

**BAZI PATOJEN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDE ETKİLİ  
ANTİMİKROBİYAL MADDELER ÜRETEBİLEN  
MİKROORGANİZMALARIN TOPRAKTAN İZOLASYONU**

**Yasemin BAŞKAYA  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Programı  
Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ  
Şubat-2015**

**T.C**  
**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI PATOJEN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDE ETKİLİ**  
**ANTİMİKROBİYAL MADDELER ÜRETEBİLEN**  
**MİKROORGANİZMALARIN TOPRAKTAN İZOLASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Yasemin BAŞKAYA**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Programı: Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**KARAMAN-2015**

## TEZ ONAYI

Yasemin BAŞKAYA tarafından hazırlanan “**Bazı Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Etkili Antimikrobiyal Maddeler Üretebilen Mikroorganizmaların Topraktan İzolasyonu**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Jüri Üyeleri

İmza:

Yrd. Doç. Dr. Gökhan SADI  
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.,  
Kamil Özdağ Fen Fak. Biyoloji Bölümü)



Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ  
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.,  
Kamil Özdağ Fen Fak. Biyoloji Bölümü)

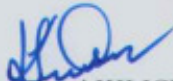


Yrd. Doç. Dr. Ceren BAYRAÇ  
(Karamanoğlu Mehmetbey Üniv.,  
Mühendislik Fak. Biyomühendislik Bölümü)



Tez Savunma Tarihi: 10.02.2015

**Yukarıdaki Sonucu Onaylarım**

  
Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL  
Enstitü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Yasemin BAŞKAYA**

**ÖZET**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**BAZI PATOJEN MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNDE ETKİLİ  
ANTİMİKROBİYAL MADDELER ÜRETEBİLEN  
MİKROORGANİZMALARIN TOPRAKTAN İZOLASYONU**

**Yasemin BAŞKAYA**

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**Şubat, 2015, 61 sayfa**

Son zamanlarda, sağlık bilimlerinde ortaya çıkan problemlerden biri antibiyotik ilaçlara karşı patojen mikroorganizmaların direnç kazanmasıdır. Bu yüzden, mevcut olarak kullanılan birçok antibiyotik mikroorganizmalara karşı etkilerini neredeyse kaybetmiştir. Bu sebepten ötürü, çoğunluğu sentetik yeni antibiyotik ilaçlar marketlere sunulmuştur. Buna mukabil şu çok iyi bilinmektedir ki dünya üzerindeki mikroorganizmaların çoğu hala bilinmemektedir, dolayısıyla onların antimikrobiyal potansiyelleri de bilinmemektedir. Bu çalışmada, toplanan toprak örneklerinden antimikrobiyal metabolit üretme kapasitesine sahip mikroorganizmalar tespit edildikten sonra belirlenen izolatların sıvı kültürde antimikrobiyal üretim kapasiteleri disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu metodlarıyla patojen mikroorganizmalar üzerinde ölçülmesi hedeflenmiştir. Bunun için, toprak örnekleri beş farklı agar üzerine ekildi. Saf kültürler elde edildikten sonra, antimikrobiyal aktiviteleri çapraz-çizgi metodu kullanılarak patojen mikroorganizmalara karşı test edildi. İzole edilen 60 bakteri arasından yaklaşık % 20'si *B. subtilis* üzerine antimikrobiyal etki gösterdi ve sadece % 1'i *S. aureus* ATCC 29213 üzerine etkiliydi. Toplamda, % 17'si antimikrobiyal madde üretme kabiliyetine sahipti. Antimikrobiyal aktivitelerini baz alarak, üç izolat fermantasyon ortamında daha detaylı incelendi. Altı numaralı mikroorganizmanın 8. gününe ait fermantasyon örneği yaklaşık 26 mm temiz alan ile *K. pneumoniae*'ya karşı en yüksek antimikrobiyal etkiyi gösterdi. Bu çalışmada, antimikrobiyal aktivitelerin hem Gram pozitif hem de Gram negatif mikroorganizmalara karşı olduğu tespit edildi. Dolayısıyla bu çalışma günümüzün problemlerinden geniş spektruma sahip antimikrobiyal madde arayışına güzel bir örnek olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik, Toprak Mikroorganizmaları, Antimikrobiyal Aktivite.

**ABSTRACT**  
**Master Thesis**

**ISOLATION OF SOIL MICROORGANISMS CAPABLE OF PRODUCING  
EFFECTIVE ANTIMICROBIAL AGENTS ON SOME PATHOGENIC  
MICROORGANISMS**

**Yasemin BAŞKAYA**

**Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**February, 2015, 61 pages**

In recent years, one of the problem arising in health sciences is acquired resistance of pathogenic microorganism against antibiotics. Therefore, currently used many antibiotics almost lost their effects on microorganism. That is why new antibiotic drugs, mostly synthetic have been introduced to the market. On the other hand, it is very well known that most of the microorganism on earth are still unknown, hence, their antimicrobial potentials. In this study, It was aimed that after determination of microorganisms, capable of producing antimicrobial metabolite from collected soil samples, antimicrobial production capacities of the determined isolates were detected by disc diffusion and minimum inhibitory concentration methods against pathogen microorganisms after incubation in liquid culture. For this purpose, soil samples were inoculated on five different agar. After obtaining pure culture, they were tested for antimicrobial activities against some pathogens microorganisms by using cross-streak method. Among isolated 60 bacteria, about 20 % of them showed antimicrobial activity against *B. subtilis*, and only the 1 % of them had activity on *S. aureus* ATCC 29213. Totally, 17 % of them has the ability to produce antimicrobial chemicals. Based on their antimicrobial activities, three of the isolates were investigated further in fermentation broth. The samples belonging to 8<sup>th</sup> day of the microorganism No 6 fermentation period showed highest antimicrobial activity about 26 mm clear zone against *Klebsiella pneumoniae*. In this study, it was noted that the antimicrobial activities were against both Gram positive and Gram negative microorganisms. Thus, this study is a case in point for study searching for broad spectrum antimicrobial chemical, one of the nowadays problems.

**Keywords:** Antibiotics, Soil Microorganisms, Antimicrobial Activity.

## ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca beni yönlendiren, bilgisini, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince yardımlarından dolayı laboratuvar çalışma arkadaşlarım, Ümmühan ÜNLÜ, İbrahim SAVRAN ve Serap GÖNEK'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında beni evlerinde misafir edip ağırlayan, ev arkadaşlarım Meryem KAYA ve Hamide ÇİÇEK'e çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim, maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ailem, annem Emine BAŞKAYA ve babam Ali BAŞKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10-M-13 nolu proje ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Yasemin BAŞKAYA

Şubat, 2015

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>ÖN SÖZ</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Antibiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi .....	4
2.2. Antibiyotikler .....	6
2.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması .....	9
2.4. Antibiyotik Ekolojisi .....	10
2.5. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları .....	11
2.5.1. Hücre Duvar Sentezini İnhibe Etme .....	12
2.5.2. Hücre Zarı İşlevini Bozma .....	12
2.5.3. Protein Sentezini Baskılayanlar .....	13
2.5.4. Nükleik Asit Sentezini Baskılayanlar .....	13
2.5.5. İntermediyer Metabolizmayı Bozanlar (Antimetabolitler) .....	13
2.6. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları .....	14
2.6.1. Antibiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı .....	14
2.6.2. Antibiyotiklerin Hayvancılıkta Kullanımı .....	14
2.6.3. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı .....	15
2.6.4. Antibiyotiklerin Laboratuvarlarda Araştırma Materyali Olarak Kullanımı .....	16
2.7. Antibiyotik Direnci .....	16



2.7.1. Antimikrobiyal Direnç Çeşitleri .....	18
2.7.2. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	20
2.8. Antibiyotik Pozitif Mikroorganizmalar .....	24
2.8.1. Bakteriler.....	25
2.8.2. Funguslar.....	26
2.8.3. Aktinomisetler .....	27
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>29</b>
3.1. Kullanılan Test Mikroorganizmaları ve Kimyasal Maddeler .....	29
3.2. Mikroorganizmaların Toprakтан İzolasyonu .....	29
3.3. İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Etkilerinin Saptanması.....	30
3.3.1. Çapraz Çizgi (Cross-Streak) Metodu.....	31
3.3.2. Fermantasyon Sıvısında Antimikrobiyal Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Saptanması.....	31
3.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerinin Saptanması .....	32
3.5. Mikroorganizmaların Tanımlanması .....	33
3.5.1. API Staph Tanı Kiti ile Tanımlanmaları.....	33
3.5.2. API 20 NE Tanı Kiti ile Tanımlanmaları.....	34
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
4.1 Toprak Mikroorganizmalarının Çapraz Çizgi Metodu İle Antimikrobiyal Etkisi ....	35
4.2. Fermantasyon Sıvısının Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisi .....	38
4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri.....	43
4.3. Seçilen Aktif İzolatların Tanımlanması.....	44
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>46</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>60</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Topraktaki organizma gruplarının ortalama sayıları .....	10
Çizelge 2.2. Bazı antibiyotikler ve etki şekilleri.....	11
Çizelge 2.3. Bazı antibiyotiklerin kullanıma giriş ve direnç bildiriliş tarihleri .....	18
Çizelge 2.4. Bakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler.....	26
Çizelge 2.5. Funguslar tarafından üretilen antibiyotik sayısı ve grupları.....	27
Çizelge 2.6. Çeşitli aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitler .....	28
Çizelge 4.1. Mikroorganizmaların disk difüzyon metodu ile elde edilen inhibisyon zon çapları .....	39
Çizelge 4.2. Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zonları.....	40
Çizelge 4.3. Bazı antibiyotiklerin zon çaplarının değerlendirilmesi.....	41
Çizelge 4.4. 2 ve 6 numaralı örneklerin 660 nm’de ölçülen absorbans değerleri.....	43

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Antibiyotik çağı evreleri .....	6
Şekil 2.2. Bazı antibiyotiklerin yapısal formülü .....	7
Şekil 2.3. Bazı antibiyotikler ve bakteri hücresinde hedef aldıkları bölgeler.....	9
Şekil 3.1. Toprak mikroorganizmalarının izolasyon görüntüleri.....	30
Şekil 3.2. Mikroorganizmaların antibiyotik etkisini belirleyen çapraz çizgi metodu .....	31
Şekil 4.1. Toprak mikroorganizmalarının inkübasyon sonrası görüntüleri.....	36
Şekil 4.2. Bazı mikroorganizmaların çapraz çizgi metodu görüntüleri.....	37
Şekil 4.3. 2, 5 ve 6 nolu mikroorganizmaların dokuz farklı patojene karşı antibakteriyal etkileri.....	42
Şekil 4.4. 2, 5 ve 6 numaralı mikroorganizmalar.....	44
Şekil 4.5. 2 ve 6 numaralı mikroorganizma sporlarının mikroskop görüntüleri.....	45

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
°C	Santigrad Derece
mm	Milimetre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
rpm	Dakikadaki devir sayısı
<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
NB	Nutrient Broth
SGA	Sabouraud Glikoz Agar
PDA	Patates Dekstroz Agar
NaCl	Sodyum Klorür
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
GSBL	Geniş Spektrumlu β-Laktamaz
KOB	Koloni Oluşturan Birim
VRE	Vankomisin Dirençli Enterokok
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
PBP	Penisilin Bağlayan Protein

## 1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin hikayesi 1929 yılında Alexander Fleming'in *Staphylococcus aureus* üzerine çalışırken bir rastlantı sonucu bu mikroorganizmanın üremesini engellediğini tespit ettiği *Penicillium notatum*'u bulmasıyla başlamıştır. Ancak bu antibiyotiğin endüstriyel uygulamaları ve antibiyotiklerin tedavide kullanımı 1940'lı yılların başlarında Chain ve Flarey'in *P. notatum*'un salgılarından elde ettiği ve penisilin adını verdikleri ilacın birçok mikroba öldürücü etkide bulunmasının keşfedilmesi ile başlamış ve hızla gelişmiştir. Penisilin keşfi ile birçok hastalığın tedavisi mümkün olmuş ve bu olay yüzyılın buluşu olarak tarihe geçmiştir. Bundan sonraki yıllar içinde antibiyotiklere karşı gelişen direncin giderek artması yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini hızlandırmıştır (Apan, 2004).

1940'lı yıllarda stafilokok ve streptokok enfeksiyonlarının tedavisinde az miktarda üretilen ham penisilin kullanılmış, 1943'de Selman Waksman'ın araştırma grubunun streptomisini bulmasıyla antibiyotik araştırmaları büyük bir hız kazanmıştır. O yıllarda, *Streptomyces griseus* aktinomiset türünden elde edilmiş olan streptomisin, tüberkülozun tedavisinde kullanılan ilk etkili antibiyotik olmuştur. 1950 ve 1960'lı yıllarda çok sayıda antibakteriyal ve antifungal keşfedilmiş, bu dönem antibiyotik keşifleri için "Altın Çağ" olarak adlandırılmıştır (Oskay ve Tamer, 2009). 1940'dan bu yana üniversiteler, enstitüler ve ilaç şirketlerinin özel araştırma laboratuvarlarında yüzbinlerce mikroorganizma, topraktan izole edilerek antibiyotik testine tabi tutulmuş ve böylece tedavide kullanılan antibiyotikler bulunmuştur. Yeni antibiyotiklerin keşfi ve yarı sentetik antibiyotik üretimi ile tıbbi açıdan hızla ilerlenmiştir (Öner, 2001).

Son 50 - 60 yıl içerisinde kullanıma giren antibiyotikler insan, hayvan ve bitki yaşamına katkı sağlamış, ölümcül pek çok enfeksiyon hastalığının tedavisini olanaklı kılmıştır. Ancak insanlık tarihinin en önemli buluşlarından olan antibiyotiklerin uygunsuz, gereksiz ve bilinçsiz kullanımları sonucu gelişen direnç nedeniyle antibiyotikler günümüzde etkilerini önemli oranda kaybetmişlerdir (Öztürk, 2008). Patogen organizmaların direnç kazanması ile antibiyotiklerin aktivitelerinin bu mikroorganizmalara karşı araştırılması, yeni ve etkili antimikrobiyal maddelerin elde edilmesi zorunlu hale gelmiştir. Özellikle 1988'lerden bu yana vankomisin dirençli Enterokokların (VRE) ortaya çıkışı, metisilin ve vankomisin dirençli *S. aureus*

(MRSA/VRSA) suşları, buna ek olarak bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan virüs (HIV/AIDS), influenza virüs alttipi H1N1 veya H5N1 kaynaklı influenza salgınları, alt solunum yolu enfeksiyonları, ishal, dirençli bakterilerin sebep olduğu sepsis ve yoğun bakım ünitelerinde gözlenen hastane enfeksiyonları gibi yeni patojenlerin ortaya çıkması doğal antimikrobiyal ürünlerin önemini tüm dünyada artırmaktadır (Rondon ve ark., 2000; Martinez ve ark., 2004; Karaaslan, 2013). Yaşanan bu olaylar günümüzde antibiyotik direncinin halk sağlığı açısından nasıl ciddi bir tehdit oluşturduğunu ve gelecekte de oluşturmaya devam edeceğini gözler önüne sermektedir. Bu yüzden yeni antimikrobiyal ürünlerin araştırılması kimyacılar, mikrobiyologlar ve farmakologların ilgilendiği temel konuların başında gelmektedir (Balkar, 2007).

Dirençli patojenlerdeki artış, yeni hastalıkların gelişimi, kullanılan bileşiklerin toksisitesindeki artış nedeniyle kesinlikle yeni mikrobiyal metabolitlere ve farklı stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Antimikrobiyallerin kullanımı arttıkça bakteriyel patojenler tarafından ortaya çıkan direnç mekanizmaları daha da artmış ve karmaşık bir hal almıştır. Çoğul antibiyotik dirençli bakterilere karşı kullanılan antibiyotiklerin gün geçtikçe etkisini yitirmesinin en önemli sebebi, bakterilerin salgıladığı  $\beta$ -laktamaz enzimleridir. (Zahner ve ark., 1988; Demain, 1998).

Son yirmi yılda, kullanımda olan antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, ikili antibiyotik dirençli birçok mikroorganizma klinik olarak izole edilip denendiğinde, bunlara tek yönlü antibiyotiklerin etkisinin yeterli olmadığını görmüştür. Antibiyotiklere direnç kazanmış mikrobiyal patojenleri kontrol altına almak için, farmakolojik olarak aktif, yeni bileşikleri keşfetmek gerekli olacağından, etki alanı daha geniş ve daha güçlü antibiyotik üreten yeni mikroorganizma suşlarının araştırılıp incelenmesi önem kazanmaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Antimikrobiyal ajanlara karşı hızla gelişen direnç, çeşitli enfeksiyonların tedavisinde yeni antimikrobiyal ajanların ve yeni etki mekanizmalarının araştırılmasına neden olmuştur. Son yıllarda yeni antibakteriyel ajan geliştirme hızı büyük ölçüde düşüş göstermektedir. Direnç gelişiminin önüne geçebilmek için doğru antibiyotik kullanımı temel ilke olmalıdır. Bunun yanında, her ne kadar yeni antibiyotikler önemli olsa da asıl amaç istenmeyen etkileri ve ilaç etkileşimlerini en aza indirmek için yeni hedeflerin saptanması, yeni mekanizmaların belirlenmesi ve bunlara yönelik yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi olmalıdır (Özşen, 2009).

Ülkemizin coğrafik konumu düşünöldüğünde topraktan farklı suşların izole edilebileceği ve hatta izole edilen bu suşlarda farklı antibiyotik türevlerinin sentezlenebileceği söylenebilir. Bol hammadde kaynağına sahip olan ölkemizde halen antibiyotik aktif maddeleri dışarıdan satın alınmaktadır. Bunun nedeni konu ile ilgili yeterli araştırmanın yapılamaması ve teknolojinin tam olarak bilinemesinden kaynaklanmaktadır (Balkar, 2007).

Yaptığımız bu çalışma ile Karaman ili Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi kampüsünün çeşitli alanlarından toprak örnekleri toplanarak izole edilen mikroorganizmaların, sıvı kültürde antimikrobiyal üretim kapasiteleri disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu metodlarıyla patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal madde üretim kapasitelerinin belirlenmesi, yeni ve doğal antibiyotiklerin bulunması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın ölkemizde yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antibiyotiklerin Tanımı ve Tarihi

Antibiyotiğin kelime anlamı Yunanca “anti” (karşı) ve “bios” (yaşam) sözcüklerinden türetilmiştir (Aktuğlu, 1997). Türk Dil Kurumu sözlüğündeki tanımı ise “Mikroorganizmaların üremesini engelleyen veya onları tahrip eden, genellikle mikroorganizmalar, küf mantarları ve bitkiler tarafından sentezlenen ya da yapay olarak üretilen maddelerin ortak adıdır” (Anonim, 2014a). Metchnikoff (1889)’un bir mikroorganizmanın, başka bir mikroorganizmanın gelişimini engellediği düşüncesinden sonra yapılan çalışmaların sonucunda tıp literatürüne “yerini alma sağaltımı” olarak geçmiştir (Yıldırım, 2004). Vuillemin tarafından aynı yıl “bir mikroorganizmanın diğer bir mikroorganizma üzerinde antagonistik faaliyetlerinin mevcut olduğu ve bu faaliyetlerden insan hastalıklarının sağaltımında yararlanılabileceği” fikri ortaya atılmış ve bu durumu “antibiosis” olarak tanımlamıştır (Öner, 1996). Papcostas ve Gate 1889’dan sonraki yıllarda bu terimi *in vitro* durumlar için sınırlandırmış, benzer aktivitenin *in vivo* da gerçekleşmesini ise “antagonizm” olarak tanımlamışlardır (Yıldırım, 2004). 1942 yılında ise Waksman “mikroorganizmaların büyümelerini inhibe edici özelliğe sahip mikrobiyal kaynaklı kimyasal madde” lerini tanımlamak için antibiyotik terimini kullanmıştır (Waksman, 1967). Günümüzde antibiyotik tanımına düşük moleküler ağırlıkta olması ve etkisini düşük konsantrasyonlarda gösterebilmesi gibi durumlarda eklenmiştir (Yıldırım, 2004).

Antibiyotiğin keşfi insan sağlığı adına büyük çığır açmış olsada ilk çağlardan beri insanların bitki ve bitki özlerinden hatta mikroorganizmalardan yararlanarak hastalıkların tedavisinde kullanıldığı görülmektedir (Denizci, 1996). Çinliler, asırlar önce ayaklarında oluşan enfeksiyonları ve çıbanları tedavi etmek için küflü soya ile kaplı sandaletler giymişler; Yunanlılar ise yara enfeksiyonlarına karşı şarap ve tuzları kullanmışlardır (Yıldırım, 2004). 1881 yılında İngiliz biyoloğu John Tiyndall tarafından küflerin antibakteriyal özellikleri tarif edilmiş ve bulanık olan kültür ortamının yüzeyinde üreyen küfler tarafından berraklaştırıldığını gözlemlemiştir. Pasteur ve Johulbert ise 1877 yılında şarbon basillerinin idrar içerisinde büyüme gösterdiklerini fakat idrar içerisine başka mikroorganizmalar eklendiğinde onların ortamda görünmez hale geldiklerini yani kaybolduklarını saptamışlardır. Böylece mikroorganizmaların tedavi amacıyla kullanılabileceği ilk kez düşünülmüştür. 1901 yılında Emmerick ve



Low'un yaptığı çalışmada ise *Pseudomonas aureginosa* suşunun sıvı kültürlerini tavşanlara enjekte ettiklerinde tavşanların şarbona yakalanmadığını görmüşlerdir. Bununla beraber hayvanın kazandığı direncin sebebini incelediklerinde bunu organizmanın ürettiği piyasinaz enziminden kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Aslan, 1999; Yıldırım, 2004).

Londra'da Azize Mary'nin Hastanesi'nde (St. Mary's Hospital) stafilokok suşları üzerinde çalışan Alexander Fleming, bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşan bir küf mantarının etrafında stafilokokların üreyemediklerini, hatta öldüklerini görmüştür. Bu mantar, yapılan çalışmalarda birçok bakteriye karşı etkin bulunmuş ve Fleming, üreyen küf mantarlarının *Penicillium* türünden oluşuyla, etkili maddeye penisilin adını vermiştir. Oxford Üniversitesi Tıp Fakültesinden Florey, Chain ve Abraham 1940 yılında penisilin üzerinde tekrar çalışmalara başlamış; bu antibiyotik farelerde oluşturulan streptokok enfeksiyonlarındaki yüksek etkinliğini deneysel olarak kanıtlamış ve sonuçlarını Mayıs 1940'da yayınlamışlardır. Penisilin'in insanlar üzerindeki ilk başarısı 1941 yılında gerçekleşmiştir (Balkar, 2007).

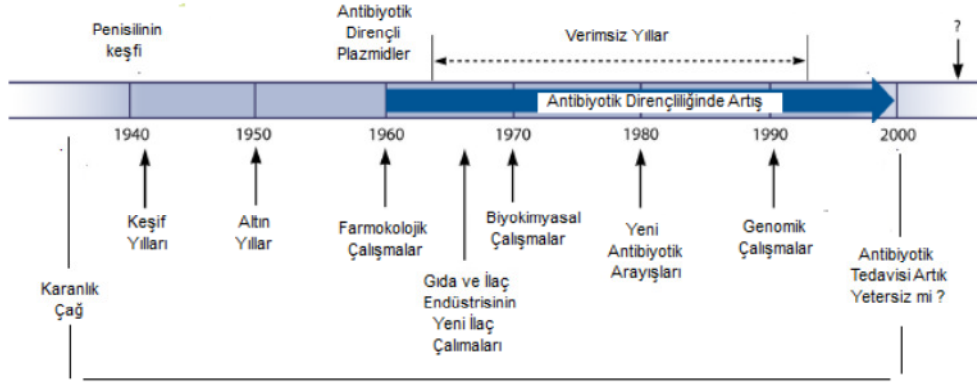
1939-1943 yılları arasında *Actinomycetes* türleri üzerinde çalışmalar yapan Waksman ve arkadaşları, *Streptomyces griseus* kültürlerinden streptomisin adını verdikleri bir madde elde etmişlerdir. 1944 yılında tedavi alanına giren bu antibiyotik, birçok gram pozitif ve gram negatif mikroorganizma yanında *Mycobacterium*'lara karşı da çok etkili olmuştur. Streptomisin, İkinci Dünya Savaşı'nın geniş insan kitlelerine yaydığı tüberküloz hastalığının denetim altına alınmasında büyük katkı sağlamıştır (Balkar, 2007).

Aslında ilk antibiyotik olan mikofenolik asit, 1896'da Gosio tarafından *Penicillium* türünden elde edilmiş ancak Alsberg ve Black tarafından 1948'de bulunmuştur (Aslan, 1999). Waksman'ın 1940'larda yaptığı çalışmalar sonucunda aktinomisin *Actinomycetes*'den elde edilen ilk antibiyotik olmuş, bunu 1942'de streptotrisin 1943'de ise streptomisin takip etmiştir (Aslan, 1999).

1952 yılında Filipinler'de McGuire ve ark. *Streptomyces erythreus* kültürlerinden eritromisin adı verilen ve makrolit grubu antibiyotiklerin ilkinin oluşturduğu yeni bir antibiyotik elde etmişlerdir. Bu antibiyotik birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteri yanında, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Treponema*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* ve *Rickettsia*'lara karşı da yüksek düzeyde aktivite göstererek geniş spektrumlu antibiyotik olarak kullanılmıştır. İspanya'da 1970'li yıllarda *Streptomyces cattleya* kültürlerinden

yeni bir  $\beta$ -laktam antibiyotiği elde edilmiş ve tienamisin adı verilmiştir. Bu madde karbapenemlerin ilk örneğini oluşturmaktadır (Aktuğlu, 1997).

Yapılan çalışmalar sonucunda günümüze kadar birçok yeni antibiyotik keşfedilmiştir. Ancak bulunan her yeni antibiyotiğe karşı aynı hızda mikroorganizmalar da direnç geliştirmektedir. 1960'lı yılların sonlarına doğru antibiyotiğe dirençli plazmidlerin bulunuşu ile "Amerika Birleşik Devletleri sağlık bakanlığına bağlı Gıda ve İlaç Kurumu (FDA)" yeni ilaç çalışmalarına başlamıştır. 1990'lı yıllardan bugüne kadar ise bakterilerin antibiyotiğe olan direncinin önlenemeyen artışının engellenmesi için biyokimyasal ve genomik çalışmalar hız kazanmıştır (Şekil 2.1) (Ergül ve Sadi, 2012). Mikrobiyolojik çalışmaların geliştirilmesi, aşı ve serumların sağaltıma girmesi, yeni kemoterapötiklerin keşfiyle bu direnç durumuyla denge sağlanmaya çalışılmaktadır.



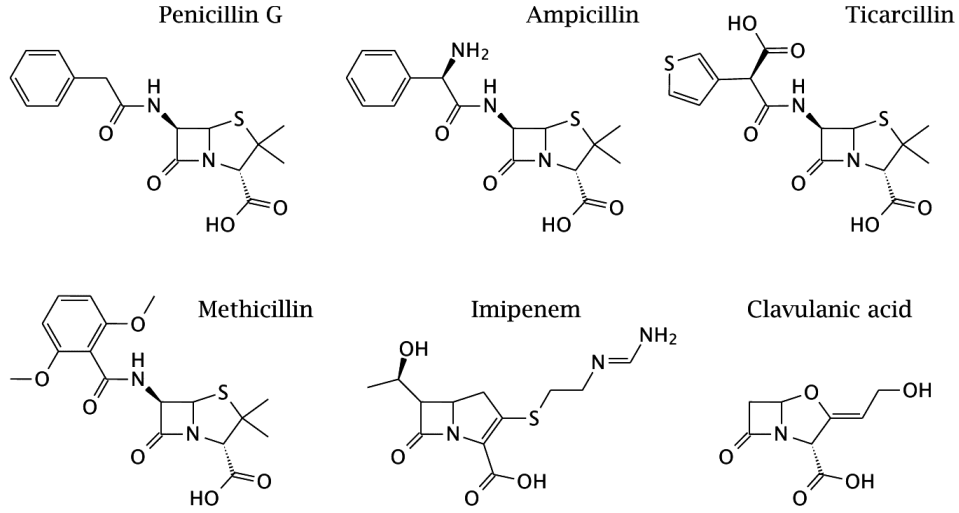
Şekil 2.1. Antibiyotik çağı evreleri (Davies ve Davies, 2010)

## 2.2. Antibiyotikler

Antibiyotikler, çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen düşük konsantrasyonları dahi diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyen "bakteriostatik" veya onların ölümüne sebep olan "bakterisid" etki gösteren ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan, düşük moleküler ağırlıktaki mikrobiyal moleküllerdir (Çakı, 2009).

Moleküler ağırlıkları 150-5000 dalton arasında değişen antibiyotikler, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların belli bölgelerine olumlu ya da olumsuz yönde etki gösterebilen, sekonder metabolitlerdir. Molekülleri karbon, hidrojen, oksijen ve azot, hatta diğer bir kısmı kükürt, fosfor veya halojen atomlarından oluşmaktadır (Şekil 2.2)

(Oskay ve Tamer, 2009). Hemen hemen tüm organik kimyasal fonksiyonel gruplar (hidroksil, karbonil, nitrojen fonksiyonel grupları vb.) ve bütün organik yapıları (alifatik zincirler, alisiklik zincirler, aromatik halkalar, heterosiklikler, karbonhidratlar, polipeptitler vb.) bulundurulur. Genellikle antibiyotikler, bakteri büyümesini baskılayan polar gruplara sahiptir (Balkar, 2007).



**Şekil 2.2.** Bazı antibiyotiklerin yapısal formülü (Anonim, 2014b)

Antibiyotikler diğer sekonder ürünler gibi, enzimatik olarak katalize edilmiş uzun reaksiyonlar serisinin son ürününü oluşturmaktadır. Sentez için yapısal ve düzenleyici genler iş görür. Yaklaşık 20 genin ortak ürünü olan antibiyotiklerin sentez reaksiyonları birkaç biyosentetik yol izinde gruplanmıştır. Bu yol izleri, normal hücrel metabolizmanın basit biyosentetik yol izi varyasyonlarıdır. Burada meydana gelen küçük değişimler farklı maddelerin oluşumuna neden olmaktadır (Balkar, 2007).

Antibiyotikler biyosentetik yol izlerine göre iki ana grup altında sınıflandırılırlar:

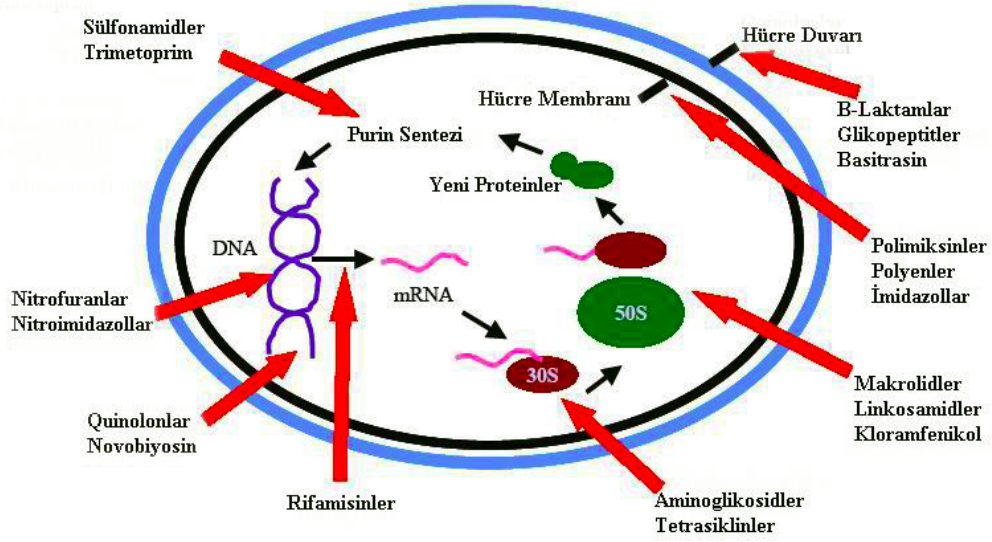
1. Primer metabolitlere analog olanlar (Aminoasitler, koenzimler, nükleosidazların analogları).
2. Polimerizasyon yolu ile türelenenler. Bunlar dört grup altında toplanmaktadır;
  - a. Klasik protein sentez mekanizmasında görev almayan aminoasitlerin yoğunlaşması sonucunda oluşan, sonraki reaksiyonlar ile modifiye edilmiş olan peptit antibiyotikleri ve türevleri.
  - b. Asetat ve propionat içeren antibiyotikler. Yağ asitlerinin biyosentetik yol izinden türelenmektedirler (poliketit sentezi).

- c. Terpenoidler. İsopiren sentezinden türevlenirler, sadece funguslar ve bazı aktinomisetler tarafından üretilirler.
- d. Aminoglikozitler. Birkaç şeker molekülünün yoğunlaşması ile (genellikle amino şeker ve siklik aminoalkol) meydana gelenler (Lancini ve ark., 1995).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavi edilmesinde ya da önlenmesinde kullanılan, kimyasal yapıları belli olan veya yapay olarak elde edilen maddelere kemoterapötik; doğal kaynaklı olanlarına ise antibiyotik denilse de, günümüzde kullanılan antibiyotiklerin çoğunun sentetik ya da yarısentetik yöntemlerle elde edilebildiğinden, antibiyotik deyimini tedavide kullanılan kemoterapötik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılmaktadır (Usta, 2012). Antibiyotik ve kemoterapötik maddelerin, mikroorganizmalar üzerine zararlı etkisi fazla olmasına rağmen; bu etki konak organizma üzerine yok denecek kadar azdır. Yani bu maddeler mikroorganizmaya zarar verirken, makroorganizmaya zarar vermemektedirler.

Kimyasal bir maddenin kemoterapötik madde olarak kullanılabilmesi için seçici toksisiteye sahip olması gerekir. Diğer bir ifadeyle, söz konusu madde, parazitleri inhibe etmeli veya öldürmeli fakat konakçı hücrelerine az veya hiç zarar vermemelidir. Ayrıca hücre ve dokulara penetrasyon özelliğine sahip olmalı ve konakçının doğal savunma mekanizmasını bozmamalıdır (Özçelik, 1998).

Sidal ya da statik etkili olabilen antibiyotikler mikroorganizmaların; kimyasal yapılarına, üretici organizmaya, etki spektrumlarına, ortam şartlarına ve hücrede etkili oldukları hedef bölgelere (Şekil 2.3) göre farklı gruplara ayrılmaktadır (Tabarez, 2005).



Şekil 2.3. Bazı antibiyotikler ve bakteri hücresinde hedef aldıkları bölgeler (Tabarez, 2005)

### 2.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler kimyasal yapılarına göre on gruba ayrılır (Berdy, 1974).

1. Karbonhidrat yapılu antibiyotikler (Saf sakkaritler, aminoglikozitler, diğer C ve N glikozitler, diğer şeker derivatları).
2. Makrosiklik lakton (Laktam) antibiyotikler (Makrolit antibiyotikler, Polyen antibiyotikler, diğer makrosiklik lakton antibiyotikler, makrolaktam antibiyotikler).
3. Kinonlar ve benzer antibiyotikler (Lineer kondanse polisiklik bileşikler, naftokinon türevleri, benzokuinon türevler, çeşitli kinon benzeri bileşikler).
4. Aminoasit, peptit antibiyotikler (Aminoasit türevleri, homopeptitler, heteromer peptitler, peptolitler, yüksek molekül ağırlıklı peptitler).
5. Nitrojen içeren heterosiklik antibiyotikler (Kondanse olmamış (tek) heterosiklikler, kondanse heterosiklikler, antibiyotik (antitümör) etkili alkaloidler).
6. Oksijen içeren heterosiklik antibiyotikler (Furan türevleri, piran türevleri, benzopiran türevleri, küçük laktonlar, polieter antibiyotikler).
7. Alisiklik antibiyotikler (Sikolakton türevleri, küçük terpenler, oligaterpen antibiyotikler).
8. Aromatik antibiyotikler (Benzen bileşikleri, kondanse aromatik bileşikler, nanbenzoid aromatik bileşikler, aromatik bileşiklerin farklı türevleri).

9. Alifatik antibiyotikler (Alkan türevleri, alifatik karboksilik asit türevleri, S veya P içeren alifatik bileşikler).
10. Miselli antibiyotikler.

#### 2.4. Antibiyotik Ekolojisi

Mikroorganizmalar denizlerin en derin kısmından gökyüzünün en üst tabakalarına kadar geniş bir alana yayılmış durumdadırlar. Ancak en fazla buldukları ortam topraktır (Yıldırım, 2004). Çünkü toprakta mikroorganizmaların yaşamı için gerekli olan su, hava, oksijen, mineral maddeler, karbon ve azot kaynakları bulunmaktadır. Toprağın mevsimlere göre değişen ısı ve pH seviyeleride farklı olduğundan her toprak tipine uygun bir toprak mikroflorası mevcuttur. Bu yüzden bir gram toprakta milyonlarca mikroorganizma yaşamaktadır. Mikroorganizma sayısının fazla olmasından dolayı mikroorganizmalar arasında bir rekabet gelişir. Bu rekabette birbirlerinin yaşamını engellemek için kendi ürettikleri toksik maddeleri kullanarak kendileri için daha geniş alan, organik madde, su gibi faktörlere sahip olmaya çalışırlar. Bu durum yeni antimikrobiaların keşfi için araştırmacıların en sık kullandığı materyal olarak toprağı seçip analiz etmelerinin sebebidir (Yıldırım, 2004). Toprakta organizma gruplarının ortalama sayıları aşağıdaki Çizelge 2.1’de verilmiştir (Özşen, 2009).

**Çizelge 2.1.** Topraktaki organizma gruplarının ortalama sayıları (Özşen, 2009)

Organizma Grupları	1 g Topraktaki Organizma Sayısı (x1000)
Bakteriler	
Direkt Metod	2500000
İndirekt Metod	15000
Aktinomisetler	700
Mantarlar	400
Algler	50
Protozoa	30

## 2.5. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Antibiyotiklerin etki mekanizmaları genellikle beş gruba ayrılmaktadır. Günümüzde kullanılan bazı antibiyotikler ve mikroorganizmalara etki şekilleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı antibiyotikler ve etki şekilleri (Öner, 1989; Schlegel, 1995)

Grup	Alt Grup/ Örnek	Etki Şekli
<b>β-Laktamlar</b>	<b>Penisilinler</b> Metisilin Aminopenisilinler Piperasilin Ampisilin	Hücre Duvarı Sentezini Durduranlar
	<b>Sefalosporinler</b> Sefalordin Sefalotin Sefagisin	
	<b>Monobaktamlar</b> Aztreonam	
	<b>Karbapenemler</b> Imipenem Meropenem	
<b>Peptidler</b>	<b>Glikopeptidler</b> Vankomisin Teikoplanin Avoparsin	
<b>Tetrasiklinler</b>	Tetrasiklin Minosiklin Klortetrasiklin	
<b>Makrolidler</b>	Eritromisin Azitromisin Oleandomisin Spiramisin Tilosin Karbomisin	Protein Sentezini Baskılayanlar
<b>Aminoglikozidler</b>	Gentamisin Tobramisin Streptomisin Kanamisin	
<b>Nitrofurantoin</b>	Nitrofurantoin	DNA Hasarı
<b>Metronidazol</b>	Metronidazol	
<b>Quinolonlar</b>	Siprofloksasin Ofloksasin Norfloksasin Nalidiksik asit	DNA Sentezini Baskılayanlar

### **2.5.1. Hücre Duvar Sentezini İnhibe Etme**

Bakteri hücre duvarı bakterinin bütünlüğünü koruyan, bölünme ve çoğalmasını sağlayan murein denilen bir polimer bileşikten meydana gelen kısımdır. Murein tabakası lineer peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirlerine bağlanmasıyla oluşan mukopolisakkarit bir yapıdadır. Gram negatif bakterilerde hücre duvarı Gram pozitif bakterilere göre daha incedir ancak dış katmanında lipopolisakkarit-lipoprotein yapılı ikinci bir tabaka bulunmaktadır. Bakterilerde dış ortamdan aktif taşıma sistemiyle alınan suda çözülmüş bir çok madde sitoplazmada konsantre edilerek hücre içi osmotik basıncı yükseltmektedir. Hücre duvarı sayesinde oluşan osmotik basınca karşı bir direnç oluşmakta böylece hücre bütünlüğü korunmaktadır (Tunail, 2009).  $\beta$ -laktam antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler), glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin), novobiosin, basitrasin, sikloserin gibi antimikrobiyal maddeler bakteri hücre duvarının sentezlenmesinde, hücre çeperindeki temel madde olan peptidoglikan oluşumunda rol oynayan transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerinin işlevlerini bloke ederek biyokimyasal yapıyı bozar ve bakteri hücrelerinin ölmesine neden olur (Öztürk, 1997).

### **2.5.2. Hücre Zarı İşlevini Bozma**

Hücre zarı mikroorganizmalar için gerekli olan maddelerin dış ortamdan membran içerisine pasif difüzyon ve aktif taşıma ile alınarak osmotik bir bariyer görevi görmektedir. Polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, imidazoller gibi antibiyotikler sitoplazma membranının geçirgenliğini artırıp sitoplazma içerisinde bulunan ve yaşamsal önemi olan aminoasit, nükleotit ve potasyum gibi maddelerin hücre dışına çıkmasını sağlayarak mikroorganizmanın ölmesine neden olmaktadır (Cingi ve Erol, 1996). Bu maddeler üremesi tamamlanmış mikroorganizmalara da etkili olurlar. Örneğin katyonik deterjan etkisi yapan polimiksinler bakteri hücre zarındaki fosfolipidlerin fosfat bölümleriyle birleşir, kendi moleküllerinin lipofilik bölümünü hücre zarı lipidlerine yerleştirerek bozarlar. Böylece mikroorganizmanın geçirgenliği artar, osmotik denge bozulur ve hücre içeriği dışarı sızar (Öztürk, 1997; Akbulut, 2012).



### **2.5.3. Protein Sentezini Baskılayanlar**

Bakterilerin protein sentezini inhibe eden çok çeşitli antibiyotik (aminoglikozitler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolitler, linkozamitler) grupları vardır. Bunların bir kısmı bakterilerin ribozomları ile birleşip orada mRNA tarafından yönetilen protein sentezini bozmakta ya da anormal proteinlerin sentezlenmesine neden olmaktadır (Ayanoğlu-Dülger, 1990). Bu tür antibiyotikler genellikle geniş spektrumlu olup, bakteriyostatiktirler ve ribozom yapılarından dolayı memeli hücrelerindeki protein sentezine etki etmezler. Bu grup ilaçlar ribozomlarda farklı etkilere neden olurlar;

1. Aminoasitlerin aktivasyonunu yani tRNA'ya bağlanmasını baskılama.
2. mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını veya aminoasit-tRNA bileşiğinin ribozom-mRNA kompleksine bağlanmasını baskılama.
3. Peptidil transferaz etkinliğini azaltarak peptid bağları oluşumunu baskılama.
4. mRNA üzerindeki kodonların, tRNA'lar tarafından yanlış okunmasına neden olma (Öztürk, 1997; Akbulut, 2012).

### **2.5.4. Nükleik Asit Sentezini Baskılayanlar**

Bu tip etki gösteren antibiyotikler (rifampin, nalidiksik asit ve diğer kinolonlar, nitrofuranlar, vidarabin, asiklovir, griseofulvin, nitroimidazole türevleri), genetik materyal içerisinde DNA sentezini veya DNA sentezi altında yapılan mRNA sentezini bozarak etki göstermektedirler. Bu maddeler deoksiguanozinlere bağlanarak DNA ile bileşikler yaparlar. Böylece DNA'ya bağlı olan RNA polimerazı inhibe ederek, mRNA'nın oluşmasını önlerler (Öztürk, 1997). Kinolonlar bu işlemi DNA replikasyonunu önleyerek yaparken, rifampin transkripsiyonu önleyerek yapmaktadır (Durupınar, 2001).

### **2.5.5. İntermediyer Metabolizmayı Bozanlar (Antimetabolitler)**

Bu sınıftaki antibiyotikler (sulfonamidler, izoniazit (INH), PAS, ethambutol, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (trimethoprim, primetamin), 5- fluorositozin vb.) bakterinin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini bozmaktadırlar. Örneğin, sulfonamidler dihidropteroat sentetazı inhibe ederek paraaminobenzoik asit (PABA) ve pteridinden dihidropteroik asit sentezini bozarlar ve dihidrofolik asidin ve

dihidrofolat redüktazla bundan oluşan tetrahidrofolik asidin yapımı azalır. Böylece pürin bazları ve timidinin yapımını sağlayan enzimlerin kofaktörü olan tetrahidrofolat türevleri yapılamaz ve bakterilerde DNA ve RNA sentezi bozulur (Öztürk, 1997).

Bunların yanında antibiyotikler etkili oldukları bakteri türlerinin genişliğine bağlı olarak dar, orta ve geniş spektrumlu olarak sınıflandırılmaktadır (Gangle, 2005). Eğer antibiyotik bir veya birkaç bakteri türüne etkili ise buna “*dar spektrumlu antibiyotik*”, çok sayıda bakteri ve diğer mikroorganizma türlerine karşı etkili ise “*geniş spektrumlu antibiyotikler*” denilmektedir. “*Orta spektrumlu antibiyotikler*” ise genellikle Gram negatif bakteri türlerine karşı azaltılmış aktiviteli maddeler içermektedir (Ayanoğlu-Dülger, 1990; Gangle, 2005).

## **2.6. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları**

Antibiyotikler genellikle kimyasal tedavide kullanılmak üzere, antimikrobiyal etkili madde olarak üretilmektedir (Crueger ve Crueger, 1984). Bunlar daha çok tıp alanında kullanılmalarının yanı sıra ziraatte patojenlere karşı, hayvancılıkta ağırlık artışı için katkı maddesi olarak ve hatta araştırma laboratuvarlarında biyokimyasal ve kültür ortamında seçici ajan olarak da kullanılmaktadır (Yıldırım, 2004).

### **2.6.1. Antibiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı**

Antibiyotikler günümüzde, klinik tedavide en önemli olan ve en çok tercih edilen ilaçlar arasındadır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi, antibiyotik veya diğer antimikrobiyal maddelerin sistematik bir şekilde ilaç olarak verilmesiyle, mikrobiyal kaynaklı hastalıkların tedavi edilmesi olarak ifade edilmektedir (Yıldırım, 2004).

### **2.6.2. Antibiyotiklerin Hayvancılıkta Kullanımı**

Antibiyotikler, hayvanların çeşitli enfeksiyonlara karşı korunmasında, hayvancılıkta ağırlık artışının olması için besin katkı maddesi olarak ve besinlerin muhafazasında biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak kullanılmaktadır.

İlk defa 1948’de diyetlerde düşük dozda antibiyotiklerin kullanımı ile tavuklarda ağırlık artışının gözlemlendiği rapor edilmiş ve daha sonraki yıllarda farklı antibiyotikler ile farklı

hayvanlarda yapılan çalışmalarda bağırsak bakteri florasının etkilenmesi sonucunda ağırlık artışı olduğu saptanmıştır (Yıldırım, 2004).

Büyüme üzerine antibiyotiklerin etkisi, aşağıda verilen nedenlere dayandırılmıştır: (Lancini ve ark., 1995).

1. Toksin üreten bağırsak bakterilerinin baskılanmasına,
2. Asemptomik hastalıklara neden olan bakterilerin baskılanmasına,
3. Diyetlerde sequester proteinler veya esansiyel besinleri parçalayan bakterilerin baskılanmasına,
4. Floranın bir bölümünün baskılanması sonucunda konağın büyümesi için gerekli besin faktörlerini sentezleyen bakterilerin uyarılmasına dayandırılmıştır.

Antibiyotiklerin hayvancılıkta kullanılmaya başlamasının ilk yıllarında medikal amaçlı olarak penisilin, tetrasiklin, eritromisin, streptomisin; besin katkısı olarak da klortetrasiklin, eritromisin gibi antibiyotikler birçok ülkede kullanılmıştır. Fakat daha sonra birçok Avrupa ülkesi ve Japonya'da bu tip antibiyotiklerin artan kullanımlarından dolayı besin kaktısı olarak kullanılması yasaklanmıştır (Denizci, 1996).

### **2.6.3. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı**

Bugün birçok antibiyotik, tehlikeli etkileri olan bakteriyal, fungal, viral enfeksiyonlara, böceklerin ve diğer parazitlerin neden olduğu hastalıklara karşı hatta, rekabetçi otlara karşı kültür bitkilerini bu hastalıklara karşı korumak için tarımda kullanılmaktadır (Lancini ve ark., 1995).

Antibiyotiklerin tarımdaki uygulamaları şu şekilde sıralanabilir (Lancini ve ark., 1995):

1. Bakteriyal enfeksiyonların kontrolünde kullanılanlar; bu amaçla genellikle insanlar için geliştirilmiş olan ve kullanılan streptomisin, özellikle *Erwina sp.* ve *Xhantomonas sp.* enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır.
2. Fungal enfeksiyonların kontrolünde kullanılanlar; bunların bir çoğu *Piricularia oryzae* türüne karşı etkili olan blastisidin S gibi nükleosid ve polioksine aittir. Diğer önemli antifungal antibiyotikler ökaryotlarda protein sentezi inhibitörü olarak bilinen siklohegzimid ve kasugamisindir.
3. Yabancı ot kontrolünde herbisit olarak kullanılanlar (Denizci, 1996).

#### 2.6.4. Antibiyotiklerin Laboratuvarlarda Araştırma Materyali Olarak Kullanımı

Günümüzde birçok antibiyotik klinikte tedavi amaçlı kullanılsa da, biyokimyasal araç olarak kullanılan çeşitleri de bulunmaktadır. Bu antibiyotiklerden bazıları enzim inhibitörü olarak kullanılıp hücrel metabolizmada görev alan bir molekülün işlevinin saptanmasında kullanılır. Örneğin, protein sentezinde birçok ayrıntılı bilgi, kloramfenikol ve siklohegzimidinin inhibitör olarak kullanılması ile ortaya çıkarılmışlardır (Waksman, 1967; Umezawa ve ark.,1972; Lancini ve ark., 1995).

Bu gibi antibiyotiklerden, prokaryot ve ökaryotlarda RNA polimeraz arasındaki farklılık rifamisin kullanımı ile saptanmıştır. Bunların yanında antibiyotikler, birkaç genetik işlemde belirteç olarak veya konjugasyon denemelerinde verilen karakterlerdeki mikroorganizmaları seçmek amacı ile ve hedef enzim inhibisyonu sonucunda, hedef enzimin genetik haritada gen pozisyonunun belirlenmesinde, bir veya daha çok antibiyotik direnç genleri taşıyan vektörlerin gen transferi için kullanıldığı genetik mühendisliğin bütün işlemlerinde ve rekombinant klonların seçiminde kullanılmaktadır (Lancini ve ark., 1995). Leben ve Keitt tarafından, 1948 yılında bulunan ve *Streptomyces kistazawaensis*, *St. griseus*, *St. blastomyces*, *St. flavochromogenes* tarafından üretilen antimisin, solunumun elektron taşıma sistemlerinde, oksidatif inhibitör olarak biyokimya laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Berdy, 1986).

#### 2.7. Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal ilaçlar hiçbir zaman gelişigüzel kullanılmamalıdır; enfeksiyonun teşhisi yapılsa bile, izole edilen primer etkenin duyarlılığının (antibiyoqram) belirlenmesi gerekmektedir. Kemoterapötik ajanların, mikroorganizmalara olan etkilerinin spektrumu oldukça farklıdır. Bazıları çok az türdeki mikroorganizmaya etkiliyken, bazıları çok daha fazla cins ve türdeki hastalık ajanlarına toksik etki yapmaktadırlar (Arda, 2000).

Bir mikroorganizmaya karşı belli bir antibiyotiğin etkinlik gösterememesi durumu **antibiyotik direnci** olarak adlandırılmaktadır. Bu direnç mikroorganizmalar arasındaki yapısal farklılıklardan olabileceği gibi başlangıçta etkiliyken sonradan etkisiz hale gelmesine neden olan çeşitli mekanizmalardan da kaynaklanabilmektedir. Bu direnç

durumu, *in vitro* olarak, ideal laboratuvar şartlarında ve uygun kontroller yapılarak bir antibiyotiğin bir mikroorganizmaya karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ya da minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) değerlerinin ölçülmesi ile belirlenmekte olup buna göre dirençli, orta dirençli ya da duyarlı kavramları arasındaki sınırlar ortaya konulmaktadır (Scott, 2005). Antimikrobiyal direnç, antibiyotiğin tedavi edici dozlarına karşı oluşan direnç olup, bu doz yükseltildiğinde mikroorganizma duyarlı olarak bulunabilse de bu durum klinik açıdan anlamlı bulunmamaktadır (Bozkaya, 2002).

Geçmişten bu güne kadar, insanlar ile mikroorganizmalar sürekli savaş halindedirler. Veba, tüberküloz, sıtma ve son zamanlarda HIV/AIDS, H1N1 veya H5N1 kaynaklı influenza salgınları gibi hastalıklara sebep olan mikroorganizma hastalıkları, insan topluluklarında çok sayıda kişiyi etkileyerek, ölümlere sebep olmuştur. Bakteriyal enfeksiyonlar açısından 1940'ların başlarında penisilinin bulunması ve antibakteriyal ilaçlarla ilgili yapılan çalışmaların katkısı ile durum düzelmiş, fakat kısa süreli olmuştur. Antibakteriyal ajanların yaygın olarak kullanılmaya başlanmasından hemen sonra bakteriler bu duruma çeşitli direnç mekanizmaları ile karşılık vermişlerdir. Antimikrobiyallerin yaygın olarak kullanımı artıkça bakteriyal patojenler tarafından ortaya konan direnç mekanizmaları da artmış ve bu durum karmaşık bir hal almıştır. Böylece insanların enfeksiyonlara karşı üstün gelme çabası günümüze kadar devam etmiştir (Kuyucu, 2007).

Günümüzde sentetik antimikrobiyal maddeleri tanımlama ve geliştirme aşamalarının yüksek maliyetler gerektirmesi ve zamanın verimli kullanımı gerekliliğinden, çalışmalar doğal aktif bileşenleri bulma ve geliştirme alanına doğru yön değiştirmiştir. Antimikrobiyal maddeler doğal kaynaklardan elde edildiğinde, sentetik maddelerin neden olduğu yan etkilerinin de ortadan kalkacağı ve bazı antibiyotiklere karşı direnç oluşturmuş türler için de alternatif olabilecekleri düşünülmektedir. MRSA ve vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) insan sağlığını ciddi anlamda tehdit eden, çoklu direnç gösteren türlerdir (Lampinen, 2005). Günümüzde hala bu türler için yeni antibiyotikler aranmaktadır. Fakat son yıllarda yeni antibiyotiklerin bulunması oldukça azalmıştır (Wise, 1998). 1980 sonrası, antimikrobiyal madde arayan birçok kurum finansal zorluk nedeni ile çalışmalarını sonlandırmış, bu konuda sadece önemli araştırmalar devam etmiştir. Sonuca bakıldığında mikroorganizmalar ile yapılan savaşta

mikroorganizmalar hiçbir zaman teslim olmamış, ancak ilaç firmaları ve yapılan araştırmalar onları kısmen teslim almıştır (Varaldo, 2002).

### 2.7.1. Antimikrobiyal Direnç Çeşitleri

Bakteriler antibiyotiklere karşı temel olarak iki şekilde direnç göstermektedir. Bunlardan ilki bakterinin kalıtsal özelliklerinden kaynaklanan ve bakteride doğal olarak her koşulda var olan **doğal** (intrinsik) **direnç**, ikincisi ise bakterinin aslında önceden kalıtsal özellikleri arasında bulunmayan fakat farklı mekanizmalarla (kromozomal direnç, plazmidler, transpozonlar, integronlar) sonradan sahip olabildiği **kazanılmış** (Non-intrinsik) **direnç** (Karaaslan, 2013). Çizelge 2.3’de bazı antibiyotiklerin hangi mikroorganizmalardan elde edildikleri, kullanıma girişi ve direnç bildiriliş tarihleri gösterilmektedir (Baquero ve Canton, 2009; Akbulut, 2012; Karaaslan, 2013).

**Çizelge 2.3.** Bazı antibiyotiklerin kullanıma giriş ve direnç bildiriliş tarihleri (Baquero ve Canton, 2009)

Antibiyotik	Keşfedilişi (kullanıma girişi)	Direnç Bildirilişi	Organizma
Sülfonamid	1935(1936)	1939	<i>S.pneumoniae</i>
Penisilin G	1940(1943)	1940	<i>S.aureus</i> , <i>S.pneumoniae</i>
Streptomisin	1944(1947)	1947	<i>E.coli</i> , <i>M.tuberculosis</i>
Tetrasiklin	1948(1952)	1952	<i>S.dysenteriae</i>
Eritromisin	1952(1955)	1956	<i>S.aureus</i>
Vankomisin	1956(1972)	1988, 2004	<i>E.faecalis</i> , <i>S.aureus</i>
Metisilin	1959(1961)	1961	<i>S.aureus</i>
Gentamisin	1963(1967)	1969	<i>K.Pneumoniae</i> <i>P.aeruginosa</i>
Nalidiksik asit	1962(1964)	1966	<i>E.coli</i>
Sefotaksim	1975(1981)	1981, 1983	<i>Enterobacteriaceae</i>
İmipenem	1976(1987)	1986	<i>P.aeruginosa</i> <i>S.marcenses</i>
Linezolid	1979(2000)	1999	<i>S.aureus</i> , <i>E.faecalis</i>
Daptomisin	1980(2004)	2005	<i>S.aureus</i> , <i>E.faecalis</i>
Tigesiklin	2005	2007	<i>A.baumannii</i> <i>K.pneumoniae</i>
Kolistin	1947(1959)	1995	<i>P.aeruginosa</i>

### **2.7.1.1. Doğal (İntrinsik) Direnç**

Bir mikroorganizmanın ilaç kullanımıyla bir ilgisi olmayan, yapısal özelliği nedeniyle dirençli olması anlamına gelen ve kalıtsal özellikte olan direnç tipidir (Öztürk, 2008). Bir türün tüm suşlarında aynı antibiyotik gruplarına karşı direnç gösterilebilmektedir. Doğal direnç, bakterinin antibiyotiğin hedef aldığı yapıyı içermemesi, antibiyotiğin bakteri içerisine girişininin sağlanamaması veya aktif olarak dışarı atılması ve bakterinin antibiyotiği parçalayan enzimler üretmesi gibi farklı şekillerle gerçekleşebilmektedir. Örneğin, *P. aeruginosa*'da aktif dışarı atılım pompaları ile tetrasiklinlerin, sülfonamidlerin ve kloramfenikolün bakteri içerisindeki hedef bölgeye ulaşamamaları, Enterokoklarda, tüm sefalosporinlerin etkin bir şekilde bağlanıp baskılayabilecekleri penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) bulunmaması nedeniyle görülen sefalosporin direnci ve Gram negatif bakterilerde vankomisin dış membranı geçememesi nedeniyle gözlenen vankomisin direnci doğal direnç tiplerine verilebilecek en yaygın örneklerdir (Bozkaya, 2002; Scott, 2005; Tenover, 2006; Karaaslan, 2013).

### **2.7.1.2. Kazanılmış (Non-intrinsik) Direnç**

Kazanılmış direnç, bakterilerin kromozomal ya da ekstrakromozomal (plazmidler, transpozonlar, integronlar) olarak genetik özelliklerindeki değişimlerden dolayı direnç kazandıran genler aracılığıyla başlangıçta duyarlı oldukları antimikrobiyal ajanlara karşı sonradan direnç kazanmalarındır (Bozkaya, 2002; Tenover, 2006). Kazanılmış direnç doğal dirençten farklı olarak, bir türün tüm suşlarında görülememekte ve aynı türün farklı suşları arasında direnç seviyeleri açısından farklılıklar gözlenebilmektedir. Bir antibiyotiğe direnç kazanmış olan mikroorganizmanın, benzer bir mekanizma ile etki eden başka antibiyotiklere karşı da direnç kazanması olayına çapraz direnç denilmektedir. Antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç ile hücrenin geçirgenliği azalabilmekte ya da hedef bölgelerinde değişiklik meydana gelerek, bu şekilde oluşan genetik değişim sonucunda dirençli kökenler ortaya çıkıp yayılmaktadır. Bakteriler, mutasyon ve seçilim yoluyla genetik bilgiyi başka bir bakteri veya dış ortamdan almak suretiyle ekstrakromozomal kazanılmış dirence sahip olabilmektedir. Bu durum, antibiyotiğin hedef aldığı yapının üretildiği gen bölgesinde bir nokta mutasyonu

aracılığıyla olabileceği gibi bir DNA baz dizisinin çıkartılması, eklenmesi ya da yerinin değişmesi sonucunda gerçekleşebilmektedir (Bozkaya, 2002; Karaaslan, 2013).

Ekstrakromozomal direnç, aynı türün farklı suşları ya da farklı türler ve cinsler arasında konjugasyon, transdüksiyon ya da transformasyon yoluyla meydana gelen genetik değişim sonucunda gerçekleşmektedir. Konjugasyon sırasında bakteri, direnç genlerini içeren plazmidi pilileri aracılığıyla diğer bir bakteriye aktarmakta; transdüksiyon, dirençli genin bir bakteriden diğerine bakteriyofaj aracılığıyla aktarılmasıyla gerçekleşmekte; transformasyon ise, bir bakterinin hücre lizisi sonucunda ortama bıraktığı DNA parçasının başka bir bakteri tarafından alınıp genetik metaryele dahil edilmesiyle meydana gelmektedir. Bu olaylar sırasında genomda kendini kopyalayarak ya da bulunduğu bölgeden ayrılarak farklı noktalara entegre olabilen hareketli gen parçaları olan transpozonlar, kazanılmış direnç geninin konak genomuna ya da plazmidlere transferini kolaylaştırabilmektedir. Ayrıca integron adı verilen hareketli DNA parçaları, kendileri direnç genlerini kodlamasalar da plazmid veya kromozomlar arasında homolog rekombinasyon alanları oluşturarak yeni direnç genlerinin yayılmasına yol açabilmektedirler (Bozkaya, 2002; Tenover, 2006; Karaaslan, 2013).

## **2.7.2. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları**

Mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlardan korunmak için onlara karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bakterilerde enzimatik inaktivasyon, geçirgenliğin azalması, antibiyotığın hücre dışına aktif pompa sistemi ile atılması (efflux), hedef molekülün değişmesi, hedef bölgenin korunması, hedefin aşırı üretimi ve hedefin bypass edilmesi gibi çeşitli direnç mekanizmaları bulunmaktadır (Opal ve Medeiros, 2005).

### **2.7.2.1. Enzimatik İnaktivasyon**

Mikroorganizmaların antibiyotikleri inaktive edici enzimler sentezlemesi, günümüzde yaygın olarak gözlenen direnç mekanizmalarındandır. Antibiyotiklerin birçoğunda, yapısal bütünlüğü ile biyolojik aktivitesini sağlayan ve hidrolitik enzimlere duyarlı olan çeşitli kimyasal bağlar bulunmaktadır (Wright, 2005). Mikroorganizmaların yapısında da bu bağları hedef alan bazı enzimler bulunabilmekte ve böylece mikroorganizmalar



bu enzimler sayesinde antibiyotiğin yapısı ve bütünlüğünü bozarak direnç sağlayabilmektedirler.  $\beta$ -laktam antibiyotiklerini (penisilinler, sefalosporinler) parçalayan  $\beta$ -laktamazlar, aminoglikozidleri ve kloramfenikölü parçalayan asetil transferaz ve eritromisini inaktive eden esteraz enzimleri bu gruba girmektedir (Bennett ve Geme, 1999).

$\beta$ -laktam antibiyotiklerine direnç durumu,  $\beta$ -laktam halkasındaki amid bağının ayrılmasına yol açarak antibiyotiği inaktive eden,  $\beta$ -laktamaz üretimine bağlıdır.  $\beta$ -laktamaz üretimi başta *Enterobacteriaceae* üyelerinde olmak üzere Gram negatif bakterilerin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direncindeki en önemli mekanizmadır (Yorgancıgil, 1999). Gram negatif bakteriler,  $\beta$ -laktamazları bakterinin peptidoglikan tabakası ile sitoplazma zarı arasında bulunan periplazmik aralığa döker, burada antibiyotiği etkisiz hale getirerek, antibiyotiğin bakteri hücre duvarına ulaşmasına engel olmaktadır (Öztürk, 2002). Kromozomal ya da plasmid veya transposonlarda lokalize transfer edilebilen genlerce kodlanan birçok  $\beta$ -laktamaz enzimi vardır (Medeiros, 1997). Amino asit ve nükleotid dizilimlerine göre 890'dan fazla farklı çeşitte dört sınıf (Sınıf A, B, C ve D)  $\beta$ -laktamaz tanımlanmıştır (Canton ve Garbalosa, 2011).

Geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar (GSBL), 1983 yılında seftazidim ve sefotaksim klinik kullanıma girmesinden hemen sonra *E. coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında direnç ortaya çıkmış ve bu bakterilerde yeni  $\beta$ -laktamazlar bulunmuştur. GSBL'ler  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile inaktivasyona duyarlılık gösterdiğinden, sefamisinleri ve karbapenemleri hidroliz edemezler. Bu durum bakterilerde ki genetik geçmişin kompleks olduğunu ve diğer  $\beta$ -laktamazları üreterek  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerinin etkinliğini azalttığını düşündürmektedir (Papanicolaou ve ark., 1990; Kuyucu, 2007).

Enzimatik inaktivasyonda  $\beta$ -laktamazların dışında, aminoglikozid grubu antibiyotiklerin 16S rRNA ile etkileşimini bozarak direnç sağlayan aminoglikozid asetiltransferazlar, kloramfenikol ve streptogramine karşı direnç kazandıran asetiltransferazlar, makrolid esterazlar, epoksidazlar, fosfotransferazlar gibi birçok farklı inaktive edici enzim de antibiyotik direncinde rol almaktadır (Wright, 2005; Karaaslan, 2013).

Aerobik bakterilerdeki aminoglikozid direnci genellikle modifiye edici plasmidler, transpozonlarla taşınan enzimler ve kromozomlar üzerindeki genlerle kodlanan enzimlere bağlıdır. Enzimatik aminoglikozid direnci, sitoplazma membranını geçerken antibiyotiğin modifiye edilmesi ile oluşur. Farklı aminoglikozidlere karşı oluşan direnç,

ilaç etkileşim hızına karşılık ilaç inaktivasyon hızındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Direnç seviyesini belirleyen önemli bir faktör de, antibiyotiği modifiye edici enzim bir aminoglikozid için yüksek afiniteye sahipse, ilacın inaktivasyonu çok düşük konsantrasyonlarda olsa dahi gerçekleşir (Opal ve Medeiros, 2005; Karaaslan, 2013).

### **2.7.2.2. Geçirgenliğin Azalması**

Beta-laktamlara bakteri direncinde hücre membran geçirgenliğinin azalması Gram negatif mikroorganizmalarda daha önemlidir. Bunun nedeni Gram negatif bakterilerin Gram pozitiflerden farklı olarak bir zar ve kovalent bağlarla birbirine bağlı peptidoglikandan oluşan dış membrana sahip olmalarıdır. Gram negatiflerde bu dış membranda içi su dolu kanallar içeren moleküler bir elek görevi gören porinlerden yapılmış porlar bulunmaktadır.  $\beta$ -laktam gibi küçük hidrofilik moleküller bu kanallar aracılığıyla organizma içerisine girer. Porinlerin, yükü, çözünürlüğü, büyüklüğü ve sayıları antibiyotiğin hücre içine giriş hızını belirler. Porinlerin sayı ve yapılarındaki bu değişiklik membran geçirgenliğinde azalmaya neden olarak Gram negatiflerin antibiyotiklere direnç kazanmasına neden olmaktadır. Ayrıca mutasyonlar ile membran porin proteinlerinin değişimi ile de geçirgenlik azalarak direnç gelişebilmektedir. Örneğin *P.aeruginosa* suşlarında kromozomal  $\beta$ -laktamaz aktivitesi ve D2 porinin değişmesine bağlı olarak imipenem direnci ortaya çıkmaktadır (Akbulut, 2012; Kuyucu, 2007). Antibiyotiklerden, aminoglikozidlerin dış membranı geçtikten sonra sitoplazmik membrandan da geçmesi gerekmektedir. Bu geçiş, enerji ve proton hareket ettirici güçlerle gerçekleştirilmektedir. Bu sistemdeki değişme ile birlikte aminoglikozidlere uzun süreli tedavi esnasında geri dönüşümlü direnç gelişebilmektedir. *E.coli*, *S.aureus* ve *Salmonella spp.* suşlarında hatalı elektron taşıma sistemleri sonucunda oluşan direnç bu şekilde tanımlanmaktadır (Kuyucu, 2007). Geçirgenliğin azalmasına bağlı olan direnç özellikle enzimlerle destekleniyorsa önemli derecede bir dirence sebep olmaktadır (Yorgancıgil, 1999).

### **2.7.2.3. Antibiyotiğin Aktif Pompa Sistemi ile Dışarı Atılması (Efflux)**

Aktif pompa sistemi, farklı sınıftaki antibiyotiklerin parçalanmadan enerjiyle dışarı atılmaları olayıdır. Antimikrobiyal ajanların aktif atılımı birçok patojende gittikçe artan sıklıkta dirençten sorumlu mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. *Escherichia coli*,

*Shigella* ve diğ er enterik mikroorganizmaların bazı suşları ilaç atılımı ile çoklu ilaç direncine yol açan çok bileş enli, düzenli ve enerji bağı mlı membran taşı ma sistemine sahiptirler. Bu enerji bağı mlı sistem ile antibiyotikler hücre içinde birikememekte ve dış arı atılmaktadırlar (Chopra ve Roberts, 2001; Kuyucu, 2007).

Gram negatif mikroorganizmalardaki tetrasiklin direncinden ço ğ unlukla bu mekanizma sorumludur. Aktif pompa sistemleri, kinolonlar, makrolidler, streptograminler ve azalidler, kloromfenikol ve  $\beta$ -laktamlara karşı oluş an direnç ten sorumlu mekanizma aktif atılı mdır. Bu atılım mekanizması streptokoklarda *mef*, grup B streptokoklarında *mreA* ve stafilokoklarda *mrs* genleri tarafından kodlanmaktadır (Sutcliffe ve ark., 1996; Clancy ve ark., 1997; Kuyucu, 2007). Aktif atılım mekanizması *P. aeruginosa* suş larında  $\beta$ -laktam direncinin tam geliş imine de neden olmaktadır. Enterik bakteriler ve stafilokoklarda kinolonların aktif atılımı tespit edilmiştir. Bu atılım birden fazla antibiyotik direnç transporter (*norA*) veya spesifik kinolon atılım pompası (*EmrAB*, *AcrAB*) ile iliş kilidir. Gram negatif bakterilerdeki tetrasiklin direncinden de yine bu mekanizma sorumludur (Srikumar ve ark., 1997; Opal ve Medeiros, 2005; Kuyucu, 2007).

#### **2.7.2.4. Hedef Bölgelerinde Değ iş me**

Hedef bölgelerindeki değ iş iklik sonucu geliş en bu direnç , en sık görülen direnç mekanizmalarından biridir (Durupınar, 2001). Mikroorganizmalar, yapılarında bulunan ve antibiyotiğ in etkisi için hedef olabilen yapı birimlerinin birinde (ribozomlar ve çeş itli enzimler), değ iş iklik yaparak ya da bu hedefi ortadan kaldırarak direnç kazanabilmektedir (Wright, 2005). Bu direnç durumu daha çok penisilin ve safalosporin gibi  $\beta$ -laktam antibiyotiklerde görülmektedir.  $\beta$ -laktam antibiyotiklere Gram pozitif bakteri direnci, hem antibiyotiğ in PBP'lere olan affinitesinde azalma hem de bakteri tarafından üretilen PBP miktarında mutasyonla oluş an değ iş iklik ile antibiyotikler hedef bölgeye bağ lanamamakta ve antibiyotiğ in etkisine direnç oluş maktadır (Akbulut, 2012).

Tetrasiklinler, makrolidler, linkosamidler ve aminoglikozidleri içeren birden fazla antimikrobiyal ajan grubundaki direnç , ribozomal bağ lanma yerlerindeki değ iş me sonucu oluş muştur. Ribozomlar üzerindeki hedef bölgelere bağ lanmadaki yetersizlik, protein sentezini ve hücre büyümesini inhibe etme yersizliğ ine neden olmaktadır. Tetrasiklin direnci, tetrasiklinlerin ribozomlara bağ lanmasına engel olan *tetM* geni

aracılığıyla gerçekleşir. Ribozomal direnç diğer aminoglikozidlerde daha seyrek olsa da birden fazla mutasyon sonucunda gelişebilmektedir (Opal ve Medeiros, 2005). Enzimlerde meydana gelen değişiklik sonucunda ise antibiyotik enzime bağlanamaz ve böylece bakteride bu antibiyotiğe karşı direnç gelişir (Yüce, 2001; Kuyucu, 2007).

Glikopeptid antibiyotikler peptidoglikan tabakasının terminal ucunda bulunan D-alanin-D-alanine bağlanır. Büyük glikopeptid molekülleri hücre duvarı içinde bu bağlanma ile öncül moleküllerin birleşmesini önler ve direnç gelişir (LeClercq ve ark., 1992; LeClercq ve ark., 1992; Kuyucu, 2007).

Kinolonlarla ilişkili olarak DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan gyrA ve gryB genlerinde görülen nokta mutasyonları sonucu hücre duvar geçirgenliğinde azalma, dışa atılım ve enzim koruma mekanizmaları ile özellikle enterik bakterilerde çoklu direnç gelişimi gözlenmektedir (Nakamura, 1989).

#### **2.7.2.5. Antibiyotik İnhibisyonunun Bypass'ı**

Spesifik antibiyotiklere karşı gelişen bir diğer direnç mekanizması da, orijinal suştan farklı bir büyüme gereksinimi olan yeni suşların ortaya çıkması ile oluşur. Ancak bu mutantların hedef enzimler tarafından sentezlenen substratlara ihtiyaçları vardır. Eğer çevrede bu substrat varsa, organizma sentez yapan enzimin inhibisyonuna rağmen çoğalabilmektedir. Bu mekanizma ile sülfonamidlere ve trimetopirime yüksek düzeyde direnç gelişebildiği tanımlanmıştır (Opal ve Medeiros, 2005; Kuyucu, 2007).

### **2.8. Antibiyotik Pozitif Mikroorganizmalar**

1940'lı yıllarda yaklaşık 10-20 arasında antibiyotik keşfedilmiştir. 1950'lerde 300-400, 1960'da 800-1000, 1970'lerde ise 2500 antibiyotik bilinmekteydi. 1980'lerde bu sayı 5 bin, 1990'da 10 bin, 2000'ler de 20 bin olmuştur. 2010 yılına gelindiğinde sadece bu yıl da 24 bin ve 2012 yılında ise 27 bin biyoaktif sekonder metabolit (antibiyotikleri içine alan) ile ilgili bilimsel yayın yapılmıştır. Günümüzde ise yaklaşık 30 bin biyoaktif sekonder metabolit ile ilgili bilimsel yayın yapıldığı bilinmektedir (Balkar, 2007).

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmalar (bakteri, fungus, aktinomiset vs.), algler, likenler, bazı bitkiler ve çeşitli hayvan organizmaları tarafından üretilmektedir. Yeni keşfedilen antibiyotiklerin büyük çoğunluğu topraktan izole edilen "yabani" izolatların

araştırılıp incelenmesiyle keşfedilmiştir. Ancak antibiyotik üreten mikroorganizmaların taksonomi ve kimyasal yapılarında bazı düzenler ve sınırlamalar görülmektedir. Antimikrobiyal madde üretme yeteneğine sahip mikroorganizmalar, doğada geniş olarak bulunmasına rağmen, farklı mikroorganizma gruplarında orantılı olarak dağılmamışlar, sadece birkaç cins ile sınırlandırılmışlardır. Bu cinsler içinde aktinomisetler antibiyotiklerin esas üreticileri olarak kabul edilmişlerdir. Küflerden yaklaşık 1500 antibiyotik veya biyoaktif metabolit izole edilmiş, bunların 1/3'ü *Penicillium* ve *Aspergillus* cinslerine ait suşlardan elde edilmiştir. Bakterilerden yaklaşık 1200 antibiyotiğin *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsinden elde edildiği rapor edilmiştir (Yıldırım, 2004). Aktinomisetler tarafından üretilip rapor edilen 6000 kadar antibiyotik vardır. Bunların 3/4'ü *Streptomyces* cinsi suşlarından elde edilmiştir. Son yıllarda GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) laboratuvarında yapılan çalışmalarda *Myxobacterial* kökenli yaklaşık 100 farklı yapıda bileşik izole edilmiş, böylece çok az sayıda suş taranmasına rağmen *Myxococcus* ve *Sorangium* üretken bir grup olarak ortaya çıkmıştır (Yıldırım, 2004).

### 2.8.1. Bakteriler

Antimikrobiyal madde üretimi bakteriler tarafından sınırlı olsa da en çok antibiyotik elde edilen bakteri grubu *Bacillus* cinsine aittir. *Pseudomonas* ve *Enterobacteriaceae* cinsi üyeleri de antibiyotik üretiminde görev alan bakteri gruplarındandır. Bakteriler habitatlarındaki rekabete karşı antibiyotiklerin sağladığı antagonistik etki sayesinde bazı besin avantajlarına sahip olmaktadır. Ancak bunun yanı sıra, sporulasyon veya çimlenme ile ilişkili olan, hormon veya sinyal moleküllerinin antibiyotik aktiviteye neden olabileceği de söylenmektedir (Anonim, 2014c). *Bacillus* cinsi tarafından üretilen antibiyotiklerin çoğu peptid yapıdadır. *Pseudomonas* üyeleri tarafından çok sayıda sekonder metabolit üretilmesine rağmen, iodin ve pycyanine sadece *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens* türlerinden üretilmektedir. Peptidoglikan inhibitörleri, sikloserin ve fosfomisin, antiprotozoal olarak da azomisin, antifungal olarak ise pyrrolnitrin ve deri enfeksiyonları için kullanılan mupirosin da bu grup mikroorganizmalardan üretilmektedir. Çizelge 2.4'de bakteriler tarafından elde edilen antibiyotikler ve elde edilen bakteri cinsleri verilmiştir.

**Çizelge 2.4.** Bakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler (Yıldırım, 2004)

Bakteriler	Antibiyotik
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacidrasin
<i>Bacillus brevis</i>	Gramisidin
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polimiksin B
	Kolitsin (Polimiksin E)
<i>Bacillus circulans</i>	Butirosin <sup>a</sup>
<i>Bacillus megaterium</i>	Glukomikotrienin
	Ansamisin
<i>Bacillus subtilis</i>	Basidrasin <sup>b</sup>
	Subtilin <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas pyroloinitrica</i>	Pirolnitrin
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pirolnitrin
	Mupirosin
<i>Pseudomonas acidophila</i>	Sülfazesin
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i>	İzosülfazesin
<i>Myxococcus fulvus</i>	Althiomisin
	Pirolnitrin
<i>Myxococcus coralodites</i>	Korallopironin
<i>Sorangium cellulosum</i>	Ambutirisin
	Soraphen

a: Klinik olarak kullanılıyor

b: Besin katkı maddesi olarak kullanılıyor

### 2.8.2. Funguslar

Funguslar, gerçek hücre çekirdeklerine sahip, dallanmış iplikçikler halinde ya da maya formunda olan ve kitin içeren hücre duvarlarına sahip ökaryotik organizmalardır (Deacon, 2005). İyi havalandırılmış topraklarda, toplam mikrobiyal protoplazmanın büyük bir kısmını oluşturarak baskın mikroorganizma durumundadırlar. Zor çevre koşullarına birçok mikroorganizmadan daha iyi adapte olabilmektedirler. *Phytium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorrhinchus*, *Trichodarma*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* toprakta en çok bulunan mantar gruplarıdır. Toprak mantarları penisilin, mikofenolik asit gliotoksin, klavasin, gladiolik asit, penisilik asit ve fumigasın gibi çok fazla sayıda

antimikrobiyal madde üretmektedirler. Çizelge 2.5’de funguslar tarafından elde edilen antibiyotik sayıları ve hangi gruba ait oldukları verilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Funguslar tarafından üretilen antibiyotik sayısı ve grupları (Yıldırım, 2004)

Funguslar	Üretilen Antibiyotik Sayısı
<i>Phycomycetes</i>	14
<i>Ascomycetes</i>	299
<i>Basidiomycetes</i>	140
Fungi Imperfecti	315

### 2.8.3. Aktinomisetler

Aktinomisetler doğada geniş olarak dağılmış, dallanmış yapıdaki tek hücreli mikroorganizmaların bir grubudur. Substrat veya vejetatif olarak tanımlanan tek tip veya substrat ve havasal olarak tanımlanan iki tip misel oluştururlar. (Öner, 1989).

Toprak mikroorganizmalarının %10-50’sini oluştururlar. Aktinomisetlerin bir çok türü antibiyotik üreticileri olarak medikal ve endüstriyel öneme sahiptir. Streptomisin, klortetrasilin, oksitetrasilin ve sikloheksimin gibi önemli antibiyotikler aktinomisetlerden elde edilmiştir. Aktinomisetlerden elde edilen antibiyotiklerin çoğu *Streptomyces* cinsleri tarafından üretilmektedir. Bu yüzden endüstriyel öneme sahip en önemli grubudur. *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Aktinomadura* ve *Nocardia* cinsleri de antibiyotik üretimi bakımından önemli gruplardır. Çizelge 2.6’da çeşitli aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin sayısı verilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Çeşitli aktinomisetler tarafından üretilen biyoaktif mikrobiyal metabolitler (Balkar, 2007)

<i>Streptomycetaceae</i>	Miktar	<i>Thermomonosporaceae</i>	Miktar
<i>Streptomyces</i>	~ 8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Microbiospora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellobosporia</i>	11	<i>Nocardiosis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora</i>	26
<b>Micromonosporaceae</b>		<i>Thermomonospora</i>	19
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Thermopolyspora</i>	1
<i>Anpullariella</i>	9	<i>Thermoactinopolyspora</i>	1
<i>Glycomyces</i>	2		
<i>Catenuloplanes</i>	3	<b>Mycobacteriaceae</b>	
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Nocardia</i>	357
<b>Pseudonocardiaceae</b>		<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Arthrobacter</i>	25
		<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Amycalotopsis/Nocardia</i>	120/357		
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Amycolata</i>	12	<b>Diğer türler</b>	
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Microellobosporia</i>	11
<b>Streptosporangiaceae</b>		<i>Frankia</i>	7
<i>Streptosporangium</i>	79	<i>Westerdykella</i>	6
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Planobispora</i>	10	<i>Sebekia</i>	3
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Elaktomyces</i>	3
<i>Planomonospora</i>	2	<i>Excelsospora</i>	3
		<i>Alkalomyces</i>	1
		<i>Catellatospora</i>	1
		<i>Erythrosporangium</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Microechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1



### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Kullanılan Test Mikroorganizmaları ve Kimyasal Maddeler

Topraktan izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan test mikroorganizma kültürleri kullanıldı. Çalışmada kullanılan kültürler şöyledir; *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* 0157: H7 ATCC 43897, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Klebsiella pneumoniae*.

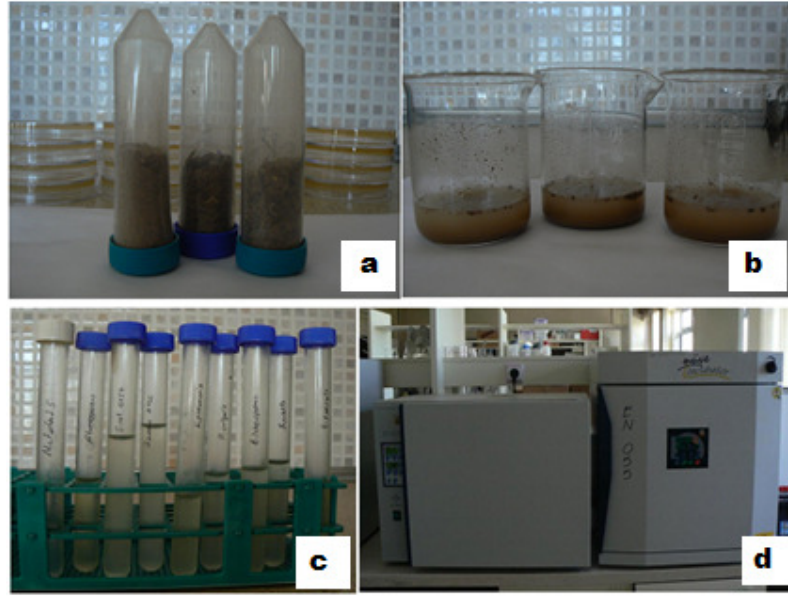
Çalışmada mikroorganizma izolatlarının aktive edilmesinde, morfolojik ve kültürel özelliklerinin incelenmesinde, antimikrobiyal aktivitelerinin gözlenmesi aşamasında Nutrient Broth, Nutrient Broth Agar, LB Broth Agar, Sabouraud – 2 % Glucose Agar, Sabouraud – 4% Dextrose Agar, Patates Dextrose Agar ve Actinomycete Isolation Agar besi yerleri kullanıldı. Besi yeri içerikleri distile suda çözülerek, pH ayarlamaları yapıldıktan sonra, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika süre ile steril edildi. Çalışmada kullanılan kimyasallar Merck, Sigma ve Fluka firmalarından temin edildi. Seçilen mikroorganizmaları tanımlama işlemlerinde API Staph (bioMérieux) ve API 20NE (bioMérieux) tam kitleri kullanıldı.

#### 3.2. Mikroorganizmaların Topraktan İzolasyonu

Araştırmada çalışılan toprak örnekleri Mart 2013 - Ağustos 2014 tarihleri arasında Karaman ili Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kampüsünün 74 farklı alanından toplandı. Toprak örnekleri, izole edilecek mikroorganizmaların arazide bulunduğu yerlere göre farklı mevsimlerdeki çevresel istekleri dikkate alınarak toprağın yüzey ve dip kısımlarından alındı. Örnekler, alkolle temizlenmiş bir spatula ile 2-4 cm ve 8-10 cm derinlikten yaklaşık 25 g kadar alınıp steril falkon tüplere konularak laboratuvara getirilip incelemeye alındı (Şekil 3.1 a). Alınan toprak örnekleri 10 g tartılarak üzerine 20 mL % 0,9’luk NaCl çözeltisi eklenip 5 dakika boyunca karıştırıldı (Şekil 3.1 b). Toprağın dibe çökmesi için 5 dakika bekletilerek steril kapaklı tüplere örneğin süpernatant kısımları süzdürüldü (Şekil 3.1 c). Önceden hazırlanan beş farklı katı besi yerine (Nutrient Broth Agar, LB Broth Agar, Actinomycete Isolation Agar, Potato

Dextrose Agar ve Sabouraud-2 % Glucose Agar) 100 µL örneklerden konularak her bir örnek için üç paralel olacak şekilde yayma ekimleri yapılarak 28°C, 35°C ve 50°C de inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.1 d). Tüm petripler inkübasyon süresi boyunca büyüyen mikroorganizmaların birbiri üzerine etkili olanları veya etraflarında bir açıklık meydana getirenleri saptamak adına gözleme alındı.

Büyüyen mikroorganizmaların birbirleri üzerine etkili olanları belirlendiğinde bu kolonilere çeşitli kodlar verilerek büyüdüğü uygun besi yeri ortamına çizgi ekimleri yapılarak saflaştırıldı. İnkübasyon sonrasında ise buzdolabında +4°C de diğer işlemlerin uygulanması için saklandı.



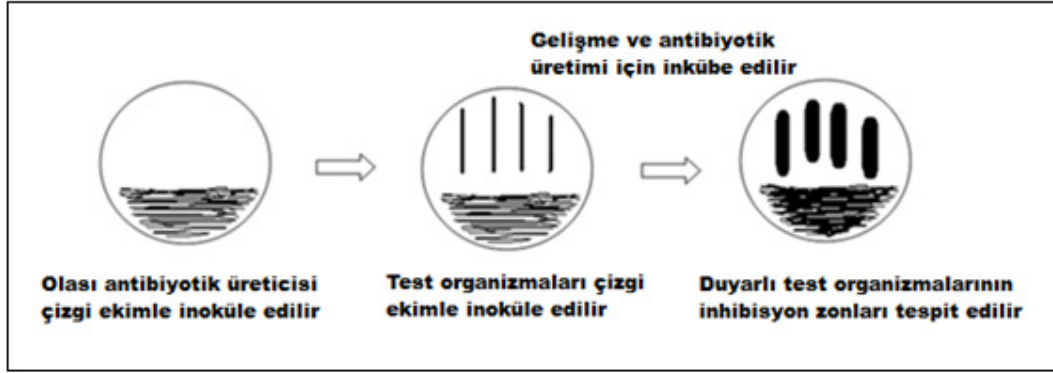
Şekil 3.1. Toprak mikroorganizmalarının izolasyon görüntüleri

### 3.3. İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Etkilerinin Saptanması

Çalışmamızda mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla çapraz çizgi (cross-streak) metodu ile Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemleri kullanıldı (Fleming, 1922; CLSI, 2006). Toprak mikroorganizmaları tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenerek bu maddelerin test mikroorganizmalarına karşı direnç durumları tespit edildi (Andrews, 2001).

### 3.3.1. Çapraz izgi (Cross-Streak) Metodu

Bu işlem için antibiyotik üreticisi olduğu düşünülerek toprak örneklerinden saflaştırılan mikroorganizmalar, uygun besi yerleri ile hazırlanmış olan petrilerin bir tarafına çizgi ekim yöntemiyle yayıldı (şekil 3.2). Belirlenen test mikroorganizmaları, antibiyotik üreticisi olduğu düşünölen mikroorganizmaların karşısına 90° açı yapacak şekilde mikroorganizma kolonisinden başlayarak petri kenarına doğru tek çizgi halinde ekildi. Mikroorganizmaların gelişimi için petri plakları farklı sıcaklıklarda (28°C, 35°C ve 50°C) inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda ortaya çıkan inhibisyon zonlarının oluşması, mikroorganizmaların test mikroorganizmalarına karşı etkili antimikrobiyal madde ürettiğini göstermektedir (Fleming, 1922).



şekil 3.2. Mikroorganizmaların antibiyotik etkisini belirleyen çapraz çizgi metodu

### 3.3.2. Fermantasyon Sıvısında Antimikrobiyal Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Saptanması

Çapraz izgi metodu sonuçlarına göre 60 mikroorganizma izolatından, test mikroorganizmaları üzerine aktif antimikrobiyal etkisinin olduğu belirlenen 9 bakteri ve 6 küf, antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi amacıyla fermantasyon besi yeri ortamında büyütölmek üzere seçildi. Fermantasyon besi yeri ortamı 1L distile su için; 10 g D(+) Glucose, 5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 g NaCl, 0,5 g Corn steep liquor kimyasalları kullanılarak hazırlandı.

Fermantasyon denemeleri sporulasyon, inokulum ve fermantasyon olmak üzere başlıca üç aşamada gerçekleştirildi. Fermantasyonda kullanılan mikroorganizmalardan bakterileri izolatları için SGA ve NB Agar, küfler için ise PDA besi yeri hazırlanarak taze kültürleri elde edildi. Kültürlerin ortamda aktif hale geçmeleri ve küflerin sporulasyona girmeleri için 35°C’de inkübe edildiler. İnkübasyon sonunda izolatlar inokulum ortamını aşılama için kullanıldı. 250 mL’lik erlenlere hazırlanan fermantasyon besi yerinden 100’er mL konuldu ve bir öze dolusu spor ve bakteri aşılama, çalkalamalı etüvde 35°C, 175 rpm’de (devir/dakika) 15 gün boyunca inkübe edildi. Fermantasyon kültür ortamından 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 ve 15. gün besi yeri örnekleri alındı ve 4°C, 5000 rpm (1663g) de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant kısımları ayrıldı. Test mikroorganizmalarının NB besi yerinde hazırlanan 24 saatlik taze kültürleri 0,5 McFarland ( $10^8$ KOB/mL) bulanıklığına eşit olacak şekilde, steril fizyolojik tuzlu su (NaCl) içerisinde süspansiyonları elde edildi.

Disk difüzyon yöntemi için, test organizmalarından 100 µL alınıp steril drigalski öze ile Nutrient Broth Agar üzerine petrinin her yerine homojen bir şekilde yayma ekimleri yapıldı. Fermantasyon besi yeri ortamından belirlenen günlerde alınan besi yeri örnekleri, 6 mm çapında olan antimikrobiyal boş test disklerine 30’ar µL yüklenerek; diskler aseptik koşullarda pens yardımıyla agar üzerine yerleştirildi. Petriler 35°C’de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve bu sürenin sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek mikroorganizmaların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenip kaydedildi (CLSI, 2006).

Fermantasyon besi yeri ortamında büyütülen bu 15 mikroorganizma arasından en fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olan 2, 5 (SGA E<sub>6</sub> 1) ve 6 numaralı üç mikroorganizma kültürü seçildi ve bu işlemler bu üç izolat üzerinde tekrarlandı.

### **3.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerinin Saptanması**

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), mikroorganizma gelişimini belirgin bir şekilde engelleyen en düşük antimikrobiyal konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Genellikle test mikroorganizmalarının antibiyotiklere olan hassasiyetini belirlemede kullanılır (Çakı, 2009). Çalışmada antibiyotiklere ait MİK değerlerinin belirlenmesinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) tarafından önerilen mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Bu deney için belirlenen mikroorganizmanın,

antimikrobiyal etkisinin tespit edildiği güne ait fermantasyon ortamından alınan besi yeri örnekleri kullanılarak 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ve 0,05 olacak şekilde farklı konsantrasyonları hazırlandı. Bir gün önceden ekilen (18-24 saat) ve uygun sıcaklıkta inkübe edilen test organizmalarının (*S. aureus* ATCC 29213, *S. Enteritidis*, *K. pneumoniae*, *A. tumefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *P. vulgaris* ve *E. faecalis*) konsantrasyonları 0,5 McFarland standardı ( $10^8$ KOB/mL) kullanılarak  $10^4$ KOB/mL olacak şekilde hazırlandı. Bu işlem için 96 kuyulu mikro plaka üzerinde kuyucuklar uygun konsantrasyonlara göre belirlendi. Kuyucuklara ilk olarak sırasıyla 100 µL hazırlanmış uygun konsantrasyondaki 2 ve 6 numaralı besi yeri örneklerinden ve 100 µL uygun konsantrasyondaki test organizmalarından konuldu. Bu işlemin devamında 3 farklı kör hazırlandı:

- a) 100µL fermantasyon besi yeri örneği + 100µL steril NB besi yeri
- b) 100µL uygun hazırlanmış test mikroorganizma + 100µL steril NB besi yeri
- c) 200µL steril NB besi yeri

Mikro plakaların üzeri steril alüminyum folyo ile kapatıldı ve uygun sıcaklıkta inkübe edildi. 18-20 saat sonunda hem gözlem yoluyla hem de 660 nm’de absarbans değerleri ölçülerek sonuçlar kaydedildi (Andrews, 2001).

### **3.5. Mikroorganizmaların Tanımlanması**

Antibakteriyal etkinliği tespit edilen 5 numaralı bakteri için Gram boyama ve API kitleriyle tanımlama işlemi yapıldı. 2 ve 6 numaralı küfler için ise metilen mavisi ile basit boyama işlemi yapılarak grup tanımlamaları gerçekleştirildi.

#### **3.5.1. API Staph Tanı Kiti ile Tanımlanmaları**

Topraktan elde edilen bakterilerin NB besiyerinde hazırlanan 24 saatlik taze kültürleri, 0,5 McFarland ( $10^8$ KOB/mL) bulanıklığı kullanılarak, steril fizyolojik tuzlu su içerisinde süspansiyonları elde edildi. Bu süspansiyonlardan API Staph kitinde bulunan kuyucuklara belirtilen kısmına kadar dolduruldu. Daha sonra bakteri süspansiyonundan 200 µL alınarak test kiti içerisinde bulunan özel bir besiyeri olan API Staph Medium’a eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra test kitinin kalan kuyucukları da doldurularak prosedür tamamlandı. Ekim yapılan kitler 35°C’de 18-24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaktiflerin herbirinden 1 damla eklenerek reaksiyonlar geliştirildi.

Bu işlemler sonunda test sonuçları kaydedildi ve özel okuma tabloları yardımı ile sonuçlar yorumlandı.

### **3.5.2. API 20 NE Tanı Kiti ile Tanımlanmaları**

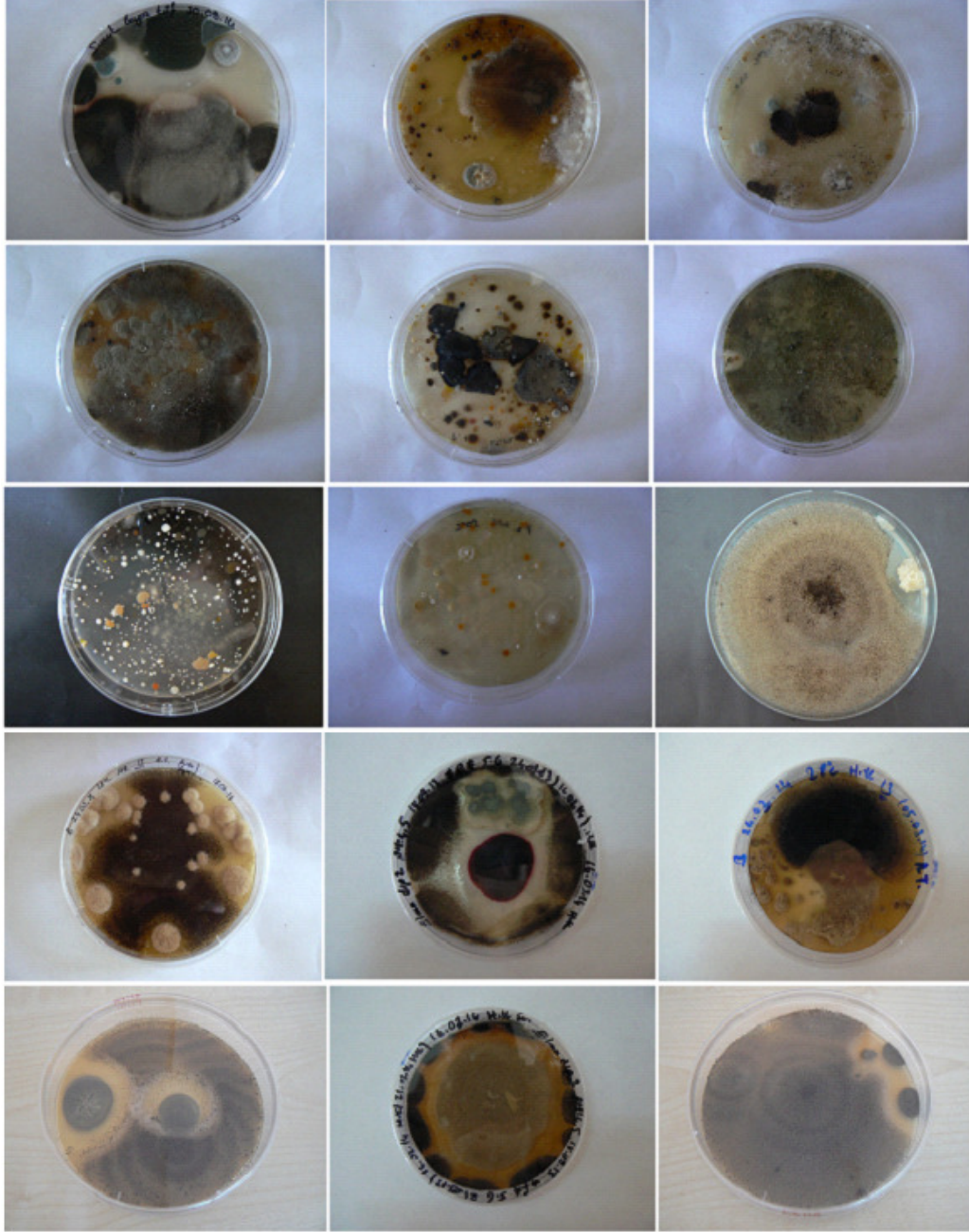
Oksidaz testi sonucu pozitif olan bakterilerin NB besiyerinde hazırlanan 24 saatlik taze kültürleri ile 0,5 McFarland ( $10^8$  KOB/mL) bulanıklığı kullanılarak, steril fizyolojik tuzlu su içerisinde bakteri süspansiyonları elde edildi. Bu süspansiyonlardan API 20 NE kitinde bulunan kuyucukların belirtilen kısmına kadar dolduruldu. Daha sonra bakteri süspansiyonundan 200 µL alınarak test kiti içerisinde bulunan özel bir besiyeri olan API AUX ortamına eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra test kitinin kalan kuyucukları da doldurularak prosedür tamamlandı. Ekim yapılan kitler 28°C'de 24 - 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaktiflerin herbirinden 1 damla eklenerek reaksiyonlar geliştirildi. Küpüllerin aldığı renge göre sonuçlar özel okuma tabloları yardımı ile değerlendirildi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Toprak Mikroorganizmalarının apraz izgi Metodu İle Antimikrobiyal Etkisi**

Karaman ili Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kampüsü'nün 74 farklı alanından toplanan 92 toprak rneği, bakteri byemesini destekleyen Nutrient Broth Agar, LB Broth Agar, aktinomiset seçici olarak Actinomycete Isolation Agar ve kf ve mayaların byemesi destekleyen Potato Dextrose Agar ve Sabouraud-2 % Glucose Agar besi yerlerine yayma ekim ile ekilerek inkübe edildiğinde mikroorganizmaların birbirleri üzerine etki ettiği ve bazılarının diğerlerine karşı etki göstererek etrafında temiz bir alan (zon) oluşturup onları byütmediği, mikroorganizmalardan bir kısmının ise diğerleri üzerine saçılımlar yaparak onların alanlarını işgal edip büyümelerine engel olduğu gözlemlendi (şekil 4.1).

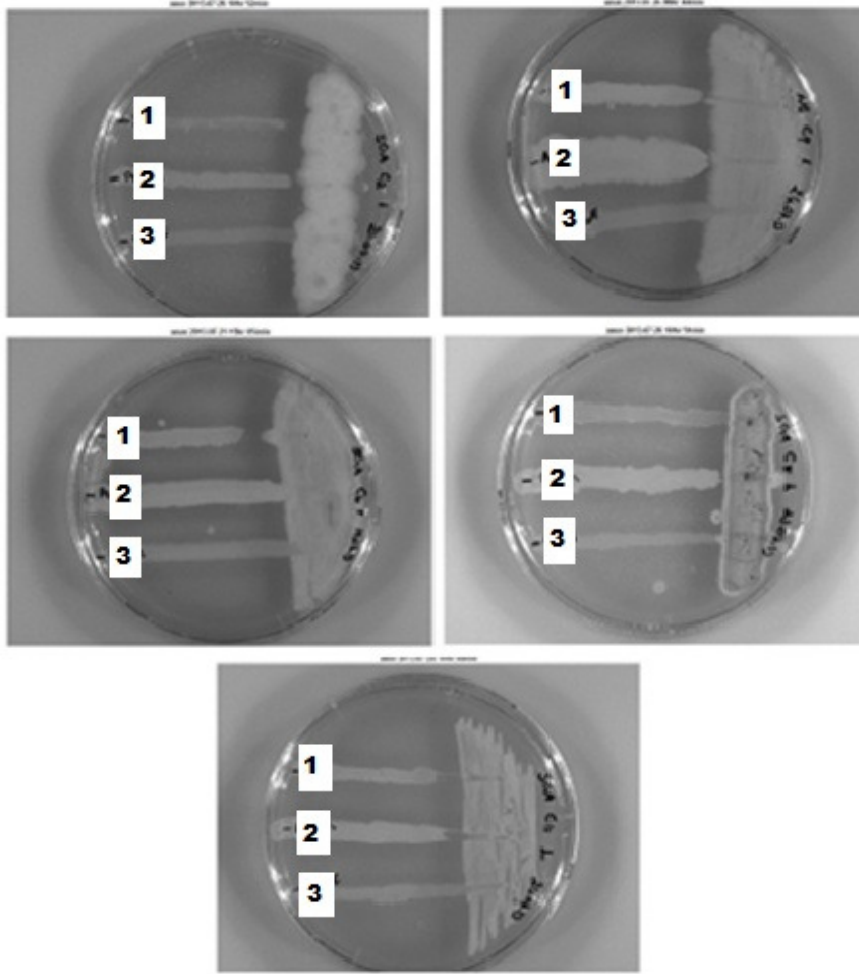
Toprak mikroorganizmaları arasından seçilerek saf kültürleri elde edilen küflerin etkileri aynı petride birbirleri üzerine 2'li, 3'l ve 4'l şekilde denendiğinde mantarların antifungal madde ürettiği şekil 4.1'deki gibi görüldü.



**Şekil 4.1.** Toprak mikroorganizmalarının inkübasyon sonrası görüntüleri

Topraktan izole edilen 172 mikroorganizmadan, birbirleri üzerine etkili olan, farklı koloni morfolojisine sahip 60 mikroorganizma suşu buldukları ortamdan izole edilerek saflaştırıldı. Saf olarak elde edilen mikroorganizma suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri test mikroorganizmaları üzerine ilk olarak çapraz çizgi metodu kullanılarak gözlemlendi. Şekil 4.2’de izole edilen bazı mikroorganizmaların çapraz çizgi görüntüleri verilmektedir.





**Şekil 4.2.** Bazı toprak mikroorganizmaların çapraz çizgi metodu görüntüleri

1. *Bacillus subtilis*, 2. *Agrobacterium tumefaciens*, 3. *Escherichia coli*.

Uygulanan çapraz çizgi metodu sonrasında ortaya çıkan inhibisyon zonları, 60 farklı izolatın test mikroorganizmalarına karşı etkili antimikrobiyal bir madde ürettiğini gösterdi. Elde edilen bulgulara göre; 60 farklı toprak mikroorganizmanın % 18'i önemli bir insan patojeni olan *B. subtilis*'i etkilerken % 22'sinin *B. subtilis*'den etkilendiği belirlendi. Toprak mikroorganizmalarının en az etkilendiği patojenin % 3 oranla *S. Enteritidis* olduğu görüldü. Mikroorganizmaların sadece % 1'inin önemli insan patojenlerinden olan *S. Enteritidis* ve *S. aureus* ATCC 29213'ü etkilediği gözlemlendi. Toprak mikroorganizmaları bir gıda patojeni olan *E.coli* 0157: H7 ATCC 43897 üzerine % 7 etkili olurken, *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897'nin toprak mikroorganizmalarına karşı % 4 etkili olduğu görüldü. Yine bitki patojenlerinden olan *A. tumefaciens*'in mikroorganizmalar üzerine herhangi bir etkisi gözlenmezken mikroorganizmalardan

sadece % 3'nün *A. tumefaciens*'a etki ettiği belirlendi. Çalışma sonucunda 60 farklı mikroorganizmadan % 17'sinin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edildi.

#### **4.2. Fermantasyon Sıvısının Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisi**

Çapraz çizgi metodu sonuçlarına göre 60 mikroorganizma arasından seçilen 9 bakteri ve 6 küf, fermantasyon besi yeri ortamında büyütülerek belirli günlerde disk difüzyonları yapıldı. Ancak bunlardan aktif antimikrobiyal etkisinin daha fazla olduğu tespit edilen 2, 5 ve 6 numaralı üç mikroorganizma kültürü seçildi. Bu üç farklı mikroorganizmanın diğer toprak mikroorganizmalarına göre daha güçlü bir etki gösterdiği ve geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinliğinin olduğu belirlendi. Üç farklı mikroorganizmanın fermantasyon besi yeri ortamlarından birer gün aralıklarla alınan örnekleri disk difüzyon metoduyla dokuz farklı mikroorganizmaya karşı denendiğinde en fazla antimikrobiyal aktivitenin 8. ve 15. günlerde olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1'e bakıldığında en yüksek etki 6 numaralı mikroorganizmanın 8. gün örneğinden *K. pneumoniae*'ya karşı 26 mm'lik bir açıklım olarak gözlemlendi. Benzer etki 2 numaralı mikroorganizmanın örneğinde de 23 mm'lik bir açıklım olarak tespit edildi. 6 numaralı mikroorganizma 8. gün örneğinde *B. subtilis*'e karşı 15 mm'lik bir açıklık yaparken, 2 numaralı mikroorganizma örneğinin de 17 mm'lik açıklık yaptığı görüldü. *A. tumefaciens*'e karşı 6 numaralı mikroorganizma, 15. gün örneğinde 13 mm'lik etki yaparken, 2 numaralı mikroorganizma örneği de 20 mm'lik bir açıklık oluşturdu. *S.aureus* ATCC 29213'e karşı 6 numaralı mikroorganizma örneği 8. günde 12 mm'lik bir açıklık oluştururken aynı patojene 2 numaralı mikroorganizma örneği en yüksek etkiyi 15. günde 15 mm'lik açıklık yaparak gösterdi. 6 numaralı mikroorganizma örneğinin *B. licheniformis*'e karşı en yüksek etkiyi 8. günde 12 mm olarak gösterirken aynı patojene benzer etkiyi 2 numaralı mikroorganizma 15. günde 14 mm açıklık yaparak gösterdi. *S. Enteritidis*'e karşı 6 numaralı mikroorganizma örneği en yüksek etkiyi 5 ve 8. günlerde 12 mm açıklık yaparak gösterirken, 2 numaralı mikroorganizma örneği benzer etkiyi 15. günde 13 mm'lik açıklık yaparak gösterdi. 6 numaralı mikroorganizma örneği *P. vulgaris*'e karşı en yüksek etkiyi 8. günde 14 mm bir açıklık yaparken 2 numaralı mikroorganizma örneği 12 mm'lik bir açıklık yaptı. Yine 6 numaralı mikroorganizmanın 15. gün örneğinden *E. faecalis*'e karşı 11 mm'lik

bir açıklık olarak gözlenirken benzer etki 2 numaralı mikroorganizmanın 15. gün örneğinde 14 mm olarak tespit edildi. Bir bakteri olan 5 numaralı mikroorganizma örneğinin *A. tumefaciens*, *E. faecalis* ve *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897 mikroorganizmalarına karşı herhangi bir etkisi gözlenmezken diğer patojenlere karşı 6 mm'lik etkisinin olduğu belirlendi.

İzolatlar *K. pneumoniae*'ya karşı kolonilerin üremesini baskılayarak bakteriyostatik bir etki gösterirken, izolatların diğer patojenlere karşı disk etrafında temiz bir alan oluşturarak bakterisidal etki gösterdiği tespit edildi. Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi 2, 6 ve 5 numaralı mikroorganizma örneklerinin *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897 kültürüne antibakteriyal bir aktivite göstermediği belirlendi.

**Çizelge 4.1.** Mikroorganizmaların disk difüzyon metodu ile elde edilen inhibisyon zon çapları (mm)

Mikroorganizmalar	2 numaralı mikroorganizma				5 numaralı mikroorganizma				6 numaralı mikroorganizma			
	0. gün	5. gün	8. gün	15. gün	0. gün	5. gün	8. gün	15. gün	0. gün	5. gün	8. gün	15. gün
<i>B. subtilis</i>	-	15	<b>17</b>	17	-	6	6	6	-	14	<b>15</b>	14
<i>B. licheniformis</i>	-	12	13	<b>14</b>	-	-	6	6	-	10	<b>12</b>	9
<i>A. tumefaciens</i>	-	14	13	<b>20</b>	-	-	-	-	-	13	<b>13</b>	13
<i>K. pneumoniae</i>	-	12	<b>23</b>	9	-	6	6	-	-	10	<b>26</b>	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	12	12	<b>15</b>	-	6	6	-	-	12	12	9
<i>S. Enteritidis</i>	-	11	12	<b>13</b>	-	-	6	6	-	12	12	9
<i>P. vulgaris</i>	-	12	12	9	-	6	6	6	-	10	<b>14</b>	9
<i>E. faecalis</i>	-	10	11	<b>14</b>	-	-	-	-	-	9	11	11
<i>E. coli</i> 0157: H7 ATCC 43897	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Disk etrafında açılma (zon) yok

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmalarının standart antibiyotiklere karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Çizelge 4.2'de belirtildiği gibi bulundu. Test mikroorganizmalarından, kullanılan antibiyotiklere karşı en yüksek çoklu direnç gösteren grubun *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897 olduğu görülürken, antibiyotiklere duyarlılığı en yüksek olan kültürün ise *S. aureus* ATCC 29213 olduğu belirlendi.

**Çizelge 4.2.** Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri/ Antibiyotik	Penisilin G 10 ünite <sup>1</sup>	Gentamisin 10µg	Tetrasiklin 30µg	Ampisilin 10µg	Oksasilin 1µg
<i>B. subtilis</i>	36	28	25	22	12
<i>B.licheniformis</i>	29	20	27	*	*
<i>A. tumefaciens</i>	-	19	28	10	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	19	13	*	*
<i>S. aureus</i>	24	18	31	14	16
<i>S. Enteritidis</i>	30	17	29	16	9
<i>P.vulgaris</i>	-	19	13	*	*
<i>E.faecalis</i>	22	11	14	*	*
<i>E. coli</i> 0157	-	16	32	-	13

-: İnhibisyon zonu yok, \*: Denenmedi

<sup>1</sup>ünite: İkinci uluslar arası standartlara göre 0,0005988 mg penisilin gösterdiği aktivite olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı gösterdikleri duyarlılığa bakıldığında, gentamisin ve tetrasikline karşı hiçbir mikroorganizmada dirençlilik gözlenmezken, penisilin ve penisilin türevlerinden olan ampisilin ve oksasiline karşı bazı test mikroorganizmalarında direnç tespit edildi. Çizelge 4.3’de çalışmada kullanılan antibiyotiklerin test mikroorganizmaları üzerine etkilerini gösteren zon çaplarının değerlendirilmesi verilmektedir.

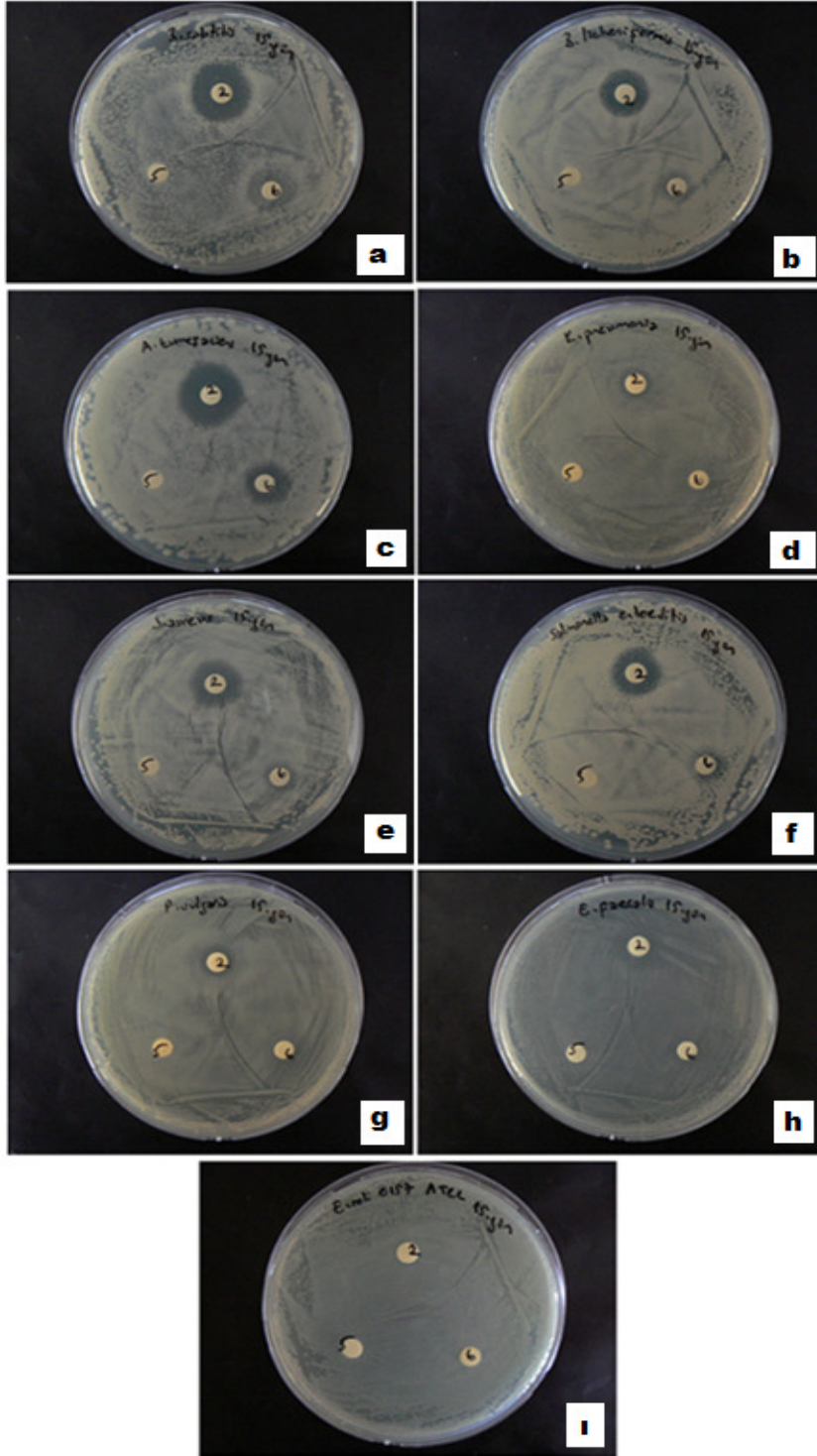
**Çizelge 4.3.** Bazı antibiyotiklerin zon çaplarının değerlendirilmesi (mm) (Özpinar ve ark., 2013; CLSI, 2014)

Bakteri/ Antibiyotik	Penisilin G 10 ünite			Gentamisin 10 µg			Tetrasiklin 30 µg			Ampisilin 10 µg			Oksasilin 1µg		
	S	OD	D	S	OD	D	S	OD	D	S	OD	D	S	OD	D
<i>S. aureus</i>	≥29	-	≤28	≥15	13- 14	≤12	≥19	15- 18	≤14	≥29	-	≤28	≥22	-	≤21
<i>S. Enteretidis</i>	≥17	14- 16	≤13	≥15	13- 14	≤12	≥19	15- 18	≤14	≥17	14- 16	≤13	≥16	11- 15	≤10
<i>K.pneumoniae</i>	≥17	14- 16	≤13	≥17	13- 14	≤14				≥17	14- 16	≤13			
<i>A. tumefaciens</i>	≥22	12- 21	≤11	≥15	13- 14	≤12				≥22	12- 21	≤11	≥22	12- 21	≤11
<i>B. subtilis</i>	≥22	12- 21	≤11	≥15	13- 14	≤12	≥19	15- 18	≤14	≥22	12- 21	≤11	≥22	12- 21	≤11
<i>B.licheniformis</i>	≥22	12- 21	≤11	≥15	13- 14	≤12	≥19	15- 18	≤14	≥22	12- 21	≤11	≥22	12- 21	≤11
<i>P.vulgaris</i>	≥17	14- 16	≤13	≥15	13- 14	≤12	≥19	15- 18	≤14	≥17	14- 16	≤13			
<i>E.faecalis</i>	≥17	-	≤16	≥10	-	≤6	≥19	15- 18	≤14	≥17	-	≤16	≥16	11- 15	≤10

S: Duyarlı, OD: Orta Duyarlı (Hassas), D: Dirençli

Çizelge 4.2 ve 4.3'e bakıldığında bazı mikroorganizmaların günümüzde bakteriyal tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazandığı görülmektedir. *K. pneumoniae*'nin penisilin G'ye dirençliken, gentamisine duyarlı olduğu; aynı zamanda 2 ve 6 numaralı örneklerin 23 ve 26 mm zon çapı ile *K. pneumoniae*'ya karşı gentamisinin bireysel açılımından daha fazla açılım yaptığı belirlendi. *A. tumefaciens*'in penisilin G'ye dirençli; 19 ve 28 mm zon çapı ile gentamisin ve tetrasikline duyarlı olduğu belirlendi. Aynı zamanda 2 numaralı örneğin 20 mm zon çapı ile *A. tumefaciens*'a etkili olduğu; 6 numaralı örneğin ise 13 mm zon çapı ile etkili olduğu görüldü. *S. aureus* 24 mm ile penisilin G'ye dirençliken, 18 ve 31 mm ile gentamisin ve tetrasikline duyarlı olduğu belirlendi. *S.aureus* ATCC 29213'nin 15 mm zon çapıyla 2 numaralı örneğe duyarlı olduğu tespit edildi. *B. subtilis* sırasıyla 36, 28 ve 25 mm zon çapı ile penisilin G, gentamisin ve tetrasikline duyarlı olurken; 17 ve 15 mm zon çapı ile 2 ve 6 numaralı örneklerin *B. subtilis*'e ekili olduğu kaydedildi.

2, 5 ve 6 numaralı üç izolatin patojen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal madde ürettiğini gösteren görüntüler Şekil 4.3'de verildi.



**Şekil 4.3.** 2, 5 ve 6 numaralı mikroorganizmaların dokuz farklı patojene karşı antibakteriyal etkileri

a. *Bacillus subtilis*, b. *Bacillus licheniformis*, c. *Agrobacterium tumefaciens*, d. *Klebsiella pneumoniae*, e. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, f. *Salmonella* Enteritidis, g. *Proteus vulgaris*, h. *Enterococcus faecalis*, i. *Escherichia coli* 0157: H7 ATCC 43897.

## 4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri

Fermantasyon besi yeri örneklerinin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkilerinin disk difüzyon metoduyla elde edilen sonuçlarına bakılarak 2 ve 6 numaralı küflerin MİK değerleri belirlendi. Bu amaçla iki mikroorganizmaya ait fermantasyon besi yeri örneklerinin 0,5 - 0,4 - 0,3 - 0,2 - 0,1 - 0,05 katlık konsantrasyonları uygulandı. Hazırlanan körlerden a körü (fermantasyon besi yeri örneği + NB besi yeri) ve c köründe (NB besi yeri) turbidite gözlemlenmezken, b köründe (patojen + NB besi yeri) beklendiği gibi turbidite oluşumu tespit edildi. Burada mikroorganizmaların etkili oldukları sekiz test mikroorganizması (*S. aureus* ATCC 29213, *S. Enteritidis*, *K. pneumoniae*, *A. tumefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *P. vulgaris* ve *E. faecalis*) kullanıldı. Sonuç olarak gözlem yoluyla ve elde edilen absorbans sonuçlarına göre üremenin belirgin bir biçimde inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu olan 0,05 değeri minimum inhibitör konsantrasyonu olarak kabul edildi.

MİK'in gözlem yolu ile yapılan sonuçlarını sayısal veriye dökmek ve sonuçları anlamlandırmak adına 2 ve 6 numaralı örneklerin 660 nm'de ölçülen absorbans değerleri Çizelge 4.4'deki gibi elde edildi.

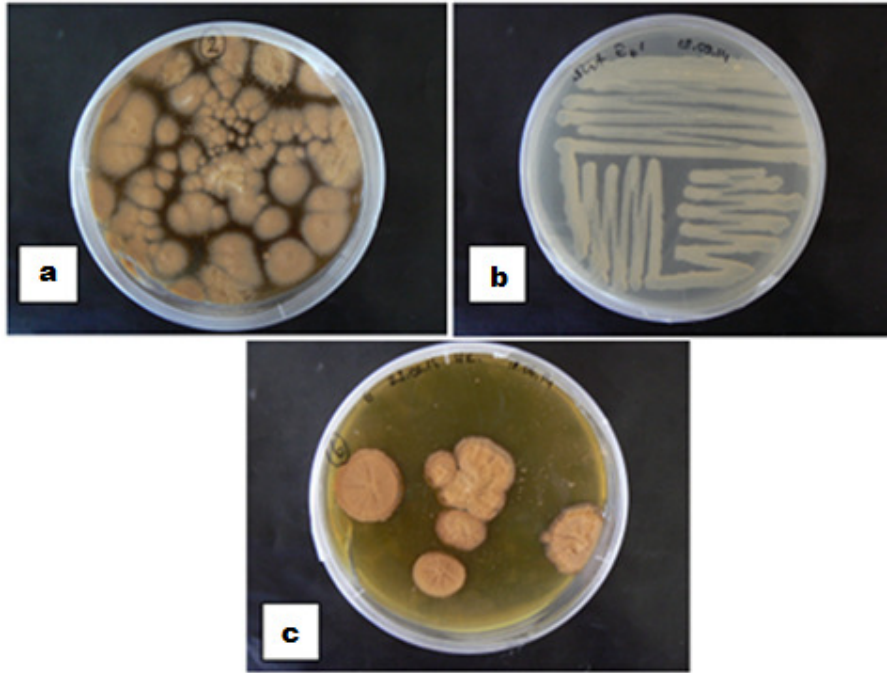
**Çizelge 4.4.** 2 ve 6 numaralı örneklerin 660 nm'de ölçülen absorbans değerleri

MİK 0,05	2 numaralı örnek (660 nm)			6 numaralı örnek (660 nm)		
	Patojen + Besiyeri	Patojen + Örnek	Fark	Patojen + Besiyeri	Patojen + Örnek	Fark
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,16	0,063	<b>0,094</b>	0,16	0,045	<b>0,111</b>
<i>S. Enteritidis</i>	0,198	0,083	<b>0,115</b>	0,198	0,042	<b>0,156</b>
<i>K. pneumoniae</i>	0,28	0,102	<b>0,181</b>	0,28	0,044	<b>0,239</b>
<i>A. tumefaciens</i>	0,144	0,055	<b>0,088</b>	0,144	0,043	<b>0,100</b>
<i>B. subtilis</i>	0,145	0,051	<b>0,094</b>	0,145	0,042	<b>0,102</b>
<i>B. licheniformis</i>	0,196	0,097	<b>0,098</b>	0,196	0,039	<b>0,157</b>
<i>P. vulgaris</i>	0,30	0,113	<b>0,189</b>	0,30	0,049	<b>0,253</b>
<i>E. faecalis</i>	0,16	0,049	<b>0,109</b>	0,16	0,126	<b>0,032</b>

### 4.3. Seçilen Aktif İzolatların Tanımlanması

Seçilen aktif izolatlardan 5 numaralı izolat, SGA besi yerinde büyütülüp incelendiğinde parlak beyaz renkli, akışkan kremsi bir yapısının olduğu görüldü (Şekil 4.4). Gram boyama sonucuna göre Gram negatif, streptobasil olduğu belirlendi.

API 20 NE tanı kiti sonucuna göre ise 5 numaralı izolatın % 98,5'le *Rhizobium radiobacter* olduğu tespit edildi. Bu türler aerobik, hareketli, spor oluşturmeyen, oksidaz pozitif ve gram negatif basillerdir. *Rhizobium* türleri içerisinde *Rhizobium radiobacter* türü insanda hastalığa en sık neden olan türdür (Altunçekiç-Yıldırım ve ark., 2014).



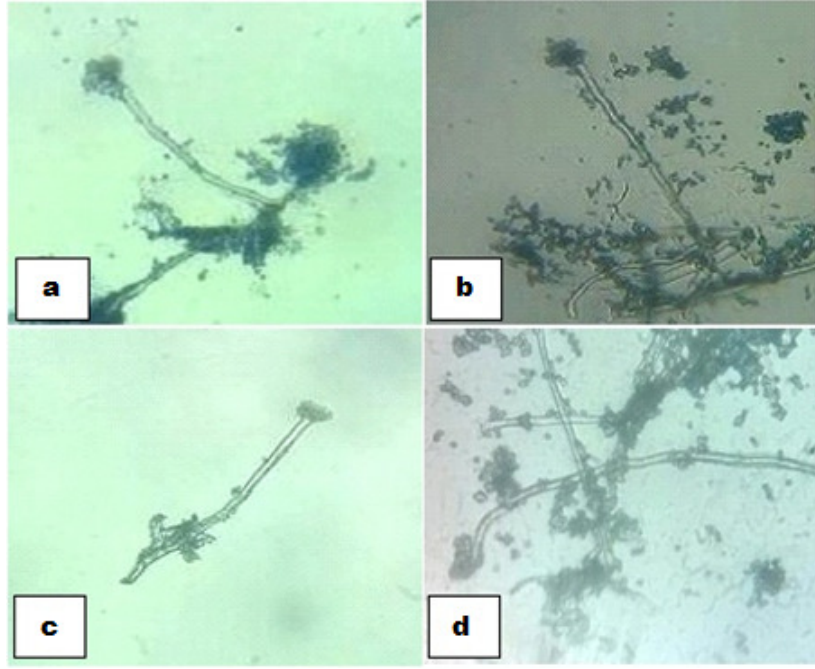
Şekil 4.4. 2, 5 ve 6 numaralı mikroorganizma kolonileri

a. 2 numaralı mikroorganizma, b. 5 numaralı mikroorganizma, c. 6 numaralı mikroorganizma

2 ve 6 numaralı izolatlar PDA besi yerinde büyütülerek (Şekil 4.4), metilen mavisi ile basit boyama yapıldı. İzolatların mikroskop görüntüsü (40X) incelendiğinde; her ikisinde spor yapılarının, eşeyli çoğalma ile ve askokarp adı verilen bir kese içinde oluşan askosporlara benzediğinden *Ascomycetes* üyeleri oldukları tespit edildi (Şekil 4.5). Haploid yapıda olan bu mikroorganizmaların kamçılı hücreleri bulunmamakta ve



vejetatif evreleri genelde septalı hiflerden meydana gelmektedir. Ayrıca hücre çeperleri genellikle kitin ve glukun içermektedir.



**Şekil 4.5.** 2 ve 6 numaralı mikroorganizma sporlarının mikroskop görüntüleri (40X)  
a-b. 2 numaralı mikroorganizma, c-d. 6 numaralı mikroorganizma

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm canlılar hayatta kalma, yaşamlarını devam ettirme ve çevrelerine uyum sağlama çabasıdır. Bakteriler de hayat mücadelelerinde maruz kaldıkları antimikrobiyal maddelere karşı direnç mekanizmaları geliştirmektedir. Bakteriler günümüzde mevcut olan antibiyotik çeşitlerinin en az birine karşı bir müddet sonra direnç mekanizması geliştirmekte ve hatta bazı durumlarda, bakteriler iki ya da daha fazla antibiyotiğe karşı aynı anda farklı direnç mekanizmaları geliştirebilmektedir. Bu yüzden neden oldukları enfeksiyonların tedavisi çok daha zor ve daha maliyetli olmaktadır (Karaaslan, 2013).

Antimikrobiyal direnç, her geçen gün artarak karşımıza çıkmakta ve bu durum çoklu dirençlilik kazanımıyla giderek daha büyük bir problem olmaktadır. Antibiyotik kullanımının insan ve hayvanlarda artması nedeniyle antibiyotiğe maruz kalan mikroorganizma sayısının artması, besin üretim tesislerinde yanlış ve fazla antibiyotik kullanılması ile direncin besin zincirine geçmesi, yanlış dezenfektan kullanımı ve antimikrobiyal etkili maddelerin su ve toprağa karışarak dirençli genlerle mikroorganizmalara yeni savunma mekanizmaları kazandırmaları gibi nedenlerle insan ve hayvan sağlığı açısından gittikçe artan bir tehdit oluşturduğu anlaşılmaktadır (Karaaslan, 2013).

Meyer ve arkadaşları (2013) Avrupa ülkelerinde antibiyotik tüketimi ve direnç verilerini yorumlayan çalışmalarında her yıl tonlarca antibiyotiğin insanlar ve hayvanlar tarafından tüketildiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada MRSA direncinin 2001 ve 2011 yılları arasında lineer bir artış gösterdiği buna karşılık özellikle karbapenem, kinolon, glikopeptid ve 3. kuşak sefalosporin kullanımındaki artışa paralel olarak 3. kuşak sefalosporinlere dirençli *E. coli* suşlarının % 1,3'ten % 16,7'ye, *K. pneumoniae* suşlarının % 4,5'ten % 20,3'e yükseldiği, aynı zamanda *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşları arasında da imipenem direncinde artış olduğunu göstermişlerdir (Karaaslan, 2013). Yaptığımız bu tez çalışmasında topraktan izole edilen 60 farklı mikroorganizma test mikroorganizmalarına karşı denendi. Sonuçlara göre topraktan elde edilen 60 mikroorganizmanın % 18'i *B. subtilis*'i etkilerken % 22'sinin *B. subtilis*'den etkilendiği belirlendi. Toprak mikroorganizmalarının en az etkilendiği patojenin % 3'le *S. Enteritidis* olduğu görüldü. 60 mikroorganizmanın sadece % 1'inin önemli insan patojenlerinden olan *S. Enteritidis* ve *S. aureus* ATCC 29213'ü etkilediği gözlemlendi.

Toprak mikroorganizmaları bir gıda patojeni olan *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897 üzerine % 7 etkili olurken, *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897'nin toprak mikroorganizmalarına karşı % 4 etkili olduğu görüldü. Yine bitki patojenlerinden olan *A. tumefaciens*'in toprak mikroorganizmaları üzerine herhangi bir etkisi gözlenmezken 60 mikroorganizmadan sadece % 3'nün *A. tumefaciens*'a etki ettiği belirlendi. Çalışma sonucunda 60 mikroorganizmadan % 17'sinin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edildi.

Antimikrobiyal maddelerin keşfi öncelikle doğal yollarla doğal maddelerin kullanılmasıyla başlamıştır. Günümüzde yeni antibiyotiklerin bulunması ve doğal olarak üretilmeleri yönünde yapılan çalışmalarda bakteri, aktinomiset, streptomiset, fungus ve alglerin sekonder metabolitlerinin antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu aşamada en çok ilgiyi doğal antimikrobiyal madde üreticisi olarak bilinen *Actinomyces*'ler çekmektedir. Fakat bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucunda çoğul dirençli izolatların ortaya çıkması ve yeni patojen organizmaların belirlenmesi, antibiyotik türevlerinin keşfini zorunlu hale getirmektedir. Karşılaşılan yeni hastalıklar ve mikroorganizmaların direnç kazanmaları, yarı sentetik antimikrobiyal maddelerin kullanılmasını gerektirmiştir. Ancak çoklu antibiyotik dirençli birçok mikroorganizmaya, tek yönlü antibiyotik uygulandığında bunların etkilerinin yetersiz ve etkisiz kaldığı görülmüştür (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Pidot, 2014). Meyer ve arkadaşları (2013) çalışmalarında, çoklu dirençli suşlardan olan *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'nin karbapenemlere ve florokinolonlara karşı artan direnç oranlarından dolayı zamanında yan etkileri nedeniyle kullanılmayan kolistini, son çare antibiyotik olarak kullanılmaya başlandığını belirtmişlerdir. Ancak günümüzde az sayıda da olsa kolistine karşı da direncin gözlemlendiğine dair raporlar bildirilmiştir.

İlaç endüstrisi için de ilgi çeken antimikrobiyal madde üreten mikroorganizmalardan elde edilen bileşiklerin, birçoğu geliştirilerek insan hastalıkları, veterinerlik ve ziraat bölümlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Doğal antibiyotik temelli ilaç keşfi için, çok farklı flora ve faunaya sahip olan ülkemiz topraklarından, izole edilen toprak mikroorganizmalarının araştırma çalışmaları günümüzde de devam etmektedir. Tez çalışmamızda bu amaçla, toprak örnekleri toplanarak geniş bir zaman aralığında canlılığını devam ettirebilen ve hem çevre şartlarına dirençli hem de diğer rakip mikroorganizmalar karşısında etkili mücadele verebilen, laboratuvar ortamında kültürü

yapılabilecek mikroorganizmaların taranması hedeflendi. Bu şekilde geniş spektruma sahip antimikrobiyal bir madde bulma şansı artırıldı. Toprak örneklerinden elde edilen izolatların *in vitro* koşullarda antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı ve toplamda 172 izolattan antimikrobiyal etkiye sahip, 2, 5 ve 6 ile numaralandırılan birbirinden farklı üç izolat seçildi.

Oskay (2002) da benzer olarak yaptığı çalışmasında Manisa ili tarım topraklarından izole ettiği 50 aktinomisetten 17'sinin antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlardan 8'inin yalnızca Gram pozitif, 3'ünün ise yalnızca Gram negatif bakterilere ve 6'sının hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerine etkisinin olduğunu saptamıştır. Özşen (2009) ise yaptığı çalışmada Çanakkale ili tarım alanlarındaki topraklardan 56 aktinomiset türü izole etmiş. İzole ettiği aktinomiset kültürlerini çeşitli test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri için araştırmıştır. Kültürlerden 42'sinin antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemiştir. İzolatlarının % 67,85'inin Gram pozitif bakterilere, % 50'sinin Gram negatif bakterilere, % 50'sinin mayalara, % 42,85'inin ise hem bakterilere hem de mayalara karşı etkili olduğunu gözlemlemiştir. Bizimde yaptığımız bu çalışma ile, topraktan elde edilen 60 farklı suş içerisinden, en fazla antimikrobiyal aktivite gösteren 3 mikroorganizma izolatu seçilerek fermantasyon besiyeri ortamında büyütüldü. Fermantasyon sonucunda yapılan disk difüzyon testinde zon oluşumlarının hem Gram pozitif (*S. aureus*) hem de Gram negatif (*A. tumefaciens*) bakteriler üzerine etkili olduğu saptandı. Seçilen bu üç izolattan 2 ve 6 ile numaralandırılan aktif küf izolatlarının test mikroorganizmalarına karşı en fazla antimikrobiyal aktiviteyi, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedeni olan, gram negatif, spor oluşturmeyen ve hareketsiz bir bakteri olan *K. pneumonia* kültürüne gösterdiği belirlendi. Onu izolatların antimikrobiyal etki derecelerine göre sırasıyla; *A. tumefaciens*, *B. subtilis*, *S. aureus* ATCC 29213, *B. licheniformis*, *S. Enteritidis*, *E. faecalis* ve *P. vulgaris* test mikroorganizmalarının takip ettiği görüldü. 5 numaralı bakteri izolatının kullanılan test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisinin ise *B. subtilis*, *S. aureus* ATCC, *B. licheniformis*, *S. Enteritidis*, *K. pneumonia* ve *P. vulgaris* kültürlerine etkili olduğu, fakat *A. tumefaciens*, *E. coli* 0157:H7 ATCC 43897 ve *E. faecalis* kültürlerine karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı belirlendi. İzolatların üçünde *E. coli* 0157:H7 ATCC 43897 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesinin olmadığını görüldü. İzolatların *K. pneumonia* kültürüne karşı disk etrafında tamamen

temiz bir zon oluşturamayıp, kolonilerin üremesini baskılayarak bakteriyostatik etkili olduğu, diğer test mikroorganizmalarına karşı ise disk etrafında temiz bir alan oluşturarak bakterisidal etki gösterdiği belirlendi.

Türkiye'den benzer bir çalışmayı Usta ve Demirkan (2012) gerçekleştirmiştir. Çalışmalarında Türkiye'nin 25 farklı ilinden aldıkları toprak örneklerinden antibiyotik potansiyeline sahip *Bacillus* türlerini izole etmişler ve test bakterilerine karşı antibiyotik üretim kapasitelerini çapraz-çizgi testi ile belirlemişlerdir. En büyük inhibisyon zonu gösteren suşu seçmiş ve bakterinin maksimum antibiyotik üretimi için farklı glukoz konsantrasyonlarına sahip 6 besi yeri kullanarak 24., 48., 72. ve 96. saatlerde örnekler alıp, antibakteriyal madde üretimini Agar Kuyu Difüzyon Metodu ile tespit etmişlerdir. *Bacillus* sp. EA62 olarak isimlendirdikleri suş, en yüksek inhibisyon zonunu (25 mm) *Shigella sonnei*'ye karşı göstermiştir. 6 farklı besiyeri ortamından sadece birinde maksimum antibiyotik üretimi 15 mm inhibisyon zon çapı ile 72. saatte elde etmişlerdir. Farklı glukoz konsantrasyonlarında antibiyotik üretimlerini karşılaştırdıklarında ise maksimum inhibisyon zonunun 72. saatte 25 mm ile % 3 w/v glukoz konsantrasyonunda ölçmüşlerdir. Glukozun % 0,5 - 2,5 w/v arası konsantrasyonlarındaki inhibisyon zon ölçümlerinde büyük farklılıklar gözlemlemişlerdir. Yaptığımız bu tez çalışmasında topraktan elde edilen 172 izolattan en fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olan 2 ve 6 numaralı küfler öncelikle çapraz çizgi yöntemiyle belirlendikten sonra fermentasyon ortamında büyütüldü ve farklı günlerde örnekler alınarak antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile denendi. Maksimum antimikrobiyal aktivitenin 8. ve 15. günlerde olduğu tespit edildi. Ancak ilerleyen günlerde aktivitede düşüş görüldü. Bu düşüşün mikroorganizmaların gelişimi ile yakından ilgili olan antimikrobiyal maddenin üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü üretilen sekonder metabolitler sadece üretici organizmanın gelişimi sırasında sentezlenmektedir. Antimikrobiyal madde aktivitelerinin, mikroorganizmaların büyüme safhasındaki logaritmik fazla beraber artmaya başlayıp, maksimum seviyeye durgun fazda geldiği bilinmektedir. Durgun fazın sonuna doğru ortamda biriken kimyasal maddeler artacak, mikroorganizmalar arasında rekabet gelişmeye başlayacağından bu maddeler yıkılarak besin olarak da kullanılabilirdiğinden antimikrobiyal madde üretimi baskılanır. Bu düşüşün bir diğer nedeninin ise, gelişme fazının sonunda proteazların yıkımından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Kim ve ark., 2006; Şensoy-Karaoğlu, 2013).

Çalışmamızda test mikroorganizmalarının duyarlılık ve direnç profillerini araştırmak üzere, kliniklerde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerden olan tetrasiklin, gentamisin, penisilin ve penisilin türevleri olan ampicilin ve oksasilin kullanıldı. Bu antibiyotiklerden penisilin, penisilinaza dayanıklı penisilin grubuna giren oksasilin ve aminopenisilinler grubunda olan ampicilin; diğer  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler gibi, penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak hücre duvarı sentezini bozmak suretiyle bakterisid etki göstermektedir. Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden olan gentamisin, ribozomun 30S alt birimine bağlanıp protein sentezini bozarak bakterisid etki göstermektedir. Tetrasiklinler ise, bakteri ribozomunun 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe edip bakteriyostatik etki gösterirler. Standart antibiyotiklerle yaptığımız çalışmada bazı test mikroorganizmalarında penisilin ve penisilin türevi antibiyotiklere direnç tespit edilirken, bu mikroorganizmaların tümünün gentamisin ve tetrasikline duyarlı oldukları belirlendi. *K. pneumoniae*'a karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirlenen 2 ve 6 numaralı örneklerin gentamisin ve tetrasiklinin tek başlarına yaptıkları açılımdan daha fazla açılım yaparak bu antibiyotiklere göre daha etkili olduğu belirlendi. Gentamisin *K. pneumoniae*'a 19 mm, tetrasiklin 13 mm açıklık yaparken; 2 ve 6 numaralı örnekler sırasıyla 23 ve 26 mm açıklık yapmışlardır. Aynı durum *A. tumefaciens*, *B. subtilis*, *S. aureus* ve *S. Enteritidis* için de benzerdir. Elde edilen verilere göre 2 ve 6 numaralı örneklerin, mikroorganizmaların ribozomal alt ünitesine bağlanmak suretiyle etki ettiği veya başka bir mekanizma ile test edilen antibiyotiklerden daha etkili bir mekanizmaya sahip oldukları düşünülmektedir.

Tez çalışmamızda topraktan elde edilerek saflaştırılan küflerin antifungal etkilerini tespit etmek amacıyla birbirlerine karşı aynı petride agar üzerinde 2'li, 3'lü ve 4'lü olacak şekilde denendiğinde küflerin antifungal madde ürettiği görüldü. Küflerden bazılarının diğerlerine karşı etki göstererek etrafında temiz bir alan oluşturup onları büyütmediği, bir kısmının ise diğerleri üzerine saçılımlar yaparak onların alanlarını işgal edip büyümelerine engel olduğu gözlemlendi. Küflerin bu etkilerinin kitinaz enziminden veya ürettikleri farklı bir antifungal maddeden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu antifungal maddenin veya kitinazın ilerki projelerde incelenmesi planlanmaktadır.

Topraktan izole edilen 60 farklı mikroorganizma izolatu arasında çapraz çizgi testinin sonuçlarına göre daha etkin antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilip seçilen 9 farklı

bakteri ve 6 farklı küf fermentasyon besi yeri ortamında çoğaltılarak disk difüzyon metoduyla test edilen fermentasyon besi yeri örnekleri sonucunda sadece 2 küf ve bir bakterinin antibakteriyal kapasite bakımından diğerlerine göre daha etkili oldukları gözlemlendi. Diğer mikroorganizmaların fermentasyon besi yeri örneklerinin antibakteriyal etkilerinin çapraz çizgi metoduna kıyasla ya daha az ya da hiçbir etki göstermedikleri tespit edildi. Bunun sebebi olarak değişen besi ortamının ve içeriğinin etkisinin olduğu tahmin edilmektedir çünkü hem katı besi yerinden sıvı besi yerine aktarıldılar hem de zengin besi yeri ortamından mısır şurubu haricinde sentetik bir besi yerinde çoğaltıldılar.

Çalışmamız sonucunda elde edilen 2, 5 ve 6 numaralı mikroorganizmalardan, 2 ve 6 numaralı küf izolatlarının test bakterilerine karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin, 5 numaralı bakteri izolatının gösterdiği etkiden daha fazla olduğu görüldü. Özellikle 2 ve 6 numaralı küf izolatlarının geniş spektrumlu antimikrobiyal madde üretme yeteneğinin daha yüksek olduğu tespit edildi. Böylece 2 ve 6 numaralı izolatların etkili oldukları sekiz test mikroorganizmasına karşı uygulanan MİK deneyinde, gözlem yoluyla ve 660 nm de ölçülen absorbans sonuçlarına göre üremenin belirgin bir biçimde inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu olan 0,05 değeri minimum inhibitör konsantrasyonu olarak kabul edildi. Elde edilen bu sonuca göre 2 ve 6 numaralı izolatların ürettikleri antimikrobiyal maddenin çalışmada uygulanan en düşük konsantrasyon olan 0,05 katlık seyreltmede dahi test mikroorganizmalarının üremelerini engellediği tespit edildi.

Ülkemizde ve dünyada antimikrobiyal aktivite çalışmaları bilimsel alandaki gelişmeleri takiben, hızla devam etmektedir. Etken maddelerin hassas tespiti için çalışmalar artırılarak, tüm fiziko kimyasal parametreler kullanılarak değerlendirmeler yapılmalıdır. Kapalı sistemlerde yapılacak olan deneylerin sonuçları ve kontaminasyon riskine bağlı kayıplar da önemli ölçüde engellenebileceğinden, kontrollü laboratuvar koşullarında yapılan deneylerin sonuçlarının daha verimli olması beklenmektedir. Antimikrobiyal bir ajanın etkinliğinin çalışma koşulları yanında birçok ekolojik faktöre bağlı olduğu unutulmadan, çalışmalar sürekli hale getirilmelidir (Çakı, 2009).

Sekonder metabolitlerin, topraktan elde edilen mikroorganizmalar tarafından üretildiğinde daha ekonomik olması beklenmektedir. Tez çalışmamızda, doğal kaynak olarak nitelendirilen toprak mikroorganizmalarına yönelmemizin en temel

nedenlerinden biri de ekonomik olarak, bulunma ve ulaşılma güçlüğünün olmamasıdır. Bu nedenle buldukları bölgeye ve mevsime bağlı tarama yapıldığında toplanan örnekler ile, ileri farmasotik araştırmalara yönelmek daha doğru olacaktır. Çünkü bir tür ne kadar zor şartlarda kalırsa savunma mekanizmasını da o kadar güçlü tutmaya çalışmaktadır. Sekonder metabolitler genellikle bir savunma mekanizması olarak tanımlanırlar ve bu yüzden türlerin buldukları ekolojik koşullar, onların antimikrobiyal etkinliğinde önemlidir.

Antibiyotik direnci tüm dünyada yaygın olarak görülen ve klinikte hastalıkların tedavisinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Gerek çalışmalarımız da gerekse yayınlanan diğer benzer çalışmalarda elde edilen bulgulara göre bakterilerde, klinik kullanımda olan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç geliştiği görülmektedir. Çalışmalarımız sırasında yaklaşık 200 izolatın birbirlerine veya test patojenlerine karşı antimikrobiyal etki gösteremediği tespit edilmiştir. Bu durumun mikroorganizmalarda gelişen direnç durumuyla paralellik gösterdiği düşünülmektedir. Bu sorunun önüne geçilmesi için doğru ve bilinçli antibiyotik kullanımına özen gösterilmelidir.

Sonuç olarak, toprak mikroorganizmalarından izole edilen aktif izolatların, test mikroorganizması olarak kullanılan bakteri kültürlerine karşı antibakteriyal etki spektrumu *in vitro* olarak tespit edilmiş olup, bunların geniş spektrumlu antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Bu izolatların, antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalara karşı antagonistik etki oluşturması oldukça önemlidir. Bu izolatların fermantasyon ortamında büyütülerek etkilerinin endüstriyel alanda kullanım için uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu gibi toprak izolatlarından yola çıkılarak yapılacak ilerki farmakolojik araştırmalarla, keşfedilecek yeni antibiyotiklerin kullanılması durumunda hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli yol alınabileceği düşünülmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Akbulut, V., 2012. İstanbul Güneybatı Sahili'nden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Antibiyotik Direnç Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*. İstanbul.
- Akkoyun, H.T., 2007. Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi*. Erzurum.
- Aktuğlu, Y., 1997. İstanbul Üniversitesi Cerahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu 2-3 Mayıs , İstanbul, 11-25.
- Altunçekiç-Yıldırım, A., Çetinkol, Y., Yağan, Ö. ve Taş, N., 2014. *Rhizobium radiobacter*'e Bağlı Gelişen Pnömoni Olgusu. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*, 3: 13.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:5-16.
- Anonim, 2014a. <http://www.tdk.gov.tr>. (Erişim Tarihi: 14/11/2014).
- Anonim, 2014b. <http://www.studyinukraine.eu/fr/antibiotics-and-the-bacterial-cell-wall>. (Erişim Tarihi: 18/12/2014).
- Anonim, 2014c. <http://www.textbookofbacteriology.net/antimicrobial.html>. (Erişim Tarihi: 16/12/2014).
- Apan, T.Z., 2004. Yeni Peptid Antibiyotik Olan Magainin ve Peksigananın Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, Cilt 61, No : 1,2,3, s. 37 – 40.
- Arai, T., Kuroda, S. ve Mikami, Y., 1976. "Classification of Actinomycetes with Reference to Antibiotics Production In Actinomycetes". The Boundary Microorganisms. 543-651. Ed. by. T. Arai, *Toppan Company Limited*, Tokyo-Singapor.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. *Medisan Yayın Serisi*, 46, s. 80-368.
- Aslan, B., 1999. *Streptomyces* Türlerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Antibiyotik Üretimi Üzerine Çalışmalar. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi*, Adana.
- Augustine, S.K., Bhavsar, S.P. ve Kapandis, B.P., 2005. "A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus*". *PU 23 J. Biosci* Vol. 30, p. 201–211.
- Ayanoğlu-Dülger, G., 1990. Kemoteropötiklere Giriş. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Programı (MİSEP-1)* 1-15 Nisan 1990, 1-10.
- Babic, M., Hujer, A.M. ve Bonomo, R.A., 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resis Updates*, 9, 142- 56.

- Balkar, N., 2007. Topraktan İzole Edilen Actinomycet'lerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması. *Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.*
- Baquero, F. ve Canton, R., 2009. Evolutionary biology of drug resistance. İçinde Mayers, D.G., ed. Antimicrobial Drug Resistance Volume-1 Mechanisms of Drug Resistance. *Humana Press*, p. 9-32.
- Bennett, J. ve Geme, J.W., 1999. Bacterial Resistance and Antibiotic Use in the Emergency Department. *Emergency Medicine*, 46 (6), 1125-1143.
- Berdy, J., 1974. "Recent developments in antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure". *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol.18, p.309-406.
- Berdy, J., 1986. "Further antibiotics with practical application". *In Biotechnology*, Vol, 4, p. 487-505. Ed. by Pape, H., Rhem, H.J. ve Verlag, V.C.H., Weinheim.
- Bozkaya, E., 2002. *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji-1, Nobel Kitabevleri, İstanbul.*
- Bush, K., Jacoby, G.A. ve Madeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 1211-33.
- Canton, R. ve Garbalosa P.R., 2011. Co-resistance: an opportunity for bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, 477-485.
- Chopra, I. ve Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology and Epidemiology of Bacterial Resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), 232-60.
- Cingi, M.İ. ve Erol, K., 1996. Farmakoloji. *Anadolu Üniversitesi Yayınları*, 975-492-231-4.
- Clancy, J., Dib-Hajj, F., Petitpas, J.W. ve Yuan, W., 1997. Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, mreA, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 2719-23.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. M7- A7.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th informational supplement, M100-S19. Wayne: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Performance Standards For Antimicrobial Disk And Dilution Susceptibility Tests For Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard. Second Edition. M31-A2 and M37-A2. Clinical Laboratory Standards Institute Pennsylvania, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2014. M100-S24; Vol. 34 No.1.

- Coral, G., 1998. Elektroporasyon Metodu ile Rekombinant Üretimi. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*. Adana. Saunders, A., 1984. Genetics and Evolution of Antibiotic Resistance. *Br Med Bull.*, 40, 54-60.
- Cruger, W. ve Cruger, A., 1984. Biotechnologie-Leehrbuch der angewandten Microbiologie. R. Oldenbourg Verlag München Wien, 197-242.
- Çakı, Z., 2009. Ege Denizi Kıyılarında Bulunan Bazı Makro Alg Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Saptanması. *Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Manisa.
- Çengel, M., 1993. Toprak Biyolojisi. *Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi, Yayınları Ders Notları*, No: 5. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- Davies, J. ve Davies, D., 2010. Origins and Evolution Of Antibiotic Resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 74, No. 3p. 417–433.
- Deacon, J.W., 2005. Fungal Biology. Blackwell Publishing Professional; 4 Edition, ISBN: 1405130660. p. 372.
- Demain, A.L., 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology*, 1: 259–264.
- Denizci, A.A., 1996. Ege ve Doğu Karadeniz Bölgesi Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerden Antibakteriyal Antibiyotiklerin Aranması ve Üretimi Üzerine Bir Araştırma. *Doktora Tezi, EÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bornova-İzmir.
- Drautz, H., Reuschenbach, P. ve Zahner, H., 1985. Metabolic Products of Microorganisms. 225 Elloramycin. A new anthracyclin-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation Characterization Structure and Biological Properties. *The Journal of Antibiotics*. Vol. 38, p. 1291-1301.
- Drawz, S. ve Bonomo, R.A., 2010. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160-201.
- Durupınar, B., 2001. Antibiyotik Dirençte Yeni Eğilimler. *Klinik Dergisi*, 14(2),47-56.
- Ergül, D. ve Sadi, İ.E., 2012. Çevresel Örneklerde Antibiyotik Dirençli Bakterilerin Araştırılması ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. *Özel Ege Lisesi*, İzmir.
- Farber, B.F., Eliopoulos, G.M., Ward, J.I. ve ark., 1977. Multiply resistant viridans streptococci: Susceptibility to beta-lactam antibiotics and comparison of penicillin binding protein patterns. *Antimicrob Agents Chemother*, 3, 47-51.
- Fleming, A., 1922. *Proc. Roy. Soc. Biol.*, 93: 306.
- Gangle, B.J., 2005. Sources and Occurrence of Antibiotic Resistance in The Environment. *Master of Science, University of Maryland*.
- Karaaslan, E., 2013. Çevreden İzole Edilen Suşların Antimikrobiyal Direnç Durumlarının Araştırılması ve Klinik Suşlarla Karşılaştırılması. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul.

- Kim, M.H., Kong, Y.J., Baek, H. ve Hyun, H.H., 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin G05 by *Micrococcus* sp. G05. *Journal of Biotechnology*, 121:54-61.
- Krause, R.M., 1992. The origin of plagues: old and new. 257, 1073-8.
- Kuyucu, N., 2007. Antibiyotik Direnci. *Çocuk Enf. Dergisi*, Özel Sayı 1, 33-8.
- Lampinen, J., 2005. Continuous Antimicrobial susceptibility testing in drug discovery. *Drug Plus International*, p. 1-3.
- Lancini, G., Parenti, F. ve Gallo, G.G., 1995. "Antibiotics": A Multidisciplinary Approach. *Plenum Pres*, New York and London.
- LeClercq, R., Dutka-Malen, S., Brisson-Noel, A. ve ark., 1992. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis.*, 15, 495-501.
- LeClercq, R., Dutka-Malen, S., Duval, J. ve Courvalin, P., 1992. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 2005-8.
- Livermore, D.M., 1992. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 2046-8.
- Livermore, D.M., 2005. Minimising antibiotic resistance. <http://Infection.theLancet.com> 5, 450-9.
- Martinez, A., Kolvek, S.J., Yip, C.L.T., Hopke, J., Brown, K.A., MacNeil, I.A. ve Osburne, M.S., 2004. "Genetically modified bacterial strains and novel bacterial Artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple bacterial hosts". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.70, p. 2452–2463.
- Medeiros, A.A., 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.*, 24, 19-45.
- Mendelman, P.M., Chaffin, D.O. ve Kalaitzoglou, G., 1990. Penicillin-binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 25, 525-34.
- Meyer, E., Gastmeier, P., Deja, M. ve Schwab, F., 2013. Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany. *International Journal of Medical Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm>. (Erişim Tarihi: 04.04.2013).
- Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T. ve Yoshida, H., 1989. gyrA and gyrB mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 254-5.
- Nikaido, H., 1985. Role of permeability barriers in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther*, 27, 197–231.

- Opal, S.M. ve Medeiros, A.A., 2005. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E. ve Dolin, R., eds. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6. ed, *Churchill Livingstone*, USA. 253-70.
- Oskay, M., 2006. Kuzey Kıbrıs Topraklarından Antimikrobiyal Aktivitesi Yüksek *Streptomyces* Suşlarının İzolasyonu, Taksonomisi ve Fermentasyon Çalışmaları Üzerine Bir Araştırma. *Doktora Tezi, CBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü*, Manisa.
- Oskay, M. ve Tamer, A.U., 2009. *Streptomyces* Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarını. *e-Journal of New World Sciences Academy Ecological Life Sciences*, 5A0008, 4, (2), 48-60.
- Ökmen, G. ve Uğur, A., 2011. Sumak Bitkisinin Yetiştığı Topraklardan İzole Edilen Antagonistik Streptomisetlerin Antimikrobiyal Potansiyeli. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4, (2):1-5, 2011.
- Öner, M., 1989a. *Actinomycetes* (Selman A. Waksman 1967'den çeviri). *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, No: 89. EÜ. Basımevi, Bornova-İzmir. s. 328.
- Öner, M., 1989b. "İleri Endüstriyel Mikrobiyoloji Ders Notları". *Ege Üniv. Fen Fak Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı*, Bornova-İzmir.
- Öner, M., 1996. Genel Mikrobiyoloji. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*. İzmir.
- Öner, M., 2001. Genel Mikrobiyoloji (4. Baskı). *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, No: 94. *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova- İzmir. s. 380.
- Özçelik, S., 1998. Genel Mikrobiyoloji. *Süleyman Demirel Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Yayın*, No: 1, Ders Kitapları No: 1, Isparta. 209-210.
- Özpinar, H., Dağ, Ş. ve Yiğit E., 2013. Şeftali (*Persica vulgaris* Miller) yaprak ekstraktının antibakteriyel etkisi. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, TR-58140, Sivas.
- Özşen, E., 2009. Çanakkale İli (Türkiye) Tarım Alanlarındaki Topraklardan İzole Edilen Aktinomisetlerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Çanakkale.
- Öztürk, R., 1997. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi ve Günümüzde Direnç Durumu. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul. 27-51.
- Öztürk, R., 2002. Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyumu*, No: 31, 83-100.
- Öztürk, R., 2008. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi*, No: 61, 1-16, 7-8 Şubat 2008, İstanbul.

- Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A. ve Jacoby, G.A., 1990. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyiminoand alphas-methoxy-beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 2200-9.
- Porter, J.N., 1976. "Antibiotics In Industrial Microbiology" s. 460-478. Ed.by Miller, B.M ve Litsky, W. *Mc Graw- Hill Book Company*.
- Quintiliani, R., Evers, S. ve Courvalin, P., 1993. The vanB gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J Infect Dis*, 167, 1220-3.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R.J., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I. A.C., Minor, Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, Handelsman, J. ve Goodman, R.M. 2000. "Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms". *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, p. 2541–2547.
- Schlegel, H.G., 1995. General Microbiology. Translated by M. Korgut. Seventh Edition. *Cambridge Universty Press*, Cambridge.
- Scott, G., 2005. Antibiotic resistance. *Medicine*, 33(1), 47-51.
- Srikumar, R., Li, X.Z. ve Poole, K., 1997. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 179, 7875-81.
- Sutcliffe, J., Tait-Kamradt, A. ve Wandrack, L., 1996. Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes resistant to macrolid but sensitive to clindamycin; a common resistance pattern made by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother*, 40, 1817-1824.
- Şensoy-Karaoğlu, Ş., 2013. Rize İli Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Bakteriyosin İçeriklerinin, Aktarılabılır Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Rize.
- Tabarez, M.R., 2005. Discovery of the new antimicrobial compound 7-O-malonyl macrolactin. *Ph.D. Thesis, Faculty of Natural Sciences, University of Carolo-Wilhelmina*. p. 167.
- Tenover, C.F., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, 3-10.
- Thomson, C.J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H. ve Labischinski, H., 2004. Antibacterial research and development in the 21th century-an industry perspective of the challenges. *Current Opin Microbiol*, 7, 445-50.
- Tunail, N., 2009. Mikrobiyoloji. *Pelin Ofset Ankara*, 978-605-603-602.

- Umezawa, H., Tsuchiya, T., Muto, R. ve Umezawa, S., 1972. "Studies on Aminosugars XXIX. The synthesis of 3'-O-Methylkanamycin". *Microbiology Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 45, p. 2842-2847.
- Usta, A., 2012. Topraktan Antibiyotik Üreten *Bacillus* Sp.' lerin Taranması, Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Etkisi ve Sporulasyonla İlişkisinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Bursa.
- Varaldo, P.E., 2002. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, 1-4.
- Waksman, S.A., 1963. "The Actinomycetes and Their Antibiotics". In *Advances in Applied Microbiology*, Vol 5. pp. 235-295. Ed. by W.W. Umbreit, *Academic Press*, New York and London.
- Waksman, S.A., 1967. "Actinomycetes". A Summary of Current Knowledge. *The Ronald Press Company*, New York.
- Wise, R., 1998. Science, medicine, and the future: the development of new antimicrobial agents. *British Medical Journal*, 317, 643-4.
- Wright, G.D., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1451-1470.
- Yıldırım, A., 2004. Topraktan izole edilen bazı aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- Yılmaz, M. ve Beyatlı Y., 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobioloji Dergisi*, 7, 35-49.
- Yorgancıgil, B., 1999. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 6 (2), 177-182.
- Yüce, A., 2001. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 4 (2), 41-46.
- Zahner, H., Drautz, H., Fiedler, H.P., Grote, R., Keller-Schierleinu, W., König, W.A. ve Zeeck, A., 1988. Ways to new metabolites from actinomycetes. In: *Biology of Actinomycetes* (ed. Okami, Y., Beppu, T. ve Ogawara, H.), Vol. 88, *Japan Scientific Societies Press*, Japan.
- Zscheck, K.K. ve Murray, B.E., 1993. Genes involved in the regulation of betalactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 37, 1966-70.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yasemin BAŞKAYA  
Doğum Tarihi ve Yer : 1987, Kadirli  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 05055180670  
e-mail : yaseminbaskayaa@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Türkan-İrfan Akün Çok Programlı Lisesi	2004

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-2010	Pozantı 80. Yıl Devlet Hastanesi Laboratuvarı	Stajyer
2013-2014	Özel Yeni Birkent Dersanesi	Öğretmen

### Yayımlar

#### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayımlar:

1. Başkaya, Y. ve Kocabaş, A., 2014. Antimicrobial Activities of Soil Isolate Microorganisms on Some Pathogens. *III. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*. 10-12 September 2014 İzmir, Abstract Book p. 194.
2. Başkaya, Y. ve Kocabaş, A., 2014. Toprakta Edilen Mikroorganizmaların Antifungal Etkilerinin Tespiti. *1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Kongresi*. 24-26 Eylül 2014 Ankara, Özet Kitabı s. 70.

### Projeler

1. Toprak mikroorganizmalarından bazı patojen mikroorganizmalar üzerine etkili antimikrobiyal maddelerin bulunması. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi BAP-10-M-13, Araştırmacı, Mayıs 2013- Aralık 2014.



## **Sertifikalar**

1. ISO 15189 Tıbbi Laboratuvar Akreditasyonu Sertifikası
2. ISO 9001: 2008 Kalite Yönetim Sistemi Sertifikası
3. Öğretmenlik Sertifikası (Formasyon Belgesi)