

***STREPTOMYCES ALBONİGER* BA2'NİN YENİ DOĞAL
ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ**

EVLİN MIZRAKLI

EYLÜL 2024

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***STREPTOMYCES ALBONİGER* BA2'NİN YENİ DOĞAL
ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ**

EVLİN MIZRAKLI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ'NİN LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM
VE SINAV YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALINDA YÜKSEK LİSANS
TEZİ OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

EYLÜL 2024

DİYARBAKIR

***STREPTOMYCES ALBONİGER* BA2'NİN YENİ DOĞAL ÜRÜNLERİNİN
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Evlin MIZRAKLI tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma, aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Biyoloji Ana Bilim Dalı**'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Prof. Dr. Ebru INCE BOSTANCI
Danışman, **Biyoloji Bölümü,**
Dicle Üniversitesi

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Ebru INCE BOSTANCI (*,**)
Biyoloji Bölümü,Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Özlem DEMİRCİ TURGUNBAYER
Biyoloji Bölümü,Dicle Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer ACER
Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Siirt Üniversitesi

ONAY

Savunma Tarihi: 27 /09/2024

(*) Jüri Başkanı.
(**)Tez Danışmanı.

Aileme ve sınırlı olan geleceğe...

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılıyıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımınla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Ad, Soyad: Evlin MIZRAKLI

İmza:

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanım Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI'ya bu çalışmanın fikir aşamasından başlayarak örneklemeler, deney setlerinin oluşturulması, çalışmanın analizlerinin yorumlanması ve tez taslağında yapılan düzenlemeler konusundaki destek ve sabrı için teşekkür ederim. Ayrıca, jüri üyelerine bu tezin kalitesini arttırmak için verdikleri eleştiri ve önerilerden dolayı teşekkür ederim.

Çalışma sürecinde Dr. Ekrem KUM'a sağladığı bilgi paylaşımı ve laboratuvar çalışmalarında yardımları için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Doç. Dr. Özlem DEMİRCİ TURGUNBAYER'e paylaştığı tecrübeleri ve verdiği desteğinden ötürü teşekkürü borç bilirim.

Bazı deneyler için cihaz desteği aldığım Moleküler Kanseri, Nanobilim ve Toksikoloji Araştırma Laboratuvarı'nın başta yürütücüsü Prof. Dr. Veysel TOLAN olmak üzere, her zaman desteğinden faydalandığım Dr. Feysel ÇAKMAK'a derin teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecinde zaman zaman cihaz ve donanım desteği aldığım Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı yürütücüsü Prof. Dr. Göksel KIZIL'a ve tezde bulunan bazı görsellerin fotoğraflarını çekmede yardımcı olan Dr. Bircan ÇEKEN TOPTANCI'ya teşekkür ederim.

Son olarak, bazen kendime inanmakta zorlanmama rağmen, aileme bana inandıkları için teşekkür etmek istiyorum. Bu süreçte yeterince vakit ayıramadığım arkadaşlarıma bunu anlayışla karşıladıkları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Aktinomisetler	3
1.2 Sekonder Metabolitler	6
1.2.1 Sekonder metabolitlerin biyolojik aktiviteleri.....	8
1.2.2 Antibakteriyel sekonder metabolitler ve antibiyotik ve direnci	8
1.3 Yeni Mikrobiyal Doğal Ürünleri Keşif ve Tarama Stratejileri.....	12
1.3.1 Farklı ve sıradışı habitatlardan yetenekli mikroorganizmaların izolasyonu	12
1.3.2 Yenilikçi kültür yaklaşımları	15
1.3.3 Genomik ve metabolomik analizler.....	18
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	25
3. MALZEME VE YÖNTEM	31
3.1 Materyal.....	31
3.1.1 Antimikrobiyal aktivite test mikroorganizmaları	31
3.1.2 Kullanılan besiyerleri	31
3.1.3 Organik ekstraksiyon.....	31
3.1.4 Kullanılan çözeltiler....	31
3.1.5 Kullanılan cihazlar	32
3.2 Yöntem	32
3.2.1 <i>Streptomyces albiniger</i> BA2'nin üretilmesi.....	32

3.2.2 Sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu.....	33
3.2.3 Antibakteriyel etkinlik tayini.....	33
3.2.4 Çapraz çizgi(Cross-streak)yöntemi ile katı besiyerinde antibakteriyel aktivite tayini.....	33
3.2.5 Katı kültürden sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu.....	34
3.2.6 LC-QTOF-MS/MS analizleri.....	34
3.2.7 GNPS ve moleküler ağ analizleri.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1 Bulgular.....	36
4.1.1 <i>S.albinoger</i> BA2'nin M2 besiyerinde bitki hormonları varlığında üretilmesi	36
4.1.2 <i>S.alboniger</i> BA2'nin sıvı kültürdeki antibakteriyel aktiviteleri	37
4.1.3 <i>S.alboniger</i> BA2'nin katı kültürdeki antibakteriyel aktiviteleri.....	41
4.1.4 <i>S.alboniger</i> BA2'nin metabolomik analizleri.....	45
4.2 Tartışma.....	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
5.1 Sonuçlar	54
5.2 Öneriler.....	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Penisilin G.....	2
Şekil 1.2 Antibiyotik çağı evreleri	2
Şekil 1.3 <i>Streptomyces</i> morfolojileri.....	4
Şekil 1.4 <i>Streptomyces</i> türlerinin yaşam periyodu.....	6
Şekil 1.5 <i>Streptomyces</i> 'lerin koloni gelişim aşamaları.....	6
Şekil 1.6 Aktinomisin D.....	10
Şekil 1.7 Antibiyotiklerin keşfi ve yıllara göre bakterilerin direnç kazanması.....	11
Şekil 1.8 Yenilikçi kültür yaklaşımları	17
Şekil 1.9 Doğal ürünlerin araştırılmasında 'Omik' yaklaşımları	19
Şekil 1.10 Genom madenciliği ile yeni bileşiklerin keşif aşamaları.....	22
Şekil 1.11 Genomik-metabolomik kombinasyonu ile yeni bileşik keşfinde aşamalar	23
Şekil 4.1 <i>S. alboniger</i> BA2'nin IAA'nın farklı konsantrasyonlarına sahip besiyerlerindeki üreme görüntüleri.....	36
Şekil 4.2 <i>S. alboniger</i> BA2'nin JA'nın farklı konsantrasyonlarına sahip besiyerlerindeki üreme görüntüleri	36
Şekil 4.3 <i>S. alboniger</i> BA2'nin JA'nın farklı konsantrasyonlara sahip kültürlerin organik ekstarktları.....	37
Şekil 4.4 <i>S.alboniger</i> BA2'nin IAA deney setinden elde edilen organik ekstraktlarının test organizmaları üzerine disk difüzyon yöntemi ile elde edilmiş zon çapı resimleri	39
Şekil 4.5 <i>S.alboniger</i> BA2'nin JA deney setinden elde edilen organik ekstraktlarının test organizmaları üzerine disk difüzyon yöntemi ile elde edilmiş zon çapı resimleri.....	41
Şekil 4.6 <i>S.alboniger</i> BA2'nin farklı konsantrasyonlara sahip IAA katı besi ortamında test organizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite resmi.....	43
Şekil 4.7 <i>S.alboniger</i> BA2'nin farklı konsantrasyonlara sahip JA katı besi ortamında test organizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite resmi.....	45
Şekil 4.8 Ekstraktların GNPS moleküler ağ analizi.....	48

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1 Geçmişten günümüze antibiyotiklerin keşif yılları.....	9
Tablo 4.1 <i>S.alboniger</i> BA2 IAA farklı konsantrasyonlarından oluşan besiyerinde üretilen, çözücü ile ekstrakte edilen bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri.....	38
Tablo 4.2 <i>S. alboniger</i> BA2 JA farklı konsantrasyonlarından oluşan besiyerinde üretilen, çözücü ile ekstrakte edilen bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri.....	40
Tablo 4.3 Farklı IAA konsantrasyonlarına sahip katı besiyerinde <i>S.alboniger</i> BA2'nin test organizmalarına karşı antibakteriyel aktivitesi.....	42
Tablo 4.4 Farklı JA konsantrasyonlarına sahip katı besiyerinde <i>S.alboniger</i> BA2'nin test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi	44
Tablo 4.5 Bitki hormonları varlığında <i>S.alboniger</i> BA2 tarafından sıvı ve katı besiyerlerinde üretilen ve GNPS veri tabanında dereplike olan bileşikler.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
Da:	Dalton
g :	Gram
L :	Litre
M:	Molarite
mg :	Miligram
mm:	Milimetre
nm :	Nanometre
µg :	Mikrogram
µl :	Mikrolitre

Kısaltma	Açıklama
ABD :	Amerika Birleşik Devletleri
BGC:	Biyosentetik Gen Kümesi
EtOAc :	Etilasetat
EtOH :	Etanol
GNPS :	Global Natural Product Social
HPTLC :	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
HTS :	Yüksek Çıktılı Tarama
IAA:	İndolasetik Asit
JA :	Jasmonik asit
m/z :	Kütle/yük
MeOH :	Metanol
MS :	Kütle Spektroskopisi
NA :	Nutrient Agar
NB :	Nutrient Broth

NCBI :	Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi
NDA :	Yeni İlaç Adayı
NMR:	Nükleer Magnetik Rezonans
NRP :	Ribozomal Olmayan Peptid
NRPS:	Non-ribozomal Peptid Sentetaz
OSMAC:	Bir Suş-Çok Bileşik
PK:	Poliketid
PKS:	Poliketidsentaz
Rf :	Alıkonma Faktörü
rpm :	Dakikadaki Devir Sayısı
SAR :	Yapı Aktivite İlişkisi
TLC :	İnce Tabaka Kromatografisi
UV :	Ultraviyole ışık
WHO :	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

***STREPTOMYCES ALBONIGER* BA2’NİN YENİ DOĞAL ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

MIZRAKLI, Evlin

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Danışman: Prof. Dr.Ebru İNCE BOSTANCI

Eylül 2024, 83 sayfa

Doğal ürünler, bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilen ve farklı biyoaktivitelere sahip sekonder metabolitlerdir. Bunların içerisinde mikrobiyal metabolitler, çeşitli kimyasal yapılara sahip olup, antimikrobiyal, antikanser, antiviral ve antidiyabetik gibi pek çok farklı biyolojik aktiviteye sahip oldukları için hastalıklarla mücadelede ilaç olarak kullanılırlar. Aktinomisetler, doğal mikrobiyal metabolitlerin önemli bir kaynağını oluşturur ve bunların içerisinde özellikle *Streptomyces* türleri biyoaktif ürünlerin en önemli kaynakları arasındadır. Bu bakteriler tarafından üretilen streptomisin, sefalosporin, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibiyotikler tıpta antibiyotik çağını başlatmıştır.

Antibiyotiklerin aşırı kullanımı, bakteriler arasında direncin hızla yayılmasına neden olmakta ve her geçen gün yeni antibiyotik direncine sahip hastane patojenlerine rastlanmaktadır. Bu yüzden, çeşitli etki mekanizmalarına sahip yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfedilmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir. Farklı kimyasal yapılara sahip yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi için farklı stratejiler mevcuttur. Bunlar arasında, farklı ve sıradışı ortamlardan yeni bakterilerin izolasyonu, bunların yenilikçi kültür stratejileri ile üretilmesi ve ürettikleri metabolitlerin omik yaklaşımlar kullanılarak hızlı ve doğru biçimde tanımlanması gelmektedir. Genomik ve metabolomik yaklaşımlar kullanılarak son yıllarda kayda değer sayıda ve çeşitte yeni biyoaktif metabolit keşfedilmiştir.

Araştırma grubumuz tarafından daha önce bitki köklerinden izole edilmiş, tanımlanmış ve genom dizilimi yapılmış olan *Streptomyces alboniger* BA2 bakterisinin genomunda sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu biyosentetik gen kümelerinin (BGC) yüksek sayıda olduğu, fakat kültür ortamında bu gen kümelerinin çoğunun aktif olmadığı tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmadaki amacımız; *S. alboniger*’ın farklı kültür stratejileri ile biyosentetik gen kümelerinin aktive edilerek yeni doğal ürünleri üretme potansiyellerinin açığa çıkarılmasıdır. Bu amaçla, *S. alboniger*, İndol Asetik Asit (IAA) ve Jasmonik Asit (JA) gibi iki farklı bitki hormonu varlığında katı ve sıvı kültür rejimlerinde üretilmiş, metabolitleri organik solventler ile elde edilmiş, özütlerin antibakteriyel aktiviteleri tespit edilmiş ve içerisindeki metabolitler LC-MS/MS kullanılarak analiz edilmiştir.

S. alboniger BA2, M2 sıvı besiyerinde farklı konsantrasyonlarda IAA ve JA varlığında durağan faza kadar üretildi. Kültürler etil asetat ile ekstrakte edilerek disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite incelendi. Antimikrobiyal aktivite taraması için altı farklı test organizması kullanıldı. *S. alboniger* BA2 aynı zamanda IAA ve JA içeren

M2 katı besiyerlerinde üretildi ve çarpaz çizgi yöntemiyle test organizmalarına karşı in vivo olarak analiz edildi. Özütlerin içerdiği bileşikler LC-MS/MS verilerinin GNPS veri tabanında bulunan bileşik kütüphanelerinde incelenmesi ile tespit edildi.

Sıvı besiyerinde üretilen *S. alboniger* BA2'nin Gram negatif ve Gram pozitif test organizmalarına karşı geniş spektrumda ve etki gücü yüksek bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görüldü. Bitki hormonu varlığında kontrole göre antimikrobiyal etkide bir artış gözlenmemiş olsa da, metabolomik çalışmaların sonuçlarında bitki hormonları varlığında *Streptomyces* sp. BA2 tarafından sıvı ve katı besiyerlerinde daha önce bu izolatta tespit edilmemiş bileşiklerin varlığı gözlemlendi. Sadece IAA varlığında fitalosine, 3-hydroxyoctanoic acid ve quinoxaline-2-carboxylic acid, sadece JA varlığında ise fitalozin gibi mikrobiyal metabolitlerin derplike olduğu görüldü. Katı kültürden yapılan antimikrobiyal metabolit analizlerinde, JA varlığında biraraya getirilen *S. alboniger* BA2 izolatu ve test organizmalarından, *E. coli*'ye karşı geliştirilen zondan taxifolin, *E. coli* ve *K. Pneumoniae*'ye karşı geliştirilen zondan ise GNPS veri tabanında yer alan fakat yapısı henüz aydınlatılmamış B27A19 isimli yeni bileşik de derplike oldu.

Mevcut çalışma, yalnızca *S. alboniger* BA2 izolatından daha önce keşfedilmemiş antimikrobiyal aktiviteler ve yeni metabolitler ortaya koyması açısından değil, aynı zamanda yenilikçi kültür stratejileri ve farklı kültür rejimlerinde mikrobiyal metabolit üretim profillerinin değişiklik gösterdiğini ortaya koyması açısından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, Doğal ürünler, Metabolomik, *Streptomyces*

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW NATURAL PRODUCTS FROM *STREPTOMYCES ALBONIGER* BA2

MIZRAKLI, Evlin

Master of Science in Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr.Ebru İNCE BOSTANCI

September 2024, 83 pages

Natural products are secondary metabolites produced by plants, fungi, and microorganisms, possessing various bioactivities. Among these, microbial metabolites exhibit a range of chemical structures and are utilized as drugs in the fight against diseases due to their antimicrobial, anticancer, antiviral, and antidiabetic activities. Actinomycetes are a significant source of natural microbial metabolites, with *Streptomyces* species being among the most important sources of bioactive products. Antibiotics produced by these bacteria, such as streptomycin, cephalosporin, chloramphenicol, and tetracycline, have ushered in the antibiotic era in medicine.

The overuse of antibiotics has led to the rapid spread of resistance among bacteria, resulting in the emergence of new antibiotic-resistant hospital pathogens. Therefore, there is an urgent need for the discovery of new antimicrobial compounds with various mechanisms of action. Different strategies are available for the discovery of new antibiotics with diverse chemical structures. These include isolating new bacteria from unusual environments, cultivating them using innovative culture strategies, and rapidly and accurately identifying the metabolites they produce using omics approaches. In recent years, a significant number and variety of new bioactive metabolites have been discovered using genomic and metabolomic approaches.

Our research group previously isolated, characterized, and sequenced the genome of *Streptomyces alboniger* BA2 from plant roots. It was found that there are a high number of biosynthetic gene clusters (BGCs) responsible for the synthesis of secondary metabolites in the genome; however, most of these gene clusters were not active in the culture medium. In light of this information, the aim of this study is to reveal the potential for producing new natural products by activating the biosynthetic gene clusters of *S. alboniger* through different culture strategies. To achieve this, *S. alboniger* was cultivated in solid and liquid culture regimes in the presence of two different plant hormones, indole-3-acetic acid (IAA) and jasmonic acid (JA). The metabolites were extracted using organic solvents, and the antibacterial activities of the extracts were determined. The metabolites were analyzed using LC-MS/MS metabolomic approaches.

S. alboniger BA2 was grown in M2 liquid medium in the presence of different concentrations of IAA and JA until reaching the stationary phase. The cultures were extracted with ethyl acetate, and antimicrobial activity was investigated using the disk diffusion method. Six different test organisms were used for antimicrobial activity screening. *S. alboniger* BA2 was also cultivated in solid media containing IAA and JA and was analyzed in vivo against the aforementioned test organisms using the cross-

streak method. The compounds and metabolite profiles contained in the extracts were identified by analyzing the LC-MS/MS data against compound libraries in the GNPS database.

It was observed that *S. alboniger* BA2, produced in liquid culture medium, has a broad spectrum and high potency antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive test organisms. Although no increase in antimicrobial effect was observed in the presence of plant hormones compared to the control, the results of metabolomic studies revealed the presence of compounds not previously detected in this isolate by *S. alboniger* BA2 in both liquid and solid media. In the presence of only IAA, microbial metabolites such as futasoline, 3-hydroxyoctanoic acid, and quinoxaline-2-carboxylic acid were dereplicated, while in the presence of only JA, futasolin was dereplicated. In antimicrobial metabolite analyses from solid culture, *Streptomyces* sp. BA2 isolate and test organisms were co-cultured in the presence of JA. According to these results, the taxifolin compound isolated from the zone against *E. coli* and the newly identified compound B27A19, which is listed in the GNPS database but whose structure has not yet been elucidated, also dereplicated against *E. coli* and *K. pneumoniae*.

This study is significant not only for uncovering previously unreported antimicrobial activities and new metabolites from the *S. alboniger* BA2 isolate, but also for demonstrating that innovative culture strategies and different culture regimes result in variations in microbial metabolite production profiles.

Keywords: Antimicrobial activity, Metabolomics, Natural products, *Streptomyces*

1. GİRİŞ

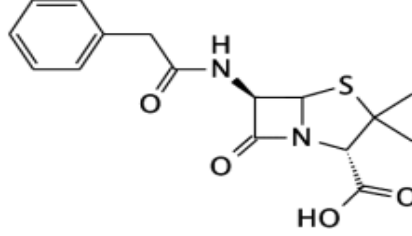
İnsanlık tarihi sürecinde avcılıktan yerleşik hayata geçişle birlikte bulaşıcı hastalıklar sorunu, toplumsal bir hal almıştır (Akbaş, 2007). Tarih boyunca insanlar bulaşıcı hastalıklar dışında da hastalıklarla mücadele etmiş ve hastalıkları tedavide farklı yollar kullanmışlardır. Bu yöntemlerden en sık kullanılan ve kullanılmaya devam edeni doğal ürünlerdir.

Doğal ürünler, canlılar tarafından ve canlının yaşadığı ortamda kendini koruma amacıyla ürettiği ürünlerdir. Doğal ürünlerin kaynağı bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalardır (Özcan, 2018). Canlılar tarafından üretilen doğal bileşiklerin çok çeşitli kimyasal yapıları bu bileşiklere biyolojik aktivite özelliği kazandırmaktadır. (Özcan, 2017). Biyoaktif doğal bileşikler, diğer bir ismiyle sekonder metabolitler yüzlerce yıldır hastalıklarla mücadele etmede ve kullanılmakta olan ilaçların çoğunun etken maddesini oluşturmaktadır. 1981-2008 döneminde anti-enfektif (antibakteriyel, antifungal vb.) olarak kullanılan ilaçlar ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yarısından fazlası doğal ürün veya doğal ürün türevleridir.

Dünya çapında bugüne kadar 500.000 doğal bileşik rapor edilmiş olup bunların 70.000'i mikrobiyal kaynaklıdır. Bunların içerisinde bilinen 23.000 biyoaktif ikincil metabolitin % 45 'ini aktinobakteriler üretmektedir (Ye vd., 2023). Aktinomisetler, alkaloidler, flavonoidler, kinonlar, ketidler ve peptitler olmak üzere farklı biyolojik aktivite gösteren çok değerli doğal ürün üretirler. Aktinomisetlerden çokça antibiyotik ve pestisit içerikleri de üretilmektedir (Long vd., 2022). Aktinomisetler, doğal ortamlarda yaygın bulunan, yüksek G+C oranına sahip Gram pozitif, aerobik ve spor üreten bakterilerdir. Diğer bakteri ve mantar türlerine göre daha yavaş büyüme özellikleriyle dikkat çekerler (Nivetha vd., 2021). Aktinomisetler arasında yer alan *Streptomyces* cinsi türleri biyoaktif ürünlerin en önemli rezervini oluşturan üyelere sahiptir. Doğal kökenli antibiyotiklerin üçte ikisini bu cinsin üyeleri üretmektedir (Khosravi Babadi vd., 2020).

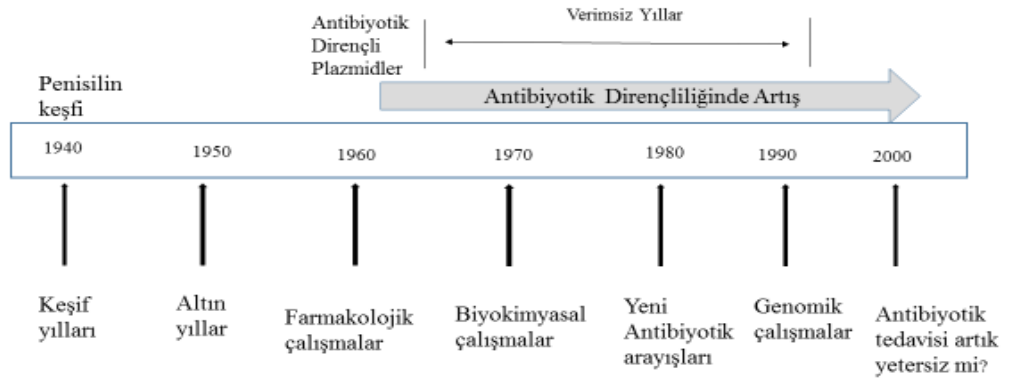
1928 yılında Alexander Fleming tarafından Penisilin'in keşfi antibakteriyel tedavi paradigmasında devrim niteliğinde bir keşiftir (Şekil 1.1). Sonraki yıllarda

streptomisin, sefalosporinler, kloramfenikol ve tetrasiklinler gibi diğer antibiyotiklerin üretimiyle birlikte tıpta antibiyotik çağı başlamıştır (Töreci, 2003).



Şekil 1.1 Penisilin G (Başkaya, 2015)

Mikrobiyal doğal ürünler içerisinde önemli bir yeri olan aktinomisinler özellikle *Streptomyces* 'lar tarafından üretilmektedir.



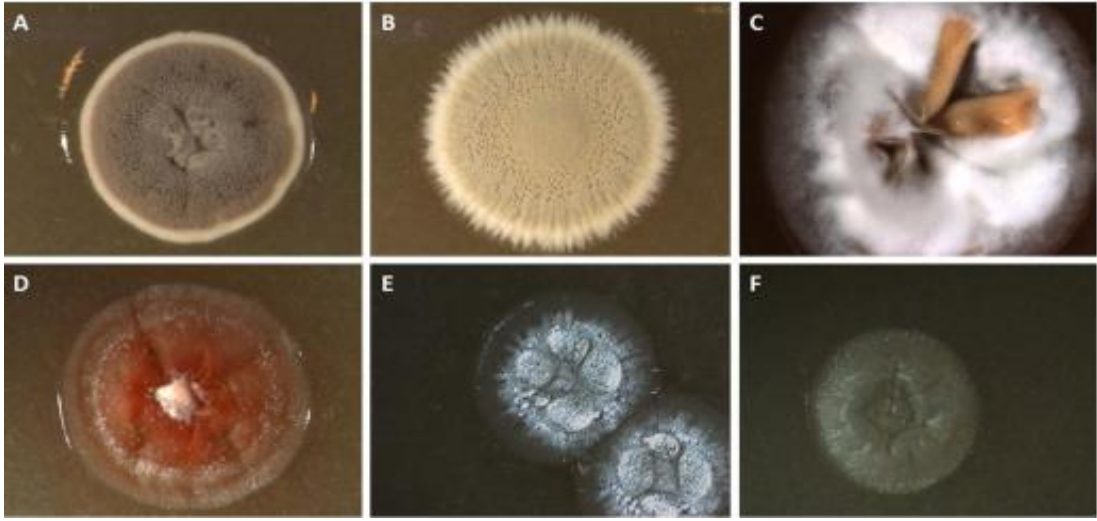
Şekil 1.2 Antibiyotik çağı evreleri

Antibiyotiklerin kullanımının artması ve çeşitlenmesiyle birlikte, bakteriler farklı direnç mekanizmaları oluşturmuştur. Bu direnç, bakteriler arasında hızla yayılmaktadır (Şekil 1.2) (Eraksoy, 2011). Bu durumun önüne geçebilmek için farklı etki mekanizmalara sahip yeni antimikrobiyal bileşiklerin keşfedilmesi gerekmektedir. Geçmişte geleneksel yöntemlerle antimikrobiyal bileşikler keşfedilmekteydi. Geleneksel yöntem, bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan örneklerin toplanması, ardından bu örneklerin ekstraksiyonu ve fraksiyonlama işlemlerine dayanmakta ve aktif bileşikler ayrıştırılmaktadır. Bu bileşikler daha sonra laboratuvar testleriyle biyolojik aktiviteleri açısından değerlendirilmekteydi. Ancak bu yöntemlerle genellikle zaten bilinen doğal ürünler yeniden keşfedilmektedir, bu da

yeni bileşiklerin bulunma oranını düşürmektedir (Harvey vd., 2015; Newman ve Cragg, 2016). Geleneksel yöntemlerle yalnızca bilinen doğal ürünler yeniden izole edilmiştir (Ren vd., 2017). Genom projeleri ile birçok mikroorganizmanın genomlarındaki genler dizilenmiştir. Sahip oldukları gen profilleri ortaya çıkarılmıştır. Özellikle yeni nesil dizileme teknolojisinin (NGS) gelişmesiyle birlikte yüksek verimli DNA dizilemenin düşük maliyetle yapılabilmesi mümkün olmuştur. Gen profilleri ile özel metabolitlerin biyosentezi için mikroorganizmaların beklenenden çok daha büyük bir kapasiteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Mikroorganizmalarda sekonder metabolitlerin sentezini Biyosentetik Gen Kümeleri (BGCs) sağlamaktadır. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisinin gelişmesi ile birçok aktinomisetin genom dizi analizi kolaylaşmış biyosentetik gen kümeleri ortaya çıkarılmıştır (Escribano ve Bibb, 2014).

1.1 Aktinomisetler

Actinomycetales takımında yer alan aktinomisetler, *Actinobacteria* şubesinin elemanıdır. *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Catenulispora* *Mycobacterium* gibi tek hücreli bakteri cinslerini ve *Nocardioide*s, *Amycolatopsis*, *Streptosporangium*, *Pseudonocardia*, *Thermopolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Streptomyces* gibi misel yapısı oluşturan cinsleri içermektedir (Chakraborty vd., 2022). Aktinomisetler, G+C içeriği yüksek olan ve genellikle monopodial, nadiren dikotomik dallanan ışınsal koloniler oluşturan mantar ve diğer bakterilerle karşılaştırıldığında yavaş büyüyen ipliksi bakterilerdir. Bu bakteriler çoğunlukla spor üretir ve bu sporlar besiyerinde pudramsı bir görünüm sergiler. Koloni morfolojileri ise kullanılan besiyeri ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişik renklerde ve oldukça çeşitlilik gösterebilir (Özcan, 2017). Aktinomisetler toprakta, deniz ve okyanuslarda, mağaralar gibi sıradışı ortamlarda, çöller ve Antarktika ekosistemleri de dahil geniş bir habitatlarda bulunabilmektedirler (Jakubiec-Krzesniak vd., 2018). Ayrıca böcek bağırsakları, dışkı gibi çeşitli habitatlarda da hayatta kaldıkları raporlanmıştır. Hatta süngerler ve birçok farmakognozik bitki ile karşılıklı etkileşimi olduğu da belgelenmiştir (Chakraborty vd., 2022).



Şekil 1.3 *Streptomyces* endofitleri çok çeşitli morfolojiler sergilemektedir. Görsel suşların SFM agar plakalarında altı gün boyunca büyütülmesi sonrasındaki görüntülerdir (Van der Meij vd., 2018). *S. coelicolor* M145, B) *S. griseus* DSM40236 ve endofitik streptomisetler MOS18 (C) MOS38, (D) MOS14, (E) MOS32 , (F) MOS25

Aktinomisetler prokaryot canlı gurubu içerisinde biyoteknolojik açıdan önemli ve değerli mikroorganizmalardır. Biyoaktif bileşik ve antibiyotiklerin önemli kaynaklarıdır. Biyoaktif moleküllerin çoğu antimikrobiyal (streptomisin, tetrasiklin), antiviral (tunikamisin) , antifungal (nistatin) ve antiparazitik (avermektin) özellik göstermektedir. Ayrıca aktinomisetler, kompleks bileşenlerin parçalanmasında kullanılan selüloz, amilaz, ksilanaz, lipaz, pektinaz ve proteaz gibi endüstriyel olarak değerli enzimleri üretirler. Organik materyalin dönüşümünde kritik bir görev üstlenirler ve antibiyotik, farmasötik ürün, kozmetik, enzim, antikanser ilaçları ve vitamin üretimi için temel bir kaynak olarak hizmet ederler (El Karkouri vd., 2019). Actinobacteria filumunun en büyük antibiyotik üreten cinsi *Streptomyces*, ilk olarak Waksman ve Henrici (1943) tarafından tanımlanmıştır (Nguyen ve Kim, 2015).

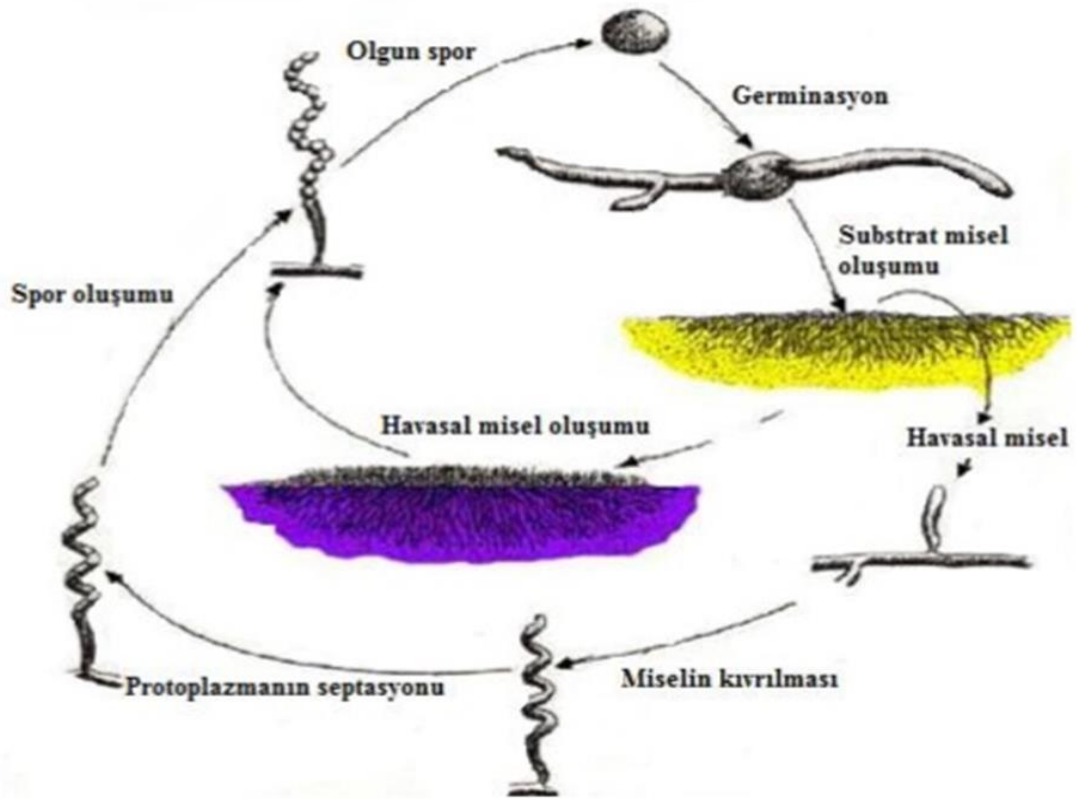
Streptomyces'ler *Actinobacteria* sınıfı *Actinomycetales* takımı içinde *Streptomycetaceae* ailesi olarak sınıflandırılmıştır (Ohnishi vd., 2008). *Streptomyces*'lar Gram pozitif ve filamentöz bakterilerdir. Optimum büyüme sıcaklıkları 25-35 derecedir fakat bazı türleri termofilik ve psikrofilik olabilmektedir. Bu bakteriler için uygun pH 6.5-8.0 arasındadır. Hücre çeperleri peptidoglikandan oluşmaktadır. Kromozomlarında yüksek oranda guanin ve sitozin nükleotitler bulunmaktadır (Oskay ve Tamer, 2009). *Streptomyces* kromozomu, lineerdir ve merkezi bir çoğalma başlangıç noktası (oriC) ve 5' uçlarına bağlı terminal proteinler ile benzersiz terminal ters tekrarları içerir (Ohnishi vd., 2018). Çoğunlukla saprotrofik

olan bu organizmalar, nadiren insanlarda ve hayvanlarda patojen olarak bulunabilirken, bazı türleri bitkilerde hastalıklara neden olabilir (Oskay ve Tamer, 2009). *Streptomyces*, glikopeptidler, poliketidler, aminoglikozidler, tetrasiklin, β -laktamlar, nükleozidler, terpenoidler, alkaloidler, makrolidler ve diğerleri gibi çeşitli sınıflara ait sayısız ikincil metabolitin senteziyle birlikte görülen karmaşık bir morfolojik farklılaşma döngüsü ile karakterize edilir (Saadouli vd., 2020). İlk aminoglikozit antibiyotik olan streptomisin, bundan daha yarım yüzyıldan fazla bir süre önce Waksman'ın laboratuvarında keşfedilmiştir. Tüberkülozdan pek çok insanı kurtaran bu önemli antibiyotik, endüstriyel ölçekte *S.griseus* tarafından üretilmektedir (Ohnishi vd., 2008).

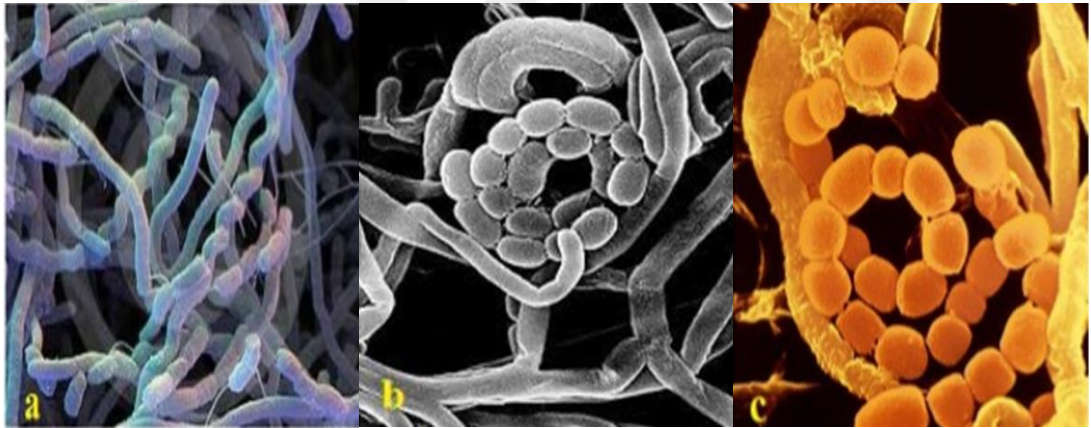
Streptomyces cinsi üyeleri 7000'den fazla biyolojik olarak aktif madde üretmektedir. Bu özelliği, onu tıp, veterinerlik, tarım ve ilaç endüstrisi gibi birçok biyoteknoloji alanında en yaygın kullanılan bakteri haline getirmiştir (Saadouli vd., 2020). *S. hygroscopicus*, çeşitli biyolojik aktiviteler sergileyen yaklaşık 180 metabolit üretir. *S. clavuligerus* sefalosporin, *S. venezuelae* kloramfenikol, *S. aureofaciens* tetrasiklin, *S. kanamyceticus* kanamisin, *S. spectabilis* tarafından spektinomisin üretilmektedir. Monensin ve mitomisin C gibi bazı popüler antibiyotikler ise sırasıyla, *S. cinnamomensis* ve *S. lavendulae* türlerinden türetilmiştir (Akintunde, 2014). Ayrıca *S. griseus*, *S. avermitilis* ve *S. cattleya* ise sırasıyla streptomisin, polipeptit avermektin ve florometabolitler üretir.

Streptomyces'ler toprağın biyolojik olarak parçalanmasında ve humus oluşumunda önemli bir rol oynarlar ve "ıslak toprak kokusu" olarak bilinen özelliğe sebep olan geosmin gibi çeşitli uçucu maddeler üretirler (Alam vd., 2022).

Streptomyces'lerin hayat döngüsü mantar misellerini andıran karmaşık radyal misel yapıları oluştururlar. Bu miselyum, morfoloji ve işlevsel özelliklerine göre hava miselyumu ve substrat miselyumu olarak ikiye ayrılır. Hava miselyumu, hava içinde gelişir ve genellikle spor taşıyan yapılar olan spor zincirleri ve sporangiaları uç kısımlarında barındırır. Hava misellerindeki sporlar hareketsiz olup çimlenerek üremeyi başlatır ve ardından substrat miselyumu oluşur. Substrat miselyumu ise, büyümek ve gelişmek için zengin besin kaynaklarının emilmesini sağlar. Vejetatif miseller stres koşullarında hava misellerine dönüşür (Chakraborty vd., 2022).



Şekil 1.4 *Streptomyces* türlerinin yaşam periyodu (Kieser vd., 2000)



Şekil 1.5 *Streptomyces*'lerin koloni gelişim aşamaları a) tam olgunlaşmış vejetatif misellerin hava serbest misellere dönüşümü b) hava misellerin dönüşümüyle spor zincirlerinin oluşumu, c) tam olgunlaşmış sarmal spor dizileri (Hopwood, 2006)

1.2 Sekonder Metabolitler

Canlılar tarafından metabolizmada büyüme ve gelişmeyi doğrudan veya dolaylı etkileyen çok çeşitli organik bileşikler üretilmektedir. Bunlar primer bileşikler (nükleotitler, aminoasit vb.) ve sekonder bileşikler olup primer bileşikler hayatsal işlevlerde doğrudan görev alırken sekonder bileşikler bu işlevlere doğrudan etki etmezler. İlk çalışmalarda sekonder metabolitlerin işlevsiz ve atık madde olduğu

düşünülmüştür. Sekonder metabolitler geçmişten beri bilinir ve çoğunlukla bitkisel kökenli oldukları düşünülmüştür (Bérđy, 2005). Bitkilerin sekonder metabolitleri, renk ve koku sağlayarak tozlaşmayı teşvik etmek ve böceklerle karşı direnç göstermek gibi fitoaleksinin işlevlerine sahiptir (Demain, 2009). Ayrıca bitkiyi, artan sıcaklık ve nemlilik, yaralanma ve ağır metallerin varlığında oluşan streslere karşı korumaktadır (Bakır, 2020). Küçük biyoaktif molekül olan sekonder metabolitler bitkiler dışında mantar, bakteri ve diğer organizmalarca da üretilmektedir (Yang vd., 2018). Sekonder metabolitler biyoaktivite gösteren doğal ürünlerin kaynaklarıdır. Bu yüzden de bu iki kavram sürekli birbirini yerine kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitler doğal ürünlerin en büyük grubunu oluştururlar. Mikrobiyal metabolit ürünler, özel yapıları ve geniş biyolojik aktiviteleri ile doğal bileşiklerin önemli bir kaynağı olup bitki kaynaklı olanlardan daha karmaşıktır ve daha fazla biyolojik çeşitlilik gösterirler. Mikrobiyal fermentasyonla üretilen veya kimyasal olarak modifiye edilen bu bileşikler, birçok hastalığın tedavisinde kullanılır ve farmakolojik araştırmalarda büyük bir öneme sahiptir (Özakın, 2010). Mikrobiyal doğal ürünler, antibiyotik üretiminde en geniş kullanım alanına sahiptir. Tanımlanmış 25.000 mikrobiyal doğal üründen yaklaşık 20.000'i antibiyotik özellikler taşır (Demain, 2009).

Mikrobiyal sekonder metabolitlerin üreticileri mantarlar ve bakteriler olup mikrobiyal sekonder metabolit ürünlerin oransal olarak en önemli üretici grubunu aktinomisetler oluşturmaktadır (Oskay ve Tamer, 2009). Aktinomisetlerin doğal ürün üretici grupları *Streptomyces*, *Saccharopolispora*, *Micromonospora*, *Amiclatopsis* ve *Actinoplanes* cinsleridir.

Prokaryotik tek hücreli bakteriler grubunda yer alan *Bacillus* ve *Pseudomonas* türleri de mikrobiyal sekonder metabolitin en sık üreticileridir son zamanlarda *Myxo* ve *Cyanobacteria* türlerinin de üretken türler arasına katıldığı görülmüştür. Sekonder metabolitler genellikle ekstrasellülerdir yani çoğunlukla hücre dışına salgılanırlar (Saadouli vd., 2020). Günümüzde sekonder metabolitler ilaç, parfüm ve pestisit gibi çeşitli endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.2.1 Sekonder metabolitlerin biyolojik aktiviteleri

Biyolojik olarak aktif sekonder metabolitler, çeşitli yapısal ve kimyasal sınıfları temsil eden bileşiklerdir. Bu sınıflar arasında poliketidler, peptidler, makrolidler, indoller, aminoglikozitler ve terpenler bulunur. Bu bileşikler, organizmaların biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirmek için üretilir ve genellikle savunma, iletişim veya rekabet gibi işlevleri yerine getirirler (Dalisay vd., 2013). Sekonder metabolitler, terapötik amaçlar için kullanılan bileşiklerin büyük bir kısmını oluşturur; ya doğrudan doğadan elde edilmişlerdir ya da doğadan elde edilen bileşiklerin sentetik türevleridir. Sekonder metabolitlerin yaklaşık üçte ikisi kadarı mikrobiyal kökenlidir (Gomez-Escribano ve Bibb, 2014). *S.achromogenes* izole edilen streptozotosin anti diyabetik, *S.caespitosus*'tan izole edilen mitomisin C antitümoral, *S.chartreusis*'ten izole edilmiş olan tunikamisin antiviral, *S.hygroscopicus* sp. ve *S. aureolacrimosus*'tan izole edilen milbemisin antiparazitik olarak biyolojik aktivite göstermektedir. Ayrıca birçok *Streptomyces* türünden avermektin ve milbemisin (insektisidal), bialafos ve fosfinitrisin, (herbisidal), bafilomisin (ATPaz inhibitörü), streptozotosin ve lasalosid (Diyabetik), monensin, salinomisin ve tilosin fosfat (büyüme promotörü), takrolimus, rapamisin ve kangleomisin (immünsüpresif ajanlar) gibi biyoaktif doğal bileşikler izole edilmiştir (Ye vd., 2023).

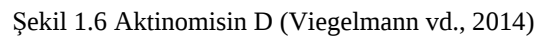
1.2.2 Antibakteriyel sekonder metabolitler ve antibiyotik ve direnci

Antibiyotiklerin tarih sahnesine çıkışı, 1928 yılında Sir Alexander Fleming'in bir *Penicillium* küfü kontaminasyonu sonucu agar üzerindeki stafilokok bakterilerinin büyümesinin durduğunu gözlemlemesiyle başlar. Fleming, bu büyüme inhibisyonunun, küf mantarının ürettiği bir madde tarafından gerçekleştirildiğini saptamıştır (Töreci, 2003). Fakat penisilinin tedavide kullanılacak hale gelmesi ve ayrıştırılması 1940'ta Florey ve Chain'in tarafından mümkün olmuş piyasaya sunulması ise 1944'te gerçekleşmiştir Yıllara göre antibiyotiklerin keşfi tablo 1.2' de sırasıyla belirtilmiştir (Töreci, 2003).

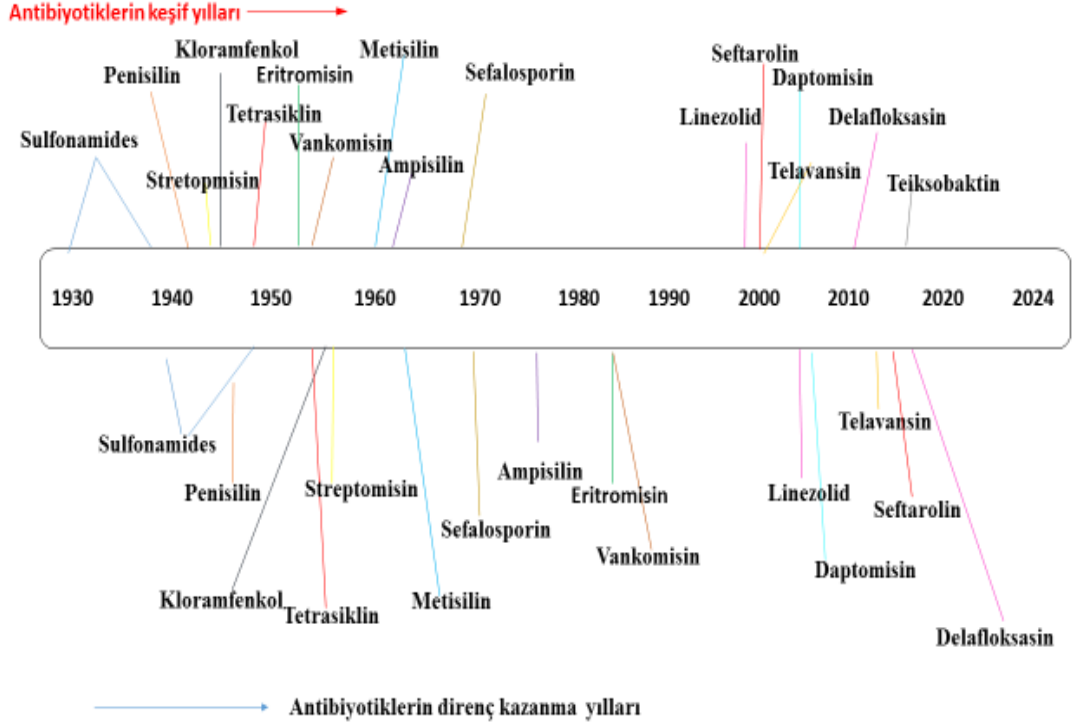
Tablo 1.1 Geçmişten günümüze antibiyotiklerin keşif yılları

Keşif Yılı	Antibiyotik
1943	Streptomisin ve basitrasin
1945	Sefalosporinler
1947	Kloramfenkol ve tetrasiklinler
1949	Neomisin (ilk aminoglikozid)
1952	Eritromisin
1956	Vankomisin
1957	Kanamisin
1960	Metisilin
1961	Ampisilin
1962	Nalidiksik asit ve florokinolon türevleri
1963	Gentamisin
1970	Trimetoprim
1981	İmipenem
1987	Azitromisin
1996	Linezolid
2000	Daptomisin
2003	Telavansin
2005	Seftarolin
2010	Delafloksasin
2015	Teiksobaktin

Aktinomisinler, 70 yılı aşkın bir süre önce keşfedilmiş olmalarına rağmen, özellikle biyolojik ve tıbbi bilimlerde birçok araştırma alanının odak noktası olmaya devam eden önemli bir doğal ürün sınıfını temsil etmektedirler (Kurosawa vd., 2006). Aktinomisinler arasında aktinomisin D en kapsamlı şekilde incelenmiştir ve Wilms tümörü (Green, 1977) ve çocukluk çağı rabdomyosarkomu (Womer, 1997) gibi kötü huylu tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Charousová vd., 2019).



Antibiyotiklerin tedavide gereğinden fazla ve düzensiz kullanımı, birçok mikroorganizma çeşidinin varolan ilaçlara karşı direnç mekanizması geliştirmesine neden olmaktadır. Bu durum antibiyotiklerin keşfi ve bu antibiyotiklere direnç gelişiminin tarihsel süreci verilen Şekil 1.7’de açıkça görülmektedir.



Şekil 1.7 Antibiyotiklerin keşfi ve yıllara göre bakterilerin direnç kazanması (Özakın, 2010)

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli bakteri türlerinin hızla yayılması, bakteriyel enfeksiyonları dünya genelinde ciddi bir halk sağlığı tehdidi haline getirmiştir. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* gibi çok sayıda patojenik bakterinin hali hazırda var olan antibiyotiklere karşı direnç oluşturduğu bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, her yıl yaklaşık 700.000 kişi antibiyotik dirençli enfeksiyonlar nedeniyle hayatını kaybetmektedir ve bu sayının 2050 yılına kadar 10 milyona ulaşabileceği tahmin edilmektedir (WHO, 2020). Örneğin, ABD'de her yıl en az 2.8 milyon insan antibiyotiklere dirençli bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle hastalanmakta ve 35.000'den fazla insan bu enfeksiyonlar nedeniyle ölmektedir (CDC, 2019).

Farmasötik endüstrileri ile birçok sentetik antibiyotik üretilmektedir. Ancak bu kimyasalların kullanımı ciddi zararlara yol açabilir; bunlar arasında kemoterapötik ilaçların insanlar ve hayvanlar için yüksek toksisitesi ve patojenlerin direnç geliştirmesi yer almaktadır. Antibiyotik direncinin artması, tedavi seçeneklerini sınırlamakta ve enfeksiyonların tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır, bu da hastalık ve ölüm oranlarını artırmaktadır (Ventola, 2015).

Bu nedenle, yeni antibiyotiklerin ve biyoaktif bileşiklerin keşfi, mevcut sağlık krizinin üstesinden gelmek için hayati bir önem taşımaktadır. Doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif bileşikler, bilim insanları için her zaman büyük ilgi uyandırmıştır, çünkü bunlar çevreye zararlı etkisi az olan güvenli ve etkili bir alternatif yaklaşım sunarlar (Saadouli vd., 2020). Doğal kaynaklı biyoaktif bileşiklerin, bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili bir tedavi sunarak antibiyotik direncine karşı önemli bir çözüm olabileceği düşünülmektedir (Newman ve Cragg, 2016).

1.3 Yeni Mikrobiyal Doğal Ürünleri Keşif ve Tarama Stratejileri

Yeni biyoaktif bileşiklerin taranmasında, organizma tercihi, yenilikçi kültür yöntemleri ve bileşiklerin çeşitli tarama teknikleriyle keşfedilmesi gibi üç ana faktör belirleyici rol oynar. Geleneksel tarama stratejileri genellikle biyolojik aktiviteye dayanır ve organik ekstraktlardan biyoaktif bileşiklerin izolasyonunu içerir. Ancak, mikrobiyal ekstraktlarda, bilinen metabolitlerin tekrar izole edilmesi bilinen bileşiklerin yeniden keşfi sorununu ortaya çıkarır. Yeni tarama yöntemleri ise mikrobiyal genom dizilerinin de yardımıyla, yüksek verimli tarama, genom taramaları, metagenomik stratejiler, modern kültür yöntemleri ve bileşik kombinasyon sentezi gibi teknik ve teknolojilere dayanır. Bu güncel yaklaşımlar, mikrobiyal kaynakların oluşturacağı biyoaktif bileşiklerin keşfini artırır. Genom taramaları, yeni biyosentetik gen kümelerinin ve bu bunlardan sentezlenen yeni biyoaktif bileşiklerin tanımlanmasına yardımcı olur (Özakın, 2015).

1.3.1 Farklı ve sıradışı habitatlardan yetenekli mikroorganizmaların izolasyonu

Antimikrobiyal direnç, halk sağlığını küresel olarak tehdit etmektedir. Bu sorun ancak yeni doğal ürünlerin sürekli keşfiyle çözülebilir. *Streptomyces* 'lar doğal ürün üretimde en yetenekli aktinomiset cinsidir. Yeni doğal ürün elde etmede klasik yöntemlerin uygulanması karasal ortamlarda daha önce bulunan bileşiklerin tekrar izolasyonuna neden olmuştur. Bu yüzden farklı ve sıradışı ortamlardan yetenekli mikroorganizmaların izolasyonu, yeni biyotif moleküllerin bulunması için avantaj sağlar. Çünkü mikroorganizma, yaşadığı habitata adaptasyonunu sekonder metabolit sayesinde gerçekleştirir. Keşfedilmemiş ya da yeterince araştırılmamış doğal ortamlardan potansiyel mikroorganizmaların aranması, biyoaktif bileşik keşfi için fırsat sunar (Pathom-Aree vd., 2006; Skropeta ve Wei, 2014). Aktinomisetler toprakta,

deniz ve okyanuslarda, mağaralar, çöller, Antarktika ekosistemleri, tuz madenleri, volkanik sıcak su kaynakları gibi sıradışı ortamlarda geniş bir habitatta bulunabilmektedirler. Son dönemlerde, derin deniz, çöl, buzullar ve volkanik bölgeler gibi daha sıradışı çevre habitatlarından potansiyel *Streptomyces* türlerinin izole edilmesine yoğunlaşmıştır. Deniz ekosistemi, gezegendeki en önemli bilinen ortamdır ve büyük çoğunluğu derin deniz olarak tanımlanan %90'dan fazlasını oluşturur. Derin deniz, çeşitli özelliklere sahip olup, bireysel türlerin dağılımını etkiler ve biyoaktif molekül keşfi için önemli bir kaynak sağlar. Deniz ekosistemi, gezegenin en önemli ortamlarından biri olup, özellikle derin deniz bölgeleri, biyoaktif molekül keşfi için önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Derin deniz, dünya yüzeyinin %70'ini kaplar ve 1000 metreden daha derinlerde yaşamın zorlayıcı olduğu, ışığın yokluğu, düşük oksijen seviyesi ve yüksek basınç gibi zorlu koşulların bulunduğu bir ortamdır. Bu ekstrem koşullar altında yaşayan organizmalar, çeşitli biyolojik adaptasyonlar geliştirerek hayatta kalmaktadır (Sivalingam vd., 2019). 1997-2008 yılları arasında 600'den fazla mikroorganizma kaynaklı yeni bileşik tanımlanmış olup, bunların çoğu aktinomisetler ve siyanobakterilerden izole edilmiştir (Imhoff vd., 2011). Özellikle *Streptomyces* türleri, antikanser ve nöroprotektif özelliklere sahip birçok biyoaktif bileşiğin kaynağı olmuştur. Örneğin, *Streptomyces* sp. HKI0595'ten izole edilen kandenols A–E antikanser özellikler sergilerken (Ding vd., 2012; Zhou vd., 2012), *Streptomyces* sp. CNB-091'den izole edilen polipeptit antibiyotikler önemli biyolojik aktivitelere sahiptir (Dharmaraj, 2010; Hernández vd., 2004; Hou vd., 2006; Sobolevskaya vd., 2007).

Çöl habitatları da son yıllarda doğal ürün keşfi açısından büyük ilgi görmüştür (Abdelkader vd., 2018; Goodfellow vd., 2017). Özellikle Atakama Çölü gibi aşırı kurak bölgelerden izole edilen *Streptomyces* türleri, güçlü antimikrobiyal ve antikanser özellikler sergileyen bileşikler üretmiştir (Elsayed vd., 2015). Ekstrem soğuk ortamlar, özellikle Antarktika ve Sibirya gibi bölgeler, yeni biyoaktif moleküllerin keşfi için önemli potansiyel taşımaktadır (Bhave vd., 2013). Sibirya kıta sahanlığından izole edilen *Streptomyces* sp. ART5, meme ve kolorektal kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösteren arcticoside ve C-1027 kromofor bileşiklerini üretmiştir. Volkanik kaplıcalar da yeni biyoaktif bileşiklerin keşfi için araştırılan sıradışı habitatlar arasında yer almakta olup, *Streptomyces* sp. SNJ042'nin

fermentasyon suyundan izole edilen ohmyungsamycins A ve B, çeşitli kanser hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik özellikler sergilemiştir (Kim vd., 2021).

Dünya üzerindeki en karmaşık ekosistemlerden biri olarak kabul edilen Rizosfer, bitki köklerini çevreleyen ve etkilenen dar bölge olup birçok organizma için sıcak bir noktadır (Hinsinger ve Marschner, 2006; Jones ve Hinsinger, 2008; Pierret vd., 2007). Rizosferde bulunan organizmalar arasında bakteriler, mantarlar, oomisetler, nematodlar, protozoalar, algler, virüsler, arkeler ve eklembacaklılar yer alır. Bu mikrobiyomun çoğu üyesi, bitki tarafından salınan büyük miktardaki besin maddelerini kullanan karmaşık bir besin ağının parçasıdır.

Aktinomisetler farklı habitatlarda yer alan bitki köklerinin çevresindeki toprak bölgesinde (rizosfer) yoğun olarak bulunurlar. Rizosfer, bitki köklerinden salgılanan organik maddelerle zenginleştiği için mikroorganizmalar için besleyici bir ortam sağlar. Çok sayıda araştırma, bitkiyle ilişkili birçok mikroorganizmanın tohum çimlenmesi, fide gücü, bitki büyümesi ve gelişimi, beslenme, hastalıklar ve üretkenlik üzerinde derin etkileri olabileceğini ortaya koymuştur. Rizosferde bulunan aktinomisetler bitkilerin büyümesini teşvik eder, patojenlere karşı koruma sağlar ve bitki-mikrop etkileşimlerini düzenler (Mendes vd., 2013).

Yapılan çalışmalar bazı aktinomisetlerin bitkilerle yoğun ilişkiler kurabildiğini ve bitkilerin iç dokularını işgal edebildiklerini göstermiştir. Örneğin *Streptomyces scabies*, konakçılara nüfuz edebilir ve endofitik ilişkiler kurabilmektedir (Benson ve Silvester, 1993; Doumbou vd., 1998). Bitkilerin iç dokularında zarar vermeden yaşayan aktinomiset bakterilerine ise endofitik aktinomiset denir (Stone vd., 2000). Bu mikroorganizmalar, konak bitkilerin kökler, gövdeler, yapraklar, çiçekler, meyveler ve tohumların farklı organlarında, genellikle hücre içi veya hücreler arası boşluklarda bulunur. Endofitik aktinomisetler, bitkilerle simbiyotik ilişkiler kurarak büyümeyi teşvik eden hormonlar üretir, bitkileri patojenlerden korur ve besin maddelerinin alınmasını kolaylaştırır (Qin vd., 2011). Örneğin, *Streptomyces sp.* EN27, pirinç bitkilerinin köklerinde endofit olarak bulunmuş ve bu bitkilerin büyümesini ve stres toleransını artırdığını göstermiştir (Verma vd., 2009). Janso ve Carter, 113 bitkiden toplanan 256 doku örneğinden (yapraklar, kökler, gövdeler vb.) 123 aktinomiset suşu izole etmişler ve bu suşları, 16S rRNA gen dizilerine dayanarak altı aileye

ayırılmışlardır: *Streptosporangiaceae* (%40), *Streptomycetaceae* (%27), *Thermomonosporaceae* (%16), *Micromonosporaceae* (%8), *Pseudonocardiaceae* (%8) ve *Actinosynnemataceae* (%2). *Streptomycetaceae* familyasındaki *Streptomyces* cinsi sadece %26 oranında bulunmuş (Matsumoto ve Takahashi, 2017). İç doku bitkilerinin görece göz ardı edilmiş ve umut verici bir nişi oluşturduğu belirtilmektedir. Dünya üzerinde yaklaşık 300,000 bitki türü bulunduğu düşünüldüğünde, her bir bitki bireyinin bir veya daha fazla endofit barındırdığı bilinmektedir (Strobel ve Daisy, 2003), bu da büyük bir biyoçeşitlilik oluşturur.

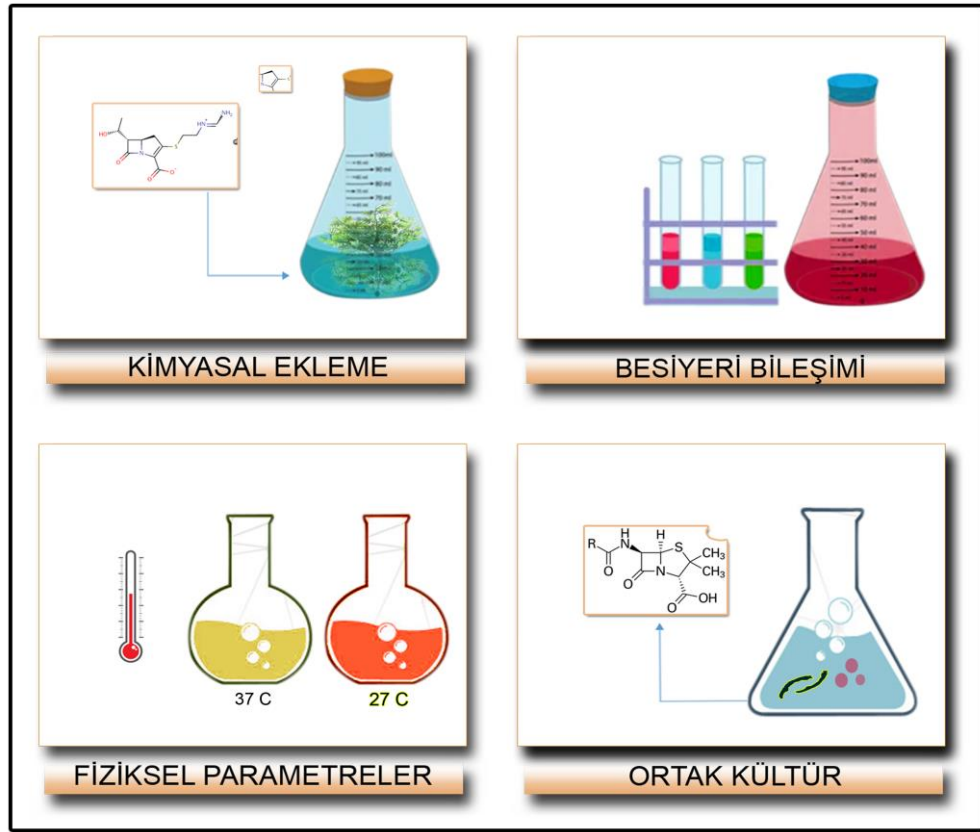
Yapılan araştırmalar yeni doğal bileşiklerin keşfi için farklı ve sıradışı habitatlardan izole edilecek yeni aktinomisetlerin, bakteriyel enfeksiyonlar, kansere karşı savaşta ve antibiyotik direncinin önüne geçmede farklı biyolojik aktivitelere sahip yeni antibiyotiklerin mükemmel bir kaynağı olacağını göstermiştir (Sivalingam vd., 2019).

1.3.2 Yenilikçi kültür yaklaşımları

Genomik veriler ışığında mikroorganizmaların potansiyel olarak üretebileceği sekonder metabolit gen kümeleri ile laboratuvar koşullarında üretilmiş ve tanımlanmış sekonder metabolitlerin sayısı arasında bir uyumsuzluk olduğu yapılan çalışmalarda sıklıkla ortaya konmaktadır. Bu gen kümeleri genellikle kriptik yani "sessiz" olarak adlandırılır, çünkü standart laboratuvar koşullarında aktif hale gelmezler. Biyoteknolojideki ilerlemelerle genetik manipülasyon yaklaşımlarıyla belirli yollara odaklanılmakta bilinen gen kümeleri üzerinde düzenlemeler yapılmaktadır. Bu manipülasyon, genlerin aktivatörlerinin ifadesinin artırılması ya da baskılayıcı genlerin silinmesine veya biyosentetik gen kümelerine güçlü promotörler ekleme tekniğine dayanır. Fakat, bu yöntemleri uygulayabilmek için kullanılan organizmaların biyolojisi hakkında yüksek düzeyde bilgi sahibi olmak gerekir. Bu yöntem kolay olmamakla beraber BGC'lerin bazen birden fazlasının bir bileşiği üretmede görev alması, bu yöntemin sınırlılığı olarak kabul edilebilir (Romano vd., 2018). Örneğin *Rhodococcus jostii*'de siderofor özellikli rhodochelin'in sentezinin, farklı kromozomal alanlarda bulunan üç bağımsız BGC'nin koordineli ifadesini gerektirdiği gösterilmiştir (Bosello vd., 2011).

Genetik manipölasyona yatkın olmayan türler veya BGC'leri hakkında yeterli bilgi gerektirmeyen mikroorganizmalardaki BGC'leri aktive etmede kültüvasyon sürecinde değışiklikler yapılarak sessiz genleri aktive etmek mümkündür. Bu "sessiz" kümeleri etkinleştirerek, farmakolojik açıdan önemli yeni doğal ürünler keşfedilebilir. Bu amaçla, yenilikçi kültür yöntemleri geliştirilmiştir (Romano vd., 2018). Yenilikçi kültür yaklaşımları; besiyeri bileşimleri, besiyerinin katı veya sıvı olması, fiziksel parametrelerdeki değışiklikler, kimyasal elisilatör eklenmesi ve ortak kültüvasyona dayanır (Şekil 1.8). Besiyeri bileşimleri canlının yaşamda kalabilmesi için ihtiyaç duyduğu karbon, azot, kükürt veya fosfor kaynakları ve iz elementlerinden oluşmaktadır. Bu kaynakların çeşitlikleri ve miktarlarındaki değışiklikler sekonder metabolit üretimini etkilemektedir. *Skeletonema marinoi* adlı diyatomla, azot açlığı koşullarında üretilen metabolitler insan melanom hücrelerinin çoğalmasını engellemiş ve *S. aureus*'un büyümesini inhibe etmiştir (Lauritano vd., 2016). Çeşitli çalışmalar, karbon kaynaklarının üretilen sekonder metabolit tipolojisi ve miktarları üzerindeki etkisini bildirmiştir. Örneğin, deniz kökenli *Acremonium sp.* MMS540 mantarı tarafından üretilen antitümör glikolipidlerin üretimi, altı farklı kültür koşulunda incelenmiştir. Glukoz ve galaktoz gibi farklı karbon kaynaklarının kullanımı, toplam lipid üretiminde dramatik değışiklikler yaratmazken, ana yağ asitlerinin oranında önemli değışikliklere ve azalmış yan yağ asidi profiline yol açmıştır (Dos Santos Dias vd., 2017).

Sekonder metabolit üretiminin yalnızca ortam bileşimine değil, aynı zamanda katı ve sıvı ortamlar arasında da farklılık gösterdiği bulunmuştur. English ve meslektaşları, izole ettikleri *Streptomyces sp.* USC-633'ün antibiyotik üretimini incelemek için sistematik bir OSMAC (Tek Suş-Çok Bileşik) yaklaşımı kullanmışlardır. Çalışmalarında, on bir farklı karbon kaynağı, iz elementler ve tek amino asit ilavesi ile yapay deniz suyu eklenmiş ve eklenmemiş sıvı ve katı besiyerleri hazırlamışlar buradan elde edilen ekstraktların antimikrobiyallerine bakmışlardır (English vd., 2017). Katı ortamdan *E.faecalis* ve *E.coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite elde edilirken sıvı ortamda sadece *E.coli*'ye karşı antimikrobiyal etki görölmüştür. Ayrıca NMR sonuçları incelendiğinde sıvı besi ortamından elde edilen ekstraktlarda etkin olmayan bileşiklerin katı besi ortamında etkin olduğu görölmüştür.



Şekil 1.8 Yenilikçi kültür yaklaşımları

Sekonder metabolit üretimi, fiziksel parametreler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimlerle önemli ölçüde değişebilmektedir. Mikroorganizmaların büyüme koşulları (sıcaklık, tuzluluk, pH gibi) optimize edildiğinde hem büyüme dinamikleri hem de sekonder metabolit üretimi üzerinde belirgin etkiler gözlemlenir. Ayrıca, farklı yetiştirme koşulları (çalkalama, statik ortamlar, sıcaklık değişiklikleri) metabolit üretimini artırabilir.

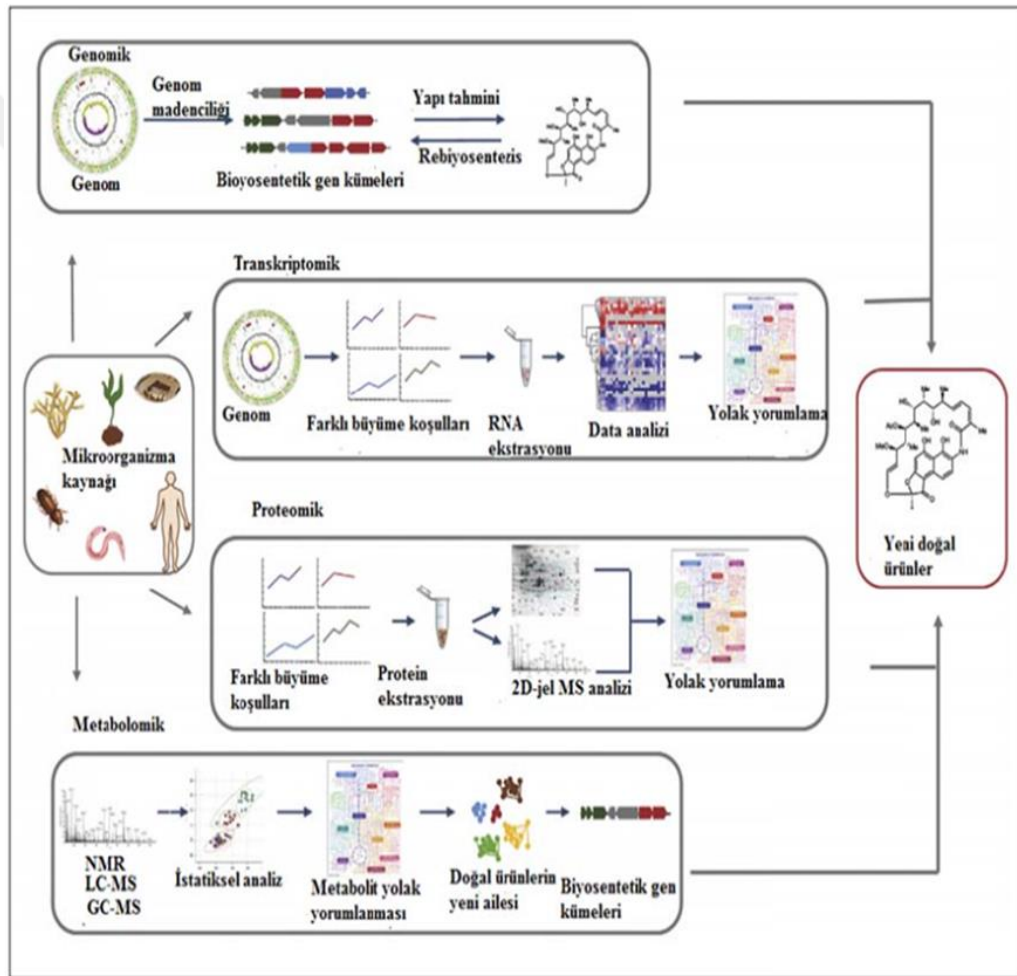
Ortak kültür (co-cultivation) tekniği, "sessiz" biyosentetik gen kümelerinin (BGC) aktivasyonunu sağlamak için oldukça etkili bir yöntemdir. Farklı mikroorganizmaların birlikte yetiştirilmesiyle, biyoaktif sekonder metabolitlerin üretimi teşvik edilir. Örneğin, *Streptomyces fradiae* ve *Penicillium* türünün bir araya getirilmesi sonucunda iki yeni poliketid bileşiği keşfedilmiştir ve bu bileşiklerin antikanser özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *Aspergillus fumigatus* ve *Streptomyces leeuwenhoekii* suşlarının birlikte yetiştirilmesiyle luteorid D ve pseurotin G gibi yeni bileşikler izole edilmiştir.

Doğal ürün yani sekonder metabolit araştırmalarında yenilikçi kültür yaklaşımlarından olan OSMAC yaklaşımında bu bileşiklerin üretimini indüklemek için çeşitli kimyasal ve fiziksel elisitörler de kullanılmaktadır. Yaygın kimyasal elisitörler arasında antibiyotikler, metal iyonları, hormonlar, organik çözücüler ve biyotik katkı maddeleri bulunmaktadır. Das ve çalışma arkadaşlarının *Streptomyces murinus* THV12 suşu ile yaptıkları çalışmada OSMAC yaklaşımıyla kimyasal elisitör olarak organik çözücü kullanmışlardır. Organik çözücülerden %5 etanol ile fermantasyonda Pentamisin'in yüksek düzeyde eksprese edildiği, %3 DMSO ile fermantasyon koşulunda ise terpen türevlerinin tespit edildiğini belirtmişlerdir (Das vd., 2023). *Streptomyces azureus* ATCC14921' de tiyostrepton üretimi kimyasal elisitör olarak kullanılan %3-5 DMSO varlığında iki kat artmış (Chen vd., 2000) Jdomisin B verimi %6 etanol ile desteklenen *S. venezuelae* kültüründe artmıştır (Doull vd., 1994). Fitohormonların elisitör olarak potansiyelinin değerlendirildiği çalışmada aktinomisetlerin rizosfer ve endosferin kimyasal ortamını taklit etmek amacıyla minimal besiyerleri ve bunlara ilave edilen bitki hormonlarından İndolasetik asit (IAA), salisilik asit (SA) ve jasmonik asit (JA) farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Minimal besiyerlerindeki aktinomisetlerin %11'inin *E. coli* hücrelerinin büyümesini inhibe eden bir veya daha fazla bileşik ürettiğini, %14'ünün ise *B. subtilis* büyümesini inhibe ettiği görülmüş bitki hormonlarının ilave edildiği ortamda kültürlenen aktinomisetlerin hem antibiyotik üretimleri iki katına çıkmış hem de suşların %20'si *E. coli* hücrelerini inhibe ederken %29'u *B. subtilis*'in büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Van der Meij vd., 2018).

1.3.3 Genomik ve metabolomik analizler

Omik, bir biyolojik sistemin yapısal ve işlevsel verisinin bütüncül olarak analizidir (Dai ve Shen, 2022). Omik yaklaşımı genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik olmak üzere çeşitlenmiştir (Şekil 1.9). Omik temelli yaklaşımlar, ürün gelişiminin genetik ve moleküler yapısını incelemek için oldukça değerlidir. Bu yöntemler, çevresel ve fizyolojik stres tepkileri sırasında DNA, transkript seviyeleri, proteinler, metabolitler ve mineral besin maddelerindeki değişiklikleri analiz ederek bize önemli bilgiler sağlar (Yang vd., 2021).

Genomik canlı sistemin içerisindeki tüm genomu inceler, transkriptomik canlı veya hücre içerisindeki tüm mRNA'ları, proteomik hücre içerisindeki tüm proteinleri ve metabolomik canlı sistem içerisinde metabolizma sonucu oluşan metabolitlerin yani bileşiklerin tamamını inceler. Canlı sistemdeki metabolitler genomdan bağımsız üretilmezler. Dolayısıyla metabolitlerin analiz verileri ilgili genler hakkında bilgi vermektedir. Tüm bunlar ışığında omik yaklaşımının bütüncül yapısı sayesinde genomik ve metabolomiğin kombine değerlendirilmesi doğal ürünlerin yani metabolomik yolların tespiti ve manipülasyonunu sağlayarak sekonder metabolit üretimini sağlar.



Şekil 1.9 Doğal ürünlerin araştırılmasında 'Omik' yaklaşımları (Palazzotto ve Weber, 2018)

Doğal ürünler diğer bir ismiyle sekonder metabolitler mikroorganizmalarca üretilen ve ilaç geliştirme amacıyla tıbbi biyoteknoloji alanında kullanılan bileşiklerin önemli kaynaklarından biridir. Ancak, patojen mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin hızla arttığı bilinmektedir, bu yüzden yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine duyulan

ihtiyaç büyüktür. 1940-1960'lı yıllar antibiyotiğin altın çağı olarak bilinmekte sonraki yıllarda ise antibiyotik elde etmede düşüşler yaşanmıştır (Tistechok vd., 2023). Bunun nedeni bu yıllarda elde edilen antibiyotikler kimyasal tarama yöntemiyle elde edilmişlerdir. Genetik ve biyoteknolojideki gelişmeler sekonder metaboliterin biyosentezinin mikroorganizma genomunun bir parçasından üretildiklerini belirlemiştir. Bu biyosentezden sorumlu genlerin bir araya gelerek oluşturduğu genom bölümü biyosentetik gen kümesi (BGC) olarak bilinmektedir.

Genom dizi analiz tekniklerinin gelişimi ile hızlı ve maliyeti az olan dizilemelerle mikroorganizmaların genomunda çok sayıda BGC'lerin olduğu belirlenmiştir. *S.coelicolor* ve *S. avermitilis* 20-30 tane BGC içermektedir (Demain, 2009). BGC'lerin içerisinde sekonder metabolitin sentezinden sorumlu ve biyosentetik kökenine göre poliketid sentazlar (PKS), ribozomal olmayan peptid sentetazlar (NRPS) ile terpenler ve sideroforları da içeren birçok gen bulunmaktadır.

Genom dizilemedeki artışla daha fazla mikrobiyom verisi elde edilmiş bu da genom madenciliği ifadesini ortaya çıkarmıştır. Genom madenciliği, genetik bilgiyi kullanarak biyolojik kaynaklardan yeni bileşiklerin keşfedilmesi sürecidir (Şekil 1.10). Genom madenciliği, canlılar tarafından üretilen çeşitli kimyasal bileşiklerde önemli bir rolü olan ikincil metabolit biyosentetik gen gruplarını (smBGC'ler) belirlemede kullanılır. Bu yöntem, karmaşık adımlarda bulunan olası biyosentetik gen gruplarını keşfetmeyi sağlar, böylece ilgili ürünlerin yapısal iskeletleri tahmin edilebilir ve gizli gen gruplarının ifadesi uyarılabilir. Bu da yeni biyomolekül keşiflerine yol açabilir (Das vd., 2023).

Metabolomik bir organizmanın birim zamanda ve belirli bir koşulda ürettiği metabolitlerin bütünü ifade eder. Metabolitlerin tespit edilmesinde kütle spektrometrisi (MS) sıklıkla tercih edilmektedir. Kütle spektrometresi, moleküler yapıdaki bileşenlerin özelliklerini belirler. Bu cihazın çalışma şekli, iyonlaştırılmış bileşenlerin kütesinin yüke oranlarına (m/z) göre gruplandırılması esasına dayanır. Belli bir ekstrakt içindeki molekülleri tespit etmekle kalmaz bileşiğin kimyasal yapısı hakkında bilgi de vermektedir (Kum, 2019). Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ve metabolomikteki ilerlemeler farklı şartlarda ortaya çıkan metabolitlerin karşılaştırılmasına olanak sağlar. Bilinmeyen bileşiklerin seçimini ve tekrarlı

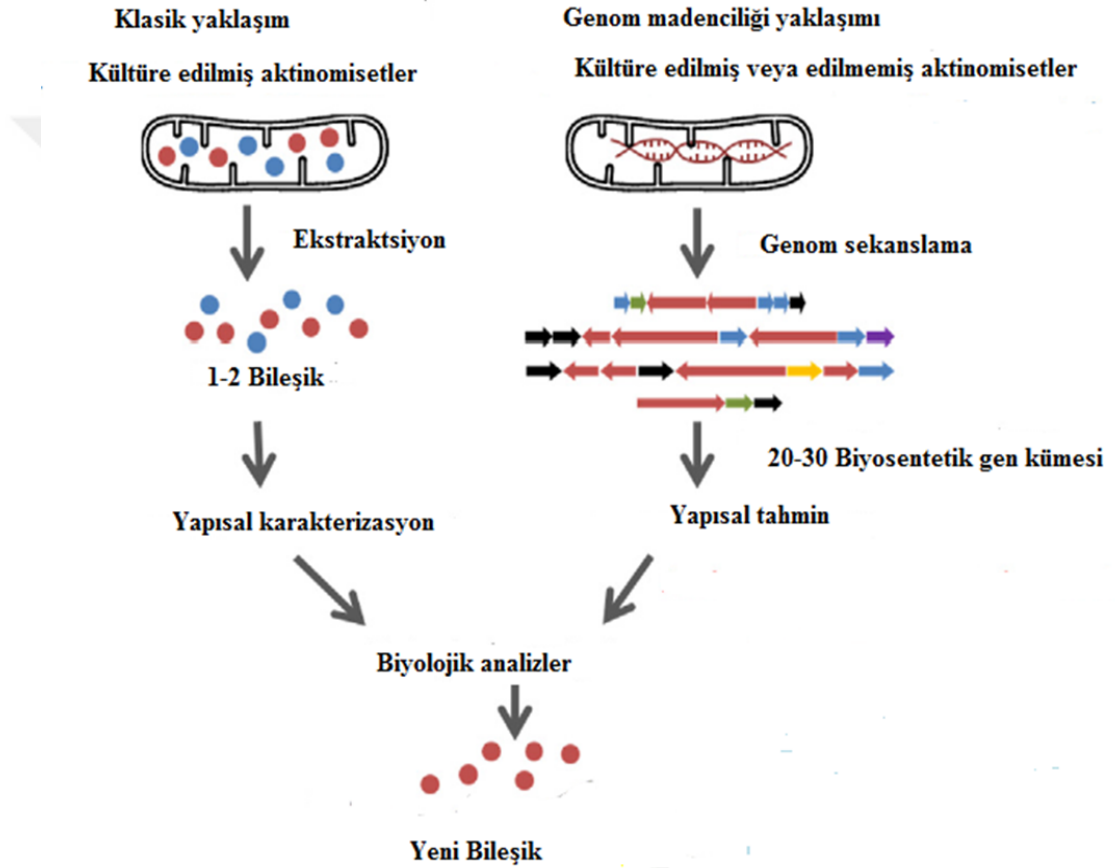
bileşiklerin tespitini hızlandırır (Palma Esposito vd., 2021). Kütle spektrometresi, diğer tekniklerle birleştirilerek daha kapsamlı analizler yapılmasına olanak tanır. Örneğin, Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS), iki seçici tekniğin kombinasyonudur ve yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, doğal bileşik elde etme çalışmalarında sıklıkla tercih edilen Manyetik Rezonans Spektroskopisi (MS/NMR) ve Gaz Kromatografisi-Mass Spectrometry (GC-MS) gibi kombine yöntemlerle de birleştirilebilir (Kum, 2019).

Doğal ürün keşfinde ve kimyasal yapıların belirlenmesinde dünya genelinde yapılmış veya yapılacak olan metabolitlerin verisini içeren ortak platformlara her zaman ihtiyaç vardır. Bu platformlar, doğal ürünlerin keşfi ve kimyasal yapıların belirlenmesi alanında araştırmacılara geniş ve detaylı veri sağlar, böylece bilimsel çalışmalarda daha derinlemesine analizler yapılabilir. Bu platformlar MetaboLights, MassBank HMDB, (Human Metabolome Database), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), ReSpect (RIKEN MSn Spectral Database for Phytochemicals), ChemSpider, PubChem, ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest) ve GNPS(Global Natural Products Social Molecular Networking)'dir. Bunların içerisinde en yaygın kullanılanlardan biri olan GNPS'dir.

GNPS, doğal ürünlerin kimyasal yapılarının analiz edilmesi ve tanımlanmasında kullanılan bir biyoinformatik platformudur. GNPS, kütle spektrometresi verilerini kullanarak doğal ürünlerin kimyasal yapılarının daha hızlı ve verimli bir şekilde analiz edilmesini sağlar (Wang vd., 2016). Bu platform, kullanıcıların verilerini yüklemelerine, diğer kullanıcıların verileriyle karşılaştırmalar yapmalarına ve yeni doğal ürünler keşfetmelerine olanak tanır. Ayrıca, GNPS topluluk temelli bir yaklaşımla bilim insanlarının iş birliği yapmasını ve bilgilerini paylaşmasını teşvik eder. Bu sayede, doğal ürünlerin kimyasal çeşitliliği hakkında daha kapsamlı bilgi elde edilmesine katkıda bulunur (Quinn vd., 2017). GNPS ortak bakteriler arasındaki sinyal iletişimini anlamada, ortak sınıfta yer alan bakterilerin ayrımını belirlemede kullanılmaktadır (Tangerina vd., 2020).

Platform, antibiyotikler ve onların yapısal analoglarını içeren doğal ürünlerin tanımlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (Nothias vd., 2020). GNPS'nin veri tabanlarında, özellikle *Streptomyces* türlerinden elde edilen birçok antibiyotik

bulunmaktadır (Mohimani vd., 2014). Örneğin, makrolidler, aminoglikozidler ve beta-laktam antibiyotikler gibi tıbbi açıdan önemli olan birçok bileşik, GNPS aracılığıyla tespit edilmiştir (Allard vd., 2016). GNPS ayrıca, mevcut antibiyotiklerin yapısal varyantlarını ve analoglarını belirlemek için kullanılmaktadır; bu da antibiyotiklerin kimyasal modifikasyonlarla etkinliğini ve spektrumunu genişletme potansiyelini ortaya koymaktadır (Watrous vd., 2012). Özellikle, antibiyotiklerin glikozilasyon seviyelerindeki farklılıkları belirleme yeteneği, GNPS'nin antibiyotik analoglarının keşfi için benzersiz bir araç olduğunu göstermektedir (Nguyen vd., 2013).



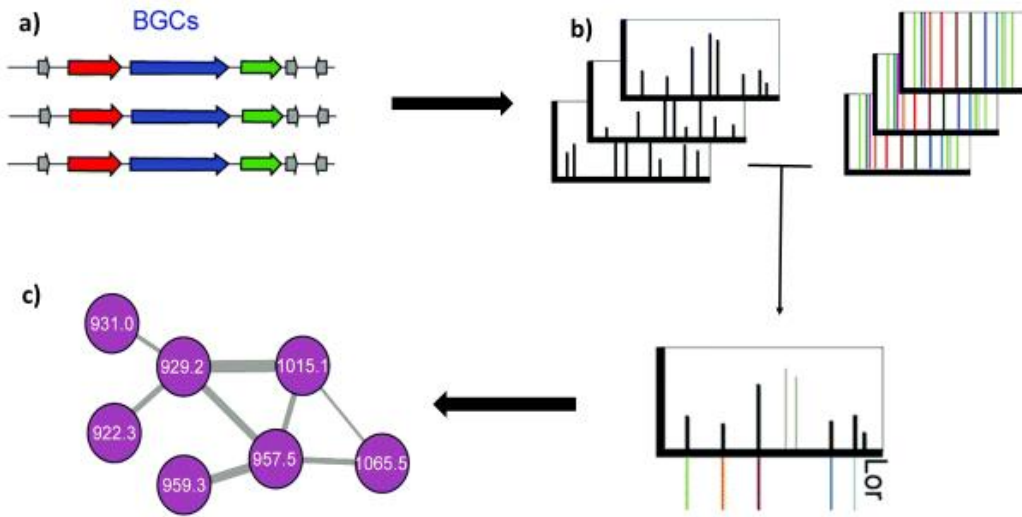
Şekil 1.10 Genom madenciliği ile yeni bileşiklerin keşif aşamaları (Choi vd., 2015)

Genomik ve metabolomik yaklaşımlar, doğal ürün çalışmalarında devrim niteliğinde ilerlemeler sağlamıştır. Genomik yaklaşımlar, mikroorganizmaların ve bitkilerin genetik materyallerini detaylı bir şekilde inceleyerek, doğal ürünlerin biyosentez yollarını ve ilgili genleri tanımlamaya olanak tanır (Moghadamtousi vd., 2015). Bu sayede, belirli bir organizmanın üretebileceği potansiyel biyoaktif bileşikler öngörülebilir ve hedefe yönelik araştırmalar yapılabilir. Örneğin, *Streptomyces*

türlerinin genomik analizi, birçok yeni antibiyotik bileşiğin keşfedilmesini sağlamıştır (Bentley vd., 2002).

Metabolomik yaklaşımlar ise, organizmaların metabolik profillerini analiz ederek, hücrelerin çeşitli koşullara verdiği biyokimyasal tepkileri anlamamıza yardımcı olur. Bu teknik, hücrelerde üretilen tüm metabolitlerin kapsamlı bir analizini yapar ve biyoaktif bileşiklerin keşfi için önemli bilgiler sunar (Fiehn, 2002). Metabolomik çalışmalar, örneğin stres altındaki bitkilerin ürettiği sekonder metabolitleri belirleyerek bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerini anlamamıza yardımcı olabilir (Verpoorte vd., 2008).

Bu yaklaşımlar birlikte kullanıldığında, doğal ürünlerin keşfi ve geliştirilmesi sürecinde sinerjik bir etki yaratır (Şekil 1.11). Genomik veriler, metabolomik analizlerle desteklendiğinde, belirli metabolitlerin üretim yolları daha iyi anlaşılır ve bu da biyoaktif bileşiklerin daha verimli bir şekilde izole edilip karakterize edilmesine olanak tanır (Patti vd., 2012). Sonuç olarak, genomik ve metabolomik yaklaşımlar, doğal ürünlerin keşfi ve geliştirilmesinde yenilikçi ve güçlü araçlar olarak öne çıkmaktadır.



Şekil 1.11 Genomik-metabolomik kombinasyonu ile yeni bileşik keşfinde aşamalar (Van der Hooft vd., 2020) Metabolomik verilerden ve biyosentetik gen kümelerinden başlayarak, metabolomik ve genomik verilerin entegrasyonu için alt yapı temelli yaklaşımlar aşağıdaki adımlardan oluşur. (a) biyosentetik gen kümelerinin küçük molekül ürünlerinin tahmin edilmesi (b) bu moleküllerin kütle spektrometrisi sırasında parçalanma deseni ve teorik spektrumlarının tahmin edilmesi, kütle spektrumlarının teorik spektrumlara karşı eşleştirilmesi, (c) anlamlı tanımlamaların moleküler ağıнын oluşturulması

Bir endemik bitki rizosfer toprağından izole edilen ve tanımlanan *Streptomyces alboniger* BA2'nin genomunda bulunan sekonder metabolitlerin sentezinden sorumlu çok sayıda BGC bulunmaktadır. *S.alboniger* BA2 bitki köklerinden izole edildiğı için doğal habitatlarında bitki hormonları ile etkileşim halindedir. Bu nedenle, IAA ve JA gibi bitki hormonlarının varlığında farklı kültür rejimlerinde sessiz gen kümelerinin aktive edilmesi mümkündür. Bu çalışmanın amacı, *S.alboniger* BA2 bakterisinin genomunda tespit edilen yüksek sayıdaki biyosentetik gen kümelerinin aktivasyon potansiyelini araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda iki farklı bitki hormonu varlığında hem katı hem de sıvı kültür rejimlerinde BA2 üretildi, metabolitleri organik solventler ile elde edildi. Elde edilen özütlerin antibakteriyel aktiviteleri belirlenerek ve içerdikleri metabolitler LC-MS/MS metabolomik yaklaşımla analiz edildi. Bu sayede, farklı kültür stratejileri ve bitki hormonlarının biyosentetik gen kümelerinin aktivasyonu üzerindeki etkileri ve yeni doğal ürünlerin üretim potansiyeli ortaya konuldu.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Doğal ürünler, yıllardır hastalıkların tedavisinde kullanılır ve yeni ilaç adaylarının geliştirilmesi için öncü maddelerdir. Doğal ürünlerin en önemli üreticileri aktinomiset grubuna dahil olan *Streptomyces* bakterileridir. Yapılan bir çalışmada; *S. bingchenggensis*'ten milbemisinler, b13, b14a, a28, a29, a30 ve sekomilbemisin A ve B izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Aynı bakteriden ST906 adlı yeni bir makrolid bileşiği de izole edilmiştir. ST906 bileşiğinin sitotoksitesitesi insan kolon karsinom hücre hattı üzerinde incelenmiş ve bileşiğin güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Xiang vd., 2009).

Endofitik aktinomisetler yeni biyoaktif metabolitlerin önemli bir rezervini oluştururlar. Yapılan bir çalışmada yeni aktinobakteriler izole edilmiş ve antibakteriyel bileşik üretimi için tarama yapılmıştır. İzole edilen *Streptomyces olivaceus* bakterisinin metabolitlerinin ekstraksiyonu için kloroform, etil asetat ve etanol çözücülerini kullanılmıştır. Sekonder metabolitlerin işlevsel grupları ve kimyasal bileşenlerin tanımlanması için GC-MS kullanılmıştır. Bu bakteriden 192 bileşik tanımlanmış ve ana bileşik olarak 5-Hidroksimetilfurfural keşfedilmiştir. Antimikrobiyal aktivite Gram pozitif ve Gram negaif bakteriler üzerinde denenmiş ve bileşiğin önemli derecede inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (MIC $\leq$ 1 mg/mL) (Maliehe vd., 2022).

Yeni biyoaktif bileşik elde edebilmek için farklı habitatlar taranmaktadır. Son yıllarda, Antarktika mikrobiyal toplulukları antibiyotik keşfi için bilim topluluklarında merak uyandırmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Antarktik *Streptomyces* suşlarından biri olan *Streptomyces* sp. so13.3 ün izolatinin Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antibiyotik aktivitesi (MIC: 15.6 µg/mL) olduğu bununla beraber Gram negatif patojenlerin üreme hızlarını zalttığı bulunmuştur. azaltmıştır (Núñez-Montero vd., 2019).

Tüberküloz (TB), yılda yaklaşık 2-3 milyon kişinin ölümüne neden olan *Mycobacterium tuberculosis* basilinin neden olduğu kronik bulaşıcı hastalıklardan biridir. Bir endofitik olan *Streptomyces* sp. YIM65484'ün fermentasyon sıvısından dört antimikrobiyal bileşik izole edilip yapıları spektral analizle aydınlatılmış; sırasıyla (2E,4E)-5-(3-hidroksifenil), ergosterol, penta-2,4-dienamid, ergosterol peroksit ve halolitoralin B olarak belirlenmiştir. Birinci bileşiğin $C_{11}H_{11}NO_2$ formülüne sahip

yeni bir bileşik olduğu bulunmuştur.. Bileşikler bir, iki, üç ve dört sırasıyla 128, 64, 32 ve 64 µg/mL MIC'lerle anti-tüberküloz aktivitesi sergilemiştir. Ayrıca, 1-4 bileşikleri *Candida albicans*, *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı da antimikrobiyal aktiviteler geliştirmişler (Zhou vd., 2015).

Streptomyces'lar biyoaktif doğal bileşiklerin verimli üreticileridir. Bu bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında HPLC ve LC/MS birlikte kullanılması karışımdaki bileşikleri ayrıştırıp her bir bileşiğin kimliğini belirlemeyi sağlar. Yapılan bir çalışmada *Streptomyces sp.* Act4Zk suşunun fermente edilmiş kültürün organik çözücüyle ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlar antimikrobiyal testte kullanılmış antifungal, *M. smegmatis* ve diğer Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca ekstraktların HPLC ve LC/MS analizleri ile üç farklı bileşik tanımlanmıştır. Bunlar staurosporin, antibiyotik MLR 52 ve antibiyotik K 252d olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma *Streptomyces* cinsinin yeni bir türünün staurosporin ve bazı türevlerini üretebildiğini açıkça ortaya koymuştur (Khosravi Babadi vd., 2021).

Literatür, sekonder metabolit üretimini artırmak için OSMAC stratejisinin *Streptomyces* türlerinde başarılı bir şekilde kullanıldığını göstermektedir. Birçok çalışma, kültür koşullarını değiştirmenin çeşitli sekonder metabolitlerin üretimini teşvik etmede önemini vurgulamıştır (Bode vd., 2002; Romano vd., 2018; Tiwari vd., 2015). Aynı zamanda, birçok durumda bakterilerin belirli koşullarda aktive edilebilen çok sayıda sessiz gen kümesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Rutledge ve Challis, 2015).

COVID-19 küresel salgınıyla antibiyotiklerin fazla ve yanlış kullanılmasıyla hali hazırda artmış olan antibiyotik dirençliliği daha da hız kazanmıştır. Yapılan bir çalışmada izole edilen *Streptomyces sp.* EMB24 suşunun enfeksiyona neden olan *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi çeşitli bakterilere antibakteriyel etki gösterdiği ve bu suşun (MRSA), tetrasikline dirençli *Neisseria gonorrhoeae* ile ampisiline direnç kazanmış *N.gonorrhoeae*'nin büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Goel vd., 2022).

Mikrobiyal doğal ürünler ilaç geliştirme alanında kullanılan ana kaynaklardır. *Actinomycetia*'nın biyoaktif bileşiklerin en iyi kaynağı olduğu kanıtlanmıştır. *Juniperus excelsa* rizosfer toprağında izole edilen 372 aktinomiset suşunun çeşitliliği ve

biyoaktif bileşik üretme potansiyeli incelenmiştir. Bu çalışmada incelenen aktinomiset suşlarının geniş bir cins ve türe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu suşların Gram-negatif, Gram pozitif bakteriler ve mayaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle *Streptomyces* sp. Je 1- 651 suşunun güçlü antimikrobiyal aktivitesiyle değerli antibiyotiklerin üretimi için potansiyel olarak görülebileceği belirtilmiştir (Tistechok vd., 2023).

İç Moğolistan'daki Kubuqi Çölü'nde 100 aktinomiset üzerinde yapılan bir araştırmada baskın cinsin *Streptomyces* olduğu görülmüştür. Suşların % 60.82'inin metanol ekstraktlarının çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalara güçlü antimikrobiyal aktiviteler sergilediği ve PC3 (prostat kanseri) ve A549'a (akciğer karsinomu) karşı yüksek ve hafif sitotoksikite etkisinin olduğu belirlenmiştir. HPLC-MS ve NMR ile metabolik analizlerinde 100-1000 Da arasında molekül ağırlığına sahip bileşikler tespit edilmiştir. PU-KB10-4 suşunun fermentasyon sıvısında griseoviridin, mitomisin C ve 4-hidroksisinamid izole edilmiştir (Saleem vd., 2023). Biyoaktif metabolitler makrolidler, antrasiklinler, aminoglikozidler, streptotrisinler, aktinomisinler ve peptidler gibi farklı gruplara ayrılır ve *Streptomyces* türleri tarafından sentezlenir. Aktinomisetlerin bu cinsi bakteriler biyoaktif sekonder metabolitler için önemli bir kaynaktırlar. Yapılmış çalışmada farklı habitatlardan ve deniz toprağından izole edilen *Streptomyces* cinsine ait 35 bakteri antimikrobial açıdan taranmıştır. G1 izolatu, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler ile çeşitli mantar patojenlerine karşı oldukça etkili bulunmuştur. Bu izolatu antimikrobiyal bileşiklerini metanol ile ekstrakte edilmiş. LC/MS analizleri sonucu m/z 758.42 değeri ile streptothricin D benzeri bir antibiyotik olduğu tespit edilmiştir (Ashraf vd., 2021).

Streptomyces cinsi bakteriler, biyoaktif doğal ürünlerin önemli bir kaynağıdır. Poliketid türevli metabolitler, klinik açıdan önemli birçok bileşiği içerir. Tip II poliketid sentaz (PKS) ile üretilen ve angusiklin grubunu içeren bu metabolitler, antikanser, antibakteriyel, antiviral, immünoşüpresif aktiviteler ve enzim inhibisyonu gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir. *Streptomyces* sp. CAH29 izolatu ile yapılan bir çalışmada CAH29 tarafından üretilen metabolit güçlü antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermiştir ve 14, 12, 10 ve 8 mm inhibisyon bölgeleri oluşturmuştur. NMR ve LCMS analizleri sonucu CAH29 tarafından üretilen metabolitin tetrangomisin olduğu belirlenmiştir (Özakin vd., 2016).

Aktinomisetlerinden elde edilen doğal ürünler, ilaç keşfi alanında değerli kaynak olma özelliğini sürdürmekte olup, bunların çoğu *Streptomyces* cinsi tarafından üretilmektedir. Standart laboratuvar koşullarında, mikropplardaki belirli gen kümeleri sessiz kalmaktadır. Çeşitli stres teknikleri, bu gizli gen kümelerini aktive ederek potansiyel metabolitlerin izolasyonuna yol açmaktadır. Bu çalışmada, *Streptomyces pratensis* NA-ZhouS1 suşunun kültür filtratından stremisin A (1) ve B (2) olarak adlandırılan iki yeni angusiklin antibiyotiği izole edilmiştir. Bu antibiyotikler, yüksek çözünürlüklü uçuş zamanı kütle spektrometrisi (HR-TOF-MS) ve NMR teknikleri ile belirlenmiştir. Ayrıca, dört bilinen bileşik- (2-[2-(3,5-dimetil-2-okso-sikloheksil)-6-okso- tetrahidro-piran-4il]-asetamid (3), siklo[L-(4-hidroksiprolinil)-L-lösin] (4), 2-metil-3H-kinazolin-4- on (5) ve mentan türevi, 3-(hidroksimetil)-6-izopropil-10,12-dioksatisiklo[7.2.1.0]dodec-4-en-8- one (6) - de elde edilmiştir. Metal stres tekniği ile keşfedilen yeni antibiyotikler, çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı 16 µg/mL'lik MIC değerleriyle antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *B.subtilis*'e karşı ise 8-16 µg/mL MIC değerinde inhibisyon sergilemiştir (Akhter vd., 2018).

Dirençli patojenik bakterilerin artışı, küresel halk sağlığı için ciddi bir tehdittir ve bu sorun doğadan yeni antibiyotikler keşfederek çözülebilir. Bu çalışmada *S.griseoviridis* K10, pH 7.2'de dört gün boyunca 32°C'de çalkalamalı inkübatörde yetiştirilmiş ve antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle analiz edilmiştir. Optimum antibiyotik üretim süresi ikinci ve üçüncü günler olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda *S. griseoviridis* K10'un *E.coli*, *P.aeruginosa*, *MRSA*, *S. aureus* ve bir mantar türü olan *C.albicans*'a karşı 13 ile 22 mm arasında değişen inhibitör zonları ile etkili olduğunu göstermiştir. *S. griseoviridis* K10 hem patojenik mantarlara hem de bakterilere karşı geniş kapsamlı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Warsito vd., 2020).

Aktinomisetlerin *Streptomyces* cinsi, bitkileri patojen mikroorganizmalara karşı sekonder metabolit üreterek savunmaktadır. Bu çalışmada, *Streptomyces* cinsinin altı izolatu, OSMAC yaklaşımı kullanılarak üç farklı ortamda yetiştirilmiş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. İzolatların, geniş antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. *Streptomyces* sp. CAH29'un etil asetat ve diklorometan ekstraktları, *S.aureus* ve *C.albicans*'a karşı 30 mm'ye kadar inhibisyon çapı oluşturmuştur. Ekstraktlarda

spiramisin, aktinomisin ve yeni kimyasal bileşikler tespit edilmiştir (Kum ve İnce, 2024).

Streptomyces cinsi, klinik açıdan önemli antibiyotiklerin % 60'ından fazlasına katkıda bulunur. Mangrov (bazı ağaç ve çalı türlerinin oluşturdukları ormanlar) ormanlarından izole edilen *S.murinus* THV12 izolatının genomik ve metabolomik analizleri ile yapılan bir çalışmada, genomu dizilenen bakterinin 47 adet sekonder metabolit gen kümesi içerdiği tespit edilmiştir. THV12 suşu, Gram-pozitif bakterilere ve *C.albicans*'a üzerine 30 mm'lik zon bölgesi ile geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Fermentasyon sıvısından elde edilen ham ekstraktların metabolit profili, HPLC ve NMR ile analiz edilmiş ve aktinomisin D, pentamisin, desferrioksamin E, sinnabaramid A gibi bileşikler tespit edilmiştir. Kimyasal elisitör olarak organik çözücülerden DMSÖ ve etanolün kullanıldığı ,ortak kültüre alma ile OSMAC yaklaşımı altında siklik ve doğrusal peptidler, bakteriyel alkaloidler, doğrusal poliketidler ve terpenoidler de bulunmuştur (Das vd., 2023).

Aktinomisetler ürettikleri metabolitler ile antibiyotik ve diğer yeni ilaçların kaynağını oluşturmaktadırlar. Lonar Gölü'nde aktinomisetlerle yapılan bir çalışmada, 32 aktinomisetin izolasyonu sağlanıp bu aktinomisetlerin antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Aktinomisetlerden antibakteriyel maddeler izole edildi ve karakterize edildi. 32 aktinomisetten yalnızca 24 izolat test organizmalarına karşı aktivite gösterdi İkincil taramaya tabi tutulan 24 izolattan 12'si *B.subtilis*'e, 13'ü *S.aureus*'a, yedisi *E.coli*'ye, üçü *Proteus vulgaris*'e ve dördü *Salmonella typhi*'ye karşı aktif olmuştur. *Streptomyces*'e ait iki numaralı kültür, tüm patojenik suşlara karşıaktivite göstermiştir. Ayrıca 48 saatte yetiştirilen *Streptomyces spp.*'nin fermentasyon suyu ekstraktındaki metabolitlerin, insan akciğer karsinomu hücresi A549'a karşı antimikrobiyal ve sitotoksik olduğunu kanıtlamıştır (Kharat vd., 2008).

Cross-streak uygulaması, test edilen bakteri ile patojen organizmanın veya mikroorganizmanın birbirleriyle rekabet etmesi sağlanarak metabolit üretmesini sağlamaya yönelik yöntemdir. Üretilen metabolit öncü olarak kullanılmadığı için agarda yeterli miktarda metabolit kalır. Bu durumda, üretilmiş olan metabolit nedeniyle patojene bakteriye karşı inhibisyon zonu oluşur ve antibakteriyel aktivite yani etkinlik test edilir (Ersal, 2019). Modifiye edilmiş Cross-streak yöntemi

kullanılarak yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için 30 aktinobakteriyel kültür incelenmiştir. Bu kültürlerden 28'inin, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler ile maya gibi çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı aktif bileşikler ürettiği tespit edilmiştir(Velho-Pereira ve Kamat, 2011).

Streptomyces roseosporus üzerine yapılan bir çalışmada, GNPS ile biyosentetik potansiyeli araştırılmış ve yeni bir daptomycin türevi olan daptoamid keşfedilmiştir. Bu çalışma, özellikle *Streptomyces*'in biyosentetik gen kümelerini hedef alarak yeni doğal ürünlerin üretim kapasitesini ortaya çıkarmıştır. GNPS, bu türevlerin moleküler ağlarını oluşturarak daha önce tanımlanmamış analogların ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur (Charlop-Powers vd., 2014).

Streptomyces türlerinde genomik ve metabolomik analizlerin GNPS ile birleştirilmesi, yeni biyolojik bileşiklerin keşfi için önemli bir yol sunmaktadır. Örneğin, Nepal topraklarından izole edilen *Streptomyces* suşlarına yapılan bir çalışmada, GNPS ve SIRIUS yazılımı kullanılarak 50'den fazla ikincil metabolit tanımlandı. Bu bileşikler arasında diketopiperazinler, aktinomisinler ve çeşitli antibiyotikler yer almakta olup, özellikle antimikrobiyal ve antitümör özelliklere sahip yeni bileşiklerin bulunması sağlanmıştır (Bhattarai vd., 2022)

Farklı bir çalışmada, 35 *Salinispora* izolatına ait ekstraktların GNPS veri tabanı aracılığıyla yapılan dereplikasyon analizleri, bilinen bileşiklerin yanı sıra yeni bir bileşik olan Retimisin A'nın izolasyonu ve tanımlandığını göstermektedir (Duncan vd., 2015).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Salvia aytachii, Orta Anadolu Bölgesi'nde yayılış gösteren bir Türkiye endemiğidir. Bu endemik bitkinin kök bölgesinden alınan toprak örneğinden izole edilen ve moleküler teşhisi yapılan *S.albinoger* BA2 izolatu bu çalışmada kullanıldı (Kum ve İnce, 2021; Yılmaz vd., 2008).

3.1.1 Antimikrobiyal aktivite test mikroorganizmaları

Antimikrobiyal etkinliğin incelenmesinde disk difüzyon yönteminde *E. coli* (ATCC 35218-2), *P. aeruginosa* (ATCC 27823), *B. subtilis* (ATCC 11774), *S. aureus* (ATCC 29213), *K. pneumoniae* (ATCC 700603-3) ve *E. faecalis* (ATCC 29212) test mikroorganizmaları kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri

M2 Agar

10 g malt özütü (Merck), 4 g maya özütü (Oxoid), 3 g glukoz (Merck) ve 15 g agar (Merck), tartıldı. Bu karışım, çeşme suyu kullanılarak 1L hacime tamamlandı ve 121°C'de 15 dk boyunca 1.2 atm basınç altında otoklavda steril edildi.

Nutrient Agar (NA)

8 g nutrient broth (Merck), 15 g agar (Merck) tartılarak saf su ile 1 L'ye tamamlanıp 121°C'de 15 dakika 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

Nutrient Sıvı Besiyeri (NB)

8 g nutrient broth (Merck), saf su eklenerek 1L hacme tamamlandı ve 121°C'de 15 dakika boyunca 1.2 atm basıncı altında otoklavda steril edildi.

3.1.3 Organik ekstraksiyon

Organik çözücü olarak etil asetat (Tekim, saflık % 99.5) kullanıldı.

3.1.4 Kullanılan çözeltiler

İndol-3-asetik asit (IAA) (Sigma) stok çözeltisi 1 mg/mL olacak şekilde %96'lık etanol (EtOH) içerisinde hazırlandı. Bu şekilde hazırlanan stok çözeltisi, her

mililitrede 1 mg IAA içerecek şekilde standardize edildi. Elde edilen stok çözeltisi, daha sonra deneylerde kullanılmak üzere uygun hacimlerde seyreltilti.

Jasmonik asit (JA) çözeltisi (Sigma Chemical); Batman Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarından temin edildi. 1030 mg/ml Jasmonik asit stok çözeltisi deneylerde kullanılmak üzere uygun hacimlerde alındı.

3.1.5 Kullanılan cihazlar

Laminar kabin (Telstar AV-100)

Etüv (Heraeus)

Etüv (Thermo-Heraeus)

UV-Vis Spectrofotometre (Shimadzu UV-1280)

LC-QTOF-MS/MS

Çalkalayıcı orbital inkübatör (Zehrincheng Zhwy-200B)

Otoklav (Hirayama-HV-502)

Hassas tartı (Weightlab instruments WSA-224)

Evaporatör (IKA RV 10)

Mikropipet (Eppendorf)

3.2 Yöntem

3.2.1 *S.alboniger* BA2'nin üretilmesi

S.alboniger BA2 sporları M2 katı kültürden, M2 katı besiyerine ekilip 28 °C'de 96 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, 50 ml M2 sıvı besiyeri içeren 250 ml'lik çentikli erlenmayere 96 saat üretilip *Streptomyces* sp. BA2 katı kültüründen ekim yapıldı. Sıvı kültürler, 28 °C'de 220 rpm'de 96 saat boyunca ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyon sonrasında farklı konsantrasyonlarda IAA (%0.01, %0.05) ve JA(%0.01, %0.02 ve %0.05) içeren 50 ml M2 besiyerlerine 100 µl inokülasyon

yapıldı. Kültürler 72 saat boyunca, 28  C sıcaklıkta 220 rpm’de üretildi.  nk basyon sonrası, miseller ile süpernatantı ayırmada süzme yöntemi kullanıldı.

3.2.2 Sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu

Süzme sonucunda elde edilen filtrat, etilasetat ile 1:1 (v/v) oranında ekstraksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstrakt sodyum sülfat (Na₂SO₄) ile kurutulduktan sonra solvent uzaklaştırmaya için 30-35  C’de evaporasyon yapıldı.

3.2.3 Antibakteriyel etkinlik tayini

Antibakteriyel etkinliğin incelenmesinde yöntem olarak disk difüzyon kullanıldı. Bu disk difüzyon testinde antibakteriyel etkiyi belirlemek için NA besiyeri kullanıldı. 24 saat önce NA besiyerinde üretilip olan patojen bakteri kolonileri 25 ml NB besiyerine ekildi. 37  C’de ve Orbital çalkalayıcıda 150 rpm’de inkübe edilerek, bulanıklık 0.5 McFarland standartına ulaşana kadar 2 ila 6 saat arasında bekletildi. Hazırlanan final ekimlerden 100  l alınarak bütün katı NA besiyerinin her bölgesine uygulanarak yayma yapıldı. Besiyerleri 10 dakika bekletildikten sonra üzerlerine 6 mm çapındaki diskler yerleştirildi ve bu disklerin üzerine 10  l ham ekstrakt uygulandı. Etüvde, 37  C’de 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra, inhibisyon bölgelerinin çapları ölçüldü. Üç tekrarlı deneyden elde edilen zon çaplarının aritmetik ortalaması alınarak, OpenAI ile standart sapma hesaplandı.

3.2.4 Çapraz  izgi (Cross-streak) yöntemi ile katı besiyerinde antibakteriyel aktivite tayini

M2 katı besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda IAA (%0.01, %0.05) ve JA(%0.01, %0.02 ve %0.05) ilave edilip bu besiyerlerinin merkezine daire şeklinde *S. alboniger* BA2 ekimi yapıldı ve 72 saat inkübe edildi. Antimikrobiyal aktivite için test organizmalarının 24 saat önceden NA’da taze kültürleri hazırlandı. Test mikroorganizmalarının kolonileri 25 ml NB’ye aktarılarak, orbital çalkalayıcıda 37  C’de ve 150 rpm’de 0.5 McFarland standardına ulaşıncaya kadar mikroorganizmaya göre değişen s relerde 2-6 saat boyunca üretildi.  remiş olan test organizmalarının herbirinden 20  L alınarak dairenin çevresine *S. alboniger* BA2 ile sadece temas

edecek şekilde radyal olarak çizgi yöntemiyle ekimleri yapıldı. Test kültürleri etüvde 32°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında zon çapları ölçüldü.

3.2.5 Katı kültürden sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu

Katı kültürlerde patojenler test organizmalarının *S. alboniger* BA2 ile etkileşim halindeki bölgelerde oluşan zon bölgelerindeki agarlar bistüri yardımıyla kesildi ve ependorf tüplere alındı. Mikropipet ile agarın üzerini geçecek miktarda etilasetat ilave edildi. Ependorfun ağzı kapatılarak parafimle sarıldı. +4 °C’de 24 saat bekletildi. 24 saat sonra ependorftan mikropipet yardımıyla üst faz alınıp LC-MS/MS analizi için hazırlandı.

3.2.6 LC-QTOF-MS/MS analizleri

Elde edilen ham ekstraktlar, final konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde metanolde çözülüp, 0,22 µm filtre kullanılarak filtrelendi ve LC-MS/MS analizlerine tabi tutuldu. Bu analizler, Agilent Extend-C18 RP UPLC kolonun (2.1×100 mm, 1.8 µm) kullanıldığı, akış hızının 0,3 mL/dk olduğu Agilent 1260 LC ve Agilent 6545 Q-TOF LC/MS sistemleri ile gerçekleştirildi. Her bir ekstraktan 20 µl sisteme enjekte edildi. Analizler için uygulanan LC gradiyenti şu şekildeydi: %10 asetonitril (ACN) (%0.1 su, 0–3 dk), %10–100 ACN (%0.1 su)/%0.1 su (3–23 dk), %100 ACN (%0.1 su, 23–25 dk), %10 ACN (%0.1 su, 25–30 dk). MS/MS analizi pozitif modda yapıldı ve 100-1600 m/z aralığındaki metabolitler tarandı. VCap değeri 3000, çarpışma enerjisi 20 eV ve gaz sıcaklığı 300 °C olarak ayarlandı. Bu analizler, Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 GNPS ve moleküler ağ analizleri

LC-MS/MS analizlerden elde edilen MS/MS spektrumlarının verileri Moleküler Network analizleri GNPS programı ile yapıldı. MS/MS verileri mzXML formatına dönüştürüldü ve GNPS sunucusuna GNPS dokümantasyon sayfasındaki yönergelere uygun olarak yüklendi (Wang vd., 2016). Bu mzXML verileri, doğal ürünlerin dereplikasyonunu ve metabolomik analizini belirlemek amacıyla GNPS'deki kütüphane arama ve moleküler ağ oluşturma araçları kullanılarak analiz edildi.

Kümelenmiş veriler Cytoscape® (sürüm 3.8.0) (Shannon, 2003) kullanılarak görselleştirildi.

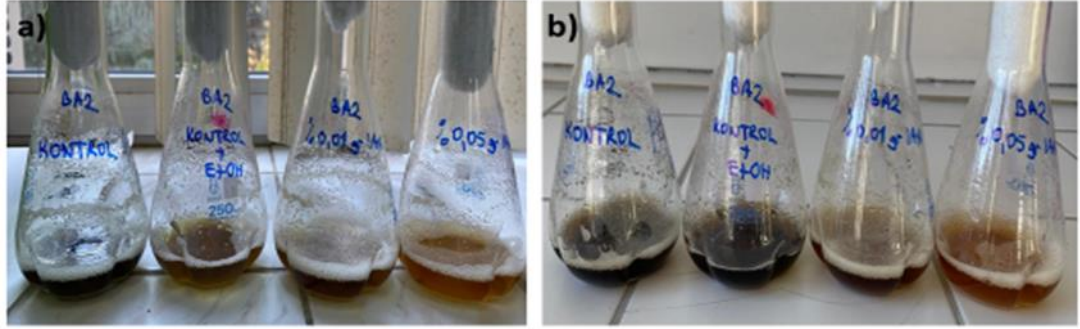


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

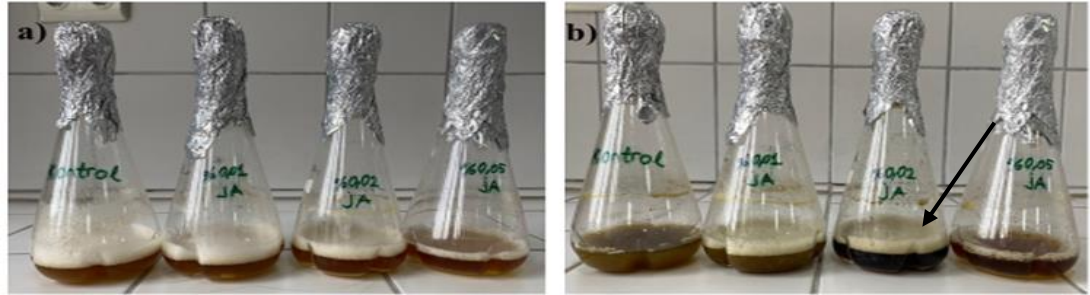
4.1 Bulgular

4.1.1 *S.alboniger* BA2'nin M2 besiyerinde bitki hormonları varlığında üretilmesi

M2 besiyerinde IAA veya JA varlığında üretilen *S.alboniger* BA2, bitki hormonları varlığında ve bunların farklı konsantrasyonlarında kültür ortamında farklı renkler oluşturdu. Her iki hormonun özellikle JA varlığında 72 saat sonrasında pigmentasyonun arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1 ve 4.2). Pigmentasyonun en yoğun olarak %0.02 JA bulunan kültürlerde olduğu tespit edildi.

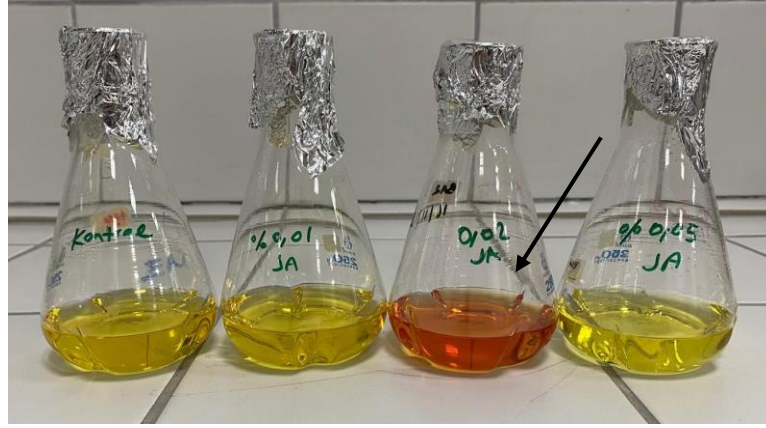


Şekil 4.1 *S.alboniger* BA2'nin IAA'nın farklı konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde 48 (a) ve 72 (b) saat sonraki üreme görüntüleri



Şekil 4.2 *S.alboniger* BA2'nin JA'nın farklı konsantrasyonlarına sahip besiyerlerinde 48 (a) ve 72 (b) saat sonrası üreme görüntüleri

72 saat üreme sonrasında kültürlerin organik ekstraktlarında %0.02 JA konsantrasyonunda elde edilen renk Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



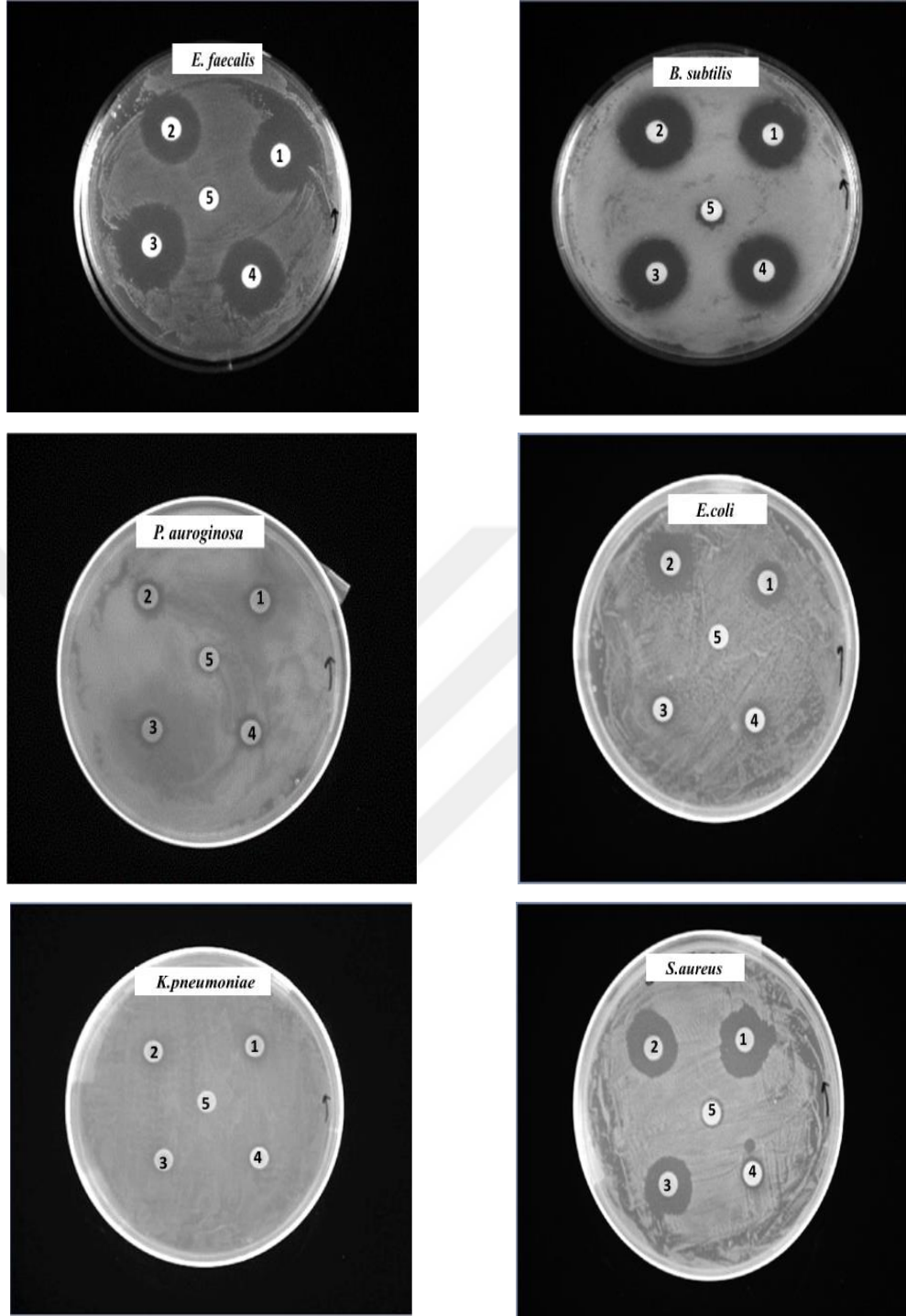
Şekil 4.3 *S.alboniger* BA2'nin JA'nın farklı konsantrasyonlarına sahip kültürlerin 72 saat üreme sonrasında elde edilen organik ekstraktları

4.1.2 *S.alboniger* BA2'nin sıvı kültürdeki antibakteriyel aktiviteleri

İki farklı bitki hormonu ile farklı konsantrasyonlarda üretilen *S.alboniger* BA2'nin çalışılan test organizmalarına karşı vermiş oldukları inhibisyon zon çapları Tablo 4.1 ve 4.2' de görülmektedir. Herhangi bir ilave yapılmaksızın M2 besiyerinde üretilen *S.alboniger* BA2'nin *K.pneumoniae* dışındaki diğer test organizmalarına karşı geniş spektrumda ve etkili zon çaplarına sahip olduğu görüldü. *S.alboniger* BA2'nin bu aktivitesinin yalnız EtOH ve EtOH'da hazırlanan %0.01'lik IAA konsantrasyonlarında kayda değer biçimde değişmediği ancak çalışılan en yüksek IAA konsantrasyonu olan %0.05'lik IAA varlığında inhibisyon çaplarında düşüş olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1 ve Şekil 4.4).

Tablo 4.1 *S.alboniger* BA2 IAA farklı konsantrasyonlarından oluşan besiyerinde üretilen, çözücü ile ekstrakte edilen bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri

Örnekler	Kullanılan Test Organizmaları ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)					
	<i>E.faecalis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Streptomyces</i> sp. BA2 (Kontrol)	21±2	20±1	10±2	15±3	-	17±3
Kontrol+EtOH	19±1	19±3	11±1	15±2	-	15±3
Kontrol+%0.01 IAA	21±3	18±1	9±1	12±2	-	15±2
Kontrol+%0.05 IAA	16±5	14±4	9±1	-	-	10±2



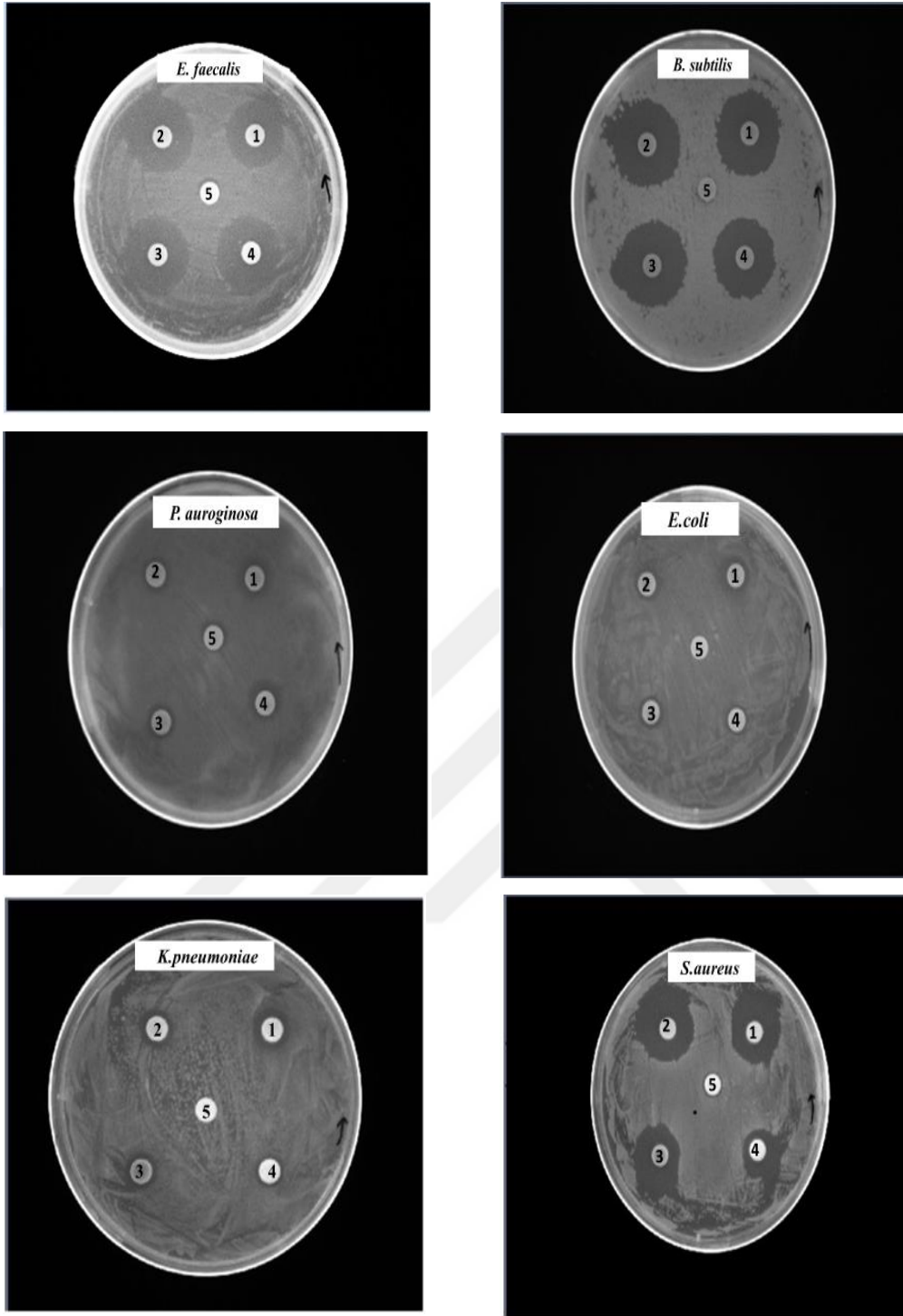
Şekil 4.4 *S.alboniger* BA2'nin IAA deney setinden elde edilen organik ekstraktlarının test organizmaları üzerine disk difüzyon yöntemi ile elde edilmiş zon çapı resimleri: 1; Kontrol (*S. alboniger* BA2) 2; EtOH içeren kültürde görülen inhibisyon zonu, 3; %0.01 IAA içeren kültüründe görülen inhibisyon zonu, 4; %0.05 IAA içeren kültüründe görülen inhibisyon zonu, 5; Negatif kontrol (Metanol)

S.alboniger BA2'nin üç farklı konsantrasyonda JA varlığında antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, zon çaplarında *E. faecalis* ve *B. subtilis*'e karşı bir artış olduğu gözlemlense de standart sapma göz önünde bulundurulduğunda bu artışın anlamlı

olmadığı görülmektedir. JA'nın artan konsantrasyonlarının *E. faecalis* ve *B. subtilis*'e karşı olumsuz bir etkisinin olmadığını ancak % 0.05 JA varlığında *P.aeruginosa*, *E.coli* ve *S.aureus*' a karşı gösterilen antimikrobiyal etkinin düştüğü gözlemlendi (Tablo 4.2 ve Şekil 4.5).

Tablo 4.2 *S.alboniger* BA2 JA farklı konsantrasyonlarından oluşan besiyerinde üretilen, çözücü ile ekstrakte edilen bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri

Örnekler	Kullanılan Test Organizmaları ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)					
	<i>E.faecalis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Streptomyces</i> sp. BA2 (Kontrol)	19±1	23±2	13±2	15±3	-	18±2
Kontrol+%0.01 JA	21±2	24±2	12±1	12±2	-	18±2
Kontrol+%0.02 JA	21±1	24±4	11±2	12±2	-	19±1
Kontrol+%0.05 JA	19±3	21±3	9±1	8±1	-	15±0



Şekil 4.5 *S.alboniger* BA2'nin JA deney setinden elde edilen organik ekstraktlarının test organizmaları üzerine disk difüzyon yöntemi ile elde edilmiş zon çapı resimleri: 1; Kontrol (*S. alboniger* BA2) 2; %0.01 JA içeren kültüründe görülen inhibisyon zonu, 3; %0.02 JA içeren kültüründe görülen inhibisyon zonu, 4; %0.05 JA içeren kültüründe görülen inhibisyon zonu, 5; Negatif kontrol (Metanol)

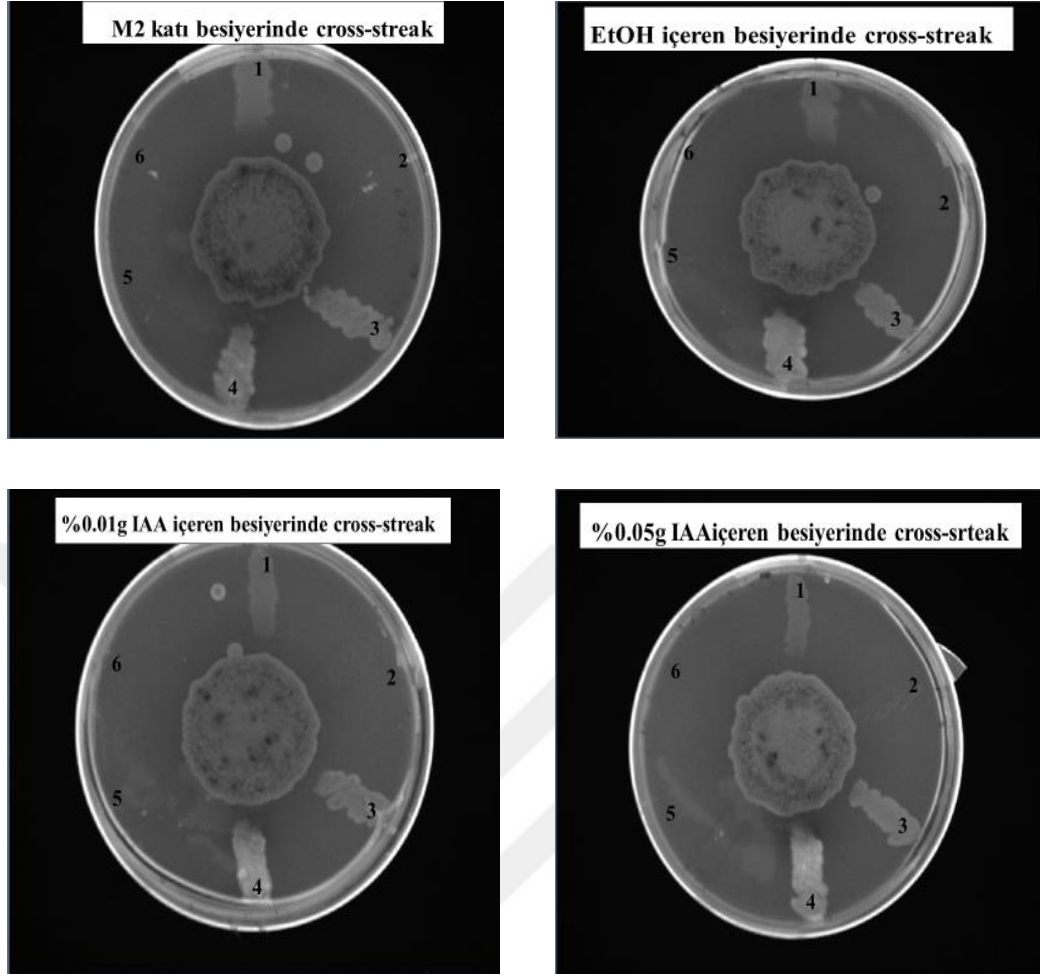
4.1.3 *S.alboniger* BA2'nin katı kültürdeki antibakteriyel aktiviteleri

Bitki hormonlarını içeren ve içermeyen katı besiyerinde kültüre edilen ve test organizmaları ile biraraya getirilen *S.alboniger* BA2'nin oluşturduğu zonların özellikle Gram pozitif mikroorganizmalara karşı daha güçlü olduğu bulundu (Tablo

4.3 ve Şekil 4.6). Bu zonlar sıvı kültürden elde edilen zonlar ile aynı şekilde ölçüldü ve mm cinsinden ifade edildi. Sıvı kültürden elde edilen organik ekstraktların *P.aeruginosa* ve *E.coli* üzerine vermiş oldukları zon çaplarının ise katı kültürde daha küçük olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra, sıvı kültürlerde tespit edilemeyen *K.pneumonia*'ya karşı bir aktiviteye çarpaz çizgi yöntemi kullanılarak yapılan katı kültürde rastlandı. Kontrol *S.alboniger* BA2 kültüründen elde edilen bu zon çaplarının, IAA varlığında kayda değer bir değişiklik göstermediği tespit edildi (Tablo 4.3). Hem hormonlu hemde hormonsuz kültürlerden bakterilerin birbirlerine bakan yüzeylerinde oluşturdukları zon çaplarından agarlar kesip alınarak bileşik ekstraksiyonu yapıldı (Şekil 4.6).

Tablo 4.3 Farklı IAA konsantrasyonlarına sahip katı besiyerinde *S.alboniger* BA2'nin test organizmalarına karşı antibakteriyel aktivitesi

Örnekler	Kullanılan Test Organizmaları ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)					
	<i>E.faecalis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Streptomyces</i> sp. BA2 (Kontrol)	32	32	2	4	2	32
Kontrol+EtOH	32	32	2	5	2	32
Kontrol+%0.01 IAA	32	32	2	4	3	32
Kontrol+%0.05 IAA	32	32	2	4	2	32

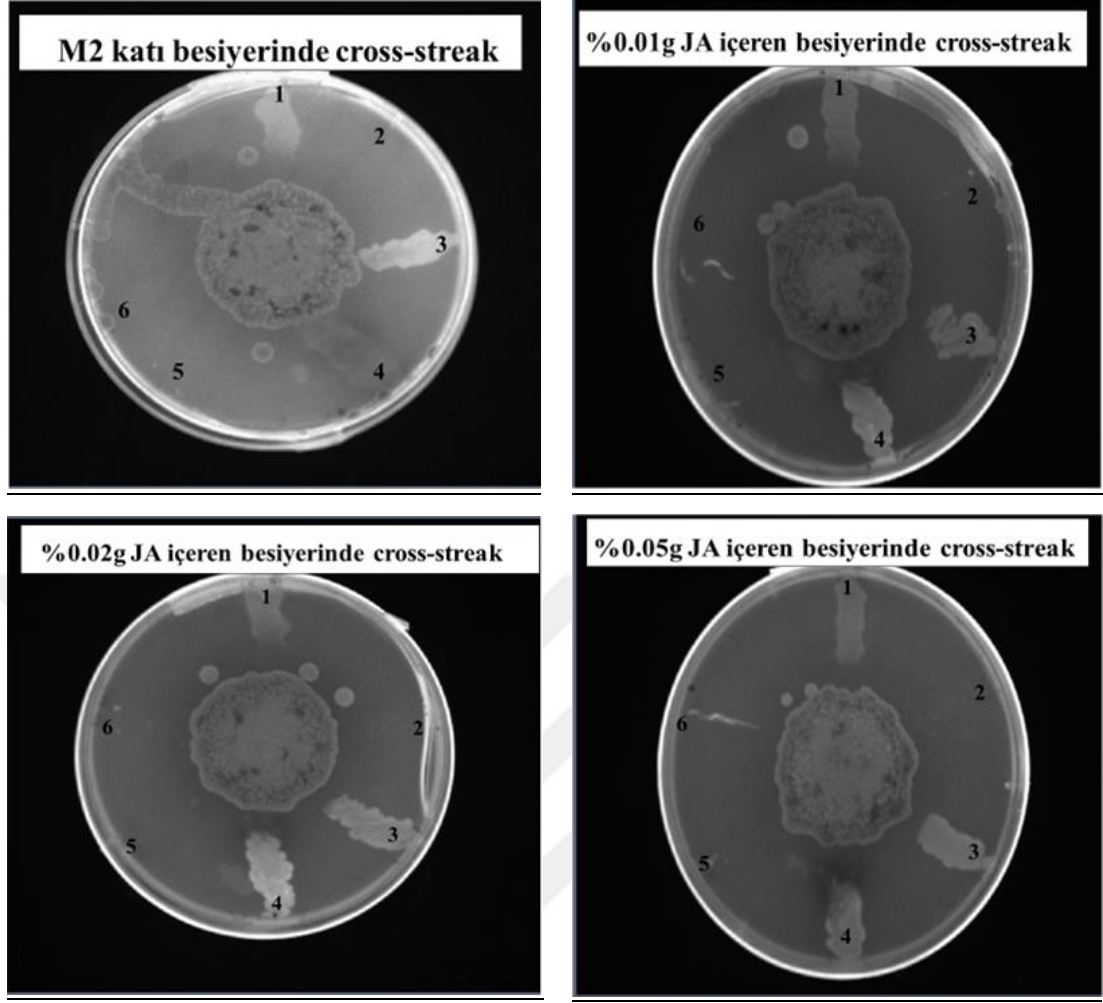


Şekil 4.6 *S.alboniger* BA2'nin farklı konsantrasyonlara sahip IAA katı besi ortamında test organizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite resmi: 1; *E.coli*, 2; *S.aureus*, 3; *K.pneumoniae*, 4; *P.auroginosa*, 5; *B.subtilis*, 6; *E.faecalis*

JA varlığında katı kültürde biraraya getirilen izolat BA2 ve test organizmalarında da kontrole kıyasla önemli bir fark görülmedi (Tablo 4.4 ve Şekil 4.7). Yalnız, %0.02 JA varlığında *E. coli*'ye karşı inhibisyon çapında bir yükselme olduğu görülmektedir.

Tablo 4.4 Farklı JA konsantrasyonlarına sahip katı besiyerinde *S. alboniger* BA2'nin test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi

Örnekler	Kullanılan Test Organizmaları ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)					
	<i>E.faecalis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>S.aureus</i>
Kontrol	32	32	2	5	2	32
Kontrol+%0.01JA	32	32	2	4	5	32
Kontrol+%0.02 JA	32	32	2	7	2	32
Kontrol+%0.05 JA	32	32	2	5	3	32



Şekil 4.7 *S.alboniger* BA2'nin farklı konsantrasyonlara sahip JA katı besi ortamında test organizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite resmi: 1; *E.coli*, 2; *S.aureus*, 3; *K.pneumoniae*, 4; *P.auroginosa*, 5; *B.subtilis*, 6; *E.faecalis*

4.1.4 *S.alboniger* BA2'nin metabolomik analizleri

S. alboniger BA2'nin M2 besiyerinde IAA ve JA gibi bitki hormonları varlığında ürettiği metabolitler LC-MS/MS ile analiz edildi. Bu analizlerden elde edilen MS/MS spektrumları GNPS veri tabanında incelendi. Öncelikle bilinen metabolitlerin tespiti için dereplikasyon analizleri yapıldı. Sonrasında ise bilinen bileşiklerin analogları ve yeni bileşikler tespit etmek için moleküler ağ analizleri yapıldı.

Yapılan analizler sonucunda, *S. alboniger* BA2'ye ait metabolitlerden 12 tanesinin GNPS kütüphanesindeki mevcut metabolitlerle yüksek benzerlik gösterdiği belirlendi (Tablo 4.5). Bu bileşiklerden bazıları analizi yapılan tüm örneklerde üretilebildiği gibi bazıları ise sadece hormonların varlığında üretildi. Örneğin, geniş spektrumda biyolojik aktiviteye sahip austinoneol benzeri bileşiğin tüm kültürlerde üretildiği

gözlemlendi. Buna ek olarak phenylethylamide ve aktinomisin bileşiklerine de tüm kültürlerde rastlandı. Sadece IAA varlığındaki kültürlerde benzerlik tespit edilen norlichexanthone bileşiği antikanser bir bileşik olup xanthone grubu içermektedir. *Streptomyces* cinsi üyeleri biyoaktif xanthone metabolitleri açısından önemli bir kaynaktır. JA içeren sıvı kültürlerin analizi sonucunda, kontrol ve IAA kültürlerden farklı olarak canarione, fualosine, 3-hydroxyoctanoic acid ve quinoxaline-2-carboxylic acid bileşiklerine ait spektrumlarla güçlü eşleşmeler tespit edildi.

Katı kültür ortamında BA2'nin test organizmaları ile biraraya getirilmesiyle oluşan zonlardan ekstrakte edilen metabolitlerden B27A19 isimli bileşik *E. coli* ve *K. pneumonia* bakterilerine karşı geliştirilmiş zonlardan elde edildi. Bu bileşik yeni bir bileşik olmakla beraber, yapısı ve biyolojik aktivitesi ile ilgili bir bulgu yoktur. Bu çalışmalardan ayrıca JA varlığındaki katı kültürde *E. coli*'ye karşı oluşturulmuş zondan elde edilen metabolitlerde taksifolin bileşiği ile yüksek benzerlik elde edildi.

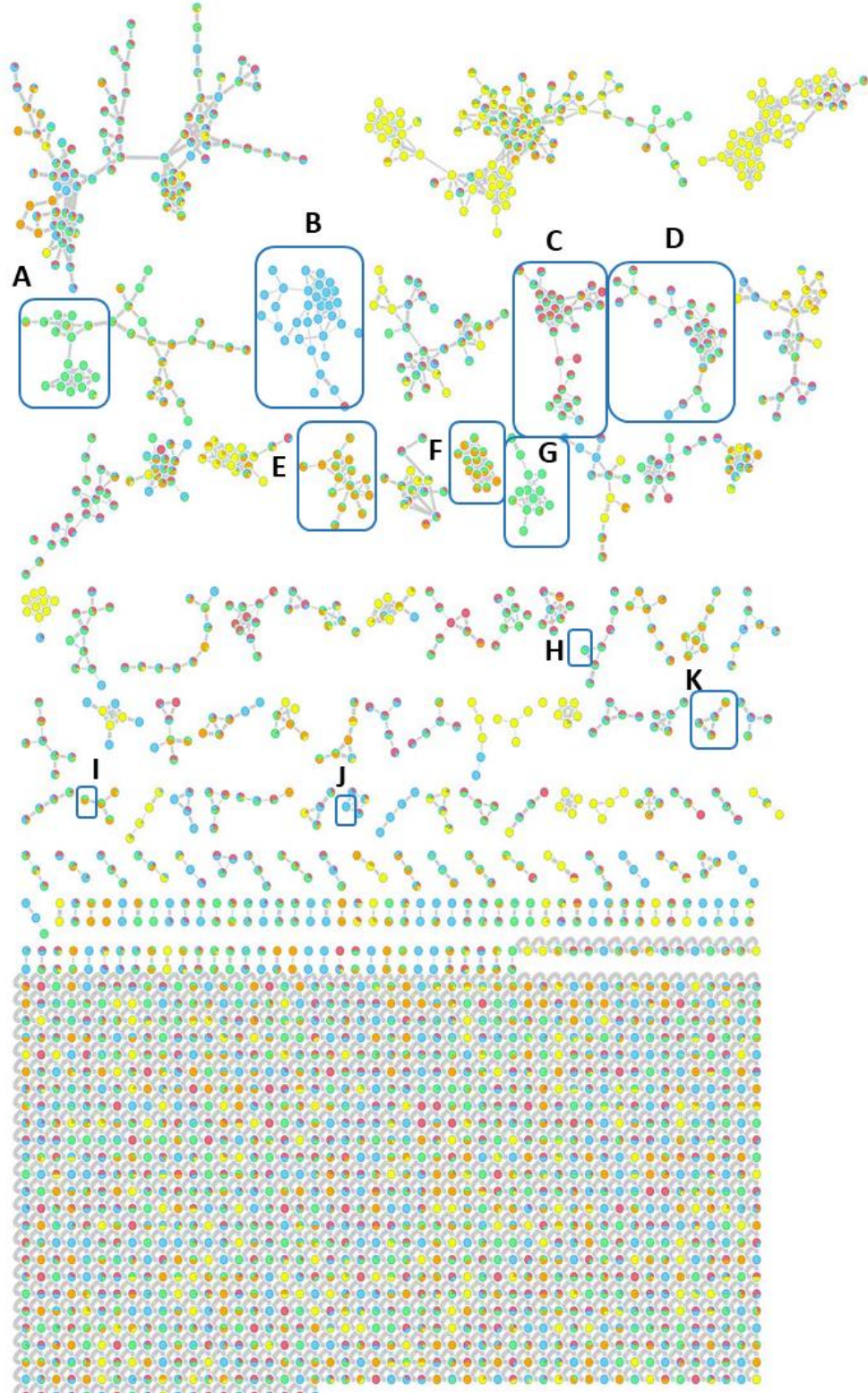
Mevcut metabolitlerin yeni analoglarını ve farklı ortamlarda üretilen yeni bileşikleri tahmin etmek amacıyla GNPS moleküler ağ analizleri yapıldı (Şekil 4.8). Moleküler ağ, tekli veya birbiriyle yapısal olarak ilişkili node (daireler) ve bunları birbirine bağlayan edge (kenarlar) den oluşmaktadır. Birbiriyle ilişkili daireler (benzer MS/MS verilerine sahip) bir araya gelip kümeleri meydana getirir. GNPS algoritması bu benzerliği vektörel bir ölçümle değerlendirerek daireleri birbirine bağlar. Bu şekilde benzer bileşikler aynı kümelerde toplanır. Yani bir kümedeki bu daireler, kimyasal yapı veya fragmentasyon özellikleri açısından benzer bileşiklere ait verilerdir. Ağdaki tekli kutucuklar ise diğer kutucuklarla ilişkili olmayan yani MS/MS verileri başka bileşiklerle benzerlik göstermeyen bileşiği temsil eder. Her daire, farklı kültürlerin ekstratlarına ait MS/MS verilerini temsil ederken, kenarlar ise bu veriler arasındaki vektörel benzerliği gösterir.

Tablo 4.5 Bitki hormonları varlığında *Streptomyces* sp. BA2 tarafından sıvı ve katı besiyerlerinde üretilen ve GNPS veri tabanında dereplike olan bileşikler

Bileşikler	Kontrol (<i>Streptomyces</i> sp. BA2)	Sıvı kültür (IAA)	Sıvı kültür (JA)	Katı kültür (IAA veya JA)	Biyolojik Aktivite
Austinoneol	+	+	+	+	Antimikrobiyal, Antioksidan, Sitotoksik (El-Demerdash vd., 2020)
Canarione	-	-	+	-	Antimikrobiyal, Antikanser (Dufossé, 2017) (Unagul vd., 2005) (Nematollahi vd., 2012)
Phenylethylamide	+	+	+	+	İnsektisit (Mollah vd., 2020)
Aurantın	+	+	+	+	Antikanser (Kopustinskiene vd., 2020)
Actinomycin_K1c	+	+	+	-	Antikanser, Antibakteriyel (Katz vd., 1977)
Actinomycin D	+	+	+	+	Antikanser (Green, 1977) (Charousová vd., 2019)
Futalosine	-	-	+	-	Nükleosid analogu (Hosokawa vd., 1999)
Norlichexanthone	-	+	-	-	Antikanser (Le Pogam and Boustie, 2016) (Soares vd., 2022)
B27A19	-	-	-	+	Veri yok
3- hydroxyoctanoic acid	-	-	+	-	Antimikrobiyal (Radiojevic vd., 2016)
Quinoxaline-2- carboxylic acid	-	-	+	-	Antimikrobiyal (Leyva-Ramos ve Pedraza-Alvarez, 2021)
Taxifolin	-	-	-	+	Antifouling (Gopikrishnan vd., 2019)

Şekil 4.8'deki moleküler ağda 11 tane bileşiğe ait kümenin olduğu ve bu kümelerde dereplike olan bileşiklerin farklı analoglarının bulunduğu görülmektedir. Bu kümelerdeki bileşikler ait oldukları doğal ürün sınıflarına göre sınıflandırıldı. Bunlar arasında; karboksilik asitler (A), aktinomisinler (C), Fenolik asitler (D) ve Meroterpenoidler önemli grupları temsil etmektedir. Dikkat çeken bulgulardan bir diğeri ise B (sadece IAA varlığında üretilen), G (sadece JA varlığında üretilen), E ve F (IAA ve JA varlığında üretilen) kümelerinde yer alan bileşiklerin sadece bitki hormonları varlığında üretilen bileşikler olması ve GNPS kütüphanesinde herhangi bir

bileşiklerle eşleşme göstermemesidir. Ayrıca, hem birbiriyle benzerlik göstermeyen tekli node'ların varlığı hemde kütüphanelerdeki mevcut bileşiklerle herhangi bir benzerliği görülmeyen fazla sayıda node olduğu tespit edildi.



Şekil 4.8 Ekstraktların GNPS moleküler ağ analizi (Kırmızı; *Streptomyces* sp. BA2-Kontrol, Mavi; IAA içeren sıvı kültürden gelen bileşikler, Yeşil; JA içeren sıvı kültürden gelen bileşikler, Turuncu; Hormon içeren katı kültürlerdeki antimikrobiyal zondan elde edilen bileşikler, Sarı; Besiyeri ve Negatif kontrol (Metanol). A) Karboksilik asitler (3-hydroxyoctanoic acid), B) Sadece IAA varlığında üretilen ve GNPS kütüphanesinde herhangi bir bileşik ile eşleşme göstermeyen bileşikler C) Aktinomisinler (Actinomycin D, Actinomycin K1C ve Aurantin), D) Fenolik asitler (methyl 2-(4,5-dihydroxy-6-methoxy-3,6-dimethyl-2-oxocyclohex-3-en-1-yl) oxy-4-hydroxy-3,6-dimethylbenzoate ve 3-(7-methoxy-4,8-dimethyl-2-oxochromen-3-yl)-N-[3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)propyl] propanamide), E) ve F) IAA ve JA varlığında üretilen ve GNPS kütüphanesinde herhangi bir bileşik ile eşleşme göstermeyen bileşikler, G) JA varlığında üretilen ve GNPS kütüphanesinde herhangi bir bileşik ile eşleşme göstermeyen bileşikler, H) IAA ve JA varlığında üretilen furanokumarin ([8-[2-(3-methylbutanoyloxy)propan-2-yl]-2-oxo-8,9-dihydrofuro[2,3-h]chromen-9-yl] 3-methylbutanoate) I) IAA ve JA varlığında üretilen Parthenolide, J) IAA varlığında üretilen Barbatic acid, K) Meroterpenoids (Austinoneol)

4.2 Tartışma

Doğal kaynaklı sekonder metabolitler, bitkiler başta olmak üzere en çok mikroorganizmalar tarafından üretilir ve çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Özellikle mikrobiyal metabolitler, antimikrobiyal, antikanser, antiviral ve antidiyabetik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olabilirler. *Streptomyces* gibi mikroorganizmalar, biyoaktif ürünlerin önemli kaynaklarından birini oluşturur. Bu bakteriler tarafından üretilen antibiyotikler, tıpta önemli bir rol oynamaktadır ve antibiyotiklerin hızlı şekilde üretilmesini sağlamışlardır.

Ancak antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı, antibiyotik direncinin yayılmasına neden olmuş ve hastane patojenlerinde yeni antibiyotik dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu sebeple, çeşitli etki mekanizmalarına sahip yeni antimikrobiyal ve farklı biyolojik aktivite özelliği gösteren bileşiklerin keşfedilmesi gerekmektedir.

Araştırmamız kapsamında, önceden moleküler teşhisi yapılmış olan *Streptomyces* izolatları arasından *S. alboniger* BA2 izolatu seçildi. Bu bakteri biyoaktif sekonder metabolit sentezinde rol alan birçok biyosentetik gen kümesi içerdiği için tercih edildi (Kum ve İnce, 2021; Kum ve İnce, 2024). Bu gen kümelerinin sadece birkaçına ait ürünler (metabolitler) kültürden elde edildiği için, izolatın aktif olmayan diğer gen kümelerini açmak ve metabolitlerin kültür ortamında üretilmesini sağlamak için farklı yaklaşımlar benimsendi. Bu amaçla *S. alboniger* BA2 iki farklı bitki hormonu olan IAA ve JA varlığında hem sıvı hemde katı kültür rejiminde üretildi. BA2 izolatu bitki köklerinden izole edildiği için, bitki büyümesini indükleyen IAA ve bitkiyi zararlılara karşı koruyan JA hormonları bu amaç için seçildi.

Daha önceki çalışmalarda M2 (Yılmaz vd., 2008), GYM, TKN ve TAS (Kum, 2019) besiyerlerinde üretilen BA2 izolatının Gram negatif patojenler olan *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi görülmemiştir. Ciddi enfeksiyonlara sebep olan ve etkili antibiyotik tedavilerinin zor olduğu Gram negatif organizmalara karşı böylesine bir antimikrobiyal etkinin görülmesi önem arz etmektedir. Bu bulgu, *Streptomyces*'lerin besiyeri bileşiminin sekonder metabolit üretme potansiyelini etkilediğini göstermekle beraber (Romano vd., 2018) farklı dönemlerde ve koşullarda üretim yapıldığında sekonder metabolit profilinin değişiklik gösterebildiğini ifade etmektedir. Örneğin M2 besiyeri musluk suyunda hazırlanmaktadır. Musluk suyundaki mineral içeriğinin değişmesi, M2 içeriğinde bulunan besiyeri bileşenlerinin farklı marka olması, üreme periyodlarındaki farklılık ve organik ekstraksiyon yönteminin farklı olması gibi parametreler etkili olmuş olabilir. Ayrıca, BA2 izolatının *E. faecalis*'e olan inhibisyon etkisi de ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

S. alboniger BA2'nin IAA varlığında üretildiğinde antimikrobiyal aktivitesinde pozitif bir değişim olmadığı gözlemlendi. Ayrıca, IAA'nın artan konsantrasyonlarında antimikrobiyal aktivitenin düşmesi, BA2'nin üremesinin azalmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Zira artan IAA konsantrasyonlarında bakteri kuru ağırlığında kayda değer bir düşüş meydana gelmiştir (bu veri tez bulgularında yer almamaktadır). Daha önce endofit aktinobakterilerin *E.coli* ve *B.subtilis* üzerine antimikrobiyal cevabına bitki hormonlarının bir etkisi olup olmadığını araştıran bir çalışmada, IAA varlığında üretilen izolatların antimikrobiyal aktivitesinde artış görülmüştür (Van der Meij vd., 2018). Bu projenin sonuçlarında IAA varlığında antimikrobiyal etkide bir artış gözlenmemiş olsa da, metabolomik çalışmaların sonuçlarında IAA varlığında yeni birçok metabolitin yapıldığı görülmüştür. Sekonder metabolitler farklı biyolojik aktivitelere sahip bileşiklerdir. Örneğin sadece IAA bulunan kültürlerden elde edilen norlichexanthone benzeri bileşik antikanser etkili ve funguslardan keşfedilmiş bir doğal metabolittir (Soares vd., 2022). Ksanton bileşikleri böcek ilacı olarak kullanılmakta ve güve yumurtaları için ovisit ve larvisit olarak kullanım alanı bulmaktadır. Bu bileşik bakteriler tarafından da üretilmekte olup, *Streptomyces* cinsi üyeleri daha fazla biyoaktif ksanton sağlayan kaynak olagelmıştır.

JA varlığında üretilen *S. alboniger* BA2'nin antimikrobiyal aktivitesinde kontrole kıyasla önemli bir fark meydana gelmemiştir. Ancak metabolomik analizlerde, kontrol kültürde ve IAA varlığında üretilmeyen bileşiklere (canarione, fualosine, 3-hydroxyoctanoic acid ve quinoxaline-2-carboxylic acid) rastlanmıştır. Bunlardan canarione bileşiği fungal kökenli olup naphthoquinone yapıda bir poliketid bileşiktir (Toma vd., 2023). Bu bileşikler tekstil endüstrisinde önemli bir yere sahip olup mikroorganizma kültürlerinden sarı, turuncu, kırmızı veya mor kristaller halinde geri kazanılarak organik çözücülerde çözünürler ve kumaşlar için boya olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar. *Streptomyces* türleri değişik yelpazede naphthoquinone bileşiklerini sentezleme kabiliyetine sahiptir. *S. alboniger* BA2'nin genomunda naphthoquinone bileşiği sentezleyen bir gen kümesi bulunmuş olup, gen kümesi ve ürünü olan bileşik ile eşleştirme çalışmalarımız devam etmektedir. Sadece JA varlığında tespit edilen bir diğer bileşik bir nükleozid analogu olan fualozin (3-[3-[3,4-dihydroxy-5-(6-oxo-3H-purin-9-yl)oxolan-2-yl]propanoyl]benzoic acid)'dir. *Streptomyces* sp. MK359-NF1'in fermentasyon kültüründen daha önce izole edilmiştir (Hosokawa vd., 1999). Bu bileşik, BA2 izolatında ilk defa tespit edilmiştir. %0.02 JA konsantrasyonundaki kültür ekstraktlarında bulunan yoğun turuncu-kırmızı renk, bu kültürlerde fazlaca bulunan fualozinden kaynaklanabilir. Zira bir hipoksantin kromofor grubu içeren bu bileşik konsantrasyonuna göre sarıdan kırmızıya kadar bir renk vermektedir. 3-hydroxyoctanoic acid antimikrobiyal aktiviteye sahip beta-hidroksi bir yağ asididir (Radivojevic vd., 2016). Çok sayıda bakteri türü tarafından karbon ve enerji rezervi olarak kullanılan bir biyopolimer olan poli(3-hidroksioktanoik asit)'in tekrarlayan birimidir. Bir 3-hidroksi monokarboksilik asit, bir 3-hidroksi yağ asidi ve bir orta zincirli yağ asididir. İşlevsel olarak bir oktanoik asit ile ilişkilidir. Daha önce *Streptomyces* türleri tarafından üretildiği rapor edilmiş bir doğal üründür (Klingbeil vd., 1996). Kinoksalin halkası içeren doğal ürünler nadirdir. Ancak Quinoxaline-2-carboxylic acid'in 1,4-dioksiti *Streptomyces ambrofaciens* kültürlerinden izole edilmiştir ve bu bileşiğin ve türetilmiş esterlerinin antibiyotik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Leyva-Ramos ve Pedraza-Alvarez, 2021). JA varlığında üretilen bu bileşikler veya bunların benzerleri BA2 izolatında ilk defa tespit edilmiştir.

Bunların yanısıra tüm kültürlerde austinoneol, phenylethylamide ve aktinomisin bileşikleri dereplike olmuştur. Bunlardan, BA2 izolatu tarafından farklı aktinomisin analogları ve bunları sentezleyen gen kümesi daha önceki çalışmalarımızda ortaya konmuştu (Kum ve İnce, 2021). Austinoneol bileşiğine bu çalışmada rastlanmakla beraber bu bileşik fungal kökenli bir meroterpenoidtir (Murray vd., 2020). *Streptomyces* türleri de fazla sayıda meroterpenoid bileşiği sentezleme kabiliyetine sahiptir. BA2 izolatının genomunda (<https://antismash.secondarymetabolites.org/upload/bacteria-30342d68-4d1b-4931-b295-93b5e584e8c8/index.html#>) bir meroterpen gen kümesi bulunmaktadır. Dereplike olan ve fungal kökenli austinoneol bileşiği ile yüksek benzerlik gösteren bileşik ve ilgili gen kümesi ile eşlendirme çalışmalarımız devam etmektedir. Bunun yanısıra kültürlerde tespit edilen phenylethylamide bileşiği de mikrobiyal kaynaklı olup insektisidal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Mollah vd., 2020).

Bu projede sıvı kültür rejiminin yanı sıra antimikrobiyal aktivite tespiti için katı kültür rejimi de benimsendi. Katı kültürde bitki hormonları varlığında gerçek zamanlı olarak biraraya getirilen BA2 izolatu ve test organizmaları, sıvı ortamdan daha farklı cevaplar verdiler. Antibakteriyel cevap açısından incelediğimizde; Gram pozitif test oraganizmalarına karşı etkinin arttığını Gram negatiflere karşı etkinin ise düştüğü gözlemlendi. Mikroorganizmaların üreme faaliyetlerinin daha doğal olarak taklit edildiği katı ortam ve canlı hücrelerin karşı karşıya gelmesi bu artışın bir sebebi olabilir. Gram negatif bakterilere karşı sıvı rejimde üretilen bileşiklerin stabilitesinin düşük olması veya katı rejimde üreme sıcaklığında bir buharlaşma meydana gelmesi de Gram negatiflere olan etkinin düşüşünü açıklayabilir. Zira sıvı kültür rejiminde bileşikler organik çözücüde muhafaza edilmektedir. *S. alboniger* BA2'nin katı kültürde özellikle *E.coli* ve *K.pneumoniae* bakterilerine karşı vermiş olduğu zon çaplarından kesi yapılarak, agardan direk bileşik izolasyonu bu çalışmada denenmiş ve başarı elde edilmiştir. *E.coli* ve *K.pneumoniae* bakterilerine karşı geliştirilmiş zonlardan yapılan izolasyonlarda, GNPS veri tabanında bulunan ve B27A19 olarak isimlendirilen bileşik tespit edilmiştir. Bileşiğe ait spektrumlar dışında herhangi bir yapı bilgisine rastlanmamıştır. Bu bileşik antimikrobiyal etkili yeni bir bileşik olma potansiyeli taşımaktadır. Bileşiğin saflaştırılma ve yapı tayininin yapılması gereklidir. Bunun dışında JA içeren katı kültürde sadece *E.coli*'ye karşı geliştirilen bir zondan

yapılan ekstraksiyon ve sonrasındaki metabolomik çalışmalar sonucunda taxifolin bileşiği elde edilmiştir. Taksifolin, daha önce mangrov kaynaklı *Streptomyces sampsonii* PM33'ten izole edilmiş ve çevre dostu antifouling preparatının geliştirilmesi için umut verici bir adaydır (Gopikrishnan vd., 2019). Guo ve ekibi, *Penicillium* sp. F23-2 mantarını kullanarak gerçekleştirdiği OSMAC tabanlı deneylerde, karmaşık sıvı ortamdan katı bir ortama geçişin, mantarın ürettiği sekonder metabolitlerde önemli bir değişikliğe neden olduğu tespit etmişlerdir. Katı ortamın kullanılması, bu mantar suşunun *S. aureus*'a karşı etkili olan beş yeni bileşiğin (penisiklonlar A-E) elde edilmesine olanak sağlamıştır (Guo vd., 2015). Ayrıca ortak kültür monokültürlerle karşılaştırıldığında yeni ya da daha yüksek miktarlarda doğal bileşiklerin üretilmesine ve sekonder metabolit profillerinde değişikliklere sebep olmuştur (Dashti, 2014; Trischman, 2004).

GNPS ağ analizlerine göre hem kümelerin olduğu hem de biribiri ile benzerlik göstermeyen tanımlanmamış node'ların çok sayıda olduğu tespit edilmiştir. Bu node'larda yer alan spektrumların çoğunun diğer kütüphanelerdeki mevcut bileşiklerle herhangi bir benzerliği tespit edilememiştir. Bu sonuç BA2 izolatının yeni metabolitleri üretme yeteneğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Projemizin bulguları, yenilikçi kültür yaklaşımlarından biri olan kültür ortamına kimyasal eklemenin farklı metabolitlerin sentezine yol açtığını göstermiştir. Bu durum belirli bir kültür ortamında ortaya çıkan metabolitlerin o ortamın, sessiz kalmış BGC'lerini aktive ettiğini düşündürmektedir. Özellikle bitki hormonlarının, mikroorganizmaların metabolik yollarını etkileyerek sekonder metabolit üretiminde değişikliklere yol açabileceği görülmektedir. IAA ve JA gibi bitki hormonlarının varlığı, *Streptomyces alboniger* BA2 gibi izolatların biyoaktif bileşik sentezini artırabilir veya düzenleyebilir; bu da doğal ürünlerin keşfi için yeni bir perspektif sunmaktadır. Gelecek çalışmalar, bu yeni keşfedilen bileşiklerin yapısal karakterizasyonunu tamamlamayı ve biyolojik aktivitelerini daha kapsamlı bir şekilde değerlendirmeyi hedeflemektedir. Ayrıca, diğer sekonder metabolit üretim yöntemlerinin, genetik manipülasyonların ve farklı çevresel koşulların etkisinin araştırılması, *Streptomyces* türlerinin biyoteknolojik potansiyelini daha iyi anlamamıza olanak sağlayacaktır. Bu kapsamda, antimikrobiyal dirençle mücadele ve yeni terapötik ajanların keşfi için alternatif yollar sunulabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

1. Katı kültür ortamında, *Streptomyces* BA2'nin Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesinde sıvı kültüre kıyasla artış gözlemlendi.
2. *S. alboniger* BA2'nin IAA ve JA gibi bitki hormonlarının kullanılması yeni metabolitlerin sentezini tetikledi.
3. Metabolomik analizlerde, GNPS veritabanında yer almayan, potansiyel olarak yeni biyoaktif bileşikler tespit edildi.
4. IAA varlığında yeni birçok metabolitin yapıldığı görüldü.
5. Sadece JA varlığında yeni olmaya aday biyoaktif bileşikler (canarione, fualosine, 3-hidroxyoktanoik asit, quinoxaline-2-karboxilik asit) tespit edildi.
6. Austinoneol-benzeri ve phenylethylamide gibi biyoaktif bileşikler, tüm kültürlerde tespit edildi.
7. JA içeren katı kültürde sadece *E.coli*'ye karşı geliştirilen bir zondan taxifolin bileşiği tespit edildi.
8. *S. alboniger* BA2'nin katı kültüründe özellikle *E.coli* ve *K.pneumoniae* bakterilerine karşı antibakteriyel etki görüldü.
9. JA içeren katı kültür ekstraksiyonundan GNPS veri tabanında bulunan ve B27A19 olarak isimlendirilen ve hakkında kısıtlı veri bulunan bir bileşik tespit edildi.
10. BA2 izolatının *E.faecalis*'e olan inhibisyon etkisi de ilk defa bu çalışma ile ortaya konuldu.

5.2 Öneriler

- 1- Farklı bitki hormonları ve kimyasal eklemelerin *Streptomyces* gibi mikroorganizmaların sekonder metabolit üretimini artırdığı göz önüne alındığında, daha fazla yenilikçi kültür yöntemleri geliştirilmelidir. Diğer kimyasal uyarıcıların ve bitki hormonlarının kullanılması yeni biyoaktif bileşiklerin keşfine katkı sağlayabilir.
- 2- Keşfedilen yeni metabolitlerin saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonunun yapılması, bu bileşiklerin biyoteknolojik potansiyelinin daha iyi anlaşılması

için gereklidir. Özellikle GNPS analizlerinde tespit edilen B27A19 gibi potansiyel yeni bileşiklerin saflaştırılması ve yapı tayini yapılmalıdır.

- 3- BA2'nin antimikrobiyal aktivitesi, daha geniş bir patojen yelpazesi üzerinde test edilmelidir. Ayrıca, diğerk bakteri ve mantar patojenlerine karşı etkinliğı değerlendirilmeli ve ilaç geliştirme çalışmaları için kullanılabilecek potansiyel ajanlar belirlenmelidir.
- 4- Ortak kültürlerin sekonder metabolit üretiminde önemli değişiklikler sağladığı göz önüne alındığında, BA2 izolatı farklı mikroorganizmalarla ortak kültürde üretim denemelerine tabi tutulabilir. Bu yaklaşım, yeni biyoaktif bileşiklerin keşfini hızlandırabilir.
- 5- Bu çalışmada elde edilen bulgular, antibiyotik direncine karşı mücadelede alternatif tedavi yolları arayışında önemli bir adım olabilir. Yeni antibiyotik ve antimikrobiyal ajanlar geliştirmek için doğal kaynaklı biyoaktif bileşiklerin üretim ve izolasyonuna yönelik daha fazla çalışma yapılmalıdır

KAYNAKLAR

- Abdelkader, M. S. A., Philippon, T., Asenjo, J. A., et al. (2018). Asenjonamides A–C, antibacterial metabolites isolated from *Streptomyces asenjonii* strain KNN 42.f from an extreme-hyper arid Atacama desert soil. *Journal of Antibiotics*, 71(4), 425-431.
- Akbaş, E. (2007). *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2007, 64 (2) : 1-8
- Akhter, N., Liu, Y., Auckloo, B. N., Shi, Y., Wang, K., Chen, J., ... and Wu, B. (2018). Stress-driven discovery of new angucycline-type antibiotics from a marine *Streptomyces pratensis* NA-ZhouS1. *Marine Drugs*, 16(9), 331.
- Akintunde, OG (2014). *Streptomyces* sp. Tarafından Antibiyotik Benzeri Aktivitenin Üretilmesi. Farklı Büyüme Koşulları Altında COUK1. Doktora tez. Johnson City, TN: Doğu Tennessee Eyalet Üniversitesi Choi, S.S., Kim, H.J., Lee, H.S., Kim, P., Kim, E.S. 2015. Genome mining of rare actinomycetes and cryptic pathway awakening. *Process Biochemistry*, 50:1184–1193.
- Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y.-M., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., and Li, A. (2022). *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13, 968053. doi:10.3389/fmicb.2022.968053.
- Allard, P. M., Péresse, T., Bisson, J., et al. (2016). Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry*, 88(6), 3317-3323.
- Ashraf, N., Bechthold, A., Anwar, M. A., Ghauri, M. A., Anjum, M. S., Khan, A. N., ... & Khaliq, S. (2021). Production of a broad spectrum streptothricin like antibiotic from halotolerant *Streptomyces fimbriatus* isolate G1 associated with marine sediments. *Folia Microbiologica*, 66(4), 639-649.
- Bakır, Ö., (2020). Sekonder Metabolitler ve Roller. *IJAAES International Journal of Anatolia Agricultural Engineering*, 2(4):39-45.
- Başkaya, Y., (2015). Bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde etkili olan antimikrobiyal maddeler üretebilen mikroorganizmaların topraktan izolasyonu. (Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi).
- Benson, D. R., and Silvester, W. B. (1993). Biology of Frankia strain, actinomycetes symbionts of actinorrhizal plants. *Microbiological Reviews*, 57(3), 293–319.
- Bentley, S. D., et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomyces *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141-147.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1-26. doi:10.1038/ja.2005.1.
- Bhattarai, B. R., Khadayat, K., Aryal, N., Aryal, B., Lamichhane, U., Bhattarai, K., Rana, N., Regmi, B. P., Adhikari, A., Thapa, S., and Parajuli, N. (2022). Untargeted metabolomics of *Streptomyces* species isolated from soils of Nepal. *Processes*, 10(6), 1173. doi: 10.3390/pr10061173.
- Bhave, S. V., Shanbhag, P. V., Sonawane, S. K., Parab, R. R., and Mahajan, G. B. (2013). Isolation and characterization of halotolerant *Streptomyces radiopugnans* from Antarctica soil. *Letters in Applied Microbiology*, 56(5), 348-355.

- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*, 3 (7), 619–627.
- Bosello, M., Robbel, L., Linne, U., Xie, X., and Marahiel, M. A. (2011). Biosynthesis of the siderophore rhodochelin requires the coordinated expression of three independent gene clusters in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of the American Chemical Society*, 133(12), 4587–4595.
- CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States.
- Chakraborty, B., Suresh Kumar, R., Almansour, A., Perumal, K., Nayaka, S., Brindhadevi, K., (2022). *Streptomyces* *flamentosus* strain KS17 isolated from microbiologically unexplored marine ecosystems exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity against human pathogens. *Process Biochemistry*, 117 (2022) 42–52. doi:10.1016/j.procbio.2022.03.010
- Charlop-Powers, Z., Owen, J. G., Reddy, B. V. B., Ternei, M. A., and Brady, S. F. (2014). Chemical-biogeographic survey of secondary metabolism in soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10), 3757–3762. doi:10.1073/pnas.1318021111
- Charousová, I., Medo, J., Hleba, L., Císarová, M., Javoreková, S., (2019). Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55:e17249.
- Chen, G., Wang, G.-Y.-S., Li, X., Waters, B., and Davies, J. (2000). Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *Journal of Antibiotics*, 53, 1145–1153. doi:10.7164/antibiotics.53.1145.
- Choi, S.S., Kim, H.J., Lee, H.S., Kim, P., Kim, E.S. 2015. Genome mining of rare actinomycetes and cryptic pathway awakening. *Process Biochemistry*, 50:1184–1193.
- Dai, X., and Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. *Frontiers in Medicine*, 9, 911861. doi:10.3389/fmed.2022.911861.
- Dalisay, D. S., Williams, D. E., Wang, X. L., Centko, R., Chen, J., and Andersen, R. J. (2013). Marine Sediment-Derived *Streptomyces* Bacteria from British Columbia, Canada Are a Promising Microbiota Resource for the Discovery of Antimicrobial Natural Products. *PLoS ONE*, 8(10), e77078. doi:10.1371/journal.pone.0077078.
- Das, V., Chatterjee, N. S., Pushpakaran, P. U., Lalitha, K. V., and Joseph, T. C. (2023). Exploration of Natural Product Repository by Combined Genomics and Metabolomics Profiling of Mangrove-Derived *Streptomyces murinus* THV12 Strain. *Fermentation*, 9(6), 576. doi:10.3390/fermentation9060576.
- Dashti, Y., Grkovic, T., Abdelmohsen, U., Hentschel, U., and Quinn, R. (2014). Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiosis* sp. RV163. *Marine Drugs*, 12(6), 3046–3059.
- Demain, A. L. (2009). Antibiotics: Natural products essential to human health. *Medicinal Research Reviews*, 29(6), 821–842. doi:10.1002/med.20154.

- Dharmaraj, S. (2010). Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 2123–2139.
- Ding, L., Maier, A., Fiebig, H.H., Lin, W.H., Peschel, G., Hertweck, C., (2012). Kandenols A–E, eudesmenes from an endophytic Streptomyces sp. of the mangrove tree *Kandelia candel*. *Journal of Natural Products*, 75:2223–2227p. doi: 10.1021/np300387n.
- Dos Santos Dias, A. C., Couzinet-Mossion, A., Ruiz, N., Bellec, M. L., Gentil, E., Wielgosz-Collin, G., and Bertrand, S. (2017). Sugar induced modification in glycolipid production in *Acremonium* sp. revealed by LC-MS lipidomic approach. *Current Biotechnology*, 6.
- Doull, J. L., Singh, A. K., Hoare, M., and Ayer, S. W. (1994). Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: Effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *Journal of Industrial Microbiology*, 13, 120–125. doi:10.1007/BF01569901.
- Doumbou, C. L., Akimov, V., and Beaulieu, C. (1998). Selection and characterization of microorganisms utilizing Thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4313–4316.
- Dufossé, L. (2017). Current carotenoid production using microorganisms. In *Bio-Pigmentation Biotechnological Implementations* (pp. 87–106). Wiley.
- Duncan, K.R., Crüsemann, M., Lechner, A., Sarkar, A., Li, J., Ziemert, N., Wang, M., Bandeira, N., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Jensen, P.R. (2015). Molecular Networking and Pattern-Based Genome Mining Improves Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and their Products from *Salinispora* Species. *Chemistry & Biology*, 22:460–471.
- El-Demerdash, A., Kumla, D., and Kijjoa, A. (2020). Chemical diversity and biological activities of meroterpenoids from marine derived-fungi: A comprehensive update. *Marine Drugs*, 18(6), 317. doi:10.3390/md18060317.
- El Karkouri, A., and Assou, S., El Hassouni, M., (2019). Isolation and screening of actinomycetes producing antimicrobial substances from an extreme Moroccan biotope. *Pan African Medical Journal*, 33:329. doi:10.11604/pamj.2019.33.329.19018.
- Elsayed, S. S., Trusch, F., Deng, H., Raab, A., Prokes, I., Busarakam, K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., van West, P., Bull, A. T., Goodfellow, M., Yi, Y., Ebel, R., and Jaspars, M. (2015). Chaxapeptin, a lasso peptide from extremotolerant *Streptomyces leeuwenhoekii* strain C58 from the hyperarid Atacama Desert. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(20), 10252–10260.
- English, A. L., Boufridi, A., Quinn, R. J., and Kurtböke, D. I. (2017). Evaluation of fermentation conditions triggering increased antibacterial activity from a near-shore marine intertidal environment-associated *Streptomyces* species. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 28–38.
- Eraksoy, H., (2011). Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Enfeksiyon Hastalıkları Özel Dergisi*, 4 (1): 1–14.

- Ersal, M. (2019). Use of Cross-Streak Method to Determine Antimicrobial Activity . *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7 (sp1), 160-162. doi:10.24925/turjaf.v7isp1.160-162.2792.
- Escribano, J.P.G., Bibb, M.J., (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41:425–431.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1-2), 155-171.
- Fleming, A., (2011, Şubat). Yaşam Karşıtları-Antibiyotikler. *Bilim ve Teknik*, (Şubat 2011).
- Goel, N., Singh, R., Sood, S., and Khare, S. K. (2022). Investigation of *Streptomyces* sp. Strain EMB24 Secondary Metabolite Profile Has Unraveled Its Extraordinary Antibacterial Potency Against Drug-Resistant Bacteria. *Marine Biotechnology*, 24(6), 1168-1175. doi:10.1007/s10126-022-10168-2.
- Gomez-Escribano, J. P., and Bibb, M. J. (2014). Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: From genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 425-431. doi:10.1007/s10295-013-1348-5.
- Goodfellow, M., Busarakam, K., Idris, H., et al. (2017). *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama desert soils and emended description of *Streptomyces viridosporus* Pridham et al. 1958. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(9), 1133-1148.
- Gopikrishnan, V., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Ramakodi, M. P., and Balagurunathan, R. (2019). Isolation, characterization, and identification of antibiofouling metabolite from mangrove-derived *Streptomyces sampsonii* PM33. *Scientific Reports*, 9, 12975. doi:10.1038/s41598-019-49478-2.
- Green, D. M. (1977). Paediatric oncology update/Wilms' tumour. *European Journal of Cancer*, 33(3), 409-418.
- Guo, W., Zhang, Z., Zhu, T., Gu, Q., and Li, D. (2015). Penicyclones A–E, Antibacterial Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Journal of Natural Products*, 78, 2699-2703.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., and Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111-129. doi:10.1038/nrd4510.
- Hernández, I. L. C., Macedo, M. L., Berlinck, R. G. S., Ferreira, A. G., and Godinho, M. J. L. (2004). Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 441–444.
- Hinsinger, P. and Marschner, P. (2006). Rhizosphere perspectives and challenges a tribute to Lorenz Hiltner. *Plant Soil* 283.
- Hopwood, DA. (2006). Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet.*, 40: 1–23.

- Hosokawa, N., Naganawo, H., Kasahara, T., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Yaamamoto, S., Tsuchiya, K.S., and Hori, M. (1999). Futolosine and its derivatives new nucleoside analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(7), 1032-1034.
- Hou, Y.-H., Qin, S., Li, Y.-X., Li, F.-C., Xia, H.-Z., and Zhao, F.-Q. (2006). Heterologous expression and purification of recombinant allophycocyanin in marine *Streptomyces* sp. isolate M097. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 22, 525–529.
- Imhoff, J.F., Labes, A., Wiese, J., (2011). Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products, *Biotechnology Advances*, 29: 468–482p.doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.001.
- Jones, D., and Hinsinger, P. (2008). The rhizosphere: Complex by design. *Plant and Soil*, 312, 1-16.
- Jakubiec-Krzesniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J., and Solecka, J. (2018). Secondary metabolites of Actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 259–272. doi:10.21307/pjm-2018-048.
- Katz, E., Williams, W. K., Mason, K. T., and Mauger, A. B. (1977). Novel actinomycins formed by biosynthetic incorporation of cis- and trans-4-methylproline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(6), 1056-1064.
- Kharat, K. R., Kharat, A., and Hardikar, B. P. (2009). Antimicrobial and cytotoxic activity of *Streptomyces* sp. From Lonar Lake . *African Journal of Biotechnology*, 8 (23), 6645-6648.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, UK: John Innes Foundation
- Hopwood, D.A. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology Uk*, 145 (9): 2183–2202.
- Kim, E., Du, Y. E., Ban, Y. H., Shin, Y. H., Oh, D. C., and Yoon, Y. J. (2021). Enhanced ohmyungsamycin a production via adenylation domain engineering and optimization of culture conditions. *Frontiers in Microbiology*, 12, 626881.
- Khosravi Babadi, Z., Ebrahimipour, G., Wink, J., Narmani, A., and Risdian, C. (2021). Isolation and identification of *Streptomyces* sp. Act4Zk, a good producer of Staurosporine and some derivatives. *Letters in Applied Microbiology*, 72 (2), 206-218. doi:10.1111/lam.13415.
- Klingbeil, B., Kroppenstedt, R. M., and Jendrossek, D. (1996). Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase gene. *FEMS microbiology letters*, 142(2-3), 215-221.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., and Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 457. doi:10.3390/nu12020457.
- Kum, E. (2019). Karasal aktinomisetlerde yeni ilaç adaylarının kimyasal ve genomik olarak taranması (Doktora tezi, Dicle Üniversitesi). Dicle Üniversitesi açık erişim sistemi. <https://acikerisim.dicle.edu.tr/xmlui/handle/11468/4237>

- Kum, E., and İnce, E. (2021). Genome-guided investigation of secondary metabolites produced by a potential new strain *Streptomyces* BA2 isolated from an endemic plant rhizosphere in Turkey. *Archives of Microbiology*, 203 (5), 2431-2438. Doi:10.1007/s00203-021-02210-z.
- Kum, E., and İnce, E. (2024). Metabolomics approach to explore bioactive natural products derived from plant-root-associated *Streptomyces*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-14
- Kurosawa, K. B., VanEssendelft, J. L., Willis, L. B., Lessard, P. A., Ghiviriga, I., Sambandan, T. G., Rha, C. K., and Sinskey, A. J. (2006). Characterization of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X2-producer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1), 145-154.
- Lauritano, C., Andersen, J. H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K. Ø., Romano, G., and Ianora, A. (2016). Bioactivity Screening of Microalgae for Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anticancer, Anti-Diabetes, and Antibacterial Activities. *Frontiers in Marine Science*, 3.
- Le Pogam, P., and Boustie, J. (2016). Xanthonones of lichen source: A 2016 update. *Molecules*, 21(3), 294. doi:10.3390/molecules21030294.
- Leyva-Ramos, S., and Pedraza-Alvarez, A. (2021). Quinoxaline 1,4-di-N-oxides: A review of the importance of their structure in the development of drugs against infectious diseases and cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 30(10), 1175–1184. doi:10.2174/1568026629999200518102331.
- Long, Y., Zhang, Y., Huang, F., Liu, S., Zang, G., and Y.(2022). Diversity and antimicrobial activities of culturable actinomycetes from *Odontotermes formosanus* (Blattaria: Termitidae). *BMC Microbiology*, 22:80. doi:10.1186/s12866-022-02501-5.
- Maliehe, T. S., Mbambo, M., Ngidi, L. S., Shandu, J. S. E., Pooe, O. J., Masoko, P., and Selepe, T. N. (2022). Bioprospecting of endophytic actinobacterium associated with *Aloe ferox* mill for antibacterial activity. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22 (1), 258. doi:10.1186/s12906-022-03733-8.
- Matsumoto, A., and Takahashi, Y. (2017). Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 514-519.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.
- Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., and Zandi, K. (2015). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2015. doi:10.1155/2014/186864.
- Mohimani, H., Gurevich, A., Mikheenko, A., et al. (2014). Dereplication of peptidic natural products through database search of mass spectra. *Nature Chemical Biology*, 10(4), 259-265.
- Mollah, M. M. I., Yeasmin, F., and Kim, Y. (2020). Benzylideneacetone and other phenylethylamide bacterial metabolites induce apoptosis to kill insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2), 449-455. doi:10.1016/j.aspen.2020.03.008.

- Murray, L. A. M., McKinnie, S. M. K., Moore, B. S., and George, J. H. (2020). Meroterpenoid natural products from *Streptomyces* bacteria: The evolution of chemoenzymatic syntheses. *Natural Product Reports*. doi:10.1039/d0np00018c.
- Nematollahi, A., Aminimoghadamfarouj, N., and Wiart, C. (2012). Reviews on 1, 4-naphthoquinones from *Diospyros* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(1), 80–88. doi:10.1080/10286020.2012.678756.
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- Nguyen, D. D., Wu, C. H., Moree, W. J., and Dorrestein, P. C., (2013). MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), E2611-E2620. doi:10.1073/pnas.1303471110.
- Nguyen, T., and Kim, J.,(2015). Antifungal and antibacterial activities of *Streptomyces polymachus* sp. nov. Isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2015), 65, 2385–2390. doi: 10.1099/ijs.0.000268.
- Nivetha, C., Deepika, T., Arjunan, A., Sivalingam, P., Revathi. N. and Muthuselvam, M., (2021). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Streptomyces* sps Isolated from Muthupettai Mangrove Soil. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 33(50B): 210-234.
- Nothias, L. F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., ... and Dorrestein, P. C. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature methods*, 17(9), 905-908.
- Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Abanto, M., Maruyama, F., Jorquera, M. A., Santos, A., Martínez-Urtaza, J., and Barrientos, L. (2019). Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials discovery. *Scientific Reports*, 9 (1), 7488. doi:10.1038/s41598-019-43960-7.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., and Horinouchi, S., (2008). Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of bacteriology*. p. 4050–4060. doi:10.1128/JB.00204-08.
- Oskay, M., ve Tamer, A., (2009). *Streptomyces* kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını. *Ecological life sciences*, 5A0008,4(2).
- Özakın, S.(2010). Lokal streptomyces izolatlarının biyoaktif sekonder metabolitlerinin kimyasal olarak taranması.(Yüksek Lisans tezi, Dicle Üniversitesi).
- Özakın, S. (2015). Farklı habitatlardan izole edilen aktinomiset genomlarında yeni ilaç adaylarının taranması (Doktora tezi, Dicle Üniversitesi).
- Özakin, S., Davis, R. W., Umile, T. P., Pirinccioglu, N., Kizil, M., Celik, G., Sen, A., Minbiole, K. P. C., and İnce, E. (2016). The isolation of tetrangomycin from terrestrial *Streptomyces* sp. CAH29: Evaluation of antioxidant, anticancer, and anti-MRSA activity. *Medicinal Chemistry Research*, 25(12), 2872-2881.

- Özcan, K. (2017). Trabzon (Karadeniz) Deniz Sedimentlerinden Elde Edilen Denizel Aktinomisetlerin Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin Taranması. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5(5), 502. doi:10.24925/turjaf.v5i5.502-506.1068.
- Özcan, M. (2018). Aktinomiset genomlarında yeni glikopeptid bileşiklerin genetik olarak taranması. (Yüksek Lisans tezi, Dicle Üniversitesi).
- Palazzotto, E., and Weber, T., (2018). Omics and multi-omics approaches to study the biosynthesis of secondary metabolites in microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 45:109–116.
- Palma Esposito, F., Giugliano, R., Della Sala, G., Vitale, G. A., Buonocore, C., Ausuri, J., Galasso, C., Coppola, D., Franci, G., Galdiero, M., and De Pascale, D., (2021). Combining OSMAC Approach and Untargeted Metabolomics for the Identification of New Glycolipids with Potent Antiviral Activity Produced by a Marine Rhodococcus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9055. doi:10.3390/ijms22169055.
- Pathom-Aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T., and Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 10(3), 181-189.
- Patti, G. J., Yanes, O., and Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263-269.
- Pierret, A., Doussan, C., Capowiez, Y., Bastardie, F., and Pagès, L. (2007). Root functional architecture: A framework for modeling the interplay between roots and soil. *Vadose Zone Journal*, 6, 269-281.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J. H., Xu, L. H., and Li, W. J. (2011). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 457-473.
- Quinn, R. A., Nothias, L. F., Vining, O., Meehan, M., Esquenazi, E., and Dorrestein, P. C. (2017). Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(2), 143-154. doi:10.1016/j.tips.2016.11.011.
- Ren, H., Wang, B., Zhao, H., (2017). Breaking the silence: new strategies for discovering novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 48:21–27.
- Radivojevic, J., Skaro, S., Senerovic, L., Vasiljevic, B., Guzik, M., Kenny, S. T., Maslak, V., Nikodinovic-Runic, J., and O'Connor, K. E. (2016). Polyhydroxyalkanoate-based 3-hydroxyoctanoic acid and its derivatives as a platform of bioactive compounds. *Biotechnological products and process engineering*, 100, 161–172. doi:10.1007/s00253-015-7015-7.
- Romano, S., Jackson, S.A., Patry, S., Dobson ADW (2018). Extending the ‘one strain many compounds’ (OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*, 16 (7), 1-29. doi:10.3390/md16070244.
- Rutledge, P. J., and Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13 (8), 509-523.

- Saadouli, I., Zendah El Euch, I., Trabelsi, E., Mosbah, A., Redissi, A., Ferjani, R., Fhoula, I., Cherif, A., Sabatier, J.-M., Sewald, N., and Ouzari, H.-I. (2020). Isolation, Characterization and Chemical Synthesis of Large Spectrum Antimicrobial Cyclic Dipeptide (l-leu-l-pro) from *Streptomyces misionensis* V16R3Y1 Bacteria Extracts. *A Novel 1H NMR Metabolomic Approach. Antibiotics*, 9(5), 270. doi:10.3390/antibiotics9050270.
- Saleem, M., Hassan, A., Li, F., Lu, Q., Ponomareva, L. V., Parkin, S., and Sajid, I. (2023). Bioprospecting of desert actinobacteria with special emphases on griseoviridin, mitomycin C and a new bacterial metabolite producing *Streptomyces* sp. PU-KB10–4. *BMC microbiology*, 23(1), 69.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., and Prabakar, K. (2019). Extreme environment *Streptomyces*: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads?. *International Journal of Microbiology*, 2019. doi:10.1155/2019/5283948.
- Skropeta, D., and Wei, L. (2014). Recent advances in deep-sea natural products. *Natural Product Reports*.31(8), 999-1025.
- Soares, J. X., Loureiro, D. R. P., Dias, A. L., Reis, S., Pinto, M. M. M., and Afonso, C. M. M. A. (2022). Bioactive marine xanthenes: A review. *Marine Drugs*, 20(1), 58. doi:10.3390/md20010058.
- Sobolevskaya, M. P., Denisenko, V. A., Moiseenko, A. S., Shevchenko, L. S., Menzorova, N. I., Sibirtsev, Y. T., ... and Kuznetsova, T. A. (2007). Bioactive metabolites of the marine actinobacterium *Streptomyces* sp. KMM 7210. *Russian Chemical Bulletin*, 56, 838-840.
- Stone, J. K., Bacon, C. W., and White, J. F., Jr. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. In C. W. Bacon and J. F. White Jr. (Eds.), *Microbial endophytes* (1st ed., pp. 3–29). Marcel Dekker.
- Strobel, G. A., and Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502.
- Tangerina, M. M. P., Furtado, L. C., Leite, V. M. B., Bauermeister, A., Velasco-Alzate, K., Jimenez, P. C., Garrido, L. M., Padilla, G., Lopes, N. P., Costa-Lotufo, L. V., and Pena Ferreira, M. J. (2020). Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. *PLOS ONE*, 15(12), e0244385. doi:10.1371/journal.pone.0244385.
- Tistechok, S., Roman, I., Fedorenko, V., Luzhetskyy, A., and Gromyko, O. (2023). Diversity and bioactive potential of Actinomycetia from the rhizosphere soil of *Juniperus excelsa*. *Folia Microbiologica*, 68(4), 645-653. doi:10.1007/s12223-023-01047-x.

- Tiwari, K., Gupta, R. K., and Singh, S. P. (2015). Enhanced production of bioactive metabolites from a mangrove associated actinomycete *Streptomyces* sp. MHM13 under submerged fermentation conditions. *Frontiers in microbiology*, 6, 682.
- Toma, M. A., Rahman, M. H., Rahman, M. S., Arif, M., Nazir, K. H. M. N. H., and Dufossé, L. (2023). Fungal pigments: Carotenoids, riboflavin, and polyketides with diverse applications. *Journal of Fungi*, 9(4), 454. doi:10.3390/jof9040454.
- Töreci, K. (2003). Antibiyotik Kullanımı ve Direnç İlişkisi. *Flora*;8(2):89-110.
- Trischman, J. A., Oeffner, R. E., de Luna, M. G., and Kazaoka, M. (2004). Competitive Induction and Enhancement of Indole and a Diketopiperazine in Marine Bacteria. *Marine Biotechnology*, 6, 215-220.
- Unagul, P., Wongsu, P., Kittakoop, P., Intamas, S., Srikitikulchai, P., and Tanticharoen, M. (2005). Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(3), 135–140. doi:10.1007/s10295-005-0151-4.
- Van Der Hooft, J. J., Mohimani, H., Bauermeister, A., Dorrestein, P. C., Duncan, K. R., and Medema, M. H. (2020). Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. *Chemical Society Reviews*, 49(11), 3297-3314.
- Van der Meij, A., Willemse, J., Schneijderberg, M. A., Geurts, R., Raaijmakers, J. M., and van Wezel, G. P. (2018). Inter-and intracellular colonization of Arabidopsis roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 679-690.
- Velho-Pereira, S., and Kamat, N. M. (2011). Antimicrobial screening of actinobacteria using a modified Cross-streak method. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(2), 223. doi:10.4103/0250-474X.91566.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T*, 40(4), 277-283.
- Verma, V. C., et al. (2009). Antibacterial and plant growth promoting activity of endophytic *Streptomyces* sp. from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 455-463.
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., and Kim, H. K. (2008). Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 159-168.
- Viegelmann, C., Margassery, L., Kennedy, J., Zhang, T., O'Brien, C., O'Gara, F., Morrissey, J., Dobson, A., and Edrada-Ebel, R. (2014). Metabolomic Profiling and Genomic Study of a Marine Sponge-Associated *Streptomyces* sp. *Marine Drugs*, 12(6), 3323-3351. doi:10.3390/md12063323.
- Waksman, S. A., and Henrici, A. T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 46(4), 337–341.
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., and Dorrestein, P. C. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828-837. doi:10.1038/nbt.3597.

- Warsito, M. F., Isnaeni, and Kusumawati, I. (2020). Antimicrobial activity of *Streptomyces griseoviridis* K10 against ESBL *Escherichia coli*, MRSA, and other pathogenic microorganisms. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 439(1), 012066. doi:10.1088/1755-1315/439/1/012066.
- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., ... and Dorrestein, P. C. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1743-E1752.
- WHO (2020). Global action plan on antimicrobial resistance.
- Womer, R. B. (1997). Soft tissue sarcomas. *European Journal of Cancer*, 33(12), 2230–2234.
- Xiang, W.-S., Wang, J.-D., Wang, X.-J., and Zhang, J. (2009). A novel macrolide compound from *Streptomyces bingchenggensis*: Fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 62 (4), 229-231. doi:10.1038/ja.2009.14.
- Yang, Y. H., Yang, D. S., Li, G. H., Liu, R., Huang, X. W., Zhang, K. Q., and Zhao, P. J. (2018). New secondary metabolites from an engineering mutant of endophytic *Streptomyces* sp. CS. *Fitoterapia*, 130, 17-25.
- Yang, Y., Saand, M. A., Huang, L., Abdelaal, W. B., Zhang, J., Wu, Y., Li, J., Sirohi, M. H., and Wang, F. (2021). Applications of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 563953. doi:10.3389/fpls.2021.563953.
- Ye, J., Zou, R., Zhou, D., Deng, X., Wu, N., Chen, D., and Xu, J. (2023). Insights into the phylogenetic diversity, biological activities, and biosynthetic potential of mangrove rhizosphere Actinobacteria from Hainan Island. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1157601. doi:10.3389/fmicb.2023.1157601.
- Yılmaz, E.İ., Kızıllı, M., Yavuz, M. (2008). Molecular Characterization of Rhizospheric Soil Streptomycetes Isolated from Indigenous Turkish Plants and Their Antimicrobial Activity. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 1461-1470.
- Zhou, H., Zhao, L., Li, W., Yang, Y., Xu, L., and Ding, Z..(2015). Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Active Metabolites from an Endophytic *Streptomyces* sp. YIM65484. *Records of Natural Products*, 9 (2), 196-200.
- Zhou, X., Huang, H., Chen, Y., Tan, J., Song, Y., Zou, J., Tian, X., Hua, Y., Ju, J., (2012). Marthiapeptide A ,an anti-infective and cytotoxic polythiazole cyclopeptide from a 60 L scale fermentation of the deep sea-derived *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652. *Journal of Natural Products*.75: 2251–2255p. doi: 10.1021/np300554f.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyad, Ad	MIZRAKLI, Evlin
Web sayfası (Research Gate, Academia, vs.)	-

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2010
Lisans	Tezsiz Yüksek Lisans Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Öğretmenliği Diyarbakır Ziya Gökalp Lisesi	2014 2002

İş Deneyimi

Dönem (Yıl)	Şirket, Kurum	Görev
2013-2016	Dicle Çok Programlı Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2016-2020	Şırnak/Cizre Namık Kemal Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2020-2024 (devam edilmektedir)	Diyarbakır/Bağlar Yeniköy Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

Yayınlar

1. DİCLE ÜNİVERSİTESİ 2. ULUSLARARASI LİSANSÜSTÜ ARAŞTIRMALAR SEMPOZYUMU *Streptomyces alboniger* BA2'nin Doğal Ürünlerinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri (DUFEBLAS-2024)

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Öğrencinin Adı, Soyadı	Evlin MIZRAKLI
Öğrenci No	21801001
Ana Bilim Dalı	Biyoloji
Program Türü	Proje ☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI
(Varsa) II. Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	-
Tez Başlığı	<i>Streptomyces alboniger</i> BA2'nin Yeni Doğal Ürünlerinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri
RAPOR BİLGİLERİ	
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası
Sayfa Sayısı	83
Raporlama Tarihi	25.10.2024
Benzerlik Oranı (%)	%6

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 83 sayfalık kısmına ilişkin, 25/10/2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☒Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç
☒Kaynaklar hariç
☒Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer (Açıklayınız)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Tez benzerlik oranı üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir, gereğini arz ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı: Evlin MIZRAKLI

Tarih:

İmza:

Danışman Adı, Soyadı: Prof. Dr. Ebru INCE BOSTANCI

İmza:

Tarih:

Ana Bilim Dalı Başkanı Adı, Soyadı: Prof. Dr. Mehmet BAŞHAN İmza:

Tarih: