

Atıf İçin: Özdemir Koçak F, 2022. *Micromonospora* ve *Nonomuraea* İzolatlarının Moleküler Tanımlamaları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(4): 2004 - 2013.

To Cite: Ozdemir Kocak F, 2022. Molecular Identification and Determination of Antimicrobial Activity of *Micromonospora* and *Nonomuraea* Isolates. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(4): 2004 - 2013.

***Micromonospora* ve *Nonomuraea* İzolatlarının Moleküler Tanımlamaları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Fadime ÖZDEMİR KOÇAK^{1*}

ÖZET: Aktinobakteriler farklı ekosistemlerde yaşayabilen ve sekonder metabolit açısından zengin kaynak oluşturan bakteri grubunun en büyük üyesini oluşturmaktadır. Nadir aktinobakteriler ise aktif metabolitler açısından önemli hedeflerden biri haline gelmiştir. Nadir aktinobakterilerden olan *Micromonospora* ve *Nonomuraea* son dönemde en çok ilgi çeken cinslerdendir. Sunulan çalışmada endemik bir türden *Micromonospora* ve *Nonomuraea* cins üyelerinin izolasyonu hedeflenmiştir. İzolatların moleküler tanımlamalarında 16S rRNA gen bölgesi analizleri kullanılmıştır. Analizler sonucunda 10 izolatın *Micromonospora* üyesi, 2 izolatın *Nonomuraea* üyesi olduğu belirlenmiştir. *Nonomuraea* sp. HCI 01 ve HCI 02 suşları *Micromonospora* sp. HCI 04, HCI 23, HCI 39, HCI 44 ve HCI 49 suşlarının olası yeni birer tür olma potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında *Micromonospora* sp. HCI 45, HCI 47 ve HCI 49 suşları *E. coli*'ye karşı, HCI 20 ve HSF 02 *S. aureus*'a karşı ve HCI 04 ve HSF 02 ise *S. cerevisiae*'a karşı etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. *Nonomuraea* sp. ise HCI 02 *S. cerevisiae*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlarla, olası yeni türlerin olduğu ve antibiyotik olma potansiyeline sahip biyolojik aktif moleküllerin varlığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, antimikrobiyal aktivite, *Micromonospora*, *Nonomuraea*

Molecular Identification and Determination of Antimicrobial Activity of *Micromonospora* and *Nonomuraea* Isolates

ABSTRACT: Actinobacteria are the largest member of the Bacteria group, which can live in different ecosystems and create a rich source of secondary metabolites. Rare actinobacteria have become one of the important targets in terms of active metabolites. *Micromonospora* and *Nonomuraea*, which are rare Actinobacteria, are among the genera that have attracted the most attention recently. In the present study, it was aimed to isolate *Micromonospora* and *Nonomuraea* genus members from an endemic species. 16S rRNA gene region analyzes were used for molecular identification of isolates. As a result of the analysis, it was determined that 10 isolates were members of *Micromonospora* and 2 isolates were members of *Nonomuraea*. It has been determined that *Nonomuraea* sp. HCI 01 and HCI 02 strains and *Micromonospora* sp. HCI 04, HCI 23, HCI 39, HCI 44 and HCI 49 strains have the potential to become a possible new species. In biological activity studies, *Micromonospora* sp. HCI 45, HCI 47 and HCI 49 strains were found to be active against *E. coli*, HCI 20 and HSF 02 against *S. aureus*, and HCI 04 and HSF 02 against *S. cerevisiae*. *Nonomuraea* sp. HCI 02 was found to have antimicrobial activity against *S. cerevisiae*. The results obtained have shown that there are possible new species and the existence of biologically active molecules with the potential to be antibiotics.

Keywords: 16S rRNA, antimicrobial activity, *Micromonospora*, *Nonomuraea*

¹ Fadime ÖZDEMİR KOÇAK (ORCID ID: 0000-0002-8557-5166), Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Bilecik, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Fadime Özdemir Koçak, e-mail: fadime.ozdemirkocak@bilecik.edu.tr

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "2013-01.BİL.13-01" kodlu projeden elde edilmiştir.

GİRİŞ

Doğada yaygın olarak bulunan aktinobakteriler, özellikle toprakta, tatlı su ve denizel ortamlarda bol miktarda bulunan Gram pozitif bakterilerdir (Benhadj ve ark., 2019). Aktinobakteri, 5 alt sınıf, 6 ordo ve 14 alt ordo dahil olmak üzere, Bakteri domaini içerisinde bulunan 18 ana soy arasında en büyük taksonomik birimlerden birini temsil eder (Barka ve ark., 2016). Aktinobakteri grubuna ait türler sekonder metabolit açısından yaygın olarak taranmaktadır. Özellikle en çok çalışılan grup *Streptomyces*'dir. Fakat nadir aktinobakterilerinde sekonder metabolit üretimi açısından özellikle antibiyotik, antitümör ajanı, herbisit olarak, pestisit veya enzimler açısından iyi aday oldukları farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Bérdy, 2012; Vickers, 2017).

Micromonospora cins üyeleri toprak, rizosfer, bitki dokuları ve denizel ortamlar gibi farklı birçok habitatlardan izole edilmiştir (Martínez-Hidalgove ark., 2020; Veyisoglu ve ark., 2020). *Micromonospora* cinsi, *Streptomyces* cinsinden sonra en çok sekonder metabolit üreten cins olarak bilinmektedir. Bu cins üyeleri gentamicin (Lancini ve Lorenzetti, 1993), rifamycins (Kim ve ark., 2006) gibi çok iyi bilinen antibiyotikler yanında Galtamycin B (Antalve ark., 2005), Levantilide C (Fei ve ark., 2013), Mintaimycins (Hu ve ark., 2022) gibi farklı etkinliğe sahip metabolitlerinde üreticileridir. Özellikle yeni metabolitlerin keşfi amacıyla farklı habitatlardan izolasyon çalışmaları günümüzde de devam etmektedir (Malisorn ve ark., 2020).

Nonomuraea cins üyeleri aerobik, Gram-pozitif, aşırı dallanmış substrat ve hava miselyumlarına sahip hareketsiz aktinomisetlerdir. *Nonomuraea* cins üyelerinin birçoğu topraktan izole edilmiş olmasına rağmen deniz ve nehir sedimenti, mağara veya bitki yaprağı gibi farklı ortamlardan izole edilenleri de vardır (Ozdemir-Kocak ve ark., 2014; Lipun ve ark., 2020; Saygin ve ark., 2020; Klykleung ve ark., 2020; Saricaoglu ve ark., 2020). Sealutomicins (Igarashive ark., 2021), Nonocarboline A-E, -Carboline (Primahana ve ark., 2020) ve Akazamicin (Yangve ark., 2019) gibi moleküller son dönemde keşfedilmiş *Nonomuraea* türleri tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Bu cins üyelerinin zengin bir ticari ürün, kayda değer bir antibiyotik ve enzim üreticisi olduğu düşünülmektedir.

Antibiyotik direnci küresel bir kriz olarak ortaya çıkmakta ve artan sayıda bakteriyel enfeksiyonun tedavisi zorlaşmaktadır. 1980'lerden beri keşfedilen yeni, klinik olarak uygun bir antibiyotik sınıfının olmaması nedeniyle, yaygın enfeksiyonlar ve küçük yaralanmaların ölümcül hale geldiğini bildirmiştir. Ortaya çıkan antibiyotik direnci sorununun üstesinden gelmek için dirençli mikroplara karşı güvenli ve etkili yeni antibiyotiklerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Back ve ark., 2021). Mikrobiyal doğal ürünler ve türevleri, farmosötik, endüstri ve ziraat gibi alanlarda yeni antibiyotiklerin ve diğer biyoaktif mikrobiyal metabolitlerin keşfi açısından bu bileşiklerin önemli bir kaynağına sahiptir ve olmaya devam edecektir. Özellikle keşif çalışmalarında çalışılmamış ekosistemler ve ekstrem habitatlar tercih edilmektedir (Abdel-Mageed ve ark., 2021; Igarashive ark., 2021; Primahana ve ark., 2020; Yang ve ark., 2019).

16S ribozomal RNA dizileme analizleri, aktinobakterileri tanımlamak için kullanılan moleküler yöntemlerden biridir. 16S rRNA analizi ile birlikte G+C oranları dikkate alınarak yapılan son revizyon ile aktinobakteri sistematigi yeniden şekillenmiştir (Nouioui ve ark., 2018). 16S rRNA gen bölgesi analizleri sistematikte hala güncelliğini koruyan moleküler tekniklerden biri olup veri tabanının geniş olması ve belirli oranda korunmuş bölgelere sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (Tindall ve ark., 2010).

Bu çalışmada, Pazaryeri İlçesi'nde endemik olarak yetişen *Humulus lupulus* (Şerbetçi otu) rizosfer toprağından *Micromonospora* ve *Nonomuraea* üyelerinin izolasyonu, elde edilen

izolatların 16S rRNA gen bölgesi ile moleküler tiplendirilmesi ve antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Micromonospora ve *Nonomuraea* suşlarının izolasyonu

Şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) rizosfer toprağından yapılan izolasyon çalışmasında; sükröz gradient santrifügasyon prosedürü ile dilüsyon plaka yöntemi uygulanarak aktinobakteri izolatları elde edilmiştir (Sembiring, 2000; Yamamura ve ark., 2003). Rizosfer örneğinden alınan toprak örnekleri steril kaplarda laboratuvara getirilmiş ve 15 gün süresince kurutulmaya bırakılmıştır. Steril havanda dövülen ve steril elekten geçirilen örneklerden 1 g tartılarak 9 ml ringer çözeltilisine eklenmiş (10^{-1} dilüsyonları) ve ilk dilüsyon 55°C 'de su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Dekontaminasyon işlemi sonrasında %10, 20 ve 30 sükröz yoğunluğuna sahip 10 ml'lik tüplerde hazırlanan sükröz çözeltilisinin üst kısmına 1 ml örnek ilave edilmiştir. Spor süspansiyonu ilave edilmiş tüpler santrifüj (oda sıcaklığında 30 dk, 240xg) edilerek ve bu örnekler 10^{-2} - 10^{-6} sulandırmaları yapılan toprak dilüsyonlarından önceden hazırlanan seçici besiyerlerine yayma plak tekniği ile inoküle edilmiş ve 28°C 'de 15 gün inkübe edilmiştir (Yamamura ve ark., 2003). Dilüsyon plaka yönteminde ise ilk dilüsyondan sonra ringer çözeltilisi içeren tüplerde seri sulandırma işlemi yapılmış ve 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlar kullanılarak yayma plaka yöntemi ile seçici besiyerlerine inoküle edilmiştir (Sembiring, 2000). Kullanılan besiyerleri ve ajanlar Çizelge 1'de verilmektedir.

Çizelge 1. Şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) rizosfer toprak örneklerindeki *Micromonospora* ve *Nonomuraea* cins üyelerinin izolasyonu için kullanılan seçici ortamlar

Adı	Basal medium	Seçici ajan*
HV*	Hümitik asit-vitamin agar	Nalidilik asit ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$), Fenol
ISP 2*	Yeast-malt ekstrakt agar	Rifamycine ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$), Cylohexemide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), Nalidilik asit ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$)
TYGA*	Tripton yeast glukoz agar	Nalidilik asit ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$), Rifamycine ($4 \mu\text{g ml}^{-1}$), Cylohexemide ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)
SM3*	Gauze's medium No.2	Nalidixic acid ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), novobiocin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$)

*Her bir izolasyonda kullanılan besiyerine nitatin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ilave edilecektir

Moleküler Karakterizasyon

İzolasyon plakalarında morfolojik olarak aktinobakteri morfolojisine benzer koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Saf kültürler %30'luk gliserol çözeltili içerisine transfer edilerek -20°C 'de stoklanmıştır.

Genomik DNA ve 16S rRNA gen bölgesi analizleri

DNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen, USA), seçilen izolatların DNA'sını elde etmek amacıyla kullanılmıştır. İzolatlardan elde edilen DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edilmiştir.

Aktinobakterilerin 16S bölgesinin çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılan iki primer (27f ve 1525r) ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir (Lane, 1991). 16S rRNA gen bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılmasında her bir örnek için 50 μl ölçüdeki bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım; Hot Start Master Mix (25 μl), primerler (1 μl), DNA (1-2 μl) ve sudan (nükleaz içermeyen) oluşmaktadır. PCR reaksiyon koşulları; ön denatürasyon (94°C , 2 dk, 1 döngü), denatürasyon (94°C , 1 dk, 35 döngü), bağlanma (55°C , 2 dk, 35 döngü), uzama (72°C , 3 dk, 35 döngü) ve son uzama (72°C , 8 dk, 1 döngü) basamaklarından oluşmuştur.

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi MacroGen (Hollanda) firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. MacroGen firması tarafından farklı 5 farklı primer (800r, MG3f, MG5f, 27f ve 1525r) kullanılarak 16S rRNA gen bölgesinin baz dizilimini ABI3730XL dizileme cihazı ile elde edilmiştir. ABI formatındaki dosyalar fasta formatına dönüştürüldükten sonra MEGAX programları kullanılarak karşılaştırmalı ve manuel olarak 5 farklı primerden elde edilen diziler birleştirilmiştir (Kumar ve ark., 2018). Birleştirilen diziler NCBI blast programında analiz edilmiştir. Daha sonra, bu diziler ExTaxon Server programı kullanılarak analizlerine devam edilmiştir (Kim ve Chun, 2014). İlgili izolatlara en yakın tip türleri belirlenmiş ve sonrasında tip türlerinin 16S rRNA gen dizileri NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> adreslerinden indirilerek elde edilmiştir. Tip türlerine ait diziler ile izolat/izolatlara ait dizilerin hizalama işlemi MEGAX programında gerçekleştirilmiştir. Aynı program kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik soyağaçlar, Neighbour-joining algoritması ve Jukes-Cantor uzaklık matrisi kullanılarak elde edilmiştir (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik ağaçları oluşturma sırasında kullanılan bootstrap analizleri ise 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite Testi

Micromonospora ve *Nonomuraea* sp. suşlarının *S. aureus* (Gram pozitif), *E. coli* ve *P. aeruginosa* (Gram negatif), *S. cerevisiae* (maya) ve *C. albicans* (fungus) patojenlerine karşı etkileri incelenmiştir (Williams ve ark., 1983). Spor süspansiyonu hazırlanan suşlar nokta ekim yöntemi ile modifiye Bennett's agar ortamına inoküle edilmiş ve 30 °C 'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Jones, 1949). Gelişen koloniler üzerine, 3-5 ml 'lik kloroform dökülmüş ve öldürülen koloniler üzerine, daha sonra her biri steril %0.5'lik nutrient agar içerisinde 2 gün süreyle gelişen patojen test organizmalar 0.1 OD'ye ayarlanarak yayma plak yöntemiyle inoküle edilmiştir. İnokülasyon petripleri 37 °C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Koloni etrafında meydana gelen açıklık bakterinin patojene karşı etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. İnhibisyon zon çapları kumpas ile ölçülmüştür.

BULGULAR VE TARTIŞMA

***Micromonosporave Nonomuraea* suşlarının izolasyonu**

Şerbetçi otu (*Humulus lupulus*) rizosfer toprağından alınan örneklere dekontaminasyon işlemi uygulandıktan sonra dilusyon plaka yöntemi ve sükröz santrifügasyon metodu kullanılarak HV, ISP 2, TYGA ve SM3 agar gibi seçici besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 10-14 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İzolasyon prosedürleri sonucunda aktinobakteri benzeri izolatlar elde edilmiş ve tek koloni ekimi ile elde edilen izolatların saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılan izolatların miselyum ve sporları %25'lik steril gliserol çözelti içerisine transfer edilerek -20 °C'de stoklanmıştır.

Moleküler Karakterizasyon

Genomik DNA izolasyonu ve 16S rRNA gen bölgesi analizleri

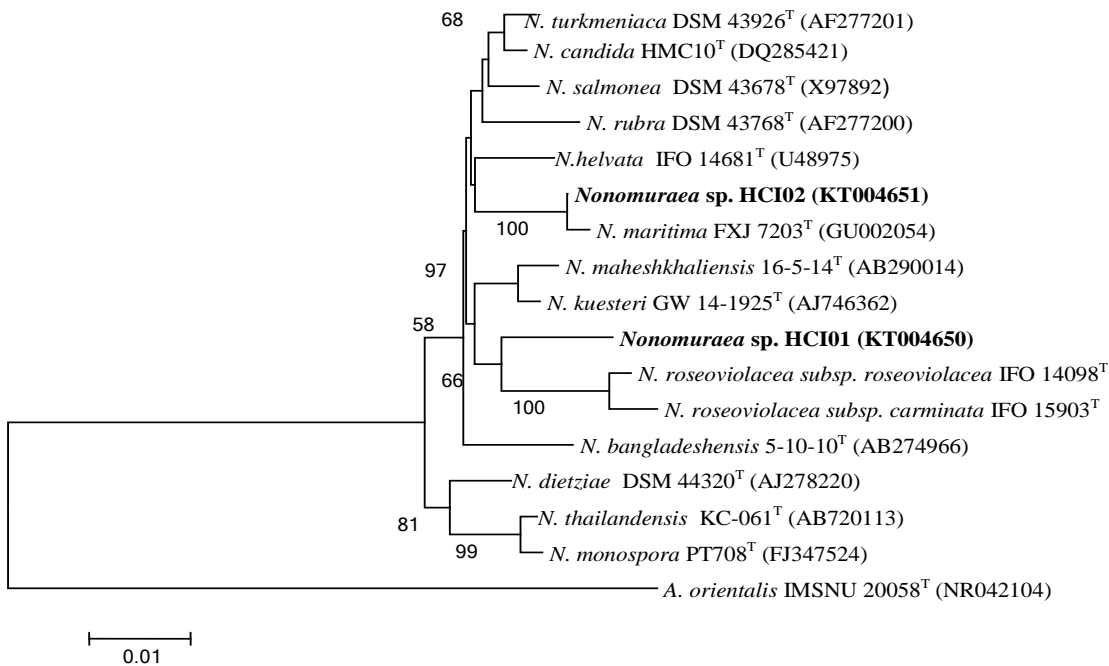
Micromonospora ve *Nonomuraea* benzeri izolatlar seçilmiş ve genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2). DNA'nın varlığı jel elektroforez yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. 16S rRNA dizileme çalışmalarında kullanılan izolatlar ve ait oldukları cinsler

Organizma	Cinsi	Organizma	Cinsi
HCI 01	<i>Nonomurae</i> sp.	HCI 34	<i>Micromonospora</i> sp.
HCI 02	<i>Nonomurae</i> sp.	HCI 39	<i>Micromonospora</i> sp.
HCI 04	<i>Micromonospora</i> sp.	HCI 44	<i>Micromonospora</i> sp.
HCI 20	<i>Micromonospora</i> sp.	HCI 45	<i>Micromonospora</i> sp.
HSF 02	<i>Micromonospora</i> sp.	HCI 47	<i>Micromonospora</i> sp.
HCI 23	<i>Micromonospora</i> sp.	HCI 49	<i>Micromonospora</i> sp.

Saf DNA örnekleri kullanılarak 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesi universal primerler kullanılarak (27f ve 1525r) çoğaltılmıştır (Lane, 1991). Çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesinin PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

PCR amplifikasyon ürünlerinin baz dizi analizi MacroGen firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesinin baz diziliminde farklı 5 farklı primer kullanılmış ve MacroGen firması tarafından ABI3730XL otomatik baz dizileme cihazıyla belirlenmiştir. Elde edilen dizilerin birleştirilmesinde MEGAX programı kullanılmış ve zayıf nitelikli baz dizileri uzaklaştırılmıştır. Oluşturulan dizi ile en yakın olduğu akraba tip türlerin dizileri MEGAX programı kullanılarak analiz edilmiştir. 16S rRNA baz dizilerinin filogenetik soyağaçları yine MEGAX programında Neighbour-joining algoritması ve Jukes-Cantor uzaklık matrisi kullanılarak çizilmiştir. Filogenetik ağaçlarda bootstrap analizleri 1000 tekarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

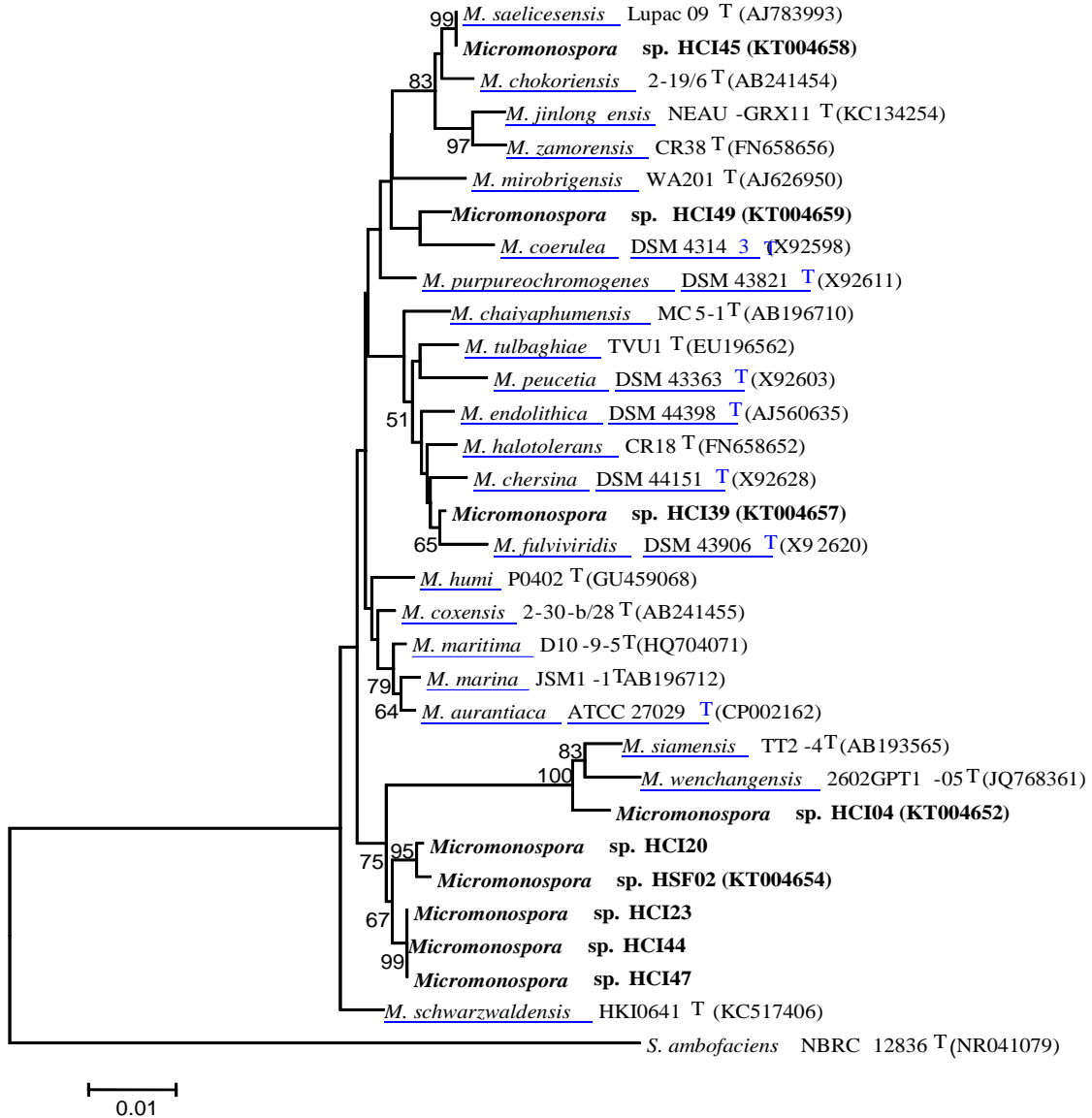


Şekil 1. Test organizmaları ile *Nonomuraea* cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. Dış grup olarak *A. orientalis* kullanılmıştır

İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatların filogenetik analizleri sonucunda 2 izolatın *Nonomuraea* cins üyesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *Nonomuraea* sp. HCI 01 izolatının *N. salmonea* tip türüne %98 benzerlik ve 28 nt (1149 bp) farklılığına sahip olduğu ve *Nonomuraea* sp. HCI 02 izolatının ise *N. maritima* ile % 99.2 benzerlik ile 11 nt (1477 bp) farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

Filogenetik analizler sonucunda 10 izolatın *Micromonospora* cinsine üye olduğu tespit

edilmiştir. *Micromonospora* sp. HCI 04, HCI 20, HCI 23, HCI 44, HCI 47 ve HSF 02 izolatlarının *M. siamensis* tip türü ile %99.0 ile %99.2 arasında benzerlik gösterdiği ve bu izolatların 10-14 nükleotit farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. *Micromonospora* sp. HCI 34 izolatu ise *M. coxensis* tip türüyle %99.1 benzerlik ve 11 nükleotit farklılığı göstermektedir. HCI 39 *Micromonospora* izolatu *M. fulviridis* ile %99.18 benzerliğe ve 12 nükleotit farklılığına sahip olduğu tespit edilmiştir. *Micromonospora* sp. HCI 45 izolatu ise *M. saeliensis* tip türü ile %99.59 benzerliğe ve 6 nükleotit farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. HCI 49 izolatu *M. purpureochromogenes* tip türü ile akrabalık ilişkisi olduğu görülmüştür (%99 benzerlik ve 14 nükleotit farklılık; Şekil 2).



Şekil 2. Test organizmaları ile *Micromonospora* cinsine ait tip türlerinin 16S rRNA gen bölgesinin Neighbour-joining filogenetik soy ağacı. Dış grup olarak *S. ambofaciens* kullanılmıştır

Ay ve ark.'nın yaptığı çalışmada *Micromonospora* izolatını Nemrut gölü sediment örneğinden izole etmiş ve 16S rRNA dizileme çalışmasında *M. radices* ile %99.4 benzerliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan homoloji çalışması ve diğer kemotaksonomik, moleküler analizlerle yeni bir tür olarak literatüre kazandırmışlardır (Ay ve ark., 2020). Toprakten izole edilen NEAU-HG-1 izolatu ise *M. auratinigra* tip türüne %98.9 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2021). Yine farklı bir çalışmada topraktan izole edilen *Nonomuraea* sp.

FMN03 izolatu moleküler, nümerik ve kemotaksonomik analizlerle yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (Ozdemir-Kocak ve ark., 2014). Karakum çölünden yapılan izolasyon çalışması ile Saygın ve arkadaşları 4 farklı yeni türü literatüre kazandırmışlardır. Farklı ortamlardan yapılan izolasyon çalışmaları ile olası yeni türlerin taramasında 16S rRNA gen bölgesi analizleri oldukça etkin olarak kullanılmaktadır. Sunulan çalışmada da *Micromonospora* ve *Nonomuraea* cinslerine ait olduğu belirlenen suşlardan potansiyel yeni tür olma ihtimali olan adaylar bulunmaktadır. Biyolojik çeşitliliğin ortaya konması ve yeni biyolojik aktif metabolit üreticilerinin keşfi amacıyla izolasyon ve tanımlama çalışmaları güncelliğini ve önemini korumaktadır.

Antimikrobiyal Aktivite Testi

Micromonospora ve *Nonomuraea* cinsine ait suşların antimikrobiyal aktiviteleri 5 farklı patojene karşı test edilmiştir. Bu suşların antimikrobiyal etkinliklerinin en az 8 mm ile en çok 12 mm arasında olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi yapılan izolatların çoğu (6 izolat) Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* bakterisinde inhibisyon oluşturmuştur. *P. aeruginosa* ve *C. albicans* patojenlerini ise hiçbir suşun inhibe etmediği belirlenmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. *Micromonospora* ve *Nonomuraea* suşlarının patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri

Örnekler	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
HCI 01	-	-	-	-	-
HCI 02	-	-	9 mm	-	-
HCI 04	-	-	10 mm	-	-
HCI 20	-	11 mm	-	-	-
HCI 23	8 mm	-	-	-	-
HCI 34	9 mm	-	-	-	-
HCI 39	9 mm	-	-	-	-
HCI 44	-	9 mm	-	-	-
HCI 45	10 mm	-	-	-	-
HCI 47	11 mm	-	-	-	-
HCI 49	11 mm	-	8 mm	-	-
HSF 02	-	12 mm	10 mm	-	-

E. coli'e karşı HCI 23 (8 mm), HCI 34 (9 mm), HCI 39 (9 mm), HCI 45 (10 mm), HCI 47 (11 mm) ve HCI 49 (11 mm) suşları etkinlik gösterirken *S.aureus*'a karşı HCI 20 (11 mm), HCI 44 (9 mm) ve HSF 02 (12 mm) suşları antimikrobiyal aktivite etkinliği göstermiştir. HCI 02 (9 mm), HCI 04 (10 mm), HCI 49 (8 mm) ve HSF 02 (10 mm) *S. cerevisiae*'a karşı etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Benhadj ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada nadir aktinobakteri izolasyonu, moleküler tanımlaması ve izolatların antimikrobiyal özelliklerini incelemişlerdir. Yapılan izolasyon çalışmasında *Actinomadura* sp., *Micromonospora* spp., *Nocardia* spp. ve *Nonomuraea* sp. izolatları elde edilmiş ve 16S rRNA analizleri ile filogenetik ilişkileri belirlenmiştir (Benhadj ve ark., 2019). Suşların antimikrobiyal özellikleri incelendiğinde *Micromonospora* suşlarından E1N386 suşunun *Staphylococcus* sp. izolatına, E5N430 suşunun ise yine *S. aureus* ve *Staphylococcus* sp. izolatına karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. E5N429 suşu ise hiç bir patojen mikroorganizmaya karşı aktivite göstermediği tespit edilmiştir. *Nonomuraea* sp. izolatu ise *E. coli*, *Staphylococcus* sp. ve *Enterobacter sakazakii* karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanım için 3 farklı besiyeri önerilmiş ve besiyeri farkına göre antimikrobiyal

etkinliğin değiştiği tespit edilmiştir. Genellikle aktinobakteri cins üyelerinin antimikrobiyal çalışmalarında Bennet's agar kullanılmakta olup bu çalışmada ISP 2 ve glukoz maya ekstrak agar (GYMA) kullanılabileceğini göstermişlerdir (Benhadj ve ark., 2019). Yaptığımız çalışmada *Micromonospora* ve *Nonomuraea* suşlarının antimikrobiyal etkinlikleri modifiye Bennet's agar kullanılarak belirlenmiş ve bazı suşlardaki düşük etkinliğin nedeninin kullanılan besiyeri olabileceği düşünülmüştür. Ancak birçok tarama çalışmasında standart olarak Bennet's agar kullanılıyor olması nedeniyle çalışmamızda besiyeri olarak tercih sebebi olmuştur (Ouhdouc ve ark., 2001).

Igarashi ve ark.'nın yaptığı çalışmada *Nonomuraea* suşundan yeni bir molekül elde etmişler ve bu molekülün yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. Buldukları bu moleküle Sealutomi cins adını veren araştırmacılar özellikle dirençli *Enterobacter* gruplarına karşı etkinlik elde etmeleri umut vericidir (Igarashi ve ark., 2021). Bu çalışmada elde edilen *Nonomureae* suşlarının antimikrobiyal etkinliklerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Farklı patojenlere karşı etkinlik çalışmaları yapılarak daha geniş bir taramanın yapılması suşların etkinlik profilini belirleyebilmek için faydalı olacağı düşünülmektedir. Derin deniz ortamında bulunan süngerden izole edilen *Micromonospora* izolatının antimikrobiyal aktivitesi farklı patojenlere karşı test edilmiştir (Back ve ark., 2021). Gram pozitif patojenlere karşı iyi bir aktivite göstermezken Gram negatif patojenlere karşı oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 2 farklı *E. coli* tip suşu kullanılmış ve bu suşlara karşı aktivite farklılığı gözlemlenmiştir. *Micromonospora* izolatlarının *E.coli*'e karşı daha etkin olduğu belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı hiç bir izolatın aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Back ve ark., 2021). Sunulan bu çalışmada kullanılan *Micromonospora* suşlarının funguslara karşı etki etmemesi, Gram pozitif patojenlere karşı düşük aktivite göstermesi ve Gram negatif patojenlere daha etkin olması yapılan çalışmanın literatürle de uyumlu olduğunu göstermektedir.

Doğal aktif metabolit eldesi amacıyla yapılan çalışmaların derlendiği literatürde, birçok *Micromonospora* izolatının farklı lokalitelerden eldesi ve sekonder metabolitlerinin tanımlanması yapılmıştır (Hifnawy ve ark., 2020). Bu çalışma ile bir aktinomiset cinsinden ortaya çıkabilecek olağanüstü biyosentetik çeşitliliği özetlemekle birlikte yeni doğal ürünler arayışında keşfedilmemiş türleri keşfetmeye yönelik gelecekteki çalışmaları desteklemektedir. Enfeksiyonlara karşı mücadelede de yeni antibiyotiklerin, antiviral ve antifungallerin tespiti oldukça önemlidir. Bu nedenle yeni türlerin keşfi yeni metabolitlerinde keşfini sağlayabileceği öngörülmektedir.

SONUÇ

Farklı çevrelerde yaşayabilen aktinobakterilerin izolasyonu, tanımlaması ve yeni biyolojik aktif metabolit taramaları oldukça önemlidir. Özellikle son dönemde mikrobiyal kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin yetersiz kalması, patojenlerin direnç geliştirmesi sağlık alanında önemli sorunlar arasındadır. Yeni antibiyotiklerin keşfi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, rizosfer toprağından yapılan izolasyon çalışmasında *Micromonoispora* ve *Nonomuraea* izolatları elde edilmiş ve 16S rRNA dizi analizleri ile moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Antimikrobiyal özellikleri belirlenen suşların özellikle Gram negatif bakterilere karşı etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yeni antibiyotik ve aktif sekonder metabolit açısından daha ileri çalışmalarla tanımlamaları yapılabilecek olan bu izolatların ticari değerleri önem arz etmektedir. 16S rRNA analizleri ile de olası yeni türlerin belirlenmesi sağlanmış ve ileri sistematik çalışmalar ile literatüre kazandırılması amaçlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından “2013-01.BİL.13-01” kodlu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdel-Mageed WM, Al-Wahaibi LH, Lehri B, Al-Saleem MS, Goodfellow M, KusumaAB, . . .Jaspars M, 2021. Biotechnological and Ecological Potential of *Micromonospora provocatoris* sp. nov., a Gifted Strain Isolated from the Challenger Deep of the Mariana Trench. *Marine Drugs*, 19(5): 243.
- Antal N, Fiedler HP, Stackebrandt E, Beil W, Ströch K, Zeeck A, 2005. Retymicin, Galtamycin B, Saquayamycin Z and Ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tü 6368. *The Journal of Antibiotics*, 58(2): 95-102.
- Ay H, Nouioui I, Klenk HP, Cetin D, Igual JM, Sahin N, Isik K, 2020. Genome-based classification of *Micromonospora craterilacus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Nemrut Lake. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(6): 791-801.
- Back CR, Stennett H L, Williams SE, Wang L, Ojeda Gomez J, Abdulle OM, . . . Jepson MA, 2021. A new *Micromonospora* strain with antibiotic activity isolated from the microbiome of a mid-Atlantic deep-sea sponge. *Marine Drugs*, 19(2): 105.
- Barka, EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquar, C, Klenk HP, . . . van Wezel GP, 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1): 1-43.
- Benhadj M, Gacemi-Kirane D, Menasria T, Guebla K, Ahmane Z, 2019. Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4): 706-712.
- Bérdy J, 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8): 385-395.
- Fei P, Chuan-Xi W, Yang X, Hong-Lei J, Lu-Jie C, Uribe P, . . . Yun-Yang L, 2013. A new 20-membered macrolide produced by a marine-derived *Micromonospora* strain. *Natural Product Research*, 27(15): 1366-1371.
- Hu X, Wang Y, Zhao C, Li S, Hu X, You X, . . . Jiang B, 2022. Mintaimycins, a Group of Novel Peptide Metabolites from *Micromonospora* sp. C-3509. *Molecules*, 27(4): 1150.
- Igarashi M, Sawa R, Umekita M, Hatano M, Arisaka R, Hayashi C, . . . Kato C, 2021. Sealutomicins, new enediyne antibiotics from the deep-sea actinomycete *Nonomuraea* sp. MM565M-173N2. *The Journal of Antibiotics*, 74(5): 291-299.
- Jones KL, 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology*, 57(2): 141-145.
- Jukes TH, Cantor CR, 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 3: 21-132.
- Kim M, Chun J, 2014. 16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server *Methods in Microbiology* (Vol. 41: 61-74): Elsevier.
- Kim TK, Hewavitharana AK, Shaw PN, Fuerst JA, 2006. Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3): 2118-2125.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547.
- Lancini G, Lorenzetti R, 1993. Biosynthesis of secondary metabolites *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites* (ss. 95-132): Springer.

- Malisorn K, Embaen S, Sribun A, Saeng-in P, Phongsopitanun W, Tanasupawat S, 2020. Identification and antimicrobial activities of *Streptomyces*, *Micromonospora*, and *Kitasatospora* strains from rhizosphere soils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(02): 123-112.
- Martínez-Hidalgo P, Flores-Félix JD, Velázquez E, Brau L, Trujillo ME, Martínez-Molina E, 2020. High taxonomic diversity of *Micromonospora* strains isolated from *Medicago sativa* nodules in Western Spain and Australia. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(1): 126043.
- Nouioui I, Carro L, García-López M, Meier-Kolthoff JP, Woyke T, Kyrpides NC, . . . Göker M, 2018. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2007.
- Ouhdouch Y, Barakate M, Finance C, 2001. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, 37(2): 69-74.
- Ozdemir-Kocak F, Isik K, Veyisoglu A, Tatar D, Sahin N, 2014. *Nonomuraea muscovyensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(7): 2467-2472.
- Primahana G, Risdian C, Mozef T, Sudarman E, Köck M, Wink J, Stadler M, 2020. Noncarbolines A–E, β -carboline antibiotics produced by the rare actinobacterium *Nonomuraea* sp. from Indonesia. *Antibiotics*, 9(3): 126.
- Sembiring L, 2000. Selective isolation and characterisation of streptomycetes associated with the rhizosphere of the tropical legume, *Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen. University of Newcastle upon Tyne.
- Sun X, Qiu S, Luo X, Jin P, Zhao J, Wu X, . . . Xiang W, 2021. *Micromonospora rubida* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from soil of Harbin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(6): 697-708.
- Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P, 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1): 249-266.
- Veyisoglu A, Carro L, Cetin D, Igual JM, Klenk HP, Sahin N, 2020. *Micromonospora orduensis* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(3): 397-405.
- Vickers NJ, 2017. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too? *Current Biology*, 27(14): 713-715.
- Williams S, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E, Sneath P, Sackin M, 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*, 129(6): 1743-1813.
- Yamamura H, Hayakawa M, Iimura Y, 2003. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4): 677-685.
- Yang T, Yamada K, Zhou T, Harunari E, Igarashi Y, Terahara T, . . . Imada C, 2019. Akazamicin, a cytotoxic aromatic polyketide from marine-derived *Nonomuraea* sp. *The Journal of Antibiotics*, 72(4): 202-209.