

Bazı Toprak Aktinomisetlerinin Antimikrobiyal Aktivite Ve Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi

Elif ÇİL^{1*}, Kamil IŞIK², Fadime ÖZDEMİR KOÇAK³

^{1*} Ordu Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

³ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu, Hemşirelik Bölümü

Özet

Kültür koleksiyonlarına depozit edilmiş üç *Actinomadura*, bir *Kribella*, üç *Micromonospora*, iki *Nocardia*, bir *Nocardioides*, iki *Nonomurae* ve iki *Streptomyces*'in antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışma 2014-2015 yılları arasında Ordu Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. Test suşlarının, four Gram pozitif (*Bacillus subtilis* NRRL B-209, *Micrococcus luteus* NRRL B-1018, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptomyces murinus* ISP 5091), three Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NRRL B-123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) *Candiada albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus parasiticus* NRRL-465 olmak üzere toplam on patojene karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite inhibisyon zonlarının varlığına veya yokluğuna göre değerlendirilmiştir. Antibiyotiklere duyarlılık testi için disk difüzyon yöntemi tercih edilmiş ve suşların CLSI tarafından önerilen dokuz antibiyotiğe (Ampicilin, Chloramphenicol, Erithromycin, Neomycin, Oxacilin, Sulfafurazole, Streptomycin, Trimethoprim sulfamethoxazole) karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir. *Micromonospora* cinsine ait izolatlar antibiyotiklere en duyarlı grup, S23 *Kribella* izolatının ise antibiyotiklere en dirençli izolat olduğu gözlenmiştir. *Streptomyces* cinsine ait MD16 (DSM 42099T, KCTC 29436) MD40 (DSM 42100, KCTC 29437) suşlarının yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle MD16 ve MD40 suşlarının umut verici antibiyotik üreten bakteriler olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Aktinomiset, Antimikrobiyal aktivite, Antibiyotik duyarlılığı, Disk difüzyon yöntemi

Antimicrobial Activity And Antibiotic Susceptibility Investigation Of Some Soil Actinomycetes

Abstarct

The research which aims to find out the antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of three *Actinomadura*, one *Kribella*, three *Micromonospora*, two *Nocardia*, one *Nocardioides*, two *Nonomurae* and two *Streptomyces* have been deposited with the culture collections, was done between 2014 and 2015 at Ordu University. Antimicrobial activity of test strains was determined against to total ten pathogens, four Gram positive (*Bacillus subtilis* NRRL B-209, *Micrococcus luteus* NRRL B-1018, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptomyces murinus* ISP 5091), three Gram negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NRRL B-123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) *Candiada albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus parasiticus* NRRL-465. The antibacterial activities were assessed by the presence or absence of inhibition zones. The disk diffusion method was preferred for antibiotic susceptibility testing and strains were examined inhibition zones agains to nine antibiotics (Ampicilin, Chloramphenicol, Erithromycin, Neomycin, Oxacilin, Sulfafurazole, Streptomycin, Trimethoprim sulfamethoxazole) recommended by CLSI. It was observed that the isolates belonging to the genus *Micromonospora* were the most susceptible group in antibiotics, S23 belonging to *Kribella* was the most resistant isolate to the

antibiotics. Strains MD16 (DSM 42099T, KCTC 29436) and MD40 (DSM 42100, KCTC 29437) belonging to *Streptomyces* genera, were exhibited to have high antimicrobial activity. It can therefore be suggested that MD16 and MD40 strains are promising antibiotic producing bacterias.

Keywords: Actinomycetes, Antimicrobial activity, Antibiotic susceptibility, Disc diffusion method

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen AR-1241 numaralı araştırma projesinin bir bölümüdür ve “Kültür koleksiyonlarına depozit edilen bazı aktinomisetlerin antibiyotik duyarlılıkları ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması” başlıklı poster sunumu ile 22. Ulusal Biyoloji Kongresinde 23-27 Haziran 2014’de Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde sunulmuştur.

*elifcil@odu.edu.tr

1. GİRİŞ

Aktinomisetler yüksek biyoteknolojik potansiyele sahip, filamentli Gram pozitif bakteri grubudur. Actinomycetales ordosu üyeleri olarak bilinen bu bakteriler antibiyotikler, antitümör ajanları, bağışıklık sistemi baskılayıcı ajanlar, enzimler gibi çeşitli biyoaktif sekonder metabolitleri üretebilen ekonomik ve biyoteknolojik açıdan oldukça değerli prokaryotlar olarak bilinmektedir (Lam 2006; Hwang et al 2014). Aktinomisetler içinde antibiyotikler ve diğer sekonder metabolitlerin en önemli kaynağı *Streptomyces* suşlarıdır. Dokuz yüzün üzerinde tür ve alttür içermesi sebebiyle Actinobacteria sınıfının en fazla üyesi olan taksonudur. Toprakta en yaygın olan aktinomiset cinsi olmakla birlikte su ekosistemlerinde de bulunduğu rapor edilmiştir (Çil 2011; Niu et al 2016). *Streptomyces* dışındaki aktinomisetler nadir aktinomisetler olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan biri olan *Actinomadura* cinsinin pek çok suşunun kazein, jelatin ve lignoselülozu parçaladığı bilinmektedir. Yaygın habitatı toprak olan *Actinomadura* cinsinin pek çok antibiyotiği ürettiği de bilinmektedir. *Actinomadura hibisca*, *A. kijaniata*, *A. macra*, *A. oligospora* antibiyotik üreticisi olarak bilinen *Actinomadura* türlerinden bazılarıdır (Çil 2011; Tomita et al 1990- Harong 1980). Diğer bir nadir aktinomiset olan *Micromonospora* cinsi, toprak, su ve deniz sedimanları da dahil olmak üzere çeşitli habitatdan izole edildiği rapor edilmiştir (Trujio et al 2010). Sahip oldukları hidrolitik enzimler sayesinde organik madde döngüsünde önemli rol oynayan *Micromonospora* üyeleri selüloz, kitin ve diğer kompleks polisakkaritleri parçalayabilmektedir (de Menezes et al 2008; Çil 2011). Toprak verimliliğini arttıran ve bitki gelişimine katkıda bulunan *Micromonospora* suşları, ilaç yapımında kullanılan önemli sekonder metabolitleri de üretmektedir (Hirsch & Valdes 2010). Daha çok klinik izolat olarak bilinen *Nocardia* suşları, toprakta bol miktarda bulunmakla birlikte mağara, deniz sedimenti, aktif çamur gibi özel habitatlardan da izole edilmiştir Yamamuna et al 2005, Jurado

et al 2008). *Nocardiooides*, *Nonomuraea* ve *Kribella* cinslerinin literatüre katılması 1970'lerden sonra olsa da son dönemlerde farklı ekolojik habitatlardan izole edilmiş ve literatüre kazandırılmış onlarca türü ve alt türü bulunmaktadır (Amin et al 2016; Ikugana et al 2011).

Bu çalışmada yaygın habitatları toprak olan, daha önceki çalışmalarda farklı lokalitlerden izole edilmiş, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri tamamlanmış ve gen bölgeleri NCBI gen bankasına depozit edilmiş bazı aktinomisetlerin antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Çalışmada kullanılan suşların bir kısmı DSMZ (Alman Kültür Koleksiyonu) ve KCTC (Kore Kültür Koleksiyonu)'ye depozit edilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Test Organizmaları

Çalışma kullanılan organizmalar 2009 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarında Fadime Özdemir Koçak tarafından seçici izolasyon yöntemlerinden biri olan sükröz gradient metodu kullanılarak izole edilmiştir Koçak 2011; Yamamuna et al 2003). Test izolatlarının laboratuvar kodu, nereden izole edildiği Çizelge 1.'de verilmiştir.

Çizelge 1. Test izolatlarının kaynakçaları

Suşun laboratuvar kodu	Suşun adı	İzolasyon kaynağı
M20	<i>Actinomadura</i> sp.	Koçak, F., Moskova (Yugo Zapadnaya Mevkii, A1)
M23	<i>Actinomadura</i> sp.	Koçak, F., Moskova (Yugo Zapadnaya Mevkii, A1)
MD49	<i>Actinomadura</i> sp.	Koçak, F., Medine (Uhud Dağı toprağı)
S23	<i>Kribella</i> sp.	Koçak, F., Balıkesir (Sındırgı Baraj gölü, A2)
G12	<i>Micromonospora</i> sp.	Koçak, F., Kütahya-Simav (Gölcük krater gölü, A3)
G36	<i>Micromonospora</i> sp.	Koçak, F., Kütahya-Simav (Gölcük krater gölü, A3)
G37	<i>Micromonospora</i> sp.	Koçak, F., Kütahya-Simav (Gölcük krater gölü, A4)
M18	<i>Nocardia</i> sp.	Koçak, F., Moskova (Yugo Zapadnaya Mevkii, A1)
S37	<i>Nocardia</i> sp.	Koçak, F., Balıkesir (Sındırgı Baraj gölü, A5)
M8	<i>Nocardiooides</i> sp.	Koçak, F., Moskova (Yugo Zapadnaya Mevkii, A1)
M2	<i>Nonomuraea</i> sp.	Koçak, F., Moskova (Yugo Zapadnaya Mevkii, A1)
M3	<i>Nonomuraea</i> sp.	Koçak, F., Moskova (Yugo Zapadnaya Mevkii, A1)
MD16	<i>Streptomyces</i> sp.	Koçak, F., Medine (Uhud Dağı toprağı)
MD40	<i>Streptomyces</i> sp.	Koçak, F., Medine (Uhud Dağı toprağı)

A1 park ormanı toprağı; A2 Orman toprağı, A3 Bataklik; A4 Meşe ağacı kök toprağı; A5 Göl kenarındaki killi toprak

2.2. Antimikrobiyal Aktivite

Çalışma'da on dört test izolatının ATCC ve NRRL kültür koleksiyonlarından temin edilen toplam dört Gram pozitif (*Bacillus subtilis* NRRL B-209, *Micrococcus luteus* NRRL B-1018, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptomyces murinus* ISP 5091), üç Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NRRL B-123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus parasiticus* NRRL-465 olmak üzere toplam on patojene karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Aktinomisetler spor oluşturan bakteriler olduğundan ringer çözeltisinde sulandırılırken homojen bir süspansiyon elde edebilmek ve granülasyonu önlemek için 0,5 cm boyutunda cam boncuklarla vida kapaklı steril şişelere aktarılıp yaklaşık 3 dk vorteksle karıştırılmıştır. Her bir izolat için hazırlanan spor solüsyonları 0,5-1 McFarland bulanıklılığına göre ayarlandıktan sonra her bir örnekten otomatik pipet yardımıyla 7 µL alınarak modifiye edilmiş Bennett's Agar besi yeri yüzeyine 5'li gruplar halinde steril boş disklerle emdirilerek inoküle edilmiştir (Jones 1949). Gerekli inkübasyon süresi cinsten cinsine değiştiği için *Actinomadura*'larda 5-7 gün, diğer aktinomisetlerde 3 gün inkübe edildikten sonra gelişen koloniler üzerine, steril enjektör yardımıyla 3-5 mL'lik kloroform dökülmüştür ve kloroformun buharlaşması için petri plaklarının kapağı, 40 dk boyunca yarı açık bir şekilde tutulmuştur. Süre sonunda kloroformla öldürülen organizmaların üzerine 0,5-1 McFarland yoğunlukta 100 µL taze patojen mikroorganizma yayma plak yöntemiyle inoküle edilmiştir. Yayma plaka yöntemi McFarland ayarı yapıldıktan sonra 30 dk içinde, petriye aktarım yapıldıktan sonra 15 dk içinde, en az üç farklı yönde eküvyon çubukla gerçekleştirilmiştir. Plaklar, 37°C 'de 24-48-72 saatlerde okunmuştur. Koloni etrafında, o patojene karşı bir inhibisyon zonu oluşmuşsa petrinin arka kısmından dijital kumpas ile zon çapı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen zon çapları 10 mm'nin altındaysa inhibisyon gerçekleşmedi olarak değerlendirilmiştir. Denemeler üçer kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerin aritmetik ortalaması ve standart sapması PASW Statistics 18 (Chicago, IL) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır (SPSS 2009).

2.3. Antibiyotik Duyarlılığı

Mikroorganizmaların antibiyotiklere olan duyarlılıkların araştırılması uluslararası CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, eski adı NCCLS) standartlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir (CLSI 2006). Antibiyotik duyarlılığı için disk difüzyon metodu uygulanırken besi yeri olarak Müeller-Hinton Agar (Merck) kullanılmıştır. CLSI tarafından önerilen Oxoid marka dokuz antibiyotiğe (Ampicilin, Chloramphenicol, Erithromycin, Neomycin, Oxacilin, Sulfafurazole, Streptomycin, Trimethoprim-sulfometaxazole) karşı

oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiştir. Her bir izolat için taze kültürlerden hazırlanan spor solüsyonları 0,5-1 McFarland bulanıklılığına göre ayarlandıktan sonra her bir örnekten otomatik pipetle 100 µL alınıp Müeller-Hinton Agar besiyeri yerine aktarılmıştır. Bakterinin tüm besiyeri yüzeyine aşılması yayma plaka yöntemiyle sağlandıktan sonra antibiyotik diskleri uygun aralıklarla petrilere aseptik şekilde yerleştirilmiş ve mikroorganizmalar 28-30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yedi gün boyunca her gün kontrol edilmiş ve yedinci günün sonunda belirlenen inhibisyon zonu temel alınmıştır. İnhibisyon zon çapları, dijital kumpasla mm olarak ölçülmüş ve denemeler üçer kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerin aritmetik ortalaması ve standart sapması PASW Statistics 18 (Chicago, IL) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

Modifiye Bennett's Agar besiyeri üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasının sonuçları Tablo 2.'de verilmiştir. Buna göre M23 laboratuvar kodlu *Actinomadura* izolatı ile MD16 ve MD40 laboratuvar kodlu *Streptomyces* izolatları dışında diğer izolatlarda Gram pozitif organizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir. M23 35,26 mm ile yalnızca *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, MD16 ve MD40 çalışmada kullanılan dört patojene de karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Test izolatlarından yalnızca MD16 Gram negatif bir organizma olan *P. vulgaris*'e karşı 41,42 mm lik inhibisyon zonu oluşturarak antimikrobiyal aktivite gösterirken, hiçbir test izolatının *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. S23 numaralı *Kribella* izolatının test edilen mikrofunguslardan 19,35 mm ile yalnızca *S. ceravisiae*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. MD16 *S. ceravisiae*'ye 46,07 mm, MD40 *S. ceravisiae*'ye 68,8 mm, *C. albicans*'a karşı 20,41 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Test izolatlarının antibiyotik duyarlılığının araştırılmasında, uluslararası CLSI standartlarına göre dokuz farklı antibiyotik diski uygulanmıştır. Antibiyotik disklerine rağmen petri plaklarında gelişip, inhibisyon zon çapı oluşmamış suşlar dirençli (R) olarak kaydedilmiştir. Test suşlarının antibiyotik duyarlılığı sonuçları Tablo 3.'de verilmiştir.

Amikasin aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir ve bakterilerdeki 30S ribozomal alt birime bağlanarak protein sentezini engellemektedir. Amikacin (30 µg/mL) antibiyotiğine en duyarlı *Nocardioidea* (M8) *Micromonospora* cinsine ait izolatlar (G12, G36 ve G37), S23 *Kribella* ve M3 *Nonomuraea* izolatı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2. Test suşlarının patojenlere karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları

Suş kodu	İnhibisyon Zon Çapı (mm)									
	Gram pozitif				Gram negatif			Mikrofungus		
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. murinus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. parasiticus</i>
M20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M23	-	-	35,26±0,5	-	-	-	-	-	-	-
MD49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S23	-	-	-	-	-	-	-	19,35±0,52	-	-
G12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MD16	58,42±0,4	43,46±1	44,9±1	52,4±0,47	-	-	-	46,07±0,27	-	-
MD40	50,08±0,51	76,9±1	38,15±0,13	40,36±0,2	-	41,42±0,44	-	68,8±0,03	20,41±0,4	-

(-)Antimikrobiyal aktivite gözlenmedi ± Standart sapma

Chloramphenicol antibiyotiği *Streptomyces venezueale* tip kültüründen elde edilen 50S ribozomal alt birime bağlanarak protein sentezini engelleyen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Chloramphenicol (30 µg/mL) antibiyotiğine en duyarlı *Micromonospora* cinsine ait izolatların olduğu belirlenmiş (G12, G36 ve G37), S37 *Nocardia* ve MD16 *Streptomyces* izolatının dirençli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Erythromycin antibiyotiği *Streptomyces erythreus*'dan elde edilen Erythromycin (15 µg/mL) antibiyotiğine en duyarlı suş 45,15 mm inhibisyon zonu ile *Micromonospora* cinsine ait G12 izolatırken, MD49, S23, G36, M18, S37 ve M8 nolu izolatlar bu antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir.

Neomycin (30 µg/mL) antibiyotiğine tek dirençli suş *Micromonospora* cinsine ait G36 izolatu iken, en duyarlı suş 63,16 mm ile *Actinomadura* cinsine ait M20 olduğu belirlenmiştir. Diğer *Actinomadura* suşları olan M23 ve MD49'da da bu antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Neomycin (30 µg/mL) antibiyotiğine yüksek duyarlılık gösteren diğer izolatlar ise 58,84 mm ile G12 ve 50,16 mm ile G37 numaralı *Micromonospora* izolatları ve 50,78 mm ile M8 numaralı *Nocardioidea* izolatının olduğu belirlenmiştir.

Ampicilin (10 µg/mL) bakterilerin hücre duvarını bozarak ölümlerine neden olan bir antibiyotiktir. M8 nolu *Nocardioidea* izolatu 32,96 mm ile bu antibiyotiğe en duyarlı izolatır. *Actinomadura* cinsine ait MD49 nolu izolat ise 15 mm, M20 nolu izolat 22,29 mm inhibisyon zon çapıyla bu antibiyotiğe duyarlıyken M23 nolu izolatın dirençli olduğu belirlenmiştir.

Çalışmadaki iki *Nocardia* suşundan biri olan S37 nolu izolat 19,24 mm inhibisyon zon çapıyla bu antibiyotiğe duyarlı bir suş olduğu belirlenmiştir.

Oxacilin (1 µg/mL) β-laktamaz dirençli ikinci kuşak bir antibiyotiktir. Çalışmadaki izolatların büyük bölümü bu antibiyotiğe dirençliyen bir kısmında ise düşük miktarda duyarlılık gözlenmiştir. *Micromonospora* (G12, G36, G37) ve *Nocardioides* (M8) cinsine ait izolatlar ve *Actinomadura* izolatı olan M20’de duyarlılık gözlenmiştir.

Streptomycin (10 µg/mL) antibiyotiği *Streptomyces griseus*’dan izole edilmiş bilinen en eski antibiyotiklerden biridir. Aminoglikozid sınıfından bir antibiyotik olup yine bir aktinomisetin sebep olduğu tüberküloz hastalığının tedavisinde kullanılır. Çalışmada en yüksek duyarlılığı diğer antibiyotiklerde olduğu gibi *Micromonospora* (G12, G36, G37) ve *Nocardioides* (M8) cinsine ait izolatlar gösterirken, M20 ve M23 *Actinomadura* izolatları ve MD16 ve MD40 *Streptomyces* izolatlarında da duyarlılık gözlenmiştir.

Çizelge 3. Test suşlarının antibiyotik direnci/duyarlılığı

Suş kodu	İnhibisyon Zon Çapı (mm)								
	AK30	C30	E15	N30	OX1	S10	SXT25	AMP10	SF300
M20	45,70±0,26	18,32±0,08	8,5±0,04	63,16±0,26	12,18±0,13	11,19±0,26	R	22,29±0,04	44,77±0,8
M23	27±0,5	22±0,2	12±0,24	36±0,65	R	17±0,08	R	R	R
MD49	34,15±0,35	17,14±0,28	R	41,65±0,27	R	R	22,38±0,27	15±0,33	50,47±0,66
S23	R	12,5±0,33	R	36±0,12	R	R	55±0,44	R	R
G12	63,88±1	51,74±0,6	45,15±0,1	58,84±0,4	8,03±0,01	66,84±1	24,49±0,28	R	R
G36	71,8±0,85	37,46±0,35	R	R	9,31±0,03	62,72±0,9	49,72±0,55	R	R
G37	60,1±0,62	38,86±0,14	17,4±0,13	50,16±0,33	18	72,8±0,66	R	R	R
M18	57,37±0,04	11,63±0,26	R	40,59±0,66	R	R	R	R	R
S37	48,6±0,33	R	R	23,39±0,1	R	R	37,9±0,24	19,24±0,28	46±0,56
M8	72,9±0,4	16,23±0,03	R	50,78±0,47	16,41±0,07	71,4±0,5	R	32,96±0,7	23,44±0,27
M2	14,94±0,13	18,53±0,14	19,52±0,16	14,21±0,13	R	R	30,83±0,25	R	R
M3	R	14,82±0,84	17,3±0,27	15,2±0,22	R	R	27,29±0,33	R	R
MD16	42,05±0,38	R	27,20±0,33	28,3±0,18	R	36,2±0,22	23,84±0,27	R	27,54±0,48
MD40	38,83±0,03	21,02±0,35	18,73±0,5	27,65±0,25	R	31,96±0,18	23,88±0,34	R	15,55±0,33

R Dirençli ± Standart sapma **AMP10** Ampicilin 10 µg/mL, **AK 30** Amikacin 30 µg/mL, **C30** Chloramphenicol 30 µg/mL, **E15** Erythromycin 15 µg/mL, **N30** Neomycin 30 µg/mL, **OX1** Oxacilin 1 µg/mL, **SF300** Sulfafurazole 300 µg/mL, **S10** Streptomycin 10 µg/mL, **SXT25** Trimethoprim-sulfometaxazole 25 µg/mL

Trimethoprim-sulfometaxazole günümüzde de kullanılan ikili bir antibiyotiktir. Bu antibiyotiğe karşı en yüksek duyarlılığı 55 mm ile *Kribella* izolatı göstermiş, pek çok antibiyotiğe duyarlı olan M8, G37, M20, M23, M18 nolu izolatların dirençli olduğu belirlenmiştir.

Sulfafurazole (300 µg/mL) bir çeşit sulfonamid grubu antibiyotiktir. MD49 nolu izolat 50,47 mm M20 44,77 mm ile en duyarlı izolatlar, yine bir *Actinomadura* izolatı olan M23 suşunun dirençli olduğu görülmüştür. S37 nolu *Nocardia* izolatında 46 mm inhibisyon zon çapı

gözlemlenirken, *Micromonospora* ve *Nonomuraea* izolatları bu antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Antibiyotik keşiflerinde ve bunların üretimindeki başarılarına rağmen, günümüzde ölüm nedenleri arasında ikinci sırasında enfeksiyon hastalıklarından kaynaklanan ölümler gelmektedir. 1942 yılında *Streptomyces*'den elde edilen streptothricin ve bundan iki yıl sonra ise streptomycin antibiyotiğinin keşfiyle bilim insanları bu cins üzerine çalışmalara başlamıştır. Günümüzde kullanılan aktinomiset kaynaklı antibiyotiklerin de %80'i ise *Streptomyces* cinsinden elde edilmektedir (de Lina Procopio et al 2012). Yapılan bu çalışmada aktinomisetlerden *Actinomadura*, *Kribella*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Nonomuraea* ve *Streptomyces* cinslerine ait izolatlardan *Streptomyces* cinsine ait suşlarda önemli antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Bu amaçla çalışma kapsamında test izolatlarının büyük bölümünün yeni birer tür olduğu uluslararası akredite laboratuvarlar olan DSMZ Alman kültür koleksiyonu ve KCTC Kore Cumhuriyeti Kültür Koleksiyonu tarafından onaylanmış ve sertifikalandırılmıştır. *Actinomadura* cinsi *Streptomyces*'ler kadar olmasa da aktinomisetler içinde iyi bir antibiyotik üreticisi olarak da bilinmektedir. Toprakta izole edilen bazı türleri antibiyotik endüstrisinde kullanılan çeşitli antibiyotikleri üretmektedir. 1991 yılında Fiji adalarındaki topraktan izole edilen *Actinomadura hibisca*, *A. kijaniata*, *A. macra*, *A. oligospora* antibiyotik üreticisi olarak bilinen türlerden bazılarıdır (Tomita et al 1990; Huang 1980; Mertz & Yao 1986). Yapılan bu çalışmada da M23 (DSM 45915) numaralı *Actinomadura* izolatı, *Streptomyces* izolatları gibi *Staphylococcus aureus* patojenine karşı etkili antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur.

Micromonospora cinsi üyeleri toprak dışında, deniz ve göl sularında, böceklerin bağırsaklarında ve özellikle bitkilerin kök sisteminde yayılış göstermekte olup sentezlediği antibiyotik ve antifungal gibi sekonder metabolitler ile bitki patojenleriyle rekabet halindedir. Cinsin bu özelliğinden yola çıkarak balçıktan izole edilmiş G12 (DSM 45933), G36 (DSM 45917), G37 (DSM 45916) numaralı izolatların antimikrobiyal madde üretilip üretmedikleri disk difüzyon yöntemiyle incelendi. Yapılan çalışmada *Nocardioides* (M8) ve *Micromonospora* cinsine ait izolatların (G12, G36, G37) antimikrobiyal aktivitesi gözlenmezken, çalışmada kullanılan antibiyotiklere en duyarlı suşlar olduğu tespit edilmiştir.

Actinobacteria sınıfından edilen yeni moleküllerin keşfi, antibiyotik araştırmalarında ve sonradan gelişen antibiyotik tedavilerinde yeni bir dönemi başlatmıştır. Zira, medikal ve endüstriyel uygulamalar için yeni antibiyotiklerin ve diğer biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin

keşfi, günümüzde hala önemini korumaktadır (Takahashi & Omuna 2003; solonski & Khonma 2008). MD16 (DSM 42099T, KCTC 29436) ve MD40 (DSM 42100, KCTC 29437) *Streptomyces* ve M23 *Actinomadura* izolatlarının primer ve sekonder metabolitlerinin araştırılabileceği, farklı disiplinlere de araştırma materyali olacağı beklentiler arasındadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından AR-1241 no'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Lam S. K., (2006), *Current Opinion in Microbiology*, 9, p. 245–251.
- Hwang K-S., Kim H. U., Charusanti P., Palsson B. Ø., Lee S. Y., (2014), *Biotechnology Advances*, 32, p. 255–268.
- Çil E. (2011). Farklı habitatlardan izole edilen *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia* ve *Streptomyces* suşlarının moleküler taksonomisi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
- Niu G., Chater K. F., Tian Y., Zhang J. and Tan H., (2016), *FEMS Microbiology Reviews*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuw012>
- Tomita K., Nishio M., Saitoh K., Yamamoto H., Hoshino Y., Ohkuma H., Konishi M., Miyaki T., Oki T., (1990), *J. Antibiotics*, XLIII (7), p. 755-762.
- Waitz J. A., Horan A. C., Kalyanpur, M. B., Lee, K. D., Loebenberg, J. A., Marquez, G., Miller, and Patel, M. G., (1981), *J. Antibiotics*, 34, p. 1101-1106.
- Huang L. H., (1980), *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, p. 565-568.
- Trujillo M. E., Alonso-Vega P., Rodrı'guez R., Carro L., Cerda E., Alonso P. and Martı'nez-Molina E., (2010), *International Society for Microbial Ecology*, 4, p. 1265–1281.
- de Menezes A. B., Lockhart R. J., Cox M. J., Allison H. E., McCarthy A. J., (2008), *Applied and Environmental Microbiology*, 74, p. 7080-7084.
- Hirsch A. M., Valdés M., (2010), *Soil Biology & Biochemistry*, 42, p. 536-542.
- Yamamura H., Masayuki H., Nakagawa Y., Tamura T., Kohno T., Komatsu F. and Iimura Y., (2005), *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, p. 433–436.
- Jurado V., Boiron P., Kroppenstedt R., Laurent F., Couble A., Laiz L., Klenk H.-P., Gonzá'lez J. M., Saiz-Jimenez C., Mounie'e D., Bergeron E., and Rodrı'guez-Nava V., (2008), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, p. 2210–2214.
- Amin A., Ahmed I., Habib N., Abbas S., Xiao M., Hozzein, W. N., Li W-J., (2016), *Antonie van Leeuwenhoek*, 109: 1101. doi:10.1007/s10482-016-0711-8.
- Koçak F. Ö. (2011). Bazı Nocardioform izolatların 16S rRNA, *rpoB* ve *gyrB* gen dizi analizleri ile moleküler sistematiği, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi
- Takagi M. and Shin-ya K., (2012), *The Journal of Antibiotics*, 65, p. 443-447.
- Gesheva, V. & Vasileva-Tonkova, E. (2012), *World J Microbiol Biotechnol* 28: 2069. doi:10.1007/s11274-012-1009-2

- Ikunaga Y., Sato I., Grond S., Numaziri N., Yoshida S., Yamaya H., Hiradate S., Hasegawa M., Toshima M., Koitabashi M., Ito M., Karlovsky P., Tsushima T., (2011), *Appl Microbiol Biotechnol* 89: p. 419-427.
- Yamamura H., Hayakawa M., Limura Y., (2003), *Journal of Applied Microbiology*, 95, p. 677–685.
- Jones, K. L., (1949), *Journal of Bacteriology*, 57, p. 141-145.
- SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc. <http://www.winwrap.com/web2/>
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard—9th ed. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. <http://clsi.org/blog/2015/01/08/clsi-publishes-new-antimicrobial-susceptibility-testing-standards/>
- de Lima Procópio, R. E., da Silvaa I. R., Martins M. K., de Azevedo J. L., de Araújo J. M., (2012), *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), p. 466-471.
- Mertz F. P. and Yao R. C., (1986), *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, p. 179-182.
- Takahashi Y. and Omura S., (2003), *Journal of General Applied Microbiology*, 49, p. 141-154.
- Solanski R., Khanna M., Lal R., (2008). *Indian Journal of Microbiology*, 48, p. 410–431.