

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ULVA LACTUCA* KOMPOSTUNDAN İZOLE
EDİLEN AKTİNOMİSETLERİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sermin YILDIRIM

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hatice KATI

Nisan 2018

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ULVA LACTUCA KOMPOSTUNDAN İZOLE
EDİLEN AKTİNOMİSETLERİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sermin YILDIRIM

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez .././20.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

..... Dr.
.....
Jüri Başkanı

..... Dr.
.....
Üye

..... Dr.
.....
Üye

..... Dr.
.....
Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Sermin YILDIRIM

13/04/2018

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca, ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, kendimi geliştirmeme imkan sağlayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hatice KATI'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Kompost örneklerinin temin edilmesinde sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve moral desteğiyle güç veren, manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım Ayşe SU başta olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Benim bu aşamalara gelebilmemde her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgmeden her zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bir bölümü, Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenmiştir. Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: FEN-BAP-A-140316-52) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
1.1. Alglerin Genel Özellikleri ve <i>Ulva lactuca</i>	3
1.2. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri	4
1.2.1. Aktinomisetlerin Morfolojik Özellikleri	5
1.2.2. Aktinomisetlerin Fizyolojik Özellikleri	8
1.2.3. Aktinomisetlerin Ekolojik Özellikleri	8
1.2.4. Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Özellikleri	10
1.2.4.1. Aktinomisetlerin Antibakteriyel Özellikleri.....	10
1.2.4.2. Aktinomisetlerin Antifungal Özellikleri.....	11
1.2.5. Aktinomisetlerin Enzim İçerikleri ve Özellikleri.....	12
1.2.5.1. Proteazlar.....	13
1.2.6. Aktinomisetlerin Moleküler Özellikleri	13
BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ	15
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. <i>Ulva lactuca</i> Kompostu	17
3.1.2. Antimikrobiyal Çalışmalarda Kullanılan Organizmalar	17

3.1.3. Kullanılan Besiyeriler	18
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Aktinomiset İzolasyonu.....	24
3.2.2. İzole Edilen Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması	25
3.2.2.1. Antibakteriyal Çalışmalar	25
3.2.2.2. Antifungal Çalışmalar	26
3.2.3. İzole Edilen Aktinomisetlerin Enzim İçeriklerinin Araştırılması.....	27
3.2.4. Aktinomisetlerin Tanımlanması	28
3.2.4.1. Morfolojik Tanımlama	28
3.2.4.2. Fizyolojik Tanımlama	29
3.2.4.3. Moleküler Tanımlama	30
3.2.4.3.1. DNA izolasyonu	30
3.2.4.3.2. PCR Çalışmaları.....	31
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. Aktinomiset İzolatları.....	32
4.2. Aktinomisetlerin Antibakteriyal Özellikleri.....	34
4.3. Aktinomisetlerin Antifungal Özellikleri	36
4.4. Aktinomisetlerin Enzim İçerikleri.....	42
4.4.1. Proteaz Aktivite Çalışmaları	44
4.5. İzolatların Tanımlaması.....	46
4.5.1. Morfolojik Olarak Tanımlanması.....	46
4.5.2. Aktinomiset İzolatlarının Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	48
4.5.3. Moleküler Olarak Tanımlanması.....	50
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat Derece
µl	: Mikrolitre
bp	: Baz Çifti
BSU	: Black Sea Ulva
cm	: Santimetre
CMC	: Karboksimetilselüloz
CTAB	: Setiltrimetilamonyum Bromür
DNA	: Deoksiribonükleikasit
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
Gr	: Gram
L	: Litre
m	: Metre
M	: Molar
MHA	: Mueller Hinton Agar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	: Patato Dekstroz Agar
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleikasit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SCA	: Nişasta Kazein Agar
SDS	: Sodyum Dedosil Sülfat
V	: Volt

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. <i>Ulva lactuca</i> (deniz marulu)	3
Şekil 1.2. Agar üzerinde büyüyen aktinomiset kolonisi	6
Şekil 1.3. Aktinomisetlerin farklı spor zincirlerinin şematik çizimleri.....	7
Şekil 3.1. Karşıt çizgi yöntemi	26
Şekil 3.2. İkili kültür tekniği	27
Şekil 3.3. Agar kuyu difüzyon yöntemi	27
Şekil 4.1. Bazı aktinomisetlerin petri görüntüleri	33
Şekil 4.2. Bazı izolatların koloni görüntüleri	33
Şekil 4.3. BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların çeşitli patojenlere karşı antibakteriyal aktiviteleri	35
Şekil 4.4. BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatlarının patojen bakterilere karşı 7. gündeki aktiviteleri	36
Şekil 4.5. Bazı aktinomisetlerin bitki patojeni funguslara karşı aktiviteleri	37
Şekil 4.6. Bazı aktinomisetlerin farklı besiyerlerinde agar kuyu difüzyon yöntemi ile bitki patojeni funguslara karşı aktivite görüntüleri	38
Şekil 4.7. Bazı izolatların enzim aktivitesi görüntüleri.....	42
Şekil 4.8. Jelatin besiyerinde proteaz aktivitesi	45
Şekil 4.9. Lekeli kumaşlarda proteaz ve deterjan etkisi.....	45
Şekil 4.10. Seçilen izolatların petri görüntüleri	46
Şekil 4.11. Seçilen izolatların koloni görüntüleri.....	47
Şekil 4.12. İzolatlara ait Gram boyama ışık mikroskobu görüntüleri	47
Şekil 4.13. İzolatlara ait spor zincirleri görüntüleri	48
Şekil 4.14. Farklı pH aralıklarında izolatların büyümesi	49
Şekil 4.15. Farklı tuz oranlarında izolatların büyümesi	49
Şekil 4.16. Farklı sıcaklıklarda izolatların büyümesi.....	50

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Biyoaktif mikrobiyal doğal ürünlerin sayıları	10
Tablo 3.1. Antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan organizmalar	18
Tablo 4.1. Aktinomiset izolatlarının çeşitli bakterilere karşı antibakteriyal etkileri	34
Tablo 4.2. SCA besiyerinde ikili kültür tekniği ile izolatların antifungal aktiviteleri	37
Tablo 4.3. SCA besiyerinde agar kuyu difüzyon tekniği ile izolatların antifungal aktiviteleri	39
Tablo 4.4. MHA besiyerinde agar kuyu difüzyon yöntemi ile izolatların antifungal aktiviteleri	40
Tablo 4.5. PDA besiyerinde agar kuyu difüzyon tekniği ile izolatların antifungal aktiviteleri	41
Tablo 4.6. İzolatların enzim içerikleri.....	43
Tablo 4.7. İzolatların lipaz/esteraz enzim içerikleri.....	44
Tablo 4.8. Yüksek aktivite gösteren BSU izolatlarının 16S rDNA analiz sonuçlarına göre benzediği bakteriler.....	50

ULVA LACTUCA KOMPOSTUNDAN İZOLE EDİLEN AKTİNOMİSETLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Denizler farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı geniş bir mikrobiyal çeşitliliğe sahiptir. Bu nedenle, deniz ortamı yeni antimikrobiyal bileşikler ve enzimler üretebilen aktinomisetler için potansiyel bir kaynaktır.

Bu çalışmada, *Ulva lactuca* (deniz marulu) kompost örneklerinden aktinomiset bakterileri izole edilmiştir. Bu aktinomisetlerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca aktinomisetlerin enzim içerikleri kalitatif yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Yüksek aktivite gösteren bazı izolatlar seçilerek morfolojik, fizyolojik ve 16S rDNA sekans analizine göre tanımlanmıştır.

İzolatların morfolojik özelliklerine bakılarak 40 aktinomiset bakterisi izole edilmiştir. Bu izolatlardan BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* patojen bakterilerine karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur. Onyeddi izolat, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. subglutinans* ve *Trichoderma* sp. funguslarına karşı antifungal aktivite göstermiştir. İzole edilen aktinomisetlerin 34'ü (%85) amilaz, 21'i (%53) lipaz/esteraz, 21'i (%53) kitinaz, 29'u (%73) pektinaz, 40'ı (%100) proteaz ve 30'u (%75) selüloz aktivitesi göstermiştir. Yüksek antimikrobiyal ve enzim aktivitesi gösteren BSU-1, BSU-12, BSU-19, BSU-25, BSU-38 nolu izolatların *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Ulva lactuca*, kompost, aktinomiset, antibakteriyel, antifungal, ekstrasellüler enzimler

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM *ULVA LACTUCA* COMPOST

SUMMARY

The seas have wide microbial variety because of physical and chemical properties. Therefore, seas are a potential source for actinomycetes to produce new antimicrobial compounds and enzymes.

In the present study, actinomycete bacteria from *Ulva lactuca* (sea lettuce) compost samples were isolated. The antibacterial and antifungal activities of these actinomycetes were investigated. In addition, the enzyme contents of actinomycetes have been determined using qualitative methods. Isolates showing high activity were identified according to morphological, physiological and 16S rDNA sequence analysis.

Forty actinomycete bacteria were isolated based on morphological properties. BSU-19 and BSU-25 among these isolates showed high antibacterial activity against pathogenic bacteria such as *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Seventeen isolates showed antifungal activity against fungi *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. subglutinans* and *Trichoderma* sp. The isolated actinomycetes showed 34 (85%) amylase, 21 (53%) lipase/esterase, 21 (53%) chitinase, 29 (73%) pectinase, 40 (100%) protease and 30 (75%) cellulase activity. BSU-1, BSU-12, BSU-19, BSU-25 ve BSU-38 isolates showing high antimicrobial and enzyme activity were found to belong to the genus *Streptomyces*.

Keywords: *Ulva lactuca*, compost, actinomycetes, antibacterial, antifungal, extracellular enzymes

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Geniş bir mikrobiyal çeşitliliğe sahip olan denizler; tuzluluk, sıcaklık, pH değerleri, basınç gibi farklı fiziksel ve kimyasal koşullara sahiptir. Bu durum yeni ve farklı bileşiklerin sentezini desteklemektedir (Lozupone ve Knight, 2007). Deniz mikroorganizmaları, endüstriyel olarak önemli moleküllerin aranmasında giderek daha önemli bir kaynak haline gelmektedir. Deniz organizmalarından benzersiz ve biyolojik olarak aktif metabolitler elde edildiğinden, deniz mikroorganizmalarına hem akademik hem de endüstriyel ilgi artmaktadır (Jensen ve Fenical, 1994; Imada, 2004; Zhang ve ark., 2005).

Deniz ortamı karasal ortamda bulunmayan geniş bir yelpazede farklı mikroorganizmaları içerir. Bu mikroorganizmalar arasında yer alan deniz aktinomisetleri tarafından üretilen antibiyotik ve enzimler hakkında bazı çalışmalar mevcuttur. Bu sebeple, deniz ortamı yeni biyolojik aktif bileşikler ve endüstriyel olarak önemli enzimler üretebilen aktinomisetler için potansiyel bir kaynaktır (Sharma ve Pant, 2001).

Mikroorganizmaların yaklaşık 23000 kadarının biyoaktif sekonder metabolit ürettiği, bu bileşiklerin 10000'inden fazlası aktinomiset tarafından üretildiği ve keşfedilen biyoaktif mikrobik metabolitlerin %45'ini temsil ettiği bildirilmiştir. Aktinomisetler arasında *Streptomyces* türü tarafından yaklaşık 7600 bileşik üretilmektedir (Berdy, 2005).

Aktinomisetler, vitaminler, enzimler ve antibiyotikler gibi ilaç geliştirme için kullanılabilen çok çeşitli sekonder metabolitleri üretme kabiliyeti ile karakterize edilirler. Biyoaktif sekonder metabolitlerin yaklaşık yarısı aktinomisetlerin kendileri tarafından üretilmektedir. Aktinomisetler veya enzimleri, polimer hidrolizi, kimyasal

sentez, toprak dekontaminasyonu, hastalıkların biyolojik kontrolü ve organik maddenin ayrışması gibi biyolojik, endüstriyel ve çevresel uygulamalar dizisine sahiptir (Pietra, 1997; Lam, 2006; Minotto ve ark., 2014). Aktinomisetlerin çoğu antibakteriyal, antifungal, antitümör, antiprotozal aktiviteye sahip sekonder metabolitleri üretmesi sebebiyle endüstrilerdeki büyük ölçekli tarama programlarında onları izolasyon hedefi haline getirir (Karanja ve ark., 2010).

Birçok aktinomiset türü, özellikle *Streptomyces* cinsine ait olanlar, birçok bitki patojeni fungusu inhibe eden antifungal biyokontrol maddeleri olarak bilinirler. Bitki hastalıklarının kontrolü, sürdürülebilir tarım için önemli bir ihtiyaçtır. Tarımda çevre kirliliği ve hedef olmayan organizmalar üzerinde zararlı etkileri olması gibi bazı problemleri olsa da kimyasalların kullanılması halen önemli bir yöntemdir. Aktinomisetlerin sahip olduğu tüm özellikler, fungal fitopatojenlerin biyolojik kontrol ajanı olarak özellikle *Streptomyces* cinslere ait olanlar sadece çevresel ve ekolojik faydaları hakkında daha iyi bir fikir vermekle kalmaz aynı zamanda tarımda alternatif olarak kullanılmasıyla da dikkat çekmektedir (Ara ve ark., 2012). *Streptomyces*, antibiyotikler ve enzimler gibi sayısız doğal metabolitleri üreten toprak aktinomisetlerinin başlıca sınıfıdır (Jaralla, 2014). Selülaz, amilaz, jelatinaz, lektinaz ve üreazlar gibi toprakta veya sedimanlardaki kompleks organik materyalleri parçalayıcı birçok enzim üretirler (Gulve, 2012).

Sekonder metabolitlerin birçoğu güçlü antibiyotiklerdir. *Streptomyces*, farmasötik endüstrisi tarafından birincil olarak kullanılan antibiyotik üreten organizmalar haline gelmiştir (Sharma, 2014). Bu mikroorganizmalar birçok terapötik uygulamaya sahip hemen hemen sınırsız yeni bileşik kaynaklarıdır (Gorajana, 2007). Bununla birlikte, yeni ilaçlar arayışı hala kanser tedavisinde öncelikli bir hedefdir. Çoklu kemoterapötik ilaçlara karşı direncin hızlı bir şekilde gelişmesi ve bunların istenmeyen yan etkileri, tedavi edilemeyen tümörler ile daha az yan etki karşısında aktif olan yeni antitümör ilaçlara olan talebin artmasına ve terapötik etkinliklerin artmasına neden olmuştur (Demain ve Sanchez, 2009).

Aktinomisetler ile ilgili çalışmalarda genellikle topraklar kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda sedimentler, mağaralar, kompostlar, süngerler ve likenler gibi az çalışılmış çevresel ortamlar gün geçtikçe bilim adamlarının ilgisini cezbetmektedir (Gonzales ve ark., 2005; Lam, 2006; Ashraf ve ark., 2007; Yücel, 2007; Öner, 2011).

1.1. Alglerin Genel Özellikleri ve *Ulva lactuca*

Denizlerin en önemli canlı kaynaklarından biri olan algler su ortamında primer üretici canlılar olup besin zincirinin önemli bir parçasını oluştururlar. Alglerden gıda, tarım, kozmetik, tıp, eczacılık ve endüstri alanlarında yararlanılmaktadır. Algler, özellikle yeni farmasötik ajanların geliştirilmesinde önemli rol oynayan yüksek biyolojik aktiviteli sekonder metabolitlere sahiptirler. Algler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda antimikrobiyal, sitotoksik, antimitojenik, antikanser ve antitümöral aktivitelerin varlığı ortaya konmuştur (Gümüş, 2006; Cirik, 2011).

Ulva lactuca L., halk arasında deniz marulu olarak bilinir (Şekil 1.1). Sap şeklinde kısa bir ayakla yatık veya dik olarak zemine tutunur. *Ulva* türleri geniş tuzluluk ve pH aralığında yaşayabilen alglerdendir. Kirliliğe karşı toleransları yüksektir. Gelişimlerinde mutlaka ışığa ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle genellikle yüzeyde yayılış gösterirler (Dural ve ark., 1989; Güner, 1991; Cirik, 2011). *Ulva lactuca* L. azotça zengin, nitrat ve fosfatın fazla olduğu ortamlarda daha iyi gelişme gösterir. Bu nedenle *Ulva lactuca* L., nitrofil form olarak da adlandırılmaktadır (Round, 1973).



Şekil 1.1. *Ulva lactuca* (deniz marulu)

1.2. Aktinomisetlerin Genel Özellikleri

Actinobacteria sınıfının ilk tanımlanması 1875 yılında Ferninand Cohn tarafından *Streptothrix foersteri* bakteri türünün teşhis edilmesiyle ve 1877 yılında Carl Otto Harz tarafından *Actinomyces bovis* türünün tanımlanmasıyla gerçekleşmiştir (Hassan ve Wellington, 2009). 1870'lerden 1950'lerin sonuna kadar aktinomisetlerin bakteriler ve mantarlar arasında bir form olduğuna inanılıyordu. Ancak *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus* gibi bakterilerin %50'den düşük G+C içeriğine sahip olmasına karşılık G+C içeriği çoğunlukla %70'in üzerinde bir oranla ayırt edilen aktinomisetlerin, Gr (+) bakterilerin önemli bir bölümünü oluşturduğu belirlenmiştir (Hopwood, 2006).

Aktinomiset terimi organizmaların morfojieleri dikkate alınarak aktis (ışın demeti) ve mykes (mantar) kelimelerinin birleşmesiyle oluşturulmuştur (Embley ve Stackebrandt, 1994). Aktinomisetler lifli Gr (+) bakterilerdir ve Actinobacteria şubesine ait karmaşık bir yaşam döngüsü ile karakterize edilir. Bacteria Domain'i içerisinde tanınan 18 ana soy arasından en büyük taksonomik birimlerden birini temsil etmektedir (Ventura ve ark., 2007). *Actinobacteria* sistematigi 2009 yılında Zhi ve arkadaşları tarafından kemotaksonomik, moleküler ve nümerik taksonomik metodları kullanılarak yeniden gözden geçirilmiştir. Güncel hiyerarşik sınıflandırmaya göre *Actinobacteria* sınıfı 5 alt sınıf, 9 takım, 55 familya, 240 cins ve 3000'den fazla türden oluşan *Bacteria* üstaleminin en büyük ve en önemli alemlerden biridir. Aktinobakter terimi *Actinobacteria* aleminin tamamını, aktinomiset terimi ise *Actinomycetales* ordusuna ait suşların tanımlanmasında kullanılmaktadır (Goodfellow ve ark., 2010).

Aktinobakteriler hem kara hem de su ekosistemlerinde, özellikle toprakta geniş ölçüde dağılmışlardır. Ölü bitki, hayvan ve fungal materyallerindeki polimer karışımlarını parçalayarak ısıya dayanıklı biyomalzemelerin geri dönüştürülmesinde önemli bir rol oynarlar. Aynı zamanda, kitin, keratin ve lignoselüloz gibi doğal polimerlerle ilişkili besin maddelerini geri dönüştürdükleri için toprağın biyolojik bozunumunda ve humus oluşumunda da önemlidir. Karakteristik "ıslak toprak kokusu"ndan sorumlu geosmin gibi çeşitli uçucu maddeleri üretir (Sharma, 2014).

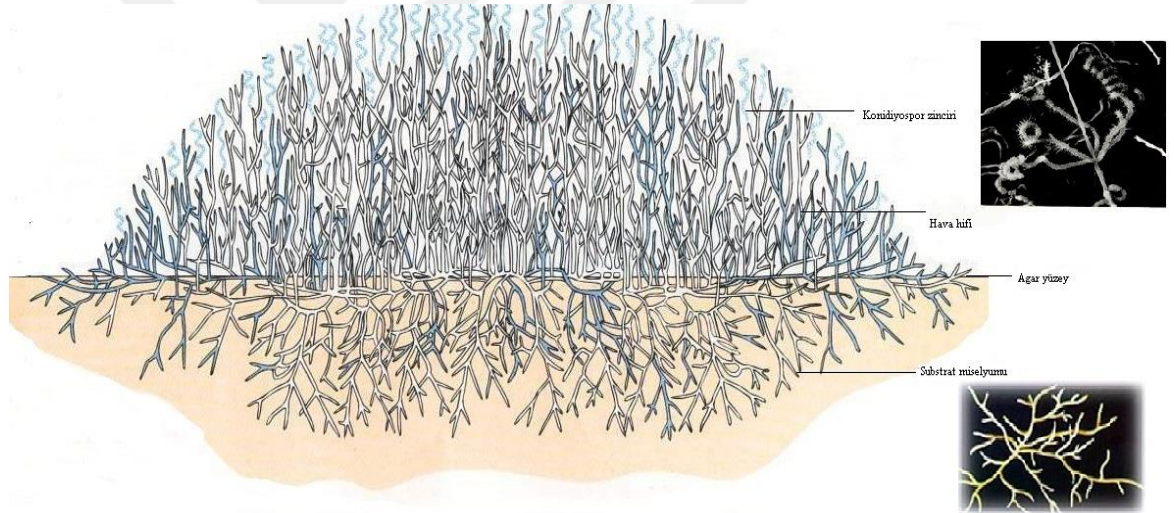
Aktinomisetler doğadaki en yaygın mikroorganizma grubu arasındadır. Bunlar, dünyanın değişik bölgelerindeki ekili ve ıslah edilmemiş topraklarda bol miktarda bulunur (Goodfellow ve Williams, 1983; Goodfellow ve Simpson, 1987). Tetrasiklin, eritromisin, vankomisin ve streptomisin gibi birçok iyi bilinen antibiyotik, aktinomisetlerin sekonder metabolizmasından kaynaklanır. Antibiyotiklerin ötesinde, bağışıklık baskılayıcı rapamisin, antikanser ajanlar doksorubisin ve bleomisin, antihelmintik avermektin ve antifungal bileşik nistatin bu grup bakteriden izole edilmiş tıbbi olarak faydalı diğer doğal ürünler arasındadır. Aktinomisetler içinde antibiyotikler ve diğer sekonder metabolitlerin en önemli kaynağı *Streptomyces* suşlarıdır. 900'ün üzerinde tür ve alttür içerdiğinden Actinobacteria sınıfının en fazla üyesi olan taksonudur. Toprakta en yaygın olan aktinomiset cinsidir. Ancak su ekosistemlerinde de bulunduğu rapor edilmiştir. Yaklaşık 18000 olarak bilinen biyoaktif bakteri bileşliğinden, aktinomiset cinsi *Streptomyces* bakterilerinden 10000'den fazlası tanımlanmıştır (Çil 2011; Weber ve ark., 2015; Niu ve ark., 2016). Aktinomisetlerin çoğu antibakteriyal, antifungal, antitümör, antiprotozal aktiviteye sahip sekonder metabolitleri üretirler ve bu onları endüstrilerdeki büyük ölçekli tarama programlarında izolasyon hedefi haline getirir (Karanja ve ark., 2010).

1.2.1. Aktinomisetlerin Morfolojik Özellikleri

Sınıflandırma birimi olan alem de aktinomisetlerin gerçek pozisyonu birçok spekülasyonun konusu olmuştur. Bu organizmalar, bakteriler, mantarlar ve özel bir grup olarak bunların birinden ya da her ikisini de türetebilen grup olarak sınıflandırılmıştır. Aktinomisetlerin morfolojisi ile ilgili edinilen bilgiler onların, bakteri formlarından bazıları ile yakından ilişkili, ancak mantar benzeri bir büyüme biçimi benimsemiş bağımsız organizmalar grubu oldukları belirtilmiştir.

Aktinomisetler, genelde dallanmış ipliklerin veya çubukların oluşumu ile karakterize olup, çoğunlukla büyümenin ilk safhalarında tek hücreli tipik bir miselyum oluştururlar. Hifler genelde septalı değildir. Ancak bazı özel koşullar altında bazı formlarda septa görülebilir (Waksman, 1939).

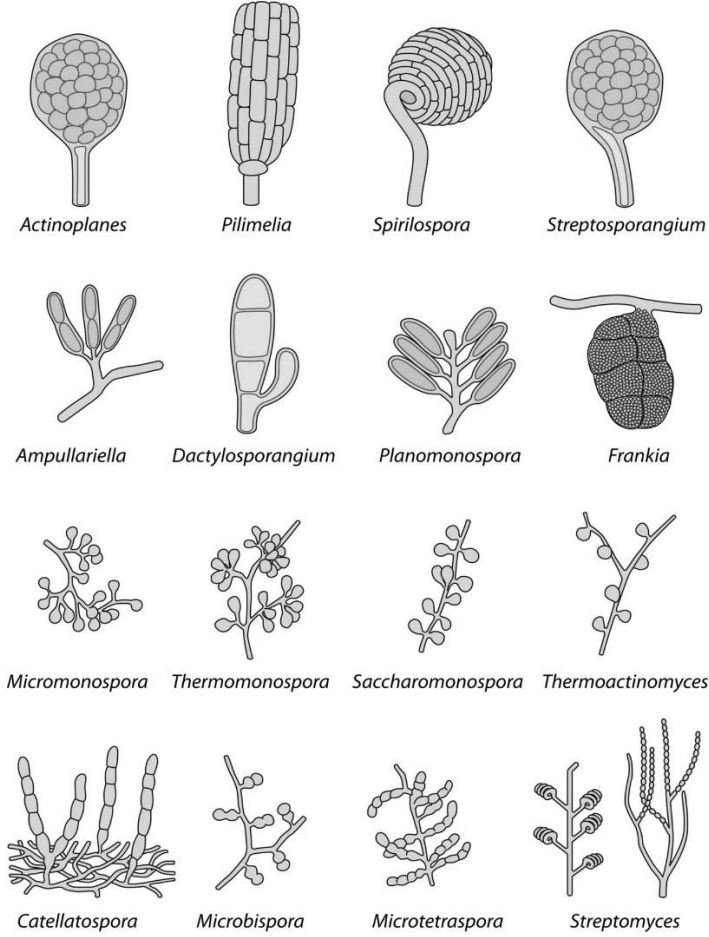
Klasik aktinomisetler iyi gelişmiş ışınsal miselyumlara sahiptir (Şekil 1.2). Morfolojik ve işlevsel farklılığına göre substrat ve hava miselyumu olarak ayrılır. Substrat miselleri beyaz, sarı, turuncu, kırmızı, yeşil, mavi, mor, kahverengi ve siyah renklerde. Bazı hifler suda çözünür veya yağda çözünen pigment üretebilir. Suda çözünür pigment kültür ortamına sızabilir ve ortam rengine eşdeğer bir renk oluşturur. Suda çözünmeyen yağda çözünebilen pigment, koloni rengi ile eşdeğer renk oluşturur. Substrat miselinin rengi ve suda çözünen pigmentlerin bulunup bulunmaması yeni türlerin belirlenmesinde bize önemli bir referans oluşturur. Hava miselyumu hifleri substrat miselyumunun belirli bir aşamaya kadar gelişip havaya uzanmasıyla oluşur. Bazen hava miselyumu ve substrat miselyumunun ayırımı yapmak zor olabilir (Li ve ark., 2016).



Şekil 1.2. Agar üzerinde büyüyen aktinomiset kolonisi (substrat miselyumu, hava miselyumu ve konidiospor zincirlerinin genel bir kesiti) (Li ve ark., 2016)

Substrat miselleri batık koloni oluştururken havasal miseller de kireçsi kolonilerin oluşumuna neden olur (Waksman, 1989). Sporlar, Actinobacteria taksonomisinde son derece önemlidir (Locci ve Sharples, 1984). Çoğu aktinomiset spor oluşturur ve sporulasyon genellikle parçalanma ya da segmentasyon oluşumu şeklinde gerçekleşir. Sporlar genelde kullanılan ortam üzerinde pudramsı şekilde görülürler. Koloni morfolojileri ise değişkenlik gösterir. Koloniler pembeden yeşile, beyazdan siyaha farklı renklerde olabilir. Kullanılan ortama ve inkübasyon süresine göre de

koloni renkleri değişmektedir (Waksman, 1989). Aktinomisetler içerisinde yer alan bazı cinsler spor oluştururken bazıları oluşturmazlar (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Aktinomisetlerin farklı spor zincirlerinin şematik çizimleri (Barka ve ark., 2016)

Bu sporlar sıcaklığa ve kuraklığa karşı dayanıklıdır. Diğer bakteriyel endosporlar gibi bir organizasyona sahip değildir (Goodfellow ve Williams, 1983). Sporlar, substratta veya havadaki miselyumda tek hücreler halinde veya farklı uzunluklarda zincirler halinde oluşturulabilir. *Micromonospora*, *Micropolyspora* ve *Thermoactinomycete* cinslerinde, spor oluşumu substrat miselyumda doğrudan ortaya çıkar. *Streptomyces* sporları ise havadaki miselyumdan büyür. *Actinoplanes* ve *Actinosynnema* grupları hareketli sporlar ile karakterize edilirken *Thermoactinomyces* benzersiz ısıya dirençli endosporlara sahiptir (Cross ve Goodfellow, 1973). Sporların pürüzsüz, siğilli, tüylü

çatallı, buruşuk yüzeylere sahip olabilmeleri kendi spor türlerinin karakterizasyonu için kullanılabilir (Dietz ve Mathews, 1971).

1.2.2. Aktinomisetlerin Fizyolojik Özellikleri

Aktinomisetler yavaş büyüme eğiliminde olan iplikli bakterilerdir. İnkübasyon süreleri 4-5 gündür ve kolonileri katıdır. Sıvı kültürde büyümeleri diğer bakteri gruplarından farklılık gösterir. Besiyerinde bulanıklık oluşturmazlar ve dipte yada yüzeyde kümeler halinde büyürler (Waksman, 1989). Aktinobakterilerin birçoğu nötr pH'lı topraklarda büyümektedir. En iyi büyüdüğü pH aralığı 6-9 arasındadır ve maksimum nötr pH'ta büyürler. Bununla birlikte, asidik topraklardan da (pH 3.5) birkaç *Streptomyces* suşu da izole edilmiştir (Kim ve ark., 2003). Kültüre edilmiş aktinomisetlerin çoğu mezofil olmakla birlikte 10°C ile 37°C arasında büyüme gösterirler. Çoğu aktinomiset termotoleranttır. Ancak, optimal büyümeleri 27°C'den yüksek olan aktinomiset türlerine de rastlanmaktadır (Williams ve ark., 1983). Yüksek sıcaklıklarda (50-65°C) büyüeyebilen aktinomisetler termofilik olarak adlandırılır (Korn-Wenish ve Kutzner, 1992).

1.2.3. Aktinomisetlerin Ekolojik Özellikleri

Aktinobakterilerin çoğu (özellikle Streptomyces), yaşam döngülerini besin açısından sınırlı koşullar altında, yarı uyku sporları olarak geçiren saprofitik toprak organizmalardır (Mayfield ve ark., 1972). Bununla birlikte, aktinomisetler topraklar, denizler, kaplıcalar (Barabote ve ark. 2009), gama ışınlarının bulunduğu yüzeylerde (Phililips ve ark., 2002), aynı zamanda insan, hayvan ve bitki patojenleri gibi çok geniş habitatlarda dağılım göstermektedirler. Topraklarda diğer ortamlardan daha fazla bulunurlar. Özellikle alkali toprak ve organik madde bakımından zengin topraklarda, mikrobiyal popülasyonun önemli bir parçasını oluştururlar. Aktinomisetler hem toprağın yüzeyinde hem de 2 m'den daha aşağıdaki derinliklerde bulunabilirler (Goodfellow ve Williams, 1983; Castillo ve ark., 2002; Tokala ve ark., 2002).

İklimin aktinobakterilerin dağılımı üzerindeki etkisine ilişkin ilk çalışma Hiltner ve Strömer tarafından yapılmıştır. Yapılan çalışmada, bu bakterilerin ilkbaharda toprağın mikrobik florasının %20'sini oluşturduğunu, fazla miktardaki ürün artıklarından dolayı sonbaharda %30'dan fazlasını oluşturduğunu, kış boyunca don etkisiyle %13'e düştüğünü göstermişlerdir (Hiltner ve Störmer, 1903).

Kompost yığınları ve buna benzer çevreler, çok çeşitli ve yoğun aktinomiset populasyonları içerirler. Kompostlama, karışık mikrobiyal populasyonların hızlı değişimleri ile yürütülen dinamik bir işlemdir. Kompostlamada rol alan mikroorganizmaların temel gruplarını aktinomisetleri de içine alan Bacteria ve Fungi alemi oluşturur (Golueke, 1991).

Kompostlamanın erken safhalarında aktinomisetler öncül-dominant mezofilik türler olarak bulunurlar ve yığın içerisindeki organik maddelerin (genellikle hayvan dışkı ve saman gibi lignoselülozik materyal) dekompozisyonunun devam etmesiyle kendiliğinden ısınma meydana gelir. Sıcaklık attıkça ortam koşulları mezofilikten termofilik populasyonlar için uygun hal almaya başlar. Sıcaklık 60°C'i aştığında mikrobiyal aktivite düşer, ancak kompost soğuduktan sonra diğer bakteri grupları ile beraber aktinomisetler yeniden dominant duruma geçerler (McKinley ve Vestal, 1985; Strom, 1985). Nem ve amonifikasyon nedeniyle nötralden alkaliye doğru değişen çevre aktinomisetlerin büyümesini sağlar. Kontrollü kompost yığınlarının düzenli olarak karıştırılması büyüme için oldukça önemlidir. Aynı zamanda kompostlama işlemini inhibe edebilecek anaerobik yani asidik mikro çevrelerin oluşumunu önler. Bu sayede aerobik bir çevrenin oluşması garantilenir (McCarthy ve Williams, 1990). Bu çevre aktinomisetlerin yoğun ve hızlı bir şekilde üremeleri için ideal bir ortamdır. Aktinomisetler öyle çok ürerler ki kompost yığınlarının yüzeyinde 'yanma' olarak da bilinen ve çıplak gözle görülebilen durum oluşur. Az miktarlarda *Saccharopolyspora* ve *Pseudonocardia* üyeleri bulunsa da, olgunlaşmış kompost yığınlarında bulunan aktinomisetlerin geneli *Streptomyces* ve *Thermomonospora*'nın termofilik suşlarıdır (Williams, 1983).

1.2.4. Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Özellikleri

Alexander Fleming'in keşfinden günümüze kadar yapılan antibiyotik araştırması, büyüleyici, heyecan verici, sürekli değişen ve gelişen bir serüvene dönüşmüştür. Tüm mikrobiyal biyoaktif sekonder metabolitlerin yaklaşık %45'inin kaynağı aktinomisetlerdir. Bu metabolitlerin (7600 bileşik) %80'i *Streptomyces* üyeleri tarafından üretilmektedir. Antibiyotik çağının başlangıcında, mantar (penisilin, griseofulvin) ve bakteri (gramicidin) türleri ilgi odağıydı. Ancak streptomisin ve daha sonra kloramfenikolün, tetrasiklinler ve makrolidlerin keşfi dikkati *Streptomyces* türlerine yöneltmiştir.

Yapılan çalışmalarda 43000'den fazla biyoaktif doğal ürün olduğu bilinmektedir. Bu sayı, antimikrobiyal, antitümör, antiviral ve diğer biyoaktif mikrobiyal metabolitler ile deniz canlıları ürünlerini içerir. Yosunlar, likenler ve çoğunlukla vasküler bitkiler gibi bitkiler aleminin yüksek türlerinden 13000'den fazla antimikrobiyal antitümör/antiviral biyoaktif mikroorganizma bileşikleri izole edilmiştir. Berdy'nin 2005 yılında yaptığı çalışmaya göre, tamamı 22500 olan antibiyotik ve benzeri biyoaktif mikrobiyal bileşiklerden, yüzde birinden azı yaklaşık 150 bileşik tıp, veterinerlik ve tarımda doğrudan kullanılmaktadır (Tablo 1.1) (Berdy, 2005).

Tablo 1.1. Biyoaktif mikrobiyal doğal ürünlerin sayıları (Berdy, 2005)

Kaynak	Antibiyotik Sayısı	Diğer Biyoaktif Metabolitlerin Sayısı	Klinikte Kullanım Sayısı
Bakteri	2900	900	10-12
Aktinomiset	8700	1400	100-120
Fungi	4900	3700	30-35
Toplam	16500	6000	140-160

1.2.4.1. Aktinomisetlerin Antibakteriyel Özellikleri

Bilindiği gibi birçok aktinomiset antibiyotik üretir. Bu antibiyotiklerden bazıları da bakteriyel ribozomları hedef alır ve solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Örneğin, Legionnaires' (Lejyoner hastalığı) tedavisinde tetrasiklin ve

eritromisin kullanılır. Vankomisin antibiyotigi, bakteri hücre duvarları ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* gibi ölümcül organizmalara karşı kullanılır. Rifamisinler lepra ve tüberküloz tedavisinde kullanılırlar ve bunlar bakteriyel RNA polimerazı hedef alır. Öte yandan, aktinomiset metabolitlerinden adriamisin, kanser tedavisinde kullanıldığı için DNA replikasyonunu önler (Sharma, 2014). Aynı zamanda bu antibiyotikler birçok pigment içerir (Miyaura ve Tatsumi, 1960). Bu renkler; kıyafetler, tablolar, kozmetik ürünler, ilaçlar ve plastikler gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır ve gıda renklendiricilerinde de önemli bir rol oynamaktadır. Pigmentlerin, biyoplastik ve biyopolimerlerde olduğu gibi nanoteknoloji endüstrisinde de rolü vardır (Nakato, 2006).

1.2.4.2. Aktinomisetlerin Antifungal Özellikleri

Fungal fitopatojenler, bitki yetiştiriciliğinde ekonomik açıdan dünya çapında ciddi sorunlara neden olmaktadır. *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus* bitkilerde yanıklık, kök çürüklüğü ve meyve çürüğü gibi hastalıklardan sorumludur. Kimyasal fungusidler tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, tarımda kimyasal fungusitlerin aşırı kullanımı, insan sağlığının bozulmasına, çevresel kirliliğin ve mantar ilacına karşı patojen direncinin gelişmesine neden olmuştur. Bu nedenle mikrobiyal antagonistler fungal bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadır (Goodfellow ve Williams, 1983; Goodfellow ve Simpson, 1987).

Aktinomisetlerin birçok türü özellikle *Streptomyces* cinsi bilinen en iyi antifungal biyolojik kontrol ajanıdır ve bazı bitki patojeni fungusu inhibe eder (Xiao ve ark., 2002; Joo, 2005; Errakhi ve ark., 2007).

Streptomyces cinsi türleri, antibiyotik üretimi ve fungal hücre duvarlarının lizisi gibi çok çeşitli etkiler göstererek karakterize edilen Actinobacteria filumuna aittir. Tek başına ya da diğer biyolojik kontrol ajanları ile kombinasyon halinde etkili biyokontrol ajanları olduğu kanıtlanmıştır. *S. lydicus*, *S. lividans*, *S. olivaceoviridis*, *S. scabies*, *S. plicatus*, *S. hydroscopicus*, *S. violaceusniger*, *S. humidus*, *S. avermitilis*,

S. aureofaciens ve *S. roseoflavus* gibi çeşitli *Streptomyces* türleri çeşitli fungal patojenlere karşı etkili olan önemli bileşiklerin tanınmış üreticileridir (Taechowisan ve ark., 2009).

1.2.5. Aktinomisetlerin Enzim İçerikleri ve Özellikleri

Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler, çok sayıda reaksiyon için potansiyel biyokatalizörler olarak düşünülür. Mikrobiyal kaynaktan türetilmiş enzimler genellikle güvenli olarak kabul edilir ve geniş sıcaklık, pH, tuzluluk veya diğer zor koşullarda işlev gösterirler. Aktinomisetler mikroorganizmaların en çeşitli gruplarından biridir ve metabolik yönden iyi karakterize edilmişlerdir. Organik maddenin ayrışmasında hayati bir rol oynamaktadır. Topraktaki kompleks organik maddeleri veya tortuları parçalayan proteaz, selüloz, amilaz, jelatinaz, lektinaz ve üreazlar gibi çeşitli enzimler üretirler. Örneğin, selüloz, kitin ve pektin karbon döngüsünde önemli bir rol oynarlar ve toprak yapısının korunmasına yardımcı olurlar (Gulve ve Desmukh, 2012; Priyadharsini ve Dhanasekaran, 2015; Kim, 2016).

1980'lerin sonundan itibaren, karasal mikroorganizmalardan izole edilen yeni bileşikler hakkındaki raporlar azalmış ve araştırmacılar su ortamındaki yeteneği keşfetmişlerdir (Ramesh ve Mathivanan, 2009). Ward ve Bora (2006), sudaki aktinomisetlerin yeni sekonder metabolitleri keşfetmek için önemli bir kaynak olarak tanıtmışlardır. Farklı çalışmalar aktinomisetlerin sekonder metabolit üretme yeteneğine sahip selüloz, amilaz, kitinaz, jelatinaz, kasejinaz ve lipaz gibi endüstriyel enzimler ve özellikle antibakteriyel bileşikler (antibiyotikler) de dahil en büyük grup olduğunu göstermiştir (Bredholt ve ark., 2008).

Aktinomisetler, organik materyallerin iyi ayrıştırıcılarıdır ve bazı aktinomiset suşları tarafından amilaz üretimi bildirilmiştir (Kar ve Ray, 2008). Kağıt ve kağıt hamuru, tekstil, çamaşır, biyoyakıt üretimi, gıda ve yem sanayi, bira ve tarım gibi geniş sanayi alanlarında uygulanabilirliği nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Kuhad ve ark., 2011). *Streptomyces*'ler, çoklu organların habis tümörlerinin tedavisinde kullanılan L-asparaginazlar üretme kabiliyetine de sahiptirler (Kumar ve Selvam, 2011).

1.2.5.1. Proteazlar

Birçok çalışmada *Streptomyces*, *Nocardia* ve *Nocardiopsis* gibi Actinomycetes üyelerinin proteaz ürettiği bildirilmiştir (Wietzorrek ve Bibb, 1997). Proteazlar yüksek pH, sıcaklık ve tuzluluk gibi çeşitli stres ortamlarına karşı tolerans gösterebilen enzimlerdir (Rathan ve Ambili, 2011). Proteazlar ticari ve endüstriyel amaçlı üretilen en önemli enzim gruplarından biridir (Deng ve ark., 2010). Doğada oldukça yaygın olarak bulunurlar. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara imkan sunması nedeniyle en önemli proteaz kaynaklarıdır. Mikroorganizma kaynaklı proteazlar biyoteknolojik yöntemlerle elde edilmesi ile bitkisel ve hayvansal proteazlara göre daha fazla tercih edilmektedir (Deshpande ve ark., 1998). Deterjanlar, yiyecekler, ilaçlar ve deri de dahil olmak üzere bir dizi endüstriyel ürün ve prosedürde kapsamlı uygulamaları vardır (Ribitscha ve ark., 2010). Son yıllarda deterjan proteazları ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

1.2.6. Aktinomisetlerin Moleküler Özellikleri

Moleküler sistematik, mikroorganizmalardaki nükleotitler arasındaki farklılıkları, sınıflandırma ve filogeni arasındaki ilişkiyi açıklamada önemli bir yere sahiptir. Milyonlarca yıl önce ortak bir atadan meydana gelen mikroorganizmalar ile farklı genomlara sahip mikroorganizmalar arasındaki ilişkinin belirlenmesi mikrobiyal sistematiğe tarihi bir dönüm noktası olmuştur. Prokaryotlardaki nükleik asitlerin korunmuş bölgelerinin ökaryotlardakinden daha fazla olduğu bilinmektedir (Koçak, 2012). Fenotipik yöntemler, bakterilerin filogenetik akrabalıklarının ortaya çıkarılmasında yetersiz kaldığından moleküler tekniklere gereksinim duyulmuştur. Canlıların genetik yapısının çözülmesi, genlerin yerlerinin, işlevlerinin ve birbirleriyle ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalarla kullanılan yöntemlerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) önemli bir yere sahiptir.

Ad-Hoc komitesi tarafından 2002 yılında prokaryotik türlerin tanımlanmasıyla ilgili bir standard oluşturulmuştur. Komitede alınan kararlara göre prokaryotik tür tanımlanırken % 70 ve üzeri DNA:DNA hibridizasyonu, % 97'nin üzerinde 16S

rRNA gen dizisi benzerliği ve belirli bir düzeyde fenotipik tutarlılığın temel alınması gerekmektedir (Stackebrandt ve ark., 2002; Coenye ve ark., 2005).

Williams ve arkadaşları (1983) tarafından *Streptomyces*'lerin tanımlanmalarında, substrat miselyumun fragmentasyonu, spor zincirlerinin oluşumu, havasal miselin oluşum tipi, spor yüzey süs tipleri ve spor morfolojisi, pigmentasyon, fizyolojik özellikler, antibiyozis, bazı antibiyotiklere dirençlilik gibi 41 karaktere dayalı tanı matrisleri oluşturulmuştur. Bu matris skalasına %80 benzerlik gösterenler bir gruba dahil olmaktadır. Ayrıca faj duyarlılık, serolojik testler ve hücrel yağ asitlerinin belirlenmesi de *Streptomyces* izolatlarının tanımlanmalarında kullanılmaktadır (Anderson ve Wellington, 2001).

Denizel ortamlar geniş bir mikrobiyal çeşitliliğe sahiptir ve aktinomisetler için de önemli bir yaşam alanı oluşturur. Aktinomisetler endüstriyel enzimlerin ve sekonder bileşiklerin önemli üreticilerindedir. Farklı kaynaklardan izole edilen ve denizel aktinomisetlerin varlığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında alg kompostundan aktinomiset izolasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, farklı bir kaynak olarak değerlendirilen ve yeni sekonder bileşiklerin keşfi amacıyla Giresun sahillerinden toplanan bir deniz algi olan *Ulva lactuca* (deniz marulu)'dan elde edilen komposttan aktinomisetler izole edilmiştir. Bu amaçla izole edilen izolatların enzim içerikleri, antifungal ve antibakteriyal aktiviteleri ile birlikte seçilen bazı izolatların morfolojik, fizyolojik ve moleküler tanımlanmalarına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yapılan bazı çalışmalarda aktinomisetlerin antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Örneğin, Devadass ve arkadaşları (2016), toprak örneklerinden izole ettiği *Streptomyces* sp. ve *Streptomyces rochei*'nin *E. faecalis* ve *C. Albicans*'a karşı çok yüksek inhibitör aktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, izolatlardan beş tanesinin kloramfenikol, klindamisin, eritromisin ve vankomisine karşı duyarlı olduğu görülmüştür.

Manisa ili ve çevresinden toplanan tarımsal toprak numunelerinden toplam 50 farklı aktinomiset suşu elde edilmiştir. Daha sonra bu suşlar, dört fitopatogenik ve altı patojenik bakteri (*Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas viridiflova*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Esherichia coli* ATCC 29998 ve *Sarcina lutea* ATCC 9341) karşısında antibakteriyel aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Tüm izolatların %34'ünün test organizmalarından en az birine karşı aktif olduğu gözlenmiştir. Bu izolatların % 34'ünün (17) antibiyotik ürettiğini ve bu izolatların % 16 (8)'sının sadece Gr (+) bakterilere karşı, % 6 (3)'sının sadece Gr (-) bakterilere karşı ve % 12 (6)'sinin hem Gr (-) hem de Gr (+) bakterilerine karşı antibakteriyel maddeler ürettiği gösterilmiştir (Oskay ve ark., 2004).

Zaitlin ve arkadaşları (2004), *Streptomyces halstedii* ve *Streptomyces rochei*'nin birçok fitopatogenik mantarlara karşı antagonistik etkinliğini göstermiştir.

Kathiresan ve arkadaşları (2005), Hindistan'ın çeşitli Mangrove çevrelerinden 160 aktinomiset izole etmişler ve onların bitki patojeni funguslara karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Yerli bir Yunan izolatu olan *Streptomyces rochei* ACTA1551, *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*'ye (domateste solgunluk hastalığı) karşı potansiyel bir biyolojik kontrol ajanı olarak çalışılmıştır. *Streptomyces* cinsinin fenotipik özelliklerine göre toplam 528 *Streptomyces* izole edilmiştir. Bunlardan inhibitör özelliklere sahip izolatlar seçilmiş ve analiz edilmiştir. Antagonistik izolatların toplam yüzdesi %7 (39 izolat) olarak bulunmuştur (Kanini ve ark., 2013).

Gulve ve Deshmukh (2012), Maharashtra Konkan sahilinden deniz kıyısı tortusu ve deniz suyunun yakınında izole edilen 107 deniz aktinomisetin antibakteriyel aktivitesini incelemiştir. 107 aktinomiset arasından 8 aktinomiset izolatu *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*'e karşı antagonistik etki göstermiştir.

Bredholt ve arkadaşları (2008), Trondheim Fiyord'undaki tortulardan elde ettikleri aktinomisetlerin antimikrobiyal potansiyeli üzerinde çalışmışlardır.

Ramesh ve Mathivanan (2009) yaptıkları çalışmada, Bengal Körfezi'nin, lipaz, amilaz, selülaz, kaseinaz ve jelatinaz gibi endüstriyel enzim üretme yeteneğine sahip su aktinomisetlerinin potansiyel kaynağı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonrasında Ramesh ve arkadaşları (2009) özellikle, 208 izolat arasında *Streptomyces fungicidicus* MML1614 olarak tanımlanan bir suştan termostabil alkalın proteaz üretebilmiştir.

Ege Denizi'ndeki farklı istasyonlardan toplanan 19 süngerden 36 adet aktinomiset izole edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal aktiviteleri *L. garvieae* karşı taranmıştır. 10 tane izolatu *L. garvieae* patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir (Altınok ve ark., 2015).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Ulva lactuca* Kompostu

Alem: Chlorophyta

Sınıf: Ulvophyceae

Takım: Ulvales

Familya: Ulvaceae

Genus: *Ulva*

Species: *Ulva lactuca* L.

Bu çalışmada, FEN-BAP-A-200515-82 nolu projede Doğu Karadeniz Bölgesinin Giresun kıyılarından toplanan *Ulva lactuca* (deniz marulu) alginden hazırlanan kompost kullanılmıştır.

3.1.2. Antimikrobiyal Çalışmalarda Kullanılan Organizmalar

Kompost örneklerinden izole edilen aktinomisetlerin antibakteriyal özelliklerini araştırmak için Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen patojen bakteriler ile antifungal özelliklerini araştırmak için Sayın Prof. Dr. Berna TUNALI (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'dan temin edilen bitki patojeni fungusları kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan organizmalar

Patojen Bakteriler	Bitki Patojeni Funguslar
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	<i>Fusarium culmorum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	<i>Fusarium graminearum</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	<i>Fusarium subglutinans</i>
<i>Klepsiella pneumonia</i> ATCC13883	<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC911	

3.1.3. Kullanılan Besiyeriler

Besiyeri 1 : Potasyum Dikromat Besiyeri

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri aktinomiset izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır (Tan ve ark., 2009).

Potasyum Dikromatlı Besiyeri İçeriği;

KNO ₃	1,0 gr
K ₂ HPO ₄	0,5 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 gr
Glukoz	10 gr
Potasyum dikromat	25 mg
Saf su	1000 ml

Besiyeri 2: Nişasta Kazein Agar Besiyeri (SCA)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri

aktinomiset izolasyonunda, antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Jeffrey, 2008). Bu besiyeri agar ve broth olarak hazırlanmıştır.

Nişasta-Kazein Besiyeri içeriği;

Çözünür nişasta	10,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Besiyeri 3: Mueller Hinton Agar Besiyeri (MHA)

Ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış 34 gr MHA 1 L saf suda çözününceye kadar karıştırılıp ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında test bakterileri için kullanılmıştır.

Besiyeri 4: Patato Dekstroz Agar (PDA) Besiyeri

Ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış 39 gr PDA 1 L saf suda çözününceye kadar karıştırılıp ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu besiyeri antifungal çalışmalar için kullanılmıştır.

Enzim çalışmaları için aşağıdaki besiyeriler kullanılmıştır. Nişasta-kazein besiyerinde nişasta yerine ilgili enzim için ilgili substrat kullanılmıştır.

Besiyeri 5: Nişasta Besiyeri

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Amilaz aktivitesi için İyot solüsyonu (I2=1gr, KI=2gr/300ml) damlatılarak bakteri etrafındaki zonlar değerlendirilmiştir (Coşkun, 2010).

Çözünür nişasta	10,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Besiyeri 6: Lipolitik Besiyeriler

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Tween 20, 80 ve tributirin (10 ml) her birinden bir tanesini kullanılmak üzere üç besiyeri hazırlanır.

Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Besiyeri 7: Kitin Besiyeri

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Kitinaz aktivitesi için inkübasyon sonrası bakteri etrafındaki şeffaf zonlar değerlendirilmiştir.

Kolloidal kitin hazırlanması: Roberts ve Selitrennikof (1988)'e göre modifiye edilerek hazırlanmıştır. Buna göre 5 gr toz kitin, 60 ml konsantre HCl'e yavaş yavaş ilave edilmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra +4°C'de bir gece yüksek devirde çalkalayıcıya bırakılmıştır. Karışım 2000 ml soğuk %95'lik etanole ilave edilmiş ve 48 saat -20°C'de bekletilmiştir. Oluşan çökelti 5000 g'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Steril distile su ile kolloidal kitin nötral (pH=7,0) oluncaya kadar yıkama işlemi yapılmıştır.

Kolloidal kitin	1,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Besiyeri 8: CMC Besiyeri

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Selülaz aktivitesi için inkübasyon sonrası petri %0,1 w/v Kongo kırmızısı boyası ile kaplanmış ve 15 dakika bekletildikten sonra boya uzaklaştırılmıştır. Daha sonra plağın üzerine 1M NaCl solüsyonu ilave edilmiştir ve 15 dakika daha bekletildikten sonra bakteri etrafındaki zonlar değerlendirilmiştir (Coşkun, 2010).

CMC (Karboksimetilselüloz)	10,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Besiyeri 9: Pektin Besiyeri

Aşağıda belirtilen ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Pektinaz aktivitesi için %0,1'lik CTAB (Setiltrimetilamonyum bromür) damlatılarak bakteri etrafındaki zonlar değerlendirilmiştir (Altan, 2004).

Pektin (elmadan yapılmış pektin)	5,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Proteaz Aktivitesi İçin Hazırlanan Besiyeriler:

Aşağıdaki besiyerileri kullanılmıştır.

Besiyeri 10:

Jelatin	15,0 gr
Kazein hidrolaz	0,3 gr
KNO ₃	2,0 gr
NaCl	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	2,0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 gr
Agar	18,0 gr
Saf su	1000 ml

Bu besiyeri proteaz üretmek ve kalitatif çalışmalar için kullanılmıştır. Ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Proteaz aktivitesi için bakteriye civa klorür solüsyonu (HgCl₃ 15 gr, HCl 20 ml, H₂O 80 ml) damlatılarak bakteri etrafındaki zon oluşumu değerlendirilmiştir (Ali, 1992).

Besiyeri 11:

Pepton	10 gr
Glukoz	10 gr
K ₂ HPO ₄	0,5 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 gr
NaCl	0,5 gr
CaCl ₂	0,5 gr
Saf su	1000 ml

Bu besiyeri proteaz üretmek için kullanılmıştır.

Besiyeri 12:

Glukoz	7,5 gr
Pepton	5 gr
KH ₂ PO ₄	5 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 gr
Saf su	1000 ml

Bu besiyeri proteaz üretmek için kullanılmıştır.

Besiyeri 13: Nütrient Broth Besiyeri

Ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış 8 gr NB 1 L saf suda çözününceye kadar karıştırılıp ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir Bu besiyeri test bakterilerinin büyümesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 14: Yumuşak Agar Besiyeri

Ortam içeriği pH 7,5 olacak şekilde ayarlanmış 8 gr NB ve 7 gr agar 1 L saf suda çözününceye kadar karıştırılıp ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir Bu besiyeri aktinomiset izolatlarının test bakterilerine karşı aktivite deneylerinde kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Aktinomiset İzolasyonu

Ulva lactuca kompost örnekleri kompost makinasının 2 bölmesinden alındı. Bölmelerin her birinin 3 farklı kısmından 10 gr kadar kompost örneği toplam 6 steril plastik tüp içerisine alınarak laboratuvara getirilen örnekler +4°C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

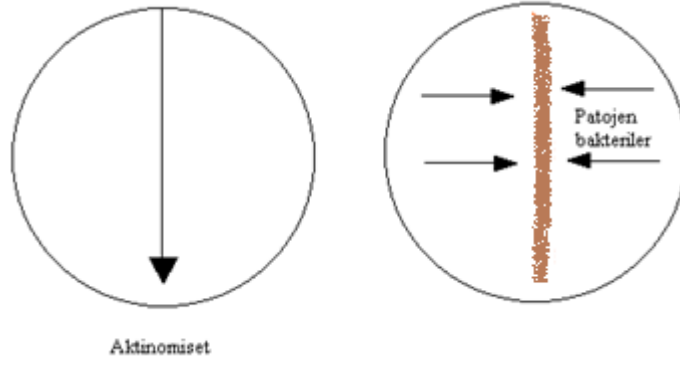
Ulva lactuca kompostundan alınan örneklerden ilk olarak 1 gr tartılarak 9 ml steril saf su ilave edilip çözünmesi için vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilen karışımın üzerindeki sıvıdan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml steril saf su bulunan steril cam tüplerde seri dilüsyonlar yapıldı. Hazırlanan seri dilüsyonlardan 10^{-3} , 10^{-6} ve 10^{-8} seyreltiklerinden aktinomiset izolasyonu için potasyum dikromatlı ve potasyum dikromatsız besiyeriyelere 100 µl yayma ekim yapıldı. Ekimler 30°C’de 14-21 gün arasında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası aktinomisetlerden farklı koloni morfolojilerine sahip olanlar seçildi. Seçilen izolatların nişasta- kazein agar (SCA) besiyerine ekimi yapıldı ve 30°C’de 3-4 gün inkübe edilerek saf kültürler elde edildi. Daha sonra saf kültürler +4°C’ye konuldu. Ayrıca %20 gliserol içinde -80 stokları yapıldı.

3.2.2. İzole Edilen Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması

Aktinomisetlerin antibakteriyel özelliklerini araştırmak amacıyla karşıt-çizgi (cross-streak) yöntemi kullanıldı (Rahman ve ark., 2011). Antifungal özelliklerini belirlemek için primer taramada ikili kültür tekniği sekonder taramada agar kuyu difüzyon yöntemi uygulandı.

3.2.2.1. Antibakteriyel Çalışmalar

Ulva lactuca kompostuna ait aktinomisetlerin antibakteriyel özelliklerini araştırmak amacıyla karşıt-çizgi yöntemi kullanıldı (Şekil 3.1). Antibakteriyel çalışmalar için hazırlanan mueller hinton agar (MHA) besiyerinin merkezine çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra 3-7 gün 30°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası büyüyen aktinomisetlere dik olacak şekilde patojen bakterilerin ekimi yapıldı ve 30°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar patojen bakterilerin etrafındaki açık zona bakılarak değerlendirildi.

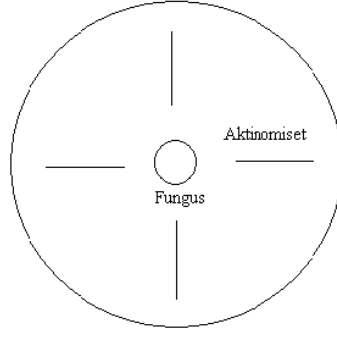


Şekil 3.1. Karşıt çizgi yöntemi

Yüksek aktivite gösteren izolatların patojen bakterilerine karşı farklı inkübasyon süreleri denendi. Deney için hazırlanan MHA besiyerlerinin merkezine izolatlar kürdanla nokta ekim yapılarak 3. günden 7. güne kadar büyütüldü. İnkübasyon süresi sonunda bir gece inkübe edilmiş patojen bakteriler yumuşak agar ile karıştırılarak büyütülen izolat üzerine döküldü.

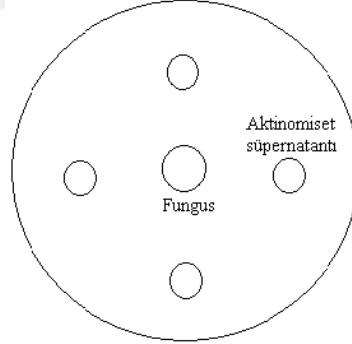
3.2.2.2. Antifungal Çalışmalar

Ulva lactuca kompostuna ait aktinomisetlerin antifungal özelliklerini araştırmak amacıyla iki basamaktan oluşan tarama deneyleri oluşturuldu. Primer taramada ikili kültür tekniği (Paul ve ark., 2007), sekonder taramada ise agar kuyu difüzyon (Perez ve ark., 1990) yöntemi kullanıldı. Antifungal çalışmalar için hazırlanan nişasta-kazein agar (SCA) besiyerinin merkezine yaklaşık 6 mm çapında delik açılarak 2-4 gün büyütülen bitki patojeni funguslarından deliklere inokülasyon yapıldı. Yaklaşık 2-3 gün inkübasyon sonrası aktinomiset izolatları çizgi ekim olarak ekildi (Şekil 3.2). İzolatlar 3-5 gün kadar 30°C'de inkübasyona bırakılarak ikili kültür tekniği uygulandı.



Şekil 3.2. İkili kültür tekniği

Agar kuyu difüzyon yönteminde ise 6 gün nişasta-kazein broth (SCB) besiyerinde büyütülen aktinomisetler 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar SCA, MHA ve PDA besiyerlerinin içerisine açılan kuyulara 100 µl konularak +4°C' de 1 gece boyunca difüz etmesi için bırakıldı. Aktinomisetler difüz olduktan sonra bitki patojeni funguslar besiyerlerinin merkezine kuyu açılarak ekildi (Şekil 3.3) ve 3-7 gün 30°C'de inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar bitki patojeni fungusların etrafındaki zona bakılarak değerlendirildi.



Şekil 3.3. Agar kuyu difüzyon yöntemi

3.2.3. İzole Edilen Aktinomisetlerin Enzim İçeriklerinin Araştırılması

Ulva lactuca kompostundan izole edilen aktinomisetlerin lipaz/esteraz, amilaz, kitinaz, proteaz, selülaz ve pektinaz enzimi üretip üretmedikleri incelendi. Aktinomisetlerin enzim içerikleri; aktinomiset büyümesinde kullanılan SCA

besiyerindeki nişasta yerine substratlar ilave edilerek hazırlanan besiyerilerinde kalitatif olarak araştırıldı. Ekim yapıldıktan sonra yaklaşık 3-7 gün inkübe edildi.

Yapılan çalışmalar sonucunda en fazla çalışılan enzim proteaz olduğu için bazı izolatlar seçilerek proteaz aktivitesi üzerine çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalardan ilki için hazırlanan jelatin besiyeri kullanıldı. Seçilen izolatlar farklı besiyerilerinde (11, 12 ve 13 No'lu besiyeriler) 3 gün 30°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 6000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. Süpernatantlardan 20 µl alınarak jelatin besiyerilerine bırakıldı ve 30°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası HgCl₂ damlatılarak aktiviteleri belirlendi. Kan lekelerinin giderilmesi üzerine yapılan ikinci çalışma Ramesh ve arkadaşlarına (2009) göre modifiye edilerek yapıldı. Bu çalışmada 3 cm'lik kare şeklinde kesilen beyaz renkli kumaşlar üzerine kan damlatılarak oluşturuldu. Lekelerin kurumması için 30°C'de 1 saat bekletildi. İnkübasyon sonrası aşağıdaki deney düzeneği oluşturuldu.

1. Kan lekeli kumaş + 10 ml dH₂O
2. Kan lekeli kumaş + 10 ml dH₂O + 100 µl deterjan
3. Kan lekeli kumaş + 10 ml dH₂O + 100 µl deterjan + 1000 µl ham enzim
4. Kan lekeli kumaş + 10 ml dH₂O + 1000 µl ham enzim

Deney düzeneği düşük devirli sallayıcıda 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 2 dk. saf suda yıkama işlemi gerçekleştirilerek kumaşlar kurumaya bırakıldı.

3.2.4. Aktinomisetlerin Tanımlanması

Antimikrobiyal ve enzim aktivitesi yüksek olan bazı izolatlar seçilerek morfolojik, fizyolojik ve moleküler tanımlanması yapıldı.

3.2.4.1. Morfolojik Tanımlama

Seçilen izolatlar koloni morfolojilerinin ve mikroskobik özelliklerinin belirlenmesi için SCA besiyerinde 2 gün inkübe edildi. izolatların Gram boyaması aşağıdaki

şekilde yapıldı (Williams ve ark., 1993). Boyama sonucunda hücreler mikroskop altında incelendi.

Gram boyama için aşağıdaki adımlar uygulanmıştır.

1. Temiz lama bir damla su damlatıldı. Steril bir öze ile izolatların lam üzerine yayılması sağlandı.
2. Hazırlanan preparat havada kurutuldu. Isı fiksasyonu sağlamak için 2-3 kere alevden geçirildi.
3. Daha sonra hazırlanan preparata ilk olarak kristal violet damlatıldı ve 1 dk bekletilerek saf su ile yıkandı.
4. Yıkama işleminin ardından gram iyodu ile boyanarak 1 dk daha bekletildi. Mor renk gidinceye kadar etil alkol ile yıkandı.
5. Son olarak safranin damlatılarak 30-60 saniye kadar bekletildi ve saf su ile yıkandı.
6. Bu işlemlerden sonra lam kurutma kağıdı ile hafifçe kurutuldu.

İzolatların spor yapılarını incelemek için cover slip yöntemi kullanıldı. Sahilah (1991)'e göre modifiye edilerek geliştirilen metotta izolatlar lam üzerine ince bir tabaka halinde dökülen SCA üzerinde 4 gün kadar büyütüldü. İnkübasyon sonrası kültürler kristal violet ile kaplanıp 1 dk. bekletildi. Saf su ile yıkama işlemi sonrası lamel ile kapatılıp ışık mikroskobunda incelendi.

3.2.4.2. Fizyolojik Tanımlama

Yapılan çalışmalarda yüksek antimikrobiyal ve enzim aktivitesi gösteren aktinomiset izolatları içerisinde seçilen 5 izolatın pH, tuz ve sıcaklık toleranslarının belirlenmesi için bir dizi testler yapıldı.

İzolatların tuz toleranslarının belirlenmesi için %2.5, %5, %7.5 ve %10 oranlarında NaCl içeren SCA besiyerileri hazırlandı. Her bir izolattan bu besiyerlerine çizgi ekim yapıldı ve 30°C'de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı.

İzolaların pH toleranslarının belirlenmesi için pH 5, 6, 7, 8 ve 9 olacak şekilde SCA besiyerleri hazırlandı. Her bir izolattan bu besiyerlerine çizgi ekim yapıldı ve 30°C’de 3-7 gün inkübasyona bırakıldı.

İzolaların üredikleri sıcaklık aralıklarının belirlenmesi için her bir izolat SCA besiyeri içeren petriye çizgi ekim ile ekildi ve bu petriler 10°C, 20°C, 25°C, 37°C, 45°C ve 50°C’de 3 -7 gün inkübasyona bırakıldı.

3.2.4.3. Moleküler Tanımlama

3.2.4.3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu çalışmalarında Liu ve arkadaşları (2000) tarafından tanımlanan metot aşağıdaki şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır.

1. Nişasta kazein broth besiyerinde izolatlar 30°C’de 48 saat inkübe edildi.
2. Sıvı besiyerinde bir gece büyütülen kültürler steril ependorf tüpüne aktarılarak 13000 rpm’de 5 dk santrifüj ile izolatlar çöktürüldü ve daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı.
3. Pellet üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edildi (100 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, %1 SDS) ve karışım homojen olana kadar karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi.
4. 150 µl potasyum asetat tamponu ilave edildi (pH 4.8: 5 M potasyum asetatın 60 ml’si, 11.5 ml glasiyal asetik asit ve 28.5 ml distile su) ve kısa bir vorteksle işlemi yapılarak 10000 g’de 1 dk. santrifüj edildi.
5. Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 10000 rpm’de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Elde edilen süpernatanta eşit hacimde izopropanol ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra 10000 rpm’de 2 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Pellet 300 µl %70’lik etanol ile yıkandı. Pellet 10000 rpm’de 1 dk. santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Pellet havada kurutuldu ve TE (Tris-EDTA) tamponunda çözüldü.
9. İzole edilen DNA’lar %0,7’lik agaroz jel elektroforezinde 80 V’da yürütüldü.

3.2.4.3.2. PCR Çalışmaları

İzole edilen DNA'lar kullanılarak 16S rDNA gen bölgelerini çoğaltmak için 16S rDNA primerleri (F 5'–ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA–3'; R 5'–ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA–3') kullanıldı (Beffa ve ark., 1996). PCR reaksiyonu 50 µl olacak şekilde 1 µl DNA, 5 µl 10xPCR tamponu, 5 µl 20 mM MgSO₄, 0.2 U Tag DNA polimeraz, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1'er µl 10 mM forward ve reverse primeri alınarak hazırlandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) şartları; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 2 dk. olacak şekilde 94°C'de 1 dk., 56°C'de 1 dk., 72°C'de 2 dk. 36 döngü ile 72°C'de 10 dk. son uzama basamağı ile gerçekleştirildi. PCR sonucunda elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rDNA gen sıraları MACROGEN (Hollanda) firmasında sekans analizi yapıldı. İzolatların 16S rDNA sekansları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırıldı.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada *Ulva lactuca* kompostundan aktinomiset izolasyonu yapılarak bu izolatların antibakteriyal, antifungal ve enzim içerikleri araştırıldı. Araştırma sonucunda yüksek aktivite gösteren izolatlardan bazıları seçilerek bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve moleküler olarak tanımlanması yapıldı.

4.1. Aktinomiset İzolatları

Ulva lactuca kompost örneklerinden aktinomiset izolasyonu için hazırlanan seri dilüsyonlar, potasyum dikromatlı ve potasyum dikromatsız besiyerilerine yapılan ekim sonucunda farklı olabileceği düşünülen 40 tane aktinomiset izole edildi. İzole edilen izolatların saf kültürlerinin elde edilmesi için SCA besiyerilerine ekimleri yapılarak üç gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bazı izolatlara ait petri görüntüleri Şekil 4.1 ve koloni görüntüleri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Koloni renkleri gri, beyaz, krem olarak gözlendi. Bu izolatlara BSU-1'den 40 kadar numara verilerek adlandırılması yapıldı.



Şekil 4.1. Bazı aktinomisetlerin petri görüntüleri



Şekil 4.2. Bazı izolatların koloni görüntüleri

4.2. Aktinomisetlerin Antibakteriyal Özellikleri

Aktinomiset izolatlarının, ikisi Gr (+) olmak üzere toplam dokuz patojen bakteriye karşı karşıt çizgi ekim yöntemi kullanılarak aktiviteleri araştırıldı (Tablo 4.1). İzolatların tamamının *E. faecalis* bakterisine karşı yüksek antibakteriyal aktivite gösterdiği görüldü.

BSU-16, BSU-17, BSU-21, BSU-27, BSU-35, BSU-36 ve BSU-40 nolu izolatların sadece *S. aureus* bakterisine karşı, BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların ise *P. aeruginosa* hariç diğer bakterilere karşı yüksek aktivite gösterdiği görüldü (Şekil 4.3).

Tablo 4.1. Aktinomiset izolatlarının çeşitli bakterilere karşı antibakteriyal etkileri

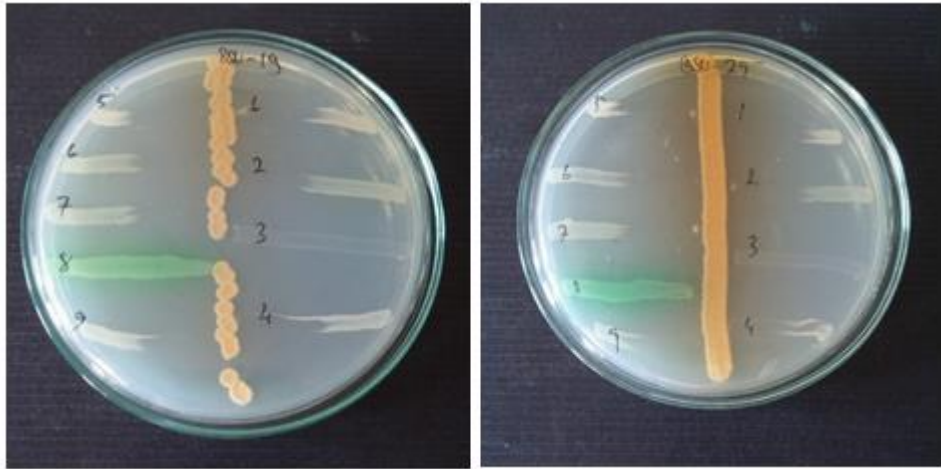
BSU	<i>Yp</i>	<i>Pv</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Kp</i>	<i>Eco</i>	<i>Ef</i>	<i>Sa</i>
1	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
2	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
3	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
4	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
5	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
6	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
7	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
8	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
9	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
10	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
11	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
12	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
13	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
14	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
15	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
16	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
17	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
18	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
19	++	++	++	-	++	++	++	+++	++
20	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
21	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
22	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
23	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
24	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
25	++	++	++	-	++	++	++	+++	++
26	-	-	-	-	-	-	-	+++	-

Tablo 4.1. (Devam)

27	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
28	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
29	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
30	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
31	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
32	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
33	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
34	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
35	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
36	-	-	-	-	-	-	-	+++	+
37	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
38	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
39	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
40	-	-	-	-	-	-	-	+++	++

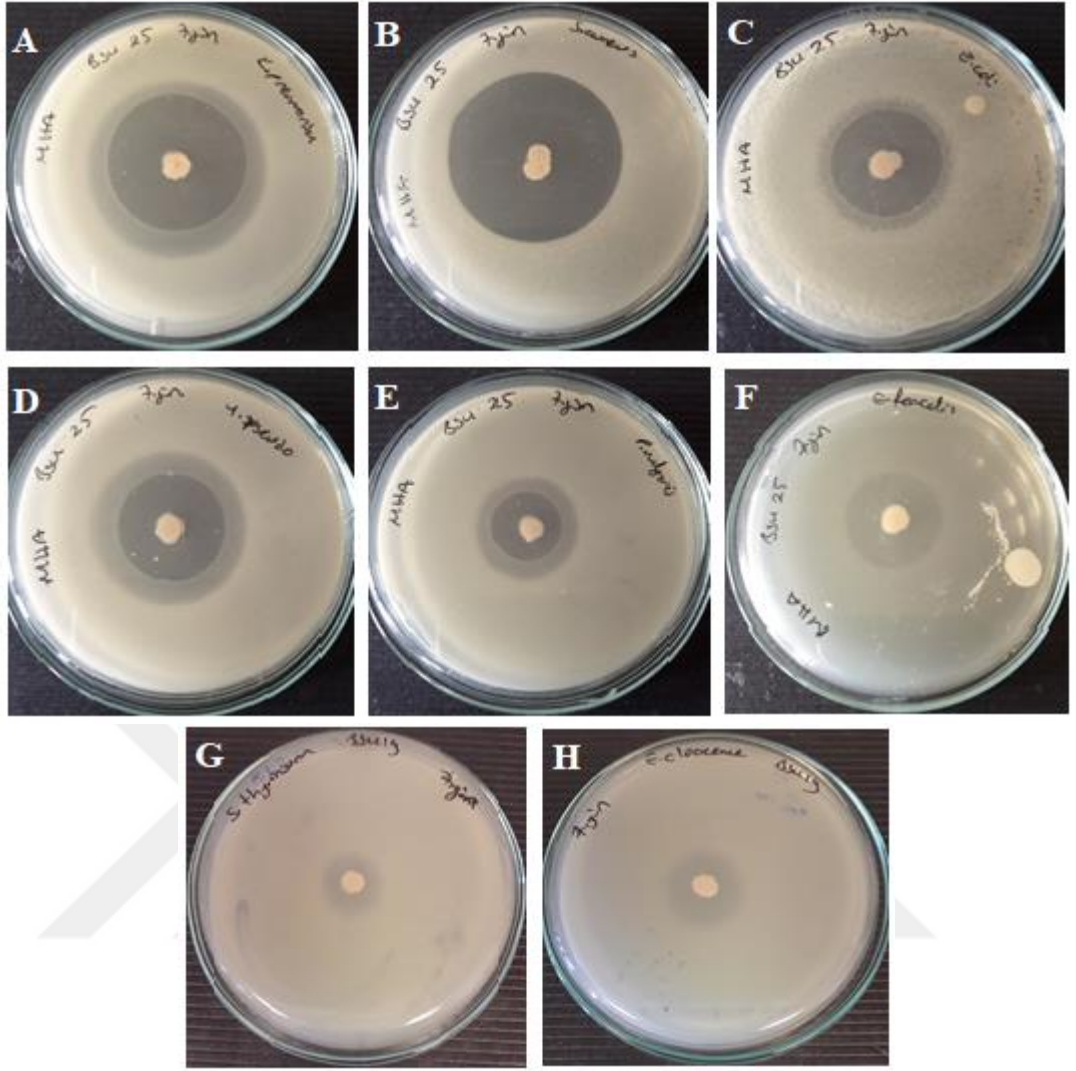
Pv: *Proteus vulgaris*; Ec: *Enterobacter cloacae*; Eco: *Escherichia coli*; St: *Salmonella typhimurium*; Kp: *Klebsiella pneumonia*; Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*; Ef :*Enterococcus faecalis*; P.a: *Pseudomonas aeruginosa*; Sa: *Staphylococcus aureus*

- : Aktivite yok , +: Düşük aktivite, ++: iyi aktivite, +++: çok iyi aktivite



Şekil 4.3. BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların çeşitli patojenlere karşı antibakteriyal aktiviteleri (1;Kp, 2;Eco, 3;Ef, 4;Sa, 5;Yp, 6;Pv, 7;Ec, 8;Pa, 9;St)

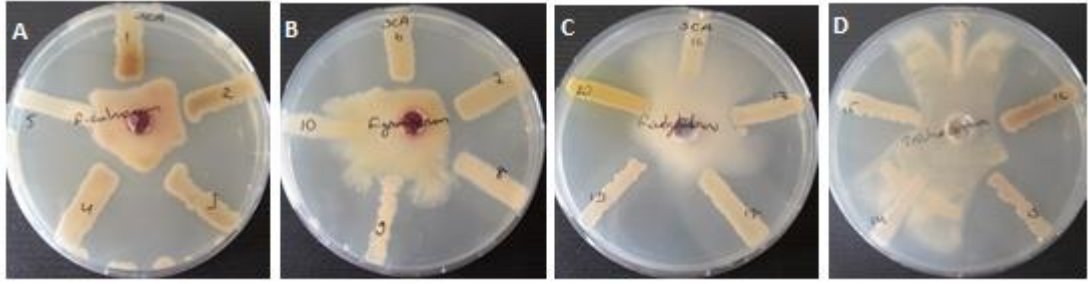
BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların patojen bakterilere karşı 3. günden itibaren aktivite göstermeye başladığı ve en yüksek aktiviteyi 7. günde gösterdiği belirlendi (Şekil 4.4). BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların *P. aeruginosa*'ya karşı aktivitesi gözlenmedi.



Şekil 4.4. BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların patojen bakterilere karşı 7. gündeki aktiviteleri
A: *Klebsiella pneumonia* (38mm); B: *Staphylococcus aureus* (40mm); C: *Escherichia coli* (28mm); D: *Yersinia pseudotuberculosis* (33mm); E: *Proteus vulgaris* (22mm); F: *Enterococcus faecalis* (20mm); G: *Salmonella typhimurium* (10mm); H: *Enterobacter cloacae* (12mm)

4.3. Aktinomisetlerin Antifungal Özellikleri

Aktinomiset izolatlarının bitki patojeni funguslara karşı aktiviteleri araştırmak için primer taramada SCA besiyerindeki ikili kültür tekniği kullanıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Bazı aktinomisetlerin bitki patojeni funguslara karşı aktiviteleri A: *F.culmorum* (BSU-1, BSU-2,BSU-3,BSU-4,BSU-5), B: *F.graminearum* (BSU-6,BSU-7,BSU-8,BSU-9, BSU-10), C: *F.subglutinans* (BSU-16,BSU-17,BSU-18,BSU-19,BSU-20), D: *Trichoderma* sp. (BSU 11,BSU-12,BSU-13,BSU-14,BSU-15)

BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-12, BSU-13, BSU-18, BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatlar dört bitki patojeni fungusu karşı diğer izolatlardan daha yüksek aktivite gösterdi. Bütün izolatlara ait SCA besiyerindeki ikili kültür tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. SCA besiyerinde ikili kültür tekniği ile izolatların antifungal aktiviteleri

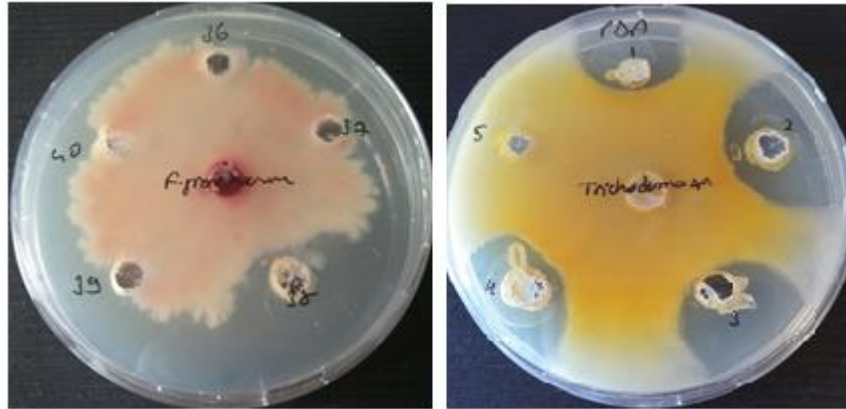
BSU	<i>F.culmorum</i>	<i>F.graminearum</i>	<i>F.subglutinans</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
1	+++	+++	++	+++
2	+++	+++	++	+++
3	+++	+++	++	+++
4	+++	+++	++	+++
5	+	+	+	+
6	+++	+++	++	+++
7	+++	+++	++	+++
8	+++	+++	-	+
9	+	++	-	+
10	-	-	-	±
11	-	-	-	+
12	+++	+++	++	+++
13	+++	+++	++	+++
14	-	+	-	±
15	++	+++	++	+++
16	-	-	-	+
17	+	++	++	+++
18	+++	+++	++	+++
19	+++	+++	+++	+++
20	+	-	+	++
21	-	-	-	+
22	-	-	-	+
23	++	-	+	++
24	-	-	-	+
25	+++	+++	+++	+++
26	++	++	++	±
27	++	++	+	++
28	+	++	±	++
29	±	±	±	++
30	±	±	±	++

Tablo 4.2. (Devam)

31	±	+	-	++
32	+	+	-	+
33	±	+	-	+
34	+++	+++	±	+++
35	++	++	+	+
36	+++	++	+	+
37	+	++	+	+
38	+++	+++	±	+++
39	++	++	+	++
40	+++	+++	+	++

+++ : Çok iyi aktivite, ++ : İyi aktivite, + : Düşük aktivite, ± : Çok düşük aktivite, - : Aktivite yok

Aktinomiset izolatlarının bitki patojeni funguslara karşı aktivitelerini araştırmak için yapılan sekonder taramada nişasta kazein broth (SCB) besiyerinde aktinomiset izolatları büyütüldü. Elde edilen süperanatanlar SCA, MHA ve PDA besiyerlerinde agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak bitki patojeni funguslara karşı denendi (Şekil 4.6). Bu izolatlardan BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-12 ve BSU-15 nolu izolatlar farklı besiyerlerinde tüm patojen funguslara karşı diğer izolatlardan daha yüksek aktivite gösterdi (Tablo 4.3-4.5).



Şekil 4.6. Bazı aktinomisetlerin farklı besiyerlerinde agar kuyu difüzyon yöntemi ile bitki patojeni funguslara karşı aktivite görüntüleri

Tablo 4.3. SCA besiyerinde agar kuyu difüzyon tekniği ile izolatların antifungal aktiviteleri

BSU	<i>F.culmorum</i>	<i>F.graminearum</i>	<i>F.subglutinans</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
1	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++
5	-	-	-	-
6	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+++	+++	+++	+++
13	+++	+++	+++	+++
14	-	-	-	-
15	+++	+++	+++	+++
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	+++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	++	+++	+++	+++
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	+++	+++	-	+++
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-

+++ : Çok iyi aktivite, ++ : İyi aktivite, + : Düşük aktivite, ± : Çok düşük aktivite, - : Aktivite yok

Tablo 4.4. MHA besiyerinde agar kuyu difüzyon yöntemi ile izolatların antifungal aktiviteleri

BSU	<i>F.culmorum</i>	<i>F.graminearum</i>	<i>F.subglutinans</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
1	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++
5	-	-	-	-
6	+++	+++	+++	+++
7	+++	+++	+++	+++
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+++	+++	+++	+++
13	+++	+++	-	+++
14	-	-	-	-
15	+++	+++	+++	+++
16	-	-	-	+
17	-	-	-	-
18	+++	+++	+++	+++
19	+++	+++	+++	+++
20	-	-	-	-
21	-	-	-	+
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	+++	+++	+++	+++
26	-	-	-	-
27	-	+	-	+
28	+	+	+	-
29	-	+	-	-
30	+	+	+	-
31	++	++	+	-
32	++	++	-	++
33	++	++	+	-
34	-	-	+	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	+++	+++	+++	+++
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-

+++ : Çok iyi aktivite, ++ : İyi aktivite, + : Düşük aktivite, ± : Çok düşük aktivite, - : Aktivite yok

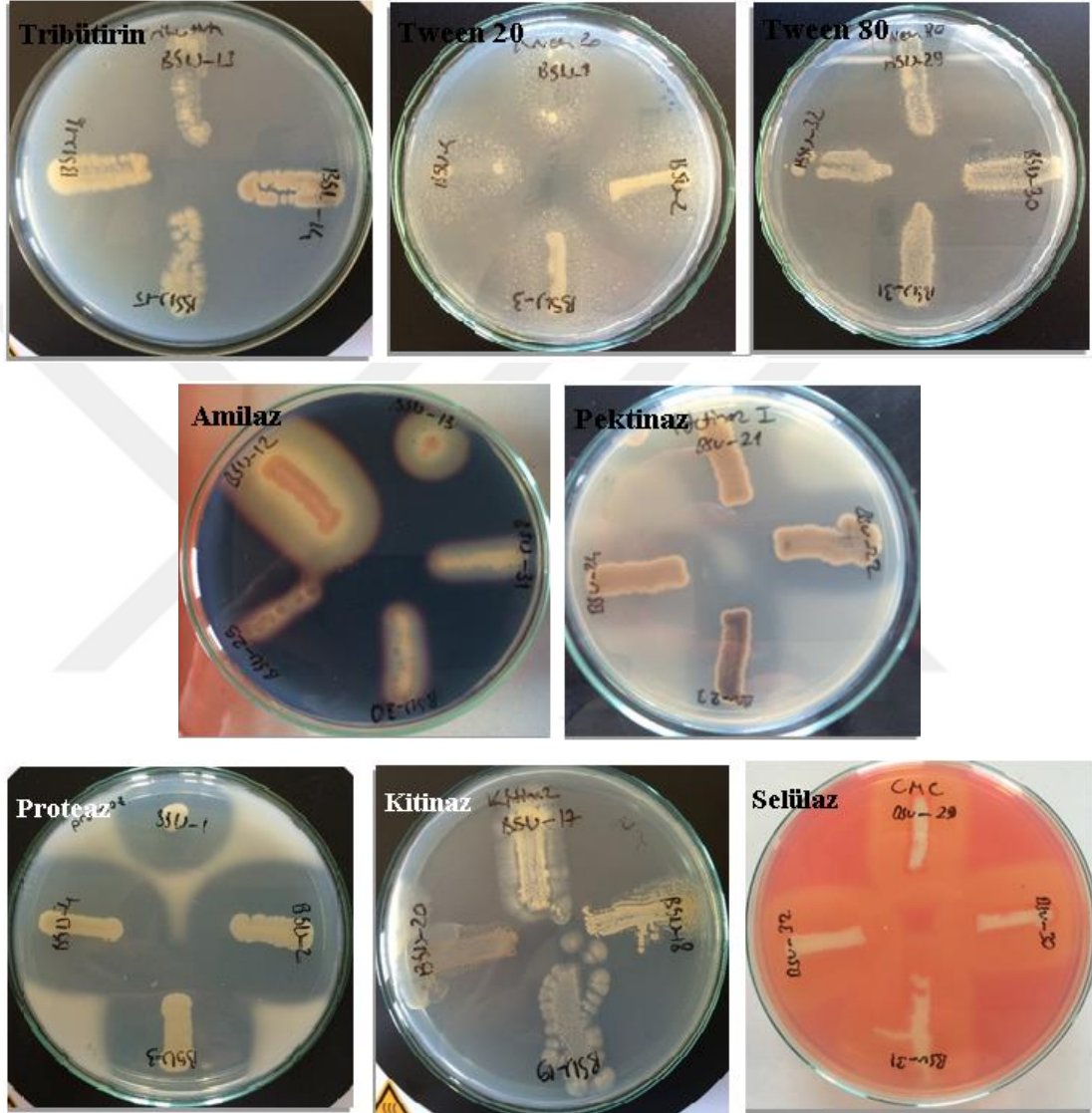
Tablo 4.5. PDA besiyerinde agar kuyu difüzyon tekniği ile izolatların antifungal aktiviteleri

BSU	<i>F.culmorum</i>	<i>F.greminearum</i>	<i>F.subglutinans</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
1	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++
4	+++	+++	+++	+++
5	-	+++	-	-
6	+++	+++	++	+++
7	+++	+++	++	+++
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+++	+++	+++	++
13	+++	+++	+++	++
14	-	-	-	-
15	+++	+++	+++	+++
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	+++	+++	++	-
19	++	++	+++	-
20	-	+	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	±	+
24	-	-	-	-
25	-	-	±	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-

+++ : Çok iyi aktivite, ++ : İyi aktivite, + : Düşük aktivite, ± : Çok düşük aktivite, - : Aktivite yok

4.4. Aktinomisetlerin Enzim İçerikleri

Aktinomiset izolatlarının amilaz, lipolitik, kitinaz, pektinaz, proteaz ve selülaz enzim içerikleri araştırıldı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Bazı izolatların enzim aktivitesi görüntüleri

İzolatların tamamının proteaz aktivitesi gösterdiği belirlendi. İzolatlardan BSU-14, BSU-19, BSU-20, BSU-23 ve BSU-38 nolu izolatlar amilaz, selülaz, kitinaz, pektinaz ve proteaz enzim aktivitesi gösterdi. Ayrıca BSU-9, BSU-10, BSU-11, BSU-12, BSU-27, BSU-28, BSU-29, BSU-30, BSU-31, BSU-32 ve BSU-33 nolu izolatlar ise yüksek proteaz aktivitesi gösterdi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. İzolatların enzim içerikleri

BSU	Amilaz	Selüla	Kitinaz	Pektinaz	Proteaz
1	++	-	+	-	+++
2	+++	-	+	-	+++
3	+++	-	+	-	+++
4	+++	-	+	-	+++
5	-	++	-	Büyümedi	++
6	+++	-	+	-	+++
7	+++	-	+	-	+++
8	+	++	-	Büyümedi	+++
9	+	++	-	Büyümedi	++++
10	-	++	-	Büyümedi	++++
11	-	++	-	Büyümedi	++++
12	+++	-	+	-	++++
13	++	-	+	-	+++
14	+	++	+	++	++
15	+++	-	-	-	+++
16	++	++	-	++	++
17	-	++	+	Büyümedi	++
18	+++	-	++	-	+++
19	+	++	+	++	+
20	+	++	+	++	++
21	++	++	-	++	++
22	++	++	-	++	++
23	+	++	+	++	++
24	++	++	-	++	++
25	+	+	-	++	++
26	+	+	+	Büyümedi	++
27	+	++	-	Büyümedi	++++
28	++	++	-	Büyümedi	++++
29	++	++	-	Büyümedi	++++
30	++	++	-	Büyümedi	++++
31	+	++	-	Büyümedi	++++
32	+	++	-	Büyümedi	++++
33	++	++	+	Büyümedi	++++
34	-	++	+	-	+
35	+	+	-	Büyümedi	+++
36	+	+	+	Büyümedi	++
37	+	++	-	Büyümedi	+++
38	+	++	+	++	+
39	+	++	+	Büyümedi	++
40	+	++	+	Büyümedi	+

- :Aktivite yok, +: 10mm 'den küçük, ++: 10mm-20mm arasında, +++: 20mm'den büyük, ++++:yüksek aktivite (+ : zon çapı mm olarak ölçülmüştür)

İzolatların tamamı Tween 20'de lipolitik aktivite gösterdi. Tween 80 besiyerinde 40 izolattan 24'ünde aktivite gözlemlendi. Tribütirin agar besiyerinde 35 izolatta aktivite gözlenirken sadece 5 izolatta (BSU-5, BSU-10, BSU-11, BSU-19, BSU-37) aktivite gözlenmedi (Tablo 4.7).

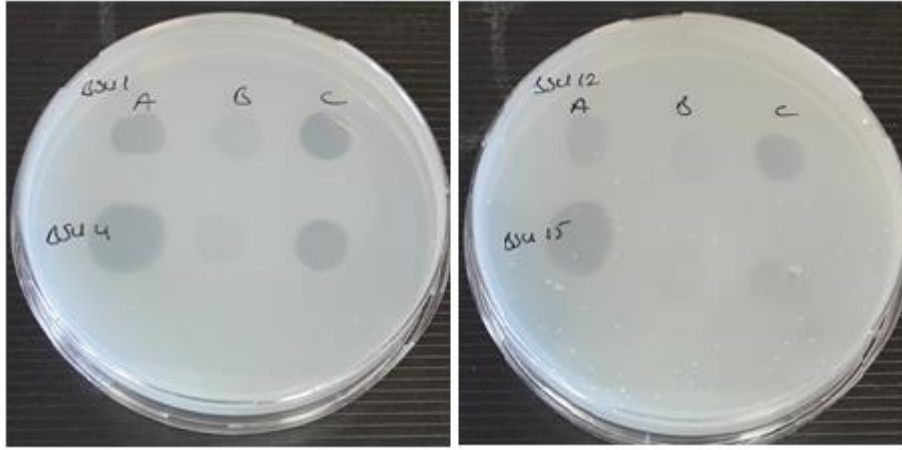
Tablo 4.7. İzolatların lipaz/esteraz enzim içerikleri

BSU	Tween 20	Tween 80	Tribütirin
1	+++	-	+
2	+++	-	+
3	+++	-	+
4	+++	-	+
5	++	-	-
6	+++	-	+
7	+++	-	+
8	+	+	+
9	++	+	+
10	+	+	-
11	++	+	-
12	+++	-	+
13	++	-	+
14	+	-	+
15	+++	-	+
16	++	+	+
17	++	+	+
18	++	-	+
19	+	+	-
20	+	-	+
21	++	+	+
22	++	+	+
23	++	-	+
24	++	+	+
25	+	+	++
26	+	+	+
27	+	+	+
28	+	+	+
29	++	+	+
30	++	+	+
31	++	+	+
32	++	+	+
33	+	+	+
34	++	+	++
35	+	+	+
36	+	+	+
37	+	-	-
38	++	+	+
39	+	-	+
40	+++	+	+

- ;Aktivite yok, +: 10mm'den küçük, ++: 10mm-20mm arasında, +++ : 20mm'den büyük, ++++: yüksek aktivite (+ : zon çapı mm olarak ölçülmüştür).

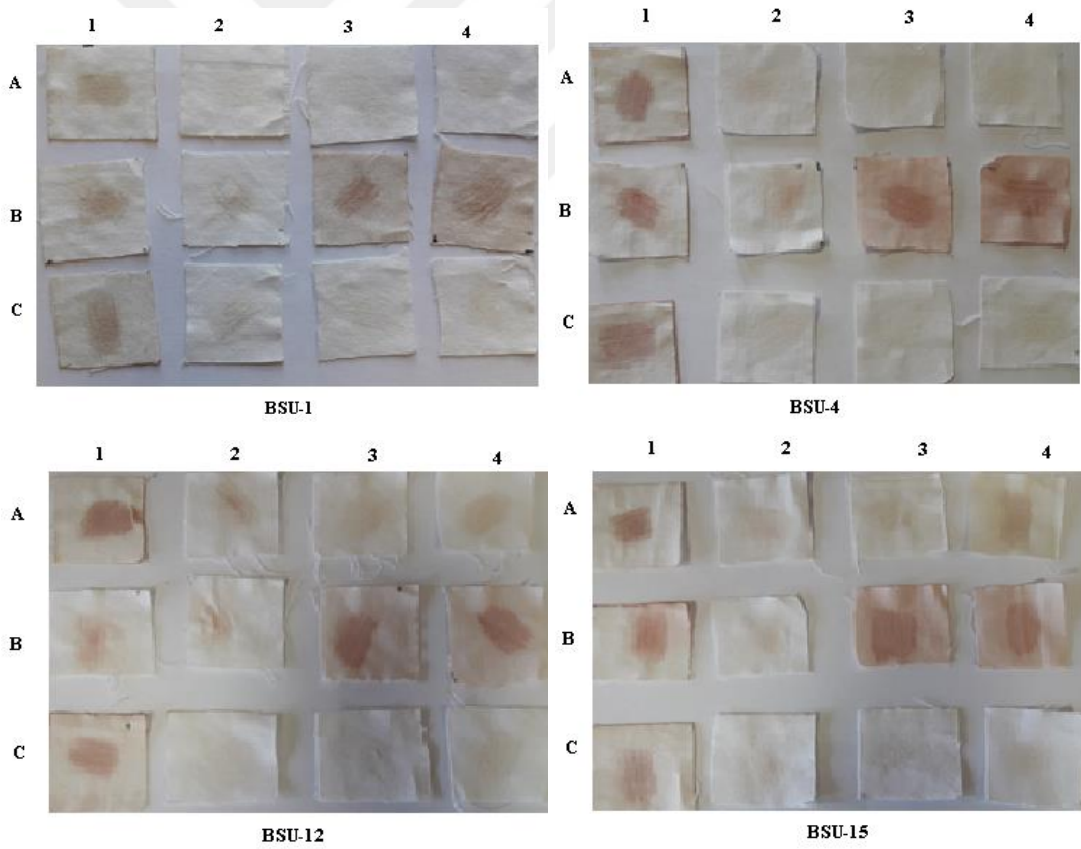
4.4.1. Proteaz Aktivite Çalışmaları

Farklı besiyerlerinde (Besiyeri 10, 11 ve 12) büyütülen BSU-1, BSU-4, BSU-12 ve BSU-15 izolatlarından elde edilen süpernatantlar jelatin besiyerinde inkübasyon sonrası HgCl₂ damlatılarak aktivitelerine bakıldı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Jelatin besiyerinde proteaz aktivitesi A: Besiyeri 10 , B: Besiyeri 11, C: Besiyeri 12

Beyaz renkli kumaştan kan lekelerinin giderilmesi üzerine yapılan çalışmada ise BSU-1, BSU-4, BSU-12 ve BSU-15 nolu izolatlardan elde edilen ham enzimin hem deterjan ile birlikte hem de tek başına lekeleri temizlediği görüldü (Şekil 4.9).



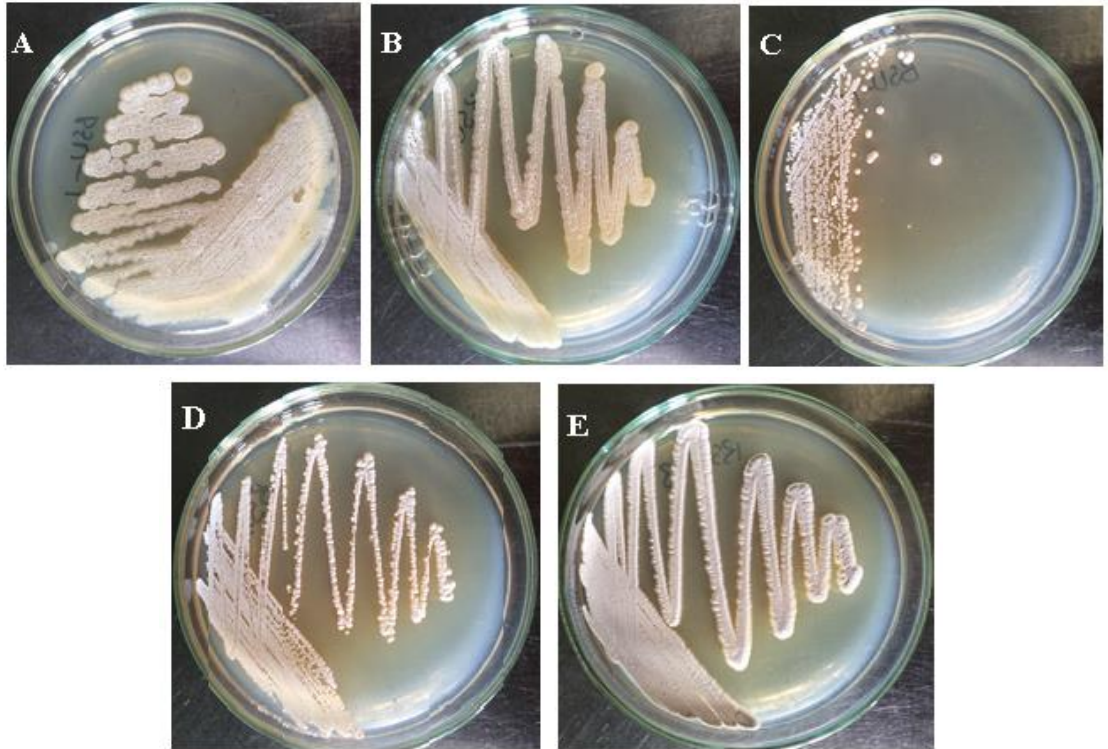
Şekil 4.9. Lekeli kumaşlarda proteaz ve deterjan etkisi A: Besiyeri 10 , B: Besiyeri 11, C: Besiyeri 12

4.5. İzolatların Tanımlaması

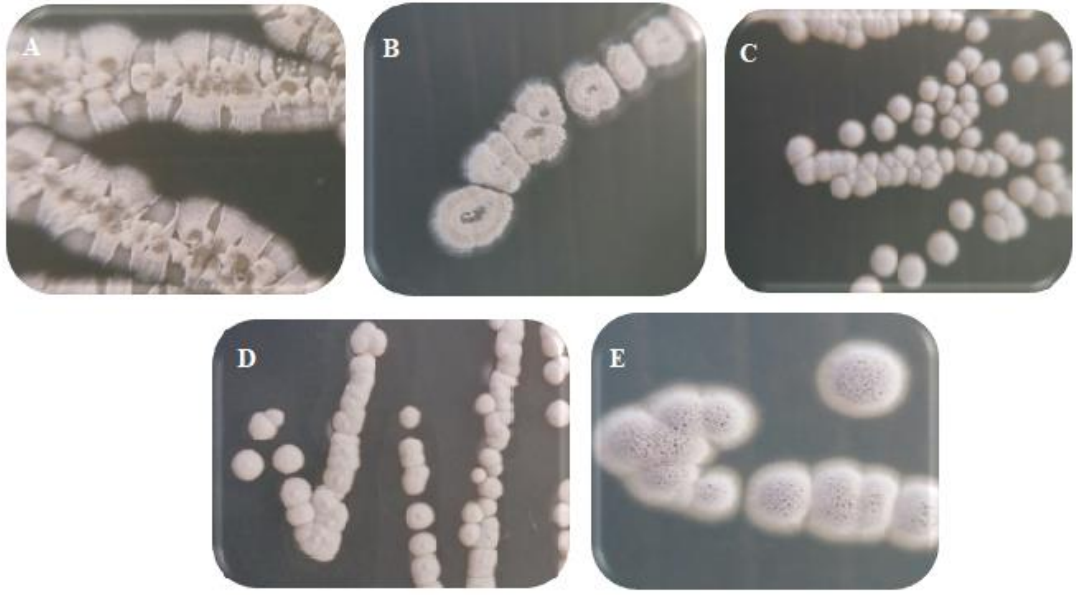
Aktinomiset izolatlarından yüksek aktivite gösteren BSU-1, BSU-12, BSU-19, BSU-25 ve BSU-38 nolu olmak üzere 5 izolat seçildi. Bu izolatlardan BSU-1 ve BSU-12 yüksek enzim ve antifungal aktivitesinden dolayı tercih edildi. BSU-38 antifungal aktivite, BSU-12 ve BSU-19 antibakteriyel aktivite gösterdiği için seçildi. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlaması yapıldı.

4.5.1. Morfolojik Olarak Tanımlanması

Morfolojik olarak yapılan çalışmalar makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. İzolatlar sıvı besiyerinde bulanıklık oluşturmadığı, dipte yada yüzeyde kümeler halinde büyüdüğü tespit edildi. Agarda kolonilerin krem ve beyaz renkli, kireçsi bir görünüme sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.10). İzolatların koloni görüntüleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

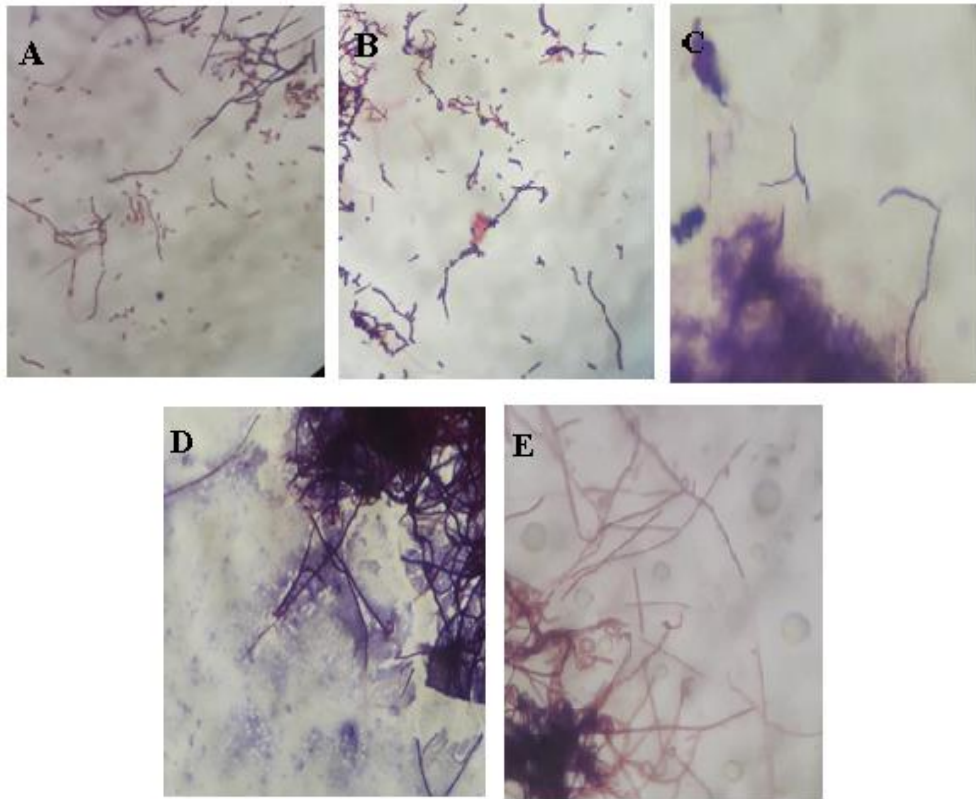


Şekil 4.10. Seçilen izolatların petri görüntüleri A) BSU-1, B) BSU-12, C) BSU-19, D) BSU-25, E) BSU-38



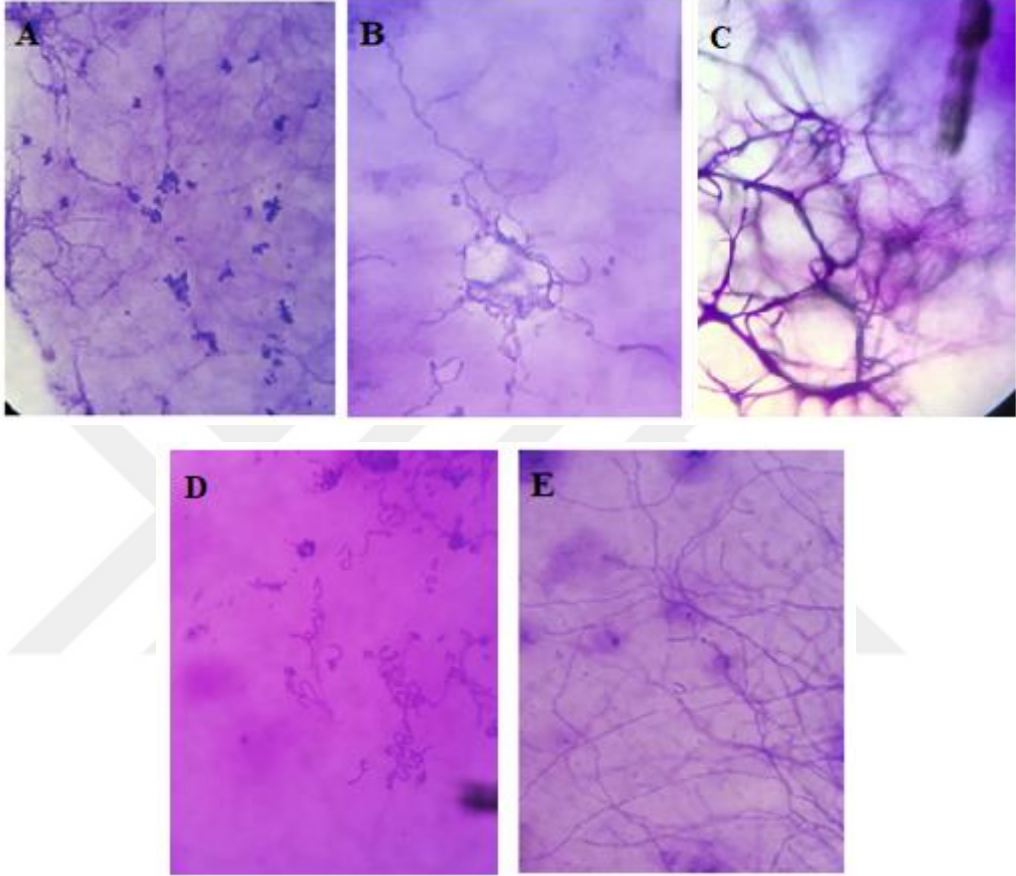
Şekil 4.11. Seçilen izolatların koloni görüntüleri A) BSU-1, B) BSU-12, C) BSU-19, D) BSU-25, E) BSU-38

SCA besiyerinde 2 gün büyütülen aktinomiset izolatlarının Gram boyamaları sonucu pozitif oldukları bulundu (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. İzolatlara ait Gram boyama ışık mikroskobu görüntüleri A) BSU-1, B) BSU-12, C) BSU-19, D) BSU-25, E) BSU-38

İzolatların spor zincir yapılarını tespit etmek amacıyla cover slip yöntemi kullanıldı. Bu izolatların zincir yapılarının uzun düz zincir ve kısa dallanmış yapılarına sahip olduğu olduğu belirlendi (Şekil 4.13). BSU-19 nolu izolatın spor zincir yapısı belirlenemedi.

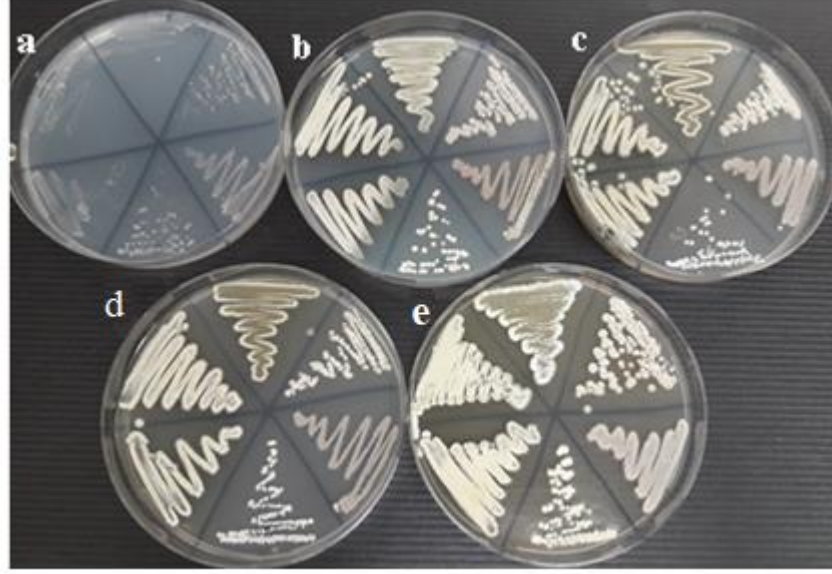


Şekil 4.13. İzolatlara ait spor zincirleri görüntüleri A) BSU-1, B) BSU-12, C) BSU-19, D) BSU-25, E) BSU-38

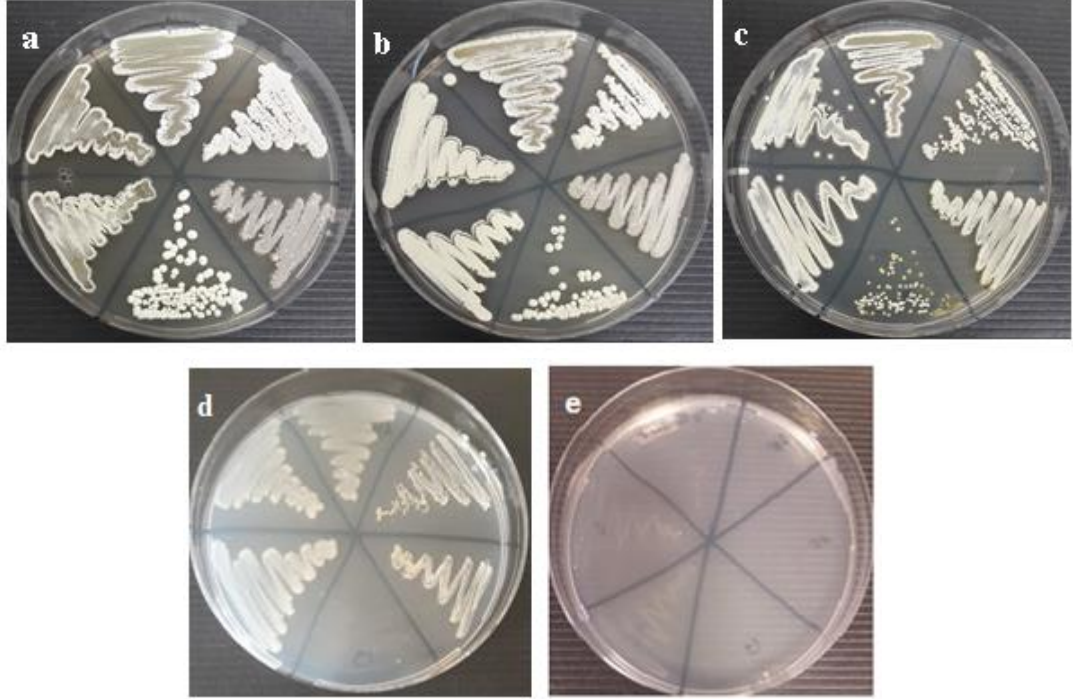
4.5.2. Aktinomiset İzolatlarının Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların pH toleransları incelendiğinde en az büyümenin pH 5'te olduğu gözlemlendi. İzolatların pH 9'daki büyümesinin diğerlerine göre daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.14). Tuzluluğa karşı toleranslarına bakıldığında %2.5, %5 ve %7.5 tuzluluk oranlarında BSU-19'a göre diğer izolatların daha iyi büyüme gösterdiği görüldü (Şekil 4.15). Sadece BSU-1 ve BSU-12'de %10 tuz oranında az miktarda büyüme gözlemlendi. Farklı sıcaklıklarda büyümeleri incelendiğinde 30°C ve 37°C de diğer

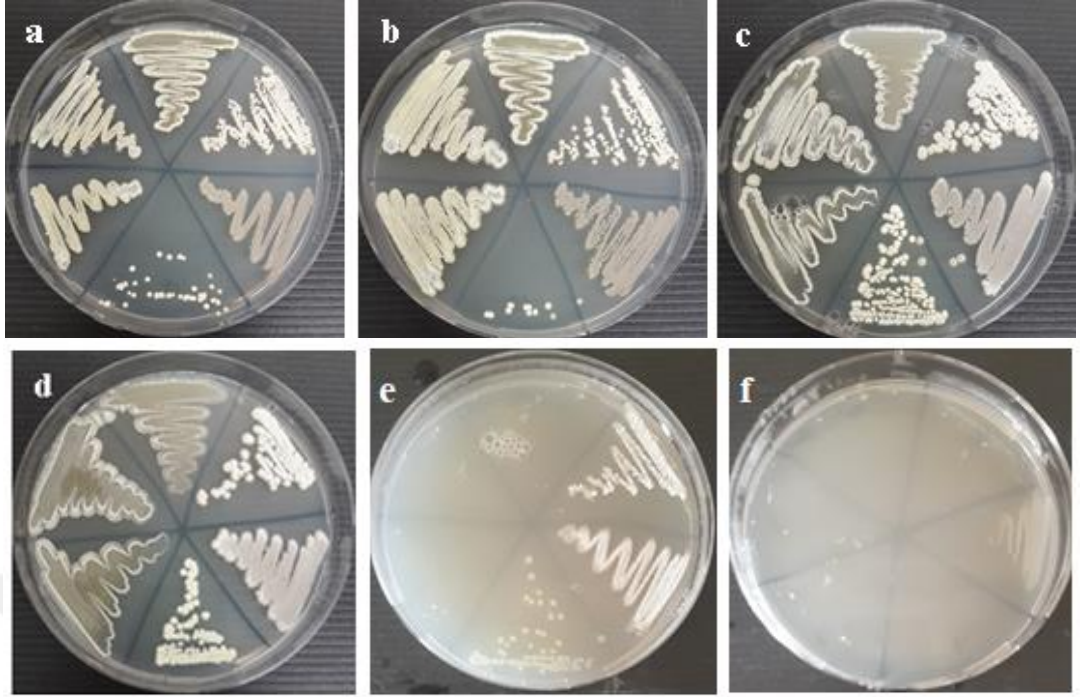
sıklıklara göre daha iyi büyüme gösterdiği belirlendi. İzolatlar 10°C’de büyüme göstermedi (Şekil 4.16).



Şekil 4.14. Farklı pH aralıklarında izolatların büyümesi. a) pH 5, b) pH 6, c) pH 7, d) pH 8, e) pH 9



Şekil 4.15. Farklı tuz oranlarında izolatların büyümesi a) kontrol, b) %2.5 tuz, c) %5 tuz, d) %7.5 tuz, e) %10 tuz



Şekil 4.16. Farklı sıcaklıklarda izolatların büyümesi a) 20°C, b) 25°C, c) 30°C, d) 37°C, e) 45°C, f) 50°C

4.5.3. Moleküler Olarak Tanımlanması

Seçilen izolatlardan DNA'lar izole edilmiştir. İzole edilen bu DNA'lar kullanılarak 16S rDNA PCR'ları yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri NCBI programında BLAST yapılması sonucunda izolatların Tablo 4.8'de verilen bakterilere benzediği bulundu.

Tablo 4.8. Yüksek aktivite gösteren BSU izolatlarının 16S rDNA analiz sonuçlarına göre benzediği bakteriler

İzolat No	Erişim Numarası	Bakterinin Adı	Benzerlik Yüzdesi
BSU-1	KY630734	<i>Streptomyces violascens</i> strain WKFS21	99
	KU317912	<i>Streptomyces lividans</i> strain T38	99
	KT758342	<i>Streptomyces albidoflavus</i> strain HQA008	99
	KP970680	<i>Streptomyces sampsonii</i> strain MDCE7	99
	KJ571056	<i>Streptomyces koyangensis</i> strain 7-7	99
	KF742499	<i>Streptomyces odorifer</i> strain 180	99
	JN129837	<i>Streptomyces albus</i> strain LYT 1411	99
	FJ862046	<i>Streptomyces krainskii</i> strain QL077	99
	EU570715	<i>Streptomyces champavatii</i> strain 173753	99
	EU344795	<i>Streptomyces fungicidicus</i> strain MML1614	99

Tablo 4.8. (Devam)

BSU-12	KU317912	<i>Streptomyces lividans</i> strain T38	98
	EU048540	<i>Streptomyces argenteolus</i> strain CGMCC 4.1693	98
	KY630734	<i>Streptomyces violascens</i> strain WKFS21	98
	KP970680	<i>Streptomyces sampsonii</i> strain MDCE7	98
	KR085950	<i>Streptomyces albidoflavus</i> strain IHBA 9992	98
	KF742499	<i>Streptomyces odorifer</i> strain 180	98
	JN129837	<i>Streptomyces albus</i> strain LYT 1411	98
	FJ862046	<i>Streptomyces krainskii</i> strain QL077	98
	EU570715	<i>Streptomyces champavatii</i> strain 173753	98
	EU344795	<i>Streptomyces fungicidicus</i> strain MML1614	98
	AB184404	<i>Streptomyces saprophyticus</i> strain NBRC 13440	98
BSU-19	FJ792577	<i>Streptomyces rochei</i> strain cfcc3165	99
	JX460857	<i>Streptomyces djakartensis</i> strain D5	99
	KX352817	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> strain JJ143	99
	KC172030	<i>Streptomyces rubrocyandiastaticus</i> strain SH40	99
	FJ481066	<i>Streptomyces avidinii</i> strain xsd08150	99
	KX528449	<i>Streptomyces maritimus</i> strain WZS1-1	99
	KJ020685	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i> strain KMF-2	99
	JN204723	<i>Streptomyces olivaceus</i> strain DE10	99
BSU-25	FJ481066	<i>Streptomyces avidinii</i> strain xsd08150	97
	KX528449	<i>Streptomyces maritimus</i> strain WZS1-1	97
	KX352817	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> strain JJ143	97
BSU-38	KC747480	<i>Streptomyces rochei</i> strain SCSIOZ-SH12	97
	KX352807	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> strain JJ119	96
	KT726172	<i>Streptomyces djakartensis</i> strain TTIO5.3	96
	KJ020685	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i> strain KMF-2	96

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yakın bir zamana kadar denizel çevrelerin sahip oldukları ekstrem ve farklı koşullar nedeniyle az mikrobiyal çeşitlilik barındırdığı düşünülmüştür. Bununla birlikte denizel çevrelerden örnek alınmanın da nispeten zor olması nedeniyle denizel çevrelerdeki mikrobiyal çeşitlilik ve aktinomisetler uzun yıllar çalışılmamıştır. Fakat denizel sistemlerin de mikrobiyal çeşitlilik yönünden zengin olduğu ortaya çıkmıştır. Böylece çalışmalar bu yönde yapılmaya başlamıştır (Sogin ve ark., 2006; Stach ve Bull, 2005).

Denizel ortamlardan izole edilen aktinomisetler yaşadıkları ekstrem koşullara adapte olup farklı sekonder metabolitler sentezleyebildikleri için yeni metabolitlerin elde edilmesi amacıyla önemli bir kaynak olarak görülmüştür. *Streptomyces* bakterileri ile ilgili çok farklı habitatlardan izolasyon çalışmaları yapıldığı halde kıyı numunelerinden yapılmamıştır (Güray, 2006).

Farklı kaynaklardan izole edilen ve denizel aktinomisetlerin varlığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında deniz alglerinden aktinomiset izolasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgiler ışığında farklı bir kaynak olarak değerlendirilen ve yeni sekonder bileşiklerin keşfi amacıyla Giresun sahillerinden toplanan bir deniz algi olan *Ulva lactuca* (deniz marulu)'dan elde edilen komposttan aktinomiset izole edildi ve bu izolatların antibakteriyel, antifungal ve enzim içerikleri araştırılarak seçilen 5 izolatın tanımlanması yapıldı.

Bu çalışmada *Ulva lactuca* materyali kullanılarak hazırlanan komposttan 40 aktinomiset izole edilmiştir. Bir çalışmada Ashraf ve arkadaşları (2007), tarım ve mutfak atıkları, patates kabuğu, şeker kamışı atıkları, ağaç kabuğu, gazete kağıdı,

testere tozu, meyve kabuğu, çim, yaprak, kullanılmış çay, ıspanak dalları, odun talaşı, meyve ve sebze atıklarını kompost yemi stokları olarak tek başına ve kombinasyon halinde kullanmışlardır. Bu kompostlardan mikroorganizmalar (Funguslardan *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Monilia*, *Helminthosporium*, *Coccidioides*, *Scedosporium*, aktinomiset olarak *Nocardia* ve bakterilerden *Bacillus*, *Lactobacilli*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*) izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Aktinomisetler toprak, kompostlar, yemler, tatlı su, çamur, hayvan gübresi, binalarda, toz zerreciklerinde ve ev gibi ortamlardan izole edilmektedir (Lacey ve ark., 1988). Diğer bir çalışmada Groth ve arkadaşları 1997'de yaptıkları çalışmada kompost topraktan yeni bir aktinomiset izole etmişlerdir ve taksonomik ve filogenetik olarak çalışmasını yapmışlardır. Jensen ve arkadaşları Guam Adası'nda 10923 metreden elde ettiği sediment örneklerinden beş yeni aktinomiset filotipi izole etmişlerdir (Lam, 2006). Cuesta ve arkadaşları (2012) ise kalkerli bir toprak, iki fazlı zeytinyağı üretim atığı (alperujo) kompost ve kompostla değiştirilmiş topraktan izole edilen aktinomiset suşlarının izolasyonunu ve tanımlamasını yapmışlardır. Gonzalez ve arkadaşları (2005) da farklı bir kaynak olarak likenlerden aktinomiset izole etmişlerdir. Bir başka çalışmada, ülkemizin çeşitli illerinde bulunan 19 doğal mağaradan izole edilen toplam 290 aktinomiset izolatatının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip madde üretim potansiyelleri araştırılmıştır (Yücel,2007). Bir başka çalışmada Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde farklı derinliklerden (0-35 m) 62 sünger örneği toplanmıştır. Bu sünger örneklerinden 267 tane aktinomiset grubu bakteri izole edilmiştir (Öner, 2011).

Aktinomiset izolasyon çalışmalarında birçok araştırmacı farklı ortamlar kullanmışlardır. Birçok aktinomiset, çoğu bakterinin büyüebildiği nutrient agar, triptik-soy agar, kanlı agar, brain-heart besiyerlerinde gelişirken, seçici besiyerleri kullanılarak da istenmeyen mikroorganizmaların büyümesi engellenmiştir (Labeda ve Shearer, 1990). Naidenova ve Vladimirova (2002) tarafından mezofilik aktinomisetlerin izolasyonuna yönelik bir çalışmada Bennet ortamı, Aktinomiset İzolasyon Agar ve Gliserol Asparagine Agar gibi ortamlar denenmiştir. Şahin ve arkadaşları (2002) ise yaptıkları çalışmada, yeni termofilik Streptomycetes

izolasyonuna yönelik çalışmalarında sikloheksimit ve rifampisin eklenmiş nişasta-kazein agarda izolasyon denemesi yapmışlardır. Bir başka çalışmada fungal büyüme için klorheksimid içeren nutrient agar petrilerinde termofilik aktinomiset izolasyonu yapılmıştır (Treuhaft ve Jones, 1982). Sultan ve arkadaşları (2002) ile Sathi ve arkadaşları (2001), Czapek-Dox broth, Bonner Addicot broth ve Oat broth gibi besiyerlerinde büyüme gözlemlenmiştir. Denizci tarafından mezofilik aktinomisetlere yönelik yapılan bir diğer çalışmada soya unu ekstresi ve çözümlü nişasta içeren bir ortam denenmiştir (Denizci, 1996). Basilio ve arkadaşları (2003), topraktan aktinomiset izolasyonu için sikloheksimit ve pimarisin ilave edilen nişasta-kazein agar kullanmışlardır. Özcan ise yaptığı çalışmada koloni morfolojilerinin daha iyi bir şekilde değerlendirilebilmesi için izolatları deniz suyuyla hazırlanan MHA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle denemiş ve bu besiyerindeki izolatları koloni morfolojileri bakımından da değerlendirmiştir (Özcan, 2012). Yine benzer bir şekilde yapılan bir çalışma da Aksoy, koloni morfolojilerinin değerlendirilebilmesi için izolatları deniz suyuyla hazırlanan aktinomiset izolasyon agar (AİA) besiyerine çizgi ekim yapmış ve koloni morfolojileri bakımından da değerlendirilmiştir (Aksoy, 2014). Tan ve arkadaşları (2009) yaptıkları aktinomiset izolasyonu çalışmasında bakteri ve fungus büyümesini engelleyen dikromatlı besiyeri kullanmışlardır. Bu çalışmada da aktinomiset izolasyonunda potasyum dikromatlı besiyeri ve nişasta kazein agar besiyeri kullanılmıştır.

Bu çalışmada izole edilen 40 aktinomisetin büyütüldüğü SCA besiyerinde oluşturduğu koloni morfolojileri Ventorino ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışma ile benzer sonuçlar göstermiştir.

İzole edilen 40 aktinomisetin *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* patojen bakterilerine karşı antibakteriyal aktivitesi karşı çizgi yöntemi kullanılarak araştırıldı. İzolatların tamamı *E. faecalis* bakterisine karşı yüksek antibakteriyal aktivite gösterirken *P. aeruginosa* bakterisine karşı hiçbir aktivite göstermedi. BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatlar *P. aeruginosa* hariç diğer bakterilere karşı yüksek

antagonistik etki gösterdi. İzole edilen 40 izolat içerisinde 7 izolatın (BSU- 16, BSU-17, BSU-21, BSU-27, BSU-35, BSU-36 ve BSU-40) sadece *S. aureus* organizmasına karşı aktivite gösterdiği belirlendi. Abd-Elnaby ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada, toplam 17 deniz aktinomiseti izole edilmiştir. *S. parvus*'un Gr (-) ve Gr (+) bakterilerine karşı aktif birleşik ürettiği belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Aeromonas hydrophila*'ya karşı sırasıyla, 14, 19, 20 ve 20 mm inhibisyon zonu elde edilmiştir. Hossain ve Rahman (2014) ise Bangladeş'in iki farklı bölgesinden toprak örnekleri toplayarak *Streptomyces* sp. izole etmişlerdir. İzole edilen izolatların *Aeromonas*, *Pseudomonas* ve *Edwardsiella* cinsine ait farklı balık patojenleri ve *Klebsiella*, *Salmonella* ve *Streptococcus* cinslerine ait insan klinik patojenlerine karşı antagonistik aktivitesini karşıt çizgi yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Başka bir çalışmada Ramesh ve Mathivanan (2009), Pulicat gölünden Kanyakumari'ye kadar, Bengal Körfezi'nin değişik yerlerinden toplam 288 deniz örneği toplamış ve 208 deniz aktinomiseti izole etmiştir. İzole edilen 208 deniz aktinomiseti izolatının 111 tanesi insan patojenlerine karşı antibakteriyal aktivite göstermiştir. Bunlardan 31,18,52 ve 81 izolat sırasıyla *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis*'e karşı antibakteriyal aktivite göstermiştir. Yine bu çalışmada 115 izolat gri, 79 izolat beyaz, 6 izolat mavi, 7 izolat pembe, 1 izolat turuncu misel renklenmesi göstermiştir.

Nişasta-kazein agar besiyerine ikili kültür yöntemiyle ekilen BSU'lardan 17 izolat (BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-8, BSU-12, BSU-13, BSU-15, BSU-18, BSU-19, BSU-25, BSU-34, BSU-36, BSU-38 ve BSU-40) bitki patojeni funguslara karşı yüksek antifungal aktivite gösterirken, bu izolatlardan BSU-19 ve BSU-25 nolu izolat kullanılan bitki patojeni fungusların tamamına (*F.culmorum*, *F.graminearum*, *F. subglutinans* ve *Trichoderma* sp.) karşı yüksek antifungal aktivite gösterdi. Aynı besiyerinde kuyu difüzyon yöntemiyle denenen BSU'lardan 13 izolat (BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-12, BSU-13, BSU-15, BSU-18, BSU-19, BSU-25 ve BSU-38) patojen funguslara karşı antifungal aktivite gösterdi. Bitki patojeni fungusların tamamına karşı ise 12 izolat (BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-12, BSU-13, BSU-15, BSU-18, BSU-19 ve BSU-25) yüksek antifungal aktivite gösterdi. Mueller hinton agar

besiyerine ikili kültür ve kuyu difüzyon yöntemi ile denenen BSU'lardan 13 izolatin (BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-12, BSU-13, BSU-15, BSU-18, BSU-19, BSU-25 ve BSU-38) tüm patojen funguslara karşı yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirlendi. Patato deksroz agar besiyerinde ikili kültür yöntemiyle ekilen BSU'lardan 7 izolat (BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7 ve BSU-15), kuyu difüzyon yöntemiyle denenen BSU'lardan 11 izolat (BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4, BSU-6, BSU-7, BSU-12, BSU-13, BSU-15, BSU-18 ve BSU-19) patojen funguslara karşı yüksek antifungal aktivite gösterdi. Ramesh ve Mathivanan (2009) yaptıkları çalışmada 151 izolatin iki bitki patojenine karşı antifungal aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ara ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada, Suudi Arabistan'a ait Riyad topraklarından 105 aktinomiset izole etmişlerdir. Biki patojeni funguslar olan *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus flavus*'u inhibe etmiştir. Sonuçta % 61,90 *A. alternata*, % 61,8 *A. flavus*, % 52,24 *F. oxysporum* ve %50,9 *A. niger*' in büyümesini engellediğini göstermişlerdir. Bharti ve arkadaşları (2010) ise Hindistan'ın Garhwal bölgesinin farklı alanlarından 69 toprak örneği toplamış toplam 316 aktinomiset izole etmişlerdir. Bu izolatlardan 98 (%31,01) izolat bir veya daha fazla patojene karşı antifungal etki göstermiştir. Aktif olan 98 izolattan 19, 67, 42, 37, 18 ve 25 izolat sırasıyla *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans*'a karşı aktivite gösterirken, 7 izolat tüm fungal patojenlere karşı etki göstermiştir. Ayrıca *Streptomyces*'in antagonistik potansiyelinin diğer cinslere kıyasla baskın olduğu bulunmuştur. Bir diğer çalışmada Poosarla ve arkadaşları (2013) Andaman Adaları'ndaki deniz sedimentlerinden toplanan örneklerden toplam altı aktinomiset izolatu izole etmişlerdir. Her izolat, beş patojen bakteri ve bazı patojen mantarlara karşı test edilmiştir. Altı izolat arasında izolatlardan biri tüm bakteri ve mantarlara karşı güçlü aktivite göstermiştir. Bu izolatların, agar difüzyon yöntemini kullanarak sırasıyla patates dekstroz agar ve nütrient agar üzerinde yüksek antifungal ve antibakteriyel bileşikler ürettiği görülmüştür. Gonzalez ve arkadaşları (2005) ise Alaska'nın soğuk alanları ile Hawaii ve Reunion adalarının tropik alanlarından toplanan likenlerden izole ettikleri aktinomisetlerin popülasyon çeşitliliğini incelemişlerdir. İzole edilen tüm izolatların *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı

antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiş ve *S. aureus*'a karşı % 23, *E. coli*' ye karşı % 6,5, *C. albicans*'a karşı % 10,7 antimikrobiyal aktivite gözlemlenmişlerdir.

Bu çalışmada, izole edilen 40 aktinomisetin 34 (85%)'ü amilaz, 21 (%53)'i lipaz/esteraz, 21 (%53)'i kitinaz, 29 (%73)'u pektinaz, 40 (%100)'i proteaz ve 30 (%75)'u selüloz aktivitesi gösterdiği bulundu. Lekshmi ve arkadaşları (2014), benzer bir çalışmada aktinomisetlerden izole ettikleri tüm suşların selüloz, lipaz ve proteaz aktivitelerini test etmişlerdir. İzole edilen 20 aktinomisetten 15 (%75)'i selüloz, 13 (% 65)'ü proteaz ve 14 (%70)'ü lipaz aktivitesi göstermiştir. Malisorn ve Nikhome (2014) ise yaptıkları çalışmada aktinomisetlerin kitinaz, amilaz ve selüloz aktivitesini araştırmışlardır. İzole edilen 129 izolattan 81'i kitinaz, 75'i amilaz ve 41'i selüloz aktivitesi göstermiştir. Mohan ve Charya (2012), çalışmalarında tatlısu sistemlerinden 24 aktinomiset izole etmişlerdir. Bu izolatlarda 8 (%100)'i amilaz, 7 (%87)'si proteaz, 6 (%75)'sı üreaz, 6 (%75)'sı selüloz ve 8 (%100)'i lipaz aktiviteleri gözlemlenmiştir. Ramesh ve Mathivanan (2009), izole ettikleri 208 izolat arasından 183, 157, 116, 72 ve 68 nolu izolatların sırasıyla lipaz, kazeinaz, jelatinaz, selüloz ve amilaz ürettiğini gözlemişlerdir. Özellikle bazı Streptomyces cinsi üyelerinin makromolekülleri parçalama kabiliyetleri ekstrasellüler enzimleri üretmelerinden kaynaklanmaktadır (Hoq ve ark., 1994). Benzer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da aktinomisetlerin yüksek enzim aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, *Ulva lactuca* kompostundan izole edilen 40 aktinomiset arasından seçilen 5 izolat morfolojik, fizyolojik ve moleküler olarak karakterize edildi. Bu çalışmada karakterize edilen 5 izolatın nişasta-kazein agarda koloni şekilleri incelendiğinde Ventorino ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışmadaki *Streptomyces* bakterilerinin kolonilerine benzediği görüldü. İzolatlar fizyolojik olarak farklı pH, tuzluluk ve sıcaklıklara göre incelendi. Aktinomisetler pH 6-9 aralığında iyi büyüme göstermektedirler (Kim ve ark., 2003). Bu çalışmada da pH 6-9 aralığında iyi büyüme görüldü. 45°C'de büyüyen aktinomisetler termotolerant, 55°C'de büyüeyebilen aktinomisetler termofil olarak bilinmektedir (Korn-Wenish ve Kutzner, 1992). İzolatlar içinde BSU-19, BSU-25, BSU-38 nolu izolatların

termotolerant suş olduğu belirlendi ve en iyi 30°C ve 37°C sıcaklıkta büyüdüğü görüldü. Basilio ve arkadaşları (2003), farklı pH ve tuz ortamında toprak aktinomisetlerinin büyümelerini incelemiş ve %5 tuz içeren ortamda büyüeyebilen aktinomisetlerin halotolerant olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada %5 tuzlulukta aktinomisetlerin büyüdüğü görülmüştür ve seçilen izolatların halotolerant olduğu düşünülmektedir. 16S rDNA analizlerine göre BSU-1, BSU-12 ve BSU-19 nolu izolatların %98 ve %99 benzerlik oranı ile BSU-25 ve BSU-38 nolu izolatların %97 oran ile *Streptomyces* cinsine benzediği tespit edildi. Yapılan bir çalışmada Öner (2011), denizel kaynaklardan izole ettiği aktinomisetlerden yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 19 izolatın 16S rDNA analizlerini araştırmış ve tüm izolatların *Streptomyces* cinsine ait olduğunu tespit etmiştir. *Streptomyces*'ler geniş bir gruptur ve tür düzeyinde tanımlanmaları oldukça zordur. 16S rDNA dizilerinin birbirlerine çok yakın olması bir organizmanın birçok organizmaya aynı oranda benzerlik göstermesine neden olur. Bu nedenle tür seviyesinde tanımlama yapabilmek için ileri fenotipik ve kemotaksonomik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; *Ulva lactuca* kompostunda 40 aktinomiset izole edildi. İzole edilen aktinomisetlerin 34'ü (%85) amilaz, 30'u (%75) selülaz, 29'u (%73) pektinaz, 21'i (%53) lipaz/esteraz, 21'i (%53) kitinaz ve 40'ı (%100) proteaz aktivitesi gösterdiği belirlendi. BSU-19 ve BSU-25 nolu izolatların patojen bakterilere karşı yüksek antibakteriyal aktivite gösterdiği, BSU-1, BSU-2, BSU-3, BSU-4 BSU-6, BSU-7, BSU-12, BSU-13, BSU-18, BSU-19, BSU-25 ve BSU-38 nolu izolatların bitki patojeni funguslara karşı yüksek antifungal aktivite gösterdiği tespit edildi. Yüksek antibakteriyal, antifungal ve enzim aktivitesi gösteren izolatlar arasından seçilen BSU-1, BSU-12, BSU-19, BSU-25, BSU-38 nolu izolatların *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlendi. Ayrıca yapılan proteaz deneylerinde bazı izolatlardan elde edilen ham enzimin hem deterjan ile birlikte hem de tek başına lekeli bez üzerinde etkili olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

- Abd-Elnaby, H., Abo-Elala, G., Abdel-Raouf, U., Abdelwahab, A., Hamed, M. 2016. Antibacterial and anticancer activity of marine *Streptomyces parvus*: optimization and application. *Biotech. Biotechnol. Equip*, 30:1, 180-191.
- Ali, O. A. G. 1992. Formation of proteases by *Aspergillus fumigatus* and *penicillium* sp. *Journal of King Saud University*, 4, 127-136.
- Altan, A. 2004. Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills. Yüksek Lisans Tezi.
- Altunok, M., Engin, S., Çamaş, M., Özkaya, F.C., Peker, Z., Çalık, H., Keskin, A.C., Akdemir, T. 2015. Aktinomiset Bakterilerinin *Lactococcus Garvieae*'ya Karşı Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje No: 2014-1-ÖDÜL-46
- Aksoy, S.Ç. 2014. Denizel sediment örneklerinden biyoaktif metabolit üretici aktinomisetlerin kültürel ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve biyoaktif metabolitlerin saflaştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Anderson, A.S., Wellington, M.H.E. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51, 797- 814.
- Ara, I., Bukhari, N.A., Perveen, K. ve Bakir, M.A. 2012. Antifungal activity of some actinomycetes isolated from Riyadh soil, Saudi Arabia: An evaluation for their ability to control *Alternaria* caused tomato blight in green house pot trial. *African J. Agric. Res*, 7(13): 2042-2050
- Ashraf, R., Shahid, F., Ali, T.A. 2007. Association of fungi, bacteria and actinomycetes with different composts. Department of Microbiology, University of Karachi, Pak. *J. Bot*, 39(6): 2141-2151.
- Barabote, R.D., Xie, G., Leu, D.H., Normand, P., Necsulea, A., Daubin, V., Me'digue, C., Adney, W.S., Xu, X.C., Lapidus, A., Parales, R.E., Detter, C., Pujic, P., Bruce, D., Lavire, C., Challacombe, J.F., Brettin, T.S., Berry, A.M. 2009. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res*, 19, 1033-1043.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 80, 1- 43.

- Basilio, A., Gonzalez, I., Vicente, M.F., Gorrochategui, J., Cabello, A., Gonzalez, A. and Genilloud, O., 2003, Patterns of antimicrobial activities from soil Actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol*, 95, 814-823.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., Aragno, M. 1996. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 uC). *Appl. Environ. Microbiol*, 62, 1723-1727.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot*, 58, 1-26.
- Bharti, A., Kumar, V., Gusain, O., Bisht, G.S. 2010. Antifungal Activity of Actinomycetes isolated from Garhwal Region. *J. Sci. Engg.Tech. Mgt*, Vol 2 (2).
- Bredholt, H., Fjaervik, E., Johnsen, G. ve Zotchev, S. B. 2008. Actinomycetes from sediments in the trondneim Fjord, Norway: Diversity and biological activity. *Marg. Drugs*, 6, 12-24.
- Cirik, Ş., Cirik, S. 2011. Su bitkileri I Deniz bitkilerinin biyolojisi, ekolojisi ve yetiştirme teknikleri. *Ege Üniv. Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, 58, 135-145.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev*, 29, 147–167.
- Coşkun A. 2010. Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Cross, T., Goodfellow, M. 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser*, 2, 11-112.
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., Fornes, F. 2012. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *J. Environ. Management*, 95, 280-284.
- Çil, E. 2011. Farklı habitatlardan izole edilen *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia* ve *Streptomyces* suşlarının moleküler taksonomisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Doktora Tezi.
- Del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M.A., Del Castillo, F.J., Alvarez, A., Tellería, D., Menéndez, I., Moreno, F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N. Engl. J. Med*, 24;346(4):243-9.
- Demain, A.L., Sánchez, S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot*, 62, 5-16.
- Deng, A., Wua, J., Zhang, Y., Zhang, G., Wena, T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technol*, 101, 7100-7106.
- Denizci, A.A. 1996. Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, .

- Deshpande, V.V., Rao, M., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Rev*, 62(3): 597-635.
- Devadass, B.J., Paulraj, M.G., Ignacimuthu, S., Theoder, P.A.S., Dhabi, N.A.A. 2016. Antimicrobial Activity of Soil Actinomycetes Isolated from Western Ghats in Tamil Nadu, India. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access*, 3(2): 00059.
- Dietz, A., Mathews, J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl. Microbiol*, 21,527–533.
- Dural, B., Guner, H., Aysel, V. 1989. Taxonomical studies on Ulvales order in Çandarlı Bay II. Ulvaceae A. Ulva L. species. *Turk J. Bot*, 113: (3): 474 – 87.
- Embley, T.M., Stackebrandt, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 48, 257-289.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M. 2007. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol*, 23, 1503-9.
- Golueke, C.G. 1991. Principles of composting, The Staff of BioCycle Journal of Waste Recycling, The Art and Science of Composting, The JG Press Inc., Pennsylvania, USA, 14-27.
- Gonzalez, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., Genilloud, O. 2005. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol*, 54, 401-415.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, 37, 189–216.
- Goodfellow, M., Simpson, K.E. 1987. Ecology of streptomycetes. *Frontiers Appl. Microbiol*, 2, 97-125.
- Goodfellow, M., Fiedler, H. 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic, *Antonie van Leeuwenhoek*, 119-142.
- Gorajana, A., Venkatesan, M., Vinjamurim, S., Kurada, B.V., Peela, .S, Jangam, P., Poluri, E., Zeeck, A. 2007. Resistoflavine, bcytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN₁/7. *Microbiol Res*, 162(4):322-327.
- Groth, I., Schumann, P., Rainey, F.A., Martin, K., Schuetze, B., Augsten, K. 1997. *Demetria terragena* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes isolated from compost soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol*, 47: 1129-1133
- Gulve, R.M. ve Deshmukh, A.M. 2012. Antimicrobial activity of the marine Actinomycetes. *Inter. Multidiscipl. Res. J*, 2(3):16-22.
- Güner, H., 1991. Tohumuz Bitkiler Sistematiği, I. Cilt, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:108, 251.

- Gümüş, G. 2007. Deniz Marulunun Kimyasal Kompozisyonunun Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Güray, G. 2006. Van Gölü çevresi (Van-Edremit) kıyı şeridi toprak numunelerinden *Streptomyces* bakterilerinin izolasyonu ve teşhisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Hassan, A.U.I., Wellington, E.M., 2009. Actinobacteria. Encyclopedia of Microbiology 3th edition by Moselio Schaechter, 26-44.
- Hiltner, L., Störmer, K. 1903. Studien über die Bakterienflora des Ackerbodens, mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach einer Behandlung mit Schwefelkohlenstoff und nach Brache. Arb. Biol. Reichsanst Land-Forstwirtschaft, 3:443–545.
- Hopwood, D.A. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. Annu. Rev. Genet, 40, 1–23.
- Hoq, M.M., Hempel, C., Deckwer, W.D. 1994, Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9 effect of agitation, aeration, and medium consumption, J. Biotechnol, 37, 49-58.
- Hossain, N., Rahman, M. 2014. Antagonistic activity of antibiotic producing *Streptomyces* sp. against fish and human pathogenic bacteria. Braz. Arch. Biol. Technol, 57(2): 233-237.
- Imada, C. 2004. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. Antonie von Leewenhoek, 87, 59–63
- Jaralla, E.M., Al-Dabbagh, N.N., Hameed, N., Abdul-Hussain, N. 2014. Screening for enzymatic production ability and antimicrobial activity of actinomycetes isolated from soil in Hillah/Iraq (IOSR-JPBS), 9(5): 42-47.
- Jeffrey, L.S.H. 2008. Isolation, Characterization and Identification of Actinomycetes from Agricultural Soils at Semongok, Sarawak. African J. Biotechnol, 7(20): 3697-3702.
- Jensen, P.R., Fenical, W. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria. Ecological perspectives. Annu. Rev. Microbiol, 48, 559–584.
- Joo, G.J. 2005. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. Biotechnol. Lett, 27, 201-5.
- Kanini, G.S., Katsifas, E.A., Savvides, A.L., Karagouni, A.D. 2013 . *Streptomyces rochei* ACTA1551, an Indigenous Greek Isolate Studied as a Potential Biocontrol Agent against *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. BioMed Research Inter, Vol. 2013, Article ID 387230.
- Kar, S., Ray, R. C. 2008. Statistical optimization of alpha amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cells in calcium alginate beads using response surface methodology. Polish J. Microbiol, 57, 49-57.

- Karanja, E.N., Boga, H.I., Muigai, A., Wamunyokoli, F., Kinyua, J., Nonoh, J.O. 2010. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenya soils. Proceeding of 2010 JKUAT Scientific Technological and Industrialization Conference, Kenya.
- Kathiresan, K., Balagurunathan, R., Selvam, M.M. 2005. Fungicidal activity of marine actinomycetes against phytopathogenic fungi. *Indian J. Biotechnol*, 4, 271–276.
- Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C.N., Goodfellow, M. 2003. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey ve ark., 1997. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83, 107–116.
- Kim, S.K. 2016. *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications*. Academic Press, 78, 608-739.
- Koçak, F.Ö. 2011. Bazı Nocardioform izolatların 16S rRNA, rpoB ve gyrB gen dizi analizleri ile moleküler sistematiği. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Korn-Wendisch F., Kutzner H.J. 1992. The family Streptomycetaceae, the Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Appl, 921-995.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res*, 2011.
- Kumar, M.S., Selvam, K. 2011. Isolation and purification of high efficiency L-asparaginase by quantitative preparative continuous elution SDS PAGE electrophoresis. *J. Microb. Biochem. Technol*, 3(5): 073-083.
- Labeda, D.P., Shearer, M.C. 1990. Isolation of actinomycetes for biotechnological applications. In *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*, 1- 20.
- Lacey, J. 1988. Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment, M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (Ed), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, 359-432.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Curr. Opin. Microbiol*, 9(3): 245-251.
- Lekshmi, M., Jayadev, A., Navami, S.S. 2014. Isolation and screening of actinomycetes from marine samples for enzyme production. *Inter. J. Sci. Engineer. Res*, 5(12).
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61461.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pederson, J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clinical Microbiol*, 38, 471.

- Locci, R., Sharples, G. 1984. Morphology, p 165–199. *In* Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST (ed), *The biology of Actinomycetes*. Academic Press. London, United Kingdom.
- Lozupone, C.A., Knight, R. 2007. Global patterns in bacterial diversity, *PNAS*, 104, 11436–11440.
- Malisorn, K., Nihome, K. 2014. Isolation and screening of Actinomycetes from soil for their enzymatic and antifungal activity. *Khon Kaen Agr. J.* 42 Suppl.4.
- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol. Biochem*, 4, 79–91.
- McCarthy, A.J., Williams, S.T. 1990. Methods for studying the ecology of actinomycetes. *Methods in Microbiology*, 22, 533-563,
- McKinley, V.L., Vestal, J.R. 1985. Physical and chemical correlates of microbial activity and biomass in composting municipal sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, 50, 1395-1403.
- Minotto, E., L. P. Milagre, M. T. Oliveira, S. T. Van Der Sand. 2014. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. *J. Adv. Sci. Res*, 5(2): 16-23
- Miyaura, J., Tatsumi, C. 1960. Studies on the antibiotics from actinomycetes. An antibiotics pigment from *Streptomyces* F-23b. *Bull Univ. Osaka Pref. Ser. B*, 1, 129-37.
- Mohan, G.M., Charya, M.A.S. 2012. Enzymatic activity of fresh water actinomycetes. *Inter. Res. J. Pharmacy*, 3, 193-197.
- Naidenova, M., Vladimirova, D. 2002. Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in Bulgaria. *J. Cult. Collect*, 3, 15-24.
- Nakato, L. 2006. *Melanin and Bio/Nanotechnology*. Kampala, Uganda: Blackherbals at the Source of the Nile, UG Ltd.
- Niu, G., Chater, K. F., Tian, Y., Zhang, J., Tan, H., 2016. *FEMS Microbiol. Rev*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuw012>
- Oskay, M., Üsame, T., Azeri, Cem. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African J. Biotechnol*, 3(9):441-446
- Öner, Ö. 2011. Denizel kaynaklardan aktinomiset grubu mikroorganizmaların izolasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Özcan, K. 2012. Türkiye’deki bazı denizel sedimentlerin prokaryotik çeşitliliğinin metagenomik analizle belirlenmesi ve denizel aktinomisetlerden antimikrobiyal bileşiklerin izolasyonu, Ege Üniversitesi, Doktora Tezi.

- Paul, N.C., Kim, W.K., Woo, S.K., Park, M.S., Yu, S.H. 2007. Fungal endophytes in roots of *Aralia* species and their antifungal activity. *J. Plant Pathology*, 23(4): 287-294.
- Perez, C., Paul, M., Bezique, P. 1990. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Alta Biomed. Group Experience*. 15, 113.
- Pietra, F. 1997. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. *Nat. Prod. Rep.*, 14, 453-464.
- Phillips, O.L., Malhi, Y., Vinceti, B., Baker, T., Lewis, S.L., Higuchi, N., Laurance, W.F., Vargas, P.N., Martinez, R.V., Laurance, S., Ferreira, L.V., Stern, M., Brown, S., Grace, J. 2002. Changes in growth of tropical forests: Evaluating potential biases. *Ecological Appl*, 12, 576-587.
- Priyadharsini, P., Dhanasekaran, D. 2015. Diversity of soil allelopathic Actinobacteria in Tiruchirappalli district, Tamilnadu, India. *J. Saud Soci. Agric. Sci*, 14(1): 54-60.
- Poosarla, A., Ramana, V., Krishna, R.M. 2013 Isolation of potent antibiotic producing actinomycetes from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Islands. *J Microbiol. Antimicrob*, 5, 6–12.
- Rahman, M.A., Islam, M.Z., Ul-Islam, M.A. 2011. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnol. Res. Int*, 2011, 1-6.
- Ramesh, S., Mathivanan, N. 2009. Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 25, 2103–2111.
- Ramesh, S., Rajesh, M., Mathivanan, N. 2009. Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614. *Bioprocess Biosyst. Eng*, 32(6):791-800.
- Rathan, R.K., Ambili, M. 2011. Cellulase Enzyme Production by *Streptomyces* sp. Using FruitWaste as Substrate. *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 5, 1114-1118.
- Ribitscha, D., Karla, W., Birner-Gruenbergera, R., Grubera, K., Eiteljoerg, I., Remler, P., Wieland, S., Siegert, P., Maurer, K.H., Schwab, H. 2010. C-terminal truncation of a metagenome-derived detergent protease for effective expression in *E. coli*. *J. Biotech*, 150(3): 408-416.
- Roberts W. K., Selitrennikoff, C. P. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity, *J. General Microbiol*, 134, 169-176.
- Round, F. E. 1973. *The Biology of Algae*, 2 nd. Ed., Edward Arnold, London.
- Sahilah, A.M. 1991. Aktinomiset yang berkaitan dengan bahan buangan ternakan ayam. BSc Tesis, University Malaya, Malaysia. (Jeffrey, L.S.H., Sahilah, A.M., Son, R., Tosiah, S. 2007. Isolation and screening of actinomycetes from Malaysian soil for their enzymatic and antimicrobial activities. *J. Trop. Agric. And Fd. Sc.* 35(1): 159-164).

- Sathi, Z.S., Rahman, A.A., Gafur, M.A. 2001, Identification and In Vitro Antimicrobial Activity of a Compound Isolated from *Streptomyces* Species, *Pakistan. J. Biol. Sci*, 4(14): 1523-1525.
- Sharma, S.L., Pant, A. 2001. Crude oil degradation by marine actinomycetes *Rhodococcus* sp. *Indian J. Mar. Sci*, 30, 146–150
- Sharma, M., Dangi, P., Choudhary, M. 2014. Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 3(2):801-832.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Mark, W.D., Huse, S.M. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 103, 12115-12120.
- Sultan, M. Z., Khatune, N. A., Sathi, Z. S., Bhuiyan, S. A., Sadik, M. G., Choudury, M. A., Gafur, M. A., Rahman, A. A. 2002. In Vitro Antibacterial Activity of an Active Metabolite Isolated from *Streptomyces* Species, *Biotechnology*, 1(2-4),100-106.
- Stach, J.E.M., Bull, A.T., 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 3-9.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. 2002. Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 52, 1043–1047.
- Strom, P.F. 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol*, 50, 899-905.
- Şahin, N., Öztürk, E., Işık, K., Kariptaş, E., Özkanca, R. 2002. Selective Isolation and Numerical Classification of Novel Thermophilic *Streptomyces*. *Turk J. Biol*, 26, 13-24.
- Taechowisan, T., Chuaychot, N., Chanaphat, S., Wanbanjob A., Tantiwachwutikul, P. 2009. Antagonistic effects of *Streptomyces* sp. SRM1 on *colletotrichum musae*, *Biotechnology*, 8(1): 86–92.
- Tan, H., Deng, Z., Cao, L. 2009. Isolation and characterization of actinomycetes from healthy goat faeces. *Letters Appl. Microbiol*, 49, 248–253.
- Tokala R.K., Strap, J.L., Jung, C.M., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L.A., Bailey, J.F., Morra, M.J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol*, 68(5): 2161-2171.
- Treuhart, M.W., Jones, M.A. 1982. Comparison of methods for isolation and enumeration of thermophilic actinomycetes from dust. *J. Clinical Microbiol*, 16(6): 995-999.
- Ventorino, V., Lonata, E., Birolo, L., Montella, S., Marcolongo, L., Chiaro, A., Espresso, F., Faraco, V., Pepe, O. 2016. Lignocellulose-adapted endo-cellulase

- producing *Streptomyces* strains for bioconversion of cellulose-based materials. *Front. Microbiol.* 7, 2061.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 495-548.
- Waksman, A.S. 1939. On The Classification Of Actinomycetes' New Jersey Agricultural Experiment Station, New Brunswick, New Jersey Received for publication September 21.
- Waksman, A.S. 1989. Actinomycetes, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi 89, İzmir, 328 (Ward and Goodfellow, 2004).
- Ward, A.C., Bora, N. 2006. Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(3): 279-86.
- Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E.M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H.U., Lee, S.Y. 2015. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends in Biotechnol.* 33(1):15-26.
- Wietzorrek, A., Bibb, M. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in *Streptomyces* appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol. Microbiol.* 25, 1181-1184
- Williams, S.T., Lanning, S., Wellington, E.M.H. 1983. Ecology of actinomycetes M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams (Ed), *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, London, 381-428.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Wellington, E.M.H., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J., Mortimer, A.M. 1983. A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J. Gene. Microbiol.* 129, 1815-1830.
- Williams, S.T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D.I., Kuznetsov, V.D., Lemonnior, F.J., Long, P.F. 1993. Detection and identification of novel actinomycetes. *Res. Microbiol.* 144(8): 653-656.
- Xiao, K., Kinkel, L.L., Samac, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol. Control*, 23, 285-95.
- Yücel, S. 2007. Mağaralardan izole edilen aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. Eskisehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- Zaitlin, B., Turkington, K., Parkinson, D., Clayton, G. 2004. Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycetes communities and inhibitors of fungi by specific actinomycetes. *Appl. Soil Ecol.* 26, 53–62.
- Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., Kuai, J. 2005. Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 276–281.

ÖZGEÇMİŞ

Sermin Yıldırım 1991 yılında Görele’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bursa’da tamamladı. 2009 yılında Yıldırım Beyazıt Lisesi’nden mezun oldu. 2010 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Erasmus Staj Hareketliliği Programı kapsamında Universty of Warsaw’da 3 ay staj eğitimine katıldı. 2014 yılında Giresun Üniversitesi’nden mezun oldu. Aynı yıl Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.