

HAVADAN VE TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN ACTINOMYCETE TÜRLERİNİN ANTİBİYOTİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif FİÇİCİ¹, Merih KIVANÇ², Muhsin KONUK¹
Demet KAYA³

- ¹ Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Afyon.
- ² Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir.
- ³ Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Bolu.

ÖZET

Havadan ve topraktan izole edilen Actinomycete türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinin amaçlandığı araştırmamızda, 83 Actinomycete türü ile çalışılmıştır. Toprakтан izole edilen 24, havadan izole edilen 5 Actinomycete türünün antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bunlardan 5 izolatanın en geniş antimikrobiyal spektrumunu olduğu belirlenmiştir. Farklı besin maddeleri içeren 4 besiyerinde fermentasyon işlemine tabi tutulan izolatlardan ekstraksiyon işlemi ile antimikrobiyal madde elde edilmiştir. En fazla antimikrobiyal etkinlik besiyeri B’de üremiş olan izolatlardan sağlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık deneyinde Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır ve 12 bakteri ile 3 mayaya karşı etkinlik belirlenmiştir. Actinomycete izolatlarının %35’inin çeşitli bakteri ve mayalara karşı etkin olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Actinomycete, Antibiyotik Aktivitesi, İzolasyon.

ANTIBIOTIC ACTIVITIES OF ACTINOMYCETE SPECIES ISOLATED FROM SOIL AND AIR

ABSTRACT

The antimicrobial activities of Actinomycete species 83 isolated from soil and air were determined. Antibiotic activities of 24 Actinomycete species isolated from soil and 5 Actinomycete species isolated from air showed antibiotic activity and 5 of the isolates was observed to have the widest spectrum. The antimicrobials were obtained by extraction from four different media. Isolates that were obtained from 'B' medium had the widest antimicrobial activity. Kirby Bauer disc diffusion method was used for antimicrobial susceptibility testing and their antimicrobial activity were determined against 12 bacteria and 3 yeasts. According to the results, Actinomycete isolates were found to be active against 35% of various bacteria and yeasts examined.

Key Words: Actinomycete, Antibiotic Activity, Isolation.

1. GİRİŞ

Actinomycete'ler, Gram pozitif, dallanan tek hücreli mikroorganizmalar olup, birçoğu toprak ve organizma dışında saprofit olarak bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların antibiyotik, vitamin ve enzim üreticileri olmaları nedeniyle son zamanlarda üzerlerinde önemle durulmaya başlanmıştır. Actinomycete türlerinin patojen mikroorganizmalar üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar ilk kez 1925'de Avrupa'da başlamış, 1940'da antibiyotiklerin sistematik izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bugüne dek bunlardan 500'den fazla preparasyon ve kimyasal bileşik elde edilmiş ve bunların birçoğu hayvan beslenmesi, besin saklanması ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde geniş bir uygulama alanı bulmuştur [1,2].

Çalışmamızda topraktan ve havadan izole edilen Actinomycetler arasından antimikrobiyal madde üreten türlerin seçimi yapılarak, antimikrobiyal aktivitelerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı karbon kaynaklarının bulunduğu fermentasyon ortamlarında üretilen mikroorganizmalarda antibiyotiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Toprakтан Actinomycete izolasyonu için Bursa mezitler 5, İnegöl, Kumla (Narlı), Eskişehir Meşelik, Bademlik, Vişnelik, Kanlıkavak, Musaözü Barajı, Organize Sanayii ve Anadolu Üniversitesi Kampüsü olmak üzere 10 istasyondan toprak örnekleri toprak üstü florasının yapraksı bitkilerden oluşmasına dikkat edilerek alınmıştır. Havadan Actinomycete izolasyonu için Meşelik, Anadolu Üniversitesi Kampüsü, Organize sanayii, Bademlik, Vişnelik, Kanlıkavak, Musaözü Barajı olmak üzere 8 istasyondan hava örnekleri alınmıştır.

Staphylococcus aureus, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* α -hemolitik *Streptokok epidermidis*, *Candida utilis* suşları Bundesanstalt für Feischforschung (Kulmbach, FRG)'den temin edilerek antimikrobiyal etkinlik araştırmalarında kullanılmıştır.

Çalışmamızda toprak örnekleri temiz bir spatula yardımıyla toprak üzerinden derine doğru yaklaşık 10-15 cm kazılarak steril kaplar içerisine alınmış, pH metre ile ölçümü yapılarak bunlardan nötr ve alkali olan örnekler izolasyon için kullanılmıştır. Toprak örnekleri CaCO_3 ile ön işlemden geçirilerek 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonları Gliserol yeast agar, Glukoz asparagin agar (oxid), Sükroz nitrat agar (oxid), Glukoz pepton agar (oxid), Glukoz yeast agar (oxid) ve Yeast ekstrakt agara (oxid) karıştırma plak yöntemi ile ekilip, 3-5 gün süreyle 28°C 'de inkübasyona tabi tutulmuştur [3,4].

Havadan Actinomycete izolasyonunda sedimentasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, Nutrient agar (oxid) ve Glukoz yeast agar (oxid) içeren petri kutularının herbirinin kapakları Eskişehir'de tesbit edilen 30 bölgede 150 mm. yüksekliğinde 15'er dakika açık bırakılmış ve daha sonra 28°C 'de, 3-5 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda tüm besiyerlerinde Actinomycete kolonilerinin varlığı araştırılmış ve üreme tesbit edildiğinde yatık Glukoz agara pasaj yapılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de stoklanmıştır [5].

Toprakтан ve havadan izole edilen Actinomycete izolatlarının antibiyotik üretimi Spektrum Plak metodu ile saptanmıştır. Stoklanmış Actinomycete kültürlerinden Nutrient agarın tam ortasına gelecek şekilde tek ve kalın bir çizgi şeklinde ekim yapılarak, 27°C 'de 5 gün inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda test mikroorganizması olarak kullanılacak bakteri veya maya kültürlerinden Actinomycete kolonisi ile 90° açı yapacak şekilde petri kutusunun kenarına kadar tek çizgi halinde ekim yapılmıştır. Besiyeri

37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda test mikroorganizmalarının Actinomycete kültürü tarafından salgılanan antimikrobiyal madde ile etkileşimi gözlenmiştir [6].

Toprakdan ve havadan izole edilen ve antibiyotik aktivitesi saptanan izolatlardan fermentasyon için aşı hazırlanarak fermentasyon besiyeri A (Gliserol 1,8 gr, Lablemco powder 0,5 gr, NaCl 0.3 gr, Polypepton 0,6 gr, Distile su 1000 ml), C (Dextroz 30 gr, Pepton 10 gr, NaCl 3,0 gr, CaCO₃ 3,0 gr, Distile su 1000 ml), D (Mısır atığı 10 gr, Pepton 5,0 gr, Meat extract 5,0 gr, NaCl 5,0 gr, Distile su 1000ml) de fermente edilerek, fermentasyon sıvısı, petrol eteri, etil asetat, kloroform, metanol, etanol, aseton ve %20'lik alkol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Bu işlemler sonunda çözücü tarafından tutulan her bir kuru maddenin antimikrobik madde varlığını saptama için 4mm. kalınlığında disklerle emdirilmiş (10mg) Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır [7,8].

3. BULGULAR

Çalışmamızda 59'u topraktan (T), 24'ü havadan (H) olmak üzere 83 (% 40,6) Actinomycete türü izole edilmiştir. Toprakdan izole edilen 24 (% 9.74), havadan izole edilen 5 (% 20,8) Actinomycete türünün antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

En fazla antimikrobiyal etkinliği olduğu saptanan T₃; T₂₆, T₂₉, T₅₈ ve H₈ izolatlarının dört farklı ortamda yapılan fermentasyonlarındaki üreme özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo1. Actinomycete izolatları T₃, T₂₆, T₅₈ ve H₈'in fermentasyon ortamında üreme durumları.

Actinomycete kültürleri	Kuru misel ağırlığı (gr/100 ml)			
	Besiyeri A	Besiyeri B	Besiyeri C	Besiyeri D
Actinomycet kültürü T ₃	1,90	2,70	1,83	1,23
Actinomycet kültürü T ₂₆	1,85	1,30	1,35	Yeterli üreme yok
Actinomycet kültürü T ₂₉	2,10	2,15	1,95	1,30
Actinomycet kültürü T ₅₈	Yeterli üreme yok	1,15	1,00	Yeterli üreme yok
Actinomycet kültürü H ₈	Yeterli üreme yok	1,05	Yeterli üreme yok	Yeterli üreme yok

Tablo 1’de görüldüğü gibi T₂₆ izolatu farklı ortamlarda en iyi üreme göstermiş; bunu T₃ ve T₂₆ izolatu izlemiştir. Diğer taraftan her beş izolat, besiyeri B’de en iyi üreme göstermiştir. T₃ ve T₂₆ izolatları her dört besiyerinde; T₂₆ izolatu, besiyeri B ve besiyeri C’de; H₈ izolatu ise sadece besiyeri B’de üremiştir.

T₃, T₂₆, T₂₉, T₅₈ ve H₈ izolatlarının A, B, C, ve D besiyerinde fermentasyon sonucu ürünün çeşitli çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen kuru madde miktarı Tablo 2’de verilmiştir.

A, B, C, ve D besiyerlerinde fermentasyon sonucu Petrol eteri ve kloroform çözücülerini etkisiz olarak bulunurken, % 20’lik alkol sadece besiyeri B’de fermente edilen T₂₆’da etkili olmuştur. A, B ve C ortamlarında gelişen Actinomyceteler için ise en iyi çözücü metanol olarak bulunmuştur. Ayrıca B ortamında çözücülerle tutulan maddenin A, C, D’ye oranla daha fazla olduğu görülmüştür.

Fermentasyon ortamı D ve B’den çözücülerle elde edilen, tutulan maddenin antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3 Fermentasyon ortamı D ve B’den çözücülerle elde edilen, tutulan maddenin antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.

Mikroorganizma	Actinomycete kültüründen hazırlanan disklerdeki zon çapı(mm)						
	Fermentasyon ortamı D		Fermentasyon ortamı B				
	T ₃	T ₂₉	T ₃	H ₈	T ₂₉	T ₂₆	T ₅₈
<i>P.aeruginosa</i>	0,8	0,6	0,2	0,6	0,4	0,2	0
<i>P.vulgaris</i>	0,2	0,5	0,3	0,4	0,4	0	0,4
<i>S.typhimurium</i>	0,4	0,7	0	0	0,3	0	0
<i>E.coli</i>	0,3	0,6	0,3	0	0	0,9	0
<i>E.aerogenes</i>	0,6	0,4	0,2	0	0,3	0	0
<i>K.pneumoniae</i>	0,4	0,1	0	0	0,5	0,8	0
<i>S.marcescens</i>	0	0	0,7	0	0,2	0	0
<i>ohemolitik streptokok</i>	0,2	0	0	0	0,6	0	0
<i>S.epidermis</i>	0	1,1	0,4	0	0,5	0	0,7
<i>B.subtilis</i>	0,5	0	0,5	0	0	0	0
<i>S.aureus</i>	0	0,5	0	0	0	0	0
<i>C.utilis</i>	0	0,4	0,3	0	1,1	0	0
%	66,6	75	66,6	16,6	75	25	16,6

Fermentasyon ortamı D'den elde edilen antimikrobiyal duyarlılık sonucuna göre T₃ izolatı 8 bakteriye (% 66,6'sına) etkin iken, T₂₉ izolatında bu oran 8 bakteri ve 1 maya olmak üzere %75'tir. Ancak T₃ izolatının *Pseudomonas aeruginosa*'ya; T₂₉ izolatının *Salmonella typhimurium*'e karşı en kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Fermentasyon ortamı B'den elde edilen ekstratın antimikrobiyal duyarlılık sonucuna göre, T₃ izolatı 8 bakteriye (%66,6), T₂₆ izolatı 2 bakteri ve 1 mayaya (%16,6), T₂₉ izolatı 8 bakteri 2 mayaya (%75), T₅₈ izolatı 2 bakteriye (%25), H₈ izolatı 2 bakteriye (%16,6) karşı etkili bulunmuştur.

T₃ izolatının en etkili olduğu bakteri *S. marcescens* iken, H₈ izolatı *P. aeruginosa*; T₂₉ izolatı *S. typhimurium*; T₂₉ izolatı *E. coli*; T₅₈ izolatı ise *S. epidermidis*'e etkili olmuştur.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla kullanılan antimikrobiyal ajanlara sürekli yenileri eklenirken mikroorganizmalar bu maddelere karşı direnç kazanmaya devam etmektedir. Antibiyotiklere gereksinim olmadığı halde bilinçsiz kullanıldığında antibiyotiğe karşı dirençli mikroorganizma topluluğu oluşmakta ve duyarlı topluluk zamanla eliminasyona uğramaktadır. Bugün bazı patojenlerin birden fazla antibiyotiğe karşı direnç kazandığı bilinmektedir. Bu nedenle yeni antibiyotikler bulmak için çalışmalar sürmektedir [4]. Mortan'a göre 1938- 1940 yılları arasında başlıca üç önemli antibiyotik keşfedilmiştir, bunlar; bakteri kökenli tyrothricin, fungal orjinli penicillin ve Actinomycetes orjinli actinomycindir. Antibiyotik çağının ilk 18 yılı içerisinde Selman Waksman tarafından streptomycin'in de içerisinde olduğu yaklaşık 30 antibiyotik kullanıma girmiştir [9].

Actinomycete türleri, antibiyotik üretim özellikleri ile önem kazanmış mikroorganizmalardır. Çalışmamızda topraktan ve havadan izole edilen 83 Actinomycete izolatından 29'unun (24'ü topraktan, %5'i havadan olmak üzere) bir ya da birden fazla sayıda bakteri ve mayaya karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Waksman ve ark [10] topraktan izole ettikleri 244 Actinomycete suşunun antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlar ve 106 (%43,4)'sının düşük, 49 (%20,08) unun ise yüksek antimikrobiyal etki gösterildiğini bildirmişlerdir. Burkholder [11] ise topraktan izole ettiği 7369 Actinomycete'den 869'unun (%11,79) *S. aureus*' u, 261'inin (%3,54) *E.coli*'yi, 514'ünün (%7,37) *C. albicans*'ı inhibe ettiğini saptamıştır. Linder [12] yaptığı bir çalışmada çeşitli toprak örneklerinden 2500 Streptomyces türü izole ederek bunlardan %77'sinin Gram pozitif bakterilere, %40'ının,

Gram negatif bakterilere, %32'sinin *Mycobacterium tuberculosis*'e ve %18'inin ise mantarlar üzerinde aktif oldukları saptanmıştır. Woodroff ve Mc Daniel [13] çeşitli ortamlarda 10.000 Actinomycete türü izole etmiş ve izolatların %25'inin antibiyotik ürettiklerini belirlemiştir. Bu kültürlerin %90'ının streptomycin ve bununla yakından ilgili bileşikler oluştururken, geriye kalan yarısı streptomycin, diğer yarısının 1/3'ünün tetracyclinleri ürettikleri; sadece %30'unun bilinmeyen bileşikler olduklarını saptamışlardır. Haque ve ark. [14] Hindistan'da yaptıkları çalışmada 100 toprak örneğinden 450 Actinomycete izole etmişler ve bunlardan ikisinin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğunu belirlemiştir. Singh ve ark [15] bir Actinomycete türü olan *S. expansaensisten* iki yeni heptadecaglycoside antibiyotik elde etmişler ve bu yeni antibiyotiklerin in vivo ve in vitro koşullarda bakteri ve mayalara karşı etkili olduklarını saptamışlardır.

Yurdumuzda yapılan bir çalışmada Hepgüvendik (1989) İzmir'de topraktan 75 Actinomycete kültürü izole etmiş ve bunlardan 5 izolatın Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmiştir[4].

Çalışmamızda topraktan ve havadan izole ettiğimiz 83 Actinomycete izolatının yaklaşık %35'i bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Toprakten izole edilen Actinomycete izolatlarının %35,6'sı bakterilere, %16'sı mayalara karşı etkin iken havadan izole edilen Actinomycete izolatlarının %21'i bakterilere, %5'i mayalara karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Antimikrobiyal maddenin etkinliğini saptamada *B. subtilis* ve *S. aureus* bir çok araştırmacı tarafından kullanılan mikroorganizmalardır. Çalışmamızda Gram pozitif, Gram negatif bakterilerle mayaları içeren bir çok mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılıkları araştırılmıştır.

Hepgüvendik [4] yaptığı çalışmada antimikrobiyal etkiye sahip kültürlerin en iyi besiyeri B'de üreme gösterdiğini saptamıştır. Çalışmamızda en fazla antimikrobiyal etkinlik glukoz, pepton, meat extract ve NaCl içeren besiyeri B'de olmuştur.

Karen [16] Streptomycete türünün agar ve sıvı kültür ortamlarında üremelerini karşılaştırmış, katı ortamda üremenin sıvı ortama göre daha fazla olduğunu saptamış, antibiyotik üretiminin sıvı ortamda azaldığını hatta bazı izolatlarda sıvı ortamda antibiyotik üretiminin hiç gözlenmediğini, bazı izolatlarda ise birkaç ekim sonunda tekrar antibiyotik üretimi olduğunu bildirmiştir. Sıvı kültürdeki misel yapısının çalkalama sonucu parçalanarak,

misel uzunluklarının 12,5 mm'ye düşmesinin antibiyotik üretimi için yetersiz olduğunu ve sıvı ortamda antibiyotik üretebileceğimiz izolatların mekanik etkilere karşı dayanıklı olması gerektiğini bildirmiştir

Çalışmamızda katı besiyerindeki T₂₉ izolatı *B. subtilis* ile *S. marcescens*'e karşı ve T₅₈ izolatı *S. aureus* ile *E. aerogenes*'e karşı etkili iken; fermentasyon sonrası söz konusu bakterilere karşı etkisiz olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde fermentasyon ortamı D'den elde edilen T₃ izolatına ait antimikrobiyal maddenin *C. utilis*'e, T₂₉ izolatına ait antimikrobiyal maddenin *B. subtilis* ile *S. marcescens*'e karşı etkisiz olduğu bulunmuştur. İzolatların katı besiyerinde adı geçen mikroorganizmalara karşı etkili iken sıvı besiyerinde etkisiz olduğunun saptanması, yapılmış olan diğer çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Fermentasyon sonucunda misellerden arındırılan sıvı petrol eteri, kloroform, metanol, etanol, %20'lik alkol, etil asetat, aseton çözücülerini ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulduğunda A, B, C, ve D besiyerinde fermentasyon sonucu petrol eteri, kloroform çözücülerini etkisiz olarak bulunmuştur. %20'lik alkol ise sadece besiyeri B, D fermente edilen T₂₆'da etkili olmuştur. A, B, ve C ortamlarında üreyen Actinomycete'ler için en iyi çözücünün etanol, D ortamında gelişen Actinomycete'ler için ise en iyi çözücünün metanol olduğu saptanmıştır. Ayrıca B ortamında çözücülerde tutulan maddenin A, B, D'ye oranla daha fazla olduğu görülmüştür.

Günümüzde Actinomycetelerin antimikrobiyal etkilerini artırma çalışmaları devam etmektedir. Noack [17] klonlama tekniği kullanarak Actinomycetelerin antibiyotik üretme kapasitelerini arttırmaya çalışmıştır. Hedge ve ark. [18] Actinomyceteler üzerinde moleküler çalışmalarda, kromozomal DNA'da yapılacak değişiklikler sonucu antibiyotik üretiminin artacağını saptamıştır. Ayrıca Hague biyokimyasal metodlar kullanarak Actinomycetelerden antibiyotik üretimini arttırmıştır [14]. Huddleston ve ark. [19] streptomycetes üreten bakterilerde strA ve strB1 olarak bilinen iki genin bulunduğunu belirlemişlerdir. Egen ve ark. [20] ise Streptomycin biyosentez geninin bakteriler arasında gen transferi ile aktarıldığını göstermişlerdir.

Sonuç olarak, çalışmamızda havadan ve topraktan izole edilen Actinomycete türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri olduğu ve denediğimiz mikroorganizmalara karşı etkili olduğu görülmüştür. Antibiyotik direncinin halen en önemli sorunlardan biri olduğu düşünüldüğünde, doğada bulunan Actinomycete türlerinin antibiyotik üretiminde halen yeri olduğu ve yeni antibiyotik türlerinin bulunmasında katkılarının olacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR:

1. Rosenthal L., La Iyşe des Bacilles Dephteriques Effectue Par un Streptathrix, Compt Rent Sac Biol, 90, 77-78, (1925).
2. Malpartina F., Hallam S. E., Kieser H. M., Motamedi H., Hutchinson C. R., Butler M. J., Sugden D A., Warren M., Mc Killop C., Bailey C. R., Homology Between Streptomyces genes Coding for Synthesis of Different Polyketides Used to Clone Antibiotic, 325, 818-821, (1987).
3. Norris J. R., Ribsons D W., Method's in Microbiology, Ed Booth C. 4, Academic Press, London and New York, 296-331, (1991).
4. Hepgüvendik N., Topraktan İzole Edilen Actinomycetelerin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, (1989).
5. Linder Bein N., Use of Poly Valent Phage for Reduction of Streptomyces on Soil Dilution Plates, Journal of Applied Bacteriology, 72, 103-111, (1991).
6. Willams W. K., and Katz E., Development of Chemically Defined Medium for The Synthesis of Actinomycin D by *S. polvulus*, Antimicrob Agents Chemother, 11, 281-290, (1977).
7. Yamaguchi H., Sato S., Yeshida S., Tokada K., Itoh M., Capuramycin a New Nucleosid Antibiotic, Taxonomy Fermentation Isolation and Characterization Journal Antibiotics, 1: (11), 28-34, (1986).
8. Bilgehan H., Klinik Mikrobiyoloji ve Tanı, 2. Baskı, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 147-188, (1995).
9. Morton N. S., Impact of Antimicrobial Agents and Chemotherapy From 1972 to 1998, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44: (8), 2009-2016, (2000).
10. Waksman S. A and Horning E. S., *Thermoactinomyces triklinsky* a Genus of Thermophilic Actinomycetes, Journal Bacteriol, 66, 377-378, (1953).
11. Burkholder I., Dupuy A., Vidal P., Actinomycin Synthesis in *Streptomyces antibioticus*, Applied and Environmental Microbiology, 55: (6), 1642-1644, (1992).

12. Linder L., Enzymatic Synthesis of Streptomycin As a model System for Study of The Regulation and Evaluation of Antibiotic Biosynthetic Pathways, *Journal of Biological Chemistry*, 263: (10), 4602-4606, (1982).
13. Woodruff N. B., and Mc Daniel E., The Antibiotic Approach in Strategy of Chemotherapy, *Symp Soc Gen Microbiol*, 5th ed., 29-48, (1956).
14. Haque S. F., Screening And Identification of Antibiotic Producing Sdtrains of Streptomycetes, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76: (2), 89-93, (1992).
15. Singh M. P., Petersen P. J., Weiss W. J., Kong F., Saccharomicin Novel Heptadecaglycoside Antibiotics Produced by *Saccharothrix expanaensis*: Antibacterial and Mechanistic Activities, *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 44: (8), 2154-2159, (2000).
16. Karen M., Robert D., Nolan E. B., A Method for Increasing the Success Rate of Duplicating Antibiotic Activities Agarliquid Cultures of Streptomycetes Isolates in New Antibiotic Screens, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 95: (1), 99-105, (1993).
17. Noack M. E., Regulation of Phenoxazinone Synthase Expression in *Streptomyces Antibioticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55: (6), 1642-1644, (1989).
18. Hedge E., Patel M., Horan A., Gullo U., Marquenze J., Gunnarsson I., Search and Discovery of New Antibiotics, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85: (3), 95-97, (1992).
19. Huddleston A. S., Cresswell N., Neves M. C., Beringer J. E., Baumberg S., Thomas D. I., Wellington E. M., Molecular Detection of Streptomycin- Producing Streptomycetes in Brazilian Soils, *Appl Environ Microbiol*, 63: (4), 1288-1297, (1997).
20. Egen S., Wiener P., Kallifidas D., Wellington E. M. H., Transfer of Streptomycin Biosynthesis Gene Clusters Streptomycetes Isolated from Soil, *Appl and Environmental Microbiology*, 64: (12), 5061-5063, (1998).