



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAYVANCILIK İŞLETMELERİ VE TERMAL
KAYNAKLARDAN ALINAN TOPRAK VE SU
ÖRNEKLERİNDEN MİKSOBAKTERİLERİN
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE
ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Neşecan DUMAN

BURDUR, 2019

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAYVANCILIK İŞLETMELERİ VE TERMAL
KAYNAKLARDAN ALINAN TOPRAK VE SU
ÖRNEKLERİNDEN MİKSOBAKTERİLERİN
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE
ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

Neşecan DUMAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arzu KART

BURDUR, 2019

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Neşecan DUMAN tarafından Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ yönetiminde hazırlanan “Hayvancılık İşletmeleri ve Termal Kaynaklardan Alınan Toprak ve Su Örneklerinden Miksobakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/10/2019

Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ (Danışman)
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Müh.-Mim. Fak., Gıda Müh. Bölümü.....

Prof. Dr. Yusuf YILMAZ (Jüri Üyesi)
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Müh.-Mim. Fak., Gıda Müh. Bölümü.....

Doç. Dr. Seyhan ULUSOY (Jüri Üyesi)
Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fak., Biyoloji Bölümü.....

ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

(İmza)

.....
Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Hayvancılık İşletmeleri ve Termal Kaynaklardan Alınan Toprak ve Su Örneklerinden Mikrobakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

18/10/ 2019

(İmza)

Neşecan DUMAN

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, bilgi ve tecrübesi ile her aşamada çalışmama önemli katkılar sağlayan çok değerli Danışman Hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ ve Dr. Öğr. Üyesi Arzu KART'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın antibakteriyel aktivitesinin belirleme aşamasında patojen bakterileri temin eden ve yöntem desteği veren çok değerli hocam Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a çok teşekkür ederim.

Araştırmamın uygulama aşamasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Özge GÖKÇE'ye, Arş. Gör. Damla BİLECEN ŞEN'e ve değerli yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Kübra KOCATÜRK, Rabia FAKI, Ozan ERFİLİBELİ, Hicran BERBERCİ ve Hilal BEDEL'e teşekkür ederim.

Çalışmamı sorunsuz bir şekilde yürütebilmem için her türlü desteği sağlayan ve her an yanımda olan Pamukkale İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü Gıda Denetim Birimi çalışanları, çok değerli arkadaşlarım Aslıhan PALA ÖZTÜRK, Murat TAŞÇI, Halil BAŞ, Deniz KÖYLÜ MERT, Mervan GÜLTEKİN ve Faruk AKSOY'a teşekkür ederim.

0489-YL-17 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen ve güç veren aileme, her zaman yanımda olan sevgili eşim Ümit Serdar DUMAN'a ve oğlum Kerem DUMAN'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Ekim, 2019

Neşecan DUMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Mikrobakterilerin Genel Özellikleri	2
2.1.1. Meyve Cisimciği Oluşturma	3
2.1.2. Kayma Hareketi.....	4
2.1.3. Sosyal Davranış.....	5
2.2. Mikrobakterilerin Tarihçesi	6
2.3. Mikrobakterilerin Sınıflandırılması ve Ekolojisi	6
2.3.1. Mikrobakterilerin Taksonomisi	9
2.3.1.1. Cystobacterineae	10
2.3.1.2. Sorangineae	11
2.3.1.3. Nannocystineae	11
2.4. Birincil ve İkincil Metabolitler.....	11
2.4.1. Mikrobakterilerin Ürettiği İkincil Metabolitler.....	11
2.4.1.1. Antibakteriyel Etki	16
2.4.1.2. Antitümör Ajanlar	21
2.4.1.3. İmmunosupresif Aktivite ve Organ Nakli	21
2.4.1.4. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Üretimi	21
2.4.1.5. Biyokontrol Ajanlar.....	22
2.5. Mikrobakterilerin Biyoremediasyonda Kullanım Olanakları	23
2.6. Toprak ve Mikroorganizmalar	23
2.7. Termal Su Kaynakları ve Mikroorganizmalar	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26

3.1. Materyal	26
3.1.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması.....	26
3.1.2. Besiyerleri	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. İzolasyon	26
3.2.2. Biyokimyasal Tanı Testleri	27
3.2.2.1. Gram Boyama	27
3.2.2.2. Kazeini Hidrolize Etme	28
3.2.2.3.Kongo Kırmızısı İle Boyama	28
3.2.3. Tanısı Yapılan Suşların Saklanması	28
3.2.4. Bakterilerin Üretilmesi	29
3.2.5. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi	29
3.2.5.1. Agar Difüzyon Yöntemi.....	29
3.2.5.2. Ekstraksiyon Yöntemi İle Biyoaktif İkincil Metabolit Üretimi ve Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi Agar Difüzyon Yöntemi	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	34
4.1. Gram Boyama.....	35
4.2. Kazein Hidrolizi	36
4.3. Kongo Kırmızısı İle Boyama.....	37
4.4. Mikroskopik İnceleme.....	39
4.5. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi	40
4.5.1.Agar Difüzyon Yöntemi	40
4.5.2. Ekstraksiyon Yöntemi İle Biyoaktif İkincil Metabolitlerin Üretimi ve Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi	42
4.6. Termal Kaynaklardan Alınan Örnekler	50
5. SONUÇ	53
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	62
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Miksobakterilerin meyve cisimciği oluşturma aşamaları.....	3
Şekil 2.2. Çeşitli türlerin meyve cisimciği oluşturma görüntüleri.....	4
Şekil 2.3. iChip Cihazı.....	20
Şekil 3.1. Dilüsyon hazırlama ve ekim	27
Şekil 3.2. Gram boyama aşamaları.....	28
Şekil 3.3. Yatık agara ekilen miksobakteri izolatları.....	29
Şekil 3.4. Miksobakteri izolatlarının sıvı besiyerinde inkübasyonu.....	30
Şekil 3.5. İnkübasyon sonrasında örneklerin filtrasyonu.....	31
Şekil 3.6. Etil asetat ilavesi ile örneklerde gerçekleşen faz ayrımı.....	31
Şekil 3.7. Rotary evaporatör ile organik fazın uzaklaştırılması.....	32
Şekil 3.8. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktlar.....	32
Şekil 3.9. Antibiyotik aktivitenin belirlenmesi.....	33
Şekil 4.1. Miksobakteri izolatlarının petri plağındaki koloni morfolojileri.....	34
Şekil 4.2. Miksobakteri izolatlarının Gram boyama sonrasında ışık mikroskopu altındaki görüntüsü.....	36
Şekil 4.3. Miksobakteri izolatlarının kazein hidrolizi sonucunda petri plağındaki görüntüsü.....	37
Şekil 4.4. Kongo kırmızısı ile muamele edilmiş miksobakteri kolonileri.....	38
Şekil 4.5. Elde edilen miksobakteri kolonilerinin stereo mikroskop görüntüsü.....	39
Şekil 4.6. Agar Difüzyon Yöntemi	41
Şekil 4.7. Patojen bakterilere karşı örneklerin antibakteriyel aktiviteleri.....	42
Şekil 4.8. Termal kaynaklardan alınan toprak ve su örnekleri.....	51
Şekil 4.9. Termal kaynaklardan yapılan ekimlere ilişkin petri plağı görüntüleri.....	52

Tablo 2.1. Miksobakterilerin sınıflandırılması.....	10
Tablo 2.2. Miksobakterilerin ürettiği biyoaktif ikincil metabolitler.....	14
Tablo 2.3. Mikrobiyal doğal ürün kaynaklı pazarlanmış antibiyotik örnekleri.....	19
Tablo 4.1. İzolatların özellikleri.....	35
Tablo 4.2. Gram boyama sonuçları.....	36
Tablo 4.3. Kazein hidroliz sonuçları.....	37
Tablo 4.4. Kongo kırmızısı ile muamele sonuçları.....	38
Tablo 4.5. Antibiyotik aktivite analiz sonuçları.....	46
Tablo 4.6. Termal kaynaklardan alınan örneklere ait ekim sonuçları.....	51



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BPW	: Tamponlanmış Peptonlu Su
cm	: Santimetre
d/d	: Devir/ Dakika
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
G	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
Lt	: Litre
Kbp	: Kilobaz Çifti
MBC	: Metil Benzimidazol Karbamat
Mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NRP	: Ribozomal Olmayan Peptid
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PCE	: Tetrakloroetilen
Pk	: Poliketid
PUFA	: Polyunsaturated fatty acid
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
TCE	: Trikloroetilen
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Hayvancılık İşletmeleri ve Termal Kaynaklardan Alınan Toprak ve Su Örneklerinden Miksobakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Neşecan DUMAN

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BARAN EKİNCİ
II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arzu KART

Ekim, 2019

Bu çalışmada miksobakteriler İzmir, Eskişehir, Bursa, ve Denizli'den (Bozkurt ilçesinden) temin edilen 52 adet toprak örneği ve ikisi termal kaynaklardan olmak üzere 4 adet su örneğinden izole edilmiştir. İzolasyon aşamasında örnekler nutrient agarda 28°C ve 50°C'de 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda morfolojik özelliklerine göre miksobakteri olarak belirlenen 56 izolattan 21 izolat test çalışması için kullanılmıştır. Saf olarak elde edilen 10 izolat için biyokimyasal tanı testleri ve mikroskopik inceleme yapılmıştır. Buna göre çalışılan izolatlar içerisinde bilinen 17 cins miksobakteriden 5 cinse (*Myxococcus* sp., *Cystobacter* sp., *Stigmatella* sp., *Nannocytis* sp., *Polyangium* sp.) ait örneğin olduğu saptanmıştır. Miksobakteri olduğu belirlenen izolatların antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla etil asetat ile ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen örneklerin Gram pozitif (*Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*) ve Gram negatif (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) patojen mikroorganizmalar için etkinlikleri belirlenmiştir. Bu yöntemle elde edilen örneklerin *S. aureus* (23, 33 ve 34 numaralı izolatlar) ve *B. cereus* (9, 23, 33, 34 numaralı izolatlar) için güçlü antibakteriyel etki gösterirken *E. coli* ve *P. aeruginosa* için antibakteriyel etkilerinin olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere göre izole edilen miksobakterilerin antibakteriyel potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Miksobakteri, kayan bakteri, antibakteriyel etki

Hazırlanan bu Yüksek Lisans tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0489-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M. Sc. Thesis

Isolation, Identification and Determination of Antibacterial Activities of Myxobacteria from Soil and Water Samples Obtained from Livestock Farms and Thermal Springs

Neşecan DUMAN

Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Division of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Melike BARAN EKİNCİ
Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Arzu KART

October, 2019

In this study, Myxobacteria were isolated in 52 soil samples from İzmir, Eskişehir, Bursa and Denizli (Bozkurt area) and 4 water samples, two from thermal sources. Samples were inoculated in nutrient agar and incubated for 7 days at 28°C and 50°C. Of the 56 colonies that were determined morphologically as myxobacteria after incubation, 21 isolates were used. Ten purified cultures were subjected to biochemical diagnostic tests and microscopic examination. According to the biochemical tests and morphological definitions, 5 out of 17 known myxobacteria (*Myxococcus* sp., *Cystobacter* sp., *Stigmatella* sp., *Nannocytis* sp., *Polyangium* sp.) were obtained. In order to determine the antibacterial activity of the isolates identified as myxobacteria, an extraction procedure with ethyl acetate was performed. The activity of the samples against Gram positive (*B. cereus* ve *S.aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) pathogenic microorganisms were also determined. The samples showed a strong antibacterial effect against *S.aureus* (isolates 23, 33 and 34) and *B.cereus* (isolates 9, 23, 33, 34), but no antibacterial effect against *E. coli* and *P. aeruginosa*. Results indicated that the isolated myxobacteria may have a potential for antibacterial activity.

Keywords: Myxobacteria, gliding bacteria, antibacterial effect

The present M.Sc. Thesis was supported by Coordinatorship of Scientific Research Projects of Burdur Mehmet Akif Ersoy University Under the Project number of 0489-YL-17

1. GİRİŞ

Afyondan morfinin, Cinchona ağaçlarından kininin, kahve çekirdeklerinden kahvenin elde edilmesiyle biyoaktif doğal bileşenlerin teröpatik etkilerde önemli roller oynadığı anlaşılmıştır (Sun, 2016). Günümüzde sentetik kimyanın gelişimi ile zengin bir çeşitlilikte organik bileşik üretilmesine rağmen, yeni ilaçların geliştirilmesinde doğal bileşikler önemli bir rol oynamaya devam etmektedir (Ngo vd., 2013). 1981 ile 2010 yılları arasında onaylanan küçük moleküllu ilaçların % 34'ü doğal ürünler olup, % 16'sı toplam sentez ile yapılmış farmakofor doğal ürünlerdir (Newman ve Cragg, 2012). *Penicillium*dan penisilin keşfedilmesi 1940'larda tıp dünyasında devrim yaratmıştır. Antibiyotiklerin öyküsüne baktığımızda mikroorganizma türevli ikincil metabolitler yarım yüzyılı aşkın bir süredir zengin bir kaynaktır. Ancak 1940'lardan 1960'lara doğru eritromisin, tetrasiklin ve kanamisin gibi başarılı antibiyotiklerin aktinomisetlerden izole edildiği altın çağdan sonra antibiyotik keşfinin hızı yavaşlamış ve dirençli bakteri yayılımı önemli bir halk sağlığı tehdidi haline gelmiştir (Lewis, 2013).

Biyoteknolojik gelişmeler kültür olarak elde edilmesinin zor olduğu ya da hiç elde edilemeyeceği düşünülen mikroorganizmaların geleceğine umut olmuştur. Bunlardan biri de miksobakterilerdir (Sun, 2016). Mikroorganizmalar içerisinde miksobakterilerin sahip oldukları genomik özelliklerinden dolayı ikincil metabolit üretimi açısından çok önemli bir grup olduğu görülmektedir (Yamamura ve Amachi, 2014). Özellikle antibiyotiğe karşı direnç kazanan mikroorganizmalar birçok canlıyı sağlık açısından olumsuz yönde etkilediği için miksobakteriler bu yönden daha çok dikkat çekmektedir.

Dünyada miksobakteriler üzerinde yapılmakta olan çalışmalarda halen yeni miksobakteri türlerine ve bu türlerin ürettiği yeni ikincil metabolitlere rastlanmaktadır. Bu yönüyle de miksobakteriler üzerinde yapılabilecek birçok çalışmanın olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla yapılan bu tez çalışmasında, dünya literatürüne katkı sağlayabilecek, endüstriyel ve tıbbi alanlar açısından biyoteknolojik öneme sahip olan miksobakterilerin çeşitli toprak ve termal su kaynaklarından izole edilerek tanımlanması sonucunda ülkemize özgü mikroorganizma kaynaklarının belirlenmesi ve bu yönde yapılması planlanan birçok çalışmaya da kaynak oluşturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Miksobakterilerin Genel Özellikleri

Gliding (Kayan) bakteriler familyasından olan miksobakteriler ürettikleri ikincil metabolitleri açısından dikkat çekmektedir. Dünya literatüründe miksobakteriler ile ilgili yapılan araştırmalar özellikle yeni nesil antibiyotik ve antitümör ajanları açısından çok önemli bir kaynak olduğu görülmektedir.

Miksobakteriler Gram (-) bakteriler olup, çeşitli özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekici bir gruptur. Hücreler arası iletişime dayanan sosyal bir davranış gösterirler. Katı yüzeylerde kayarak hareket ederler ve büyük makromolekülleri ekzoenzimleri ile parçalarlar (Dawid, 2000). Bu mikroorganizmalar dünya üzerindeki birçok yerde, açık deniz sedimentlerinde, nehir çamurlarında, hidrotermal alanlarda olmak üzere hemen hemen her yerde bulunurlar (Jiang vd., 2010).

Miksobakterilerin oldukça büyük bir genoma sahip olmaları (9-10 milyon nükleotid) onlara iyi bir ikincil metabolit üretme potansiyelini sağlar. Son yıllarda elde edilen 100'den fazla biyoaktif madde miksobakterilerden izole edilmiştir (Karwehl vd., 2009). Zamanla gelişen antibiyotik direncine karşı yeni antibiyotiklerin tanımlanması ve geliştirilmesi açısından yüksek öneme sahiptir. Geçmişte özellikle yeni miksobakteri tür ve cinsleri yeni biyoaktif metabolitlerin ortaya çıkarılmasında güvenilir kaynaklar olmuştur (Mohr vd., 2012; Plaza vd., 2012).

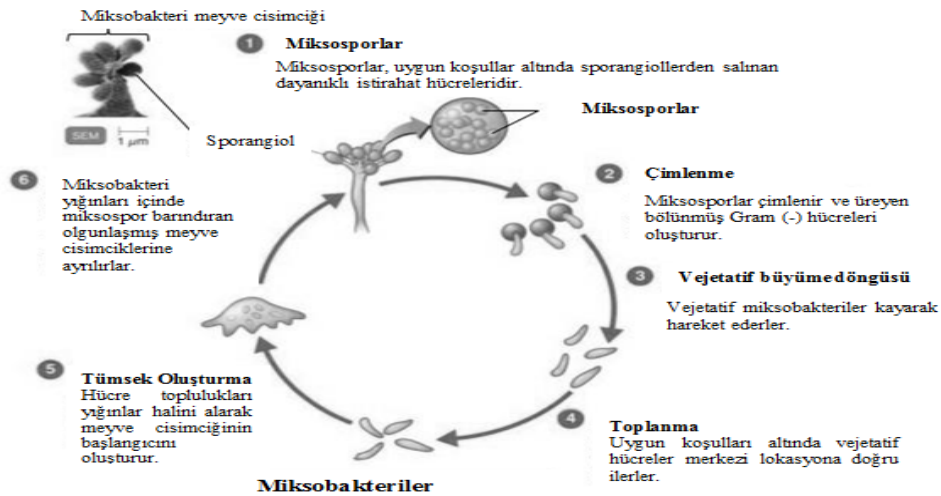
Miksobakterilerin neden bu kadar çok sayıda ikincil metabolit ürettikleri hala iyi anlaşılamamış olmakla birlikte, toprak ortamında rekabet avantajı sağladıkları ve hücre-hücre etkileşimini modüle etmek için kullanıldıkları ileri sürülmüştür (Diez vd., 2012; Davies vd., 2006). Miksobakteriler ürettikleri çeşitli enzimler sayesinde diğer mikroorganizmaları parçalamalarının yanı sıra bazı makromolekülleri de parçalayabilmektedir. Miksobakteriler aynı zamanda çoklu doymamış yağ asidi, herbisit ve insektisid gibi endüstriyel ve tarımsal açıdan önemli bileşiklerin eldesinde de kullanılabilir yeni kaynaklardan biri olarak görülmektedir. Yine bazı miksobakteri türlerinin biyoremediasyon olanakları araştırılmış özellikle arseniğin doğal su kaynaklarından temizlenmesi amacıyla kullanılabilirliği gösterilmiştir (Yamamura ve Amachi, 2014).

Genel habitatları toprak olan miksobakterilerden antibiyotik etkili ikincil metabolitlerin etkin, ucuz ve kolay elde edilmesinin yanı sıra üretilen, düşük moleküler

ağırlıklı, organik doğal ürünler olan antimikrobiyaller, seçici toksisiteye sahip olduklarından, çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmalara karşı etkili olup, makroorganizmaya zarar vermezler.

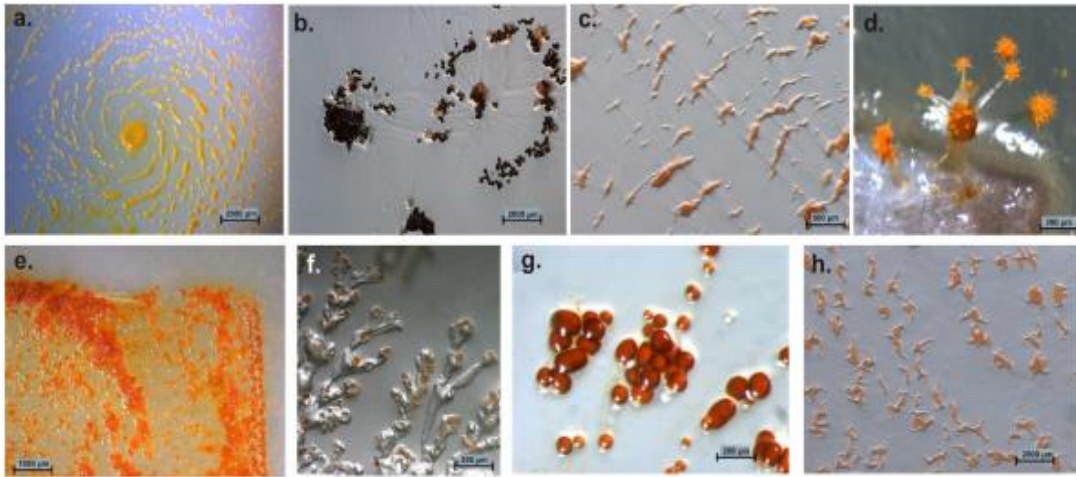
2.1.1. Meyve Cisimciği Oluşturma

Miksobakterilerin hayat döngüsü eşsizdir ve prokaryotlar arasında tektir. Hücreler arasında bir işbirliği gerçekleştirilmektedir. Hücreler yığın içinde düzensiz bir şekilde dağılmıştır. Hücrelerin oluşturduğu kümelerin ışınsal tarzda ve bazen yığının çevresi boyunca kabarık bir çizgi halinde yoğunlaştığı görülmektedir. Vejetatif hücrelerin bulunduğu kolonilerin karakteristik şekli miksobakterilerin diğer kayan bakterilerden hemen ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Şekil 2.1’de gösterildiği gibi olumsuz şartlar altında hücreler yığın içindeki belirli bölgelerde bir araya gelmektedirler. 10^4 - 10^6 adet hücre bir araya gelerek bu kütleli oluşturmaktadırlar. Bu kütleler küresel veya kabarık çizgiler şeklinde gözlemlenmektedir (Holt vd., 1994). Daha sonra değişik şekillerde devam eden kümeleşme meyvemsi yapılara dönüşmektedir (Clifton, 1958). Meyvemsi yapılar tipik olarak boyutları 0.1-0.6 mm arasında değişmektedir. Göze çarpan parlak renklerle çıplak gözle görülebilmektedir (Holt vd., 1994; Reichenbach, 1993). Olgun meyvemsi yapı içinde ikinci bir morfogenetik yapı meydana gelmektedir. Daha kalın ve daha kısa olan çubuklar çoğunlukla kendilerini kapsülle çevirerek optik olarak parlak, fizyolojik olarak durgun ve kurumaya dirençli mikso sporlar vermektedir. Bu kapsül germinasyondan sonra boş kalmaktadır. Sporangiol olarak bilinen bu yapı küresel veya ovalimsi olabilmektedir. Bu yapı için sporangium terimi de kullanılabilir (Holt vd., 1994).



Şekil 2.1. Miksobakterilerin meyve cisimciği oluşturma aşamaları (Holt vd., 1994)

Şekil 2.2’de görüldüğü üzere mikrobakteriler için karakteristik olan meyve cisimciği şekli türlere göre farklılık göstermektedir. Meyve cisimciği basit olabildiği gibi birkaç birimin birleşmesiyle daha karmaşık yapıda da olabilmektedir. Sporangiol oluşturmayanlar basit olarak düzenlenir, bazı durumlarda birkaç meyvemsi yapı beraber bulunur ve bireysel meyvemsi yapının sınırı her zaman net bir şekilde görülemez. Meyvemsi yapı içindeki değişik sayıdaki sporangiyoller salkımın yukarısında bir küme veya paketler halinde oluşmaktadır. Basit bir agregat kütesinden karışık meyvemsi yapı alanlarına kadar tüm meyvemsi yapılar ve sporagiyoller basit bir meyvemsi yapının benzeridir. Buna örnek olarak *Myxococcus* cinsi verilebilir. Gelişim süresince meyvemsi yapıların tipik morfolojisi çoğunlukla hızlı bir şekilde kaybolmaktadır (Reichenbach ve Höfle, 1989).



Şekil 2.2. Çeşitli türlerin meyve cisimciği oluşturma görüntüleri (a) *Myxococcus xanthus*, (b) *Cystobacter ferrugineus*, (c) *Archangium sp.*, (d) *Chondromyces sp.*, (e) *Sorangium sp.*, (f) *Polyangium sp.*, (g) *Cystobacter fuscus*, (h) *Corallocooccus coralloides* (Dawid, 2000)

2.1.2. Kayma Hareketi

En az anlaşılan bakteri hareket sistemlerinden biri kaymadır. Kayma hareketi, uzun hücre eksenini boyunca kamçı veya pili yardımı olmadan aktif yüzey translokasyonu olarak tanımlanmıştır. Bu tanım neyin kayma hareketini desteklemediğini belirtmekte ancak ne olduğunu açıklamamaktadır. Kayma hareketi; mikrobakteriler, siyanobakteriler ve mikoplazmalar dahil olmak üzere oldukça farklı bakteri grupları arasında yaygındır. Bununla birlikte, bu bakteri gruplarında, birden fazla hareketlilik mekanizması yer alabilir. Kayma hareketleri hücre morfolojisinde değişikliklere neden olmaz. Kayma hareketiyle

ilişkili organeller veya hareketlilikte görev alan kısımlar kolayca gözlenememektedir (Nan ve Zusman, 2011).

Miksobakteriler içerisinde çalışmalara en çok konu olan *M. xanthus*, flagella'dan yoksundur ve sıvı kültürde yüzemez. Bununla birlikte, hücreler katı yüzeylerde genellikle koordine gruplarda değil izole bireyler olarak kayma hareketi gösterir. Hareket, bu bakterinin toprak tozundan beslenmesini ve diğer mikroorganizmaları yok etmesini sağlar. Besinlerin veya tüketebilecekleri diğer bakterilerin mevcudiyeti çevrede azaldığında, çoğu hücre meyve veren gövdeler şeklinde toplanmayı ve tek tek hücrelerin sporlara dönüştürülmesini içeren davranışlar sergiler. *M. xanthus*'ta hareket, topluluk haline gelme, predasyon (diğer bakterileri tüketme), meyve veren vücut oluşumu ve sporülasyon için önemlidir (Nan ve Zusman, 2011).

M. xanthus türüne ait suşların çoğunda sosyal aktivite için hücre hareketi esastır. *Myxococcus xanthus* hücreleri, sırasıyla A ve S hareket sistemi olarak adlandırılan iki farklı sistemini kullanarak hareket eder (Hodgkin ve Kaiser, 1979). İki hareketlilik sistemi, aynı yönde hareket kuvveti oluşturmak için birbirlerinden bağımsız olarak çalışır (Leonardy vd., 2007) ve farklı yüzeylerde farklı seçici avantajlar sergilerler. Ancak, onların faaliyetleri koordinelidir. S hareket sistemi genellikle sadece hücreler birbirleriyle temas mesafesindeyken gerçekleşirken, A hareket sistemi ise tek hücrelerde ve hücre gruplarında da aktiftir (Hodgkin ve Kaiser, 1979).

2.1.3. Sosyal Davranış

İşbirliği çalışması yüzyıllar boyu biyologları meşgul etmiştir ancak mikroorganizmalarda sosyal davranış potansiyeli henüz yeni tanımlanmıştır. Bu sosyal boyutun tanınmasından bu yana, mikrobiyal işbirliğine yönelik araştırmalar hızlanmış ve mikroorganizmalar hızlı evrilmeleri nedeniyle laboratuvar çalışmalarına uygun olmaları, moleküler ve genetik araştırmalar için ideal bir model sistemi haline gelmiştir (Tarnita, 2017).

Miksobakteriler, tek hücreden çok hücreli hayata geçişi etkin bir şekilde yapan, çok yönlü kooperatif davranışlar sergileyen ve makroskopik sosyal organizmalarda görülen ve sofistike olarak tanımlanabilecek çok hücreli gelişim gösteren bakteriyel gruplardan biridir (Munoz-Dorado vd., 2016).

Miksobakteriler diğer bakterilerden dikkat çekici sosyal davranışlarıyla, özellikle de miksosporları içeren çok hücreli meyve veren organların oluşumu ile ayrılırlar. Sosyal davranışların biyolojisi üzerine yapılan çalışmaların çoğu, mükemmel bir genetik sisteme

sahip ve çeşitli deneysel yaklaşımlara uygun olan bir tür olan *Myxococcus xanthus* ile sınırlı kalmıştır (Shimkets, 1990).

Myxococcus xanthus, diğer miksobakteriler gibi, ortam şartlarına bağlı olarak gruplarda işbirliği içinde hareket eden ve beslenen sosyal bir bakteridir. Yüzeylede, çubuk şeklindeki vejetatif hücreler; koordine edilmiş bir şekilde avını arayarak hareket eder ve sürü olarak adlandırılan dinamik çok hücreli gruplar oluşturur. Sürüler içerisinde, hücreler birbirleriyle etkileşime girerler ve iki ayrı hareket sistemi kullanırlar. Tek tek hücrelerin hareketini yönlendiren maceracı bir hareketlilik, sürülerin ön kenarında izler oluşturan balçık salgılanması ile ilişkilidir (Munoz-Dorado vd., 2016).

2.2. Miksobakterilerin Tarihçesi

İlk olarak, miksobakterilerin meyve veren cisimleri oluşturma yetenekleri nedeniyle mantarlara ait olduğu düşünülmüştür. 1809'da Alman botanikçi H. F. Link ilk olarak miksobakterileri izole ederek “gasteromycete” (mantarlar) olarak adlandırmıştır. Günümüzde, bu tür *Kofteria flava* olarak bilinmektedir (Reichenbach, 2005). İki tane daha tür, *Stigmatella aurantiaca* ve *Chondromyces*, İngiliz mikolog M. J. Berkeley (Berkeley, 1857) tarafından “Hyphomycetes” olarak sınıflandırılmıştır (Reichenbach, 2005).

1892'de Amerikalı botanikçi Roland Thaxter, onları farklı bir bakteri grubu olarak belirtmiş ve bu bakterilerin şaşkırtıcı ve beklenmedik yaşam döngüsünü tanımlayan “Miksobakteri” adını vermiştir (Thaxter, 1892). Miksobakterilerin taksonomisi esas olarak vejetatif hücrelerin, bunların sürülerinin, meyve veren cisimlerin ve miksosporların morfolojisine dayanır (Reichenbach, 2005). Vejetatif hücrelerin ve miksosporların şekli ve büyüklüğü gibi fenotipik özellikler ve meyve veren cisimlerin şekli, büyüklüğü, rengi ve yapısı genotipin ifadeleridir. Meyve veren vücut oluşumu laboratuvarında yapay ekim sırasında kaybolabilir ve bu türlerin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında karışıklığa yol açmaktadır (Reichenbach, 2005).

2.3. Miksobakterilerin Sınıflandırılması ve Ekolojisi

Miksobakteriler, Gram (-) bakterilerdir ve relatif olarak büyük (0.6-1.2 x 3-15 mm) çubuk şeklindeki hücrelerdir. Toprak ve ilgili yaşam alanlarında yaşarlar ve üç yetenekle ünlüdürler: Kayarak hareket eder ve kolonileri bu nedenle kültür plakasını yavaş yavaş yayan ince, film benzeri yapılar oluşturmaktadır. Karmaşık iletişim sistemlerine ve son derece gelişmiş sosyal yaşamlarına sahiptirler; bunlar iki seviyede ifade edilen dikkate değer bir morfojenetik potansiyel göstermektedir. Açlık koşullarıyla indüklenen 10^5 - 10^6

hücreleri içeren bir kooperatif morfogenezinde meyvemsi bir yapı üretebilirler. Olgunlaşan meyve cisimcikleriyle birlikte, hücrenel bir morfogenez gerçekleşir ve bu süre boyunca vejetatif hücreler dirençli miksosporları dönüştürür. Miksobakteriler tüm bakteriler arasında en büyük genomlara (9.500-10.000 kbp) ve % 66-72 mol G + C içeren bir DNA'ya sahip olması da söz konusudur (Dworkin, 1996).

Ekolojik özellikler miksobakterilerin kendine özgü özelliklerini etkilemektedir. Tüm miksobakteriler biyolojik makromolekülleri parçalayabilmektedir. Çoğu tür proteolitik ve bakteriyolitik ve ölü organik maddelere, ölü ve yaşayan bakterilere, mayalara ve diğer mikroorganizmalara bir dizi baskın enzimle saldırılmaktadır. Miksobakterilerin bir kısmı selülozu parçalayabilmektedir. Ekzoenzim üretimine önemli miktarda enerji harcayan enzimatik saldırı, bir topluluk tarafından gerçekleştiriliyorsa daha etkilidir; o zaman daha yüksek enzim seviyelerine ulaşılabilir ve difüzyondaki kayıplar en aza indirilebilir. Bir hücre, başka bir hücrenin çabısından yararlanabilirken bunu tersi de geçerlidir.

Çoğu miksobakteri, dar pH aralığında aerobik mezofiller olup, düşük bir tuz toleransı ve vejetatif durumda kuruma için son derecede duyarlıdır. Sıcaklık aralığı çok daha geniş olmasına rağmen neredeyse tüm miksobakteriler 30⁰C'de iyi büyür. Çoğu suşlar psikotropiktir ve düşük sıcaklıklarda (4-8⁰C'de buzdolabında) yavaş da olsa büyür (Zhukova, 1963).

Miksobakterilerin tuz toleransı oldukça düşüktür. Daha önce de belirtildiği gibi, miksobakteriler deniz habitatlarından izole edilebilir fakat yakın zamana kadar bu şekilde elde edilen tüm suşlar halotolerant değildir. Tuz bataklıklarından yüksek tuz içeriğine sahip çöl habitatlarının bulunduğu topraklar, miksobakterilerin onlardan izole edilmesinden önce yatağa yatırılmalıdır (Rückert, 1983). Bazı miksobakterilerin tuzu diğerlerinden daha iyi tolere ettiği görülmektedir. Aktif bir yaşam için, miksobakterilerin elbette suya ihtiyacı vardır. Kozmik hücreler kuruma için oldukça duyarlıdır, böylece liyofilizasyon onların korunması için uygun bir yöntem değildir.

Miksosporlar zaten zararlı çevresel faktörlere karşı dirençli olmasına rağmen, meyve veren vücut, tek bir hücre yerine bir nüfusa sahip yeni bir yaşam döngüsünün başlatılmasını garanti eder. Ayrıca sürü kolonisinde kimyasal ve fiziki mekanizmalar hücreleri bir arada tutarlar. Öte yandan, miksobakterili tek hücreli koloniler şeklinde üretmek önem arz edebilir. Bireysel hücreler, yoğun bir şekilde inoküle edildiğinde hızlı büyümeye izin veren agarda kolonilere kolayca dönüşürler. Miksobakteriler birçok farklı büyüme inhibitörü üretir (Gray, 1997). Bu durum miksobakterilerin zengin bir ikincil

metabolit kaynağı olan birkaç bakteriyel gruptan biri olduğu göstermektedir (Reichenbach ve Höfle, 1998).

Miksobakteriler çok yaygındır ve her yerde bulunurlar. Belirli yaşam tarzlarıyla miksobakteriler kesinlikle çok başarılıdır. Neredeyse her yerde, Antartika'dan tropiklere, deniz seviyesinden yüksek rakımlara, tropik yağmur ormanlarından çöllere kadar tüm bitki kuşaklarında bulunurlar. En zengin miksobakteri floraları sıcak, yarı kurak alanlarda, örneğin ABD'nin güneybatısındaki, kuzey Hindistan'da veya Mısır'dır. Bu bölgelerden alınan tek bir kaşık topraktan 5-10 farklı tür elde edilebilmektedir. Mikosporları ve yaşamsal alanda bozulmamış biyomakromoleküller miksobakterilere bu alanlarda seçim avantajı sağlayabilir. Aynı zamanda orta Avrupa'da, ABD'nin orta batısında ve benzer yerlerde çok yaygındırlar. Kuzey ormanlarında ve yüksek rakımlarda bulunan, daha savunmasız ortamlarda, örneğin Sahra Çölü gibi, çoğunlukla *Miksokoklar*, *Korokonokoklar*, *Archangium* ve *Nankosistisstranlar* gibi çok az türü bulunur (Reichenbach, 1999).

Miksobakteriler temelde toprak bakterileridir. Miksobakterilerin tipik bir yaşam alanı, kum ve çöl kumlarından zengin siyah topraklardır. Bilinen tüm miksobakteriler kesinlikle aerobiktir ve toprağın en üst tabakasında yaşar. Tavşan gübresi miksobakterilerin izolasyonu için klasik bir kaynaktır (Reichenbach ve Dworkin, 1992).

Gübre üzerindeki miksobakteriler nereden geldiği düşünüldüğünde; aerobik organizmalar olarak, miksobakterilerin hayvanlarda canlı olma ihtimali yoktur. Ancak, kalın katmanlı karlar üzerinde toplanan gübre üzerindeki miksobakteriler, hayvanın sindirim sistemini geçebileceklerini düşündürmektedir. (Rückert, 1975a). Miksobakteriler sazanın bağırsak içeriğinden düzenli olarak izole edilmiş ve balıklarda yaşamak yerine geçtikleri sonucuna varılmıştır (Till, 1982).

Miksobakteriler bazen özel yaşam alanlarına yerleşirler. Toz ve toprak, hava akımları ve bu nedenle kuraklığa dirençli toprak organizmaları tarafından taşınırlar (Wu vd., 1968). Almanya'daki çeşitli fundalıklardan ve ağaçlardan alınan yapraklardan yaklaşık yarısı miksobakterileri üretmiştir (Rückert, 1981). Olumsuz habitatlar için tipik olduğu gibi yalnızca birkaç tür keşfedilmiştir. Beklenmedik bir şekilde miksobakteriler bataklıklardan da izole edilmiştir. Pek çok miksobakteri, Vestaburg (MI, ABD) yakınlarındaki alkali bir bataklık (pH 6-8.7) çeşitli yerlerinden elde edilmiştir (Hook, 1977). Gerçekten şaşırtıcı olan, Almanya'nın Rhoń dağlarındaki turba bataklıklarında (pH 3.2-4.8) ve Belçika-Almanya sınırındaki Hautes Fagnes / HoheVenn'teki (pH 3.7, su içeriği) miksobakterilerin (*Myxococcus*, *Corallocooccus* ve *Polyangium* sp.) keşfidir (Dawid, 1984).

Bazı tahminlere göre Güney İngiltere'de gram toprak başına 2000 ila 75000 arasında bakteriyolitik mikrobakteri olduğu düşünülmektedir. Rakamların kompostta ciddi bir artış gösterdiği, burada 500.000 hücre *Mx. Fulvus*'un yanı sıra diğer mikrobakterilere de az sayıda rastlandığı görülmüştür. Yugoslavya'daki çeşitli toprak türlerine ilişkin bir araştırma, gram başına 1.500-80.000 bakteriyolitik mikrobakteri göstermiştir (Singh, 1947).

2.3.1. Mikrobakterilerin Taksonomisi

Bilinen tüm mikrobakteriler tek sıralı *Myxococcales*'de birleşmiştir. Mikrobakterilerin filogenetik konumu, 16S rRNA/DNA çalışmaları ile katı bir baz üzerine konmuştur (Ludwig vd., 1983). Bu çalışmalar, mikrobakterilerin Deltaproteobakteri sınıfında filogenetik olarak tutarlı bir grup olduğunu göstermiştir (Stackebrandt vd., 1988). *Myxococcales* ailesinin üç alt bölümden oluştuğu da açıktır: *Cystobacterineae* ve *Sorangineae* cinslerinden ayrılan büyük bir bölünme (Reichenbach, 1974b) ve *Nannocystineae*'yi ayıran ikinci bir bölünme bulunmaktadır. Alt bölümler, meyve cisimciklerinin organizasyonuna ve mikrosporların şekline göre ailelere ayrılmıştır. Cins ve türlerin tanımı aynı özelliklere ve birkaç tamamlayıcı fizyolojik olgu üzerindedir (Reichenbach, 2005).

Genel olarak bakıldığında, üç alt bölümü, beş aileyi, 17 cins ve yaklaşık 50 farklı mikrobakteri türü ayırt edilmiştir. Bu sayıların tamamlanamamış olmakla birlikte, gelecekte çok fazla sayıda artması beklenmemektedir. Bununla birlikte, mikrobakteri taksonomisinin henüz tamamlanmış olarak kabul edilememektedir ve örneğin *Corallocooccus*, *Archangium*, *Cystobacter*, *Nannocystis*, *Sorangium* ve *Polyangium* cinslerinin bazı türlerinin ayırt edilmesinde hala büyük problemlerle karşı karşıya olduğu bilinmektedir (Reichenbach, 2005).

Tablo 2.1. Miksobakterilerin sınıflandırılması (Mohr, 2018)

Sınıf	Takım	Famulya	Cins
<i>Myxococcales</i>	<i>Cystobacterineae</i>	<i>Myxococcaceae</i>	<i>Myxococcus</i>
			<i>Coralloccoccus</i>
			<i>Pyxicoccus</i>
		<i>Cystobacteraceae</i>	<i>Archangium</i>
			<i>Cystobacter</i>
			<i>Melittangium</i>
			<i>Stigmatella</i>
	<i>Sorangineae</i>	<i>Polyangiaceae</i>	<i>Hyalangium</i>
			<i>Sorangium</i>
			<i>Polyangium</i>
			<i>Haploangium</i>
			<i>Chondromyces</i>
	<i>Nannocystineae</i>	<i>Nannocystaceae</i>	<i>Byssophaga</i>
			<i>Jahnia</i>
		<i>Kofleriaceae</i>	<i>Nannocystis</i>
<i>Kofleria</i>			
			<i>Haliangium</i>

2.3.1.1. *Cystobacterineae*

Vejetatif hücreler az ya da çok ince uçlara sahiptirler. Çubuk şeklinde olup, 3.5–12 µm uzunluğunda ve 0.6–0.8 µm genişliğindedirler. Yığın halindeki koloniler özellikle agar yüzeyinde ışınal damarlar şeklinde gözlemlenebilmektedir. Yığınlar uçlara aleve benzeyen bir şekilde eklenmektedir. Miksosporlar çarpıcı bir hücrel morfogenez yoluyla ortaya çıkmaktadır. Vejetatif hücreler daima önemli ölçüde kısalır ve şişer. Miksosporlar daima bir kapsül varmış gibi görünmesine rağmen, çoğunlukla sadece elektron mikroskopu altında görülür. Bakteri kümeleri Kongo kırmızısı ile boyanmaktadır. Yağ asidi örüntüsü, dallanmış zincirli yağ asitleri tarafından baskındır; 2- ve 3-hidroksi yağlı asitler önemli miktarda mevcuttur. Bütün türler bakteriyolitik tiptedir (Reichenbach, 2005).

2.3.1.2. Sorangineae

Vejetatif hücreler, yaklaşık 2.5-8.0 µm uzunluğunda ve 0.6-1.0 µm genişliğinde, genişçe yuvarlatılmış uçlara sahip, katı, silindirik çubuklar, bazen neredeyse küp şeklindedir. Yığınlar agar içine bazen de plakanın tabanına nüfuz eder. Meyvemsi yapılar ince olup ovalimsi ya da küreseldir. Işınsal damarlar, halka şeklindeki çıkıntılar ve fan benzeri yapılar üretilmesine rağmen, yüzey yapıları daha az belirgindir. Yığın olan bölgede agar yüzeyi az ya da çok korozif olabilir. Çoğu zaman, hücreler bir grup olarak yığın kenarına toplanabilmektedir. Merkezden uzaklaşan küre biçiminde ya da böbrek şeklinde kümeler oluştururlar ve agar yüzeyine derin kazınmış yollar bırakırlar. Mikosporlar şekil bakımından vejetatif hücrelerden biraz farklıdır ve kapsül içermezler ancak çok ince olanlar ancak optik olarak aktiftirler. Balçık ve koloniler Kongo kırmızısı ile boyanmazlar. Dallanmış zincirli yağ asitleri yağ asidi modelinde azaltılır ve hidroksi yağ asitleri tamamen yoktur. Birkaç tür selüloz ayrıştırıcıdır (Reichenbach, 2005).

2.3.1.3. Nannocystineae

İki familyaya karşılık gelen iki tür vardır:

Belirli ortamlarda sümüksü tabakası olmayan yığın kolonileri, agar plakasını çok derin bir şekilde süngerimsi bir kütleye dönüştüren paslanmaya maruz kalmaktadır. Vejetatif hücreler kısa çubuk şeklindedir. Meyve cisimcikleri küçük ve orta büyüklükteki sporangioelleri bir araya getirir.

Diğer bir tür ise vejetatif hücreler, *Sorangineae*'lerinkine benzeyen, uçları yuvarlatılmış ancak 4-6 mm daha uzun ve 0.6-0.7 mm genişliğinde daha hassas ince çubuklardır (Reichenbach, 2005).

2.4. Birincil ve İkincil Metabolitler

2.4.1. Mikrobakterilerin Ürettiği İkincil Metabolitler

İkincil metabolitler organizma tarafından üretilen ancak organizmanın büyümesi için gerekli olmayan ve sadece sınırlı taksonomik gruplarda mevcut olan bileşiklerdir (Bentley, 1997). Ticari öneme sahip bu metabolitlerin çoğu tıp, eczacılık, kozmetik, gıda, tarım, çevre ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu metabolitler biyolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağını sunarlar (Fakhouri, vd., 2001) ve birçok yönde insanlık için önemli olan enzimler, pigmentler ve

antibiyotikleri içerirler (Giri vd., 2004). Doğada yaygın olarak bulunan birçok mikroorganizma ticari olarak önemli birincil ve ikincil metabolitler üretirler.

Birincil metabolitler, aktif hücre çoğalması sırasında üretilirler. Alkol tipik bir birincil metabolittir. Ürünlerin bazıları ise aktif üreme fazında değil de duraklama fazında oluşur. Bu metabolitlere “ikincil metabolit” denir. Ekonomik açıdan değerli olan pek çok kimyasal ikincil metabolittir ve birincil metabolite kıyasla çok fazla üretimi mevcuttur. Birincil metabolitler, mikroorganizmanın çoğalması ve yaşamsal faaliyeti için esas bileşenler olup düşük molekül ağırlıklı ürünlerdir. Birincil metabolitlere en uygun örnek aminoasitler, pürin, pürimidin ve vitaminler verilebilir. Birincil metabolitlerin aşırı üretimine mikroorganizma normal şartlarda izin vermez. Mikroorganizmaların metabolik kontrol sistemleri bu maddelerin gereği kadar oluşumuna fırsat verir. Ancak bazı mikroorganizmaların kontrol mekanizmalarındaki anormallikler sonucunda bazı metabolitlerin aşırı üretimi söz konusu olabilir. Bu da endüstriyel çapta biyoteknolojik yöntemlerle yapılan üretimler için avantaj oluşturur. İkincil metabolitler, mikroorganizma üremesinin sonlarına doğru genelde durgunluk fazında üretilirler ve mikroorganizmanın gelişme ve üremesi için gerekli ürünler değildirler (URL-1, 2019).

İkincil metabolitlerin sentezi, kromozal DNA ve plasmid DNA’daki genler tarafından kodlanmıştır. İkincil metabolizma süreçleri hala tam anlamıyla anlaşılamamıştır. İkincil metabolizma besin, biyosentez, indükleyicilerin ilavesi ile veya gelişim oranındaki azalma ile ortaya çıkar (Demain vd., 1998). Çok sayıda bakteri ve mantar ikincil metabolit adı verilen bu metabolizma atıkları üretmektedirler. Bugüne kadar ikincil metabolit üreten 2000'nin üzerinde bakteri karakterize edilmiştir.

Üstel faz biter bitmez ikincil metabolizma adı verilen başka bir faz başlar. Bu faz sonunda üretilen maddeler “ikincil metabolitler” olarak adlandırılır. Bu faz, sınırlı besin maddesinde veya atık ürünlerin birikmesi durumunda ortaya çıkar. Her ne kadar antibiyotikler, alkaloidler, steroidler, gibberellinler, toksinler, vb. gibi bileşikler, hücre materyallerinin sentezi ve büyümeleri ile doğrudan bir ilişkiye sahip olmamakla birlikte, küçük miktarlarda üretilirler. Bu nedenle ikincil metabolitler, birincil metabolitlerin son ürünleri olarak kabul edilir (URL-2, 2019).

İkincil metabolitler yalnızca çok spesifik mikroorganizmalar tarafından üretilir, çoğunlukla antibiyotikler ve diğer ürünlerin eldesi için kullanılır. Genel olarak mikroorganizmalar, genellikle birden çok ikincil metabolit bileşiği sentezler. Yukarıda belirtildiği gibi, bu ikincil metabolitler doğrudan hücre büyümesine ve gelişmesine fayda

sağlamazlar, ancak hücrenin hayatta kalmasını destekleyen bazı bilinmeyen işlevler gerçekleştirirler (URL-2, 2019).

Birincil ve İkincil Metabolitler Arasındaki Temel Farklılıklar

1. Birincil metabolitler, organizmaların büyüme evrelerinde üretilen ürünler olarak kabul edilir. İkincil metabolitlerin, bir mikroorganizmanın büyümesi sırasında durağan fazda yer alan ve ekolojik fonksiyonlarda rol oynadığı birincil metabolitlerin son ürünleri olduğu söylenmektedir.
2. Birincil metabolizma yolu, büyüme safhasında meydana gelir ve aynı zamanda trophofaz olarak bilinir, ikincil metabolizma yolu ise durağan fazda meydana gelir ve aynı zamanda idiofaz olarak da bilinir.
3. Birincil metabolitler büyük miktarlarda üretilir ve ekstraksiyonları kolaydır, aslında ürünler her türde aynıdır, ikincil metabolitler küçük miktarlarda üretilir ve ekstraksiyonu zordur, hatta ürünleri farklı türler için farklıdır.
4. Birincil metabolizma yolu boyunca üretilen ürünler, endüstrilerde çeşitli amaçlar için faydalıdır ve ayrıca hücre büyümesinin çoğalmasında ve gelişmesinde çok önemli bir rol oynar. Antibiyotikler gibi ikincil metabolitler ise uzun süre hayatta kalmak için hücreye dolaylı olarak destek verirler.
5. Vitaminler, karbonhidratlar, proteinler ve lipitler birincil metabolitlere; fenolikler, steroidler, uçucu yağlar, alkaloidler ve steroidler ise ikincil metabolitlere örnektir (URL-2, 2019)

Miksobakterilerden üretilen hücre iskeleti ile etkileşime giren diğer bileşikler disorazol, kondramid ve rizopodindir. Potansiyel bir diğer antitümör ilaç, proteazomu inhibe eden arginindir. *Sorangium cellulosum*'dan elde edilen soraphen'in antifungal etkisi vardır ve bitki korumasında kullanılmak üzere değerlendirilmiştir. Ökaryotik hücrelerde asetil-CoA karboksilazı ile etkileşime girer ve aktivitesini inhibe eder. Asetil-CoA karboksilaz, yağlı asit sentezi için önem taşıdığından kanser ve obezitenin tedavisinde yararlı olabilir (Revermann, 2012).

Çoğu biyoaktif madde, asetat veya aminoasitlerin metabolizmasından kaynaklanır. Sentetik yetenek, soylara spesifiktir, türlere özgü değildir. Şimdiye kadar sadece yaklaşık 40 çeşit miksobakteri bulunmuştur fakat çok sayıda suş izole edilmiştir, bu, aynı bileşiklerin, farklı türlerin, cinslerinin ve hatta miksobakterilerin ailelerinin suşlarında

ortaya çıktığı anlamına gelir (Dawid, 2000). Tablo 2.2’te Miksobakterilerin ürettiği biyoaktif ikincil metabolitler yer almaktadır.

Tablo 2.2. Miksobakteriler ürettiği biyoaktif ikincil metabolitler

Bileşik	Yapısal Sınıf	Biyolojik Aktivite
Ambruticin	Lakton	Antifungal
Althiomycin	Siklik Peptid	Antibakteriyel
Angiolam	Makrolakton	Antibakteriyel
Aurachin	Kinolon	Antifungal, Antibakteriyel
Corallopyronin	a-piron	Antibakteriyel
Epothilone	Makrolakton	Antifungal, Sitotoksik
Etnangien	Makrolakton	Antibakteriyel, Antiviral
Haliangicin	Polien	Antifungal, Sitotoksik
Jelangolid	Lakton	Antifungal
Leupyrrin	Makrodilakton	Antifungal, Sitotoksik
Myxovalargin	Peptid	Antibakteriyel, Sitotoksik
Pedein	Siklik Peptid	Antifungal, Sitotoksik
Phenalamide	Polien	Antiviral
Ripostatin	Makrolakton	Antibakteriyel, Antifungal
Sorangicin	Makrolakton	Antibakteriyel
Tubulysin	Peptid	Sitotoksik
Thuggacin	Macrolid	Antibakteriyel

Miksobakteriyel biyoaktif maddelerin aktiviteleri için birkaç örnek şöyledir:

1- RNA polimerazlarını bloke eden kimyasal maddeler: 1983'te *Mx. fulvus*'dan izole edilen myxosporin ve *Cc. coralloides* tarafından üretilen corallopyronin (1985) adlı maddelerin her ikisi de Gram (+) bakteriler üzerinde etki eder ve Gram (-) hücrelere nüfuz etmemektedir. Corallopyronin'nin myxosporine göre RNA Polimeraz inhibisyonunda daha başarılı olduğu, bunun da yapılarında yer alan piron halkasının 3. karbonundaki yan zincirden kaynaklandığı bilinmektedir (Irschik vd., 1984). *So.cellulosum* suşları (1985) tarafından üretilen sorangisin, Gram (+) bakterilere karşı, yüksek dozlarda da Gram (-) bakterilere karşı iyi etki gösterir.

2- Ökaryotlarda protein sentezini bloke eden üç mikrobakteryal antibiyotikten, myxovalargin en iyi incelenen yöntemdir. *Mx. fulvus*'un bir suşunda bulunmuştur. Aynı zamanda *Cc. Coralloides* ve *Argegephyra* da bulunmuştur. Maya ve küflere karşı inaktiftir. Ayrıca Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı da antibiyotik etkinliği vardır.

3- Şimdiye kadar mikrobakterilerden on bir farklı elektron taşıma inhibitörü izole edilmiştir. *Mx. fulvus* türünden elde edilen myxothiazol (1980) solunum zincirindeki sitokrom kompleksini bloke ederken, NADH ubikinon oksido redüktaz, *Mx. xanthus*'tan myxalamide (1983) ve *Sg. aurantiaca*'dan aurachine (1987) tarafından bloke edilmiştir. Bu maddeler antifugal aktivitelere sahiptir (Reichenbach ve Höfle, 1993). Thuggacin A *Mycobacterium tuberculosis*'in elektron taşıma sistemine etki eder ve bu bileşiği anti-tüberküloz tedavisi için ilginç bir potansiyel aday yapmaktadır (Steinmetz vd., 2007).

4- 1987'de umut verici bir madde *So.cellulosum*'dan izole edilmiştir: epotilon (Jahn, 1911). Ökaryotik hücrelerin hücre iskeletine etki ederek hücre bölünmesini bloke eder ve hücre ölümüne yol açar. Etki alanı dar olup bakteriler üzerinde pek etkili değildir ve mantarlar üzerinde nadiren etkilidir. Epotilon kanser hücreleri üzerinde etkilidir. Yumurtalık kanseri, göğüs kanseri ve bağırsak kanserine sebep olan hücrelerin gelişmesini durdurucu etkiye sahiptir (Reichenbach, 1996). Epotilonlar, mikrotübüle etkileyen yeni bir grubu oluştururlar. İksabepilon, meme kanseri tedavisinde kullanılan bir epotilon türevi ve makrolid antibiyotiktir (Abudayyak vd., 2018).

Fonksiyonlarına Göre İkincil Metabolitler

Mikroorganizmalar dünya çapında bulaşıcı ve ölümcül hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotikler, antitümör ajanlar, immünoşüpresanlar, alkaloidler ve enzim inhibitörleri üretir ve ölüm oranının düşürülmesinde ve insan yaşam beklentisinin azalmasında anahtar rol oynar (Singh vd., 2017).

Mikrobakterilerden elde edilen ilk antibiyotik mbrütisin yapısı 1977'de aydınlatılmıştır. (Corominas-Faja vd., 2014). O zamandan beri mikrobakterilerden yeni antibiyotik arayışları devam etmektedir. Antibakteriyel, antiviral ve antifungallere ek olarak, mikrobakteriyel metabolitler, antitümör ilaçlar olarak işlev görür ve insülin duyarlılaştırıcı ve immün düzenleyici özellikler sergiler (Weissman ve Muller, 2009). Ek olarak, antimalaral, antihipertansif, antihiperkolesterolemik, antidiyabetik ve insülin duyarlılaştırıcı özellikleri de mikrobakteriyel metabolitlere bağlanabilir (Berod vd., 2014).

2.4.1.1. Antibakteriyel Etki

Mikroorganizma kaynaklı hastalıklar her geçen yıl artmakta ve halk sağlığı için büyük bir tehdit haline gelmektedir (Jones vd., 2008). Bakteriler, mantarlar, virüsler, prionlar, riketsiya ve diğer mikroorganizmalar tarafından insanlara bulaşan 200'den fazla hastalık bilinmektedir (Diana vd., 2010).

Günümüzde tedavi amacıyla kolayca kullanılan antimikrobiyal maddelerin, antibiyotik adı altında tıp hizmetine sunulduğu yenidir. Ancak tabiatteki antimikrobiyal madde oluşumu şüphesiz canlılar tarihi kadar eskidir. Alexander Fleming'in 1929'da, stafilokokların üremesini engellediğini tespit ettiği *Penicillium notatum*, bu faaliyetini milyonlarca yıldan beri sürdürmekteydi. Ancak maddenin endüstriyel uygulamaları ve antibiyotiklerin tedavide kullanılışı 1940'lardan sonra başlamış ve hızla gelişmiştir. 1950'lerde Streptomisin, Kloramfenikol ve Tetrasiklinlerin izolasyonlarını, bu ve benzeri antibiyotiklerin klinik kullanımındaki artışı takip etmiştir. Yeni antibiyotiklerin keşfi ve yarı sentetik antibiyotik üretimi, tıbbi tedavi olanaklarını önemli oranda zenginleştirmiştir (Todar, 2008). Ancak, antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı ve ilaçlara karşı direnç kazanmış patojen mikroorganizmalar sebebiyle, tüm Dünyada antibiyotik direnci ana problemlerden birisi olmuştur. Dolayısıyla, yeni ve etkili antimikrobiyal maddelerin bulunması zorunlu hale gelmiştir. Toprak mikroorganizmalarının çeşitliliği bu konuda geniş bir kaynak sunmaktadır (Başkaya ve Kocabaş, 2016).

Prokaryotlar arasında horizontal gen transferinin yaygın olması nedeniyle antibiyotiğe dirençli bakteri türlerinin gelişmesi Dünyada yeni nesil antibiyotiklerin keşfine yönelik ilgiyi canlı tutmaktadır.

Antibiyotikler, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların belli bölgelerine olumlu ve/veya olumsuz yönde etki gösterebilen, düşük moleküler ağırlığa sahip, mikrobiyal kökenli ikincil metabolitlerdir. Moleküler ağırlıkları 150-5000 dalton arasında değişir. Molekülleri karbon, hidrojen, oksijen ve azot, hatta diğer bir kısmı kükürt, fosfor veya halojen atomlarını içerir. Sidal ya da statik etkili olabilen antibiyotikler; kimyasal yapılarına, üretici organizmaya, etki spektrumlarına ve hücrede etkili oldukları hedef bölgelere göre farklı gruplara ayrılabilirler. Terapötik ya da koruyucu amacının yanında, hayvanın günlük besinine antibiyotik karıştırılarak hayvan beslenmesinde de kullanılır. Bu olay antimikrobiyallerin hayvan büyümesini teşvik etmesi ve dolayısıyla hayvanın yeterli ağırlığa sahip olması için uygulanmaktadır. Ayrıca antibiyotikler; besinlerin saklanması, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçiciliği sağlamada araştırma

materyali olarak, tarımda koruyucu madde ya da büyüme hızlandırmak için kullanılmaktadır (Oskay ve Tamer, 2009).

Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almakta; tıbbın dışında tarım gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaları önemlerini daha da artırmaktadır. Bu yaygın kullanımları ise hem ekonomik yükü hem de yan etkilerinin sıkça ortaya çıkmalarına yol açmış bu ise aynı zamanda, toplum sağlığını da tehdit eder bir hale gelmelerine neden olmuştur. Özellikle az gelişmiş toplumlarda bilinçsizce kullanılması ve patojen mikroorganizmaların bunlara karşı hızla direnç kazanmaları sorun olmaktadır. (Oskay ve Tamer, 2009).

Patojen organizmaların patojen olmayan ancak antibiyotiklere direnç geni taşıyan organizmalardan da bu direnç genlerini kolayca alabilmeleri, doğal ortamlarında özellikle toprakta bulunan ve henüz keşfedilmemiş antibiyotiklerle insanlardan çok daha önce tanışmalarıdır. Durum böyle iken ve bulaşıcı salgınlar başlamadan önce yeni ve etkili antibiyotik aktif maddelerinin bir an önce keşfedilmesi yerinde olacaktır (Oskay ve Tamer, 2009).

Son yarım yüzyılda, direnç gelişimine karşı tek seçenek, yeni antimikrobiyal maddelerin keşfedilmesi olmuştur. 1960'lara kadar elde edilebilmiş sınırlı sayıdaki antibiyotiklerin aşırı kullanımı, antibiyotik keşfi çağının sonunu getirmiştir. Klinikte kullanılan antibiyotiklerin çoğu, kültürü yapılabilen az sayıdaki toprak mikroorganizmalarından elde edilmiştir. Sentetik antimikrobiyaller bakteri hücrelerine yeterli oranda penetre olamamasından dolayı doğal olanların yerini alamamıştır. Doğal ürünler, hedef mikroorganizmalara penetrasyon zorluğunu aşarlar. Yeni antibiyotik kaynağı olabilecek toprak mikroorganizmalarının % 99'undan çoğunun *in vitro* şartlarda kültürü yapılamadığı için bu faydalı bakterilerden antibiyotiklerin keşfedilmesi yıllar önce durmuştur. Günümüzde, önceki yıllarda kültürü yapılamamış bu toprak mikroorganizmalarını üretmek için kendi doğal ortamlarının kullanıldığı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Böylece doğal ortamlarında üretilen bakterinin daha önce farkedilemeyen gen ürünlerinin elde edilmesi ve kimyasal farklılıklarının ortaya çıkarılması sağlanabilmektedir (Lewis, 2013; Ling vd., 2015).

Bir strateji olarak daha eski fakat az kullanılan antibiyotiklerin kullanımı hem laboratuvarlarda hem de klinik çalışmalarda devam etmektedir. Son yıllarda, metisiline dirençli bakteriler adı verilen Gram (+) patojenler arasında direnç gelişimi konusunda büyük endişe duyulmaktadır.

En çok satan ilaçların neredeyse yarısı doğaldır veya doğal ürünlerle ilgilidir. Genellikle, doğal molekül kendisi kullanılmamıştır, ancak kimyasal veya genetik yollarla manipülasyon için öncü bir molekül görevi görmüştür. Aspirin buna iyi bir örnektir (Demain, 1999). Yirminci yüzyılda yaşam ömrünün iki katına çıkmasının temelinde bitki ve mikrobiyal ikincil metabolitlerin kullanımına bağlı olduğu belirtilmiştir (Verdine, 1996).

Günümüzde sentetik antimikrobiyal maddeleri tanımlama ve geliştirme aşamalarının yüksek maliyetler gerektirmesi sebebiyle çalışmalar doğal aktif bileşenleri bulma ve geliştirme alanına doğru yön değiştirmiştir. Antimikrobiyal maddeler doğal kaynaklardan elde edildiğinde, sentetik maddelerin neden olduğu yan etkilerinin de ortadan kalkacağı ve bazı antibiyotiklere karşı direnç oluşturmuş türler için de alternatif olabilecekleri düşünülmektedir. Doğal kaynak olarak nitelendirilen toprak mikroorganizmalarına yönelmenin en temel nedenlerinden biri de ekonomik olarak, bulunma ve ulaşılma güçlüğü olmamasıdır. Bir tür ne kadar zor şartlarda kalırsa savunma mekanizmasını da o kadar güçlü tutmaya çalışmaktadır. İkincil metabolitler genellikle bir savunma mekanizması olarak tanımlanırlar ve bu yüzden türlerin buldukları ekolojik koşullar, onların antimikrobiyal etkinliğinde önemlidir (Başkaya ve Kocabaş, 2016).

Miksobakterilerden yüzün üzerinde yeni kimyasal yapı iskelesi keşfedilmiştir (Garcia ve Müller, 2009; Gerth vd., 1996). Bunun dışında, son birkaç yıl içerisinde, farklı biyolojik aktiviteler gösteren farklı miksobakteri türlerinden çok umut verici bileşikler de tanımlanmıştır (Surup vd., 2014). Tablo 2.3'te ticari olarak piyasada bulunan ve kullanımda olan ürünlere yer verilmiştir.

Tablo 2.3. Mikrobiyal doğal ürün kaynaklı pazarlanmış antibiyotik örnekleri

İkincil metabolit	Ticari adı	Elde edildiği mikroorganizma
Penicilin	Penicillin G, V, Ampicillin, Methicillin, Amoxicillin, Carbenicillin	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>
Cephalosporins	MEFOXIN (Cefoxitin), CECLOR (Cefaclor), CLAFORAN (Cefotaxime), ROCEPHIN (Ceftriaxone), CEFTIN (Cefuroxime)	<i>Acremonium spp.</i> , <i>Emericellopsis spp.</i> , <i>Amycolatopsis lactamdurans</i> , <i>Streptomyces clavuligerus</i>
Tienamisin	PRIMAXIB (Imipenem), INVANZ (Ertapenem)	<i>Streptomyces cattleya</i>
Eritromisin	ERYTHROCIN, ZITHROMAX (Azithromycin), BIAXIN (Clarithromycin), KETEK (Telithromycin)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Vancomisin	VANCOGIN	<i>Streptomyces orientalis</i>
Fosfomisin	MONURIL	<i>Streptomyces fradiae</i>
Mupirosin (pseudomonic asit)	BACTROBAN	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Fusidik asit	FUSIDIN LEO	<i>Fusidium griseum</i>
Streptogramins	SYNERCID	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Daptomisin	CUBICIN	<i>Streptomyces roseosporus</i>

Bir grup araştırmacı, geliştirdikleri iChip teknolojisi ile toprak bakterilerini *in vitro* şartlarda üretmeyi başararak bu bakterilerden farklı yapı ve etki mekanizmasına sahip olan yeni bir hücre duvarı inhibitörü elde etmişlerdir. iChip teknolojisi, çevre mikroorganizmalarının kendi doğal ortamlarında üremelerine imkân veren bir sistemdir. Şekil 3.3'te gösterilmekte olan üzerinde toplam 384 kuyucuk olan (72-19-1mm) bir plastik levha, kültürü yapılacak doğal ortam süspansiyonu içine daldırılır. Plaktaki her bir kuyucuk, ortamın bakterilerini de içeren süspansiyon sıvısını içine hapseder. Daha sonra

kuyucukların üst ve alt yüzeyine yarı geçirgen membran yerleştirilir ve bunlarında üstüne kuyucukları aynı hizada olacak şekilde kuyucuklu üst ve alt plaklar yerleştirilerek sıkıca vidalanır. Bu sistem, doğal ortamında inkübe edilir. İnkübasyon sonrası plaklar ayrılır, membranlar deliklerde bulunan bakterilerle birlikte alınır ve laboratuvar şartlarında üremeleri sağlanır (Ling vd., 2015).



Şekil 2.3. iChip Cihazı (Ling vd., 2015)

Araştırmacılar, bu şekilde önce kendi doğal ortamında, daha sonra da besin maddeleri ve üreme faktörleri katarak *in vitro* şartlarda üretmeyi başardıkları *Eleftheria terrae*'den, “teiksobaktin” olarak isimlendirilen yeni bir hücre duvarı inhibitörü antimikrobiyal madde elde edildiğini bildirmişlerdir. *E. terrae* yeni keşfedilen bir bakteridir. Bakteri genomunun dizi analizi çıkarılmıştır. Taksonomide beta-proteobacteria sınıfı içinde yer alır (Ling vd., 2015).

Teiksobaktin Gram (-) bir bakteri tarafından üretilir. Bakteri, ürettiği bu maddeyi dışarı atar ve tekrar içeri girmesi engellenir. Böylece, kendisini antibiyotiğin etkisinden korur (Ling vd., 2015).

Teiksobaktin, Gram (+) bakterilerde peptidoglikan öncü maddesi olan ve çok iyi korunan lipid II'ye ve hücre duvarındaki teikoik asidin öncü maddesi olan lipid III'e bağlanarak etkili olur. Hücre duvarı teikoik asit oluşumunun geç dönem sentezi aşamasında engellenmesi, üretilmiş toksik etkili ara ürünlerin birikimine neden olur. Bu da bakterisit etkiyi oluşturur. Ayrıca, teikoik asitler, peptidoglikan sentezini önleyen otolizinleri bağlar. Bu da bakteriyi otolizinlerinin yıkıcı etkisinden korur. “Teiksobaktin”,

bakteri hücresi teikoik asidinin öncü maddelerine (lipid III) bağlanarak teikoik asitin sentezlenmesini engelleyip, otolizinlerin serbest kalmasına ve hücrenin lizisine sebep olur. Böylece, antibiyotiğin mükemmel litik ve bakterisit etkisi ortaya çıkar (Ling vd., 2015).

Teiksobaktin'nin, peptidoglikan sentezinde rol alan enzimlerden birini engellemediği, DNA, RNA ve protein sentezine etkili olmadığından dolayı, yeni bir peptidoglikan sentezi inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Ling vd., 2015).

2.4.1.2. Antitümör Ajanlar

Tümörler genellikle cerrahi olarak çıkarılma, radyasyon ve kemoterapi ile tedavi edilir. Metastatik kanseri tedavi etmek için cerrahi yöntemler ve radyasyon tedavisi yetersizdir ve bu nedenle, kemoterapi, vücudun diğer bölgelerine yayılan kanserin tedavisinde ağırlıklı olarak faydalıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, yılda yaklaşık 8,2 milyon insan kanserden ölmektedir. Dünya çapında tüm ölümlerin % 13'ünü oluşturduğu tahmin edilmekte ve önümüzdeki yirmi yılda % 70'lik yeni kanser vakalarının artması beklenmektedir (URL-3, 2019).

Farmasötik endüstrisinde en yüksek uygulamaya sahip miksobakteriyel bileşikler, *Sorangium cellulosum* kaynaklı A ve B epotilonlarıdır (Egerton, 2008). Toksanlar ve antrasiklinler kullanan kemoterapilere etkili bir alternatif olarak, meme kanserinin farklı aşamalarında hastaların monoterapisi için yarı sentetik bir epotilon türevi İksabepilon geliştirilmiştir (Pivot vd., 2007). Günümüzde, bu bileşiklerin değiştirilmiş versiyonları, çeşitli kanser türlerine karşı klinik deneylerde test edilmektedir (Surup vd, 2014).

2.4.1.3. İmmünosupresif Aktivite ve Organ Nakli

Antibakteriyel ve antitümör ajanların yanı sıra diğer değerli enzim inhibitörleri immünosupresanlar içeren bileşikler ve alkaloidler farmakolojik öneme sahiptir ve ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Organ transplantlarının reddedilmesini önlemek ve otoimmün hastalıkları sınırlamak için immün sistemin etkinliğini azaltmak için immünosupresif ilaçlar gerekir. Organ nakli alanındaki immün yanıtın baskılanmasındaki önemli rolleri nedeniyle bir dizi mikrobiyal kökenli bileşik bildirilmiştir.

2002 yılında keşfedilen ve bir miksobakteri olan *Archangium gephyra* tarafından üretilen Argyrin güçlü immünosüpresif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş siklik bir peptittir (Weissman ve Müller, 2010).

2.4.1.4. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Üretimi

Mikrobakterilerin çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) üretme potansiyelleri bulunmaktadır. PUFA'lar ticari olarak değerlidir ve insan sağlığı için elzemdir. Çoklu doymamış yağ asitleri, özellikle eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA), ilaç ve gıda endüstrisi için özel bir öneme sahiptir. Bu yağ asitleri yaygın olarak gıda ve süt ürünlerinde takviye ve ilaç olarak (örneğin, hipertrigliseridemi tedavisinde) kullanılır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin üretimi bakterilerde nadir görülmesine rağmen, deniz mikrobakteri cinsi olan *Plesiocystis*, *Enhygromyxa*, *Haliangium* ve son zamanlarda toprakta izole edilmiş *Phaselicystis* türlerinden elde edilmişlerdir. Çok fazla miktarda EPA ve DHA, *Sorangium* izolatlarından biri olan “*Aetherobacter SBSr008*”de bulunmuştur (Garcia vd., 2011).

Çoklu doymamış yağ asitleri kalple ilişkili birçok hastalığın önlenmesinde, birçok immün inflamatuvar reaksiyonda ve beyin gelişiminde rol oynarlar. İnsan sağlığına önemli yararları nedeniyle sürekli araştırma konusu olmuştur (Garcia vd., 2011).

2.4.1.5. Biyokontrol Ajanlar

Yabani otlar, tarım alanlarını ve doğal alanları tehdit etmeye yol açar; Bununla birlikte, birçok yabani ot için yeterli, uygun maliyetli kontrol önlemleri mevcuttur. İstenmeyen bitkilerin istila edilmesini önlemek için biyolojik kontrollerin tanıtılması. Genomik, genom madenciliği ve moleküler tekniklerde son gelişmeler Biyo-kontrol ajanlarının geliştirilmesi, kimyasal herbisitlere ve yabancı ot yönetimi için daha fazla seçeneğe olan ihtiyacı azaltacaktır (Sharma vd., 2014).

Tarımsal öneme sahip bilinen bir antibiyotik olan pyrrolnitrin, mikrobakteri türlerinden *Myxococcus fulvus*, *Coralloccoccus exiguous* ve *Cystobacter ferrugineus*'tan izole edilmiştir (Gerth vd., 1982).

Fusarium roseum *Myxococcus xanthus*'un yağ asitleri tarafından inhibe edilmiştir. Çok çeşitli antibiyotik üretme ve bir dizi mikroorganizma yok etme kabiliyetlerine rağmen, mikrobakterilerin bitki sağlığındaki rolü göreceli olarak keşfedilmeye devam etmektedir (Bull vd., 2002).

Yapılan bir çalışmada mikrobakteriler, geleneksel olarak işlenen topraklarda ve 5 yıl veya daha uzun bir süre boyunca hiçbir fümigasyon oluşmadığı test edilen beş sertifikalı organik çilek üretim alanında da tespit edilmiştir. Toprağın MBC ile fümigasyonu mevcut yöntemler ile saptanabilen mikrobakterileri elimine etmiştir. Yedi

deneyden altısında, mikrobakteriler MBC fümigasyonlu arazilerde tespit edilmemiş veya fümigasyondan sonraki 1 ay içinde değerlendirilen numunelerin sadece %2,5'inde tespit edilmiştir. Buna karşılık, mikrobakteriler fümigasyonlanmamış kontrol alanlarının %17,5 ile %100'ünde tespit edilmiştir. Mikrobakteriler; *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia spp.*, *Cylindrocarpon spp.*, *Phytophthora capsici*, *V. albo atrum* ve *V. dahliae*'yi önemli ölçüde inhibe etmiştir. Sadece bir mikrobakteri; *M. coralloides*, *F. oxysporum f*'yi inhibe etmiştir (Bull vd., 2002).

2.5. Mikrobakterilerin Biyoremediasyonda Kullanım Olanakları

Tehlikeli maddeleri, zararsız veya daha az zararlı maddelere parçalamak için mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmektedir. Biyoremediasyon doğal olarak meydana gelen bir süreç olup, mikroorganizmaların çevresel kirlilikleri dönüşüme uğratarak son ürün haline getirmeleri sürecidir (Dindar vd., 2010).

Sağlık ve ekolojik yönden geniş alana yayılmış olan petrol ve petrol türevleri, gazolin, PAH, klorlu alifatikler (PCE), tetrakloretilen (TCE) ve klorlu aromatik hidrokarbonlar mikroorganizmalar tarafından kolayca detoksifikasyona uğratılırlar. Metaller bile biyolojik olarak parçalanamaları da mikroorganizmalar tarafından daha az zararlı hale dönüştürebilirler (Vidali, 2001).

Bu mikroorganizmalar arasında mikrobakterilerin önemli bir yeri vardır. Mikrobakteriler ürettikleri çeşitli enzimler sayesinde diğer mikroorganizmaları lize edebilmelerinin yanı sıra bazı makromolekülleri de parçalayabilmektedir. Bazı mikrobakteri türlerinin biyoremediasyon olanakları araştırılmış özellikle arseniğin doğal su kaynaklarından temizlenmesi amacıyla kullanılabileceği gösterilmiştir (Yamamura ve Amachi, 2014).

2.6. Toprak ve Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar dünya üzerinde, bitki ve hayvanların ortaya çıkışından milyonlarca yıl önce oluşmuşlardır. Hiçbir canlı türü, dünyada yaşamın desteklenmesi ve devamı için mikroorganizmalar kadar önemli değildir. Dünyadaki mikroorganizmaların çoğu toprak kökenlidir. Ekosistem üzerindeki toprağın mikroorganizmaların kendi bolluğuna rağmen oluşum süreci tam olarak anlaşılmamıştır (Gülle ve Özdemir, 2015).

Mikroskobun keşfi (1623-1723) ve mikrobiyolojinin doğduğu 17. yüzyıldan bu yana toprakta mikroskobik bir canlı popülasyonun varlığı bilinmektedir. 18. yüzyılda

mikroorganizmaların toprakta organik maddeleri ayrıştırdığı, bitki ve hayvan döngüsüne katıldığı bilirse de bu durum 19. yüzyılda Fransa'da Louis Pasteur tarafından açıklanmıştır. Pasteur ve Robert Koch'un 1880'li yıllarda gerçekleştirdikleri mikrobiyolojik yöntemler konusundaki bulguları ve bunların araştırmalara girmesi ile bakteri izolasyonlarında önemli adımlar atılmıştır (Haktanır ve Arcak, 2017).

Toprak, *in vitro* koşullarla kıyaslandığında besin ve enerji kaynakları bakımından mikroorganizmalar için genel olarak fakir ve sınırlıdır (Nannipieri vd., 2003). Bunun yanında hem mikroorganizma sayısının fazla olması hem de çeşitlilikten kaynaklı olarak mikroorganizmalar arasında bir rekabet ortamı oluşur. Bu rekabette mikroorganizmalar yaşam için avantaj sağlamak amacıyla ürettikleri toksik maddeleri kullanarak kendileri için daha geniş alan, organik madde ve su gibi faktörlere sahip olmaya çalışırlar. Bu durum yeni antimikrobialerin keşfedilmesi için toprağın seçilip, analiz edilmesinin bir sebebidir (Yıldırım, 2004).

Caron (1895), tıp biliminde hastalık etkeni mikroorganizmalar ne denli önemliyse toprak mikroorganizmalarının da toprak bilimi için o düzeyde öneme sahip olduğunu vurgulamıştır. Tıbbi mikrobiyoloji gelişimi toprak mikrobiyolojisini de etkilemiş, özellikle İkinci Dünya Savaşı yıllarında, toprak mikroorganizmalarından çeşitli antibiyotikler elde edilerek, tıp alanında önemli gelişmeler olması toprak mikroorganizmalarının ekolojilerini de önemli hale getirmiştir (Haktanır ve Arcak, 2017).

Toprakta bulunan mikroorganizmaları içerisinde miksobakteriler ayrı bir öneme sahiptir. Miksobakteriler; çoğunlukla ilginç şekilleri ve ayrışma olaylarındaki önemleri vurgulanan bakterilerdir. Bazı miksobakteriler diğer bakterileri çözme ve özümleme özelliği gösterirken, diğerleri saprofitiktir. *Cytophaga* cinsi özellikle selülozun aerob ayrışmasında aktif rol oynar. Bu tür içinde ayrıca kitin ayrıştıran gruplar da yer alır. Miksobakteriler toprakta çok yaygın olup özellikle vejetasyon gübre, kompost ve çürümekte olan odunsu dokunun ayrışmasında etkilidirler (Haktanır ve Arcak, 2017).

Yaşam döngüleri içinde, özelleşmiş bir meyve gövdesi oluşturur ve sonunda çubuk şekli alırlar. En yaygın bulunan türleri *Chondrococcus*., *Archangium* ve *Polyangium*' dur. Miksobakteriler agar besi ortamı üzerine çok az toprak konularak yapılan aşılama sonucu, inkübasyonu takiben çıplak gözle görülebilen meyve gövdeleri oluşumu ile izlenebilirler. Ancak bu işlem sırasında agar besi ortamına özel bir bakteriyel süspansiyon ile de aşılama yapılmalıdır. Bu teknik miksobakterilerin ortamdaki diğer bakterileri çözmesi (lisis) ve onları besin kaynağı olarak kullanması ile ilgilidir. Lisis mekanizması bakterileri çözmek için ekstraselüler enzimlerin salgılanması ile ilgilidir. Miksobakterler bütün işlenen

topraklarda bulunabilir. Kontrol edilen çayır topraklarında her bir gram toprakta 2000 ile 76.000 civarında populasyon saptanmıştır. Nemli topraklarda büyük populasyonların bulunması, bu organizmaların kurak koşullara dayanıklı olmadığını göstermektedir (Haktanır ve Arcak, 2017).

2.7. Termal Su Kaynakları ve Mikroorganizmalar

Hidrotermal kuyular ve sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır (Baker vd., 2001). Yapılan pek çok çalışmada, sıcaklığın mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğu, yüksek sıcaklığın farklı mikroorganizmalar tarafından farklı derecelerde tolere edildiği, pek çok ökaryotik canlının kısa bir süre bile olsa 50°C sıcaklığa dayanamazken, bir grup mikroorganizmanın daha yüksek sıcaklıklarda bile yaşayabildiği bildirilmiştir (Özşahin ve Kaymaz, 2013).

Ülkemiz sınırları içinde ise sıcaklığı 40°C'nin üzerinde olan 133 adet sıcak su kaynağı bulunmaktadır (Akkaya ve Kıvanç, 2009). Türkiye jeolojik ve jeomorfolojik özelliklerinin bir sonucu olarak termal kaynaklar bakımından zengin bir ülkedir. Sıcaklıkları genellikle 20°C'den fazla olan 600'ün üzerinde termal kaynak bulunan Türkiye'de, toplam termal kaynak sayısının 1300'den fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bu özellikleri yönüyle Türkiye, Avrupa'da birinci, dünyada ise ilk beş ülke arasında yer almaktadır (Özşahin ve Kaymaz, 2013).

Endüstride genellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen prosesler yer aldığından yüksek sıcaklığa dayanıklılık enzimler için oldukça önemlidir. Özellikle termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı günümüzde en fazla pratik ticari kullanım alanı bulmuştur. Son yıllarda yapılan birçok çalışma sıcak su kaynakları gibi ekstrem şartlardan izole edilen bakterilerin tanımlanması ve bunların önemli ürünleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Ekstrem şartlarda yaşamak ve çoğalmak için mikroorganizmalar metabolik ve diğer hücresel fonksiyonlarını bu ortamlara adapte etmişlerdir (Güven, 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Farklı bölgelerden (Antalya, Burdur, Denizli, Eskişehir ve Isparta) alınan 50 farklı toprak ve 6 farklı su örneği bakteri izolasyonu amacıyla toplanmıştır.

3.1.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Örnekler steril malzemeler kullanılarak aseptik olarak toplanmıştır. Alınan örnekler alındıkları bölgeleri tanımlayacak şekilde adlandırılmıştır. Örnekler tarih ve sayıları içerecek şekilde tanımlandıktan sonra, ortam sıcaklığında ve sterilite bozulmadan laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Bakterilerin gelişmesi, izolasyonu ve tanımlanması için kullanılmıştır. Bakterilerin topraktan izolasyonu için nutrient agar (Pancreatic digest of gelatin (5.0 g), Beef extract (3.0 g), Agar (15.0 g), Saf su (1000 mL) besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır. Meyvemsi yapı oluşturanların saflık kontrolleri yapıldıktan sonra stoğa alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolasyon

Laboratuvara getirilen örnekler 10 g'lık kısımlar halinde 20-25 °C'deki 90 mL FTS'ye ilave edilerek karıştırılmış ve bu şekilde hazırlanan 10^{-1} dilüsyondan yine 9 mL FTS ile 10^{-7} ye kadar seyreltme yapılmıştır (Özçelik, 1998). Hazırlanan dilüsyonlardan alınan 0,1 mL seyreltiler steril koşullarda izolasyon besiyerlerine homojen şekilde yayılarak 7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerin morfolojileri incelenerek miksobakteri olduğu tahmin edilenler seçilmiştir (Şekil 4.1).



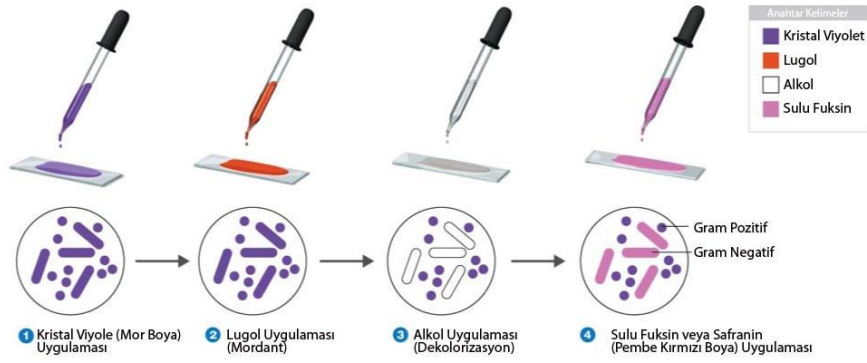
Şekil 3.1. Dilüsyon hazırlama ve ekim a) Besiyeri hazırlama, b) Dökme ekim, c) Dilüsyon hazırlama, d) İnkübasyon

3.2.2. Tanı testleri, besiyeri ve çözeltiler

Tanının gerçekleştirilmesi amacıyla seçilen izolatların koloni morfolojisi incelenerek, Gram boyama, kazeini hidrolize etme, Kongo kırmızısı ile boyanma özellikleri belirlenmiş ve stereo mikroskopta incelenerek koloni morfolojisi gözlemlenmiştir (Buchanan ve Gibbons, 1974).

3.2.2.1. Gram Boyama

Gram boyama tekniği, mikrobiyolojide sık kullanılan bir boyama yöntemi olup mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılmaktadır. Gram boyama ile bakteriler “Gram (+)” ve “Gram (-)” olarak ikiye ayrılmaktadır. Şekil 4.2’de Gram boyama aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Gram boyama aşamaları (URL-4)

3.2.2.2. Kazeini hidrolize etme

İzolatlar kazeini hidrolize etme yeteneklerini kontrol etmek için aşağıda bileşimi verilen yağsız süt içeren besiyerine (Gerhardt vd., 1981) ekilmiştir. Bu besiyerinde kolonilerinin etrafında renksiz zon oluşumu, kazein hidroliz edildiğinden pozitif sonuç olarak kabul edilmektedir. Besiyeri üzerine % 10'luk HCl çözeltisi damlatılarak HCl'in kazeinle girdiği reaksiyon sonucu bu bölgelerde mavi rengin ortaya çıkmaması kazeinin tamamen parçalanmadığı anlamına gelmektedir.

Yağsız sütlü besiyeri; çift kuvvetli 50 mL nutrient agar hazırlanarak 121⁰C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ayrıca 50 mL % 10'luk yağsız süt (w/v) hazırlanarak 121⁰C'de 5 dakika sterilize edilmiştir. Her iki besiyeri de 50⁰C sıcaklığa getirilerek aseptik koşullarda eşit miktarda karıştırılmıştır.

3.2.2.3. Kongo kırmızısını absorbe etme

İzolatların 0,01 gram kongo kırmızısı ve 100 ml su ile hazırlanan kongo kırmızısını absorbe etme özellikleri aşağıda bileşimi verilen kongo kırmızısı çözeltisinin koloniler üzerine damlatılmasıyla belirlenmiştir (Buchanan ve Gibbons, 1974).

3.2.3. Tanısı yapılan suşların saklanması

İzolasyon besiyerinde miksobakteri olduğu kanısı ile seçilen koloniler, tanı işlemleri süresince nutrient agara aşılanmıştır. Tanı testleri sonunda miksobakteri tanısı kesinleşen suşlar nutrient agardan hazırlanmış olan 5'er mL'lik yatık agarlarda (Şekil 4.3) stoğa alınmıştır. Bu suşlar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3.3. Yatık agara ekilen mikrobakteri izolatları

3.2.4. Bakterilerin üretilmesi

Sıvı besiyerine aşıl原因 örneklerin inkübe edilmesi amacıyla çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır. Bakteriler 200 d/d hızla çalkalanarak 28⁰C’de 24-36 saat inkübe edilmiştir (Farez-Vidal, 1994).

3.2.5. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

3.2.5.1. Agar Difüzyon Yöntemi

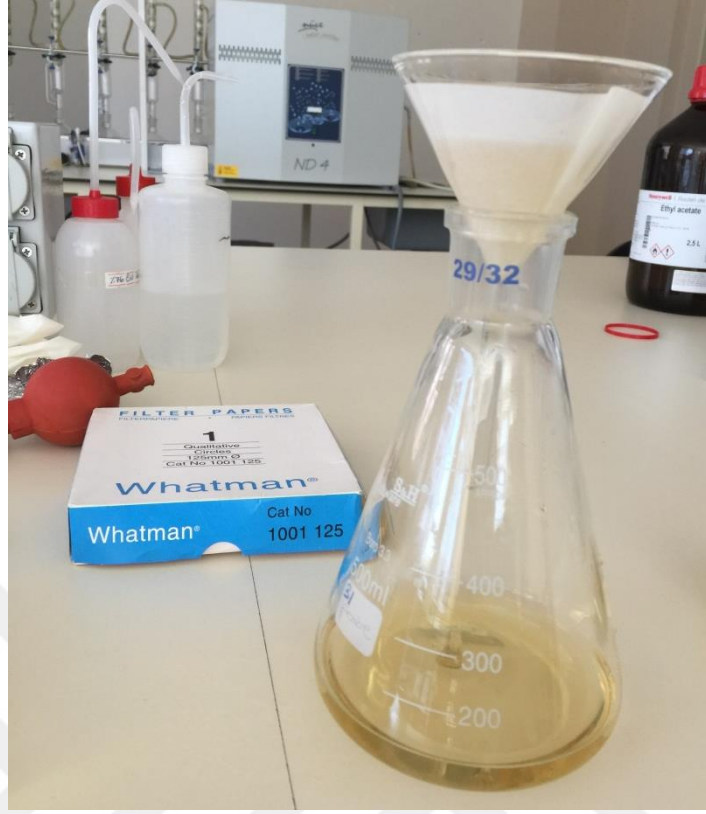
Elde edilen izolatların antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla; tanı testleri sonucunda mikrobakteri olduğu belirlenen suşlar 15 gün nutrient broth besiyerinde 28⁰C ve 150 rpmde çalkalaarak inkübe edilmiş ve daha sonra kültürlerden 500 mL ependorf tüplerine alınarak 13.500 d/d da 5 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı besiyerinde inkübe edilmiş ve bulanıklığı 0,5 Mcfarland bulanıklığa eşdeğer bulanıklığa ayarlanan *E. coli* kültüründen 100 µL hazırlanmış olan 5 mL soft agar içerisine eklenmiştir. İçerisinde nutrient agar bulunan petrilere hazırlanmış olan soft agar dökülmüş ve agarın katılaşması beklenmiştir. Katı halde bulunan soft agara pastör pipeti yardımıyla kuyucuklar açılmıştır. Söz konusu kuyucuklar içerisine 70 µl 4, 5, 8, 16, 25, 26 ve 28 kodlu örnkelerden konulmuş ve 35⁰C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Burada oluşan inhibisyon zonu antibakteriyel aktivitenin bulunduğunu göstermektedir.

3.2.5.2. Ekstraksiyon Yöntemi İle Biyoaktif İkincil Metabolit Üretimi ve Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Miksobakterileri izolatları biyoaktif ikincil metabolit üretimi için 1 L'lik şişeler içerisinde sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4). Besiyerine 2 öze dolusu bakteri izolatı inoküle edilip 37 °C'de 15 gün inkübe edilmiştir. Bu işlem 10 tane 1 L'lik şişelerde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler Whatman No:1 kağıdından filtre edilip, temiz Erlenmayer şişelerine aktarılmıştır (Şekil 3.5). Elde edilen örnekler üzerine 1:1 oranında etil asetat eklenerek 3 kez ekstrakte edilmiştir. Her bir etil asetat ilavesinden sonra 2 dk süre ile şişeler karıştırılmıştır. Karışma sonrası ayrılan üst faz (Şekil 3.6) alınarak döner buharlaştırıcıda 37°C sıcaklıkta ve 80 rpm'de etil asetat uçurularak ham metabolit ekstresi elde edilmiştir (Şekil 3.7). Döner buharlaştırıcıda balonun dibine yapışan ekstratlar de etil asetat eklenerek çözdürüldükten sonra etüvde tekrar etil asetat uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar üzerine dimetil sülfoksit ilavesi sonrasında antibakteriyel aktiviteleri belirlenmek üzere örnekler kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.8). Elde edilen ekstratlar -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. Miksobakterileri izolatlarının sıvı besiyerinde inkübasyonu



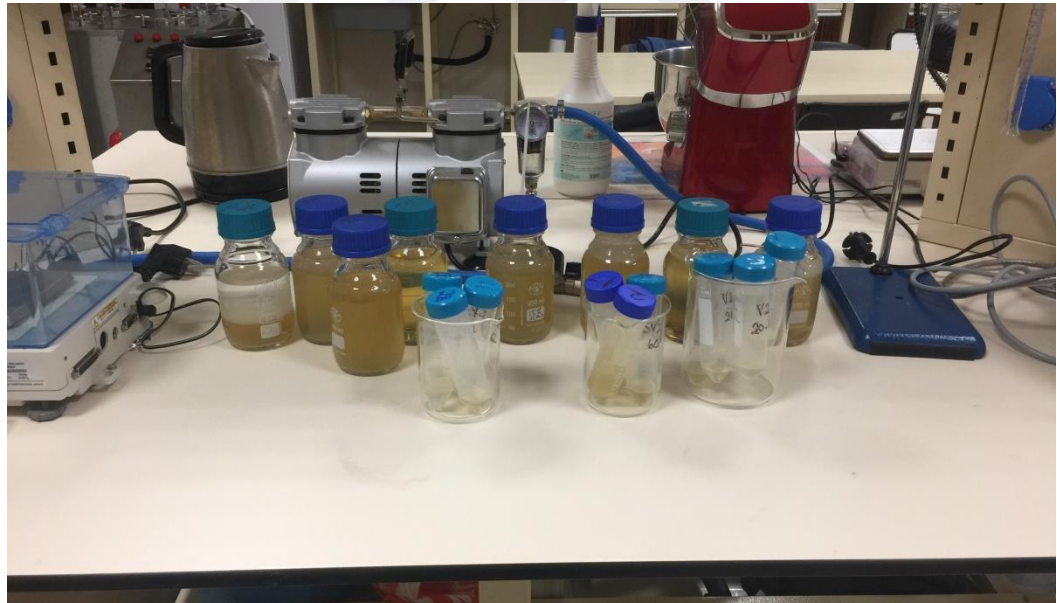
Şekil 3.5. İnkübasyon sonrasında örneklerin filtrasyonu



Şekil 3.6. Etil asetat ilavesi ile örneklerde gerçekleşen faz ayrımı



Şekil 3.7. Rotary evaporatör ile organik fazın uzaklaştırılması



Şekil 3.8. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktlar

Hazırlanan ekstraktlar antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi amacıyla sıvı besiyerinde inoküle edilmiş ve bulanıklık değeri 0,5 Mcfarland olan patojen suşlar *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* kültürlerinden 100 μ L, hazırlanmış olan 5 mL soft agara eklenmiştir. İçerisinde nutrient agar bulunan petrilere hazırlanmış olan soft agar

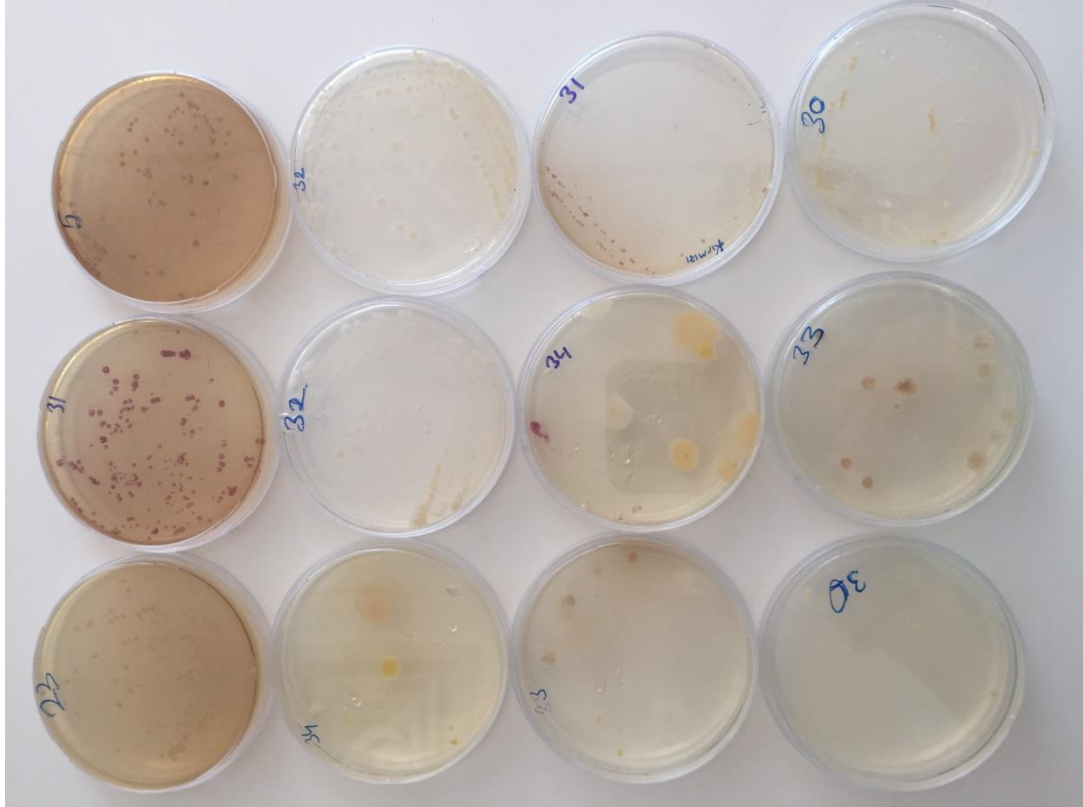
(BPW 25,5 g/L, Agar 5 g/L) dökülmüş ve agarın katılaşması beklenmiştir. Katı halde bulunan soft agara pastör pipeti yardımıyla kuyucuklar açılmıştır. Söz konusu kuyucuklar içerisine 70 µl örneklerden konulmuş ve her bir petrinin merkezine kontrol amaçlı gentamisin (Genta (80 mg)) isimli antibiyotik (1/10 oranında seyreltilerek) 50 µL ilave edilmiştir (Şekil 3.9). Ekimler 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Burada oluşan inhibisyon zonu antibakteriyel aktivitenin bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 3.9. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Saflaőtirmalar sonucunda toplam 56 örnekten 1. saflaőtirma sonucunda 21 adet, 2. saflaőtirma sonucunda 10 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlara tanı testleri uygulanarak antimikrobiyal aktivite testinde kullanılacak olan miksobakteri izolatları dođrulanmıőtir.



Şekil 4.1. Miksobakteri izolatlarının petri plağındaki koloni morfolojileri

Tablo 4.1. İzolatların özellikleri

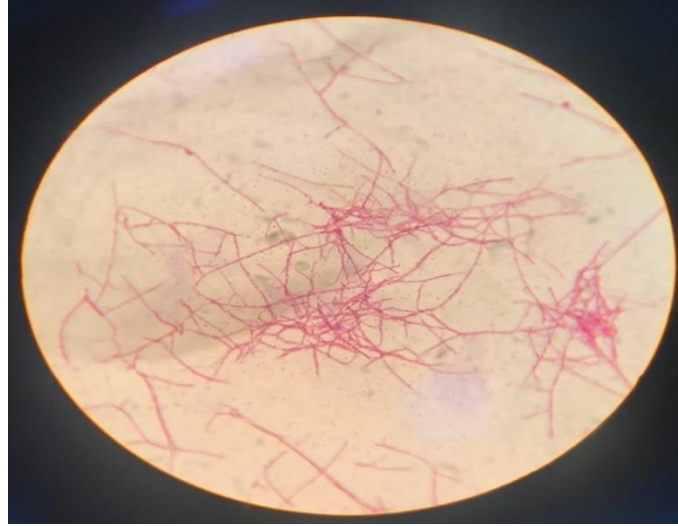
Kod	Suşlar	Gram Boyama	Kazein Hidroli zi	Kongo Kırmızısını absorbe etme	Çözünbilir Pigment	Koloni büyüklüğü ve şekli	Koloni rengi	Hücre şekli
4	TE- (10 ⁻³)	Gram (-)	-	+	-	Orta	açık sarı	çubuk
5	TE- (10 ⁻⁴)	Gram (-)	-	+	koyu sarı	Orta	kahverengi	çubuk
9	TE- (10 ⁻⁵)	Gram (-)	+	+	-	Orta	beyaz	çubuk
23	TB11- (10 ⁻³)	Gram (-)	-	+	açık sarı	çok küçük	gri	çubuk
28	TB11- (10 ⁻⁴)	Gram (-)	-	+	-	çok küçük	koyu sarı	çubuk
30	TB11- (10 ⁻⁶)	Gram (-)	-	+	-	çok küçük	çok açık sarı	çubuk
31	SB-(10 ⁻²)	Gram (-)	-	+	-	çok büyük	koyu pembe/mor	çubuk
32	TB8- (10 ⁻⁴)	Gram (-)	+	+	çok açık sarı	orta, zincir şeklinde	sarı (etrafı beyaz zonlu)	çubuk
33	KÜE- (10 ⁻³)	Gram (-)	-	+	-	Büyük	koyu sarı	çubuk
34	Sİ1- (10 ⁻³)	Gram (-)	-	+	açık sarı	Küçük	pembe/kırmızı	çubuk

TE: toprak örneği Eskişehir, TB: toprak örneği Bozkurt, SB: su örneği Bursa, KÜE:kümes toprağı Eskişehir, Sİ1: su örneği İzmir

Denizli, Eskişehir, Bursa ve İzmir İllerinden toplamda 56 örnek alınmış olup, 2. saflaştırma sonucu elde edilen 10 izolattan 8 tanesi toprak örneklerinden elde edilmiş ve İzmir ve Bursa illerinden alınan su örneklerinden mikrobakteri izolasyonu yapılmıştır. Başlangıçta 4 adet su örneğinden mikrobakteri eldesi ve 17 adet toprak örneğinden de mikrobakteri izole edilmiştir. Ancak yapay besiyerlerinde ikinci saflaştırmada bu sayı 10'a inmiştir. Bu sayısının iki tanesi İzmir ve Bursa illerinden alınan su örneğidir.

4.1. Gram boyama

Gram boyama sonucunda elde edilen veriler ekte belirtilmiştir. Gram (-) ve çubuk şeklinde oldukları bilinen mikrobakterilerin tanımlanması için yapılmış olan Gram boyama işlemi ile 10 adet izolatın Gram (-) özellik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.2. Miksobakteri izolatlarının Gram boyama sonrası ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (x100)

Tablo 4.2. Miksobakteri izolatlarının Gram boyama sonuçları

Suşlar	Gram boyama	Suşlar	Gram boyama
4	-	30	-
5	-	31	-
9	-	32	-
23	-	33	-
28	-	34	-

4.2. Kazeini hidrolize etme

Bu test, sütün proteinini oluşturan ve kolloidal karakterde bulunan kazeinin, bakterilerce sentezlenen, proteolitik ve ekstrasellüler bir enzim olan proteaz tarafından hidrolize edilebilme durumunu saptamak için kullanılmıştır. Mikroorganizmaların türlerinin tanımlanmasında işe yaramaktadır. Sütlü agar besiyerine çizgi tarzında mikroorganizmalar ekilerek petri kutusu 28°C de 2-14 gün kadar inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda koloniler etrafında oluşan açık alan, sütteki kazeinin hidrolize olduğunu ifade eder. Negatif durumlarda koloni etrafında hafif opaklaşma görülür. Besiyeri üzerine %10'luk HCL çözeltisi damlatılarak renk oluşumu gözlemlenir. HCL'nin kazein ile girdiği reaksiyon sonucunda bu bölgelerde mavi rengin oluşmaması kazeinin tamamen parçalanmaması anlamına gelmektedir. Kazeini hidrolize eden izolatlar Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3. Mikrobakteri izolatlarının kazein hidrolizi sonucunda petri plağındaki görüntüsü

Tablo 4.3. Kazein hidrolizi sonuçları

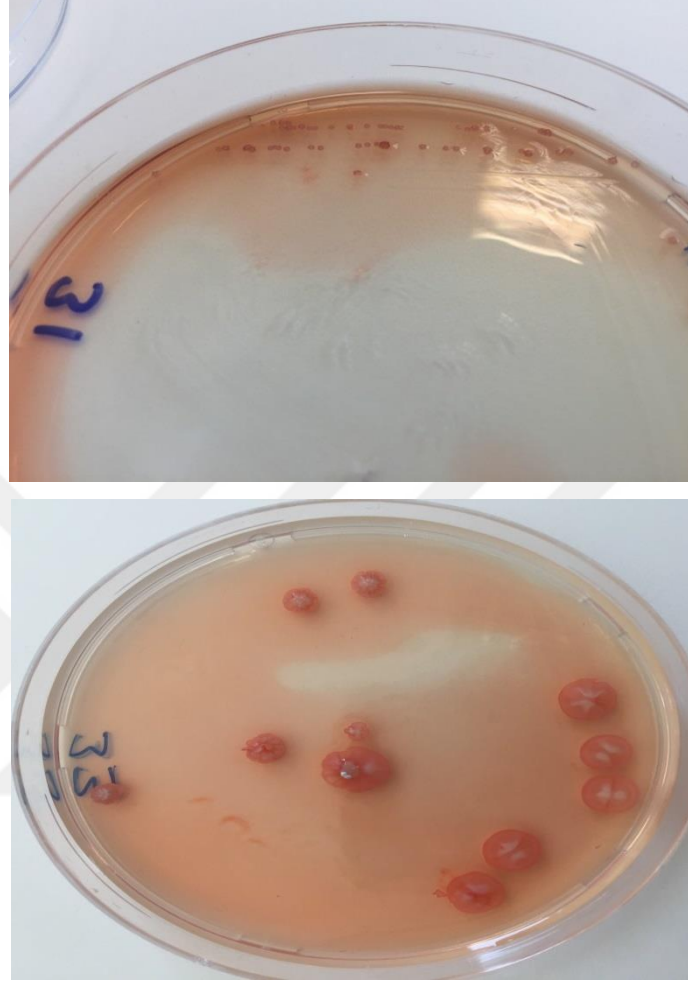
Suşlar	Kazein Hidrolizi	Suşlar	Kazein Hidrolizi
4	-	30	-
5	-	31	-
9	+	32	+
23	-	33	-
28	-	34	-

Tablo 4.3'e göre sadece Eskişehir ve Bozkurt/Denizli bölgelerinden alınan *Stigmatella* sp. 9 ve *Myxococcus* sp. 32 nolu örneklerin kazeini hidrolize edebildiği görülmüştür.

4.3. Kongo kırmızısını absorbe etme

Bazı mikroorganizmaların tanımlanmasında boyanma özelliklerinden yararlanır. Bu nedenle, mikroorganizmaları tanımda, boyama çok önemli role sahiptir. Bunun için

çok özel boyama yöntemleri ortaya konulmuştur. Bunlardan biri de Kongo kırmızısıdır. Kongo kırmızısını absorbe eden izolatlar Şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4. Kongo kırmızısı ile muamele edilmiş mikrobakteri kolonileri

Tablo 4.4. Kongo kırmızısı ile muamele sonuçları

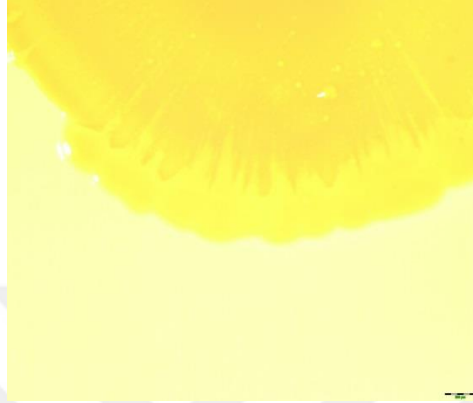
Suşlar	Kongo kırmızısı ile muamele	Suşlar	Kongo kırmızısı ile muamele
4	+	30	+
5	+	31	+
9	+	32	+
23	+	33	+
28	+	34	+

Tablo 4.4'te görüldüğü üzere tüm *mikrobakteri* örneklerinin Kongo kırmızısını absorbe edebildiği görülmüştür. Kongo kırmızısını hemen hepsi absorbe etmekle birlikte

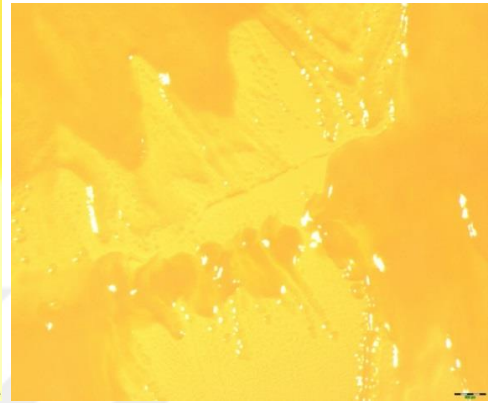
Sorangineae takımına ait bazı türler ve *Kofteria* cinsinin Kongo kırmızısını absorbe etmediği bilinmektedir.

4.4. Mikroskobik İnceleme

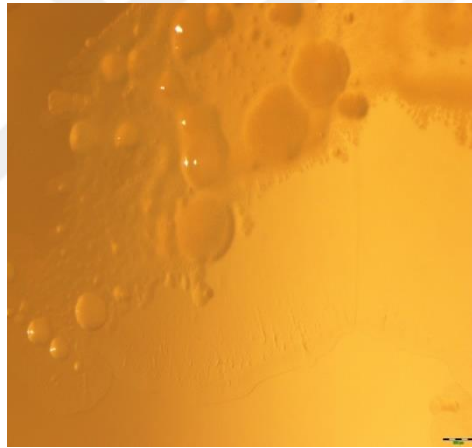
Stereo mikroskop ile yapılan inceleme ile saflaştırma sonucunda elde edilen kolonilerin morfolojik özelliklerine ilişkin Şekil 4.5'te yer alan görüntüler elde edilmiştir.



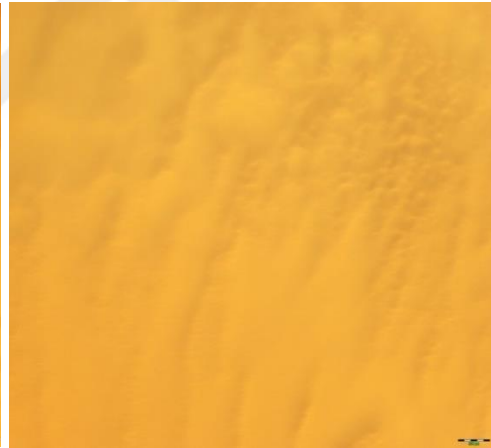
Nannocytis sp. 4



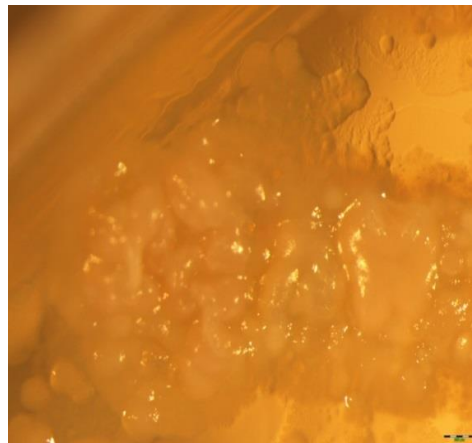
Cystobacter sp. 5



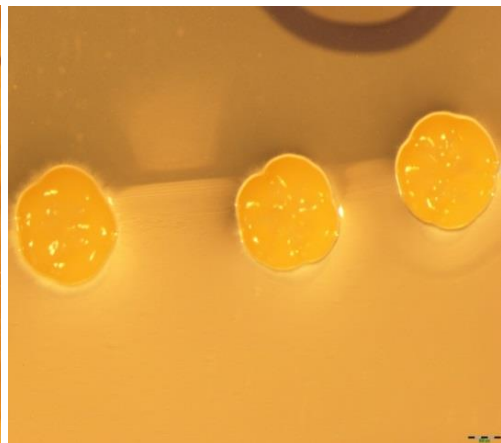
Stigmatella sp. 9



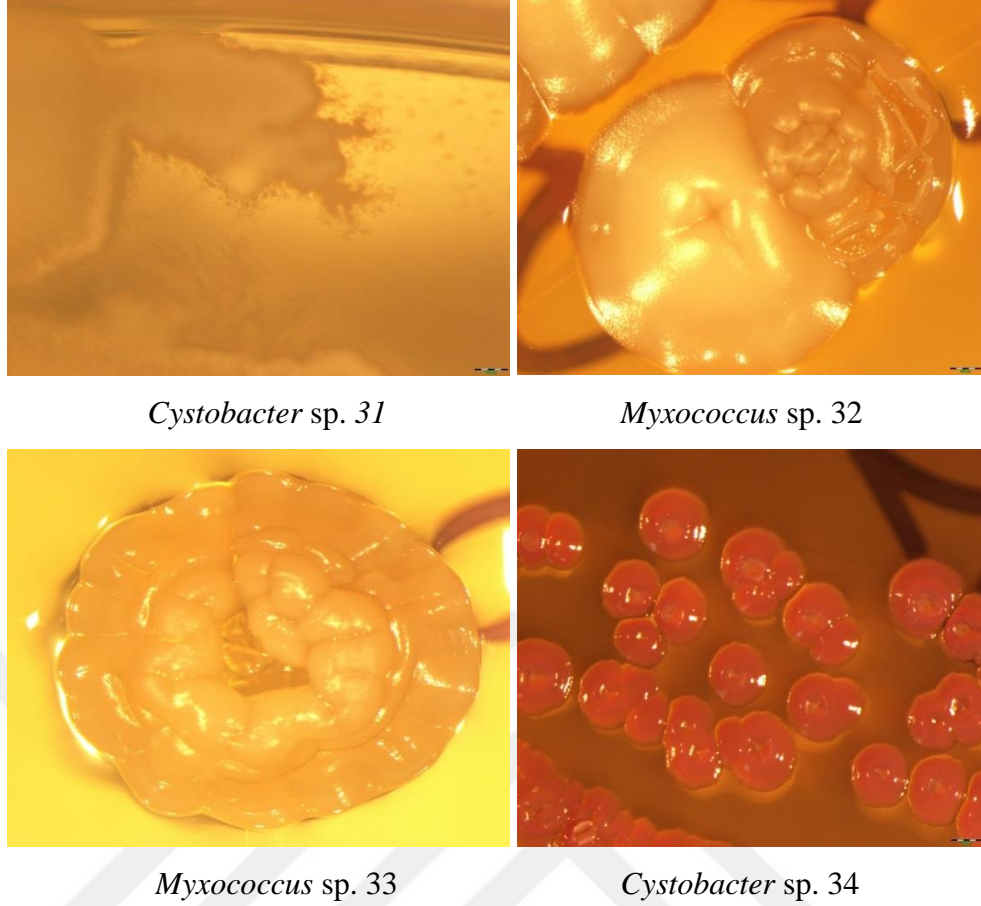
Polyangium sp. 23



Polyangium sp. 28



Myxococcus sp. 30



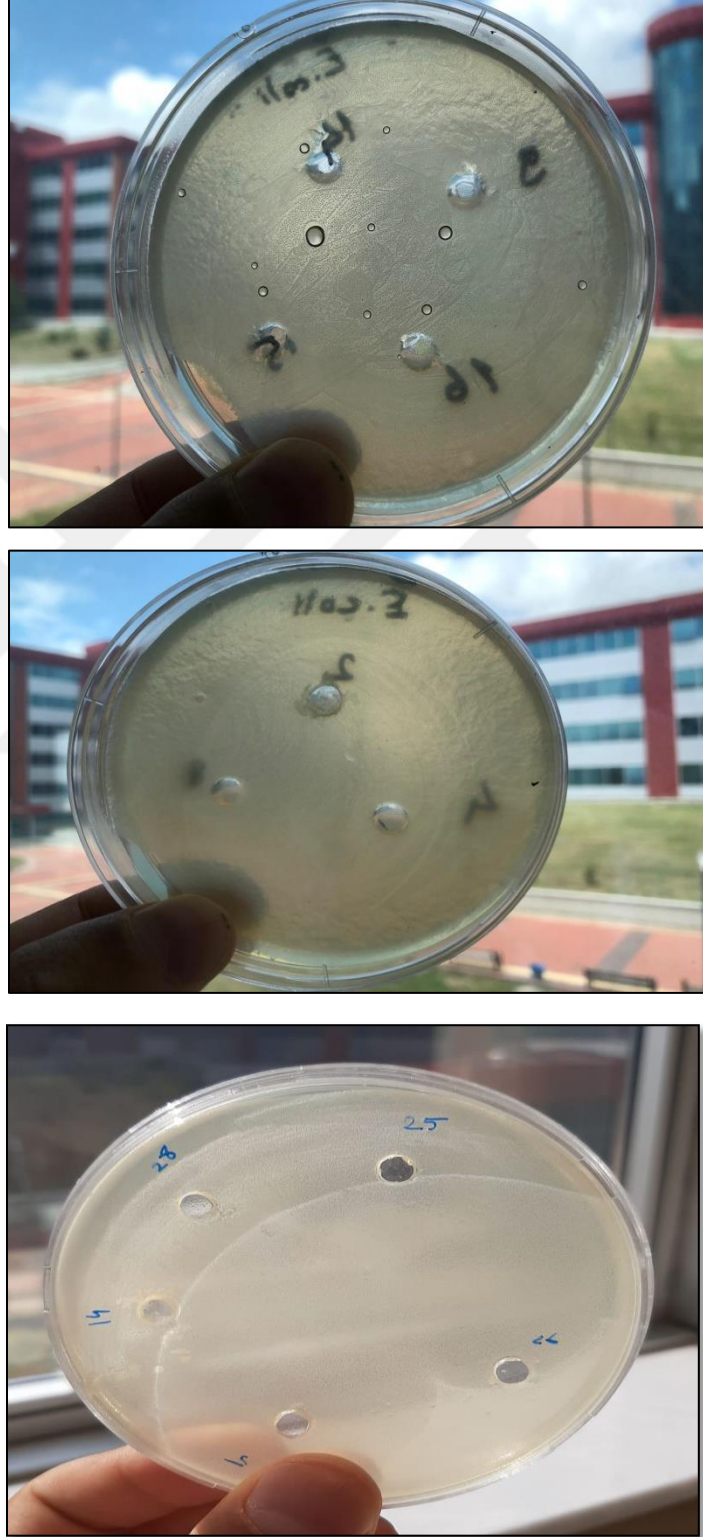
Şekil 4.5. Elde edilen mikrobakteri kolonilerin stereo mikroskop görüntüleri (x28)

Myxococcus sp. cinsine ait kolonilerin genellikle sarımsı renkte ortası turuncu olduğu ve bu kolonilerin çok büyük boyutlarda olmadığı, *Cystobacter* sp. cinsine ait kolonilerin kahverengi olduğu ve zincir şeklinde koloni oluşturdukları, *Nannocytis* cinslerinin tek tek ayrı koloniler şeklinde olduğu ve açık sarı bir renge sahip olduğu, *Stigmatella* sp. cinsinin beyaz renk koloniler şeklinde olduğu bilinmektedir. Şekil 5.5'te belirtilen elde edilen izolatlarla ilişkin görüntüler yer almakta olup, bunlardan 4 kodlu örneğin *Nannocytis* sp. cinsine 5, 31 ve 34 kodlu izolatların *Cystobacter* sp. Cinsine, 9 kodlu izolatın *Stigmatella* sp. cinsine, 23 ve 28 kodlu izolatların *Polyangium* sp. cinsine 30, 32 ve 34 kodlu izolatların ise *Myxococcus* sp. cinsine ait olduğu düşünülmekte olup daha sağlıklı bir sınıflandırma yapabilmek için moleküler sınıflandırma yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

4.5. Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

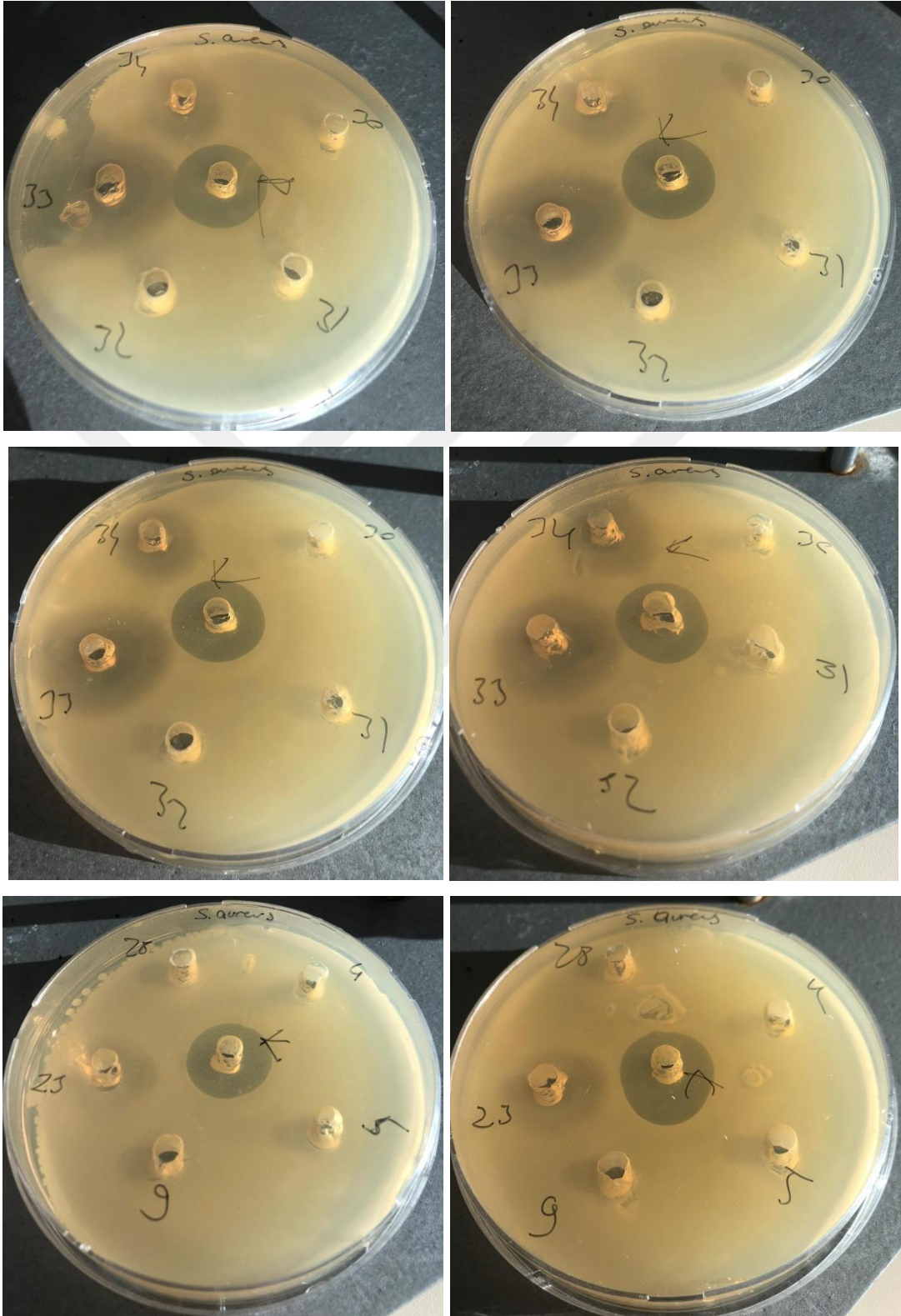
4.5.1. Agar Difüzyon Yöntemi

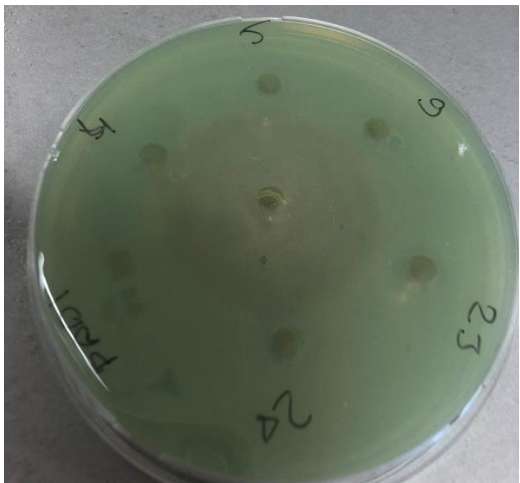
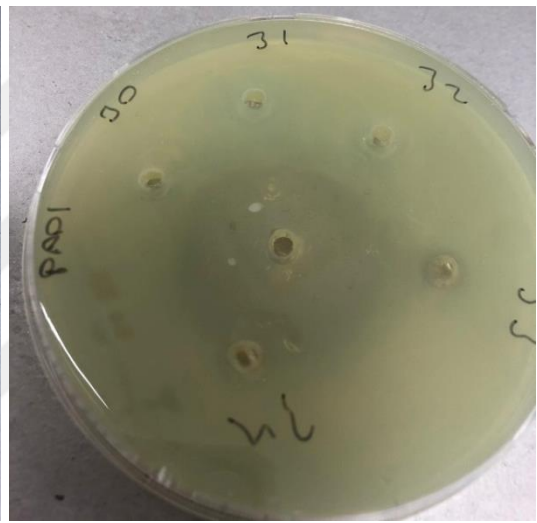
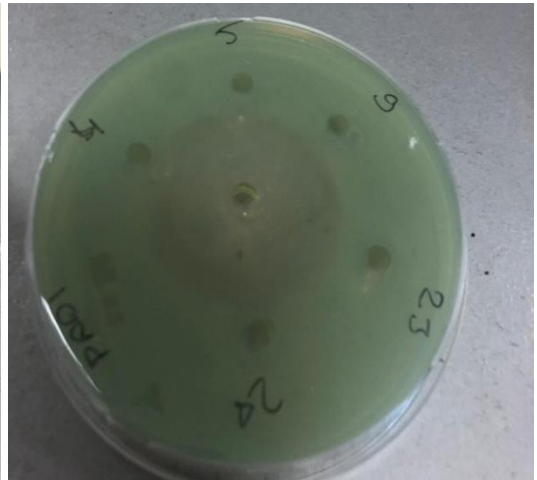
Ön deneme sonucunda; 24 saat inkübasyona bırakılarak elde edilen veriler Şekil 4.6'da görülmektedir. *E. Coli* suşuna karşı antibakteriyel aktivitenin bu süreçte başlamadığı görülmektedir.

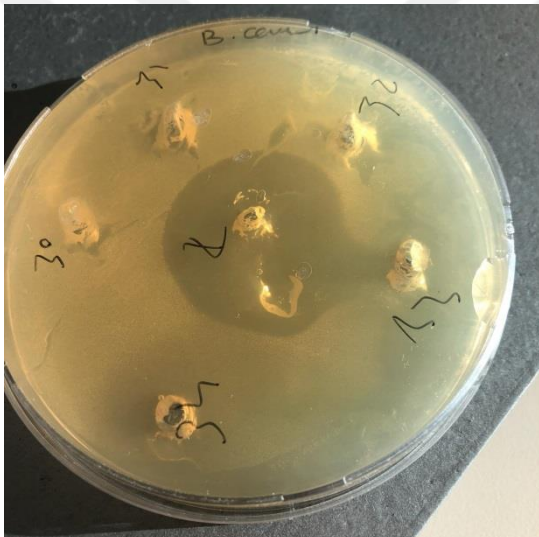
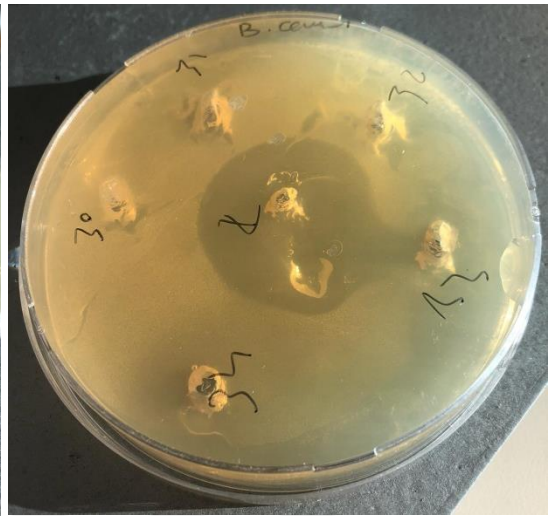
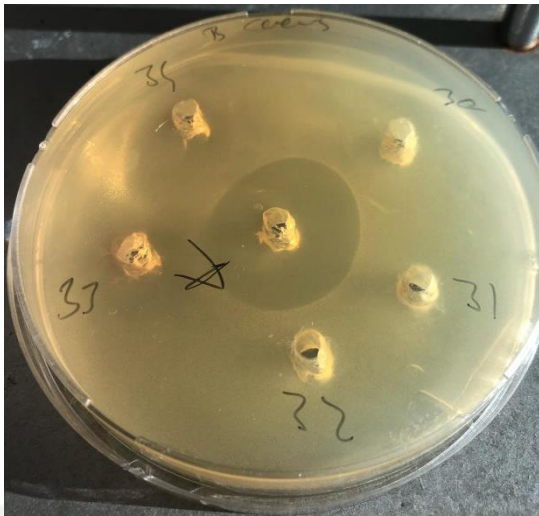


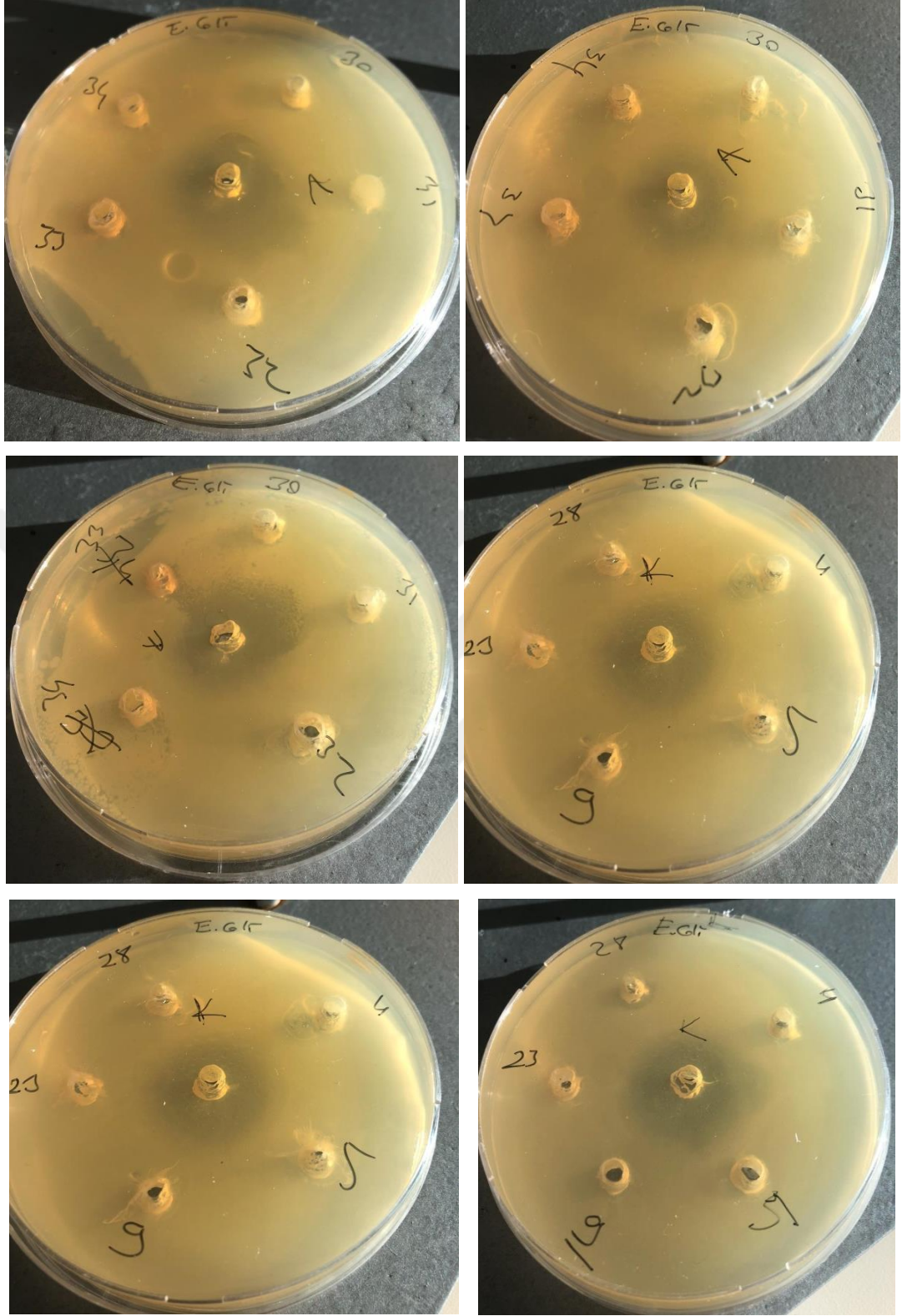
Şekil 4.6. Agar difüzyon yöntemi sonucu

4.5.2. Ekstraksiyon Yöntemi İle Biyoaktif İkincil Metabolit Üretimi ve Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi









Şekil 4.7. Patogen bakterilere karşı örneklerin antibakteriyel aktiviteleri

Tablo 4.5. Antibakteriyel aktivite test sonuçları

Kodlar	Kontrol	4	5	9	23	28	Kontrol	30	31	32	33	34
<i>S. aureus</i>	25	-	-	-	-	-	20	-	-	-	25	20
	18	-	-	-	-	-	20	-	-	-	25	18
	22,5	-	-	-	22	-	20	-	-	-	24	20
<i>B. cereus</i>	35	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-
	30	-	-	10	18	-	28	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	19	10	20	-	-	-	28	20
<i>E. coli</i>	25	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	10	28	-	-	-	-	-
	22,5	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	35	-	-	-	-	-	35	-	-	-	-	-
	45	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-

*Tabloda belirtilen ölçümler mm (milimetre) cinsinden verilmiştir.

S. aureus için yapılan analiz sonucunda; 4, 5, 9, 28 kodlu örneklerde kontrol grubunu zon çapının sırasıyla 25, 18 ve 22,5 mm olarak ölçüldüğü örneklerde herhangi bir antibakteriyel aktivite meydana gelmemişken, 23 kodlu örnekte 2 paralelde gelişme olmazken 1 paralel de 22 mmlik bir zon oluşumu gözlenmiştir. Aynı şekilde *S. aureus* için 31, 32 ve 33 kodlu örneklerde herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiş olup, 33 kodlu örnekte sırasıyla 25, 25 ve 24 mm (kontrolden daha fazla miktarda) zon oluşumu görülmüştür. 34 kodlu örnekte; 20, 18 ve 20 mm (kontrol ile aynı oranda) zon oluşumu meydana gelmiştir.

B. cereus için yapılan analiz sonucunda; 4, 5, 9, 28 kodlu örneklerde kontrol grubunu zon çapının sırasıyla 35, 30 ve 30 mm olarak ölçüldüğü örneklerden 4 ve 5 kodlu örneklerden hiçbir gelişme gözlenmemişken 9 kodlu örneğin sadece 1 pararlelinde 10 mm gelişme olduğu, 23 kodlu örnekte 18 ve 19 mm gelişme olduğu görülmüştür. 30, 31 ve 32 kodlu örneklerden yapılan ekimlerde kontrolün 30, 28 ve 20 mm olduğu petrilere gelişme olmamış ve 33 kodlu örnekte kontrolden fazla ve 34 kodlu örnekte kontrol ile aynı oranda zon oluşumu meydana gelmiştir.

E. coli ve *P. aeruginosa* için yapılan ekimlerin hiçbirinde zon oluşumu gerçekleşmemiştir.

Yapılan çalışma sonucunda;

- Örneklerin *Gram (-) bakteriler olan E. coli (ATTC 25922) ve P. Aeruginosa (PA01)* için antibakteriyel aktivite göstermediği,
- Örneklerin en fazla *B. cereus (ATTC 6051)* üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdiği, özellikle 33 kodlu (Eskişehir'den alınan kümes toprağı) örneğın kontrolde daha büyük bir zon oluşturduğı,
- *S. aureus (ATTC 25923)* üzerinde 23 kodlu (Bozkurt'dan alınan kümes toprağı) örnekten ekstrakte edilen antibakteriyel aktiviteye sahip bileşenlerin etkili olduğı,
- 34 kodlu (İzmir'den alınan su örneğı) örneğın *Gram (+) bakteriler olan S. aureus (ATTC 25923) ve B. cereus (ATTC 6051)* (kontrolle aynı oranda) üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Dünya'da birbirinden çok farklı habitatlardan mikrobakteri izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Mikrobakteriler ile ilgili yapılan bu çalışmalar halen yeni mikrobakteri türlerine ulaşılabilirdiğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada Şubat 1997'de Hachijo-jima sahilinden elli numune toplanmış ve Temmuz 1997'de Miura Yarımadası kıyılarından 40 numune toplanmıştır. Numuneler arasında kum, odun parçası, küçük ölü hayvan (balık, yumuşakçalar ve kabuklu hayvanlar) ve yosunlar bulunmaktadır. İki deniz izolatu mikrobakterilerin karakteristik morfolojik ve kemotaksonomik özelliklerini göstermiştir. 16S rRNA benzerliğine dayanan filogenetik analiz, iki izolatu, *Soranginia* alt sınıfının bir üyesi olan *Nannocystis* cinsiyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. *Nannocystis* cinsi, her yerde bulunan bir mikrobakteridir ve tropik bölgelerden Antartika'daki topraklara kadar çok çeşitli karasal ortamlarda yaşadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, *Nannocystis* cinsinin bir atasal suşunun çeşitli türlere ayrıldığını ve bazılarının deniz ortamlarına adapte olduğu düşünülmektedir (Lizuka vd., 1998).

Deniz suyunda bulunan tuz konsantrasyonunda büyüyen mikrobakteriler daha önce bilinmemekteydi o yüzden elde edilen bu veriler deniz ekosistemlerinden mikrobakterilerin filogenetik ve fizyolojik özelliklerini tanımlayan ilk rapordur (Lizuka vd., 1998).

Yapılan diğeri bir araştırmada toplamda 64 ülkeden 1398 toprak numunesi toplanmış, Dünya çapında araştırılan toprak numunelerinde daha önce tanımlanmış toplam 30 mikrobakteri türü tespit edilmiştir (Dawid, 2000).

Toprak numunesi toplanan 64 ülkeden 31'inde miksobakteri izole edilememiştir. Bu ülkelerin ekstrem iklim bölgelerine sahip olduğu görülmektedir. Özellikler Turba bataklıkları ve Antartika topraklardan gelen negatif numunelerin oranının yüksek olduğu göze çarpmaktadır ve sırasıyla yüksek toprak asitliği veya çok düşük toprak sıcaklığından kaynaklanmaktadır (Dawid, 2000).

Bu çalışmalar sırasında, hatırı sayılır sayıda suşun bugüne kadar hiç bilinmeyen birkaç antibiyotik ve diğer biyolojik olarak aktif ikincil metabolitleri üretebildiği bulunmuştur. Bu arada diğer araştırmacılar tarafından da miksobakteriler tarafından oluşturulan birçok antibiyotik keşfedilmiş ve izole edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise Güney Afrika'daki Sambesi nehrinin kıyısından izole edilen *So. cellulosum*'un antifungal ve antitümör maddeler ürettiği bulunmuştur (Dawid, 2000).

Çalışmamızla paralel olarak 2017 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada; Büyük Britanya'dan alınan toprak örneklerinden elde edilen izolatların büyük bir kısmının *Coralloccoccus* spp. ve *Myxococcus* spp. türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar kullanılarak gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite test sonucunda;

Gram (+) ve Gram (-) patojen bakterilere karşı gelişen en küçük zon genişliğinin 6 mm olduğu, ortalama olarak 11-20 mm arasında bir zon büyüklüğü elde edildiği, maksimum aktivitenin 19 mm (*S. Saprophyticus*, Gram (+)) ve 42 mm (*K. Pneumoniae*, Gram (-)) olduğu, izolatlar arasında antimikrobiyal aktivite açısından çok farklılıkların bulunduğu, *Coralloccoccus* spp. ve *M. xanthus* adlı bakterilerin sırasıyla 23,2 mm ve 24,3 mm aktivite gösterdiği, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı 11,7 mm ile düşük bir aktivite gösterdiği, yakın zamanda keşfedilen *M. xanthus* DK1622 adlı bakterinin 11,5 mm ile çok zayıf bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Livingstone, P.G., 2017). Bu sonuç yani *Myxococcus* cinsinin antimikrobiyal etkisinin Gram (+) ve Gram (-) türler üzerinde farklı olması bu bakterilerin makromolekülleri parçalayan ya da hücre duvarını yıkan enzimler tarafından farklı şekilde etkilendiğini göstermektedir.

M. xanthus'un, hem miskovirescin hem de dış membran veziküllerinin salgılanması yoluyla *E. coli*'yi öldürdüğü gösterilmiştir (Berleman vd., 2014). Dış zar vezikülleri hidrolitik enzimler ve ikincil metabolitler ile doludur ve böyle bir kompleks etkili maddelerin salgılanması, çoğu miksobakterinin sergilediği geniş av aralığını açıklayabilir ve direnç gelişmesi olasılığını azaltabilir (Livingstone, P.G., 2017).

Bacillus subtilis salgılarıyla ve avlanmaya dirençli büyüklüklerde sporlaşarak *M. xanthus*'un saldırısına tepki verir (Müller vd., 2014.). *Coralloccoccus* spp.'un koraloproninler, korolozinler ve koralmisinler de dahil olmak üzere çeşitli ikincil

metabolitler ürettiği bilinmektedir (Schäberle vd., 2015; Kim vd., 2016). *Pyxidicoccus spp.*, Gram negatif bakterilere karşı bazı antibiyotik aktiviteler gösterir ancak özellikle Gram pozitif bakterilere karşı etkindirler (Kim vd., 2016). *Pyxidicoccus spp.* *S. aureus*'u öldürebilen makrolidler üretmektedir (Weissman ve Müller, 2009, 2010).

Kumar ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, Hindistan'daki çeşitli toprak örneklerinden elli miksobakteriyel suş, saf kültürden izole edilmiş ve bu miksobakteriler arasında, test mikroorganizmaları ve insan kanser hücreleri karşısında güçlü inhibisyon aktiviteleri gösteren moleküler karakterizasyon için dokuz izolat seçilmiştir. Fonksiyonel karakterizasyon için seçilen dokuz miksobakteriyel izolattan beşi Gram (-) test bakterilerine karşı inhibitör ajanlar üretirken, altı izolat *M. smegmatis* karşı aktivite göstermiştir (Kumar vd., 2017).

Miksobakterilerin antimikrobiyal etkilerinin Gram (+) bakterilere mi yoksa Gram (-) bakteriler üzerine mi daha fazla olduğu ile ilgili değişik sonuçlar bulunmaktadır. Kumar ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmalar, miksobakterilerin çoğunlukla Gram (+) bakterileri inhibe eden doğal ürünleri salgıladıklarını, buna karşın çok az miksobakteriyel izolatin Gram (-) bakterilere karşı inhibisyon aktivitesi gösterdiklerini ortaya koyarken,

Gaspari ve diğerleri tarafından İsrail'den izole edilen miksobakterilerin % 50'den fazlasının, Gram (-) bakterilere karşı inhibitör aktivite gösteren bileşikler sentezlediğini tespit etmişler ve bu veriler miksobakterilerin Gram (-) patojenler üzerinde etkili olan bileşiklere olan tıbbi ihtiyacı karşılama kabiliyetine sahip olduğunu düşündürmüştür (Kumar vd., 2017).

Bir diğer çalışmada; toprak numuneleri, 2014-2015 yılları arasında Bahamalar (Nassau-Başkent), Florida (Hollywood Beach), Massachusetts (Sandisfield), Mexico (Mexico city), Arjantine (Igazu), Argantine (Buenos Aires), Bolivya (Santa Cruz), Florida (Miami), British Columbia(Vancouver), Doğu Kanada merkezi (Ontorio)'dan toprağın veya kumlu yüzeyin yaklaşık 10-15 cm altında toplanmıştır. Elde edilen numuneler daha sonra miksobakterilerin doğrudan izole edilmesi için kullanılmıştır. Aktif ikincil metabolitler için miksobakteriler "mikrop fabrikaları" olarak görülmüştür ve bu nedenle bu çalışma miksobakterilerin *Myxococcus sp.* adlı iki bakteriyolitik cinsi izole etmek için yapılmıştır. İki konvansiyonel yöntem kullanılarak toprak/kum numunelerinden *Coralloccoccus sp.*, saflaştırılmış ve 11 test mikroorganizmasına (dört Gram (+), dört Gram (-), iki maya ve bir mantar) karşı antimikrobiyal aktivitesinin saptanması amacıyla metanol ekstraktları elde edilmiştir. Tespit edilen otuz dokuz suştan ancak 23'ü saflaştırılmış ve antimikrobiyal faaliyetler için analiz edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin derecesi ve dağılımı açısından,

en aktif izolatlardan ikisi (BNEM1 ve SFEC2) daha ileri karakterizasyon için seçilmiştir. Morfolojik parametreler ve BLAST tarafından yapılan bir dizi benzerlik araştırması, *Myxococcus xanthus* - BNEM1 ve *Coralloccoccus coralloides* - SFEC2'ye % 99 benzerlik sergilediğini ortaya koymuştur (Charousová vd., 2016).

Kiritimati adasında bulunan Hypersaline Gölünde mikrobiyal toplulukların karakterizasyonu için farklı birçok çalışma yapılmıştır. Kiritimati Adası, Orta Pasifik'teki dünyanın en büyük mercan atolü ve Kiribati Cumhuriyeti'nin Kuzey Hat Adaları'nın bir parçasıdır. Yapılan bir çalışmada kumlu toprak örneği Hypersaline Gölüne yakın bir yerden alınmıştır ve bu ilginç bölgede mikrobakteri tespit edilememiştir (Schneider vd., 2013). Kiritimatiden örnekler Mart ayında 2011 yılında Hypersaline Gölünün 10 metre içerisinde alınmıştır. Bu kumlu örnekte bitki artıkları görülmemiştir. Kompost numuneleri, Mayıs 2012'de serbest duran bir kompost yığınının (Almanya) çeşitli kısımlarından toplanmış, daha sonra birleştirilmiş ve homojen hale getirilmiştir. Araştırmaya Kiritimati'den elde edilen 17 ve kompost numunesinden 25 olmak üzere toplam 42 kültür dahil edilmiştir (Mohr vd., 2015).

16S rRNA gen analizlerine dayanarak Kiritimati'nden gelen 17 suş *Myxococcaceae*'ye (*Myxococcus* spp.) ve *Cystobacteraceae*'ye (*Archangium gephyra* tip suşuna (T)% 99.1 dizi homolojisi) aittir. Komposttan elde edilen suşlar *Myxococcaceae* ve *Polyangiaceae* olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmanın 42 kültüründen 40, *Myxococcaceae*'ye (*Myxococcus*, *Coralloccoccus*) ait olup, biri *Systobacteraceae*'ye (*Archangium*), diğeri *Polyangiaceae*'ye (*Polyangium*) aittir (Mohr vd., 2015).

Jeotermal kaynakların bakteriyel çeşitliliği hakkında çok sayıda çalışma yayınlanmış olmasına rağmen, termofilik mikrobakterilerin veya sıcak kaynaklardan gelen mikrobakterilerin sekanslarını araştırmak için sadece çok az çalışma olduğu ortaya çıkmıştır. Kaplıcalar, muhtemelen mezofilik mikrobakteriler için en uygun yaşam alanı değildir. Ancak yeni mikrobakterileri izole etmek için bu habitatların da daha çok araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

4.6. Termal Kaynaklardan Alınan Örnekler

Ülkemiz termal kaynaklar bakımından oldukça zengin olmasına rağmen, bu kaynakların mikrobiyal özellikleri ve biyoteknolojik öneme sahip termofilik mikroorganizma profilleri açısından çok az çalışma bulunmaktadır.

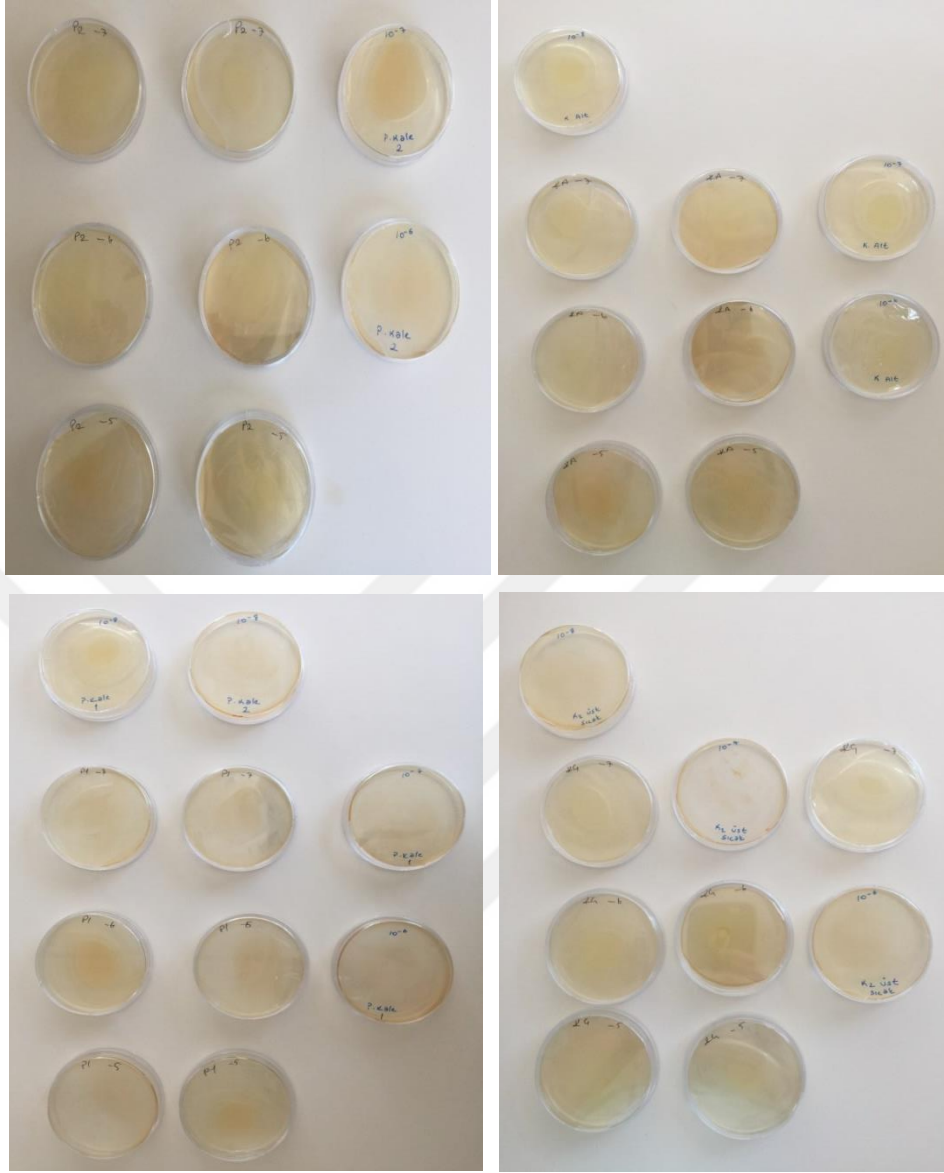
Denizli İli sınırlarında yer alan Pamukkale ve Karahayıt bölgelerinden alınan 4 adet toprak ve 4 adet su numunesinin (Şekil 4.8) 28°C ve 50°C'deki inkübasyon sonucunda herhangi bir mikrobiyal gelişme gözlemlenmemiştir (Tablo 4.6).



Şekil 4.8. Termal kaynaklardan alınan toprak ve su örnekleri

Tablo 4.6. Termal kaynaklardan alınan örneklerin ekim sonuçları

Kaynak		İnkübasyon	
		28 °C	50 °C
Toprak	P1	-	-
	P2	-	-
	KA	-	-
	KÇ	-	-
Su	P1	-	-
	P2	-	-
	KA	-	-
	K2	-	-



Şekil 4.9. Termal kaynaklarından yapılan ekim sonuçları

5. SONUÇ

1. Yapılan tez çalışması ile bilimsel çalışmaların ilgi odağı olduğu görülen miksobakterilerin ülkemizdeki farklı bölge ve kaynaklardan elde edilme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Denizli, Eskişehir, Bursa ve İzmir illerinden toplanan toplam 56 toprak ve su örneği çalışılmıştır. İlk olarak 21 adet miksobakteri saflaştırılabilmesine rağmen 2. saflaştırma sonucunda 10 adet izolat kalmıştır ve bu izolatlar üzerinde çalışılmaya devam edilmiştir.
2. İki adet su örneğinden miksobakteri izolasyonun sağlanması, genel habitatları toprak olan bu mikroorganizmaların ülkemizdeki su kaynaklarından da elde edilebileceğini göstermesi açısından umut verici olmuştur.
3. Termal kaynaklardan alınan 4 adet toprak ve 4 adet su örneğinden hiçbirinde miksobakteri türüne rastlanmamış olması bu bakterilerin daha çok mezofilik özellik gösterdiğinin bir kanıtıdır.
4. İzole edilen bakterilerin tanımlanması için biyokimyasal testler, boyama testleri ve mikroskopik incelemeden yararlanılmıştır. Ancak kesin bir sınıflandırma için moleküler testlere ihtiyaç duyulmaktadır.
5. Tanımlama işleminden sonra antimikrobiyal aktivite belirlenme aşamasına geçilmiştir. Elde edilen 10 adet izolat ile gerçekleştirilen antibakteriyel aktivite testinde örneklerin en fazla *B. cereus* (ATTC 6051) üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür.
6. Özellikle *Myxococcus sp.* 33 kodlu (Eskişehirden alınan kümes toprağı) örneğinden elde edilen antimikrobiyal maddenin kontrolden (Gentamisin) daha büyük bir zon oluşturduğu saptanmıştır. Bu durum bu elde edilen antimikrobiyal maddenin daha iyi araştırılması halinde Gram (+) bakteriler üzerinde çok etkili olarak antibiyotik karışımlarda kullanılabileceği hususunda umut verici bir çalışma olmuştur.
7. *Myxococcus sp.* 23 kodlu (Bozkurt'dan alınan kümes toprağı) örnekten ekstrakte edilen antibakteriyel aktiviteye sahip bileşenlerin *S. aureus* (ATTC 25923) üzerinde etkili olduğu,
8. İzmirden alınan su örneğinden elde edilen *Myxococcus sp.* 33 ve *Cystobacter sp.* 34 kodlu örneklerin Gram (+) bakteriler olan *S. aureus* (ATTC 25923) ve *B. cereus* (ATTC 6051) (kontrolle aynı oranda) üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği,
9. Örneklerin hiçbirisi Gram (-) bakteriler olan *E. Coli* (ATTC 25922) ve *P. aeruginosa* (PA01) için antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Ekstrakte edilen bileşiklerin

Gram (-) bakterilerin hücre duvarında yer alan kompleks yapı nedeniyle etkinliğinin görülmediği, peptidoglikan, lipoprotein, dış membran ve lipopolisakkarid yapıdan meydana gelen hücre duvarının bu etkiyi engellediği anlaşılmaktadır. Gram (+) bakterilerde hücre duvarının daha kalın olmasına rağmen peptidoglikan ve teikoik asitten meydana gelmiş basit bir yapı mevcuttur. Bu yapıda antibakteriyel etkili bileşilerin hücre zarından içeriye girerek bakterilere etki etmesine neden olduğu görülmektedir (URL-5).

10. Konu ile ilgili yapılan literatür araştırmasında ülkemizde miksobakteriler üzerinde yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan tez çalışması bu açıdan özgün bir nitelik taşımakta olup, sırasıyla Bozkurt'dan alınan kümes toprağı, Eskişehirden alınan kümes toprağı ve İzmirden alınan su örneğinden elde edilen *Myxococcus* sp 23, 33 ve 34 kodlu miksobakterilerin *S. aureus* (ATTC 25923) ve *B. cereus* (ATTC 6051) suşları için antibakteriyel aktivite göstermesi de en önemli bulgudur.
11. Gram (-) bakteriler üzerine de etki gösterebilecek miksobakteri suşu elde etmek için ileriki çalışmalarda daha değişik ve çok sayıda habitattan toprak ve su örneğinin toplanması önerilmektedir. Ayrıca izole edilen miksobakterilerin moleküler tanımlamasının yapılması sadece Türkiye değil Dünya literatürüne de çok büyük katkı sağlayacaktır.
12. Yine ileride yapılacak çalışmalarda antimikrobiyal maddelerin kimyasal yapılarının aydınlatılması ve sınıflarının belirlenmesi, potansiyel kullanımlarının belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abudayyak, M., Yalçın, C., Ö., Korkut, E., 2018. Kemoterapi ile indüklenmiş periferel nöropatinin tedavisi ve önlenmesine yönelik farmakolojik yaklaşımlar. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43, 2, 203-217.
- Akkaya, S., E., Kıvanç M., 2009. Termofil bakteriler; sıcak su kaynaklarında yaşayan Gram negatif basillerin izolasyon ve identifikasyon yöntemleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 07,1,1-23.
- Baker, G., C., Gaffar, S., Cowan, D., A., Suharto, A., R., 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiology Letters*, 200, 1,103–109. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10700.x>
- Başkaya, Y., Kocabaş, A., 2016. Toprakta izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal madde üretim potansiyellerinin belirlenmesi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 19, 4, 393-398.
- Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C., N., Bähre, H., Tschirner, S., K., Gorinski, N., Gohmert, M., Mayer, C., T., Huehn, J., Ponimaskin, E., Abraham, W., R., Müller, R., Lochner, M., Sparwasser, T., 2014. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells, *Nature Medicine*, 20, 1327-1333.
- Bentley, R., 1997. Secondary metabolites play primary roles in human affairs. *Perspectives In Biology And Medicine*, 40,2, 197-221.
- Buchanan, R. E., Gibson, N. E., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 404.
- Bull, C., T., Shetty, K., G., Subbarao, K., V., 2002. Interactions between myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. *Plant Disease*, 86, 889-896.
- Charousová, I., Medo, J., Javoreková, S., 2016. Isolation, antimicrobial activity of myxobacterial crude extracts and identification of the most potent strains. *Archives of Biological Sciences*, doi: 10.2298/ABS161011132C
- Clifton, C., E., 1958. Introduction to the bacteria, Mc Graw-Hill Book Company, 134-135.
- Corominas-Faja, B., Cuyàs, E., Gumuzio, J., Bosch-Barrera, J., Leis, O., Ángel G. Martin, A. G., Javier A. Menendez, J. A., 2014. Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses self-renewal growth of cancer stem cells. *Oncotarget*, 5, 18, 8306-8316.
- Dawid W., 2000. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 403-427.
- Davies, J., Spiegelman, G., B., Yim, G., 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion In Microbiology*, 9, 445-453.

- Demain, A., L., 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 52, 455-463.
- Diez, J., Martinez, J., P., Mestres, J., Sasse, F., Frank, R., Meyerhans, A., 2012. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microbial Cell Factories*, 11-52.
- Dindar, E., Topaç Sağban, F., O., Başkaya, H., S., 2010. Kirlenmiş toprakların bioremediasyon ile ıslahı. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 15, 2.
- Dworkin, M., 1996. Social and developmental biology of myxobacteria. *Microbiological Reviews*.
- Egerton, N., 2008. "Ixabepilone (ixempra), a therapeutic option for locally advanced or metastatic breast cancer". *Pharmacy and Therapeutic*, 33, 9, 523-531.
- Farez-Vidal, M. E., Fernandez-Vivas A., Arias, J. M., 1994. Properties and significance of an α -amylase produced by *Myxococcus coralloides*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 14-19.
- Garcia, D., Müller, R., K., 2009. Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods. *Methods In Enzymology* ,3, 458, 59-91.
- Garcia, R., Pistorius, D., Stadler, M., Müller, R., 2011. Fatty acid-related phylogeny of myxobacteria as an approach to discover polyunsaturated omega-3/6 fatty acids. *Journal of Bacteriology*, 193, 8, 1930-1942.
- Gerhardt, P., Costilow, R., N., Krieg, N., R., Murray, R., G., E., Nester, E., W., Phillips, G., B., Wood, W., A., 1981. Manual of methods for general bacteriology. *American Society For Microbiology, Washington DC, ABD*
- Gerth, K., Trowitzsch, W., Wray, V., Höfle, G., Irschik, H., and Reichenbach, H. 1982. Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus*, *The Journal of Antibiotics*, 35, 1101-1103.
- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, Reichenbach, H., 1996. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangiumcellulosum* (myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 49, 6, 560-563.
- Gülle F., Özdemir, S., 2015. Sağlıklı toprağın görülmeyen kahramanları. *Sakarya Ticaret Borsası Dergisi*, 51, 6-8.
- Güven, R., G., 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 09, 1, 1-10.
- Haktanır, K., Arcak, S., 2017. Toprak biyolojisinin konusu, önemi ve gelişimi. http://acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/31661/TO402_Toprak_biyolojisi_dersi.pdf, (Erişim Tarihi:31.07.2017)

- Hodgkin, J., Kaiser, D., 1979. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Molecular Genetics and Genomics*, 171, 177-191.
- Holt, J., G., Krieg, R., N., Peter, H., S., Staley, J., T., Williams, T., S., 1994. Group 16 the fruiting, gliding bacteria: the myxobacteria. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 515-525.
- Hook, L. A., 1977. Distribution of myxobacters in aquatic habitats of an alkaline bog. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 333-335.
- Jahn, E., 1911. Myxobacterales. In: *kryptogamenflora der Mark Brandenburg*, 5, 187-206.
- Jiang, D., M., Kato, C., Zhou, X., W., Wu, Z., H., Sato, T., Li, Y., Z., 2010. Phylogeographic separation of marine and soil myxobacteria at high levels of classification. *The ISME Journal*, 4, 1520-1530.
- Karwehl, S., Mohr, K., I., Jansen, R., Sood, S., Bernecker, S., Stadler, M., 2009. Edonamides, the first secondary metabolites from the recently described myxobacterium *Aggregicoccus edonensis*. doi: 10.1016/j.tetlet.2015.09.139
- Kim, Y. J., Kim, H. J., Kim, G. W., Cho, K., Takahashi, S., Koshino, H., 2016. Isolation of coralmycins A and B, potent anti-gram negative compounds from the myxobacteria *Coralloccoccus coralloides* M23. *Journal Natural Product*, 79, 2223-2228. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00294
- Kumar, S., Kumar Yadav, A., Chambel, P., Kaur., R., 2017. Molecular and functional characterization of myxobacteria isolated from soil in India. *3 Biotech*, 7-112.
- Leonardy, S., Freymark, G., Hebener, S., Ellehaug, E., Søgaaard-Andersen, L. 2007, Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*, *The Embo Journal*, 26, 21: 4433-4444.
- Livingstone, P. G., Morphey, R. M., Whitworth, D. E., 2017. Myxobacteria are able to prey broadly upon clinically-relevant pathogens, exhibiting a prey range which cannot be explained by phylogeny. *Frontiers in Microbiology*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01593>
- Lizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Yamanaka, S., 1998. Isolation of myxobacteria from the marine environment, Isolation of myxobacteria from the marine environment, *FEMS Microbiology Letters*, 169, 317-322.
- Lewis K., 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 371-387.
- Ling L., L., Schneider, T., Peoples, A., J., Spoering, A., L., Engels, I., Conlon, B., P., Mueller, A., Schäberle, T., F., Hughes, D., E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V., A., Cohen, D., R., Felix, C., R., Fetterman, K., A., Millett, W.,

- P., Nitti, A., G., Zullo, A., M., Chen, C., Lewis, K. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455-9.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E., 1983. A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*. *Archives of Microbiology*, 35,58-62.
- Mohr, K., I., Garcia, R., O., Gerth, K., Irschik, H., Muller, R., 2012. *Sandaracinus amylolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of *Sandaracinaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1191–1198. doi:10.1099/ijs.0.033696-0.
- Mohr, K., I., Stechling, M., Wink, J., Wilharm, E., Stadler, M., 2015. Comparison of myxobacterial diversity and evaluation of isolation success in two niches: Kiritimati Island and German compost. *Microbiology Open*, 5(2), 268–278.
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres F. J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., 2016. Myxobacteria: moving, killing, feeding and surviving together, frontiers in microbiology, 26;7:781. doi: 10.3389/fmicb.2016.00781
- Nan, B., Zusman, D., R., 2011. Uncovering the Mystery of Gliding Motility in the Myxobacteria, *Annual Review of Genetic*, 45, 21–39.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions, *European Journal of Soil Science*, 54:655–670.
- Newman, D., J., Cragg., G., M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Product*, 23, 75(3), 311–335. doi:10.1021/np200906s.
- Ngo, L., T., Okogun, J., I., Folk, W., R., 2013. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. *Natural Product Reports*, 30(4), 584–592. doi:10.1039/c3np20120a.
- Oskay, M., Tamer, A., U., 2009. *Streptomyces* kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını, *e-journal of New World Sciences Academy*, 4, 2.
- Özçelik, S., 1998. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Isparta, 2, 2 91.
- Özşahin, E., Kaymaz, Ç., K., 2013. Türkiye'nin Termal Su Kaynaklarının Coğrafi Açından Değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 50, 25-38.
- Plaza, A., Garcia, R., Bifulco, G., Martinez, J. P., Hüttel, S., Sasse, F., Müller, R., 2012. Aetheramides A and B, potent HIV-Inhibitory depsipeptides from a Myxobacterium of the new genus “Aetherobacter”. *Organic Letters*, 14, 2854–2857.

- Pivot, X., Dufresne, A., Villanueva, C., 2007. Efficacy and safety of ixabepilone, a novel epothilone analogue. *Clinical Breast Cancer*, 7, (7), 543-549.
- Revermann, O., 2012. Novel secondary metabolites from myxobacteria and their biosynthetic machinery, Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften der Naturwissenschaftlichen-Technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften, Der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany.
- Reichenbach, H., Höfle, G., 1989. The gliding bacteria: a treasury of secondary metabolites, In: Bushell, M. E., and Grafe U., *Bioactive Metabolites From Microorganism*, Elsevier Science Publisher, 70-100. Amsterdam, The Netherlands.
- Reichenbach, H., Höfle, G., 1993. Production of bioactive secondary metabolites, Myxobacteria II. Edited by Dworkin, M., Kaiser, D., *American Society For Microbiology, Washington*.
- Reichenbach, H., 1993. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. *American Society For Microbiology, Washington DC, ABD*
- Reichenbach, H., 1999. The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology*, 1, (1), 15–21.
- Reichenbach, H., 2005. Order VIII. Myxococcales. Tchan, Pochon and Prevot 1948, 398AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition*, 2, C, 1059– 1072. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Langley, E., 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>.
- Schäberle, T. F., Schmitz, A., Zocher, G., Schiefer, A., Kehraus, S., Neu, E., 2015. Insights into structure-activity relationships of bacterial RNA polymerase inhibiting coralopyronin derivatives. *Journal of Natural Products*, 78, 2505–2509. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00175
- Schneider, D., Arp, G., Reimer, A., Reitner, J., Daniel, R., 2013. Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline lake of the Kiritimati atoll, Central Pacific, *Plos One*, 10, (8), 6. doi: 10.1371/journal.pone.0066662.
- Sharma, A., Kumari, N., Menghani, E., 2014. Bioactive secondary metabolites: an overview, *International Journal of Scientific And Engineering Research*, 5, (4), 1395-1403.
- Shimkets, L. J., 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria, *Microbiological Reviews*, 473-501.

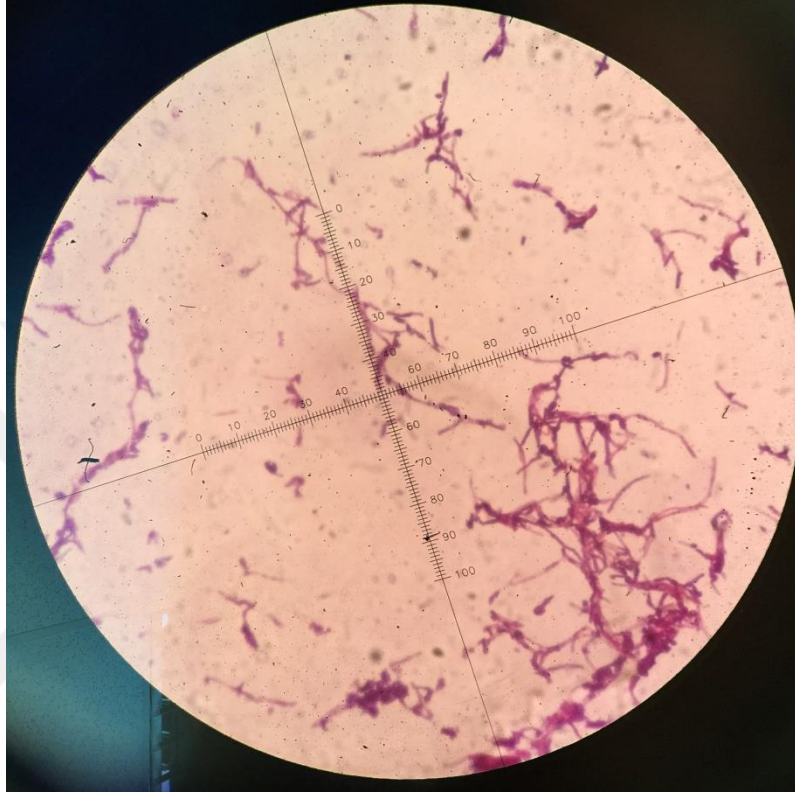
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Kumar Mehta, P., 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *Biotech*, 7-15, doi:10.1007/s13205-016-0586-4
- Stackebrandt E., Murray, R. G. E., Trilper, H. G., 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the 'purple bacteria and their relatives'. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 321-325.
- Steinmetz, H., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H., Höfle, G., Jansen, R., 2007. Thuggacins, macrolide antibiotics active against *Mycobacterium tuberculosis*: isolation from myxobacteria, structure elucidation, conformation analysis and biosynthesis, *Chemistry*, 13, 20, 5822-32. doi:10.1002/chem.200700269
- Sun, Y., 2016. Biosynthetic analysis of marine myxobacterial secondary metabolites. *Laboratory of Bioactive Natural Products Chemistry Department of Applied Molecular Biosciences Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan*
- Surup, F., Mohr, K., I., Viehrig, K., Herrmann, J., 2014. Disciformycins A and B: 12-membered macrolide glycoside antibiotics from the myxobacterium *Pyxidicoccus fallax* active against multiresistant staphylococci. *Angewandte Chemie International Edition*, 53, 49.
- Tarnita, C., E., 2017. The ecology and evolution of social behavior in microbes, *Journal of Experimental Biology*, 220, 18-24. doi:10.1242/jeb.145631
- Thaxter, R., 1892. On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes, *Botanical Gazette*, 17, 389-406.
- Todar, K., 2008. Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease. <http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial.html>. Erişim Tarihi:03.05.2018
- URL-1, 2019. Primer ve Seconder Metabolitler. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/64342/mod_resource/content/0/Ders%203.pdf, (Erişim Tarihi:04.03.2019)
- URL-2, 2019. Difference between primary metabolites and secondary metabolites. <https://biodifferences.com/difference-between-primary-metabolites-and-secondary-metabolites.html>, (Erişim Tarihi: 04.03.2019)
- URL-3, 2019. <http://www.who.int/cancer/en/>, (Erişim Tarihi:26.06.2019)
- URL-4, 2019. <https://gida.erciyes.edu.tr/upload/28JPKP6Gram-boyama.pdf>, (Erişim Tarihi: 28.06.2019)
- URL-5,2019. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/97%20hafta_Bakteriler_1.pdf, (Erişim Tarihi: 28.06.2019)
- Weissman, K. J., Muller, R., 2009. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism, *Bioorganic and Medical Chemistry*, 17:2121-2136.

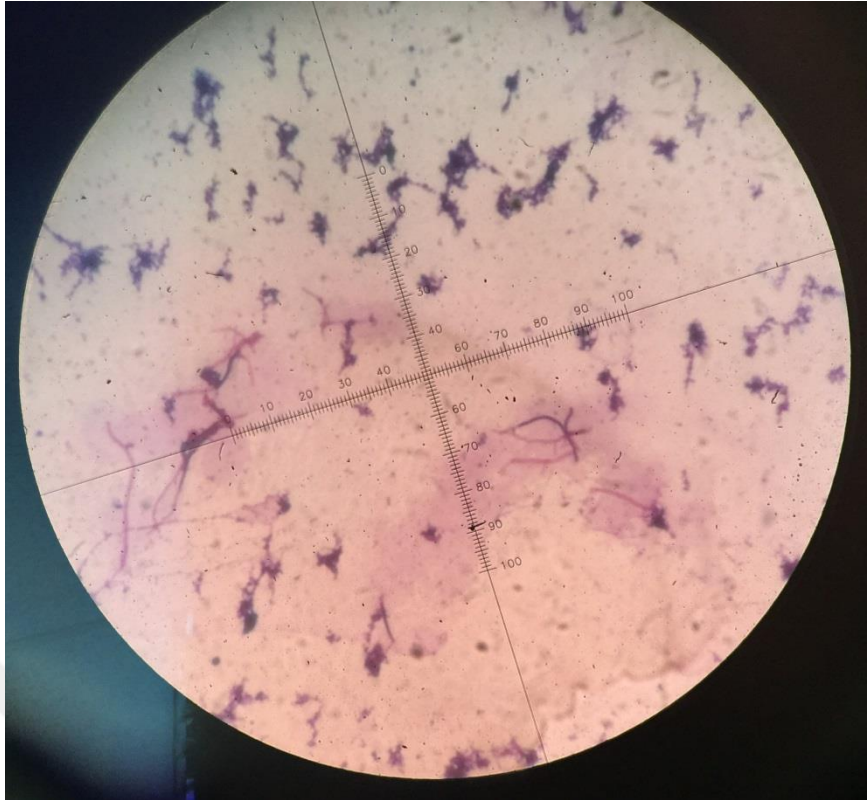
- Weissman, K., J., Müller, R., 2010. ChemInform abstract: myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and Modes-of-Action. *Natural Product Reports*, doi: 10.1039/c001260m.
- Verdine, G., L., 1996. The combinatorial chemistry of nature. *Nature*, 384, 11–13.
- Vidali, M., 2001. Bioremediation an overview, *Pure And Applied Chemistry*, 73, 7, 1163-1172.
- Vos, M., Velicer, G., J., 2009. Social conflict in centimeter and global-scale populations of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Current Biology*, 19, 1763–1767, doi: 10.1016/j.cub.2009.08.061
- Yamamura, S., Amachi, S., 2014. Microbiology of inorganic arsenic: From Metabolism To Bioremediation. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 118, (1), 1-9.
- Yıldırım, A., 2004. Toprakta izole edilen bazı aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi *Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eskişehir, Türkiye*.

EKLER

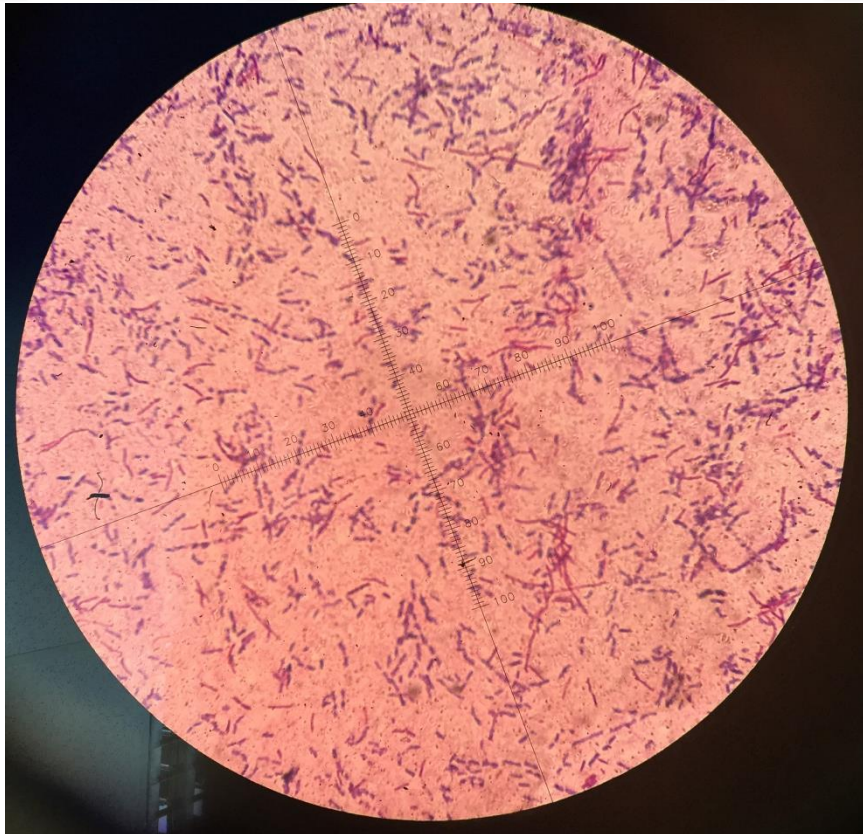
EK-1

Elde Edilen Gram Boyama Mikroskop Görüntüleri (100x objektif ile)





5

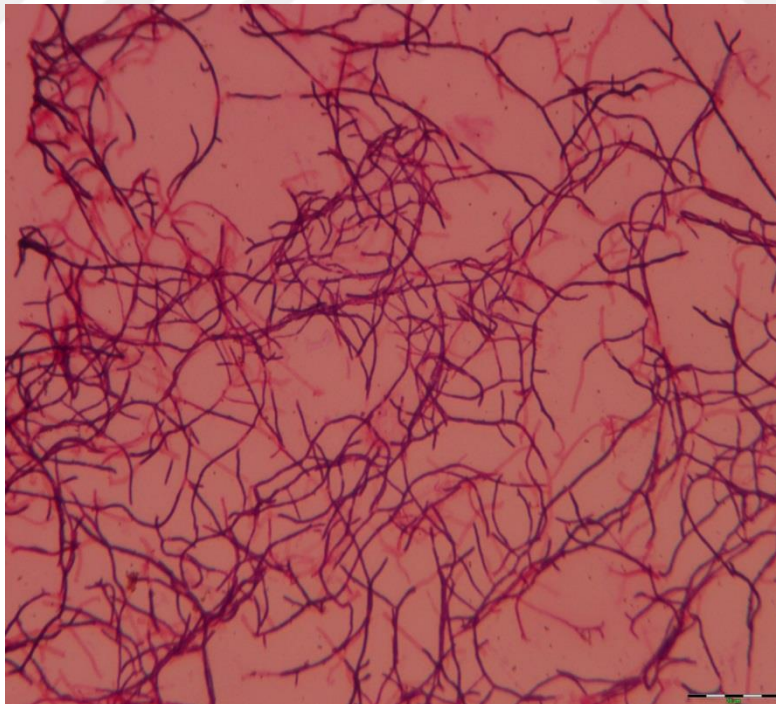


63

9

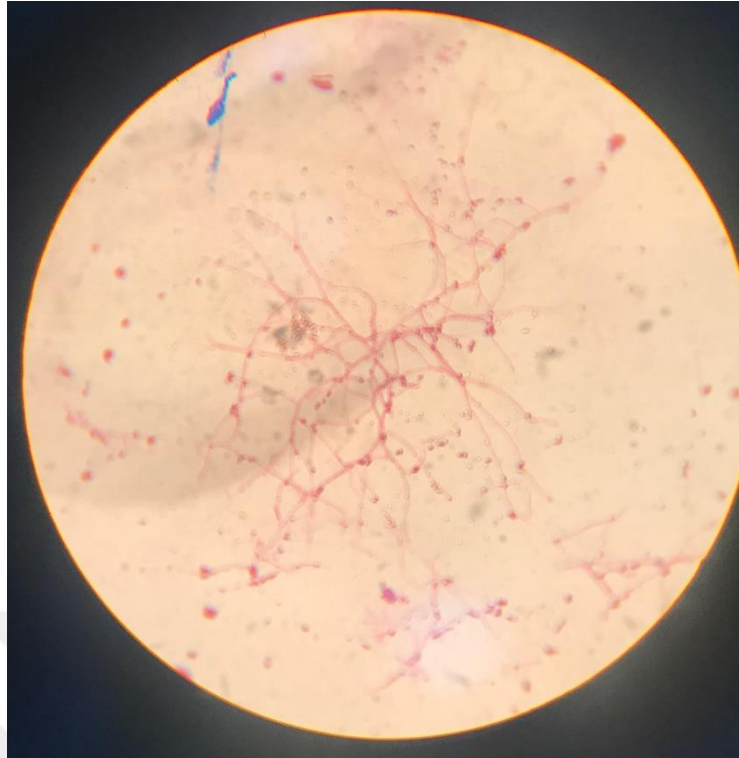


23



28

64

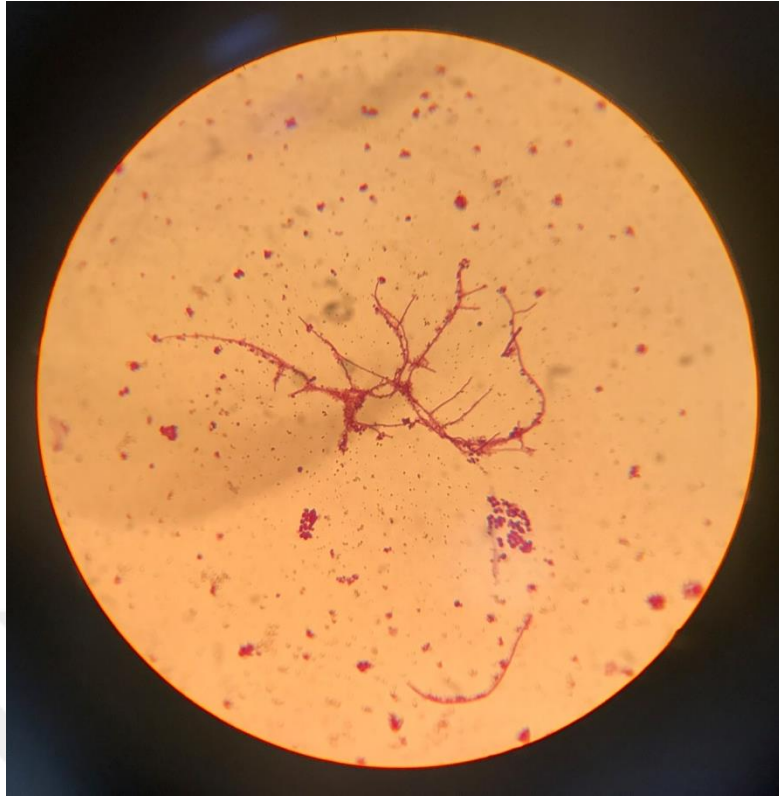


30

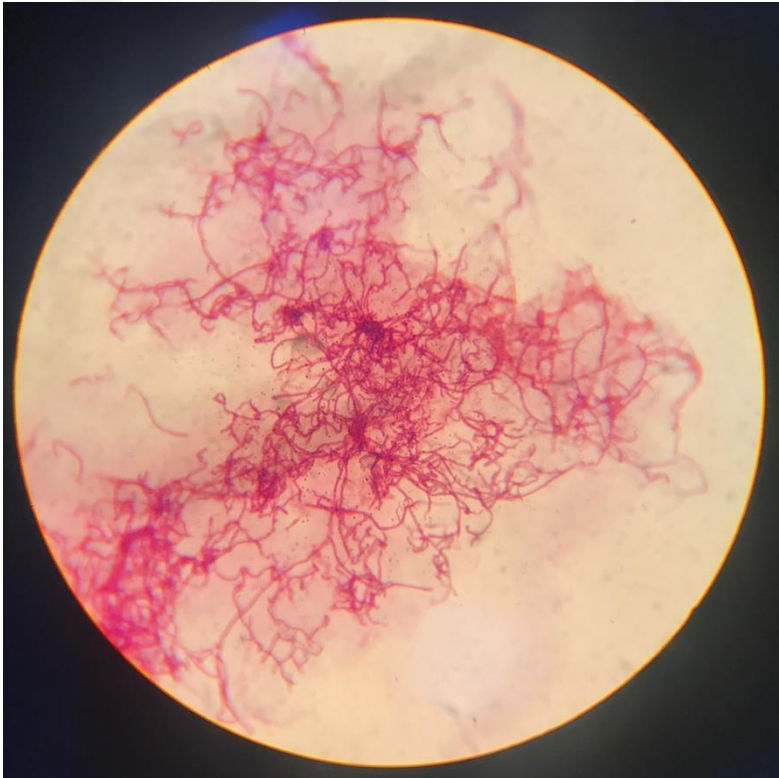


31

65

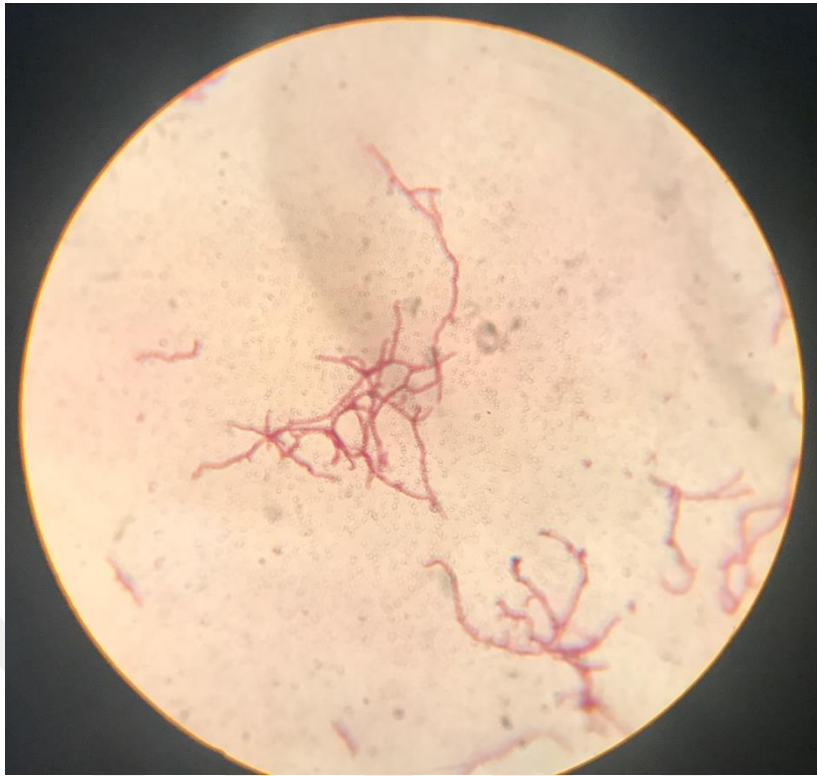


32



33

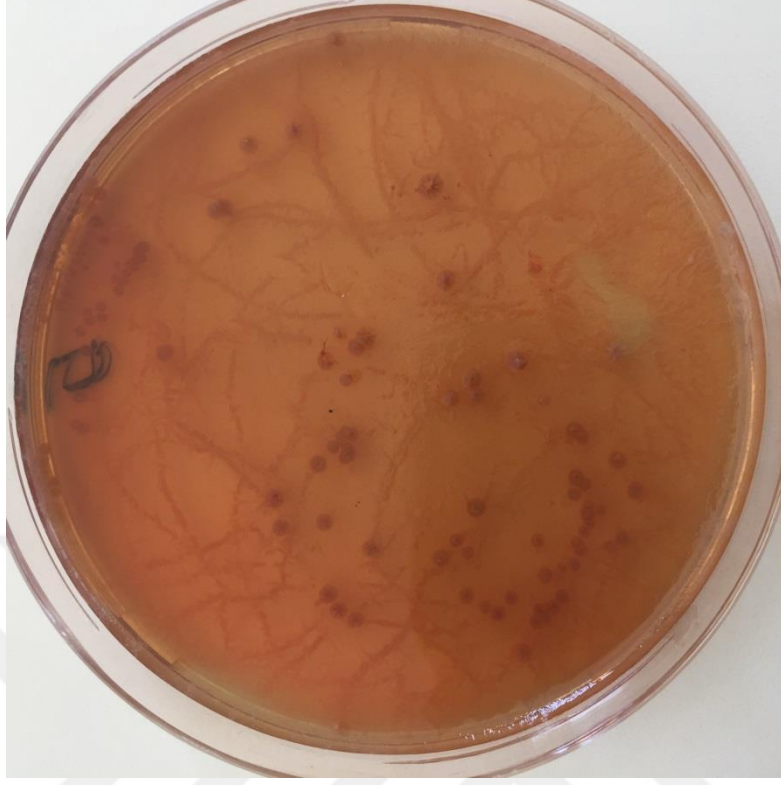
66



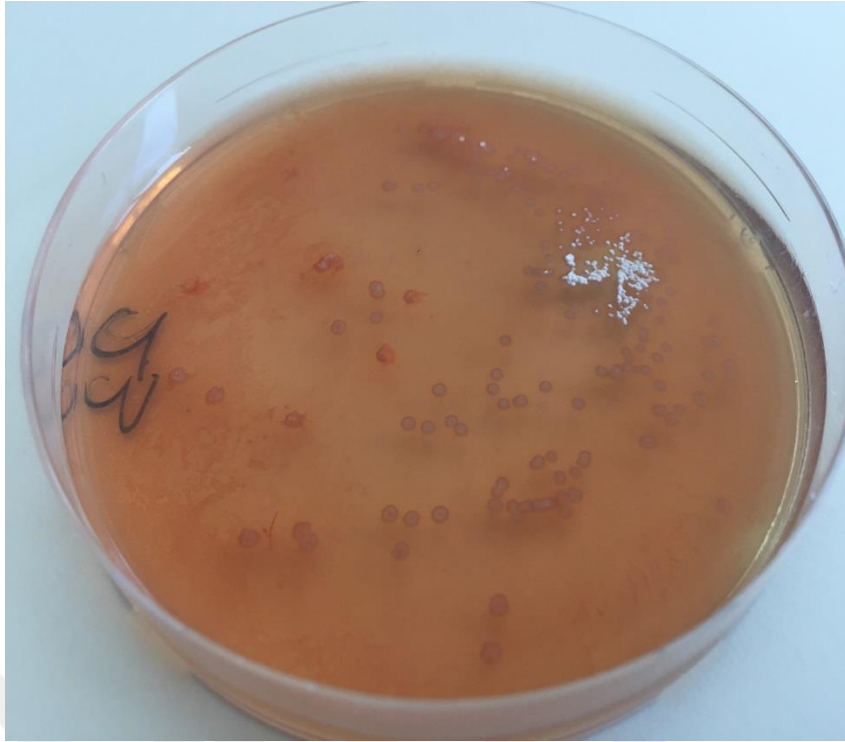
34

67

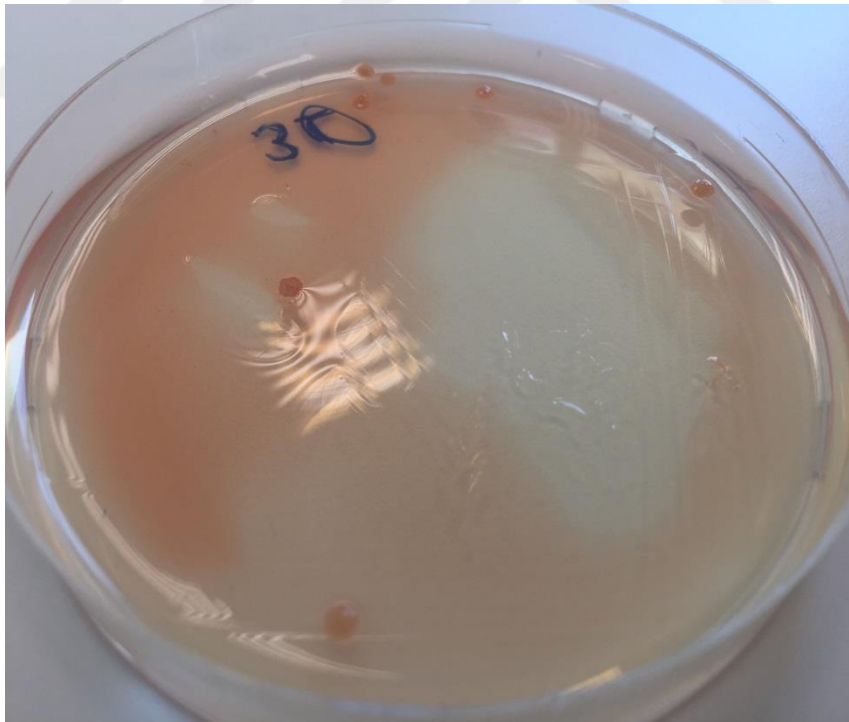
Kongo Kırmızı ile Boyanma



5

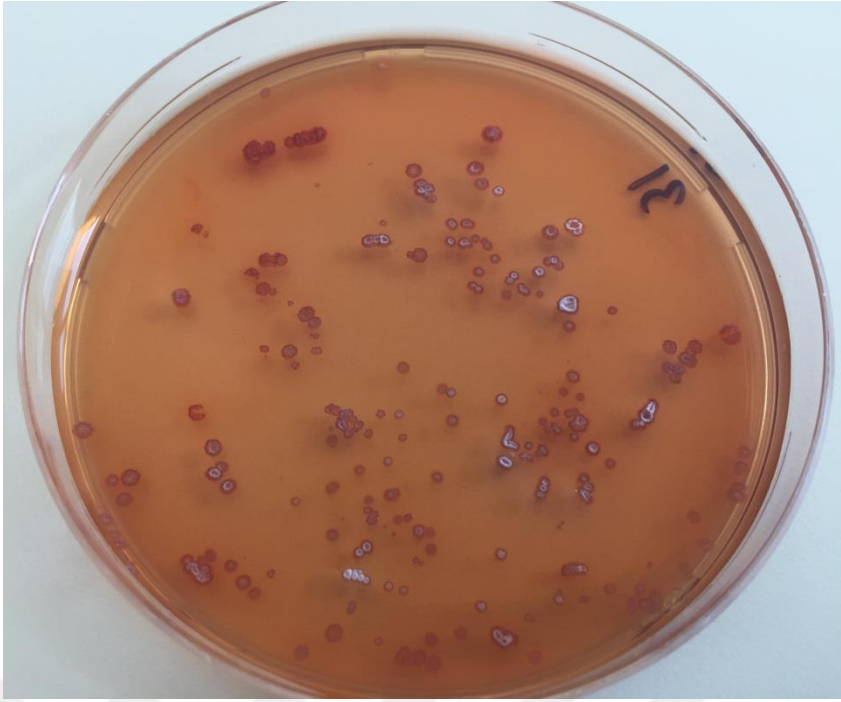


23

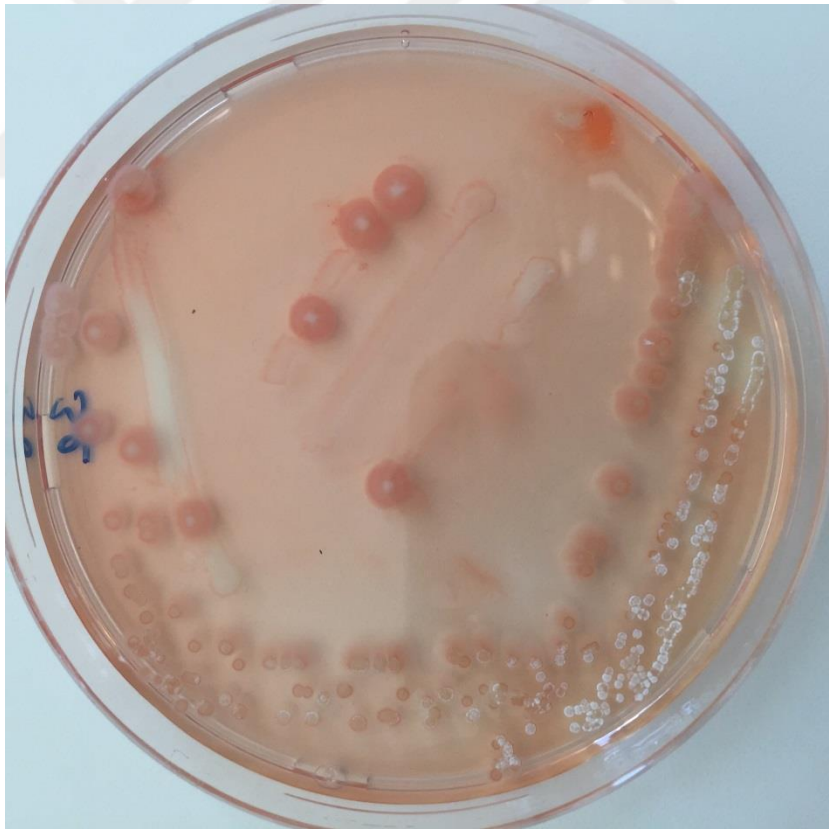


30

69



31

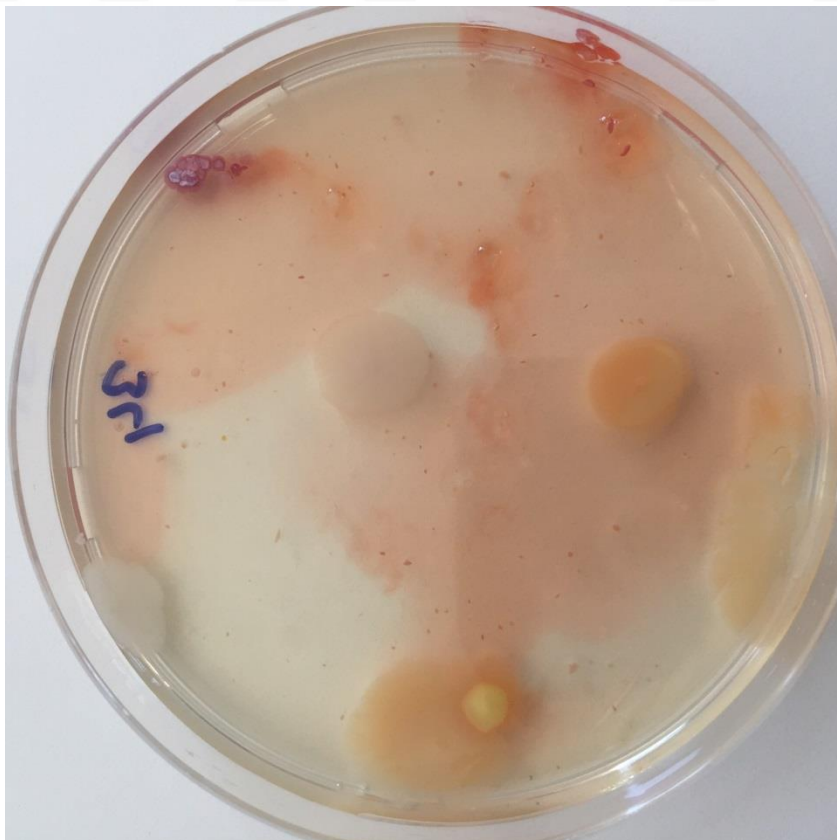


32

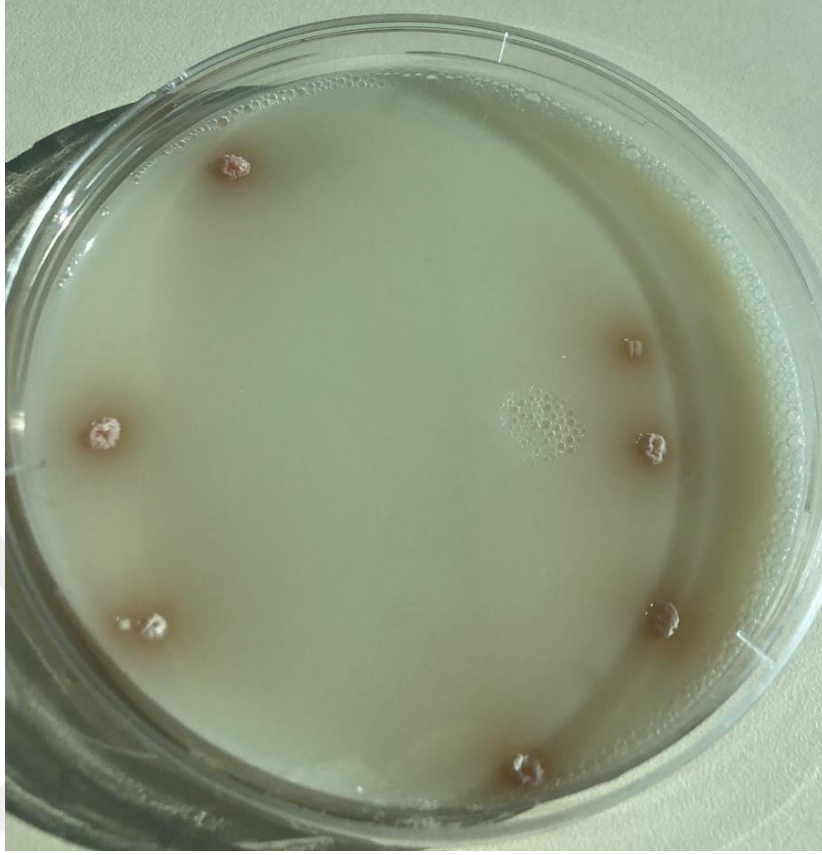
70



33



71

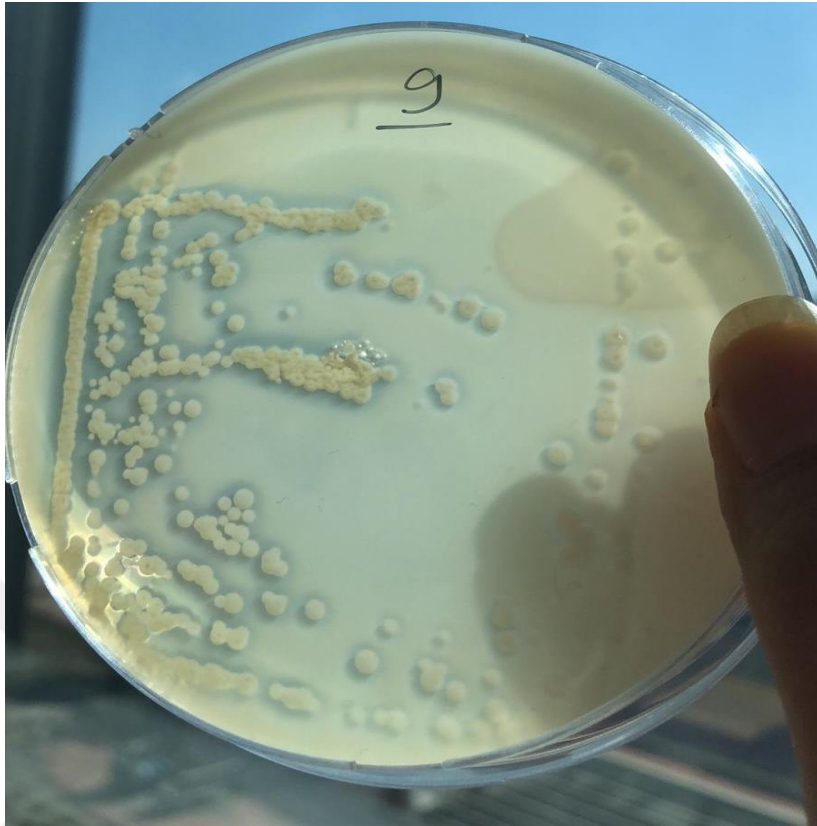
Kazein Hidrolizine İlişkin Görüntüler

4

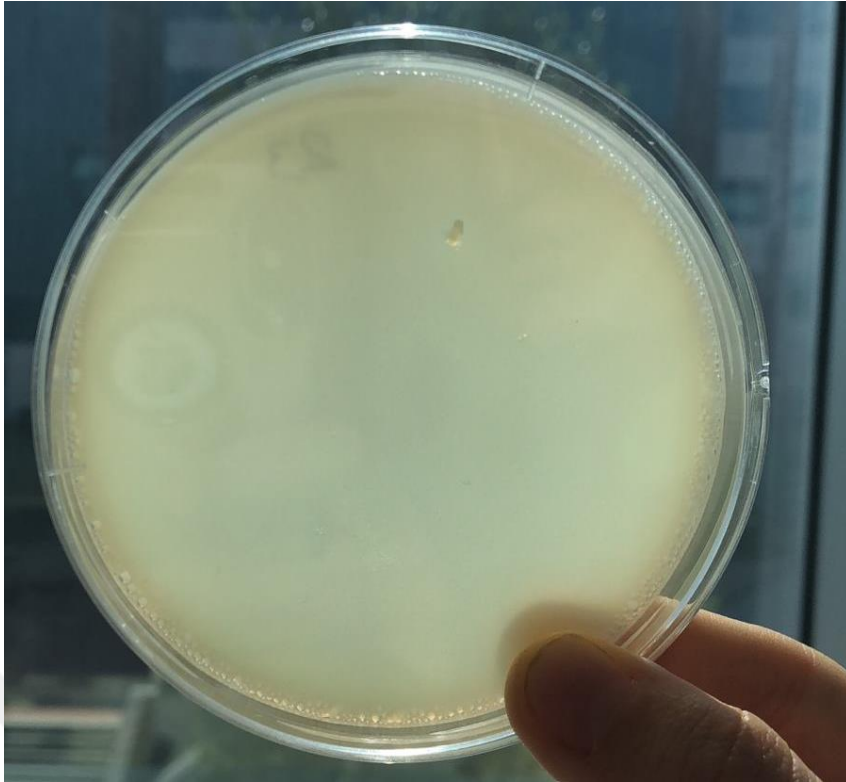


72

5



9



23



28

74



30

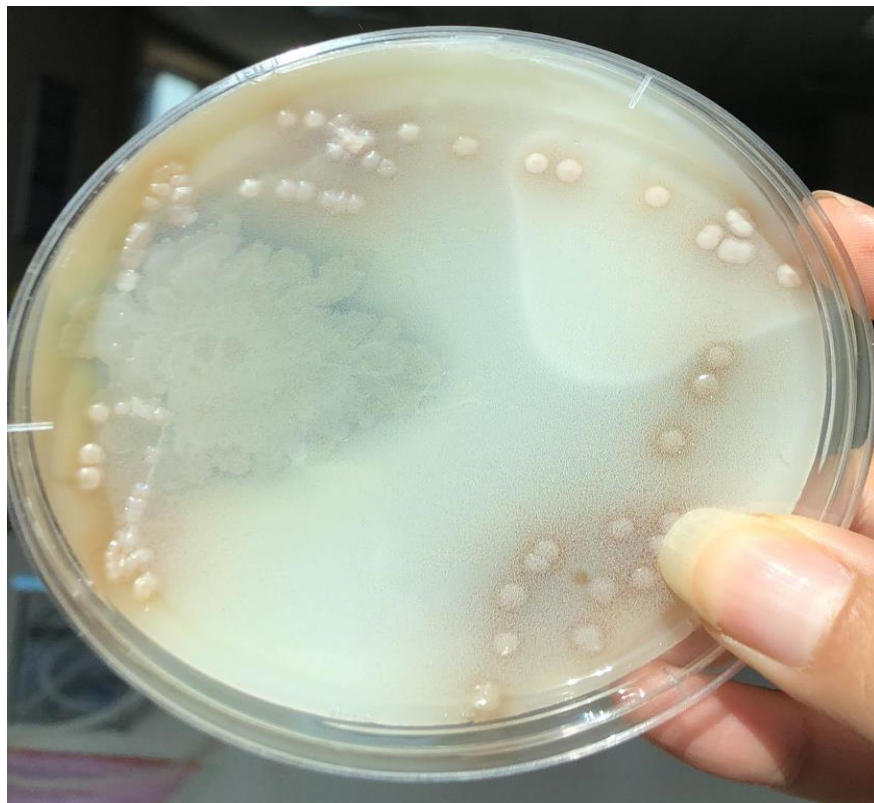


31

75

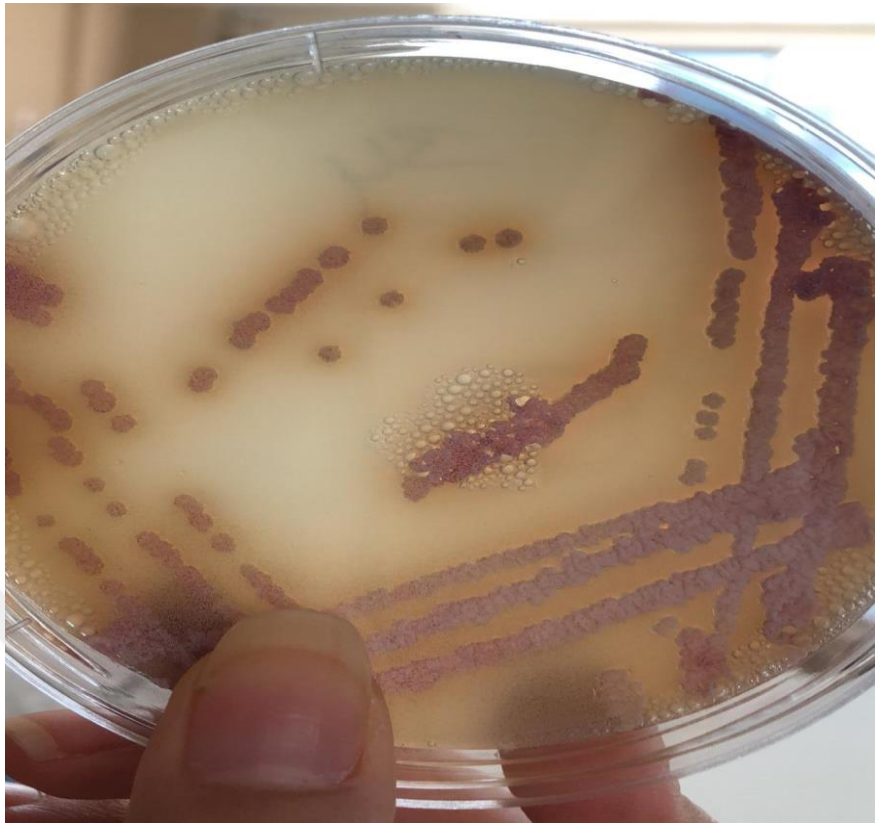


32



33

76



34

77

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :Neşecan DUMAN
Doğum Yeri ve Yılı :Üsküdar-11/06/1985



<u>Eğitim Durumu</u>	<u>Yıl</u>
Lise :Amasya Anadolu Lisesi	1999-2003
Lisans :Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	2004-2008
Yüksek Lisans :Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	2016-2019
<u>Çalıştığı Kurum / Kurumlar</u>	<u>Yıl</u>
1- Tarım ve Orman Bakanlığı Şişli İlçe Müdürlüğü	2012-2016
2- Tarım ve Orman Bakanlığı Pamukkale İlçe Müdürlüğü	2016-halen

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

- 1-
- 2-

