BELİRLİ FUNGUS TÜRLERİNİN BAZI BAKTERİ TÜRLERİ ÜZERİNDE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Öztürk DÜNDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman:
Prof. Dr. Ahmet ASAN

2011 – EDİRNE

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BELİRLİ FUNGUS TÜRLERİNİN BAZI BAKTERİ TÜRLERİ ÜZERİNDE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZTÜRK DÜNDAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ...12.10.2011.. tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet Asan
(Danışman)

Doç. Dr. Ece ŞEN
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Halide AYDOĞDU
(Üye)

ÖZET

Belirli Fungus Türlerinin Bazı Bakteri Türleri Üzerinde Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması

Bu çalışmada *Aspergillus niger, Aspergillus wentii*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium digitatum* ve *Trichothecium roseum* mikrofunguslarının *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Salmonella sp*. ATCC 14028 standart suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

PDA (Merck) besiyerinde 7 günlük inkübasyonu dolmuş mikrofungus kültürlerinden Thoma lamıyla ml'sinde 10^8 spor olacak şekilde sayılmıştır. İçinde 100 ml PDB bulunan 500 cc'lik erlenmayer içine her bir mikrofungus için 1 ml konulmuştur. Daha sonra 28˚C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonu dolmuş mikrofungus kültürlerini içeren PDB'ler, daha sonra Whatman No 4 kağıdıyla miselyumlardan filtrasyon yardımıyla ayrılmıştır. Kültür süpernatantları 50 cc'lik diklorometan ile 3 kez yıkanarak ekstrakte edilmiştir. Ayırma hunisiyle besiyerinden uzaklaştırılan diklorometanlar evaporatör balonlarına alınıp, evaporasyon aletiyle azot gazı altında uçurulmuştur. Böylece muhtemel antimikrobiyal maddeler evaporatör balonunun alt kısmında kristal halinde kalmıştır. Bu kristal halindeki antimikrobiyal maddelere aseton koyulmuş ve bir sonraki aşama için hazır hale getirilmiştir.

Disk difüzyon yöntemi ve çelik halka yöntemi kullanılarak mikrofunguslardan elde edilmiş antimikrobiyal maddeler, 50 ve 100 µl Muller Hinton Agar besiyerine inokule edilmiş standart suşlara karşı denenmiştir. Kontrol grubu olarak 50 ve 100 µl aseton ve kontrol antibiyotiği denenmiştir. Oluşan zon çapları söz konusu mikrofungusun bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğunu göstermiştir.

Bu tez TÜBAP (2010 -12) tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, mikrofungus, disk difüzyon yöntemi, çelik halka yöntemi

ABSTRACT

Investigation of Antimicrobial Activities of Some Species of Fungi on Some Species of Bacteria:

In this work, Antimicrobial activities are investigated that *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus terreus* , *Penicillium digitatum* and *Trichothecium roseum* of microfungi against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Salmonella sp.* ATCC 14028 standard strains.

Microfungus samples were incubated for 7 days at PDA medium, counted as a 10^8 spor in 1 ml by microscopy. 1 ml was put into 500 cc erlenmayer in 100 PDB for each microfungus then incubated for 14 days at of 25 ˚C.

Some PDBs that contains implemented microfungus culteres were separated from myceliums with Whatman no: 4 paper by filtration. Culture supernatants were washed 3 times with 50 cc dichloromethane and extracted.

Dichloromethanes were removed from medium by seperating funnel then taken into evaporator balloons, blown under nitrogen gas by evoparation equipment. Consequently, likely antimikrobial substances had stayed as crystal cas at the bottom of evaporator balloon. Acetone was put into these antimicrobial substances and we proceeded for next step.

Antimicribial substances which were obtained from disc diffusion method and steel ring method were tested against Standard strains inoculated into 50 ml and 100 ml Muller Hinton Agar medium. As a control group 50 and 100 µl acetone and control antibiotics were tested. Sensivity zone diameters shown antimicrobial activity against mikrofungus to bacteria.

This work has supported by TÜBAP (2010)

Key words: Antimicrobial acitivity, microfungus, disc diffusion method, steel ring method

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasında elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öztürk DÜNDAR

TEŞEKKÜR

Tez konumu beraber belirlediğim, tüm çalışmalarım boyunca beni yönlendiren, tüm kişisel bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her türlü destek ve ilgiyi benden esirgemeyen Biyoloji Bölüm Başkanı, değerli tez hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN (Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarıma katkıda bulunan, kullandığım mikrofungus türlerini teşhis eden ve tezimi yazarken tüm bilgi ve becerilerini benimle paylaşan değerli hocam Araş. Gör. Dr. Burhan ŞEN (Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)'e teşekkür ederim.

Tez konusunda benimle fikir ve bilgilerini paylaşan Uzm .Dr. Suzan Ökten (Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana istediğim zamanlarda laboratuar araç ve gereçlerini kullanmama izin veren Kimya Bölümü öğretim üyeleri ve Kimya Bölümü Yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarım (Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü)'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında gerektiğinde bana izin veren Laboratuar sorumlum Uzm. Analist Ayşegül Erdem (Deva İlaç Topkapı Mikrobiyoloji Laboratuarı Sorumlusu)'e teşekkür ederim.

Bana büyük güç veren, beni bugünlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen, başarılarımla gurur duyan, her zaman yanımda olan ve olacak olan annem ve babam Kudret /HACİ RAMAZAN DÜNDAR , ablam Özlem DÜNDAR, ağabeylerim Özcan /Özkan /Özgür DÜNDAR ve kardeşim Uğur DÜNDAR olmak üzere tüm aileme en içten duygularımla teşekkür ederim.

İçindekiler

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

ÖZET……..…….....I

ABSTRACT……..……II

BEYAN…….....……III

TEŞEKKÜR……...……IV

İÇİNDEKİLER……...…...V

TABLO LİSTESİ…….. ...VI

ŞEKİL LİSTESİ……..…….....VII

SİMGELER ……..…… ...IX

1. GİRİŞ.....1

3. MATERYAL VE METOD.....20

4. BULGULAR.....23

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....38

KAYNAKLAR.....41

ÖZGEÇMİŞ.....44

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1- Mantarlardan elde edilen antibiyotikler ……..12

Tablo 2 – Çelik Halka yöntemiyle 100 µl'e göre milimetrik bulgular……...23

Tablo 3 – Çelik Halka yöntemiyle 50 µl'e göre milimetrik bulgular…….24

Tablo 4- Disk Difüzyon yöntemi ile 100 µl'e göre milimetrik bulgular…….34

Tablo 5-Disk Difüzyon yöntemi ile 50 µl'e göre milimetrik bulgular ……..35

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Disk Difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite araştırılması …….... 22

Şekil 2.Çelik halkalar kullanılarak antimikrobiyal aktivite araştırılması ……. 22

Şekil 3-a Çelik Halka yöntemiyle *A.niger ,A.terreus A.wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *S.aureus*'a karşı etkisi…….24

Şekil 3-b Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum ,T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *S.aureus*'a karşı etkisi……..25

Şekil 3-c Çelik Halka yöntemiyle *A.niger*, *A.terreus A.wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *S.aureus*'a karşı etkisi……25

Şekil 3-d Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum*, *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *S.aureus*'a karşı etkisi…….26

Şekil 4-a Çelik Halka yöntemiyle *A.niger*, *A.terreus*, *A.wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *S.epidermidis'e* karşı etkisi…….26

Şekil 4-b Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum*, *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *S.epidermidis'e* karşı etkisi…….27

Şekil 4-c Çelik Halka yöntemiyle *A.niger*, *A.terreus*, *A.wentii'den* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *S.epidermidis*'e karşı etkisi…….27

Şekil 4-d Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum*, *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *S.epidermidis*'e karşı etkisi…….28

Şekil 5-a *A.niger , A.terreus , A.wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *B.subtilis*'e karşı etkisi…….....28

Şekil 5-b Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum*, *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *B.subtilis'e* karşı etkisi……29

Şekil 5-c Çelik Halka yöntemiyle *A.niger*, *A.terreus*, *A.wentii'den* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *B.subtilis*'e karşı etkisi…….29

Şekil 5-d Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum*, *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *B.subtilis*'e karşı etkisi.....30

Şekil 6-a Çelik Halka yöntemiyle *A.niger*, *A.terreus* *A.wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *Salmonella sp.'e* karşı etkisi……...30

Şekil 6-b Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum, T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Salmonella sp*.e karşı etkisi……31

Şekil 6-c Çelik Halka yöntemiyle *A.niger*, *A.terreus*, *A.wentii'den* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *Salmonella sp.'e* karşı etkisi…….31

Şekil 6-d Çelik Halka yöntemiyle *P.digitatum*, *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Salmonella sp.'e* karşı etkisi…….32

Şekil 7- Çelik Halka yöntemiyle *A.niger, A.wentii, A.terreus, P.digitatum* ve *T.roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddelerin ve asetonun 50 ve 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *P.aeruginosa*'ya karşı etkisi……32

Şekil 8- *S.aureus* ATTC 6538 P bakterisinin PIP (Piperasilin) ve LOR (Lorafloksasin) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları…….....33

Şekil 9- *B.subtilis* ATTC 6633 bakterisinin PIP (Piperasilin) ve LOR (Lorafloksasin) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları…….....33

Şekil 10- *S.epidermidis* ATTC 12228 bakterisinin LOR (Lorafloksasin) ve PIP (Piperasilin) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları……...34

Şekil 11- *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin 50 µl ve 100 µl 'sinin *Staphylococcus epidermidis'e* karşı antimikrobiyal etkisi……..36

Şekil 12- *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* , *Aspergillus wentii* , *Trichothecium roseum* ve *Penicillium digitatum* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin 100 µl 'sinin *Bacillus subtilis'e* karşı etkisi……...36

Şekil 13-Değişik türlerde antimikrobiyal aktivitenin gözlenmediği petriler……..37

SİMGELER

AMM	Antimikrobiyal maddeler
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyonu
MLK	Minimal letal konsantrasyonu
PIP	Piperasilin
LOR	Lorofloksasin
NB	Nutrient Broth
PABA	Para-amino benzoik aside
PDB	Patates Dekstroz Broth
PDA	Patates Dekstroz Agar
^{0}C	Santigrat Celcius
ml	mililitre
µm	mikrometre

GİRİŞ

A. ANTİMİKROBİYAL MADDELER

Antimikrobiyal maddeler (AMM); mikroorganizmaları öldüren (=mikrobisid etki) veya onların üremesini /gelişimini engelleyen (=mikrobiyostatik etki) kimyasal maddelerdir. Bu tanıma; dezenfektanlar, antiseptikler, antibiyotikler ve inhibitör etkili diğer bazı maddeler girmektedir. Hipokloritler, kloraminler, iyodoforlar, kuarterner amonyum bileşikleri, amfoterik bileşikler, oksidan maddeler (hidrojen peroksit, perasetik asit, ozon, vb.), alkaliler (sodyum hidroksit); kostik veya kostik soda , potasyum hidroksit gibi), asitler, alkoller, aldehitler (formaldehit gibi), fenol ve türevleri, sabunlar, ağır metal iyonları ve tuzları gibi çeşitli dezenfektanlar ve antiseptikler, penisilin, streptomisin ve tetrasiklinler gibi çeşitli antibiyotikler, metilen mavisi, kristal violet ve brilliant green gibi inhibitör etkili çeşitli mikrobiyostatik boyalar ve sodyum klorür ve sodyum nitrit gibi koruyucu olarak kullanılan bazı gıda katkı maddeleri AMM'lere örnek olarak gösterilebilir.

AMM'lerden dezenfeksiyon ve antisepsi yaratma amacıyla veya enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ilaç (antibiyotik) olarak ya da gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak yararlanılmaktadır. Dezenfektanlar alet-ekipman, cansız materyal (su gibi) ve cansız yüzeyler ile küçük oda ve bölmelerin atmosferine , antiseptikler ise canlının deri ve mukozasına uygulanan dezenfeksiyon etkili AMM'lerdir. Dezenfektanlar; hastane ve benzeri sağlık kuruluşları, gıda işletmeleri, lokanta, yemekhane ve restaurant gibi toplu gıda tüketim yerleri, yemek fabrikaları, hayvan üretim çiftlikleri, tuvaletler ve çöp toplama vb. alanlarda yer alan her türlü alet-ekipman ve yüzey (tavan, taban, duvar, tezgah, tank, bidon, kova, vb.) ile küçük oda veya bölmelerin atmosferi ve su gibi diğer bazı cansız materyalin dezenfeksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan, bazı AMM'lerden selektif (seçici) besiyerlerinde selektivite ajanı olarak da yararlanabilmektedir.

B. ANTİMİKROBİYAL MADDE ETKİNLİĞİNİN TEST EDİLMESİ

Bu amaçla, AMM'lere genelde duyarlı olduğu bilinen mikroorganizma suşlarından yararlanılır. Spesifik ve duyarlı test mikroorganizmasının seçimi ve kullanımı bu testlerin ilk ve önemli aşamasıdır. En yaygın kullanılan test mikroorganizmaları *Salmonella* t*yphosa, Staphylococcus aureus, Bacillus stearothermophilus, B. mesentericus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarıdır. Bu testlerle bir AMM'nin belli bir test mikroorganizma üzerindeki etkisi 'minimal inhibitör konsantrasyonu' (MİK) veya "minimal inhibisyon konsantrasyonu" şeklinde belirlenebildiği gibi, söz konusu herhangi bir mikroorganizma suşunun belli bir AMM'ye karşı duyarlılığı da ortaya konulabilir. Diğer taraftan bu testlerden yararlanılarak herhangi bir ortamdaki (bir yüzey, bir gıda, vb.) AMM varlığı da nitel veya nicel olarak ortaya konulabilmektedir.

AMM etkinliğinin test edilmesinde birçok yöntemden yararlanılabilmektedir. Ancak "tüp dilüsyon yöntemi" ve "agar difüzyon yöntemi" bu amaçla kullanılan en yaygın yöntemlerdir.

Tüp Dilüsyon Yöntemi:

Bu yöntemle daha çok AMM'lerin MİK ve/veya MLK değerleri belirlenmeye çalışılmaktadır. MİK değeri; denenen test mikroorganizma suspansiyonunda (*belli sayıda canlı mikroorganizma içeren kültür sıvısı)* test koşullarında üremeyi (*mevcut canlı hücre sayısının artışını*) inhibe eden en düşük AMM konsantrasyonudur.

MİK değeri; mikroorganizma çeşidi ve sayısı , besiyeri bileşimi ve pH'sı, inkübasyon sıcaklık ve süresi gibi faktörlerden etkilenir. Dolayısıyla MİK sonucu verilirken test koşulları ayrıca belirtilmelidir.

Agar Difüzyon Yöntemi:

Pek çok AMM'nin (*özellikle antibiyotik ve dezenfektanların*) etkinliği bu yöntemle kolay ve kısa sürede ortaya konulabilir. Bu yöntemden yararlanılarak test edilecek mikroorganizmanın AMM/AMM'lere duyarlılığı veya herhangi bir ortamdaki bir AMM'nin varlığı da belirlenebilmektedir.

Yöntem; test mikroorganizması aşılanmış petri kutusundaki uygun bir agarlı besiyerine uygun bir şekilde eklenen AMM'nin (ya da AMM içerdiğinden şüphenilen örneğin), besiyerinde diffüze olması ve diffüze olduğu alanda test mikroorganizmasının gelişimini engelleyip engellemediğinden belirlenmesi prensibine dayanmaktadır.

Denenen AMM test mikroorganizması üzerinde etkiliyse; AMM'nin eklendiği yerin çevresinde, inkübasyon sonrasında mikroorganizma gelişiminin gözlenmediği bir 'inhibisyon zonu'oluşur. Petri kutusundaki agar yüzeyinde koloni oluşumu şeklinde üreme gözlenirken, inhibisyon zonu içinde mikroorganizma gelişimine işaret eden hiçbir koloniye rastlanmaz. İnhibisyon zonu mikroorganizma gelişiminin engellendiğini gösterir.

Agar difüzyon yöntemi birkaç şekilde uygulanabilmektedir. Ancak en yaygın uygulama şekli "kağıt disk agar difüzyon" ve "delik agar difüzyon" yöntemleridir.

1. Kağıt Disk Agar Difüzyon Yöntemi:

Bu yöntemin ilk aşamasında, seçilen test mikroorganizmasının daha önceden hazırlanan genç sıvı kültürü (18-24 saatlik) dökme plak yöntemi ya da yüzeye yayma yöntemiyle uygun bir agarlı besiyerine aşılanır. Bu amaçla daha çok yüzeye yayma yöntemiyle aşılama tercih edilmektedir.

Yüzeye yayma yönteminde; steril boş bir petri kutusuna dökülmüş ve katılaşması sağlanmış steril agarlı besiyerinin kuru yüzeyine sıvı kültürden steril pipetle 0.1 ml örnek aktarılır ve alevde sterilize edilmiş bir Drigalski özesi ile agar yüzeyinde yayma yapılır. Yüzeye yayma, sıvı kültüre daldırılan steril bir eküvyonla direkt olarak da gerçekleştirilebilir. Yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış agarlı besiyeri oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilir.

Dökme plak yöntemiyle aşılamada ise; sıvı kültürden 1 ml örnek alınarak içi boş steril bir petri kutusuna aktarılır. Bunun üzerine daha önceden hazırlanmış ve yaklaşık 50 ˚C'ye soğutulmuş steril agarlı besiyerinden 15-20 ml kadar dökülür ve petri kutusuna üç defa sağ ve daha sonra da üç defa sol yöne çevirme hareketı yaptırılarak örnek ile besiyerinin karışması sağlanır. Ekim yapılmış agarlı besiyeri katılaşması için oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilir.

Daha önce hazırlanarak uygun bir kapalı kapta otoklavda sterilize edilen yaklaşık 1-1.5 cm çapındaki kağıt diskler (absorblama gücü yüksek olan kağıt filtre kağıtlarından hazırlanmış) bulunduğu kapalı kaptan aseptik koşullarda ve steril bir pens yardımıyla tek tek alınır ve her bir disk denenecek AMM'nin farklı dilüsyonuna ya da farklı bir AMM çözeltisine daldırılarak çözeltiyi absorblamasını sağlamak üzere bu şekilde kısa bir süre beklenir. Daha sonra kağıt disk çözeltiden çıkarılır ve sıvının fazlası çözelti tübünün ağız kısmına değdirilerek drene edilmeye çalışılır. Çözeltiyi absorblamış ve sıvının fazlası alınmış disk, test mikroorganizma aşılanmış agarlı besiyerinin yüzeyine yerleştirilir. Eldeki pensle diskin üst kısmına hafifçe bastırılarak alt yüzeyinin besiyeri yüzeyine tam olarak temas etmesi sağlanır. Steril kağıt disklerden bir tanesi ise aynı şekilde hareket edilerek steril damıtık suya daldırılır, sıvının fazlası drene edilir ve kontrol (AMM içermeyen örnek) olarak agarlı besiyeri üzerine yerleştirilir.

Petri kutusundaki agarlı besiyerinin yüzeyine, kontrol de dahil olmak üzere uygun aralıklarla en fazla 5-7 disk yerleştirilmelidir. Aksi takdirde, agarlı besiyeri yüzeyinde disklerden diffüze olacak farklı çözeltilerin birbirine karışma sorunu yaşanabilir ve bu durum yanlış test sonuçları alınmasına neden olabilir.

Yöntemin en son aşamasında ise, petri kutusu düz şekilde etüve yerleştirilir ve test mikroorganizmasına uygun koşullarda inkübasyonu (örneğin 37˚C de 24-48 saat) sağlanır. Petri kutusu, inkübasyon sonrasında disklerin çevresinde oluşacak inhibisyon zonları yönünden incelenmeye alınır

İnhibisyon Zonlarının Özellikleri:

İnhibisyon zonları temizlik ve çap yönlerinden incelenmelidir. İnhibisyon zonları temiz olmalı ve içinde hiçbir koloni içermemelidir. Ancak inkübasyonun 24. saatinde inhibisyon zonları temizken, bazen 48 saat sonunda zon içinde koloniler oluşmaya başlayabilir. Bu nedenle inhibisyon zonları inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde ayrı ayrı incelemeye alınarak değerlendirilmelidir. Zon çapı ile AMM'nin inhibisyon gücü arasında her zaman doğrusal bir ilişki yoktur. İnhibisyon zonunun çapı; AMM'nin inhibisyon gücünün yanı sıra, bu maddenin besiyerinde diffüze olma derecesine de bağlıdır.

2. Delik Agar Difüzyon Yöntemi:

Bu yöntemde de aynen kağıt disk agar difüzyon yönteminde olduğu gibi hareket edilmektedir. Ancak delik agar difüzyon yönteminde test mikroorganizmasıyla aşılanmış agarlı besiyeri yüzeyine AMM emdirilmiş kağıt diskler yerleştirilmemekte, bunun yerinde besiyerinde uygun aralıklarla ve belli sayıda delikler açılarak bu deliklerin her birine denenecek AMM çözeltisi dökülmektedir**.**

Agarlı besiyerine test mikroorganizmasının aşılanmasında aynen kağıt disk agar difüzyon yönteminde olduğu gibi hareket edilmektedir. Test mikroorganizması aşılanmış agarlı besiyerinde delik açmak için steril içi boş cam veya metal borular ya da tüplerden yararlanılır. Bu boru veya tüplerin ağız çapları yaklaşık 1-1.5 cm olmalıdır. Bu amaçla ağız çapları uygun Durham tüpleri kullanılabilir. Tübün (veya borunun) ağız kısmı etil alkole daldırılır ve daha sonra alevden geçirilerek sterilize edilir. Tüp ağzı soğuduktan sonra agarlı besiyeri yüzeyine tam dik pozisyonda temas ettirilir. Daha sonra tüp dik vaziyette besiyeri dibine kadar daldırılır ve kendi ekseni etrafında hafifçe sağa ve sola döndürülür. Bu hareketle agarlı besiyeri halka şeklinde kesilmiş olacaktır. Tüp yine dik vaziyette besiyerinden çıkarılır. Bu işlem sonrasında, kesilmiş agarlı besiyeri çoğunlukla tüpün içine geçer ve tüple birlikte uzaklaştırılır ve böylece de besiyeri içinde bir delik açılmış olur. Kesilmiş agarlı besiyeri tüp içine geçmediği takdirde,bu kesik kısım etil alkol kullanılarak alevde sterilize edilmiş bir pens yardımıyla besiyerinden aseptik koşullarda uzaklaştırılır.

Besiyerinde yukarıda anlatıldığı şekilde hareket edilerek uygun aralıklarla ve belli sayıda delikler açılır. Petri kutusundaki agarlı besiyerinde, kontrol de dahil olmak üzere uygun aralıklarla en fazla 5-7 delik açılmalıdır. Deliklerin her birine denenecek AMM'nin farklı dilüsyonu ya da farklı bir AMM çözeltisi dökülür. Kontrol deliğine ise steril damıtık su dökülür. Döküm işlemlerinde küçük hacimli steril pipetlerden (örneğin 0.1 ml'lik) veya Pastör pipetlerinden yararlanılır. Denenecek AMM çözeltisi delik içini doldurmalı ancak hiçbir şekilde taşırılmamalıdır.

Bazı durumlarda AMM çözeltileri döküldüğü agar deliği altından petri kutusu alt yüzeyine sızarak bu düzeyde yayılabilmekte ve sonuçta da delikte boşalmalar meydana gelmektedir. Bu sorunu yaşamamak için aşağıdaki şekilde bir yol izlenmelidir. Test mikroorganizması aşılanmış agarlı besiyerinde delikler açılır. Herbir delik içine steril bir pipetle yaklaşık 50˚C'deki steril agarlı besiyerinden , deliğin altını ince bir zar

şeklinde dolduracak miktarda aktarma yapılır. Aktarılan bu agarlı besiyerinin katılaşması beklenir ve daha sonra da deliklere yukarıda anlatıldığı şekilde denenecek çözeltiler dökülür.

Petri kutusu AMM çözeltilerinin dökümünü takiben 5-10 dakika kadar hiçbir işlem yapmadan düz konumda tezgah üzerinde bekletilir. AMM çözeltileri bu esnada agarlı besiyerinde diffüze olmaya başlar. Bu işlemin amacı; petri kutusunun etüve taşınması anında AMM çözeltilerinin deliklerden dışarı taşma riskini en aza indirmektir.

Yöntemin en son aşamasında ise , petri kutusu düz şekilde ve yere paralel olarak, çözeltileri delik dışına taşırmadan dikkatlice taşınarak etüve düz şekilde yerleştirilir. Petri kutusunun inkübasyonu (örneğin 37˚C'de 48 saat) sağlanır. Petri kutusu, inkübasyon sonrasında deliklerin çevresinde oluşacak inhibisyon zonları yönünden incelemeye alınır. Bu incelemelerde 'kağıt disk agar difüzyon yöntemi'nde anlatıldığı şekilde hareket edilir.

Dilüsyon Kullanım Testi (Use-Dilüsyon Testi):

Bu test temelde tüp dilüsyon yöntemine dayanmakta ve bu testle kontamine yüzeylerin dezenfeksiyonuna uygun AMM konsantrasyonunun belirlenmesi yoluna gidilebilmektedir. Bu yönteme daha çok fenolik olmayan dezenfektanların etkinliğini belirlemek için başvurulmaktadır. Bu amaçla, steril küçük paslanmaz çelik silindirler veya halkalar, steril küçük cam çubuklar ya da toplu iğne gibi materyalden yararlanılmakta ve test aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilebilmektedir.

Steril paslanmaz çelik silindirler (veya yukarıda belirtilen diğer bir materyal), önceden hazırlanmış olan uygun bir kaptaki sıvı test mikroorganizma kültürünün (18-24 saatlik) içine bırakılır ve tümüyle ıslanmaları sağlanır. Burada, ıslanmış silindirler kontamine olmuş yüzeyler olarak kabul edilmektedir. Daha sonra kültür sıvısı uygun bir kaba dökülerek ayrılır ve ıslanmış silindirler, tabanına filtre kağıdı yerleştirilmiş steril bir petri kutusuna alevde sterilize edilmiş bir pens yardımıyla aseptik koşullarda aktarılır. Silindirlerin yüzeyleri kuruyana dek bu şekilde beklenir. Bunu takiben silindirler, aseptik koşullarda ve alevde sterilize edilmiş bir pens yardımıyla tek tek alınır ve her biri, içinde belli konsantrasyonlarda test edilecek AMM bulunan tüplere ayrı ayrı bırakılır. Tüpler bu şekilde daha önceden belirlenen bir süre boyunca bekletilir (1, 5, 10, 20, 30 veya 60 dakika). Daha sonra tüp içeriği, silindirler tüpte kalacak şekilde dikkatlice ve aseptik koşullarda lavaboya boşaltılır. Tüpteki silindirler, içinde 7-8 ml

steril damıtık su şeklinde 1 dakika bekletilir. Bu süre sonunda her bir tüpteki su, silindirler içerde kalacak şekilde lavaboya boşaltılır ve herbir silindir, içinde 7-8 ml Nutrient Broth (NB) veya uygun diğer sıvı besiyeri bulunan tüplere ayrı ayrı aktarılır (silindirlerin boş tüpten besiyeri içeren tübe bu aktarımlarında;boş tüp aseptik koşullarda ağız kısmı aktarma yapılacak tübün ağız boşluğuna denk gelecek şekilde ters çevrilir ve boş tüpün dibine parmakla hafifçe vurularak silindirin diğer tüp içine düşmesi sağlanır). Kontrol olarak, petri kutusundaki silindirlerden bir tanesi içinde steril NB bulunan ayrı bir tüpe aktarılır. Bu kontrol tübü ve diğer bütün NB tüpleri uygun koşullarda inkübe edilir (örneğin 37˚C'de 48 saat). İnkübasyon sonunda üreme gözlenmeyen en düşük AMM konsantrasyonu yüzey dezenfeksiyonuna uygundur sonucuna varılır.

Bu deneme; karşılaştırma yapabilmek amacıyla farklı AMM'ler (her birinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak) devreye sokularak aynı anda gerçekleştirilebilir.

Test uygulanışında kurumaya duyarlı *Salmonella typhi* gibi bir bakteri kullanılmamalıdır. *Staphylococcus aureus* veya *S. cholerae-suis* gibi test bakterileri bu amaca daha uygundur (Temiz, 2010).

D. Kemoterapi ve Antibiyotikler

Tarihsel Gelişme

Kemoterapi, hastalıkların kimyasal maddelerle tedavi edilmesi olayıdır. Hastalık tedavisinde kullanılan kimyasal maddelere kemoterapotik ajanlar adı verilir. Bu maddelerin bazıları mikroorganizmaların metabolizma ürünleri olarak üretilirler. Bunlara antibiyotik adı verilir. Diğer bazıları ise laboratuarda, kimyasal yollar kullanılarak sentetik olarak üretilirler.

Hastalıkların kimyasal maddeler kullanılarak tedavi edilmesinin tarihi çok eskilere kadar gider. Mesela Mısırların hastalarına iyileşmeleri için küflü ekmek yedirdikleri bilinmektedir. 1500'lerde kinkona ağacının kabuklarından elde edilen kinin, etkili bir şekilde sıtma hastalarında kullanılmıştır. Güney Amerikalı yerlilerin başlattığı bu uygulama 1630'larda Avrupa'ya taşınmıştır.

1912'de Paul Ehrlich, frengi (sifiliz) hastalığına karşı **salvarsan** adı verilen ilacı kullanmıştır. Böylece bakteriyel hastalıklara karşı etkili ilk kemoterapotik ajan

bulunmuştur. Salvarsan, laboratuarda sentez edilen ve hastalara zarar vermeden onları tedavi edebilen ilk kemoterapotik maddedir. Ancak günümüzde frengiye karşı çok daha etkili antibiyotikler kullanılmaktadır. 1935'te Gerhard Domagk, prontosil adını verdiği sentetik bir maddenin streptokok enfeksiyonlarına karşı hastalara zarar vermeden kullanılabileceğini bulmuştur. Bu maddenin hasta hayvanların vücutlarına verildiğinde etkili olduğu halde mikroorganizmaların laboratuar kültürleri üzerine etkili olmaması dikkat çekmiştir. Fransız kimyacısı Jacques Trefouel ve arkadaşları hayvan vücutlarına prontosil verildiğinde sulfanilamid adı verilen renksiz bir madde salgılandığını ve mikroorganizmaların üzerinde asıl bu maddenin etkili olduğunu göstermişlerdir. Sulfanilamidin sadece vücut içerisinde değil aynı zamanda mikroorganizmaların laboratuar kültürleri üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu buluştan sonra sulfanilamid benzeri maddeler üzerinde yoğun bir araştırma başlamış ve 1945'lerde sulfanilamidin binlerce türevleri yapılmıştır. Bunlara genel olarak **sulfonilamidler** veya **sulfa ilaçlar** adı verilir. Bu maddelerin birçoğu bakterilerin gelişmesini inhibe etmek bakımından sulfanilamid'ten çok daha etkilidir.

Sulfonamidler günümüzde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kimyasal yapı olarak para-amino benzoik aside (PABA) benzerler ve bu maddenin sentezlenmesini inhibe ederek etki gösterirler. PABA memeli ve prokaryot hücrelerin önemli bir metaboliti olan folik asit sentezinde kullanılan bir maddedir. Sulfonamidler ise PABA'nın folik asit yapısına girmesini engelleyerek etkili olmaktadırlar. İnsanlar ve diğer memeliler gıdalarıyla folik asidi aldıklarından dolayı bu maddenin eksikliği önemli bir problem çıkarmaz. Ancak bakteriler PABA'yı kullanarak kendi folik asitlerini üretmek zorundadırlar. Bundan dolayı sulfonamidler bakteriler için etkili bir kemoterapotik ajan olarak fonksiyon görür.

Salvarsan ve sulfonamidler laboratuarda kimyasal olarak sentezlenebilen sentetik kemoterapotik ajanlardır. Antibiyotikler ise bir mikroorganizma tarafından metabolizma ürünü olarak sentez edilen ve diğer mikroorganizmalar üzerinde etkili olan maddelerdir. Bu doğal maddelerin tedavi edici etkileri, antibiyotik olarak tanınmalarından çok önceden beri insanlar tarafından bilinmektedir. Asırlar önce Çinliler sivilceleri tedavi etmek için küflü soya fasülyesi peltesi kullanmışlardır. 1881'de İngiliz mikrobiyolog John Tyndall, içlerinde bakteri gelişen kültür ortamlarının bulandığını ancak bu ortamların yüzeyinde küf geliştiğinde bulanıklığın kaybolduğunu gözlemiştir. Pasteur

ve Joubert, antraks (şarbon basilinin saf kültürlerinin idrarda geliştiğini ancak diğer organizmalar olduğunda gelişmenin olmadığını görmüşlerdir. 1901'de Emmerich ve Low tavşanları antraktsan korumak için bu hayvanlara *Pseudomonas aeruginosa*'nın sıvı kültürlerini enjekte etmişlerdir. 1920'lerde Gratia ve Dath antibiyotikler ile ilgili ilk sistematik araştırmayı yapmışlar ve **aktinomisetin** antibiyotiğini bulmuşlardır. Ancak o zamanlar aktinomisetin hastalık tedavisinde kullanılmak yerine sadece aşı üretimi sırasında bakteri hücrelerinin parçalanması için kullanılmıştır.

Bütün bu buluş ve uygulamalara rağmen modern antibiyotik çağının 1929'da Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesi ile başladığı kabul edilir. Fleming, *Staphylococcus aureus* ekimi yapılmış bir petri plağı içerisinde, kontaminasyon sonucu gelişmiş bir küf kolonisinin etrafındaki geniş bir zonda bakterilerin gelişmediğini görmüştür. Fleming, bakterilerin gelişmesine, küf kolonisinden ortama yayılan bir maddenin engel olduğunu düşünmüş ve gelişen küfün *Penicillium* cinsine ait bir tür (*Penicillium notatum*) olmasından dolayı bu maddeye **Penisilin** adını vermiştir. İkinci dünya savaşına kadar bu madde tedavi amacı ile kullanılmamıştır. Ancak savaşta yaralanan askerlerin yoğun bir şekilde enfekte olmaları ve bunların tedavi edilme ihtiyacı, İngiliz ve Amerikan bilim adamlarının bu madde üzerinde yoğun şekilde araştırma yapmalarını sağlamış ve penisilin 'mucize ilaç' olarak büyük miktarlarda üretilmeye başlanmıştır.

Penisilinin keşfinden ve tedavide kullanılmaya başlanmasından sonra diğer antibiyotikler de birbiri peşine keşfedilmeye başlanmıştır. 1939'da Rene Dubos, *Bacillus brevis*'ten gramisidin ve tirosidin antibiyotiklerini, 1944'te Bugie ve Waksman, *Streptomyces griseus*'tan **streptomisin**i elde etmişlerdir. Waksman ilk defa 'antibiyotik'terimini kullanmıştır. 1947'de geniş spektrumlu ilk antibiyotik olan **kloromisetin** antibiyotiği bulunmuştur. Bu antibiyotik hücre içi bakteri patojenlerine etkili olan bir maddedir. 1948'de Benjamin Duggar ilk **tetrasiklin** antibiyotiğini keşfetmiştir. Bu antibiyotik geniş spektrumlu bir kemoterapotik ajan olarak günümüzde de yaygın şekilde kullanılmaktadır. 1950'lerde çok sayıda mikroorganizma, antibiyotik üretimi bakımından gözden geçirilmiş ve hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek şekilde düzinelerce antibiyotik bulunmuştur.

Günümüzde yüzlerce antibiyotik bilinmekte ve her gün yeni antibiyotikler bulunmaktadır. Ayrıca bilinen antibiyotiklerin modern genetik mühendislik ve

moleküler biyoloji teknikleri ile kimyasal yapıları değiştirilerek daha etkili şekilde kullanılmaları sağlanmaktadır. Ancak bilinen antibiyotiklerin büyük bir çoğunluğunun insan ve hayvanlara toksik olduğundan dolayı tedavide kullanılmaları imkansızdır. Günümüzde kullanılan antibiyotiklerin yarısından fazlası *Streptomyces* türleri tarafından , çok az bir kısmı da *Bacillus* cinsi bakteriler ve *Penicillium* ve *Cephalosporium* (*Acremonium*) cinsi küfler tarafından üretimektedir (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2002).

E. BAKTERİLERDEN VE MANTARLARDAN ELDE EDİLEN ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotikler canlı organizmalardan elde edilen, mikroorganizmaları öldürücü ve üremelerini durdurucu etkileri olan maddelerdir, bazıları sentetik olarak da yapılmıştır. Bazı antibiyotikler dokular için toksik olmadığından ya da az toksik olduğundan kemoterapötik olarak kullanılır. Her antibiyotiğin en etkili olduğu mikroorganizma cinsleri vardır. Bazıları bir çok cins mikroorganizma etkilidir ve bunlara geniş spektrumlu antibotikler denir.

Antibiyotikler Waksmann'ın 1956'daki tarifine göre mikroorganizmalar tarafından husule getirilen ve çok sulandırılmuş halde bile diğer bazı mikroorganizmaların üremesini durduran veya onları öldüren kimya maddeleri olarak tarif edilmiştir.

Antibiyotikler bir çok mikroorganizmalardan ve özellikle *Penicillium, Cephalosporium, Streptomyces, Micromonospora* ve *Bacillus* türlerinden elde edilmiştir ve yenileri de elde edilmektedir. Diğer yönden bazı antibiyotiklerin terkipçe aynı olan kimya maddeleri yapıldığı gibi (*Chloromycetine benzeri Chloramphenicol*), mikroorganizma ürünü antibiyotiklerin etkin köküne başka kollar takarak Ampicillin, Carbenicillin … gibi yeni ilaçlar hazırlanmış ve bu iki yoldan elde edilen sentetik ve biyosentetik maddeler de antibiyotik olarak kabul edilmiştir.

Antibiyotikler bakteri hücre duvarının yapımını bozarak (*beta-laktam antibiyotikleri, Bacitrasin*), ribozomların işleyişini önleyerek (*aminoglikomakrolidler, tetrasiklinler* ,*chloramphenicol*), sitoplazma zarını bozarak (Polymyxin G), mantarların sterollu zarlarını etkinsizleştirerek (*amphotericin B, nystatin* gibi polyene antibiyotikleri) mikroorganizmaları öldürür veya onların üremelerini durdururlar.

Antibiyotikler arasında bakterisidler(Penicillinler, Cephalosporinler, Vancomycin, Aminoglikosidler, Bacitracin, Polymyxin, Colistin) ve bakteriostatikler (*kloramfenikol, tetrasiklin'ler, eritromisin, linkomisin, klindamisin ,novobiosin…*) ayrılabildiği gibi başlıca Gram pozitif bakterilere etkililer (*penicilin, erythromycin*), Gram negatiflere etkililer [*Streptomisin, Kanamisin, Neomisin, Polymyxin B, Colistine methanesulfonate* ve etki alanı geniş antibiyotikler *(Ampicillin, Amoxycillin, Carbenicillin, Cefoxitin, Gentamicin, Tobramycin, Tetrasiklinler. Kloramfenikol…*)] bulunmaktadır(Unat, 1985).

Günümüzde enfeksiyonlara karşı antibiyotikler kullanılmaktadır ve şu an 8000'den fazla antibiyotik bilinmekte ve her yıl yüzlerce yeni antibiyotik buna ilave edilmektedir. Ancak araştırmalar *Streptomyces*, *Penicillium* ve *Bacillus* cinslerine ait türler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunların en önemlileri Tablo 1, 2 ve 3 te görülmektedir. Bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen antibiyotikler de vardır.

Bazı araştırıcılar ise yeni antibiyotiklerin keşfi için diğer mikroorganizma gruplarını da incelemektedir. Biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle antibiyotikler üretilse de yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi için başlıca yol "screening" (eleme) ve antimikrobiyal aktivitenin test edilmesi yöntemleridir. Bu yöntemler mikrobiyolog, kimyager, genetikçi, moleküler biyolog, farmakolog, biyokimyager ve veteriner gibi bilim adamlarını birlikte çalıştıkları bir çok disiplin tarafından kullanılsa da, bu alanda en büyük görevi mikrobiyologların üstlendiği açıktır (Nakayama, 1981).

Kimyasal bileşikler olduklarından, antibiyotiklerin bazıları sentetik olarak da elde edilmiştir. Ayrıca benzer yapıda olan diğer antibiyotikler sentetize edilmiştir. Birbirine yakınlığı olan antibiyotikler gruplar halinde toplanırlar.

İlk elde edilen penisilin tuzları benzil penisilin kökünü ihtiva ederler. Bunlar sindirim yolunda parçalandıklarından ağızdan kullanılamazlar. 1953 yılında penisilinin bir türevi olan fenoksimetil penisilin (penisilin V) elde edilmiştir. Bu madde asitlere mukavim olduğundan midede parçalanmaz ve ağız yolundan kullanılır. Bütün penisilinlerin çekirdeği 6-amino penisilanik asitten ibarettir. Buna ilave olan yan zincirlerle muhtelif penisilinler oluşur. Bu hususun anlaşılması, sentetik penisilinlerin keşfine yol açmıştır. Fenoksimetil penisilin de bu şekilde elde edilmiş sentetik bir penisilindir. Diğer sentetik penisilinlerden fenetisilin (broksil), propisilin (brocillin), fenbenisilin (penspek), ampisilin (penbritin), kloksasilin (orbenin) de asitlere dayanıklıdır. Bunlardan ampisilin Gram negatif basillere de etkilidir. Bir diğer sentetik penisilin olan metisilin (celbenin)

asitlere dayanıksızdır, fakat penisilinazeye dayanıklıdır. Bundan dolayı penisilinaze enzimi ile penisiline mukavemet gösteren *Staphlococcus aureus'*un sebep olduğu infeksiyonlarda kullanılır. Kloksasilin'in dahil bulunduğu izoksazolil penisilinler de penisilinazeye dayanıklıdr.

Bir *Cephalosporium* türünden elde edilen Sefalosporin N, C ve P isimleri verilen 3 antibiyotik penisiline benzer yapıdadırlar. Gram Pozitif koklardan başka *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis'e* de etkilidir.

Tablo 1 : Mantarlardan elde edilen antibiyotikler

Antibiyotik	Elde edilen mantarlar	Etikili olduğu mikroorganizmalar
Penicilin	*Penicillium notatum*	Gram +koklar, Gram –koklar *Bacillus anthracis, Anaplasma bovis, Corynebacterium sp., Clostridium sp.*
Streptomycin	*Streptomyces griseus*	Streptokoklar, pnömokoklar, *Neisseria gonorrhoeae Gram – bakteriler, Mycobacterium tuberculosis*
Chloramphenicol	*Streptomyces venezuelae*	Gram + koklar, Gram – koklar, *Clostridium sp., Corynebacterium diphteriae. Bacillus anthracis, Anaplasma bovis,* Gram – çomaklar, *Borrelia sp., Treponema sp.*, Riketsiyalar, *Psittacus lymphogranuloma* grubu viruslar

Tetracycline	*Streptomyces texas*	Gram + koklar, Gram – koklar ,Gram + çomaklar , *Anaplasma bovis*, *Proteus sp. ve Pseudomonas* sp. hariç Gram – çomaklar, spiril ve Spiroketler, Riketsiya ve büyük viruslar .
Chlortetracycline	*Streptomyces aureofaciens*	Gram +koklar,Gram – koklar ,Gram + çomaklar, *Anaplasma bovis*, *Proteus sp*. ve *Pseudomonas sp*. hariç Gram – çomaklar, spiril ve Spiroketler, Riketsiya ve büyük viruslar .*Entomoeba histolytica*
Oxytetracycline	Streptomyces rimosus	Gram +koklar,Gram – koklar ,Gram + çomaklar , *Anaplasma bovis*, *Proteus sp.* ve *Pseudomonas sp*. hariç Gram – çomaklar,spiril ve Spiroketler,Riketsiya ve büyük viruslar .*Entomoeba histolytica*
Demethylchlor tetracycline	*Streptomyces aureofaciens'in mutant suşu*	Gram +koklar, Gram – koklar ,Gram + çomaklar *,Anaplasma bovis*, *Proteus sp.* ve *Pseudomonas sp.* hariç Gram – çomaklar,spiril ve Spiroketler,Riketsiya ve büyük viruslar .*Entomoeba histolytica*
Erythromycin	*Streptomyces erythreus*	Gram + koklar, bazı Gram – koklar, Clostridium sp., *Corynebacterium sp.*, *Bacillus anthracis*, *Haemophilus sp*., *Brucella sp*.,*Borrelia sp*., *Leptospira icterohemoeehaglae, Rickettsia akari, Entomoeba histolytica*

Magnamycin (Carbomycin)	*Streptomyces haistedii*	Gram +koklar, bazı Gram – koklar, *Corynebacterium diphteriae*, Bazı Riketsiyalar ve büyük viruslar, *Entomoeba histolytica*
Oleandomycin	*Streptomyces antibioticus*	Gram +koklar, *Neisseria meningitidis* hariç Gram – koklar, *Haemophilus influenzae , Rickettsia akari*
Neomycin	*Streptomyces fradiae*	Gram +bakteriler(Clostridium sp. hariç)Gram – bakteriler ,*Borrelia sp. , L.icterohemorrhagiae. Mycobacterium tuberculosis*
Framycetin (Neomycin B)	*Streptomyces decaris (Streptomyces lavendulae)*	Enterokok hariç Gram +koklar, Gram –koklar, *Haemophilus pasteurella* ve *Vibrio sp*. hariç Gram negatif bakteriler, *Mycobacterium tuberculosis*
Viomycin	*Streptomyces puniceus*	*Mycobacterium tuberculosis*
Kanamycin	*Streptomyces kanamyceticus*	*Staphylococcus aureus,* Enterobakteriler, *Vibrio cholerae, Mycobacterium tuberculosis*
Spiramycin	*Streptomyces ambofaciens*	Gram + koklar, *Neisseria gonorrhoeae,* Riketsiyalar
Novobiocin	*Streptomyces spheroides*	Gram +koklar, Gram – koklar, *Corynebacterium diphteriae, Bacillus anthracis, Haemophilus sp., Pasteurella sp., Proteus sp., Entomoeba histolytica*

Vancomycin	*Streptomyces orientalis*	*Gram + bakteriler*
Cycloserine	*Streptomyces orchidaceus*	*Stafilococcus sp., Streptococcus sp., Corynebacterium diphteriae, Escherichia coli. Mycobacterium tuberculosis*
Fumagillin	*Aspergillus fumigatus*	*Entomoeba histolytica*

Neomycin	*Streptomyces fradiae*	Gram+bakteriler (*Clostridium sp* .hariç), Gram – bakteriler , *Borrelia sp., Leptospira icterohemorrhagiae, Mycobacterium tuberculosis*
Framycetin (Neomycin B)	*Streptomyces decaris (Strep.lavendulae)*	Enterokok hariç Gram +koklar, Gram –koklar, *Haemophilus pasteurella* ve *Vibrio sp.* hariç Gram negatif bakteriler , *Mycobacterium tuberculosis*
Viomycin	*Streptomyces puniceus*	*Mycobacterium tuberculosis*
Kanamycin	*Streptomyces kanamyceticus*	*Staphylococcus aureus,* Enterobakteriler, *Vibio cholerae, Mycobacterium tuberculosis*
Spiramycin	Streptomyces ambofaciens	Gram + koklar, *Neisseria gonorrhoeae,* Riketsiyalar
Novobiocin	*Streptomyces spheroides*	Gram +koklar, Gram – koklar, *Corynebacterium diphtheriae, Bacillus anthracis, Haemophilus sp.*, *Pasteurella sp.,Proteus sp., Entamoeba histolytica*

Vancomycin	*Streptomyces orientalis*	*Gram + bakteriler*
Cycloserine	*Streptomyces orchidaceus*	*Stafilococcus sp., Streptococcus sp., Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis*
Fumagillin	*Aspergillus fumigatus*	*Entamoeba histolytica*

Fusidik asit, *Fusidium coccineum*'dan elde edilen bir antibiyotiktir. Fusidin bunun sodyum tuzudur. Kimyasal yapısı sefalosporin P'ye benzer. Gram + ve Gram – koklar, *Corynebacterium diphtheriae* ve *Clostridium*'lara etkilidir.

Streptomyces cinsinden Streptomisin dışında kimyasal yapısı ve antibakteriyel spektrumu bu antibiyotiğe benzeyen Neomisin, Kanamisin, Paramomisin, Framisetin antibiyotikleri de elde edilmiştir.

Tetrasiklin grubunda tetrasiklin, klortetrasiklin oreomisin), oksitetrasiklin (terramisin), ve demetilklortetrasiklin vardır. Bunlardan başka pirolidinometil tetrasiklin, tetrasiklin -1- metilen –lizin ve 6-metilen oksitetrasiklin gibi yeni bileşikler bulunmuştur.

Eritromisin grubu veya makrolid grupta eritromisin , oleandomisin, spiramisin , karbomisin (magnamisin), ostreogrisin vardır.

Polipeptid antibiyotikler grubunda gramisidin, polimiksinler, basitrasin bulunmaktadır.

Antifungal antibiyotikler mantarlara karşı kullanılır. Çok kullanılanlar siklohekzimid, nistatin, amfoterisin B, griseofulvin ,tenesetindir. Antifungal antibiyotiklerden bir grup

poliyen konjugasyon karakteristiği olan ultraviyole absorbsiyon spektrumu verirler. Bunlara poliyen antibiyotikler denir. Poliyen antibiyotiklerden nistatin tetraen, amfoterisin B heptaen ihtiva eder. Diğer poliyen antifungal antibiyotiklerden pimarisin tetraen, askosin, kandisidin, kandidin, perimisin ve trikomisin heptaen ihtiva ederler.

Tümör hücrelerini inhibe eden antibiyotikler de vardır. Aktinomisin, azoserin ve DON bu çeşit antibiyotiklerdir (Çetin, 1965).

F. ANTAGONİZM

Antagonizm ve antibiosis terimleri bir mikroorganizmanın diğeri üzerinde büyüme ve faaliyetlerinin azalması ile sonuçlanan etkileri tanımlamak için kullanılmaktadır. Antibiosis, fizyolojik karakteristiklerde ve morfolojide ve bir virulansın azalmasında geçici veya sabit bir durum ortaya çıktığında kullanılır. İki organizma aynı ortam üzerinde büyütüldüklerinde birisi diğerini ekseriye ezecek ve hatta onu öldürecektir. Bu antagonistik faaliyetler rekabete veya birinin besin maddelerini diğerinden daha iyi bir şekilde tüketmesine dayanır.

Bir çok antagonizm tipleri mevcuttur:

1. **İnvivo** içinde antagonizm,**invitro** içinde antagonizm
2. Bakteriostatik veya fungustatik, bakterisidal veya fungisidal etkiler.
3. İşlev antagonizması,büyüme antagonizması.
4. Doğrudan ve dolaylı antagonizma
5. Bir yanlı veya iki-yanlı antagonizma.
6. İzoantagonizm ve heteroantagonizm, veya aynı türün suşları arasında antagonizma ve farklı türler arasında antagonizma.
7. Litik olay ile antagonizma.

Antagonizmanın en iyi ve en belli olanları toksinler, lizinler veya bakteriolisinler olarak adlandırılan antibiyotik üretmeye dayananlarıdır. Bu maddeler fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri bakımından birbirlerinden çok fark ederler. Bunlardan bazıları

kaynatıldıklarında veya ışığa maruz bırakıldıklarında tahrip oldukları halde, diğerleri ışı ve ultraviyole ışınlara karşı dirençlidirler. Bazıları suda çözünür; diğerleri suda çözünmez, fakat özel çözücülerde çözünür. Bazıları hayvanlar için, çok zehirli oldukları halde, bazıları da nispeten zehirsizdirler.

Toprak, su çukurları ve kompostalar, antagonistik organizmaların özellikle Actinomycete'lerin ana kaynaklarını oluştururlar. Antagonistik organizmalar tarafından antibiyotiklerin üretimi mutlaka başka organizmaların onların yanında bulunmalarını gerektirmez. Toprak zenginleştirilemez ve bundan dolayı, başlangıçta antibiyotik çıkaran suşları tahrik etmek için başka organizmalara gereksinim olduğu sanılmıştır. Esasında, onlar birbirlerinden adaptasyon olayını sergileyen enzimatik prosesler, veya nitrifiye eden veya nitrojen fikze eden bakterilerin gelişimi ile birbirinden ayrılırlar. Azot fikse eden bakterilerden azotu fikse etmesinden bir organizma doğrudan yararlanır. Antibiyotik oluşumu ile besin maddelerinin parçalanması, oksidasyonu ve azot fiksasyonu arasında bir korelasyon yoktur.

G.ANTİBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL ARAŞTIRMA İNCELEMELERİ

Antibiyotik üretme kapasitesine sahip mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılan işlemlerden bir tanesi dışardan gelen bir madde ile, genellikle tozla enfekte olmuş bakteriyel plakların incelenmesine dayanır. Burada kontaminant biraz büyüdüğünde etrafında açık bir zon oluşur. Bu zonun içinde bakteriyel büyüme önlenir. İşte bu Alexander Fleming'in küften penisilin üretmede ilk defa gördüğünün temelini oluşturur. Diğer yöntem ise çeşitli organizmaların doğal maddelerden izole edilerek onların agar çizgi yöntemi ile çeşitli bakteri ve fungusların büyümelerinin inhibe edilip edilmediğinin testinden başka bir şey değildir. Waksman ve Woodruff (1940) tarafından bu ikinci işlem uygulanarak elde edilmiştir(Öner, 1989).

Bu araştırma; antimikrobiyal aktivite çalışmalarının önemini vurgulamak, yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarına katkıda bulunmak ve belirli fungus türlerinin, bazı bakteri türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini incelemek amacıyla yapılmıştır. Makrofunguslar ve mikrofungusların bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite çalışmaları oldukça önem taşıyan ve gündemde olan çalışmalar arasındadır. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları pek çok şekilde yapılmaktadır. Örneğin; Bitkilerden

elde edilen ekstrelerin mantar ve bakterilere karşı etkileri, mantarlardan elde edilen ekstraktların, bakterilere ya da diğer mantarlara karşı etkileri ve bakterilerden elde edilen antimikrobiyal maddenin yine bakterilere etkileri gibi bir çok çalışma mevcuttur. Fleming (1929), White ve Hill (1942), Wang ve arkadaşları (1972), Dülger ve arkadaşları (1999), Raaijmakers ve arkadaşları (2002), Santamarina ve arkadaşları (2002), Jonathan ve Fasidi (2003), Yılmaz ve arkadaşları (2003), Imtiaj ve Lee (2007), Wang ve arkadaşları (2007), Demirhan ve arkadaşları (2007),Sano ve arkadaşları (2007), Fagade ve Oyelade (2009), Gesheva (2010) yıllarında makrofungus, mikrofungus ve likenlerde antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapmıştır. Yapılan çalışmalarda kullanılan mantarlar ve mantarların etkisinin incelendiği bakteriler farklıdır. Bu araştırma çalışmasında kullanılan çelik silindirlerle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışması, genellikle antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan Disk Difüzyon yöntemine alternatif olarak kullanılabilecek bir yöntem olmuştur. Böylece bu çalışma şimdiye kadar yapılan metodlara ilaveten farklı metod kullanımıyla farklılık sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan yöntem ile bir çok mikrofungus türünün bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Gelecekte yeni çalışmalar için öncülük edebilecek bu çalışmalar önem arz etmektedir. Böylece çeşitli yerlerden izole edilen mantar türleri teşhis edilip, tür düzeyinde tanımlandıktan sonra bazı bakteri türleri üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışmalarıyla desteklenip daha geniş kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilebilecektir.

MATERYAL VE METOD

Test mikroorganizmaları:

Bu tezde kullanılan bakteri örnekleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Bilimler Mikrobiyoloji bölümüne ait standart suş koleksiyonundan ve Deva İlaç Mikrobiyoloji Laboratuarından temin edilmiştir. Araştırmada; *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 P, *Stapylococcus epidermidis* ATTC 12228, *Bacillus subtilis* ATTC 6633 , *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027 ve *Salmonella sp*. ATTC 14028 standart suşları kullanılmıştır.

Mikrofunguslar:

Bu tezde kullanılan mikrofungus örnekleri Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji laboratuarından temin edilmiştir. Kullanılan mikrofungus örnekleri havadan izole edilip Araştırma Görevlisi Dr. Burhan ŞEN tarafından teşhis edilmiştir.

Araştırmada *Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Aspergillus wentii, Trichothecium roseum* ve *Penicillium digitatum* türleri kullanılmıştır.

Mikrofungusların ekstraksiyonu:

PDA (Merck) besiyerinde 7 günlük inkübasyonu dolmuş mikrofungus örneklerinden Thoma lamıyla ml'sinde 10^8 spor olacak şekilde sayılmıştır. İçinde 100 ml PDB bulunan 500 cc'lik erlenmayer içine her bir mikrofungus için 1 ml konulmuştur. Sıvı Potato Dekstrakt ortamının içeriği: litrede gr olarak Dextrose (20.0 gram), Peptone (5.0 gr.), KH_2PO_4 (1.0 gr.), $MgSO_4.7H_2O$ (0.5 gr.), NaCl (5.0 gr.) dır. Daha sonra 28 ˚C' de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonu dolmuş mikrofungus kültürlerini içeren PDB'ler, daha sonra Whatman No 4 kağıdıyla miselyumlardan filtrasyon yardımıyla ayrılmıştır. Kültür süpernatantları 50 cc'lik diklorometan ile 3 kez yıkanarak ekstrakte edilmiştir. Ayırma hunisiyle besiyerinden uzaklaştırılan diklorometanlar evaporatör balonlarına alınıp, evaporasyon

aletiyle azot gazı altında uçurulmuştur. Böylece muhtemel antimikrobiyal maddeler evaporatör balonunun alt kısmında kristal halinde kalmıştır. Bu kristal halindeki antimikrobiyal maddelere 10 ml aseton koyulmuş bir sonraki aşama için hazır hale getirilmiştir. **(**Santamarina ve ark.)

Antimikrobiyal aktivite için 2 farklı yol kullanılmıştır:

1. Disk Difüzyon Yöntemi (Kirby-Bauer Yöntemi):

Bakteriyal gelişimin inhibisyonuna dayalı bu yöntemde Nutrient Broth (Merck) besiyerlerinde 1 ml'sinde 0.5 Mac Farland (10^8 CFU /ml) bulanıklığında hazırlanan test mikroorganizmaları kullanılmıştır. Sıcaklığı 45-50 ˚C'ye ayarlanmış 100 ml besiyerinin üzerine test mikroorganizması süspansiyonları ayrı ayrı ilave edilmiştir. Mikroorganizmanın besiyeri içinde homojen bir şekilde dağılması için karıştırılmıştır. Besiyerleri 9 cm çapındaki petrilere 20 ml olacak şekilde aktarılmıştır.

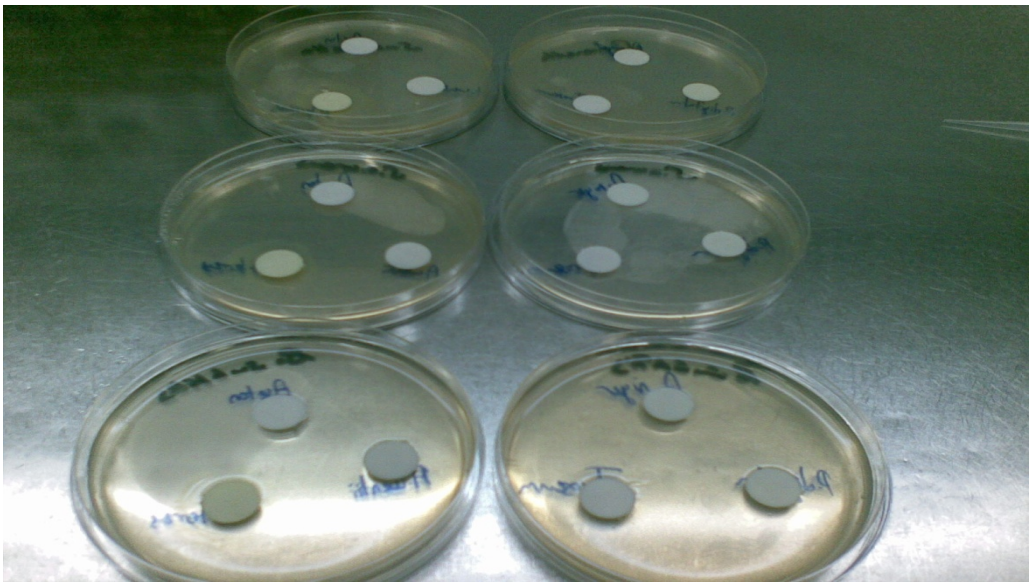
Daha sonra 13 mm'lik kağıt disklere (BD,Blank Paper Discs,13 mm), küflerden elde edilen maddeler 50 ve 100 mikrolitre emdirilip test mikroorganizmalarına karşı denenmiştir. Zonların karışmaması için aynı petride en fazla 4 kağıt disk kullanılmıştır. Kontrol olarak 50 ve 100 mikrolitre aseton kağıt disklere emdirilip denenmiştir. Tüm test mikroorganizmalarına karşı yapılan antimikrobiyal aktivite deneyleri 3 paralel çalışılmıştır. 37˚C'de 24 saat inkübe edilen petrilerde oluşan zonlar kaydedilmiştir (Şekil 1). Aynı zamanda pozitif kontrol için Piperasilin ve Lorafloksasin antibiyotikleri kullanılmıştır.

2.Çelik silindirler kullanılarak yapılan yöntem:

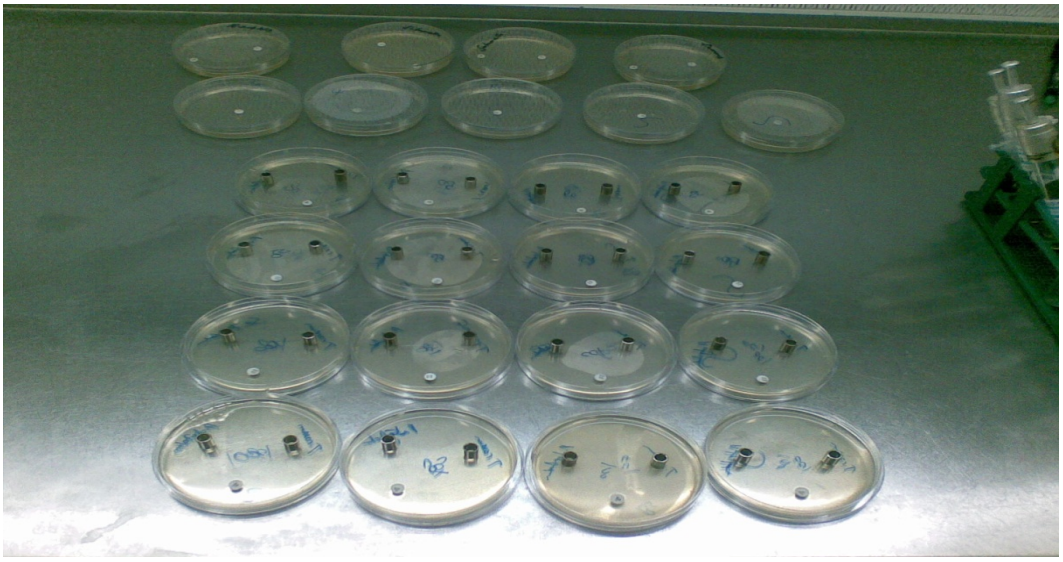
Antimikrobiyal çalışmalarda oluşacak zonun iyice görülebilmesi için, olabildiğince küçük mm'lik diskler kullanılmalıdır. Antibiyogram çalışmalarında kullanılan antibiyotiklerin disk çapı 5 mm'dir. Bu yüzden bu çalışmada 5 mm'lik disk tedarik edilemediğinden bu diskin yerini tutacak 5 mm çapında çelik silindirler kullanılmıştır.

Disk difüzyon yöntemindeki aşamalar tekrarlanmış sadece diskler yerine çelik halkalar kullanılmıştır. Kontrol için çelik halkalara 50 ve 100 mikrolitre aseton

koyulmuştur (Şekil 2). Aynı zamanda pozitif kontrol için Piperasilin ve Lorafloksasin antibiyotikleri kullanılmıştır.



Şekil 1-Disk Difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite araştırılması



Şekil 2-Çelik halkalar kullanılarak antimikrobiyal aktivite araştırılması

BULGULAR

Müeller-Hinton Agar besiyeri (Oxoid) kullanılarak ölçülen inhibisyon zonları sonrasında 5 farklı mikrofungusun 5 farklı bakteriye karşı antimikrobiyal aktiviteleri ve pozitif kontrol için kullanılan antibiyotiklerin oluşturduğu zonlar, negatif kontrol olarak çözgenin (aseton) oluşturabileceği zonlar ölçülmüştür (Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6 ve Tablo 7). Yapılan ölçümler sonrası 3 kez tekrarlanan petrilerde oluşan zonların ortalaması alınarak ortalama antimikrobiyal aktivite hesaplanmıştır.

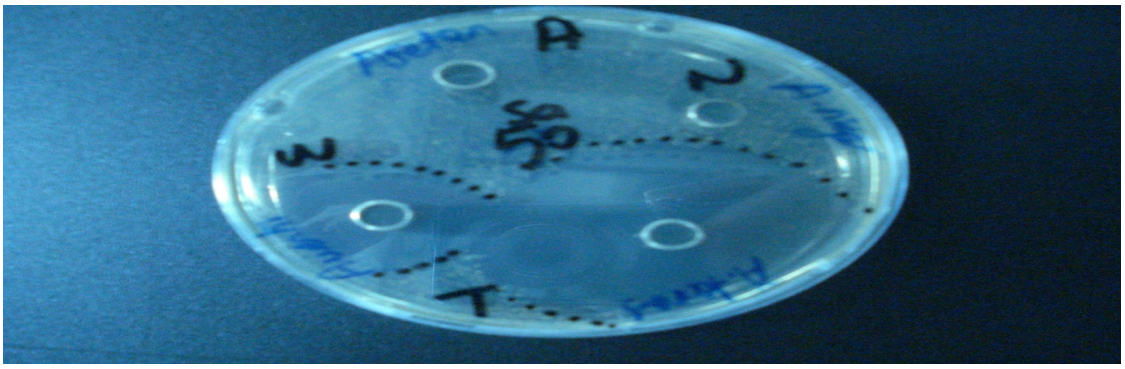
Tablo 2 – Çelik Halka yöntemiyle 100 µl'e göre milimetrik bulgular

Çelik Halka yöntemi	***Staphylococcus aureus*** ATTC 6538 P	***Staphylococcus epidermidis*** ATTC 12228	***Bacillus subtilis*** ATTC 6633	***Salmonella sp.*** ATTC 14028	***Pseudomonas aeruginosa*** ATTC 9027
Aspergillus niger	-	-	-	-	-
A. wentii	33.3 mm	23.9 mm	36.2 mm	27.2 mm	-
A . terreus	54.2 mm	47.7 mm	49.2 mm	13.3 mm	-
Penicillium digitatum	37.3 mm	28.4 mm	-	-	-
Trichothecium roseum	-	-	-	-	-
Aseton	-	-	-	-	-
Piperasilin	58.1 mm	43.3 mm	51.1 mm	19.1 mm	43.2 mm
Lorafloksasin	37.2 mm	54.2 mm	64.2 mm	-	40.1 mm

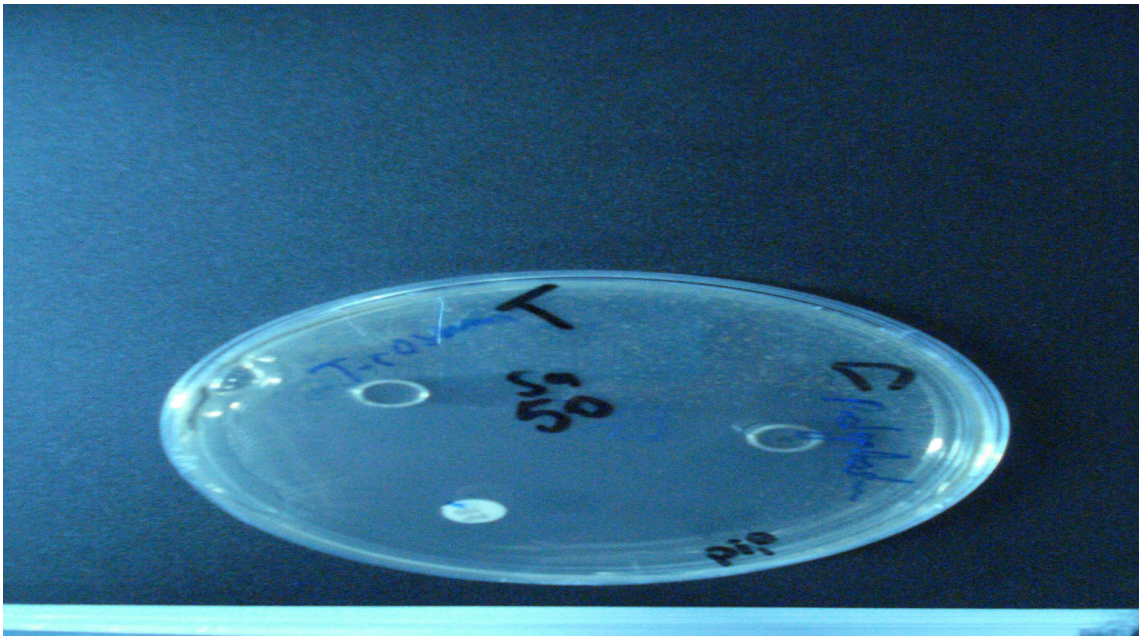
Tablo 3 – Çelik Halka yöntemiyle 50 µl'e göre milimetrik bulgular

Çelik Halka yöntemi	***Staphylococcus aureus*** ATTC 6538 P	***S.epidermidis*** ATTC 12228	***B.subtilis*** ATTC 6633	***Salmonella sp.*** ATTC 14028	***Pseudomonas aeruginosa*** ATTC 9027
Aspergillus niger	-	-	-	-	-
A. wentii	32.3 mm	23.9 mm	29.1 mm	22.4 mm	-
A. terreus	51.3 mm	43.6 mm	43.3 mm	-	-
Penicillium digitatum	27.2 mm	22.1 mm	-	-	-
Trichothecium roseum	-	-	-	-	-
Aseton	-	-	-	-	-

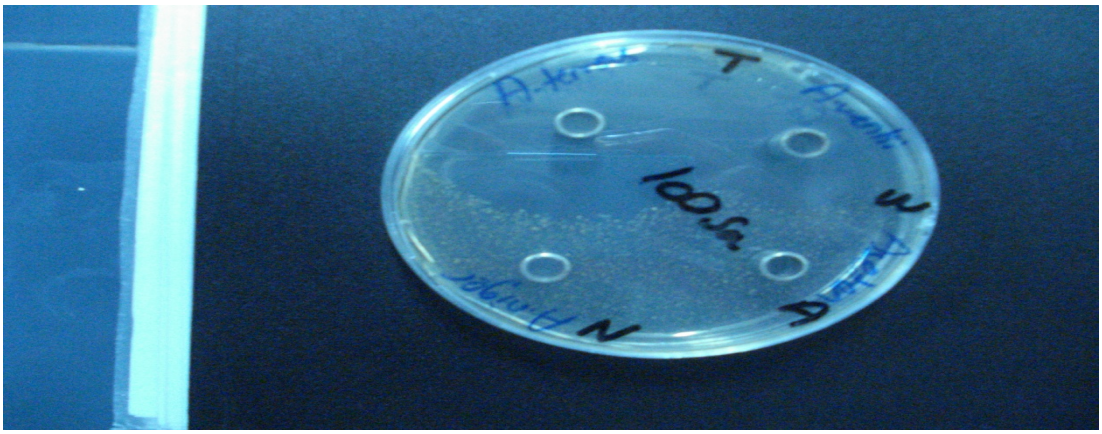
Çelik Halka yöntemiyle yapılan deneylerde *Aspergillus wentii, Aspergillus terreus* ve *Penicillium digitatum* mikrofungus türlerinden elde edilen antimikrobiyal maddelerin standart suşlara etkileri gözlenmektedir. Şekil 3(a-d), şekil 4(a-d), şekil 5(a-d),şekil 6(a-d),şekil 7.



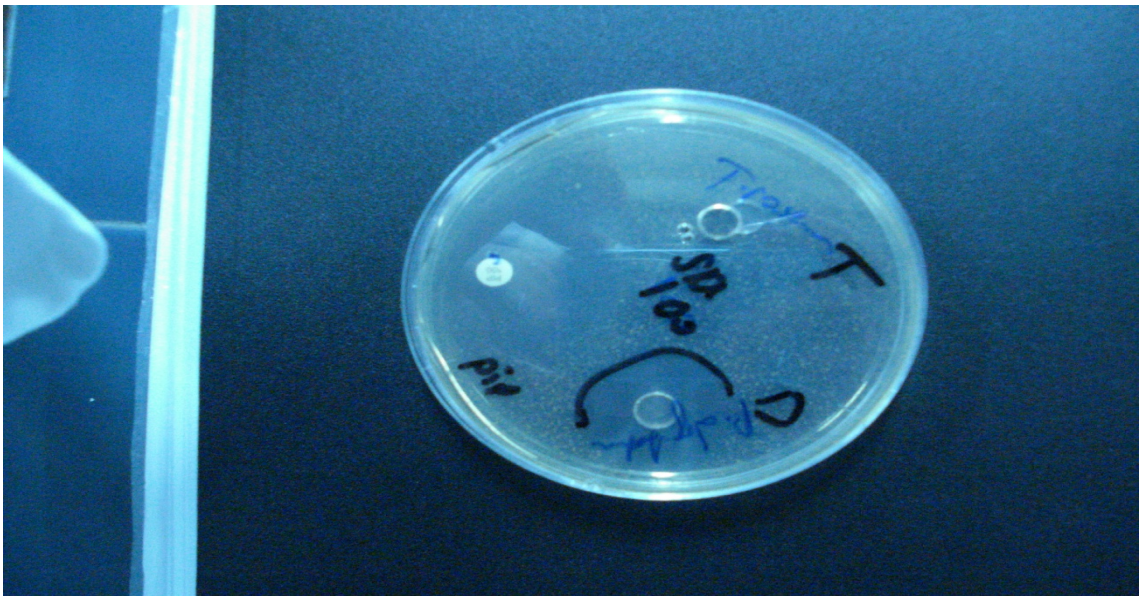
Şekil 3-a Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi



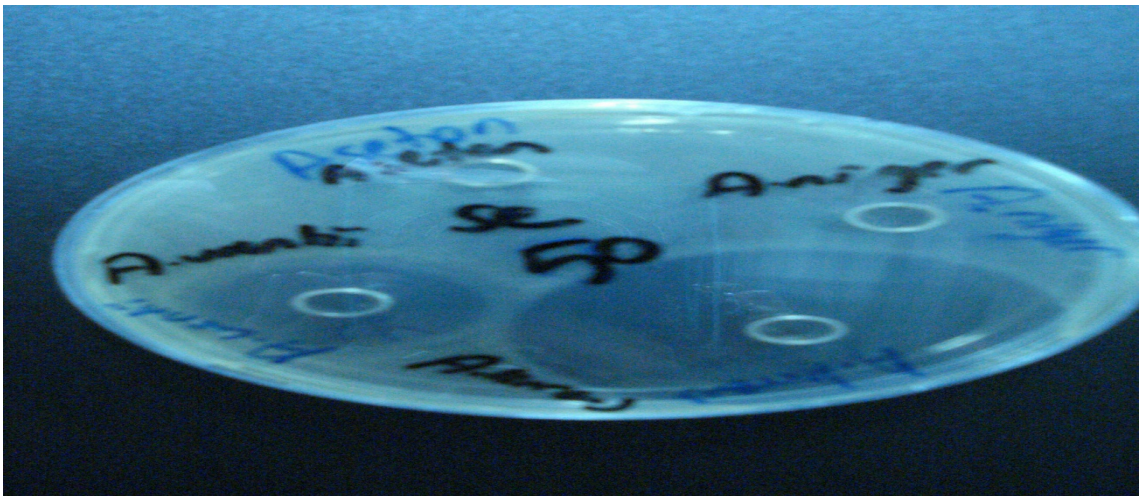
Şekil 3-b Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi



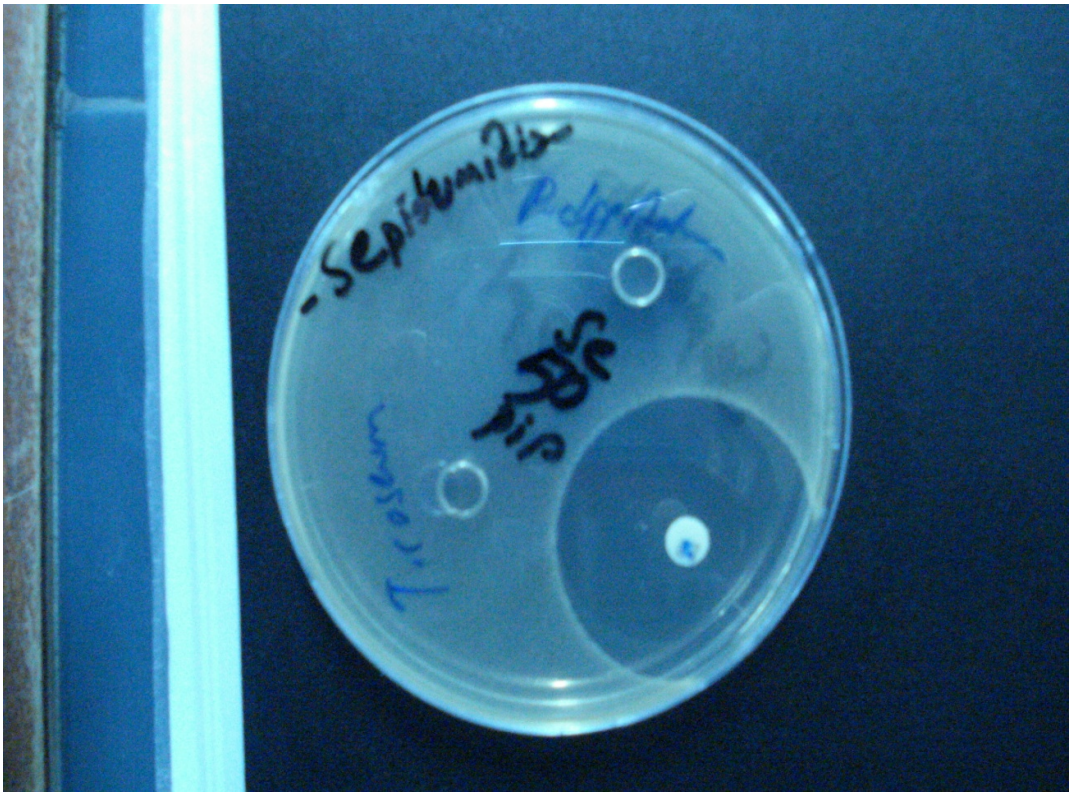
Şekil 3-c Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspetgillus terreus* ve *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi



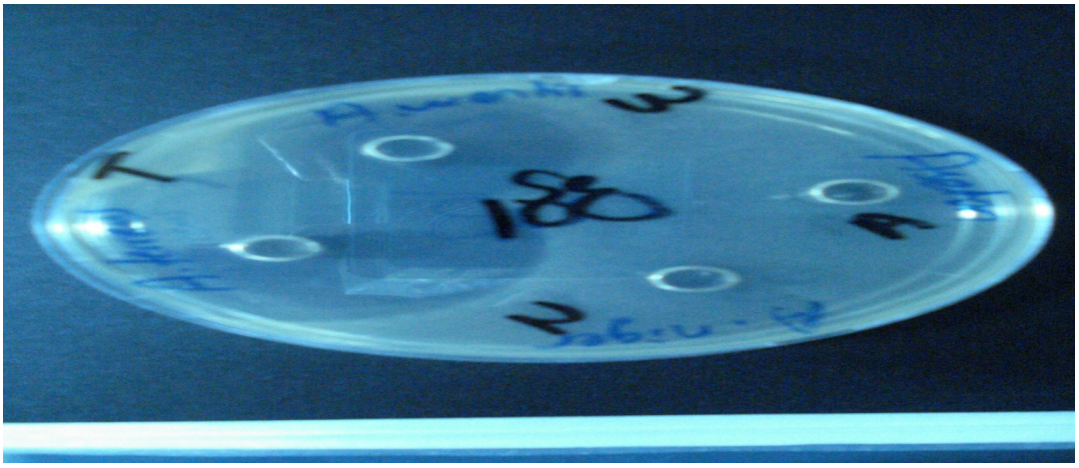
Şekil 3-d Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi



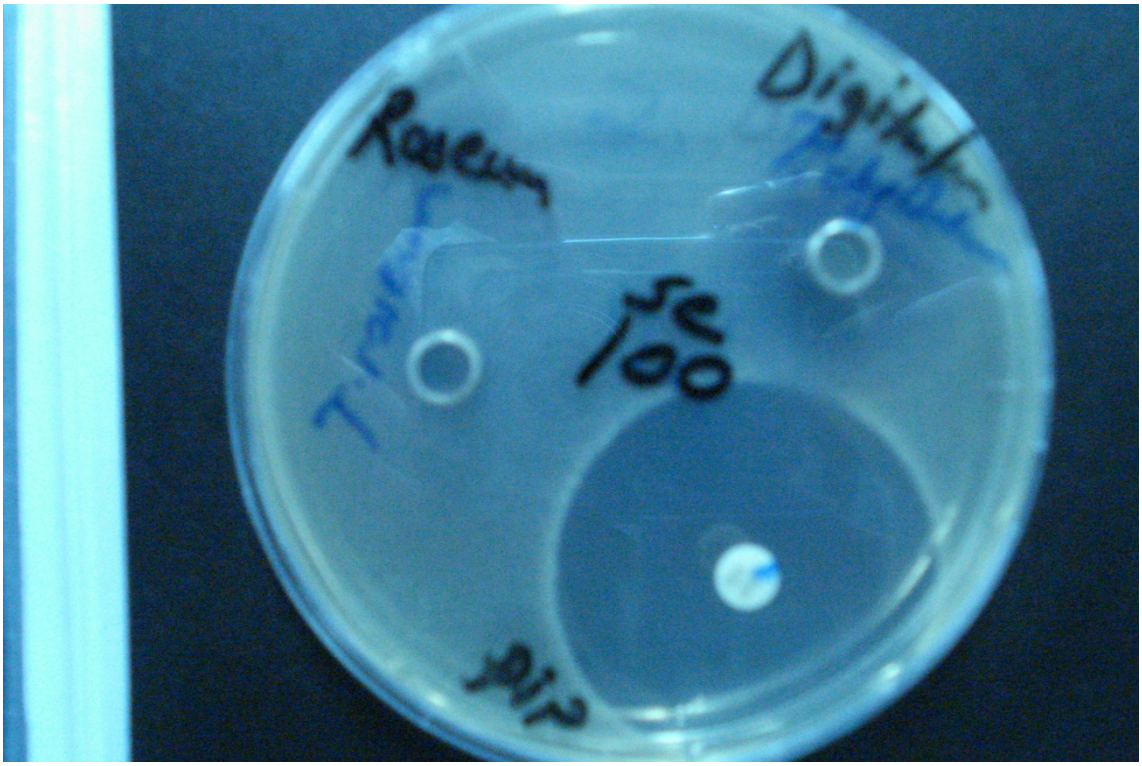
Şekil 4-a Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *Staphylococcus epidermidis'e* karşı antimikrobiyal etkisi



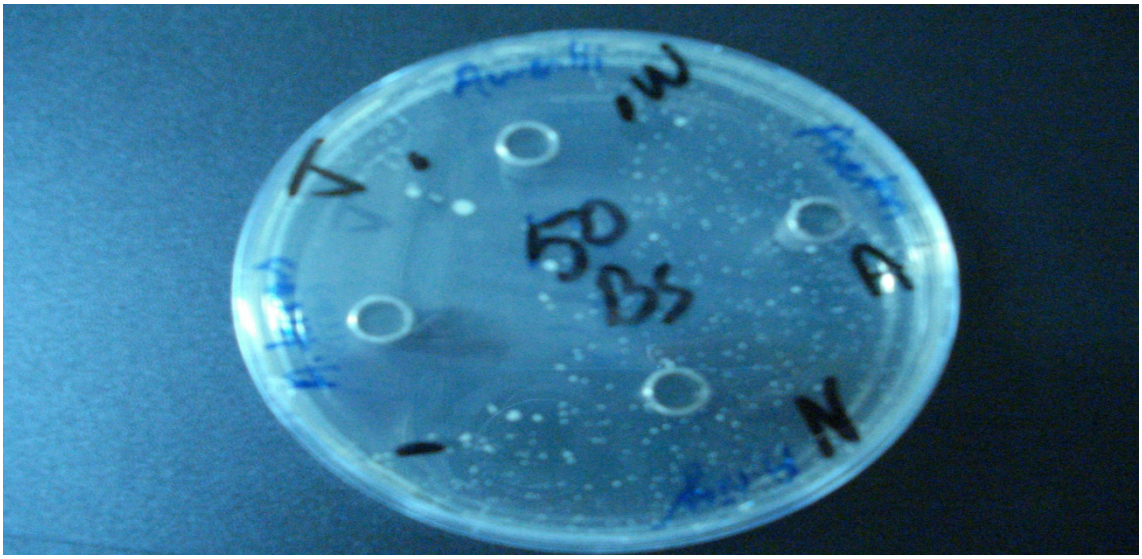
Şekil 4-b Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Staphylococcus epidermidis'e* karşı antimikrobiyal etkisi



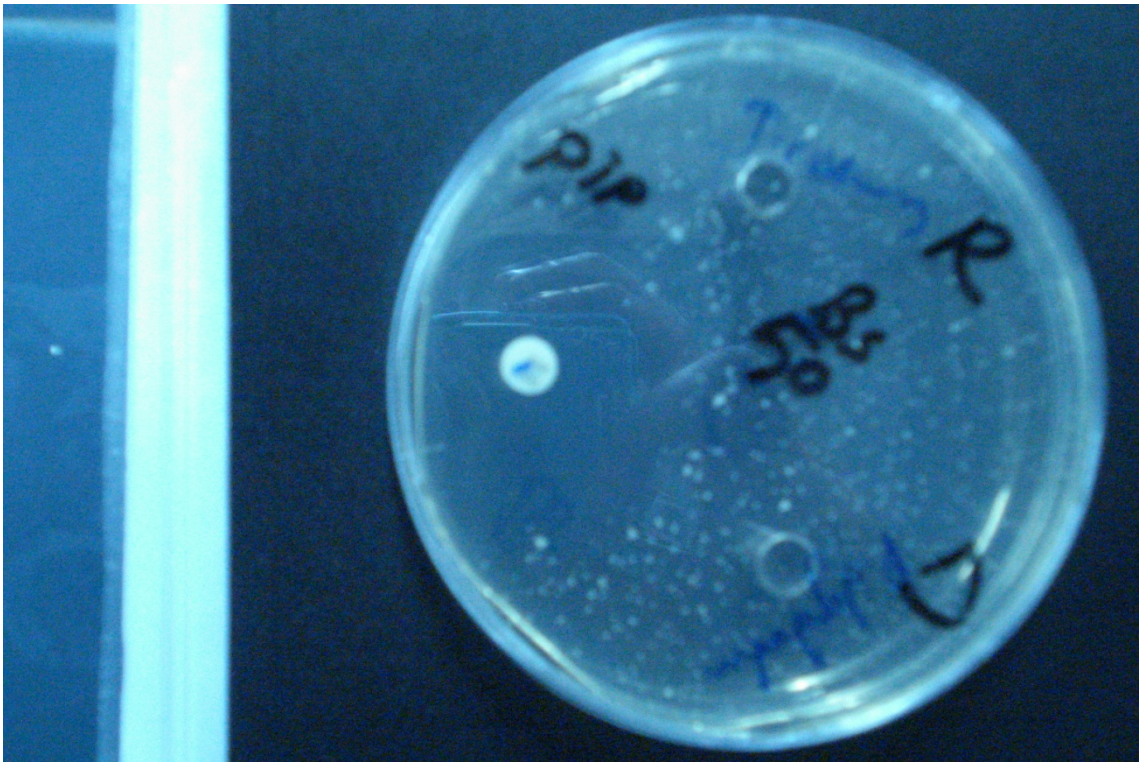
Şekil 4-c Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii'den* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl'sinin *Staphylococcus epidermidis*'e karşı abtimikrobiyal etkisi



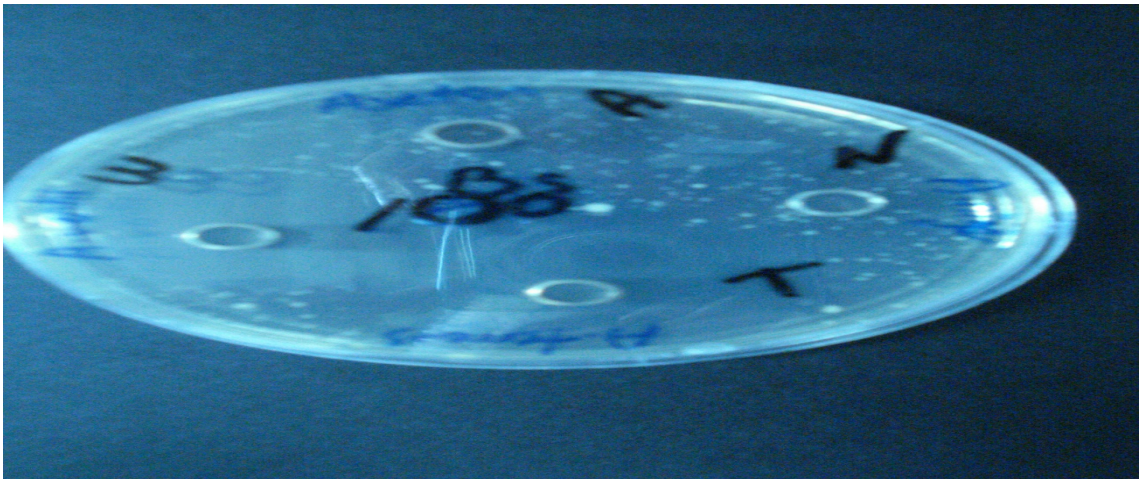
Şekil 4-d Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Staphylococcus epidermidis*'e karşı antimikrobiyal etkisi



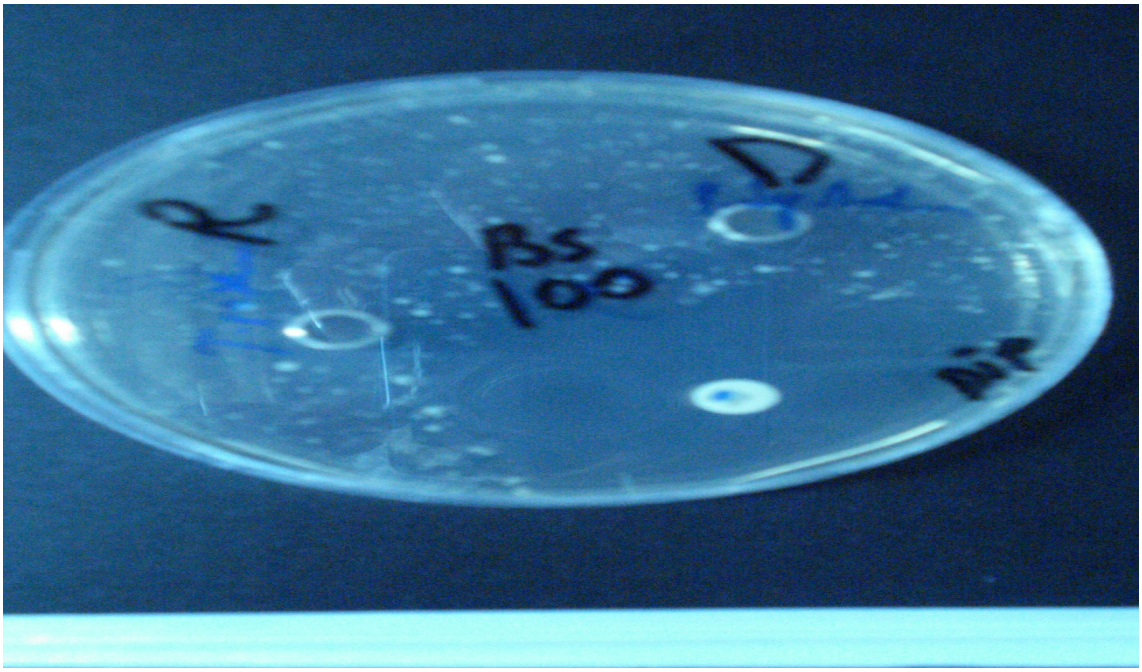
Şekil 5-a *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *Bacillus subtilis'e* karşı antimikrobiyal etkisi



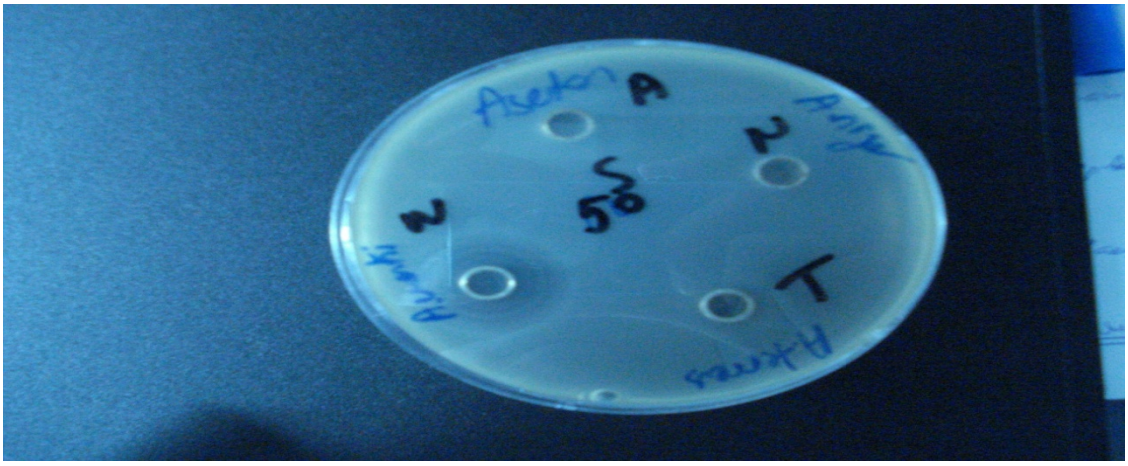
Şekil 5-b Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Bacillus subtilis'e* karşı antimikrobiyal etkisi



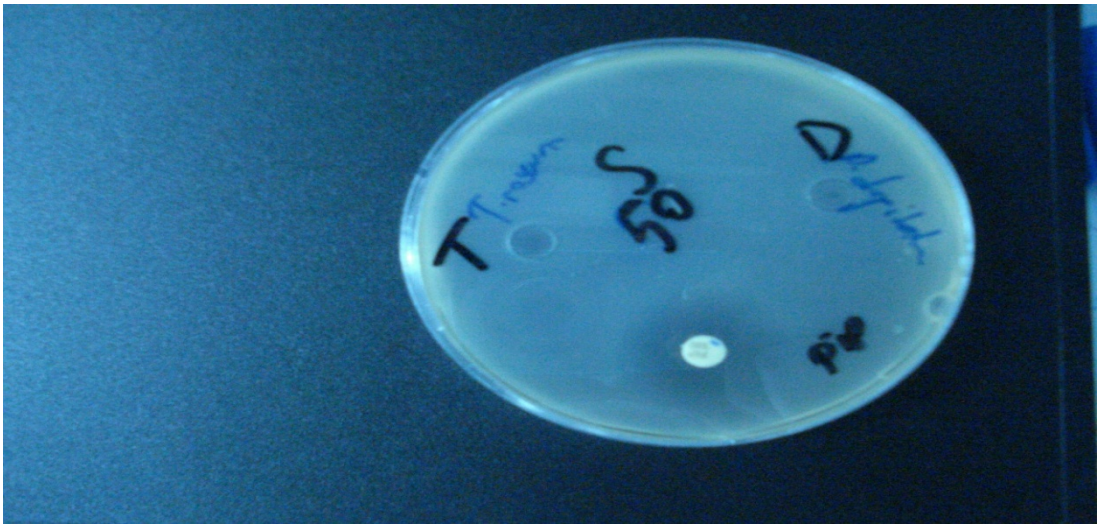
Şekil 5-c Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii'den* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *Bacillus subtilis*'e karşı antimikrobiyal etkisi



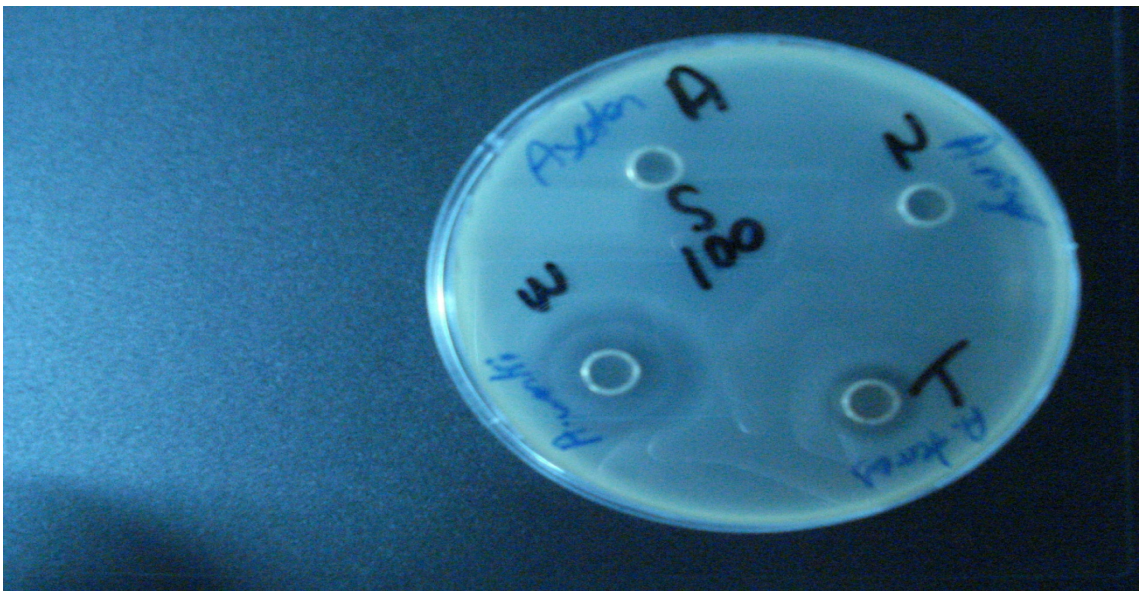
Şekil 5-d Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Bacillus subtilis*'e karşı antimikrobiyal etkisi



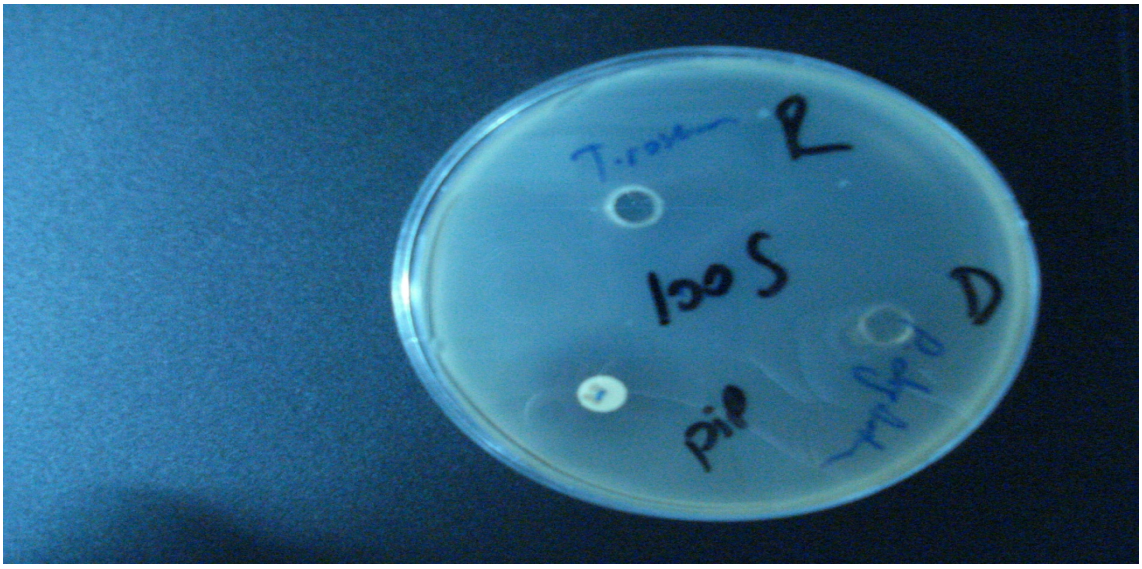
Şekil 6-a Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 50 µl 'sinin *Salmonella sp.'e* karşı antimikrobiyal etkisi



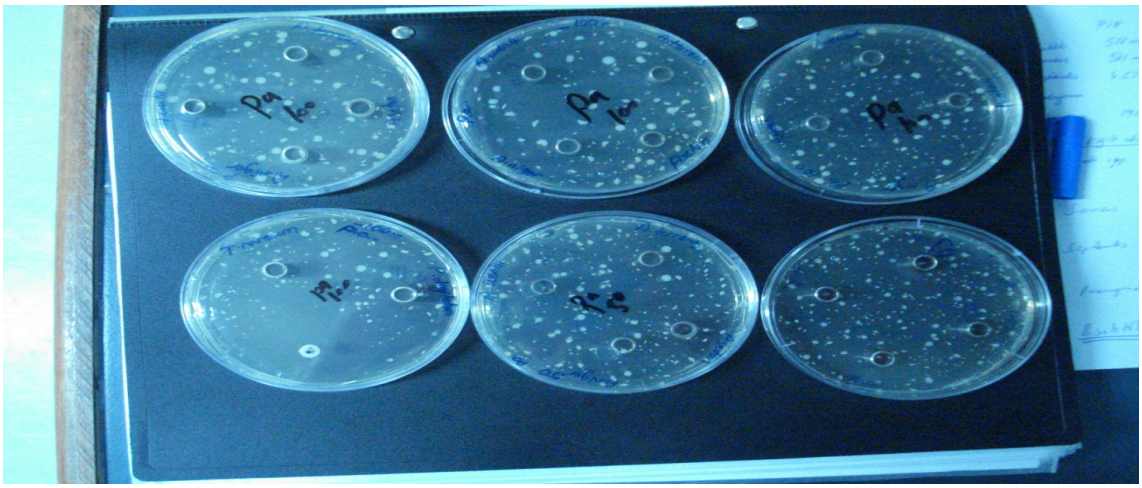
Şekil 6-b Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*, *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 50 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Salmonella sp.'e* karşı antimikrobiyal etkisi



Şekil 6-c Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus wentii'den* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve asetonun 100 µl 'sinin *Salmonella sp.'e* karşı antimikrobiyal etkisi

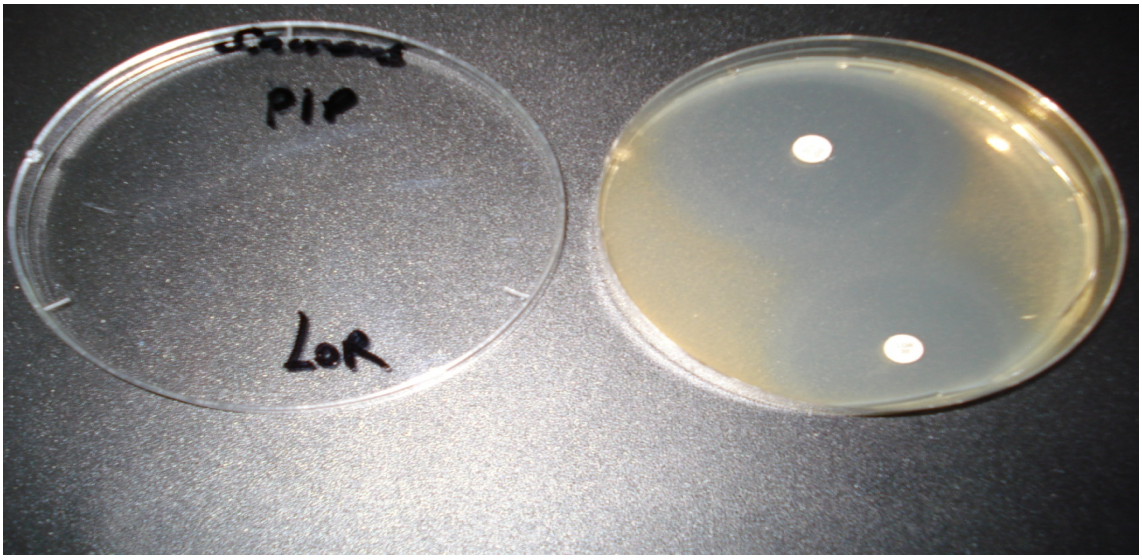


Şekil 6-d Çelik Halka yöntemiyle *Penicillium digitatum*,*Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddenin 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Salmonella sp.'e* karşı etkisi

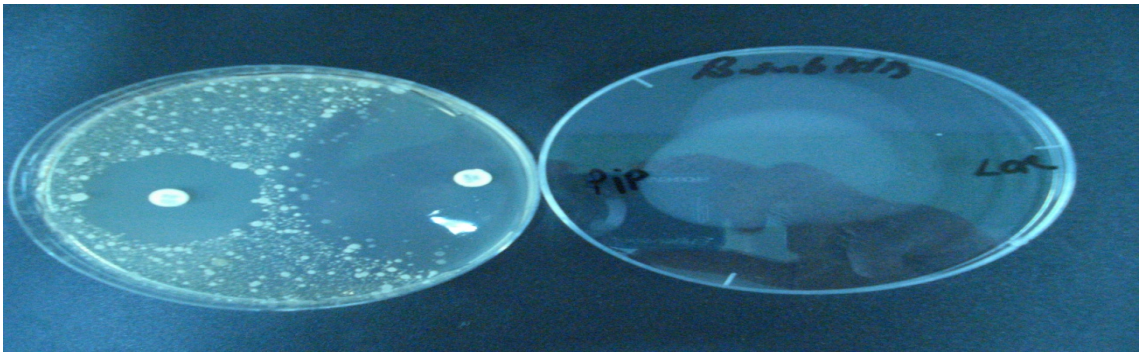


Şekil 7- Çelik Halka yöntemiyle *Aspergillus niger, Aspergillus wentii, Aspergillus terreus, Penicillium digitatum* ve *Trichothecium roseum*'dan elde edilen antimikrobiyal maddelerin ve asetonun 50 ve 100 µl'sinin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etkisi

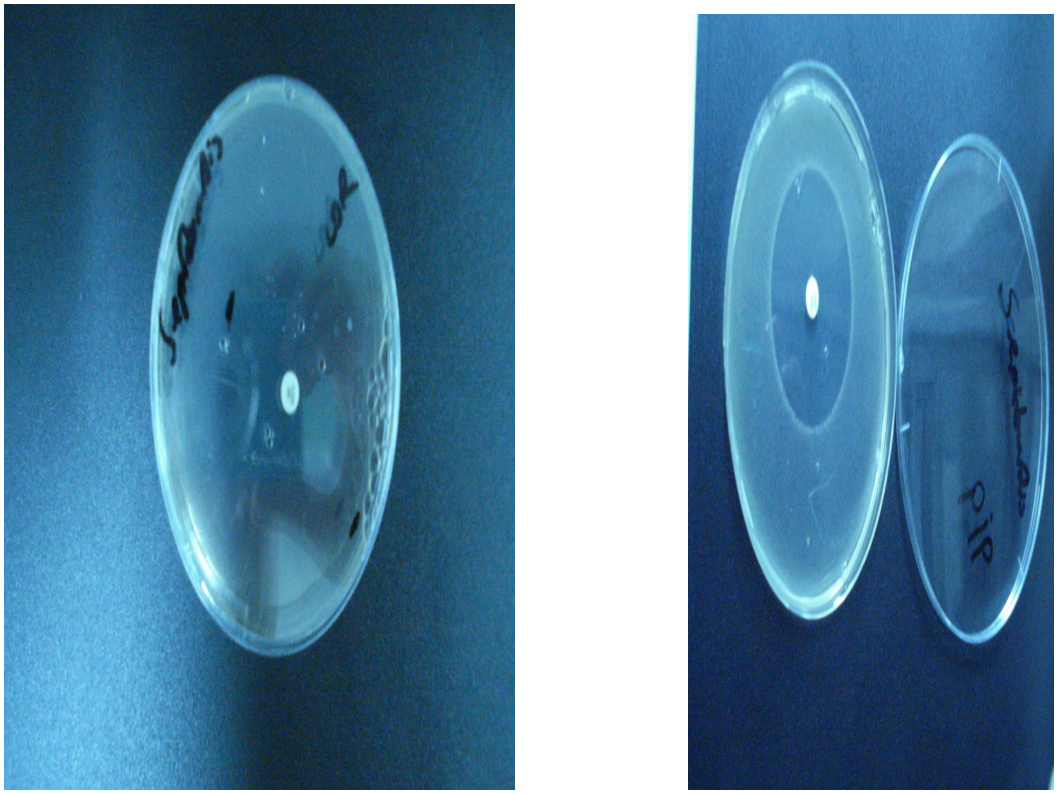
Yapılan çalışmalarda standart suşların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları için ayrı ayrı petrilere antibiyotikler koyulmuş, oluşan zonlar gözlenmiştir. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella sp*. standart suşları PIP'e (Piperasilin) ve *Salmonella sp*. hariç diğer 4 standart suş LOR'e (Lorafloksasin) karşı duyarlıdır (Şekil 8, Şekil 9,Şekil 10).



Şekil 8- *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 P bakterisinin PIP (Piperasilin) ve LOR (Lorafloksasin) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları



Şekil 9- *Bacillus subtilis* ATTC 6633 bakterisinin PIP (Piperasilin) ve LOR (Lorafloksasin) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları



Şekil 10- *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228 bakterisinin LOR (Lorafloksasin) ve PIP (Piperasilin) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları

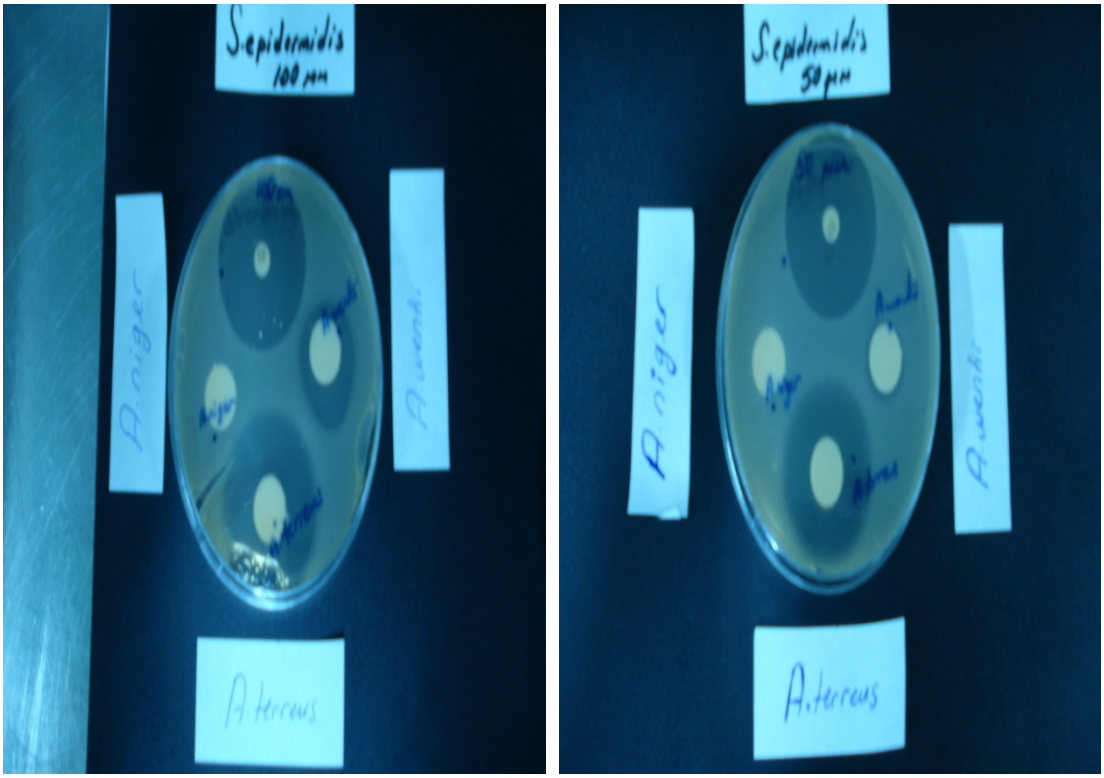
Tablo 4- Disk Difüzyon yöntemi ile 100 µl'e göre milimetrik bulgular

Disk Difüzyon yöntemi	***Staphylococcus aureus*** ATTC 6538 P	***S.epidermidis*** ATTC 12228	***B.subtilis*** ATTC 6633	***Salmonella sp.*** ATTC 14028	***P.aeruginosa*** ATTC 9027
Aspergillus niger	-	-	-	-	-
A. wentii	24.1 mm	24.2 mm	32.3 mm	21.1 mm	-
A. terreus	42.2 mm	37.2 mm	41.1 mm	22.1 mm	22.1 mm
Penicillium digitatum	-	-	-	-	-
Trichothecium roseum	-	-	-	-	-
Aseton	-	-	-	-	-

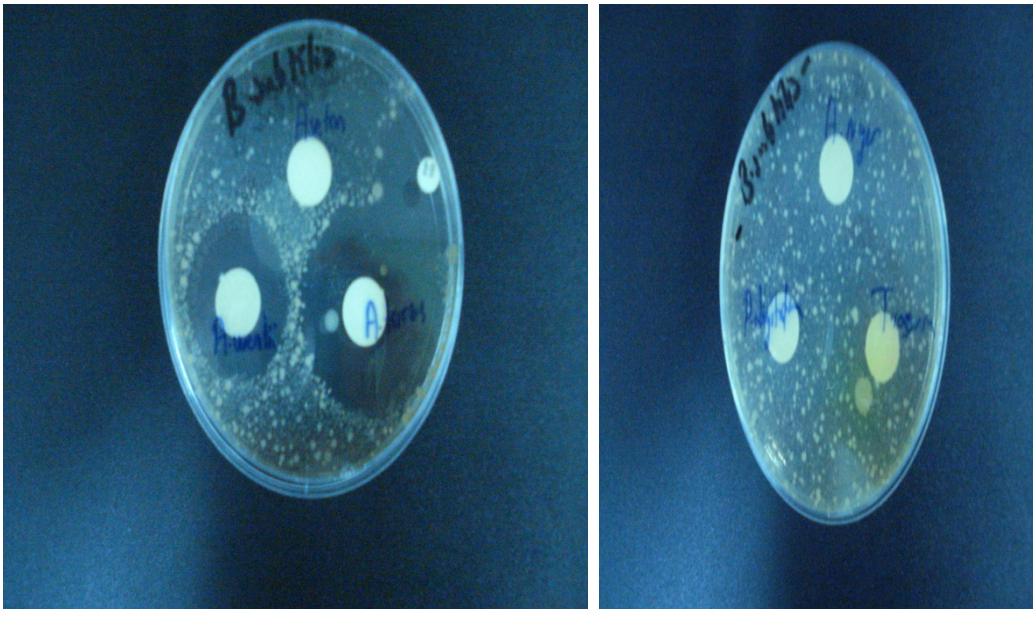
Tablo 5-Disk Difüzyon yöntemi ile 50 µl'e göre milimetrik bulgular

Disk Difüzyon yöntemi	***Staphylococcus aureus*** ATTC 6538 P	***S.epidermidis*** ATTC 12228	***Bacillus subtilis*** ATTC 6633	***Salmonella sp.*** ATTC 14028	***Pseudomonas aeruginosa*** ATTC 9027
Aspergillus niger	-	-	-	-	-
A. wentii	-	15.1 mm	-	-	-
A.terreus	-	35.1 mm	-	-	-
Penicillium digitatum	-	-	-	-	-
Trichothecium roseum	-	-	-	-	-
Aseton	-	-	-	-	-

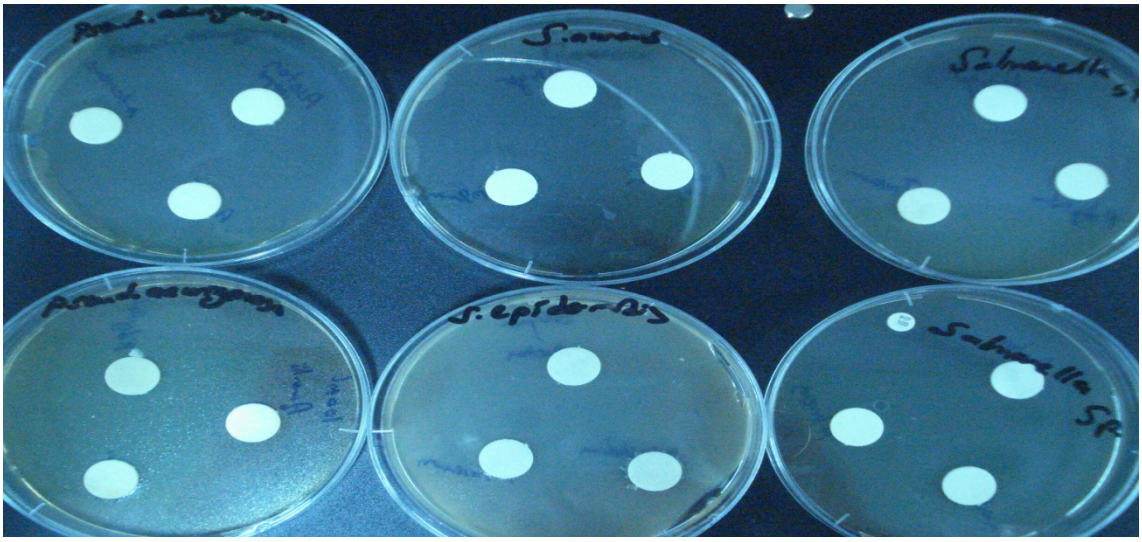
Disk Difüzyon yöntemiyle çelik halka yöntemine nazaran daha az çap gözlenmekte, özellikle *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii* mikrofunguslarının antimikrobiyal aktiviteleri görülmektedir (Şekil 11-Şekil 12-şekil 13).



Şekil 11- *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus wentii* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin 50 µl ve 100 µl 'sinin *Staphylococcus epidermidis'e* karşı antimikrobiyal etkisi



Şekil 12- *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* , *Aspergillus wentii* , *Trichothecium roseum* ve *Penicillium digitatum* elde edilen antimikrobiyal maddenin ve PIP (Piperasilin) antibiyotiğinin 100 µl 'sinin *Bacillus subtilis'e* karşı etkisi



Şekil 13-Değişik türlerde antimikrobiyal aktivitenin gözlenmediği petriler

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma ile belirli fungus türlerinin bazı bakteri türleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada bazı bakteri türlerine karşı bazı mantarların antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu araştırmada antimikrobiyal aktivitenin; mikrofungusun türüne veya cinsine, kullanılan çözgenin standart suşların üzerindeki etkisine ve kullanılan standart suşların farklılığına göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4, tablo 5 , tablo 6 ve tablo 7). Yapılan incelemelerde *Aspergillus wentii* ve *Aspergillus terreus* mikrofungus türlerinin 50 ve 100 mikrolitresinin standart suşlarının çoğunda etkili olduğu görülmüştür. Santamarina ve ark. 2002'de yaptığı çalışmada *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin bakteri türleri üzerinde antagonistik etki gösterdiğini saptamıştır. *Penicillium griseofulvum*, griseofulvin ve patulin üretme kabiliyetiyle bakteriyel gelişimi engelleyen önemli bir inhibitör olarak raporlanmıştır. Aslında 1929 yılında ilk defa Fleming *Penicillium* türlerinden birinin (*Penicillium notatum*) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi olduğunu görmüştür. 1942 yılında White *Aspergillus flavus*'tan elde ettikleri antibakteriyal ürün Aspergillik asit'in antimikrobiyal aktivitesini gözlemlemiştir. 1972 yılında antibiyotiklerin fungal kültürlerden sıklıkla izole edildiği fakat sadece çok az rapor edilmiş *Pycomycetes* sınıfına ait bazı mantarların antibiyotik üretebildiği yayınlanmıştır(Wang ve arkadaşları, 1972). Wang ve arkadaşları süt içeren ortamda *Rhizopus oligosporus*'un daha çok antibakteriyal aktivite gösterdiğini saptamıştır. 1990'lı yıllara gelindiğinde antimikrobiyal aktivite çalışmaları daha da önem kazanmış ve geçmişte yapılan bu çalışmalar klavuz kabul edilerek oldukça önemli çalışmalar yapılmıştır. 1999 yılında Dülger ve arkadaşları makrofungusların antibakteriyel aktivitelerini araştırmıştır. Bu makrofungus çalışmalarında çalışılacak mantar türü (*Russula Delica* Fr. /*Coriolus versicolor*) kurutulduktan sonra 15 gram tartılarak 150 ml kloroform içerisinde Soxhlet cihazına yerleştirilip 12 saat ekstrakte edildikten sonra çözgenlerle (etilasetat , aseton ve etanol) muamele edilmiştir. Uygun koşullarda saklanan bu ekstreler, daha sonra disklere emdirilip Mülller Hinton Agar besiyerinde Disk Difüzyon yöntemiyle antibakteriyal aktivite çalışması yapılmıştır. Literatür bilgilerine göre disk difüzyon uygulamalarında etanol ekstrelerinin daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir(Dülger ve ark.1999). 2002 yılında Raaijmakers ve arkadaşları bakterilerin antibiyotik üretimi ile ilgili çalışma

yapmıştır. 2003 yılında Jonathan ve Fasidi Nijerya'ya özgü yenilen 2 makromantar türünün (*Lycoperdon giganteum* ve *Lycoperdon pusilum)* antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Su , metanol ve etanol çözücüleri kullanılarak yapılan çalışmada Disk Difüzyon yöntemi ve MIC yöntemi uygulanmıştır. Bu çalışmada Etanol ekstresinin en iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Fagade ve Oyalade'nin 2009 yılında yaptığı çalışmada da etanol ekstresinin en iyi sonuç verdiği saptanmıştır. 2004 yılında Yılmaz ve arkadaşları tarafından *Cladonia foliacea* likeninin antimikrobiyal aktivitesi ve bu likene ait Usnik asit, Atranorin ve Fumarprotocetraric asit oluşumuyla ilgili bir çalışma yapılmıştır. Likenlerin de yüksek oranda organik bileşik ürettiği primer ve sekonder metabolite sahip olduğu vurgulanmıştır. 2007 yılında Imtiaj ve Lee tarafından Kore'deki vahşi mantarlarda antibakteriyal ve antifungal aktivite çalışması yapılmıştır. Yine 2007 yılında Wang ve arkadaşları *Psedomonas* CUY8'den elde edilen chitosonase ve chitooligosakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada MIC ve Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır. 2007 yılında Sano ve arkadaşları tarafından *Aspergillus oryzae*'nin kültürü olan Koji'nin ürün substratları üzerine bir çalışma yapılmıştır.

Santamarina ve ark. 2002'de yaptıkları çalışmada *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinden elde edilen ekstraktların 50 mikrolitresinin hiçbir bakteri türünde hiçbir inhibisyon zonu gözlemleyememiş, 100 mikrolitre için bazı türlerin antimikrobiyal aktivitelerini gözlemlemiştir. Bu araştırmada 50 mikrolitre kullanılan antimikrobiyal maddelerin de standart suşlarda etkili olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, kullanılan mikrofungusun türüne, içerdiği metabolik aktiviteye, kullanılan çözgenle etkileşimine bağlı olabilir. Santamarina ve ark. yaptıkları çalışmada PDB (Potato Dextrose Broth)'un mikrofungusların gelişimi ve antimikrobiyal maddelerini ortama salabilmeleri için iyi bir besiyeri olduğunu gözlemlemişlerdir.

Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında çok çeşitli test yöntemlerinin ve test mikroorganizmalarının kullanılmakta olduğu, bu yöntemler arasında ise en uygun ve güvenilir olanının Disk Difüzyon Metodu olduğu bildirilmektedir(Demirhan ve ark. , 2007). Bu araştırmada kullanılan Disk Difüzyon yöntemine nazaran çelik halka yöntemi daha başarılı olmuştur. Bunun nedeni kullanılan kağıt diskin çapına , çözgenle etkileşimine, çözgenin kağıt diske geçebilmesine , etrafa taşmasına bağlı olabilir. Ancak çelik halka metodunda 5 mm'lik çapında çelik halkalar kullanılması hem çözgenin

etrafa yayılmasına engel olmuş, hem de iyi bir zon oluşmasına olanak sağlamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda bu çalışmada kullanılan aseton dışında siklohekzan , aseton ve siklohekzan karışımı da denenmiştir (Santamarina ve Ark.). Fungusların ekstraksiyonunda kullanılan diklorometan dışında etil asetatta alternatif olarak kullanılabilmektedir. Halil Bıyık ve ark. günümüzde yürütmekte oldukları projede 15 günlük inkübasyondan sonra miselleri filtre etmekte ve kalan sıvıyı etil asetat (3 x 200 mL) ile ekstrakte etmektedirler. Miseller etil asetat ile 24 saat çalkalandıktan sonra filtre edilmektedir. Daha sonra etil asetat tabakası evapore edilerek ve küçük miktarlarda antibiyotik ekstraktları elde etmektedirler. Bu çalışmada kullanılan evaporasyon aletinin diklorometan için uygun bir sıcaklıkta ayarlanıp öyle evapore etmesi önemlidir. Aksi taktirde uçurulan diklorometan ile birlikte antimikrobiyal madde de uçurulabilir. Diklorometan yerine başka bir kimyasal da kullanılabilir. Her kimyasalın kendine has belirli sıcaklıkta evapore edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma mikrofungusların antimikrobiyal aktivitelerinin önemini vurgulamaktadır. Ülkemizde ve yurtdışında antimikrobiyal aktivite çalışmaları üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır. Makrofungusların bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi, belirli bitkilerin ekstraktlarının bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesi, mantarların ekstaktlarının yine mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesi hakkında bir çok çalışma mevcuttur. Bu çalışma ile bazı mikrofungusların belirli bakteri türleri üzerine antimikrobiyal aktivitesi çalışmalarına yardımcı bir kaynak ve kullanılan değişik metod ile alternatif fikir vermesiyle önem taşımaktadır. Bu çelik silindirle uygulanan metod ile bir çok yeni çalışma yapılabilir. Böylece Disk Difüzyon yöntemiyle paralel kullanılarak metodlar arasında kıyas yapabilme şansı bulunabilcektir. Bu tip araştırmalar sonucu elde edilen sonuçlarla bakterilere karşı yeni antimikrobiyal maddeler bulunabilip, hastalık yapıcı bakterilere karşı yeni antibakteriyal madde ya da antibiyotikler keşfedilebilecektir.

KAYNAKLAR

Fleming, A.,On the antibacterial action of cultures of *Penicillium,* with special reference to their use in the isolation of *B.influenzae,British*]ournal of *Experimental Pathology,*Vol. **10,** pages *226-236,1929*

Waksman, S.A., Woodruff, H.B., Bacteriostatic and bactericidal subtances produced by a soil actinomycetes, Proc.soc.Exptl Biol.Med,45,609-614, 1940

White, E.C., Hill, J.H.,Studies on antibacterial products formed by molds, 1942

Çetin, E.T., Pratik Mikrobiyoloji, Akgün matbaası, İstanbul, 185-194, 1965

Wang, H.L., Ellis, J.J., Hesseltine, C.W., Antibacterial activity produced by molds commonly used in food fermentations, Mycologia, VOL. 64, 1972

Nakayama, K.: Sources of Industrial Microorganisms, In: Biotechnology (Khem, H.J. and Reed. G. Ed.). Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel, 355-410, 1981

Unat, E.K., Temel Mikrobiyoloji, Beta Basım Yayın dağıtım, 378-381, 1985

Öner, M., Actinomycetes, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 219-222, 1989

Dülger, B., Şen F., Gücin F., *Russula delica* Fr. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi, Tr. J. of Biology 23 : 127-133, 1999

Dülger, B.,Arslan Ü., *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. Makrofungusunun Antimikrobiyal Aktivitesi, Tr. J. of Biology 23 : 385–392, 1999

Raaijmakers, J.M., Vlami, M., Souza J.T., Antibiotic production by bacterial biocontrol agents, *Antonie van Leeuwenhoek* **81:** 537–547, 2002

Santamarina MP., **Roselló,J.**, **Llacer,R.**, **Sanchis,V.** Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom,*Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects *in vitro,* Rev Iberoam Micol 19: 99-103,2002

Hasenekoğlu İ., Yeşilyurt S., Mikrobiyoloji, Erzurum, 453-456, 2002

Jonathan, S.G., Fasidi I.O., Antimicrobial acitivites of two Nigerian edible macrofungi *Lycoperdon pusilum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (pers), African Journal of Biomedical Research, 6: 85- 90 , 2003

Yılmaz, M., Türk, Ö.A., Tay,T., Kıvanç,M., The Antimicrobial Activity of Extracts of the Lichen *Cladonia foliacea* and Its (-)-Usnic Acid, Atranorin, and Fumarprotocetraric Acid Constituents,Z. Naturforsch. **59c,** 249-254 , 2004

Imtiaj, A., Lee,T.S., Screening of Antifungal and Antibacterial Activities from Korean Wild Mushrooms,World Journal of Agricultural Sciences 3: 316-321, 2007

Demirhan, A., Yeşil Ö.D., **Yıldız A.**, **Gül A.**, Bazı Makrofungus Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Arastırma, Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi 19 (4), 425-433, 2007

Wang,Y., Zhou,P., Yu,J., Pan, X., Wang,P., Lan,W., Tao,S., Antimicrobial effect of Chitooligosaccharides Produced by Chitosanase from *Pseudomonas* CUY8, Asia Pac J Clin Nutr ,16 (Suppl 1): 174-177, 2007

Sano,**Y., Ishikava,Y., Muramatsu,S., Uzuka,Y., Kokubo,S., Omata,S., Kitamura,T.**, **Matsugo, S.**, Study on the Koji Mold Producing Substrate, Food Sci. Technol. Res., 13(1), 13-19, 2007

Fagade, O.E., Oyelade, A.A., A comparative study of the antibacterial activities of some wood-decay fungi to synthetic antibiotic discs., *EJEAFChe, 8 (3)*: 184-188, 2009

Gesheva, V., Production of antibiotics and enzymes by soil microorganisms from the windmill islands region, Wilkes Land, East Antarctica, Polar Biol 33:1351–1357, 2010

Temiz, A., Genel Mikrobiyoloji uygulama teknikleri, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 216,222-226,2010

ÖZGEÇMİŞ

20.08.1985 İSTANBUL doğumluyum. İlk ve orta eğitimimi Tevfik kut İlköğretim okulunda tamamladım. Liseyi Florya Tevfik Ercan Süper lisesinde tamamladım. 2004 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım. 2008 yılı güz döneminde Trakya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 2010 yılında bir ilaç firmasının mikrobiyoloji laboratuarında Uzman Analist olarak işe başladım. Halen aynı firmada aynı pozisyonda çalışmaktayım. Yabancı dilim İngilizcedir.