

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ *FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANİSA İLİ TARIM ALANLARINDAKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

121515

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Arş. Grv. Mustafa OSKAY

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Anabilim Dalı : Biyoloji
Programı : Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

MANİSA 2002

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANİSA İLİ TARIM ALANLARINDAKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Arş. Grv. Mustafa OSKAY

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09 / 01 / 2002
Tezin Savunulduğu Tarih : 22 / 01 / 2002

Tez Danışmanı : Prof. Dr. A. Üsame TAMER
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ
: Doç. Dr. Rengin ELTEM

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

MANİSA 2002

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ŞEKİLLER DİZİNİ	II
TABLolar DİZİNİ	IV
TEŞEKKÜR	V
TÜRKÇE ÖZET	VI
YABANCI DİL (İNGİLİZCE)' DE ÖZET (ABSTRACT)	VII
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAKLARIN ÖZETİ	3
2.1. Aktinomisetlerin İzolasyon ve Tanılanmasıyla İlgili Çalışmalar	3
2.2. Aktinomisetlerden Antibiyotik Üretimi İle İlgili Çalışmalar	9
2.2.1. Antibiyotikler Hakkında Genel Bilgiler	5
2.2.2. Antibiyotik Üreticisi Aktinomisetlerle İlgili Çalışmalar	10
2.3. Aktinomisetlerin ve Ürünlerinin Toprak Kökenli Patojenlerin Biyokontrolünde Kullanımı	12
3. MATERYAL ve METOT	14
3.1. Materyal	14
3.1.1. Araştırma İçin Seçilen İstasyonlar	14
3.1.2. Test Mikroorganizmaları	14
3.1.3. Besiyerleri	15
3.2. Metotlar	25
3.2.1. Toprakdan Aktinomiset İzolasyonu	25
3.2.2. İzole Edilen Aktinomiset' lerin Antimikrobiyal Spektrumlarının ve Etkinlik Derecelerinin Saptanması	26
3.3. İzolatların Tanılanması	28
3.3.1. Renk Gruplaması	28
3.3.2. Kültürel ve Morfolojik İncelemeler	28
3.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal özelliklerinin Belirlenmesi	29
4. BULGULAR	30
4.1. İzolasyon Sonuçları	30
4.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi	30
4.3. Renk Gruplaması	39
4.4. Kültürel ve Morfolojik Özellikler	48
4.5. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler	63
5. TARTIŞMA	79
6. KAYNAKLAR	85
7. ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Antibiyotiklerin Bakteri Hücresinde Hedef Aldığı Bölgeler	10
Şekil 4.1. 3Ba1 No' lu İzolatın Test Organizmalarına Karşı Antibakteriyal Etkisi	34
Şekil 4.2. 3Ba3 No' lu İzolatın Test Organizmalarına Karşı Antibakteriyal Etkisi	34
Şekil 4.3. 5C12 No' lu İzolatın Test Organizmalarına Karşı Antibakteriyal Etkisi	35
Şekil 4.4. 9B40 No' lu İzolatın Test Organizmalarına Karşı Antibakteriyal Etkisi	35
Şekil 4.5. 1B49 No' lu İzolatın Test Organizmalarına Karşı Antibakteriyal Etkisi	36
Şekil 4.6. 10P50 No' lu İzolatın Test Organizmalarına Karşı Antibakteriyal Etkisi	36
Şekil 4.7. 3Ba3 No' lu İzolatın <i>F. oxysporum</i> ' a Karşı Antimikrobiyal Etkisi	37
Şekil 4.8. 1B49 No' lu İzolatın <i>F. oxysporum</i> ' a Karşı Antimikrobiyal Etkisi	37
Şekil 4.9. 3Ba3 No' lu İzolatın Bazı Mayalara Karşı Antimikrobiyal Etkisi	38
Şekil 4.10. 1B49 No' lu İzolatın Bazı Mayalara Karşı Antimikrobiyal Etkisi	38
Şekil 4.11. 3Ba1 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	40
Şekil 4.12. 3Ba3 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	41
Şekil 4.13. 5C12 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	41
Şekil 4.14. 1B19 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	42
Şekil 4.15. 9B40 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	42
Şekil 4.16. 10P50 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	43
Şekil 4.17. 3Ba1 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	43
Şekil 4.18. 3Ba3 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	44
Şekil 4.19. 5C12 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	44
Şekil 4.20. 1B19 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	45
Şekil 4.21. 9B40 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	45
Şekil 4.22. 10P50 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	46
Şekil 4.23. 3Ba1 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	46
Şekil 4.24. 1B19 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	47
Şekil 4.25. 1B49 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	47
Şekil 4.26. 10P50 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında 14 Günlük Gelişimi	48
Şekil 4.27. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 3Ba1 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	52
Şekil 4.28. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 3Ba3 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	52
Şekil 4.29. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 5C12 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	53
Şekil 4.30. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 1B19 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	53
Şekil 4.31. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 9B40 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	54
Şekil 4.32. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 1B49 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	54
Şekil 4.33. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 10P50 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	55
Şekil 4.34. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 10P50 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi	55

Şekil 4.35. 3Ba1 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da 14 Günlük Gelişimi	56
Şekil 4.36. 3Ba3 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da 14 Günlük Gelişimi	56
Şekil 4.37. 5C12 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da 14 Günlük Gelişimi	57
Şekil 4.38. 1B19 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da 14 Günlük Gelişimi	57
Şekil 4.39. 9B40 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da 14 Günlük Gelişimi	58
Şekil 4.40. 3Ba1 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında 14 Günlük Gelişimi	58
Şekil 4.41. 3Ba3 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında 14 Günlük Gelişimi	59
Şekil 4.42. 5C12 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında 14 Günlük Gelişimi	59
Şekil 4.43. 10P50 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında 14 Günlük Gelişimi	60
Şekil 4.44. 3Ba1 No' lu İzolatın Glukoz-Asparagin Agar' da 14 Günlük Gelişimi	60
Şekil 4.45. 5C12 No' lu İzolatın Glukoz-Asparagin Agar' da 14 Günlük Gelişimi	61
Şekil 4.46. 10P50 No' lu İzolatın Glukoz-Asparagin Agar' da 14 Günlük Gelişimi	61
Şekil 4.47. 3Ba1 No' lu İzolatın Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)' da 14 Günlük Gelişimi	62
Şekil 4.48. 3Ba3 No' lu İzolatın Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)' da 14 Günlük Gelişimi	62
Şekil 4.49. 1B19 No' lu İzolatın Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)' da 14 Günlük Gelişimi	63
Şekil 4.50. 3Ba1 No' lu İzolatın Tirozin Agar (ISP 7) Ortamında Melanin Oluşturması	66
Şekil 4.51. 5C12 No' lu İzolatın Tirozin Agar (ISP 7) Ortamında Melanin Oluşturması	66



TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Aktinomisetlerde Hücre Duvarı Tipleri	4
Tablo 2.2. <i>Streptomyces</i> ve İlişkili Genusların Bazı Morfolojik Özellikleri	6
Tablo 2.3. Hücre Çeperi Kemotip I olan Diğer <i>Actinomycetes</i> ile <i>Streptomyces</i> Genusu Ayrımında Kullanılan Karakterler	7
Tablo 2.4. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması	9
Tablo 2.5. <i>Streptomyces</i> Genusu Üyeleri Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler	11
Tablo 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı İstasyonlar	14
Tablo 4.1. İzole Edilen Aktinomiset Kültürü Sayılarının İstasyonlara Göre Dağılımı	30
Tablo 4.2. İzolatların Antibakteriyal Etkileri	31
Tablo 4.3. Test Organizmalarına karşı Etki Gösteren İzolatların Sayıları ve % Oranları	32
Tablo 4.4. Tanılaması Yapılan İzolatların Bazı Maya ve Küflere Karşı Antimikrobiyal Etkileri	33
Tablo 4.5. Tanılaması Yapılan İzolatlarımızın ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (7 Günlük İnkübasyon Sonuçları)	39
Tablo 4.6. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 günlük inkübasyon sonuçları)	39
Tablo 4.7. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 5 ve ISP 6 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 günlük inkübasyon sonuçları)	40
Tablo 4.8. Tanılaması Yapılan İzolatların Kültürel Karakteristikleri	49
Tablo 4.9. Tanılaması Yapılan İzolatların Bazı Besiyerlerindeki Spor Zinciri Morfolojisi	51
Tablo 4.10. Seçilen İzolatların Çeşitli Karbon Kaynaklarını Kullanımı	63
Tablo 4.11. Seçilen İzolatların Azot Kaynaklarını Kullanımı	64
Tablo 4.12. İzolatların Farklı Sıcaklık ve İnhibitörlerle Büyüme Özellikleri	64
Tablo 4.13. İzolatların Bazı Fizyolojik Özellikleri	65
Tablo 4.14. İzolatların Bazı Antibiyotiklere Karşı Hassasiyetleri	65
Tablo 4.15. 3Ba1' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	67
Tablo 4.16. 3Ba3' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	68
Tablo 4.17. 5C12' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	70
Tablo 4.18. 1B19' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	72
Tablo 4.19. 9B40' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	73
Tablo 4.20. 1B49' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	75
Tablo 4.21. 10P50' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Türün Pozitif Olasılık Matriksi	77

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasını öneren ve çalışmalarımda her türlü desteğini esirgmeden beni yönlendiren, değerli bilgilerinden yararlandığım tez danışmanım, Hocam Sayın Prof. Dr. A. Üsame TAMER' e; değerli zamanından ödün vererek bazı kaynakların teminini sağlayan Yrd. Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a, fotoğrafların çekiminde yardımlarını gördüğüm Tolga Tunç ÇALIŞKAN (Stüdyo Nil)' a, ayrıca yardımlarından dolayı meslektaşlarım Araş. Grv. Kamuran AKTAŞ, Araş. Grv. Cem AZERİ ve Araş. Grv. Fatih KALYONCU' ya teşekkür ederim.



ÖZET
MANİSA İLİ TARIM ALANLARINDAKİ TOPRAKLARDAN İZOLE EDİLEN
AKTİNOMİSETLERİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa OSKAY
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. A. Üsâme TAMER
Ocak 2002

Manisa ili tarım alanlarındaki topraklardan 50 aktinomiset kültürü izole edilmiştir. İzole edilen aktinomiset kültürlerinden 17' sinin antimikrobiyal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösterenlerden 8 izolat sadece Gr (+) bakterilere, 3 izolat sadece Gr (-) bakterilere ve 6 izolat ise hem Gr (-) bakteriler hem de Gr (+) bakteriler üzerine etkili bulunmuşlardır.

Test organizması olarak seçilen fitopatojen bakterilere karşı en etkili izolatlar 3Ba3 (18 mm ile *Agrobacterium tumefaciens*, 15 mm ile *Erwinia amylovora* ve 13 mm ile *Pseudomonas viridiflova*) ile 5C12 (26 mm ile *E. amylovora*, 18 mm ile *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* ve 11 mm ile *P. viridiflova*)' dir.

Antimikrobiyal aktivite ve spektrum durumları değerlendirilerek 50 aktinomiset kültürü arasından seçilen 7 izolattan, izolat 3Ba1 *Streptomyces antibioticus*; izolat 3Ba3 *Streptomyces rimosus*; izolat 5C12 *Streptomyces lavendulae*; izolat 1B19 *Streptomyces lydicus*; izolat 9B40 *Streptomyces phaeochromogenes*; izolat 1B49 *Streptomyces halstedii* ve izolat 10P50 *Streptomyces albus* olarak tanılanmıştır.

Ayrıca çalışmada tanılaması yapılan izolatların bazı maya ve küflere karşı antimikrobiyal etkileri de tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Streptomyces*, izolasyon, identifikasyon, biyolojik kontrol ve antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES WHICH ISOLATED FROM FARMING SOILS OF MANISA PROVINCE OF TURKEY

OSKAY Mustafa

Msc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. A. Üsame Tamer

2002, January

50 *Actinomycetes* cultures were isolated from farming soils of Manisa Province. Antimicrobial activity were determined from 17 of 50 isolated cultures. Because of that, 8 isolates produce antimicrobial substances against only on Gr (+) bacteria, 3 isolates only against Gr (-) bacteria and last 6 isolates against both Gr (-) and Gr (+) bacteria.

The most effective isolates on phytopathogen bacteria that selected as test organisms are isolate 3Ba3 (18 mm against on *Agrobacterium tumefaciens*, 15 mm against on *Erwinia amylovora* and 13 mm against on *Pseudomonas viridiflova*) and isolate 5C12 (26 mm against on *E. amylovora*, 18 mm against on *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* and 11 mm against on *P. viridiflova*)

According to antimicrobial activity and spectrum broadness, seven isolates were selected and identified among 50 *Actinomycetes* cultures; The isolate 3Ba1 as *Streptomyces antibioticus*; the isolate 3Ba3 as *Streptomyces rimosus*; the isolate 5C12 as *Streptomyces lavendulae*; the isolate 1B19 as *Streptomyces lydicus*; the isolate 9B40 as *Streptomyces phaeochromogenes*; the isolate 1B49 as *Streptomyces halstedii* and the isolate 10P50 as *Streptomyces albus*.

Also, in this study antimicrobial effects of identified isolates on some yeasts and moulds were determined.

Key Words: *Streptomyces*, Isolation, Identification, biological control and antimicrobial activity.

1. GİRİŞ

İlaç endüstrisi araştırmacıları yeni ilaçlar aramada moleköl bankaları kurma, yüksek verimlileri seçim, biyo-enformatik ve robot bilimi gibi modern yöntemlere başvuruyorlar. Yarının antibiyotikleri nasıl bulunacak? Bunun için moleköl mikrobiyolojinin ortaya koyduğu bakteri direnci, DNA' nın kendi benzerlerini yapması, bakteri bölünmesi, bakteriler arası iletişim vs. gibi çok özel konulara eğiliniyor. Bakterilerin yaşaması ya da hastalık yapması için hangi genlerin gerekli olduğu araştırılıyor.

1970' lerde ilaç endüstrisi, hastane ortamlarında ortaya çıkan bakteri direnci problemini kontrol altına alabilecek ilaçlarla silahlanmış bulunuyordu. Her biri bir-iki antibiyotik üzerinde uzmanlaşmış firmalar, ellerindeki antibiyotiklerin etki alanını (spektrumunu) genişletmişler ve yan etkilerini azaltmışlardı. İçlerinden bazıları diğer bakteri, virüs ve mantar öldürücü ilaçlara yöneldiler. Bazılarıysa antibakteriyal ilaç üretmekten vazgeçtiler. Onlara göre piyasanın gereksinimleri karşılanmıştı. 1980' lerin sonlarına doğru ortaya çıkan iki olay bu görüşü değiştirdi; bazı bakterilerin birçok antibiyotiğe çoklu direnç kazanması ve bakteri direncinin yalnız hastanelerde değil, toplumda da yaygınlaşması. İlaç endüstrisi ve mikrobiyologlar bir yandan yeni antibiyotikler ve aşılar ararken, bir yandan da bakterilerde direnç yaratmayacak bileşikler aramaya başladılar. Bu yeni tip ilaçlar, antibiyotikler gibi bakterileri öldürmek yerine onların hastalık yapma mekanizmalarını bozacak ya da birbirleriyle iletişimine engel olacaktır (Alsan, 1999).

Antibiyotikler günümüzde, bütün dünyada en fazla kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu yaygın kullanım hem ekonomik yükü hem de yan etkilerin sık görülmesi gibi önemli sorunları da beraberinde getirirken; dirençli bakterilerin gelişmesine neden olmalarından dolayı da, toplum sağlığını tehdit eder duruma gelmişlerdir.

Son 40 yılda yeni antibiyotiklerin keşfi için en az 15 milyon organizma izole edilmiş ve yaklaşık on bin farklı antimikrobiyal madde tanımlanmış; her yıl bunların bir çoğu karakterize edilerek 200-300 tanesinin yeni olduğu saptanmıştır. Fakat bu çalışmalar çoğunlukla, en önemli antibiyotik üreticileri olarak bilinen funguslar, aktinomisetler ve *Bacillus* genusu üyeleri üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Son birkaç yılda diğer genuslar üzerinde detaylı araştırmalar yapılmasının gerekliliği de vurgulanmaktadır.

Aktinomisetlerden en fazla antibiyotik üreticileri *Streptomyces* genusuna giren türlerdir. Fakat son zamanlarda antibiyotik tarama programları *Micromonospora* ve *Nocardia* genusu türleri üzerinde de yoğunlaşmıştır.

İnsan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde, hayvan beslemede kullanılan antibiyotikleri ürettiği saptanan organizmalar diğer taraftan tarımda, toprak kaynaklı patojenlerin sebep olduğu ve günden güne büyük bir problem haline gelen, bitki hastalıklarına karşı kullanılabilir. Bitki hastalıklarıyla mücadelede kullanılan kimyasallar; uygulama zorluklarının oluşu, kısa ve dar

periyotlu etkileri, patojenlerin bunlara karşı direnç kazanması ve ekonomik yüklerinin çok fazla oluşu gibi nedenlerden dolayı giderek önemini kaybetmektedirler. Bunun aksine, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde mikroorganizmaların kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır.

Bitki hastalıklarının biyolojik kontrol çalışmalarında esas materyali mikroorganizma gruplarından aktinomisetler oluşturur. Çok sayıda araştırmacı (Lacey, 1973; Lechevalier et al., 1977; Williams, 1976; Turhan 1981; Goodfellow and Williams, 1983; Turhan and Grossmann 1986; Turhan and Turhan 1989; Sembiring and et al., 2000) in vitroda yaptıkları çalışmalarla *Streptomyces* türlerinin toprak kaynaklı patojenlerin büyümesini inhibe ettiğini saptamış, güçlü antagonistik etkilerini belirledikleri izolatların bu patojenlere karşı biyolojik mücadelede kullanılabileceklerini belirtmişlerdir.

Aktinomisetlerden antibiyotik üretimi konusundaki çalışmaların (Lacey, 1973; Öner ve ark., 1987; Hsieh and Jones, 1995; Denizci, 1996; Pandza et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Hatano, 1999; Sheldon et al., 1999) daha yoğun olduğu görülmektedir. Bol hammadde kaynağına sahip olduğumuz halde dışarıdan satın aldığımız çeşitli antibiyotik aktif maddelerinin ülkemizde üretilmemesinin nedeni, konu ile ilgili teknolojilerin yeterli olmayışı ve bu konuda araştırma eksikliğinin bulunmasıdır. Çalışmamızda izole ettiğimiz aktinomiset kültürlerinin fitopatojen bakterilere karşı etkileri saptanmaya çalışılmış; aktinomisetlerin bu alanda diğer mikroorganizmalara nazaran daha etkili olabileceklerini göstermek amacı güdülmüştür. Yukarıda da belirttiğimiz gibi hem biyolojik mücadele de hem de bu konuda ülkemizde yapılacak yeni çalışmalara bir ön kaynak oluşturmak için bu tür bir araştırmayı yapmayı amaç edindik.

2. KAYNAKLARIN ÖZETİ

2.1. Aktinomisetlerin İzolasyon ve Tanınmasıyla İlgili Çalışmalar

Actinomycetes türleri topraklar, kompostlar, tatlı su depoları, besin maddeleri ve atmosfer gibi her türlü doğal madde üzerinde görülürler. Aktinomisetler çoğu topraklarda çok bol olup gramda bir milyonu aşkın canlı sayımı yapılabilmektedir. Onlar için bazik ve nötral topraklar asit topraklardan, nötral turbalar, asit turbalardan daha uygun ortamlardır (Lacey, 1973; Williams, 1976; Goodfellow and Board, 1980; Goodfellow and Williams, 1983; Öner, 1989).

1888 yılına kadar geriye gidilecek olursa, Globig topraktan termofilik bir form izole etmiş ve aktinomisetlerin toprakta bulunabildiğine dikkati çekmiştir. Ayrıca gübre ve samandan benzer kültürler izole edilmiştir. 1900 yılında Beijerinck aktinomisetlerin toprakta, bahçe toprağında bir metreye kadar, kumsal toprakta 2 metreye kadar çok bol miktarda bulduklarını ortaya koymuştur. Hiltner ve Störmer 1903' de jelatin plak metodunu kullanarak aktinomisetleri ilk defa saymışlar ve aktinomisetlerin sayısının mevsime bağlı olarak değiştiğini bulmuşlar; onların toprak mikroflorasının %13-30' nu oluşturduğunu, mevsime bağlı olarak ilkbaharda %20, yazın %13 ve sonbaharda %30 olarak saptamışlardır. Conn 1916' da aktinomisetlerin bitki köklerinde zengin toprakların mikrobiyal popülasyonlarının %40' ına kadar çıktıklarını; halbuki ekimi yapılan topraklarda onların sayılarının toplam mikrofloranın sadece %21' ini teşkil ettiğini saptamıştır (Öner, 1989).

Aktinomisetlerin topraktaki bolluğunu kontrol eden en önemli faktörlerin, organik madde miktarı, nisbi rutubet miktarı, sıcaklık, toprağın havalanması, pH ve toprak vejetasyonu olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Lechevalier, 1989; Öner, 1989; Williams., et al., 1989; Anderson and Wellington, 2001).

Aktinomisetlerin hücre çeperi kompozisyonunun detaylı olarak çalışılması onların yeniden sınıflandırılmalarını kolaylaştırmıştır. Lechevalier ve ark.' nin bulgularına göre *Streptomyceceae* familyası üyelerinin peptidoglikan yapısında LL-diaminopimelik asit, diğer aktinomiset üyelerinde ise meso-diaminopimelik asit (meso-DAP) bulunmuştur (Tablo 2.1.). Bazı aktinomisetlerde LL-DAP içermesine rağmen bunlar (*Arachnia*, *Pimelobakter*, *Sporichthya*, *Kineosporia*, *Nocardiodies*, *Kitasatosporia*, *Intrasporangium* v.b.) biyokimyasal, morfolojik ve fiziksel özellikleri ile *Streptomyceceae*'den kolayca ayrılabilirler (Becker and et al., 1965; Cross, 1989; Goodfellow, 1989; Williams et al., 1989).

Tablo 2.1. Aktinomisetlerde Hücre Duvarı Tipleri (Prescott, Harely and Klein; 1990' dan).

Hücre Duvarı Tipi	DAP İzomeri	Glisin (Interpeptid Köprülerinde)	Karakteristik Şeker	Örnek Genus
I	L,L	+		<i>Streptomyces</i>
II	Meso	+		<i>Microminospora</i> <i>Actinoplanes</i>
III	Meso	-		<i>Thermoactinomyces</i> <i>Actinomadura</i> <i>Frankia</i>
IV	Meso	-	Arabinoz, Galaktoz	<i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardia</i>

Streptomycetaceae' nin sınıflandırılmasında peptidoglikan tipide önemlidir. Bu familyada peptid ara köprüsünün glisinlerden oluştuğu A₃Y tipinde peptidoglikan vardır. Ayrıca hücre çeperleri fosfolipidler, menaquinonlar, yağ asitleri ve asetillenmiş muramik asit kalıntıları içerir. Familya üyelerinin sanıldığı gibi tayinleri kolay yapılamamaktadır. Örneğin; *Kitasatospora*' da havasal miselden şekillenen sporlar LL-DAP içerir, katı ve sıvı besiyerinde büyüyen vejetatif (substrat) miselyumlarda ise meso-DAP vardır. *Actinomadura* ve *Microtetraspora*' da ise meso-DAP yanında iz halde LL-DAP bulunmaktadır. Ve de familya üyelerindeki yağ asitleri ve polar yağların miktarı ortam şartlarına bağlı olarak değişmektedir.

Filogenetik çalışmalarla sınıflandırma ve tanımlamada morfoloji ve kemotaksonomi kadar moleküler kriterlerde önemlidir. *Streptomycetaceae*' nin GC içeriği %69-78' dir. rRNA-DNA ilişkileri, 16S rRNA ve 5S rRNA oligonukleotid sıralarının bulunması ile *Streptomycetaceae*' nin tanımlanması daha da kolaylaşacaktır.

Ayrıca familyanın karakteristik özelliklerini saptamada morfolojik özellikler de göz önünde bulundurulur; bunlar, substrat miselyumun fragmentasyonu, spor zincirlerinin oluşumu, havasal miselin oluşum tipi ve spor yüzey süs tipleri v.b. olabilir. Sporlar piknidia, sporangia veya sporangiaya benzer vesiküllerde oluşturulurlar. Sporlar fungus sporlarına benzerliğinden dolayı konidia veya artrospor olarak isimlendirilirler. Havasal miselyumun dallanması, spor zincir şekilleri ve spor yüzeyleri gibi morfolojik özellikleri substrat miselyumdan daha önemlidir. Spor yüzey şekilleri; yumuşak, siğilli, spin şeklinde veya tüylü; spor zincir şekilleri ise; düz, fleksiöz veya spiral şekillerinde olabilmektedir. Havasal sporların oluşumu ise, havasal hiflerin spor zincirleri şekline transformasyonu şeklinde olduğu varsayılmıştır. Bu olay genustan genusa farklılık göstermekle beraber, hifin fragmentasyonu ile çubuk şeklinde veya kokoid elementler oluşmaktadır. Hareketli sporlar nadir olarak gözükmemektedir.

Streptomyces (Waksman ve Henrici 1943), aktinomisetler içerisinde gerek morfolojisi gerekse toprakta bol bulunan bir cins olmasından dolayı çok iyi tanımlanmış; antibiyotik üretimi ve diğer sekonder metabolitleri üretmesi yönünden çok önemli bir genustur (Cross, 1989; Locci,

1989; Öner, 1989; Wendisch and Kutzner, 1991; Atalan, 1993; Denizci, 1996; Al-Tai., et al., 1999).

Streptomyces genusu kimyasal, moleküler ve taksonomik metot çalışmaları ile şekillendirilmiştir (Goodfellow et al., 1986; Lechevalier, 1989; Williams et al., 1989; Anderson and Wellington, 2001). Onlar, Gram pozitif, asit fast olamayan, nadiren parçalanen vejetatif hiflere (0.5-2 µm) sahip ve üremeleri aerial (Havasal) hiflerin uçundaki hareketsiz sporlarla olan organizmalardır. İstisna birkaç tür substrat miselyumda kısa spor zincirleri oluşturur; sclerotium, piknidium, sporangium ve synnema benzeri yapılar oluşturulabilir; büyümenin başlangıcında koloniler düz ve yumuşak, sonraları sert-sıkı, pamukumsu, flokkoz, granüllü, pudramsı veya kadifemsi görülebilir. Ve substrat miselin renginden sorumlu çok sayıda pigment üretilebilir, ayrıca diffüze olabilen pigmentlerde oluşturulabilir. Çoğu strain tek ya da çok sayıda antibiyotik üretebilir. Aerob olup, kemo-organotrofik oksidatif bir metabolizmaya sahiptirler. Katalaz pozitifdir. Genellikle nitratlar nitritlere indirgenir ve adenin, eskulin, kasein, jelatin, hipoksantin, nişasta, L-tirozin parçalanır. Büyüme ve enerji için çok sayıda organik bileşik tek karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Optimum sıcaklık 25-35 °C olup bazı türler, psikrofilik ve termofiliktir. Optimum pH 6.5-8.0' dir. Hücre çeperi peptidoglikan yapısında büyük miktarda L-Diaminopimelik asit (L-DAP) içerirler. Mikolik asit içermezler ve doymuş izo ve anteizo yağ asitleri, predominant izoprenolok olarak dokuz izopren birimi ile hekza ve okta dehidrojene menaquinon; ayrıca, difosfatidilethonalamin, fosfatidilgliserol, fosfatidilinositol, difosfotidilinositol içeren kompleks polar lipid içerirler; bu lipid karakterleri ile Fosfolipid tip 2 grubuna dahildirler. DNA' da % G+C oranı 69-78 arasında değişir. Birkaç tür insanlara ve hayvanlara patojen olup, diğerleri fitopatojendirler.

Goodfellow ve arkadaşları 1992' da yaptıkları bir çalışma ile *Actinopycnidium*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* ve *Microellobospora* genuslarının bazı özellikleri bakımından *Streptomyces* genusu üyelerine benzer olduklarını saptamışlar ve bu genusların *Streptomyces* genusu üyelerine dahil edilmesi gerektiğini savunmuşlardır. Kriter olarak da DNA benzerliği, biyokimyasal ve serolojik özellikleri, fajlara olan duyarlılıkları v. b. alınmıştır. Tablo 2.2.' de *Streptomyces* ve ilişkili genusların bazı morfolojik özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.2. *Streptomyces* ve ilişkili Genusların Bazı Morfolojik Özellikleri (Lechevalier, 1989; Locci, 1989' Goodfellow et al., 1992' den).

Genus	Substrat miselyum				Havasal miselyum			
	Spor zinciri	Birkaç ihtiva sporangia benzeri vesiküller	spor eden	Sklerotia	Uzun artrospor zincirleri	Birkaç ihtiva sporangia benzeri vesiküller	spor eden	Hareketli sporlar
<i>Streptomyces</i>	+, ^a	-	-	-	+	-	-	-
<i>Actinopycnidium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Actinosporangium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Chainia</i>	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Elytrosporangium</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Kitasatoa</i>	-	+	-	-	+	+	-	?
<i>Microellobosporia</i>	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Streptoverticillum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-

a, semboller; +, pozitif; -, negatif; +,-, bazı türler pozitif; ?, kesin belirli değil.

Genus *Chainia* koloni yüzeylerinde büyük miselyum toplulukları içerisinde sferik skleroitik granüller oluştururlar. Havasal hif ve spor zincirleri *Streptomyces* ile hemen hemen aynıdır. Laboratuvarında büyütülmüş olanlarda sklerotia oluşumu kaybolmasına rağmen havasal misel üretimi artmaktadır. *Streptomyces*' de gözlenen sklerotia benzeri yapılar orijin ve yapı bakımından *Chainia*' daki sklerotiumdan farklıdır. Bu granüllerin biokimyasal analizleri yapılamamaktadır.

Chainia' daki sklerotia (20- 75 µm yarıçapında veya daha büyük)' nın detaylı çalışılması, bunların orijininin geniş dallanmış yağ damlaları içeren hifsel bölgeler olduğunu göstermiştir. Bu çok lokuslu yapıların bireysel hücreleri L-2-3 diaminopropionik asit içeren hiflerle çevrilmiş ve hep birlikte çimento şeklinde sıkı bir yapı oluşturmuştur. Zamanla sklerotianın yağ içeriği yaklaşık kuru ağırlığının %50' sine ulaşır. Sklerotia ezilirse yağ damlaları ortalığa yayılır. *Chainia*' nın yaşam siklusünde sklerotianın görevi tam anlaşılmamış olup, yapılan kültür çalışmalarında sklerotia'nın kuruluğa olağanüstü bir direnç gösterdiği anlaşılmış, fonksiyonunda kuru çevrelerde organizmanın yaşamasını sağlamak olduğu açıklanmıştır.

Genus *Elytrosporangium* ve *Microellobosporia* eskiden burgu şeklindeki vesiküllerin oluşumu nedeniyle *Streptomyces*'den ayrı olarak sınıflandırılıyordu. '*Merosporangia*' ismi verilen yapıda, 7 tane hareketsiz spor bulunmaktadır; bu yapı, *Elytrosporangium*' da substrat miselyumu üzerinde *Microellobosporia*' da ise ya substrat ya da havasal misel üzerinde oluşturulur. Spor oluşum tarzı diğer *Streptomyces* artrospor zincirleriyle aynı olup, biraz daha

büyük olabilir. Vesikül duvarı zayıf buruşuk membranlı olup, diğer aktinomiset genuslarında bulunan spor zincirlerini çevreleyen fibroz kına denk geldiği düşünülüyor.

Streptomyces' in izolasyon ve karakterizasyon metodları *Kitasatoa* içinde aynı olup, *Streptomyces* havasal miselyumu üzerinde görülen artrospor uzun zincirleri bu genusa aynıdır. Ama filogenetik olarak bu genus sporangia-oluşturan aktinomisetlerden uzaktır. DNA homolojisi, hücre duvarı tipi, lipid şekilleri, faj- hücre ilişkileri gibi benzerliklerinden dolayı *Streptomyces*' e aktarılmıştır. Tablo 2.3.' de hücre çeperi kemotip 1 olan diğer *Actinomycetes* ile *Streptomyces* genusu ayırımında kullanılan karakterler verilmiştir.

Tablo 2.3. Hücre Çeperi Kemotip 1 olan Diğer *Actinomycetes* ile *Streptomyces* Genusu Ayırımında Kullanılan Karakterler (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Locci, 1989' dan).

Karakterler	Streptomyces	Intrasporangi um	Streptovorticillum	Kineosporia	Nocardioides	Sporichthya
Koloni büyüklüğü	Görülür	ND	Görülür	Küçük	ND	Mikroskobik
Substrat miselyum	+	+	+	+	+	-
Sporlar	+/-	-	-	-	-	-
Sporangia	-	-	-	+	-	-
Hareketli sporlar	-	-	-	+	-	-
Fragmentasyon	-	-	-	-	+	-
Havasal miselyum	+	-	+	-	?	+
Artrospor zinciri	+	-	-	-	-	+
Vertisil artrosporlar	+,-	-	+	-	-	+
Spor yüzeyi						
Düz	+	-	+	-	-	+
Spor yüzeyi saçsı, kvrık ya da dikenli	+,-	-	+,-	-	-	-
Hareketli sporlar	-	-	-	-	-	+
Hücre çeperi hidrolizati						
şekerleri;arabinoz, galaktoz, ksiloz	-	-	-	+	-	-
Lipid karakterleri						
Fosfolipid tip	Pii	Piv	Pii	Piii	PI	ND
Predominant menaquinon	MK-9(H6) Ya da MK-9(H8)	MK-8	MK-9(H6) Ya da MK-9(H8)	MK-9(H4)	MK-8(H4)	MK-9(H6) Ya da MK-9(H8)
Yağ asitleri						
Doygun düz zincirli	+	+	+	ND	+	+
İzo-/anteizo- dallı	+	-	+	ND	+	+
Doymamış	-	+	-	ND	+	+
10-metil dallanmış	-	-	-	ND	+	+
Mol % G+C	69-78	71	69-73	ND	66-72	ND

a; Sembol, +, pozitif; -, negatif; +,-, bazı türler pozitif; ND, not determined; ?, kesin belli değil.

Staneck ve Roberts (1974) basit ince-tabaka kromatografi işlemini ile klinik materyallerden elde ettikleri 35 izolatu tanılamış ve gruplamışlar, ayrıca sonuçlarını 18 referans suşla karşılaştırmışlardır. Sonuçta ince-tabaka kromatografisi ile aktinomisetlerin bütün hücre diaminopimelik asit ve karbonhidratlarının kolayca saptanabildiğini, bu metodun rutin klinik laboratuvarlarında çok daha hızlı sonuç verdiğini ve daha uygun olduğunu açıklamışlardır. Athalye ve arkadaşları (1981) aktinomisetlerin izolasyonunda çok sayıda besiyerine Rifampisin (5 µg/ml) ilave etmişler, topraktan *Actinomadura* strainlerini, organik maddeden ve samandan *Thermomonospora chrogea* ve *Streptomyces albus*' u daha kolay izole edebilmişlerdir. Çalışmalarında bu antibiyotiğe (2-5 µg/ml oranlarda) karşı bazı *Streptomyces* türlerinin duyarlı olduğunu görmüşlerdir. Toprak örneklerinin 100 °C' de 15 dakika muameleye tabi tutulmasının çok sayıda istenmeyen bakteriyi imha ettiğini çalışmalarında belirtmişlerdir.

Aktinomisetler arasında hem antibiyotik üreticileri hem de önemli diğer sekonder metabolitleri üretmelerinden dolayı *Streptomyces* genusuna giren türler yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Goodfellow ve arkadaşları (1992) 252 *Streptomyces* tür ve tür gruplarını 273 karakter bakımından numerik olarak belirlemişler ve elde ettikleri sonuçları eski çalışmalarla karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalarında 7-amino-4-metilcoumarin ve 4-metilumbelliferon' a dayalı hızlı enzim testlerinin *Streptomyces* sistematüğinde yararlı bilgiler verdiğini açıklamışlardır. Ruiz ve arkadaşları (1995) samandan Ksilan' ı parçalayan bir aktinomiseti *Streptomyces halstedii* olarak tanılamışlar, bu organizmanın endüstride kullanılabileceğine işaret etmişlerdir. Hatano ve arkadaşları (1997) *Streptomyces spitsbergensis* Wieczorek et al. 1993' ü morfolojik, kültürel ve fiziksel özellikleri açısından yeniden incelemişler bu türün vertisil oluşturan Streptomisetler' den olduğunu, DNA-DNA hibridizasyon verileriyle *Streptomyces baldaccii* (Farina and Locci 1966) Witt and Stackebrandt 1991 ile sinonim olduğunu belirlemişlerdir. Li (1997) topraktan selülozu parçalayan bir aktinomiset izole etmiş, morfolojik karakterleri ve hücre duvarı tipine göre bu izolatını *Streptomyces cellulolyticus* olarak tanılamıştır.

Sembiring ve arkadaşları (2000) tropik bir angiosperm olan *Paraserianthes falcataria*' nın kök çevresinden ve yetiştiği alanlardaki topraklardan aldıkları örneklerden çok sayıda *Streptomyces* izole etmişlerdir. İzolatların renk gruplamasını Oat Meal Agar ve Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar' ı besiyerinde belirlemişler, pigment oluşturabilme kabiliyetlerini referans suşlarla karşılaştırmışlardır. Renk gruplaması ve morfolojik özellikleri bakımından 94 suşla uyuşan kendi izolatlarının *Streptomyces violaceusniger* olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 12 izolatu bugün için geçerli olan tanımlanmış *S. violaceusniger* sınıfına giren türlerle karşılaştırmışlar, 6 izolatın genotipik ve fenotipik özellikleri açısından bu sınıf üyelerinden ve kullanılan referans strainlerden farklı olduklarını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar izole ettikleri *S. violaceusniger*' in patojen funguslara karşı antagonist olduğunu çalışmalarında belirtmişlerdir.

2.2. Aktinomisetlerden Antibiyotik Üretimi ile İlgili Çalışmalar

2.2.1. Antibiyotikler Hakkında Genel Bilgiler

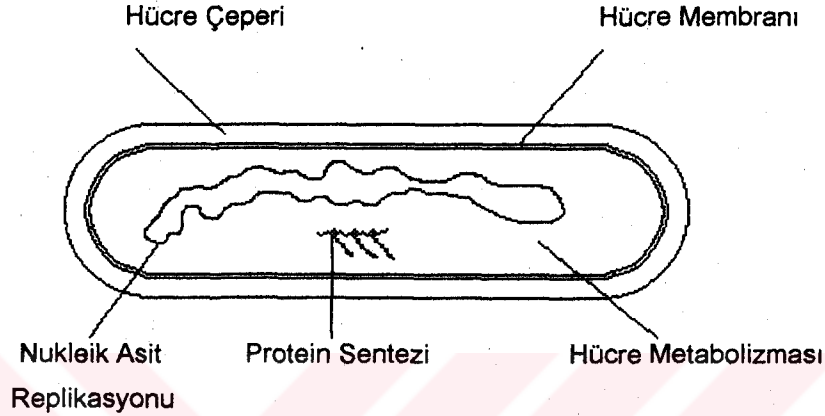
Antibiyotikler, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların belli bölgelerine olumsuz yönde etki gösteren, düşük moleküler ağırlıkta, mikrobiyal kökenli sekonder metabolitlerdir. Moleküler ağırlıkları 150-5000 dalton arasında değişir. Molekülleri karbon, hidrojen, oksijen ve azot, hatta diğer bir kısmı kükürt, fosfor veya halojen atomlarını içerir. (Öner, 1989; Anonim, 1996; Denizci, 1996; Anonim, 2001b).

Antibiyotikler sidal ya da statik etkili olabilirler. Antibiyotikler kimyasal yapılarına, üretici organizmaya, etki spektrumlarına ve hücrede etkin oldukları hedef bölgelere göre farklı gruplara ayrılabilirler. Tablo 2.4' de antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış şekli verilmiştir.

Tablo 2.4. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması (Öner, 1989; Schlegel, 1995; Anonim, 2001c' den modifiye).

Antibiyotik grupları	Antibiyotikler
β-laktam antibiyotikleri:	
Penisilinler	benzilpenisilin, ampisilin, ureidopenisilin, amoksisilin, piperasilin, metisilin
Sefalosporinler	sefalotin, sefalordin, sefagisin
Karbapenemler	imipenem
Aminoglikosidler	Streptomisin, kanamisin, gentamisin
Glikopeptidler	Vankomisin, avoparsin, teikoplanin
Makrolidler:	
14-üyeliler	eritromisin, roxithromisin, oleandomisin
15- üyeliler	azithromisin
16- üyeliler	spiramisin, tilosin, karbomisin, klarithromisin
Linkosamidler	Linkomisin, klindamisin
Streptograminler:	
Streptogramin A' lar	streptogramin A, pristinamisin IIA, virginiamisin M, mikamisin A, sinergistin A
Streptogramin B' ler	streptogramin B, virginiamisin S, pristinamisin IB, mikamisin B, sinergistin B
	dalfopristin/quinupristin, virginiamisin
Tetrasiklinler	minosiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin
Folik asit sentezi inhibitörleri	sülfamethoxazol, trimethoprim
Quinolonlar	nalidiksik asit, ciprofloksasin, enrofloxasin
Diğer	Nitrofurantoin, sülfonamid, 2,2-diamino-pirimidin; Zn-basitrasin

Antibiyotikler mikroorganizmaların farklı bölgelerine etkin olabilmektedirler. Antibiyotiklerin bir bakteri hücresinde hedef aldığı bölgeler Şekil 2.1.' de gösterilmiştir. Bu farklılık antibiyotiğin kimyasal yapısına, mikroorganizma cinsine, antibiyotiğin konsantrasyonuna, ortam şartlarına ya da mikroorganizmanın metabolik yolunun değişkenliğine bağlı olabilmektedir.



Şekil 2.1. Antibiyotiklerin Bakteri Hücresinde Hedef Aldığı Bölgeler.

Antibiyotikler insanlar ve de hayvanlardaki çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Terapötik ya da koruyucu amacının yanında, hayvanın günlük besinine antibiyotik karıştırılarak hayvan beslenmesinde de kullanılır. Bu olay antimikrobiyalların hayvan büyümesini teşvik etmesi ve dolayısıyla hayvanın yeterli ağırlığa sahip olması için uygulanmaktadır. Ayrıca antibiyotikler besinlerin muhafazasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçiciliği sağlamak amacıyla, araştırma materyali olarak, ziraatta koruyucu olarak ya da büyümeyi teşvik amacıyla kullanılmaktadır (Öner, 1989; Denizci, 1996; Anonim, 2001c).

2.2.2. Antibiyotik Üreticisi Aktinomisetlerle İlgili Çalışmalar

1943 yılında streptomisin *Streptomyces griseus'* dan izole edilmesinden sonra özellikle toprak kökenli antibiyotik-üreticisi mikroorganizma araştırma çalışmaları yoğunlaşmıştır. Günümüzde klinikte kullanılan antibiyotiklerin çoğunluğunun aktinomisetler tarafından üretildiği bir gerçektir. Aktinomiset antibiyotiklerinin % 75' e yakını ise *Streptomyces* genusuna giren türler tarafından üretilmektedir (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. *Streptomyces* Genusu Üyeleri Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler (Wendisch and Kutzner, 1991' den).

Etki Tarzı	Antibiyotik	Yapısal Sınıf	Üreticiler
Antibakteriyal	Streptomisin	Aminoglikozid	<i>S. griseus</i>
	Kanamisin A, B	Aminoglikozid	<i>S. kanamyceticus</i>
	Higromisin B	Aminoglikozid	<i>S. hygrosopicus</i>
	Sefamisin A, B	Beta-laktam	<i>S. chartreusis</i>
	Tienamisin	Beta-laktam	<i>S. cattleya</i>
	Klavularik asit	Beta-laktam	<i>S. clavuligerus</i>
	Oleandomisin	Makrolid	<i>S. antibioticus</i>
	Lankasidin	Makrolid	<i>S. violaceoniger</i>
	Pristinamisin	Peptolipid	<i>S. pristinaespiralis</i>
	Oksitetrasiklin	Tetrasiklin	<i>S. rimosus</i>
	Linkomisin	Tanımlanmamış	<i>S. lincolnensis</i>
	Kloramfenikol	Tanımlanmamış	<i>S. venezuelae</i>
	Antifungal	2-OH-İmetilklavam	Beta-laktam
Nistatin		Polien (tetraen)	<i>S. noursei</i>
Amfoterisin B		Polien (heptaen)	<i>S. nodosus</i>
Candisin/Levorin		Polien (heptaen)	<i>S. griseus</i>
Antiviral	Ara-A	Nukleosid	<i>S. antibioticus</i>
	Tunikamisin	Nukleosid	<i>S. chartreusis</i>
Antitümoral	Daunorubisin	Antrasiklin	<i>S. peuceticus, S. coeruleorubidus</i>
	Doxorubisin	Antrasiklin	<i>S. peuceticus var. Caesius</i>
	Ditrisarubisin	Antrasiklin	<i>S. cyaneus</i>
	Mitomisin C	Kinon	<i>S. caespitosus</i>
	Aktinomisin	Kromopeptid	<i>S. antibioticus</i>
	Sarkomisin	Tanımlanmamış	<i>S. erythrochromogenes</i>
Antiparazitik	Higromisin B	Aminoglikozid	<i>S. hygrosopicus</i>
	Avermektin	Makrolid	<i>S. avermitilis</i>
	Milbemisin	Makrolid	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>aureolacrimosus</i>
	Monensin	Polieter	<i>S. cinnamomensis</i>
	Salinomisin	Polieter	<i>S. albus</i>
	Insektisidal	Avermektin	Makrolid
Milbemisin		Makrolid	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>aureolacrimosus</i>
Herbisidal	Bialafos	Tanımlanmamış	<i>S. hygrosopicus</i>
	Fosfinotirisin	Tanımlanmamış	<i>S. viridochromogenes</i>

Günümüzde *Streptomyces* üyelerinin antibiyotik üretiminden sorumlu genler saptanmakta, genin promotor bölgesine etki edilerek antibiyotiğin ekspresyonu artırılmaktadır. Ayrıca antibiyotik üretiminden sorumlu genlerin daha hızlı çoğalan organizmalara aktarımı yapılarak antibiyotiğin ucuz yoldan hızlı bir şekilde üretimi yapılmaktadır. Sheldon et al. (1997, 1999) mitomisin üretiminden sorumlu *Streptomyces lavendulae*'nin gen haritasını çıkarmışlar, antibiyotik üretiminden sorumlu geni saptamışlardır. Aynı şekilde Pandza et al. (1997) *Streptomyces rimosus*'dan oksitetrasiklin üretimiyle ilgili geni belirleyerek, aynı antibiyotiği üreten ve bu organizmayla ilişkili olmayan *S. coelicolor*'un antibiyotik üretiminden sorumlu genleri ile karşılaştırmışlardır. Benzer çalışmalar aktinomisin üreticisi *S. antibioticus* (Hsieh and Jones, 1995) ve streptomisin üreticisi *S. rameus* (Hatano, 1999) üzerinde yapmıştır.

1987' de Öner ve ark. *Streptomyces mediterranei*'den; fermentasyon yöntemiyle sentetik ortam kullanarak laboratuvar çapında rifamisin kompleksini üretmişlerdir. Denizci (1996), Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi topraklarından izole ettiği 356 aktinomiset suşunun antibiyotik aktivitelerini saptamış, etkin bulduğu 4 izolattan üretilen antibiyotiklerden üçünü preparatif ince tabaka kromatografisi (TLC) ile saflaştırmıştır. Üretilen antibiyotiklerin peptid yapıda olmadıkları; ikisinin kuvvetli polar diğer ikisinin apolar olduklarını belirlemiştir.

Yapılan araştırmalar (Lacey, 1973; Goodfellow and Board, 1980; Goodfellow and Williams, 1983; Lechevalier, 1989; Locci, 1989; Öner, 1989; McCarthy and Williams, 1990) *Streptomyces* genusu dışında diğer aktinomisetlerinde antibiyotik ürettiklerini göstermiştir. *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Thermoactinomyces*, *Streptoverticillum*, *Microtetraspora*, *Kitasatoa*, *Kitasatosporia*, *Chainia*, *Ampullariella*, *Saccharopolyspora* gibi toprak kökenli aktinomiset genusları antibiyotik üretebilme kabiliyetine sahiptirler.

2.3. Aktinomisetlerin ve Ürünlerinin Toprak Kökenli Patojenlerin Biyokontrolünde Kullanımı

Streptomyces genusu üyelerinin kültür filtratlarının bitki hastalıklarına karşı kullanılması Pridham ve arkadaşları tarafından 1950' li yıllarda başlatılmıştır. Onlar, sera denemelerinde 10 *Streptomyces* kültür filtratından 9' unun antagonistik etkilerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Reddi ve Rao *Streptomyces ambofaciens*'in domates bitkilerinin kurumasına yol açan *Pythium* sp. ve pamuklarda patojen *Fusarium* sp.'ye karşı etkili olduğunu laboratuvar denemeleriyle kanıtlamışlardır. Kök hastalıklarına karşı *Streptomyces* türlerinin metabolit, spor, misel ya da bunların kombinasyonu kullanılabilir. Rothroch ve Gottlieb fasulyelerde kök çürüklüğüne neden olan *Rhizoctonia* sp.'nin *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ile kontrol edilebileceğini kanıtlamışlardır. Steril toprağı *Rhizoctonia* sp. ile aşımışlar ve *S. hygroscopicus* var. *geldanus*'dan elde edilen *geldanamisin* antibiyotiğini 1 gram toprak başına yaklaşık olarak 20 µg vermişler ve sonucun bu patojene karşı etkili olduğunu görmüşlerdir. Benzer çalışmalar *Streptomyces* üyelerinin rizosferde hem nicel hem de nitel açıdan önemli; bitki kök çevresinde

iyi kolonize olup, bitki büyüme hormonları gibi görev yaptıklarını ispatlamışlardır. Diğer taraftan Milus ve Rothrock spesifik *Streptomyces* strainlerinin rizosfer (buğdayla ekili araziler)' de sayılarının diğer bakterilere oranla daha az (10^2 - 10^5 cfu/g) olduğunu açıklamışlardır (Walter and Crawford, 1995).

Streptomyces türlerinin antifungal etkileri laboratuvar koşullarında yoğun bir şekilde çalışılmasına rağmen, toprakta ya da rizosfer çevrelerinde yapılan çok az çalışma vardır. Yapılan çalışmalar bu genus üyelerinin rizosferde dağılışına fungal ve bakteriyal patojenlerle ilgisine dayanmamıştır. Crawford ve arkadaşları bitki köklerinde zengin toprak örneklerinden izole ettikleri 83 aktinomiset izolatının antifungal etkilerini saptamışlar, bu izolatlardan bir tanesinin *Pythium ultimum*' a karşı kuvvetli antagonizm gösterdiğini, daha sonra bunun *Streptomyces lydicus* olduğunu saptamışlardır (Walter and Crawford, 1995).

Turhan (1981a) İzmir ve civarındaki topraklardan izole ettiği, *Streptomyces ochraceiscleroticus* olarak tanımlanan aktinomiset suşunun in vitroda; kök hastalığına sebep olan toprak kaynaklı patojenlere karşı etkisini incelemiştir. Turhan bu çalışmasında önce streak plak metodunu kullanmış ve antagonistin teste tabi tutulan patojenlerin büyümesini ortalama olarak 10.8-18.2 mm engellediğini göstermiştir. *S. ochraceiscleroticus*' tan salınan metaboliti PDA (Potato Dextrose Agar) içine aktardığında ise, bu ortama ekimi yapılan bütün patojenlerin büyümesini tamamen durduğunu saptamıştır.

Turhan (1981b)' in yaptığı ikinci bir çalışma ile *Streptomyces ochraceiscleroticus* (C/2-9)' u önce in vitroda fungal patojenlere karşı, daha sonra in vivo çalışmasıyla bazı önemli toprak kaynaklı patojenlere karşı etkisini incelemiştir. C/2-9' un yapay yolla patojenlerin inoküle edildiği toprakta büyüyen bitkileri bütün hastalıklara karşı etkili bir şekilde koruduğunu göstermiştir. Bazı bitki tohum (pamuk, karpuz, kavun, salatalık, domates, biber)' larını ekimden önce C/2-9 filtratı ile karıştırmış, sonuçta bu bitkilerin hastalıklardan korunduğunu belirlemiştir ve C/2-9' un toprak kaynaklı patojenlerin biyolojik mücadelesinde kullanılabileceğine işaret etmiştir.

Turhan ve Grossmann (1986) Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole ettikleri 300 aktinomiset izolatının sekiz farklı fungal kökenli patojenlere karşı etkilerini incelemişlerdir. Teste tabi tutulan aktinomiset izolatlarının %90' ının *Sclerotinia sclerotiorum*' un, %17' sinin *Rhizoctonia solani*' nin ve %14' ününde *Alternaria alternata*' nın büyümesini inhibe ettiğini saptamışlar; *Rhizoctonia solani* ve *Alternaria alternata*' ya karşı güçlü antagonistik etki gösteren aktinomiset izolatlarının, teste tabi tutulan diğer fungal patojenlere karşı da etkili olduklarını saptamışlardır.

Turhan ve Turhan (1989) *Streptomyces nobilis* ve *Streptomyces scleroticus*' u biyolojik mücadelede güçlü bir antagonist olarak kullanılan *Trichoderma harzianum* ile beraber *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani*' ye karşı etkilerini in vitroda saksı denemeleriyle karşılaştırmışlardır. Sonuçta kullanılan *Streptomyces* türlerinin patojenlere karşı antagonistik etkilerinin *Trichoderma harzianum*' dan çok daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Araştırma için Seçilen İstasyonlar

Araştırmada kullanılan toprak örnekleri 2-11 aralık 1999 tarihleri arasında Manisa ili ve çevresindeki ekim yapılan arazilerden alınmıştır (Tablo 3.1.).

Örnekleme aktinomisetlerin çevresel istekleri göz önüne alınarak organik maddece zengin, nemli ve nötral pH' daki arazilerden yapılmıştır. Polietilen torbalar içinde laboratuvara getirilen örnekler hemen ön incelemeye alınmıştır.

3.1.2. Test Organizmaları

İzole edilen aktinomisetlerin antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için kullanılan fitopatogen bakteriler (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas viridiflova*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*) Zirai Mücadele Enstitüsü (Bornova/İzmir)' den, diğerleri ise (*Bacillus subtilis* ATTC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 10031, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Esherichia coli* ATCC 29998 ve *Sarcina lutea* ATCC 9341) Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Bornova/İzmir)' den temin edilmiştir. Ayrıca test organizması olarak seçilen küfler (*Aspergillus foetidus* var. *pallidus*, *Penicillium herquei*, *Trichoderma viride* ve *Fusarium oxysporum*) ve mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces sp.*, *Williopsis californica* ve *Geotrichum penicillaum*) CBÜ. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Muradiye/Manisa)' dan temin edilmiştir.

Tablo 3.1. Toprak Örneklerinin Alındığı İstasyonlar (Bütün örnekler 1999 yılı Aralık ayında Manisa İli ve çevresinden alınmıştır).

İstasyon Numarası	Alındığı Yer	Toprak Tipi
1	İzmir yolu (5. Km.) buğday tarlası	Humuslu
2	CBU/İktisat fak. yanı mısır tarlası	Humuslu/Kumlu
3	Muradiye jandarma karakolu yanı bağ toprağı	Killi
4	Horozköy-Muradiye arası meyvalık toprağı	Kumlu/Kireçli
5	Manisa-Turgutlu yolu 6. km. çavdar tarlası	Humuslu
6	Manisa belediyesi hayvan pazarı karşısı sebze tarlası	Humuslu
7	Spil dağı çıkışı 8. km. meyvalık toprağı	Kumlu/Tınlı
8	Üçpınar arpa tarlası	Humuslu
9	Turgutlu buğday tarlası	Killi
10	Kampüs yanı pamuk tarlası	Humuslu/Kumlu

3.1.3. Besiyeleri

Besiyeri 1: Gliserol-Yeast Ekstrakt Agar

Gliserol (Birpa)	1	g
Yeast Ekstrakt (Difco)	0.4	g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.02	g
Pepton (Difco)	5.0	g
Agar (Oxoid)	3	g
Distile su	200	ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra besiyeri 55 °C' ye kadar soğutulmuş, üzerine 50 µg/ml oranında steril sikloheksimid ve nistatin antibiyotiği ilave edilmiştir. Ortam çalışmamızda aktinomisetlerin izolasyonunda büyüme ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)

Yeast Ekstrakt (Difco)	4	g
Malt Ekstrakt (Difco)	10	g
Glukoz (Merck)	4	g
Agar (Oxoid)	20	g
Distile su	1000	ml
pH	7.3	

Besiyeri içerikleri distile suda tamamen çözülmüş ve 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ortam çalışmamızda hem stok, hem de izolatlarımızın kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Oat Meal Agar (ISP 3)

Oat Meal (yulaf unu)	20	g
Agar (Oxoid)	15	g
*Shirling and Gottlieb iz tuzlar solusyonu	1	ml
Distile su	1000	ml

İz Tuzlar Solüsyonu (Shirling and Gottlieb, 1966)

FeSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	0.1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O (Horasan Kimya)	0.1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.1 g
Distile su	100 ml

Ortam şu şekilde hazırlanmıştır: 20 gram yulaf unu 15-20 dakika 1 litre distile suda kaynatılmış ve büyük partiküllerin eliminasyonu için tülbent beziyle süzölmüştür. Filtrata 1 ml iz tuzlar solüsyonu ilave edilerek pH NaOH ile 7.2' ye ayarlanarak, 121 °C' de 1.1 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatlarımızın kültürel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 4 : Bennet' s Agar

Gliserol (Birpa)	20 g
L-Alanin (Merck)	2.5 g
NaCl (Atabay)	1 g
CaCO ₃ (Atabay)	0.1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	0.1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.1 g
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	1 litre
pH	7.2

Otoklavda 1.1 atmosferde, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam, izolatlarımızın büyüme ve bazı kimyasal inhibitörlere tolerans testleri^{1,2} nde kullanılmıştır.

¹Kimyasal İnhibitörlere Tolerans Testleri İçin Kullanılan Kimyasallar:

"Her bir test maddesi Bennet' s Agar (pH: 7.2)' a aşağıdaki oranlarda steril solüsyonları halinde ilave edilmiştir."

NaCl (Atabay)	%7	w/v
NaCl (Atabay)	%10	w/v
NaCl (Atabay)	%13	w/v
Na Azid (Merck)	%0.01	w/v
Na Azid (Merck)	%0.02	w/v

Fenol (Birpa)	%0.1	w/v
Potasyum tellürit (Merck)	%0.001	w/v
Kristal violet (Merck)	%0.0001	w/v

²Kimyasal inhibitörlerin sterilizasyonu:

Kristal violet, sodyum azid ve sodyum klorürün %10' luk stok solüsyonları distile suyla hazırlanmış ve uygun miktarları modifiye Bennet' s agara (otoklavlamadan önce) ilave edilmişlerdir. Fenolün stok solüsyonu distile suda hazırlanmış ve filtrasyon ile sterilize edilmiştir. Sonra otoklavlanmış Bennet' s Agar' a ilave edilmiştir. Potasyum tellüritin 0.2 g' ı 20 ml steril distile suda hazırlanmış ve sonra uygun miktarı otoklavlamadan sonra Bennet' s Agar' a ilave edilmiştir.

Besiyeri 5 : İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)

Çözünür Nişasta (Horasan Kimya)	10	g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	1	g
NaCl (Atabay)	1	g
(NH ₄)H ₂ SO ₄ (Atabay)	2	g
Shirling and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu	1	ml
Bakteriyolojik Agar (Oxoid)	20	g
Distile Su	1	litre
pH	7.2	

Bir miktar soğuk su ile pasta haline getirilen nişasta distile su ile 1 litreye tamamlanır, üzerine diğer besiyeri içerikleri ilave edilerek pH 7.2' ye ayarlanır. Ortam otoklavda 1.1 atmosfer altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Çalışmamızda izolatlarımızın kültürel karakteristiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 6 : DNaz Agar

DNaz Agar (Oxoid)	39	g
Distile su	1	litre
pH	7.3	

Distile suda tamamen çözünen hazır ortam 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Mikrobiyal inokülasyondan sonra 7 günlük inkübasyona tabi kùltürè 1 M HCl ilavesi sonucu oluşan açık zon DNaz üretimi için pozitif kabul edilmiştir.

Besiyeri 7 : Jelatin Hidroliz Ortamı

Nutrient broth (Difco)	1.3 g
Jelatin (Difco)	4 g
Distile su	100 ml

Tüm besiyeri içerikleri distile suda çözümlenerek 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, izolatlarımızın fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 8 : Egg Yolk Agar

Bakteriyolojik pepton (Difco)	10 g
Glukoz (Merck)	1 g
NaCl (Atabay)	10 g
Yeast Ekstrakt (Difco)	5 g
Agar (Oxoid)	15 g
Egg Yolk Emülsiyon	%5 (v/v)

Egg –Yolk dışındaki tüm besiyeri içerikleri homojen bir şekilde çözümlenerek 121 °C' de, 1.1 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanmış ve pH 7.2 ' ye ayarlanmıştır. Üzerine %5 v/v oranında egg-yolk ilavesi yapılan ortam çalışmamızda izolatlarımızın lesitinaz, proteolizis ve lipolizis reaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 9 : Oksalat Kullanım Ortamı

Potasyum oksalat (Merck)	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Atabay)	1 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.2 g
NaCl (Atabay)	1 g
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	920 ml
pH	7.2

Ortam 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve üzerine 80 ml 0.1 M CaCl₂ ilave edilmiştir. 7-14 gün inkübasyon sonucunda oluşan açık zon oluşumu oksalat kullanımı için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Besiyeri 10 : Nitrat agar

KNO ₃ (Uparc)	2 g
Nutrient broth (Difco)	1 litre
Bakteriyolojik agar (Oxoid)	6 g

121 °C' de otoklavlanmış ve pH 7.2' ye ayarlanmıştır. Hidrojen Sülfür üretimi steril kurşun asetat filtre kağıtlarının deney tüplerine daldırılmasıyla belirlenmiştir. Nitrat redüksiyonu 7-14 gün inkübasyon sonunda ortama 0.2 ml Griess-Ilosvay 1 ve 2* ajanlarının ilavesi sonucu oluşan kırmızı renk pozitif sonuç olarak alınmıştır.

*Griess -Ilosvay 1 ve 2

- 1) 0.8 ml sülfanilik asit 5 M asetik asitin 100 ml' sinde çözülerek hazırlanmıştır.
- 2) 0.6 ml dimetilnaftilamin 5 m asetik asitin 100 ml' sinde çözülerek hazırlanmıştır.

Besiyeri 11 : Glukoz-Nitrat Agar

Glukoz (Merck)	30 g
NaNO ₃ (Horasan Kimya)	2 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.5 g
KCl (Atabay)	0.5 g
FeSO ₄ (Merck)	0.01 g
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	1 litre

Tüm besiyeri içerikleri distile suda tamamen çözülmüş ve sterilize edilmiştir. Çalışmada izolatlarımızın kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 12: Glukoz-Asparagin Agar

Glukoz (Merck)	10 g
Asparagin (Merck)	0.5 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.5 g
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	1 litre

121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam çalışmamızda izolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 13 :Azot Kaynağı* Kullanım Ortamı

Glukoz (Merck)	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.01 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1 g
NaCl (Atabay)	0.5 g
Agar (Oxoid)	3 g
Distile su	200 ml

Ortam 1.1 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş ve pH 7.2' ye ayarlanmıştır.

*Azot kaynakları: Azot kaynakları (L-Arginin, L-Sistein, L-Histidin, L-Fenilalanin, L-Valin, KNO₃, L-Asparagin, L-Hidroksiprolin, L-Lizin, L-Tirozin ve DL- α -n-Bütirik asit)' na ait her bir solüsyon tinalizasyon ile sterilize edilmiştir ve sonra aseptik şartlarda steril basal ortama son konsantrasyon 1.0 g/lt olacak şekilde ilave edilmiştir.

Besiyeri 14 : Gliserol Asparagin Agar (ISP 5)

L-Asparagin (Merck)	1 g
Gliserol (Birpa)	10 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1 g
Shirling and Gottlieb iz tuzlar solüsyonu	1 ml
Agar (Oxoid)	20 g
Distile su	1 litre

121 °C' de 20 dakika otoklavlanmış ve pH 7.2' ye ayarlanmıştır. Ortam çalışmamızda izolasyon ve kültürel özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 15 : Nişasta-Asparagin Agar

Çözünür nişasta (Horasan Kimya)	10 g
L-Asparagin (Merck)	0.06 g
NaNO ₃ (Horasan Kimya)	0.2 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.06 g
NaCl (Atabay)	0.1 g
MgCO ₃ (Merck)	0.2 g
Agar (Oxoid)	3 g
Distile su	200 ml

Ortam 121 °C' de 1.1. atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilerek pH 7.3' e ayarlanmıştır. Çalışmamızda izolatlarımızın kültürel özelliklerinin belirlenmesi ve bazı fizyolojik özelliklerinin tespitinde kullanılmıştır.

Besiyeri 16 : Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)

Bakto-pepton (Difco)	15 g
Proteoz pepton (Difco)	5 g
Yeast ekstrakt (Difco)	1 g
Ferrik amonyum sitrat (Merck)	0.5 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1 g
Sodyum tiyosülfat (Merck)	0.08 g
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	1 litre
pH	7.2

Ortam 121 °C' de 1.1. atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilerek pH 7.3' e ayarlanmıştır. Çalışmamızda izolatlarımızın kültürel özelliklerinin ve melanin oluşturabilme kabiliyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 17 : Melanin Formasyon Ortamı

Yeast ekstrakt (Difco)	1 g
L-Tirozin (Merck)	1 g

NaCl (Atabay)	8.5 g
Agar (Oxoid)	15 g
Distile su	1 litre
pH	7.2

Besiyeri içerikleri distile suda tamamen çözününceye kadar karıştırılmış, 1.1 atmosferde 121 °C' de 15 dakika sterilize edilerek, izolatlarımızın melanin oluşturabilme kabiliyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 18: Muller-Hinton Broth

Muller-Hinton Broth (Oxoid)	21 g
ya da	
Beef infüzyon (Merck)	300 g
Kazein asit hidrolizat (Merck)	17.5 g
Çözünür nişasta (Horasan Kimya)	1.5 g
Distile su	1 litre
pH	7.4

1.1 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilen ortam çalışmamızda test organizmalarının aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 19: Muller-Hinton Agar

Besiyeri 18.' e 17 gram agar ilave edilerek hazırlanan ortam, 1.1 atmosfer basınçta 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiş, izolatlarımızın antimikrobiyal etkinliklerinin saptanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 20: Patates Dekstroz Agar

Potato Dekstroz Agar (Merck)	23 g
ya da	
Patates infüzyon (Merck)	200 ml
Glukoz (Merck)	20 g
Agar (Oxoid)	20 g
pH	5.6

Besiyeri içerikleri tamamen karıştırıldıktan sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır ve 121 °C' de 15 dakika sterilize edilir. Ortam çalışmamızda izolatların funguslara karşı antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 21: Nutrient Broth

Nutrient broth (Difco)	8 g
ya da	
Pepton (Difco)	5 g
NaCl (Atabay)	5 g
Beef Ekstrakt (Difco)	1.5 g
Yeast Ekstrakt (Difco)	1.5 g
Distile su	1 litre
pH	7.4

Ortam sterilize edildikten sonra izolatlarımızın aktive edilmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 22: Tirozin Agar (ISP 7)

Gliserol (Birpa)	15 g
L-Tirozin (Merck)	0.5 g
L-Asparagin (Merck)	1 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.01 g
NaCl (Atabay)	0.5 g
*Pridham and Gottlieb İz Tuzlar solüsyonu	1 ml
Agar (Oxoid)	20 g
Distile su	1 litre
pH	7.2

*Pridham and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu

CuSO ₄ .5H ₂ O (Horasan Kimya)	0.64 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.11 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O (Horasan Kimya)	0.79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Horasan Kimya)	0.15 g

Distile su 100 ml

Besiyeri içerikleri distile suda tamamen çözülerek sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatlarımızın melanin oluşum kabiliyetlerinin tespitinde kullanılmıştır.

Besiyeri 23: Üre Redüksiyonu Ortamı

K ₂ HPO ₄ (Merck)	9.1 g
Na ₂ HPO ₄ (Atabay)	9.5 g
Fenol-red (Merck)	0.01 g
Yeast ekstrakt (Difco)	0.1 g
Distile su	1 litre
*Üre solüsyonu (%15)	13.3 ml
pH	7.2

*Üre solüsyonu (%15' lik) membran filtre ile sterilize edilmiştir.

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 1.1 atms. basınç altında 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklavlamadan sonra üre solüsyonu (%15, w/v) steril ortama ilave edilmiştir. Ortam çalışmamızda izolatların fizyolojik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 24: Karbon Kaynağı* Yararlanma Ortamı (ISP 9)

Amonyum sülfat (Atabay)	2.64 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	2.38 g
MgSO ₄ (Merck)	1 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	5.65 g
Pridham and Gottlieb İz tuzlar solüsyonu	1 ml
Agar (Oxoid)	18 g
Distile su	1 litre

Ortam 1.1. atmosfer basınç altında 121 °C' de 20 dakika otoklavlanmış ve pH 7.2' ye ayarlanmıştır.

***Karbon Kaynakları:** Karbon kaynakları (Adonitol, Laktoz, Ksilitol, Sakkaroz, Galaktoz, Mannitol, İnozitol, Ksiloz, Dekstran, Ramnoz, Maltoz, Na Sitrat, Glukoz ve Sorbitol)' na ait her bir solüsyon tinalizasyon ile sterilize edilerek aseptik şartlarda, steril ortama son konsantrasyon 1.0 g/lt ya da 10.0 g/lt olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.2. METOTLAR

3.2.1. Toprakten Aktinomiset İzolasyonu

Çalışmamızda aktinomiset izolasyonunda kullanılan toprak örnekleri ekim (Arpa, buğday, mısır, pamuk, sebze, bağ, meyva) yapılan arazilerden alınmıştır. İzolasyon için toprağı sulandırma yöntemi (The Soil Dilution Method) kullanılmıştır. Toprak örnekleri Manisa ili ve civarından toplam 10 istasyondan alınmıştır. Örneklerin alınmasında ekimi yapılan arazilerde organik maddece zengin yerlerden kompozit örnek alınmıştır. Toprak örneklerinin alınması ve topraktan aktinomiset izolasyonu sırasıyla aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır (Öner, 1989).

1. Toprak örnekleri alkolle temizlenmiş bir çapa ile açılan toprak profilinden, toprak alınan yüzey alkolle temizlenmiş bir spatül ile hafifçe kazındıktan sonra yine alkolle temizlenmiş bir kaşıkla, 10-15 cm arasındaki derinliklerden alınmıştır. Her istasyondan beş profil açılarak kompozit toprak örneğı alınmıştır.
2. Laboratuvarımıza getirilen her bir örnekten aseptik koşullarda 10 gr alınarak 500 ml' lik erlenlere konmuş üzerine %1 oranında CaCO_3 ilave edilerek karıştırılmış; 30 °C' de 25 saat inkübe edilerek ön işlemden geçirilmiştir.
3. 2.' deki işlemden sonra, yukarıda alınan erlenlerde bulunan 10 gr toprak örneğı üzerine 90 ml steril distile su ilave edilmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen 1/10 oranında sulandırılmış toprak örneğı süspansiyonundan steril bir pipet yardımıyla 1 ml alınarak, içinde 9 ml steril distile su bulunan tüpe aktarılmış, Vortex yardımıyla homojen şekilde karıştırılmış ve böylece 1/100 ' lik toprak süspansiyonu elde edilmiştir. Aynı işlem 1/1000, 1/10000, 1/100000 ve 1/1000000' lik süspansiyonlar elde etmek için tekrarlanmıştır.
4. Hazırlanan 1/10000, 1/100000 ve 1/1000000 ' lik süspansiyonlardan 1' er ml steril pipet ile alınarak steril petri kabına aktarılmış; üzerine 50 °C' ye kadar soğutulmuş besiyeri 1. ilave edilerek her toprak örneğı süspansiyonundan yukarıdaki farklı üç sulandırma için toplam 30 petri kabı hazırlanmıştır. Besiyeri ile toprak süspansiyonunun homojen karışımının sağlanması için rotasyon hareketi yapılmıştır.
5. Hazırlanan petripler 27 °C' de 7-14-21 gün inkübasyona bırakılmıştır.
6. Tüm petri kapları inkübasyonun ikinci gününden itibaren teker teker çıplak gözle ve mikroskopun 10X objektifi altında Aktinomiset kolonilerinin var olup-olmadığını saptamak için gözlenmiştir.

7. Aktinomiset kolonileri izolasyon ortamlarında gözleendiğinde, bu kolonilere numara verilerek besiyeri 1. ve besiyeri 2. ortamlarında çizgi ekim tekniği ile tekrardan bir saflaştırma yapılmıştır.
8. Saflaştırılan aktinomiset kolonileri yatık besiyeri 2. bulunan tüplere çekilerek, 27 °C' de bir hafta inkübe edilerek büyütölmüşler, inkübasyon sonrasında buzdolabında +4 °C' de stok olarak saklanmışlardır.

3.2.2. İzole Edilen Aktinomiset' lerin Antimikrobiyal Spektrumlarının ve Etkinlik Derecelerinin Saptanması

İzole edilen aktinomisetlerin antibakteriyal etkileri Spektrum-Plak Metodu kullanılarak aşağıda açıklandığı gibi saptanmıştır.

1. Öncelikle stoktaki aktinomiset izolatlarımız ve kontrol mikroorganizmalarının aktivasyonu sağlanmış (Test mikroorganizmaları Nutrient Broth bulunan tüplere aktararak 24 saat inkübasyona bırakılmış, stoktaki aktinomisetler ise 27 °C' de 24 saat inkübe edilmişlerdir).
2. Önceden hazırlanmış Muller-Hinton Agarlı petrilerin bir köşesine aktive edilen aktinomisetlerden ekim yapılmıştır. Bu şekilde ekimi yapılan Muller-Hinton Agarlı petrilerimiz 27 °C' de 5 gün inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon işlemi sonunda antibakteriyal etkiyi saptamak için test organizması olarak kullanılacak bakterilerin aktive edilen Nutrient Broth kültürlerinden alınarak aktinomiset kolonisi ile 90° lik açı yapacak şekilde aktinomiset kolonisinden başlayarak (Aktinomiset kolonisine temas ettirmeden) petrinin diğer kenarına doğru tek çizgi halinde ekilmişlerdir.
4. Test organizmalarından, fitopatojen bakteriler için 27 °C, diğer bakterilerin büyümesi için petriler 37 °C' de inkübe edilmişlerdir.
5. İnkübasyon sonunda test organizmalarının inhibisyon zonları milimetre cinsinden ölçülmüştür.

Tanılaması yapılan izolatların küfler (*Aspergillus foetidus* var. *pallidus*, *Penicillium herquei*, *Fusarium oxysporum* ve *Trichoderma viride*)' e ve mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces sp.*, *Geotricum penicillaum* ve *Williopsis californica*)' a karşı antimikrobiyal etkileri aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır.

1. Stoktaki tanılaması yapılan izolatlarımız Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agarlı besiyerinde 5 gün 27 °C' de, mayalar Nutrient Broth' lu tüplerde 24 saat 27 °C' de,

küfler ise PDA (Patates Dekstroz Agar)' lı besiyerinde 48 saat 27 °C' de büyütülerek aktifleştirilmişlerdir.

2. İzolatların mayalara karşı antimikrobiyal etkisi yukarıda açıklanan Spektrum-Plak yöntemiyle saptanmıştır.
3. Küflere karşı antimikrobiyal etkinin belirlenmesi için öncelikle aktive edilen aktinomiset izolatlarımız PDA' lı besiyerinde görünür koloni oluşturuncaya kadar (yaklaşık 2 gün) büyütülmüşlerdir.
4. Daha sonra aktive edilen küfler önceden hazırlanmış PDA' lı besiyeri bulunan petrinin tamamına ekilmişler, büyütülen aktinomiset kolonileri steril olarak PDA' lı besiyerinden alınarak test organizmasının ekildiği petriye steril olarak koloni üzerinden hafif bastırılarak aktarılmışlar ve 2 gün 27 °C' de inkübe edilmişlerdir.
5. İnkübasyon sonunda aktinomiset kolonilerinin bulunduğu kısımdan başlanarak inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüştür.



3.3. İzolatların Tanılanması

Antimikrobiyal aktivitelerinin yüksek oluşu nedeniyle seçilen izolatların identifikasyonu yapılmıştır.

3.3.1. Renk Gruplaması

Seçilen 7 izolatımız, içinde ISP 3, ISP 4, ISP 6 ve ISP 5 besiyerleri bulunan petrilere ekildi; 25 °C' de 3 hafta inkübe edildi (Shirling and Gottlieb, 1966) ISP 3 ve ISP 4 ortamlarında inkübe edilen izolatlarımız havasal spor yığını rengi, substrat misel rengi açısından ve ISP 5 ortamında inkübe edilen izolatlarımız ise diffüze pigment açısından çıplak göz ile incelendi. Renkler referans olarak Stamp Color Key (Stanley Gibbons Publication Ltd., 1986) kartları kullanılarak saptandı. ISP 6 petrilere karakteristik koyu renkli melanin pigmenti üretimi açısından incelendi.

3.3.2. Kültürel ve Morfolojik İncelemeler

İzolatlarımız Oat Meal Agar (ISP 3, Shirling and Gottlieb, 1966), ve Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar' da (ISP 6, Shirling and Gottlieb, 1966) spor zinciri morfolojisi, havasal, substrat misel rengi ve çözünür pigment ve melanin üretim kabiliyetleri açısından incelendi. Ayrıca izolatlar Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt Agar (ISP 2, Shirling and Gottlieb, 1966), Gliserol-Asparagin Agar (Tamer ve ark., 1989), İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4, Shirling and Gottlieb, 1966), Tirozin Agar (ISP 7, Shirling and Gottlieb, 1966), Glukoz Nitrat Agar (Öner, 1989), Gliserol Nitrat Agar (Öner, 1989) ve Glukoz Asparagin Agar (Öner, 1989) ortamlarında diğer morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacı ile 27 °C' de 7-14 gün boyunca büyütüldüler. İncelemeler, çıplak gözle ve Jena mikroskop yardımı ile X640 büyütme altında yapıldı.

Spor zinciri morfolojileri için izolatlarımızın ISP 4 besiyeriyle slide kültürleri (Önceden sterilize edilmiş lam üzerine 50 °C' ye kadar soğutulmuş ISP 4 besiyerinden 1 damla damlatılmış ve üzerine steril lamel kapatılmıştır. Sonra uygun izolattan iğne yardımıyla örnek alınarak lamelin kenarlarındaki besiyerinin dört bir köşesine aktarma yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparat nemli steril kaplar içinde 27 °C' de 14 gün inkübe edilmiştir.) hazırlanarak ışık mikroskobu ile (Nikon, 400X ve 1000X büyütme altında) incelenmiş, Shirling and Gottlieb (1966) tarafından terminolojisi uygulanan kategorilere ayrılmıştır.

3.3.3. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Lesitinaz, proteolizis ve lipolizis aktivitesi besiyeri 8.' de 2, 4 ve 6. günlerde 25 °C' de inkübasyon sonucu tespit edildi. Nitrat redüksiyonu, besiyeri 10.' da 25 °C' de 2 hafta inkübasyon sonunda saptandı. Hidrojen sülfür üretimi için, içinde besiyeri 10. bulunan test tüplerine kurşun asetat ile spreyleneş Watman filtre kağıtlarında siyah rengin görölmesi pozitif sonuç olarak değeriendirildi. Oksalat kullanımı besiyeri 9.' da 25 °C' de 4. gün inkübasyon sonunda saptandı (Wendish and Kutzner, 1991). Tirozinaz üretimi besiyeri 17.' de 25 °C' de 4. gün inkübasyon sonunda, jelatin hidrolizi besiyeri 7. ve nişasta hidrolizi besiyeri 15.' de saptandı. Tirozin parçalanması, besiyeri 4.' e %0,5 oranında tirozin ilavesi ile 7, 14, 21 günlerde açık zon oluşumunun gözlenmesi ile pozitif sonuç olarak değeriendirildi. DNaz besiyeri 6., üreaz besiyeri 23., melanin üretimi besiyeri 16., 17. ve 22.' de belirlendi.

Karbon kaynaklarının kullanımı besiyeri 24.' de 7, 14, 21 gün sonunda, glukoz içeren pozitif kontrol ortamı ile karşılaştırılarak ve azot kaynaklarının kullanımı besiyeri 13.' de 15 gün sonunda L-Asparagin ile ayrıca L-Prolin içeren pozitif kontrol ortamı ile karşılaştırılarak saptandı. Antibiyotiklere dirençlilik, önceden hazırlanmış besiyeri 4.' de inokule edilmiş petrilere hazır, antibiyotik emdirilmiş diskler (Oxoid)' in yerleştirilmesiyle 1,2,3 ve 7. günlerde inhibisyon zonu gözlenerek saptandı. Organizmaların çeşitli kimyasal inhibitörlere ve sıcaklığa toleransları besiyeri 4.' de, 7-14-21 gün inkübasyon sonunda, 4 °C' de yapılan testlerde, 2-4 hafta sonunda saptandı.

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon Sonuçları

Manisa ili ve çevresindeki tarım yapılan arazilerdeki toprak örneklerinden 50 aktinomiset izole edilmiştir. Örnekleme yapıldığı istasyonlar ve bu istasyonlardan izole edilen aktinomiset sayıları Tablo 4.1' de verilmiştir. Tanılaması yapılan 3Ba1 (soldan sağa sırasıyla 3; istasyon numarası, Ba; bağ toprağı ve 1; seçilen izolat numarası) ve 3Ba3' nolu izolatlara 3. istasyondan, 5C12' nolu izolatomuz 5. istasyondan, 1B19 ve 1B49' nolu izolatlara 1. istasyondan, 9B40' nolu izolat 9. istasyondan ve son olarak 10P50' nolu izolat 10. istasyondan izole edilmiştir.

Tablo 4.1. İzole Edilen Aktinomiset Kültürü Sayılarının İstasyonlara Göre Dağılımı.

İstasyon Numarası	Arazideki Ekimi Yapılan Ürün	Arazi Toprak Tipi	Elde Edilen Aktinomiset İzolatı Sayısı	Tanısı Yapılan İzolatlar
1	Buğday	Humuslu	5	1B19 ve 1B49
2	Mısır	Humuslu/Kumlu	5	
3	Bağ	Killi	4	3Ba1 ve 3Ba3
4	Meyvalık	Kumlu/Kireçli	4	
5	Çavdar	Humuslu	9	5C12
6	Sebze	Humuslu	7	
7	Meyvalık	Kumlu/Tınlı	5	
8	Arpa	Humuslu	3	
9	Buğday	Killi	2	9B40
10	Pamuk	Humuslu/Kumlu	6	10P50

4.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesi

İzole ettiğimiz aktinomisetlerin antibakteriyal aktiviteleri bölüm 3.2.2.' de anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.2.' de verilmiştir. Bunlara ilaveten Tablo 4.3.' de inhibisyon zonuna bağlı olarak test organizmalarına karşı etki gösteren aktif izolatların sayıları ve % oranları, Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5. ve 4.6.' da tanılamaları yapılan izolatomuzun test bakterilerine karşı etki spektrumları verilmiştir.

Tablo 4.2. İzolatların Antibakteriyal Etkileri (mm).

İzolat no:	<i>E. amylovora</i>	<i>P. viridiflova</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>C. michiganensis</i> <i>subsp. michiganensis</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>E. faecalis</i> ATCC 10541	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 29998	<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341
3Ba1	-	11	-	-	-	32	-	-	-	18
3Ba2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3Ba3	15	13	18	-	12	8	-	-	26	13
2M4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2M5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2M6	-	9	-	-	10	-	-	-	-	-
5C7	-	2	-	-	-	3	-	-	-	-
5C8	12	-	18	-	-	-	-	-	-	-
5C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C12	26	11	-	18	11	-	-	8	-	5
5C13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1B16	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
1B17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1B18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1B19	-	-	-	-	11	-	-	9	-	-
4Me20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4Me21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4Me22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4Me23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S27	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
6S28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6S30	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-
7Me31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7Me32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7Me33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7Me34	-	-	-	-	9	-	3	-	-	-
7Me35	-	-	13	10	-	-	-	-	-	-
8A36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8A37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8A38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9B39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9B40	-	-	-	16	18	-	-	-	-	-
10P41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10P42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10P43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10P44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10P45	-	-	-	13	-	-	-	13	15	-
3Ba46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2M47	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
2M48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1B49	-	-	-	-	19	-	-	16	-	-
10P50	-	-	-	9	7	-	-	9	-	13

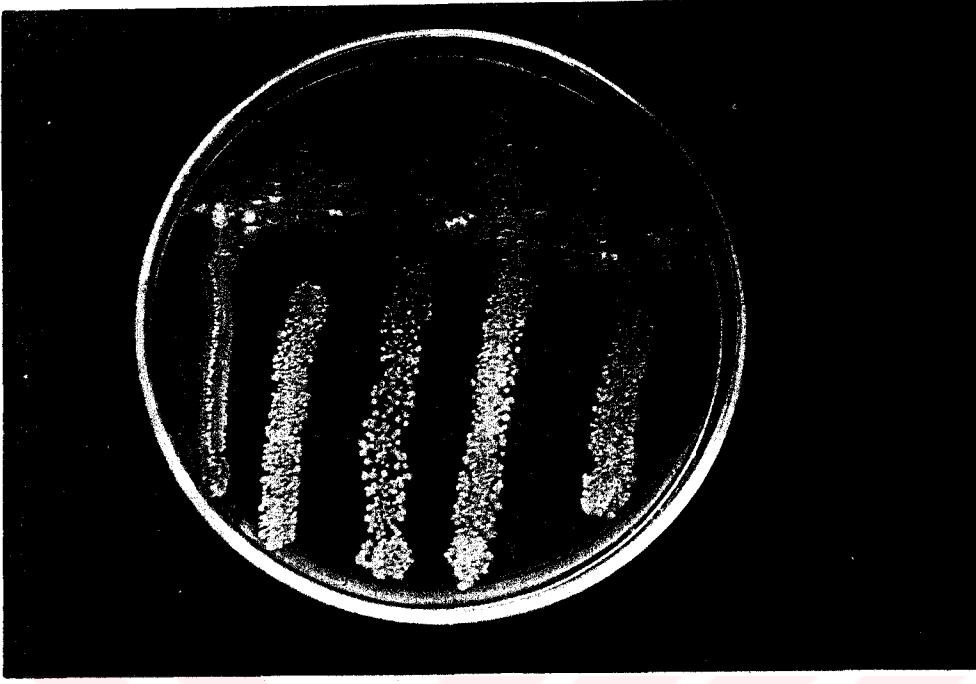
3; İstasyon numarası, Ba; bağ toprağı, 1; izolat numarası.

Tablo 4.3. Test Organizmalarına karşı Etki Gösteren İzolatların Sayıları ve % Oranları.

Test Organizmaları	++++	+++	++	+	Pasif	Total aktif	% Aktif
<i>E. amylovora</i>	0	1	2	0	47	3	%6
<i>P. viridiflova</i>	0	0	3	2	45	5	%10
<i>A. tumefaciens</i>	0	0	3	1	46	4	%8
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	0	0	4	1	45	5	%10
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0	0	7	3	40	10	%20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	1	0	0	2	47	3	%6
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 10541	0	0	1	1	48	2	%4
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0	0	2	3	45	5	%10
<i>E. coli</i> ATCC 29998	0	1	1	0	48	2	%4
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	0	0	3	1	46	4	%8

++++, İnhibisyon zonu 30 mm ve daha büyük; +++, 20-29; ++, 10-19; +, 10 mm' den az; Pasif, İnhibisyon görülmemiş.

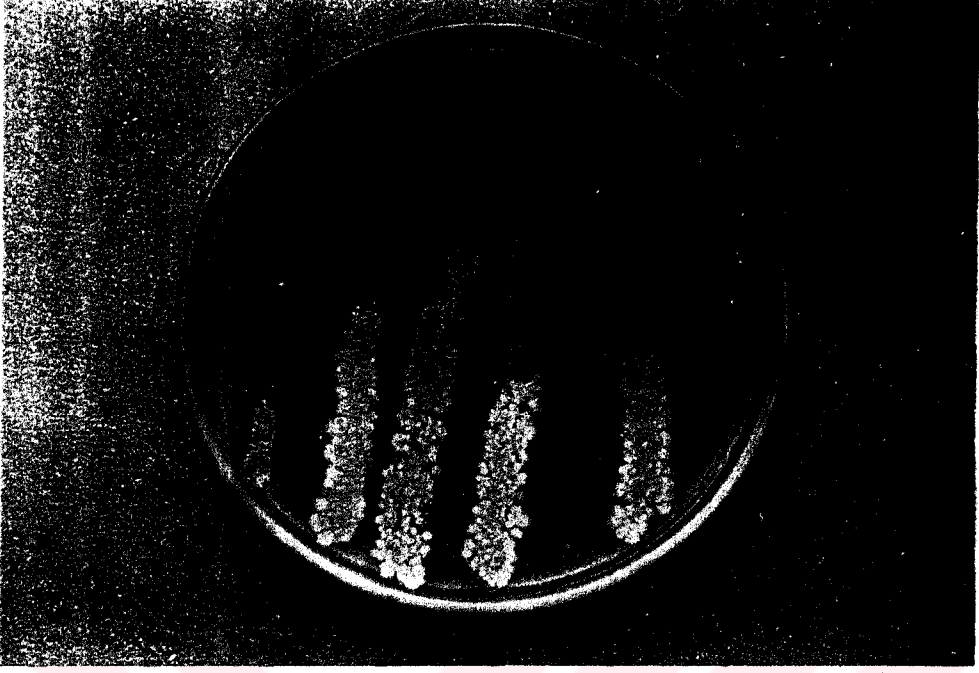
Tablo 4.2.' ye baktığımızda, tanılması yapılan 3Ba1' nolu izolat en yüksek antibakteriyal etkiyi 32 mm ile *K. pneumoniae* ATCC 10031 (Gram negatif)' e, sonra sırasıyla 18 mm ile *Sarcina lutea* ATCC 9341 (Gr +) ve 11 mm ile *P. viridiflova* (Gr -)' ya karşı; 3Ba3' nolu izolat 26 mm ile *E. coli* ATCC 29998 (Gr -)' ye, sonra sırasıyla 18 mm ile *A. tumefaciens* (Gr -)' e, 15 mm ile *E. amylovora* (Gr -)' ya, 13 mm ile *P. viridiflova* (Gr -) ve *S. lutea* ATCC 9341 (Gr +)' ya eşit oranda, 12 mm ile *B. subtilis* ATCC 6633 (Gr +)' e ve 8 mm ile *K. pneumoniae* ATCC 10031 (Gr -)' e karşı; izolat 5C12, 26 mm ile *E. amylovora*' ya, sonra sırasıyla 18 mm ile *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gr +)' e, 11 mm ile *P. viridiflova* ve *B. subtilis* ATCC 6633' e eşit oranda, 8 mm ile *S. aureus* ATCC 6538 (Gr +)' a ve son olarak 5 mm ile *S. lutea* ATCC 9341' e karşı; 1B19' nolu izolat 11 mm ile *B. subtilis* ATCC 6633' e ve 9 mm ile *S. aureus* ATCC 6538' e karşı; 9B40' nolu izolat 16 mm ile *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*' e ve 18 mm ile *B. subtilis* ATCC 6633' e karşı; 1B49' nolu izolat 19 mm ile *B. subtilis* ATCC 6633' e ve 16 mm ile *S. aureus* ATCC 6538' e karşı ve son olarak 10P50' nolu izolat 13 mm ile *S. lutea* ATCC 9341' e, 9 mm ile *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*' e ve *S. aureus* ATCC 6538' e eşit oranda ve 7 mm ile *B. subtilis* ATCC 6633' e karşı göstermişlerdir. Tablo 4.3' de görüldüğü gibi, 50 aktinomiset izolatından test organizmalarına karşı en fazla antibakteriyal etki Gram pozitif bakteriler (Sırasıyla *B. subtilis* ATCC 6633' e karşı %20; *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *S. aureus* ATCC 6538' e eşit oranda %10, *S. lutea* ATCC 9341' e karşı %8 ve son olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 10541' e karşı %4)' e karşı görülmüştür. Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyal etkisi bulunan izolat sayı (*P. viridiflova*' ya karşı %10, *A. tumefaciens*' e karşı %8, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 ve *E. amylovora*' ya eşit oranda %6, *E. coli* ATCC 29998' e karşı %4)' sı daha azdır. Tanılması yapılan izolatlardan 3Ba1, 3Ba3, 5C12 ve



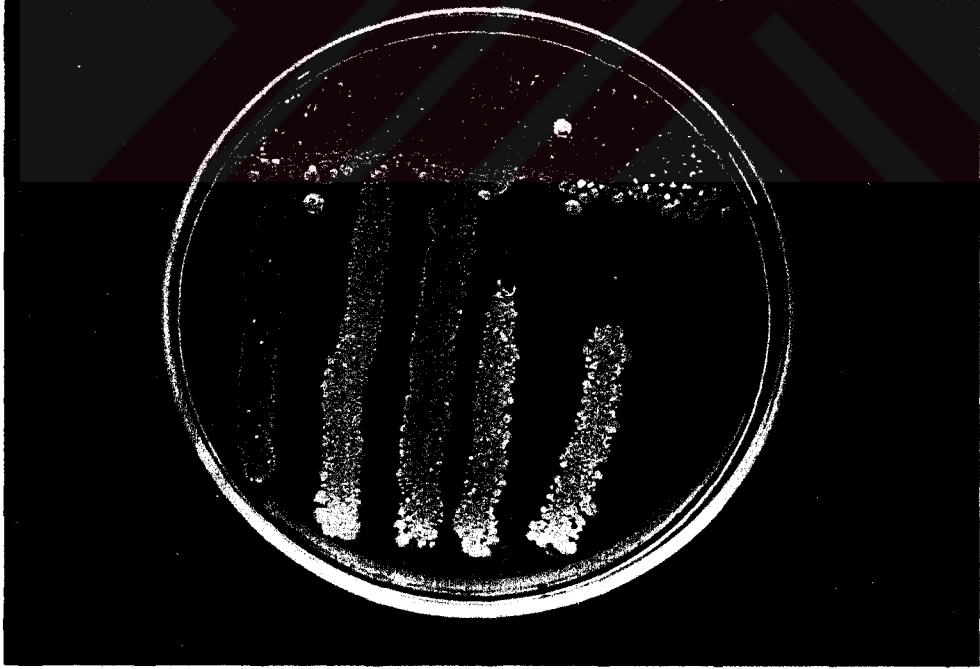
Şekil 4.1. 3Ba1 No' lu İzolatın Antibakteriyal Etkisi (soldan sağa doğru sırasıyla *E. amylovora*, *P. viridiflova*, *A. tumefaciens*, *C. michiganensis subsp. michiganensis* ve *B. subtilis* ATCC 6633)



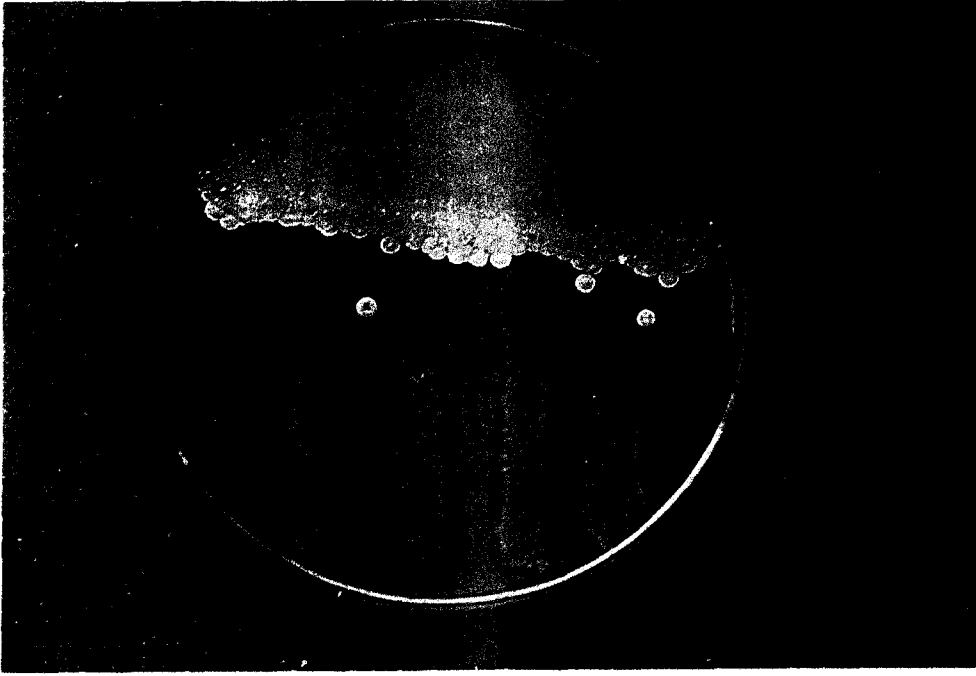
Şekil 4.2. 3Ba3 No' lu İzolatın Antibakteriyal Etkisi (soldan sağa doğru sırasıyla *E. amylovora*, *P. viridiflova*, *A. tumefaciens*, *C. michiganensis subsp. michiganensis* ve *B. subtilis* ATCC 6633)



Şekil 4.3. 5C12 No' lu İzolatın Antibakteriyal Etkisi (soldan sağa doğru sırasıyla, *E. amylovora*, *P. viridiflova*, *A. tumefaciens*, *C. michiganensis subsp. michiganensis* ve *B. subtilis* ATCC 6633).



Şekil 4.4. 9B40 No' lu İzolatın Antibakteriyal Etkisi (soldan sağa doğru sırasıyla, *E. amylovora*, *P. viridiflova*, *A. tumefaciens*, *C. michiganensis subsp. michiganensis* ve *B. subtilis* ATCC 6633).



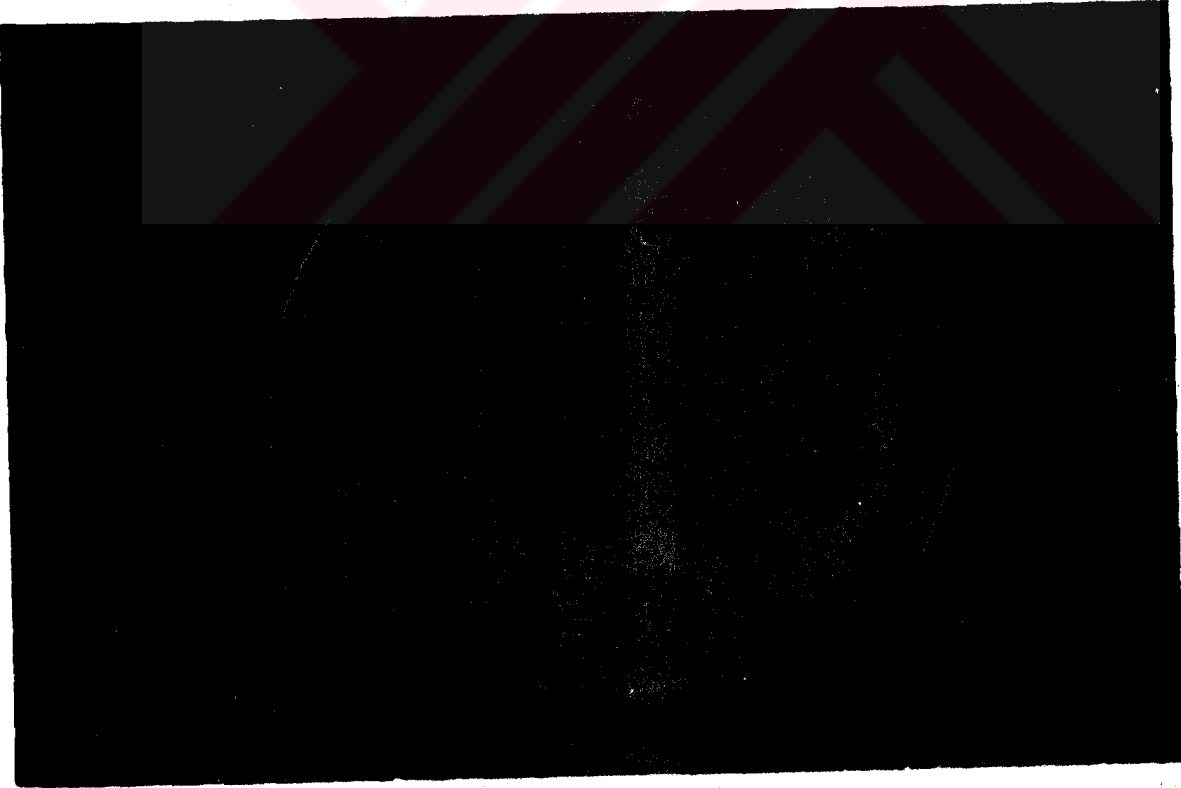
Şekil 4.5. 1B49 No' lu İzolatın Antibakteriyal Etkisi (soldan sağa doğru sırasıyla: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 29998 ve *Sarcina lutea* ATCC 9341).



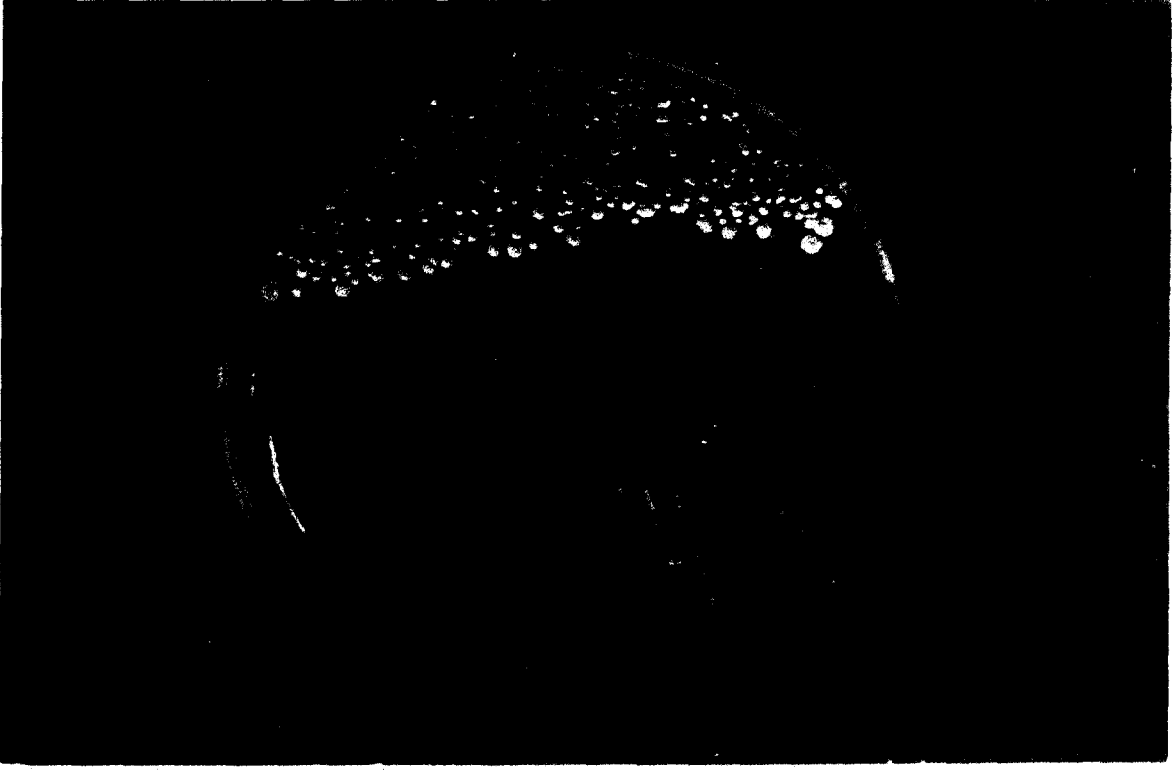
Şekil 4.6. 10P50 No' lu İzolatın Antibakteriyal Etkisi (soldan sağa doğru sırasıyla: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 29998 ve *Sarcina lutea* ATCC 9341)



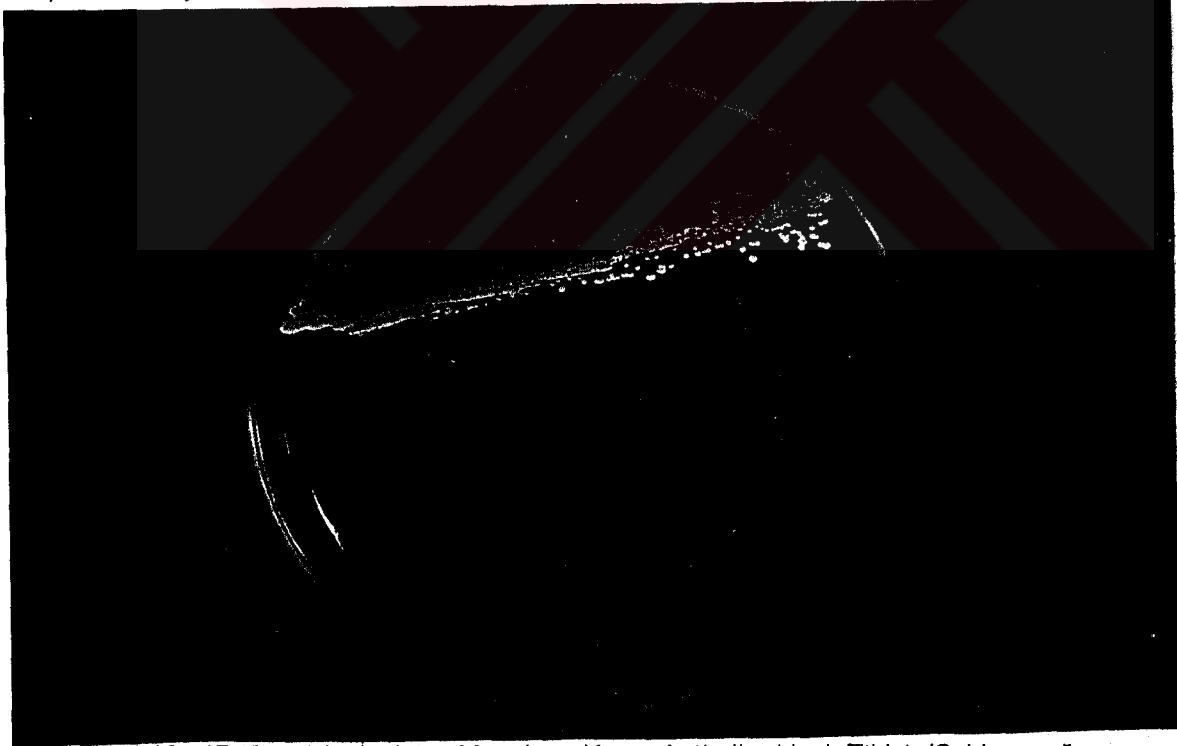
Şekil 4.7. 3Ba3 no' lu İzolatın *F. oxysporum*' a Karşı Antimikrobiyal Etkisi



Şekil 4.8. 1B49 no' lu izolatin *F. oxysporum*' a Karşı Antimikrobiyal etkisi



Şekil 4.9. 3Ba3 no' lu izolatın Mayalara Karşı Antimikrobiyal Etkisi (Soldan sağa sırasıyla *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces sp.*, *Williopsis californica* ve *Geotrichum penicillaum*).



Şekil 4.10. 1B49 no' lu izolatın Mayalara Karşı Antimikrobiyal Etkisi (Soldan sağa sırasıyla *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces sp.*, *Williopsis californica* ve *Geotrichum penicillaum*).

4.3. Renk Grublaması

Tanılaması yapılan izolatların renk gruplarının belirlenmesi 3.3.1.' de anlatılan yöntemle saptandı ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.5., Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.' de; Ayrıca bu izolatların ISP 2, ISP 3 ve ISP 4 ortamlarındaki görünüşleri Şekil 4.11., 4.12., 4.13., 4.14., 4.15., 4.16., 4.17., 4.18., 4.19., 4.20., 4.21., 4.22., 4.23., 4.24., 4.25. ve 4.26.' da verildi.

Tablo 4.5. Tanılaması Yapılan İzolatlarımızın ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Grublaması (7 Günlük İnkübasyon Sonuçları).

Ortamlar	Oat Meal Agar (ISP 3)			İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)			
	Özellik	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Diffüze Pigment Rengi	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Diffüze Pigment Rengi
İzolatlar							
3Ba1	Gri	Açık-Kahve	Duman	Gri	Yeşil/Gri	-	
3Ba3	Beyaz/Gri	Sarı	-	BY			
5C12	Sarı	Sarı	-	Krem	Deve tüyü	-	
1B19	Beyaz/Sarı	Sarı	-	Gri	Sarı	-	
9B40	Kirli Beyaz	Kirli Beyaz	-	BY			
1B49	Duman	Kirli Beyaz	-	Gri	Krem	-	
10P50	Beyaz/Sarı	Sarı	-	Gri	Gri	-	

BY; Büyüme yok.

Tablo 4.6. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 3 ve ISP 4 Besiyerlerinde Renk Grublaması (14 Günlük inkübasyon sonuçları).

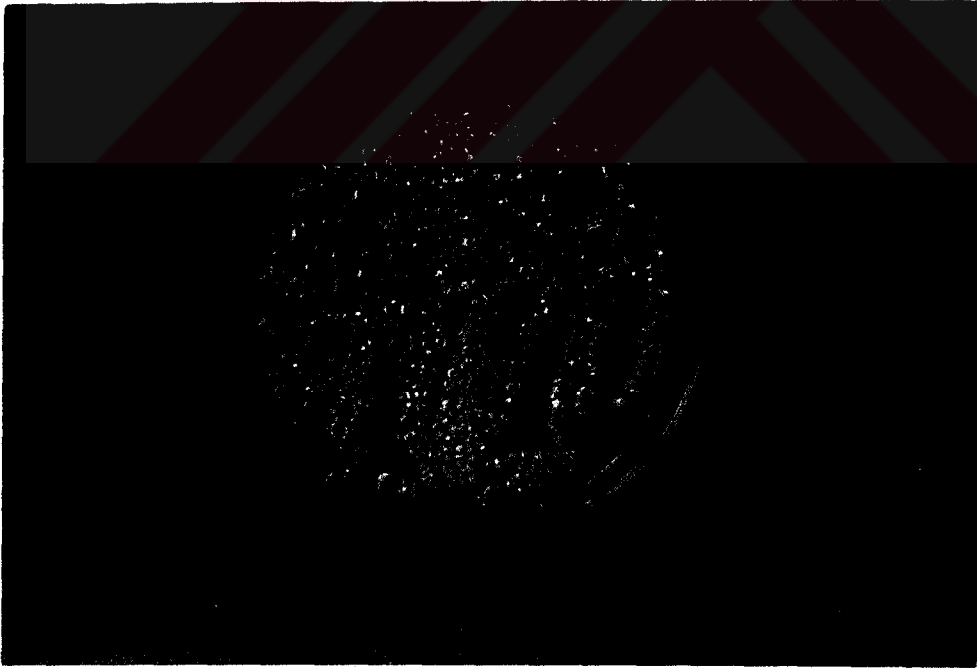
Ortamlar	Oat Meal Agar (ISP 3)			İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)			
	Özellik	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Diffüze Pigment Rengi	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Diffüze Pigment Rengi
İzolatlar							
3Ba1	Gri	Açık Kahve	Açık Kahve	Gri	Yeşil/Gri	-	
3Ba3	Duman/Gri	Açık Krem	-	BY			
5C12	Turuncu/Yeşil	Krem/Yeşil	-	Açık krem	Deve tüyü	-	
1B19	Duman/Beyaz	Açık Krem	-	Gri/Açık Yeşil	Gri	-	
9B40	Duman/Beyaz	Kirli Beyaz	-	BY			
1B49	Gri	Duman	-	Gri	Açık Kahve/Krem	-	
10P50	Beyaz/Krem	Kirli Beyaz/Krem	-	Gri/Beyaz/Açık Yeşil	Gri	-	

BY; Büyüme yok.

Tablo 4.7. Tanılaması Yapılan İzolatların ISP 5 ve ISP 6 Besiyerlerinde Renk Gruplaması (14 Günlük inkübasyon sonuçları).

Ortamlar	Pepton Yeast Ekstakt Iron Agar (ISP 6)			Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)		
Özellik	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Melanin Oluşumu	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Diffüze Pigment Rengi
İzolatlar						
3Ba1	Gri	Sarı/Kahve	-	Gri/Koyu Yeşil	Yeşil	-
3Ba3	BY			Beyaz	Açık Krem	-
5C12	Duman	Sarı/Kahve	-	Gül	Gül	-
1B19	Beyaz/Duman	Krem	-	Beyaz	Sarı	-
9B40	BY			Sarı	Açık Krem	-
1B49	BY			Beyaz	Açık Krem	-
10P50	Beyaz/Sarı	Sarı	-	Beyaz	Sarı	-

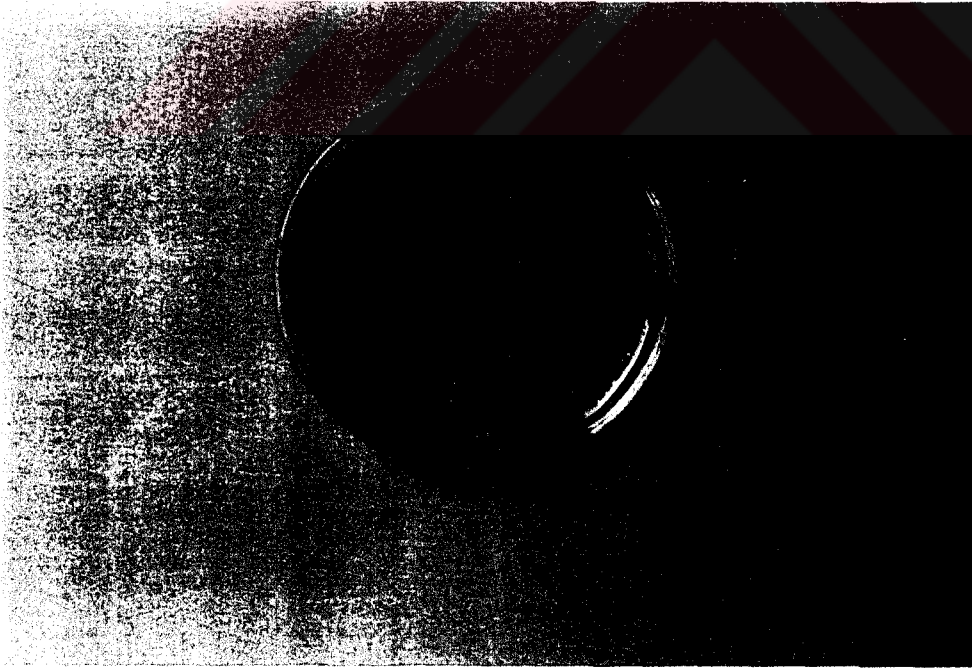
BY: Büyüme yok.



Şekil 4.11. 3Ba1 No' lu İzolatın Yeast Ekstakt Malt Ekstakt (ISP 2) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



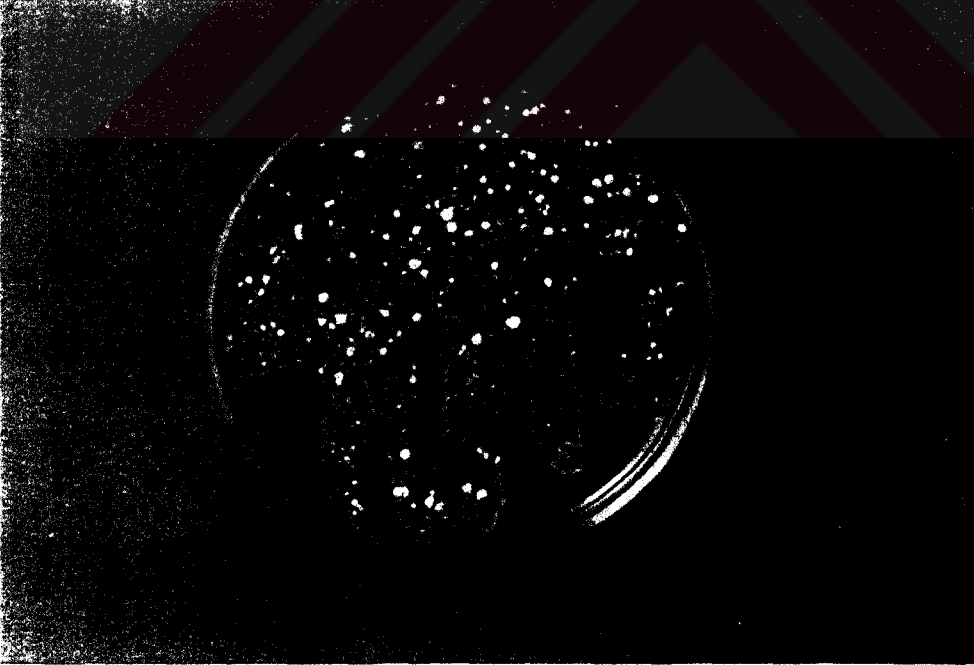
Şekil 4.12. 3Ba3 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.13. 5C12 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



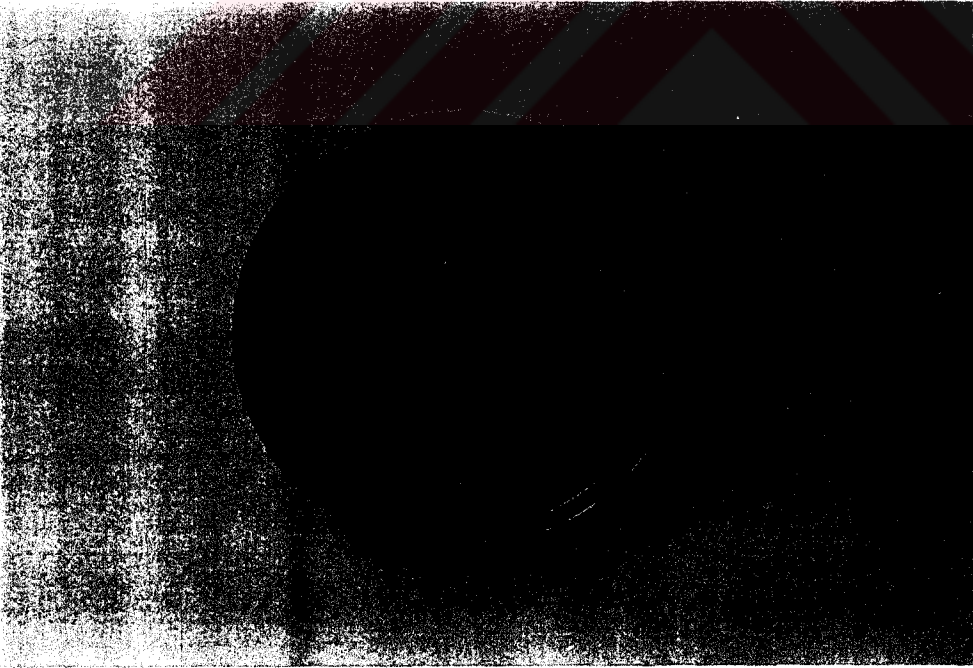
Şekil 4.14. 1B19 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.15. 9B40 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



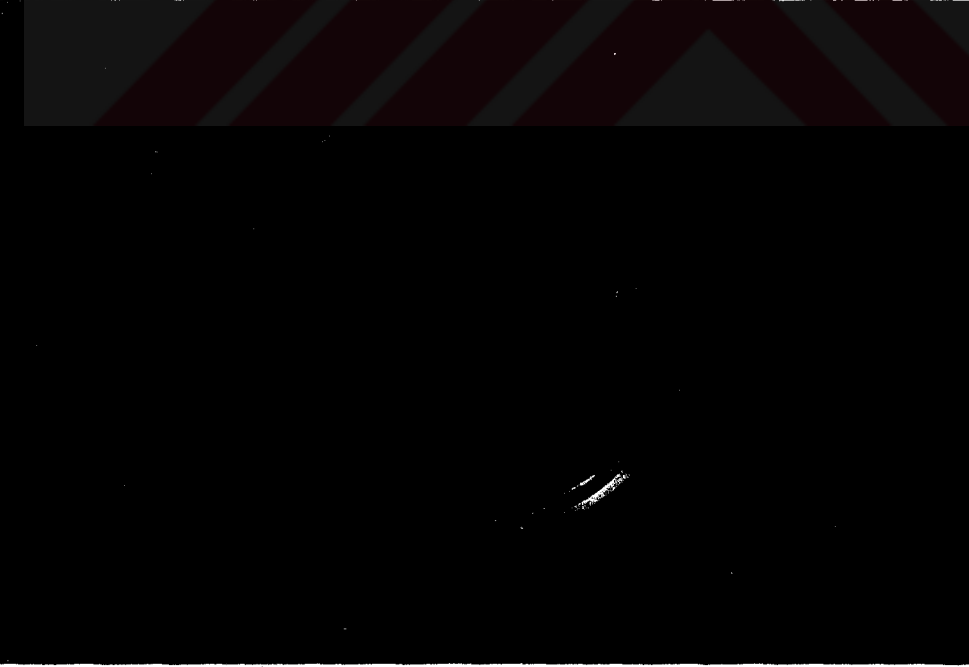
Şekil 4.16. 10P50 No' lu İzolatın Yeast Ekstrakt Malt Ekstrakt (ISP 2) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.17. 3Ba1 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.18. 3Ba3 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi



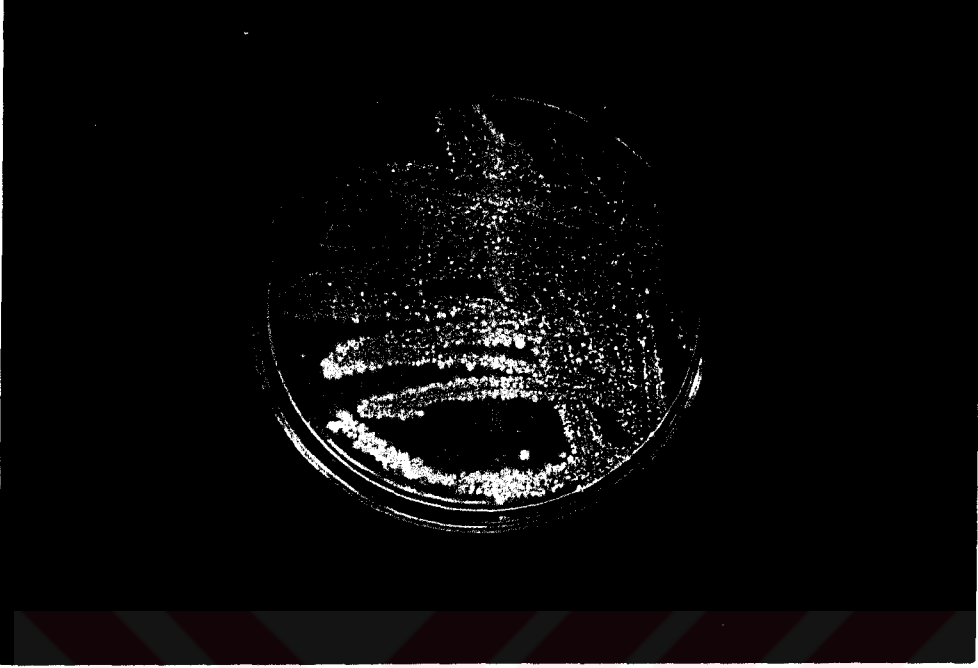
Şekil 4.19. 5C12 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi



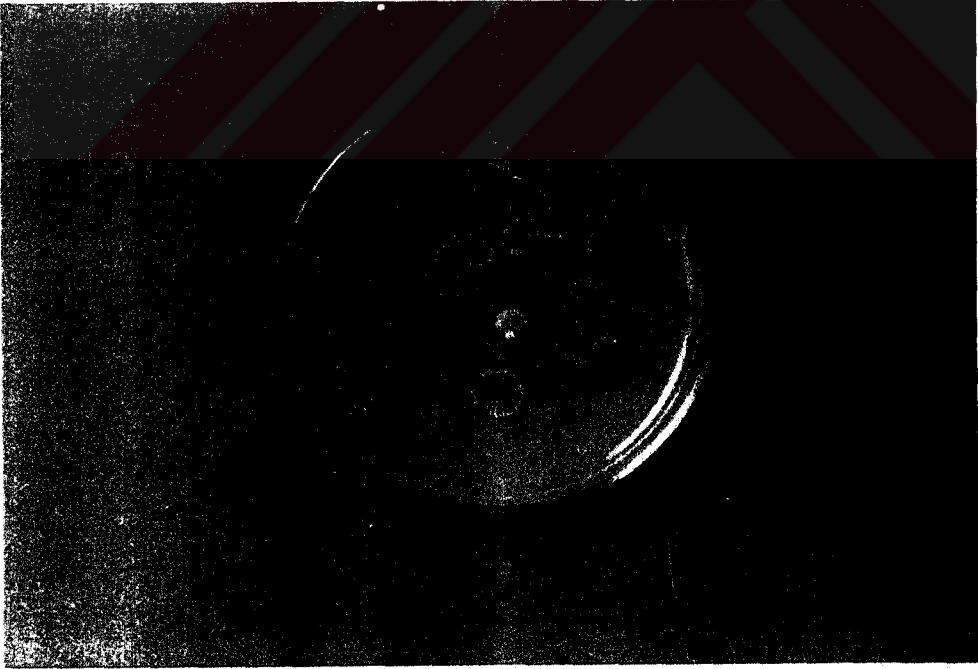
Şekil 4.20. 1B19 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



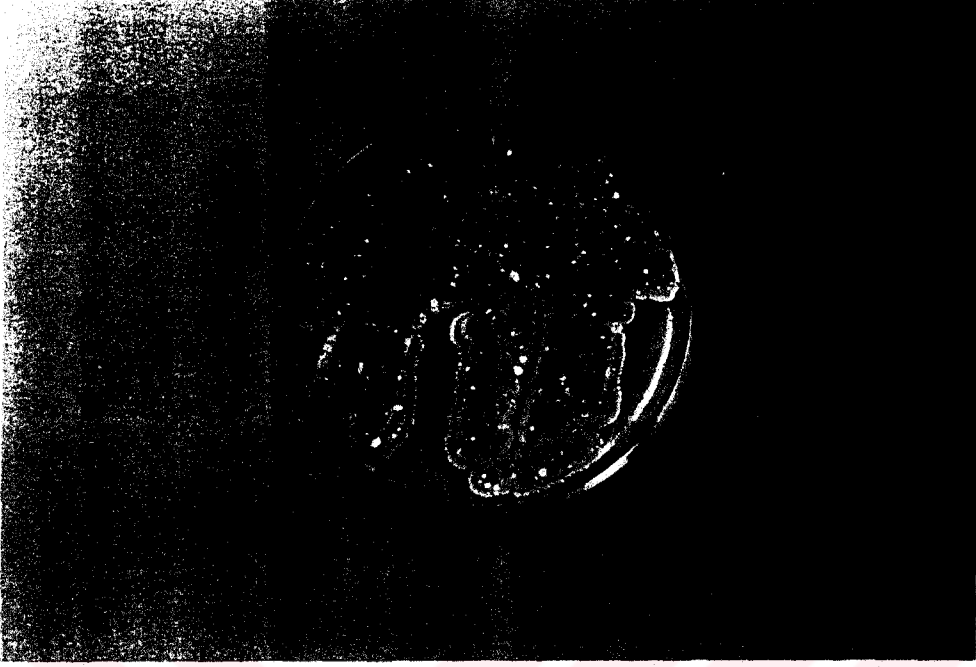
Şekil 4.21. 9B40 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



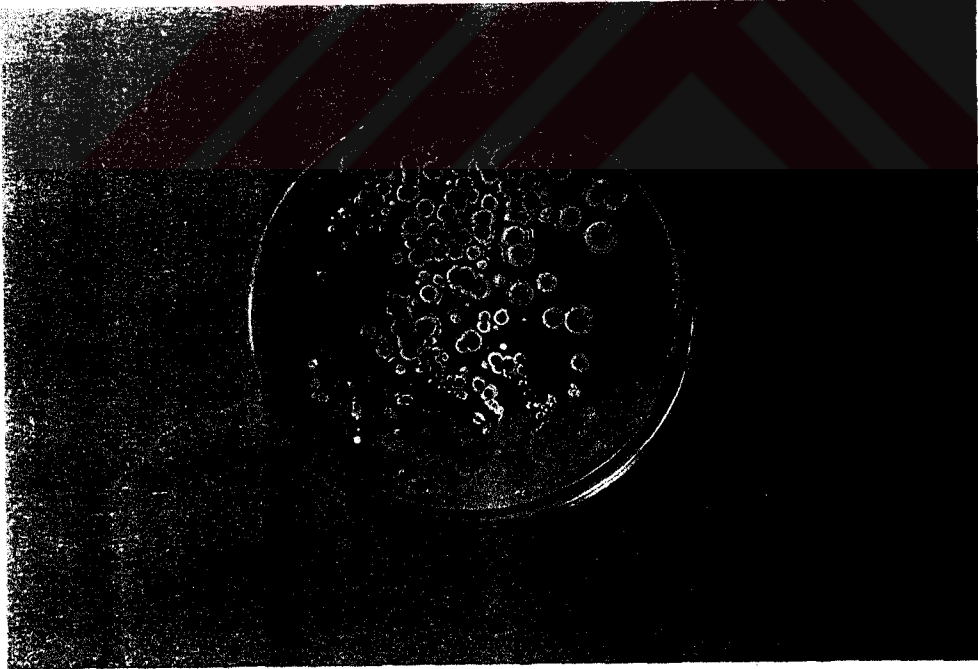
Şekil 4.22. 10P50 No' lu İzolatın Oat Meal Agar (ISP 3) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi



Şekil 4.23. 3Ba1 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.24. 1B19 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.25. 1B49 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.26. 10P50 No' lu İzolatın İnorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4) Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.

4.4. Kültürel ve Morfolojik Özellikler

İzolatların kültürel özellikleri 3.3.2.' de anlatılan yöntemle saptanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.8.' de verilmiştir. Tablo 4.9' de ise izolatların ISP 3, ISP 4, ISP 5 ve ISP 6 besiyerlerinde spor zinciri morfolojileri tipleri verilmiş; Ayrıca izolatların spor zinciri morfolojileri Şekil 4.27., 4.28., 4.29., 4.30., 4.31., 4.32., 4.33. ve 4.34.' de gösterilmiştir. 3Ba1, 3Ba3, 5C12, 1B19 ve 9B40 No' lu izolatların Glukoz-Nitrat ortamında gelişimleri Şekil 4.35., 4.36., 4.37., 4.38. ve 4.39.' da; 3Ba1, 3Ba3, 5C12 ve 10P50 No' lu izolatların Nişasta-Asparagin Ortamında gelişimleri Şekil 4.40., 4.41., 4.42. ve 4.43.' de; 3Ba1, 5C12 ve 10P50 No' lu izolatların Glukoz-Asparagin Ortamında gelişimleri Şekil 4.44., 4.45. ve 4.46.' da; 3Ba1, 3Ba3 ve 1B19' No' lu izolatların Gliserol-Asparagin Agar ortamında gelişimleri Şekil 4.47., 4.48. ve 4.49.' da gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Tanılaması Yapılan İzolatların Kültürel Karakteristikleri.

Izolat no	Ortamlar	Büyüme	Havasal Misel Rengi	Substrat Misel Rengi	Çözünür Pigment Rengi
3Ba1	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Gri	Siyah	Açık Kahve
	Oat Meal Agar (ISP 3)	iyi	Gri	Açık Kahve	Açık Kahve
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	iyi	Gri	Nefti Yeşili/Gri	-
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	iyi	Gri/Yeşil	Nefti Yeşili	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	iyi	Gri	Sarı/Kahve/Kirli beyaz	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	iyi	Duman/Gümüşü	Siyah/Koyu Kahve	Açık Kahve
	Nişasta Asparagin Agar	iyi	Gri	Siyah/Lacivert	Açık Kahve
	Glukoz Nitrat Agar	iyi	Gri/Siyah	Siyah	Açık Kahve
	Glukoz-Asparagin Agar	iyi	Gri	Yeşil	-
3Ba3	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Gri	Oksit Sarı	-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	iyi	Kirli Beyaz/Gri	Açık Krem	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	BY			
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	iyi	Beyaz	Açık Krem	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	iyi	Gri	Sarı/Beyaz	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	iyi	Gri	Koyu Kahve	Açık Kahve
	Nişasta Asparagin Agar	iyi	Gri/Zayıf Beyaz	Duman/Krem	Sarı
	Glukoz Nitrat Agar	iyi	Gri/Duman	Kahve	-
	Glukoz-Asparagin Agar	iyi	Gri	Krem	-
5C12	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Gül/Kırmızı	Gül	-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	iyi	Turuncu/Yeşil	Krem/yeşil	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	orta	Açık Krem	Sarı	-
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	zayıf	Pembe	Pembe	-

	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	iyi	Kirli beyaz	Sarı/Kahve	Duman
	Tirozin Agar (ISP 7)	iyi	Kahve	Kahve	Kahve
	Nişasta Asparagin Agar	iyi	Gül/kırmızı	Gül	-
	Glukoz Nitrat Agar	iyi	Kırmızı/Gül	Gül	-
	Glukoz-Asparagin Agar	iyi	Gül Kurusu/Portakali	Gül kurusu/Oksit Sarı	-
1B19	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Gri/Sarı	Krem/Sarı/Açık Yeşil	-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	iyi	Duman/Beyaz	Açık Krem/Sarı	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	iyi	Gri/Açık Yeşil	Gri	-
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	iyi	Beyaz	Krem/Sarı	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	iyi	Duman	Sarı/Krem	-
	Tirozin Agar (ISP 7)	iyi	Yeşil/Gri	Gri	-
	Nişasta Asparagin Agar	iyi	Beyaz	Krem	-
	Glukoz Nitrat Agar	iyi	Gri/Beyaz	Gri/Krem	-
	Glukoz-Asparagin Agar	iyi	Gri/Beyaz	Sarı	-
9B40	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Krem/Beyaz	Sarı/Krem	-
	Oat Meal Agar (ISP 3)	iyi	Duman/Beyaz	Kirli Beyaz	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	BY			
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	Zayıf	Sarı	Açık krem	-
	Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)	BY			
	Tirozin Agar (ISP 7)	BY			
	Nişasta Asparagin Agar	iyi	Kirli Beyaz/Duman	Krem/Sarı	Sarı
	Glukoz Nitrat Agar	iyi	Açık Krem/Beyaz	Krem	-
Glukoz-Asparagin Agar	BY				
	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Duman	Açık krem	-

1B49	Oat Meal Agar (ISP 3)	Orta	Gri	Duman	-
	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	iyi	Gri	Açık Kahve/Krem	-
	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	Çok Zayıf	Beyaz	Açık Krem	-
	Pepton Yeast Ekstart Iron Agar (ISP 6)	BY			
	Tirozin Agar (ISP 7)	BY			
	Nişasta Asparagin Agar	BY			
	Glukoz Nitrat Agar	iyi	Duman	Siyah/Sarı	
	Glukoz-Asparagin Agar	BY			
	10P50	Yeast Ekstrakt-Malt Ekstrakt Agar (ISP 2)	iyi	Gri	Krem/Yeşil
Oat Meal Agar (ISP 3)		iyi	Beyaz/Krem	Kirli Beyaz/Krem	-
Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)		iyi	Gri/Beyaz/Yeşil	Gri	-
Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)		iyi	Beyaz	Sarı	-
Pepton Yeast Ekstrakt Iron Agar (ISP 6)		iyi	Sarı	Sarı	-
Tirozin Agar (ISP 7)		iyi	Gri	Yeşil	-
Nişasta Asparagin Agar		iyi	Beyaz/Duman	Açık Krem	-
Glukoz Nitrat Agar		iyi	Beyaz	Krem	-
Glukoz-Asparagin Agar		iyi	Beyaz/Gri	Sarı	-

: BY; Büyüme Yok.

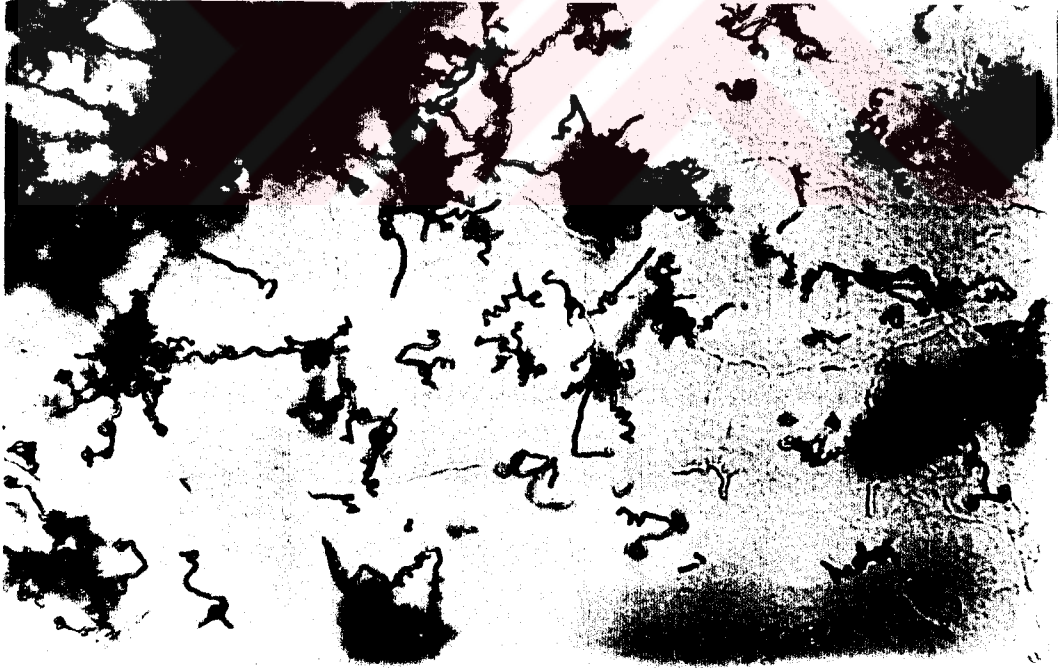
Tablo 4.9. Tanılaması Yapılan İzolatların Bazı Besiyerlerindeki Spor Zinciri Morfolojisi.

Besiyerleri / İzolatlar	Oat Meal Agar (ISP 3)	Inorganik Tuz-Nişasta Agar (ISP 4)	Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)	Pepton Yeast Ekstart Iron Agar ISP 6
3Ba1	S	S	S	S
3Ba3	S	S	S	S
5C12	Rf	Rf	Rf	Rf
1B19	S	S	S	S
9B40	S	S	S	S
1B49	Rf	Rf	Rf	Rf
10P50	S	S	S	S

S; Spiral, Rf; Rektifleksibils.



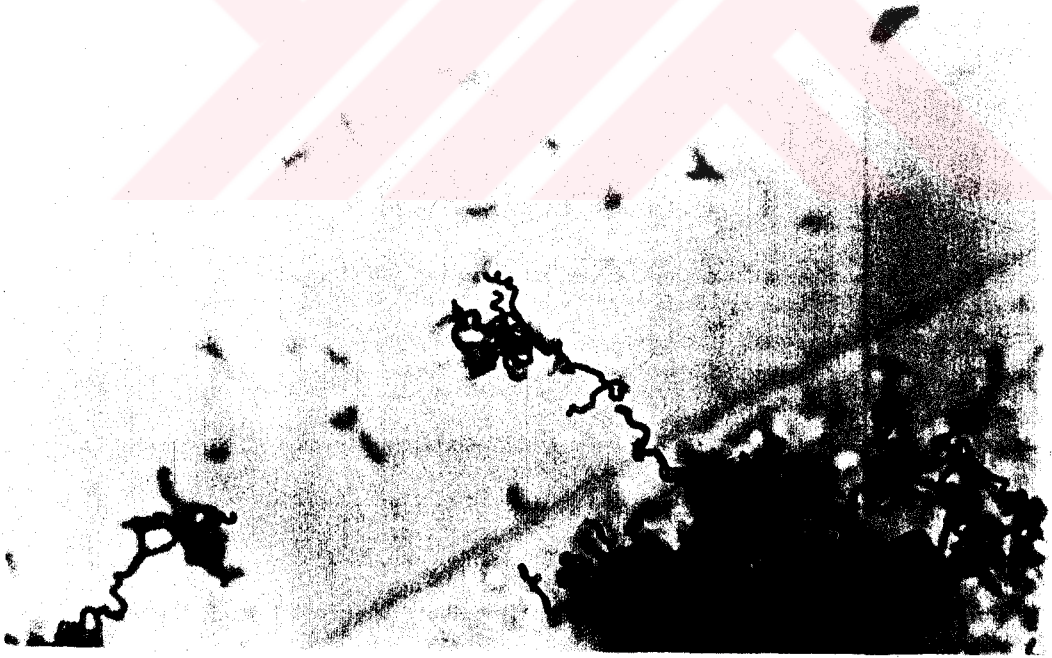
Şekil 4.27. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 3Ba1 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



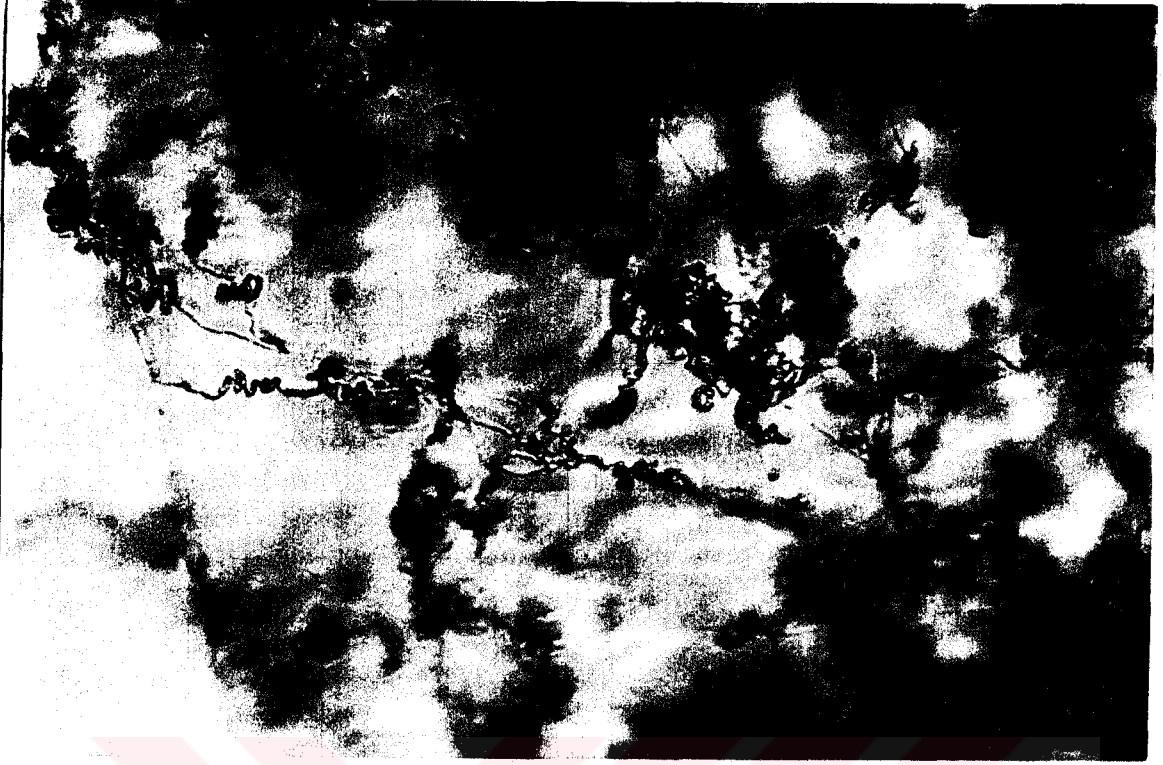
Şekil 4.28. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 3Ba3 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



Şekil 4.29. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 5C12 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



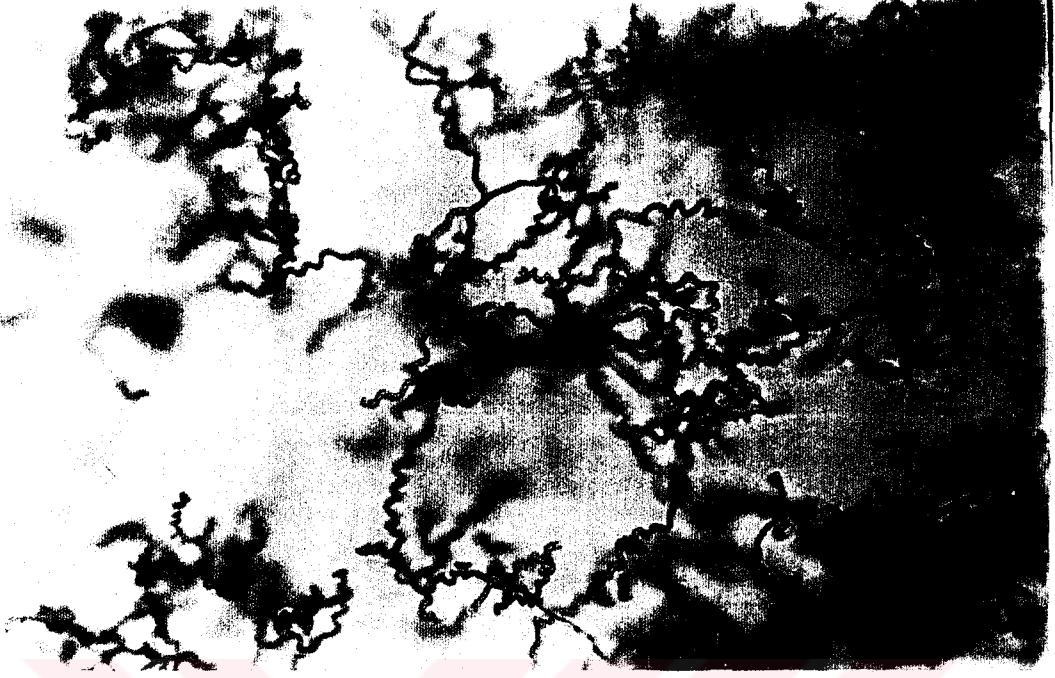
Şekil 4.30. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 1B19 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



Şekil 4.31. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 9B40 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



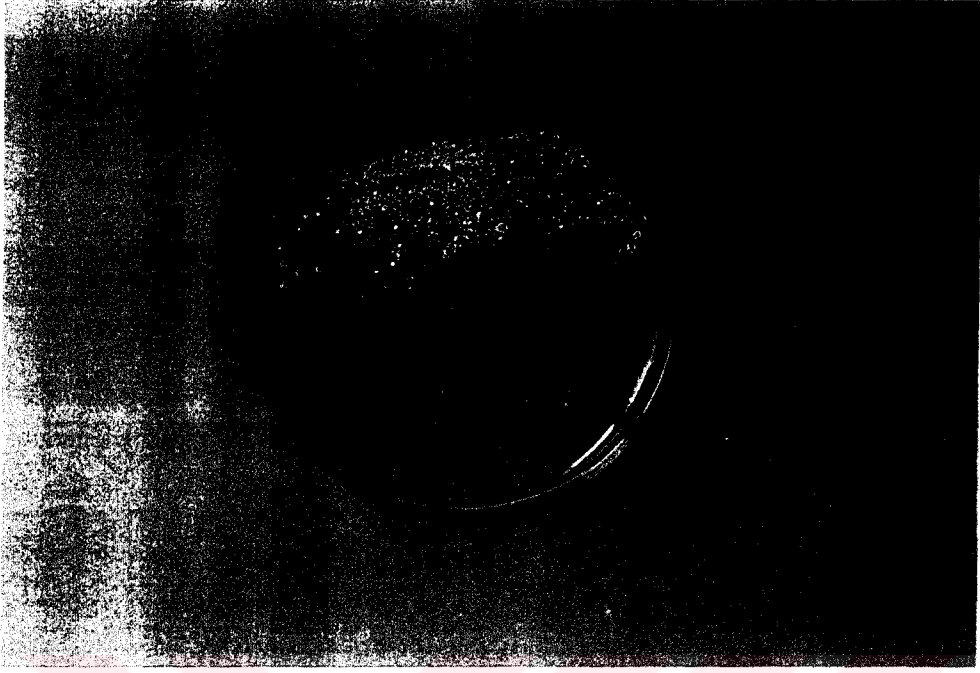
Şekil 4.32. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 1B49 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



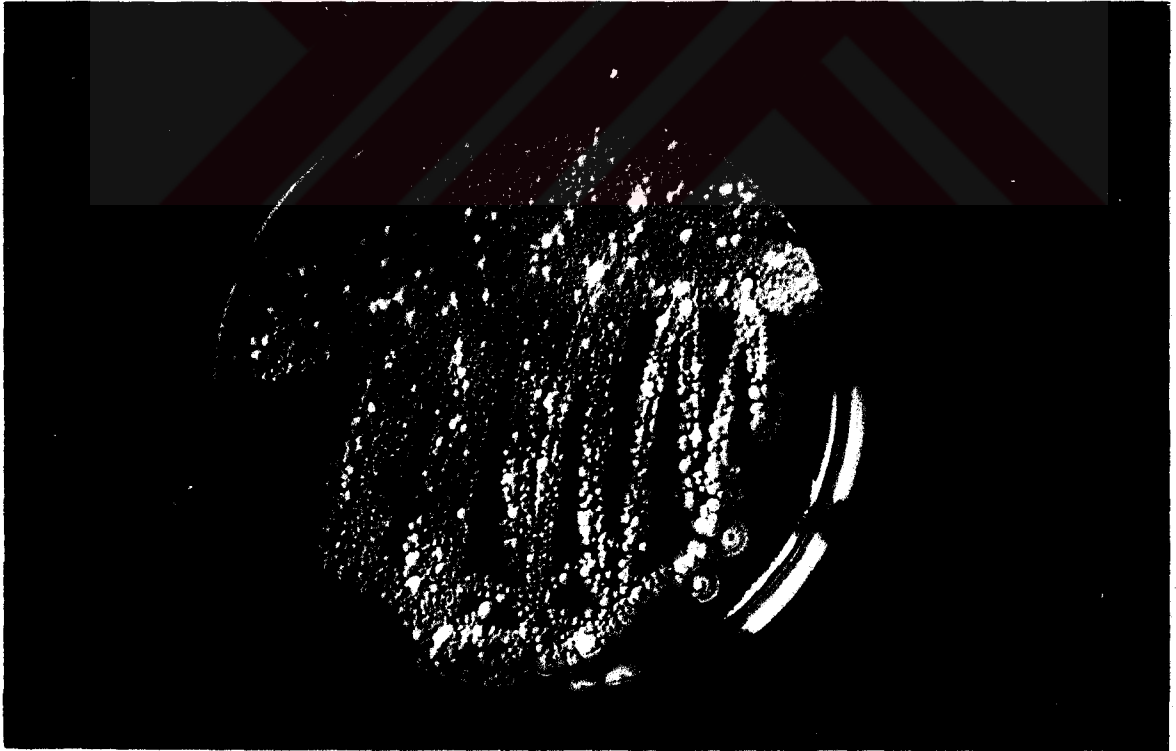
Şekil 4.33. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 10P50 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (400X)



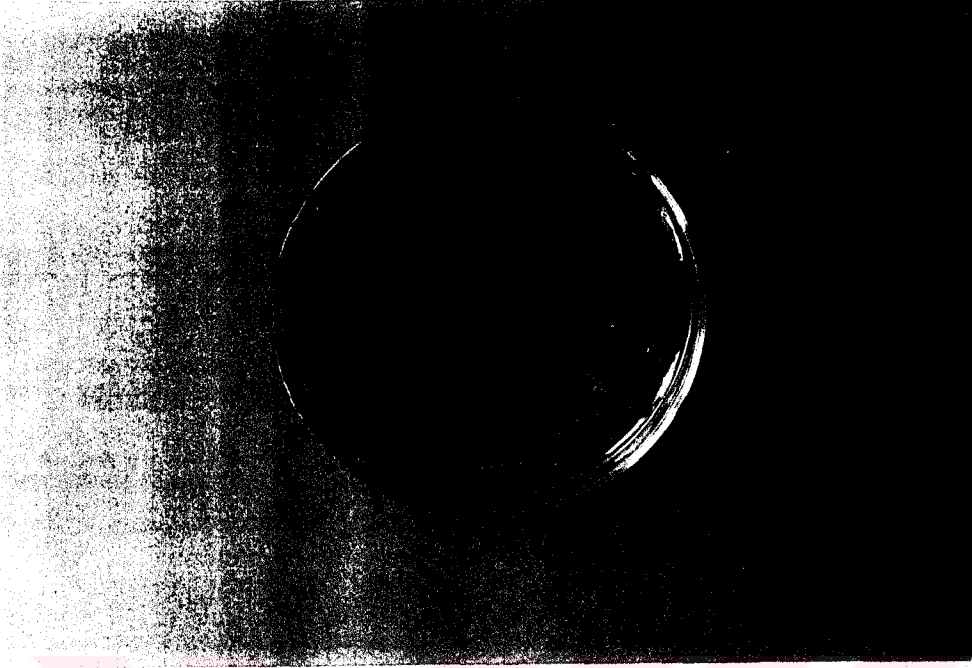
Şekil 4.34. İnorganik Tuz-Nişasta Agar Ortamında Geliştirilmiş 10P50 No' lu İzolatın Spor Zinciri Morfolojisi (1000X)



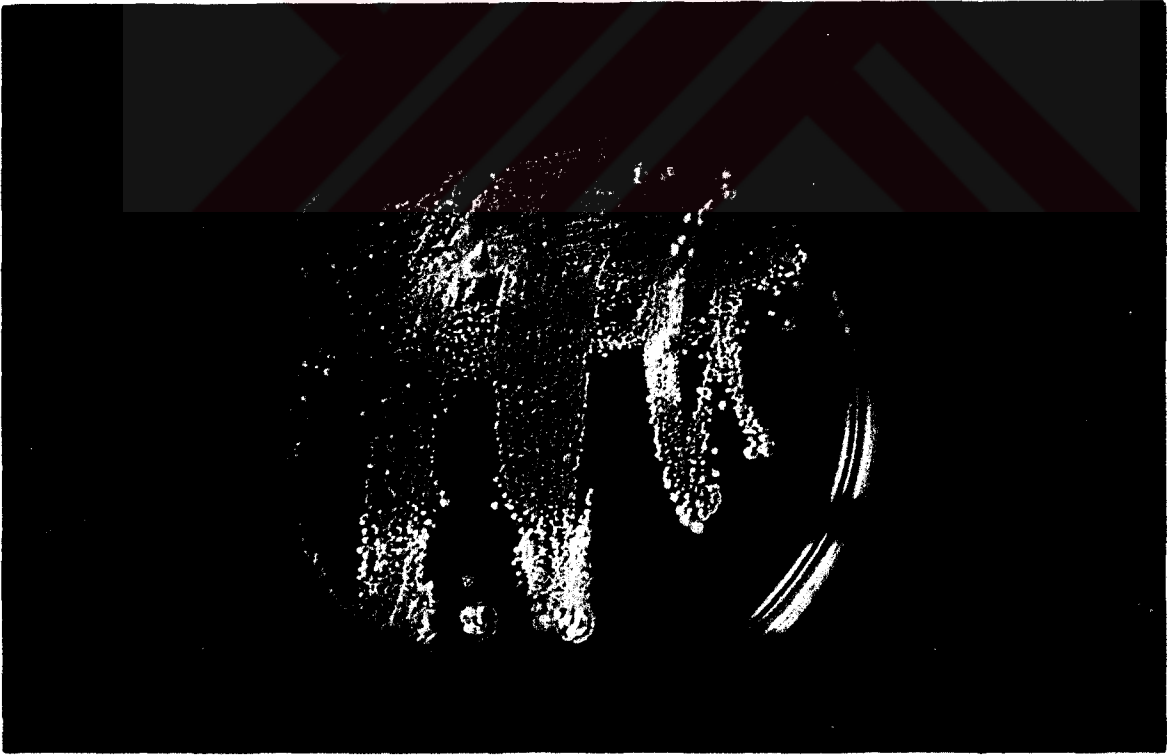
Şekil 4.35. 3Ba1 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.36. 3Ba3 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



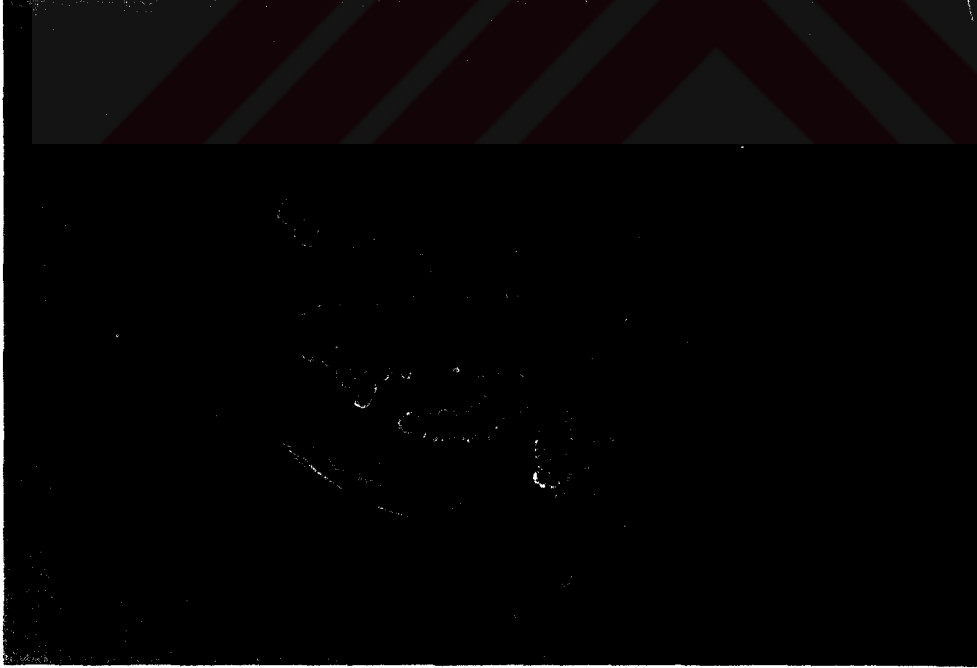
Şekil 4.37. 5C12 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.38. 1B19 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



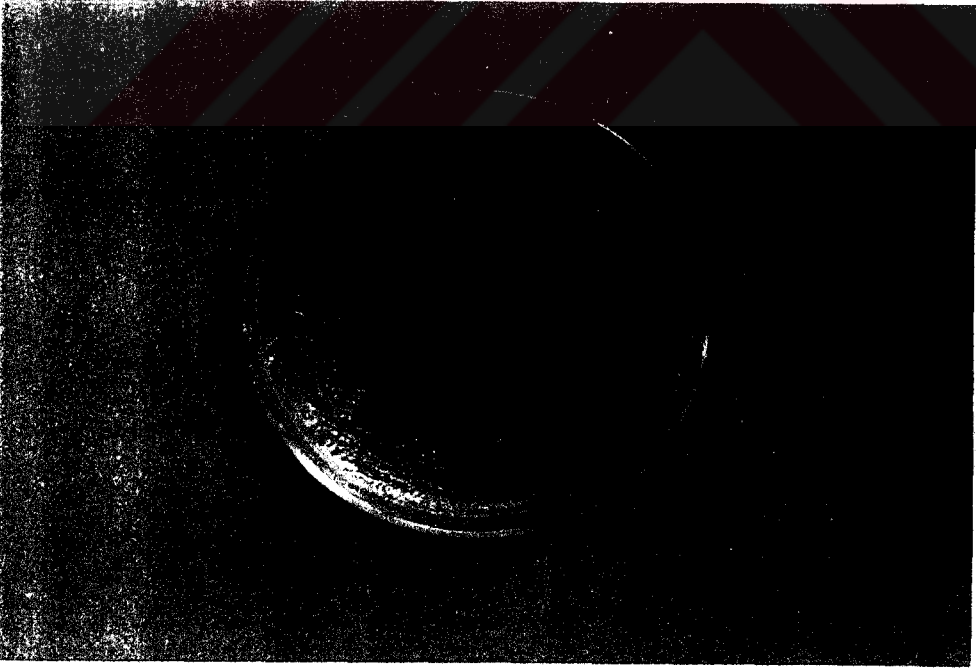
Şekil 4.39. 9B40 No' lu İzolatın Glukoz-Nitrat Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



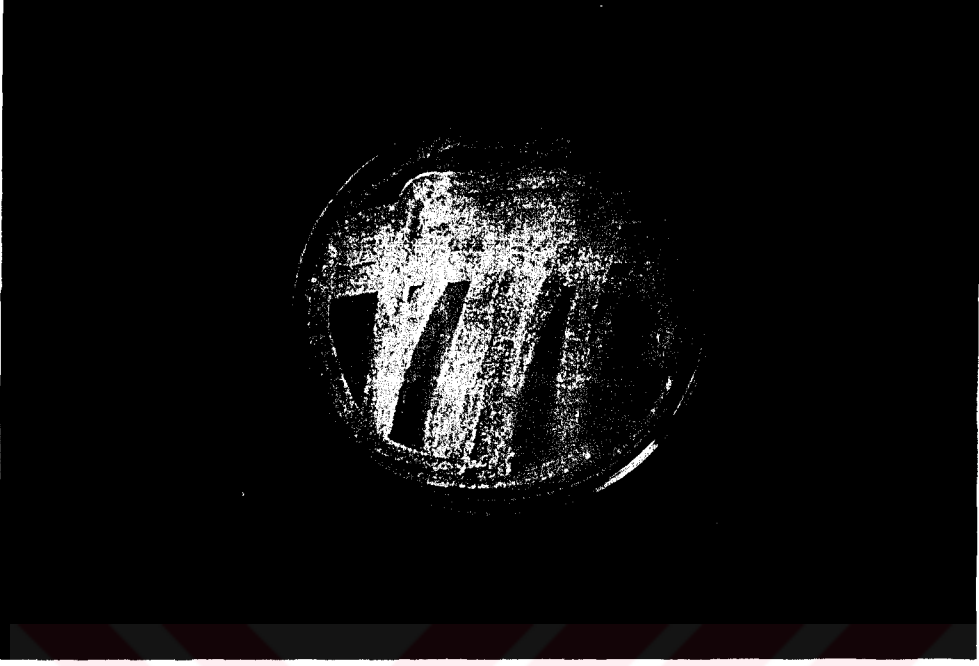
Şekil 4.40. 3Ba1 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



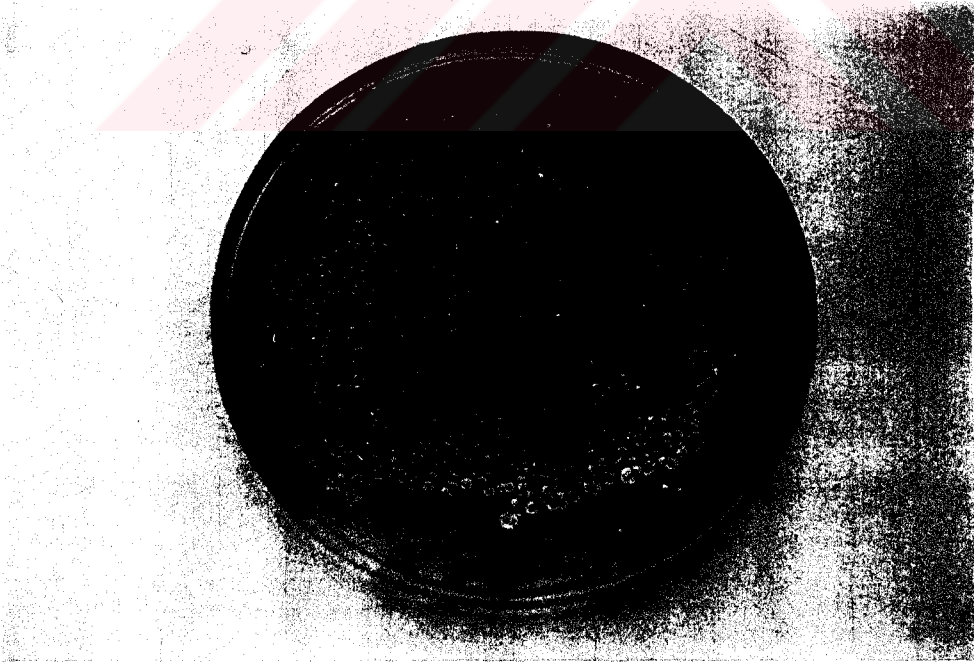
Şekil 4.41. 3Ba3 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.42. 5C12 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.43. 10P50 No' lu İzolatın Nişasta-Asparagin Agar Ortamında (14 Günlük) Gelişimi



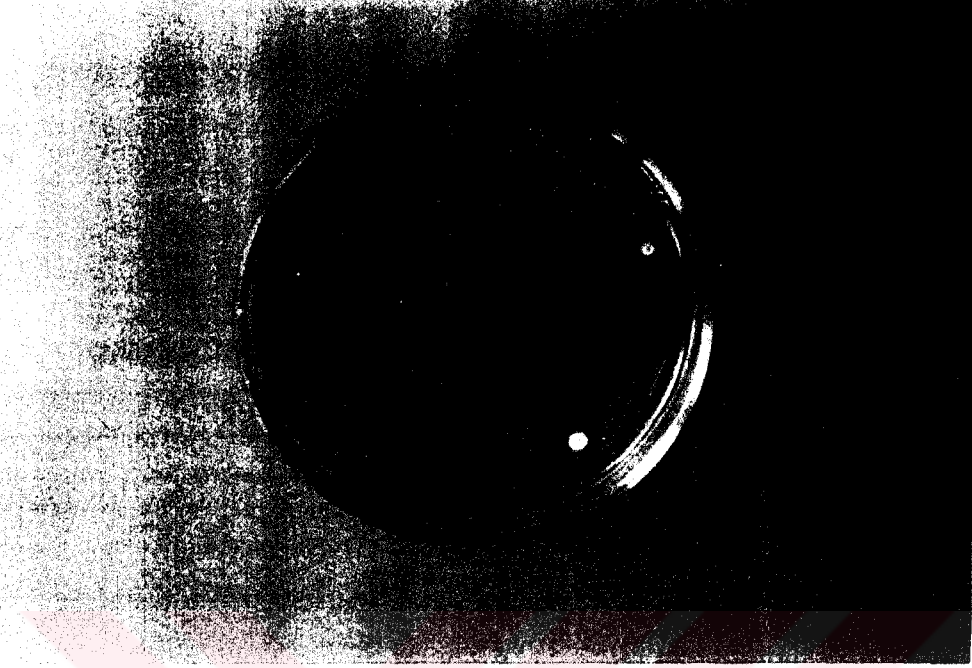
Şekil 4.44. 3Ba1 No' lu İzolatın Glukoz-Asparagin Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.45. 5C12 No' lu İzolatın Glukoz-Asparagin Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.46. 10P50 No' lu İzolatın Glukoz-Asparagin Agar' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.47. 3Ba1 No' lu İzolatın Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.48. 3Ba3 No' lu İzolatın Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)' da (14 Günlük) Gelişimi.



Şekil 4.49. 1B19 No' lu İzolatın Gliserol-Asparagin Agar (ISP 5)' da (14 Günlük) Gelişimi.

4.5. Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolatlarımızın fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri 3.3.3.'de anlatılan yöntemle saptanmış ve sonuçlar Tablo 4.10., 4.11., 4.12., 4.13. ve 4.14' de verilmiştir. Ayrıca 3Ba1 ve 5C12 No' lu izolatların Tirozin Agar (ISP 7) ortamında Melanin oluşumuna ait görüntüler Şekil 4.50. ve 4.51.' de gösterilmiştir. İzolatların özellikleri ile akraba olduğu türün pozitif olasılık matrisleri, Williams ve arkadaşlarının *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology'* de verdikleri *Streptomyces* strainlerinin karakteristikleri ile beraber incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.15., 4.16., 4.17., 4.18., 4.19., 4.20.ve 4.21.' de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.10. Seçilen İzolatların Çeşitli Karbon Kaynaklarını Kullanımı.

Karbon Kaynağı	3Ba1	3Ba3	5C12	1B19	9B40	1B49	10P50
Adonitol	+	+	-	+	+	-	+
Laktoz	+	+	+	+	+	-	+
Ksilitol	-	+	-	-	+	-	-
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	-
Galaktoz	+	+	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	-	+	+	+	+

İnozitol	+	+	+	+	+	-	+
Ksiloz	+	+	+	+	+	-	+
Dekstran	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoz	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	-	+
Na Sitrat	+	+	+	+	-	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	+	+	-	+

Tablo 4.11. Seçilen İzolatların Azot Kaynaklarını Kullanımı.

Azot Kaynağı	3Ba1	3Ba3	5C12	1B19	9B40	1B49	10P50
L-Arginin	+	-	+	+	+	-	+
L-Sistein	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidin	+	-	+	+	+	+	+
L-Fenilalanin	+	+	+	+	+	-	+
L-Valin	+	+	+	+	+	+	+
KNO ₃	+	-	+	+	+	+	+
Asparagin	+	+	+	+	+	+	+
L-Hidroksiprolin	+	+	+	+	+	-	+
L-Lizin	+	+	+	+	+	+	+
L-Tirozin	+	+	+	+	+	+	+
DL- α -n-bütirik asit	-	-	-	-	-	+	-

Tablo 4.12. İzolatların Farklı Sıcaklık ve İnhibitörlerle Büyüme Özellikleri.

İzolatlar	3Ba1	3Ba3	5C12	1B19	9B40	1B49	10P50
Sıcaklık							
4 °C	-	-	-	-	-	-	-
37 °C	+	-	-	+	+	+	+
45 °C	+	-	-	-	+	-	+
İnhibitörler							
Fenol (0.1)	+	-	+	-	+	+	-
Sodyum Azid (0.01)	+	+	-	+	-	+	+
(0.02)	-	-	-	-	-	-	+
Potasyum Tellürit (0.001)	-	+	-	+	+	+	-
Kristal Violet (0.0001)	-	-	-	-	-	+	-

Sodyum Klorid (%7)	+	+	-	+	-	+	+
(%10)	-	+	-	-	-	-	-
(%13)	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.13. İzolatların Bazı Fizyolojik Özellikleri.

Özellikler	3Ba1	3Ba3	5C12	1B19	9B40	1B49	10P50
Nişasta Hidrolizi	+	+	-	-	+	-	-
Tirozin Hidrolizi	+	+	+	+	+	-	+
Nitrat Redüksiyonu	+	-	+	-	-	-	-
Oksalat Kullanımı	+	+	-	+	+	-	+
Melanin (ISP 6' da)	+	-	+	-	-	-	-
Jelatin Hidrolizi	+	-	+	+	-	-	+
Lesitinaz	+	+	+	+	-	+	-
Lipolizis	-	+	-	-	+	+	+
Dnaz	+	+	+	+	-	+	+
Üreaz	-	+	-	-	-	-	-
H ₂ S Üretimi	-	-	+	-	+	-	-
Proteolitik aktivite	-	+	-	+	+	+	+

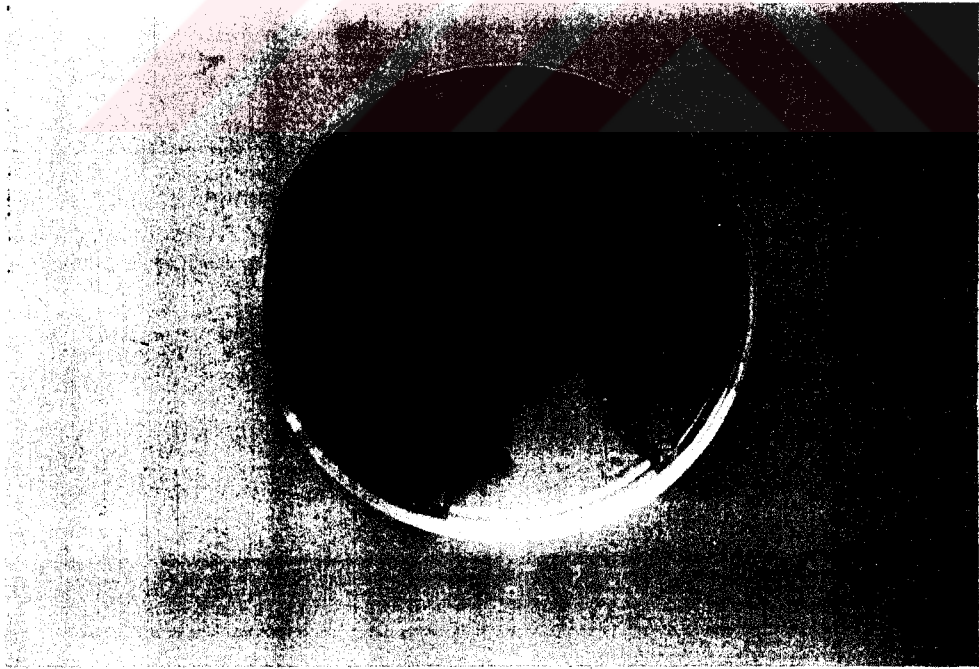
Tablo 4.14. İzolatların Bazı Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıkları.

Antibiyotikler	3Ba1	3Ba3	5C12	1B19	9B40	1B49	10P50
Novobiyosin (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
Neomisin (30 µg)	S	R	S	S	S	S	S
Karbenisillin (100 µg)	S	S	S	S	S	S	ND
Nalidiksik asit (30 µg)	R	R	S	R	R	S	S
Imipenem (10 µg)	S	S	S	S	S	S	R
Eritromisin (15 µg)	R	R	S	R	S	R	R
Penisilin G (10 i.u)	R	R	R	R	S	R	R
Ampisillin (10 µg)	S	R	S	R	R	R	R
Kloramfenikol (30 µg)	S	S	S	R	R	R	S
Vankomisin (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
Sulfamethoxazole (25 µg)	S	S	S	R	S	S	S
Rifampisin (50 µg)	S	R	S	S	S	R	R

R; Resistant (Dirençli), S; Sensitif (Duyarlı), ND; Belirlenemedi.



Şekil 4.50. 3Ba1 No' lu İzolatın Tirozin Agar (ISP 7) Ortamında Melanin Oluşturması.



Şekil 4.51. 5C12 No' lu İzolatın Tirozin Agar (ISP 7) Ortamında Melanin Oluşturması.

Tablo 4.15. 3Ba1' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi.

Özellikler	İzolat 3Ba1	<i>Streptomyces antibioticus</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi^b		
Rektifleksibils	-	20
Spiral	+	60
Vertisillat	-	0
Spor Kütlesi Rengi		
Kırmızı	-	0
Gri	+	100
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	+	0
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	+	0
Melanin Üretimi		
Pepton Yeast Iron Agar' da	+	80
Tirozin Agar' da	+	60
Miselyum fragmentasyonu	-	0
Batik Misel Sporulasyonu	-	0
Antibiosis		
<i>B. subtilis</i>	+	40
Enzim Aktivitesi		
Lesitinaz ^c	+	40
Lipolisiz ^c	-	0
Nitrat İndirgenmesi	+	80
H ₂ S Üretimi	-	0
Antibiyotiklere Resistantlık		
Neomisin (50 µg/ml)	-	0
Rifampisin (50 µg/ml)	-	20
Penisilin G (10 i.u.)	+	40
45 °C' de Büyüme	+	80
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)		
NaCl (%7)	+	20
Sodyum Azid (0.01)	+	60
Fenol (0.1)	+	80
Potasyum Tellürit (0.001)	-	60
Azot Kaynaklarından yararlanma		
DL-α-n-Butirik Asit	-	20

L-Sistein	+	80
L-Valin	+	60
L-Fenilalanin	+	40
L-Histidin	+	100
L-Hidroksiprolin	+	40
Karbon Kaynaklarından Yararlanma		
Sukroz	+	80
Mezo-Inositol	+	80
Mannitol	+	80
L-Ramnoz	+	60
Adonitol	+	20
Dekstran	-	0
Ksilitol	-	0

a, *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

3Ba1 no' lu izolatin özellikleri Tablo 4.15.' de verilmiş, nümerik taksonomik yöntemlerle tanılanmış *Streptomyces antibioticus*' un özellikleri ile karşılaştırıldığında; izolatomuz potasyum tellürit (%0.001)' li ortamda büyüyemekte, DL- α -n-bütirik asiti kullanamamaktadır. Buna rağmen *Streptomyces antibioticus* olarak tanılanan 60 strain potasyum tellüritli ortamda büyümekte, 40 strain ise büyüyememekte; 20 straini, DL- α -n-bütirik asiti kullanmakta 80 straini kullanamamaktadır. 3Ba1' nolu izolatta diffüze pigment üretiminin olması tek fark olarak görülmektedir. Bu yüzden 3Ba1 no' lu izolatomuz *Streptomyces antibioticus* olarak tanılanmıştır.

Tablo 4.16. 3Ba3' nolu İzolatin Özellikleri ve Akriba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi

Özellikler	İzolat 3Ba3	<i>Streptomyces rimosus</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi^b		
Rektifleksibils	-	14
Spiral	+	57
Vertisillat	-	0
Spor Kütlesi Rengi		
Kırmızı	-	0
Gri	-	0
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	-	0
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	-	0

Melanin Üretimi

Pepton Yeast Iron Agar' da	-	0
----------------------------	---	---

Tirozin Agar' da	-	0
------------------	---	---

Miselyum fragmentasyonu	-	0
--------------------------------	---	---

Batık Misel Sporulasyonu	-	0
---------------------------------	---	---

Antibiosis

<i>B. subtilis</i>	+	100
--------------------	---	-----

Enzim Aktivitesi

Lesitinaz ^c	+	86
------------------------	---	----

Lipolisiz ^c	+	100
------------------------	---	-----

Nitrat İndirgenmesi	-	86
---------------------	---	----

H ₂ S Üretimi	-	14
--------------------------	---	----

Antibiyotiklere Resistantlık

Neomisin (50 µg/ml)	+	100
---------------------	---	-----

Rifampisin (50 µg/ml)	+	100
-----------------------	---	-----

Penisilin G (10 i.u.)	+	100
-----------------------	---	-----

45 °C' de Büyüme	-	43
-------------------------	---	----

Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)

NaCl (%7)	+	100
-----------	---	-----

Sodyum Azid (0.01)	+	71
--------------------	---	----

Fenol (0.1)	-	71
-------------	---	----

Potasyum Tellürit (0.001)	+	71
---------------------------	---	----

Azot Kaynaklarından yararlanma

DL- α -n-Butirik Asit	-	0
------------------------------	---	---

L-Sistein	+	29
-----------	---	----

L-Valin	+	57
---------	---	----

L-Fenilalanin	+	86
---------------	---	----

L-Histidin	-	100
------------	---	-----

L-Hidroksiprolin	+	29
------------------	---	----

Karbon Kaynaklarından Yararlanma

Sukroz	+	0
--------	---	---

Mezo-Inositol	+	100
---------------	---	-----

Mannitol	+	100
----------	---	-----

L-Ramnoz	+	0
----------	---	---

Adonitol	+	100
----------	---	-----

Dekstran	-	14
----------	---	----

Ksilitol	+	86
----------	---	----

a, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

3Ba3 no' lu izolatin özellikleri, Tablo 4.16' de nümerik taksonomik yöntemlerle tanımlanmış *Streptomyces rimosus*' un özellikleri ile karşılaştırıldığında; izolatomuz nitrati indirgeyememekte, hidrojen sülfür üretmemekte, fenol (%0.1)' lü ortamda büyüememekte, 45 °C' de büyüme göstermemekte ve histidini kullanamamaktadır. Buna rağmen *Streptomyces rimosus* olarak belirlenen 86 strain nitrati indirgemekte 14 strain indirgememekte, 14 strain hidrojen sülfür üretmekte, 86 strain ise üretmemekte, 71 straini fenollü ortamda büyümekte 29 strain büyümemektedir. Ayrıca 43 strain 45 °C' de büyüme göstermekte, 57 strain ise büyüme göstermemektedir. *Streptomyces rimosus* olarak belirlenen strainlerin tümü histidini kullanmaktadır. 3Ba3 no' lu izolatomuz ile *S. rimosus* arasındaki tek farkın bu olması nedeniyle, izolatomuz *Streptomyces rimosus* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.17. 5C12' nolu İzolatin Özellikleri ve Akraba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi

Özellikler	İzolat 5C12	<i>Streptomyces lavendulae</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi ^b		
Rektifleksibils	+	92
Spiral		17
Vertisillat	-	0
Spor Kütle Rengi		
Kırmızı	+	83
Gri	-	8
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	-	0
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	-	0
Melanin Üretimi		
Pepton Yeast Iron Agar' da	+	100
Tirozin Agar' da	+	92
Miselyum fragmentasyonu	-	0
Batık Misel Sporulasyonu	-	0
Antibiosis		
<i>B. subtilis</i>	+	92
Enzim Aktivitesi		
Lesitinaz ^c	+	100
Lipolisiz ^c	-	33

Nitrat İndirgenmesi	+	50
H ₂ S Üretimi	+	42
Antibiyotiklere Resistantlık		
Neomisin (50 µg/ml)	-	50
Rifampisin (50 µg/ml)	-	33
Penisilin G (10 i.u.)	+	58
45 °C' de Büyüme	-	17
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)		
NaCl (%7)	-	0
Sodyum Azid (0.01)	-	0
Fenol (0.1)	+	58
Potasyum Tellürit (0.001)	-	42
Azot Kaynaklarından yararlanma		
DL-∞-n-Butirik Asit	-	42
L-Sistein	+	33
L-Valin	+	17
L-Fenilalanin	+	42
L-Histidin	+	8
L-Hidroksiprolin	+	42
Karbon Kaynaklarından Yararlanma		
Sukroz	+	50
Mezo-Inositol	+	25
Mannitol	-	8
L-Ramnoz	+	17
Adonitol	-	8
Dekstran	-	0
Ksilitol	-	0

a, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

Tablo 4.17.' de nümerik taksonomik yöntemlerle tarif edilmiş *Streptomyces lavendulae*' nin karakterleri 5C12 no' lu izolatin karakterleri ile karşılaştırıldığında aralarında hiçbir fark olmadığı görülmektedir. Bu yüzden 5C12 no' lu izolat *Streptomyces lavendulae* olarak tanılanmıştır.

Tablo 4.18. 1B19' nolu İzolatın Özellikleri ve Akraba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi

Özellikler	İzolat 1B19	<i>Streptomyces lydicus</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi ^b		
Rektifleksibils	-	0
Spiral	+	100
Vertisillat	-	0
Spor Kütle Rengi		
Kırmızı	-	9
Gri	+	91
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	-	0
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	-	0
Melanin Üretimi		
Pepton Yeast Iron Agar' da	-	0
Tirozin Agar' da	-	0
Miselyum fragmentasyonu	-	0
Batık Misel Sporulasyonu	-	0
Antibiosis		
<i>B. subtilis</i>	+	73
Enzim Aktivitesi		
Lesitinaz ^c	+	64
Lipolisiz ^c	-	18
Nitrat İndirgenmesi	-	9
H ₂ S Üretimi	-	0
Antibiyotiklere Resistantlık		
Neomisin (50 µg/ml)	-	18
Rifampisin (50 µg/ml)	-	9
Penisilin G (10 i.u.)	+	91
45 °C' de Büyüme	-	0
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)		
NaCl (%7)	+	55
Sodyum Azid (0.01)	+	18
Fenol (0.1)	-	9
Potasyum Tellürit (0.001)	+	55
Azot Kaynaklarından Yararlanma		
DL-α-n-Bütirik Asit	-	9

L-Sistein	+	46
L-Valin	+	27
L-Fenilalanin	+	100
L-Histidin	+	36
L-Hidroksiprolin	+	55
Karbon Kaynaklarından Yararlanma		
Sukroz	+	73
Mezo-Inositol	+	91
Mannitol	+	91
L-Ramnoz	+	18
Adonitol	+	82
Dekstran	-	0
Ksilitol	-	55

a, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

1B19' nolu izolat Tablo 4.18.' de verilen özellikler tarafından nümerik taksonomik yöntemlerle tanımlanmış *Streptomyces lydicus* ile karşılaştırıldığında; fenollü (0.1) ortamda büyümemekte, DL- α -n-Bütirik asit ve Ksilitol' den yararlanamadığı görülmektedir. Buna karşın *Streptomyces lydicus* olarak tanımlanan ve tarif edilen 9 strain fenollü ortamda büyümemekte, 91 strain ise büyümemektedir; ayrıca 9 strain DL- α -n-Bütirik asiti kullanmakta, 91 strain kullanamamakta; 55 strain Ksilitol' ü kullanmakta, 45 strain ise bundan yararlanamamaktadır. Ayrıca izolat 1B19 L-Ramnoz' u karbon kaynağı olarak kullanabilmesine rağmen *Streptomyces lydicus* olarak tanımlanan sadece 18 strain kullanabilmekte, 82 strain ise kullanamamaktadır. Bu yüzden 1B19' nolu izolatomuz *Streptomyces lydicus* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.19. 9B40' nolu İzolatin Özellikleri ve Akriba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi

Özellikler	İzolat 9B40	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi^b		
Rektifleksibils	-	0
Spiral	+	67
Vertisillat	-	0
Spor Kütlesi Rengi		
Kırmızı	-	0
Gri	-	0

Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	+	50
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	+	33
Melanin Üretimi		
Pepton Yeast Iron Agar' da	-	17
Tirozin Agar' da	-	33
Miselyum fragmentasyonu	-	0
Batık Misel Sporulasyonu	-	0
Antibiosis		
<i>B. subtilis</i>	+	17
Enzim Aktivitesi		
Lesitinaz ^c	-	0
Lipolisiz ^c	+	83
Nitrat İndirgenmesi	-	17
H ₂ S Üretimi	+	83
Antibiyotiklere Resistantlık		
Neomisin (50 µg/ml)	-	0
Rifampisin (50 µg/ml)	-	50
Penisilin G (10 i.u.)	-	33
45 °C' de Büyüme	+	67
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)		
NaCl (%7)	-	83
Sodyum Azid (0.01)	-	67
Fenol (0.1)	+	100
Potasyum Tellürit (0.001)	+	100
Azot Kaynaklarından yararlanma		
DL-α-n-Butirik Asit	-	67
L-Sistein	+	17
L-Valin	+	100
L-Fenilalanin	+	83
L-Histidin	+	83
L-Hidroksiprolin	+	67
Karbon Kaynaklarından Yararlanma		
Sukroz	+	83
Mezo-Inositol	+	100
Mannitol	+	100
L-Ramnoz	+	100

Adonitol	+	100
Dekstran	-	50
Ksilitol	+	100

a, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

9B40' nolu izolat Tablo 4.19' de verilen özellikler ile nümerik taksonomik yöntemlerle tanılanmış *Streptomyces phaeochromogenes* ile karşılaştırıldığında; nitrata indirgeyemediği, NaCl (%7) ve sodyum azid (0.01)' li ortamda büyümediği; DL- α -n-Butirik asit ve dekstrandan yararlanamadığı görülmektedir. Buna karşın *Streptomyces phaeochromogenes* olarak belirlenen 17 strain nitrata indirgemekte, 83 strain indirgeyememekte; 83 strain NaCl' lü ortamda büyümekte, 17 strain büyümemekte; 67 strain sodyum azidli ortamda büyümekte, 33 strain büyümemekte; 67 strain DL- α -n-Butirik asitten yararlanabilmekte, 33 strain yararlanamamakta; 50 strain dekstranı kullanmakta, 50 strain ise kullanamamaktadır. Bu kriterler dahilinde 9B40' nolu izolat *Streptomyces phaeochromogenes* olarak tanılanmıştır.

Tablo 4.20. 1B49' nolu izolatın Özellikleri ve Akarba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi

Özellikler	izolat 1B49	<i>Streptomyces halstedii</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi ^b		
Rektifleksibils	+	77
Spiral	-	23
Vertisillat	-	0
Spor Kütle Rengi		
Kırmızı	-	0
Gri	+	100
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	-	8
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	-	0
Melanin Üretimi		
Pepton Yeast Iron Agar' da	-	0
Tirozin Agar' da	-	0
Miselyum fragmentasyonu	-	0
Batik Misel Sporulasyonu	-	0
Antibiosis		
<i>B. subtilis</i>	+	8
Enzim Aktivitesi		

Lesitinaz ^c	+	15
Lipolisiz ^c	+	100
Nitrat İndirgenmesi	-	23
H ₂ S Üretimi	-	92
Antibiyotiklere Resistantlık		
Neomisin (50 µg/ml)	-	0
Rifampisin (50 µg/ml)	+	31
Penisilin G (10 i.u.)	+	92
45 °C' de Büyüme	-	23
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)		
NaCl (%7)	-	92
Sodyum Azid (0.01)	+	85
Fenol (0.1)	+	85
Potasyum Tellürit (0.001)	+	100
Azot Kaynaklarından yararlanma		
DL-∞-n-Butirik Asit	+	54
L-Sistein	+	69
L-Valin	+	62
L-Fenilalanin	-	77
L-Histidin	+	69
L-Hidroksiprolin	-	23
Karbon Kaynaklarından Yararlanma		
Sukroz	+	23
Mezo-Inositol	-	23
Mannitol	+	69
L-Ramnoz	+	69
Adonitol	-	8
Dekstran	-	69
Ksilitol	-	0

a, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

1B49' nolu izolatin özellikleri Tablo 4.20' de verilen özellikler tarafından nümerik taksonomik yöntemlerle tanılanmış *Streptomyces halstedii* ile karşılaştırıldığında; izolat 1B49 nitrati indirgeyememekte, hidrojen sülfür üretememekte, NaCl (%7)' lü ortamda büyümemekte, L-Fenilalanin' i ve L-Hidroksiprolin' i azot kaynağı olarak kullanamamakta, mezo-inositol, adonitol ve dekstranı karbon kaynağı olarak kullanamamaktadır. Diğer taraftan

Streptomyces halstedii olarak tanılanan ve tarif edilen 23 strain nitrati indirgemekte, 77 strain indirgeyememekte; 92 strain hidrojen sülfür üretebilmesine rağmen 8 strain üretememekte; yine 92 strain NaCl (%7)' lü ortamda büyümekte, 8 strain büyüyememekte; 77 strain L-Fenilalanin' i azot kaynağı olarak kullanmakta, 23 strain kullanamamakta; 23 strain L-Hidroksiprolin' i kullanmakta, 77 strain kullanamamakta; 23 strain mezo-inositolü karbon kaynağı olarak kullanmasına rağmen 77 strain kullanmamakta; adonitolü 8 strain kullanabilmekte, 92 strain kullanmamakta ve son olarak 69 strain dekstranı karbon kaynağı olarak kullanmakta, 31 strain ise kullanamamaktadır. Karşılaştırılan bu karakterlerden dolayı 1B49' nolu izolatımız *Streptomyces halstedii* olarak tanılanmıştır.

Tablo 4.21. 10P50' nolu İzolatın Özellikleri ve Akriba Olduğu Düşünülen Türün Pozitif Olasılık Matrisi

Özellikler	İzolat 10P50	<i>Streptomyces albus</i> ^a
Havasal Misel Spor Varlığı	+	100
Spor Zinciri Morfolojisi^b		
Rektifleksibils	-	0
Spiral	+	100
Vertisillat	-	0
Spor Kütle Rengi		
Kırmızı	-	0
Gri	-	0
Miseliyal Pigment Kırmızı-Portakal	-	0
Diffüze Pigment Üretilir	-	0
Diffüze Pigment Sarı-Kahverengi	-	0
Melanin Üretimi		
Pepton Yeast Iron Agar' da	-	0
Tirozin Agar' da	-	0
Miselyum fragmentasyonu	-	0
Batık Misel Sporulasyonu	-	0
Antibiosis		
<i>B. subtilis</i>	+	17
Enzim Aktivitesi		
Lesitinaz ^c	-	0
Lipolisiz ^c	+	100
Nitrat İndirgenmesi	-	0
H ₂ S Üretimi	-	83
Antibiyotiklere Resistantlık		
Neomisin (50 µg/ml)	-	0

Rifampisin (50 µg/ml)	+	100
Penisilin G (10 i.u.)	+	100
45 °C' de Büyüme	+	100
Çeşitli İnhibitörlerle Büyüme (% w/v)		
NaCl (%7)	+	100
Sodyum Azid (0.01)	+	100
Fenol (0.1)	-	17
Potasyum Tellürit (0.001)	-	50
Azot Kaynaklarından yararlanma		
DL- α -n-Butirik Asit	-	9
L-Sistein	+	0
L-Valin	+	17
L-Fenilalanin	+	17
L-Histidin	+	100
L-Hidroksiprolin	+	67
Karbon Kaynaklarından Yararlanma		
Sukroz	-	33
Mezo-Inositol	+	33
Mannitol	+	100
L-Ramnoz	+	17
Adonitol	+	100
Dekstran	-	0
Ksilitol	-	0

a, *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology* (Williams et al., 1989)' dan alınmıştır; b, ISP 4 ortamında 14. gün sonuçları; c, Egg-Yolk ortamı sonuçları; +, pozitif; -, negatif.

10P50' nolu izolat, Tablo 4.21.' deki özellikler ile nümerik taksonomik yöntemler ile tanılanmış *Streptomyces albus* ile karşılaştırılırsa; izolat 10P50 hidrojen sülfür üretmemekte, fenol (0.1) ve potasyum tellürit (0.001)' li ortamda büyümeyemekte, DL- α -n-Bütirik asiti azot kaynağı olarak kullanmamakta, sukrozu ise karbon kaynağı olarak kullanamamaktadır. *Streptomyces albus* olarak tanılanan 83 strain hidrojen sülfür üretmekte, 17 strain üretmemekte; 17 strain fenollü ortamda büyüebilmesine rağmen 83 strain büyümeyemekte; 50 strain potasyum tellüritli ortamda büyümekte, 50 strain ise büyümeyemekte; 9 strain DL- α -n-Bütirik asiti azot kaynağı olarak kullanmakta, 91 strain kullanmamakta; 33 strain sukrozu karbon kaynağı olarak kullanmakta, 67 strain ise kullanamamaktadır. Bu kriterler ışığında 10P50' nolu izolat *Streptomyces albus* olarak tanılanmıştır.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda elde edilen toplam 50 aktinomiset izolatından 17' sinin antimikrobiyal etki gösterdikleri; bunlardan %16' sının sadece Gr (+) bakteriler, %6' sının sadece Gr (-) bakterilere ve %12' sinin hem Gr (+) hem de Gr (-) bakteriler üzerine etkili oldukları belirlenmiştir. Ayrıca antibakteriyal etkisi belirlenen izolatların %10' u *S. aureus* ve %4' ü *E. coli* üzerinde etkili oldukları saptanmıştır. İzolatlarımızın Gr (-) test organizmaları üzerindeki en yüksek etkisi %10' luk bir değerle *Pseudomonas viridiflova*' da saptanmıştır. *E. coli* üzerindeki etkileri ise en düşük olanıdır. Gr (+) bakterilerden etkilenenler arasında ise %20' lik bir değerle *B. subtilis* birinci, *Enterococcus faecalis* %4' lük değerle en son sıradadır. Yukarıdaki açıkladığımız değerlere baktığımızda, aktinomisetlerden Gr (+) bakteriler üzerine etki yapanların en yüksek, Gr (-) bakteriler üzerine etki edenlerin sayısının ise en düşük olduğu görülmektedir. Bundan dolayı Gr (+) bakteriler üzerine etkili yeni antibiyotik araştırmalarının kapalı bir alan olduğu, Gr(-) bakterilere etkili antibiyotik araştırmaların incelemeye açık oluşu görüşü, çalışmamız ile de doğrulanmış olmaktadır.

Bir Rus araştırmacı olan Nakhimovskaia (1937) topraktaki antagonistik aktinomisetleri ilk defa incelemiş ve incelediği 80 kültürden 47 tanesinin antagonistik madde çıkardığını; 27 tanesinin ise aktif madde ürettiğini saptayarak bunların hepsinin Gr (+) bakteriler üzerine etkili olduğunu belirlemiştir. Linder ve Wallhauser (1955) antagonizm yönünden 2500 *Streptomyces* straini izole etmişler ve bunların %77' sinin Gr (+) bakterilere (*S. aureus*), % 40' inin Gr (-) bakteriler (*E. coli*), %32' sinin *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*) ve %18' inin de funguslar (*A. niger*) üzerine etkili olduklarını saptamışlardır (Denizci, 1996). Kuzey Kanada topraklarından izole edilmiş 600 aktinomisetin antibiyotik aktivitesi üzerine yapılan çalışmada, izole edilen kültürlerin %47' sinin *S. aureus*, %8.2' sinin *E. coli*, %19.5' inin *M. tuberculosis* üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Çeşitli ortamlardan izole edilen toplam 10.000 kültürün incelenmesinde, bunların %25' inin bakteriler üzerine etkili antibiyotikler ürettikleri saptanmıştır (Öner, 1989). Denizci 1996 yılında Ege ve Doğu Karadeniz topraklarından izole ettiği 356 aktinomiset kültüründen 114 tanesinin Gr (+) bakterilere, 13 tane izolatin hem Gr (+) hem de Gr (-) bakterilere 1 tanesinin ise sadece Gr (-) bakterilere karşı etkin olduklarını saptamıştır. Aynı araştırmacı izole ettiği aktif izolatların hepsinin *Streptomyces* türleri olduğunu çalışmasında göstermiştir. Ayrıca aktinomisetler ile ilgili yapılan çalışmalarda incelenen çeşitli genuslar arasında *Streptomyces* genusu üyelerinin hem daha fazla oranda oldukları hem de en yüksek sayıda antibiyotik üreticileri oldukları bir çok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (Lechevalier, 1989; Locci, 1989; Öner, 1989; McCarthy and Williams, 1990; Schlegel, 1995; Denizci, 1996; Jongsik et al., 1997; Li, 1997; Al-Tai et al., 1999). Yukarıda belirttiğimiz araştırmacıların çalışmalarında elde ettikleri sonuçlarla bizim araştırmamızdaki sonuçların uyduğu görülmektedir. Çalışmamızda tanılanması yapılan izolatların büyük çoğunluğu (%16) nun Gr (+)

bakterilere, daha az bir kısmı (%6)'nın Gr (-) bakterilere karşı etkin antibiyotik ürettikleri saptanmıştır.

Lechevalier (1989) aktinomisetleri morfolojik ve kimyasal kriterler üzerine oturtulmuş geniş gruplara ayırmıştır. Bu belirleme genus düzeyinde tanılama için en iyi ve basit olanıdır. Goodfellow (1989) *Streptomyces* genusu türlerinin ayrımında en basit yöntemin nümerik taksonomi yöntemleri, en güvenilir olanının ise 16S rRNA analizi benzerliklerine göre olduğunu saptamıştır. Şu anki laboratuvar ve çalışma imkanlarımız yeterli olmadığından, izolatların 16S rRNA analizleri daha sonraki çalışmalarımızla tespit edilecektir. Yaptığımız çalışmada seçilen izolatlarımızın tanısı için makroskobik, mikroskobik incelemeler, biyokimyasal testler, kültürel özellikler ve fizyolojik özelliklerden yararlanılmıştır. İzolatlarımızın kültür ortamlarında başlangıçta derimsi yumuşak; sonraları sert-sıkı, tekstürlü, koloni görünüşlerinin pamuksu-yünlü oluşları; kültürlerin toprak kokusu vermeleri ile *Streptomyces* genusu üyeleri olduğu düşünülmüş ve bu mikroskobik incelemeler ile doğrulanmıştır. Şöyleki; izolatlarımız substrat, havasal misel ve hareketsiz sporlar içermelerinin yanında, aerial misel üzerinde uzun spor zincirleri oluşturmaktadırlar. Ayrıca bu 7 izolatımız substrat miselde sporangium ve hareketli sporların gözlenmeyişi nedeniyle *Kineosporia*' dan; spor zincirlerinin 3Ba1, 3Ba3, 1B19, 9B40 ve 10P50' nolu izolatlarda spiral, 5C12 ve 1B49' nolu izolatlarda Rektifleksibils olması nedeniyle *Streptoverticillum*' dan; substrat miselyumlarının bulunması nedeniyle de *Sporichthya* genuslarından ayırt edilmişlerdir.

3Ba1' nolu izolatımızın Lakkaz enziminin Dopamin' i başlangıç maddesi olarak kullanarak sonraki aşamalarda üretmiş olduğu bir pigment olan melanin üretme yeteneğinin oluşu, spor zincirlerinin spiral, havasal spor renginin gri, ters yüzey rengi (substrat misel) renginin sarı-kahve oluşu; karbon ve azot kaynaklarını kullanımı açısından *Streptomyces antibioticus*' a benzerliği nedeniyle; Bu izolatımızı *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology*' deki *Streptomyces* türleri ile karşılaştırarak *S. antibioticus* olarak tanıladık. *S. antibioticus*' un antibakteriyal etkili Oleandomisin ve Aktinomisin, ayrıca antiviral etkili Ara-A antibiyotiklerini ürettiği Öner (1989), Hsieh and Jones (1995) ayrıca Denizci (1996) tarafından belirtilmektedir. Çalışmamızda *S. antibioticus* olarak tanıladığımız 3Ba1' nolu izolatımız Gr (-) bakterilere etkili antibiyotik üretmekte olup bu araştırmacıların çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

3Ba3' nolu izolatımızın spor zincirlerinin spiral, havasal misel renginin beyaz-sarı, substrat miselinin sarı-kahve oluşu; melanin pigmentinin üretilmemesi; karbon ve azot kaynaklarını kullanımı, antibiyotiklere olan resistantlık ve çeşitli inhibitörlerle büyüebilme benzerliklerinden dolayı *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology*' de verilen türlerle karşılaştırarak *Streptomyces rimosus* olarak tanısını yapmış bulunmaktayız. Ancak bu izolatımız L-Ramnoz' u ve Histidini kullanabilmesine rağmen *S. rimosus* olarak tanımlanan ve tarif edilen strainler kullanamamaktadır. İzolat 3Ba3 ile *S. rimosus* arasındaki tek fark bu olmasına rağmen diğer özelliklerin benzerliğinden dolayı bu tür dahilinde kalmaktadır. *S. rimosus*' un antibakteriyal

etkili Oksitetrasiklin ve Rimosidin antibiyotiklerini ürettiği Öner (1989), Denizci (1996) ve Pandza et al. (1997) tarafından tespit edilmiştir. *S. rimosus* olarak tanıladığımız 3Ba3 çalışmamızda kullandığımız hem Gr (-) hem de Gr (+) bakterilere karşı etkili antibiyotik üretmektedir.

5C12' nolu izolatin spor zincirlerinin rektifleksibils, havasal spor renginin kırmızı, ters yüzey renginin sarı-kahve oluşu, melanin üretebilme yeteneğinin bulunması ve diğer kültürel, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini benzerliğinden dolayı, *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology'* de verilen türlerle karşılaştırılarak *Streptomyces lavendulae* olarak tanılanmıştır. *S. lavendulae'* nin Gr (+) bakterilere etkili Lavendomisin, antibakteriyal etkili Streptotirisin ve Mitomisin antibiyotiklerini ürettiği Öner (1989), Denizci (1996), Sheldon et al. (1997) ve Sheldon et al.(1999) tarafından saptanmış olup; çalışmamızda *S. lavendulae* olarak belirlediğimiz 5C12' nolu izolat hem Gr (-) hemde Gr (+) bakterilere karşı etkili antibiyotik üretmektedir.

1B19' nolu izolatomuzun spor zincirlerinin spiral, oluşu melanin üretebilme yeteneğinin olmayışı; karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme yeteneğinin benzerliği nedeniyle *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology'* de türler dahilinde *Streptomyces lydicus* olarak tanıladık. *S. lydicus'* un Gr (+) bakterilere ve mayalara etkili Lidikamisin antibiyotiğini ürettiği Öner (1989) ve Denizci (1996) tarafından belirtilmektedir. *S. lydicus* olarak tanıladığımız 1B19' nolu izolat ise sadece Gr (+) bakterilere karşı etkili antibiyotik üretmektedirler. Bu sonuçla, yukardaki araştırmacıların ifadeleri bağdaşmaktadır.

9B40' nolu izolatin spor zincirinin spiral, havasal spor renginin beyaz-sarı oluşu; melanin üretilmeyişi; karbon, azot kaynaklarını kullanabilme ve antibiyotiklere resistantlık benzerlikleri nedeniyle *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology'* de nümerik taksonomik yöntemlerle belirlenmiş türlerle karşılaştırıldığında *Streptomyces phaeochromogenes* olduğu görülmektedir. Bunların dışında *Streptomyces phaeochromogenes* olarak tanılan 9B40' nolu izolat sadece Gr (+) bakteriler (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* ve *Bacillus subtilis*)' e karşı etkili bulunmasına rağmen, araştırılan literatürlerde *S. phaeochromogenes'* in hangi tür antibiyotik ürettiğine dair bilgilere rastlanılmamıştır.

Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology' de verilen, nümerik taksonomik metotlarla tanımlanmış ve tarif edilmiş olan *Streptomyces halstedii* rektifleksibils spor zincirlerine sahip olup, havasal spor rengi gri, substrat misel rengi sarı-kahvedir; melanin pigmenti üretmez ve %7 NaCl' lı ortamda büyüebilmektedir. 1B49' nolu izolatomuz ile bu kriterler benzerdir. Ayrıca karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme yetenekleri de hemen hemen benzer olduğundan dolayı 1B49' nolu izolatomuzı *S. halstedii* olarak belirledik. *Streptomyces halstedii* olarak tanılan 1B49' nolu izolatomuz sadece Gr (+) bakteriler (*Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*)' e karşı etkili olduğu saptanmış taranan ilgili literatürlerde bu türün üretmiş olduğu antibiyotiklerle ilgili bilgilere rastlanılmamıştır. Ancak günümüzde *S. halstedii'* den Ksilan' ı Ksiloligosakkaritler' e ve Ksiloz' a parçalayan Ksilanaz enziminin üretildiği Ruiz ve arkadaşları

(1995) tarafından belirtilmektedir. Bu son ürünler gıdaların ve kısa sürede bozulan kimyasalların korunmasında kullanılmaktadır.

Son olarak 10P50' nolu izolatomuzun spor zinciri spiral, havasal spor yığını rengi beyaz, ters yüzey rengi sarıdır; melanin üretebilme kabiliyeti yoktur, diffüze pigmentler üretilmez. Bu özellikler *Streptomyces albus* ile benzerdir. Ayrıca karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme benzerliklerinden dolayı *Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology'* de verilen bilgiler dahilinde 10P50' nolu izolat, *Streptomyces albus* olarak tanılanmıştır. *S. albus'*un antibakteriyal etkili Salinomisin ve Aktinomisetin antibiyotiklerini ürettiği Öner (1989) ve Denizci (1996) tarafından belirtilmiştir. *S. albus* olarak tanıladığımız 10P50' nolu izolatomuz hem Gr (-) hem de Gr (+) bakterilere karşı etkin antibiyotik üretmektedir.

Aktinomisetlerin rizosferde rekabet güçlerinin diğer mikroorganizmalara göre yüksek oluşu, iyi kolonize olmaları ve etkili metabolit (antibiyotikler, hemiselülaz, selülaz, kitinaz, glukonaz ve amilaz gibi enzimler)' ler üretmeleri onların biyokontrol ajanları olarak kullanılmasına neden olmuştur. Pridham ve arkadaşları (1950)' li yıllarda *Streptomyces* kültür filtratlarının bitki hastalıklarına karşı antagonistik etkileri olduğunu saptamışlardır. Reddi ve Rao *Streptomyces ambofaciens'* in *Fusarium* sp. ve *Pythium* sp.' ye karşı etkili olduğunu in vitroda belirlemişlerdir (Turhan, 1981a). Maalesef ülkemizde aktinomisetlerin biyolojik mücadelede kullanım olanakları üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır. Turhan (1981a) İzmir ve civarındaki topraklardan izole ettiği bir antagonist (*Streptomyces ochraceiscleroticus'* in in vitroda; kök hastalığına sebep olan toprak kaynaklı fungal patojenlere karşı etkisini incelemiştir. Turhan bu çalışmada bu antagonistin patojenlerin büyümesini ortalama olarak 10.8-18.2 mm engellediğini göstermiştir. Turhan (1981b)' in yaptığı ikinci bir çalışma ile *Streptomyces ochraceiscleroticus* (C/2-9)' u önce in vitroda fungal patojenlere karşı, daha sonra in vivo çalışmasıyla bazı önemli toprak kaynaklı patojenlere karşı etkisini incelemiştir. C/2-9' un yapay yolla patojenlerin inoküle edildiği toprakta büyüyen bitkileri bütün hastalıklara karşı etkili bir şekilde koruduğunu göstermiştir. Bazı bitki tohum (pamuk, karpuz, kavun, salatalık, domates, biber)' larını ekimden önce C/2-9 filtratı ile karıştırmış, sonuçta bu bitkilerin hastalıklardan korunduğunu belirlemiştir ve C/2-9' un toprak kaynaklı patojenlerin biyolojik mücadelesinde kullanılabileceğine işaret etmiştir. Turhan ve Grossmann (1986) Türkiye' nin farklı bölgelerinden izole ettikleri 300 aktinomiset izolatının sekiz farklı fungal kökenli patojenlere karşı etkilerini incelemişlerdir. Teste tabi tutulan aktinomiset izolatlarının %90' ının *Sclerotinia sclerotiorum'* un, %17' sinin *Rhizoctonia solani'* nin ve %14' ününde *Alternaria alternata'* nin büyümesini inhibe ettiğini saptamışlar; *Rhizoctonia solani* ve *Alternaria alternata'* ya karşı güçlü antagonistik etki gösteren aktinomiset izolatlarının, teste tabi tutulan diğer fungal patojenlere karşı da etkili olduklarını saptamışlardır. Turhan ve Turhan (1989) *Streptomyces nobilis* ve *Streptomyces scleroticus'* u biyolojik mücadelede güçlü bir antagonist olarak kullanılan *Trichoderma harzianum* ile beraber *Pythium ultimum* ve *Rhizoctonia solani'* ye karşı etkilerini in vitroda saksı

denemeleriyle karşılaştırmışlardır. Sonuçta kullanılan *Streptomyces* türlerinin patojenlere karşı antagonistik etkilerinin *Trichoderma harzianum*' dan çok daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda test organizması olarak kullandığımız fitopatojen bakteriler *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas viridiflova*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' dir. İzole ettiğimiz aktinomisetlerden %6' sı *E. amylovora* (Gram negatif)' ya etkili olup, en az sayıdadır. Gr (-) fitopatojen bakterilerden *P. viridiflova*' ya etki eden izolat sayısı %10 olup, bu en yüksek değerdir. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram pozitif)' e etki eden izolat sayısı ise %10' dur. Walter ve Don (1995)' un bitki köklerinde fungal çürüklüğe sebep olan patojenler (*Pythium ultimum*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* ve *Phymatotrichum omnivorum*)' e karşı yaptıkları bir çalışmada *Streptomyces lydicus*' u oldukça etkili bir antagonist olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda tanıladığımız 1B19' nolu izolat *Streptomyces lydicus* olup, test organizmaları olarak kullandığımız fitopatojen bakterilere karşı hiçbir etkisi bulunmamaktadır. Çalışmamızda tanılması yapılan izolatların *Aspergillus foetidus* var. *pallidus*, *Penicillium herquei*, *Trichoderma viride* ve *Fusarium oxysporum*' a karşı antimikrobiyal etkileri belirlenmiş olup; izolatlardan 3Ba3 (*S. rimosus*) ve 1B49 (*S. halstedii*) *F. oxysporum*' un büyümesini belli oranlarda (0.7-0.8 mm) durdurmuşlardır. Diğer izolatların sözü edilen Funguslara karşı hiçbir etkileri yoktur. *Streptomyces lavendulae* olarak tanılanan 5C12' nolu izolatımız en yüksek etki (26 mm inhibisyon ile)' yi *E. amylovora*' ya karşı göstermiş olup; bu, tanılanan tüm izolatlar içinde en yüksektir. İzolat 3Ba1 (*S. antibioticus*) sadece *P. viridiflova* (gram negatif)' ya karşı, 9B40 (*S. phaeochromogenes*) ve 10P50 (*S. albus*) sadece *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gram pozitif)' e karşı, izolat 3Ba3 (*S. rimosus*) en yüksek etkisini *Agrobacterium tumefaciens* (Gram negatif)' e karşı etkili bulunmuştur. İzolat 1B49 (*S. halstedii*) fitopatojen bakterilerden hiç birine karşı etki göstermemiştir.

Ayrıca tanılması yapılan izolatların *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces* sp., *Williopsis californica* ve *Geotrichum penicillaum* mayalarına karşı antimikrobiyal etkileri de belirlenmiştir. İzolatlardan 3Ba1 (*S. antibioticus*), 5C12 (*S. rimosus*), 1B19 (*S. lydicus*), 9B40 (*S. phaeochromogenes*) ve 10P50 (*S. albus*) sözü edilen bu test organizmalarına karşı hiçbir antimikrobiyal etki göstermemiştir. İzolat 3Ba3 20 mm' lik bir inhibisyonla *G. penicillaum*' un büyümesini inhibe etmiştir. Aynı zamanda bu izolat *Kluyveromyces* sp. (0.5 mm ile) ve *W. californica* (0.4 mm ile)' ya karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. İzolat 1B49 ise sadece *S. cerevisiae*' ya karşı 0.8 mm' lik bir antimikrobiyal etki göstermiştir.

Ülkemiz nüfusunun %30' lara varan kesimi tarımla uğraşmaktadır. Ancak tarım ürünlerimizin yetiştirilmesi, hasadı ve depolanması sırasında büyük oranda verim düşüklüğü görülmektedir. Bu verim düşüklüğünün başlıca nedenlerinden birisi, tarımsal ürünlerde çeşitli zararlara sebep olan fitopatojen bakterilerdir. Yaptığımız çalışmada test organizması olarak

kullandığımız fitopatojen bakterilere karşı etkin antogonistler belirlenmiştir. Etkili olan izolatların bazı fungal kökenli patojenlere karşı etkileri de saptanmıştır.

Bol hammadde kaynağına sahip olduğumuz halde antibiyotiklerin çoğunu diğer ülkelerden ithal etmekteyiz. Bu da büyük bir ekonomik kayıp demektir. Çalışmamızda Gr (+) ve Gr (-) bakterilere etkili izolatlardan aktif antibiyotiklerin izole edilerek, saflaştırılması, kimyasal yapısının aydınlatılması gerekmektedir. Ayrıca antibiyotik etkisi saptanan izolatların 16S rRNA analizlerinin yapılması, bu izolatlarda ekonomik önemi olan bazı enzim (Ksilanaz, hemiselülaz, glukonaz, selülaz gibi) lerin aranması yerinde olacaktır. Ancak bu tür çalışmaların yapılabilmesi için mikrobiyologlar, eczacılar ve organik kimyacıardan oluşan bir ekip çalışmasının olması, ayrıca çalışmaları destekleyecek araştırma merkezlerine ihtiyaç olduğu kanısındayız.



6. KAYNAKLAR

1. Al-Tai, A., Kim, B., Kim, S.B., Manfio, G.P. and Goodfellow, M. *Streptomyces malaysiensis* sp. nov., a new streptomycete species with rugose, ornamented spores. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, p. 1395-1402. 1999.
2. Alsan, S. Yarının Antibiyotikleri. TÜBİTAK, Bilim ve Teknik Dergisi. Sayı: 376. 1999.
3. Anderson, A.S. and Wellington M.H.E. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 797-814. 2001.
4. Anonim. Bacteriology 330 Lecture Topics: Antimicrobial Agents. Kenneth Todar University of Wisconsin Department of Bacteriology. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lectureama>. 1996.
5. Anonim. Antibiotics on the Farm. From the New York Times. January 9, 2001a.
6. Anonim. The Microbial World, Penicillin and other antibiotics. <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/penicill.htm>. 2001b.
7. Anonim. Human Health and Antibiotic Growth Promoters. <http://www.fedesa.be/Antibio/HAN/han1-1.htm>. 2001c.
8. Atalan, E. Selective Isolation, Characterization and Identification of Some *Streptomyces* species. PhD Thesis. Department of Microbiology The Medical School. University of Newcastle upon Tyne. England. 1993.
9. Athalye, M., Lacey, J. And Goodfellow, M. selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes using Rifampicin. *Journal of Applied Bacteriology*. 51, 289-297. 1981.
10. Becker, B., Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycetes. *Applied Microbiology*, Vol. 13, No:2. Printed in U.S.A. 1965.
11. Cross, T. Growth and Examination of Actinomycetes Some Guidelines. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol:4 p. 2340-2343. Williams & Wilkins

Company, Baltimore. 1989.

12. Denizci, A.A. Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma. Doktora tezi. Kod no: 10 0600 0000 014. EÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü Bornova-İzmir. 1996.
13. Goodfellow, M. and Board, R. G. Microbiological classification and identification. *Society for Applied Bacteriology, Symposium series, No: 8*. Academic Press, London, New York. 1980.
14. Goodfellow, M and Williams, S. T. Ecology of Actinomycetes. *Annual Review Microbiology*. 37: 189-216. 1983.
15. Goodfellow, M. Suprageneric Classification of Actinomycetes. *In Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology*. Vol:4 p. 2333-2339. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
16. Goodfellow, M., Ferguson, E. V., and Sanglier J. J. Numerical Classification and identification of *Streptomyces* species. *Gene*. 115: 225-233. 1992.
17. Hatano, K., Nishii, T. and Mordarska, H. Apr. *Streptomyces spitsbergensis* Wieczorek et al. 1993 is a Later Subjective Synonym of *Streptomyces baldaccii* (Farina and Locci 1996) Witt and Stackebrandt 1991. *International Journal of Systematic Bacteriology*. p. 573-574. 1997.
18. Hatano, K. Replacement of ATCC 21273, the current type strain of *Streptomyces rameus* Shibata 1959, with IFO 3782: Request for an Opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*. p. 931-932. 1999.
19. Hsieh, C.J. and Jones, G.H. Nucleotide Sequence, Transcriptional Analysis, and Glucose Regulation of the Phenoxazinone Synthase Gene (*phsA*) from *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Bacteriology*. p. 5740-5747. 1995.
20. Jongsik, C., Hong-Duk, Y., Yang-Ig, Y., Hongkum, L., Min-Young, K., Yung-Chil, H. and Sa-Ouk, K. *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. p. 492-498. 1997.

21. Lacey, J. *Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*. Edited by G. Sykes and F. Skinner. *The Society for Applied Bacteriology Symposium Series No: 2*. Academic Press London-New York. 1973.
22. Lechevalier, M. P., Bievre, C. D. and Lechevalier, H. Chemotaxonomy of Aerobic Actinomycetes: Phospholipid Composition. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 5, p. 249-260. Pergamon Press. Printed in England. 1977.
23. Lechevalier, H.A. The Actinomycetes III, A Practical Guide to Generic Identification of Actinomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 4: 2344-2347. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
24. Li, X., *Streptomyces cellulolyticus* sp. nov., a New Cellulolytic Member of the Genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. p. 443-445. 1997.
25. Locci, R. *Streptomyces* and related Genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 4: 2451-2508. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.
26. McCarthy, A.J. and Williams, S.T. Methods for Studying the Ecology of Actinomycetes. *Methods In Microbiology*. Vol.: 22. 533-363. Ed. by. R. Grigorova and J.R. Norris, Academic Press Limited, London. 1990.
27. Öner, M., Tamer, A. Ü. and Bursalıoğlu, M. Rifamisin Kompleksinin Üretimi. *Mikrobiyoloji Bül.* 21: 296-300. 1987.
28. Öner, M. *Actinomycetes* (Selman A. Waksman 1967' den çeviri). Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:89. EÜ. Basımevi, Bornova-İzmir.1989.
29. Pandza, K., Pflanze, G., Cullum, J. and Hranueli, D. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome.. *Microbiology*. 143, p. 1493-1501. 1997.
30. Prescott, L.M., Harely, J.P., and Klein D.A. *Microbiology* W.C. Brown Publishers, New York, p. 491. 1990.
31. Ruiz-Arribas, A., Fernandez-Abaloz, J.M., Sanchez, P., Garda, A.L., and Santamaria, R.I.

Overproduction, Purification, and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Applied and Environmental Microbiology.*, p. 2414-2419. 1995.

32. Schlegel, H.G. General Microbiology. Translated by M. Korgut. Seventh Edition. Cambridge University Press, Cambridge. 1995.
33. Sembiring, L., Ward, A.C. and Goodfellow, M. Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 78: 353-366. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 2000.
34. Sheldon, P.J., Johnson, D.A., August, P.R., Liu, H.W. and Sherman, D.H. Characterization of a Mitomycin-Binding Drug Resistance Mechanism from the Producing Organism, *Streptomyces lavendulae*. *Journal of Bacteriology*. P. 1796-1804. 1997.
35. Sheldon, P.J., Mao, Y., He, M. and Sherman, D.H. Mitomycin Resistance in *Streptomyces lavendulae* Includes a Novel Drug-Binding-Protein-Dependent Export System. *Journal of Bacteriology*. P. 2507-2512. 1999.
36. Shirling, E. B. and Göttlieb, D. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 16, No: 3, P. 313-340. 1966.
37. Stanek, J. L. and Roberts, G. D. Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. *Applied Microbiology*. p. 226-231. 1974.
38. Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. 3. ve 4. Sınıflar için Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu. T.C. Anadolu Üniversitesi, Eğitim, Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları No:74 Eskişehir, 260 sayfa. 1989.
39. Turhan, G. A new race of *Streptomyces ochraceiscleroticus* in the biological control of some soil-borne plant pathogens I. Effects of isolate C/2-9 on some of the most important soil-borne fungi in vitro. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 88 (6), 373-381. 1981a.

40. Turhan, G. A new race of *Streptomyces ochraceiscleroticus* in the biological control of some soil-borne plant pathogens II. In vivo studies on the possibilities of using C/2-9 against some important diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 88 (7), 422-434. 1981b.
41. Turhan, G. and Grossmann, F. Investigation of a Great Number of Actinomycete Isolates on Their Antagonistic Effects Against Soil-Borne Fungal Plant Pathogens by an Improved Method. *Journal of Phytopathology*. 116, 238-243. 1986.
42. Turhan, G. and Turhan K. Suppression of Damping-off on Pepper caused by *Pythium ultimum* Trow and *Rhizoctonia solani* Kühn by Some New Antagonists in Comparison with *Trichoderma harzianum* Rifai. *Journal of Phytopathology* 126, 175-182. 1989.
43. Walter, M.Y., and Don, L. C. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a Potential Biocontrol Agent against Fungal Root and Seed Rots. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3119-3128. 1995.
44. Wendisch, F.K. and Kutzner, H.J. The family *Streptomycetaceae*. In *Prokaryotes*. Second edition. Vol. 1. 922-995. Ed. by A. Ballows et.al, Springer Verlag. 1991.
45. Williams, S. T. *Streptomyces* in the Soil Ecosystem. Edited by M. Mordarski, W. Kuryeowicz and J. Jeljaszewicz. Proceedings of the International Symposium on *Nocardia* and *Streptomyces*. Warsaw, 1976.
46. Williams, S.T., Goodfellow, M. and Alderson, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943.339^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol:4, 2452-2492. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1989.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mustafa OSKAY
Doğum Tarihi : 03.03.1975
Doğum Yeri : Sivaslı/Uşak
Mezun Olduğu İlkokul : Kökez İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Ortaokul: Kökez İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Lise : Sivaslı Lisesi
Okuduğu Fakülte : E.Ü. Fen Fakültesi/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji
Fakülte Bitirme Tarihi : 1997
Aldığı Ünvan : Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ağırlıklı Biyolog
Yüksek Lisans : CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü
Başlama Tarihi : 1998
Çalıştığı Kurum : CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi, Araştırma Görevlisi.