

## Topraktan İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Madde Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Yasemin BAŞKAYA

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, K.Ö. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman

Aytaç KOCABAŞ\*

Geliş (Received) : 20.05.2016

Kabul (Accepted) : 27.06.2016

**ÖZET:** Mevcut ticari antibiyotiklerin çoğunluğu mikroorganizma kökenlidir ve ilaç endüstrisinin en önemli alanlarından bir tanesi antibiyotik üretimidir. Ancak, antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı ve çoklu ilaç dirençliliği kazanmış patojen mikroorganizmalar sebebiyle, tüm Dünya’da, antibiyotik dirençliliği ana problemlerden birisi olmuştur. Dolayısıyla, yeni ve etkili antimikrobiyal maddelerin bulunması zorunlu hale gelmiştir. Toprak mikroorganizmalarının çeşitliliği bu amaç için geniş bir kaynak sunmaktadır. Bu çalışmada, topraktan antimikrobiyal metabolit üretme kapasitesine sahip mikroorganizmalar izolasyonlarının gerçekleştirilmesi ve sonra izolatların sıvı kültürde antimikrobiyal üretim kapasiteleri disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu yöntemleriyle test mikroorganizmalar üzerinde belirlenmesi hedeflenmiştir. İlk aşamada izole edilen 172 mikroorganizmadan çapraz çizgi metodu testi sonucunda % 35’inin etkin antimikrobiyal metabolit ürettiği tespit edilmiştir. Bunlar arasından 2 tane ascomycota ailesine ait küfün geniş spektruma sahip antibakteriyel madde ürettiği tespit edilmiştir. Küflerin üretim profilleri çıkarıldığında 8 ila 15. gün süresince antimikrobiyal maddenin etkinliğinin fazla olduğu tespit edilmiştir. En geniş inhibisyon zonu *K. pneumoniae*’ya karşı elde edilmiştir (26mm).  
**Anahtar Kelimeler:** Toprak Mikroorganizmaları, Antimikrobiyal Aktivite, Antimikrobiyal dirençlilik, Disk difüzyon yöntemi, Çapraz çizgi yöntemi

### Determination of Antimicrobial Substance Production Potentials of Soil Isolate Microorganisms

**ABSTRACT:** Most of the available commercial antibiotics are originated from microorganisms and one of the most important area of pharmaceutical industry is antibiotic production. On the other hand, because of improper usage of antibiotics and multidrug resistance pathogen microorganisms, antibiotic resistance becomes one of the main problems all over the world. Therefore, investigating a new and efficient antimicrobial chemicals becomes obligatory. Diversity of soil microorganisms offers a great resource for this purpose. Objective of this study was to insulate s number of microorganisms from soil that have a potential for antimicrobial metabolite production and to determine antimicrobial production capacities of these isolates on test microorganisms by disk diffusion and minimum inhibition concentration methods. It was determined by the cross-streak plate methods that % 35 of the 172 microorganisms isolated from the preliminary screening can produce efficient antimicrobial metabolite. Among these, 2 fungi belonging to Ascomycota family was detected producing wide spectrum antibacterial chemicals. After obtaining production profiles of fungi, it was detected that antimicrobial chemical activity was high through 8. and 15. days. The maximum inhibition zone was observed against *K. pneumoniae* (26mm).

**Keywords:** Soil microorganisms, Antimicrobial activity, Antimicrobial resistance, Disk diffusion method, Cross-streak method

### GİRİŞ

Mikroorganizmalar denizlerin en derin kısmından gökyüzünün en üst tabakalarına kadar geniş bir alana yayılmış durumdadırlar. Bu alanlardan birisi olan toprak mikroorganizmaların yaşamı için gerekli olan su, hava, oksijen, mineral madde, karbon ve azot kaynağı bulundurmaktadır (Yıldırım, 2004). Toprak, karmaşık ve dinamik bir biyolojik sistemdir. Bir gram toprakta bulunan bakteri sayısı 10 milyar ve tür sayısının binlerce olabileceği tahmin edilmektedir (Torsvik ve Ovreas, 2002). Toprak çeşitliliğinin belirlenebilmesi için bireysel çalışmaların yanında (Roesch ve ark., 2007) Dünya çapında projeler de yürütülmektedir (Gilbert ve ark., 2014). Gelişen teknoloji ile birlikte mikroorganizmalar laboratuvar ortamında kültüre edilmeden varlıkları 16S rRNA ve 18S rRNA yeni nesil sekanslama metagenomik çalışmalarıyla tespit edilebilmektedir. Yeni nesil sekanslama teknolojileri

kullanılarak elde edilen analizler sonucunda hesaplanan en yüksek sayı 8.3 milyon’dur (Gans ve ark., 2005). Toprağın fizikokimyasal yapısı, iklim değişiklikleri ve tarımsal uygulamalar bakteri dağılımını ve çeşitliliğini önemli ölçüde etkilemektedir (Nannipieri ve ark., 2003; Roesch ve ark., 2007, Torsvik ve Ovreas, 2002). Bu dağılım ve çeşitlilik, biyoteknolojik uygulamalar için çok geniş bir kaynak sunmaktadır.

Toprak, *in vitro* koşullarla kıyaslandığında besin ve enerji kaynakları bakımından mikroorganizmalar için genel olarak fakir ve sınırlıdır (Nannipieri ve ark., 2003). Bunun yanında hem mikroorganizma sayısının fazla olması hem de çeşitlilikten kaynaklı olarak mikroorganizmalar arasında bir rekabet gelişir. Bu rekabette mikroorganizmalar yaşam için avantaj sağlamak amacıyla ürettikleri toksik maddeleri kullanarak kendileri için daha geniş alan, organik madde, su gibi faktörlere sahip olmaya çalışırlar. Bu

\*Sorumlu Yazar : Kocabas, A. aytackocabas@gmail.com

durum araştırmacıların yeni antimikrobiyallerin keşfedilmesi için toprağı seçip, analiz etmelerinin bir sebebidir (Yıldırım, 2004).

Yarım asırdan fazla zamandır hayatımızda olan antibiyotikler insan, hayvan ve bitki yaşamına katkı sağlamış ve ölümcül pek çok enfeksiyonel hastalığının tedavisini olanaklı kılmıştır. Ancak insanlık tarihinin en önemli buluşlarından olan antibiyotiklerin uygunsuz, gereksiz ve bilinçsiz kullanımları sonucu gelişen direnç sebebiyle antibiyotikler günümüzde etkilerini önemli oranda kaybetmişlerdir (Öztürk, 2008; Serpi ve ark., 2012). Antimikrobiyal dirençlilikten Amerika ve Avrupa'da yılda yaklaşık 50000 insan ölmektedir ve bu sayı tüm Dünya genelinde 700000 civarındadır. Antibiyotik dirençlilik problemi kontrol edilemezse 2050 yılında yılda 10 milyon insanın ölebileceği tahmin edilmektedir (British Report, 2016a). Bunun yanında aynı türe ait dirençli mikroorganizmanın sebep olduğu hastalığın tedavisi için yapılan harcamalar çok daha fazla olmaktadır ve önlenemezse sadece tedavi için harcamalar değil üretim diğer sağlık sorunları ile ilgili tedavilerde de buna bağlı olarak harcamalar artacaktır. Antimikrobiyal dirençliliğin sebep olacağı ekonomik kayıp 2050 yılı için 100 trilyon Amerikan doları olarak öngörülmektedir ve bu kaybın içerisine tedavi için yapılacak harcamalar dahil edilmemiştir (British Report, 2016b). Dolayısıyla, patojen organizmaların direnç kazanması ile antibiyotiklerin aktivitelerinin bu mikroorganizmalara karşı araştırılması, yeni ve etkili antimikrobiyal maddelerin elde edilmesini zorunlu hale getirmiştir (Çetin 2012). Özellikle 1988'lerden bu yana vankomisin dirençli Enterokokların (VRE) ortaya çıkışı, metisilin ve vankomisin dirençli *S. aureus* (MRSA/VRSA) suşları, buna ek olarak bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan virüs (HIV/AIDS), influenza virüs alttipi H1N1 veya H5N1 kaynaklı influenza salgınları, alt solunum yolu enfeksiyonları, ishal, dirençli bakterilerin sebep olduğu sepsis ve yoğun bakım ünitelerinde gözlenen hastane enfeksiyonları gibi yeni patojenlerin ortaya çıkması doğal antimikrobiyal ürünlerin önemini tüm Dünya'da artırmaktadır (Karaaslan, 2013; Martinez ve ark., 2004; Rondon ve ark., 2000). Yeni hastalıkların ortaya çıkması, dirençli patojen mikroorganizma miktarında ve kullanılan bileşiklerin toksisitesindeki artış nedeniyle kesinlikle yeni mikrobiyal metabolitlere ve farklı stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Demain, 1998; Ökmen ve Uğur, 2011). Yaşanan bu olaylar günümüzde antibiyotik direncinin halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturduğunu ve gelecekte de oluşturmaya devam edeceğini göstermektedir. Bu yüzden yeni antimikrobiyal ürünlerin araştırılması kimyacılar, mikrobiyologlar ve farmakologların ilgilendiği temel konuların başında gelmektedir (Balkar, 2010).

Son yirmi yılda, kullanımda olan antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, ikili antibiyotik dirençli birçok mikroorganizma klinik olarak izole edilip denendiğinde, bunlara tek yönlü antibiyotiklerin etkisinin yeterli olmadığı görülmüştür. Antibiyotiklere direnç kazanmış

mikrobiyal patojenleri kontrol altına almak için, farmakolojik olarak aktif, yeni bileşiklerin bulunması gerekmektedir. Bunun için etki alanı daha geniş ve daha güçlü antibiyotik üreten yeni mikroorganizma suşlarının araştırılıp incelenmesi önem kazanmaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Bu çalışmada farklı alanlardan toprak örnekleri alınarak buradan izole edilen mikroorganizmaların, sıvı kültürde antimikrobiyal üretim kapasiteleri disk difüzyon ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) metoduyla patojen mikroorganizmalar üzerinde denerek mikroorganizmaların antimikrobiyal madde üretim kapasitelerinin ve etkilerinin belirlenmesi böylece yeni ve doğal antimikrobiyal madde bulunması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Toprak örneği toplanması ve birincil tarama

Toprak örnekleri Karaman ili üniversite yerleşkesinden ve farklı mevsimsel koşullarda toplanmıştır. Toplanan örneklerden 10 g'ı 20 mL % 0.9 NaCl izotonik çözeltide 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra toprağın çökmesi beklenmiş ve süpernatant kısmı ayrılmıştır. Önceden hazırlanan beş farklı katı besiyerine (Nutrient Agar, LB Broth Agar, Actinomyceete Isolation Agar, Potato Dextrose Agar ve Sabouraud-2 % Glucose Agar) 100 µL örnekler her bir örnek için üç paralel olacak şekilde yayma ekimleri yapılarak farklı sıcaklıklarda (28 °C, 35 °C, 50 °C) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, etrafında temiz alan oluşturan mikroorganizmalar saflaştırıldı ve +4 °C de diğer işlemlerin uygulanması için saklandı.

### İkincil tarama

Antimikrobiyal aktivite tayini için *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* 0157: H7 ATCC 43897, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Klebsiella pneumoniae* test mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Birincil tarama sonrası izole edilen toprak mikroorganizmalarının antimikrobiyal aktivitelerinin taraması, test mikroorganizmaları kullanılarak çapraz çizgi metodu ile belirlenmiştir. Mikroorganizmaların gelişimi için petri plakları farklı sıcaklıklarda (28 °C, 35 °C) inkübasyona tabi tutuldu (Fleming, 1922). İnkübasyon sonunda inhibisyon zonu oluşturan mikroorganizmalar seçilmiştir.

### Antimikrobiyal aktivite tayini

Çapraz çizgi yöntemi (ikincil tarama) sonrası seçilen mikroorganizmalar antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi (CLSI, 2006) ile belirlenmesi amacıyla fermantasyon besiyeri ortamında çoğaltılmıştır. Fermantasyon besiyeri ortamının içeriği (g L<sup>-1</sup>): 10 g D(+) Glucose, 5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g NaCl, 0.5 g mısır şurubu. İnkübasyon çalkalamalı etüvde 35 °C, 175 devir dakika<sup>-1</sup> 15 gün boyunca

gerçekleştirildi. Fermantasyon kültür ortamından 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 ve 15. gün besiyeri örnekleri alınarak 4°C ve 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant kısımları disk difüzyon metodu için kullanılmıştır (CLSI, 2006). En yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren mikroorganizmalar seçilmiş ve MİK değerleri test mikroorganizmalar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için antimikrobiyal etkilerinin en yüksek olduğu günde fermantasyon ortamından alınan besiyeri örneklerinin 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 ve 0.05 konsantrasyonları hazırlanmıştır ve inkübasyon hem gözlem yoluyla hem de 660 nm'de absorbans değerleri ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir (Andrews, 2001).

### BULGULAR

Toprak örneklerinin inkübasyonları sonrası birincil tarama ile 172 mikroorganizma antimikrobiyal üretme potansiyelleri olması sebebiyle tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların seçilimi, etraflarında diğer mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyerek temiz alan oluşturmaları (inhibisyon zonu) ya da saçılımlar yaparak diğer alanları işgal etmelerine bağlı olarak yapılmıştır. Belirlenen bu 172 mikroorganizma ile ikincil tarama (çapraz çizgi yöntemi) gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizmalar çapraz çizgi metodu ile test mikroorganizmalarına karşı denendiğinde ortaya çıkan inhibisyon zonları, 60 farklı izolatın test mikroorganizmalarına karşı etkili antimikrobiyal bir madde ürettiğini göstermiştir (Çizelge 1). Elde edilen bulgulara göre; 60 farklı toprak mikroorganizmasının % 35'i Gram pozitif endospor oluşturan *B. subtilis*'e karşı etki gösterirken, % 7'si bir gıda patojeni olan *E.coli* 0157: H7 ATCC 43897'ye karşı etkili olmuştur.

Çizelge 1. Çapraz çizgi test sonuçları

	Etkili izolat sayısı	Etkilenme oranı (%)	
Test Mikroorganizmaları	<i>B. subtilis</i>	21	35
	<i>B. licheniformis</i>	15	25
	<i>A.tumefaciens</i>	3	5
	<i>K. pneumoniae</i>	10	17
	<i>S. aureus</i>	2	3
	<i>S. Enteritidis</i>	2	3
	<i>P. vulgaris</i>	6	10
	<i>E. faecalis</i>	6	10
	<i>E. coli</i> 0157: H7	4	7

Yine bitki patojenlerinden olan *A. tumefaciens*'e karşı % 5'inin etki ettiği belirlenmiştir. Toplamda çapraz çizgi sonucuna göre 172 farklı mikroorganizmadan % 35'inin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çapraz çizgi metodu ile test edilen 60 mikroorganizma arasından 15 tanesi (9 bakteri ve 6 küf) disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin

tespiti için seçilmiştir. Bu 15 mikroorganizma arasından 2 ve 6 numaralı küflerin daha geniş spektrumda etki gösterdikleri belirlenmiştir. Seçilen bu mikroorganizmalar sıvı kültüre alınmış, farklı günlerde disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri takip edilmiştir (Çizelge 2). Antimikrobiyal etkinin 5. günden sonra başladığı tespit edilmiştir ve test mikroorganizmalarına karşı genel olarak en etkili oldukları gün olarak 8. gün belirlenmiştir (Çizelge 2). Zon çapları 9mm'den 26mm'ye kadar değişmektedir.

Çizelge 2. İzolatların disk difüzyon test sonuçları (mm)

	Fermantasyon Süresi (Gün)						
	İzolat 2			İzolat 6			
	5	8	15	5	8	15	
Test Mikroorganizmaları	<i>B. subtilis</i>	15	17	17	14	15	14
	<i>B. licheniformis</i>	12	13	14	10	12	9
	<i>A.tumefaciens</i>	14	13	20	13	13	13
	<i>K. pneumoniae</i>	12	23	9	10	26	-
	<i>S. aureus</i>	12	12	15	12	12	9
	<i>S. Enteritidis</i>	11	12	13	12	12	9
	<i>P. vulgaris</i>	12	12	9	10	14	9
	<i>E. faecalis</i>	10	11	14	9	11	11
	<i>E. coli</i> 0157: H7	-	-	-	-	-	-

- : Disk etrafında inhibisyon zonu yok

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmalarının standart antibiyotiklere karşı oluşturduğu inhibisyon zonları Çizelge 3'te verilmiştir. Test mikroorganizmalarından, kullanılan antibiyotiklere karşı en yüksek çoklu direnç gösteren grubun *E. coli* 0157: H7 ATCC 43897 olduğu görülürken, antibiyotiklere duyarlılığı en yüksek olan kültürün ise *S. aureus* ATCC 29213 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3'te görüldüğü gibi; gentamisin ve tetrasikline karşı hiçbir mikroorganizmada dirençlilik gözlenmezken, penisiline karşı bazı test mikroorganizmalarında direnç tespit edilmiştir.

Disk difüzyon metodu ile elde edilen sonuçlara bakılarak 2 ve 6 numaralı küfler MİK değerlerinin tespiti için seçilmiştir. Her iki küf için, gözlem yoluyla ve elde edilen absorbans sonuçlarına göre üremenin belirgin bir biçimde inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu olan 0.05 değeri minimum inhibitör konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir.

İzolatlardan 2 ve 6 numaralılar PDA besiyerinde büyütülerek, metilen mavisi ile basit boyama yapılarak incelendiğinde; her ikisinin de spor yapılarının, eşeyli çoğalma ile ve askokarp adı verilen bir kese içinde oluşan askosporlara benzediğinden *Ascomycetes* üyeleri oldukları tespit edilmiştir.

2 ve 6 numaralı küf izolatlarının patojen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal madde üretimi Şekil 1'de verilmiştir.

Çizelge 3. Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zonu (mm)

		Antibiyotikler		
		PenisilinG 10 ünite <sup>1</sup>	Gentamisin 10µg	Tetrasiklin 30µg
Test Mikroorganizmaları	<i>B. subtilis</i>	36	28	25
	<i>B.licheniformis</i>	29	20	27
	<i>A. tumefaciens</i>	-	19	28
	<i>K.pneumoniae</i>	-	19	13
	<i>S. aureus</i>	24	18	31
	<i>S. Enteritidis</i>	30	17	29
	<i>P.vulgaris</i>	-	19	13
	<i>E.faecalis</i>	22	11	14
	<i>E. coli</i> 0157	-	16	32

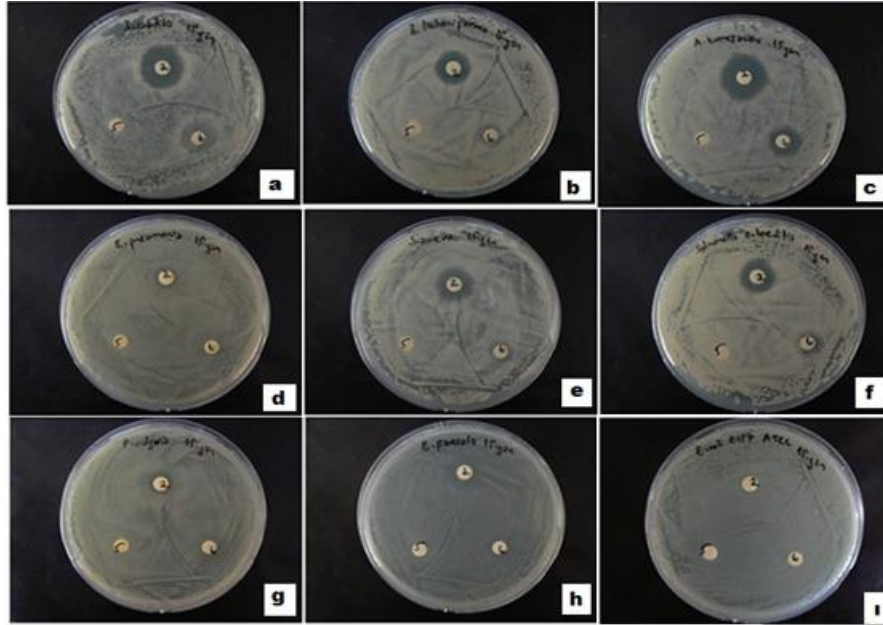
-: İnhibisyon zonu yok

<sup>1</sup>ünite: İkinci uluslararası standartlara göre 0,0005988 mg penisilinün gösterdiği aktivite olarak tanımlanmıştır.

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Alınan toprak örnekleri ile, geniş bir zaman aralığında canlılığını devam ettirebilen ve hem çevre şartlarına dirençli hem de diğer rakip mikroorganizmalar karşısında etkili mücadele eden mikroorganizmaların taranması hedeflenmiş ve geniş spektruma sahip antimikrobiyal bir madde bulma şansı artırılmıştır.

Toprak örnekleri farklı mevsimsel koşullar göz önünde bulundurularak toplanmıştır çünkü değişen iklim koşulları mikrobiyal dağılımı etkilemekte ve değiştirmektedir (Nannipieri ve ark., 2003; Torsvik ve Ovreas, 2002). Örnekler, besiyerlerinde inkübasyona bırakıldıklarında, çoğalan mikroorganizmaların hayatta kalma şanslarını artırmak için farklı avantajlar (hızlı çoğalma, yayılma, antimikrobiyal madde üretme gibi) gösterdikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 1. 2 ve 6 numaralı mikroorganizmaların dokuz farklı patojene karşı antimikrobiyal aktiviteleri. a. *Bacillus subtilis*, b. *Bacillus licheniformis*, c. *Agrobacterium tumefaciens*, d. *Klebsiella pneumoniae*, e. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, f. *Salmonella Enteritidis*, g. *Proteus vulgaris*, h. *Enterococcus faecalis*, ı. *Escherichia coli* 0157: H7 ATCC 43897.

Genel olarak etrafında temiz alan oluşturabilen mikroorganizmaların antimikrobiyal madde üretme kapasiteleri göz önüne alınarak, 172 mikroorganizma birincil tarama sonrası seçilmiştir. İkincil tarama olarak çapraz çizgi yöntemi, disk difüzyon yöntemine kıyasla daha hızlı olması sebebiyle tercih edilmiştir. İkincil tarama sonrası 60 mikroorganizmanın en az bir test mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Altmış mikroorganizmadan %18'inin *B. subtilis*'e karşı etkili olduğu bulunmuştur. Buna karşılık *E. coli* O157:H7'ye karşı etkili olan mikroorganizma sayısı % 7 civarında kalmıştır. Bunun sebebi *B. subtilis*'in doğal

toprak mikroorganizması olması (Roesch, 2007) ve test için kullanılan *E. coli*'nin hem gıda patojeni olması hem de antibiyotik dirençliliği bulunan bir mikroorganizma olmasıdır (Çizelge 3). Dolayısıyla toprakta bir mikroorganizmanın *B. subtilis* ile rakip olma oranı *E. coli* ile rakip olma oranından daha yüksektir ve elde ettiğimiz bu fark bunun bir sonucu olarak kabul edilebilir.

Yapılan testler sonucunda en geniş spektruma sahip (birden fazla mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki gösterebilen) ve en fazla inhibisyon alanı (açık alan) oluşturan iki mikroorganizma seçilmiştir (2 ve 6 numaralı küfler). Bu aşamada öncelikle açık alan



oluşumlarına, daha sonra farklı mikroorganizma gruplarına etki etmelerine bakılarak seçim yapılmıştır. Seçilen mikroorganizmaların küf olmaları şaşırtıcı değildir. Genel olarak elde edilen antimikrobiyal maddelerin ya küfler tarafından ya da bakteriler arasında en çok aktinomisetler arasından olduğu bilinmektedir (Valli 2012, Chaudhary 2013). Her iki küfe ait antimikrobiyal madde etkinliğine ait çalışma, küflerin sıvı kültüre ekimleri yapılarak ve farklı günlerde ortamdan alınan örneklerin disk difüzyon testi sonucu oluşturduğu inhibisyon zonlarına bakılarak gerçekleştirilmiştir. Beklendiği gibi ilk günlerde antimikrobiyal aktivite gözlemlenmemiş ve 5. günden itibaren antimikrobiyal maddenin aktivitesi artmaya başlamıştır. En etkin mikrobiyal aktivite 8. gün gözlemlenmiştir.

Test mikroorganizmaları standart antibiyotik olarak kullanılan penisilin, tetrasiklin ve gentamisine karşı dirençlerine ilişkin bilgileri Çizelge 3'te verilmiştir. Buradan elde edilen veriler 2 ve 6 numaralı küflerin ürettiği antimikrobiyal maddenin kullanılan 3 standart antibiyotikten farklı olabileceğini göstermektedir. *A. tumefaciens*, *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* penisiline karşı dirençliyen küflerden elde edilen antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Buna ek olarak, *E. coli* tetrasiklin ve gentamisine karşı duyarlı iken küflerden elde edilen antimikrobiyal maddeye karşı direnç göstermiştir.

2 ve 6 numaralı izolatların etkili oldukları dokuz test mikroorganizmasına karşı uygulanan MİK deneyinde, gözlem yoluyla ve 660 nm'de ölçülen absorbans sonuçlarına göre üremenin belirgin bir biçimde inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu olan 0.05 değeri minimum inhibitör konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir. Elde edilen bu sonuçta göre 2 ve 6 numaralı izolatların ürettikleri antimikrobiyal maddenin çalışmada uygulanan en düşük konsantrasyon olan 0.05 katlık seyreltmede dahi test mikroorganizmalarının üremelerini engellediği tespit edilmiştir.

Günümüzde sentetik antimikrobiyal maddeleri tanımlama ve geliştirme aşamalarının yüksek maliyetler gerektirmesi ve zamanın verimli kullanımı gerekliliğinden, çalışmalar doğal aktif bileşenleri bulma ve geliştirme alanına doğru yön değiştirmiştir. Antimikrobiyal maddeler doğal kaynaklardan elde edildiğinde, sentetik maddelerin neden olduğu yan etkilerinin de ortadan kalkacağı ve bazı antibiyotiklere karşı direnç oluşturmuş türler için de alternatif olabilecekleri düşünülmektedir. Bu çalışmada, doğal kaynak olarak nitelendirilen toprak mikroorganizmalarına yönelmemizin en temel nedenlerinden biri de ekonomik olarak, bulunma ve ulaşılma güçlüğü olmamasıdır. Bu nedenle buldukları bölgeye ve mevsime bağlı tarama yapıldığında toplanan örnekler ile ileri farmasötik araştırmalara yönelmek daha doğru olacaktır. Çünkü bir tür ne kadar zor şartlarda kalırsa savunma mekanizmasını da o kadar güçlü tutmaya çalışmaktadır. Sekonder metabolitler genellikle bir savunma

mekanizması olarak tanımlanırlar ve bu yüzden türlerin buldukları ekolojik koşullar, onların antimikrobiyal etkinliğinde önemlidir.

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

#### TEŞEKKÜR

10-M-13 proje kapsamında çalışmamızı destekleyen Karamanoglu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

- Andrews, J.M. 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.
- Balkar, N., Korcan, S.E., Konuk, M. 2010. Afyonkarahisar İlinde İzole Edilen Actinomycet İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *BiyoTehnoloji Elektronik Dergisi*, 1(1): 21-26
- British Report, 2016a. Review On Antimicrobial Resistance. Infection Prevention, Control And Surveillance: Limiting The Development and Spread of Drug Resistance. AMR. London, England.
- British Report. 2016b. Review On Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: An Overview of Our Work. AMR. London, England.
- Chaudhary, H.S., Yadav, J., Shrivastava, A.R., Singh, S., Singh, A.K., Gopalan, N. 2013. Antibacterial Activity of Actinomycetes Isolated From Different Soil Samples of Sheopur (A City of Central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 4(2), 118-123.
- CLSI, editor, 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition. M07- A7.
- Çetin M. 2012. Hayvan Beslemede Antibiyotik ve Antiparazitlere Alternatif Olarak Bitkisel Ekstraktlar ve Pelinotu'nun (*Artemisia absinthium*) Kullanılması. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 15(4):58-63.
- Demain, A.L. 1998. Induction of Microbial Secondary Metabolism. *International Microbiology*, 1: 259-264.

- Fleming, A. 1922. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. Proceedings of the Royal Society B, 93: 306-318.
- Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J. 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. Science, 309: 1387-1390.
- Gilbert, J.A., Jansson, J.K., Knight, R. 2014. The Earth Microbiome Project: Successes and Aspirations. BMC biology, 12: 69-72.
- Karaaslan, E. 2013. Çevreden İzole Edilen Suşların Antimikrobiyal Direnç Durumlarının Araştırılması ve Klinik Suşlarla Karşılaştırılması. İÜ. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi, 107S.
- Martinez, A., Kolvek, S.J., Yip, C.L.T., Hopke, J., Brown, K.A., MacNeil, I.A., Osburne, M.S. 2004. Genetically Modified Bacterial Strains and Novel Bacterial Artificial Chromosome Shuttle Vectors For Constructing Environmental Libraries and Detecting Heterologous Natural Products in Multiple Bacterial Hosts. Applied and Environmental Microbiology, 70: 2452-2463.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. 2003. Microbial Diversity and Soil Functions, European Journal of Soil Science, 54:655-670.
- Ökmen, G., Uğur, A. 2011. Sumak Bitkisinin Yetiştığı Topraklardan İzole Edilen Antagonistik Streptomisetlerin Antimikrobiyal Potansiyeli. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 4(2):1-5.
- Öztürk, R. 2008. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi, 7-8 Şubat, İstanbul.
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A., Farmerie, W.G., Triplett, E.W. 2007. Pyrosequencing Enumerates and Contrasts Soil Microbial Diversity, The ISME Journal, 1: 283-290.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiang, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J., Goodman, R.M. 2000. Cloning The Soil Metagenome: A Strategy For Accessing The Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganism. Applied and Environmental Microbiology, 66: 2541-2547.
- Serpi M., Özdemir Z. Ö., Salman Y. 2012. Bazı Bitki Ekstrelerinin *Propionibacterium acnes* Üzerine Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması. KSÜ Doğa Bil. Derg., 15(1): 7-12.
- Torsvik, V., Ovreas, L. 2002. Microbial Diversity and Function in soil: from Genes to Ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 5: 240-245.
- Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth, K. P., Reena, A. 2012. Antimicrobial Potential of *Actinomyces* Species Isolated From Marine Environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(6), 469-473.
- Yıldırım, A. 2004. Toprakdan İzole Edilen Bazı Aktinomiset İzolatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar. Osmangazi Üniversitesi. Fen Bil. Ens., Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 87 s.
- Yılmaz, M., Beyatlı Y. 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi. Orlab on-Line Mikrobiyoloji Derg, 7: 35-49.