

**YENİ İZOLAT *STREPTOMYCES* TÜRLERİNDEN
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES BY
NEWLY ISOLATED *STREPTOMYCES* SPECIES
AND INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL
ACTIVITIES**

MELİKE SAYIN

PROF. DR NİLÜFER CİHANGİR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Sevgili aileme...

ÖZET

Yeni İzolat *Streptomyces* Türlerinden Sekonder Metabolit Üretimi Ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi

Melike SAYIN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Ocak 2021, 90 Sayfa

Streptomyces cinsi, son derece yüksek sekonder metabolit üretebilme yetenekleri ile mikroorganizmalar arasında önemli bir yere sahiptir. Şimdiye kadar tanımlanan en büyük antibiyotik üreticisi olan bu cinsten elde edilen antimikrobiyal maddelerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Var olan antimikrobiyal maddelerin yanlış şekilde ve gereksiz kullanımından dolayı gelişen direnç sebebiyle, yeni antimikrobiyal maddelerin aranması zorunlu hale gelmiştir. Son yıllarda sekonder metabolit keşfinin azalması, yeni metabolit arayışlarını farklı alanlara yönlendirmektedir. Antibiyofilm ve anti-quorum sensing maddelerinin araştırılması gittikçe artan antibiyotik dirençliliğine karşı umut vadetmektedir. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasının amacı, yeni izole edilen *Streptomyces* türlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin, diğer mikroorganizmalar üzerindeki biyolojik aktivitelerinin araştırılmasıdır. Çeşitli bölgelerin topraklarından elde edilen 135 adet izolatın antimikrobiyal, anti-quorum sensing ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir. Ön incelemeler sonucu 43 adet izolat antimikrobiyal, 10 adet izolat anti-quorum sensing, 25 adet izolat ise antibiyofilm etkili bulunmuştur. Etkili bulunan izolatların sekonder metabolitleri ekstrakte edilip, minimum inhibisyon konsantrasyon

(MİK) değerleri belirlenmiştir. İzolatların biyolojik aktiviteleri karşılaştırılarak en etkili ve farklı 9 adet izolat belirlenmiş, çeşitli aktivitelere sahip sekonder metabolitler ekstraktlarının kimyasal bileşimi Gaz kromatografisi - kütle spektrometresi (GC-MS) analizi ile incelenmiştir. GC-MS analizi, ekstrakt bileşimlerinin toplamda 94 adet farklı kimyasal bileşenden oluştuğunu göstermiştir. Literatür taramaları sonucu 94 bileşen arasından 24 adet bileşenin antimikrobiyal; 4 adet bileşenin anti-quorum sensing; 3 adet bileşenin ise antibiyofilm aktivitelerine sahip olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces*, sekonder metabolit, antimikrobiyal, antibiyotik, anti-quorum sensing, antibiyofilm.

ABSTRACT

Production of Secondary Metabolites By Newly Isolated *Streptomyces* Species and Investigation of Their Biological Activities

Melike SAYIN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

January 2021, 90 pages

The great importance given to *Streptomyces* among microorganisms with its ability to produce extremely high secondary metabolites. The number of antimicrobial products obtained from this genus, which is the largest antibiotic producer ever identified, has been increasing day by day. The investigation of new antimicrobial molecules has become imperative due to the resistance caused by the wrong and unnecessary use of existing antimicrobial agents. The decrease in secondary metabolite discovery in recent years has led the search for new metabolites in different areas. The examinations of antibiofilm and anti-quorum sensing agents show promise against the gradually increasing antibiotic resistance. The aim of this thesis study is to investigate the biological activities of secondary metabolites obtained from newly isolated *Streptomyces* species on other microorganisms. Antimicrobial, anti-quorum sensing and antibiofilm activities of 135 *Streptomyces spp.*'s isolated from the soils of various regions were investigated. As a result of the initial examinations, 43, 10 and 25 isolates were found to have antimicrobial, anti-quorum sensing and antibiofilm effects, respectively.. Secondary metabolites of the effective isolates were extracted and minimum inhibition concentration (MIC) values

were determined. The most effective and different 9 isolates were determined by comparing the biological activities of the isolates, and the chemical composition of the secondary metabolite extracts with various activities were examined by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) analysis. GC-MS analysis showed that the extract compositions consisted of 94 different chemical components in total. As a result of the literature reviews, among 94 components, 24 components are antimicrobial; Anti-quorum sensing of 4 components; 3 components were found to have antibiofilm activities.

Keywords: *Streptomyces*, secondary metabolite, antimicrobial, antibiotic, anti-quorum sensing, antibiofilm.

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve sevgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Cihangir'e,

Engin bilgi birikimleri ve destekleri ile her zaman yanımda olan Biyoteknoloji Anabilim Dalı üyeleri değerli hocalarım, Prof. Dr. Nilüfer Aksöz, Prof. Dr. Işıl Seyis Bilkay, Dr. Öğr. Üyesi Neslihan İdil, Dr. Doruk Aracagök, Dr. Sinem Diken Gür, Dr. Hande Avcıoğlu, Dr. Sezen Bilen Özyürek, Dr. Gülcan Özbakır, Dr. Kübra Erkan Türkmen ve Dr. Gözde Koşarsoy Ağçeli, Dr. Hamideh Hammamchi 'ye,

Tez ve diğer çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve manevi destekleri ile her koşulda yanımda olan sevgili M. Hasan Akyıl ve Dr. Özgecan Erdem hocama,

Yardımları ve bilgileri ile bana her zaman destek olan çalışma arkadaşlarım; Selcan Genç, Cansu Sevim'e,

Tez süresi boyunca maddi desteğinden ötürü Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Her zaman sevgiyle ve sabırla yanımda olan sevgili arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca yanımda olan, maddi ve manevi destekleri ile bu günlere gelmemi sağlayan aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Aktinomisetler	3
2.2. Streptomisetler	3
2.3. Sekonder Metabolitler	5
2.4. Streptomisetlerin Bazı Biyolojik Özellikleri.....	7
2.4.1. Antimikrobiyal Etki.....	7
2.4.1.1. Antibiyotikler.....	7
2.4.1.2. Antifungal Maddeler.....	11
2.4.1.3. Antiviral Maddeler.....	11
2.4.2. Biyofilm	12
2.4.3 Quorum Sensing.....	14
2.4.4. Anti-Quorum Sensing	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. <i>Streptomyces</i> 'lerin İzolasyonu	24
3.2. <i>Streptomyces</i> 'lerin Tanımlanması	24
3.2.1. Morfolojik Tanımlama	24
3.2.2. Biyokimyasal Tanımlama	24
3.2.3. Moleküler Tanımlama	25
3.3. Sekonder Metabolitlerin Üretimi	25
3.5. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	26
3.5.1. Çapraz Çizgi Yöntemi.....	26

3.5.2. Agar Difüzyon Yöntemi	26
3.5.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	28
3.6. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Belirlenmesi	29
3.6.1. Çapraz Çizgi Yöntemi	29
3.6.2. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerin İkincil Taraması	30
3.7. Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	31
3.8. Sekonder Metabolitlerin Tanımlanması.....	32
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	34
4.1. <i>Streptomyces</i> 'lerin Tanımlanması.....	34
4.1.1. Morfolojik Tanımlama.....	34
4.1.2. Biyokimyasal Tanımlama	35
4.1.3. Moleküler Tanımlama.....	35
4.2. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	37
4.2.1. Çapraz Çizgi Yöntemi	37
4.2.2. Agar Difüzyon Yöntemi	39
4.2.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	45
4.3. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Belirlenmesi	47
4.3.1. Çapraz Çizgi Yöntemi	47
4.3.2. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerin İkincil Taraması	48
4.3.3. Viyolasin İnhibisyonunun Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi	49
4.4. Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	51
4.4. Sekonder Metabolitlerin Tanımlanması.....	54
5. YORUM	64
6. KAYNAKLAR	67
EKLER	75
Ek 1 – İzolatların Biyolojik Aktiviteleri.....	75
Ek-2 Ekstraktların kimyasal bileşimi.....	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Streptomyces sp.</i> 'nin katı besiyeri üzerinde görüntüsü.....	4
Şekil 2.2. Mikroorganizma sayısına bağlı olarak metabolitlerin üretim zamanı.	6
Şekil 2.3. Çeşitli antibiyotiklerin bulunma tarihleri [24].	8
Şekil 2.4. Biyofilm oluşum sürecinin şematik gösterimi [44].....	13
Şekil 2.5. Quorum sensing sistemi tarafından düzenlenen bazı mikrobiyal topluluk davranışları [51].	15
Şekil 2.6. Üç temel QS sisteminin temsili sinyallerinin kimyasal yapıları [53].	16
Şekil 2.7. İki temel quorum sensing mekanizmasının şematik gösterimi. (A) LuxI/R sistemi; (B) LuxS/AI-2 sistemi [56].	18
Şekil 2.8. <i>C. violaceum</i> 'da quorum sensing mekanizmasının regülasyonu ve viyolasin sentezi [63].	20
Şekil 3.1. Çapraz çizgi yönteminin şematik gösterimi.....	26
Şekil 3.2. Agar difüzyon yönteminin şematik gösterimi.....	27
Şekil 3.3. Çapraz çizgi yönteminin şematik gösterimi.....	29
Şekil 3.4. Agar difüzyon yönteminin şematik gösterimi.....	30
Şekil 4.1. M33, M40, MKG, 29, M100, M9 izolatlarının SCA besiyerindeki görünüşleri.	34
Şekil 4.2. <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) suşu ile, BB3 ve M62 izolatlarının SCB besiyerindeki görünüşleri.....	35
Şekil 4.3. 16S rRNA gen dizilemesi yapılan izolatların SnapGene programındaki görüntüsü.....	36
Şekil 4.4. Test mikroorganizmalarının çapraz çizgi yöntemi ile belirlenen bazı antimikrobiyal etki sonuçları. a) <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633; b) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; c) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213; d) <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603; e) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853; f) <i>Shigella boydii</i> ATCC 9207; g) <i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199; h) <i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290; i) <i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640; j) <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933.	38

Şekil 4.5. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	39
Şekil 4.6. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	40
Şekil 4.7. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922'ye karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	40
Şekil 4.8. <i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	40
Şekil 4.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	41
Şekil 4.12. <i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290'a karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	42
Şekil 4.13. <i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640'a karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	42
Şekil 4.14. <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.	42
Şekil 4.15. <i>C. violaceum</i> ATCC 12472'nin çapraz çizgi yöntemi bazı etki sonuçları. M35) Etkisiz; HAY) Antimikrobiyal etki; M62) Anti-quorum sensing etki.....	47
Şekil 4.16. <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472'ye karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının antimikrobiyal ve anti-quorum sensing zon görüntüleri.	48
Şekil 4.17. Antimikrobiyal etki sonucu şeffaf zon ve anti-quorum sensing etki sonucu açık renk zonun görüntüsü.....	48
BB3 ve 13 ekstraktları <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. M62, MKG ve KGA ekstraktlarında hem antimikrobiyal hem de anti-quorum sensing aktivitesi gözlemlenmiştir. M122	

ekstraktı antimikrobiyal aktivite göstermeksizin anti-quorum sensing aktivitesi göstermiştir.....	49
Şekil 4.18. M62 ekstraktının çeşitli konantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktının viyolasin inhibisyon sonuçları.....	50
Şekil 4.19. KGA ekstraktının çeşitli konantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktının viyolasin inhibisyon sonuçları.....	50
Şekil 4.20. <i>Streptomyces spp.</i> kültür sıvıları ile antibiyofilm özelliklerinin araştırılması.....	51
Şekil 4.21. BB3 izolatının çeşitli konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktlarının antibiyofilm sonuçları.....	52
Şekil 4.22. M122 izolatının çeşitli konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktlarının antibiyofilm sonuçları.....	53
Şekil 4.23. BB3 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Gliserol; c) Stearik asit; d) Palmitoleik asit; e) Gallik asit;.....	58
f) Maltoz; g) Porfin; h) Neohesperidin.....	58
Şekil 4.24. KGA ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) 3-metil-2-okzobütanoik asit; c) Maleik asit; d) 1,2-sikloheksandion; e) Gliserol; f) Stearik asit; g) Palmitoleik asit; h) Urasil; i) Gallik asit; j) Maltoz; k) Porfin.....	58
Şekil 4.25. M33 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) d-Glukoz; c) Gliserol; d) Stearik asit; e) Palmitoleik asit; f) Urasil; g) L-piroglutamik asit; h) Gallik asit; i) Maltoz; j) Porfin.....	59
Şekil 4.26. MKG ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Treoz; c) Gliserol; d) Palmitoleik asit; e) Gallik asit; f) Maltoz; g) Laktoz; h) Porfin.....	59
Şekil 4.27. M122 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Vanilin; c) Gliserol d) Stearik asit; e) Palmitoleik asit; f) Urasil; g) L-piroglutamik asit; h) Gallik asit; i) Maltoz; j) Porfin.....	60
Şekil 4. 28. M62 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Gliserol c) Stearik asit; d) Palmitoleik asit; e) L-piroglutamik asit; f) Gallik asit; g) Maltoz; i) Porfin.....	60
Şekil 4. 29. M154 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Gliserol c) Palmitoleik asit; d) L-piroglutamik asit; e) Gallik asit; f) Maltoz; g) Porfin.....	61

Şekil 4.30. 13 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) 3-metil-2-okzobütanoik asit c) Gliserol d) Stearik asit; e) Palmitoleik asit; f) Gallik asit; g) Maltoz; h) Urasil; i) Porfin 61

Şekil 4.31. 29 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Maleik asit; c) Gliserol; d) Pirogallol; e) Stearik asit; f) Palmitoleik asit; g) Laktobiyonik asit; h) Gliserik asit i) Urasil; j) L-piroglutamik asit; k) Gallik asit l) Maltoz; m) Porfin 62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Optimize edilmiş GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.	33
Çizelge 4.1. 16S rRNA dizi analizlerinin NCBI BLAST sonuçları.	37
Çizelge 4.2. Test mikroorganizmalarının standart antibiyotik disklerine karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm).	43
Çizelge 4.3. Sekonder metabolit ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı zon çapları (mm).	44
Çizelge 4.4. Sekonder metabolit ekstraktlarının MİK değerleri.	46
Çizelge 4.5. Sekonder metabolit ekstraktlarının antimikrobiyal ve anti-quorum sensing zon çapları.	49
Çizelge 4.6. Sekonder metabolit ekstraktların kimyasal bileşenleri.	54
Çizelge 4.6. (devamı)	55
Çizelge 4.6. (devamı)	56
Çizelge 4.6. (devamı)	57
Çizelge 4.7. Çeşitli ekstrakt bileşenlerinin biyolojik aktiviteleri.	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat Derece
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
mm	Milimetre

Kısaltmalar

CFU	Koloni Oluşturan Birimler
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PBP	Penisilin Bağlayıcı Peptit
NRP	Non-ribozomal Peptit
NRPS	Non-ribozomal Peptit Sentaz
PKS	Poliketid Sentaz
EPS	Ekstraselüller Polimer Fibriller
QS	Quorum Sensing
QSI	Quorum Sensing İnhibitörleri
QQ	Quorum Quenching
AHL	Açıl Homoserin Lakton
AI-2	Oto-indüktör 2
AIP	Oto-indükleyici Peptitler

K_2HPO_4	Dipotasyum Fosfat
KNO_3	Potasyum Nitrat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum Sülfat
$CaCO_3$	Kalsiyum Karbonat
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Demir II Sülfat
ACN	Asetonitril
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
$H_2 O_2$	Hidrojen Peroksit
SCA	Starch Casein Agar (Nişasta Kazein Agar)
SCB	Starch Casein Broth (Nişasta Kazein Broth)
MHA	Mueller-Hinton Agar
LB	Luria Bertani
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optik Dansite
rpm	Dakikada Devir Sayısı

1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin gereksiz ve yanlış kullanımı ile gelişen antibiyotik dirençliliği, tüm canlıları patojen bakterilere karşı savunmasız kılmaktadır. Ne yazık ki, son yıllarda yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi ciddi ölçüde azalmıştır. Üstelik başarılı bir şekilde geliştirilen yeni ilaçlar mikrobiyal direncin gelişmemesi için yalnızca son derece ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır [1]. Bu durum araştırmacıları yeni antimikrobiyal maddelerin keşfine yöneltmiştir. Aktinomisetler tarih boyunca çeşitli biyoaktif moleküller için önemli bir kaynak olmuştur. Aktinomiset türlerinden tanımlanan biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin %34'ü *Streptomyces* türlerinden izole edilmiştir. *Streptomyces* cinsi, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör, antiparazitik, insektisit ve herbisit gibi birçok maddenin kaynağıdır [2]. Bu durum dolayısıyla yeni antimikrobiyal bileşiklerin taranması *Streptomyces* türleri üzerinde yoğunlaşmıştır.

Antibiyotiklere karşı gelişen dirence karşı tek çözüm yeni antibiyotiklerin keşfi değildir. Tanımlanan antimikrobiyal maddeler çeşitli yollarla modifiye edilip kullanılabilir. Ancak bu maddelerin hatalı şekilde kullanımı devam ettiği sürece, yeni antibiyotiklerin keşfi ya da yeniden düzenlenmeleri sadece zaman kazanmaktan ibaret olacaktır. Bu nedenle patojenik bakterilere karşı sürdürülebilir ve uzun vadeli etki sağlayacak yeni yöntemler geliştirmek her zamankinden daha önemlidir [1].

Farklı bir strateji ise, antimikrobiyal maddelerin araştırılmasına ek olarak antipatojenik maddelerin tanımlanması ve kullanılmasıdır. Bakteriler arasında “Quorum Sensing” olarak isimlendirilen bir iletişim sistemi mevcuttur. Çevreyi algılama ya da çoğunluğu algılama olarak da bahsedilen bu sistemde bakteri popülasyonu, sinyal molekülleri salgılayarak koordineli yanıtlar başlatmaktadır [3]. Biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere patojeniteyi etkileyen birçok mekanizma quorum sensing tarafından kontrol edilmektedir. Bu sistemin engellenmesiyle bakteriyel patojenitenin giderilmesi ya da hafifletilmesi yeni bir seçenek olabilir. Anti-quorum sensing adı verilen bu yeni seçenek ile, bakteri hücrelerini öldürülmediği ya da üremelerini engellenmediği için direnç oluşumu daha az beklenmektedir [4]. Fakat ne yazık ki şu ana dek tanımlanan anti-

quorum sensing bileşiklerin birçoğu insan kullanımı için uygun bulunmamıştır. Bu sebeple yeni antimikrobiyal maddelerin keşfine olan ihtiyaç gibi, yeni anti-quorum sensing bileşiklerine ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır [5].

Bu çalışmada, var olan antibiyotik krizine yeni antibiyotikler eklenmesi veya yeni alternatif yöntemler geliştirilmesi umuduyla farklı bölgelerin topraklarından izole edilen *Streptomyces* izolatlarının antimikrobiyal, anti-quorum sensing ve antibiyofilm gibi biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Etkili izolatlar belirlenerek sekonder metabolitleri üretilmiş ve bu metabolitlerin tanımlanması, karşılaştırılması ve literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aktinomisetler

Aktinomisetler, filamentöz ve hifa içeren yapıları nedeniyle morfolojik olarak funguslara benzemektedir. Ancak Gram pozitif, filamentöz bakteriler olarak sınıflandırılır. Birçoğu doğada oldukça yaygın bulunan ve serbest yaşayan mikroorganizmalardır. En fazla toprakta bulunmakla birlikte, hem karasal hem de sucul yaşam alanlarında bulunurlar [6]. Bir gram toprağın 10^9 CFU (koloni oluşturan birimler) içerdiği ve bunun 10^7 'sinin Aktinobakteriler olduğu düşünülmektedir [7]. Topraktaki birçok substratı, özellikle de daha az parçalanabilir olan kitin, selüloz ve hemiselüloz gibi böcek ve bitki polimerlerini kullanabilirler [8]. Aktinomisetler ekonomik ve biyoteknolojik olarak en değerli mikroorganizmalar içinde gösterilir. Bu bakteriler çeşitli antibiyotikler, antitümör ajanları, bağışıklık sistemi baskılayıcı ajanlar ve enzimler gibi birçok biyoaktif sekonder metabolitleri üretebilme özelliğine sahiptir [9]. Actinomycetales takımına ait Aktinomisetler, 14 alt takım, 49 familya ve 140'tan fazla cins içermektedir [6]. Streptomisetler, Aktinomisetler arasında en fazla üye içeren ve biyoaktif sekonder metabolitlerin en önemli grubudur [10].

2.2. Streptomisetler

Streptomyces cinsi, genellikle toprakta bulunan, Gram-pozitif özellik gösteren, aerob ve filamentöz bakterileri içermektedir. Bu cinsin bakterileri, karasal ve sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Büyük bir kısmı saprofit olmasına rağmen, birkaç tür insanlarda, hayvanlarda veya bitkilerde hastalık oluşturabilmektedir [11]. *Streptomyces* türleri aerob olmakla birlikte kemoorganotroftur. Genomları tipik olarak büyüktür (8-10 Mb) [12]. Spesifik olarak %69–73 Guanin + Sitozin aralığında değişen bir DNA baz kompozisyonuna sahiptir [13]. Hücre duvarı peptidoglikan yapıdadır ve yüksek miktarda L-Diaminopimelik asit (L-DAP) içerir. Optimum üreme ısıları 25°C ile 35°C arasındadır ancak psikrofilik veya termofilik türler de bulunmaktadır [14]. Optimal pH ise 6.5 ila 8.0 aralığında değişkenlik göstermektedir [15].

Spor taşıyan hifleri içeren havasal miselyum ve substrat (vejetatif) miselyum olmak üzere iki çeşit miselyum meydana getirmektedirler. Koloniler başta düz ve yumuşak, bir süre geçtikten sonra ise sert, mat ve kadifemsi olabilir [16]. Türe özgü olarak kahverengi,

kırmızı, turuncu, gri, beyaz, sarı, yeşil ve mavi gibi çeşitli renklerde koloniler oluşabilir [17].



Şekil 2.1. *Streptomyces sp.*'nin katı besiyeri üzerinde görüntüsü.

Streptomyces cinsi birçok organik bileşiği karbon kaynağı olarak kullanabilir. Selüloz, nişasta, kitin gibi bileşikler parçalayan enzimleri ürettiğinden, topraktaki madde döngüsünde de önemli bir yere sahiptir [18]. Besin ve pH gibi faktörler topraktaki dağılımlarını, gelişimini ve aktivitesini belirler [19]. Toprak içerisindeki düşük miktardaki oksijen konsantrasyonunda da gelişebilmektedirler. Ancak üreme ortamlarındaki karbondioksit oranı %10'u geçtiği zaman gelişimleri inhibe edilir. *Streptomyces* sporları kuraklık gibi faktörlere dayanıklı olduğundan dolayı, diğer mikroorganizmaların vejetatif formdaki türlerine oranla sayısı toprakta çok daha fazladır [3].

Bu cinsin bakterileri normal koşullarda spor formundadır ancak uygun şartlar sağlandığında sporlar çimlenerek substrat miselyumunu oluşturur [2]. Substrat miselyumunun, birkaç nükleotide sahip bölümler içeren geniş aralıklı septalar bulundurduğu düşünülmektedir. Substrat miselyumunun basit dallanmaları sonucunda havasal hipler oluşmaya başlamaktadır. Son olarak ise, havasal miselyumun uçları hidrofobik spor zincirlerine farklılaşmaktadır [20].

Streptomisetlerin yaşam döngüsü, sporun içine su girmesiyle ortaya çıkan germ tüpleri ile başlar [21,22]. Germ tüpleri, yanal duvarlardan rastgele aralıklarla ortaya çıkan ek

dallarla birlikte, hifal uçlarda polar büyüme ile uzar. Devam eden polar büyüme ve dallanma döngüleri sonucunda yoğun bir filament ağı olan vejetatif miselyum (batık miselyum) oluşur. Bu dallanmış miselyum, koloniyi, bitkinin toprağa tutunmasını sağlayan bir bitki kök sistemine benzer şekilde, büyüme substratına bağlar. Daha sonra ikinci farklılaşmış büyüme aşamaları başlar. Dallanmayan hava hifaları, vejetatif miselyumdan havaya yükselir. Havasal miselyumun büyümesi sona erdiğinde sporülasyona geçiş başlar [23].

Streptomyces griseus ve *Streptomyces coelicolor* iyi çalışılan iki *Streptomyces* türleridir. *S. griseus*, streptomisin antibiyotiğinin endüstriyel üretimi için kullanılan ilk türdür. *S. coelicolor* ise genetik çalışmalarda en yaygın olarak kullanılan türdür[24].

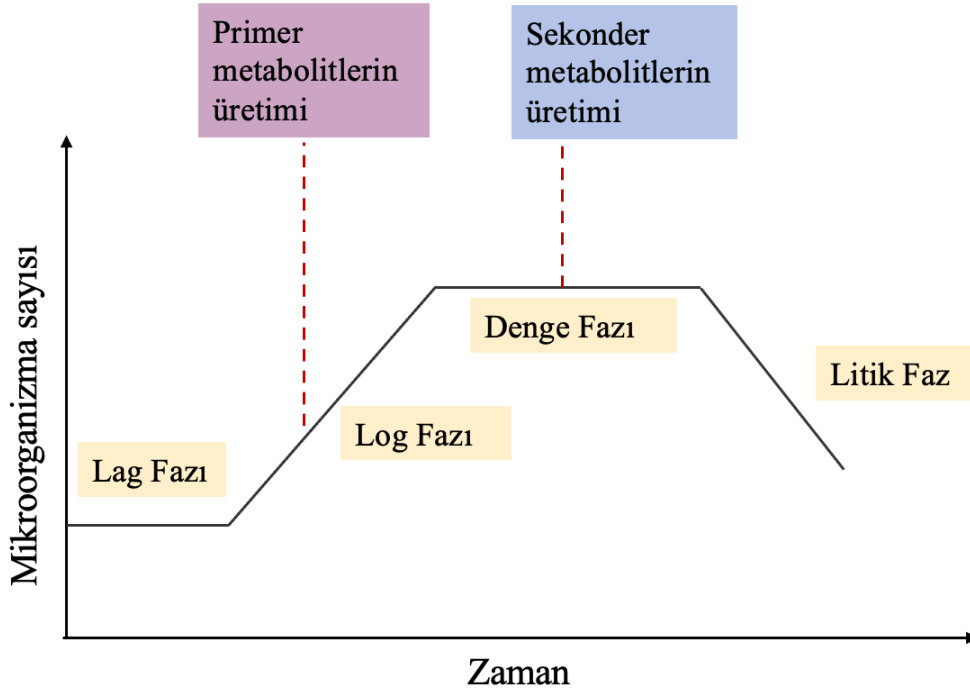
2.3. Sekonder Metabolitler

Streptomyces cinsinin en dikkat çekici özelliklerinden biri de sekonder metabolit üretebilme yetenekleridir [2]. Sekonder metabolitler; organizmaya avantaj sağlayan, bulunduğu ortama adapte olmasını kolaylaştıran moleküllerdir. Sekonder metabolitler, primer metabolizma sonucunda açığa çıkan ara ürünlerden sentezlenmektedirler. Hücrenin yaşam süreçleri için gerekli olan birincil metabolitlerin aksine, ikincil metabolitler bir anlamda “fazla” ürünlerdir, varlığı ve miktarları dış ortamdan etkilenir [25].

Belirli sekonder metabolizma yollarının yatay gen transferiyle yayıldığı düşünülen bir özellik olan kümelenme eğilimindedir [12]. Bu biyoaktif moleküller, ikincil metabolizmalarının bir parçası olarak, bakterileri kromozomunda kodlanan biyosentetik gen kümelerinden (BGC) üretilir [26]. Bu gen kümeleri uygun koşullar sağlanana kadar genellikle sessiz kalır [27]. Genellikle özel biyosentetik yollarda sentezlenir, ancak spesifik öncüler ve çeşitli kofaktörler kullanılarak birincil metabolizmaya bağlanır [28]. Hem morfolojik farklılaşmayı hem de ikincil metabolit üretimini kontrol eden pleiotropik regülatörlerden gelen sinyaller, nihayetinde biyosenteze bağlı genlerin transkripsiyonunu açan yola özgü regülatörlere iletilir [29].

İkincil metabolizmanın sentezlenme doğası aslında genetikdir, ancak ekspresyon çevresel değişimlerden büyük ölçüde etkilenebilir [30]. Biyosentezin, besin tükenmesi gibi dış uyarılara yanıt olarak, büyüme hızının azalmasıyla ya da rekabet söz konusu olduğunda

kendi kendini koruma aracı olarak hücrenin hayatta kalması için büyük önem taşıdığı düşünülmektedir [26,30].



Şekil 2.2. Mikroorganizma sayısına bağlı olarak metabolitlerin üretim zamanı.

Birçok sekonder metabolitin üretimi morfolojik farklılaşma ile birlikte olur. Vejetatif büyümeden, havasal büyümeye geçiş sırasında sekonder metabolitlerin üretiminde artış meydana gelir. Büyüme tipindeki değişiklik sırasında, vejetatif miselyumun kısmi lizisi, havasal miselyumu oluşturmak için gerekli besinleri sağlamak için gerçekleşir; besinlerin bu şekilde salınması rakipleri cezbedebilir. Sekonder metabolitlerin gelişme ve üretim döngüsünün senkronize olması, bakterilerin besinleri saklamak için istilacıları uzaklaştırması veya etraftaki bakterileri beslemek için öldürmesi için bir yol olabilir [7].

Çeşitli bitkilerin ve omurgasızların farklı *Streptomyces* suşlarını koruyup beslediği ve simbiyontların konakçılarına patojenik mikroorganizmalardan korumak için çeşitli ikincil metabolitler ürettiği birkaç etkileşim mevcuttur [12]. *Streptomyces* türlerinin temas halinde olduğu, farklı veya aynı cins içinde olabilecek diğer mikroorganizmalarla rekabet edebilmesi için de sekonder metabolitler oldukça önemlidir [24].

Mikroorganizmalar, sekonder metabolitleri genel olarak üremelerinin gecikme ve durağan fazında sentezler. Ancak, Aktinomisetler ve Streptomisetler bu biyoaktif molekülleri üstel, sabit ve ölüm evrelerinde üretebilir [7].

Bugüne dek yaklaşık 10.000 kadar mikrobiyal metabolit sentezlendiği tespit edilmiş fakat bu sayının oldukça küçük bir dilimi üzerinde araştırılma yapılma imkanı bulunmuştur [31]. Günümüz için bilinen biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin %45'i, çeşitli Aktinomiset türlerinden, bunun %34'ü *Streptomyces* türlerinden ve %11'i nadir Aktinomiset türlerinden izole edilmiştir [2].

Streptomycesler, immünomodülatörler, vazoaktif maddeler ve nörolojik ajanlar gibi farmakolojik maddelere ek olarak antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör, antiparazitik, insektisit ve herbisit gibi maddelerin, proteazlar, lipazlar, selülazlar, amilazlar, pektinazlar ve ksilanazlar gibi enzimlerin kaynağıdır [7].

2.4. Streptomisetlerin Bazı Biyolojik Özellikleri

2.4.1. Antimikrobiyal Etki

Streptomyces türlerinin çeşitli antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antiparazitik maddeler ürettiği bilinmektedir. Bu maddeler içinde ön planda olan moleküller elbette antibiyotiklerdir.

2.4.1.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, diğer mikroorganizmaları inhibe eden ya da öldüren, çeşitli fungus ve bakteriler tarafından düşük konsantrasyonlarda üretilen maddelerdir [7]. Bu ismin ilk olarak kullanılışı, bir mikroorganizmanın ürettiği, diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyen herhangi bir küçük molekül olarak, Selman Walksman tarafından 1941 yılında gerçekleştirilmiştir [32].

1940 ve 1952 yılları arasında, Waksman antimikrobiyal aktiviteye sahip 10'dan fazla farklı madde izole etmiştir. Ancak bu maddelerden en etkilisi 1943 yılında Albert Schatz'ın *S. griseus* tarafından izole ettiği bir protein sentez inhibitörü olan streptomisinidir. Streptomisin örneği, bir aydan daha az gibi bir kısa sürede William Feldman'ın hayvan modellerinde toksikoloji çalışmaları yapması için Mayo Clinic'e gönderilmiştir. Daha sonra, Feldman ve Hinshaw arasındaki işbirliğiyle, tüberküloz

hastalarında denemelerin ardından bir yıldan az bir sürede ilk klinik çalışmalar başlamıştır [33].

Böylece, 1945-1955 yılları arasında, *Penicillium notatum* tarafından üretilen penisilin, *Streptomyces* türleri tarafından üretilen streptomisin (*S. griseus*), kloramfenikol (*Streptomyces venezuelae*) ve tetrasiklin (*Streptomyces rimosus*) ile birlikte antibiyotik çağı başlamıştır. 1942'de ilk antibiyotik olan streptotirisinin, 2 yıl sonra ise streptomisinin keşfi bu cinsten üretilen antibiyotiklerin sistematik olarak taranmasını tetiklemiştir [34]. 1955 ve 1962 yılları arasında, antibiyotiklerin yaklaşık olarak %80'i *Streptomyces* tarafından sağlanmış böylece yeni antibiyotiklerin en büyük tedarikçisi haline gelmiştir. Günümüzde *Streptomyces* türleri tarafından üretilen 60'dan fazla antibiyotik, tıp alanı dışında, tarım ve sanayi alanında da kullanılmaktadır [7,32].



2006	Platensimisin <i>Streptomyces platensis</i>
2003	Daptomisin <i>Streptomyces roseosporus</i>
2000	Linezolid (Sentetik)
1985	Mupirosin <i>Pseudomonas fluorescens</i>
1970	Ribostamisin <i>Streptomyces ribosidificus</i>
1969	Fosfomisin <i>Streptomyces fradiae</i>
1968	Trimetoprim (Sentetik)
1963	Gentamisin <i>Micromonospora purpurea</i>
1963	Fusidik Asit <i>Fusidium coccineum</i>
1962	Nalidiksik asit (Sentetik)
1959	Tinidazol (Sentetik)
1957	Kanamisin <i>Streptomyces kanamyceticus</i>
1956	Rifamisin <i>Amycolatopsis rifamisinica</i>
1956	Novobiosin <i>Streptomyces niveus</i>
1955	Vankomisin <i>Amycolatopsis orientalis</i>
1952	Sikloserin <i>Streptomyces garyphalus</i>
1952	Linkomisin <i>Streptomyces lincolnensis</i>
1952	Eritromisin <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
1951	Virginamisin <i>S. virginiae, S. pristinaespiralis</i>
1951	İzoniazid (Sentetik)
1951	Viomisin <i>Streptomyces vinaceus, S. capreolus</i>
1950	Nistatin <i>Streptomyces noursei</i>
1950	Tetrasiklin <i>Streptomyces aureofaciens</i>
1949	Neomisin <i>Streptomyces fradiae</i>
1949	Kloramfenikol <i>Streptomyces venezuelae</i>
1947	Polimiksin <i>Bacillus polymyxa</i>
1947	Nitrofurantoin (Sentetik)
1945	Sefalosporin <i>Streptomyces clavuligerus</i>
1945	Basitrasin <i>Bacillus licheniformis</i>
1944	Streptomisin <i>Streptomyces griseus</i>
1941	Penisilin <i>Penicillium chrysogenum</i>

Şekil 2.3. Çeşitli antibiyotiklerin bulunma tarihleri [24].

19. yüzyıldan beri pnömoni, tüberküloz ve difteri gibi enfeksiyonlar başlıca ölüm nedenlerinden biri olmuştur. Ancak antimikrobiyal tedavi kavramı, 20. yüzyılın başlarında St. Mary Hastanesinde Aşı Bölümüne katılan Alexander Fleming'in keşfi ile başlamıştır. Fleming, daha önce bir petri kabına kendi burun mukozasını ekleyerek keşfettiği lizozimin, antimikrobiyal etkilerini incelerken eski bir *Staphylococcus aureus* kültüründe olağandışı bir durum fark etti. Bu bakterilerin büyümesi, çeşitli mikroorganizmalarla kontamine olmuş petri kabındaki mavi bir küfün varlığıyla inhibe edilmişti. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve disk difüzyonu kavramına benzer bir şekilde inhibitör miktarını ve inhibitör sıvısının dilüsyonlarını iki katına çıkarma etkisini açıklamıştır. Fakat bu yeni maddenin kararsızlığı, ekstraksiyondaki zorluk gibi nedenlerden dolayı penisilinin terapötik değerini gösterememiştir [33].

Antibiyotikler birçok farklı şekilde sınıflandırılmakta, ancak genel olarak etki şekillerine ve mekanizmalarına göre gruplandırılmaktadır. Etki şekillerine göre; bakteriyostatik ve bakteriyosidal olarak ayrılmaktadır. Tetrasiklin gibi bakteriyostatik antibiyotikler mikroorganizmaların gelişimini önleyerek, penisilin gibi bakteriyosidal antibiyotikler mikroorganizmaları öldürerek etki göstermektedir.

Antibiyotikler 5 temel mekanizma ile etki göstermektedir.

- Hücre duvarının sentezini engelleyerek etki gösterenler:

Bakteriyel hücreler, uzun polimerlerden oluşan peptidoglikandan yapılmış bir hücre duvarı ile kaplıdır. Penisilin gibi β -laktam ajanlarının hedefleri hücre duvarı sentezinde görev alan penisilin bağlayan proteinler (PBP)'lerdir. PBP, β -laktam halkası ile etkileşime girerek, peptidoglikanın sentezi için uygun olmayan bir bileşik haline gelir. Vankomisin gibi glikopeptit antibiyotikler ise peptidoglikan öncülleri olan D-alanil D-alaninlere bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe eder [24].

- Hücre zarının işlevini bozarak etki gösterenler:

Hücre zarı suya, iyonlara ve besin maddelerine karşı bir difüzyon bariyeri görevi görmektedir. Polimiksinler, hücre zarının geçirgenliğini artırarak hücrenin osmotik dengesini bozmaktadır. Ancak böbreklerde ve sinir sisteminde toksik etki gösterdikleri için pek fazla kullanılmamaktadır. Platensimisin gibi son zamanlarda piyasaya sürülen antibiyotikler polimiksinlerden farklı olarak, hücre zarı için gerekli yağ asitlerinin sentezini sağlayan enzimleri inhibe ederek etki göstermektedir [24].

- DNA sentezini inhibe ederek etki gösterenler:

Kinolonlar, replikasyon çatalının ilerlemesinde oldukça büyük bir görevi olan DNA girazı inhibe ederek etki göstermektedir. Rifamisinler ise mRNA sentezini bozmaktadır.

- Antimetabolit etki göstererek etki edenler:

Sülfonamidler gibi antimetabolitler, bakteri metabolizması için gerekli maddelerin sentezlenmesini inhibe etmektedir.

- Protein sentezini inhibe eden:

Bakteri ribozomu, 30S ve 50S olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Tetrasiklin, streptomisin, kanamisin ve gentamisin gibi antibiyotikler ribozomun 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini bloke ederken, eritromisin, klindamisin ve kloramfenikol gibi antibiyotikler ise 50S alt birimini hedefleyerek etki gösterir [35].

Antibiyotikler ribozomal olmayan (non-ribozomal) peptid sentez yolağı (NRP), poliketid sentaz yolağı ve şikimat yolağı gibi çok çeşitli yollarla sentezlenebilmektedir.

Non-ribozomal peptitler; mRNA'dan bağımsız olarak, multimodüler NRPS enzimleri tarafından bir araya getirilen ürünlerdir. NRPS (non-ribozomal peptid sentazlar) enzimleri, N-terminal ucundaki yağ asitlerini, metil gruplarını, fosfat gruplarını ve oligosakkaritleri bağlayarak NRP moleküllerinde yapısal çeşitlilik oluşturmaktadır. Bu enzimler birçok bakteri türünde bulunabilmektedir. Basitrasin, polimiksin B ve vankomisin gibi antimikrobiyal maddeler non-ribozomal peptid sentez yollarıyla sentezlenmektedir.

Poliketidler birçok organizmada bulunmakla birlikte, özellikle aktinomisetlerde bol miktarda bulunmaktadır [36]. Bu moleküllerin sentezi, poliketid sentazlar (PKS) olarak bilinen modüler enzimleriyle gerçekleşmektedir. Poliketidler, yağ asitlerinin sentezine benzer şekilde oluşturulmaktadır.

PKS enzimleri tip I PKS, tip II PKS ve tip III PKS olmak üzere üç tipte sınıflandırılmıştır: Tip I PKS, NRPS'ye benzeyen, birkaç modül içeren çoklu bir enzim kompleksidir. *Saccharopolyspora erythraea*, eritromisini bu yolla üretmektedir [37].

Tip II PKS çoğunlukla ayrı enzimler içerir ve her enzim poliketid sentezinin birleşme hattında belirli bir işlevi yerine getirmektedir. Tip II PKS enzimleri ile tetrasiklinler, tetrasenomisinler, pradimisin tipi polifenoller gibi çeşitli aromatik bileşikler üretilmektedir. *Streptomyces resistomycificus* bu yolla bakteriyel RNA ve DNA

polimerazı inhibe edebilen resistomisin üretmektedir. Tip III PKS enzimleri ise, poliketid sentezinin başlangıç molekülünü seçme tercihlerinde farklılık göstermektedir [37].

NRPS ve Tip I PKS'ler mikroorganizmalarca sentezlenen biyoaktif bileşiklerin önemli bir kısmının sentezinde gerekli olan mekanizmalardır. *Streptomyces*'ler antibiyotiklerini genellikle PKS'ler, NRPS'ler veya her ikisinin bir kombinasyonu gibi enzimatik kompleksler kullanarak üretmektedir [35].

Şikimat yolağı, aromatik metabolitlerin temel yapı taşlarını oluşturmaya katkıda bulunmaktadır. Aromatik bileşiklerden türetilen metabolitler, antibakteriyel bileşikler olarak görev alabilmektedir. *Pseudomonas*, *Burkholderia* ve *Streptomyces* gibi mikroorganizmalar bu şekilde aromatik yapı taşlarını kullanarak çeşitli sekonder metabolitleri bir araya getirip fenazin bileşiklerini sentezleyebilmektedir. Fenazinler virülans faktörü olmakla birlikte, antifungal madde olarak da işlev görmektedir. Ayrıca *S. venezuelae* gibi aktinomisetler, aromatik öncüller kullanarak kloramfenikolu birleştirmektedir [37].

2.4.1.2. Antifungal Maddeler

Antifungaller, fungusları öldüren ya da gelişimlerini engelleyen maddelerdir. Fungal patojenler, oluşturdukları hastalıklardan dolayı hem tıbbi hem de tarımsal açıdan önemli zararlara neden olmaktadır. Birçok aktinomiset türü, özellikle *Streptomyces* cinsi antifungal maddelerin güçlü üreticileri olarak bilinmektedir.

Streptomyces'in fungal patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi, çoğunlukla sekonder metabolitlerin ve hücre dışı hidrolitik enzimlerin sentezi ile gerçekleşmektedir [38]. *Streptomyces* türlerinin sentezlediği polienler, *Aspergillus* ve *Candida* cinsleri dahil olmak üzere oldukça fazla fungusa karşı, oldukça geniş etki spektrumuna sahiptir. Amfoterisin B, nistatin ve natamisinler sentezlenen temel polienlere örnektir [39].

2.4.1.3. Antiviral Maddeler

Antiviral maddeler, virüs replikasyonunu çeşitli basamaklarda inhibe eden ajanlardır.

Antiviral ajanlar; virüsün hücre membranına bağlanması, penetrasyon, genomun zarfından çıkarılması, viral ekspresyon, transkripsiyon, translasyon, komponentlerin

birleştirilmesi ve hücreden ayrılma gibi çeşitli replikasyon aşamalarında etkili olabilmektedir.

Aktinomisetler, çeşitli antiviral bileşikler sentezleyebilen mikroorganizmalardır. Sitotoksik olmayan konsantrasyonda asiklovire dirençli Herpes simpleks virüsüne karşı yüksek antiviral aktiviteye sahip aktinomisetlerden izole edilmiş biyoaktif bileşiklere sahiptir.

Aktinomisetlerden izole edilmiş biyoaktif bileşikler asiklovire dirençli Herpes simpleks virüsüne karşı yüksek antiviral etki göstermiştir. *Streptomyces nitrosporeus*'tan elde edile Benzastatin C alkaloidinin, Herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1), Herpes simpleks virüs tip 2'ye (HSV-2) karşı antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca *Streptomyces sp.*'den elde edilen bir antiviral bileşiğinin influenza virüsünün büyümesini engellediği bildirilmiştir.

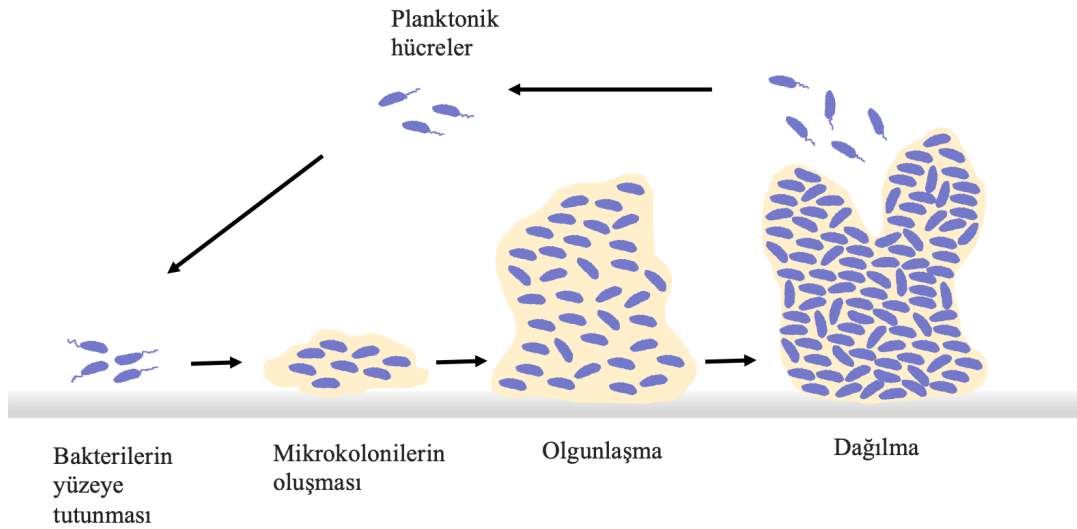
2.4.2. Biyofilm

Tarihte mikroorganizmalar uzun bir süre boyunca planktonik yaşayan hücreler olarak tanımlanmıştır. Ancak bu tanım, Anton Van Leeuwenhoek'un kendi ağız ve diş etlerini incelediğinde bakterilerin bir yüzey üzerinde kümeler halinde bulunabileceğini gözlemlemesiyle değişmeye başlayacaktır. Louis Pasteur, şarabın asetik hale gelmesinin nedeni olarak bakteri kümelerini gözlemlediğinde; Henrici, tatlı sulardaki biyolojik kirliliği incelerken bakterilerin su altındaki yüzeylere yapışarak geliştiklerini ifade ettiğinde ve ZoBell & Allen, deniz suyundaki batık cam slaytlarına bakterilerin tutunmasını ve gelişmesini incelediğinde ise biyofilm tanımı oluşmaya başlamıştır [40].

Günümüzde biyofilm, bir yüzeye yapışık olarak bakterilerin hücre dışı polimerik bir madde ürettiği ve bu maddeye gömülü olarak bulunduğu bir mikroorganizma kümesi olarak tanımlanmaktadır [41]. Tek bir türden veya birçok türün bir araya gelmesiyle oluşabilmektedir. Biyofilm oluşumu canlı ve cansız yüzeylerde gerçekleşebilmektedir. Bu yüzeylere mutfak ve banyo gibi ev yüzeyleri, boru hatları hatta kalp pilleri, implantlar ve kateterler gibi tıbbi önem taşıyan yüzeyler örnek verilebilir [41].

Biyofilm kütesinin büyük bir kısmını su oluşturmaktadır. Bileşimi bakterinin türüne, çevresel koşullara ve biyofilmin hangi fazda olduğuna göre değişiklik gösterse de genel olarak polisakkaritler, proteinler, lipitler, ekstrasellüler DNA içerir [42,43].

Biyofilm oluşturmanın mikroorganizmaya sağladığı birçok avantaj mevcuttur. Ekstraselüller polimer fibriller (EPS) bakteriyi antimikrobiyal ajanlara ve konakçı bağışıklık sistemine karşı dirençli hale getirir. Bunun yanında biyofilm sayesinde mikroorganizma ısı, nem, pH değişikliklerine ve ultraviyole ışınlarına karşı korunur; besinleri depolarken ve atık maddeleri uzaklaştırırken kolaylık kazanmış olur. Biyofilm oluşumuyla, virölans özelliklerinin ekspresyonu ya da artışı gibi değişiklikler de söz konusu olabilmektedir [41,43].



Şekil 2.4. Biyofilm oluşum sürecinin şematik gösterimi [44].

Biyofilm oluşumu birçok adımda gerçekleşir. İlk adım, planktonik bakterilerin katı bir yüzeye bağlanmasını ve ardından EPS'nin üretilmesini içerir. Böylece bağlı hücreler çoğalmaya ve mikrokolonileri oluşurmaya başlar. Mikrokoloniler de büyüyerek olgun bir biyofilm tabakası oluşturur. Matriks yüzeye yayılır ve biyofilmin iskelesini oluşturur. Mikro kanallar aracılığıyla besin maddeleri ve oksijen bakterilerin kullanımı için ulaşılabilir halde bulunur. Ayrıca matriksin yapısı, hücreler arası etkileşimleri ve DNA değişimini de uygun kılar [41]. Son aşamada, hücre yoğunluğu belirli bir seviyeye gelir ve bakterilerin bir kısmı yapıdan koparak serbest hale geri döner. Bu biyofilmin bakterilerin birbirleri ile iletişim kurmalarını mümkün kılmasıyla gerçekleşir. Bakteriler çeşitli sinyal molekülleriyle biyofilm içindeki hücre yoğunluğunu “Quorum Sensing (oğunluk Algılama/evreyi Algılama)” mekanizması ile algılamaktadır [42].

Şu ana dek doğal ve sentetik olmak üzere birçok ajan biyofilmin engellenmesinde kullanılmıştır. Ancak matriks antimikrobiyal gibi çeşitli bileşenlerin geçirgenliğini azalttığı için biyofilmin tamamen yok edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle yeni antimikrobiyal ve antibiyofilm maddelerinin keşfi hayati önem taşımaktadır [45].

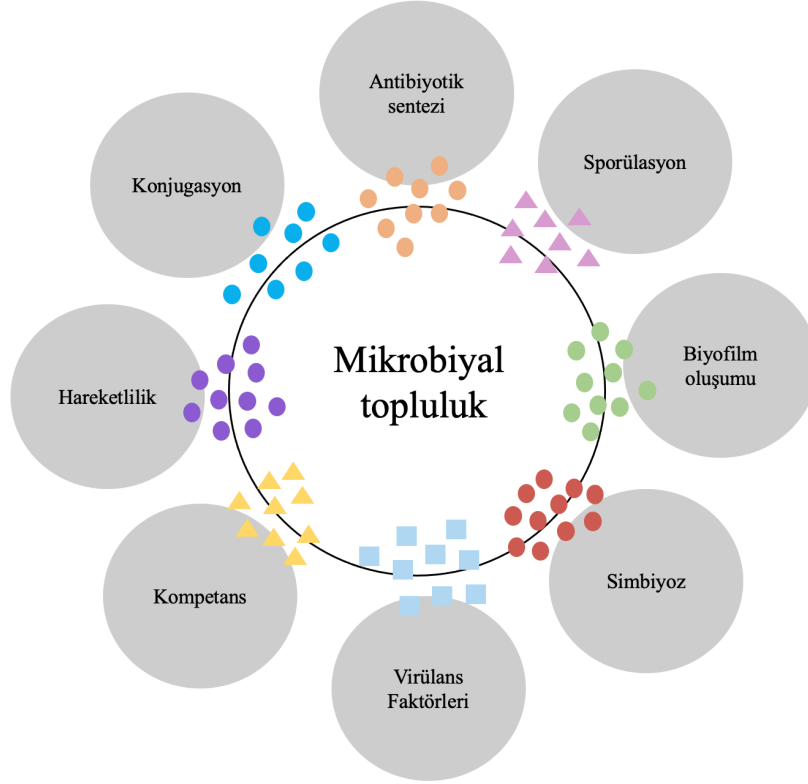
2.4.3 Quorum Sensing

Çeşitli biyolojik fonksiyonlarını düzenlemek için birçok bakteri türü, popülasyon yoğunluklarını algıladığı ve bunlara yanıt verdiği karmaşık iletişim sistemleri kullanır. Bunları oto-indüktör adı verilen küçük sinyal moleküllerinin üretilmesine, yayılmasına ve tanınmasına bağlı olarak gerçekleştirir [46,47].

Bu iletişim sistemi, 1994 yılından önce genel olarak "otoindüksiyon" olarak adlandırılmış ve ilk olarak Gram-negatif bir deniz mikroorganizması olan *Vibrio fischeri* için 1970'lerin başında tanımlanmıştır. Ancak 1994 yılına gelindiğinde, Dr. Steven Winans, bakterilerdeki oto indüksiyonu "çoğunluk algılama" terimi olarak tanıtmıştır [48].

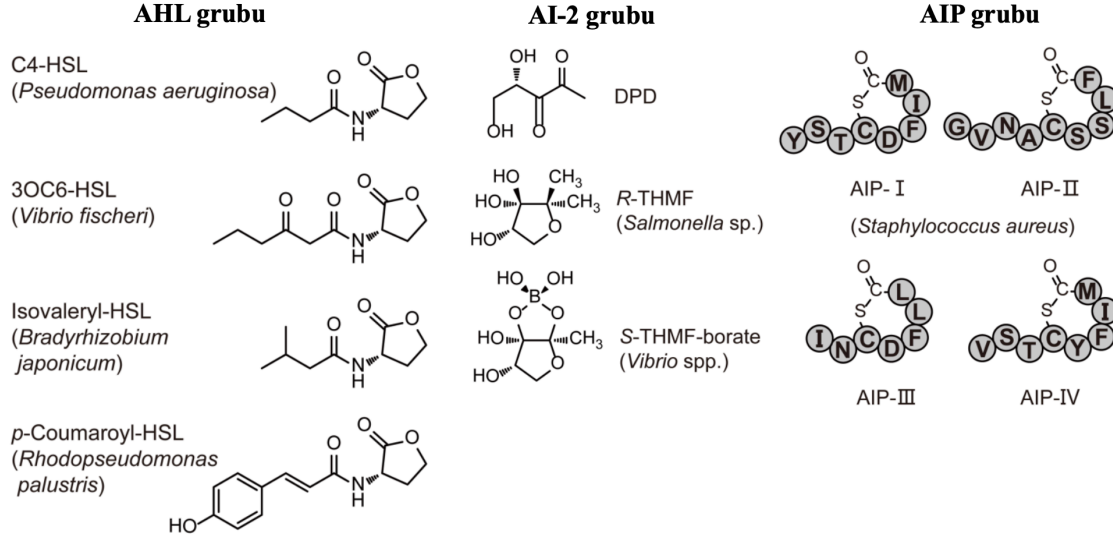
Bakterileri, otoindüktörleri sürekli bazal seviyede üretir ve hücre içine alır. Yüksek popülasyon yoğunluğu ile, çevredeki bu tür moleküllerin miktarı da fazlalaşmış olur [49]. Sentezlenen otoindüktörler hücre dışında birikirler ve difüzyon, özgün taşıyıcılar veya pompalar aracılığıyla hücre içine alınırlar. Yeterli miktarda sinyal biriktiğinde ise ilgili genlerin ekspresyonu regüle edilir. Genelde yüksek hücre yoğunluklarında görülebildiği gibi bazen nispeten düşük yoğunluklarda da gözlemlenmektedir.

Bakterilerdeki bu 'iletişim' sistemleri her yerde bulunur ve lüminesans, virülans, biyofilm oluşumu, antibiyotik üretimi, pigment üretimi, bitki-mikroorganizma etkileşimleri gibi çeşitli hücre fonksiyonlar düzenlediği bildirilmiştir [49]. Birçok patojen, çoğunluk algılamayı muhtemelen, konağın bağışıklık sistemini verimli bir enfeksiyon oluşturacak hücre sayısına ulaşıncaya dek, kendi varlığına karşı uyardıktan kaçınması amacıyla kullanmaktadır [50].



Şekil 2.5. Quorum sensing sistemi tarafından düzenlenen bazı mikrobiyal topluluk davranışları [51].

Bakterilerde üç QS sistemi vardır: bunlardan ilki Gram-negatif bakterilerde bulunan N-açıl homoserin laktonlar (AHL veya HSL) aracılığıyla LuxI/LuxR tipi QS; ikincisi hem Gram-pozitiflerde hem de Gram-negatif bakterilerde bulunan luxS kodlu oto-indüktör 2 (AI-2) sistemi; son olarak da Gram-pozitif bakterilerde oligopeptid-iki bileşenli tip (AIP) QS sistemi [52].



Şekil 2.6. Üç temel QS sisteminin temsili sinyallerinin kimyasal yapıları [53].

2.4.3.1. Gram-Negatif Bakterilerde Quorum Sensing

Birçok Gram-negatif bakteri, çoğunluğu algılamak için sinyal molekülü olarak küçük, lipofilik ve difüze olabilen açil homoserin lakton moleküllerini kullanır [3]. Şu ana dek en iyi karakterize edilen sinyal molekülleri, açil homoserin laktonlardır [49]. Bu moleküller, LuxI/R protein familyasına ait iki protein tarafından sentezlenir ve düzenlenir [54].

Açil homoserin laktonların üretilmesi Lux I tipi proteinler tarafından sağlanırken, Lux R tipi proteinler bakterinin kendi ürettiği AHL ile birleşebilen sitoplazmadaki eşleniğidir [55]. AHL konsantrasyonu belli bir eşiğe ulaştığı zaman, transkripsiyon aktivatörü LuxR'ın amino terminaline bağlanır [54]. Lux I/Lux R kompleksi, spesifik DNA promotor sekanslarına bağlanarak, hedef genlerin transkripsiyonunu sağlamış olur. Her bakteri, yalnızca kendisine özgü bir AHL ya da AHL kombinasyonları sentezler [55].

Bakteriyel çoğunluk algılama mekanizması ile ilgili araştırmalar *V. fischeri* ve *V. harveyi* biyoluminesanslarının ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarla başladığından dolayı bu bakteriler model mikroorganizmalar olarak kullanılmışlardır.

İlgili araştırmalarda, *V. fischeri* sıvı besiyerinde üretiliyordu ve besi ortamındaki bakteri miktarı fazlaştığında biyoluminesans olayının gözlemlenmesine sebep oluyordu. İlk önce besiyerinde bir inhibitör bulunduğu, ancak bakteri sayısı arttığında bu inhibitörün uzaklaştırıldığı düşünülmüştür. Daha sonra biyoluminesansın, inhibitör bir maddenin

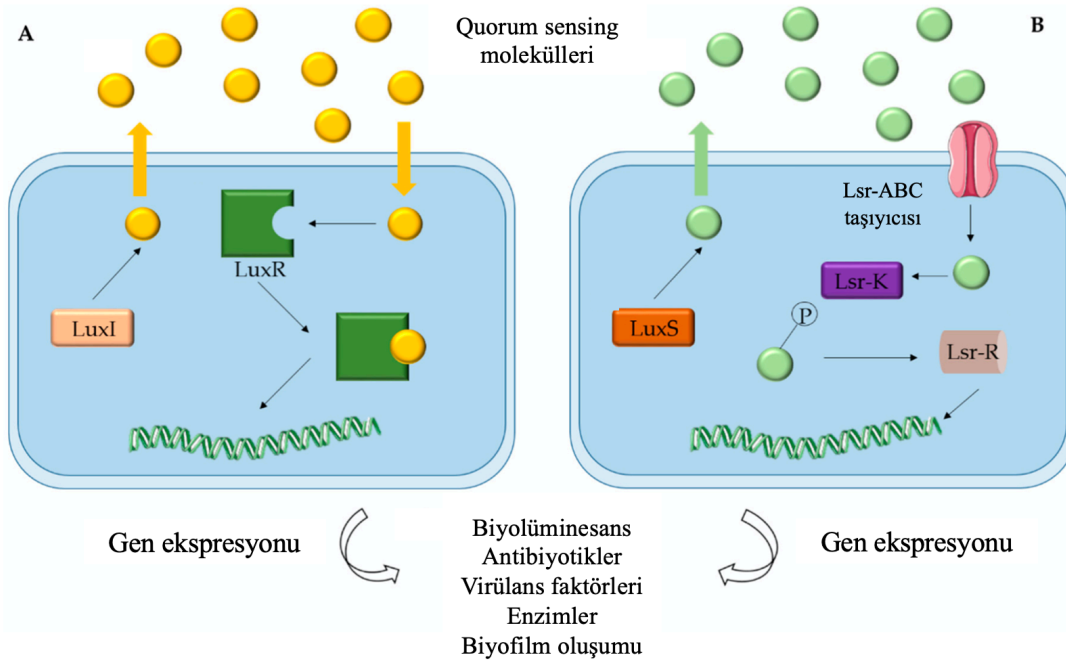
ortamdan uzaklaştırılması ile değil, aktivatör bir bileşiğin (otoindüktör) ortamda birikerek etki göstermesi sonucu meydana geldiği bildirilmiştir. Bu aktivatör bileşik ilk olarak 1981'de, Eberhard ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve N-(3-oxohexanoil)-homoserin lakton (3-oxo-C6-HSL) olarak tanımlanmıştır [49].

AHL aracılı çoğunluk algılama sistemleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Burkholderia cepacia* ve *Eschericia coli* gibi insan hastalığıyla ilişkili bakterilerle ilişkilendirilmiştir [49]. Sinyal molekülleri ve reseptör proteinlerinin oluşturduğu kompleks ayrıca, *V. harveyi*'de (LuxM / N) biyoluminesans, *Chromobacterium violaceum*'da (CviI / R) violacein pigmenti, *Proteus mirabilis*'te (RsbA) ve *Serratia marcescens*'te (SwrI / R) kamçı hareketliliği ve bu mikroorganizmaların tümünde biyofilm oluşumu gibi çeşitli fenotiplerden sorumlu spesifik genlerin ekspresyonunu tetikler [47].

2.4.3.2. AI-2 Tipi Quorum Sensing

Türüçü ve türdışı sinyallere yanıt verebilme özelliği bakterinin hayatta kalma şansını büyük ölçüde artıracak veya bakterilerin topluluklar oluşturmasına izin verebileceği düşünülmektedir. Bu olanak, *V. harveyi* gibi birçok mikroorganizmaya da kendi hücre yoğunluğuna ek olarak, karışık bir popülasyondaki toplam bakteri oranını da bilmesini sağlamaktadır [50].

Lux S geni tarafından ifade edilen oto-indüktör 2 (AI-2), hem Gram negatif ve hem de Gram pozitif bakteriler tarafından türler arası iletişimi sağlayan otoindükleyici moleküldür. Bu sebeple bu molekülün evrensel veya atasal bir sinyal olduğu düşünülmektedir [55].



Şekil 2.7. İki temel quorum sensing mekanizmasının şematik gösterimi. (A) LuxI/R sistemi; (B) LuxS/AI-2 sistemi [56].

LuxS genine sahip bakteri türlerinin büyük bir kısmının AI-2 aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Yersinia pestis*, *Campylobacter jejuni*, *Deinococcus radiodurans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi birçok bakteride ise yüksek oranda korunmuş luxS homologları tanımlanmış durumdadır [50].

LuxS / AI-2 tipi sisteminin biyofilm, biyoluminesans, antibiyotik direnci, sporülasyon ve virülans faktörlerinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir [57]. Örneğin AI-2 molekülleri, *S. pyogenes*'de virülansı etkileyen genlerin düzenlenmesinde rol almaktadır [58].

2.4.3.3. Gram-Pozitif Bakterilerde Quorum Sensing

Gram pozitif bakteriler, hücre popülasyon yoğunluğuna yanıtı açıl homoserin laktonlar yerine, otoindükleyici peptitler (AIP) aracılığıyla verir. AHL sinyalinin aksine, 5 ila 17 amino asitten oluşan bu oligopeptitler, bakteri hücre membrandan hücre yüzeyindeki oligopeptid taşıyıcılar olmadan geçemezler [55]. Peptit sinyalleri, sitoplazmik tepki düzenleyici proteinlerle etkileşime giren iki bileşenli sensör kinaz proteinleri tarafından tanınır [50]. Çoğunluğu algılama sisteminin regülasyonu bakteriden bakteriye değişiklik gösterir ancak genelde iki bileşenli algılama sistemini içerir. İki bileşenli bütün bakteriyel sistemler, sensör kinaz ve yanıt regülatörü olan bir çift komponent ile işlev görür. Bu çift oluşup fosforillendiğinde, ilgili gen ekspresyonu değiştirebilmektedir [55].

Bu sisteme yanıt veren bir dizi işlem arasında; *B. subtilis* ve *S. pneumoniae*'de DNA alımı, *S. aureus*'ta virülansın regüle edilmesi, *E. faecalis*'te konjugasyon, *Lactobacillus sake* ve *Carnobacterium piscicola*'da mikrosin üretimi vardır [50]. Bunlara ek olarak, Gram negatif bir patojen olan *Providencia stuartii*, tıpkı Gram pozitif bakteriler gibi peptidler aracılığıyla iletişim mekanizmasını yönetmektedir [55].

AIP'ler genelde sinyal molekülü olmak dışında bir işleve sahip değildir ancak buna ek olarak antimikrobiyal etki gösteren moleküller de tanımlanmıştır. Çoğunluk algılama sistemi düzenleyici genlerin indüklenmesine ek olarak ayrıca, bakteriyosin üretimi, kompetans gibi olayları da aktive eder [59].

2.4.3.4. *Chromobacterium*'da Quorum Sensing

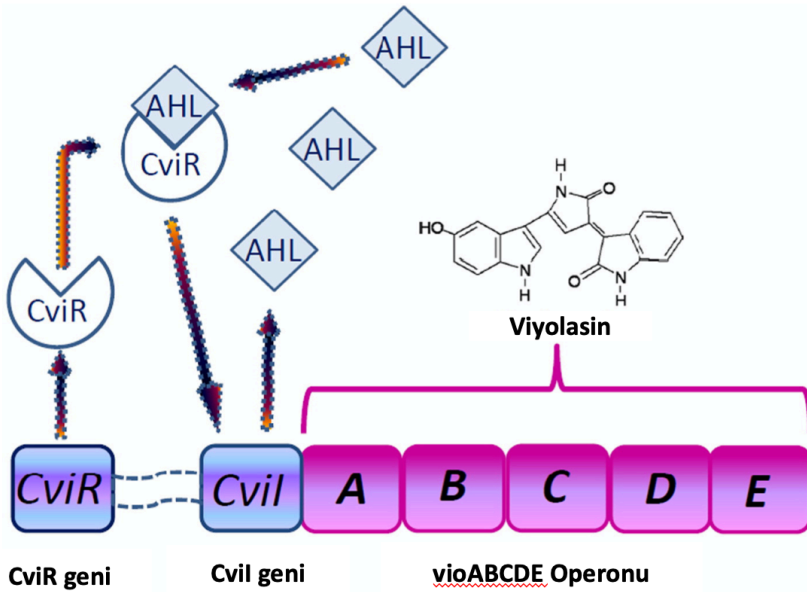
Chromobacterium violaceum, tropikal ve subtropikal bölgelerde bulunan Gram-negatif, fakültatif anaerob bir kokobasildir. Normal su ve toprak florasının bir parçasıdır.

C. violaceum, nadiren de olsa insanlarda ve diğer hayvanlarda enfeksiyonlara sebep olabildiği için fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir. Özellikle karaciğer, akciğerler ve dalağa hızla yayılıp sepsis oluşturabilirler. Sebep olduğu enfeksiyonların yayımlanmış klinik raporlarındaki bir güncelleme, *C. violaceum*'a bağlı enfeksiyonların nadir oluştuğunu ancak yüksek mortalite görüldüğü belirtmektedir [60]. Enfeksiyonun bilhassa bağışıklığı baskılanmış ve yeterli beslenmeyen hastalarda şiddetli ilerlediği bildirilmiştir [61].

C. violaceum, viyolasin (violacein) adlı suda çözünmeyen bir pigment üretmektedir ve bu pigment kolonilere mor rengini vermektedir. Viyolasin, sekonder bir metabolik yolla triptofandan üretilmektedir. Biosentezi, beş enzimatik reaksiyon (VioA-E) ve oksidatif dekarboksilasyonun enzimatik olmayan bir aşamasıyla toplamda altı adım içerir [61].

Viyolasin üretimi, mikrobiyal durağan büyüme fazında, yani popülasyon yoğunluğunun yükseldiği ve besinlerin tükendiği zaman birçok organizmaya (bakteriler, funguslar, virüsler ve hatta nematodlar) öldürücü etki gösterebilmektedir. Öte yandan viyolasinin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antioksidan, antiprotozoal ve antitümör gibi aktiviteleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [61].

Viyolasin sentezi, quorum sensing kontrolü altında gerçekleşmektedir. *C. violaceum*'da çoğunluk algılama sistemi LuxI / LuxR sistemine homolog CviI / CviR proteinlerinden oluşur [62]. CviI, S-adenozil metiyonin ve yağ asitlerini AHL'lere dönüştürür. Belirli konsantrasyon seviyelerine ulaşan AHL, *vioABCDE* operonunun transkripsiyonunu indükleyen CviR'e bağlanır (Şekil 2.8) [61].



Şekil 2.8. *C. violaceum*'da quorum sensing mekanizmasının regülasyonu ve viyolasin sentezi [61].

C. violaceum'un mini-Tn5 transpozon mutajenezine tabi tutarak, AHL üretimini gerçekleştirilemeyen dolayısıyla viyolasin-negatif, beyaz kolonilere sahip CV026 mutanını oluşturulmuştur. CV026'nın *C. violaceum*'a karşı çapraz çizgi şeklinde ekildiğinde ya da ortama AHL eklendiğinde viyolasin üretmek yanıt verdiği gözlemlenmiştir. Böylece,

hem *C. violaceum*'daki viyolasin üretiminin çoğunluk algılama yoluyla düzenlendiği kanıtlanmış, hem de CV026'nın AHL'lerin tespiti için biyosensör olarak kullanılmasının potansiyeli gösterilmiştir [63]. Viyolasin üretimi, CV026'da ortamdaki C4-C8 arası uzunluktaki N-açıl zincirleri tarafından indüklenirken, başka bir mutant olan VIR07'de şu C10-C16 uzunluktaki N-açıl zincirleri varlığında gerçekleşir.

Genetik çalışmalarda yaygınca kullanılan *Caenorhabditis elegans* nematodunun, *C. violaceum*'un neden olduğu ölümden AHL ligandının yerine bağlanmasını engelleyen antagonistler aracılığıyla korunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle çoğunluk algılama sisteminin *C. violaceum* patogenezinde de önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir. [62].

2.4.4. Anti-Quorum Sensing

Anti-quorum sensing moleküllerinin ilk keşfi, kırmızı bir makroalg olan *Delisea pulchra*'nın halojenlenmiş furanonlarının, bazı bakterilerin kolonizasyonunu engellediğinin bildirilmesine dayanmaktadır. Daha sonra bu bileşiklerin *P. aeruginosa* ve *S. liquefaciens* gibi bakterilerin sinyal moleküllerini inhibe ettiği gözlemlenmiştir [64,65]. Tanımlanan birçok anti-quorum sensing molekülleri diğer organizmalara göre daha çok taranan bitkiler ve bakterilerden elde edilmiştir [64].

QS sürecinin engellenmesi, kullanılacak mekanizmanın doğasına (kimyasal bileşikler, enzimler), etki etme şekline ve ilgili hedeflerine bağlı olduğu için çeşitlilik gösterir. Ancak bu sistemi bozmak için genellikle üç ana adım hedeflenir; sinyal molekülü, sinyal üreticisi ve sinyal reseptörü. Bunlar da enzimatik olmayan Quorum Sensing İnhibitörleri (QSI) ve Quorum Quenching (QQ) enzimleri olarak iki grup altında incelenebilir. QSI genellikle bağlanma bölgesi için yarışarak ya da yapısal modifikasyonlar yoluyla sinyal sentazlarını veya reseptörlerini inaktif hale getirebilen bileşikler kapsar. QQ enzimleri ise sinyal molekülünün bozulmasıyla sinyal sistemini inhibe hale getirir [64].

2.4.4.1. Sinyal Molekülünün İnhibisyonu

Sinyal iletiminin engellenmesi için belki de en bilinen yol, sinyalin hedef alınmasıdır. Sinyalin kendisi hedef alındığında, metabolik, kimyasal veya enzimatik degradasyon söz

konusudur. Örneğin AHL'ler, homoserin lakton halkasının doğası gereği 7'nin üstündeki pH seviyelerinde kararsızdır ve biyolojik aktivitelerini yitirir [66].

Şu ana kadar QS sinyallerini parçalayabilen dört tip enzim işaret edilmiştir; AHL lakton halkasını hidrolize eden AHL-laktonazlar ve dekarboksilazlar, açıl yan zincirini ayıran AHL-açılazlar ve deaminazlar [67].

Arthrobacter sp., *Bacillus sp.*, *A. tumefaciens*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Ralstonia sp.* ve *V. paradoxus* gibi türlerde AHL parçalayıcı enzimleri kodlayan genler bildirilmiştir. İlk olarak *Bacillus cereus*'da tanımlanan AHL-laktonazlar (AiiA), lakton halkalarını hidrolize ederek AHL'yi inaktif hale getirmektedir [46]. *Variovorax paradoxus*, enerji ve azot kaynağı olarak yalnızca AHL'yi kullanır. Böylelikle hem kendi metabolizmasına katkı sağlar hem de rekabet ortamındaki diğer bakterilerin iletişimini engellemiş olur. *P. aeruginosa* PAO1, sekiz karbondan uzun AHL açıl zincirlerini parçalayabilen PvdQ adlı bir AHL-açılaza sahiptir. *Streptomyces sp.*'deki AhIM AHL-açılazı ise sekiz karbondan kısa zincirli AHL'leri parçalayabilmektedir [65].

QQ enzimleri üretme kabiliyeti, bakteriler arasında yoğun bir şekilde yayıldığı gibi, diğer prokaryotik organizmalarda ve birçok ökaryotik organizmalarda da bulunmaktadır [64].

2.4.4.2. Sinyal Üreticisinin İnhibisyonu

En yaygın yaklaşımlardan biri de transkripsiyonel regülatörün hedeflenmesidir. Sinyal molekülü üretilmediği takdirde, bakteriler yeterli sayıda bulunup bulunmadıklarını algılayamaz ve böylelikle QS genleri ifade edilmez [66].

P. aeruginosa'da LasR ve RhIR, *C. violaceum*'da CviR, *V. harveyi*'de LuxN, *V. fischeri*'de LuxR, *A. tumefaciens*'de TraR, *S. liquefaciens*'de SwrR hedef alınabilecek bazı transkripsiyonel regülatördendir [46].

2.4.4.3. Sinyal Alınımının Engellenmesi

Başka bir yaklaşım ise sinyal molekülünün, sinyal proteinine bağlanmasının engellenmesi sonucu transkripsiyonel regülatör olarak işlev göremeyecek hale gelmesidir. Muhtemelen en yoğun araştırılan inhibisyon stratejisi, sinyal reseptörünü bir sinyal analogu ile bloke etmektir [66]. Genelde AHL analogları, AHL yan zincirlerini

uzatarak üretilmektedir [65]. İstisna olarak bazı QS sinyalleri, başka bir QS sistemini inhibe edebilir. *Burkholderia pseudomallei*'nin C10HSL'si, *C. violaceum*'a bu şekilde etki etmektedir [67].

2.4.4.4. QSI'lerin Biyoteknolojik Önemi

Şu ana dek birçok çalışma, antibiyotiklerle sürekli tedavinin hedef organizmalar üzerinde toksik veya büyümeyi inhibe edici etkileri ile, geniş spektrumlu bir etki alanına sahip oldukları için bakterilerin direnç gelişimine sebebiyet verdiğini belirtmiştir. Böylece araştırmacılar antibiyotik tedavisinin yerine alternatifler üretmeye başladılar. Ancak alternatiflerin birçoğu antibiyotikler gibi bakterileri öldürmeye dayanmaktadır [4].

Bu yüzden QSI stratejileri, hızla gelişen antibiyotik direncinin mevcut senaryosunda çok önemli bir potansiyel değere sahiptir. QS tarafından kontrol edilen sistemlerden birçoğu patojeniteyi etkilediğinden, iletişimin engellenmesi patojenik bakterilerin virülans özelliklerini kaybetmesine sebep olabilir. Böylelikle QSI molekülleri, bakteriyel hastalıkların canlılar üzerindeki etkisini sınırlamak ya da engellemek için önemli bir hale gelir [49].

2.4.4.5. *Streptomyces*'te QSI

Streptomyces, sekonder metabolitlerin yanı sıra birçok enzimi de sentezleme kabiliyetine sahiptir. Bu durum da *Streptomyces* türünü QSI'ler için potansiyel bir kaynak haline getirmektedir.

Yapılan araştırmalarda *Streptomyces sp.*'nin hücre dışına AHL bozundurucu enzimler salgılayarak çoğunluk algılama sistemine müdahalede bulunduğu bildirilmiştir. *Streptomyces sp.* S664 ve *Streptomyces lividans*'ta AHL- açılazı kodalayan ahlM geni tanımlanmıştır [46].

Ayrıca *Streptomyces sp.* tarafından üretilen AHL-açılaz, 6 veya daha fazla karbona sahip açıl zincirleri ile AHL'leri degrade ettiği için oldukça spesifiktir [67].

Streptomyces sp.'de bulunan butirolaktonlar (2 (3H) -furanon), AHL analogları olarak hareket eder. *Hortonia sp.* ve *Streptomyces antibioticus*'da bütanoil biyosentezinin doğal olarak oluşan ara ürünlerinin *C. violaceum* CV026'nın QS mekanizması üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [67].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. *Streptomyces*'lerin İzolasyonu

Çeşitli bölgelerin topraklarından, yaklaşık 5 cm ila 20 cm arası derinlikten alınan örnekler, steril polietilen torbalar içinde saklanmıştır. Toprak örnekleri, *Streptomyces*'lerin izolasyonunun verimini arttırmak için öncelikle oda sıcaklığında kurutulmuştur. Örnekler, serum fizyolojik içinde süspanse edilmiş ve seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekler fungal kontamineyi önlemek için sikloheksimid (50 µg/mL) içeren Starch Casein Agar (nişasta: 10 g, K₂HPO₄: 2 g, KNO₃: 2 g, kazein: 0,3 g, MgSO₄.7H₂O: 0,05 g, CaCO₃: 0,02 g, FeSO₄.7H₂O: 0,01 g, agar: 15 g, dH₂O 1000 ml ve pH: 7.0 ± 0.1) besiyerine ekilmiştir [68]. Petriler 30 ° C'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. Işık mikroskopundaki morfolojik özellikleri temelinde potansiyel *Streptomyces spp.*'ler seçilmiş ve saf kültürleri elde edilmiştir.

3.2. *Streptomyces*'lerin Tanımlanması

3.2.1. Morfolojik Tanımlama

İzolatlar öncelikle morfolojik olarak cins düzeyinde, spor taşıyan hiflerin morfolojileri incelenerek tanımlanmıştır. Belirlenen izolatların morfolojik tayinine, Gram boyama metodu kullanılarak devam edilmiştir. Lam üzerine fikse edilen örnekler önce kristal viyole ile 60 saniye, sonra sırasıyla lugol ile 60 saniye, Alkol ile 15 saniye ve Bazik Fuksin ile 30 saniye muamele edilmiştir. Kurumaya bırakılan örnekler ışık mikroskopu ile incelenmiştir.

3.2.2. Biyokimyasal Tanımlama

3.2.2.1. Katalaz Testi

SCA besiyerindeki saf kültür izolatların tek kolonilerine 1 mL %3'lük H₂O₂ eklenmiştir. Hava kabarcıklarının görüldüğü kültürlerin katalaz testi sonuçları pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Moleküler Tanımlama

16S rRNA tüm bakterilerde bulunan iyi korunmuş diziler bulundurmaktadır. Diziler bakteri türüne özel olarak değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle 16S rRNA dizileri ile tür tayini yapılabilmektedir. İzolatların moleküler tanımlamaları Ficus Biyoteknoloji'den 16S rRNA gen sekanslama hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Örnekler LB (Luria Bertani) broth ortamına ekilmiş ve 30 °C 150 rpm'de bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. DNA izolasyonu, NucleoSpin Microbial DNA kiti protokolüne uygun bir şekilde yapılmıştır. Ekstrakte edilen DNA, kontrol amacıyla 1xTAE tampon ile hazırlanan ve etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 60 dakika boyunca 100 volt akımda elektroforezde yürütülmüştür. 60 dakika sonunda jel UV ışığı altında görüntülenmiştir. İzole edilen DNA, analiz için Ficus Biyoteknoloji'ye gönderilmiştir.

3.3. Sekonder Metabolitlerin Üretimi

Streptomyces'lerin kültürasyonu Starch Casein Broth (SCB) besiyerinde (nişasta: 10 g, K₂HPO₄: 2 g, KNO₃: 2 g, kazein: 0,3 g, MgSO₄.7H₂O: 0,05 g, CaCO₃: 0,02 g, FeSO₄.7H₂O: 0,01 g, dH₂O 1000 ml ve pH: 7.0 ± 0.1) gerçekleştirilmiştir [68]. 250 mL'lik erlenlerde 100 mL hazırlanan besiyeri sterilize edildikten sonra, öze dolusu bakteri örneği besiyerine inoküle edilmiştir. 7 gün boyunca 200 rpm'de inkübe edilen kültürler, ekstraksiyon için toplanmıştır.

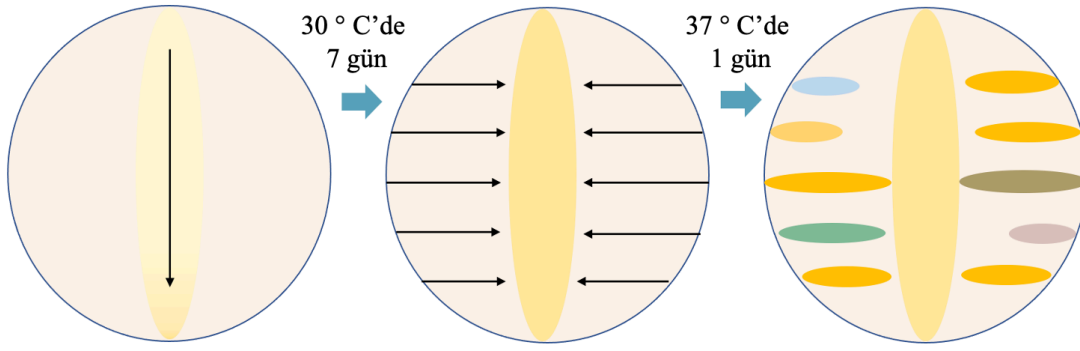
3.4. Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu

Toplanan kültürler, 1:1 oranında etil asetat ile muamele edilmiş, hazırlanan kültür-etil asetat karışımı 30 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra sekonder metabolitleri içeren üst (organik) faz tüplere aktarılmıştır. Daha sonra aktarılan faz uçurulmaya bırakılmıştır. Tüplerin dibinde kalan ham ekstrakt %50 (v/v) ACN (Asetonitril) - dH₂O ile çözülmüş ve 4 °C'de saklanmıştır.

3.5. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.5.1. Çapraz Çizgi Yöntemi

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin ön değerlendirilmesi için çapraz çizgi yöntemi uygulanmıştır. MHA (Mueller-Hinton Agar) petri plakalarının tam ortasına tek bir çizgi şeklinde *Streptomyces* izolatları ekilmiştir. Petriler 30 °C'de 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyondan alınan plakalara, ortadaki *Streptomyces* çizgisine 90° açıyla gelecek şekilde test mikroorganizmaları düz bir çizgi olacak şekilde ekilmiştir ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Antimikrobiyal etki, test mikroorganizmasının inhibisyonu ile gözlemlenmiştir [39].



Şekil 3.1. Çapraz çizgi yönteminin şematik gösterimi.

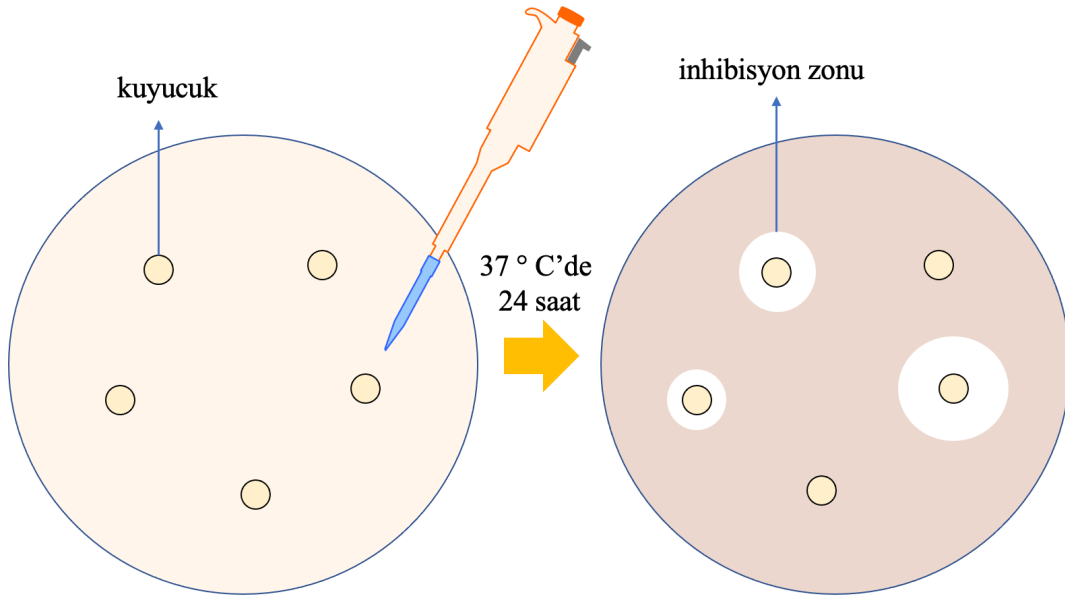
Bu deneyde antimikrobiyal etki; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Shigella sonnei* ATCC 9290 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir.

Deneylerde kullanılan mikroorganizmaların temini Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

3.5.2. Agar Difüzyon Yöntemi

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin ikincil değerlendirilmesi için agar difüzyon metodu kullanılmıştır. Bu deneyde antimikrobiyal etki; *Bacillus subtilis* ATCC 6633,

Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Shigella sonnei* ATCC 9290 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. Test mikroorganizmaları LB broth ortamına ekilmiş ve 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yoğunlukları Mc Farland 0,5 (10^8 CFU/ml) standartına göre ayarlanmış 100 µL test mikroorganizması MHA besiyeri üzerine aktarılmış ve eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra MHA plaklarına 4 mm çapta kuyucuklar açılmıştır. Kuyucuklara konsantrasyonları 150 mg/mL olarak sabitlenen 50 µl sekonder metabolit ekstraktları eklenmiştir. Petriler 37 °C' de 1 gün boyunca inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için klindamisin; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için gentamisin; *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 için siprofloksasin; *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 için seftriakson; *Proteus mirabilis* ATCC 25933 için aztreonam diskleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise ekstraktları çözmek için kullanılan %50 ACN emdirilmiş diskler kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucukların etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Agar difüzyon yönteminin şematik gösterimi.

3.5.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

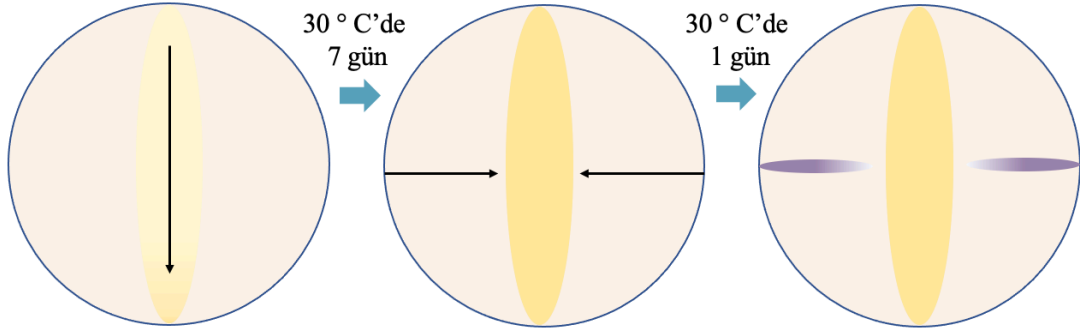
Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2009) standartlarına göre 96 kuyucuklu mikropalakalarda mikrodilüsyon kullanılarak belirlenmiştir. İlk olarak kuyucuklara 100'er µL LB Broth besiyeri eklenmiştir. Besiyerine en yüksek konsantrasyonları 150 mg/mL olarak belirlenmiş 100'er µL 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 oranında seri sulandırılmış sekonder metabolit ekstraktları eklenmiştir. Daha sonra yoğunlukları Mc Farland 0,5 (10^8 CFU/ml) standartına göre ayarlanmış 5'er µL test mikroorganizmaları kuyucuklara ilave edilmiştir. Mikropalakalar 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan mikropalakaların absorbans değerleri 595 nm'de ölçülmüştür.

Test mikroorganizmaları için belirlenen MİK'ler agar difüzyon yöntemi ile kontrol edilmiştir. Mc Farland 0,5 (10^8 CFU/ml) standartına göre ayarlanmış 100'er µL test mikroorganizmaları MHA besiyerinin üzerine eklenmiş ve eküvyon yardımıyla yayılmıştır. MHA plaklarına 4 mm çapta kuyucuklar açılmış; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 oranlarında seri sulandırılmış sekonder metabolit ekstraktları kuyucuklara yüklenmiştir. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun sonunda kuyucuk etrafındaki inhibisyon zon çapları incelenmiştir.

MİK değerlerinin tespiti *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Shigella sonnei* ATCC 9290, *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 ve *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 mikroorganizmaları için yapılmıştır.

3.6. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Belirlenmesi

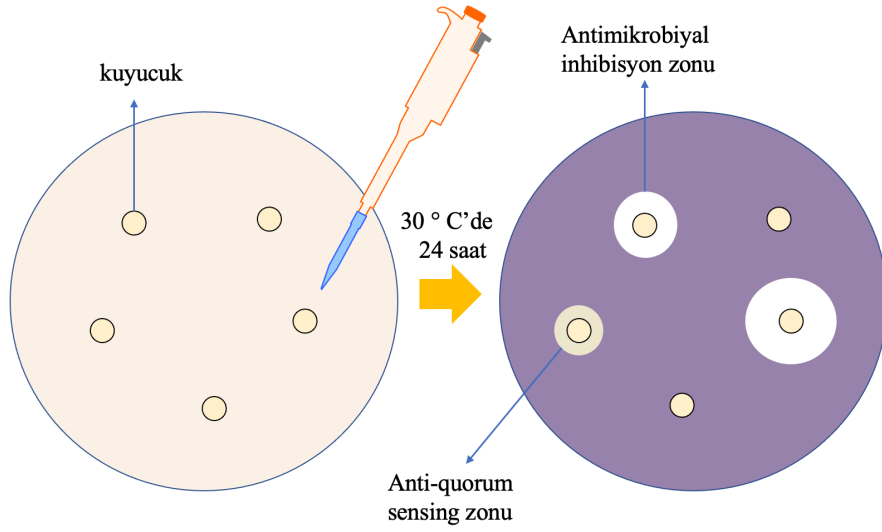
3.6.1. Çapraz Çizgi Yöntemi



Şekil 3.3. Çapraz çizgi yönteminin şematik gösterimi.

İzolatların anti-quorum sensing aktivitelerinin belirlenmesi için *C. violaceum* ATCC 12472 suşu kullanılmıştır. Etkilerin ön değerlendirilmesi çapraz çizgi yöntemiyle yapılmıştır [39]. MHA plakalarının tam ortasına dik bir çizgi şeklinde *Streptomyces* izolatları ekilmiş ve petri plakaları 30 °C'de 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyondan alınan plaklara, ortadaki *Streptomyces* çizgisine 90° açıyla düz bir çizgi şeklinde *C. violaceum* ATCC 12472 ekilmiştir ve 30° C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Anti-quorum sensing etkisi, *C. violaceum* ATCC 12472'nin viyolasin sentezinin inhibisyonu ile gözlemlenmiştir.

3.6.2. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerin İkincil Taraması



Şekil 3.4. Agar difüzyon yönteminin şematik gösterimi.

İzolatlarının anti-quorum sensing aktivitelerinin ikincil değerlendirilmesi için *C. violaceum* ATCC 12472 suşu kullanılmıştır. İlk olarak *C. violaceum* ATCC 12472 LB brotha ekilerek 30° C' de 24 saat inkübe edilmiştir. %0.5 oranında agar içeren 5 mL eritilmiş LB besiyeri içine, inkübasyondan alınan 100 µL *C. violaceum* ATCC 12472 (620 nm'de 0,6 OD'ye ayarlanmış) eklenmiştir. Daha sonra bu besiyeri-bakteri karışımı, önceden dökülen katılaşmış ince bir LB agar tabakası üzerine dökülmüştür. Yeni plaklar katılaştıktan sonra besiyeri üzerine 4 mm çapta kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara konsantrasyonları 150 mg/mL olarak sabitlenen 50 µL sekonder metabolit ekstraktları eklenmiştir. Petri plakları 30° C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun duyarlı olduğu gentamisin antibiyotik diski kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise ekstraktları çözmek için kullanılan %50 ACN emdirilmiş disk kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucukların etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Kuyucuk etrafında oluşan açık renk zon anti-quorum sensing, tamamen şeffaf zon ise antimikrobiyal etki olarak değerlendirilmiştir.

3.6.3. Viyolasin İnhibisyonunun Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi

Viyolasin inhibisyonunun spektrofotometrik olarak tespiti için *C. violaceum* ATCC 12472 suşu kullanılmıştır. 24 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakalara ilk olarak 1'er mL steril LB broth eklenmiştir. Sonrasında LB broth içine 30° C' de 24 saatlik inkübasyondan alınan 50 µL *C. violaceum* ATCC 12472 (620 nm'de 0,6 OD'ye ayarlanmış) ilave edilmiştir. Anti-quorum sensing aktivitesi olduğu gözlemlenen sekonder metabolit ekstraktlarının seri sulandırılmış 150 mg/mL, 75 mg/mL, 37,5 mg/mL, 18,75 mg/mL, 9,38 mg/mL, 4,69 mg/mL konsantrasyonları sırasıyla kuyucuklara eklenmiştir. Negatif kontrol olarak steril LB broth, pozitif kontrol olarak ise herhangi bir sekonder metabolit ekstraktı içermeyen *C. violaceum* ATCC 12472 suşu inokule edilmiş LB broth kullanılmıştır. 30° C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardan 2'şer mL alınıp 10.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantları uzaklaştırılan pelletlere 2 mL DMSO eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. 10.000 rpm'de tekrar 15 dakika santrifüj edilen örneklerin viyolasin içeren süpernatant kısmı toplanmış ve 585 nm'ye ayarlanmış spektrofotometre cihazında ölçülmüştür [69]. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve OD değerlerinin aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.7. Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi

Streptomyces spp.'lerin antibiyofilm aktivitelerinin ön değerlendirilmesi için izolatların kültür süpernatantları kullanılmıştır. Saf kültür halindeki izolatlar SCB besiyerinde 30 °C'de, 200 rpm'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürler toplanmış, 4 °C'de, 10.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş, süpernatantlar steril tüplere aktarılmıştır. 100 µL *Streptomyces spp.* kültür süpernatantları ve 60 µL steril LB broth içeren 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakalarına eklenmiştir. Son olarak kuyucuklara 40 µL McFarland 0,5 standartına göre hazırlanmış *Staphylococcus aureus* 29213 ilave edilmiştir. Kontrol olarak 200 µL steril LB broth besiyeri kullanılmıştır. Plakalar 24 saat boyunca, 37 °C' de inkübe edilmiştir [70]. İnkübasyon sonrasında süpernatantlar uzaklaştırılarak, plaka 3 kez distile su ile hafifçe yıkanmıştır. Yıkanan plaka oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra kuyucuklara 250 µL %1'lik kristal viyole eklenmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Ardından kristal viyole plakadan uzaklaştırılmış ve 2 kez distile su ile yıkanıp kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan

kuyucuklara 250 µL %70'lik etanol ilave edilmiştir. Elde edilen çözeltinin yoğunluğu 595 nm'ye ayarlanmış spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

Antibiyofilm etkisi gözlemlenen *Streptomyces spp.*'ler için deney antibiyofilm etkilerinin antimikrobiyal aktivite sonucu olup olmadığını test etmek adına tekrar edilmiştir. 1'er mL steril LB broth içeren 24 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakasına, McFarland 0,5 standartına göre hazırlanmış 50 µL *Staphylococcus aureus* 29213 ilave edilmiştir. Kuyucuklara bu kez kültür süpernatantları yerine MİK ve altındaki konsantrasyonları içeren farklı konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktları ilave edilmiştir. Plakalar 24 saat boyunca, 37 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon alınan plakadan süpernatantlar uzaklaştırılarak, plaka 3 kez distile su ile hafifçe yıkanmış ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kuyucuklara 250 µL %1'lik kristal viyole eklenmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Ardından kristal viyole plakadan uzaklaştırılmış ve 2 kez distile su ile yıkayıp tekrar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklara 250 µL %70'lik etanol ilave edilmiştir. Elde edilen çözeltinin yoğunluğu 595 nm'ye ayarlanmış spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı yapılmış ve sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.8. Sekonder Metabolitlerin Tanımlanması

3.8.2. GC-MS Analizi

GC-MS analizi, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç ve Kozmetik Ar-Ge ve Kalite Kontrol Laboratuvarı'ndan (HÜNİKAL) hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Sekonder metabolit ekstraksiyon sonrası tüplerde kalan ham ekstrakt %50 ACN-%50 dH₂O ile çözülmüş ve analiz için HÜNİKAL'e gönderilmiştir.

GC-MS analizleri Çizelge 3.1.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar MS-DIAL yazılımı kullanılarak ayrıştırılmış, tepe noktalarının alıkonma zamanları düzenlenmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Son olarak, alıkonma indeksli Fiehn ve Golm kütüphaneleri kullanılarak metabolitlere ait pikler (Score>%70) tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1. Optimize edilmiş GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.

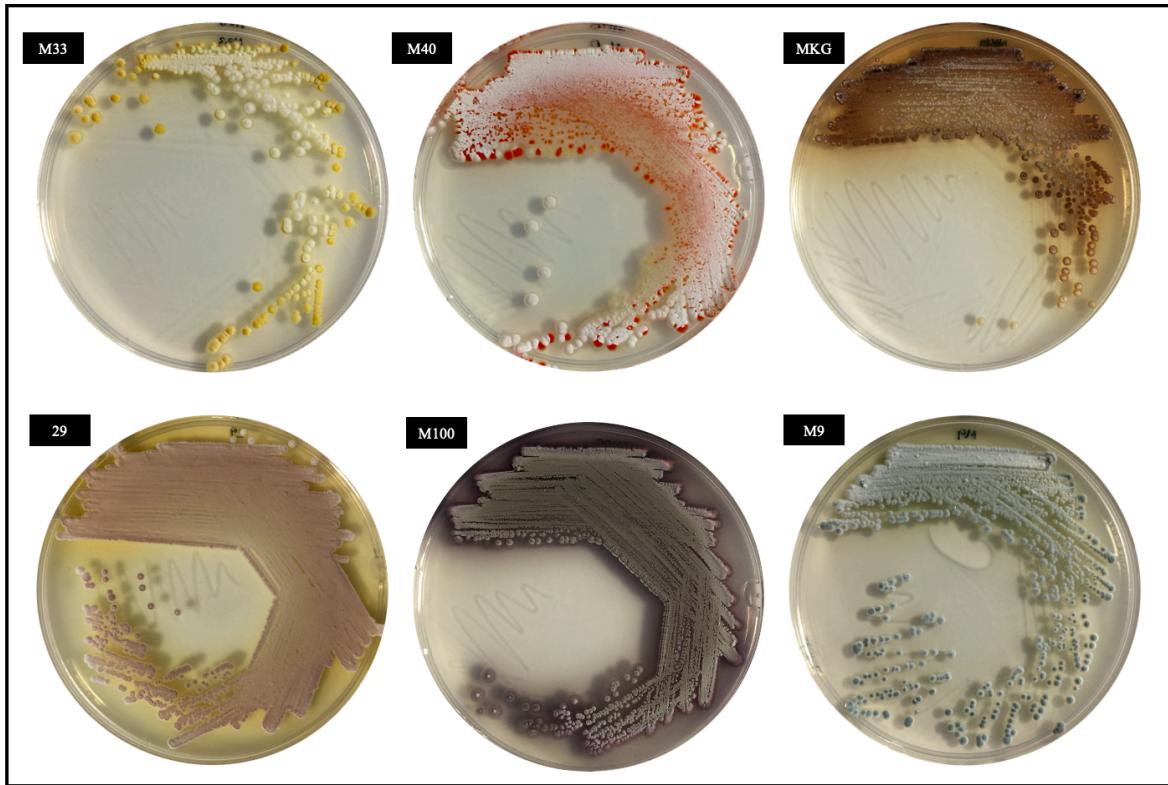
Kolon	DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
Analiz süresi	37.5 dakika
Taşıyıcı Gaz	Helyum 1 mL/dakika
MSD geçiş sıcaklığı	290°C
Çözücü gecikme süresi	5.90 dakika
Kütle aralığı	50-650 dalton

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

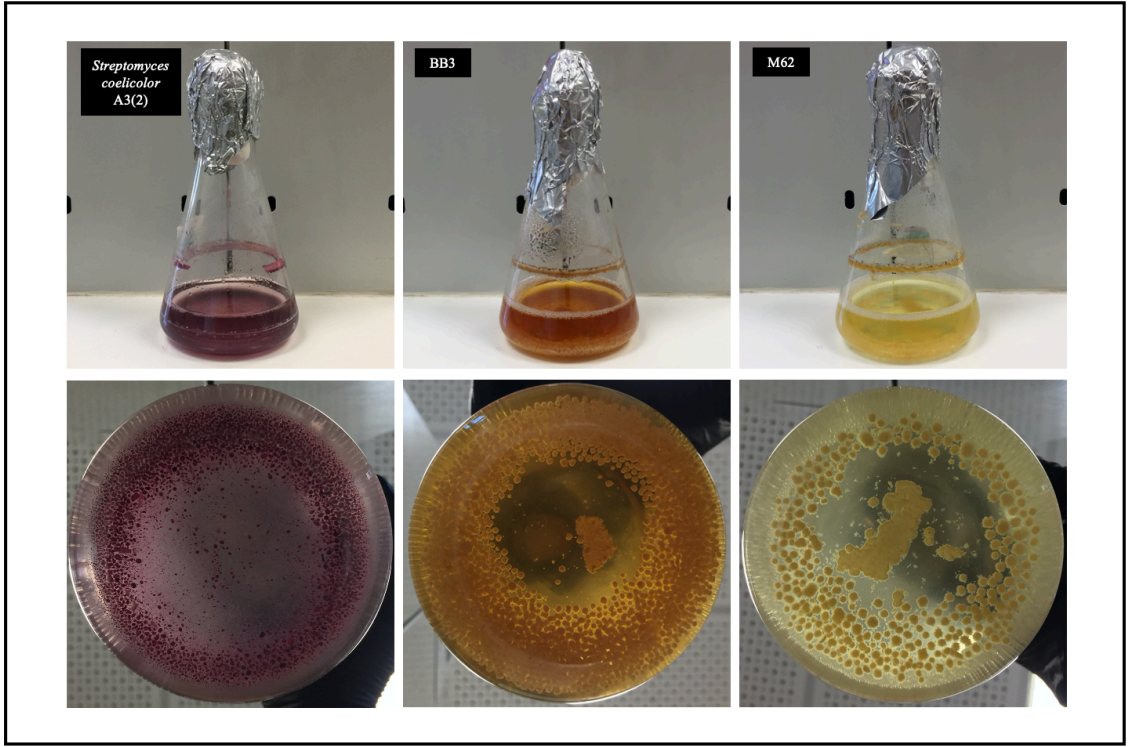
4.1. *Streptomyces*'lerin Tanımlanması

4.1.1. Morfolojik Tanımlama

Katı besiyerindeki koloni özellikleri incelendiğinde, kolonilerin tipik olarak mat, kadifemsi ve çeşitli pigmentlere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Gram boyama sonucu mikroskopta mor renkli dallanmış filamentöz yapılar gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1. M33, M40, MKG, 29, M100, M9 izolatlarının SCA besiyerindeki görünümleri.



Şekil 4.2. *Streptomyces coelicolor* A3(2) suşu ile, BB3 ve M62 izolatlarının SCB besiyerindeki görünüşleri.

4.1.2. Biyokimyasal Tanımlama

SCA besiyerindeki izolatların tek kolonilerine 1 mL %3'lük H₂O₂ eklendiğinde tüm petrilere hava kabarcıklarının oluştuğu gözlemlenmiştir. Böylelikle katalaz testi sonucu tüm izolatlar için pozitif kabul edilmiştir.

4.1.3. Moleküler Tanımlama

Streptomyces izolatlarının tanımlanmasında 16S rRNA gen dizilemesi yöntemi kullanılmıştır. Dizileme sonucu elde edilen sonuçlar, NCBI BLAST programı kullanılarak GenBank'tan temin edilebilen dizilerle karşılaştırılıp, benzerlik oranları elde edilmiştir. Zayıf nitelikli okumaların olduğu dizi bölgeleri diziden çıkarılarak yaklaşık 500-600 nükleotidlik bir 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimi belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 16S rRNA gen dizilemesi yapılan izolatların SnapGene programındaki görüntüsü.

BB3 numaralı izolatın karşılaştırılan 556 nükleotidlik bölgesinde 2 nükleotid farklılık ile 99.64% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. M122 numaralı izolatın karşılaştırılan 546 nükleotidlik bölgesinde 7 nükleotid farklılık ile 98.55% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. MKG numaralı izolatın karşılaştırılan 552 nükleotidlik bölgesinde 3 nükleotid farklılık ile 99.46% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. 29 numaralı izolatın karşılaştırılan 601 nükleotidlik bölgesinde 8 nükleotid farklılık ile 98.67% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. M33 numaralı izolatın karşılaştırılan 537 nükleotidlik bölgesinde 3 nükleotid farklılık ile 99.44%oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. 13 numaralı izolatın karşılaştırılan 601 nükleotidlik bölgesinde 2 nükleotid farklılık ile 99.67% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. M62 numaralı izolatın karşılaştırılan 533 nükleotidlik bölgesinde 1 nükleotid farklılık ile 99.81% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. KGA numaralı izolatın karşılaştırılan 530 nükleotidlik bölgesinde 1 nükleotid farklılık ile 99.81% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. M154 numaralı izolatın karşılaştırılan 596 nükleotidlik bölgesinde ise 17 nükleotid farklılık ile 97.15% oranıyla *Streptomyces sp*'ye benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. 16S rRNA dizi analizlerinin NCBI BLAST sonuçları.

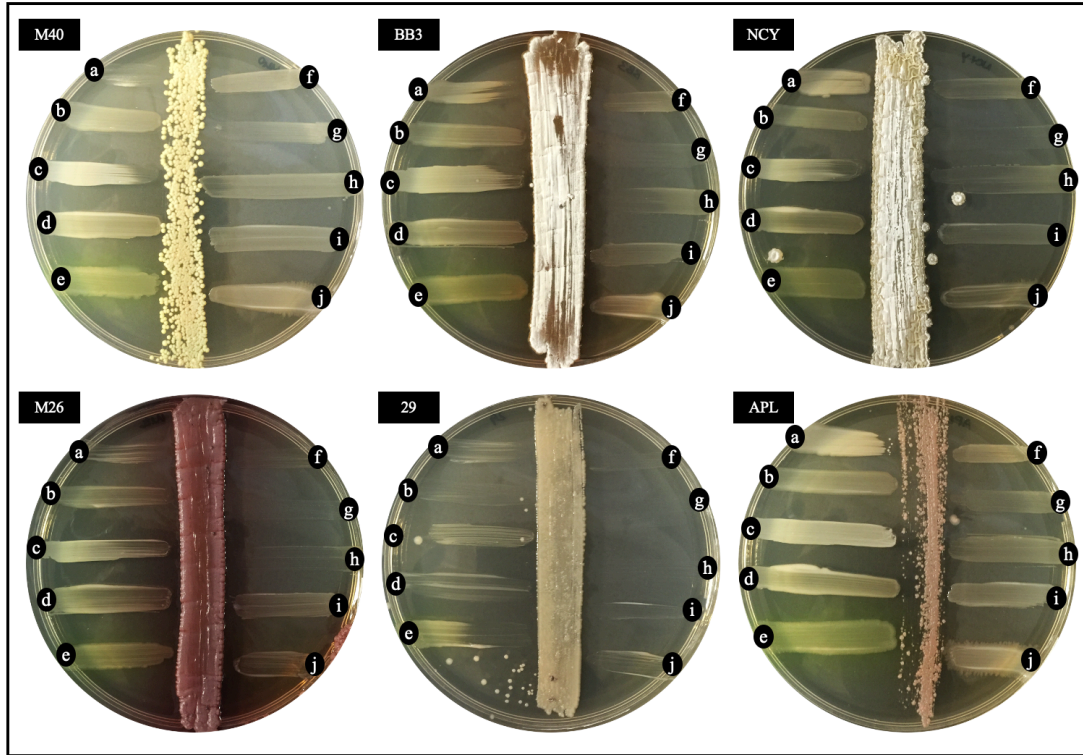
İzolot	Nükleotid	Benzerlik	Mikroorganizma
BB3	554/556	%99.64	<i>Streptomyces sp.</i>
M122	539/546	%98.55	<i>Streptomyces sp.</i>
MKG	549/552	%99.46	<i>Streptomyces sp.</i>
29	593/601	%98.67	<i>Streptomyces sp.</i>
M33	534/537	%99.44	<i>Streptomyces sp.</i>
13	599/601	%99.67	<i>Streptomyces sp.</i>
M62	532/533	%99.81	<i>Streptomyces sp.</i>
KGA	529/530	%99.81	<i>Streptomyces sp.</i>
M154	579/596	%97.15	<i>Streptomyces sp.</i>

4.2. Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.2.1. Çapraz Çizgi Yöntemi

Çapraz çizgi metoduna göre yapılan taramalar sonucu 135 izolattan 43 tanesi antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İzolatlar bu aşamada inhibisyon zonlarının uzunluğu baz alınarak az etkiliden çok etkiliye doğru olmak üzere +, ++, +++, +++++ olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.1’de gösterildiği üzere inhibisyon zonları; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mikroorganizmasında M23, M26, M30, M32, M35, M37-A, M37-B, M40, M46, M62, M63, 6, 17, 28, 29, BB3, HAY, MKG, TSA, BK, APL, MB, KGA, SGA, MBO, ÜP, ÜB, ÜB2, ÜB5, PMB; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mikroorganizmasında M26, M30, M32, M33, M35, M37-A, M37-B, M40, M62, M63, 6, 7, 13, 16, 17, 20, 25, 28, 29, BB, BB3, BK, MB, HAY, MKG, TSA, KGA, SGA, MBO, ÜY, ÜG, NCY, ÜB, ÜB5, PMB; *Escherichia coli* ATCC 25922 mikroorganizmasında M32, M33, M55, M154, M155, 11, 13, 29, BB3, ÜP, ÜB5; *Klebsiella pneumonia* ATCC

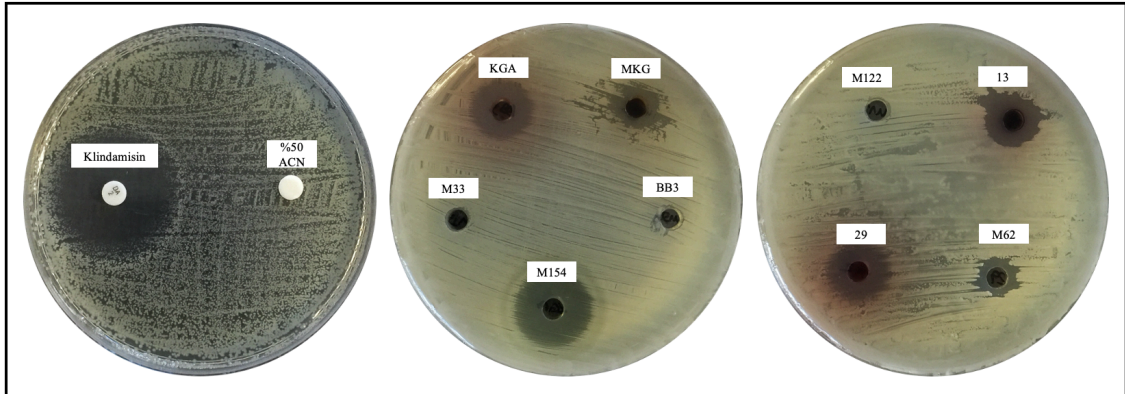
700603 mikroorganizmasında, M154, 13, 29, ÜB5; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mikroorganizmasında M33, 7, 11; *Shigella boydii* ATCC 9207 mikroorganizmasında M23, M26, M30, M32, M37-A, M37-B, M46, M62, M63, M155 6, 7, 11, 12, 17, 20, 25, 28, 29, BB3, TSA, BK, SY, SGA, MBO, NCY, ÜP, ÜB, ÜB2, ÜB5; *Shigella flexneri* ATCC 9199 mikroorganizmasında M23, M26, M30, M32, M37-A, M37-B, M46, M62, M63, M155, 6, 7, 11, 12, 17, 20, 25, 28, 29, BB3, TSA, BK, APL, SY, KGA, SGA, MBO, NCY, ÜP, ÜB, ÜB2, ÜB5; *Shigella sonnei* ATCC 9290 mikroorganizmasında M23, M26, M30, M32, M37-A, M37-B, M40, M46, M62, M63, M155 6, 7, 11, 12, 17, 20, 25, 28, 29, BB3, TSA, BK, SY, SGA, MBO, NCY, ÜP, ÜB, ÜB2, ÜB5; *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 mikroorganizmasında 13; *Proteus mirabilis* ATCC 25933 mikroorganizmasında ise 13 izolatında gözlemlenmiştir.



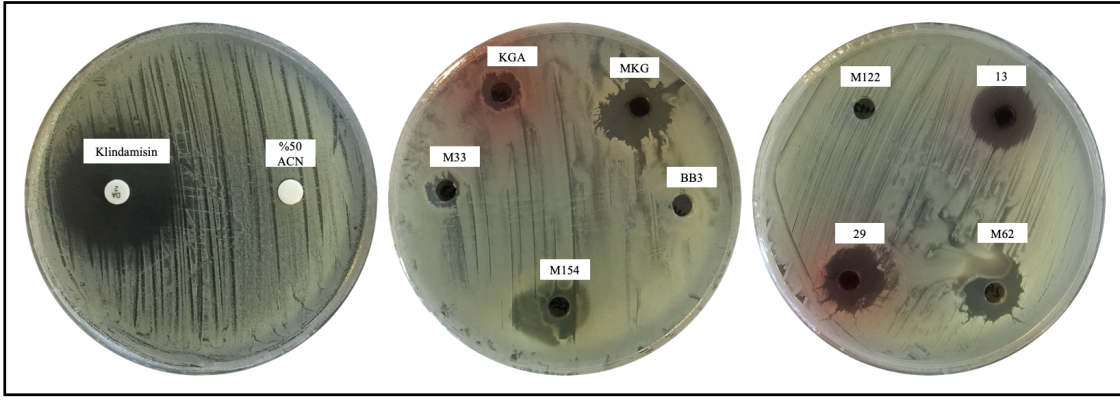
Şekil 4.4. Test mikroorganizmalarının çapraz çizgi yöntemi ile belirlenen bazı antimikrobiyal etki sonuçları. a) *Bacillus subtilis* ATCC 6633; b) *Escherichia coli* ATCC 25922; c) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; d) *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603; e) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; f) *Shigella boydii* ATCC 9207; g) *Shigella flexneri* ATCC 9199; h) *Shigella sonnei* ATCC 9290; i) *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640; j) *Proteus mirabilis* ATCC 25933.

4.2.2. Agar Difüzyon Yöntemi

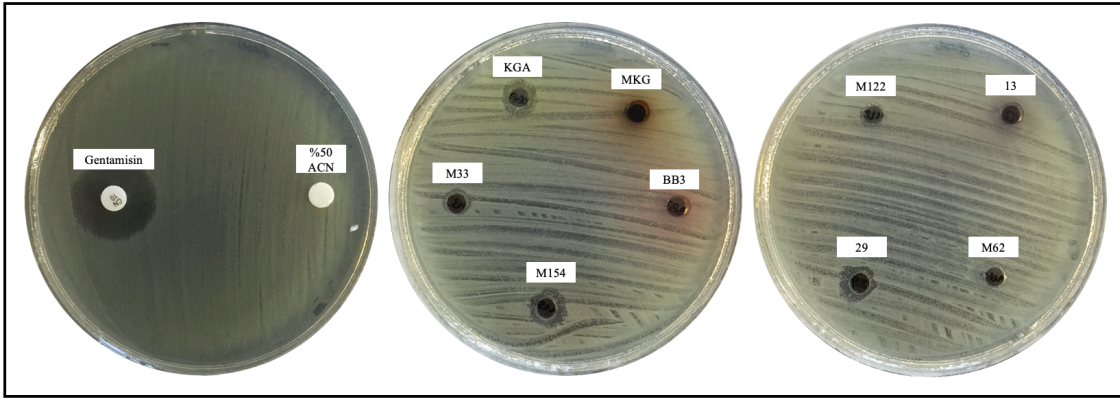
Etkili olarak tespit edilen izolatlardan, birbirlerinden farklı koloni morfolojisi ve antimikrobiyal etki gösterenler seçilmiş, en fazla antimikrobiyal aktivite gösterenler bu aşama için değerlendirmeye alınmıştır. Pozitif kontrol olarak, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için klindamisin; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 için gentamisin; *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 için siprofloksasin; *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 için seftriakson; *Proteus mirabilis* ATCC 25933 için aztreonam diskleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise %50 ACN emdirilmiş diskler kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda standart antibiyotik disklerinin zon çapları Çizelge 4.2.'de, ekstrakte edilen sekonder metabolitlerin oluşturduğu inhibisyon zonlarının çapları Çizelge 4.3'te verilmiştir.



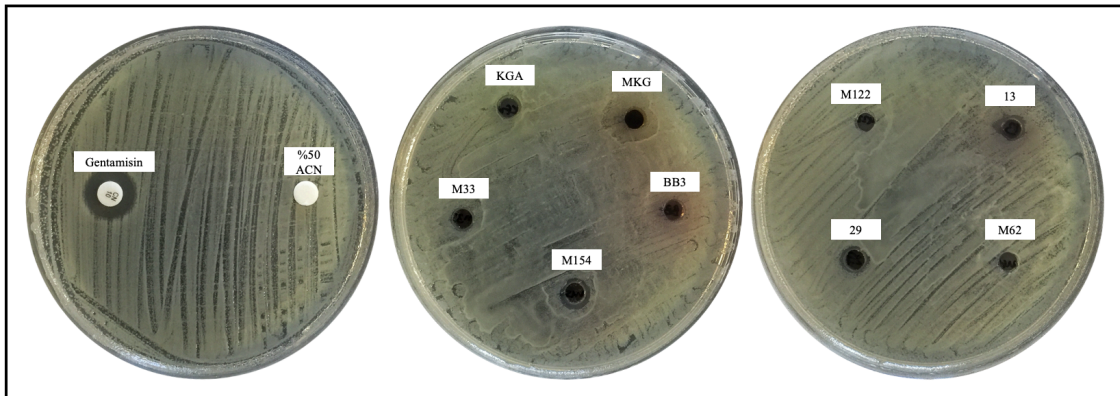
Şekil 4.5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



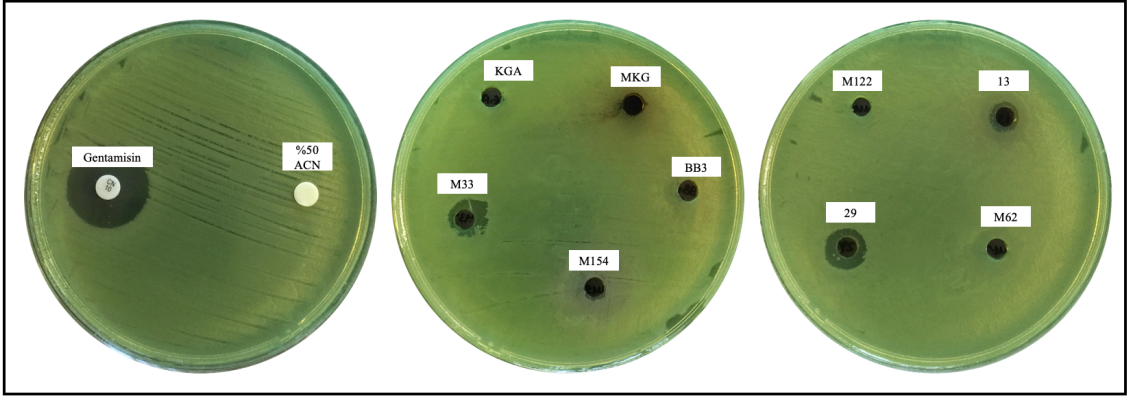
Şekil 4.6. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



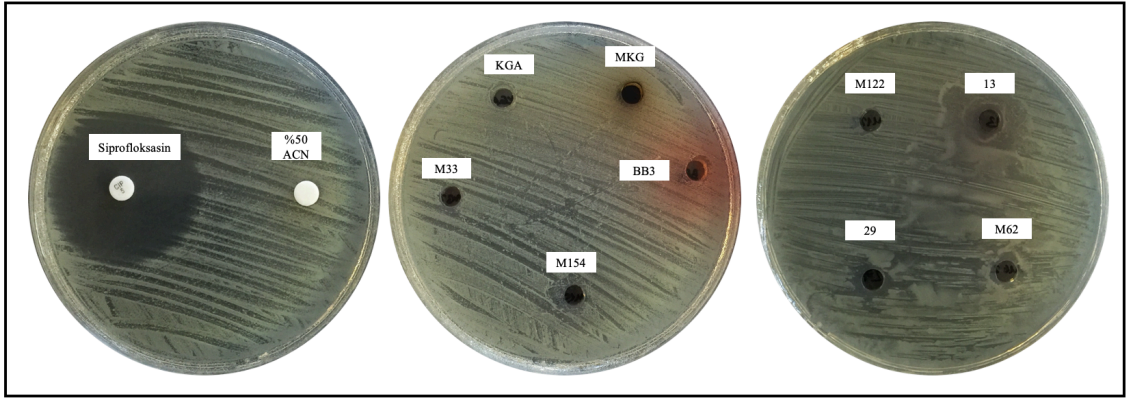
Şekil 4.7. *Escherichia coli* ATCC 25922'ye karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



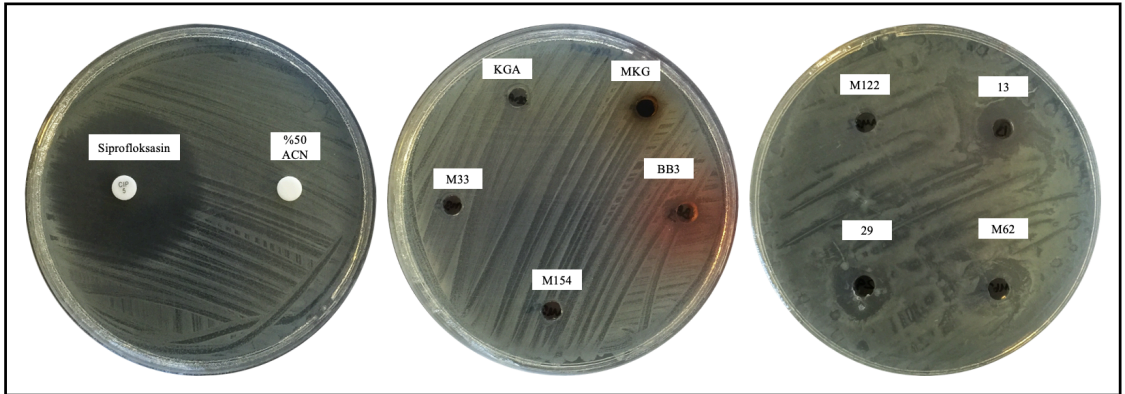
Şekil 4.8. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



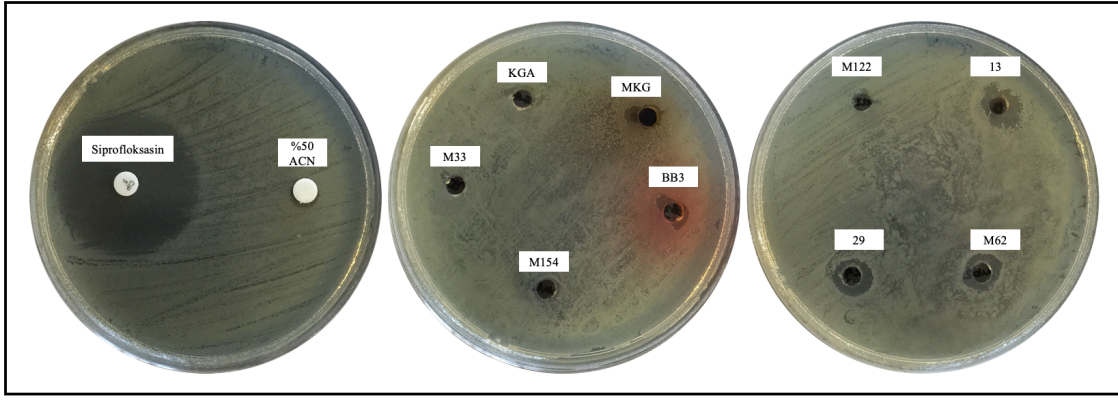
Şekil 4.9. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



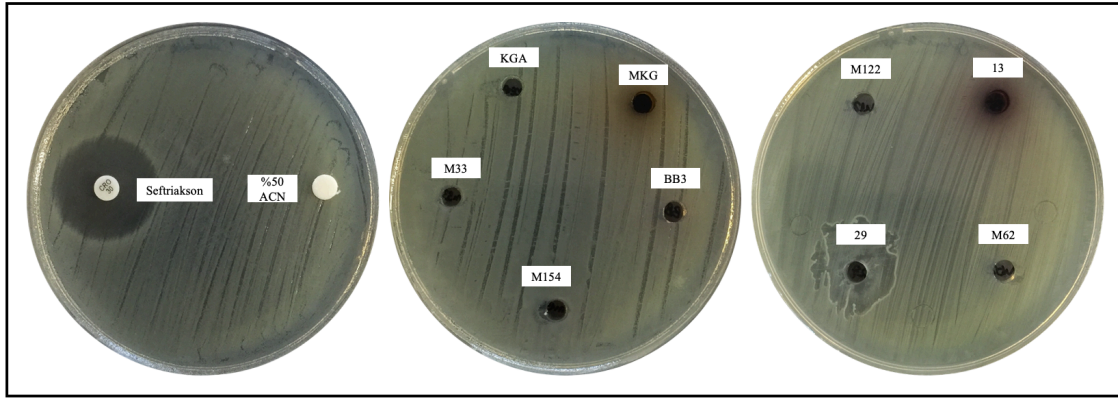
Şekil 4.10. *Shigella boydii* ATCC 9207'ye karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



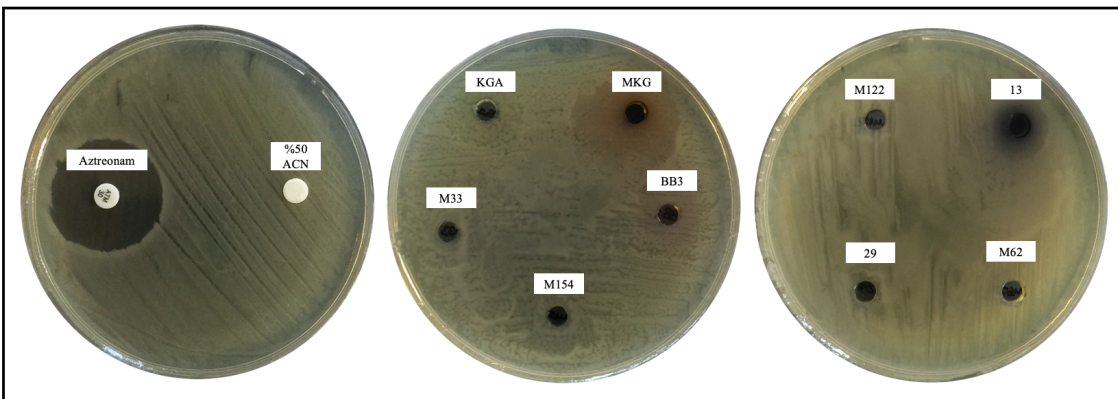
Şekil 4.11. *Shigella flexneri* ATCC 9199'a karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zolarının görüntüleri.



Şekil 4.12. *Shigella sonnei* ATCC 9290'a karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



Şekil 4.13. *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640'a karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.



Şekil 4.14. *Proteus mirabilis* ATCC 25933'e karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının inhibisyon zonlarının görüntüleri.

Çizelge 4.2. Test mikroorganizmalarının standart antibiyotik disklerine karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (mm).

Test Mikroorganizmaları	Antibiyotikler				
	Aztreonam (30 mcg)	Gentamisin (10 mcg)	Siprofloksasin (5 mcg)	Klindamisin (2 mcg)	Seftriakson (30 mcg)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TE	TE	TE	35	TE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	TE	TE	TE	34	TE
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TE	20	TE	TE	TE
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	TE	11	TE	TE	TE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	TE	20	TE	TE	TE
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	TE	TE	37	TE	TE
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	TE	TE	37	TE	TE
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	TE	TE	37	TE	TE
<i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640	TE	TE	TE	TE	21
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	28	TE	TE	TE	TE
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	TE	14	TE	TE	TE

TE: Test edilmemiştir.

Bacillus subtilis ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için test edilen klindamisin sırasıyla 22 mm ve 23 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 için test edilen gentamisin sırasıyla 20 mm, 11 mm, 20 mm ve 14 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Shigella boydii* ATCC

9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 için test edilen siprofloksasin üç mikroorganizmada da 37 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 için test edilen seftriakson 21 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Proteus mirabilis* ATCC 25933 için test edilen aztreonam ise 28 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Çizelge 4.3. Sekonder metabolit ekstraktlarının test mikroorganizmalarına karşı zon çapları (mm).

Test Mikroorganizmaları	Streptomyces İzolatları								
	BB3	M33	M62	M122	MKG	KGA	M154	13	29
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	10	-	12	16	21	15	17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	8	14	-	16	10	15	18	16
<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	-	7	-	-	-	9	10	-	9
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	-	8	7	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	9	-	-	-	-	-	7	11
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	-	-	6	-	-	-	-	8	9
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	-	-	7	-	-	-	-	12	14
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	12	-	18	-	10	6	-	16	16
<i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640	-	-	-	-	-	-	-	11	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	-	-	-	-	-	-	10	-
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	5	-	6	-	6	5	-	7	-

Bacillus subtilis ATCC 6633 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan M62, MKG, KGA, M154, 13 ve 29 ekstraktları arasından en büyük zonu 21 mm ile M154 oluşturmuştur. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan M33, M62, MKG, KGA, M154, 13 ve 29 ekstraktları arasında en fazla antimikrobiyal etkiyi 18 mm

ile 13 göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı M33, KGA, M154 ve 29 ekstraktları arasında en fazla antimikrobiyal etkiyi 10 mm ile M154 oluşturmuştur. *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan M154, 13 ve 29 ekstraktları arasından en büyük zonları 8 mm ile M154 ve 29 oluşturmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan M33, 13 ve 29 ekstraktlarından en fazla antimikrobiyal etkiyi 11 mm ile 29 göstermiştir. *Shigella boydii* ATCC 9207 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 suşlarına karşı inhibisyon zonu oluşturan M33, 13 ve 29 ekstraktlarından en büyük zonları, *Shigella boydii* ATCC 9207'de 9 mm, *Shigella sonnei* ATCC 9290'da 14 mm çapla 29 oluşturmuştur. *Shigella flexneri* ATCC 9199 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan BB3, M62, MKG, KGA, 13 ve 29 ekstraktlarından en fazla antimikrobiyal etkiyi 18mm ile M62 göstermiştir. *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 ve *Proteus mirabilis* ATCC 25933 suşlarına karşı sırasıyla 11 mm ve 10 mm ile yalnızca 13 ekstraktı inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan BB3, M62, MKG, KGA ve 13 ekstraktları arasından en büyük zonu 7 mm ile 13 oluşturmuştur. M122 izolatının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisi tespit edilmemiştir.

4.2.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Metabolitlerin minumum inhibitör konsatrasyon değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sekonder metabolit ekstraktlarının MİK değerleri Çizelge 4.4.'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. Sekonder metabolit ekstraktlarının MİK değerleri.

Test Mikroorganizmaları	Streptomyces İzolatları								
	BB3	M33	M62	M122	MKG	KGA	M154	13	29
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	4,69	-	1,17	2,24	9,38	9,38	9,38
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	18,75	4,69	-	1,17	2,24	9,38	9,38	18,75
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	18,75	-	-	-	9,38	18,75	-	18,75
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	-	18,75	9,38	18,75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	18,75	-	-	-	-	-	9,38	18,75
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	-	-	4,69	-	-	-	-	4,69	9,38
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	-	-	4,69	-	-	-	-	4,69	9,38
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 9199	4,69	-	4,69	-	4,69	9,38	-	4,69	4,69
<i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640	-	-	-	-	-	-	-	18,75	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	-	-	-	-	-	-	-	18,75	-
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	75	-	75	-	37,5	75	-	18,8	-

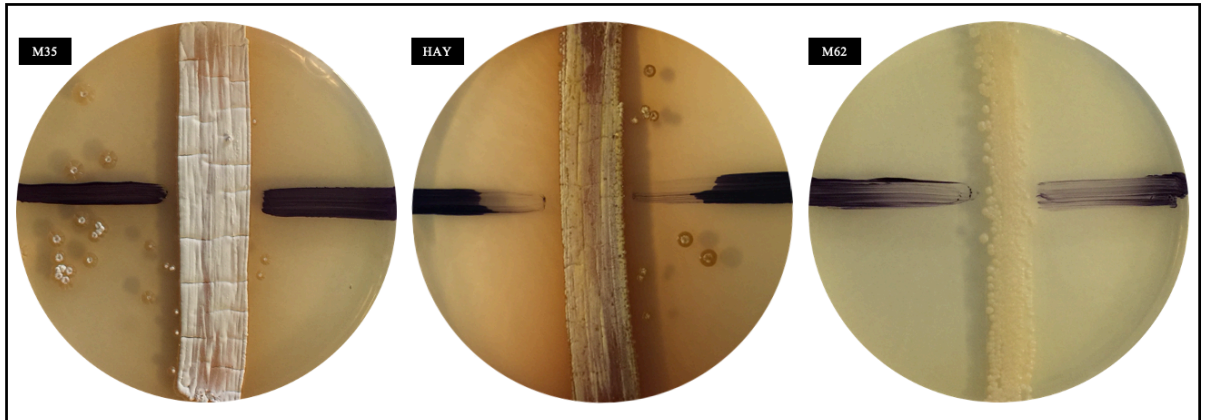
BB3 ekstraktının MİK değeri, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için 4,69 mg/mL iken *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 suşu için 75 mg/mL'dir. M33 ekstraktının MİK değeri, antimikrobiyal etki gösterdiği tüm mikroorganizmalar için 18,75 mg/mL olarak tespit edilmiştir. M62 ekstraktının MİK değeri, antimikrobiyal etki gösterdiği tüm mikroorganizmalar için 4,69 mg/mL olarak tespit edilmiştir. MKG ekstraktının MİK değeri, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları için 1,17 mg/mL; *Shigella flexneri* ATCC 9199 için 4,69 mg/mL; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 için 37,5 mg/mL'dir. KGA ekstraktının MİK değeri, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları için 2,24 mg/mL;

Shigella flexneri ATCC 9199 için 9,38 mg/mL; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 için 75 mg/mL olarak bulunmuştur. M154 ekstraktının MİK değeri, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları için 9,38 mg/mL iken, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 için 18,75 mg/mL'dir. 13 ekstraktının MİK değeri, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için 9,38 mg/mL; *Shigella boydii* ATCC 9207, *Shigella flexneri* ATCC 9199 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 için 4,69 mg/mL; *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 ve *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 için 18,75 mg/mL olarak tespit edilmiştir. 29 ekstraktının MİK değeri, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Shigella boydii* ATCC 9207 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 için 9,38 mg/mL; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella*; *Shigella flexneri* ATCC 9199 için 4,69 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

4.3. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.3.1. Çapraz Çizgi Yöntemi

Çapraz çizgi metoduna göre yapılan taramalar sonucu 135 izolattan 10 tanesi anti-quorum sensing aktivitesi göstermiştir. İzolatlar bu aşamada inhibisyon zonlarının uzunluğu baz alınarak değerlendirilmiştir; M32, M62, M63, M122, 12, 28, KB, MKG, KGA, SY izolatları etkili olarak gözlemlenmiştir.

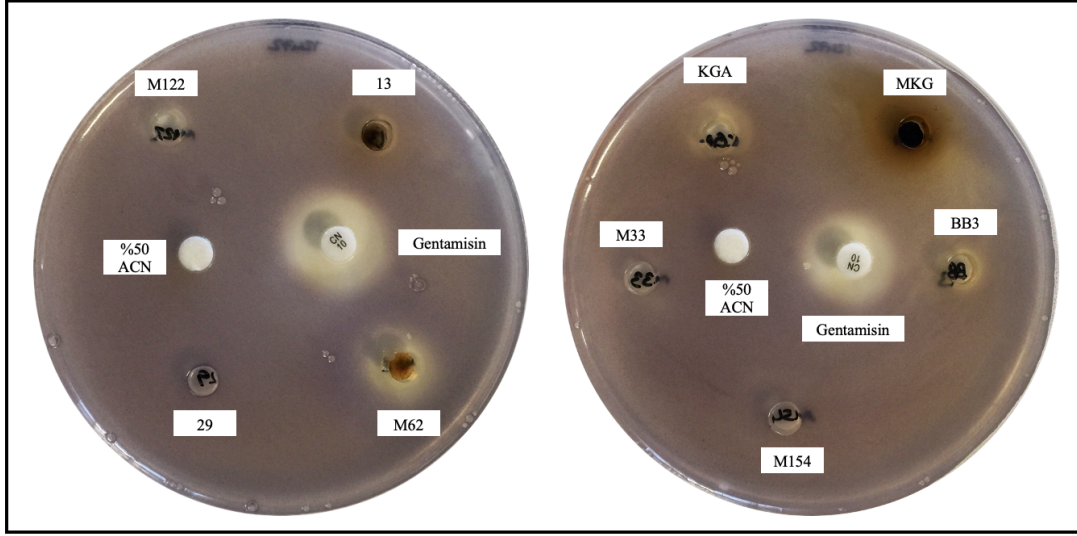


Şekil 4.15. *C. violaceum* ATCC 12472'nin çapraz çizgi yöntemi bazı etki sonuçları.

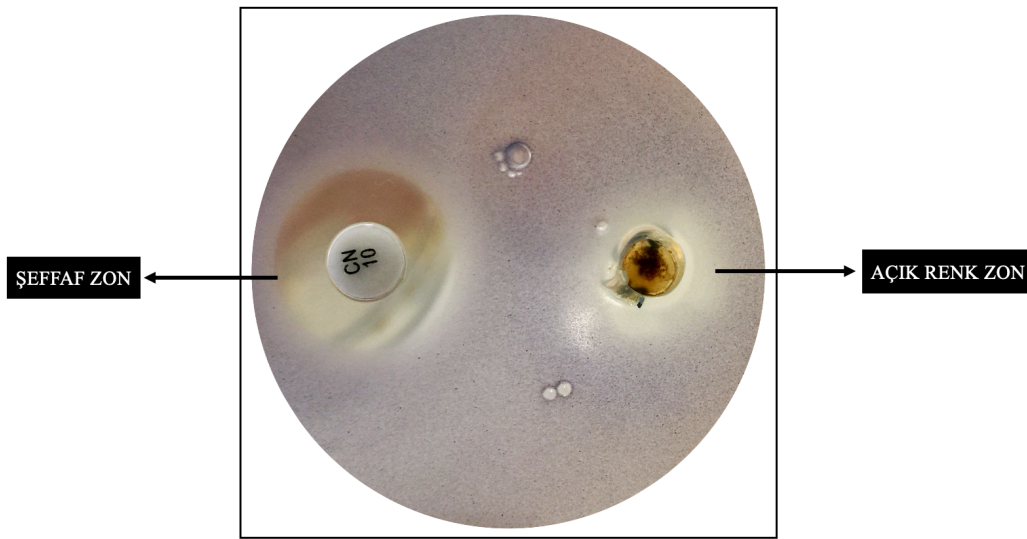
M35) Etkisiz; HAY) Antimikrobiyal etki; M62) Anti-quorum sensing etki.

4.3.2. Anti-Quorum Sensing Aktivitelerin İkincil Taraması

İzolat ekstraktlarının anti-quorum sensing aktiviteleri, kuyucuklar etrafındaki zon büyüklüğüne ve rengine göre değerlendirilmiştir. Şeffaf renkteki zon antimikrobiyal etki, açık renk zon ise anti-quorum sensing etkisi olarak ifade edilmiş (Şekil 4.17), petri görüntüleri Şekil 4.16.'da, zon çapları Çizelge 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.16. *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'ye karşı pozitif ve negatif kontrollerin, KGA, MKG, M33, M154, BB3, M122, 13, 29 ve M62 sekonder metabolit ekstraktlarının antimikrobiyal ve anti-quorum sensing zon görüntüleri.



Şekil 4.17. Antimikrobiyal etki sonucu şeffaf zon ve anti-quorum sensing etki sonucu açık renk zonun görüntüsü.

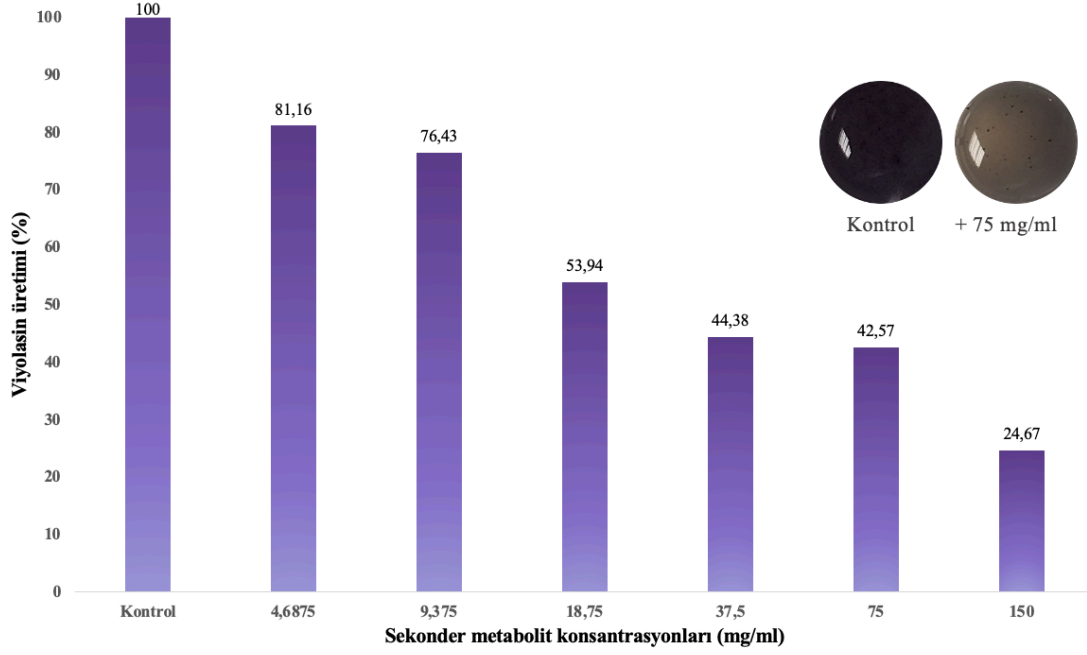
Çizelge 4.5. Sekonder metabolit ekstraktlarının antimikrobiyal ve anti-quorum sensing zon çapları.

Ekstraktlar	Zon Çapları (mm)	
	Antimikrobiyal Etki	Anti-QS Etki
BB3	5	-
M33	-	-
M62	6	11
M122	-	8
MKG	6	14
KGA	5	11
M154	-	-
13	7	-
29	-	-

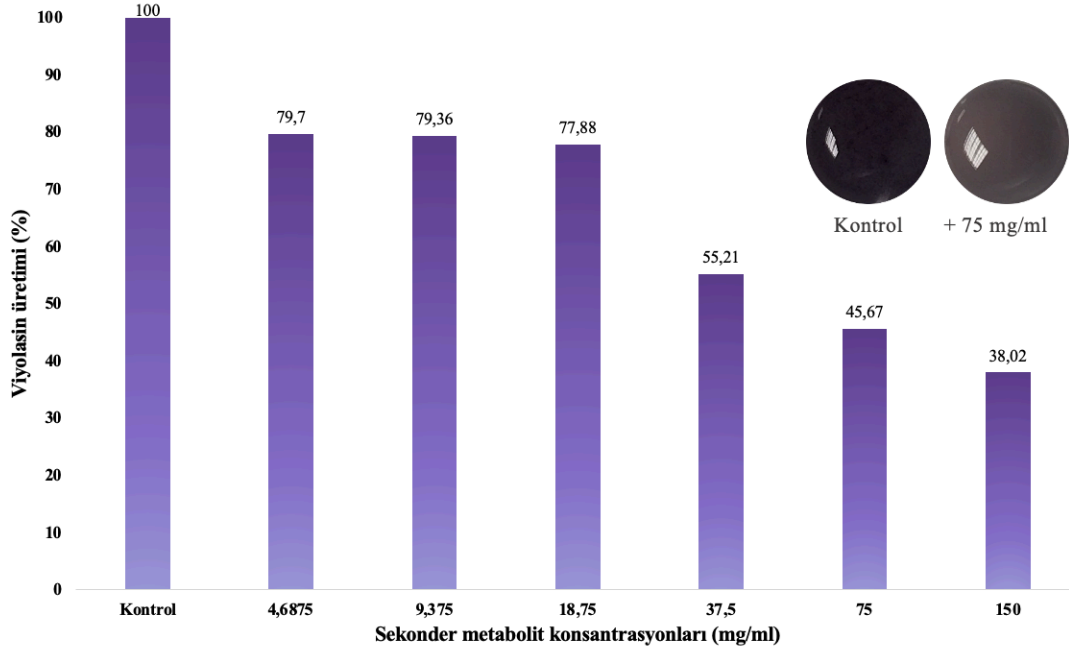
BB3 ve 13 ekstraktları *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. M62, MKG ve KGA ekstraktlarında hem antimikrobiyal hem de anti-quorum sensing aktivitesi gözlemlenmiştir. M122 ekstraktı antimikrobiyal aktivite göstermeksizin anti-quorum sensing aktivitesi göstermiştir.

4.3.3. Viyolasin İnhibisyonunun Spektrofotometrik Olarak Ölçülmesi

Anti-quorum sensing aktivitesi tespit edilen M62 ve KGA izolatlarının, quorum sensing mekanizması tarafından kontrol edilen viyolasin pigment üretiminin inhibisyonu spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. M62 ekstraktının çeşitli konstantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktının viyolasin inhibisyon sonuçları.

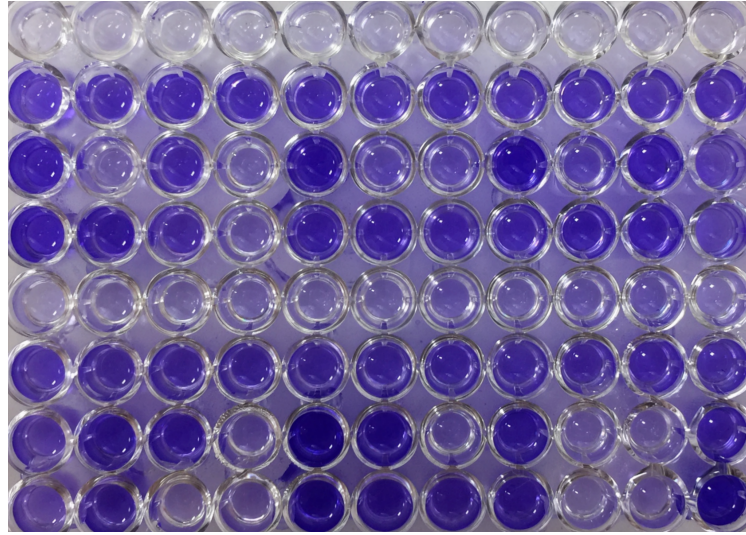


Şekil 4.19. KGA ekstraktının çeşitli konstantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktının viyolasin inhibisyon sonuçları.

M62 ve KGA sekonder metabolit ekstraktlarının *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'ye karşı belirlenen MİK değerleri 75 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ekstraktların MİK değerinin altındaki konsantrasyonlarda da viyolasin pigmentinin üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. 37,5 mg/mL'lik konsantrasyonlarda viyolasin üretimi, M62 ekstraktı tarafından %44,38'e, KGA ekstraktı tarafından %55,21'e indirgenmiştir. Böylelikle viyolasin inhibisyonunun, antimikrobiyal aktiviteden bağımsız olarak geliştiği saptanmıştır.

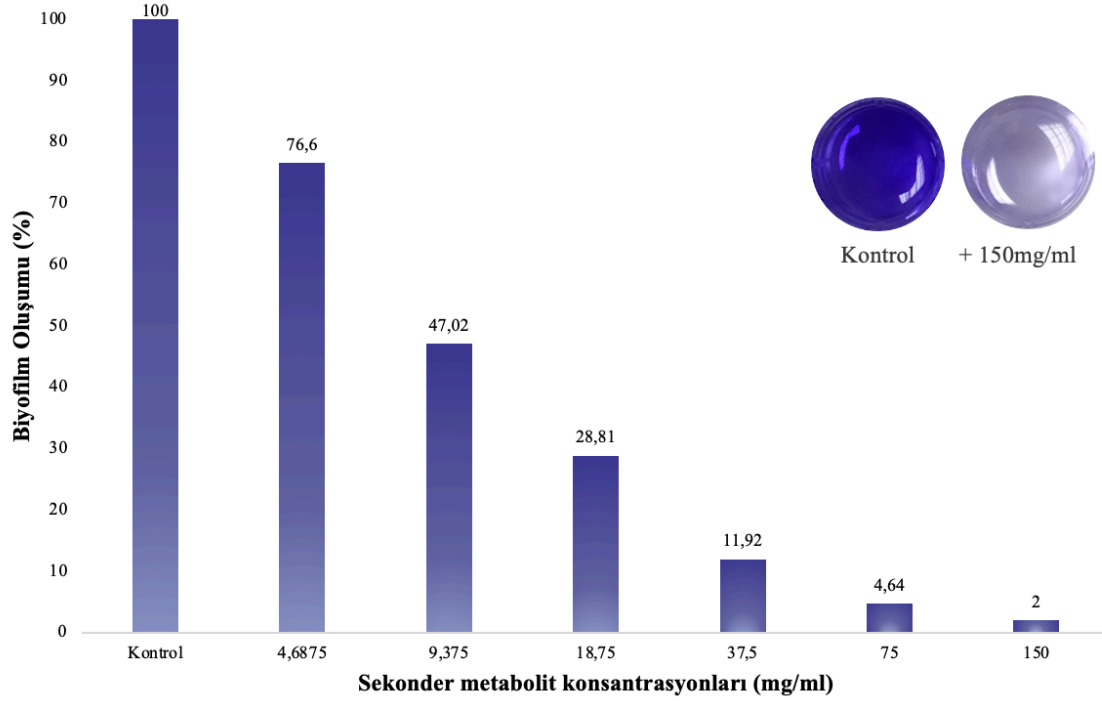
4.4. Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Streptomyces spp. kültür süpernatantları ile gerçekleştirilen antibiyofilm deneyi sonucu 25 adet izolatın antibiyofilm aktiviteleri tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



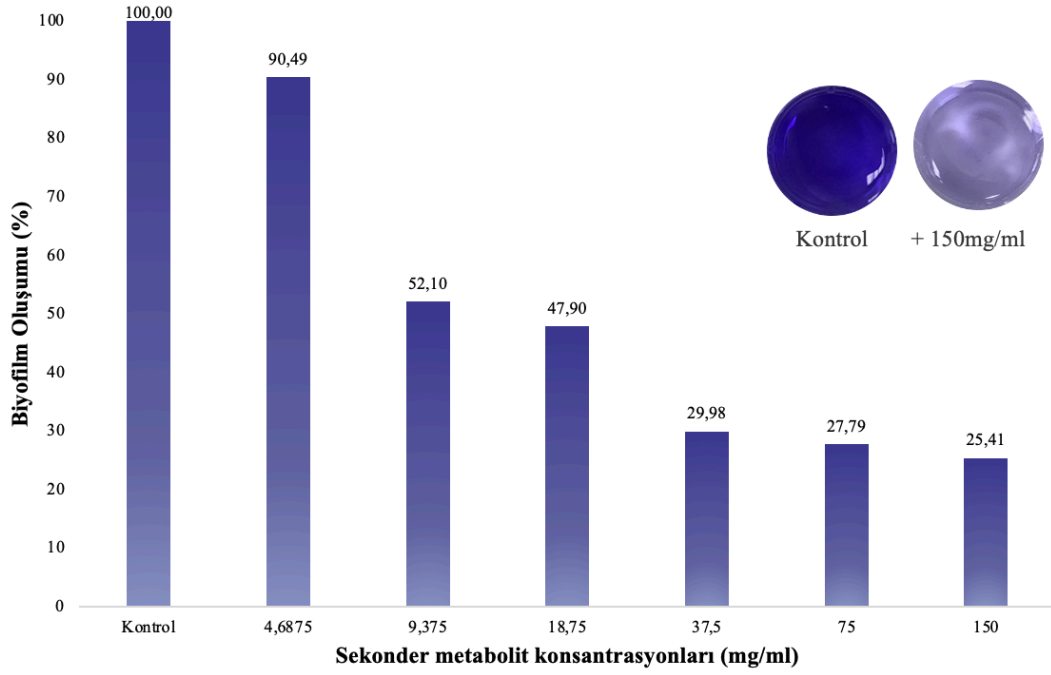
Şekil 4.20. *Streptomyces spp.* kültür sıvıları ile antibiyofilm özelliklerinin araştırılması.

Antibiyofilm aktivitesinin antimikrobiyal etki ile ilgili olup olmadığını incelemek adına, etkili olarak belirlenen izolatların çeşitli konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktlarıyla deney tekrar edilmiştir. 3 kez tekrarlanan deneyler sonucunda M122 ve BB3 antibiyofilm etkili olarak saptanmıştır.



Şekil 4.21. BB3 izolatının çeşitli konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktlarının antibiyofilm sonuçları.

BB3 ekstraktının *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mikroorganizmasına karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemesi dolayısıyla, etkili tüm konsantrasyonlar antimikrobiyal etkiden bağımsız olarak antibiyofilm özellik göstermiştir. BB3 ekstraktı biyofilm oluşumunu, 150 mg/mL konsantrasyonunda %2'ye; 75 mg/mL konsantrasyonunda %4,64'e; 37,5 mg/mL konsantrasyonunda %11,92'ye; 18,75 mg/mL konsantrasyonunda %28,81'e, 9,38 mg/mL konsantrasyonunda %47,02'ye; 4,69 mg/mL konsantrasyonunda %76,6'ya kadar azaltmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.22. M122 izolatının çeşitli konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktlarının antibiyofilm sonuçları.

M122 ekstraktının *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mikroorganizmasına karşı herhangi bir antimikrobiyal etki göstermemesi dolayısıyla, etkili tüm konsantrasyonlar antimikrobiyal etkiden bağımsız olarak antibiyofilm özellik göstermiştir. M122 ekstraktı biyofilm oluşumunu, 150 mg/mL konsantrasyonunda %25,41'e; 75 mg/mL konsantrasyonunda %27,79'a; 37,5 mg/mL konsantrasyonunda %29,98'e; 18,75 mg/mL konsantrasyonunda %47,90'a, 9,38 mg/mL konsantrasyonunda %52,10'a; 4,69 mg/mL konsantrasyonunda %90,49'a kadar azaltmıştır (Şekil 4.22).

4.4. Sekonder Metabolitlerin Tanımlanması

GC-MS analizleri sonucu M62, 29, M154 ekstraktlarının kimyasal bileşimlerinin 94; BB3 ve M122 ekstraktlarının kimyasal bileşimlerinin 93; KGA ve MKG ekstraktlarının kimyasal bileşimlerinin 92; 13 ekstraktının kimyasal bileşiminin 91 ve M33 ekstraktının kimyasal bileşiminin 90 bileşikten oluştuğu saptanmıştır. Ekstraktların tüm bileşenleri Çizelge 4.6'da, ana bileşenleri ise Şekil 4.23.-4.31.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Sekonder metabolit ekstraktların kimyasal bileşenleri.

Metabolit	Molekül Formülü	Molekül Kütlesi (g/mol)
2-amino-1-phenylethanol	C ₈ H ₁₁ NO	137
Phosphoric acid	H ₃ PO ₄	98
Pyridine-2,6-dicarboxylic acid	C ₇ H ₅ NO ₄	167
Orcinol	C ₇ H ₈ O ₂	124
Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
Arachidic acid	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312
Pyrogallol	C ₆ H ₆ O ₃	126
Cellobiose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
Benzene-1,2,4-triol	C ₆ H ₆ O ₃	126
Myristic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	118
Lactulose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
Uracil	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	112
Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	152
2-hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	152
4-hydroxypyridine	C ₅ H ₅ NO	95
4-hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	152
1,2-Cyclohexanediol	C ₆ H ₈ O ₂	112

Çizelge 4.6. (devamı)

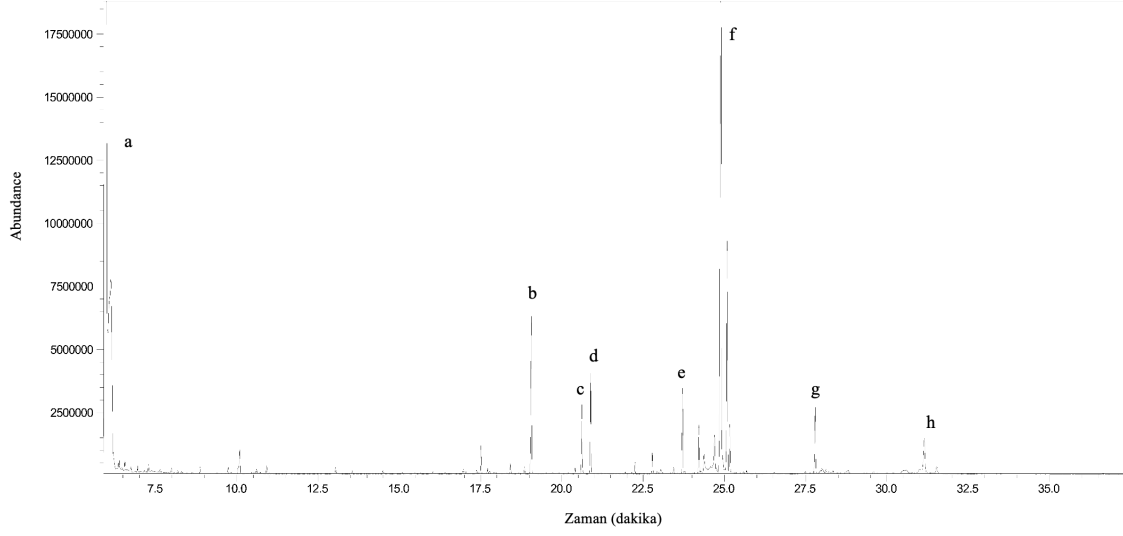
Metabolit	Molekül Formülü	Molekül Kütlesi (g/mol)
4-hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138
6-hydroxy caproic acid	C ₆ H ₁₂ O ₃	132
D-lyxosylamine	C ₅ H ₁₁ NO ₄	149
2-keto-L-gulonic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	194
Lactobionic acid	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	358
3-aminopropionitrile	C ₃ H ₆ N ₂	70
Leucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
D-Treitol	C ₄ H ₁₀ O ₄	122
L-(-)-fucose	C ₆ H ₁₂ O ₅	164
5-hydroxyindole-3-acetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₃	191
Maltotriose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504
Adipic acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	146
Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122
D-glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180
1-hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	242
N-methylglutamic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	161
Tagatose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180
2,3-dihydropyridine	C ₅ H ₅ NO ₂	111
Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138
Phloroglucinol	C ₆ H ₆ O ₃	126
Maltotriitol	C ₁₈ H ₃₄ O ₁₆	506
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170
Lauric acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200
1,3-diaminopropane	C ₃ H ₁₀ N ₂	74
Isomaltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
Glyceric acid	C ₃ H ₆ O ₄	106

Çizelge 4.6. (devamı)

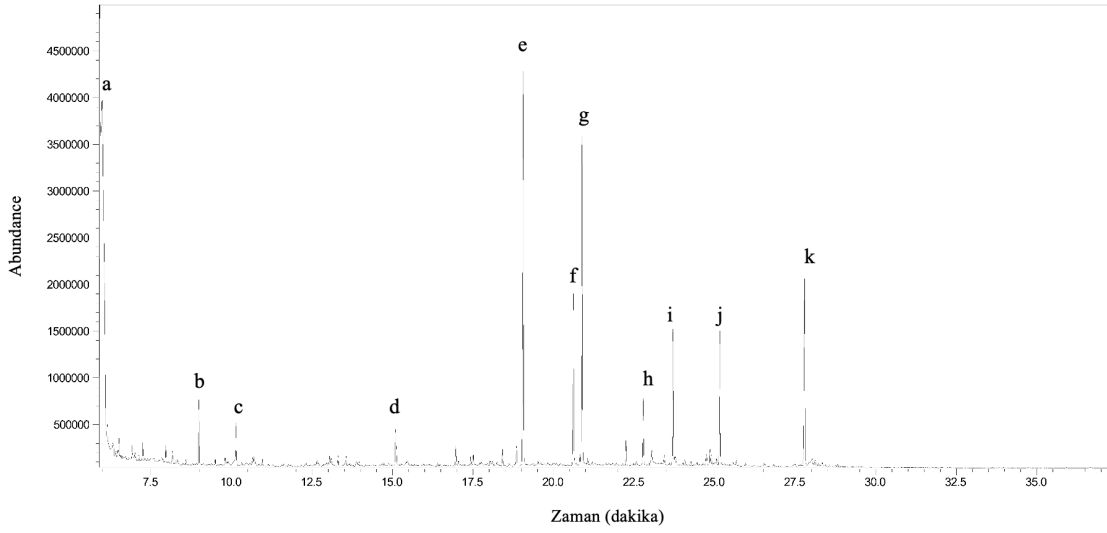
Metabolit	Molekül Formülü	Molekül Kütlesi (g/mol)
Threose	C ₄ H ₈ O ₄	120
Melibiose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
Neohesperidin	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₅	613
Maleic acid	C ₄ H ₄ O ₄	116
Fumaric acid	C ₄ H ₄ O ₄	116
Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254
Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
Galacturonic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	194
D-allose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180
3-methyl-2-oxobutanoic acid	C ₅ H ₈ O ₃	116
Squalene	C ₃₀ H ₅₀	411
Stearic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
Norepinephrine	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169
L-serine	C ₃ H ₇ NO ₃	105
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
Testosterone	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288
2-aminoethanethiol	C ₂ H ₇ NS	77
Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	507
Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
2'-deoxycytidine	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	227
Porphine	C ₂₀ H ₁₄ N ₄	310
N-methylantranilic acid	C ₈ H ₉ NO	151
N-acetyl-L-glutamic acid	C ₇ H ₁₁ NO ₅	189
3,4-dihydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄	154
Gluconic acid lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	178
L-pyroglutamic acid	C ₅ H ₇ NO ₃	129

Çizelge 4.6. (devamı)

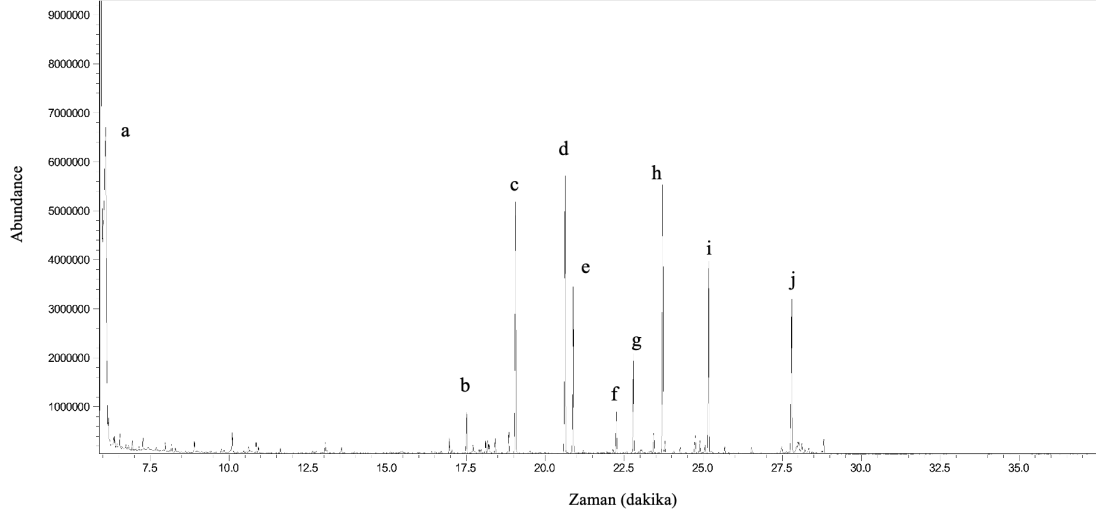
Metabolit	Molekül Formülü	Molekül Kütlesi (g/mol)
D-(+) trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
10-hydroxydecanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₃	188
DL-glyceraldehyde	C ₃ H ₆ O ₃	90
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃	92
Epsilon-caprolactam	C ₆ H ₁₁ NO	113
Hydroquinone	C ₆ H ₆ O ₂	110
3-indoleacetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175
Ribitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	52
Acetol	C ₃ H ₆ O ₂	74
Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342
Malonic acid	C ₃ H ₄ O ₄	104
2-hydroxypyridine	C ₅ H ₅ NO	95
D-(+)-melezitose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	504
D-malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	134
3-indolelactic acid	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃	205
DL-p-hydroxyphenyllactic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	182
Arabitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	152
Lactamide	C ₃ H ₇ NO ₂	89
Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	90
4-aminobenzoic acid	C ₇ H ₇ NO ₂	137
Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150
Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	75
Tryptophane	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204



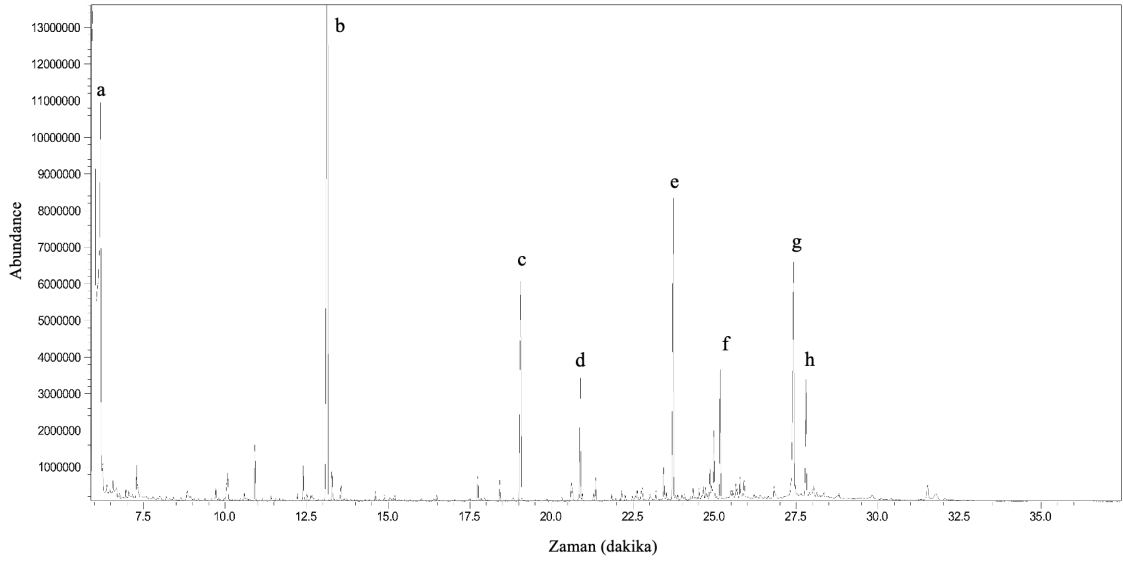
Şekil 4.23. BB3 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Gliserol; c) Stearik asit; d) Palmitoleik asit; e) Gallik asit; f) Maltoz; g) Porfin; h) Neohesperidin



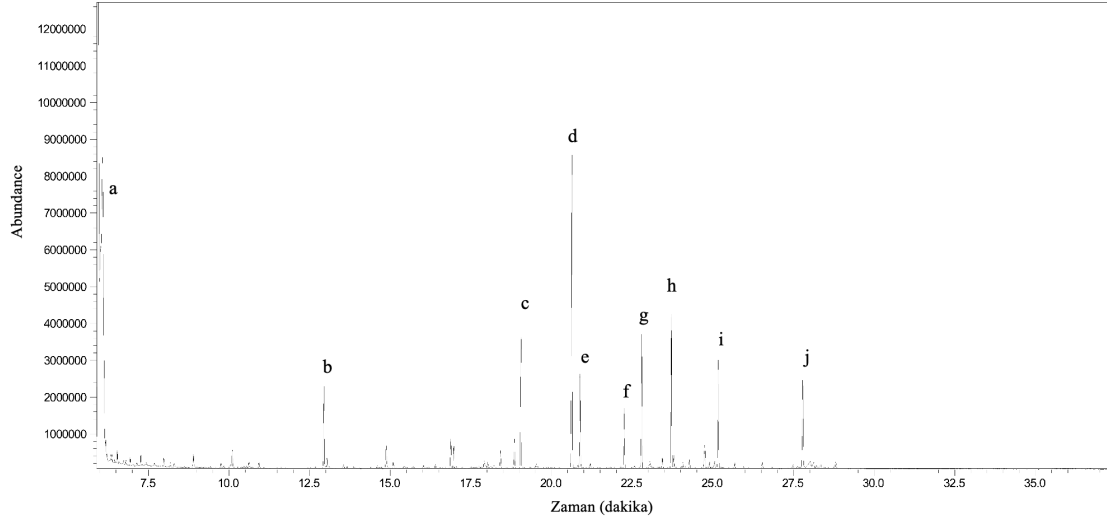
Şekil 4.24. KGA ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) 3-metil-2-okzobütanoik asit; c) Maleik asit; d) 1,2-sikloheksandion; e) Gliserol; f) Stearik asit; g) Palmitoleik asit; h) Urasil; i) Gallik asit; j) Maltoz; k) Porfin



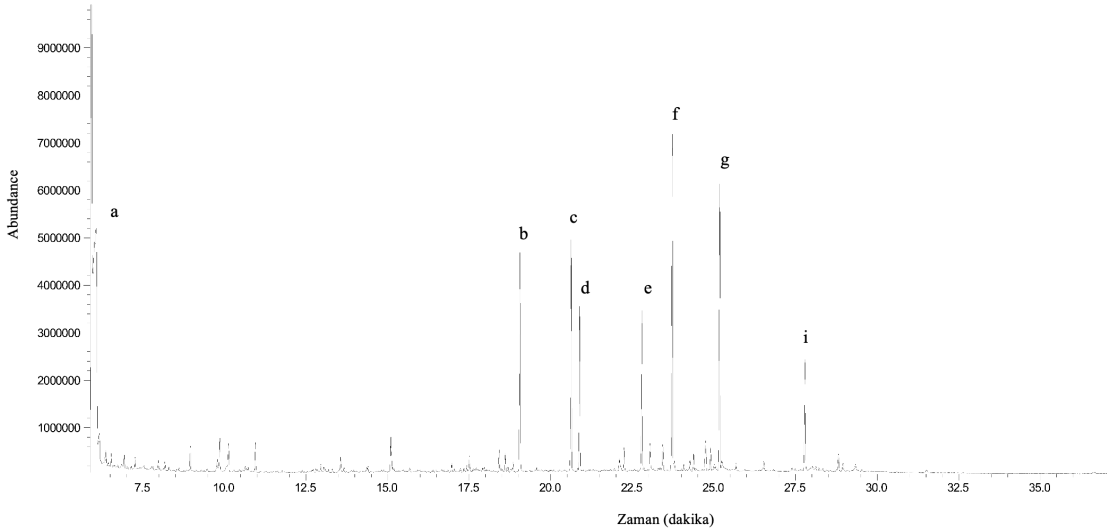
Şekil 4.25. M33 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) d-Glukoz; c) Gliserol; d) Stearik asit; e) Palmitoleik asit; f) Urasil; g) L-piroglutamik asit; h) Gallik asit; i) Maltoz; j) Porfin



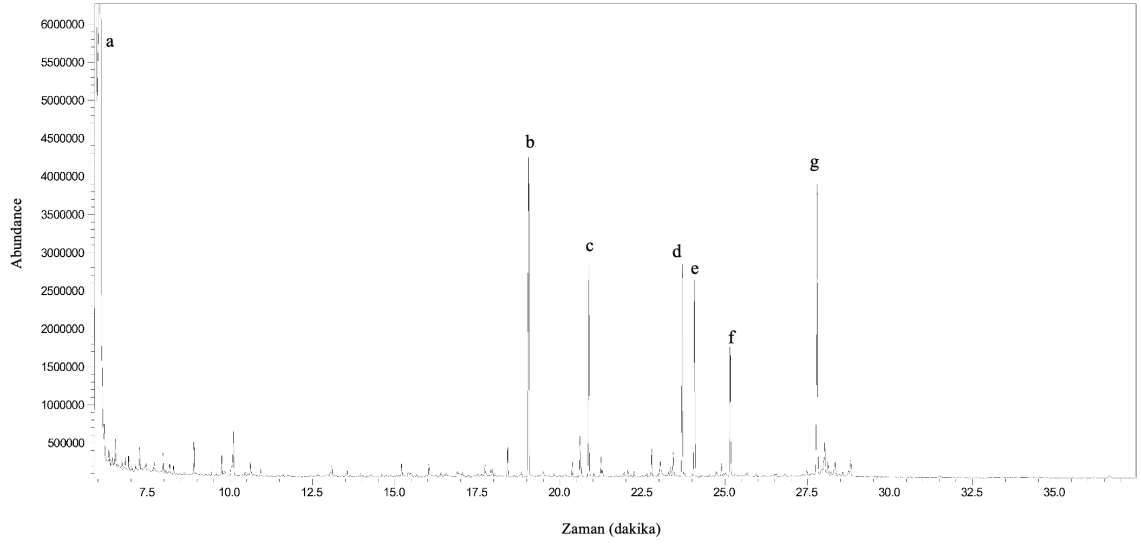
Şekil 4.26. MKG ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Treoz; c) Gliserol; d) Palmitoleik asit; e) Gallik asit; f) Maltoz; g) Laktoz; h) Porfin



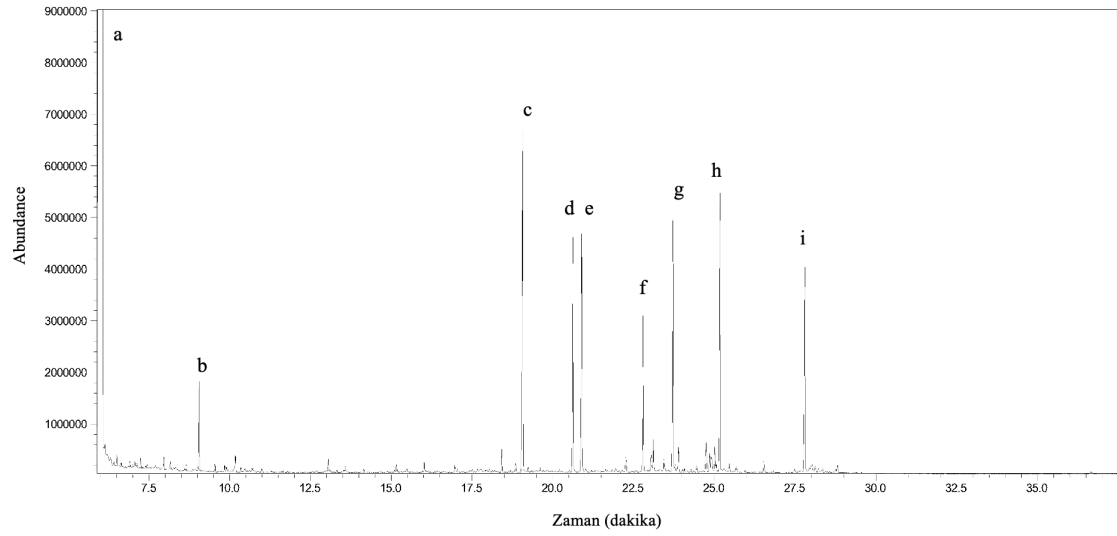
Şekil 4.27. M122 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Vanilin; c) Gliserol d) Stearik asit; e) Palmitoleik asit; f) Urasil; g) L-piroglutamik asit; h) Gallik asit; i) Maltoz; j) Porfin



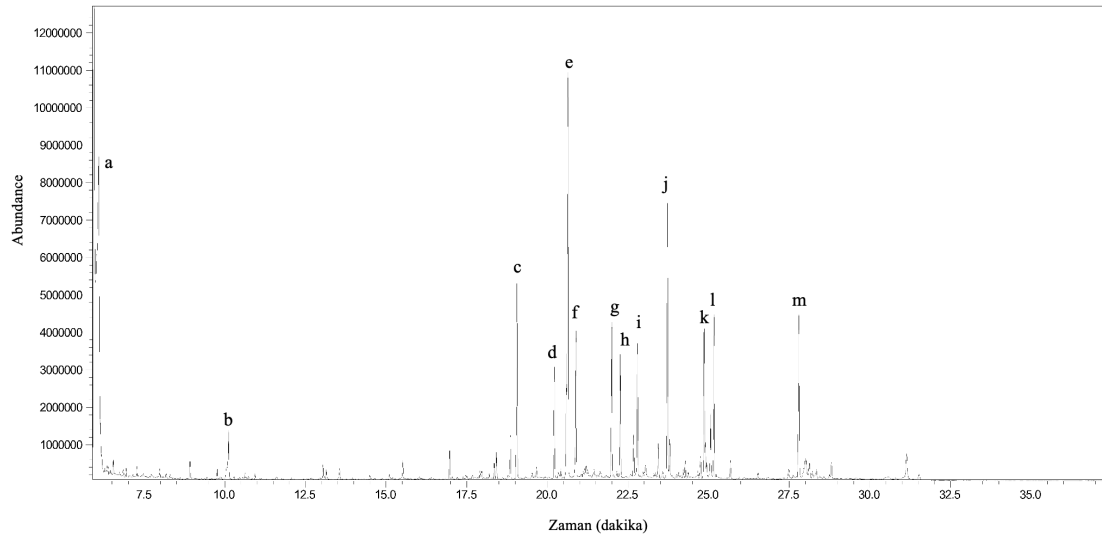
Şekil 4. 28. M62 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Gliserol c) Stearik asit; d) Palmitoleik asit; e) L-piroglutamik asit; f) Gallik asit; g) Maltoz; i) Porfin



Şekil 4. 29. M154 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Gliserol c) Palmitoleik asit; d) L-piroglutamik asit; e) Gallik asit; f) Maltoz; g) Porfin



Şekil 4.30. 13 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) 3-metil-2-okzobütanoik asit c) Gliserol d) Stearik asit; e) Palmitoleik asit; f) Gallik asit; g) Maltoz; h) Urasil; i) Porfin



Şekil 4.31. 29 ekstraktının GC-MS kromatogram görüntüsü a) Fosforik asit; b) Maleik asit; c) Gliserol; d) Pirogallol; e) Stearik asit; f) Palmitoleik asit; g) Laktobiyonik asit; h) Gliserik asit i) Urasil; j) L-piroglutamik asit; k) Gallik asit l) Maltoz; m) Porfin

Streptomyces spp.'lerden elde edilen ekstraktların kimyasal bileşenleri literatürde taratılıp, biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi toplanmıştır. Toplanan bilgiye göre, 94 bileşen arasında 24 adet bileşen antimikrobiyal; 4 adet bileşen anti-quorum sensing; 3 adet bileşen antibiyofilm aktivitelerine sahiptir.

Çizelge 4.7. Çeşitli ekstrakt bileşenlerinin biyolojik aktiviteleri.

Metabolitler	Biyolojik Aktiviteler	Kaynak
Phosphoric acid	Antimikrobiyal	[71,72]
Pyrogallol	Antimikrobiyal, Anti-Quorum Sensing	[73,74]
Myristic acid	Antimikrobiyal, Anti-Quorum Sensing	[75,76]
Succinic acid	Antimikrobiyal	[77]
Vanillin	Antimikrobiyal, Anti-Quorum Sensing, Antibiyofilm	[78–80]
4-hydroxybenzoic acid	Antimikrobiyal	[81]
4-aminobenzoic acid	Antimikrobiyal	[82]
Lactobionic acid	Antimikrobiyal	[83,84]
Lauric acid	Antimikrobiyal, Antibiyofilm	[85,86]
Isomaltose	Antimikrobiyal	[87]
Maleic acid	Antimikrobiyal	[88]
Fumaric acid	Antimikrobiyal	[89]
Palmitoleic acid	Antimikrobiyal, Antibiyofilm	[90,91]
Oleic acid	Antimikrobiyal	[92]
Stearic acid	Antimikrobiyal	[93]
Epsilon-caprolactam	Antimikrobiyal	[94]
Hydroquinone	Antimikrobiyal	[95]
D-malic acid	Antimikrobiyal, Anti-Quorum Sensing	[96,97]
Oxalic acid	Antimikrobiyal	[98]
Palmitic acid	Antimikrobiyal	[99,100]
Glycine	Antimikrobiyal	[101]
Glycerol	Antimikrobiyal	[102]
Gallic acid	Antimikrobiyal	[103]
Arachidonic acid	Antimikrobiyal	[104]

5. YORUM

Mikroorganizmaları öldürmek ya da üremesini engellemek şüphesiz tarihteki en büyük başarılarından biridir. Ancak mikroorganizmalar üremeleri engellendiğinde oldukça büyük ve seçici bir baskı altında kalır ve baskıdan sağ çıkan mikroorganizmalar bunun sonucu olarak direnç geliştirmeye başlar. Son yıllarda yaşanan antimikrobiyal maddelerin yanlış ve gereksiz kullanımı da bakterilerin bu maddelere direnç kazanmasıyla sonuçlanmıştır. Böylelikle yeni antimikrobiyal maddelere olan ihtiyaç oldukça artmıştır. Bu ihtiyaç en başta yeni antimikrobiyal maddelerin keşfiyle giderilebilir. Ancak son 30 yılda yalnızca iki yeni sınıf antibiyotik keşfedilmiştir [105]. Yeni antimikrobiyal maddelerin keşfine ek olarak, zaten var olan metabolitlerin modifiye edilip kullanılabilmesi de seçenekler arasındadır. 2000 yılından itibaren yeni onaylanan ilaçların bir kısmı aslında *Streptomyces* tarafından üretilen sentetik antibiyotik analoglarıdır [106].

Bu arayış sadece bakterisidal veya bakteriyostatik maddeler için değil, bunların yerine patojenik özelliklerin kontrol edilebildiği alternatif yöntemleri kapsamaktadır. Çalışmalar anti-quorum sensing ya da antibiyofilm özellikler gösteren moleküller, monoklonal antikolar, bakteriyofaj terapisi gibi birçok farklı stratejiye yönelmiştir.

Streptomyces cinsi tarih boyunca birçok biyoaktif molekülün en büyük sağlayıcılarından biri olduğu için elbette bu arayışta da ilk başvuru organizmaların içindedir. Şimdiye kadar tanımlanan en büyük antibiyotik üreticisi olan bu cinsten elde edilen antimikrobiyal maddelerin sayısı gittikçe artmaktadır [7].

Bu tez çalışmasında, *Streptomyces* cinsine ait izolatların bazı biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Farklı bölgelerden alınan toprak örneklerinden 142 adet izolat elde edilmiş, önce morfolojik olarak değerlendirilmiş daha sonra ise 16S rRNA analizleri yapılmıştır. 16S rRNA dizileri NCBI BLAST programında karşılaştırılmış, çeşitli aktivitelere sahip izolatların tamamı %97,15-%99,81 arasındaki oranlarla *Streptomyces sp.*'ye benzerlik göstermişlerdir.

Antimikrobiyal özelliklerinin taranması için ilk olarak çapraz çizgi yöntemi kullanılmıştır. Bu aşamada antimikrobiyal özellik gösteren 58 izolat bir sonraki aşama için seçilmiştir. Seçilen izolatların sekonder metabolitleri ekstrakte edilmiş ve agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Disk etrafında oluşan zonların

büyükliğüne bakılarak etkili izolatlar tespit edilmiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşuna karşı BB3, M62, MKG, KGA, 13 ve 29 ekstraktları; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşuna karşı BB3, M33, M62, MKG, KGA, 13 ve 29 ekstraktları; *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı M33, M154 ve 29 ekstraktları. *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603 suşuna karşı M154, 13 ve 29 ekstraktları; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı M33, 13 ve 29 ekstraktları; *Shigella boydii* ATCC 9207 ve *Shigella sonnei* ATCC 9290 suşlarına karşı M33, 13 ve 29 ekstraktları; *Shigella flexneri* ATCC 9199 suşuna karşı BB3, M62, MKG, KGA, 13 ve 29 ekstraktları; *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640 ve *Proteus mirabilis* ATCC 25933 suşlarına karşı 13 ekstraktı; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 suşuna karşı BB3, M62, MKG, KGA ve 13 ekstraktları inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Sekonder metabolit ekstraktlarının MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. MİK değerleri test mikroorganizmalarına göre değişiklik göstermekle birlikte BB3 ekstraktı için 4,69-75 mg/mL arasında; MKG için 1,17-37,5 mg/mL arasında; KGA için 2,24-75 mg/mL arasında; M154 için 9,38-18,75 mg/mL arasında; 13 için 9,38-18,75 mg/mL arasında; 29 için 4,69 -9,38 mg/mL arasında tespit edilmiştir. M62 ve M33 ekstraktlarının MİK değerleri etkili oldukları tüm test mikroorganizmaları için sırasıyla 4,69 mg/mL ve 18,75 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

İzolatların anti-quorum sensing aktivitesi antimikrobiyal madde taramasındaki gibi iki aşamada yapılmıştır. Çapraz çizgi yöntemiyle etkili olarak belirlenen 58 adet izolatın sekonder metabolitleri ekstrakte edilmiştir. Üretilen sekonder metabolitlerin anti-quorum sensing ve antimikrobiyal etkileri, ekstraktların kuyucukların etrafında oluşturduğu zon ile belirlenmiştir. Kuyucuk etrafında oluşan açık renk zon anti-quorum sensing, şeffaf zon ise antimikrobiyal etki olarak değerlendirilmiştir. M122 ekstraktlarının yüklendiği kuyucuğun etrafında açık renk zon; M62, KGA ve MKG ekstraktlarının kuyucuklarında ise şeffaf ve açık renkli zonlar tespit edilmiştir. Oluşan zonun antimikrobiyal etki ile oluşup oluşmadığının araştırılması için sekonder metabolitlerin çeşitli konsantrasyonlardaki viyolasin inhibisyonu spektrofotometrik olarak incelenmiştir. M62 ve KGA ekstraktlarının *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472'ye karşı 75 mg/mL olarak belirlenen MİK değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda bile viyolasin inhibisyonu tespit edilmiştir.

Antibiyofilm etki, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 mikroorganizmasına karşı araştırılmıştır. Deney ilk olarak *Streptomyces spp.* kültür süpernatantları ile yapılmıştır.

Bu aşamada 25 adet izolatın antibiyofilm aktiviteleri saptanmıştır. Etkili saptanan izolatların farklı konsantrasyonlardaki sekonder metabolit ekstraktları ile biyofilm inhibisyonu tekrar araştırılmıştır. 3 kez tekrarlanan deney sonucunda, M122 ve BB3 ekstraktlarının antibiyofilm aktiviteleri tespit edilmiştir. M122 ve BB3 ekstraktları test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal aktivite göstermemekle birlikte, ekstraktların araştırılan tüm konsantrasyonlarında antibiyofilm aktivite gözlemlenmiştir.

İzolatların incelenen biyolojik aktivitesine dayanarak 9 adet etkili *Streptomyces sp.* seçilmiştir. Seçilen izolatların sekonder metabolit ekstraktlarının kimyasal içerikleri GC-MS analizi ile araştırılmıştır. GC-MS analizleri M62, 29, M154 ekstraktları içinde 94; BB3 ve M122 ekstraktları içinde 93; KGA ve MKG ekstraktları içinde 92; 13 ekstraktı içinde 91 ve M33 ekstraktı içinde 90 adet olmak üzere ekstraktların içinde toplamda 94 adet farklı kimyasal bileşik olduğunu göstermiştir. Literatür incelemelerine göre fosforik asit, süksinik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 4-aminobenzoik asit, laktobiyonik asit, izomaltoz, maleik asit, fumarik asit, oleik asit, stearik asit, epsilon kaprolaktam, hidrokinon, oksalik asit, palmitik asit, glisin, gliserol, gallik asit ve arakidik asit antimikrobiyal aktivite; pirogallol, miristik asit, d-malik asit hem antimikrobiyal hem anti-quorum sensing aktivite; laurik asit ve palmitoleik asit hem antimikrobiyal hem antibiyofilm, vanilin ise antimikrobiyal, anti-quorum sensing ve antibiyofilm aktivite göstermektedir. Böylece BB3, M62, M33, KGA, MKG, M154, 13, 29 ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri ana bileşenleri içinde fosforik asit, gliserol, stearik asit, palmitoleik asit, maleik asit, L-piroglutamik asit, laktobiyonik asit, pirogallol ve gallik asit bulundurmaları ile ilgili olabilir. Aynı şekilde BB3 ve M122 ekstraktlarının antibiyofilm etkileri ana bileşenleri içinde palmitoleik asit bulundurmaları ile; M122 ekstraktının anti-quorum sensing etkisi ana bileşenleri içinde vanilin olması ile ilgili olabilir.

Özet olarak bu tez çalışmasında izolatlar birbirinden farklı bölgelerden izole edilerek, izolatlar ve ekstraktları arasında çeşitlilik sağlanmıştır. Antimikrobiyal, antibiyofilm ve anti-quorum sensing aktiviteleri incelendikten sonra seçilen izolatlar 16S rRNA analizi ile *Streptomyces sp.* olarak tanımlanmıştır. İzolatların biyolojik aktivitelerinin kaynağına ışık tutmak adına, sekonder metabolitleri ekstrakte edilmiş ve kimyasal bileşimleri GC-MS analizi ile aydınlatılmıştır. Bu tez çalışmasının, artan antibiyotik direncine karşı yeni çözümlerin eklemesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] B. LaSarre, M.J. Federle, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77 (2013) 73–111.
- [2] J. Bérdy, *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* 58 (2005) 1–26.
- [3] S. Ulusoy, *Cankaya University Journal of Arts and Sciences* 1 (2008) 145–151.
- [4] S.V.P. Issac Abraham, A. Palani, B.R. Ramaswamy, K.P. Shunmugiah, V.R. Arumugam, *Archives of Medical Research*. 42 (2011) 658–668.
- [5] H. Zhu, C.C. He, Q.H. Chu, *Lett. Journal of Applied Microbiology* 52 (2011) 269–274.
- [6] Mobolaji Felicia Adegboye, *African Journal of Agricultural Research* 7 (2012) 2255–2261.
- [7] H.B. Mohammed Harir, Z.F. and R.P. Miloud Bellahcene, *Basic Biology and Applications of Actinobacteria* 6 (2012) 99–122.
- [8] I.L. Pepper, T.J. Gentry, *Earth Environments*. In *Environmental Microbiology: Third Edition*. Elsevier Inc., Amsterdam 59-88 2015.
- [9] K.S. Lam, *Current Opinion in Microbiology* 9 (2006) 245–251.
- [10] E. Çil, K. Işık, F.Ö. Koçak, *Ordu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi* 6 (2016) 75–84.
- [11] L. Sembiring, M. Goodfellow, *Microbiology Indonesia* 2 (2008) 49–56.
- [12] E.R. Stulberg, G.L. Lozano, J.B. Morin, H. Park, *Frontiers in Microbiology* 7 (2016) 1–12.
- [13] S.T. Williams, M. Goodfellow, G. Alderson, E.M. Wellington, P.H. Sneath, M.J. Sackin, *Journal of General Microbiology* 129 (1983) 1743–1813.
- [14] M. Cotârleț, T.G.H. Negoită, G.E. Bahrim, P. Stougaard, *Brazilian Journal of Microbiology* 42 (2011) 868–877.

- [15] M. Kontro, U. Lignell, M.R. Hirvonen, A. Nevalainen, *Lett. Journal of Applied Microbiology* 41 (2005) 32–38.
- [16] M. Oskay, *E-Journal of New World Sciences Academy* 4 (2009) 48–60.
- [17] K.F. Chater, *Microbiology* 144 (1998) 1465–1478.
- [18] L.T.A.S. Semêdo, R.C. Gomes, A.A. Linhares, G.F. Duarte, R.P. Nascimento, A.S. Rosado, M. Margis-Pinheiro, R. Margis, K.R.A. Silva, C.S. Alviano, G.P. Manfio, R.M.A. Soares, L.F. Linhares, R.R.R. Coelho, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (2004) 1323–1328.
- [19] E. Atalan, *Selective Isolation, Characterisation and Identification of Some Streptomyces Species*, PhD thesis, University of Newcastle, Callaghan, 1993.
- [20] A. Manteca, R. Alvarez, N. Salazar, P. Yagüe, J. Sanchez, *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2008) 3877–3886.
- [21] U. Süsstrunk, J. Pidoux, S. Taubert, A. Ullmann, C.J. Thompson, *Molecular Microbiology* 30 (1998) 33–46.
- [22] A. Derouaux, S. Halici, H. Nothaft, T. Neutelings, G. Moutzourelis, J. Dusart, F. Titgemeyer, S. Rigali, *Journal of Bacteriology* 186 (2004) 3282.
- [23] S.E. Jones, M.A. Elliot, *Current Opinion in Microbiology* 42 (2018) 25–30.
- [24] R.E. de Lima Procópio, I.R. da Silva, M.K. Martins, J.L. de Azevedo, J.M. de Araújo, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16 (2012) 466–471.
- [25] M. Rao, Q. Li, L. Feng, X. Xia, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401(2) (2011) 699–706.
- [26] H. Lunde, *Engineering of Secondary Metabolite Production in Streptomyces*, PhD thesis, Technical University of Denmark, Kopenhag, 2017.
- [27] D. Kallifidas, G. Jiang, Y. Ding, H. Luesch, *Microbial Cell Factories* 17 (2018) 1–14.
- [28] I. Borodina, J. Siebring, J. Zhang, C.P. Smith, G. Van Keulen, L. Dijkhuizen, J. Nielsen, *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 25186–25199.

- [29] Y. Chen, M.J. Smanski, B. Shen, *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (2010) 19–25.
- [30] G. Sharon, in: **2010**.
- [31] A.L. Demain, *International Microbiology* 1 (1998) 259–264.
- [32] J. Clardy, M.A. Fischbach, *Current Biology* 19 (2007) 437–441.
- [33] L. Zaffiri, J. Gardner, L.H. Toledo-pereyra, *Journal of Investigative Surgery* 1939 (2012) 67–77.
- [34] B.D. Bhole, *Archives of Microbiology* 176 (2001) 386–390.
- [35] G.A. Quinn, A.M. Banat, A.M. Abdelhameed, I.M. Banat, *Journal of Medical Microbiology* 69 (2020) 1040–1048.
- [36] G.N. Stephanopoulos, A.A. Aristidou, J. Nielsen, in: *Metabolic Engineering*, 203–283, **1998**.
- [37] K. Gokulan, S. Khare, C. Cerniglia, *Metabolic Pathways: Production of Secondary Metabolites of Bacteria*, Second Edition, Elsevier, Amsterdam, **2014**.
- [38] B. Prapagdee, C. Kuekulvong, S. Mongkolsuk, *International Journal of Biological Sciences* 4 (2008) 330–337.
- [39] M. Oskay, *African Journal of Biotechnology* 8 (2009) 3007–3017.
- [40] N. Høiby, *Apmis* 125 (2017) 272–275.
- [41] J.K. Oberoi, T. Momin, R. Ande, N. Katkar, *The Journal of Biology and Today's World* 9 (2020) 1–8.
- [42] Ö. Altınok, Ö. Gürpınar, Ö. Eser, *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi* 1 (2018) 45–51.
- [43] İ. Gün, F.Y. Ekinci, *Gıda/The Journal of Food*, 34.3. 34 (2009) 165–173.
- [44] M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, N. Nomura, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80 (2016) 7–12.

- [45] C. Hecer, *Aydın Gastronomy* 3 (2019) 87–100.
- [46] S. Park, H. Kang, H. Jang, J. Lee, B. Koo, *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005) 2632–2641.
- [47] I.A. Sybiya Vasantha Packiavathy, P. Agilandeswari, K.S. Musthafa, S. Karutha Pandian, A. Veera Ravi, *Food Research International* 45 (2012) 85–92.
- [48] Y. Turovskiy, D. Kashtanov, B. Paskhover, M.L. Chikindas, *Advances in Applied Microbiology* 62 (2007) 191–234.
- [49] A.L. Adonizio, K. Downum, B.C. Bennett, K. Mathee, *Journal of Ethnopharmacology* 105 (2006) 427–435.
- [50] B.L. Bassler, *Current Opinion in Microbiology* 2 (1999) 582–587.
- [51] B. Köse-Mutlu, T. Ergön-Can, I. Koyuncu, C.H. Lee, *Environmental Engineering Research* 24 (2019) 543–558.
- [52] S. Nur, M. Norizan, W. Yin, K. Chan, *Sensors (Basel)*. 13 (2013) 5117–5129.
- [53] K. Tang, X.H. Zhang, *Marine Drugs* 12 (2014) 3245–3282.
- [54] J. Wang, C. Quan, X. Wang, P. Zhao, S. Fan, *Microbial Biotechnology* 4 (2011) 479–490.
- [55] İ. Karaboz, A. Sukatar, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2 (2004) 23–32.
- [56] A. Borges, M. Simões, *Marine Drugs* 17 (2019).
- [57] R. Chatterjee, M.M. Shreenivas, R. Sunil, *Frontiers in Microbiology* 9 (2019) 1–17.
- [58] A. Podbielski, B. Kreikemeyer, *International Journal of Infectious Diseases* 8 (2014) 81–95.
- [59] M.H.J. Sturme, M. Kleerebezem, J. Nakayama, A.D.L. Akkermans, E.E. Vaughan, W.M. De Vos, *Antonie Van Leeuwenhoek* 81 (2002) 233–243.

- [60] J.H. Batista, J.F. d. S. Neto, F Frontiers in Microbiology 8 (2017) 1–7.
- [61] N. Durán, G.Z. Justo, M. Durán, M. Brocchi, L. Cordi, L. Tasic, G.R. Castro, G. Nakazato, Biotechnology Advances 34 (2016) 1030–1045.
- [62] D.L. Stauff, B.L. Bassler, Journal of Bacteriology 193 (2011) 3871–3878.
- [63] K.H. Mcclean, M.K. Winson, L. Fish, A. Taylor, S.R. Chhabra, M. Camara, M. Daykin, H. John, S. Swift, B.W. Bycroft, G.S.A.B. Stewart, P. Williams, Microbiology 143 (1997) 3703–3711.
- [64] A. Borges, Marine Drugs 17 (2019) 427.
- [65] E. Açıkgoz, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi 10 (2012) 27–44.
- [66] T.B. Rasmussen, M. Givskov, International Journal of Medical Microbiology 296 (2006) 149–161.
- [67] V.C. Kalia, Biotechnology Advances 31 (2013) 224–245.
- [68] S. Küster, E., Williams, Nature 202 (1964) 928–929.
- [69] V. Chaudhari, H. Gosai, S. Raval, V. Kothari, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 7 (2014) S204–S211.
- [70] K. Leetanasaksakul, A. Thamchaipenet, Agriculture and Natural Resources 52 (2018) 228–233.
- [71] M. Prado, E.J.N.L. da Silva, T.M. Duque, A.A. Zaia, C.C.R. Ferraz, J.F.A. de Almeida, B.P.F. de Almeida Gomes, Journal of Applied Oral Science 23 (2015) 158–163.
- [72] M.T. Arias-Moliz, C.M. Ferrer-Luque, E. Espigares-Rodríguez, J. Liébana-Ureña, M. Espigares-García, Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology 106 (2008) 84–89.
- [73] Cynthia, I. Florence, S. Hery, D. Akhmad, Research Journal of Chemical and Environmental Sciences 22 (2018) 39–47.
- [74] I. Kocaçalışkan, I. Talan, I. Terzi, Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.

61 (2006) 639–642.

- [75] X. Chen, X. Zhao, Y. Deng, X. Bu, H. Ye, N. Guo, *The Journal of Antibiotics* (Tokyo) 72 (2019) 298–305.
- [76] M.H. Abd-Alla, S.R. Bashandy, *ISRN Microbiology* 2012 (2012) 1–7.
- [77] A. Purohit, A. Mohan, *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 116 (2019) 108596.
- [78] D.J. Fitzgerald, M. Stratford, M.J. Gasson, J. Ueckert, A. Bos, A. Narbad, *Journal of Applied Microbiology* 97 (2004) 104–113.
- [79] R.M. Cava-Roda, A. Taboada-Rodríguez, M.T. Valverde-Franco, F. Marín-Iniesta, *Food and Bioprocess Technology* 5 (2012) 2120–2131.
- [80] A.Y. Lehi, A. Akbari, H. Soleimani, *Membrane and Water Treatment* 6 (2015) 173–187.
- [81] J.Y. Cho, J.H. Moon, K.Y. Seong, K.H. Park, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (1998) 2273–2276.
- [82] M. Krátký, K. Konečná, J. Janoušek, M. Brablíková, O. Jand’ourek, F. Trejtnar, J. Stolaříková, J. Vinšová, *Biomolecules* 10 (2020) 1–20.
- [83] J. Cao, H. Fu, L. Gao, Y. Zheng, *Folia Microbiologica* 64 (2019) 899–906.
- [84] S. Kang, F. Kong, X. Shi, H. Han, M. Li, B. Guan, M. Yang, X. Cao, D. Tao, Y. Zheng, X. Yue, *Food Control* 108 (2020) 106876.
- [85] P. Kumar, J.H. Lee, H. Beyenal, J. Lee, *Trends in Microbiology* 28 (2020) 753–768.
- [86] M. Matsue, Y. Mori, S. Nagase, Y. Sugiyama, R. Hirano, K. Ogai, K. Ogura, S. Kurihara, S. Okamoto, *Cell Transplant.* 28 (2019) 1528–1541.
- [87] T. Fatoki, D. Sanni, D. Momodu, H. Ugboko, C. Adeseke, B. Faleye, *J. Appl. Life Sci. Int. Journal of Applied Life Sciences International* 16 (2018) 1–10.
- [88] C.M. Ferrer-Luque, M.T. Arias-Moliz, M.P. González-Rodríguez, P. Baca, *Journal*

- of Endodontics 36 (2010) 1673–1675.
- [89] C.L. He, B.D. Fu, H.Q. Shen, X.L. Jiang, X. Bin Wei, African Journal of Biotechnology 10 (2011) 2973–2977.
- [90] C.B. Huang, B. George, J.L. Ebersole, Archives of Oral Biology 55 (2010) 555–560.
- [91] M. Nicol, S. Alexandre, J.B. Luizet, M. Skogman, T. Jouenne, S.P. Salcedo, E. Dé, International Journal of Molecular Sciences 19 (2018) 1–10.
- [92] F. Dilika, P.D. Bremner, J.J.M. Meyer, Fitoterapia 71 (2000) 450–452.
- [93] S. Jubie, P.N. Ramesh, P. Dhanabal, R. Kalirajan, N. Muruganantham, A. Shanish Antony, Eur. Journal of Medicinal Chemistry 54 (2012) 931–935.
- [94] N.N. Baxi, Annals of Microbiology 63 (2013) 1471–1476.
- [95] C. Ma, N. He, Y. Zhao, D. Xia, J. Wei, W. Kang, Biotechnology and Applied Biochemistry 189 (2019) 1291–1303.
- [96] R.M. Raybaudi-Massilia, J. Mosqueda-Melgar, O. Martín-Belloso, Food Control 20 (2009) 105–112.
- [97] A. Almasoud, N. Hettiarachchy, S. Rayaprolu, D. Babu, Y.M. Kwon, A. Mauromoustakos, Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 66 (2016) 560–564.
- [98] A.M. Kwak, I.K. Lee, S.Y. Lee, B.S. Yun, H.W. Kang, Mycobiology 44 (2016) 338–342.
- [99] A.P. Desbois, V.J. Smith, Applied Microbiology and Biotechnology 85 (2010) 1629–1642.
- [100] B.T.S. Yff, K.L. Lindsey, M.B. Taylor, D.G. Erasmus, A.K. Jäger, Journal of Ethnopharmacology 79 (2002) 101–107.
- [101] J.K. Lee, K. Tatsuguchi, T. Watanabe, M. Tsutsumi, Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi) 26 (1985) 279.
- [102] V.S.M. Saegeman, N.L. Ectors, D. Lismont, B. Verduyck, J. Verhaegen, Burns

34 (2008) 205–211.

- [103] A. Borges, C. Ferreira, M.J. Saavedra, M. Simões, *Microbial Drug Resistance* 19 (2013) 256–265.
- [104] U.N. Das, *Journal of Advanced Research* 11 (2018) 57–66.
- [105] Á. Manteca, P. Yagüe, in: S. Kırmusaoğlu (Ed.), *Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, IntechOpen, Rijeka, 2019.
- [106] H.M. Kemung, L.T.H. Tan, T.M. Khan, K.G. Chan, P. Pusparajah, B.H. Goh, L.H. Lee, *Frontiers in Microbiology* 9 (2018) 1–26.

EKLER

Ek 1 – İzolatların Biyolojik Aktiviteleri

<i>Streptomyces</i> spp.	ANTİMİKROBİYAL ETKİ											
	A B i O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATC C 2592 2	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATC C 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATCC 9290	<i>S. abbaetuberculosis</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
M1												
M3												
M5												
M6												
M7												
M8												
M9												
M11												
M12												
M13												
M17												
M20												
M21												
M22												
M23			++					+++	++++	++++		
M25												
M26			++++					++++	++++	++++		
M29												

ANTİMİKROBİYAL ETKİ

<i>Streptomyces</i> spp.	A B İ O	AQS	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATC 2592 2	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATC C 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATC C 9290	<i>S. abaeetuberculosis</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
M30			++++		++++			++++	+++	++++		
M31	✓				+							
M32	✓	✓	++++		++			++++	+++	++++		
M33	✓			+++	+++		+++					
M34												
M35	✓		++		+++							
M37-A	✓		++++		+++			++++	++++	++++		
M37-B	✓		++		++			++++	++++	++++		
M39												
M40	✓		++++ +		++						+	
M41												
M42												
M46			++					+++	+++	++		
M47-E												
M50												
M55	✓			++								
M61												
M62	✓	✓	+++		++			++	++++	++		

ANTİMİKROBİYAL ETKİ

<i>Streptomyces</i> spp.	A B İ O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATC C 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATC C 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATC C 9290	<i>S. abbaetuberculosis</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
M63	✓	✓	++++		+++			+++	++++	++		
M82												
M84												
M85												
M88												
M94												
M96												
M100												
M122	✓	✓										
M124												
M140												
M153												
M154	✓		++++	++	+++	++						
M155				++				+++	++++	++++		+
M157												
1												
2												
3												

ANTİMİKROBİYAL ETKİ

<i>Streptomyces</i> spp.	A B i O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATCC 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATCC 9290	<i>S. abbaetuberculosis</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
4												
5												
6					+			+++	++++	+++		
7	✓				++			+++	++++	++		
8												
9												
10												
11								+++	++++	+++		
12	✓	✓						++++	++++	++++		
13			+++		++++	++	++	++	++++	++++	++	++
14												
15												
16					+			+	++++	+++		
17								++	++++	++++		
18												
19												
20					+	+++		++++	++++	++	++	
21												

ANTİMİKROBİYAL ETKİ

<i>Streptomyces</i> spp.	A B i O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATCC 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
22											
23											
24											
25									+++		
27											
28		✓	++					++	++++	++++	
29	✓		+++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	
32											
BB3	✓								++++		
BC											
BK			+++					+++	++++	++++	
BP											
GM											
KB	✓	✓									
MB	✓		+++		+						
OY											
AMB											
APL			+						+++		

ANTİMİKROBİYAL ETKİ

<i>Streptomyces</i> spp.	A B İ O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATC C 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATC C 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATC C 9290	<i>S. abbaetuberculosis</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
BTM												
BPB												
HAY	✓		++++		+++							
HPK												
MKG		✓	+++		+++				+++			
TBA												
TGA												
TSA	✓		++					++++	++++	++++		
KGA		✓	++++	++	++				++++			
SGA	✓		++		+			++++	++++	++++		
PAK												
STR3												
AKM												
MBO			++++		+++				++++	++++		
ÜB	✓				++			++++	++++	++++		
ÜB1												
ÜB2	✓		++		++				+++	+		
ÜB3												

ANTİMİKROBİYAL ETKİ												
<i>Streptomyces</i> spp.	A B i O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATC 2592 2	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATC C 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATCC 9290	<i>S. abaeetubas</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
ÜB5				++	++++	++		++	++	++		
ÜK1												
ÜK3												
ÜY					+				+++	+++		
ÜP			++					++++	++++	++++		
ÜG					+							
PG												
NCY					++			++	+++	+++		
NCY5												
NCY6												
NCY7												
FM												
PKC												
K8												
SY	✓	✓										
PMB	✓		++++		++							
BRD												
ANG												

ANTİMİKROBİYAL ETKİ

<i>Streptomyces</i> spp.	A B i O	A Q S	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. boydii</i> ATCC 9207	<i>S. flexneri</i> ATCC 9199	<i>S. sonnei</i> ATCC 9290	<i>S. abbaetuberculosis</i> ATCC 35640	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
--------------------------	----------------------------	----------------------	---------------------------------	------------------------------	--------------------------------	-------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------	---------------------------------	-------------------------------	---	-----------------------------------

K2

K7

K1

K3

K6

126

Ek-2 Ekstraktların kimyasal bileşimi.

BB3	KGA	M33	M63	M122
2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol
phosphoric acid	phosphoric acid	phosphoric acid	phosphoric acid	phosphoric acid
pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid
orcinol	orcinol	orcinol	orcinol	orcinol
heptadecanoic acid	heptadecanoic acid	heptadecanoic acid	heptadecanoic acid	heptadecanoic acid
arachidic acid	arachidic acid	arachidic acid	arachidic acid	arachidic acid
pyrogallol	pyrogallol	pyrogallol	pyrogallol	pyrogallol
cellobiose	cellobiose	cellobiose	cellobiose	cellobiose
benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol
myristic acid	myristic acid	myristic acid	myristic acid	myristic acid
succinic acid	succinic acid	succinic acid	succinic acid	succinic acid
lactulose	lactulose	lactulose	lactulose	lactulose
uracil	uracil	uracil	uracil	uracil
vanillin	vanillin	vanillin	vanillin	vanillin
2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid
4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine
4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid
1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione
4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid
6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid
D-lyxosylamine	D-lyxosylamine	D-lyxosylamine	D-lyxosylamine	D-lyxosylamine
2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid
lactobionic acid	3-aminopropionitrile	3-aminopropionitrile	lactobionic acid	3-aminopropionitrile
3-aminopropionitrile	leucrose	leucrose	3-aminopropionitrile	leucrose
leucrose	D-threitol	D-threitol	leucrose	D-threitol
D-threitol	L-(-)-fucose	L-(-)-fucose	D-threitol	L-(-)-fucose
L-(-)-fucose	5-hydroxyindole-3-acetic acid	5-hydroxyindole-3-acetic acid	L-(-)-fucose	5-hydroxyindole-3-acetic acid
5-hydroxyindole-3-acetic acid	maltotriose	maltotriose	5-hydroxyindole-3-acetic acid	maltotriose
maltotriose	adipic acid	adipic acid	maltotriose	adipic acid
adipic acid	benzoic acid	benzoic acid	adipic acid	benzoic acid
benzoic acid	D-glucose	D-glucose	benzoic acid	D-glucose
D-glucose	1-hexadecanol	1-hexadecanol	D-glucose	1-hexadecanol
1-hexadecanol	N-methylglutamic acid	N-methylglutamic acid	1-hexadecanol	N-methylglutamic acid
N-methylglutamic acid	tagatose	tagatose	N-methylglutamic acid	tagatose
tagatose	2,3-dihydroxypyridine	2,3-dihydroxypyridine	tagatose	2,3-dihydroxypyridine
2,3-dihydroxypyridine	salicylic acid	salicylic acid	2,3-dihydroxypyridine	salicylic acid

BB3	KGA	M33	M63	M122
salicylic acid	phloroglucinol	phloroglucinol	salicylic acid	phloroglucinol
phloroglucinol	maltotriitol	maltotriitol	phloroglucinol	maltotriitol
maltotriitol	gallic acid	gallic acid	maltotriitol	gallic acid
gallic acid	lauric acid	lauric acid	gallic acid	lauric acid
lauric acid	1,3-diaminopropane	1,3-diaminopropane	lauric acid	1,3-diaminopropane
1,3-diaminopropane	isomaltose	isomaltose	1,3-diaminopropane	isomaltose
isomaltose	glyceric acid	glyceric acid	isomaltose	glyceric acid
glyceric acid	threose	threose	glyceric acid	threose
threose	melibiose	melibiose	threose	melibiose
melibiose	neohesperidin	neohesperidin	melibiose	neohesperidin
neohesperidin	maleic acid	maleic acid	neohesperidin	maleic acid
maleic acid	fumaric acid	fumaric acid	maleic acid	fumaric acid
fumaric acid	palmitoleic acid	palmitoleic acid	fumaric acid	palmitoleic acid
palmitoleic acid	oleic acid	galacturonic acid	palmitoleic acid	oleic acid
galacturonic acid	galacturonic acid	D-allose	oleic acid	galacturonic acid
D-allose	D-allose	3-methyl-2-oxobutanoic acid	galacturonic acid	D-allose
3-methyl-2-oxobutanoic acid	3-methyl-2-oxobutanoic acid	squalene	D-allose	3-methyl-2-oxobutanoic acid
squalene	squalene	stearic acid	3-methyl-2-oxobutanoic acid	squalene
stearic acid	stearic acid	norepinephrine (noradrenalin)	squalene	stearic acid
norepinephrine (noradrenalin)	norepinephrine (noradrenalin)	L-serine	stearic acid	norepinephrine (noradrenalin)
L-serine	L-serine	Sucrose	norepinephrine (noradrenalin)	L-serine
Sucrose	Sucrose	testosterone	L-serine	Sucrose
testosterone	testosterone	2-aminoethanethiol	Sucrose	testosterone
2-aminoethanethiol	2-aminoethanethiol	adenosine	testosterone	2-aminoethanethiol
adenosine	adenosine	maltose	2-aminoethanethiol	adenosine
maltose	maltose	2'-deoxycytidine	adenosine	maltose
2'-deoxycytidine	2'-deoxycytidine	porphine	maltose	2'-deoxycytidine
porphine	porphine	N-acetyl-L-glutamic acid	2'-deoxycytidine	porphine
N-methylanthranilic acid	N-methylanthranilic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid	porphine	N-methylanthranilic acid
N-acetyl-L-glutamic acid	N-acetyl-L-glutamic acid	gluconic acid lactone	N-methylanthranilic acid	N-acetyl-L-glutamic acid
3,4-dihydroxybenzoic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid	L-pyroglutamic acid	N-acetyl-L-glutamic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid
gluconic acid lactone	gluconic acid lactone	D-(+) trehalose	3,4-dihydroxybenzoic acid	gluconic acid lactone
L-pyroglutamic acid	L-pyroglutamic acid	10-hydroxydecanoic acid	gluconic acid lactone	L-pyroglutamic acid
D-(+) trehalose	D-(+) trehalose	DL-glyceraldehyde	L-pyroglutamic acid	D-(+) trehalose
10-hydroxydecanoic acid	10-hydroxydecanoic acid	glycerol	D-(+) trehalose	10-hydroxydecanoic acid
DL-glyceraldehyde	DL-glyceraldehyde	epsilon-caprolactam	10-hydroxydecanoic acid	DL-glyceraldehyde

BB3	KGA	M33	M63	M122
glycerol	glycerol	hydroquinone	DL-glyceraldehyde	glycerol
epsilon-caprolactam	epsilon-caprolactam	3-indoleacetic acid	glycerol	epsilon-caprolactam
hydroquinone	hydroquinone	ribitol	epsilon-caprolactam	hydroquinone
3-indoleacetic acid	3-indoleacetic acid	acetol	hydroquinone	3-indoleacetic acid
ribitol	ribitol	lactose	3-indoleacetic acid	ribitol
acetol	acetol	malonic acid	ribitol	acetol
lactose	lactose	2-hydroxypyridine	acetol	lactose
malonic acid	malonic acid	D-(+)-melezitose	lactose	malonic acid
2-hydroxypyridine	2-hydroxypyridine	3-indolelactic acid	malonic acid	2-hydroxypyridine
D-(+)-melezitose	D-(+)-melezitose	DL-p-hydroxyphenyllactic acid	2-hydroxypyridine	D-(+)-melezitose
D-malic acid	D-malic acid	arabitol	D-(+)-melezitose	D-malic acid
3-indolelactic acid	3-indolelactic acid	lactamide	D-malic acid	3-indolelactic acid
DL-p-hydroxyphenyllactic acid	DL-p-hydroxyphenyllactic acid	oxalic acid	3-indolelactic acid	DL-p-hydroxyphenyllactic acid
arabitol	arabitol	4-aminobenzoic acid	DL-p-hydroxyphenyllactic acid	arabitol
lactamide	oxalic acid	palmitic acid	arabitol	lactamide
oxalic acid	4-aminobenzoic acid	ribose	lactamide	oxalic acid
4-aminobenzoic acid	palmitic acid	Glycine	oxalic acid	4-aminobenzoic acid
palmitic acid	ribose	Tryptophane	4-aminobenzoic acid	palmitic acid
ribose	Glycine		palmitic acid	ribose
Glycine	Tryptophane		ribose	Glycine
Tryptophane			Glycine	Tryptophane
			Tryptophane	

M154	MKG	13	29
2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol	2-amino-1-phenylethanol
phosphoric acid	phosphoric acid	phosphoric acid	phosphoric acid
pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid	pyridine-2,6-dicarboxylic acid
orcinol	orcinol	orcinol	orcinol
heptadecanoic acid	heptadecanoic acid	heptadecanoic acid	heptadecanoic acid
arachidic acid	arachidic acid	arachidic acid	arachidic acid
pyrogallol	pyrogallol	pyrogallol	pyrogallol
cellobiose	cellobiose	cellobiose	cellobiose
benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol	benzene-1,2,4-triol
myristic acid	myristic acid	myristic acid	myristic acid
succinic acid	succinic acid	succinic acid	succinic acid
lactulose	lactulose	lactulose	lactulose
uracil	uracil	uracil	uracil
vanillin	vanillin	vanillin	vanillin

M154	MKG	13	29
2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid	2-hydroxyphenylacetic acid
4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine	4-hydroxypyridine
4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid	4-hydroxyphenylacetic acid
1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione	1,2-cyclohexanedione
4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid	4-hydroxybenzoic acid
6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid	6-hydroxy caproic acid
D-lyxosylamine	D-lyxosylamine	D-lyxosylamine	D-lyxosylamine
2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid	2-keto-L-gulonic acid
lactobionic acid	lactobionic acid	3-aminopropionitrile	lactobionic acid
3-aminopropionitrile	3-aminopropionitrile	leucrose	3-aminopropionitrile
leucrose	leucrose	D-threitol	leucrose
D-threitol	D-threitol	L(-)-fucose	D-threitol
L(-)-fucose	L(-)-fucose	5-hydroxyindole-3-acetic acid	L(-)-fucose
5-hydroxyindole-3-acetic acid	5-hydroxyindole-3-acetic acid	maltotriose	5-hydroxyindole-3-acetic acid
maltotriose	maltotriose	adipic acid	maltotriose
adipic acid	adipic acid	benzoic acid	adipic acid
benzoic acid	benzoic acid	D-glucose	benzoic acid
D-glucose	D-glucose	1-hexadecanol	D-glucose
1-hexadecanol	1-hexadecanol	N-methylglutamic acid	1-hexadecanol
N-methylglutamic acid	N-methylglutamic acid	tagatose	N-methylglutamic acid
tagatose	tagatose	2,3-dihydroxypyridine	tagatose
2,3-dihydroxypyridine	2,3-dihydroxypyridine	salicylic acid	2,3-dihydroxypyridine
salicylic acid	salicylic acid	phloroglucinol	salicylic acid
phloroglucinol	phloroglucinol	maltotriitol	phloroglucinol
maltotriitol	maltotriitol	gallic acid	maltotriitol
gallic acid	gallic acid	lauric acid	gallic acid
lauric acid	lauric acid	1,3-diaminopropane	lauric acid
1,3-diaminopropane	1,3-diaminopropane	isomaltose	1,3-diaminopropane
isomaltose	isomaltose	glyceric acid	isomaltose
glyceric acid	glyceric acid	threose	glyceric acid
threose	threose	melibiose	threose
melibiose	melibiose	neohesperidin	melibiose
neohesperidin	neohesperidin	maleic acid	neohesperidin
maleic acid	maleic acid	fumaric acid	maleic acid
fumaric acid	fumaric acid	palmitoleic acid	fumaric acid

M154	MKG	13	29
palmitoleic acid	palmitoleic acid	oleic acid	palmitoleic acid
oleic acid	oleic acid	galacturonic acid	oleic acid
galacturonic acid	galacturonic acid	D-allose	galacturonic acid
D-allose	D-allose	3-methyl-2-oxobutanoic acid	D-allose
3-methyl-2-oxobutanoic acid	3-methyl-2-oxobutanoic acid	squalene	3-methyl-2-oxobutanoic acid
squalene	squalene	stearic acid	squalene
stearic acid	stearic acid	norepinephrine (noradrenalin)	stearic acid
norepinephrine (noradrenalin)	norepinephrine (noradrenalin)	L-serine	norepinephrine (noradrenalin)
L-serine	L-serine	Sucrose	L-serine
Sucrose	Sucrose	testosterone	Sucrose
testosterone	testosterone	2-aminoethanethiol	testosterone
2-aminoethanethiol	2-aminoethanethiol	adenosine	2-aminoethanethiol
adenosine	adenosine	maltose	adenosine
maltose	maltose	2'-deoxycytidine	maltose
2'-deoxycytidine	2'-deoxycytidine	porphine	porphine
porphine	porphine	N-acetyl-L-glutamic acid	N-methylanthranilic acid
N-methylanthranilic acid	N-methylanthranilic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid	N-acetyl-L-glutamic acid
N-acetyl-L-glutamic acid	N-acetyl-L-glutamic acid	gluconic acid lactone	3,4-dihydroxybenzoic acid
3,4-dihydroxybenzoic acid	3,4-dihydroxybenzoic acid	L-pyroglutamic acid	gluconic acid lactone
gluconic acid lactone	gluconic acid lactone	D-(+) trehalose	L-pyroglutamic acid
L-pyroglutamic acid	L-pyroglutamic acid	10-hydroxydecanoic acid	D-(+) trehalose
D-(+) trehalose	D-(+) trehalose	DL-glyceraldehyde	10-hydroxydecanoic acid
10-hydroxydecanoic acid	10-hydroxydecanoic acid	glycerol	DL-glyceraldehyde
DL-glyceraldehyde	DL-glyceraldehyde	epsilon-caprolactam	glycerol
glycerol	glycerol	hydroquinone	epsilon-caprolactam
epsilon-caprolactam	epsilon-caprolactam	3-indoleacetic acid	hydroquinone
hydroquinone	hydroquinone	ribitol	3-indoleacetic acid
3-indoleacetic acid	3-indoleacetic acid	acetol	ribitol
ribitol	ribitol	lactose	acetol
acetol	acetol	malonic acid	lactose
lactose	lactose	2-hydroxypyridine	malonic acid
malonic acid	malonic acid	D-(+)-melezitose	2-hydroxypyridine
2-hydroxypyridine	2-hydroxypyridine	D-malic acid	D-(+)-melezitose
D-(+)-melezitose	D-(+)-melezitose	3-indolelactic acid	D-malic acid
D-malic acid	D-malic acid	DL-p-hydroxyphenyllactic acid	3-indolelactic acid
3-indolelactic acid	3-indolelactic acid	arabitol	DL-p-hydroxyphenyllactic acid
DL-p-hydroxyphenyllactic acid	DL-p-hydroxyphenyllactic acid	lactamide	arabitol
arabitol	arabitol	4-aminobenzoic acid	lactamide
lactamide	lactamide	palmitic acid	oxalic acid
oxalic acid	oxalic acid	ribose	4-aminobenzoic acid
4-aminobenzoic acid	palmitic acid	Glycine	palmitic acid
palmitic acid	ribose	Tryptophane	ribose
ribose	Tryptophane		Glycine
Glycine			Tryptophane
Tryptophane			

