de UV ışığı altında hedef bileşik yalnız görünmesine rağmen; iyot ve potasyum permanganat ajanlarının uygulanmasıyla başka bir maddenin varlığı daha belirlendi.

4.1.5.1. HPTLC İle Hedef Bileşiğın Saflaştırılması

F3a fraksiyonu ile klorofom-metanol (9:1) çözücü sistemiyle yapılan preparatif TLC uygulaması sonrası hedef bileşiğın TLC tabakasından geri kazanılması sonucu saf olarak elde edildi.

4.1.5.2. Hedef Bileşiğın Farklı Renklendirici Kimyasal Maddelerle Muamele Edilmesi

Doğal rengi açık sarı olan bileşikteki fonksiyonel grupların tespit edilmesi amacıyla çeşitli TLC ajanlarla muamele edilmesi sonucunda değişik renklerin oluştuğu gözlemlendi. Tablo 4.5'te de belirtildiği gibi Anisaldehit/H₂SO₄ püskürtülmesi sonucunda kahverengi, Vanillin/ H₂SO₄ etkileşiminde koyu kahverengi, sodyum hidroksit ile kırmızı-pembe renk verdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda bileşiğın sodyum hidroksit ile etkileşimi sonucu oluşan renk göz önüne alındığında kinon yapısında, orcinol, anisaldehit/H₂SO₄, sülfürik asit reaktifleri ile vermiş olduğu renklerden dolayı ise makrolid yapıda olabileceği düşünöldü.

4.1.5.3. Hedef Bileşiğın Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması

Saf olarak elde edilen bileşiğın *C. albicans*'a 6 mm'lik, *S. aureus*'a 12 mm'lik, *S. pyogenes*'e 7 mm'lik zon yarı çapları ile organizmalar üzerine inhibisyon etkisinin olduğu göröldü.

Saf halde elde edilen bileşiğın ¹H NMR spektrumu alındı. Madde miktarı az olduğu için ¹³C NMR spektrumu alınamadı. Yapı aydınlatma çalışmaları için fazla miktarda maddeye gereksinim olduğundan bu aşamadan sonra organizma çok daha geniş ölçekte (~ 8 L) üretilerek buraya kadar anlatılan saflaştırma teknikleri ve

analitik yöntemlerle saf olarak elde edilecektir. ^1H NMR, ^{13}C NMR, FTIR ve kütle spektroskopisi verileri elde edilerek yapısı aydınlatılacak, doğal bileşik veri tabanlarında şimdiye kadar bulunmuş olan bileşiklerle kıyaslanacaktır.

4.2. TARTIŞMA

Prokaryot sistematğinde 16S rRNA geni evrimsel öneme sahip bir göstereçtir. Mikroorganizmaların moleküler yöntemlerle teşhisinin yapılmasında oldukça sık kullanılmaktadır. Biyokimyasal temelli tanımlama yöntemleri yavaş, zor, ve oldukça pahalı olmasına karşın moleküler teşhis yöntemi daha hızlı ve etkili bir metottur.

Çalışmamızda 16S rDNA dizi analizine dayalı biyoinformatik incelemeler sonucunda izolatların *Streptomyces* cinsine dahil üyeler olduğunu ve çizilen filogenetik ağaç ile farklı türlerle olan akrabalıkları tespit edildi. Yapılan BLAST incelemeleri sonucunda gen bankasına sunulan diğer *Streptomyces* türleri ile % 97-99 oranında benzerlik görölse de izolatların, filogenetik ağaçtaki pozisyonlarından yola çıkarak yeni *Streptomyces* türü olma olasılıklarının yüksek olduğu görölmektedir. Yeni bileşik ürettiği tespit edilen türlerin tam tür teşhisleri DNA-DNA hibridizasyonu ile yapılacaktır.

Akhand ve ark¹. moleküler teşhis yöntemi ile yaptıkları analiz sonucunda izolatlarının % 99,3'lük oranla *Streptomyces parpurascens* türüne benzediği tespit etmişlerdir. Daha sonra yapılan analizler sonucu izolatin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin *Streptomyces parpurascens* türünden farklı olduğunu tespit ettiklerinden bu izolatinin yeni bir tür olduğunu belirtmişlerdir.

Yang ve ark². topraktan izole ettikleri *Streptomyces* sp. ECO00047 izolatının çizilen filogenetik ağaç sonucunda % 99,4 oranında *Streptomyces diasticus* türü ile benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Kurosawa ve ark³. Aktinomisin X₂ sekonder metabolitinin izolasyonunun yapıldığı *Streptomyces* MITKK-103'ün uygulanan moleküler teşhis yöntemi

sonucunda *Streptomyces padanus*, *Streptomyces griseofuscus* ve *Streptomyces galbus* türlerine oldukça yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir.

Sarah ve ark⁴. *Streptomyces* sp. IMD2703 izolatu ile yaptıkları çalışmada izolatu 16S rRNA geni kullanılarak gerçekleştirilen moleküler teşhisi sonucunda % 99 oranında *Streptomyces lavendulae* ve *Streptomyces globus*'a benzediğini belirtmişlerdir. Daha sonra uygulanan DNA-DNA hibridizasyonu sonucunda izolatu % 79.8 oranında *Streptomyces globus* türüne yakınlık gösterdiği belirtilmiştir.

El Naggar ve ark⁵. bir toprak izolatu olan *Streptomyces* sp. MAR01'in moleküler filogeni çalışmaları sonucunda % 99'luk bir benzerlik oranıyla *Streptomyces aureofaciens* türüne yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir.

Elleuch ve ark⁶. 16S rRNA genin amplifiye edilip dizi analizi ve biyoinformatik incelemeler sonucunda elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda *Streptomyces* sp. TN262 izolatu'nun *Streptomyces flaogriseus* türüne oldukça benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda moleküler teşhisleri yapılan 12 izolatu *Streptomyces* cinsine dahil üyeler olduğunun tespit edilmesinden sonra Benett +Glukoz besiyerindeki antimikrobiyal bileşik üretme kapasiteleri araştırıldı. Bu araştırma sonucunda 9 izolatu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Bu sonuç literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyaslandığında elde edilen oranın yüksek olduğu tespit edildi. İzolatların endemik bitki rizosferi bölgelerinden izole edildiği ve bu bölgelerin biyoaktif sekonder metabolit sentezleme potansiyeli yüksek olan *Streptomyces* türleri için önemli habitatlar olduğu göz önünde bulundurulduğunda sonuçların bu bilgi ile uyum içinde olduğu görülmektedir. Ayrıca kültür ortamını bileşenleri,

pH, sıcaklık, minareller gibi çeşitli faktörler sekonder metabolit üretimini etkilemektedir. 12 izolattan bazılarının TSB besiyerinde üretildiğinde antimikrobiyal aktivite göstermemesine rağmen⁷ Benett+Glukoz besiyerinde üretildiğinde antimikrobiyal aktivite göstermesi yukarıda bahsedilen faktörlerden ötürü besiyerinin bu açıdan ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu sebepten dolayı organizmaların biyoaktif sekonder metabolit üretme potansiyellerini artırmaya yönelik çeşitli faktörlerle ilgili optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Yılmaz ve ark⁷. endemik bitki rizosfer bölgesinden izole edilen *Streptomyces* cinsi 55 toprak izolatından % 40'nın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Iliç ve ark⁸. çalışma grubunun yaptığı araştırmada değişik toprak örneklerinden izolasyonu yapılan 20 *Streptomyces* izolatının % 44,5'inin antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Ouhdouch ve ark⁹. rizosfer toprağı, dağ toprağı, çöl kumu, göl suyu, deniz suyu, sediment, atık su gibi çeşitli ekosistemlerden izolasyonu gerçekleştirilen 320 aktinomisetten 2/3'ünün antifungal aktivitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle *Streptomyces* cinsine dahil 10 izolatın ise geniş spektrumda antifungal ve antibakteriyel aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir.

Ettienne ve ark¹⁰. aminoglikozit antibiyotik üretme potansiyellerinin araştırıldığı 2,238 aktinomisetten % 63'lük oran ile üretimin en fazla *Streptomyces* cinsine dahil türlerce gerçekleştirildiği tespit edilmiştir.

Thakur ve ark¹¹. *Streptomyces* cinsi 110 toprak izolatının antimikrobiyal potansiyellerinin araştırıldığı çalışmada tüm izolatlardan % 33'ünün hem antifungal hem de antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Uğur ve ark¹². Muğla yöresi topraklarından izolasyonları yapılan 74 farklı *Streptomyces* izolatından % 45,9'unda antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir.

Lemriss ve ark¹³. yapılan çalışma sonucunda 110 aktinomisetten % 49'unun antifungal aktiviteye sahip olduğu, bunlardan *Streptomyces* cinsine dahil olanlarından 5'nin ise tüm patojen funguslara karşı inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda *Streptomyces* sp. CAH29'nun farklı besiyerlerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırıldığında en iyi besiyerinin Benett+Glukoz besiyeri olduğu görüldü. Ayrıca nişastalı besiyerlerinde aktimikrobiyal etkinin azalmasına bağlı olarak bu karbon kaynağının antimikrobiyal sekonder metabolit sentezinin baskılanmasına neden olduğu düşünüldü. Sekonder metabolitlerin sentezi için gerekli öncü bileşikler primer metabolizma sonucu olduğundan dolayı sekonder metabolit sentezi primer metabolizma ile yakından ilişkilidir. Bu nedenden dolayı karbon kaynakları, azot kaynakları ve mineraller gibi kültür ortamının temel bileşenleri, sekonder metabolit sentezinde önemli rol oynamaktadır. Kültür ortamında bulunan değişik karbon ve azot kaynakları herhangi bir biyoaktif sekonder metabolitin sentezini artırıp azaltabilmektedir. Primer metabolizma sonucu sentezlenen sekonder metabolit öncülü bileşikler belli bir metabolik yolda bulunan enzimlerin aktivitesine bağlı olarak sentezlenmektedir. Metabolik yol üzerinde bulunan bu enzimler genellikle geri besleme mekanizmasına dayalı aktivite gösterdiğinden dolayı karbon kaynakları, azot kaynakları ve mineraller bu enzimlerin aktivasyonuna veya inhibisyonuna neden olabilmektedir.

Değişik karbon kaynakları transkripsiyonel aktivasyon veya inhibisyon etkilerine neden olmaktadır. Buna en iyi örnek glukoz katabolit represyon mekanizması gösterilebilir. Katabolit represyon mekanizmasıyla gliserol, fruktoz, galaktoz, arabinoz gibi karbon kaynaklarının kullanımından sorumlu enzimlerin sentezini transkripsiyonel düzeyde glukoz tarafından baskılanmaktadır. Ayrıca glukoz belli metabolik yollar üzerinde bulunan ve sekonder metabolit sentezi ile ilişkisi olan bazı enzimlerin represyonuna neden olmaktadır. Bunların yanısıra glukoz aynı zamanda aktinomisin gibi birçok sekonder metabolitin sentezinde önemli rol oynayan bir karbon kaynağıdır. Bu sebeplerden dolayı literatüre bakıldığı zaman farklı biyoaktif sekonder metabolitin sentezinde farklı karbon ve azot kaynakları en iyi biyolojik aktivitenin ortaya çıkmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Denemiş olduğumuz besiyerleri içinde en iyi aktivitenin glukozlu besiyerinde elde edilmesi bu bilgiyi destekler niteliktedir.

Saadoun ve ark¹⁴. antimikrobiyal etki üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmada en iyi karbon kaynağının glukoz olduğunu belirtmişlerdir.

Zeid ve ark¹⁵. Magnamisin antibiyotiklerinin sentezinde en iyi karbon kaynağının glukoz olduğunu bildirmişler.

Cruze ve ark¹⁶. *Streptomyces griseocarneus* türünden elde ettikleri poliyen antifungal bileşiğin sentezi için glukozun en iyi karbon kaynağı olduğunu belirtmişler.

Fguira ve ark¹⁷. Gram (+) / Gram (-) bakteriler ve funguslara karşı maksimum antimikrobiyal aktivitenin tek karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında elde edildiğini bildirmişlerdir.

Thakur ve ark¹⁸. antifungal aktivite üzerine değişik karbon kaynaklarının etkisinin araştırıldığı bu çalışmada kullanılan tüm karbon kaynakları içinde en düşük aktiviteyi nişastalı besiyerinde görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Mehdi ve ark¹⁹. *Streptomyces* sp. TN97 ile yapılan bir çalışmada TSB besiyerinde farklı karbon kaynakları kullanıldığında en düşük antimikrobiyal aktivite nişastalı kültür ortamında tespit edilmiştir.

Ouhdouch ve ark²⁰. antimikrobiyal aktivitenin 3 farklı besiyerinde incelendiği çalışmada antimikrobiyal etki açısından en iyi besiyerinin Benett olduğunu bildirilmişlerdir.

Elleuch ve ark²¹. *Streptomyces* sp. TN262 modifiye Benett besiyerinde glukoz, fruktoz, nişasta, gliserol, sakkaroz gibi karbon kaynakları kullanıldığında maksimum biyolojik aktivitenin gliserollü besiyerinde görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda; Benett+Glukoz besiyerinde üretilen *Streptomyces* izolatlarının en fazla Gram (+) mikroorganizmalar üzerine antiikrobiyal aktivitelerinin olduğu tespit edildi. Tüm izolatlardan 4'ünün antifungal aktiviteye, 3'ünün ise Gram (-)'lere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlarımız literatürdeki bilgiler ile de uyum içerisindedir. Literatürde de genellikle *Streptomyces* türlerinden elde edilen ekstraktların en fazla antimikrobiyal etkisinin Gram (+) organizmalar üzerinde daha fazla olduğuna rastlanmaktadır. Gram (-)'lerde dış membran yapısının bulunması lipofilik karakterdeki bileşiklerin hücre içine girişini zorlaştırırken, Gram (+)'lerde böyle bir durum söz konusu değildir.

Özellikle bitki rizosfer bölgesinde ve endofitik olarak yaşayan *Streptomyces*'lar bitki kökleri ve bu bölgedeki diğer organizmalarla simbiyotik bir ilişki kurabilmelerinden dolayı bitkileri çeşitli patojenlere karşı korumaktadırlar. Bitkileri özellikle patojenik funguslara karşı korumalarından ötürü antifungal etkiye sahip çeşitli biyoaktif sekonder metabolitler üretebilmektedirler. Funguslar hücre duvarlarında bulunan kitinden dolayı çoğu dış etkene karşı kendilerini koruyabilmektedirler. Fungusların ökaryot hücre yapısına sahip olduğu düşünüldüğünde *Streptomyces*'ların üretmiş oldukları biyoaktif bileşiklerin kimyasal yapı olarak oldukça çeşitlilik arz ettiği görülmektedir. Ayrıca *Streptomyces*'lar birçok biyopolimeri degradesyona uğratabilecek litik enzimleri sentezlemeleri ile, topraktaki organik madde döngüsünde büyük rol oynamaktadırlar. Topraktaki diğer organizmalarla olan bu ilişkilerinden dolayı; *Streptomyces* sp. CAH29 izolatından saf olarak elde ettiğimiz bileşiğin hem antibakteriyel hem de antifungal aktiviteye sahip olması sitotoksik özelliğe sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Thakur ve ark²². biyolojik aktiviteleri taranan *Streptomyces* izolatlarının % 59'nun antibakteriyel, % 42'sinin antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Antibakteriyel etkili izolatların % 15,38 Gram (-) , % 78,46'sı ise Gram (+) organizmalara yönelik olduğu bildirilmiştir.

Monami ve ark²³. yapılan çalışmada *Streptomyces* izolatlarının % 18- % 33 oranında *Candida albicans*'a karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Iliç ve ark²⁴. Biyolojik aktiviteye sahip 5 farklı *Streptomyces* izolatı ile yaptıkları çalışma sonucunda inhibisyon etkilerinin en fazla Gram (+) organizmalar

üzerine olduğu, inhibisyon etkisinin en az ise Gram (-) organizmalara yönelik olduğu tespit edilmiştir.

Uğur ve ark²⁵. antibakteriyel aktivitesi araştırılan *Streptomyces* izolatlarının % 5,9 ile en az Gram (-) organizmalar üzerine etkili olduğu görülmüştür.

Augustine ve ark²⁶. Toprak ve su örneklerinden izolasyonunu yaptıkları 312 aktinomisetten % 22'sinin antifungal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Lemriss ve ark.²⁷ yaptıkları çalışmalar sonucunda 110 aktinomiset izolatının % 49'nun test organizması olarak kullanılan en az bir fungus üzerine antifungal etki gösterdiği belirtmişlerdir.

Ouhdouch ve ark²⁸. Fas'ta yapılan bir çalışmada topraktan izole edilen 320 *Streptomyces* izolatından % 7,2'sinin *Candida albicans* üzerine antifungal aktivitesinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Yılmaz ve ark²⁹. 55 farklı toprak izolatından % 14'nün antifungal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Streptomyces sp. CAH29 lokal izolatının sekonder metabolitlerinin ekstraksiyonunda kullanılan polaritesi birbirinden farklı diklorometan, etilasetat ve hekzan çözücülerini kullanıldı. En fazla aktiviteye etilasetat ekstraktlarında rastlanması literatür ile uyum içerisindedir. Su fazı ve filtrat örneklerinde herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye rastlanılmaması bu bileşiklerin suda çözünmediği veya aktif formda bulunmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda biyolojik aktiviteye sahip olduğunu belirlediğimiz ve saflaştırmayı hedeflediğimiz bileşiğin değişik çözücü sistemlerinin kullanıldığı TLC denemeleri sonucunda diklorometan-metanol, kloroform-metanol mobil

fazlarında oldukça iyi yürüdüğü, heksan-etilasetat mobil fazında ise yürümediği tespit edildi. Buna bağlı olarak bileşiğin orta polarlıkta bir yapıda olabileceği düşünülmektedir. Saf olarak elde edildikten sonra bileşiğin metanol, etilasetat, kloroform gibi çözücülerde rahat çözünmesi, suda ise çözünmemesi bu bulguyu destekler niteliktedir.

Franco ve ark³⁰. birçok antimikrobiyal bileşiğin ekstraksiyonunda etilasetat kullanıldığı rapor edilmiştir.

UV absorbans değerleri bileşikler hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bileşiklerin UV’ce aktif olmaları aromatik gruplar içerebileceğini düşündürmektedir. Özellikle non poliyen ve poliyen antifungalların birbirinden ayrılmasında 3 temel kriter göz önüne alınmaktadır. Bunlardan ilki UV spektrum değerleridir. 215 -270 nm maksimum absorbans değeri poliyenlere özgü bir özelliktir. İkincisi non poliyen antifungal ajanlara özgü olan ergestrol inhibisyonudur. Sonuncusu ise yine non poliyen antifungal ajanlara özgün bir özellik olan antibakteriyel etkinin gözlenmesidir. Saf olarak elde etmiş olduğumuz bileşiğin UV’de 270 nm maksimum absorbans vermesi ve ayrıca antifungal etkisinin yanında antibakteriyel etkisinin olması non poliyen karakterinde olabileceğini düşündürmektedir.

Iliç ve ark³¹. yapılan çalışma sonucunda antifungal aktivitesi belirlenen *Streptomyces* izolatlarının UV maksimum değerleri 216-262 nm arasında değişmektedir.

Saadoun ve ark³². antifungal etkili bileşiğin etanol ekstraktının 205 nm de maksimum absorbans verdiğini ve ayrıca flukonazol ve mikonazol antifungal ilaçlarının 205-275 nm’de maksimum absorbans verdiğini bildirmişlerdir.

Uğur ve ark³³. biyolojik aktivitesi belirlenen 9 farklı *Streptomyces* izolatının butanol ekstraktlarının maksimum UV absorbans değerlerinin 212-260 nm arasında değiştiği rapor edilmiştir.

TLC renklendirici reaktiflerin kullanılmasıyla bileşiklerdeki çeşitli fonksiyonel grupların belirlenmesi kimyasal tarama yönteminin temelini oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda değişik özellikteki renklendirici reaktifler kullanıldı. Ninhidrin, dragendorff, ehrlich gibi reaktiflerle herhangi bir renk değişiminin gözlenmemesi bileşikte peptit bağının, alkaloid yapısının, primer amin ve indol gruplarının bulunmadığını işaret etmektedir. Öte yandan sodyum hidroksit ile kırmızı-pembe renk değişiminin gözlenmesine bağlı olarak kinon yapısında, anisaldehit/H₂SO₄ ile koyu kahverengi renk vermesinden ötürü ise makrolid yapısında olabileceği düşünülmektedir.

Li ve ark³⁴. *Streptomyces* sp. M045 izolatından elde chinikomisin biyoaktif sekonder metabolitindeki kinon grubunun sodyum hidroksit ile kırmızı renk verdiğini bildirmişlerdir.

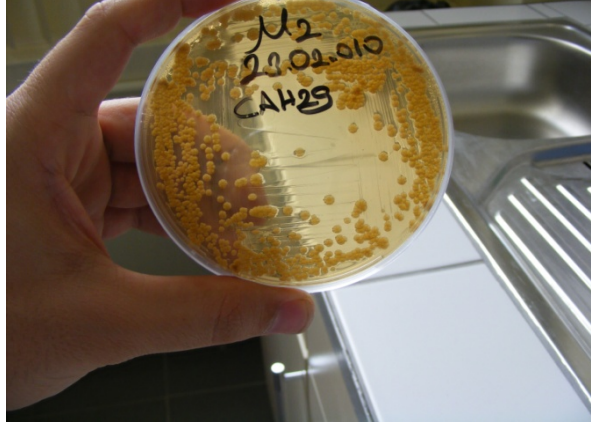
Fiedler ve ark³⁵. izolasyonlarının gerçekleştirdikleri makrolid yapısındaki sineromisin sekonder metabolitinin anisaldehit/H₂SO₄ ile kahverengi renk oluşturduğu, musakin'in ise orcinol ile turuncu renk verdiğini belirtmişlerdir.

Grabley ve ark³⁶. *Penicillium* cinsine dahil organizmalardan izole ettikleri makrolid yapısında olan bileşiklerden bazılarının anisaldehit/H₂SO₄ ile kahverengi ve koyu kahverengi renk değişimini gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir.

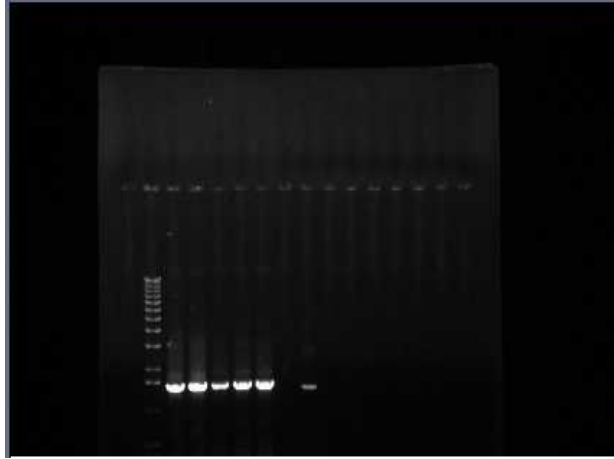
Hu ve ark³⁷. makrolid yapıda olan ilaçların hızlı bir şekilde tanımlaması için sülfürik asit kullanılmıştır. Bunun sonucunda eritromisin, azitromisin,

asetilkitasamisin gibi makrolid yapısındaki ilaçların sülfürik asit ile koyu kahverengi renk verdiği gözlenmiştir.

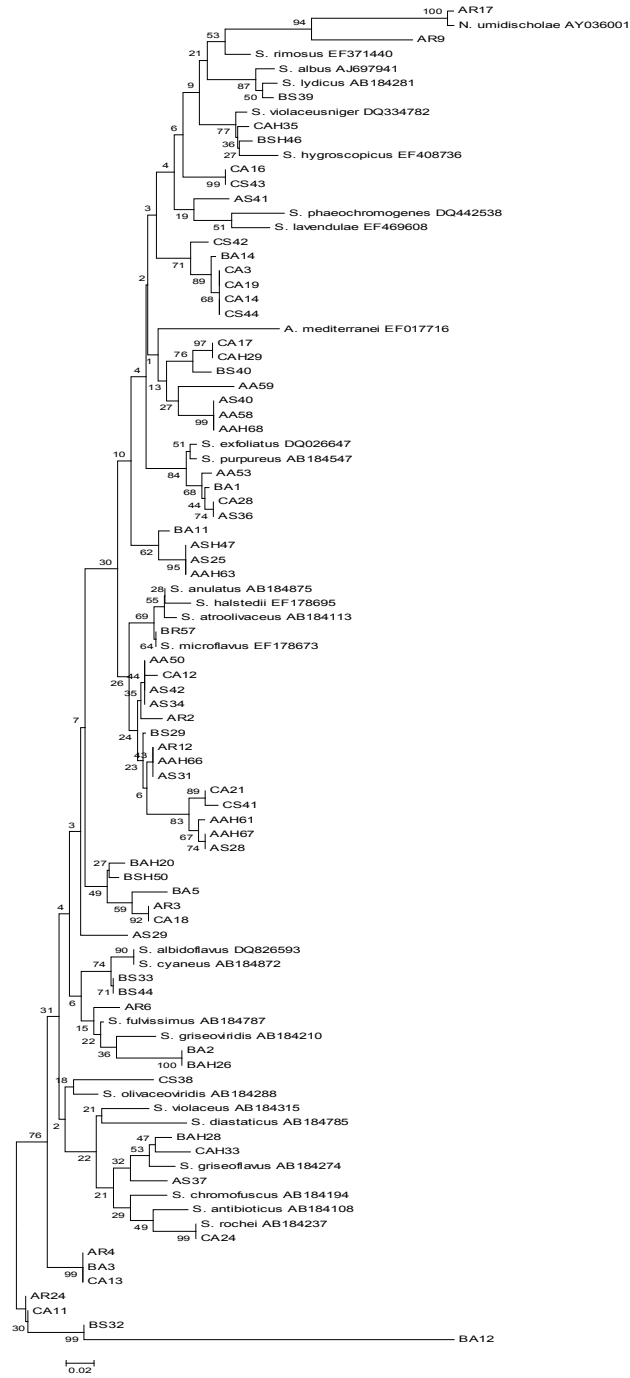
4.3. TABLO ve RESİMLER



Resim 4.1. *Streptomyces* sp. CAH29'un M2 Katı Besiyerindeki Görünümü



Resim 4.2. Amlifiye Edilmiş 16S rRNA Geni



Şekil 4.1. Daha önceden teşhisleri yapılarak yayınlanan 55 izolat¹ ve bu çalışmada teşhisleri gerçekleştirilen 12 *Streptomyces* izolatının, 25 *Streptomyces* grubunu temsil eden türlerin 16S rRNA genlerinin 120 baz çifti uzunluğunda (158-277) bölgesi baz alınarak Neighbor-joining yöntemiyle çizilen filogenetik ağaç².

Tablo 4.1. Benett + Glukoz Besiyerinde Üretilen Lokal *Streptomyces* İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.

Lokal İzolatlar	İnhibisyon zon yarı çapları (mm)															Ekstrakte edilen madde miktarı (mg)
	<i>S. aureus</i>			<i>S. pyogenes</i>			<i>C. albicans</i>			<i>E.coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			
	O	F	S	O	F	S	O	F	S	O	F	S	O	F	S	
<i>Streptomyces</i> sp. AR4	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,8
<i>Streptomyces</i> sp. AR6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7
<i>Streptomyces</i> sp. AR9	9	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9
<i>Streptomyces</i> sp. AS28	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2
<i>Streptomyces</i> sp. AS36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,1
<i>Streptomyces</i> sp. BA12	6	-	-	8	-	-	5	-	-	4	-	-	-	-	-	7,2
<i>Streptomyces</i> sp. BA14	9	-	-	6	-	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	6,5
<i>Streptomyces</i> sp. BS29	9	-	-	10	-	-	7	-	-	6	-	-	-	-	-	7,6
<i>Streptomyces</i> sp. BS32	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,3
<i>Streptomyces</i> sp. CA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,6
<i>Streptomyces</i> sp. CS41	16	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,4
<i>Streptomyces</i> sp. CS42	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3
Elde edilen ekstraktlar 150 µl etilasetatta çözüldü O: Organik faz, F: Filtrat, S: Su fazı																

Tablo 4.2. *Streptomyces* sp. CAH29 İzolatının Farklı Besiyerlerindeki Antimikrobial Aktivitesi.

İnhibisyon zon yarı çapları (mm)											
Organizma	Organik Faz				Su Fazı			Filtrat	Ekstrakte edilen madde miktar (mg)		
	Besiyeri	E	H	D	E	H	D		E	H	D
<i>S. aureus</i>	M2	10	-	-	-	4	-	-	20,4	6,3	10,6
	B+Glu	11	-	-	-	4	-	-	7,5	2,2	6,2
	B+Gli	9	-	-	-	-	-	-	32,5	2,5	5,3
	B+Ni	6	-	-	-	-	-	-	12,6	0,4	5,9
	AT	5	-	5	-	-	-	-	13,5	2,5	10,2
<i>S. pyogenes</i>	M2	8	6	-	-	5	-	-	20,4	6,3	10,6
	B+Glu	13	5	10	-	-	-	-	7,5	2,2	6,2
	B+Gli	13	14	8	-	-	-	-	32,5	2,5	5,3
	B+Ni	8	11	6	-	-	-	-	12,6	0,4	5,9
	AT	6	5	-	-	-	-	-	13,5	2,5	10,2
<i>C. albicans</i>	M2	15	4	7	-	-	-	-	20,4	6,3	10,6
	B+Glu	16	7	7	-	-	-	-	7,5	2,2	6,2
	B+Gli	15	4	4	-	-	-	-	32,5	2,5	5,3
	B+Ni	-	5	5	-	-	-	-	12,6	0,4	5,9
	AT	4	-	-	-	-	-	-	13,5	2,5	10,2
<i>E. coli</i>	M2	3	4	-	-	-	-	-	20,4	6,3	10,6
	B+Glu	3	5	-	-	-	-	-	7,5	2,2	6,2
	B+Gli	4	5	-	-	-	-	-	32,5	2,5	5,3
	B+Ni	3	4	-	-	-	-	-	12,6	0,4	5,9
	AT	-	4	-	-	-	-	-	13,5	2,5	10,2
<i>P. aeruginosa</i>	M2	4	-	4	-	-	-	-	20,4	6,3	10,6
	B+Glu	5	-	4	-	-	-	-	7,5	2,2	6,2
	B+Gli	5	-	3	-	-	-	-	32,5	2,5	5,3
	B+Ni	4	-	3	-	-	-	-	12,6	0,4	5,9
	AT	4	-	-	-	-	-	-	13,5	2,5	10,2
Elde edilen ekstraktlar 400µl hacminde kendi çözücülerıyla çözüldü E: Etilasetat, H: Hekzan, D: Diklorometan											

Tablo 4.3. *Streptomyces* sp. CAH29 İzolatının Benett + Glukoz Kültür Ortamından Elde Edilen pH'lı ve pH'sız Ekstraktların Antimikrobiyal Aktiviteleri.

İnhibisyon zon yarı çapları (mm)								
Organizma	Organik Faz		Su Fazı		Filtrat	Liyofilizat	Ekstrakte edilen madde miktarı (mg)	
	pH'lı	pH'sız	pH'lı	pH'sız			pH'lı	pH'sız
<i>S. aureus</i>	8	11	-	-	-	-	375,1	28,5
<i>S. pyogenes</i>	7	14	-	-	-	-	375,1	28,5
<i>C. albicans</i>	15	15	-	-	-	-	375,1	28,5
<i>E. coli</i>	6	2	-	-	-	-	375,1	28,5
<i>P. aeruginosa</i>	5	3	-	-	-	-	375,1	28,5
pH ayarlanması yapılan ekstrakt 700 µl, pH ayarlaması yapılmayan ekstrakt 350 µl etilasetatta çözüldü								

Tablo 4.4. Çözücülerin Test Organizmaları Üzerine İnhibisyon Etkileri.

İnhibisyon zon yarı çapları (mm)			
Organizma	Etilasetat	Hekzan	Diklorometan
<i>E. coli</i>	2	-	4
<i>S. aureus</i>	3	-	-
<i>S. pyogenes</i>	3	-	3
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>C. albicans</i>	4	-	3
Her çözücüden 20 µl yüklendi			

Tablo 4.5 Standart antibiyotiklerin Test Organizmaları Üzerine Etkisi.

İnhibisyon zon yarı çapları (mm)						
Test Organizmaları	İmipenem	Netilmisin	Amoksisilin	Ofloksasin	Eritromisin	Amfoterisin B
<i>S. aureus</i>	18	11	15	14	15	-
<i>S. pyogenes</i>	20	12	13	13	13	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	10
<i>E. coli</i>	15	13	11	14	R	-
<i>P. aeruginosa</i>	10	9	R	10	R	-

R: Dirençli

Tablo 4.6. Saflaştırılan Biyoaktif Bileşiğin Farklı TLC

Reaktifleri İle Reaksiyonları

TLC Reaktifleri	Renk
Anisaldehit/H ₂ SO ₄	Kahverengi
Vanillin/ H ₂ SO ₄	Koyukahverengi-yeşilimsi
Orcinol	Turuncu
Ehrlich	Renk değişimi gözlenmedi
NaOH	Pembe
İyot	Sarı, kahverengi
Potasyumpermanganat	Renk değişimi gözlenmedi
H ₂ SO ₄	Kahverengi
Ninhidrin	Renk değişimi gözlenmedi
Dragendorff	Renk değişimi gözlenmedi
Doğal renk	Sarı

Tablo 4.7. Farklı TLC Reaktiflerinin Belli Fonksiyonel Gruplar İle Reaksiyonları.

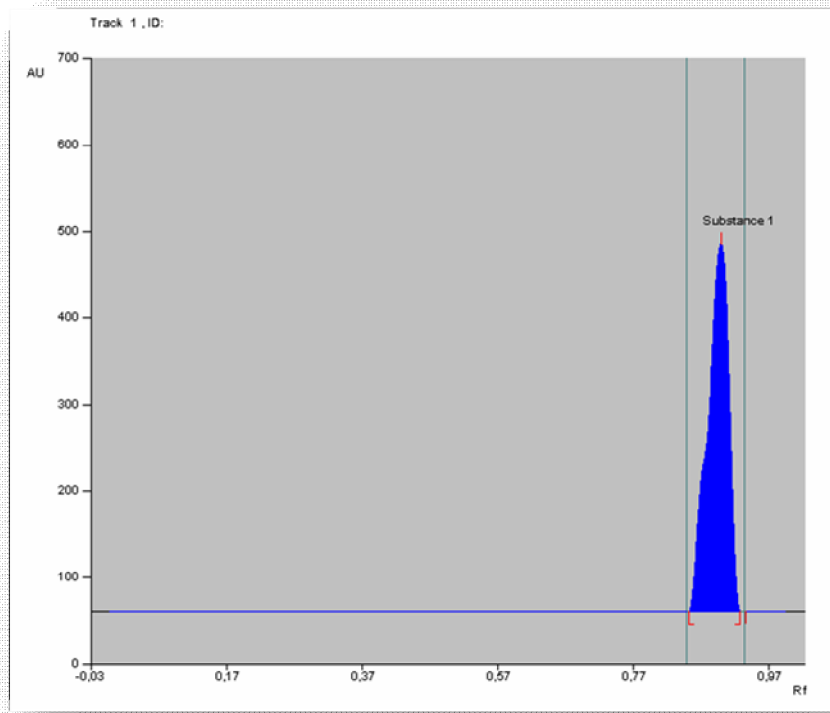
TLC Reaktifi	Olası Fonksiyonel Gruplar	Renk
Anisaldehit/H ₂ SO ₄	Şeker, streoid, terpen, terpenoid, fenilhidrazin, lakton	Mor, mavi, kırmızı, Pembe-mavi, yeşil-sarı, kahverengi
Vanillin/H ₂ SO ₄	Steroid, fenol ,alkol	Kırmızı, kahverengi, sarı
Orcinol	Glikolipit, glikozit	Mor
Ehrlich	Amin, indol, sülfoamid	Kırmızı, mor
NaOH	Kinon	Kırmızı, pembe
İyot	Çoklu çift bağ	Koyu sarı, kahverengi
Potasyumpermanganat	Doymamış yağ asidi, alkol	Sarı
H ₂ SO ₄	Makrolid	Kahverengi
Ninhidrin	Peptit bağı	Kırmızı
Dragendorff	Fenol, alkaloid, nitrojenli bileşik, sürfaktan	Turuncu

Tablo 4.8. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Spot Bölgeleri ve Maksimum Absorbans Değerleri.

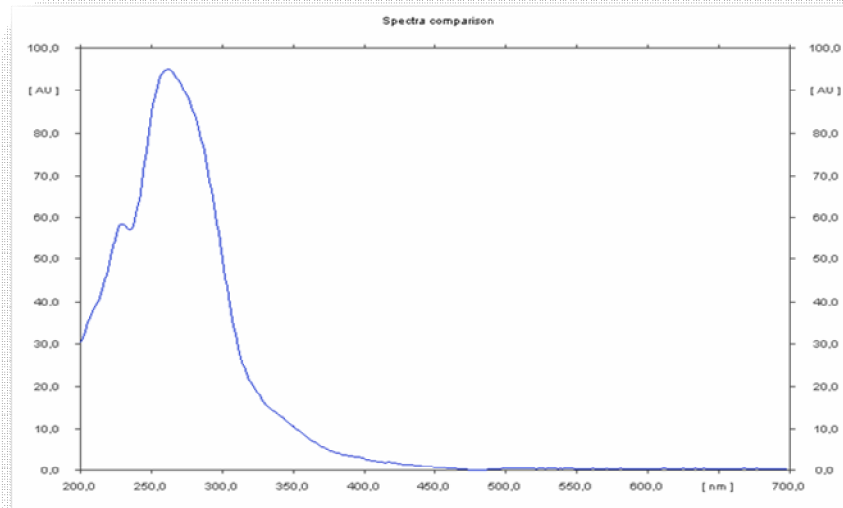
Show all of selected substance						Show all
	Track	Rf	Assigned Substance	Max Signal	Display	
1	4	0,08	Substance 13	596 AU @ 223 nm	<input type="checkbox"/>	
2	4	0,11	Substance 16	414 AU @ 224 nm	<input type="checkbox"/>	
3	4	0,21	Substance 23	394 AU @ 315 nm	<input type="checkbox"/>	
4	4	0,24	Substance 10	529 AU @ 302 nm	<input type="checkbox"/>	
5	4	0,31	Substance 2	927 AU @ 328 nm	<input type="checkbox"/>	
6	4	0,38	Substance 8	463 AU @ 239 nm	<input type="checkbox"/>	
7	4	0,54	Substance 4 ←	468 AU @ 376 nm	<input type="checkbox"/>	
8	4	0,60	Substance 12 ←	463 AU @ 200 nm	<input type="checkbox"/>	
9	4	0,64	Substance 14 ←	519 AU @ 200 nm	<input type="checkbox"/>	
10	4	0,69	Substance 5 ←	619 AU @ 270 nm	<input type="checkbox"/>	
11	4	0,72	Substance 9	164 AU @ 252 nm	<input type="checkbox"/>	
12	4	0,84	Substance 15	-14 AU @ 698 nm	<input type="checkbox"/>	



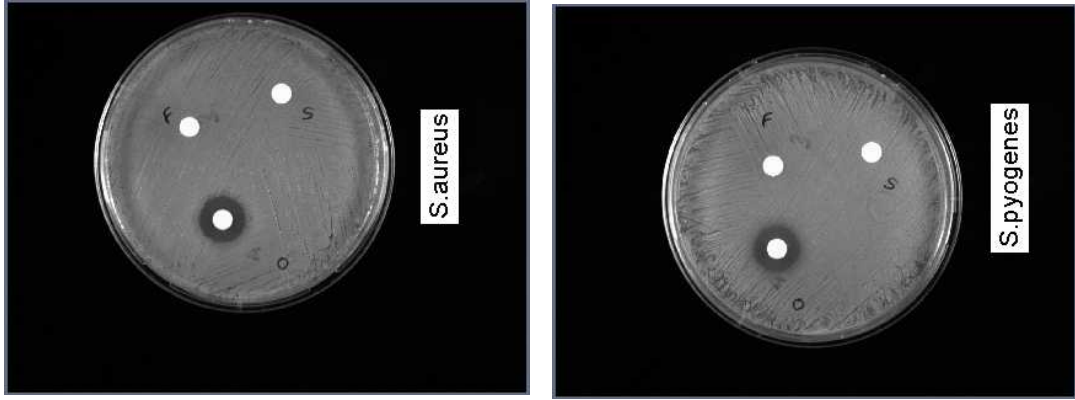
Resim 4.3. HPTLC Tabakasından Geri Kazanılan Antimikrobiyal Etkili Spot Bölgeleri.



Şekil 4.2. HPTLC Tabakalarından Ayrılan Antimikrobiyal Etkili Bileşiklerin Kromatogramı.

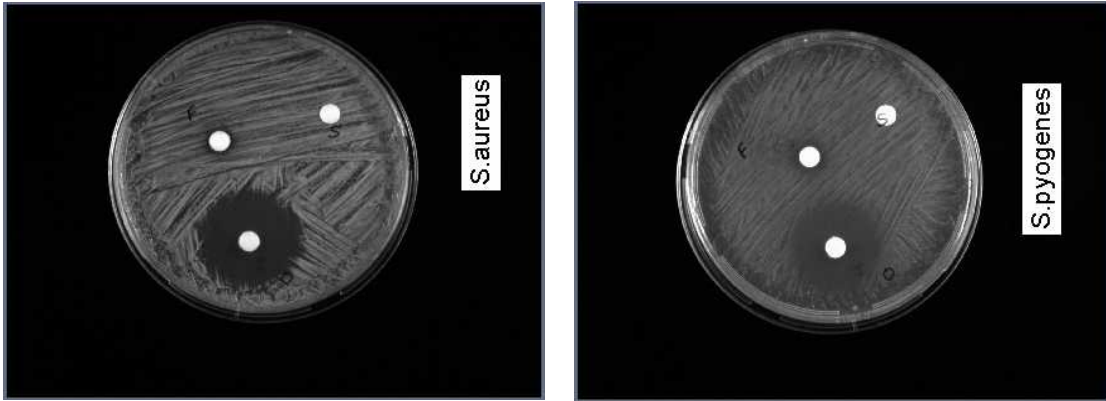


Şekil 4.3. HPTLC Tabakalarından Ayrılan Antimikrobiyal Etkili Bileşiğin UV Absorbans Grafiği.



Resim 4.4. AR9 İzolatının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

F: Filtrat, S: Su fazı, O: Ekstrakt

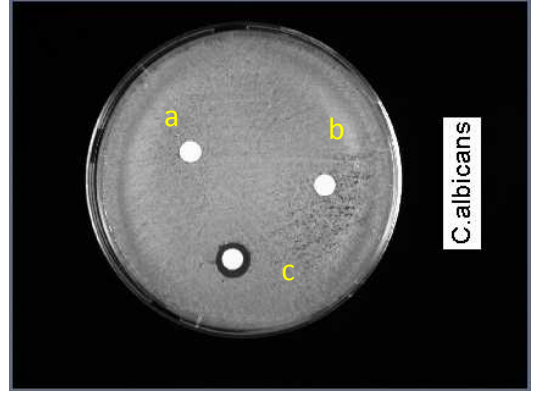


Resim 4.5. CS41 İzolatının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi

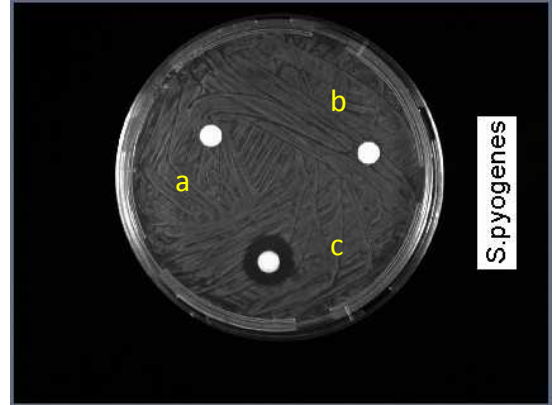
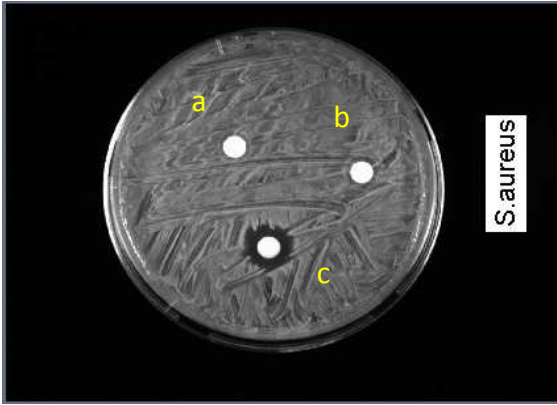
F: Filtrat, S: Su fazı, O: Ekstrakt



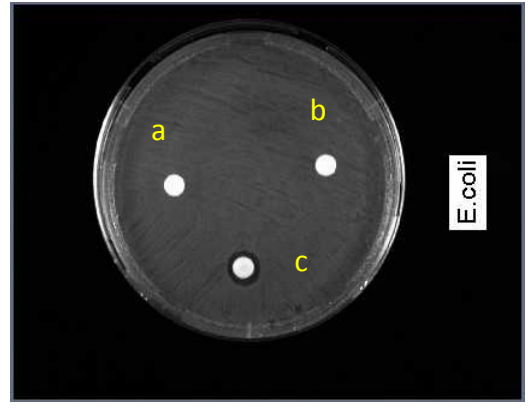
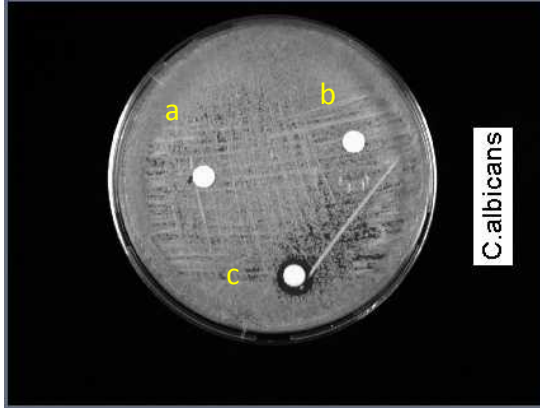
Resim 4.6. BS32 İzolatının *S. aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi
F: Filtrat, S: Su fazı, O: Ekstrakt



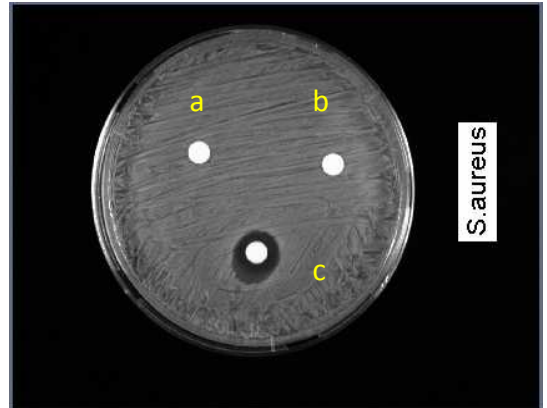
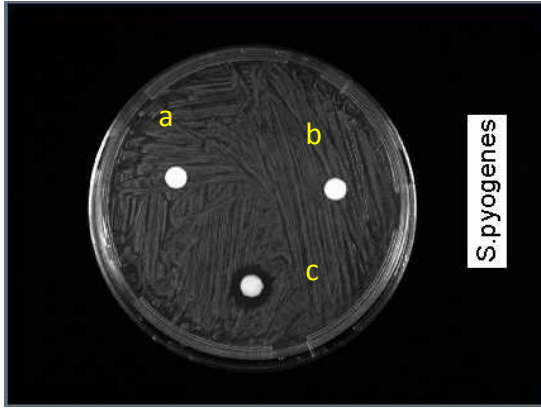
Resim 4.7. BA12 İzolatının *C. albicans* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



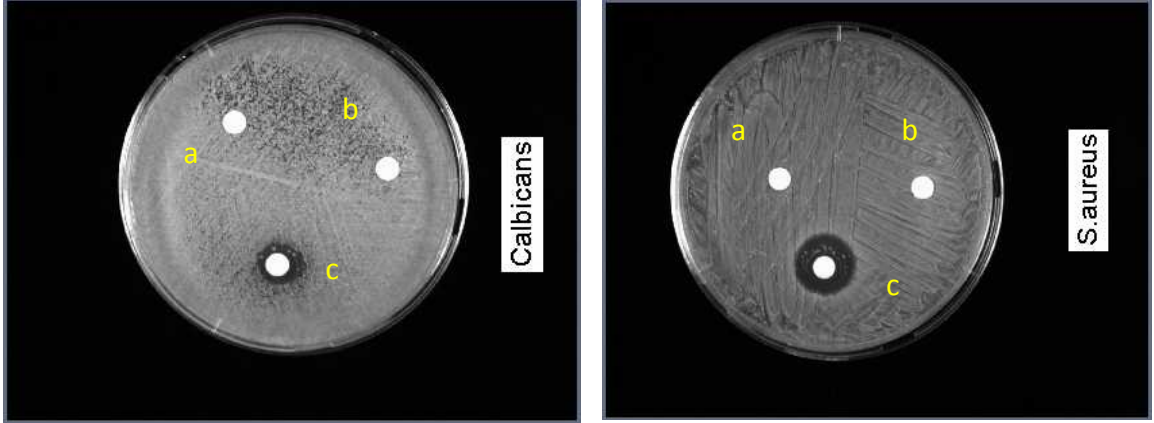
Resim 4.8. BA12 İzolatının *S. aureus* ve *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



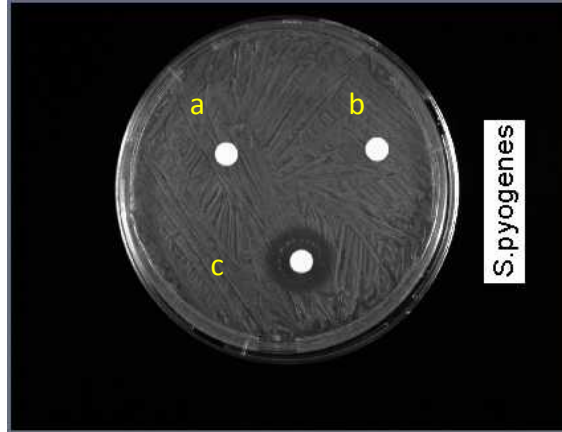
Resim 4.9. BA14 İzolatının *C. albicans* ve *E. coli* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



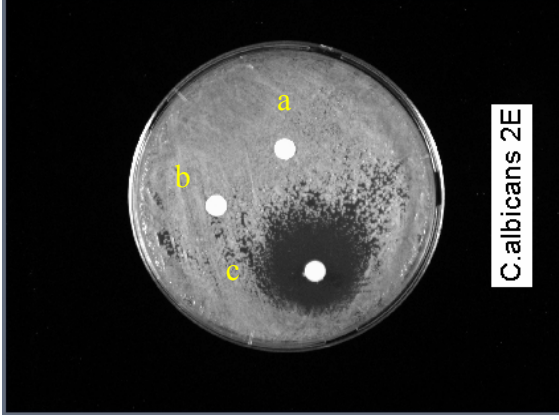
Resim 4.10. BA14 İzolatının *S. pyogenes* ve *S. aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



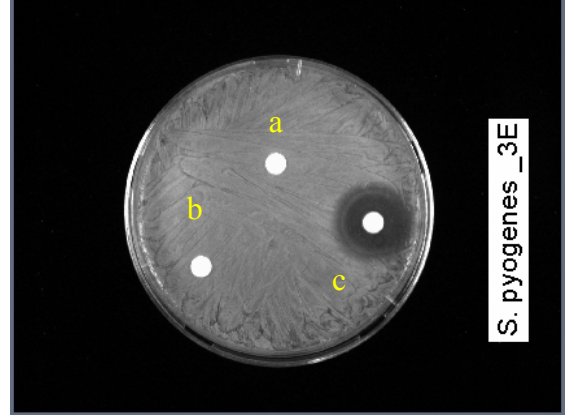
Resim 4.11. BS29 İzolatının *C. albicans* ve *S. aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: Filtrat, b: Su Fazı, c: Ekstrakt



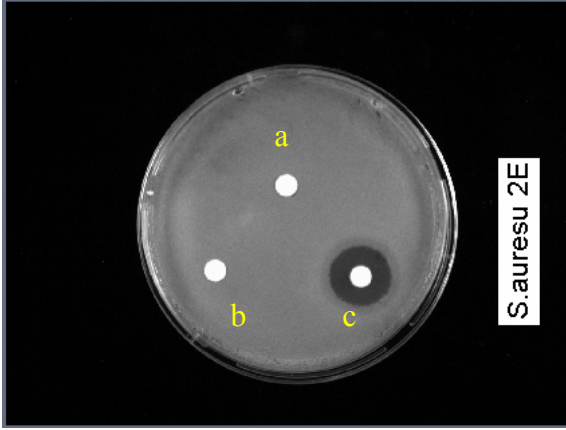
Resim 4.12. BS29 İzolatının *S. pyogenes* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



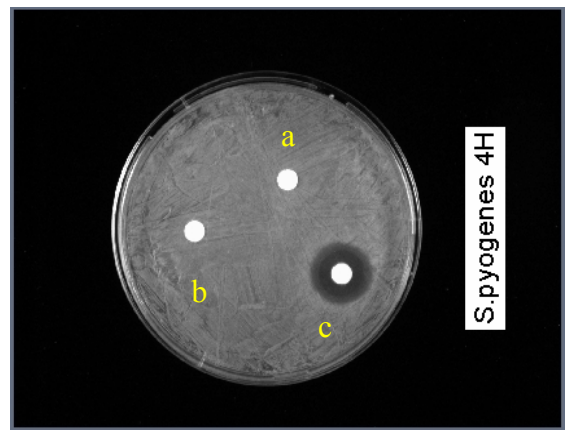
Resim 4.13. CAH29 İzolatının Benett + Glukoz Besiyeri EtOAc Ekstraktının *C. albicans* Üzerine Antifungal Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



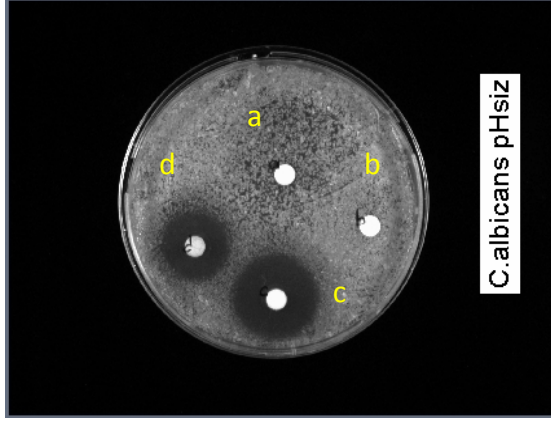
Resim 4.14. CAH29 İzolatının Benett + Gliserol Besiyeri EtOAc Ekstraktının *S. pyogenes* Üzerine Antibakteriyel Etkisi
a: Filtrat, b: Su fazı, c: Ekstrakt



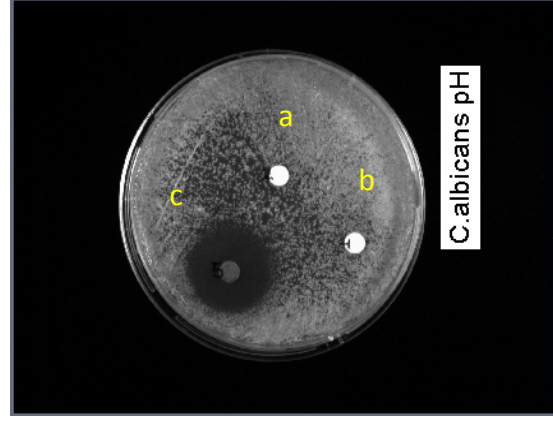
Resim 4.15. CAH29 İzolatının Benett + Glukoz Besiyeri EtOAc Ekstraktının *S. aureus* Üzerine Antibakteriyel Etkisi



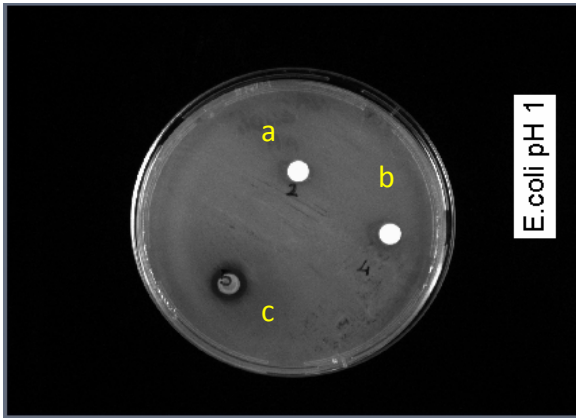
Resim 4.16. CAH29 İzolatının Benett + Nişasta Besiyeri Hekzan Ekstraktının *S. pyogenes* Üzerine Antibakteriyel Etkisi



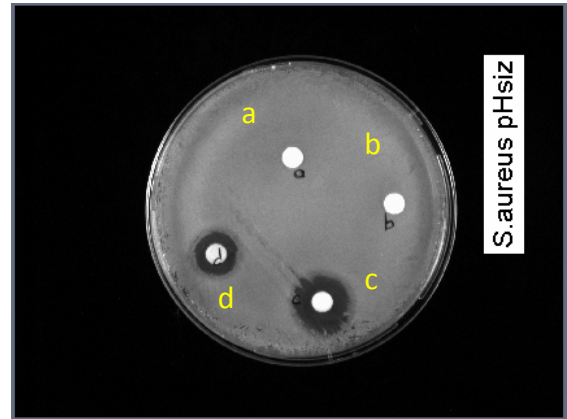
Resim 4.17. CAH29 İzolatının *C. albicans* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antifungal Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt, d: Seyreltme



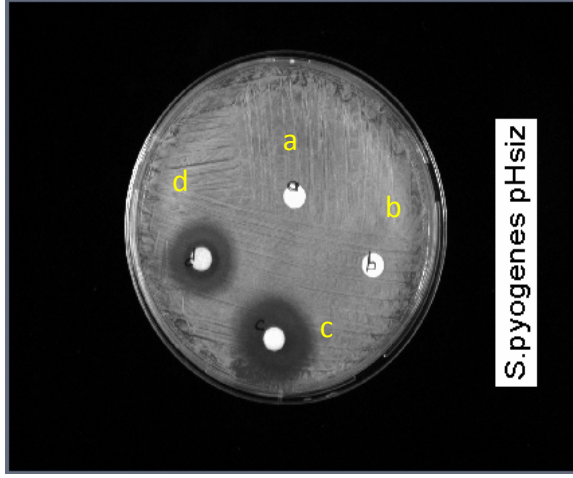
Resim 4.18. CAH29 İzolatının *C. albicans* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antifungal Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt,



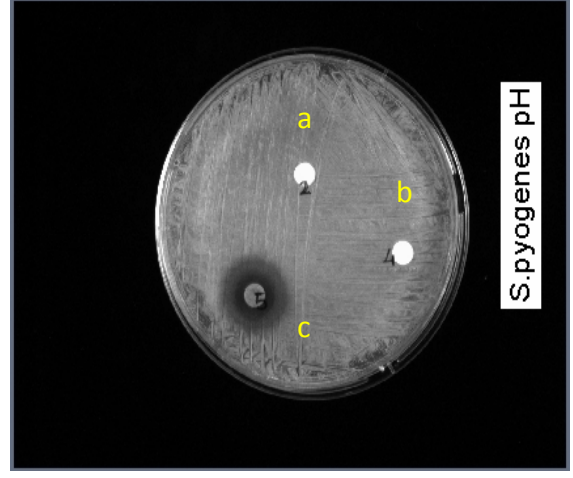
Resim 4.19. CAH29 İzolatının *E. coli* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt, d: Seyreltme



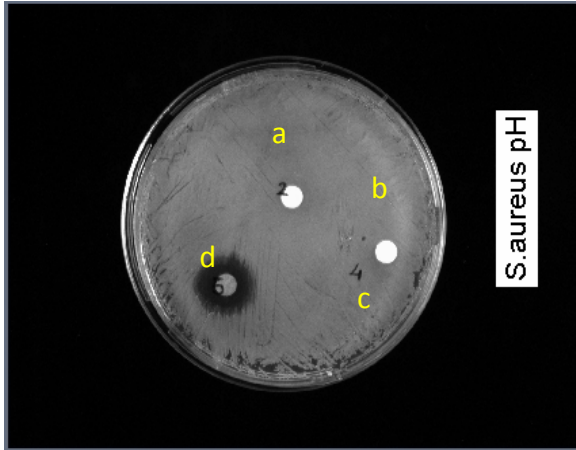
Resim 4.20. CAH29 İzolatının *S. aureus* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt, d: Seyreltme



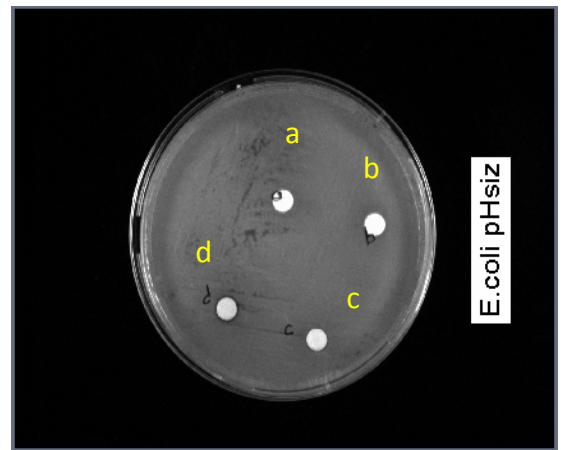
Resim 4.21. CAH29 İzolatının *S. pyogenes* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt, d: Seyreltme



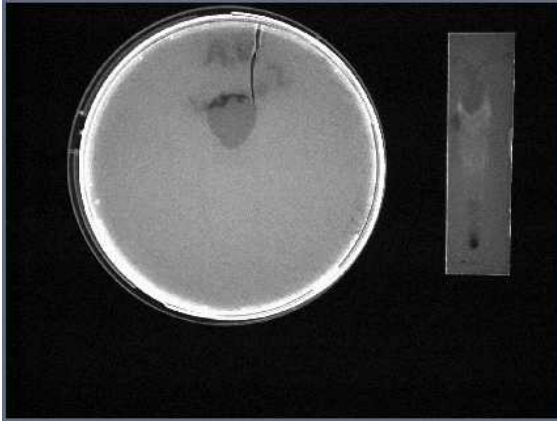
Resim 4.22. CAH29 İzolatının *S. pyogenes* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt,



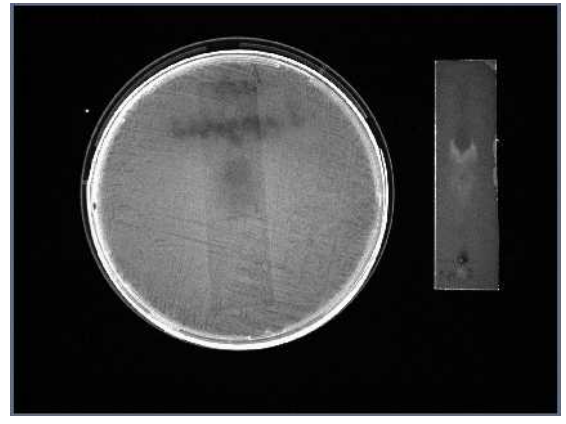
Resim 4.23. CAH29 İzolatının *S. aureus* Üzerine pH'lı Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt, d: Seyreltme



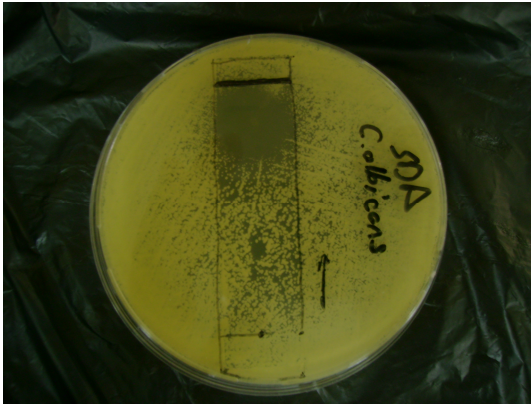
Resim 4.24. CAH29 İzolatının *E. coli* Üzerine pH'sız Ekstraktın Antibakteriyel Aktivitesi
a: Liyofilizat, b: Su fazı, c: Ekstrakt, d: Seyreltme



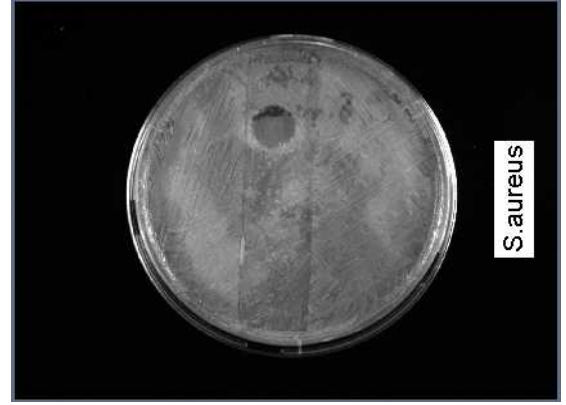
Resim 4.25 *S. aureus*'a Etkili Biyoaktif Spotun Biyootografisi.



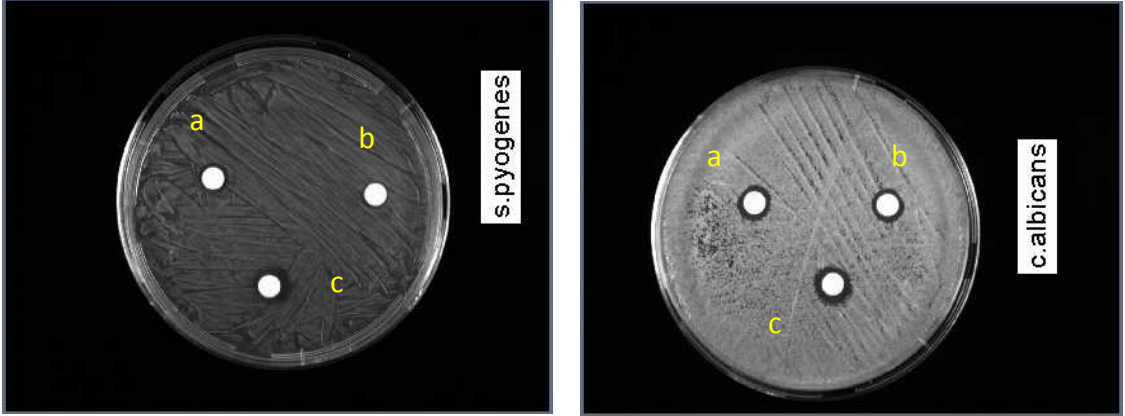
Resim 4.26 *S. pyogenes*'e Etkili Biyoaktif Spotun Biyootografisi.



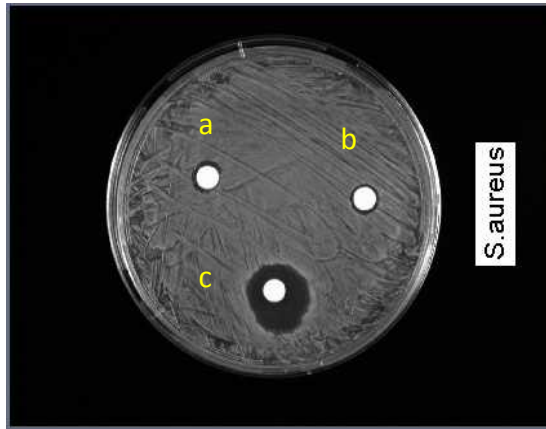
Resim 4.27. *C. albicans* Üzerine Etkili Spotun Biyootografi Yöntemi İle Tespiti.



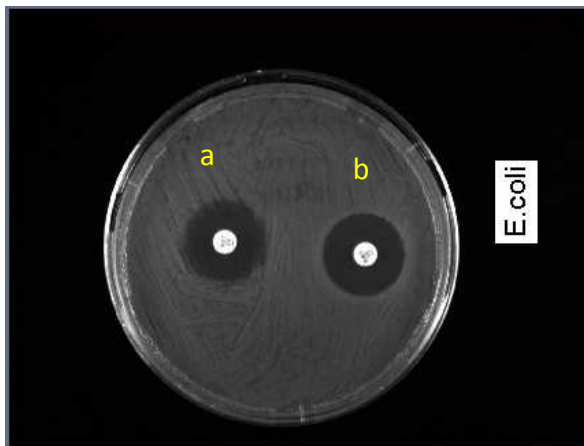
Resim 4.28. F3 Fraksiyonun *S. aureus* Üzerine Biyootografi İle İnhibisyon Etkisi.



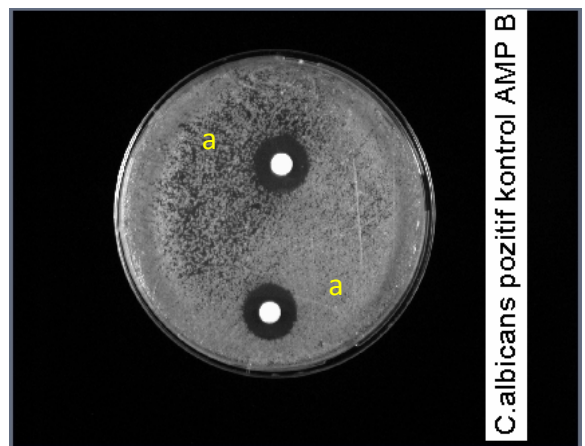
Resim 4.29. Saf Bileşğin *S. pyogenes* ve *C. albicans* Üzerine İnhibisyon Etkisi
a: MeOH, b: EtOAc, c: Saf madde



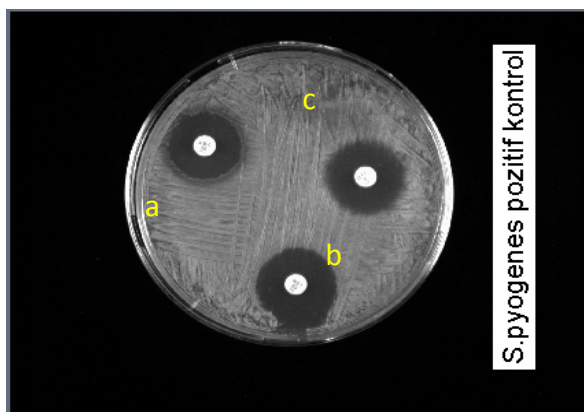
Resim 4.30. Saf Bileşğin *S. aureus* Üzerine İnhibisyon Etkisi



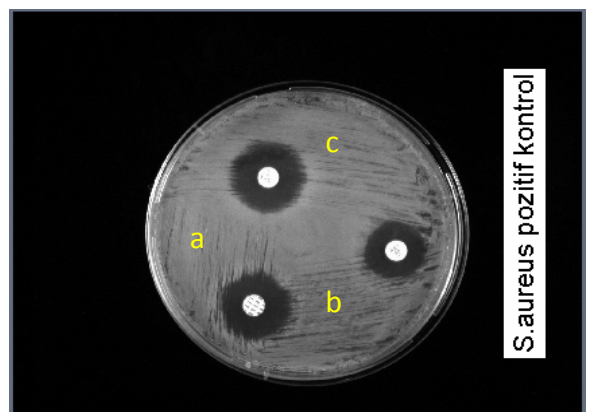
Resim 4.31. Pozitif Kontrol a: AMC, b: NET



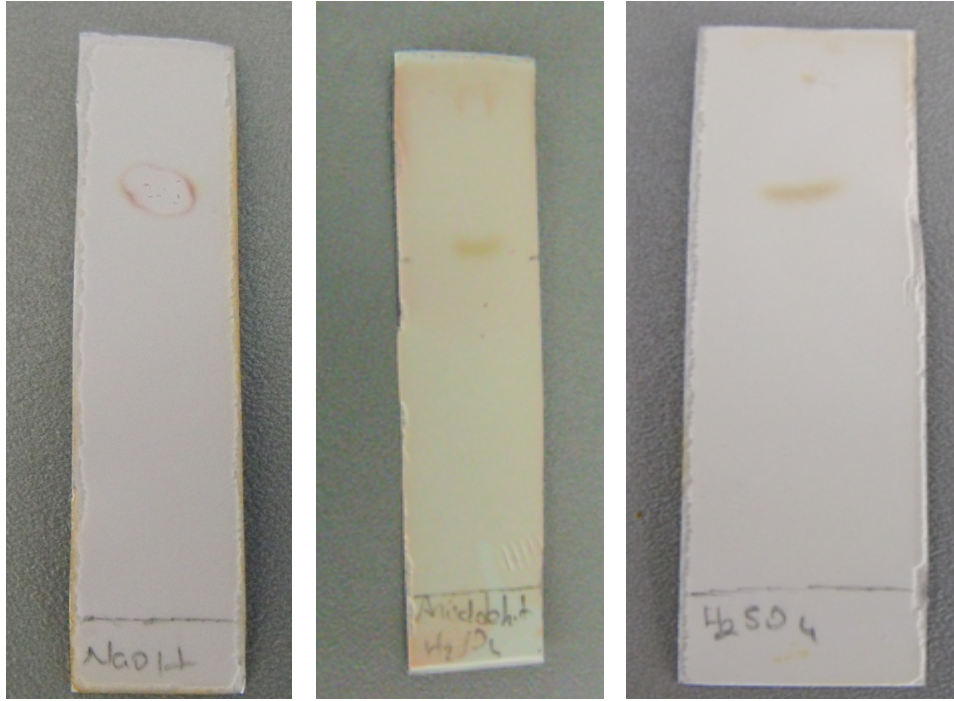
Resim 4.32. Pozitif Kontrol a: AFB



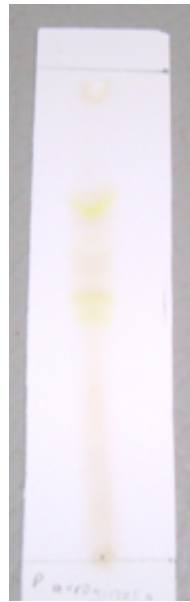
Resim 4.33. Pozitif Kontrol a: AMC, b: NET, c: OFX



Resim 4.34. Pozitif Kontrol a: AMC, b: NET, c: E



Resim 4.35. Hedef Bileşğin TLC Reaktifleri İle Reaksiyonları



Resim 4.36. DCM-MeOH (9:1) Çözücü Sistemi İle Birbirinden Ayrılan Spot Bölgeleri

KAYNAKLAR

1. Akhand, M.M.; Bari, M.A.; Islam, M.A.; Khondkar, P. *Sub Acute Toxicity Study of an Antimicrobial Metabolite from Streptomyces lalonnensis sp. On Long Evan's Rats*, *Middle East Journal of Scientific Research*, **2010**, 5, 34-38.
2. Yang, P.W.; Li, M.G.; Zhao, J.Y.; Zhu, M.Z.; Shang, H.; Li, J.R.; Cui, X.L. *Oligomycin A and C Major Secondary Metabolites Isolated from the Newly Isolated Strain Streptomyces diastaticus*, *Folia Microbiology*, **2010**, 55, 10-16.
3. Kurosowa, K.; Bui, V.P.; Van Essendelft, J.L.; Willis, L.B.; Lessard, P.A.; Ghiviriga, I.; Sambandan, T.G.; Rha, C.K.; Sinskey, A.J. *Characterization of Streptomyces MITKK-103, a Newly Isolated Actinomycin X₂ Producer*, *Applied Microbial and Cell Physiology*, **2006**, 72, 145-154.
4. Sarah, J.; Murphy, C.D. *Identification and Characterization of a Streptomyces sp. Isolate Exhibiting Activity Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, *Microbiological Research*, **2008**, 165, 82-86.
5. El Naggar, M.Y.; El Assar, S.A.; Abdul Gawad, S.M. *Meroparamycin Production by Newly Isolated Streptomyces sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structure Elucidation*, *The Journal of Microbiology*, **2006**, 44, 432-438.
6. Elleuch, L.; Shaaban, M.; Smaoui, S.; Mellouli, L.; Rebai, I.K.; Fguria, L.F.B.; Shaaban, K.A.; Laatsch, H. *Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial Streptomyces sp. TN262*, *Applied Biochemistry Biotechnology*, **2010**, 162, 579-593.
7. Yılmaz, E.İ, Kızıl, M.; Yavuz, M. *Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomycetes Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their*

Antimicrobial Activity, World Journal of Microbiology Biotechnology, **2008**, 24, 1461-1470.

8. Ilić, S.B.; Konstantinovic, S.S.; Todorovic, Z.B.; Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Jokovic, N.; Radovanovic, B.C. *Characterization and Antimicrobial Activity of Bioactive Metabolites in Streptomyces Isolates, Mikrobiologiya*, **2007**, 76, 421-428.

9. Ouhdouch, Y.; Barakate, M.; Finance, C. *Actinomycetes of Moroccan Habitats: Isolation and Screening for Antifungal Activities, European Journal of Soil Biology*, **2001**, 37, 69-74.

10. Etienne, G.; Armau, E.; Dassain, M.; Tiraby, G. *A Screening Method to Identify Antibiotics of the Aminoglycoside Family, The Journal of Antibiotics*, **1991**, 44, 1357-1366.

11. Thakur, D.; Bora, T.C.; Bordoloi, G.N.; Mazumdar, S. *Influence of Nutrition and Culturing Conditions for Optimum Growth and Antimicrobial Metabolite, Journal de Mycologie Medicale*, **2009**, 19, 161-167.

12. Uğur, A.; Şahin, N. *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates, Turkish Journal of Biology*, **2002**, 27, 79-84.

13. Lemriss, S.; Laurent, F.; Couble, A.; Casoli, E.; Lancelin, J.M.; Bonaccio, D.; Rifai, S.; Fassouane, A.; Boiron, P. *Screening of Nonpolyenic Antifungal Metabolites Produced by Clinical Isolates of Actinomycetes, Canadian Journal of Microbiology*, **2003**, 49, 669-674.

14. Saadoun, I.; Muhanna, A. *Optimal Production Condition, Extraction, Partial Purification and Characterization of Inhibitory Compounds Produced by Streptomyces Ds-104 Isolate Against Multi Drug Resistant Candida albicans, Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **2008**, 2, 402-420.

15. Abou-Zeid, A.; El Diwany, A. *Utilization of Molasses as a Natural Medium for Production of magnamycin by Streptomyces halstedii*, *Agriculture Wastes*, **1980**, 2, 23-30.
16. Cruz, R.; Arias, M.E.; Soliveri, J. *Nutritional Requirement for the Production of Pyrazoloisoquinolinone Antibiotics by Streptomyces griseocirneus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1999**, 53, 115-119.
17. Fguira, L.F.B.; Fotso, S.; Mehdi, A.; Mellouli, L.; Laatsch, H. *Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities of Newly Isolated Streptomyces sp. Strain US80*, *Research in Microbiology*, **2004**, 156, 341-347.
18. Thakur, D.; Yadav, A.; Gogoi, B.K.; Bora, T.C. *Isolation and Screening of Streptomyces in Soil of Protected Forest Areas from the States of Assam and Tripura, India, for Antimicrobial Metabolites*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2007**, 17, 242-249.
19. Mehdi, R.B.A.; Sioud, S.; Fguira, L.F.B.; Bejar, S.; Mellouli, L. *Purification and Structure Determination of Four Bioactive Molecules From a Newly Isolated Streptomyces sp. TN97 Strain*, *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 1506-1513.
20. Ouhdouch, Y.; Barakate, M.; Finance, C. *Actinomycetes of Moroccan Habitats: Isolation and Screening for Antifungal Activities*, *European Journal of Soil Biology*, **2001**, 37, 69-74.
21. Elleuch, L.; Shaaban, M.; Smaoui, S.; Mellouli, L.; Rebai, I.K.; Fguira, L.F.B.; Shaaban, K.A.; Laatsch, H. *Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial Streptomyces sp. TN262*, *Applied Biochemistry Biotechnology*, **2010**, 162, 579-593.

22. Thakur, D.; Yadav, A.; Gogoi, B.K.; Bora, T.C. *Isolation and Screening of Streptomyces in Soil of Protected Forest Areas from the States of Assam and Tripura, India, for Antimicrobial Metabolites*, *Journal de Mycologie Medicale*, **2007**, 17, 242-249.
23. Al Monami, F.; Saadoun, I. *Studies on Oil Streptomyces from Jordan*, *Actinomycetes*, **1997**, 8, 42-48.
24. Ilić, S.B.; Konstantinovic, S.S.; Todorovic, Z.B.; Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Jokovic, N.; Radovanovic, B.C. *Characterization and Antimicrobial Activity of Bioactive Metabolites in Streptomyces Isolates*, *Mikrobiologiya*, **2007**, 76, 421-428.
25. Uğur, A.; Şahin, N. *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates*, *Turkish Journal of Biology*, **2002**, 27, 79-84.
26. Augustine, S.K.; Bhavsar, S.; Kapadnis, B.P. *A Non Polyene Antifungal Antibiotic from Streptomyces albidoflavus PU 23*, *Journal of Biosciences*, **2005**, 30, 201-211.
27. Lemriss, S.; Laurent, F.; Couble, A.; Casoli, E.; Lancelin, J.M.; Bonaccio, D.; Rifai, S.; Fassouane, A.; Boiron, P. *Screening of Nonpolyenic Antifungal Metabolites Produced by Clinical Isolates of Actinomycetes*, *Canadian Journal of Microbiology*, **2003**, 49, 669-674.
28. Ouhdouch, Y.; Barakate, M.; Finance, C. *Actinomycetes of Moroccan Habitats: Isolation and Screening for Antifungal Activities*, *European Journal of Soil Biology*, **2001**, 37, 69-74.
29. Yılmaz, E.İ., Kızıl, M.; Yavuz, M. *Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomyces Isolated from Indigenous Turkish Plants and*

- Their Antimicrobial Activity, World Journal of Microbiology Biotechnology*, **2008**, 24, 1461-1470.
30. Franco, M.M.; Countinho, L.E.L. *Detection of Novel Secondary Metabolites, Critical Reviews in Biotechnology*, **1991**, 11, 193-276.
31. . Ilić, S.B.; Konstantinovic, S.S.; Todorovic, Z.B.; Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Jokovic, N.; Radovanovic, B.C. *Characterization and Antimicrobial Activity of Bioactive Metabolites in Streptomyces Isolates, Mikrobiologiya*, **2007**, 76, 421-428.
32. Saadoun, I.; Muhanna, A. *Optimal Production Condition, Extraction, Partial Purification and Characterization of Inhibitory Compounds Produced by Streptomyces Ds-104 Isolate Against Multi Drug Resistant Candida albicans, Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **2008**, 2, 402-420.
33. Uğur, A.; Şahin, N. *Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates, Turkish Journal of Biology*, **2002**, 27, 79-84.
34. Li, F.; Maskey, R.P.; Qin, S.; Sattler, I.; Fiebig, H.H.; Maier, A.; Zeeck, A.; Laatsch, H. *Chinikomycin A and B: Isolation Structure Elucidation and Biological Activity of Novel Antibiotics from a Marine Streptomyces sp. Isolate M045, Journal of Natural Products*, **2003**, 68, 349-353
35. Burkhardt, K.; Fiedler, H.P.; Zeeck, A. *New Cineromycin and Musacins Obtained Pattern Analysis of Streptomyces griseoviridis FH-S 1832, The Journal of Antibiotics* **1996**, 49, 432-437.
36. Grabley, S.; Zeeck, A. *The Chemical Screening Approach Drug Discovery from Nature, Springer-Verlag*, **1999**, 124-148.
37. Hu, C.Q.; Zou, W.B.; Hu, W.S.; Ma, X.K.; Xue, J. *Establishment of a Fast Chemical Identification System for Screening of Counterfeit Drugs of*

Macrolide Antibiotics, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2006**,
40, 68-74.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yeni biyoaktif bileşiklerin en zengin kaynağı doğal ürünlerdir. Yeni ilaçların araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda mikrobiyal kaynaklı biyoaktif sekonder metabolitler oldukça önemli öncül bileşiklerdir. Kimyasal yapıları oldukça değişkenlik gösteren sekonder metabolitler bu özelliklerinden dolayı farklı biyolojik aktivitelere ve dolayısıyla değişik hastalıkların tedavisinde kullanılabilir ilaç öncü maddesi bileşiklerdir. *Streptomyces*'lar doğal ürünlerin zengin bir kaynağını teşkil etmektedir.

Sekonder metabolit üretme potansiyeli yüksek olan *Streptomyces* cinsi organizmalarda biyoaktif metabolitlerin taranması sonucu yeni bileşiklerin keşfi olası bir durumdur. Özellikle sıradışı habitatlarda yaşayan *Streptomyces*'lerden yeni sekonder metabolitlerin izole edilme ihtimali daha yüksektir.

Günümüzde doğal kaynaklardan biyoaktif sekonder metabolitlerin taranmasında farklı yöntem ve stratejiler denenmektedir. Kimyasal tarama yöntemi de bu stratejilerden biri olarak sekonder metabolitlerin araştırılmasında sık kullanılan yöntemlerden biridir.

- 1) Mevcut izolatların moleküler yöntemlere dayalı teşhis çalışmaları sonucunda *Streptomyces* cinsine dahil oldukları tespit edildi.
- 2) Biyolojik aktiviteleri araştırılan AR4, AR9, AS28, BA12, BA14, BS29, BS32, CS41, CS42 kodlu izolatların antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlendi.

- 3) Kimyasal tarama yöntemiyle biyoaktif sekonder metabolitleri taranan CAH29 kodlu izolatın en iyi antimikrobiyal aktiviteyi Benett+Glukoz besiyerinde gösterdiği belirlendi.
- 4) Ekstraksiyon için en iyi çözücünün ise etilasetat olduğu tespit edildi.
- 5) CAH29 kodlu izolatın hem antifungal hem de antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görüldü.
- 6) CAH29 kodlu izolatın etilasetat ekstraktındaki bileşiklerin TLC’de birbirinden en iyi diklorometan-metanol (9:1) çözücü sistemiyle ayrıldığı tespit edildi.
- 7) Biyootografi yöntemiyle biyolojik aktivitesi tespit edilen hedef bileşik kolon kromatografisi ve HPTLC yöntemleri kullanılarak saf olarak elde edildi.
- 8) Saf bileşiğin değişik TLC renklendirici reaktifleri ile bazı fonksiyonel gruplara sahip olabilme potansiyelleri değerlendirildi.
- 9) Saf olarak elde edilen bileşiğin hem antifungal hem de antibakteriyel aktivitesi olduğu belirlendi.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : SÜLEYMAN ÖZAKIN

Doğum Yeri: DİYARBAKIR

Doğum Tarihi: 24-10-1984

Medeni Hali: BEKAR

Yabancı Dili: İNGİLİZCE

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : FATİH LİSESİ (SÜPER LİSE) - 2003

Lisans : DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ - 2008

Yüksek Lisans : DİCLE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI - 2010